

アルツハイマー病の早期診断と治療への応用を指向した生薬由来成分
plantainoside B のアミロイド β への結合性と神経保護作用の研究

2022 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】統合薬科学系

福田 愛菜

博士課程学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程
氏名 (英字名) : 福田愛菜 (Aina Fukuda)
学位論文題目 : アルツハイマー病の早期診断と治療への応用を指向した生薬由来成分
plantainoside B のアミロイド β への結合性と神経保護作用の研究

序章

少子高齢化が進むなか、加齢を最大の発症リスクとするアルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) の罹患率は増加の一途をたどる。しかし、現在の AD 治療は薬物療法を含めて対症療法であり、発症機序に根差したより根本的な治療法の開発が課題となっている。AD の病態形成機序に関して、アミロイド β (amyloid β ; A β) の低分子量複合体 (オリゴマー) が強い神経毒性を示し、AD 発症を招くとするオリゴマー仮説が提唱されている。また、記憶形成に関わり大脳全域に投射するアセチルコリン (acetylcholine; ACh) 作動性神経 (ACh 神経) は AD の早期から脱落しており、脳内アセチルコリンの欠乏が AD 発症の一端を担うとするコリン仮説も提唱されている。しかし、極めて高い凝集性を示す A β を用いた解析は難しく、また、研究対象としてのヒト ACh 神経の入手は困難であることから、これらの仮説に基づく AD 発症機序の詳細は未だ不明である。本研究では、凝集開始点の制御により安定したオリゴマー形成が可能な 26-*O*-acyl isoA β_{1-42} (isoA β) と、ヒト人工多能性幹 (human induced pluripotent stem; hiPS) 細胞から分化誘導した ACh 神経を用い、オリゴマー仮説やコリン仮説を考慮したヒト培養細胞系での神経障害モデルを構築し、A β オリゴマーによる神経障害について解析した。さらに、A β 凝集体に結合する低分子化合物を生薬抽出エキスから探索し、神経保護作用ならびに放射性同位元素標識体による脳内 A β の検出について解析した。

1) A β オリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指したヒト ACh 神経障害モデルの構築と A β オリゴマーによる神経障害機序の解析

分子構造内に *O*-acyl 結合を有する isoA β は、酸性条件下では凝集せず単量体として存在するが、中性条件下で *O*-acyl 結合はアミド結合となり、isoA β は元来の A β の一次構造となって凝集を開始する。この isoA β の中性条件下での経時的な凝集を解析したところ、単量体から A β オリゴマーを経て高分子量複合体 (フィブリル) を形成した。各凝集時点における A β をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に処置したところ、A β オリゴマーが豊富に存在する条件下では顕著な細胞障害が検出され、フィブリル形成が進むと細胞障害は減弱した。共焦点レーザー顕微鏡により培養細胞と A β との空間的局在を解析したところ、事前に凝集させた A β フィブリルを処置した場合と比較して、事前凝集過程を経ない A β の処置では細胞表面の A β 接着領域が約 35%増加した。このことから、A β オリゴマーによる細胞接着はフィブリルよりも強く、細胞障害に深く関与することが示唆された。次に、コリン仮説を考慮した AD 病態を細胞培養系で再現することを目的として、hiPS 細胞から ACh 神経への分化誘導方法を検討した。Dual SMAD 阻害法により神経外胚葉系への分化誘導を進め、脳の前後軸および背腹軸の

空間的座標についてはそれぞれ Wnt/ β -catenin シグナル経路の阻害剤である XAV939 と sonic hedgehog シグナル経路の活性化剤である purmorphamine を用いて調節した。その結果、分化誘導 24 日目において、アセチルコリン合成酵素を発現する細胞が全細胞の約 86% となり、高い純度で ACh 神経を分化誘導することができた。このヒト ACh 神経細胞に isoA β を処置したところ、樹状突起を含むヒト ACh 神経の表面に A β が接着し、細胞障害が誘導された。以上より、A β オリゴマー誘発ヒト ACh 神経障害モデルの構築に成功し、この神経障害には A β の細胞表面接着が関与することを見出した。

2) *Bacopa monniera* 抽出エキスをを用いた A β 結合性低分子化合物の探索およびその神経保護作用の解析と放射性同位元素標識体による A β の検出

isoA β から作製した A β 凝集体を結合させたセファロースビーズを用い、先行研究で AD モデルマウス脳内の A β 量を減少させることが報告されているハーブ *Bacopa monniera* の全草抽出エキスから A β 凝集体に結合する低分子化合物を探索したところ、plantainoside B を同定した。第 1 章で構築した A β オリゴマー誘発ヒト ACh 神経障害モデルを用いた解析により、plantainoside B が A β の細胞表面への接着を減弱させて神経保護作用を示すことがわかった。さらに、plantainoside B は isoA β 処置による細胞内への Ca²⁺流入およびミトコンドリア膜電位の低下を有意に抑制した。無細胞系にて A β の凝集に対する plantainoside B の作用を解析したところ、thioflavin T、原子間力顕微鏡ならびにウェスタンブロッティング法による解析において、plantainoside B は顕著な A β 凝集抑制作用を示した。一方、放射性同位元素 ¹²⁵I を標識した plantainoside B を A β 凝集体と混合して blue native ポリアクリルアミドゲルで展開したところ、5~60 量体の A β 凝集体や A β フィブリルが存在する位置に強い放射能が検出された。また、脳内 A β 蓄積を示す AD モデルマウスの脳切片に ¹²⁵I 標識 plantainoside B を処置した結果、野生型マウスと比べ強い放射能が検出された。最後に、新規物体認識試験にて野生型マウスの認知機能を解析したところ、海馬内への isoA β 投与により認知機能が低下し、plantainoside B はその低下を抑制することがわかった。以上より、plantainoside B は A β フィブリルを主体にオリゴマーにも結合し、A β の凝集や細胞表面への接着を抑制してヒト ACh 神経を保護すること、さらに、A β 投与により誘導されたマウスの認知機能障害を改善することが示唆された。また、plantainoside B は脳切片でも A β 凝集体に結合することが示唆された。

総括

本研究では、オリゴマー仮説やコリン仮説の証明を目指した A β オリゴマー誘発ヒト ACh 神経障害モデルを構築し、その機序として A β の細胞表面接着、細胞内 Ca²⁺流入ならびにミトコンドリア膜電位低下の関与を見出した。また、plantainoside B の A β フィブリルを主としたオリゴマーへの結合性、A β の凝集や細胞表面への接着抑制による神経保護作用、ならびに isoA β 投与によるマウスの認知機能障害に対する改善作用が示され、¹²⁵I 標識 plantainoside B は脳切片でも A β を検出できることがわかった。AD の早期発見・早期治療の重要性が認識されるなか、本研究は、診断 (A β 蓄積の検出) と治療 (神経細胞保護) を同時に担う AD に対する theranostics 開発の可能性を示唆しており、その基盤形成の一助となることが期待される。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また本論文は、一部、未発表データを含んでいる。

Aina Fukuda, Souichi Nakashima, Yoshimi Oda, Kaneyasu Nishimura, Hidekazu Kawashima, Hiroyuki Kimura, Takashi Ohgita, Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Aoi Hanaki, Mizuki Okazaki, Erika Matsuda, Yui Tanaka, Seikou Nakamura, Takahiro Matsumoto, Satoshi Akiba, Hiroyuki Saito, Hisashi Matsuda, Kazuyuki Takata. Plantainoside B in *Bacopa monniera* binds to A β aggregates attenuating neuronal damage and memory deficits induced by A β . *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320–333. [第 1 章、第 2 章]

目次

序論	1
1-1. 緒言	5
1-2. 実験方法.....	7
1-2-1. 細胞培養.....	7
1-2-2. hiPS 細胞を用いた前脳基底部 ACh 神経への分化誘導.....	7
1-2-3. A β 調製と凝集実験.....	8
1-2-4. Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis による A β の凝集解析.....	8
1-2-5. isoA β による細胞障害の解析.....	9
1-2-6. 免疫蛍光細胞染色	9
1-2-7. 画像解析.....	10
1-2-8. 統計解析.....	10
1-3. 実験結果.....	11
1-3-1. Native (野生型) A β ₁₋₄₂ を用いた細胞障害の解析	11
1-3-2. isoA β 凝集能と SH-SY5Y 細胞を用いた細胞障害の解析	12
1-3-3. isoA β による細胞障害と A β の空間的局在.....	14
1-3-4. hiPS 細胞由来 ACh 神経の分化誘導条件の検討	16
1-3-5. hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いたオリゴマー仮説およびコリン仮説の 証明を目指した <i>in vitro</i> 細胞障害モデルの構築	19
1-3-6. hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いた isoA β による神経障害と A β の空間的局在	20
1-4. 考察	22
2-1. 緒言	24
2-2. 実験方法.....	26
2-2-1. 実験動物.....	26
2-2-2. <i>Bacopa monniera</i> と抽出エキス.....	26
2-2-3. <i>B. monniera</i> 由来 A β 結合性低分子化合物の探索	26
2-2-4. <i>B. monniera</i> 由来 A β 結合性低分子化合物の解析.....	26
2-2-5. Plantainoside B の単離と同定.....	27
2-2-6. Plantainoside B の isoA β 細胞障害に対する神経保護作用の解析.....	28
2-2-7. 免疫蛍光細胞染色	28
2-2-8. 細胞内 Ca ²⁺ imaging	28
2-2-9. ミトコンドリアの内膜電位の解析.....	29
2-2-10. Thioflavin-T (ThT) fluorescence assay を用いた plantainoside B による A β 凝集抑制の解析	29

2-2-11. 原子間力顕微鏡を用いた plantainoside B による A β 凝集抑制の解析.....	29
2-2-12. Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis による A β の凝集解析.....	29
2-2-13. 放射性同位元素 ^{125}I を用いた plantainoside B の標識.....	30
2-2-14. Blue native ポリアクリルアミドゲルを用いた ^{125}I 標識 plantainoside B による plantainoside B の A β への結合性の解析.....	30
2-2-15. マウス脳切片における ^{125}I 標識 plantainoside B を用いた plantainoside B の A β 結合性の解析	30
2-2-16. 免疫組織染色	31
2-2-17. isoA β と plantainoside B のマウス海馬内投与.....	31
2-2-18. 新規物体認識試験	31
2-2-19. 画像解析.....	31
2-2-20. 統計解析.....	32
2-3. 実験結果.....	33
2-3-1. <i>B. monniera</i> 全草抽出エキスの A β 結合性低分子化合物の探索	33
2-3-2. <i>B. monniera</i> 全草抽出エキスの plantainoside B の単離と同定	36
2-3-3. Plantainoside B による A β オリゴマー誘発 ACh 神経障害抑制作用の解析	39
2-3-4. Plantainoside B 処置による A β と ACh 神経の空間的局在変化の解析.....	40
2-3-5. Plantainoside B の A β による細胞内 Ca^{2+} 流入に対する抑制作用の解析	42
2-3-6. A β 誘発ミトコンドリア機能障害に対する plantainoside B の 抑制作用の解析.....	44
2-3-7. Plantainoside B の A β 凝集に対する抑制効果の解析	46
2-3-8. Plantainoside B の A β オリゴマー形成に対する抑制効果の解析.....	48
2-3-9. 放射性同位元素 ^{125}I を用いた plantainoside B の標識化.....	49
2-3-10. ^{125}I 標識 plantainoside B を用いた plantainoside B と A β 凝集体との結合の解析.....	51
2-3-11. ^{125}I 標識 plantainoside B を用いたマウス脳切片における A β 検出の解析	53
2-3-12. 海馬内 A β 投与による認知機能低下に対する plantainoside B の抑制作用の解析	55
2-4. 考察	57
総括	60
謝辞	62
参考文献.....	63

略語一覧表

AA	<i>L</i> -ascorbic acid
ACh	acetylcholinergic
AD	Alzheimer's disease
ANOVA	analysis of variance
APP	amyloid precursor protein
ATP	adenosine 5'-triphosphate
A β	amyloid β
<i>B. monniera</i>	<i>Bacopa monniera</i>
BBB	blood brain barrier
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
Blue Native-PAGE	blue native-polyacrylamide gel electrophoresis
CH ₃ COOH	acetic acid
CO ₂	carbon dioxide
ChAT	choline acetyltransferase
DMSO	dimethyl sulfoxide
E6	essential 6
E8	essential 8
EtOAc	ethyl acetate
FBS	fetal bovine serum
FDA	food and drug administration
GABA	γ -amino butyric acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
LC/MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LDH	lactate dehydrogenase
MS	mass spectrometry
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
N ₂	nitrogen
NEAA	non-essential amino acids solution
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartate
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PVDF	polyvinylidene difluoride
Plant. B	plantainoside B
RI	radioisotope

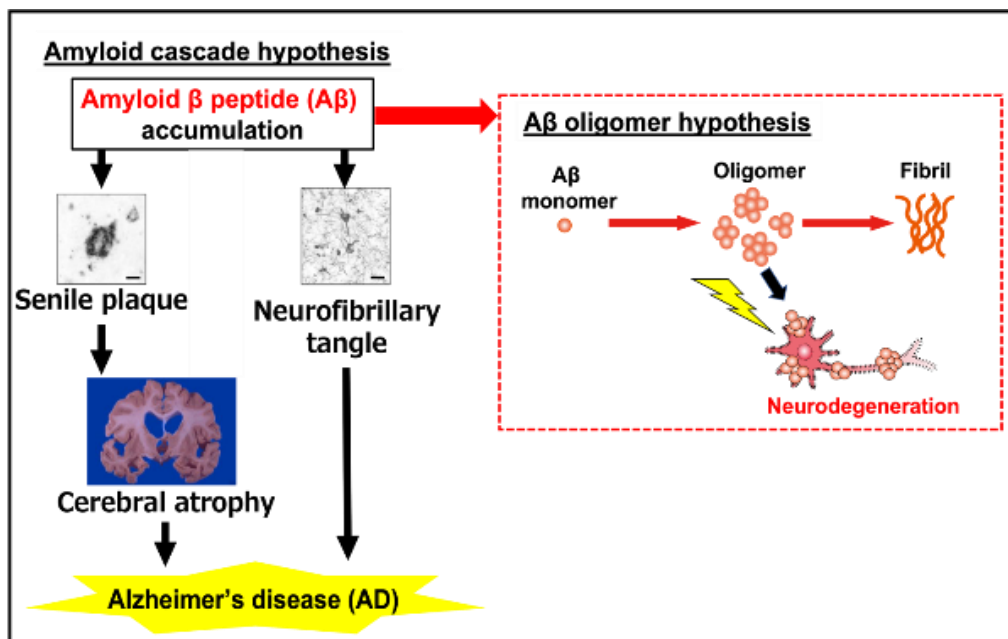
ROS	reactive oxygen species
SMAD	small mothers against decapentaplegic
Shh	sonic hedgehog signal
Sulfo-SMCC	<i>N</i> -2[(4-maleimidomethyl)cyclohexylcarbonyloxy]sulfosuccinimide
TFA	trifluoroacetic acid
ThT	thioflavin T
UV	ultraviolet
hiPS	human induced pluripotent stem
isoA β	26- <i>O</i> -acyl isoA β_{1-42}

序論

世界では高齢化が急速に進んでおり、特に本邦は世界でも高齢化率が高い。2020年には日本総人口のうち65歳以上の高齢者は28.6%を占めていたが、30年後の2050年には37.7%にも及ぶと想定されており、今後ますます高齢者の割合の増加が予想される。¹⁾ アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は、物忘れなどの症状を特徴とした認知症の1つであり、認知症患者のうち6割以上を占める神経変性疾患である。^{2,3)} ADでは加齢が最大のリスクと考えられており、2050年には700万人に及ぶと推定されている。^{4,5)}

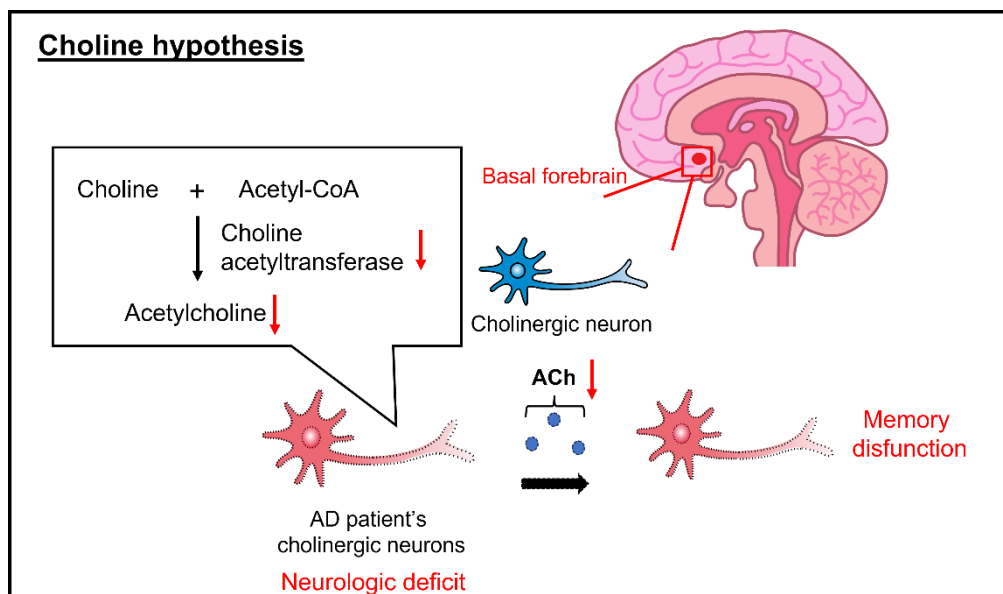
ADは、アミロイド β タンパク質 (amyloid β ; A β) が脳内の神経細胞外に蓄積することが疾患発症の引き金であると考えられている。A β が蓄積することで形成される不溶性の凝集体が老人斑であり、AD脳でみられる特徴的な病理所見の1つである。このA β の蓄積がきっかけとなり、過剰にリン酸化されたタウタンパク質が神経細胞内に蓄積して神経原線維変化を引き起こし、神経脱落による脳の萎縮が生じてAD病態が形成されるという一連の流れをアミロイドカスケード仮説といい、AD発症機序として世界中で広く支持されている。⁶⁾ この仮説を基にA β をターゲットとしたAD疾患関連の研究が進められてきた。⁷⁾ この中で、AD患者脳でA β 低分子量複合体 (オリゴマー) が見つかり、このA β オリゴマーがシナプス障害を生じさせ、AD発症に深く関与するというA β オリゴマー仮説が提唱されるようになった (Schema 1)。⁸⁻¹⁰⁾ そのメカニズムの一つとして、A β オリゴマーが細胞膜上で膜孔を形成し、細胞内にCa²⁺を過剰に流入させ、細胞内の恒常性を破綻させて細胞障害を引き起こすことが報告されている。¹¹⁾ また、近年実施されたA β オリゴマーを含むA β 凝集体をターゲットとした抗A β 抗体 (レカネマブ) の臨床試験では、AD患者の脳内A β の減少と認知機能障害の改善が示され、^{12,13)} 2023年にアメリカのFood and Drug Administration (FDA) よりAD治療薬として承認されている。こうした報告からもAD治療薬開発においてA β オリゴマーが重要なターゲットとなりうることが考えられる。

一方、脳の前脳基底部には、記憶の形成や学習、認知機能等に関与するアセチルコリン (acetylcholine; ACh) 作動性神経 (ACh神経) の細胞体が存在しており、大脳全域にその軸索を投射している。¹⁴⁾ AChは、神経の内部でコリンとアセチルCoAを原料に、合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) により生成される神経伝達物質であり、記憶形成にも大きな役割を果たしている。しかし、AD患者の脳内では前脳基底部のACh神経が早期から脱落していることが報告されており、さらにChAT活性も低下している。^{15,16)} この事実から、AChの分泌低下が認知機能に影響を及ぼすと考えられ、ACh欠乏がAD発症の一端を担うとするコリン仮説も提唱されている (Schema 2)。現在臨床応用されているAD治療薬の主流は、ACh分解酵素阻害薬であるドネペジル、ガランタミン、リバスチグミンの3種類であり、シナプス間隙のACh濃度の向上や維持を目的とした、コリン仮説に基づく治療薬である。しかし、これらの治療法は症状に対する対症療法であるため、効果は一時的であり、十分な治療効果を得ることが難しい。このようにADに対するより根本的な治療法が必要とされている。



Schema 1. Amyloid cascade hypothesis and $A\beta$ oligomer hypothesis

The amyloid cascade hypothesis is one of the leading hypotheses for the pathogenesis of AD. It is believed that the accumulation of $A\beta$ in the brain triggers the formation of senile plaques and neuronal cell death associated with neurofibrillary tangles that lead to the onset of AD. The oligomer hypothesis is also known and states that $A\beta$ oligomers are particularly neurotoxic among $A\beta$ species.



Schema 2. Choline hypothesis

In the basal forebrain, cholinergic neuron cell bodies are clustered in the basal forebrain, which project to the cerebrum and are involved in memory formation, etc. It is known that cholinergic neurons are shed from an early stage in AD patient brains, and the choline hypothesis has been proposed.

AD の治療が困難なのは、AD の臨床症状は病態形成開始から数十年経過してから現れるためである。すなわち、AD の臨床症状が現れる約 20 年前から脳内では A β が蓄積され始めており、その約 10 年後から神経原線維変化や神経細胞死が起こり始めると考えられている。¹⁷⁾ このことから、現在の AD 治療のように臨床症状が現れてから治療薬の投与を開始しても、すでに脳内での A β 蓄積や神経細胞死は 10 年以上も前に始まっており、症状の回復や改善を期待することは難しいというものである。こうした点を考慮し、次世代の AD 治療薬開発には、認知症症状が見られるよりも前に脳内での A β 蓄積を検出してそれを抑制し、神経細胞死を防ぐ必要がある。この点において、A β 凝集の初期段階であり高い神経毒性を示すとされる A β オリゴマーをターゲットとすることは、AD のより根本的な治療を目指す疾患修飾療法 (disease-modifying therapies; DMTs) の開発につながると考えられる。

上述のように、AD の DMTs 開発において A β オリゴマー仮説やコリン仮説の検証系や実験系を取り入れた基礎研究は必須である。しかし、このような基礎研究の実施には様々な問題が存在している。A β オリゴマーは、A β の単量体 (モノマー) が凝集して高分子量複合体 (フィブリル) を形成する際に一時的に形成される A β 凝集体である。¹⁸⁾ この一時的に形成される A β オリゴマーによる神経障害作用の解析は、不揃いな凝集体に起因する実験的ばらつきが大きく、再現性が問題となっている。また、ACh 神経をはじめとするヒト脳神経細胞の入手は限定的であり、実際にヒト検体を用いた解析は容易かつ頻繁に実施できるものではない。こうした背景から、AD の病態形成仮説としての A β オリゴマー仮説やコリン仮説の検証は不十分なところもあり、また仮説に根差した治療薬の探索も困難なものとなっている。これらの問題を解決するために本研究では、26-*O*-acyl isoA β (isoA β) およびヒト人工多能性幹 (human induced pluripotent stem; hiPS) 細胞を用いた。

isoA β は、アミノ酸の配列中に *O*-acyl 結合を有している。酸性条件下ではこの *O*-acyl 結合が維持されるため立体障害となり、isoA β は A β の凝集様式である β シート構造を形成することができず、モノマー構造を維持する。¹⁹⁻²¹⁾ 一方で、isoA β を中性条件に置き換えると、*O*-acyl 結合は維持されず、アミド結合に変換される。それにより、A β は元来の一次構造となり、 β シート構造を形成して凝集を開始する。このように、溶媒の pH 条件を変更することで A β の凝集開始を制御することが可能である。すなわち、isoA β を細胞へ処置することで、これまで通常の A β では調製が困難であった A β オリゴマーを確実に細胞に処置することが可能となり、A β オリゴマーによる細胞障害の評価に有用性が高いと考えられる。

hiPS 細胞は、ヒトの体細胞に特定の 4 つの遺伝子を導入することで、核内のエピジェネティック変化を初期化し、再度、生体内のほとんどの細胞に分化できる多能性を獲得した細胞である。^{22,23)} hiPS 細胞は、受精卵から作られる胚性幹 (embryonic stem; ES) 細胞とは異なり、ヒトの体細胞から作製できることなどから、基礎・臨床研究への応用や治療応用する上で、さまざまな倫理的な問題が解決できる。さらに、自己細胞を用いて hiPS 細胞を作製し、目的とする細胞に分化することが可能であるため、これまで免疫拒絶反応等が問題となってきた細胞移植治療においても、大変有用な細胞であることが期待されている。また、その多能性から様々な疾患研究領域で使用され、^{24,25)} AD に関する研究領域においても、脳内における免疫担当細胞のミクログリアを iPS 細胞から誘導してその働きを解明するためなどに使用されている。^{26,27)} 近年では、前脳基底部の ACh 神経への分化誘導法についても報告があり、²⁸⁻³⁰⁾ hiPS 細胞から分化誘導した ACh 神経を用いることで、これまで実施すら困難であったヒト ACh 神経を用いた AD の病態解明や治療法開発研究に大きな進展をもたらす可能性が期待される。

本研究の第 1 章では、A β オリゴマー仮説に焦点を当て、isoA β を用いて経時的な凝集過程とともにオリゴマー形成を評価し、A β オリゴマーと A β フィブリルの細胞障害性を比較した。また、コリン仮説にも着目し、hiPS 細胞から前脳基底部に位置する ACh 神経への分化誘導方法を独自に構築した。さらに hiPS 細胞由来 ACh 神経に isoA β を処置することで、A β オリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指した神経細胞障害モデルを構築してその機序を解析した。

第 2 章では、isoA β から作製した A β オリゴマーが豊富な A β 凝集体をセファロースビーズに結合し、生薬抽出エキスを混合することで、A β オリゴマーに結合性を示す低分子化合物を探索した。さらに得られた A β 結合性低分子化合物の神経保護作用について第 1 章で構築した A β オリゴマー誘発ヒト ACh 神経障害モデルを用いて解析した。さらに、この低分子化合物の放射性同位元素標識体を用いて A β との結合性やマウス脳切片上での A β の検出について解析した。

第 1 章 A β オリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指したヒト ACh 神経障害モデルの構築と A β オリゴマーによる神経障害機序の解析

1-1. 緒言

高齢化が進む本邦において、総人口に占める 65 歳以上の高齢者の割合は 2020 年では 4 人に 1 人であるのに対して、2050 年には 3 人に 1 人となることが推定されている。¹⁾ また、この背景のもと、加齢を最大の疾患発症リスクとする AD 患者数の増加も推定されている。^{4,5)} AD 発症機序について、脳内 A β 蓄積が病態形成の引き金であるとするアミロイドカスケード仮説⁶⁾ が提唱され、その中でも A β オリゴマーが特に強い神経障害を示すというオリゴマー仮説が注目されている。⁹⁾

A β は、凝集度の違いによりモノマー、オリゴマー、フィブリルと大きく 3 種類に分けられる。A β オリゴマーはさらに、分子量が 50 kDa 以下の A β -derived diffusible ligands (ADDLs)、³¹⁾ 15 - 20 個の A β が凝集した分子量が 90 kDa 以下の A β oligomers (A β Os)³²⁾ および分子量が 200 kDa 程度の A β 凝集体が繊維状に集積したプロトフィブリル^{33,34)} などが知られている。これらの A β オリゴマーは神経障害を示す^{8,31)} が、その中でもプロトフィブリルが特に強い神経障害を示すことが報告されている。^{36,37)} レカネマブは、この A β プロトフィブリルを標的とした抗体製剤であり、早期 AD 患者を対象とした臨床第 3 相試験において、認知機能の低下を約 27%抑制することが示され^{12,13)}、2023 年にアメリカ FDA より新規 AD 治療薬として承認された。このように、最近では、オリゴマー仮説の裏付けと考え得る臨床試験の結果も報告され、AD における更なる DMTs 開発において A β オリゴマーが重要な標的と考えられている。³⁸⁾ しかし、現時点でも A β オリゴマーによる詳細な神経障害機序や AD 発症機序は解明されていない。

このオリゴマー仮説を検証するにあたり、様々な A β オリゴマーの調製方法が報告されてきた。^{39,40)} しかし、これらの HPLC や限外ろ過等を用いる方法は、サンプルの希釈、移動相の混入、カラム内へのタンパク質の吸着や調製に要する時間など、手技的な問題点が多く挙げられ、研究結果の再現性が懸念されてきた。こうした背景より、オリゴマー仮説の検証やその細胞障害機序の詳細な解明には、簡便かつ短時間で A β オリゴマーを調製する方法が必要と考えられる。isoA β は、アミノ酸配列中の 25 位グリシンと 26 位セリンが *N*-amide 結合ではなく *O*-acyl 結合で結合している。¹⁹⁻²¹⁾ Trifluoroacetic acid (TFA) などの酸性条件下では、isoA β の 26 位アミノ酸の N-H 鎖と酸性化合物が相互作用を起こすため、N-H 鎖が水素結合供与体としての性質を示さなくなる。その結果、isoA β は *O*-acyl 結合を保った状態で維持され、A β 元来のアミド結合へと変換されず、結果、 β シート構造が形成できなくなり凝集を起こさない。一方で、中性条件下では、isoA β の *O*-acyl 結合維持に働く酸性化合物が存在しないため、N-H 鎖が水素結合供与体としての性質を示し、*O*-acyl 結合が *N*-amide 結合に変換される。この反応により、isoA β は元来の A β (野生型 A β) と同一の一次構造となり、 β シート構造を形成して凝集を開始する。このように isoA β は、溶媒の pH により凝集の開始点を制御することで再現性良く均質なオリゴマー形成が可能な A β であり、その調製も、isoA β の凍結粉末を

TFA で溶解するという簡便なものである。

記憶の形成や学習に関与する前脳基底核から大脳全体に投射する ACh 神経は、AD 発症早期より障害を受けることが知られており、その結果生じる ACh の枯渇が AD の認知機能障害をもたらすというコリン仮説が提唱されている。^{15,16)} この仮説を証明するためには、ヒト ACh 神経を用いた検証系による基礎研究が必須である。しかし、様々な神経がネットワークを形成している脳において、特定のヒト神経細胞を入手することは困難である。そのため、A β オリゴマーと ACh 神経の関連性について詳細は不明である。hiPS 細胞は、体内のほとんどの細胞への分化誘導が可能であり、hiPS 細胞を用いることでヒト神経細胞への分化も可能である。近年、hiPS 細胞から前脳基底部に存在する ACh 神経への分化誘導方法も報告されている。²⁸⁻³⁰⁾ しかし、これまでの分化誘導方法では、未分化な hiPS 細胞の維持培養にマウス由来のフィーダー細胞を使用しており、分化誘導時や誘導後の細胞への目的外であるマウス細胞の混入が懸念される。⁴¹⁻⁴³⁾ また、ACh 神経への分化誘導時にはリコンビナントタンパク質が使用されており、高価かつ活性にロット差があり分化誘導の安定性に懸念が残る。⁴⁴⁾ このように、分化誘導の再現性や純度の高い ACh 神経を hiPS 細胞から効率的に分化誘導する方法についてさらに検討する必要がある。

本章では、AD 病態機序の解明や新規治療薬のスクリーニングにも使用できる A β オリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指し、ヒト ACh 神経障害モデルの構築を検討した。本検討において、安定的な A β オリゴマー形成を目的に isoA β を実験に用いた。また、再現性や純度の高い前脳基底部の ACh 神経を分化誘導することを目的に、未分化な hiPS 細胞をフィーダー細胞フリー環境下で培養維持し、リコンビナントタンパク質に変わって化合物を用いる新たな分化誘導法を検討した。すなわち、hiPS 細胞から神経細胞への誘導には二種類の small mothers against decapentaplegic (SMAD) 阻害剤 (Dual SMAD 阻害法)⁴⁵⁾ を用い、その後の前脳基底部の ACh 神経への誘導には、脳発生の背腹軸を調節する sonic hedgehog シグナル経路の活性化剤と前後軸を調節する Wnt/ β -catenin シグナル経路の阻害剤を使用した。さらに、分化誘導したヒト ACh 神経に isoA β を処置することで、A β オリゴマーによるヒト ACh 神経障害モデルの構築を検討した。

1-2. 実験方法

1-2-1. 細胞培養

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞 (ATCC、Manassas、VA、USA) は、 1.0×10^4 cells/well となるように、10 cm シャーレ上で培養し、5 日おきに継代した。細胞維持に使用した培地は、Eagle's minimum essential medium (Fujifilm Wako Chemicals、大阪、日本) と Ham's F-12 (Fujifilm Wako Chemicals) を等量に混合した基礎培地に、100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン (Fujifilm Wako Chemicals)、非必須アミノ酸 (non-essential amino acids solution; NEAA; Fujifilm Wako Chemicals)、200 mM *L*-グルタミン (Fujifilm Wako Chemicals) および 15% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS; Fujifilm Wako Chemicals) になるように調製し、5%CO₂、37°C の環境下において培養した。

hiPS 細胞は、あらかじめ iMatrix-511 silk (Nippi、東京、日本) でコーティングした 6 well プレートに、 1.5×10^4 cells/well になるように播種し、フィーダーフリー (フィーダー細胞非存在下) で培養した。基礎培地は、essential 8 (E8; Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) とし、継代初日のみ 10 μ M Y-27632 を加え、2 日目以降は取り除いた。培地交換は毎日実施し、細胞の増殖に応じて培地の量を変更した。本研究で用いた hiPS 細胞 (1231A3 株)⁴¹⁾ は、RIKEN Bioresource Research Center (筑波、日本) より提供されたものを使用した。また、本 hiPS 細胞の使用にあたり、京都薬科大学倫理委員会の承認を得ており (承認番号: 20-18-26)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省、平成 26 年 12 月 22 日制定、平成 29 年 2 月 28 日一部改正)」および個人情報の保護に関する法律 (平成 15 年法律第 57 号) を遵守して実施した。

1-2-2. hiPS 細胞を用いた前脳基底部 ACh 神経への分化誘導

hiPS 細胞を iMatrix-511 silk でコーティングした 6 well プレートに、 5.0×10^6 cells/well になるように播種し、2 日間 10 μ M Y-27632 および 100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む E8 で培養した。分化誘導開始を 0 日目とし、基礎培地を 100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン、NEAA、GlutaMAX (Fujifilm Wako Chemicals)、および 100 μ M 2-メルカプトエタノール溶液 (Fujifilm Wako Chemicals) を含む essential 6 (E6; Thermo Fisher Scientific) に変更した。hiPS 細胞からの前脳基底部 ACh 神経細胞への分化誘導において、先ず既報にある Dual SMAD 阻害法⁴⁵⁾を採用し、SMAD1/5/9 阻害薬である LDN193189 (Selck Chemicals、Houston、TX、USA) および SMAD2/3 阻害薬 A83-01 (Fujifilm Wako Chemicals) を用いて hiPS 細胞を外胚葉系へ誘導した。さらに、脳の背腹軸の調節を sonic hedgehog signal (shh) シグナルの活性化剤である purmorphamine (Selck Chemicals) により、さらに脳の前後軸の調節は Wnt/ β -catenin シグナルの阻害剤である XAV939 (Selck Chemicals) を用いて実施し、前脳基底部の神経細胞へと誘導した。

分化誘導 0 日目は、基礎培地に 10 μ M Y-27632、200 nM LDN193189、500 nM A83-01、2 μ M XAV939 を混合して細胞へ処置した。1 μ M purmorphamine は分化誘導 1 日目から追加した。10 μ M Y-27632、500 nM A83-01 はそれぞれ分化誘導 3 日目、6 日目から取り除いた。基礎

培地である E6 は分化誘導 5 日目から 11 日目にかけて、徐々に、B27 supplement vitamin A minus (Thermo Fisher Scientific)、GlutaMAX、100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific) に置き換えた。分化誘導 11 日目からは、neurobasal medium を基礎培地とし、200 nM LDN193189 と 2 μ M XAV939 を加えて細胞へ処置した。分化誘導 16 日目には、TrypLE (Thermo Fisher Scientific) を処置して 5 分間 37°C の環境下で培養し、プレートから剥離した。剥離した細胞は、neurobasal medium に懸濁し、1,300 rpm で 3 分間遠心して回収した。あらかじめ、poly-L-ornithine hydrobromide (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、iMatrix silk 511、1 μ g/mL fibronectin (Fujifilm Wako Chemicals) でコーティングした培養プレートに、 1.0×10^6 cells/well になるように細胞を播種した。この時、基礎培地として neurobasal medium に 100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン、10 μ M Y-27632 を溶解したものを使用した。分化誘導 16 日目の発現転写因子を解析するための免疫蛍光細胞染色用に準備した細胞には、基礎培地に 200 nM LDN193189 と 2 μ M XAV939 を溶解したものを処置し、一方で分化誘導した細胞を成熟させる場合は、基礎培地に 5 μ M SU5402 (Selleck Chemicals)、1 μ M PD0325901 (Selleck Chemicals)、200 μ M L-ascorbic acid (AA; Sigma-Aldrich)、10 μ M DAPT (Selleck Chemicals)、20 ng/mL brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Peprotech、Rocky Hill、NJ、USA)、および 10 μ M Y-27632 を溶解したものを使用した。⁴⁶⁾ 培地交換は、分化誘導 15 日目までは毎日、16 日目以降は 3 - 4 日間ごとに実施した。

1-2-3. A β 調製と凝集実験

Native (野生型) A β_{1-42} は 合成 human A β_{1-42} 塩酸塩 (AnaSpec、San Jose、CA、USA) を、Ca²⁺ および Mg²⁺ を含有しない phosphate buffered saline [PBS (-)] で溶解した。isoA β (Peptide Institute Inc.、大阪、日本) は、滅菌した高純水を用いて 0.1% に調製した TFA (Fujifilm Wako Chemicals) で溶解し、4°C、20,000 \times g で 1 時間遠心した。遠心後、上清を回収し、micro volume spectrophotometer (NanoPhotometer NP80; Implen、Germany) にて 280 nm の吸光度を測定して濃度を求めた。調製した 150 μ M isoA β は実験に使用するまで、-80°C で凍結して保存した。

isoA β の中性条件下における経時的な凝集度の解析は、1% FBS を含む SH-SY5Y 細胞の基礎培地を用いて実施した。isoA β と培地を Protein LoBind Tubes (Eppendorf、Hamburg、Germany) 内で最終の濃度が 6 μ M になるように調製し、37°C で静置して、経時的にサンプルを回収した。

1-2-4. Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis による A β の凝集解析

isoA β の中性条件下における経時的な凝集の解析は、Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (Blue Native-PAGE) にて実施した。Blue Native-PAGE は、従来の sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE と異なり、タンパク質の変性作用が弱い Coomassie brilliant blue を用いることで、凝集体の変性を起こさずタンパク質を展開することができる。⁴⁷⁾ あらかじめ凝集させた A β を 4 倍濃度の NativePAGE Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) と混合させた。回収したサンプルは、4 - 16% Bis-Tris mini protein gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて電気泳

動し、凝集体の大きさごとに分離した。電気泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。PVDF メンブレンは、転写後 0.05% Tween-20 を含む 25 mM tris aminomethane と 0.15 M NaCl の混合溶液 (TBST) で洗浄し、抗体の非特異的な結合を阻害するため、Bullet Blocking One for Western blotting (ナカライテスク、京都、日本) を 5 分間処置した。一次抗体は Bullet Immunoreaction Buffer (ナカライテスク) で調製した抗 A β 抗体 (clone 6E10; 1:2,000; Biolegend、San Diego、CA、USA) を 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、2 次抗体として Bullet Immunoreaction Buffer (ナカライテスク) で調製した horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibody against mouse IgG (1:2,000) を 30 分間室温で処置し、TBST で洗浄した。バンドの検出は、Chemi Lumi One Super (ナカライテスク) を用いて、lumino-image analyzer (ImageQuant LAS500 system; GE Healthcare Life Science、Pittsburgh、PA、USA) により検出した。

1-2-5. isoA β による細胞障害の解析

isoA β による細胞障害を解析するため、SH-SY5Y 細胞および hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いて WST-8 assay および LDH assay を行った。96 well プレートに SH-SY5Y 細胞を 3.0×10^3 cells/well で播種し、5%CO₂、37°C の環境下において 7 日間培養した。hiPS 細胞由来 ACh 神経は、分化誘導 16 日目の細胞を 1.5×10^5 cells/well 播種し、8 - 12 日間培養した。isoA β を処置する直前に、細胞の増殖を抑制するため SH-SY5Y 細胞の培地を 15%FBS 含有基礎培地から 1%FBS 含有基礎培地に置き換えた。hiPS 細胞由来 ACh 神経は、新鮮な成熟用の培地に交換した。A β (1-6 μ M) を処置した後 48 時間、5%CO₂、37°C の環境下で培養した。48 時間後、WST-8 assay において、生細胞数測定試薬である Cell Count Reagent SF (ナカライテスク) を処置し、5%CO₂、37°C の環境下で培養し、2 時間後 450 nm の吸光度を測定した。LDH assay は LDH cytotoxicity assay kit (ナカライテスク) を用いた。実験方法は kit に含まれている説明書に従って実施した。isoA β を処置した細胞に 100 μ L/well Substrate Solution を加え、室温で遮光して 20 分静置した。その後、50 μ L/well Stop Solution を加え、450 nm の吸光度を測定した。LDH assay における control として、kit に含まれている lysate reagent (Triton X-100) で細胞を融解させた群を high control とし、この control 群と比較した際の細胞障害率を算出した。

1-2-6. 免疫蛍光細胞染色

SH-SY5Y 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (松波硝子、大阪、日本) に、hiPS 細胞由来 ACh 細胞はマルチウエルガラスボトムディッシュ (松波硝子) に播種し、5%CO₂、37°C の環境下において培養した。PBS (-) で 3 回洗浄した後、4%paraformaldehyde (PFA) を処置し、4°C で 30 分間静置した。再度 PBS (-) で 3 回洗浄し、0.1%Triton X 含有 PBS (PBST) を処置して、10 分間室温で静置した。以下の一次抗体を使用して 5%ロバ血清含有 PBST で溶解し、細胞へ処置して 4°C で一晩反応させた。一次抗体として、マウス抗 A β 抗体 (clone 6E10; 1:500)、ラビット抗 NKX2.1 抗体 (1:500; Abcam、Cambridge、UK)、ラビット抗 FOXG1 抗体 (1:500; Abcam)、ラビット抗 LHX8 抗体 (1:200; Thermo Fisher Scientific)、マウス抗 ISLET-1 抗体 (1:500; Abcam)、マウス抗 MAP2 抗体 (1:500; Sigma-Aldrich)、チキン抗 MAP2 抗体 (1:500; Abcam)、

ヤギ抗 ChAT 抗体 (1:250; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた。二次抗体は、PBST を用いて調製し、室温で 2 時間細胞と反応させた。二次抗体として、Alexa488 標識ロバ抗マウス抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific)、Alexa555 標識ロバ抗マウス抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific)、Alexa647 標識ロバ抗マウス抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific)、Alexa488 標識ロバ抗ラビット抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific)、Alexa555 標識ロバ抗ラビット抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific)、Alexa647 標識ロバ抗ラビット抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific)、Alexa555 標識チキン抗ヤギ抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific)、Alexa488 標識ロバ抗チキン抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞骨格 F-actin の標識として rhodamine-phalloidin (1:3,000; Thermo Fisher Scientific)、さらに核の標識として Hoechst33342 (1:4,000; Thermo Fisher Scientific) を用いて、二次抗体処置時に同時に処置した。各蛍光物質は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。

1-2-7. 画像解析

事前の凝集過程を経ずオリゴマーが豊富な A β と、凝集させてフィブリルが豊富な A β による SH-SY5Y 細胞表面への接着は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800) で撮影した画像をもとに、画像解析ソフト (Photoshop version 22.2.0.; Adobe, San Jose, CA, USA) を用いて解析した。すなわち、rhodamine-phalloidin (F-actin) の蛍光が確認できる領域の面積を基準とした時の、A β と rhodamine-phalloidin が共局在する部分の面積の割合を算出した。画像は 1 実験あたり 11 枚の画像を解析し、平均値を算出して評価した。

hiPS 細胞由来 ACh 神経の分化誘導における関連転写因子の発現解析は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800) で撮影した画像をもとに、画像解析ソフト (Photoshop version 22.2.0.) にて解析した。全細胞 (Hoechst33342 陽性細胞) に対する、転写因子陽性細胞数の割合を算出した。

1-2-8. 統計解析

全ての実験結果の解析は、統計解析ソフトである GraphPad Prism 5 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) を使用して実施した。得られた実験の結果は、平均値±標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で表示した。2 群間の比較は Student's t 検定を用いた。3 群以上の比較は、分散分析法 (analysis of variance; ANOVA) を用いて、検定には Bonferroni/Dunn 検定を用いた。両側検定で危険率 5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

1-3. 実験結果

1-3-1. Native (野生型) $A\beta_{1-42}$ を用いた細胞障害の解析

はじめに、native $A\beta_{1-42}$ による神経障害作用について、SH-SY5Y 細胞を用いて WST-8 assay にて解析した。WST-8 assay は細胞内に存在する脱水素酵素による酸化還元反応を応用し、生細胞数を測定する解析である。native $A\beta_{1-42}$ (1 - 9 μ M) を処置してから 48 時間後の SH-SY5Y 細胞の生存率を解析したところ、処置したすべての濃度において細胞障害が誘導されなかった (Fig. 1)。

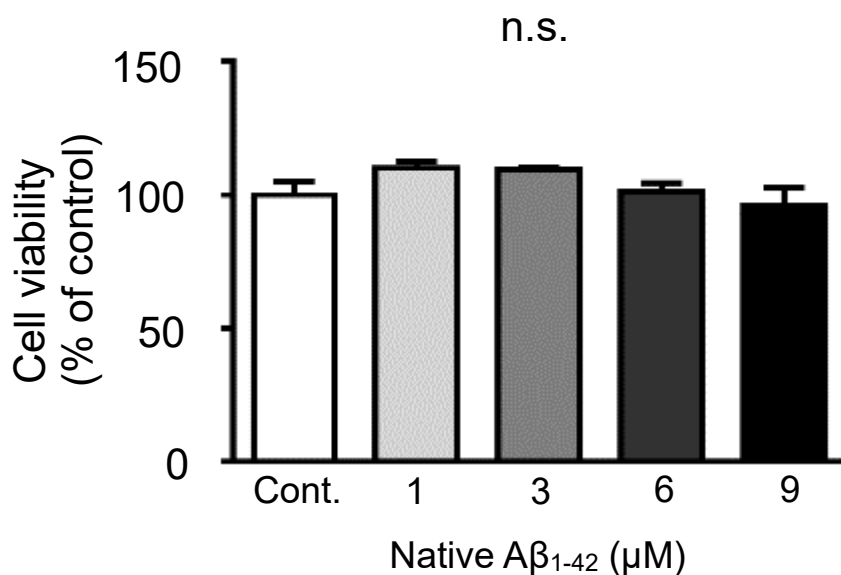


Figure 1. Analysis of cytotoxicity of native $A\beta_{1-42}$.

SH-SY5Y cells were treated with native $A\beta_{1-42}$ (1 - 9 μ M) for 48 h; cell viability was analyzed by the WST-8 assay. Data represent mean \pm SEM (n = 3). The statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with post-hoc Bonferroni's/Dunn's test. Control; cont., not significant; n.s.

1-3-2. isoA β 凝集能と SH-SY5Y 細胞を用いた細胞障害の解析

A β オリゴマーによる細胞障害機序を解明し、A β オリゴマーを標的とした AD 治療方法を探索するためには、*in vitro* 評価系において A β オリゴマーによる細胞障害を再現する必要がある。1-3-1 の結果より、native A β_{1-42} では細胞障害が誘導されなかった。これは、A β が大変凝集しやすく、A β の調製段階から凝集が開始していた可能性がある。また、A β オリゴマーの形成が一時的であり、細胞との接触が短時間であったため、その障害が誘導されなかった可能性も考えられる。そのため、A β モノマーからオリゴマーを安定して形成して、細胞に処置することが可能な A β を用いることで、A β オリゴマーの細胞障害を再現できると考えた。そこで、中性条件下で native A β_{1-42} に変換され、モノマーからの凝集開始を制御できる isoA β を用いて細胞障害性を解析することとした。

まず isoA β の中性条件下で凝集を開始した後の経時的な凝集体形態を Blue Native-PAGE にて解析した (Fig. 2A)。その結果、静置 1 時間後にはすでに isoA β は凝集を開始しており、20 - 1048 kDa までの A β オリゴマーの形成が確認できた (Fig. 2A)。また、3 - 6 時間後にかけて 66 - 1048 kDa の凝集体が増加し、1048 kDa 以上の大きな凝集体であるフィブリルが徐々に生成した。さらに 9 - 72 時間後には、20 kDa 付近のバンドが消失し 66 - 1048 kDa が減少する一方で、1048 kDa 以上のフィブリルが増加していた (Fig. 2A)。この結果から、isoA β は凝集の開始が制御され、安定してオリゴマーを形成することがわかった。そこで isoA β による細胞障害作用を評価するため、SH-SY5Y 細胞に isoA β を処置して、WST-8 assay にて解析した。その結果、isoA β の濃度依存的な細胞障害が処置後 48 時間において、再現性良く安定して誘導されることがわかった (Fig. 2B)。

次に A β 凝集体の違いによる細胞障害の強さを解析するため、あらかじめ中性条件下で isoA β を静置して A β 凝集体を作製し、静置時間ごとに SH-SY5Y 細胞に処置した。その結果、静置時間 12 時間までの凝集体処置では顕著な細胞障害が誘導されたが、24 時間後や 72 時間後に形成される凝集体を処置すると細胞障害が軽減された (Fig. 2C)。

以上をまとめると、isoA β 凝集実験の結果 (Fig. 2A) では静置 9 時間後には 20 kDa 付近の A β 凝集体は消失していたが、この凝集体を細胞に処置しても細胞障害は誘導された (Fig. 2C)。また、66 - 1048 kDa のオリゴマーが減少する 24 時間以降で細胞障害が減弱したことから、この細胞障害には 66 - 1048 kDa の A β オリゴマーが深く関与していることが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333.から引用した。

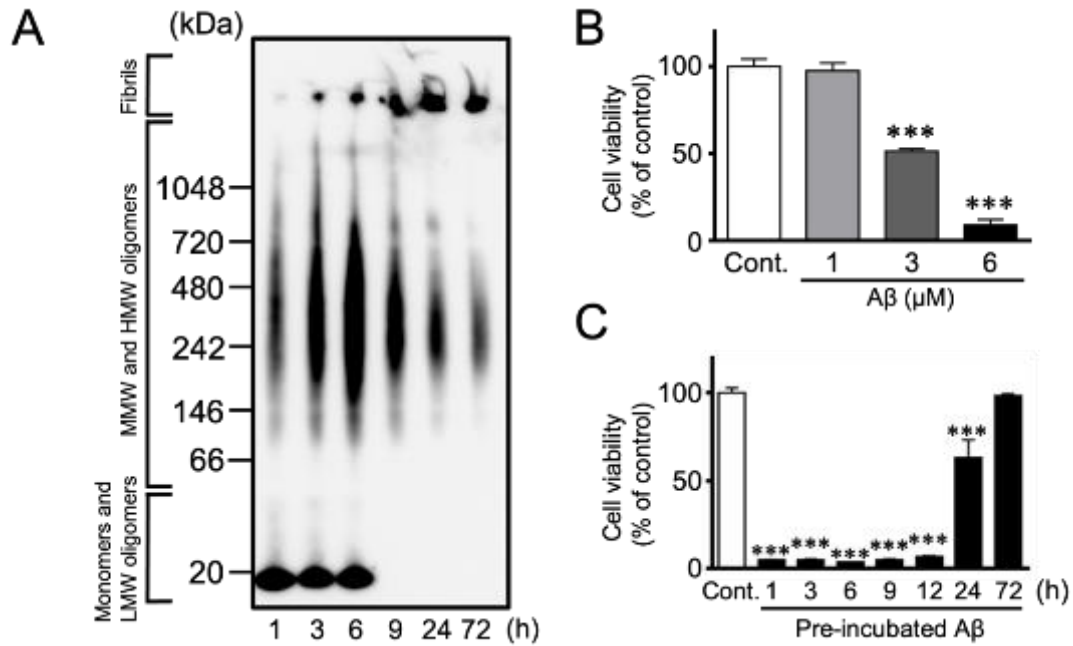


Figure 2. Analysis of aggregation and cytotoxicity of isoA β .

A, isoA β (6 μ M) was incubated for 1 - 72 hour (h) at 37°C in culture medium for SH-SY5Y cells; A β aggregation was analyzed by blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (Blue Native-PAGE) using an anti-A β antibody. LMW; low molecular weight, MMW; middle molecular weight, HMW; high molecular weight. **B and C**, Cells were treated with isoA β (1 - 6 μ M) (**B**) or 1 - 72 h pre-incubated A β (6 μ M) (**C**) for 48 h; cell viability was analyzed by the WST-8 assay. Data represent mean \pm SEM (**B**, **C**; $n = 3$). The statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with post-hoc Bonferroni's/Dunn's test (**B** and **C**). *** $P < 0.001$ vs. control (cont.). One representative experiment is shown; similar results were obtained in three independent experiments.

1-3-3. isoA β による細胞障害と A β の空間的局在

1-3-2 の結果より、isoA β による細胞障害には 66 - 1048 kDa の A β オリゴマーが深く関与している可能性が示唆された。そこで、細胞に処置している間にこの A β オリゴマーが豊富に形成される未凝集の isoA β を SH-SY5Y 細胞に処置した場合と、事前に 24 時間静置してフィブリル化させた A β を処置した場合において、A β の局在について共焦点レーザー顕微鏡で解析した。その結果、未凝集体処置群では、A β が細胞体全体を覆うように強固に接着している様子が確認できた (Fig. 3A)。一方で、あらかじめ 24 時間凝集させた A β を処置した群では、未凝集体処置群で見られたような A β と細胞との接着は確認できず、溶媒中に浮遊している様子が確認できた (Fig. 3B)。そこで、それぞれの処置群における A β と細胞体との接着を定量解析したところ、未凝集体処置群においては A β が細胞表面の約 70%に接着しており、24 時間凝集体処置群ではその接着が約 36%となり、有意に減少することがわかった (Fig. 3C)。

この結果から A β オリゴマーはフィブリルと比較して細胞体に接着しやすく、その結果、細胞への障害性を示すことが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333.から引用した。

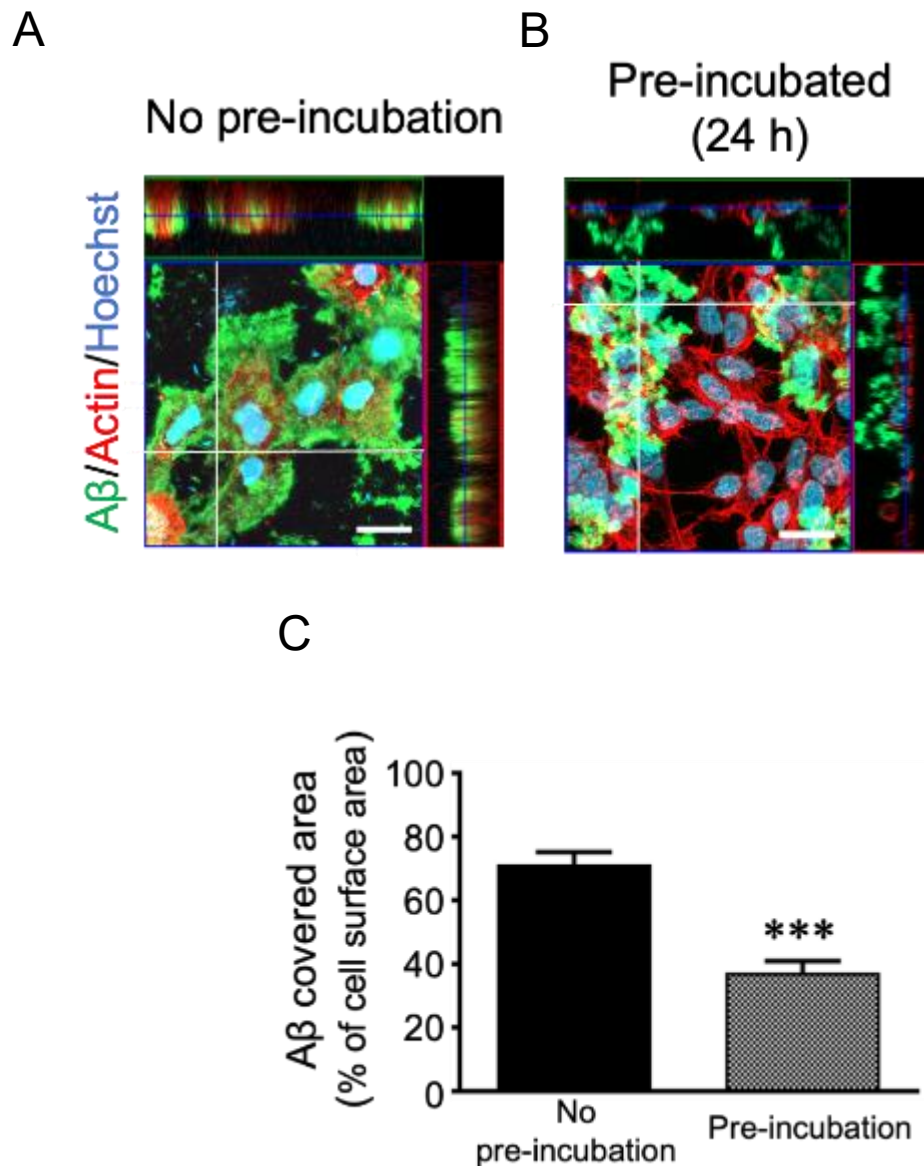


Figure 3. Analysis of cell attachment of A β oligomers and fibrils.

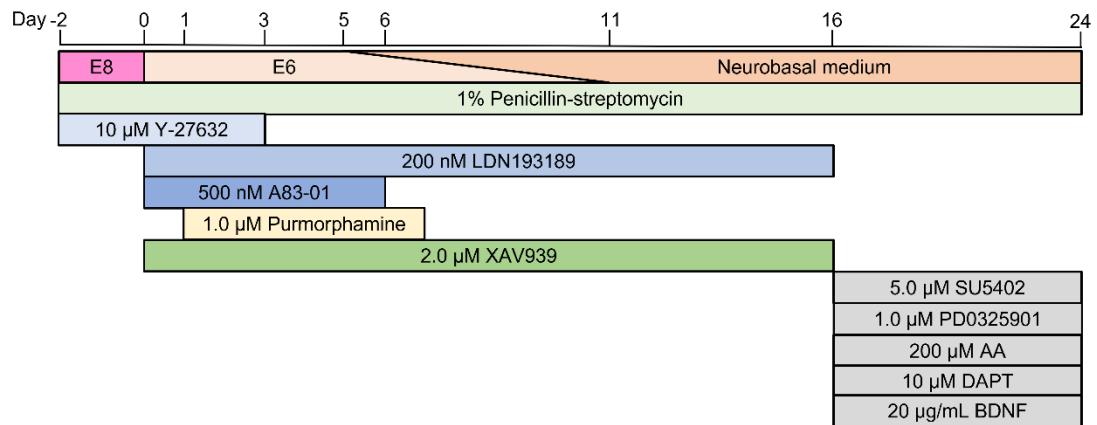
A and B, Confocal laser scanning microscopy was performed after treatment with or without 24 h pre-incubated isoA β . Cells were stained with antibody against A β (green). Actin (cell morphology marker) and nuclei were stained with rhodamine-phalloidin (red) or Hoechst 33342 (cyan), respectively. Scale bars, 20 μ m. **C**, Image analysis measured the cell surface area covered with A β (merged area with A β and actin stained). Data represent mean \pm SEM (C; n = 11). The statistical significance of differences among groups was determined by Student's t-test. *** P < 0.001 vs. no pre-incubation.

1-3-4. hiPS 細胞由来 ACh 神経の分化誘導条件の検討

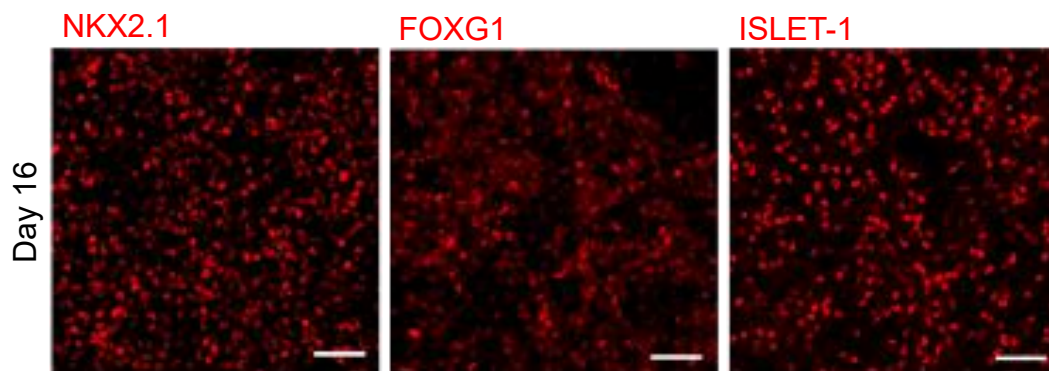
1-3-3 までの解析は、SH-SY5Y 細胞を用いて実施した。しかしながら、SH-SY5Y 細胞は株化細胞であり、がん細胞としての性質を有し、また、ACh 神経として機能する神経でもないことから多くの点でヒト ACh 神経とは性質が異なる細胞であることが予想される。そこでより正確なヒト ACh 神経の機能解析を実施するために hiPS 細胞から ACh 神経を分化誘導することとした。

外側基底核の γ -amino butyric acid (GABA) 神経へ分化誘導した先行研究⁴⁸⁾を参考に、終脳腹側に存在する前脳基底部の ACh 神経への分化誘導用に改変し、誘導プロトコルを作成した (Fig. 4A)。分化誘導 16 日目と 24 日目における転写因子およびタンパク質の発現を共焦点レーザー顕微鏡で解析し、前脳基底部 ACh 神経への誘導を評価した。また、先行研究を参考に短期間で神経の分化を進めるため、⁴⁶⁾ 16 日目以降は fibroblast growth factor レセプター (FGFR) 阻害剤である SU5402、MAPK 阻害剤である PD0325901、さらに γ -secretase 阻害により幹細胞の分化に関わる Notch シグナルを阻害する DAPT を処置した (Fig. 4A)。その結果、16 日目において、終脳の前方マーカーである FOXG1²⁹⁾ および終脳腹側マーカーである NKX2.1^{29,49)} の発現が確認できた (Fig. 4B)。さらに、ACh 神経の発生早期の段階で確認される ISLET-1^{50,51)} の発現も確認でき、16 日目には前脳基底部の ACh 神経前駆細胞への誘導が確認できた (Fig. 4B)。さらに 24 日目においては、NKX2.1、ISLET-1 に加えて、ACh 神経の機能性マーカーで ACh の合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase; ChAT)²⁹⁾ が誘導されたことが示唆された (Fig. 4C)。さらに、ACh 神経の発生に関与する転写因子 LHX8⁵⁰⁾ および ISLET-1 と ACh 神経の機能性 (成熟) マーカーである ChAT のそれぞれの陽性細胞の数を全細胞数で比較したところ、LHX8 陽性細胞の割合が $25.3 \pm 7.4\%$ 、ISLET-1 陽性細胞の割合は $47.7 \pm 5.1\%$ 、ChAT 陽性細胞の割合は $86.6 \pm 3.1\%$ であった (Fig. 4D)。以上より、本研究で構築した hiPS 細胞から ACh 神経への分化誘導方法により、純度の高い成熟した ACh 神経が誘導できることがわかった。下記結果は、一部 Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333.から引用した。

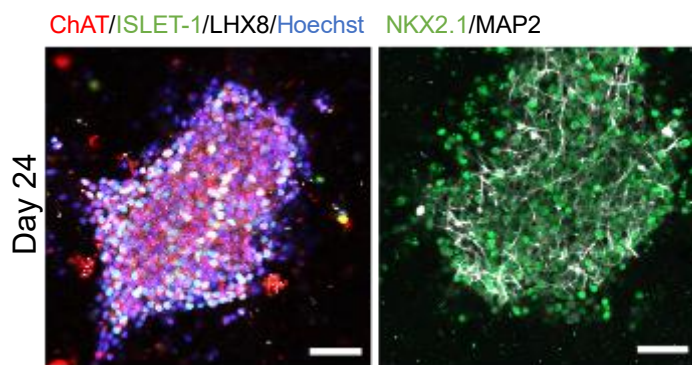
A



B



C



D

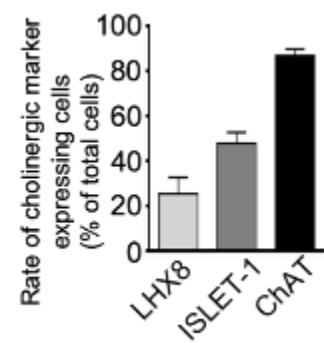


Figure 4. Developmental evaluation of ACh neurons derived from hiPS cells.

A, Protocol for induction of ACh neurons from hiPS cell differentiation during maturation. **B and C**, Confocal laser scanning microscopy was performed during differentiation of hiPS cells toward basal forebrain cholinergic neurons using antibodies against NKX2.1 [maker for ventral telencephalon, red in (B) and green in (C)], FOXG1 [telencephalon, red in (B)], ISLET-1 [cholinergic neurons, red in (B) and green in (C)], MAP2 [dendrites, white in (C)], LHX8 [cholinergic neurons, white in (B)], ChAT [cholinergic neurons, red in (B)], and Hoechst 33342 [nuclei, blue in (C)]. Scale bars, 50 μ m. **D**, The graph shows the rate of cells expressing cholinergic markers, such as LHX8 (an early marker), ISLET-1 (an early marker), or ChAT (a functional marker), in relation to the total number of cells (Hoechst 33342⁺ cells). The data represent the mean \pm SEM (n = 3).

1-3-5. hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いたオリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指した *in vitro* 細胞障害モデルの構築

1-3-4 にて作製した hiPS 細胞由来 ACh 神経細胞と isoA β を用いて、A β による細胞障害を WST-8 assay と lactate dehydrogenase (LDH) assay で解析した。isoA β を処置して 48 時間後の細胞障害を解析した。Lactate dehydrogenase (LDH) assay は、細胞が障害を受け細胞膜が崩壊することで細胞内に存在する LDH が細胞外に放出されることを利用し、細胞障害の程度を評価する。これらの 2 つの解析の結果、WST-8 assay より、A β の濃度依存的な生細胞数の減少が確認できた (Fig. 5A)。さらに、LDH assay の結果においても、A β の濃度依存的な細胞外 LDH の増加が見られた (Fig. 5B)。以上より、isoA β 処置によって ACh 細胞障害が誘導されることがわかり、ヒト ACh 神経細胞を用いたオリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指した細胞障害モデルが構築できた。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333.から引用した。

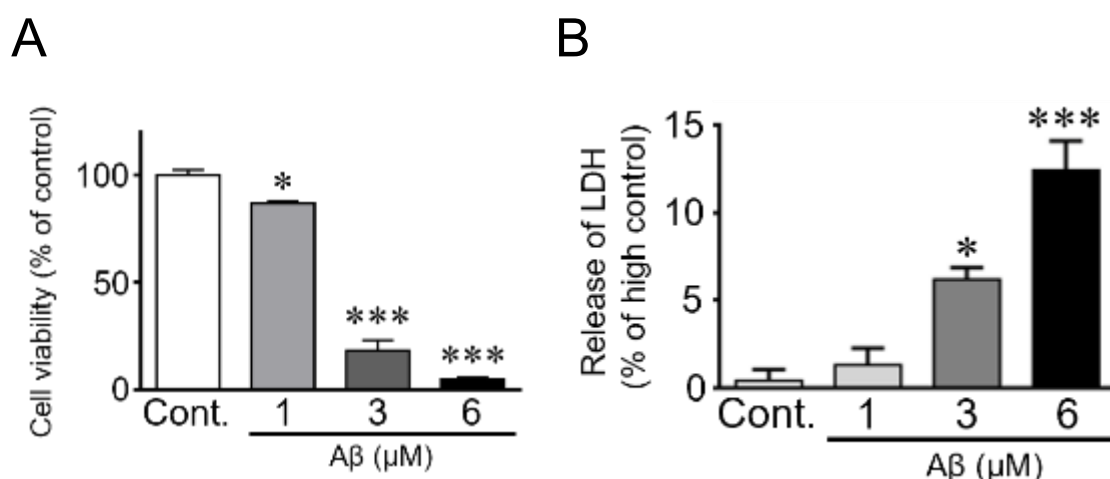


Figure 5. Analysis of isoA β -induced cytotoxicity using hiPS cell-derived ACh neurons.

A-B, hiPS cell derived ACh neurons were treated with isoA β (1-6 μ M) for 48 h; cell viability and cytotoxicity were analyzed by the WST-8 (A) and LDH assays (B), respectively. Data represent mean \pm SEM (A, B; n = 3). The statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post-hoc Bonferroni's/Dunn's test. * P < 0.05, *** P < 0.001, vs. control (Cont.).

1-3-6. hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いた isoA β による神経障害と A β の空間的局在

isoA β 処置による ACh 神経障害の詳細をさらに解析するため、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞の形態変化を評価した。isoA β を処置してから 48 時間、Rhodamine-phalloidin (赤色) を用いて細胞骨格の actin を染色したところ、control 群では細胞骨格が保持されていることが確認できた (Fig. 6A)。一方で、A β 処置群においては、A β が細胞表面に沿って強固に接着していることが確認できた (Fig. 6B 左パネル)。さらに、A β が存在している部分の細胞骨格は、control 群で見られた様な細胞骨格が保持された様子は得られず、細胞骨格が障害を受けていることが確認できた (Fig. 6B 右パネル)。

次に、ACh 神経の樹状突起に対する isoA β 処置の影響を解析したところ control 群では、分断等のない樹状突起の伸展がしっかりと観察できた (Fig. 6C)。一方で、isoA β 処置群では、A β が樹状突起に絡み付き (Fig. 6D 左パネル、白矢印)、樹状突起が断片化されている様子がみられた (Fig. 6D 右パネル、白矢印)。以上の結果より、isoA β による ACh 神経障害には、細胞体表面や樹状突起への A β の接着が深く関与することが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333. から引用した。

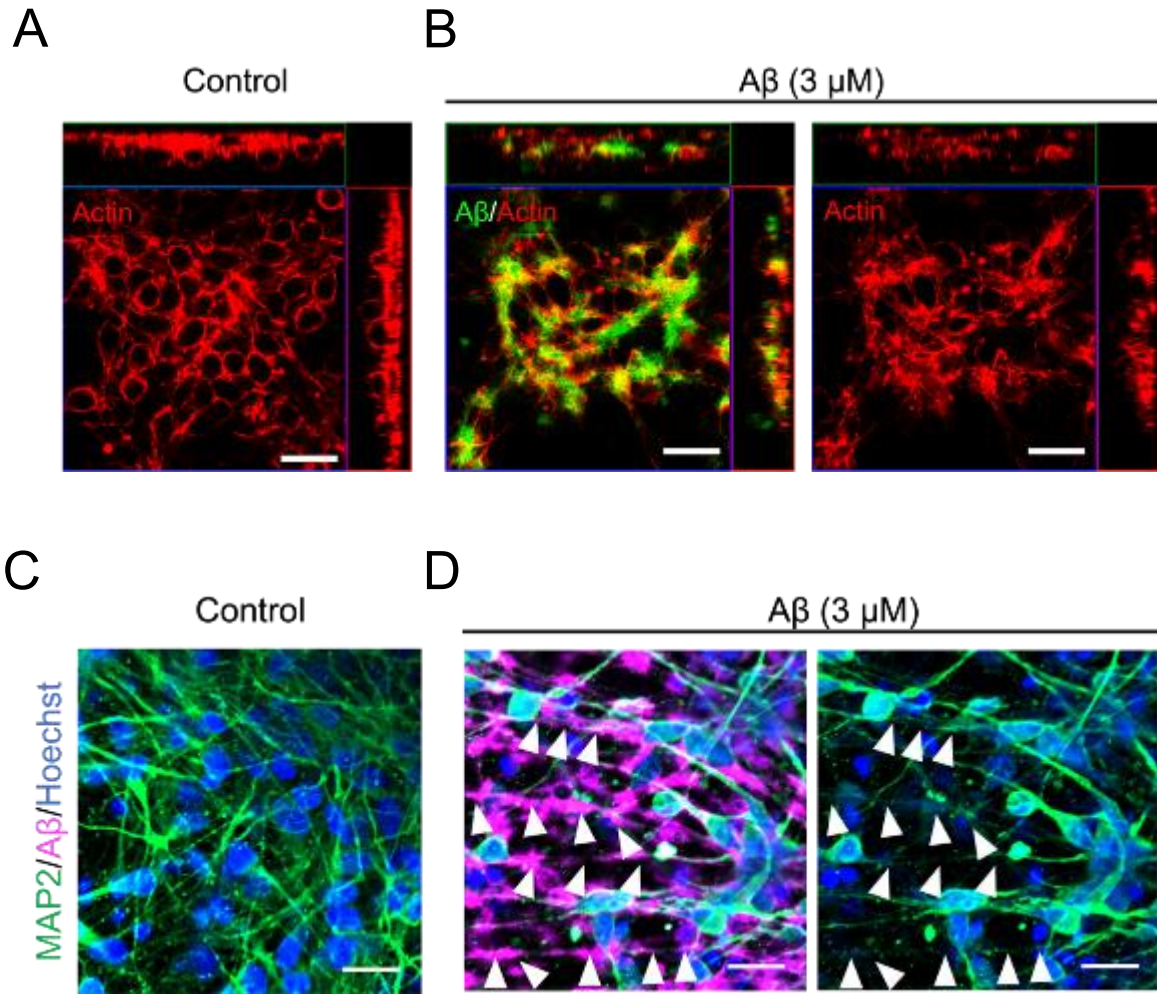


Figure 6. Neurodegenerative effects of isoAβ in hiPS cells-derived ACh neurons.

A-D, Confocal laser scanning microscopy was performed using antibodies against Aβ [green in (B) and magenta in (D)], actin [cell morphology marker, red in (A)], and MAP2 [dendrites, green in (C) and (D)]. Representative images of cell bodies and neurites are shown in (A) and (B) (Z-stack). Nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue) in (C) and (D), and arrow heads show damaged dendrites. Scale bars, 20 μm.

1-4. 考察

本章では、A β オリゴマー仮説およびコリン仮説を考慮した培養細胞系での神経障害モデルの構築および神経障害が生じる機序の解明を目的とした解析を行った。

A β は凝集性が非常に高く、A β オリゴマーは凝集過程で一時的に形成されるためその構造の維持が困難である。本解析においても、細胞に native A β ₁₋₄₂ をそのまま処置しても細胞障害が誘発されなかった。これは用いた native A β ₁₋₄₂ が調製中に凝集を開始しており、細胞に処置した時点でフィブリルを含む様々な凝集体の混合物となり、十分な量ならびに時間の A β オリゴマーを細胞に曝露できなかったためであると考えられる。そこで本研究では、native A β ₁₋₄₂ の代わりに溶媒の pH によって凝集開始を制御可能な isoA β を用いることで、細胞障害の誘発に十分な A β オリゴマーを細胞に曝露できるのではないかと考えた。この isoA β を中性条件下で静置して経時的な凝集を解析すると、時間依存的にモノマーからオリゴマーを経てフィブリルを形成することがわかった。それぞれの静置時間の A β 凝集体を SH-SY5Y 細胞へ処置すると、66 - 1048 kDa の A β オリゴマー、すなわち、A β Os およびプロトフィブリルが豊富に存在する静置時間が 12 時間までの A β 凝集体を処置することで細胞障害が誘導されることが確認できた。すなわち A β オリゴマーがフィブリルより強い細胞障害を示すことが示唆された。

本研究において、A β オリゴマーと A β フィブリルの細胞障害性を比較し、A β オリゴマーの強い細胞への接着性が細胞障害に深く関与することが示唆された。これまでの研究において、A β オリゴマーは細胞膜に接着して膜孔を形成することや、¹¹⁾ グルタミン酸受容体のサブタイプの一つである NMDA 受容体に作用することで、細胞内の恒常性を破綻させることが報告されている。⁵²⁾ また近年の研究より、A β オリゴマー自体が細胞膜表面に発現しているタンパク質に結合し、エンドサイトーシスに関与するタンパク質であるクラスリンなどを介して細胞内に取り込まれることが報告されている。⁵³⁾ この A β と結合する細胞膜発現タンパク質は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 ¹⁵⁴⁾ やプリオンタンパク質 ⁵⁵⁾ が知られている。さらに細胞内に取り込まれた A β オリゴマーは、シナプスの可塑性を阻害することや、ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解を抑制することが知られている。このため、過剰にリン酸化されて神経軸索から遊離するタウタンパク質や細胞内に取り込まれた A β オリゴマーそのものが細胞内に蓄積して細胞障害を誘導することが報告されている。⁵⁶⁾ また、A β オリゴマーは A β フィブリルよりも容易にエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれることが報告されており、⁵⁷⁾ 以上の報告は、A β オリゴマーが細胞障害を誘導する作用点が細胞表面に存在することを示唆するものである。本解析では、A β フィブリルに比べ A β オリゴマーにおいて細胞との接着性が高いことが示されたが、この接着度がどのような要因で生じるのかは今後の研究課題である。

これまで AD に関する研究領域で多用されてきた SH-SY5Y 細胞はがん細胞に由来する神経芽細胞種である。実際の分化・成熟した神経細胞とは異なり、増殖能を持ち不死化細胞としての性質を示す。⁵⁸⁾ さらに SH-SY5Y 細胞は、樹状突起に発現する MAP2 のような成熟神経マーカーを発現しない。^{59,60)} 一方、本研究で用いた hiPS 細胞から分化誘導した ACh 神

経は、MAP2 を発現する多数の樹状突起を形成しており、そのため A β と樹状突起の接着について評価することができた。AD 患者の脳では発症早期に樹状突起が萎縮することが報告されており、⁶⁾ 本研究により、A β 接着が樹状突起の萎縮の引き金となる可能性が示唆された。本研究で構築した isoA β と hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いた細胞障害モデルによる更なる機序の解明が期待される。

hiPS 細胞を用いた ACh 神経への分化誘導方法に関して、これまでの報告では hiPS 細胞の未分化状態の維持にマウス由来のフィーダー細胞との共培養を必要としており、また、分化誘導時にはリコンビナントタンパク質の分化因子を多用している。²⁸⁻³⁰⁾ フィーダー細胞の使用は、異種細胞かつ目的外の細胞の混入を招き、⁴¹⁻⁴³⁾ リコンビナントタンパク質の使用はコスト面の他、ロット差や半減期の短さなどから分化誘導効率の低下をもたらすこともある。⁴⁴⁾ 本研究では、フィーダー細胞フリー環境下で hiPS 細胞を未分化状態で維持培養し、また、分化誘導にはリコンビナントタンパク質の代わりに化合物を主体とした分化誘導方法を用いることで、コスト面で優れ簡便かつ再現性の高い分化誘導方法の確立を目標とした。その結果、今回の分化誘導方法を採用することで、分化誘導 16 日目において FOXG1、NKX2.1 や ISLET-1 といった前脳基底部の発生を示すマーカータンパク質の発現が確認でき、さらに分化 24 日目では、アセチルコリン合成酵素である ChAT が約 86%の細胞で発現していた。既報の ACh 神経への分化誘導方法²⁹⁾ では、ChAT 発現率が誘導開始から 35 日目において 20-40%程度である。最近報告された Krajka らの誘導方法では、分化誘導開始 60 日目にて ChAT の発現が確認され、96 日目で約 32.7%の神経で活動電位の発生が確認されている。²⁸⁾ 電気生理学的解析は今後の課題であるが、本研究で構築した誘導方法は、既報と比べてもより早くより効率的に ChAT を発現する機能性ヒト ACh 神経を産生できることになる。以上から、本研究において、フィーダー細胞フリー環境下で化合物を用いた簡潔かつ費用面ならびに誘導日数においても効率的な利便性の高いヒト ACh 神経への分化誘導方法が構築できた。本誘導方法により作製したヒト ACh 神経が AD 研究やその他の脳科学全般の発展に寄与することが期待される。

第 1 章では、isoA β および hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いることで、A β オリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指した A β オリゴマー誘発神経障害モデルを構築した。このモデルを用いた解析により、A β による ACh 神経障害には A β の細胞表面や樹状突起への接着が深く関与することが示唆され、また、その接着は、A β フィブリルよりも A β オリゴマーの方が強いことがわかった。第 2 章では、さらに本モデル系を用いて A β オリゴマーによる神経障害作用を抑制する化合物の探索、および、その保護作用機序の解析を行った。さらには、A β オリゴマーに対するイメージングについて検討した。

第 2 章 *Bacopa monniera* 抽出エキスをを用いた A β 結合性低分子化合物の探索およびその神経保護作用の解析と放射性同位元素標識体による A β の検出

2-1. 緒言

現在世界で使用されている AD 治療薬は、主にアセチルコリンの分解を抑制するコリンエステラーゼ阻害剤である。この薬剤は神経細胞死を抑制する作用は示さず、一時的な病態の進行を抑制する作用のみを持つとされている。そのため、A β による神経障害を抑制する作用を持つ AD 治療薬の開発が求められている。また、生体での脳内 A β 蓄積の検出方法の確立は、早期診断のみならず、新規 AD 治療法の開発にむけた客観的な効果の判定のためにも重要な開発課題である。

天然物は、その含有成分に様々な化合物を有しており新規薬物の探索に用いられている。⁶¹⁾ また、含有する化合物の多様性から、天然物は、新規治療薬のリード化合物探索におけるライブラリとして有用である。このように、A β オリゴマーの検出や、A β オリゴマーによる神経障害に対する保護作用を有する化合物の探索に天然物を用いることは大変有用であると考えられている。⁶¹⁻⁶³⁾ 天然物から探索され AD 関連の研究が進められた例としてクルクミンがある。クルクミンはウコンをはじめとするショウガ科植物に広く含有される成分であり、A β の凝集抑制作用、⁶⁴⁾ A β が誘発する酸化ストレスからの神経細胞保護作用、⁶⁵⁾ さらに、脳内 A β の蓄積抑制作用⁶⁴⁾ を有することが報告されている。さらに近年では、このクルクミンの構造を応用して作出された A β オリゴマーに特異的な結合を示す誘導体も報告されている。⁶⁶⁾

脳内 A β の検出方法については古くから研究が進められており、1997 年に放射性同位元素の Tc-99m を標識した抗 A β 抗体の報告があり、⁶⁷⁾ AD 患者への投与が実施されたが、血液脳関門を通過せず、脳内に ^{99m}Tc 標識抗 A β 抗体が移行しないという問題点があった。この問題に対して 2008 年に、放射性同位元素 ¹¹C で標識した Pittsburgh compound-B (PiB) を用いることで、脳内 A β 蓄積を検出することが可能であることが報告された。⁶⁸⁾ ¹¹C 標識 PiB は比較的広く使用されているが、¹¹C の半減期が 20 分と短時間であるという問題点がある。⁶⁹⁾ また、抗 A β 抗体および PiB 化合物で A β フィブリルの検出は可能であるが、A β オリゴマーの検出は困難とされている。⁷⁰⁾ 一方、上記で述べたクルクミン誘導体は、脳内の A β オリゴマーの検出が可能であることが報告されており、⁶⁶⁾ A β がフィブリルとなって蓄積する前の早期段階で AD の診断に応用できる可能性を示唆している。このように、AD 治療薬開発において、天然物からの化合物探索も大変重要なリソースとなり得ることが期待されている。

Bacopa monniera は、トリテルペノイドサポニンを成分として含み、古くからインドの伝統医学のアーユルヴェーダ医学で記憶力増強作用を目的に使用されているハーブの一種である。^{71,72)} この作用を裏付けるように、脳内に A β が蓄積したマウスに *B. monniera* エキスを長期間投与すると、脳内 A β 量が脳皮質ならびに海馬において減少することが報告されている。⁷³⁾ さらに、*B. monniera* はラットの初代培養神経細胞を用いた解析において、A β による細胞内酸化ストレスの発生を軽減することで神経障害を抑制することも報告されている。⁷⁴⁾ これらの報告より、*B. monniera* には A β の神経障害から神経を保護する作用を持つ物質が含ま

れることが考えられる。しかし、脳内 A β の減少や A β による神経障害を抑制する成分 (化合物)、ならびに、詳細な神経保護作用機序は解明されていない。そこで *B. monniera* 成分の中から、A β による神経障害に対して神経保護作用を持つ化合物を特定し、その構造や神経保護作用機序を解明することは、A β 治療方法の開発において重要な手がかりになると考えた。

本章では、A β オリゴマーに結合性を持つ低分子化合物を *B. monniera* の全草抽出エキスから探索し、nuclear magnetic resonance (NMR) および mass spectrometry (MS) データにてその化合物を同定した。さらに、本化合物による A β の神経障害に対する神経保護作用について、第1章で構築した A β オリゴマー誘発ヒト ACh 神経細胞障害モデルを用いて解析した。また、放射性同位元素 ^{125}I 標識体によるマウス脳切片上での A β の検出について解析した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 実験動物

マウスは C57BL/6 雄マウス (生後 10 週齢; オリエンタルバイオサービス、京都、日本) を用いた。APdE9 雄マウス (9 ヶ月齢) は、Jackson Lab. (Bar Harbor、ME、USA) より購入したマウスを C57BL/6 マウスと交配して系統維持して実験に用いた。動物は 25°C の恒温にて飼育し、水や餌は自由に摂取させた。照明は 12 時間サイクルとした。動物実験は「動物実験に関する指針 (日本実験動物学会)」および「京都薬科大学動物実験に関する指針」に従った。なお、本研究の動物実験は京都薬科大学動物実験委員会 (承認番号 : DIPS19-001) にて承認を得ている。

2-2-2. *Bacopa monniera* と抽出エキス

Bacopa monniera 全草の methanol (MeOH) 抽出エキスは既報で調製したものを使用した。⁷⁵⁾

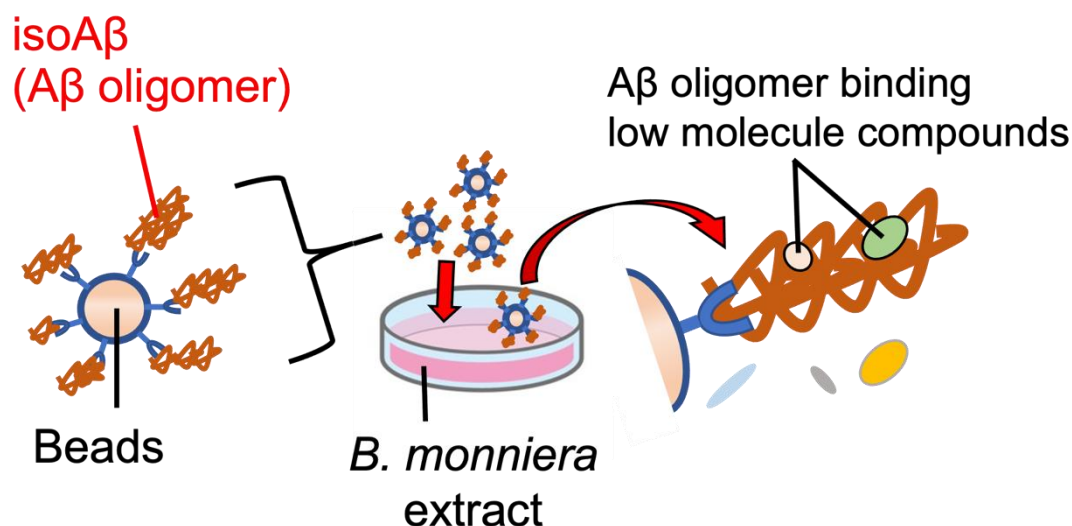
2-2-3. *B. monniera* 由来 A β 結合性低分子化合物の探索

既報⁷⁶⁾の方法を応用し、A β 凝集体を結合させたセファロース®ビーズ (Cytometric Beads Array Functional Bead A9; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて A β 結合性低分子化合物を探索した (Schema 3)。具体的には、まず 6 μ M isoA β を PBS 中で 1 時間または 24 時間、37°C で凝集させ、フィルター (10 kDa; Amicon Ultra centrifuged filters; Merck Millipore) で濃縮した。濃縮した A β 凝集体を N-2[(4-maleimidomethyl)cyclohexylcarbonyloxy]sulfo succinimide (sulfo-SMCC) と 1 時間室温で反応させ、A β と sulfo-SMCC を結合した。次にセファロース®ビーズと 1 M の dithiothreitol を混合して、セファロース®ビーズの表面上に存在するジスルフィド結合をチオール基に還元して活性化させた。活性化させたセファロース®ビーズを遠心して上清を除いた後、20 μ L の Coupling Buffer (BD Biosciences, California, USA) に再度懸濁し、sulfo-SMCC を結合した A β (sulfo-SMCC-A β 結合物) と混合して室温で 1 時間攪拌させ sulfo-SMCC-A β 結合物とセファロース®ビーズを反応させた。セファロース®ビーズ表面の未反応 SH 基は、N-ethylmaleimide を加えて 15 分間室温で反応させることで保護した。最後に A β 凝集体を結合させたセファロース®ビーズを Functional Bead Conjugation Buffer Set 中に含まれる Storage Buffer (BD Biosciences) を加えて 900 \times g で遠心して洗浄を 3 回実施した。全ての反応は暗所で行った。

2-2-4. *B. monniera* 由来 A β 結合性低分子化合物の解析

上述した *B. monniera* の MeOH 抽出エキス (100 g) を、ethyl acetate (EtOAc) と H₂O で溶媒分配し、EtOAc 可溶性画分 (15.8 g、15.8%) と H₂O 可溶性画分 (84.2 g、84.2%) を得た。10 mg の EtOAc 可溶性画分を 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む高純水で溶解し、10,000 \times g で 10 分間遠心した後、フィルターで濾過して不溶物を取り除いた。その後、EtOAc 可溶性画分を前述の A β 凝集体結合セファロース®ビーズと混合して室温暗所で 1 時間反応させた。遠

心分離 (900×g) して洗浄後、ethanol (EtOH) を加え、100℃で湯せんして Aβ と結合した成分を分離させた。遠心分離 (900×g) 後、上清を回収して検体とした。



Schema 3. Exploration of Aβ oligomers-binding low molecule compounds from *B. monniera*

回収した検体中に含まれる化合物について、liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) を用いて分析した。LC/MS は液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析装置 (LCMS-8040; 島津製作所、京都、日本)、カラムは Cosmosil 5C₁₈-MS-II (粒子径 5 μm、内径 2.0 mm×150 mm; ナカライテスク)、ソフトウェアは LabSolutions LCMS Ver.5.6 software (島津製作所) を用いた。LC 条件は formic acid で pH3.0 に調製した H₂O と acetonitrile (MeCN) を移動相とし、グラジエント解析 (測定開始時 MeCN:H₂O = 10:90、1 時間後 MeCN:H₂O = 100:0) で実施した。MS 条件は、ネブライザーのガス流量を 3 L/min、乾燥ガスの流量を 15 L/min、desolvation line の温度を 250℃、heat block の温度を 400℃に設定して測定した。以前の研究⁷⁵⁾で *B. monniera* からの既知化合物の精製のためにおこなった移動相および保持時間等に関する検討 (条件検討 A) を参考に、HPLC の結果より各ピークに当たる化合物を推定した。

2-2-5. Plantainoside B の単離と同定

B. monniera の EtOAc 可溶性画分 (14.0 g) を展開溶媒 [CHCl₃:MeOH (v/v): 30:1 → 15:1 → 7:1 → 5:1 (v/v) → MeOH] として chloroform (CHCl₃) および MeOH の混合溶液を用いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (順相シリカゲル 840 g) により、10 個の画分 (Fraction; Fr) に分離した。それぞれの画分の収量は、Fr.E1 (2.2 g)、Fr.E2 (1.6 g)、Fr.E3 (0.3 g)、Fr.E4 (0.4 g)、Fr.E5 (0.9 g)、Fr.E6 (1.5 g)、Fr.E7 (4.8 g)、Fr.E8 (0.7 g)、Fr.E9 (0.8 g)、Fr.E10 (0.9 g) であつ

た。前述の条件検討 A より Fr.E7 に、目的とする化合物が含有されていることが推定されたため、Fr.E7 (1.1 g)を用いて HPLC [SPD-20A (島津製作所)] で精製した。HPLC の設定は、移動相を MeCN:H₂O:acetic acid (CH₃COOH)=14:86:0.3 とし、カラムは Cosmosil 5C₁₈-MS-II (粒子径 5 μm、内径 10 mm × 250 mm; ナカライテスク) を使用して plantainoside B (45.9 mg、0.228%) と考えられる化合物を単離した。本化合物について、NMR [JEOL JNM-ECA600 (600 MHz); JEOL Ltd.、東京、日本] の ¹H-NMR と ¹³C-NMR データ、および、MS スペクトルデータを用いて構造解析し、既報⁷⁾と比較して、plantainoside B であることを同定した。単離精製した plantainoside B をこれ以降の研究において使用した。

2-2-6. Plantainoside B の isoAβ 細胞障害に対する神経保護作用の解析

hiPS 細胞由来 ACh 神経細胞を用いて WST-8 assay および LDH assay を行った。hiPS 細胞由来 ACh 神経細胞は、分化誘導 16 日目の細胞を 96 well プレートに 1.5×10^5 cells/well 播種し、8 - 12 日間培養した。成熟用培地に交換し、3 μM Aβ と 1 - 30 μM plantainoside B を hiPS 細胞由来 ACh 神経細胞に処置した。48 時間、5%CO₂、37°C の環境下で培養した。48 時間後、Cell Count Reagent SF を処置し、WST-8 assay (詳細は 1-2-5 を参照) にて細胞生存率を解析した。一方、細胞障害については LDH cytotoxicity assay kit を用いて解析した (詳細は 1-2-5 を参照)。

2-2-7. 免疫蛍光細胞染色

hiPS 細胞由来 ACh 細胞をマルチウェルガラスボトムディッシュ (松波硝子) に播種した。PBS (-) で 3 回洗浄した後、4% paraformaldehyde (PFA) を処置し、4°C で 30 分間静置した。再度 PBS (-) で 3 回洗浄し、0.1% Triton X 含有 PBS (PBST) を処置して、10 分間室温で静置した。一次抗体は、マウス抗 Aβ 抗体 (clone 6E10; 1:500) を 5% ロバ血清含有 PBST で溶解し、細胞へ処置して 4°C で一晩反応させた。二次抗体は、Alexa488 標識ロバ抗マウス抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞骨格の一つである actin の標識は Rhodamine-phalloidin (1:3,000; Thermo Fisher Scientific) を PBST で調製し、室温・遮光で 2 時間細胞と反応させた。各蛍光物質は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800; Carl Zeiss) を用いて観察した。

2-2-8. 細胞内 Ca²⁺ imaging

細胞内 Ca²⁺過剰流入について、細胞内で Ca²⁺と錯体を形成して蛍光を発する fluo-4 AM (Thermo Fisher Sciences) を用いて解析した。分化誘導 16 日目の hiPS 細胞由来 ACh 神経細胞をマルチウェルガラスボトムディッシュに 1.5×10^5 cells/well 播種し、8 - 12 日間培養した。ACh 神経に fluo-4 AM の終濃度が 10 μM になるように細胞培地で調製し、30 分間 37°C で静置した。Fluo-4 AM 非含有培地で細胞表面を洗浄後、3 μM Aβ と 1 - 30 μM plantainoside B を細胞へ 2 時間処置した。インキュベーションチャンバーを用いて細胞培養環境を 37°C、5%CO₂ に維持し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800; Carl Zeiss) を用いて 5 分ごとに 3 時間蛍光を観察した。

2-2-9. ミトコンドリアの内膜電位の解析

ミトコンドリア障害の指標として、JC-1 MitoMP Detection Kit (DOJINDO、熊本、日本) を用いてミトコンドリアの内膜電位変化を評価した。JC-1 は構造中にカチオンを持つ化合物で、ミトコンドリア内膜と親和性を示す。膜電位が分極している際は、JC-1 が凝集体を形成して赤色蛍光を示す。一方で、ミトコンドリア膜電位が脱分極している際は、JC-1 は凝集体を形成せず単量体となり緑色蛍光を示す。本試薬を用いて、赤色蛍光と緑色蛍光の割合を算出し、内膜電位の変化を解析した。分化誘導 16 日目の hiPS 細胞由来 ACh 神経細胞をマルチウェルガラスボトムディッシュに 1.5×10^5 cells/well 播種し、8 - 12 日間培養した。その後、3 μ M A β と 1 - 30 μ M plantainoside B を細胞へ処置し、48 時間 5%CO₂、37°C の環境下で培養した。新鮮な培地で洗浄後、JC-1 試薬の終濃度が 2 μ M になるように調製して、細胞へ処置し、30 分間 37°C、5%CO₂ 環境下を維持した。再度新鮮な培地で洗浄した後、kit に含まれている 10 倍濃度の Imaging solution を滅菌した高純水で希釈し、細胞に処置して蛍光を測定した。蛍光測定は、GloMAX (Promega、Madison、USA) にて、緑色蛍光を 475 nm/500 - 550 nm、赤色蛍光を 520 nm/580 - 640 nm のフィルターを用いて測定した。

2-2-10. Thioflavin-T (ThT) fluorescence assay を用いた plantainoside B による A β 凝集抑制の解析

6 μ M A β と 100 μ M plantainoside B を PBS で溶解し、1 - 24 時間 37°C、5%CO₂ で静置した。各時間サンプルを回収し、ThT を終濃度が 10 μ M になるように加えて、蛍光を測定した。蛍光測定は、蛍光分光光度計 (F-7000; 日立、東京、日本) を用いて 445 nm の励起波長を用いて、485 nm の蛍光波長を測定した。

2-2-11. 原子間力顕微鏡を用いた plantainoside B による A β 凝集抑制の解析

6 μ M A β と 100 μ M plantainoside B を PBS で溶解し、24 時間 37°C、5%CO₂ で静置した。A β を高純水で希釈 ($\times 10$) し、マイカ基盤上 (Nilaco Corp、東京、日本) に滴下して 10 分間室温で静置した。マイカ基盤を洗浄後、Nanoscope IIIa Tapping Mode AFM (Veeco Instrument、Plainview、NY) と single-crystal microcantilever (OMCLAC160TS-R3; Olympus、東京、日本) を用いて A β の凝集を測定した。各サンプルは少なくとも 3 視野撮影した。

2-2-12. Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis による A β の凝集解析

6 μ M A β と 100 μ M plantainoside B を細胞培養液 (1%FBS を含む) で溶解し、1 - 48 時間 37°C、5%CO₂ で静置した。各時間サンプルを回収して 4 倍濃度の NativePAGE Sample Buffer と混合させた。回収したサンプルは、4 - 16% Bis-Tris mini protein gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて電気泳動し、凝集体の大きさごとに分離した。電気泳動後、PVDF メンブレンに転写した。PVDF メンブレンは、転写後 0.05% TBST で洗浄し、抗体の非特異的な結合を阻害するため、Bullet Blocking One for Western blotting (ナカライテスク) を 5 分間処置した。一次抗体として抗 A β 抗体 (clone 6E10; 1:2,000) を Bullet Immunoreaction Buffer (ナカライテスク) で希釈し、4°C で 24 時間処置した。TBST で洗浄後、2 次抗体として Bullet Immunoreaction Buffer (ナカライテスク) で調製した HRP-linked secondary antibody against mouse IgG (1:2,000) を 30

分間室温で処置し、TBST で洗浄した。免疫反応性を Chemi Lumi One Super (ナカライテスク) を用いて化学発光させ、lumino-image analyzer (ImageQuant LAS500 system; GE Healthcare Life Science) にて検出した。

2-2-13. 放射性同位元素 ^{125}I を用いた plantainoside B の標識

Plantainoside B (500 μg) を MeOH (10 μL) で溶解し、*N*-クロロスクシンイミド (0.5 mg) を含む溶媒 (MeOH:CH₃COOH = 70:20, 90 μL) と混合した。 [^{125}I]NaI (15 MBq) を加え、室温で 30 分間振とうさせながら反応させた。N₂ ガスを吹き付けて溶媒を除去し、SPD-20A (島津製作所) ultraviolet 検出器 (220 nm、254 nm) と Radioisotope (RI) 検出器 Gabi Nova (Elysuaraytest, Liege, Belgium) を接続した reversed-phase-HPLC を用いて、 ^{125}I 標識 plantainoside B を精製した。精製用のカラムは、Cosmosil 5C₁₈-AR-II column (粒子径 5 μm 、内径 4.6 mm \times 150 mm; ナカライテスク) を使用し、移動相は H₂O と MeCN を使い、MeCN を 10% の濃度から開始して、30 分間で 50% になるように経時的に濃度を変化させた。流速は、1.0 mL/min に設定して、標識反応の進行、および精製は RI 検出器で検出されたピークを用いて評価した。得られた ^{125}I 標識 plantainoside B (3.2 - 5.9 MBq) は、実験への使用直前に N₂ ガスを用いて MeCN を除去した。放射能の測定は dose calibrator (IGC-8; 日立) を使用した。

2-2-14. Blue native ポリアクリルアミドゲルを用いた ^{125}I 標識 plantainoside B による plantainoside B の A β への結合性の解析

Plantainoside B の A β 凝集体に対する結合性は、blue native ポリアクリルアミドゲルを用いて検討した。あらかじめ isoA β を PBS で溶解し、1 - 6 時間 37°C、5%CO₂ 環境下で静置した。凝集後、20 MBq/mL になるように PBS で調製した ^{125}I 標識 plantainoside B と 4 倍濃度の NativePAGE Sample Buffer を混合し、サンプルとした。回収したサンプルは、Blue native ポリアクリルアミドゲルである 4 - 16% Bis-Tris mini protein gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて電気泳動した。泳動後のゲルは、photo-imaging plate (Fujifilm Plate BAS-TR2025; 富士フィルム、東京、日本) に 24 時間コンタクトし、imaging analyzer (Typhon 9410; GE Helthcare) で放射能を検出した。

2-2-15. マウス脳切片における ^{125}I 標識 plantainoside B を用いた plantainoside B の A β 結合性の解析

9 ヶ月齢の雄の AD モデルマウス (APdE9) と wild-type マウスから摘出した脳から切片を作製して実験に用いた。マウスから脳を摘出する際に、三種混合麻酔を用いた。三種混合麻酔は、0.3 mg/kg メデトミジン塩酸塩 (ドミツール; ZENOAQ、福島、日本)、4 mg/kg ミダゾラム (ドルミカム; 丸石製薬、大阪、日本)、5 mg/kg ブトルファノール酒石酸塩 (ベトルファール; Meiji Seika ファーマ、東京、日本) を生理食塩水 (テルモ、東京、日本) と混合して使用した。三種混合麻酔をマウスの腹腔内に投与した後、開胸し、左心室から PBS により灌流した。灌流後 4%PFA を循環させ、固定した後に脳を摘出した。摘出した脳は 4%PFA で 3 日間浸潤固定し、4 日目から 30%シュウクロース溶液中にて 3 日間脱水した。脱水後、optimal

cutting temperature compound (Sakura Finetek、東京、日本) を用いて凍結包埋し、クライオスタット (Leica Instruments、Nussloch、Germany) を用いて厚さ 20 μm の凍結切片を作製した。脳切片は PBS と混合して 350 MBq/mL となるように調製した ^{125}I 標識 plantainoside B に浸透して、室温で 2 時間振とうさせた。脳切片を PBS で洗浄後、スライドガラス (松波) に固定して photo-imaging plate (Fujifilm Plate BAS-TR2025; 富士フイルム) に 24 時間コンタクトし、imaging analyzer (Typhon 9410; GE Healthcare) で放射能を検出した。

2-2-16. 免疫組織染色

免疫組織染色は、フリーフローティング法で行い、蛍光染色は間接免疫蛍光法で行った。一次抗体は、マウス抗 A β 抗体 (clone 6E10; 1:2000) を処置して 4°C で一晩反応させた。二次抗体は、Alexa555 標識ロバ抗マウス抗体 (1:500; Thermo Fisher Scientific) を用いた。核染色に Hoechst33342 (1:4000) を用い、室温で遮光して 2 時間反応させた。各蛍光物質は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800; Carl Zeiss) を用いて観察した。

2-2-17. isoA β と plantainoside B のマウス海馬内投与

マウスに三種混合麻酔を腹腔内投与し、脳固定装置に固定した。PBS (-) 投与群を対照群として、20 μM isoA β 、20 μM isoA β と 30 μM plantainoside B を C57BL/6 マウスの左右両側の海馬 (冠矢交差から尾側へ 2.00 mm、外側へ 1.50 mm、硬膜下 2.00 mm) へマイクロシリンジ (Hamilton、Reno、NV、USA) を用いて 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で投与した。投与後、開頭部は医療用接着剤で狭窄した。脳固定装置からマウスを解放し、アチパメゾール塩酸塩 (0.3 mg/kg、アンチセダン; ZENOAQ) を腹腔内投与し、麻酔下から覚醒させた。

2-2-18. 新規物体認識試験

isoA β の海馬内投与による認知機能低下に対する plantainoside B の抑制作用を検討するため、投与 1 週間後のマウスの認知機能を新規物体認識試験にて評価した。本試験では、約 20 lx の照明下でオープンフィールド (縦×横×高さ、40 cm×40 cm×30 cm) を使用した。行動解析は、はじめに 10 分間マウスをオープンフィールドに入れて自由探索を行わせて、実験環境に馴化させた。30 分のインターバル後、形・色が異なる物体 O1 および O2 をフィールドの対角に設置して、マウスを 10 分間探索させた (trial phase)。24 時間後、物体 O2 を O3 に置き換えて配置し、再度マウスを 10 分間探索させた (test phase)。行動解析には EthoVision XT11.5 (Noldus Information Technology、Lessburg、VA、USA) を用いて、マウスが物体付近に滞在する時間を測定した。物体指向指数は、既存物体 (Familiar object) を O1、新規物体 (Novel object) を O3、Object 滞在時間を T_{Ox} として下記計算式にて算出した。

$$\text{物体指向指数 (Object preference index)} = T_{O3}/(T_{O1}+T_{O3}) \times 100 (\%)$$

2-2-19. 画像解析

A β の細胞表面への接着について、共焦点顕微鏡で撮影した画像をもとに、Rhodamine-

phalloidin で標識した細胞表面のアクチン骨格が占める面積と、A β が共局在する細胞表面積を画像解析ソフト (Photoshop version22.2.0.) を用いて測定し、その割合を算出した。1 実験あたり 10 枚の画像を解析し、平均値を算出して評価した。

2-2-20. 統計解析

全ての実験結果の解析は、統計解析ソフトである GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) を使用して実施した。得られた実験の結果は、平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で表示した。2 群間の比較は Student's t 検定を用いた。3 群以上の比較は、分散分析法 (analysis of variance; ANOVA) を用いて、検定には Bonferroni/Dunn 検定を用いた。両側検定により危険率 5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

2-3. 実験結果

2-3-1. *B. monniera* 全草抽出エキスの $A\beta$ 結合性低分子化合物の探索

$A\beta$ オリゴマーが豊富な iso $A\beta$ の 1 時間凝集体 (オリゴマー) またはフィブリルが豊富な 24 時間凝集体 (フィブリル) をセファロース®ビーズに結合させ、*B. monniera* 全草抽出エキスの EtOAc 可溶性画分と混合した。 $A\beta$ と結合した化合物を EtOH 中で $A\beta$ から剥離させた後、LC/MS で検体中に含まれる陽イオンと陰イオンをそれぞれ測定した。抽出した化合物の相対的な量をピーク面積値を用いて算出した。 $A\beta$ オリゴマーおよび $A\beta$ フィブリルを結合させたセファロース®ビーズから得られた検体間で抽出量にほとんど差がない化合物 (compound A、保持時間約 21 分) を基準物質とした (Fig. 7A)。この compound A に対する各化合物の相対的な抽出量を比較した。陽イオンの分析結果は、両検体間で抽出量に差が見られた化合物は確認できなかった (Fig. 7B)。陰イオンにおいては、10 - 15 分間で見られた 3 本のピークにおいて、 $A\beta$ オリゴマーを結合したセファロース®を用いて得られたピーク (Fig. 7C) の方が、 $A\beta$ フィブリルを用いたピーク (Fig. 7D) より高いことがわかった。その中でも、保持時間約 11 分の主成分のピーク (Fig. 7E, F) は、最も差が大きく (Fig. 7G)、このピークは、MS スペクトルの結果から m/z 値 477 の陰イオンであることがわかった。そこで、この化合物 ($m/z = 477$) について、 $A\beta$ オリゴマーにより結合性を示す化合物 compound X として以後の解析を進めた。その他の検出された化合物は、検体間での相対量に差がみられなかったり、 $A\beta$ フィブリルを用いた検体の方が相対量多かったり、または抽出量がわずかであった。

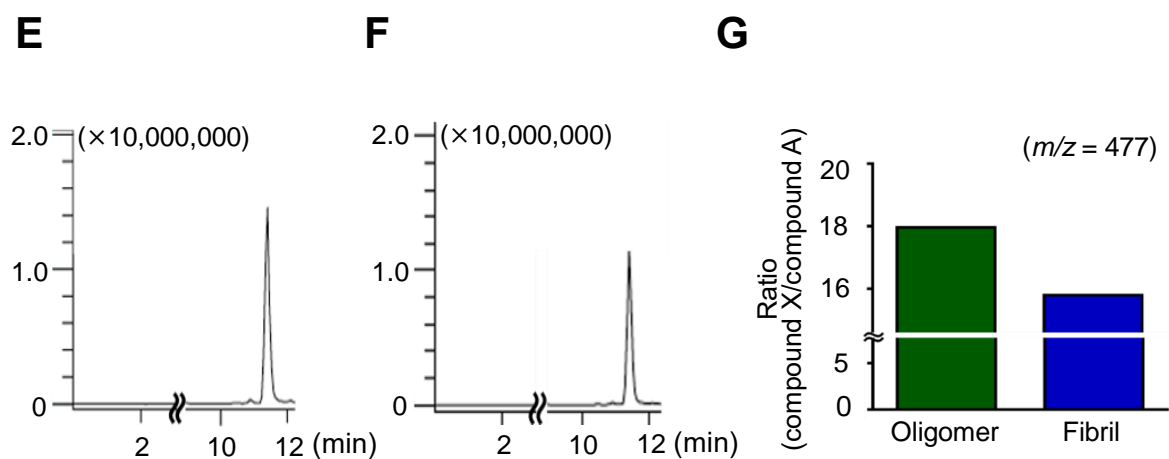
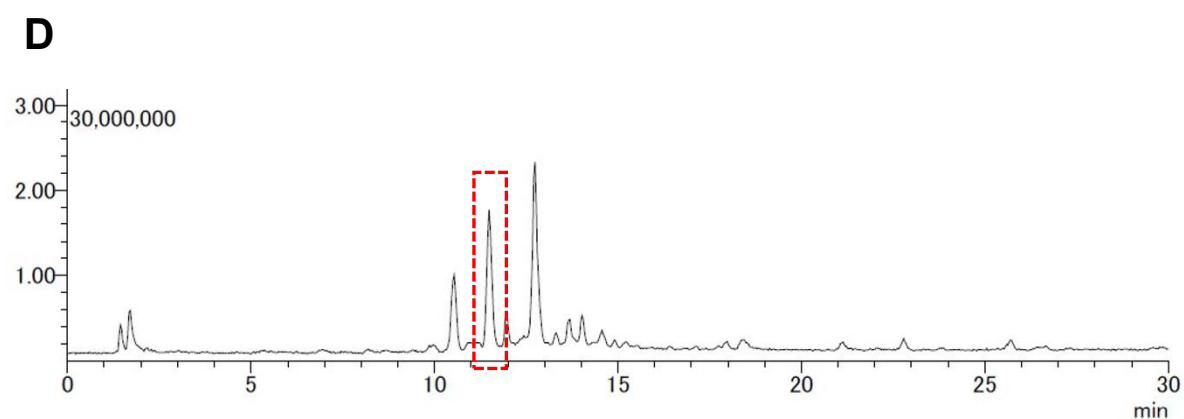
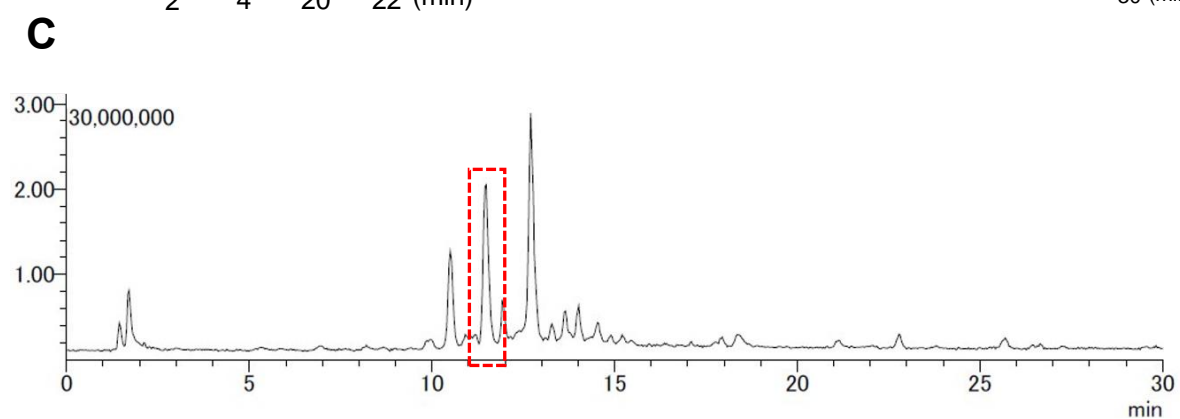
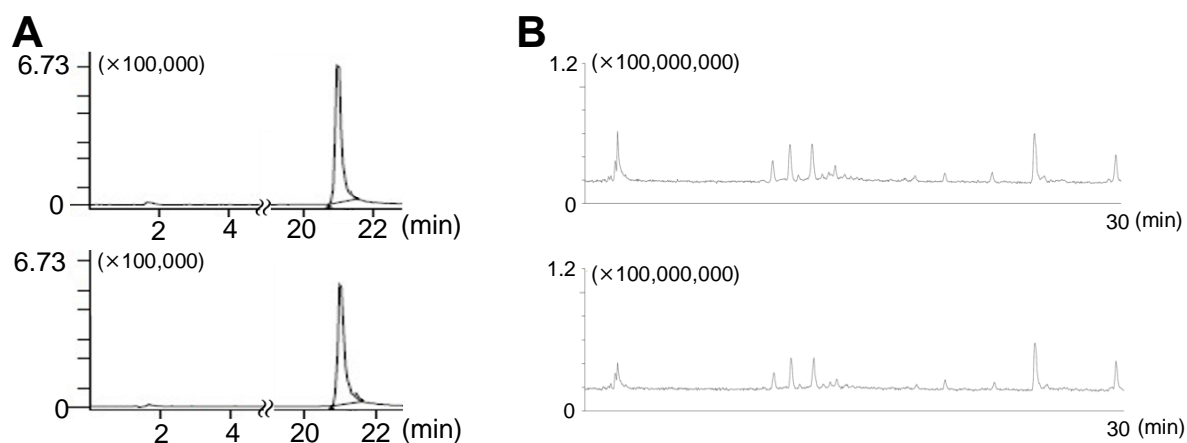


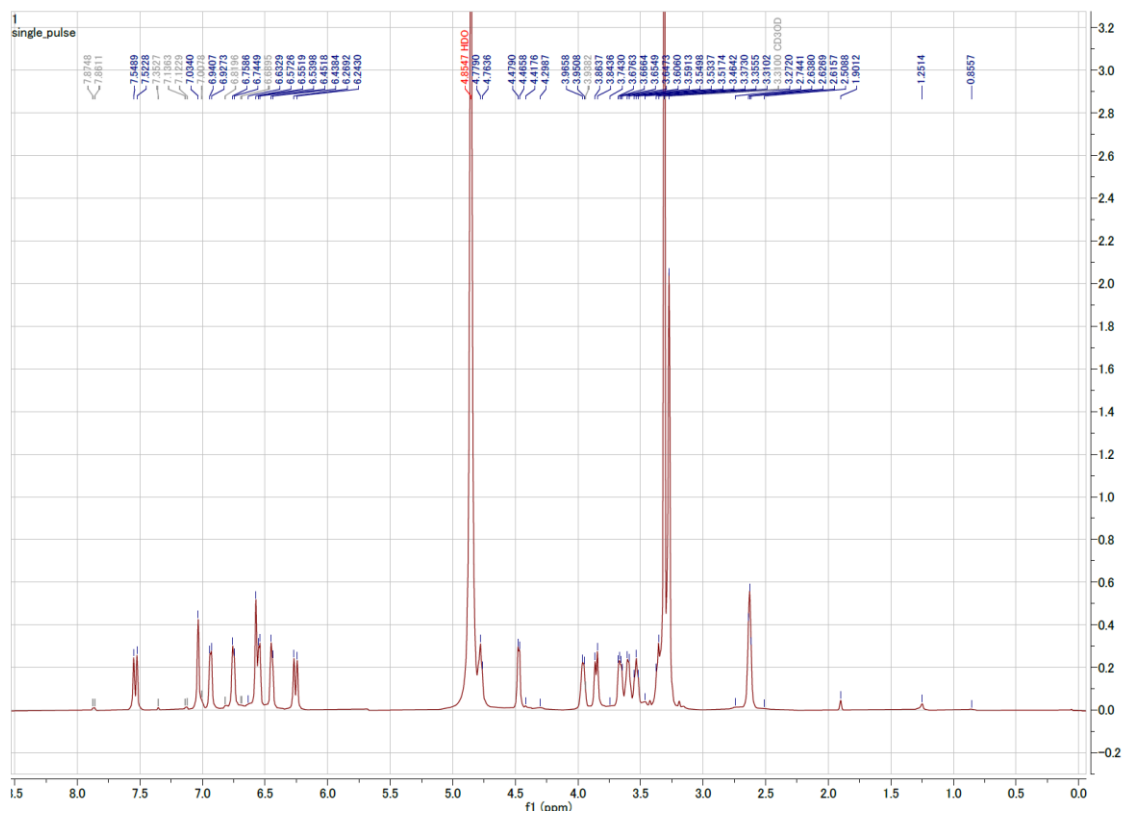
Figure 7. Exploration of A β -binding low-molecular-weight compounds from *B. monniera* extract.

A, MS chromatogram of compound A detected by LC/MS (negative ion) of oligomer sample (upper panel) and fibril sample (lower pannel). **B**, MS chromatogram of positive ion detected by LC/MS for 30 min with oligomer sample (upper panel) and fibril sample (lower sample). **C and D**, MS chromatogram of negative ion detected by LC/MS for 30 min indicate the compounds derived from *B. monniera* extract which were bound to A β oligomers (C) or fibrils (D). **E and F**, MS peaks of the oligomer sample (C, red dotted square) and fibril sample (D, red dotted square); MS spectral peaks were detected in the A β oligomer sample (E) and fibril sample (F) at approximately 11 min retention times. **G**, The relative amount of each compound in the A β oligomer sample or the A β fibril sample was determined based on the amount of compound A.

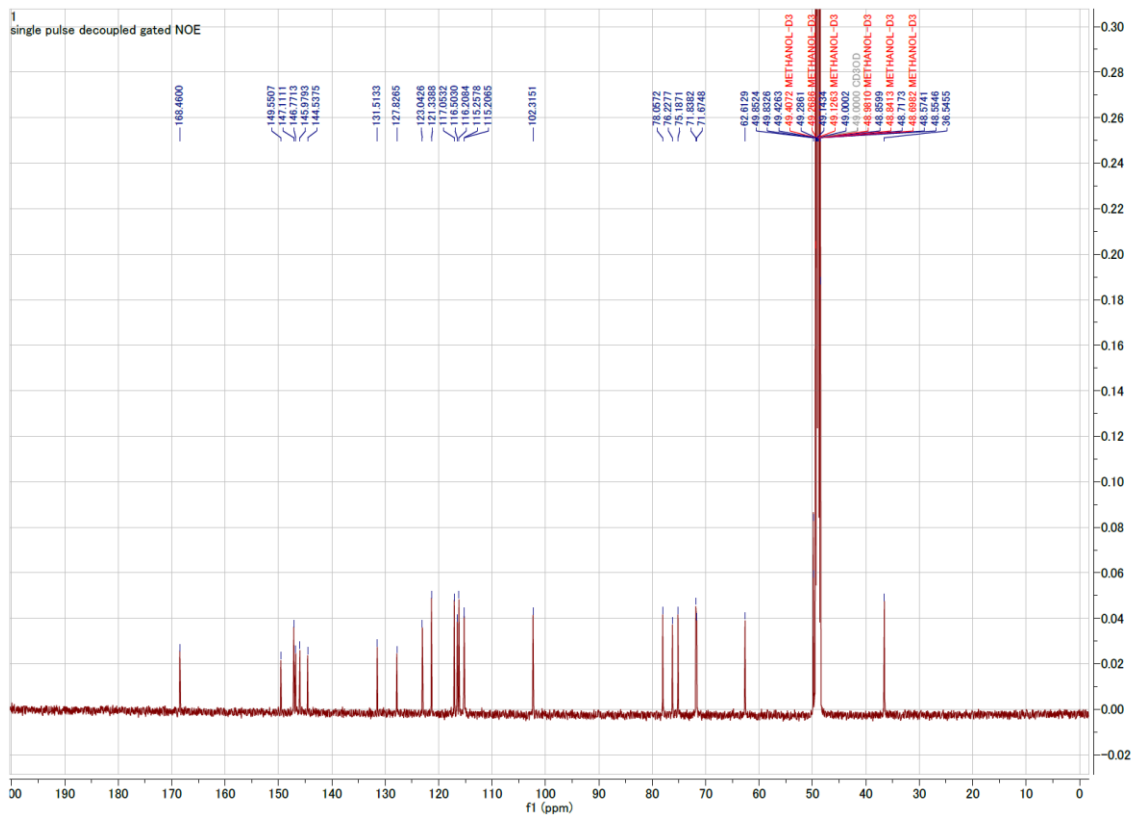
2-3-2. *B. monniera* 全草抽出エキスの plantainoside B の単離と同定

2-3-1 の分析で A β オリゴマーに結合性を示す化合物 compound X について、前述の条件検討 A より plantainoside B であることが推定された。そこで、本研究において、さらなる解析を進めるため、既報⁷⁵⁾を参考に *B. monniera* の EtOAc 可溶性画分から順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて plantainoside B を分離・精製した。単離化合物の NMR スペクトルデータ (Fig. 8A, B) と MS スペクトルデータ (Fig. 8C) を、既報⁷⁷⁾と比較した結果、分離・精製した物質が plantainoside B (分子量 478.45) (Fig. 8D) であることが確認できた。

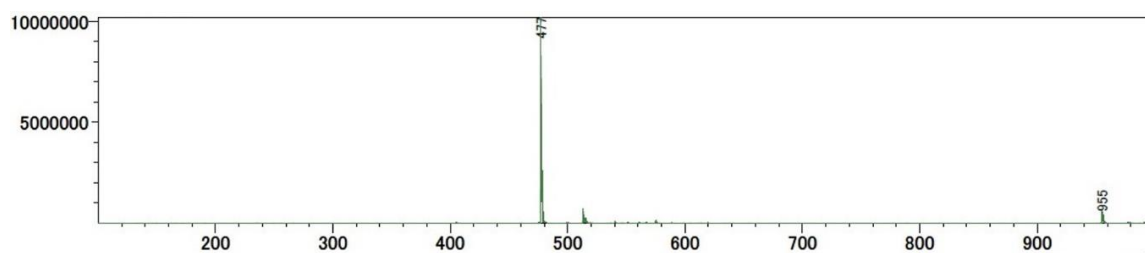
A



B



C



D

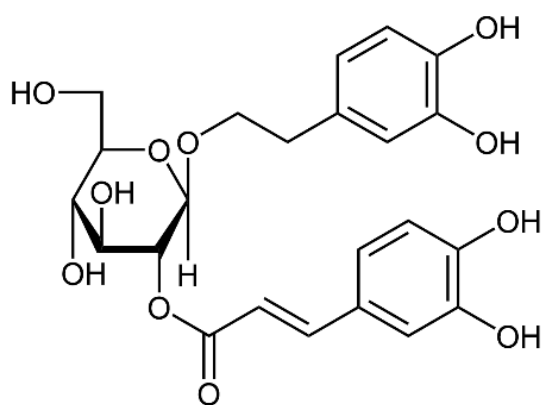


Figure 8. Isolation of plantainoside B.

A - C, The collected compound was analyzed by NMR and MS, in which ^1H -NMR (A), ^{13}C -NMR (B), MS spectrum (C) data were analyzed for identification. **D**, Chemical structure of plantainoside B.

2-3-3. Plantainoside B による A β オリゴマー誘発 ACh 神経障害抑制作用の解析

第1章にて作製した hiPS 細胞由来 ACh 神経を用いた A β オリゴマー誘発神経障害モデルを用い plantainoside B の神経保護作用について検討した。isoA β (3 μ M) と plantainoside B (1 - 30 μ M) を同時に hiPS 細胞由来 ACh 神経へ処置して 48 時間後の細胞障害について WST-8 assay と LDH assay で解析した。WST-8 assay において、plantainoside B の濃度依存的に isoA β 処置による細胞生存率の低下が抑制されることがわかった (Fig. 9A)。さらに、LDH assay の結果においても、plantainoside B の同時処置により濃度依存的な LDH 放出量の減少が見られたことから、isoA β による細胞膜への障害が plantainoside B により抑制されることがわかった (Fig. 9B)。以上より、isoA β によるヒト ACh 神経障害が plantainoside B の濃度依存的に抑制されることがわかり、plantainoside B の神経保護作用が示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333.から引用した。

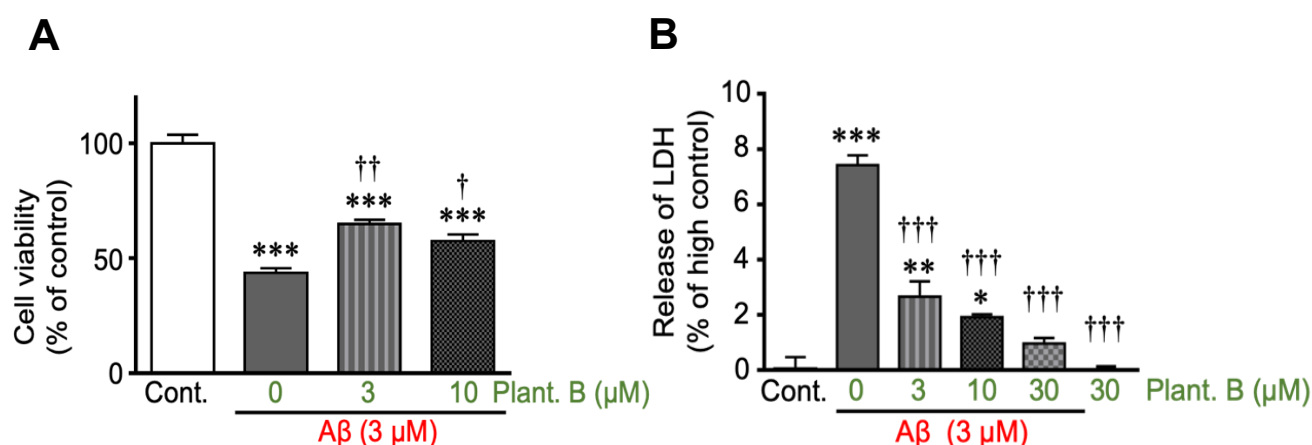


Figure 9. Analysis of neuroprotection of plantainoside B by A β neurotoxicity.

A and B, Cells were treated with isoA β (3 μ M) in the presence or absence of plantainoside B (Plant. B, 3–30 μ M) for 48 h. Cell viability and cytotoxicity were analyzed by the WST-8 (A) or LDH assay (B), respectively. Data represent means \pm SEMs. The statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post hoc Bonferroni's/Dunn's test (A, B; n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. control, † P < 0.05, †† P < 0.01, ††† P < 0.001 vs. A β only.

2-3-4. Plantainoside B 処置による A β と ACh 神経の空間的局在変化の解析

第 1 章 (1-3-3 および 1-3-6) の解析において A β の神経障害性には神経細胞表面への A β 接着が関与することが示唆された。そこで、plantainoside B 処置による神経細胞上の A β の局在変化を免疫蛍光細胞染色および共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。A β (3 μ M) 単独処置群においては、細胞体と A β が接着している様子が見られた (Fig. 10A、左パネル白矢印)。一方で、plantainoside B (30 μ M) 同時処置群では、A β 単独処置群と比較して細胞体と A β との強固な接着が減少していた (Fig. 10A、右パネル)。細胞体が A β に覆われている面積の割合を細胞表面面積 (actin 染色部位) を用いて算出したところ、plantainoside B 同時処置群において A β 単独処置群に対して約 15% 接着面積が減少していた (Fig. 10B)。以上より、plantainoside B は A β と細胞との接着を抑制することで、A β による神経障害に対する神経保護作用を示すことが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333. から引用した。

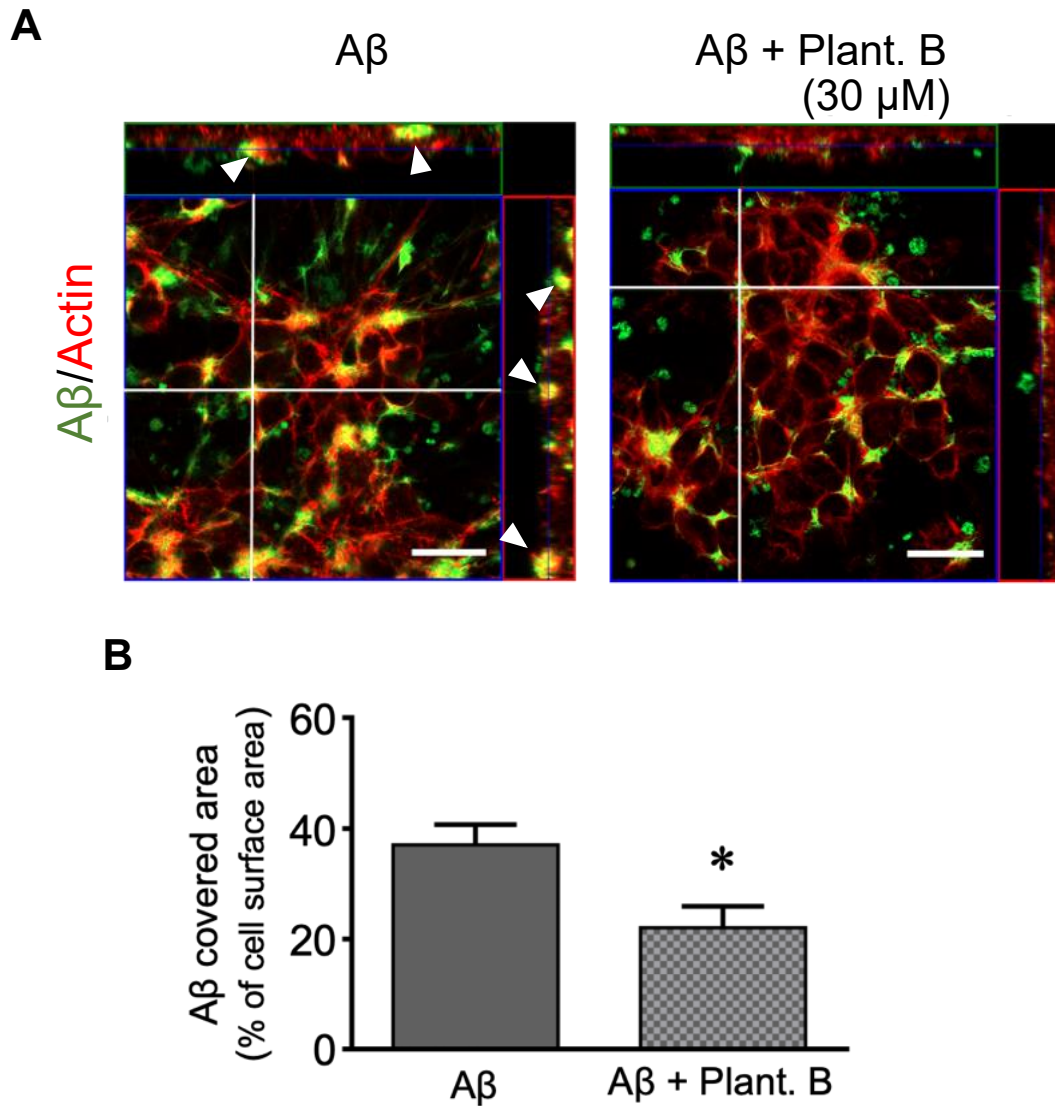


Figure 10. Analysis of spatial localization of $A\beta$ and ACh neurons

A, Confocal laser scanning microscopy (Z-stack) was performed using antibodies against $A\beta$ (green) and actin (cell morphology marker, red). White arrow heads indicate $A\beta$ attachment to cell surface. Scale bars, 20 μ m. **B**, Cell surface area covered with $A\beta$ (merged $A\beta$ and actin area) was measured by image analysis. Data represent means \pm SEMs. The statistical significance of differences among groups was determined by Student's t-test ($n = 10$). * $P < 0.05$ vs. $A\beta$.

2-3-5. Plantainoside B の A β による細胞内 Ca²⁺流入に対する抑制作用の解析

A β オリゴマーの神経障害機序の一つに細胞内への Ca²⁺の過剰流入が示唆されている。^{11, 52)} これまでの解析結果から、plantainoside B は A β と神経との接着を抑制することで神経保護作用を示すことから、A β の細胞膜への作用を減少させて、細胞内への Ca²⁺の過剰流入を防ぐ可能性が考えられた。そこで、蛍光 Ca²⁺インジケーターである fluo-4 AM を用いて hiPS 細胞由来 ACh 神経への経時的 Ca²⁺流入を評価した (Fig. 11)。蛍光強度の変化は共焦点レーザー顕微鏡を用いて 180 分間観察した (Fig. 11A)。半定量評価として、細胞 1 個の表面積あたりの蛍光強度を算出し、蛍光強度の変化をグラフ化した (Fig. 11B)。その結果、control 群と比較して isoA β 単独処置群において 180 分後の細胞内の蛍光強度は顕著に高くなり、A β による細胞内への Ca²⁺の過剰流入が検出された。一方、plantainoside B 同時処置群では、A β 単独処置群で見られた蛍光強度の上昇は確認できなかった。本解析より、plantainoside B は A β による細胞内への Ca²⁺過剰流入に対する抑制作用を持つことが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333.を改変して引用した。

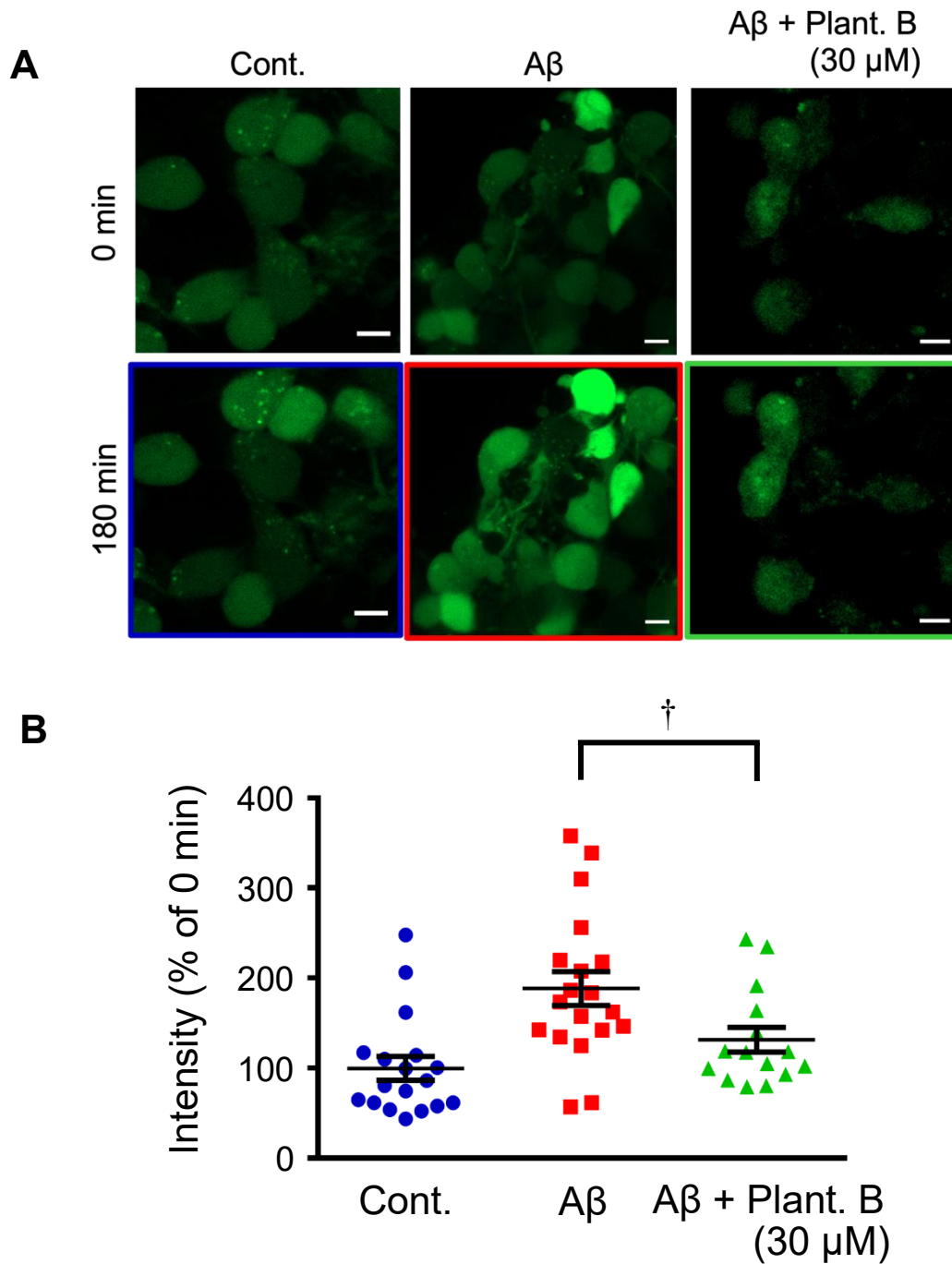


Figure 11. Analysis of neuroprotective effects of plantainoside B against A β oligomer-induced Ca²⁺ influx into the cytoplasm in hiPSC-derived cholinergic neurons.

A, Time-lapse calcium imaging with fluoro-4 was performed using a confocal laser scanning microscope. Scale bars, 5 μ m. **B**, Image analysis was performed to measure the increase of fluorescent intensity 180 min after A β treatment. Data represent means \pm SEMs. The statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post hoc Bonferroni's/Dunn's test [$n = 18$ (Cont.), $n = 19$ (A β), $n = 15$ (A β + Plant. B)]. *** $P < 0.001$ vs. Cont., † $P < 0.05$ vs. A β only

2-3-6. A β 誘発ミトコンドリア機能障害に対する plantainoside B の抑制作用の解析

A β オリゴマーによる細胞障害にミトコンドリア機能異常の関与が報告されている。⁷⁸⁾ その機序として、Ca²⁺が細胞内に流入することでミトコンドリア内にも Ca²⁺が流入し、ミトコンドリア膜電位異常を起こすことで、ATP の産生低下や ROS の産生につながるとされている。⁷⁸⁾ 2-3-5 の結果より、A β オリゴマーは細胞内 Ca²⁺過剰流入を誘発することがわかった。そこで、本細胞モデルにおいても A β オリゴマー処置により細胞内ミトコンドリアの膜電位異常が誘導される可能性が考えられる。そこで hiPS 細胞由来 ACh 神経に A β を処置して、ミトコンドリア膜電位変化を解析した。この解析には、ミトコンドリア膜電位変化を蛍光色素にて評価できる JC-1 試薬を用いて検討した。その結果、A β では正常膜電位を示す赤色蛍光の割合が減少し、異常膜電位を示す緑色蛍光の割合が上昇した (Fig. 12)。また、2-3-5 の結果より、plantainoside B が A β オリゴマーによる細胞内 Ca²⁺過剰流入を抑制することが示された。そこで、A β と 3 - 30 μ M plantainoside B を同時処置した際のミトコンドリア膜電位変化を解析した。その結果、plantainoside B の濃度依存的に、正常膜電位を示す赤色蛍光の割合が増加し、一方で膜電位異常を示す緑色色素の割合が減少して、ミトコンドリア膜電位異常が抑制された (Fig. 12)。以上より、A β オリゴマー処置により hiPS 細胞由来 ACh 神経にミトコンドリア膜電位異常が誘導される一方で、plantainoside B はこの異常を抑制して神経保護作用を示すことが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, *46*, 320-333.から引用した。

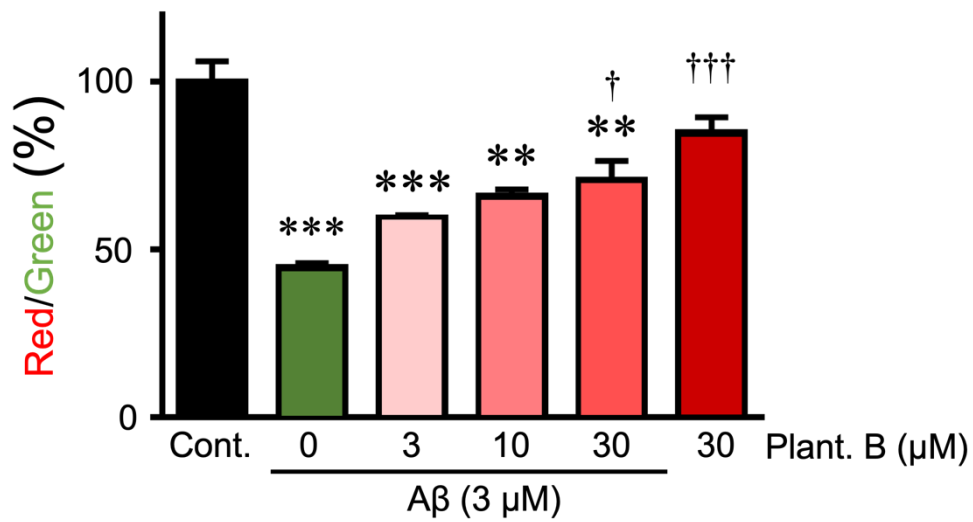


Figure12 Analysis of the neuroprotective effects of plantainoside B against A β oligomer-induced mitochondrial dysfunction in hiPSC-derived cholinergic neurons.

The mitochondrial membrane potential was assessed by JC-1 analysis and the red/green fluorescence ratio calculated. Data represent means \pm SEMs. The statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post hoc Bonferroni's/Dunn's test ($n = 3$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Cont., † $P < 0.05$, ††† $P < 0.001$ vs. A β only

2-3-7. Plantainoside B の A β 凝集に対する作用の解析

次に、plantainoside B の A β 凝集に対する作用を ThT assay (1 - 24 時間) および AFM (24 時間) にて解析した。 β シート構造を認識し A β フィブリル形成にともなって蛍光を発する ThT を用いた ThT assay において、isoA β を単独で凝集させた場合、凝集開始から 6 時間後にかけて蛍光強度が急激に上昇し、24 時間後までにプラトーに達した (Fig. 13A)。一方、plantainoside B 存在下、isoA β を凝集させた場合、凝集開始 1 時間後から 24 時間後までに、蛍光強度の上昇はほとんど確認できなかった。このことから plantainoside B 存在化ではフィブリル形成が強く抑制されることが示唆された。さらに、AFM で 24 時間後の凝集体形成を解析したところ、isoA β と plantainoside B を同時に凝集させた場合は、isoA β を単独で凝集させた場合に見られた A β 凝集塊はほとんど見られなかった (Fig. 13B)。以上の結果より、plantainoside B は A β 凝集を強く抑制することが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333. から引用した。

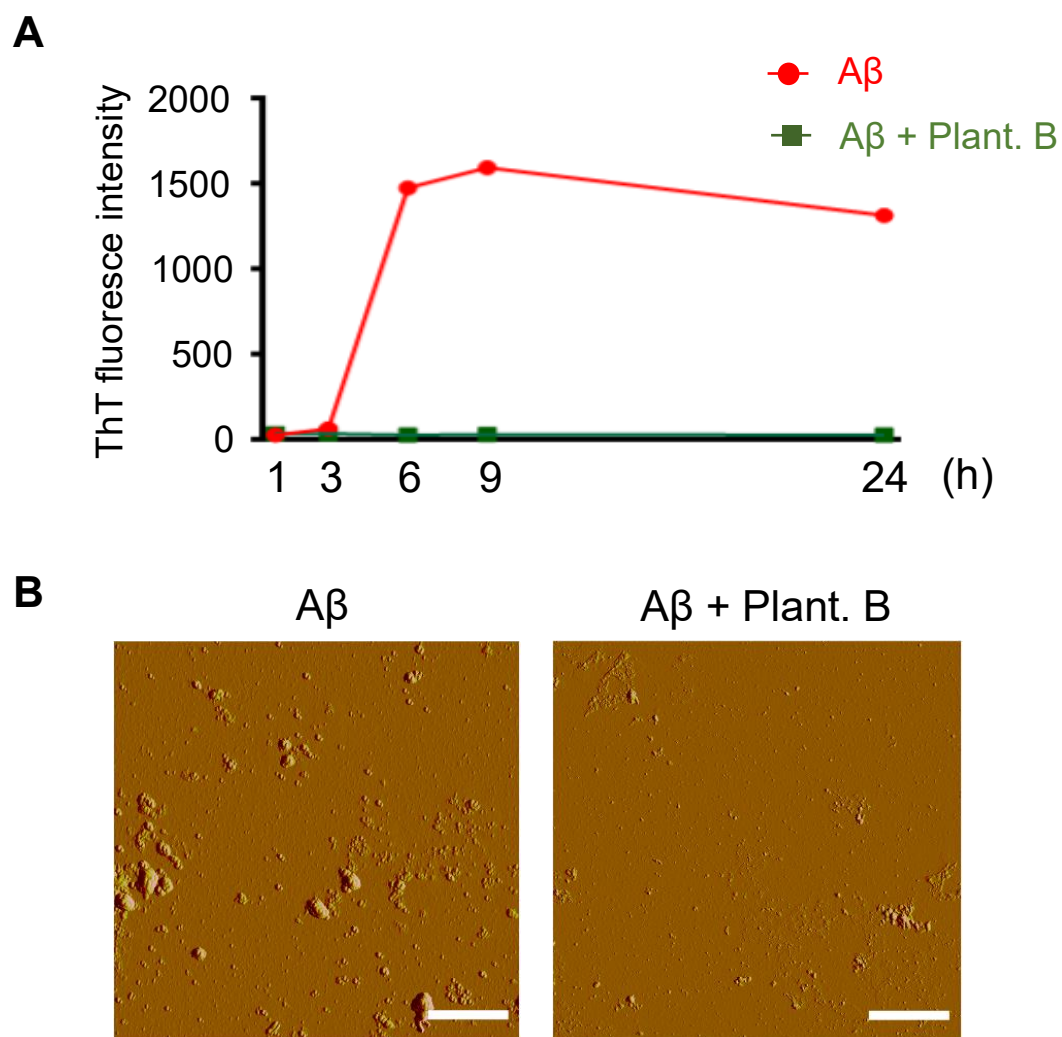


Figure 13. Inhibitory effect of plantainoside B on A β fibril formation.

A and B, The isoA β (6 μ M) was incubated at 37°C for 1–24 h with or without plantainoside B (Plant. B, 100 μ M) in PBS. Thioflavin T (ThT) assay (A) and AFM (B) were performed to analyze the effect of Plant. B on A β aggregation. Scale bars, 2 μ m.

2-3-8. Plantainoside B の A β オリゴマー形成に対する抑制効果の解析

2-3-7 の解析結果より、plantainoside B は isoA β の凝集に対して抑制的に作用することが示唆された。さらに詳細にオリゴマーを含む A β 凝集体形成に対する plantainoside B の作用を解析するために Blue Native-PAGE による解析を実施した。isoA β のみを凝集させた場合、凝集開始 1 時間の時点で既に 20 - 480 kDa のオリゴマーおよび 1048 kDa 以上のフィブリルが形成されていた。その後、146 kDa 以上のオリゴマーおよびフィブリルの形成が進み、24 時間後では 20 kDa の凝集体が検出できなくなり、オリゴマーも減少してフィブリル形成がさらに進んだ。一方で、plantainoside B (100 μ M) を含む isoA β 凝集では、凝集開始 1 時間後の時点では 20 - 480 kDa のオリゴマーが徐々に形成され始め、48 時間後でも A β オリゴマーの形成が見られたが、A β 単独群と比較して凝集速度が緩やかであった。また、凝集 48 時間においても 20 kDa の凝集体は検出された。以上より、plantainoside B 存在下において、A β 凝集が著しく遅延することが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333. から引用した。

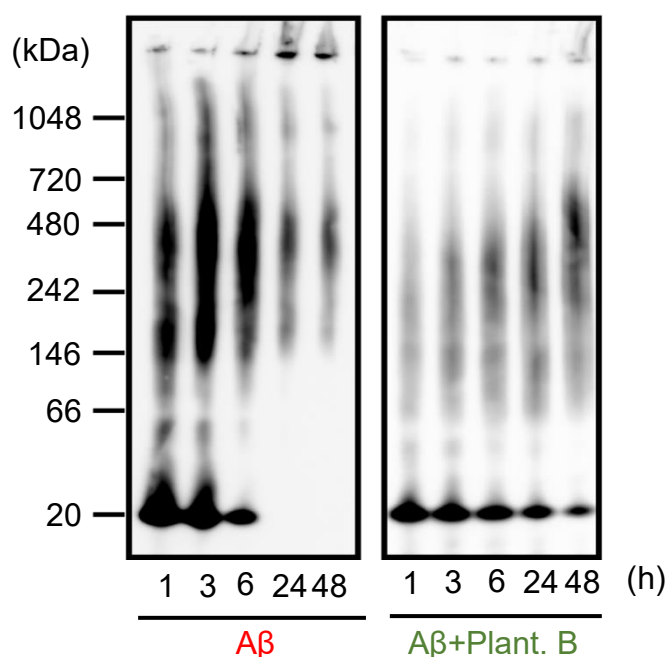
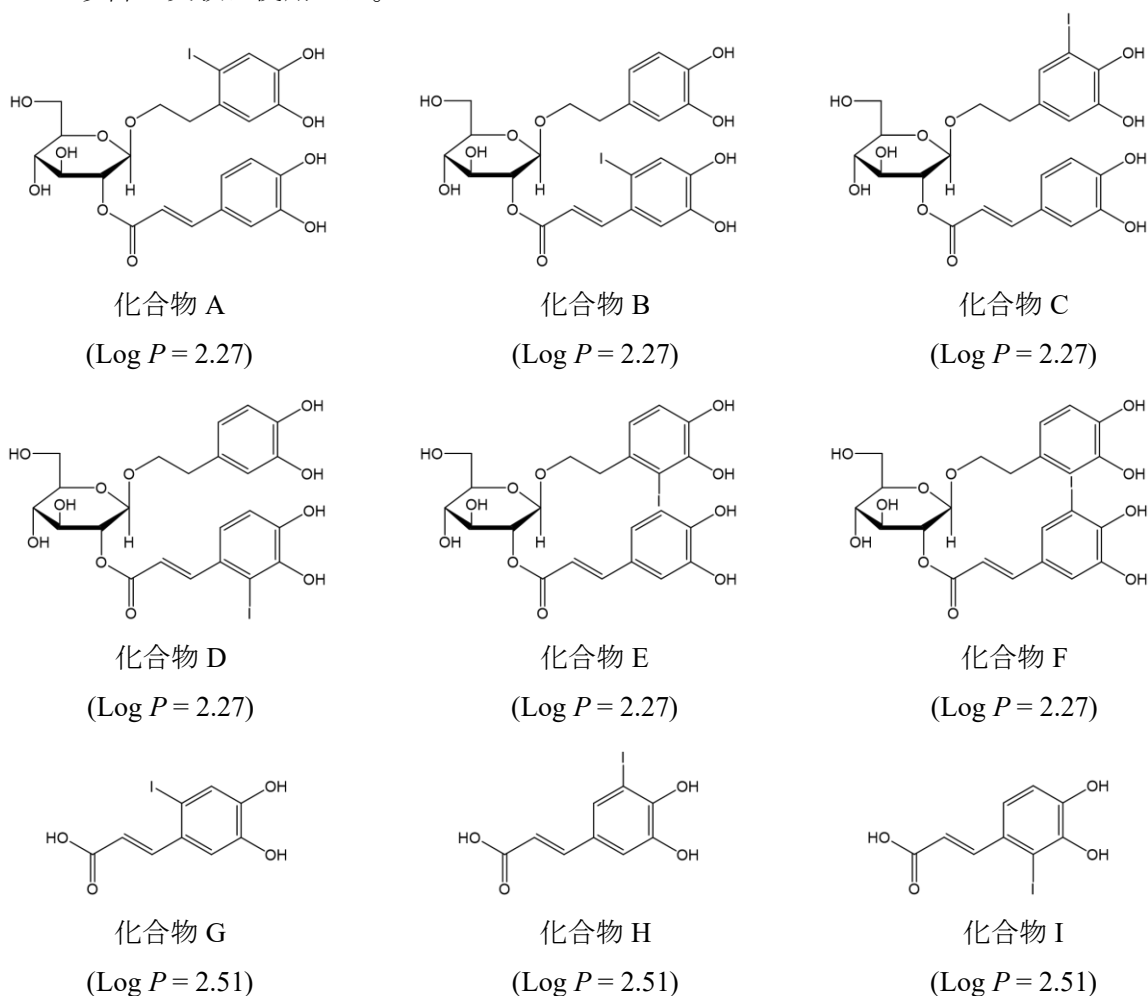


Figure 14. Inhibitory effect of plantainoside B on A β aggregation.

The isoA β (6 μ M) was self-aggregated at 37°C for 1–48 h with or without Plant. B (100 μ M) in cell culture medium. A β aggregates were analyzed by blue native-polyacrylamide gel electrophoresis with an anti-A β antibody.

2-3-9. 放射性同位元素 ^{125}I を用いた plantainoside B の標識化

Plantainoside B の $\text{A}\beta$ 凝集体への結合について放射性同位元素 ^{125}I を用いて解析するため、plantainoside B の ^{125}I 標識を行った。酸化剤として *N*-クロロスクシンイミドを用いて ^{125}I を plantainoside B に付加し、HPLC でその標識を確認した。HPLC の保持時間を比較したところ、非標識体 plantainoside B の UV ピークが保持時間約 10.9 分で検出された (Fig. 15A)。一方、 ^{125}I 標識体では約 13.6 分、13.8 分、14.7 分に RI ピークが検出された (Fig. 15B)。これは、plantainoside B のヨウ素化により脂溶性が上昇し ^{125}I 標識体の保持時間が非標識体よりも長くなったことが理由として考えられる。Plantainoside B に対して 1 原子の ^{125}I が置換した場合に想定される化学構造を Schema 4 に示した。化合物 A - F は plantainoside B に含まれるカテコール骨格中に ^{125}I 付加した構造異性体である。化合物 G - I は plantainoside B のエステル構造が加水分解した後に ^{125}I 付加もしくは ^{125}I 付加後に加水分解した化合物である。それぞれの化合物の脂溶性を、Chem Draw 20.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, USA) を用いてオクタノール/水分分配係数 ($\log P$ 値) を算出すると、化合物 G - I は化合物 A - F と比較してより脂溶性が高いことが予想される。すなわち、14.7 分のピークが化合物 G - I である可能性がある。そこで、13 分から 14 分の間に検出されたピークを示す化合物を ^{125}I 標識された plantainoside B として以降の実験に使用した。



Schema 4. Structures of ^{125}I -labeled plantainoside B compounds.

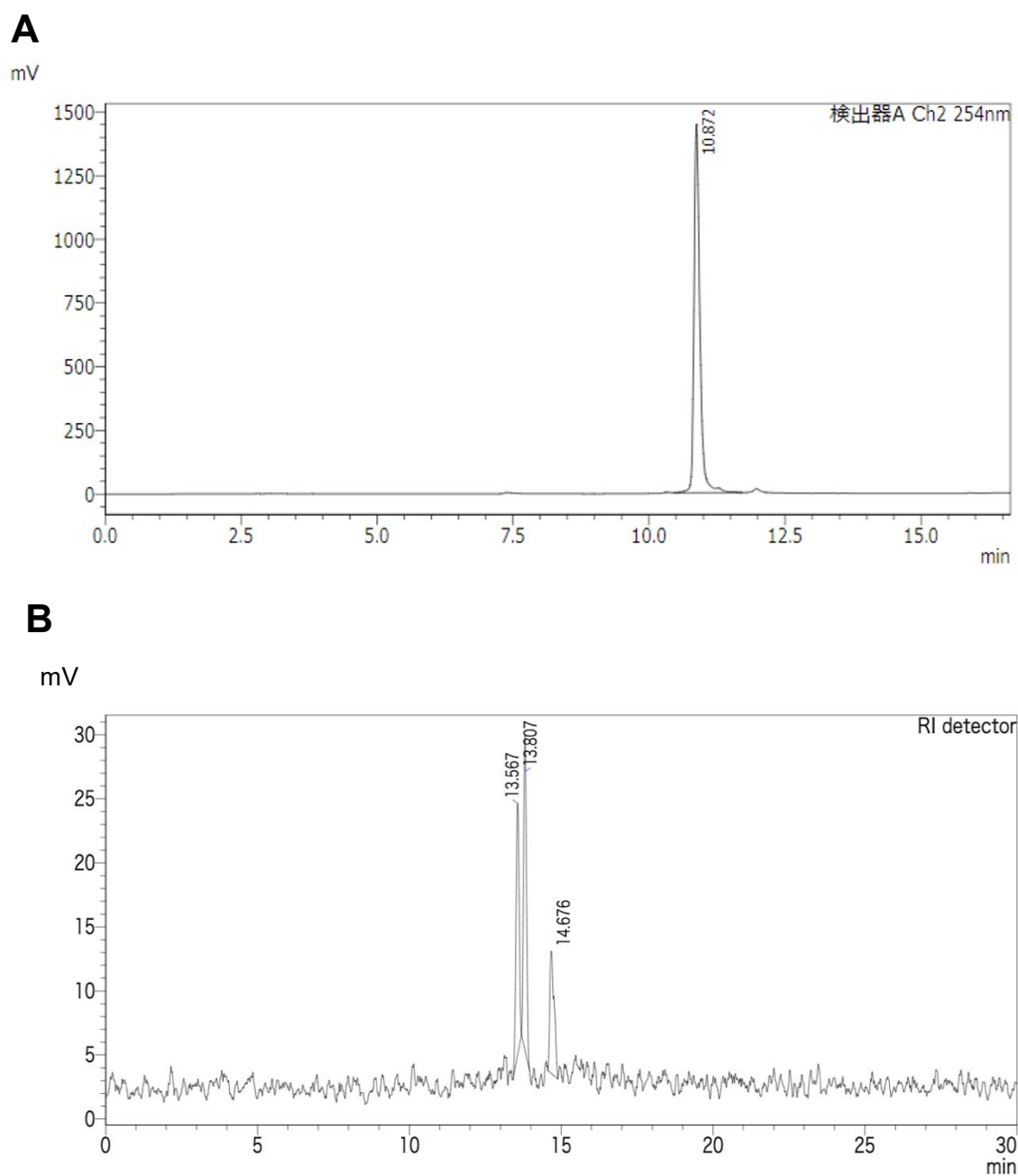


Figure 15. Evaluation of ^{125}I -labeling of plantainoside B by HPLC.

A and B, The progress of ^{125}I -labeling of plantainoside B was determined by comparing the retention times of compounds with or without ^{125}I -binding reaction in HPLC. UV peak of the unlabeled plantainoside B was observed at a retention time of approximately 10.9 min (A). In contrast, RI peaks of ^{125}I -labeled plantainoside B were observed at about 13.6, 13.8, and 14.7 min (B).

2-3-10. ^{125}I 標識 plantainoside B を用いた plantainoside B と $\text{A}\beta$ 凝集体との結合の解析

2-3-9 で調製した ^{125}I 標識 plantainoside と $\text{A}\beta$ 凝集体を混合した検体を blue native ポリアクリルアミドゲルで $\text{A}\beta$ 凝集体を展開し、 ^{125}I 標識 plantainoside B が結合した $\text{A}\beta$ 凝集体をオートラジオグラフィーによって特定した (Fig. 16)。1 時間または 6 時間凝集させた $\text{A}\beta$ を本解析に使用した。 $\text{A}\beta$ を泳動し、抗 $\text{A}\beta$ 抗体で検出した凝集体の結果と比較した (Fig. 16 左パネル)。その結果、1 時間凝集させた $\text{A}\beta$ と ^{125}I 標識 plantainoside B を混合して泳動したゲルでは、オートラジオグラフィーによって 20 - 242 kDa および 1048 kDa 以上の位置に放射能が検出された (Fig. 16 右パネル)。6 時間凝集 $\text{A}\beta$ と ^{125}I 標識 plantainoside B を混合して泳動したゲル上でも、20 - 242 kDa 周辺で弱い放射能が検出されたが、1048 kDa 以上の位置でさらに強い放射能が認められた (Fig. 16 右パネル)。Blank として、 ^{125}I 標識 plantainoside B のみを泳動したゲル上には明瞭な放射能は検出されなかった。以上より、 ^{125}I 標識 plantainoside B は主に 1048 kDa 以上の $\text{A}\beta$ フィブリルに結合し、また、20 - 242 kDa の $\text{A}\beta$ オリゴマーにも結合性を示すことがわかった。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333. から引用した。

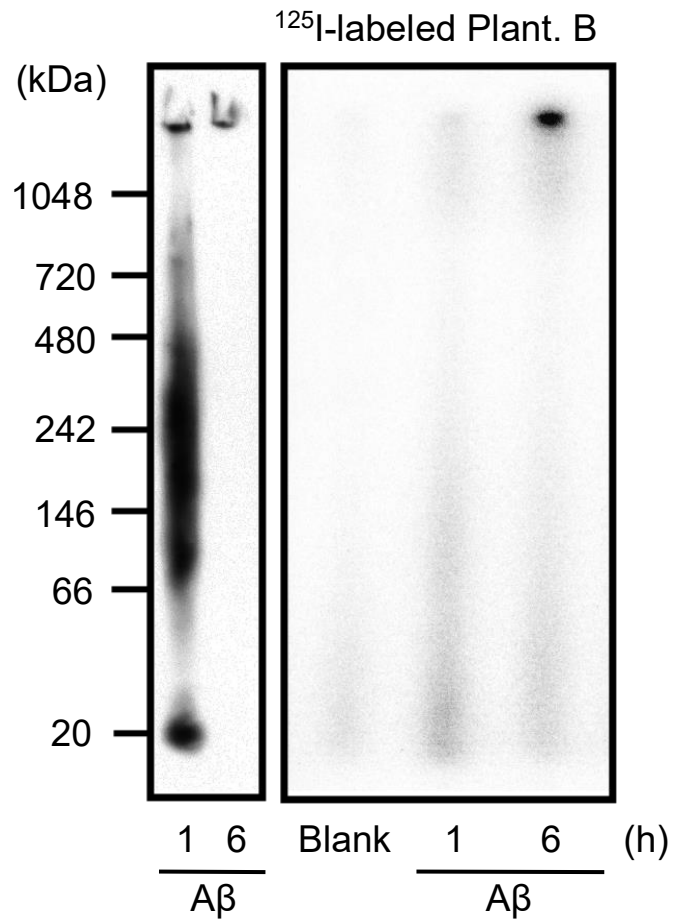


Figure 16. Analysis of the binding of plantainoside B to A β aggregates using ^{125}I -labeled plantainoside B.

The isoA β (6 μM) aggregates preincubated for 1 or 6 hours at 37°C in PBS were run on blue native polyacrylamide gels and detected with anti-A β antibodies (Fig. 16, left panel), or samples mixed with ^{125}I -labeled plant on the aggregates were run on blue native polyacrylamide gels and then detected by autoradiography (Fig. 16, right panel); the anti-A β antibodies detected the A β aggregates on 1 h and 6 h samples (Fig. 16, left panel). The radioactivity on the gel was detected by autoradiography (Fig. 16, right panel). Blank indicates that ^{125}I -labeled Plant. B without A β aggregates was loaded on the gel (Fig. 16, right panel).

2-3-11. ^{125}I 標識 plantainoside B を用いたマウス脳切片における $\text{A}\beta$ 検出の解析

2-3-10 の解析において、 ^{125}I 標識 plantainoside B を用いることで、plantainoside B は $\text{A}\beta$ のフィブリルを主として $\text{A}\beta$ オリゴマーにも結合性を示すことが示唆された。そこで、本化合物を用いてマウスの脳切片上の $\text{A}\beta$ の検出について解析した。脳内に $\text{A}\beta$ が蓄積する AD モデルマウス (APdE9 マウス) と wild-type マウスの脳切片を用いた。APdE9 マウスは、AD の原因遺伝子として知られているヒト amyloid precursor protein (APP) 変異遺伝子 (Swedish mutation、K595N/M596L) と PSEN1 の変異遺伝子 (PS1-dE9) を導入したマウスであり、脳内で顕著な $\text{A}\beta$ 蓄積がみられる。⁷⁹⁾まず、抗 $\text{A}\beta$ 抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡で解析すると、wild-type では認められなかったが、AD モデルマウス脳切片において $\text{A}\beta$ の蓄積が検出された (Fig. 17A)。このマウスの連続脳切片を用いて、 ^{125}I 標識 plantainoside を処置してオートラジオグラフィで解析すると、wild-type マウスの脳切片では放射能が検出されなかったが、AD モデルマウスの脳切片では脳全体で強い放射能が検出された (Fig. 17B)。この放射能が plantainoside B による結合によるものかどうかを評価するため、過剰量の非標識 plantainoside B でブロッキングしたところ、wild-type マウスならびに AD モデルマウスの脳切片の両方において放射能が検出されなかった (Fig. 17C)。さらに、 ^{125}I のみを脳切片へ処置しても、放射能は検出されなかった (Fig. 17D)。以上より、 ^{125}I 標識 plantainoside B を用いると、plantainoside B の $\text{A}\beta$ への結合性により AD モデルマウスの脳切片上で放射能が検出され、 $\text{A}\beta$ 検出に応用できることが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333. から引用した。

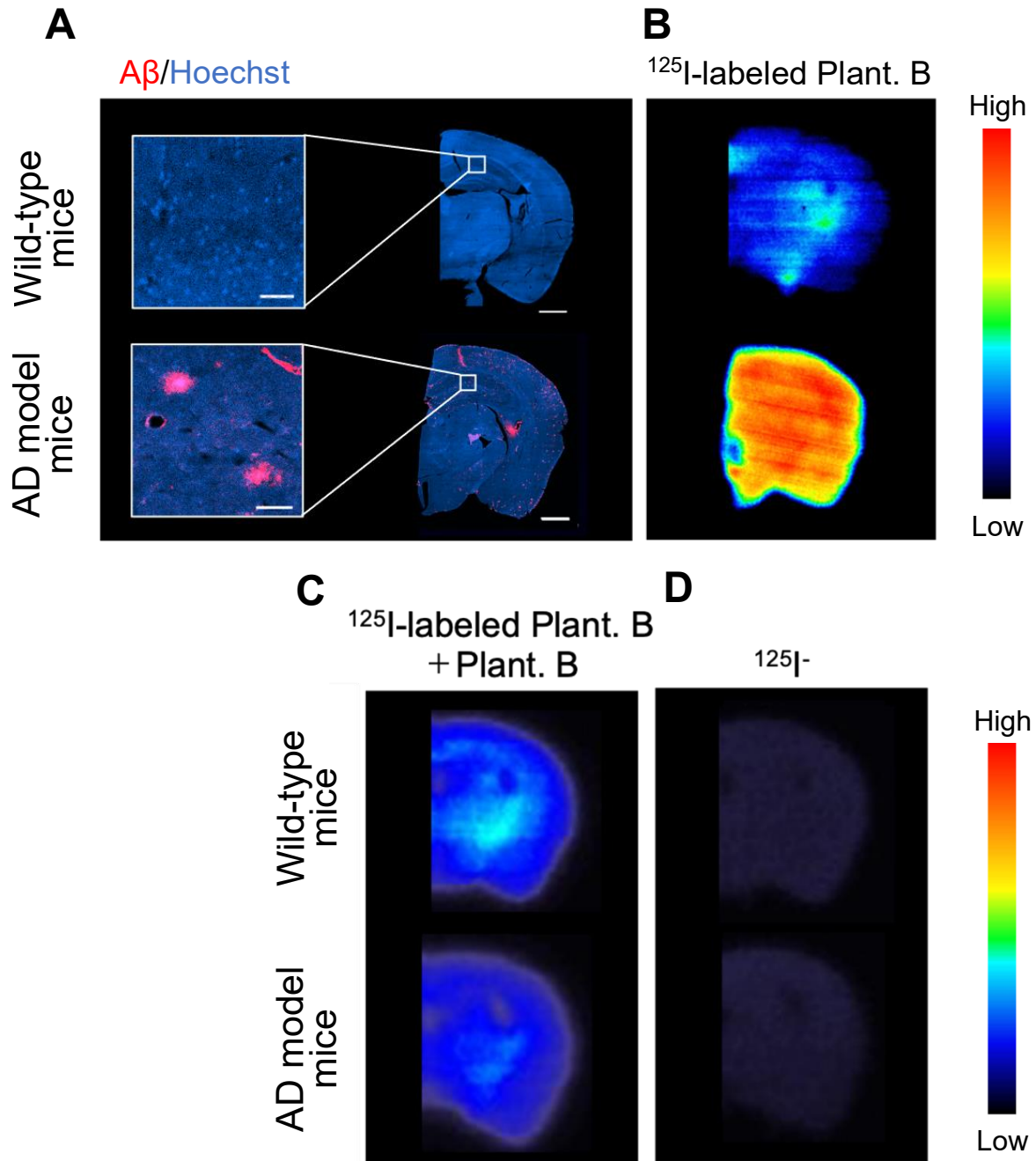


Figure 17. Binding affinity of plantainoside B on mouse brain tissues.

A and B, Confocal laser scanning microscopy with anti- $A\beta$ antibody (red) and Hoechst 33342 (nuclei, blue) (A) and autoradiography with ^{125}I -labeled plantainoside B (Plant. B) (B) were performed using brain tissues from wild-type mice and a mouse model of amyloid pathology (APdE9 mice). Scale bars, 1 mm and 50 μm in insets. **C and D**, Autoradiography was performed with ^{125}I -labeled Plant. B in the presence of excess amount of non-labeled Plant. B (0.8 mM; approximately 10^6 higher concentrations than that of ^{125}I -labeled Plant. B) (C). Autoradiography with ^{125}I solution (D).

2-3-12. 海馬内 A β 投与による認知機能低下に対する plantainoside B の抑制作用の解析

これまでの解析結果より、plantainoside B は *in vitro* 評価系において、isoA β による細胞障害作用を抑制して神経保護作用を示すことが示唆された。そこで、plantainoside B の *in vivo* における神経保護作用について、新規物体認識試験により評価した。野生型マウスの海馬両側に、PBS を投与した群を対照群として、isoA β を投与した群、isoA β と plantainoside B を同時に投与した群を用いて、投与から 1 週間後の認知機能を評価した (Fig. 18A)。PBS 投与群および isoA β と plantainoside B 同時投与群のマウスは、test phase において新規物体である O3 付近に滞在する時間が長くなることが確認できた一方で、isoA β 投与群では O1 と O3 付近の滞在時間については大きな変化は見られなかった (Fig. 18B)。

マウスは通常新規物体に指向性を示すため、認知機能が正常である場合は、新規物体付近で滞在する時間が既知の物体付近滞在時間よりも長くなると考えられる。一方で、認知機能が低下しているマウスにおいては、既知と新規の区別がつかないため、同等の指向性を示し、新規物体への指向指数は 50% 近くを示すと考えられる。そこで、本解析でもマウスの物体に対する指向性について滞在時間を用いて数値化し、物体指向指数を算出した。その結果、PBS 投与群および isoA β と plantainoside B 同時投与群では O3 付近に滞在する時間の割合である物体指向指数が、O1 および O3 付近に滞在した総時間のうち約 60% を占めた (Fig. 18C)。一方で、isoA β 単独投与群においては物体指向指数が有意に減少し、約 50% であった。このことから、isoA β を投与することで野生型マウスの認知機能が低下するが、plantainoside B を同時に投与すると認知機能低下が抑制されることが示された。以上より、plantainoside B は野生型マウスを用いた *in vivo* 解析においても isoA β による神経障害に対して保護作用を示すことが示唆された。下記結果は、Fukuda et al., *Biol. Pharm. Bull.* **2023**, 46, 320-333. から引用した。

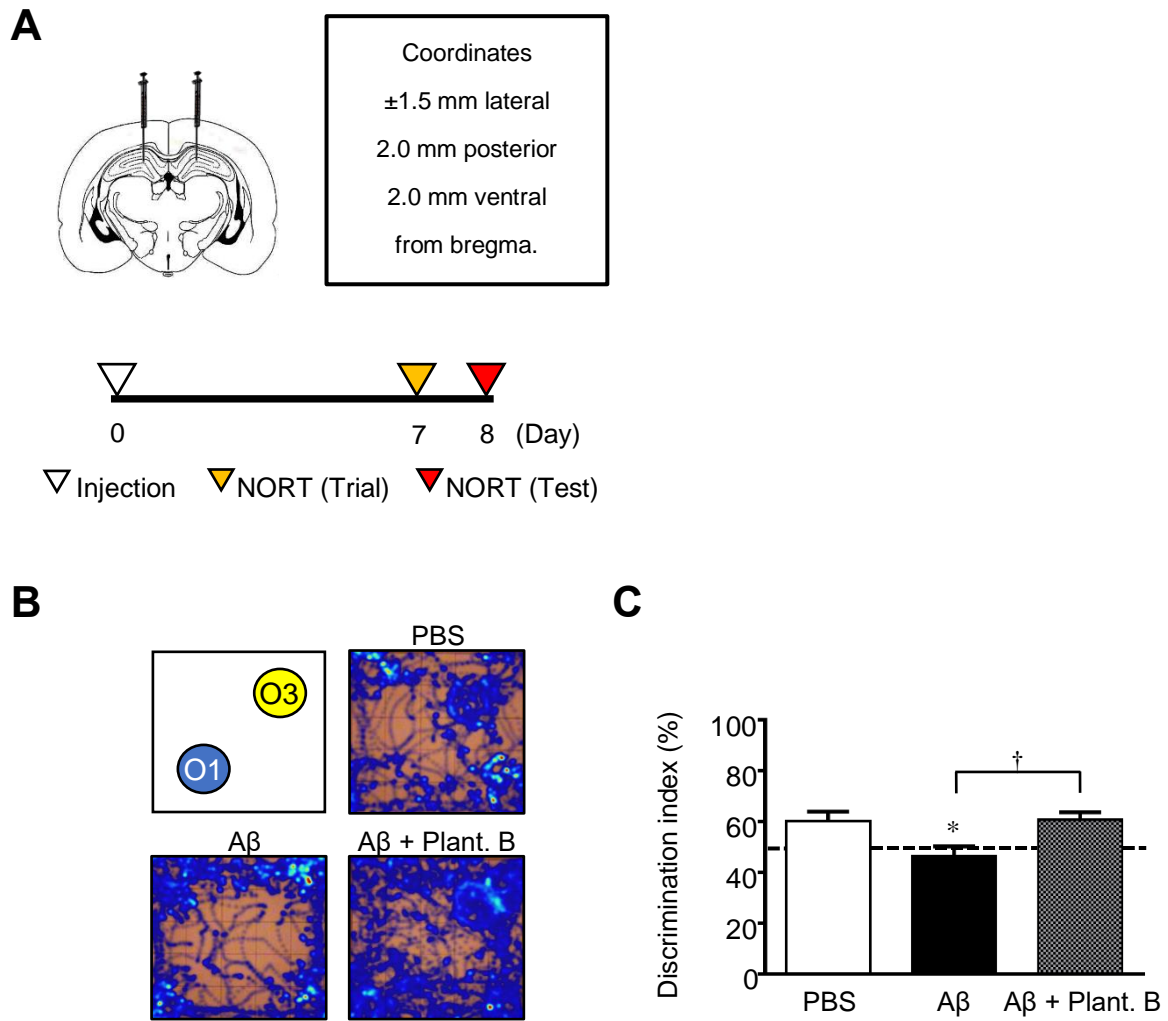


Figure 18. Analysis of attenuation of A β induced memory impairments by plantainoside B in mice.

A, Schematic diagram indicating the coordinates of intrahippocampal injection of PBS, isoA β , or isoA β plus Plant. B in wild-type mice and schedule of novel object recognition test (NORT). **B**, Representative trajectories of mice in the NORT test phase are shown. O1 and O3 indicate the position of familiar object and novel object, respectively. **C**, Bars indicate the discrimination index analyzed by NORT. Data represent means \pm SEMs (PBS injection; $n = 10$, A β injection; $n = 8$, A β + Plant. B injection; $n = 10$). The statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with post-hoc Bonferroni's/Dunn's test. * $P < 0.05$ vs. PBS injection, † $P < 0.05$.

2-4. 考察

本章では、記憶力増強作用を持ち、AD モデルマウスの脳内 A β を減少させることが報告されている *B. monniera*^{73,74)} の含有成分から、A β オリゴマーに結合性を示す化合物を探索し plantainoside B を同定した。

本研究で、plantainoside B と A β を同時に hiPS 細胞由来 ACh 神経に処置すると、A β と神経の接着が抑制され、細胞内 Ca²⁺ 過剰流入および、ミトコンドリア内膜電位異常も抑制された。A β が神経と接着する際に標的になる因子として、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体や NMDA 受容体が知られている。^{80,81)} $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体は特に A β と親和性が高い受容体であり、¹¹⁾ A β が $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体や NMDA 受容体に結合すると Ca²⁺ の細胞透過性が上昇し、細胞内への Ca²⁺ 過剰流入が誘発される。^{80,81)} また、A β と結合する分子として、シナプス終末に多く存在して神経細胞内の Ca²⁺ 濃度の維持に関与しているモノシアログングリオシド GM1 が知られている。^{82,83)} この分子も $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体や NMDA 受容体と同様に、A β が結合することで⁸⁴⁾、A β の凝集を促進し、細胞内への Ca²⁺ 過剰流入を誘発して神経障害を示すことが報告されている。⁸⁵⁾ 興味深いことに細胞膜や受容体を介した Ca²⁺ の細胞内過剰流入は、A β オリゴマーによって誘導されることが報告されている。^{11,86)} さらに、細胞内に Ca²⁺ が流入することで、ミトコンドリア内に Ca²⁺ が流入し、その結果 ROS の産生が誘導されて神経障害が生じると考えられている。⁸⁷⁻⁹⁰⁾ また、小胞体からの Ca²⁺ 流出も誘導され、細胞内 Ca²⁺ 濃度がさらに上昇することも報告されている。⁹¹⁾ このことから、A β オリゴマーによる神経障害には、Ca²⁺ の細胞内過剰流入が深く関与していると考えられる。Plantainoside B が細胞と A β オリゴマーの接着を抑制する機序については、plantainoside B と A β オリゴマーが結合し、A β オリゴマーの立体構造が変化することで物理化学的に細胞へ接着できない可能性、並びに、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体や NMDA 受容体、および GM1 上に存在する A β 結合部位に plantainoside B が競合的に結合することで、A β と受容体の結合を抑制することが考えられる。

この他にも、plantainoside B そのものが神経細胞に直接作用することで、神経細胞のストレス耐性が向上した可能性が考えられる。 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体を刺激すると神経の酸化ストレスを抑制し、神経障害が減弱すること⁹²⁾ から、plantainoside B が受容体刺激薬としての作用を持つことで、神経保護作用を示す可能性が考えられる。一方で、NMDA 受容体においては、受容体刺激による神経の過剰な興奮が神経障害を誘導すること⁹³⁻⁹⁵⁾ から、plantainoside B が受容体拮抗薬としての作用を示し、神経の過剰な興奮を抑制する可能性がある。その結果、A β による神経障害が減弱されるといった神経保護作用機序が考えられる。 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体や NMDA 受容体を含めた plantainoside B による神経保護作用への関連性については、本研究では plantainoside B の詳細な神経保護作用機序の解析できておらず、上記に記載した A β 結合性分子との関連性などを含めて、今後の研究課題である。

ThT assay において plantainoside B と A β を同時に凝集させたサンプルでは、A β のみを凝集させたサンプルで見られたような蛍光強度の増加は見られなかった。また AFM においても、plantainoside B と A β を同時に凝集させたサンプルでは、A β のみを凝集させたサンプルで

見られたような凝集塊は確認できなかった。さらに Blue Native-PAGE の結果により plantainoside B の存在下では A β オリゴマーの形成が顕著に遅延することも確認できた。カテコール構造を持つ化合物は、そのヒドロキシ基と A β のアミノ酸配列中の 16 番目と 28 番目のリシン残基が付加反応して、A β の β -シート構造形成を阻害し、A β の凝集を抑制することが報告されている。^{96,97)} Plantainoside B の分子構造にも 2 つのカテコール構造が存在していることから、先行研究で示された様式で A β 凝集抑制作用を示した可能性が考えられる。すなわち、plantainoside B は分子内のカテコール構造で A β 凝集体に結合し、A β オリゴマーと神経の接着を防ぎ、また、更なる A β 凝集を抑制することで神経保護作用を示すことが考えられる。上記を考慮すると、plantainoside B が抗 A β 抗体のような作用を示し、脳内免疫担当細胞であるミクログリアによる貪食作用を誘導する可能性が考えられる。抗 A β 抗体は、A β と特異的に結合して複合体を形成し、A β の凝集を抑制すると同時に、抗体がオプソニン効果によりミクログリアに貪食されて除去される。⁹⁸⁾ Plantainoside B は抗 A β 抗体と同様に A β 凝集体と結合性を示すことから、plantainoside B がオプソニン効果のような作用を持つ場合、A β 凝集体と plantainoside B の複合体をミクログリアが貪食して A β が除去される可能性がある。一方で、plantainoside B がミクログリアに直接作用して貪食能を促進すること⁹⁹⁾で A β が除去され、AD 病態の形成および進行を抑制するといった神経保護作用が考えられる。しかしながら、本研究において plantainoside B によるミクログリアの A β 貪食能への影響については解析できていない。本研究で構築した A β オリゴマー誘発 ACh 神経障害モデルにミクログリアを加えて共培養した *in vitro* モデルによる plantainoside B の神経保護作用の解析は、今後の研究課題である。

放射性同位元素 ¹²⁵I で標識した plantainoside B による A β 結合性の解析により、A β フィブリルを主体に A β オリゴマーに plantainoside B は結合性を示すことがわかった。AD に対する早期発見・治療を目指した A β のイメージングなどの臨床応用を考えると、PiB 化合物で用いられていた ¹¹C は、半減期が 20 分と短く使用しづらいといった問題がある。⁶⁹⁾ 一方、画像診断において ¹²³I は半減期が約 13 時間であり、¹¹C と比較して汎用性に優れている。¹⁰⁰⁾ 本研究では、¹²³I で標識した化合物の開発の基礎研究として ¹²³I よりも半減期が約 60 日と長く、扱いやすい ¹²⁵I を用いて検討を進めた。また、AD モデルマウスの脳切片に ¹²⁵I 標識 plantainoside B を処置すると、脳切片の広範囲にわたって放射能が検出された。これは、¹²⁵I 標識 plantainoside B が、A β オリゴマーにも結合性を持つことから、A β フィブリルで形成される A β プラークのみならず、脳全体に存在する A β オリゴマーまでを検出したためと考えられる。このように、これまでも脳内 A β を検出するためのプローブの開発が進められているが、^{66,101)} 本解析で同定された plantainoside B も脳切片上の A β 凝集体を検出できることがわかり、A β 検出プローブとしての可能性が示唆された。また、plantainoside B は、野生型マウスへの A β の海馬内投与により誘導された認知機能低下を抑制する作用を示したことから、¹²⁵I 標識 plantainoside B は A β 凝集体を検出すると同時に神経保護に作用するプローブとなりうることを示唆される。一方で、本解析では plantainoside B を海馬に投与した際の認知機能の低下抑制を示したが、臨床応用を考慮すると、末梢投与による脳内への移行が期待される。Plantainoside B は構造中に 2 つのヒドロキシ基を含み、これに起因する水溶性の高さから BBB への透過性において懸念

が残る。しかしながら、 ^{125}I 標識 plantainoside B の脂溶性は、Chem Draw 20.0 を用いて $\log P$ 値を算出すると $\log P = 2.27$ であり、plantainoside B ($\log P = 0.91$) よりも脂溶性が高いことから、 ^{125}I で標識することで脂溶性が上がるのが想定される。現在までの解析で、ピリダジン系色素による脳内 $\text{A}\beta$ イメージング用プローブは、BBB を透過し、そのプローブの脂溶性は $\log P = 2.94$ であることが報告されている。¹⁰²⁾ また、クルクミン誘導体による $\text{A}\beta$ イメージングプローブも $\log P = 3$ 程度になるように構造が設計されている¹⁰³⁾ ことから、 ^{125}I 標識 plantainoside B も BBB を通過する可能性は十分考えられるが、今後マウスを用いた検討が必要である。その上で、より効率的に脳への移行させるためには脂溶性を $\log P = 3$ 程度に高め、BBB を通過後、活性化体になるプロドラッグ化が必要であると考えられる。一方で、脳内における化合物の濃度が上昇するような投与経路についても評価する必要がある。一般的に BBB を通過できると考えられる分子量は、500 程度である¹⁰⁴⁾ が、plantainoside B を ^{125}I で標識することで、分子量が 478.45 から 604.35 と大きくなる。最近の研究報告により、化合物を鼻腔から投与すると、鼻粘膜から吸収された化合物が、BBB を介さず脳へ直接移行することが報告されている。¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾ AD 治療薬の候補として研究が進められているリファンピシン (分子量 822.95) においても、経鼻投与により脳へ移行して、脳内 $\text{A}\beta$ の減少作用を示すことが報告されており、^{108,109)} 経鼻投与が化合物を脳内へ到達させるための投与方法の 1 つとして考えられている。また、AD 患者が高齢者に多いことも考慮すると、より侵襲性が低い経鼻投与は大変有用な投与経路であることが考えられる。本研究では、 ^{125}I 標識 plantainoside B の末梢投与および経鼻投与による脳移行性については解析できておらず、今後の研究課題である。

第 2 章では、 $\text{A}\beta$ オリゴマーに対して結合性を示す低分子化合物を *B. monniera* より探索して plantainoside B を同定した。この plantainoside B の $\text{A}\beta$ オリゴマーに対する神経保護作用を *in vitro* 評価系および *in vivo* 評価系において解析した。その結果、plantainoside B は $\text{A}\beta$ オリゴマーと神経の接着を抑制することで、細胞内 Ca^{2+} 過剰流入を介した、ミトコンドリア膜電位異常を抑制して神経保護作用を示した。さらに、放射性同位元素で標識した plantainoside B を用い、plantainoside B が $\text{A}\beta$ フィブリルを主体に $\text{A}\beta$ オリゴマーに結合性を有すること、さらには、マウスの脳切片上の $\text{A}\beta$ オリゴマーを含む $\text{A}\beta$ 凝集体を検出できることがわかった。以上より、plantainoside B は $\text{A}\beta$ オリゴマーに対する神経保護作用および $\text{A}\beta$ 凝集体検出能を同時に示す化合物であることが示唆された。

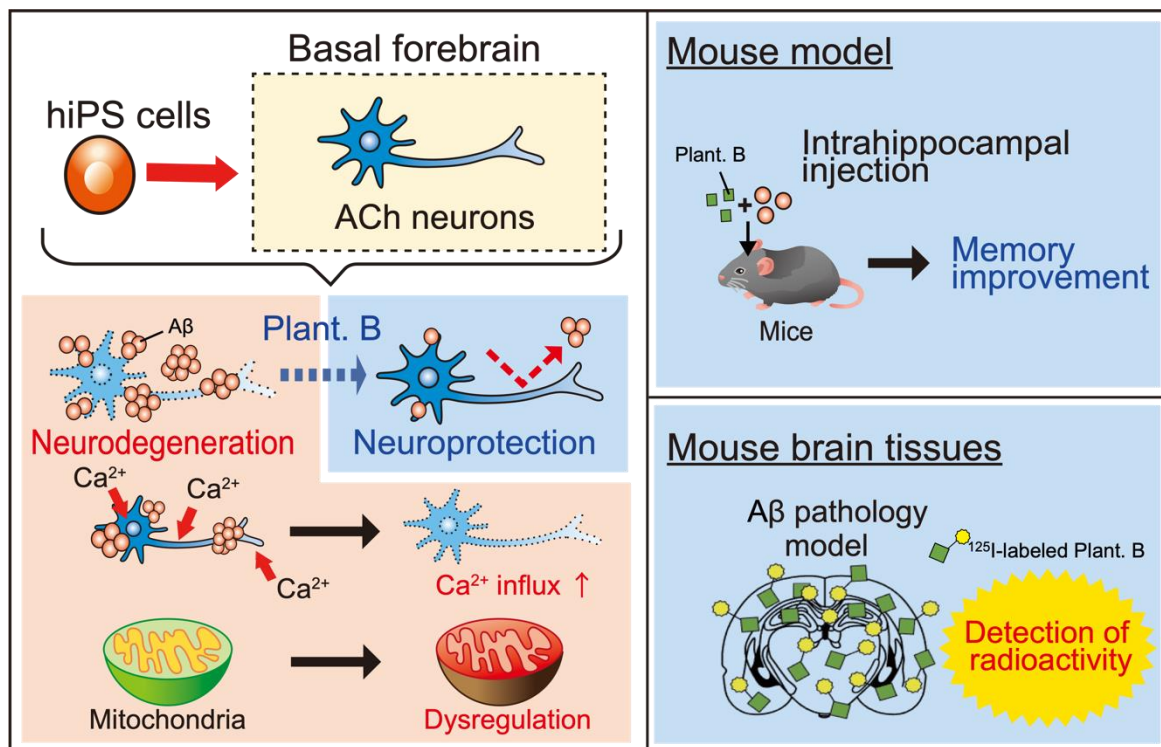
総括

ADにおいて早期診断・早期治療は、十分な治療効果を得る上で大変重要な点である。本研究では、AD病態形成早期段階に着目して、isoA β から形成されるオリゴマーおよびhiPS細胞由来ACh神経を用いた病態モデルを構築してA β の神経障害機序を解析した。さらに、A β オリゴマーに親和性を示す化合物を生薬成分から探索して、神経保護作用およびA β 検出能を*in vitro*、*in vivo*評価系を用いて解析した。

第1章では、A β の凝集開始を溶媒のpHによって制御でき、安定したオリゴマーを形成再現することが可能なisoA β を用いて、A β オリゴマーによる細胞障害を再現した。さらに、これまでAD関連研究で用いられてきたSH-SY5Y細胞に変わり、AD発症早期からの脱落が知られる前脳基底部のACh神経について、hiPS細胞からフィーダーフリー環境下かつ低分子化合物を用いて簡便かつ再現性良く分化誘導が可能な方法を構築した。このヒトACh神経にisoA β を処置して神経障害を誘導することで、A β オリゴマー仮説とコリン仮説を考慮したA β オリゴマー誘発ヒトACh神経障害モデルを構築した。このA β オリゴマー誘発神経障害モデルを用いて神経障害機序を解析したところ、樹状突起を含む神経細胞表面へのA β の接着が深く関与することがわかり、その作用はA β フィブリルよりA β オリゴマーにおいて特に強いことがわかった。

第2章では、isoA β を用いて、A β オリゴマー結合性を示す低分子化合物をハーブの一種である*B. monniera*から探索し、plantainoside Bを同定した。第1章で構築したA β オリゴマー誘発神経障害モデルを用い、plantainoside Bの作用を解析した結果、plantainoside BはA β と神経の接着を抑制し、細胞内Ca²⁺過剰流入およびミトコンドリアの膜電位変化を抑制して、神経保護作用を示すことがわかった。また、ThT assayやAFMによる解析から、plantainoside BがA β の凝集を強く抑制することも示された。また、plantainoside Bによる神経保護作用は、野生型マウスを用いた*in vivo*評価系でも解析し、isoA β の海馬内投与による認知機能低下に対しても抑制作用を示した。さらに¹²⁵I標識plantainoside Bを用いた解析により、plantainoside BはA β フィブリルを主体にA β オリゴマーにも結合することがわかり、ADモデルマウスの脳切片上のA β の検出も可能であることが示された (Schema 5)。

以上より、本研究においてplantainoside Bの放射性同位元素標識体を用いることで、脳切片上でのA β オリゴマーが検出でき、またA β オリゴマーによる細胞障害からACh神経を保護できることを見出した。今後のさらなる研究により、plantainoside Bをシードとした化合物を応用することで、ADに対する早期診断と治療を同時に担うtheranosticsの開発につながることを期待される。



Schema 5. Neuroprotection of plantainoside B (Plant. B)

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学統合薬科学系 高田和幸 教授、西村周泰 助教 (現同志社大学大学院 准教授) に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、実験にご協力、ご助言、ご指導を賜りました次の方々に、心よりお礼申し上げます。

京都薬科大学生薬学分野

松田久司 教授、中村誠宏 准教授、中嶋聡一 助教、尾田好美 博士

京都薬科大学放射性同位元素研究センター

河嶋秀和 准教授

京都薬科大学代謝分析学分野

木村寛之 准教授

京都薬科大学病態生化学分野

秋葉聡 教授、石原慶一 准教授、河下映里 助教

京都薬科大学薬品物理化学分野

斎藤博幸 教授、扇田隆司 助教

京都薬科大学公衆衛生学分野

松本崇宏 助教

本論文の作成にあたり、ご助言とご高閲を賜りました京都薬科大学代謝分析学分野 安井裕之 教授ならびに細胞生物学分野 藤室雅弘教授 に厚く御礼申し上げます。

在学中の経済的援助を賜りました日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に採用いただいた日本薬学会に心より感謝いたします。

そして、京都薬科大学統合薬科学系および同卒業生の諸氏、特に実験にご協力頂いた花木葵 氏、岡崎瑞紀 氏、松田英里香 氏、田中雪衣 氏、病態生理学分野 荒木裕哉 学士、生薬学分野 細田依里 学士に、深く御礼申し上げます。また末筆ながら、大学院生活を送るにあたり、ご指導、激励を頂きました先生方、他分野大学院生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念致します。

最後に、4年間、生活面ならびに精神面で支えてくれた家族に深く感謝いたします。

参考文献

1. 内閣府. 令和3年版高齢社会白書 **2021**.
2. Ikejima, C.; Hisanaga, A.; Meguro, K.; Yamada, T.; Ouma, S.; Kawamuro, Y.; Hyouki, K.; Nakashima, K.; Wada, K.; Yamada, S.; Watanabe, I.; Kakuma, T.; Aoyama, Y.; Mizukami, K.; Asada, T. Multicentre Population-Based Dementia Prevalence Survey in Japan: A Preliminary Report. *Psychogeriatrics* **2012**, *12* (2), 120–123.
3. Prince, M.; Albanese, E.; Guerchet, M.; Prina, M. Dementia and Risk Reduction an Analysis of Protective and Modifiable Factors. World Alzheimer Report. **2014**.
4. 二宮利治. 日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究. **2015**.
5. Nakahori, N.; Sekine, M.; Yamada, M.; Tatsuse, T.; Kido, H.; Suzuki, M. Future Projections of the Prevalence of Dementia in Japan: Results from the Toyama Dementia Survey. *BMC Geriatr.* **2021**, *21* (1), 602.
6. Hardy J.; Selkoe D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **2002**, *297* (5580), 353–357.
7. Selko D. J.; Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595–608.
8. Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J. Naturally Secreted Oligomers of Amyloid β Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo. *Nature* **2002**, *416* (6880), 535–539.
9. Parys, J. B.; Leuven, K. U.; Bootman, M.; Yule, D. I.; Sanderson, M. J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. D.; Rietdorf, K.; Collins, T.; Walker, S.; Park, J. G.; Palmer, A. E.; Almassy, J.; Decrock, E.; Bock, M. De; Wang, N.; Bol, M.; Ashish, K.; Kaestner, L.; Lipp, P.; Vogt, K. E.; Ogden, D.; Taylor, C. W.; Tovey, S. C.; Webb, S. E.; Chan, C. M.; Miller, A. L. Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Med.* **2014**, *14* (8), 837–842.
10. Balducci, C.; Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Scip, A.; Biasini, E.; Tapella, L.; Colombo, L.; Manzoni, C.; Borsello, T.; Chiesa, R.; Gobbi, M.; Salmona, M.; Forloni, G. Synthetic Amyloid- β Oligomers Impair Long-Term Memory Independently of Cellular Prion Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (5), 2295–2300.
11. Yasumoto, T.; Takamura, Y.; Tsuji, M.; Watanabe-Nakayama, T.; Imamura, K.; Inoue, H.; Nakamura, S.; Inoue, T.; Kimura, A.; Yano, S.; Nishijo, H.; Kiuchi, Y.; Teplow, D. B.; Ono, K. High Molecular Weight Amyloid β_{1-42} Oligomers Induce Neurotoxicity via Plasma Membrane Damage. *FASEB J.* **2019**, *33* (8), 9220–9234.
12. Cummings, J.; Aisen, P.; Lemere, C.; Atri, A.; Sabbagh, M.; Salloway, S. Aducanumab Produced a Clinically Meaningful Benefit in Association with Amyloid Lowering. *Alzheimer's Res. Ther.* **2021**, *13* (1), 98.
13. van Dyck, C. H.; Swanson, C. J.; Aisen, P.; Bateman, R. J.; Chen, C.; Gee, M.; Kanekiyo, M.;

- Li, D.; Reyderman, L.; Cohen, S.; Froelich, L.; Katayama, S.; Sabbagh, M.; Vellas, B.; Watson, D.; Dhadda, S.; Irizarry, M.; Kramer, L. D.; Iwatsubo, T. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2023**, 388 (1), 9–21.
14. Perry, E.; Walker, M.; Grace J.; Perry R. Acetylcholine in Mind: A Neurotransmitter Correlate of Consciousness? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1999**, 22 (6), 273–280.
 15. Whitehouse, P. J.; Price, D. L.; Struble, R. G.; Clark, A. W.; Coyle, J. T.; Delon, M. R. Alzheimer's disease and senile dementia: Alzheimer ' s Disease and Senile Dementia : Loss of Neurons in the Basal Forebrain. *Science* **1982**, 215 (4537), 1237–1239.
 16. Davis, K. L.; Mohs, R. C.; Marin, D.; Purohit, D. P.; Perl, D. P.; Lantz, M.; Austin, G.; Haroutunian, V. Cholinergic Markers in Elderly Patients with Early Signs of Alzheimer Disease. *JAMA.* **1999**, 281 (15), 1401–1406.
 17. Jack, C. R.; Knopman, D. S.; Jagust, W. J.; Shaw, L. M.; Aisen, P. S.; Weiner, M. W.; Petersen, R. C.; Trojanowski, J. Q. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* **2010**, 9 (1), 119–128.
 18. Nirmalraj, P. N.; List, J.; Battacharya, S.; Howe, G.; Xu, L.; Thompson, D.; Mayer, M. Complete Aggregation Pathway of Amyloid β (1-40) and (1-42) Resolved on an Atomically Clean Interface. *Sci. Adv.* **2020**, 6 (15). eaaz6014.
 19. Wang, H.; Kakizawa, T.; Taniguchi, A.; Mizuguchi, T.; Kimura, T.; Kiso, Y. Synthesis of Amyloid β Peptide 1-42 (E22 Δ) Click Peptide: PH-Triggered in Situ Production of Its Native Form. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (14), 4881–4887.
 20. Sohma, Y.; Hirayama, Y.; Taniguchi, A.; Mukai, H.; Kiso, Y. 'Click Peptide' Using Production of Monomer A β from the *O*-Acyl Isopeptide: Application to Assay System of Aggregation Inhibitors and Cellular Cytotoxicity. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, 19 (5), 1729–1733.
 21. Taniguchi, A.; Sohma, Y.; Hirayama, Y.; Mukai, H.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Matsuzaki, K.; Kiso, Y. "Click Peptide": PH-Triggered in Situ Production and Aggregation of Monomer A β 1-42. *Chembiochem.* **2009**, 10 (4), 710–715.
 22. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, 131 (5), 861–872.
 23. Wilmut, I. The First Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts. *Cell Stem Cell.* **2007**, 1 (6), 593–594.
 24. Kikuchi, T.; Morizane, A.; Doi, D.; Onoe, H.; Hayashi, T.; Kawasaki, T.; Saiki, H.; Miyamoto, S.; Takahashi, J. Survival of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Midbrain Dopaminergic Neurons in the Brain of a Primate Model of Parkinson's Disease. *J. Parkinsons. Dis.* **2011**, 1 (4), 395–412.
 25. Mandai, M.; Watanabe, A.; Kurimoto, Y.; Hirami, Y.; Morinaga, C.; Daimon, T.; Fujihara, M.; Akimaru, H.; Sakai, N.; Shibata, Y.; Terada, M.; Nomiya, Y.; Tanishima, S.; Nakamura, M.; Kamao, H.; Sugita, S.; Onishi, A.; Ito, T.; Fujita, K.; Kawamata, S.; Go, M. J.; Shinohara, C.;

- Hata, K.; Sawada, M.; Yamamoto, M.; Ohta, S.; Ohara, Y.; Yoshida, K.; Kuwahara, J.; Kitano, Y.; Amano, N.; Umekage, M.; Kitaoka, F.; Tanaka, A.; Okada, C.; Takasu, N.; Ogawa, S.; Yamanaka, S.; Takahashi, M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377* (8), 792–793.
26. Abud, E. M.; Ramirez, R. N.; Martinez, E. S.; Healy, L. M.; Cecilia, H. H.; Newman, S. A.; Yeromin, A. V.; Scarfone, V. M.; Samuel, E.; Fimbres, C.; Caraway, C. A.; Fote, G. M.; Abdullah, M.; Agrawal, A.; Kaye, R.; Gyls, K. H.; Cahalan, M. D.; Brian, J.; Antel, J. P.; Mortazavi, A.; Carson, M. J.; Poon, W. W.; Blurton-Jones M. iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron* **2017**, *94* (2), 278–293.
 27. de Leeuw, S. M.; Kirschner, A. W. T.; Lindner, K.; Rust, R.; Budny, V.; Wolski, W. E.; Gavin, A. C.; Nitsch, R. M.; Tackenberg, C. APOE2, E3, and E4 Differentially Modulate Cellular Homeostasis, Cholesterol Metabolism, and Inflammatory Response in Isogenic iPSC-Derived Astrocytes. *Stem Cell Rep.* **2022**, *17* (1), 110–126.
 28. Krajka, V.; Naujock, M.; Pauly, M. G.; Stengel, F.; Meier, B.; Stanslowsky, N.; Klein, C.; Seibler, P.; Wegner, F.; Capetian, P. Ventral Telencephalic Patterning Protocols for Induced Pluripotent Stem Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 716249.
 29. Hu, Y.; Qu, Z. yin; Cao, S. ying; Li, Q.; Ma, L.; Krencik, R.; Xu, M.; Liu, Y. Directed Differentiation of Basal Forebrain Cholinergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *J. Neurosci. Methods* **2016**, *266*, 42–49.
 30. Yue, W.; Li, Y.; Zhang, T.; Jiang, M.; Qian, Y.; Zhang, M.; Sheng, N.; Feng, S.; Tang, K.; Yu, X.; Shu, Y.; Yue, C.; Jing, N. ESC-Derived Basal Forebrain Cholinergic Neurons Ameliorate the Cognitive Symptoms Associated with Alzheimer’s Disease in Mouse Models. *Stem Cell Rep.* **2015**, *5* (5), 776–790.
 31. Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K. L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from A β_{1-42} Are Potent Central Nervous System Neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (11), 6448–6453.
 32. Deshpande, A.; Mina, E.; Glabe, C.; Busciglio, J. Different Conformations of Amyloid β Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons. *J. Neurosci.* **2006**, *26* (22), 6011–6018.
 33. Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y.; Fezoui, Y.; Condron, M. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B. Amyloid β -Protein Fibrillogenesis: Structure and Biological Activity of Protofibrillar Intermediates. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (36), 25945–25952.
 34. Walsh, D. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Condron, M. M.; Teplow, D. B. Amyloid β -Protein Fibrillogenesis: Detection of a Protofibrillar Intermediate. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (35), 22364–22372.
 35. Figueiredo, C. P.; Clarke, J. R.; Ledo, J. H.; Ribeiro, F. C.; Costa, C. V.; Melo, H. M.; Mota-Sales, A. P.; Saraiva, L. M.; Klein, W. L.; Sebollela, A.; De Felice, F. G.; Ferreira, S. T.

- Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight A β Oligomers But Not the Persistent Impairment Induced by Low-Molecular-Weight Oligomers. *J. Neurosci.* **2013**, *33* (23), 9626–9634.
36. Johansson, A. S.; Garlind, A.; Berglind-Dehlin, F.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Gellerfors, P.; Ekholm-Pettersson, F.; Palmblad, J.; Lannfelt, L. Docosahexaenoic Acid Stabilizes Soluble Amyloid- β Protofibrils and Sustains Amyloid- β -Induced Neurotoxicity in Vitro. *FEBS J.* **2007**, *274* (4), 990–1000.
 37. Ono, K.; Tsuji, M. Protofibrils of Amyloid- β Are Important Targets of a Disease-Modifying Approach for Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (3), 952.
 38. Swanson, C.; Cummings, J.; Dhadda, S.; McDade, E.; Wang, J.; Kramer, L. D.; Koyama, A.; Reyderman, L.; Berry, D.A.; Berry, S.; Gordon, R.; Kramer, L. D.; Cummings, J. L. A Randomized, Double-Blind, Phase 2b Proof-of-Concept Clinical Trial in Early Alzheimer's Disease with Lecanemab, an Anti-A β Protofibril Antibody. *Alzheimer's Res. Ther.* **2021**, *13* (1), 80.
 39. Rosensweig, C.; Ono, K.; Murakami, K.; Lowenstein, D. K.; Bitan, G.; Teplow, D. B. Preparation of stable amyloid β -protein oligomers of defined assembly order. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *849*, 23–31.
 40. Teplow, D. B. Preparation of Amyloid β -Protein for Structural and Functional Studies. *Methods Enzymol.* **2006**, *413*, 20–33.
 41. Nakagawa, M.; Taniguchi, Y.; Senda, S.; Takizawa, N.; Ichisaka, T.; Asano, K.; Morizane, A.; Doi, D.; Takahashi, J.; Nishizawa, M.; Yoshida, Y.; Toyoda, T.; Osafune, K.; Sekiguchi, K.; Yamanaka, S. A Novel Efficient Feeder-Free Culture System for the Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3594.
 42. Takahashi, K.; Narita, M.; Yokura, M.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Human Induced Pluripotent Stem Cells on Autologous Feeders. *PLoS One* **2009**, *4* (12), e8067.
 43. Yue, X. S.; Fujishiro, M.; Nishioka, C.; Arai, T.; Takahashi, E.; Gong, J. S.; Akaike, T.; Ito, Y. Feeder Cells Support the Culture of Induced Pluripotent Stem Cells Even after Chemical Fixation. *PLoS One* **2012**, *7* (3), e32707.
 44. Wnorowski, A.; Sharma, A.; Chen, H.; Wu, H.; Shao, N. Y.; Sayed, N.; Liu, C.; Countryman, S.; Stodieck, L. S.; Rubins, K. H.; Wu, S. M.; Lee, P. H. U.; Wu, J. C. Effects of Spaceflight on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Structure and Function. *Stem Cell Rep.* **2019**, *13* (6), 960–969.
 45. Chambers, S. M.; Fasano, C. A.; Papapetrou, E. P.; Tomishima, M.; Sadelain, M.; Studer, L. Highly Efficient Neural Conversion of Human ES and IPS Cells by Dual Inhibition of SMAD Signaling. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (3), 275–280.
 46. Qi, Y.; Zhang, X.; Renier, N.; Wu, Z.; Atkin, T.; Sun, Z.; Ozair, Z.; Tchieu, J.; Zimmer, B.; Fattahi, F.; Ganat, Y.; Azevedo, R.; Zeltner, N.; Brivanlou, A. H.; Karayiorgou, M.; Gogos, J.; Tomishima, M.; Tessier-lavigne, M.; Shi, S.; Studer, L. Combined small-molecule inhibition

- accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (2), 154–163.
47. Schägger, H.; von Jagow, G. Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Anal. Biochem.* **1991**, *199* (2), 223–231.
 48. Amimoto, N.; Nishimura, K.; Shimohama, S.; Takata, K. Generation of Striatal Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Controlling Extrinsic Signals with Small Molecules. *Stem Cell Res.* **2021**, *55*, 102486.
 49. Harkin, L. F.; Gerrelli, D.; Gold Diaz, D. C.; Santos, C.; Alzu'bi, A.; Austin, C. A.; Clowry, G. J. Distinct Expression Patterns for Type II Topoisomerases IIA and IIB in the Early Foetal Human Telencephalon. *J. Anat.* **2016**, *228* (3), 452–463.
 50. Allaway, K. C.; Machold, R. Developmental Specification of Forebrain Cholinergic Neurons. *Dev. Biol.* **2017**, *421* (1), 1–7.
 51. Elshatory, Y.; Gan, L. The LIM-Homeobox Gene Islet-1 Is Required for the Development of Restricted Forebrain Cholinergic Neurons. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (13), 3291–3297.
 52. Demuro, A.; Parker, I.; Stutzmann, G. E. Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (17), 12463–12468.
 53. Fuentealba, R. A.; Liu, Q.; Zhang, J.; Kanekiyo, T.; Hu, X.; Lee, J. M.; Ladu, M. J.; Bu, G. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) Mediates Neuronal A β 42 Uptake and Lysosomal Trafficking. *PLoS One* **2010**, *5* (7), e11884.
 54. Shi, J. M.; Zhu, L.; Lan, X.; Zhao, D. W.; He, Y. J.; Sun, Z. Q.; Wu, D.; Li, H. Y. Endocytosis Is a Key Mode of Interaction between Extracellular β -Amyloid and the Cell Membrane. *Biophys. J.* **2020**, *119* (6), 1078–1090.
 55. Laurén, J.; Gimbel, D. A.; Nygaard, H. B.; Gilbert, J. W.; Strittmatter, S. M. Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid- β Oligomers. *Nature* **2009**, *475* (7233), 1128–1132.
 56. Almeida, C. G.; Takahashi, R. H.; Gouras, G. K. β -Amyloid Accumulation Impairs Multivesicular Body Sorting By Inhibiting the Ubiquitin-Proteasome System. *J. Neurosci.* **2006**, *26* (16), 4277–4288.
 57. Chafekar, S. M.; Baas, F.; Scheper, W. Oligomer-Specific A β Toxicity in Cell Models Is Mediated by Selective Uptake. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1782* (9), 523–531.
 58. Lopez-Suarez, L.; Awabdh, S. Al; Coumoul, X.; Chauvet, C. The SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line, a Relevant in Vitro Cell Model for Investigating Neurotoxicology in Human: Focus on Organic Pollutants. *Neurotoxicology* **2022**, *92*, 131–155.
 59. Schneider, L.; Giordano, S.; Zelickson, B. R.; S Johnson, M.; A Benavides, G.; Ouyang, X.; Fineberg, N.; Darley-Usmar, V. M.; Zhang, J. Differentiation of SH-SY5Y Cells to a Neuronal Phenotype Changes Cellular Bioenergetics and the Response to Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51* (11), 2007–2017.
 60. Xie, H. R.; Hu, L. S.; Li, G.Y. SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line:in Vitro Cell Model

- of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Chin. Med. J.* **2010**, *123* (8), 1086–1092.
61. Chen, X.; Drew, J.; Berney, W.; Lei, W. Neuroprotective Natural Products for Alzheimer's Disease. *Cells* **2021**, *10* (6), 1309.
 62. Shao, R.; Xiao, J. Natural Products for Treatment of Alzheimer's Disease and Related Diseases: Understanding Their Mechanism of Action. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11* (4), 337.
 63. Kennedy, D. O.; Wightman, E. L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Adv. Nutr* **2011**, *2* (1), 32–50.
 64. Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P.; Kayed, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (7), 5892–5901.
 65. Kim, D. S. H. L.; Park, S. Y.; Kim, J. Y. Curcuminoids from *Curcuma Longa* L. (Zingiberaceae) That Protect P₀12 Rat Pheochromocytoma and Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells from β A(1–42) Insult. *Neurosci. Lett.* **2001**, *303* (1), 57–61.
 66. Yanagisawa, D.; Kato, T.; Taguchi, H.; Shirai, N.; Hirao, K.; Sogabe, T.; Tomiyama, T.; Gamo, K.; Hirahara, Y.; Kitada, M.; Tooyama, I. Biomaterials Keto Form of Curcumin Derivatives Strongly Binds to A β Oligomers but Not Fibrils. *Biomaterials* **2021**, *270*, 120686.
 67. Friedland, R. P.; Kalaria, R.; Berridge, M.; Miraldi, F.; Hedera, P.; Reno, J.; Lyle, E.; Marotta, C. A. Neuroimaging of Vessel Amyloid in Alzheimer's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1997**, *826*, 242–247.
 68. Remes, A. M.; Laru, L.; Tuominen, H.; Aalto, S.; Kemppainen, N.; Mononen, H.; Någren, K.; Parkkola, R.; Rinne, J. O. Carbon 11-Labeled Pittsburgh Compound B Positron Emission Tomographic Amyloid Imaging in Patients with APP Locus Duplication. *Arch. Neurol.* **2008**, *65* (4), 540–544.
 69. Hostetler, E. D.; Sanabria-Bohórquez, S.; Fan, H.; Zeng, Z.; Gammage, L.; Miller, P.; O'Malley, S.; Connolly, B.; Mulhearn, J.; Harrison, S. T.; Wolkenberg, S. E.; Barrow, J. C.; Williams, D. L.; Hargreaves, R. J.; Sur, C.; Cook, J. J. [¹⁸F]Fluoroazabenzoxazoles as Potential Amyloid Plaque PET Tracers: Synthesis and in Vivo Evaluation in Rhesus Monkey. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (8), 1193–1203.
 70. Meier, S. R.; Sehlin, D.; Roshanbin, S.; Falk, V. L.; Saito, T.; Saido, T. C.; Neumann, U.; Rokka, J.; Eriksson, J.; Syvänen, S. ¹¹C-PiB and ¹²⁴I-Antibody PET Provide Differing Estimates of Brain Amyloid- β after Therapeutic Intervention. *J. Nucl. Med.* **2022**, *63* (2), 302–309.
 71. Roodenrys, S.; Booth, D.; Bulzomi, S.; Phipps, A.; Micallef, C.; Smoker, J. Chronic Effects of Brahmi (*Bacopa Monnieri*) on Human Memory. *Neuropsychopharmacology* **2002**, *27* (2), 279–281.
 72. Russo, A.; Borrelli, F. *Bacopa Monniera*, a Reputed Nootropic Plant: An Overview. *Phytomedicine* **2005**, *12* (4), 305–317.
 73. Holcomb, L. A.; Dhanasekaran, M.; Hitt, A. R.; Young, K. A.; Riggs, M.; Manyam, B. V.

- Bacopa Monniera* Extract Reduces Amyloid Levels in PSAPP Mice. *J. Alzheimer's Dis.* **2006**, 9 (3), 243–251.
74. Limpeanchob, N.; Jaipan, S.; Rattanakaruna, S.; Phrompittayarat, W.; Ingkaninan, K. Neuroprotective Effect of *Bacopa Monnieri* on Beta-Amyloid-Induced Cell Death in Primary Cortical Culture. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 120 (1), 112–117.
 75. Ohta, T.; Nakamura, S.; Nakashima, S.; Oda, Y.; Matsumoto, T.; Fukaya, M.; Yano, M.; Yoshikawa, M.; Matsuda, H. Chemical Structures of Constituents from the Whole Plant of *Bacopa Monniera*. *J. Nat. Med.* **2016**, 70 (3), 404–411.
 76. Nakashima, S.; Oda, Y.; Morita, M.; Ohta, A.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Nakamura, S. Analysis of Active Compounds Using Target Protein Cofilin-Cucurbitacins in Cytotoxic Plant *Bryonia Cretica*. *Toxins* **2022**, 14 (3), 212.
 77. Chakravarty, A. K.; Sarkar, T.; Nakane, T.; Kawahara, N.; Masuda, K. New Phenylethanoid Glycosides from *Bacopa Monniera*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50 (12), 1616–1618.
 78. Luongo, T. S.; Lambert, J. P.; Yuan, A.; Zhang, X.; Gross, P.; Song, J.; Shanmughapriya, S.; Gao, E.; Jain, M.; Houser, S. R.; Koch, W. J.; Cheung, J. Y.; Madesh, M.; Elrod, J. W. The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Rep.* **2015**, 12 (1), 23–34.
 79. Jankowsky, J. L.; Fadale, D. J.; Anderson, J.; Xu, G. M.; Gonzales, V.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Lee, M. K.; Younkin, L. H.; Wagner, S. L.; Younkin, S. G.; Borchelt, D. R. Mutant Presenilins Specifically Elevate the Levels of the 42 Residue β -Amyloid Peptide in Vivo: Evidence for Augmentation of a 42-Specific γ Secretase. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, 13 (2), 159–170.
 80. Wang, H. Y.; Lee, D. H.; Andrea, M. R.; Peterson, P. A.; Shank, R. P.; Reitz, A. B. β -Amyloid_{1–42} Binds to $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (8), 5626–5632.
 81. Caballero, E.; Hernando-Pérez, E.; Tapias, V.; Calvo-Rodríguez, M.; Villalobos, C.; Núñez, L. Amyloid Beta Oligomers-Induced Ca^{2+} Entry Pathways : Role of Neuronal Networks, NMDA Receptors and Amyloid Channel Formation. *Biomedicines* **2022**, 10 (5), 1153
 82. Ledeen, R. W.; Wu, G. Ganglioside Function in Calcium Homeostasis and Signaling. *Neurochem. Res.* **2002**, 27 (7–8), 637–647.
 83. d'Azzo, A.; Tessitore, A.; Sano, R. Gangliosides as Apoptotic Signals in ER Stress Response. *Cell Death Differ.* **2006**, 13 (3), 404–414.
 84. Yanagisawa, K. GM1 Ganglioside-Bound Amyloid β -Protein in Alzheimer's Disease Brain. *Neurobiol. Aging* **1998**, 19 (1), S65–S67.
 85. Okada, T.; Ikeda, K.; Wakabayashi, M.; Ogawa, M.; Matsuzaki, K. Formation of Toxic $\text{A}\beta$ (1–40) Fibrils on GM1 Ganglioside-Containing Membranes Mimicking Lipid Rafts : Polymorphisms in $\text{A}\beta$ (1–40) Fibrils. *J. Mol. Biol.* **2008**, 382 (4), 1066–1074.
 86. Fani, G.; Mannini, B.; Vecchi, G.; Cascella, R.; Cecchi, C.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M.;

- Chiti, F. A β Oligomers Dysregulate Calcium Homeostasis by Mechanosensitive Activation of AMPA and NMDA Receptors. *ACS Chem. Neurosci.* **2021**, *12* (4), 766–781.
87. Huang, Y. R.; Liu, R. T. The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (12), 4477
 88. Calvo-Rodriguez, M.; Bacskai, B. J. Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death. *Trends Neurosci.* **2021**, *44* (2), 136–151.
 89. Wang, W.; Zhao, F.; Ma, X.; Perry, G.; Zhu, X. Mitochondria Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Recent Advances. *Mol. Neurodegener.* **2020**, *15* (1), 30.
 90. Calvo-Rodriguez, M.; Hou, S. S.; Snyder, A. C.; Kharitonova, E. K.; Russ, A. N.; Das, S.; Fan, Z.; Muzikansky, A.; Garcia-Alloza, M.; Serrano-Pozo, A.; Hudry, E.; Bacskai, B. J. Increased Mitochondrial Calcium Levels Associated with Neuronal Death in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 2146.
 91. Ferreira, I. L.; Ferreira, E.; Schmidt, J.; Cardoso, J. M.; Pereira, C. M. F.; Carvalho, A. L.; Oliveira, C. R.; Rego, A. C. A β and NMDAR Activation Cause Mitochondrial Dysfunction Involving ER Calcium Release. *Neurobiol. Aging* **2015**, *36* (2), 680–692.
 92. Navarro, E.; Buendia, I.; Parada, E.; León, R.; Jansen-Duerr, P.; Pircher, H.; Egea, J.; Lopez, M. G. Alpha7 Nicotinic Receptor Activation Protects against Oxidative Stress via Heme-Oxygenase 1 Induction. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *97* (4), 473–481.
 93. Gao, X.; Xu, X.; Pang, J.; Zhang, C.; Ding, J. M.; Peng, X.; Liu, Y.; Cao, J. M. NMDA Receptor Activation Induces Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Physiol. Res.* **2007**, *56* (5), 559–569.
 94. Volbracht, C.; Van Beek, J.; Zhu, C.; Blomgren, K.; Leist, M. Neuroprotective Properties of Memantine in Different in Vitro and in Vivo Models of Excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **2006**, *23* (10), 2611–2622.
 95. Chen, C. M.; Lin, J. K.; Liu, S. H.; Lin-Shiau, S. Y. Novel Regimen through Combination of Memantine and Tea Polyphenol for Neuroprotection against Brain Excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86* (12), 2696–2704.
 96. Hanaki, M.; Murakami, K.; Gunji, H.; Irie, K. Activity-Differential Search for Amyloid- β Aggregation Inhibitors Using LC-MS Combined with Principal Component Analysis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *61*, 128613.
 97. Sato, M.; Murakami, K.; Uno, M.; Nakagawa, Y.; Katayama, S.; Akagi, K.; Masuda, Y.; Takegoshi, K.; Irie, K. Site-Specific Inhibitory Mechanism for Amyloid β 42 Aggregation by Catechol-Type Flavonoids Targeting the Lys Residues. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (32), 23212–23224.
 98. Strohmeyer, R.; Kovelowski, C. J.; Mastroeni, D.; Leonard, B.; Grover, A.; Rogers, J. Microglial Responses to Amyloid β Peptide Opsonization and Indomethacin Treatment. *J. Neuroinflammation* **2005**, *2*, 18.
 99. Takata, K.; Kitamura, Y.; Saeki, M.; Terada, M.; Kagitani, S.; Kitamura, R.; Fujikawa, Y.;

- Maelicke, A.; Tomimoto, H.; Taniguchi, T.; Shimohama, S. Galantamine-Induced Amyloid- β Clearance Mediated via Stimulation of Microglial Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (51), 40180–40191.
100. 公益社団法人日本アイソトープ協会. 放射性医薬品開発研究への招待. **2022**
 101. Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergström, M.; Savitcheva, I.; Huang, G. F.; Estrada, S.; Ausén, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Långström, B. Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* **2004**, 55 (3), 306–319.
 102. Park, Y. D.; Kim, J. J.; Lee, S.; Park, C. H.; Bai, H. W.; Lee, S. S. A Pyridazine-Based Fluorescent Probe Targeting A β Plaques in Alzheimer's Disease. *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, 2018, 1651989.
 103. Ran, C.; Xu, X.; Raymond, S. B.; Ferrara, B. J.; Neal, K.; Bacskaï, B. J.; Medarova, Z.; Moore, A. Design, synthesis, and testing of difluoroboron derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid- β deposits. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (42), 15257–15261.
 104. Pardridge, W. M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRx* **2005**, 2 (1), 3–14.
 105. Jeong, S. H.; Jang, J. H.; Lee, Y. B. Drug Delivery to the Brain via the Nasal Route of Administration: Exploration of Key Targets and Major Consideration Factors. *J. Pharm. Investig.* **2023**; 53 (1), 119-152.
 106. Hanson, L. R.; Frey, W. H. Intranasal Delivery Bypasses the Blood-Brain Barrier to Target Therapeutic Agents to the Central Nervous System and Treat Neurodegenerative Disease. *BMC Neurosci.* **2008**, 9 (Suppl 3), S5.
 107. Lochhead, J. J.; Thorne, R. G. Intranasal Delivery of Biologics to the Central Nervous System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64 (7), 614–628.
 108. Erdő, F.; Bors, L. A.; Farkas, D.; Bajza, Á.; Gizurarson, S. Evaluation of Intranasal Delivery Route of Drug Administration for Brain Targeting. *Brain Res. Bull.* **2018**, 143, 155–170.
 109. Umeda, T.; Hatanaka, Y.; Sakai, A.; Tomiyama, T. Nasal Rifampicin Improves Cognition in a Mouse Model of Dementia with Lewy Bodies by Reducing A-synuclein Oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22 (16), 8453.