

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬と
その有効成分の同定

笹岡 紀男

目次

表紙	• • • • •	1
目次	• • • • •	2
要旨	• • • • •	3
序論	• • • • •	5
結果	• • • • •	7
考察	• • • • •	1 5
実験手法・材料	• • • •	1 9
引用文献	• • • • •	2 5
謝辞	• • • • •	3 0
図	• • • • •	3 1

要旨

少子高齢化問題を抱える現代社会において、認知症患者はこれから益々増加することが予想され、特にその約半数を占めるアルツハイマー病に対する治療薬、及び予防薬の早急な開発が求められている。アルツハイマー病は脳内のアミロイド前駆体タンパク質 (APP) に細胞内の β -、 γ -セクレターゼが作用し産生される不溶性のアミロイド β ($A\beta$ 42) が、脳内に蓄積し、細胞死を引き起こすことで発症する。これまでに多くの β -、 γ -セクレターゼ阻害薬の研究開発がなされているが、重篤な副作用を来すことから未だ有効性を示す薬剤は存在しない。また、アルツハイマー病は早期診断が非常に困難で、治療・予防については、かなり早期から、かつ長期間行う必要が想定され、いかに副作用の少ない治療薬を開発するかが極めて重要となる。そこで私は、それら安全性の観点から漢方薬の原料として知られる植物エキスに着目し、 $A\beta$ 産生の阻害活性を有する植物エキスを同定し、実際に病態モデルマウスに投与することでその植物エキスのアルツハイマー病における効果を検証した。

1、 $A\beta$ 産生抑制効果をもつ植物エキスのスクリーニング及び主要成分の決定

アルツハイマー病発症の最初のイベントである $A\beta$ 産生を担う γ -セクレターゼの阻害活性をもつ植物エキスのスクリーニングを行うためのアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて、約 1,600 種類の植物エキスをスクリーニングし、その中で阻害活性を有するヒシユカエキスを同定した。また、ELISA による細胞培養液中の $A\beta$ 分泌量の定量結果からも、ヒシユカエキス添加群は非添加群と比較して有意に $A\beta$ 量の減少を示した。さらに、私はヒシユカエキス中の γ -セクレターゼ阻害活性をもつ主要成分を決定するために Bligh Dyer 法、固相抽出法、HPLC (順相、逆相) によりエキスを精製後、その最終精製物の化学構造を質量分析、NMR を用いて解析し、Garcinielliptone HC を同定した。

2、新規アルツハイマー病モデルマウスに対する薬理学的効果

$A\beta$ 産生抑制効果を認めたヒシユカエキスのアルツハイマー病モデルマウスに対する薬理学的効果を評価する目的で、家族性アルツハイマー病の変異として同定された Indiana 変異をもつ APP を発現させるトランスジェニックマウス

(V717F マウス) を作出した。作出した V717F マウスに生後 6 週齢からヒシユカエキスを飲水投与し、記憶・学習能力を Morris の水迷路を用いて評価した。結果、ヒシユカエキスを投与した 9 ヶ月齢及び 12 ヶ月齢の V717F マウスは非投与マウスと比較して有意に記憶障害抑制効果がみられた。また、脳切片の免疫染色の結果から、16 ヶ月齢の V717F マウスにおいては、ヒシユカエキス投与群は非投与群と比較して脳内 A β 蓄積量の減少を認めた。さらに、 γ -セクレターゼ本体の活性中心であると考えられている Presenilin1 の家族性アルツハイマー病変異として同定された P267S 変異のある Presenilin1 (P267S) を共発現させた V717F/P267S マウスを作出し、Morris の水迷路と Y 字迷路による行動実験によりエキスのアルツハイマー病に対する記憶低下の予防効果を評価した。結果は前述同様、9 ヶ月齢の V717F/P267S マウスのエキス投与群は非投与群と比較して、有意に記憶・学習能力の低下を抑制した。

以上より、私は γ -セクレターゼ活性を簡便に評価できる測定方法を構築し、そのスクリーニングからヒシユカエキスの同定、さらにその主要成分の決定に成功した。また、ヒシユカエキスは *in vitro* 及び *in vivo* において A β 産生を有意に抑制し、アルツハイマー病における記憶・学習能力低下を抑制したことからアルツハイマー病予防薬として有用であると考えられた。

序論

超後期高齢化社会に突入しつつある我が国では、アルツハイマー病に代表される認知症患者のさらなる増加が予想される。しかしながら、現時点では根本的な治療法や予防法が確立されておらず、対症療法だけに依存している状況である。今、十分な対応策を講じなければ、来るべき医療費と人的負担の膨大な増加は、我が国の存亡をも左右しかねない事態になりうる。一方で、この状況は多くの先進国にも当てはまり、アルツハイマー病に対する有効な治療法の開発は、先進国に共通する重要課題であり (Wang *et al.*,2008 ; Ferri *et al.*,2005)、特に世界で最も顕著な高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、この分野の研究の推進ほど、緊急かつ重要な科学的対策は無いといえる。

アルツハイマー病の発症原因の最も上流に位置すると考えられているのが老人斑の主要構成成分である β Amyloid ($A\beta$) の産生である (Hardy *et al.*,2002 ; Morelli *et al.*,2012)。 $A\beta$ は、その前駆体タンパク質である Amyloid Precursor Protein (APP) (Selkoe,1996) の膜貫通近傍部分から β -セクレターゼと γ -セクレターゼの 2 つのタンパク質プロセッシング酵素の働きで切り出される (Vassar *et al.*,1999 ; Haass *et al.*,1992)。遺伝性アルツハイマー病では、ほとんどの症例で $A\beta$ (特に $A\beta$ 42) の産生亢進が観察され、アルツハイマー病の発症には γ -セクレターゼによる APP からの $A\beta$ の切り出しが律速段階であると考えられる (Selkoe, 2012 ; Thomas *et al.*,2007)。また、これまで報告されている家族性アルツハイマー病のほとんどの症例で APP 及び γ -セクレターゼの構成因子の 1 つである Presenilin に変異 (Capell *et al.*, 1998) が見られ、 $A\beta$ 産生の亢進が認められている (Selkoe, 2001)。

健常者であっても、 $A\beta$ 沈着が 40 歳代から始まる例も存在するが (Braak H *et al.*, 1997)、それからの進行は緩やかで、約 20 年かけて明らかな沈着がみられるようになり、さらに 20 年、もしくはそれ以上かけて軽度認知障害が惹起される (Funato *et al.*, 1998)。アルツハイマー病患者においてはこの一連の $A\beta$ 沈着から最終的な認知症までの進行が非常に早く、50 歳代前半で発症する場合も報告されている (Godbolt *et al.*, 2004)。

これらのことから、アルツハイマー病の薬物治療・予防においては、かなりの長期に渡って薬物投与を行う必要があると想定される。したがって、いかに

副作用が少なく安全な治療薬、及び予防薬を提供できるかが極めて重要となる。この観点から私は、合成化合物ではなく漢方薬に代表される植物エキスに着目した。漢方薬は古くからヒトに飲まれており、副作用も比較的少なく安全性を確保しやすいため、より安全性の高い治療法を提供できる可能性を持っているといえる。また、現在臨床で使用されているアルツハイマー病治療薬は、障害を受けた神経細胞の機能を助けるものであり、神経細胞の障害や死を防ぐものではない。今もなお、 $A\beta$ の産生を阻害する薬剤や $A\beta$ の排出を促進する薬剤の開発、及び抗体を用いた治療法の開発に激しい競争が繰り広げられているが、本研究で目指した少ない副作用で長期投与が可能なアルツハイマー病のリスクを軽減するという治療薬は欧米で開発が進められている治療薬とは一線を画すものである。

APP から $A\beta$ の切り出しを担う γ -セクレターゼの阻害剤はアルツハイマー病による神経細胞の障害を止めると考えられた (Dovey *et al.*, 2001)。しかしながら、 γ -セクレターゼ阻害剤は $A\beta$ の生成を抑制する以外に、同じ γ -セクレターゼが関与する Notch プロセッシングに対しても影響を及ぼすため (Selkoe, 2004)、細胞分化や運命決定に重要な役割を果たす Notch のシグナル伝達を阻害するために重篤な副作用を惹起する (Xia *et al.*, 2001)。そのため、Notch プロセッシングに影響することなく、 γ -セクレターゼの作用を調節し、 $A\beta$ の生成を抑制する必要がある。

近年、抑肝散とよばれるアルツハイマー病の周辺症状（鬱状態、行動異常）に効果を示す漢方薬が注目されているが (Fujiwara *et al.*, 2011)、中核症状（記憶障害）を予防・治療する漢方薬は未だ見つかっていない。しかし、私は、より良いスクリーニング系を用いれば、アルツハイマー病に対して有効な成分をもつ植物エキスを見つけることができると考えた。

本研究で私は、 γ -セクレターゼ活性を従来の $A\beta$ の産生量から推測する方法ではなく、ルシフェラーゼレポーターアッセイで、より安価で簡便に定量できる方法を構築し、このアッセイ系を用いて $A\beta$ 産生を阻害する活性をもつヒシユカエキスを同定した。さらに、このヒシユカエキスをアルツハイマー病モデルマウスに病態発症前から持続的に投与することによって、有意な予防効果を認めた。

結果

A β 産生抑制活性を有する植物エキスのスクリーニング

アルツハイマー病の病因の最も上流に位置すると考えられているのが老人斑の主要構成成分である A β の産生である。A β は、その前駆体タンパク質である Amyloid Precursor Protein (APP) の膜貫通近傍部分から β -セクレターゼと γ -セクレターゼの 2 つのタンパク質プロセシング酵素の働きで切り出される。生体における APP の生理学的意義はほとんど不明であるが、遺伝性アルツハイマー病では、ほとんどの症例で APP からの A β (特に A β 42) の産生亢進が観察され、アルツハイマー病の発症には、 γ -セクレターゼによる A β の APP からの切り出しが律速段階であると想定される (Figure 1)。

従来、 γ -セクレターゼ活性は、A β の C 末端部分を認識する抗体を用いた ELISA 法によって定量し、その量から推測する方法しか無かった。しかし、ELISA 法は、大量の γ -セクレターゼ阻害候補物質のスクリーニングを行うには非常に高価で莫大な費用が必要となる。私は、この問題を解決するために、安価で簡便なルシフェラーゼ活性で測定を行えるアッセイ系を構築した。

このアッセイ系では、既に β 切断された Indiana 変異をもつ APP (β CTF-V717F) の N 末端部位に FLAG タグを付加し、C 末端部分に酵母の転写因子である Gal4 の DNA 結合領域と Herpes Simplex virus の転写活性化領域を融合した Gal4-VP16 を付加したタンパク質 (FLAG- β CTF-Gal4VP16) を発現させるベクターを構築した。この Gal4-VP16 は、転写研究領域で汎用されている強力な転写因子で、その活性はプロモーター領域に Gal4 認識配列 (GalRE) を挿入したルシフェラーゼのレポーター (TK(GalRE)Luc) で測定することができる。この FLAG- β CTF-Gal4VP16 と TK(GalRE)Luc を HEK293A 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に植物エキスを添加、さらに 24 時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した (Figure 2)。また、このアッセイ系では、非特異的な転写抑制作用が擬陽性になるため、サイトメガロウィルス (CMV) のプロモーターで β ガラクトシダーゼ (β -gal) を発現させるプラスミド (CMV- β -gal) を同時にトランスフェクションし、 β -gal 活性に変化を与えずルシフェラーゼ活性のみを低下させるものをポジティブと判

定した。このアッセイ系において、ルシフェラーゼ活性は既存の γ -セクレターゼ阻害剤である N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシン t-ブチルエステル (DAPT) の添加で濃度依存的に低下したことから、 γ -セクレターゼによって細胞膜に存在する FLAG- β CTF(V717F)-Gal4VP16 が切断された結果、Gal4VP16 が核に移行してレポーターの転写を活性化していることが確認できた (**Figure 3**)。

樹立したアッセイ系を用いて私は、約 1,600 種類の植物エキスをスクリーニングし、結果、数種類の植物エキスが濃度依存的にルシフェラーゼ活性を特異的に低下させ、その中で最も顕著なものはヒシュカエキスであることを見出した (**Figure 3**)。

また、このヒシュカエキスは β CTF の Indiana 変異 (V717F) だけでなく London 変異 (V717I) でもほぼ同等のレベルでルシフェラーゼ活性を減少させた (**Figure 4**)。ヒシュカエキスに γ -セクレターゼの阻害活性があることの確認実験として、FLAG- β CTF(V717F)-Gal4VP16 を HEK293A にトランスフェクションし、その培養上清中の A β 分泌量を、A β に特異的な ELISA を用いて確認した結果、ルシフェラーゼアッセイの結果と同様に有意に A β 量を減少させた (**Figure 5**)。

一方で、 β CTF と同じく γ -セクレターゼが作用することが知られている Notch1 の N 末端領域を除去した活性化型 Notch1 を HEK293A 細胞に強制発現させ、ヒシュカエキスを添加したときのルシフェラーゼ活性を調べた。その結果、 β CTF と同様にヒシュカエキス添加群ではコントロールと比較してルシフェラーゼ活性の減少がみられたが、活性化型 Notch1 ではその減少レベルは β CTF と比較して僅かであった (**Figure 6**)。

γ -セクレターゼ阻害活性を持つヒシュカエキス成分の精製と構造決定

樹立したスクリーニングによって γ -セクレターゼの阻害活性を認めたヒシュカエキスに対し、その主要成分の精製を行った (**Figure 7**)。

まず、ヒシュカエキスを Bligh Dyer 法により水溶性 (Fraction 1)、脂溶性 (Fraction 2) の 2 層に分離した後、前述のレポーターアッセイによりエキス中の γ -セクレターゼ阻害活性が脂溶性分画 (Insoluble Fraction) に移行していることを確認した (**Figure 8**)。続いて、この脂溶性分画を Silica Cartridges を

使用した固相抽出により 2 分画に分離した。用いた溶媒は 100%クロロホルム (Fraction 2-1)、100%メタノール (Fraction 2-2) で、レポーターアッセイにより 100%メタノール分画 (Fraction 2-2) に移行していることを確認した (Figure 9)。

次に、100%メタノール分画 (Fraction 2-2) を 5CN-MS 順相カラムにより、ヘキサン：クロロホルム=50：50 の溶媒からスタートし、毎分 1%ずつメタノール濃度を上昇させるプロトコールで HPLC を実施した。結果、3 分～7 分の分画 (Fraction 4～Fraction 7) に活性成分が溶出していることを確認した (Figure 10)。また、この順相 HPLC で得た活性分画を回収し、5C18-AR-II カラムにより、アセトニトリル：水=80：20 の溶媒からスタートし、毎分 1%ずつアセトニトリル濃度を上昇させるプロトコールで逆相 HPLC を行った。その結果、8 分～12 分の分画 (Fraction 9～Fraction 12) に活性成分が溶出していることを確認した (Figure 11)。さらに、この活性分画を回収し、2 度目の逆相 HPLC として、Symmetry shield C18 カラムで前述と同様に毎分 1%ずつアセトニトリル濃度を上昇させるプロトコールで分離を行った結果、14 分～16 分 (Fraction 15～Fraction 16) に活性成分が溶出していることを確認した (Figure 12)。

最後に、活性成分をより純粋なシングルピークに精製するために、 π -NAP カラムを用いてアセトニトリル：水=65：35 の溶媒で逆相 HPLC を行った。その結果、よりシャープなシングルピークが分離開始後 15 分 (Fraction 15) にみられ (Figure 13)、その化合物の最大吸収波長は 247 nm と 332 nm を示した (Figure 14)。

上記に記した一連の方法を用いて、ヒシユカエキスの脂溶性分画 330 mg から開始し、最終的に 2 mg の精製化合物を得た。さらに私は、この分子の構造を明らかにするために、質量分析及び核磁気共鳴 (NMR) を用いて、分子構造の決定を試みた (京都大学薬学研究科の竹本教授、塚野助教の協力による)。結果、この化合物の分子量は 416 であり (Figure 15)、NMR によるこの化合物のケミカルシフトは以下の通りであった。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.81-4.76 (m, 3H), 3.64 (m, 1H), 2.93 (dd, $J = 14.4, 10.9$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 14.4, 8.0$ Hz, 1H), 2.70-2.59 (m, 4H), 1.57 (s, 6H), 1.52 (s, 6H), 1.30 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.23 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 204.8, 202.3, 199.3, 158.1, 135.2, 135.0, 118.1, 117.7, 108.9, 102.3, 92.5, 72.0, 61.8, 39.2, 37.4, 34.9, 26.5, 25.8, 25.7, 25.1, 24.3, 20.1, 18.8,

17.9, 17.7.

NMR より、上記の化合物は Garcieiliptone HC ($C_{25}H_{36}O_5$) という既知の化合物であることが明らかとなった (**Figure 15**) (Lu *et al.*, 2008)。

精製した Fraction 15 の γ -セクレターゼ阻害活性の有無をルシフェラーゼアッセイにより確認し (**Figure 16**)、 IC_{50} 値を算出した。Fraction 15 の IC_{50} 値は $5.4 \mu g/mL$ であり、DAPT は $29nM$ であった。これまでに報告のある DAPT の IC_{50} 値は $20 nM$ であり (Dovey *et al.*, 2001)、このアッセイ系が妥当であることを示している。さらに、ルシフェラーゼアッセイ以外の確認実験として、HEK293A 細胞に FLAG- β CTF (V717F)-Gal4VP16 を過剰発現させ、ヒシユカエキスと Fraction 15 を添加し、 γ -セクレターゼの阻害活性を Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) の蓄積量を比較することでウェスタンブロッティングを用いて検証した。トランスフェクション効率の内部標準タンパク質として導入した GFP の発現量に差はほぼ無いことを確認し、N 末端に付加した FLAG タグ、及び C 末端に付加した Gal4 をそれぞれ FLAG 抗体、Gal4 抗体を用いて検出した。結果、既に報告ある通り AICD の検出は困難であったが (Kimberly *et al.*, 2001)、ポジティブコントロールとして添加した DAPT と酷似してヒシユカエキス及び Fraction 15 の添加群は、濃度依存的に α CTF-Gal4VP16 を蓄積させることを確認した (**Figure 17**)。この結果より、ヒシユカエキス及び Fraction 15 が γ -セクレターゼを阻害し、それによって蓄積した α CTF が検出されたと考えられる。また、Fraction 15 添加群はヒシユカエキス添加群と比較してやや阻害活性の増加がみられた。

ヒシユカエキス投与によるアルツハイマー病症状の緩和

今回、スクリーニングによって同定したヒシユカエキスが実際にアルツハイマー病の症状を緩和もしくは予防できるかを検証するためにアルツハイマー病モデルマウスを新たに作出した。これまでに、幾つかのアルツハイマー病モデルマウスの報告があり、そのうちのいくつかは市販されている。また、試料提供契約を交わすことで入手が可能である。しかしながら、これらのマウスは非常に高価であり、交配によって増やすことが禁じられている場合がある。さらには、薬物開発に利用することの制限も存在し、いずれのマウスも非常に使い勝手が悪い。そこで、当研究室ではこれまでに幾つかのトランスジェニック

マウス作出の実績もあることから、今回新たなアルツハイマー病モデルマウスの作出を実施した。脳の神経細胞に特異的に発現させることを目的に、神経特異的エノラーゼ (neuron-specific enolase : NSE) 遺伝子のプロモーター支配下に家族性アルツハイマー病で同定された Indiana 変異 (V717F) をもつ APP を発現させるトランスジーンをマウスの受精卵にインジェクションし、APP トランスジェニックマウス (V717F マウス) を得た。この V717F マウスを水投与群及びヒシュカエキス投与群 (エキスを水に溶解し 2 g/L としたものを投与) にグループ分けし、生後 6 週間から各々を自由摂取させた。飲水量に関して、野生型マウスと水投与及びヒシュカエキス投与の V717F マウスはどのグループも 4~6 mL/day/mouse で、グループ間に有意な差はなく、体重変化に関しても 18 ヶ月齢まで有意な差はみられなかった (**Figure 18**)。さらに摂取させたヒシュカエキスは V717F マウスの脳内におけるトランスジーン mRNA 量を変動させることはなかった (**Figure 19**)。

病態モデルマウスに対するヒシュカエキスの効果を評価ための記憶・学習能力測定実験として Morris の水迷路を用いた。プール内の水面下にプラットホームを設置しており、プールに放たれたマウスは水を嫌うため、プラットホームを避難場所とみなし、徐々に記憶する。1日目から5日目まで毎日行う訓練セッションにおいて、2 ヶ月齢のマウスでは野生型マウスと V717F マウスとの間にプラットホームに辿り着くまでの時間の差は認められなかった。しかし、6ヶ月齢頃から野生型マウスと V717F マウスの間に徐々に差が見られ始め、9ヶ月齢、12ヶ月齢では有意な差が認められた。また、V717F マウスのヒシュカエキス投与群は非投与群と比較して、プラットホームにたどり着くまでの時間が有意に短縮された (**Figure 20**)。一方、水面下のプラットホームの位置を記憶しているかを検証するプローブテスト (6日目) では、プラットホームを取り除き、ターゲット区間と非ターゲット区間 (平均) における滞在時間を比較した。結果、2ヶ月齢の V717F マウスはターゲット区間と非ターゲット区間の滞在時間に有意な差はみられず、記憶能力の低下が確認されなかったが、訓練セッションの結果と同様に9ヶ月齢、12ヶ月齢の V717F マウスで、記憶能力の低下が確認された。また、9ヶ月齢、12ヶ月齢のヒシュカエキス投与 V717F マウスでは野生型マウスと同様に滞在時間に有意な差を保持したままであった (**Figure 21**)。

しかしながら、15ヶ月齢、18ヶ月齢の V717F マウスではヒシュカエキス投与マウスと非投与マウスとの間で、訓練セッションでの経時的な到着時間の短縮

はみられず、6日目のプローブテストにおいても、滞在時間に有意な差はみられなかった。この結果から、本研究で同定したヒシュカエキスは惹起されるアルツハイマー病の症状を完全に抑制するのではなく、発症を遅延させる効果を持つことが示唆された。

次に、作出した V717F マウスと野生型マウス、及びヒシュカ投与マウスと水投与マウスにおいて、総運動量に差があるのかを検証するために、オープンフィールドテストを用いて、5 分間モニターした。本試験は実験動物の自発運動量や活動性、一般行動を測定する場合に汎用されるが、動物の不安や恐怖などの情動機能を評価する実験系としても利用可能である。フィールドは中心からほぼ同じ面積になるよう 3 つの区画に分けており、中心部をゾーン 3、その周りをゾーン 2、壁に面した周縁部をゾーン 1 とした。通常、マウスは広い新規環境下に曝された場合、立ち上がり行動や歩行を繰り返して探索行動を行うが、この時、壁に触れ、フィールドの周縁部をより好んで歩行する「接触走性」という行動パターンを示す。すなわち、通常、マウスは装置内をまんべんなく歩行せずに、装置中央部への探索行動の割合は極めて少ない。3 ヶ月齢から 18 ヶ月齢までのマウスを 3 ヶ月おきに円形のフィールド内に滞在させ、比較した結果、野生型マウスと V717F マウスの総移動距離は共に 1500 cm 前後であり、有意な差は認められなかった (**Figure 22A**)。また、マウスの不安行動を調べるため、マウスがオープンフィールド装置の中央部に滞在する割合を調べた。前述の通り、不安を感じるマウスはフィールドの周縁部分に滞在している時間が増加し、逆に不安が減少しているマウスはフィールドの中央部分に滞在する時間が増加する。野生型のマウスと V717F マウスの 6、12、15 ヶ月齢においては不安行動の割合 (%) に差は認められなかった。しかし、18 ヶ月齢の V717F マウスでは中央部分への滞在時間が有意に上昇した。また、その滞在時間はヒシュカエキスを投与することによって有意に抑えられた (**Figure 22B**)。この結果より、ヒシュカエキスはアルツハイマー病にみられる不安行動の消失を抑制する効果をもつことが示唆された。

さらに、私は同じ NSE 遺伝子のプロモーターの支配下に家族性アルツハイマー病で同定された変異を持つ Presenilin1 (PS1(P267S)) を発現させるトランスジェニックマウスを作出し、前述の V717F マウスと掛け合わせることで、V717F/P267S トランスジェニックマウス (V717F/P267S マウス) を作出した。作出した V717F/P267S の記憶・学習能力を前述同様に Morris の水迷路によつ

て経時的に検討した。その結果、7ヶ月齢までは野生型マウスとの間に差はみられなかったが (**Figure 23**)、9ヶ月齢においては記憶・学習能力の低下が観察された。この V717F/P267F マウスは Morris の水迷路においてもヒシュカエキス投与マウスは非投与マウスと比較して有意に改善効果がみられた (**Figure 24A**)。また、プローブテストにおいても同様に、ターゲット区間と非ターゲット区間 (平均) における滞在時間を比較した結果、ヒシュカエキス投与群は野生型マウスと同様に有意な差を保持したままであった (**Figure 24B**)。

Morris の水迷路と同じく、マウスやラットなどの空間作業記憶の評価に一般的に用いられている方法として Y 字迷路が知られているが、V717F/P267S マウスにおける、Morris の水迷路以外の記憶・学習能力の検証実験として Y 字迷路を実施した。3 回連続して異なるアームへ進入した回数をアームへの総進入回数から 1 を引いた値で除した後、100 を乗した数値を交替反応 (alternation) として検討、比較した。その結果、9ヶ月齢マウスの V717F/P267S マウスは記憶・学習能力に低下がみられたが、ヒシュカエキス投与マウスは野生型マウスとほぼ同じレベルで記憶・学習能力が保持されたままであった (**Figure 25**)。

これら 2 種類のアルツハイマー病モデルマウスを用いた行動実験の結果から、ヒシュカエキスはアルツハイマー病でみられる記憶・学習能力の低下、及び不安行動の消失を有意に遅延させると考えられる。

ヒシュカエキス投与による β アミロイド沈着の抑制

アルツハイマー病認知症では、脳内 $A\beta$ の集積 (老人斑) や神経原繊維変化などの特徴的な病理変化がみられる。これに伴い神経細胞が破壊され、脳が萎縮することにより脳機能が低下すると考えられている。特に、大脳皮質・海馬の萎縮、及び脳室の拡大がみられるようになる。

本研究において作出した V717F マウスの脳内の $A\beta$ 沈着がヒシュカエキス投与によって減少しているかを検証するために、マウスの脳切片を作製し、 $A\beta$ の発現を確認した。まず、抗 $A\beta$ 抗体 (6E10) による組織免疫染色を行い、 $A\beta$ が大脳皮質及び海馬に存在しているかを検討した。 $A\beta$ 沈着は 16ヶ月齢で大脳皮質及び海馬に $20\mu\text{m}$ 以下の小さなものが多く見られた。また、16ヶ月齢の V717F マウスのヒシュカエキス投与マウスは水投与マウスと比較して大脳皮質の $A\beta$ 斑が著しく抑制されており、特に長径 $20\mu\text{m}$ 以上の $A\beta$ 沈着の数が減少

していた(**Figure 26**)。さらに、アミロイドに高い親和性をもつ1-フルオロ-2,5-ビス-(3-ヒドロキシカルボニル-4-ヒドロキシ)スチリルベンゼン (FSB) による脳切片のA β 染色においても、6E10抗体と同じく、ヒシュカエキス投与マウスは非投与マウスと比較して有意に抑制されていることが観察された (**Figure 27**)。

今回、動物実験で扱ったヒシュカエキス投与マウス及び野生型マウスにおいては γ -セクレターゼ阻害による副作用として報告のある皮膚障害や皮膚がんは、観察されなかった。

考察

漢方薬は臨床経験をもとに発展してきたという歴史的背景にあるために、数千年の歴史があるにもかかわらず、漢方薬の科学的根拠はほとんど分かっていない。科学的根拠に基づく西洋医学が主流となった今、漢方薬の科学的性質を明らかにすることが求められている。そのため、漢方薬に含まれる成分及びその薬理学的作用を調べ、明らかにしていくことは重要な意味があるといえる。

また、現在治療法のない疾患において、漢方薬が有効であったという例も報告されており、西洋医学では治療不可な病気の改善を漢方医学に求める人も数多く存在する。これまでにアルツハイマー病の中核症状に対する漢方薬の存在は知られていないが、より良いアッセイ系でスクリーニングを行えば、既存の漢方製剤の中にアルツハイマー病に対する有効成分を含むものが存在する可能性は十分にあると考えられる。

「アミロイド仮説」によると、 $A\beta$ はアルツハイマー病発症の主要な原因物質であり (Hardy *et al.*, 2002 ; Morelli *et al.*, 2012)、家族性アルツハイマー病の研究からもこれまでに同定されたほぼ全ての関連遺伝子の変異によって $A\beta$ (特に $A\beta 42$) の産生亢進が引き起こされていることが示されており、孤発性のアルツハイマー病においても $A\beta$ の産生抑制が有効な治療戦略になるであろうと推測されている。 $A\beta$ 産生の最初期段階を担う γ -セクレターゼは、少なくとも4つのタンパク質からなる複合体であり (Yu *et al.*, 1998 ; Kopan *et al.*, 2004)、*in vitro* での複合体の再構築は極めて難しい。細胞の内在性 γ -セクレターゼの活性は産生される $A\beta$ の量を ELISA 法で定量することで推定されている。しかしながら、ELISA 法はコストが高く、薬剤のスクリーニングには適さない。従って、 γ -セクレターゼの阻害を安価にアッセイする方法の確立が急務であった。このような状況の下、私は γ -セクレターゼの活性を転写因子の活性に変換し、ルシフェラーゼレポーターとして安価に、そして簡便にモニターするシステムを構築した。本研究において、私はこのシステムを用いて、約 1,600 種類の植物エキスをスクリーニングし γ -セクレターゼ阻害活性を有するヒシユカエキスを同定した。また、このヒシユカエキスに含まれる γ -セクレターゼ阻害活性を持つ成分として Garcinielliptone HC を見出した。Garcinielliptone HC は 2008 年にフクギ (オトギリソウ科) から初めて、新規化合物として抽出、同定され

た化合物であった (Lu *et al.*, 2008)。

本研究において、このヒシュカエキスから Garcinielliptone HC までの精製過程で、 γ -セクレターゼ阻害活性がそれほど上昇しないことから、ヒシュカエキス中の γ -セクレターゼ活性を持つ成分は 1 つのみではなく、さらにこれらの成分は他の成分と複合的に作用している可能性が示唆される。ただし、今回同定した Garcinielliptone HC については単一でも阻害活性を持つことを確認している。

既存の γ -セクレターゼ阻害剤は $A\beta$ の生成を抑制するほかに、同じ γ -セクレターゼが関与する Notch プロセッシングに対しても大きく影響を及ぼすと言われている。Notch は細胞分化や運命決定に重要な役割を果たす受容体であるため、単純な γ -セクレターゼ阻害は Notch シグナルの阻害により副作用を惹起する。また、 γ -セクレターゼの阻害は皮膚病、皮膚がんを引き起こすことが報告されている (Xia *et al.*, 2001)。実際、米国イーライリリー (株) が開発を進めていた semagacestat は第 3 相臨床試験において認知症の悪化、さらに皮膚がんのリスクを上昇させることが明らかとなり、2010 年に開発中止となった (Extance, 2010)。これらのことから、アルツハイマー病の治療薬は Notch プロセッシング及びその他の副作用を惹起することなく γ -セクレターゼの作用を調節することで $A\beta$ の生成を抑制する必要がある。インドメタシン、スリンドックやイブプロフェンなど一部の非ステロイド系抗炎症薬は Notch シグナル系への影響が少ない γ -セクレターゼ阻害剤として注目されているが、現在臨床段階にあり未だ実用化には至っていない (Leoutsakos *et al.*, 2012)。本研究の結果からヒシュカエキスは、Notch1 に作用する γ -セクレターゼより β CTF に作用する γ -セクレターゼを阻害する可能性を持っており、ヒシュカエキスを長期投与したマウスは、脳内 $A\beta$ 沈着の抑制効果は認められたものの、投与開始後の成長障害、皮膚病、皮膚がんは観察されなかった。これらのことから、現在までに報告のある γ -セクレターゼを特異的に阻害する薬剤が惹起する副作用はみられないと考えられる。

本研究で用いたヒシュカとはホップのことであり、既に同定されている主な成分として、キサントフモール、イソキサントフモール、8-プレニルナリンゲニン、イソフムロン、ホップフラボノールメチルプテノールなどがあり、中国では、緑色の花穂を乾燥させたものが不眠、頭痛、神経痛などに使用されている。また、EU では民間薬として用いられており、苦味成分、香り成分といった機能

性を持つ物質が多く含まれている。ヒシュカには、エストロゲン様の作用も報告されており、更年期障害改善効果があることも知られている (Journals *et al.*, 2006)。更年期におけるエストロゲンの減少はアルツハイマー病発病の1つの引き金となり、これが海馬の記憶機能を抑えていると考えられている (Wharton *et al.*, 2011)。一方でヒシュカは妊婦には処方しない。γ-セクレターゼの阻害は、発生期に重要な Notch の切断も阻害することになり、ヒシュカに妊婦への使用制限があることは好ましいものと考察される。

前述のエストロゲン様作用から、ヒシュカは閉経後の合併症に対しての臨床試験がこれまでに行われている。この試験の結果からヒシュカは最大 300mg/day まで投与しても明らかな副作用はみられていない (Heyerick *et al.*, 2006)。また、主要成分の脳への移行に関して、本研究で精製した Garcieiliptone HC は脂溶性で分子量が 416 と小さいため、脳への移行は問題ないと考える。

本研究で作出した V717F マウス及び V717F/P267S マウスは、若齢期では野生型マウスと比較して行動実験の結果、及び病理学的所見に差は認められなかったが、中齢期において、記憶・学習能力の低下を来し、V717F マウスにおいては老齢期にオープンフィールドテストで不安を感じないという異常行動を示した。これらの表現型より本研究で新たに作出したアルツハイマー病モデルマウスはアルツハイマー病の病理を再現していると思われる。

一般的にアミロイド斑は長径が 30~200 μm であるが、16 ヶ月齢においては多くが 30 μm 以下のものであった。9 ヶ月齢と早期段階で記憶障害が認められたことより、Aβ の蓄積が起こる前に形成される Aβ オリゴマーが記憶障害を引き起こしていることが示唆された。

現時点ではアルツハイマー病の三大病理（老人斑、神経原繊維変化、神経細胞脱落）を時系列に従って再現する病態モデルは存在しない。したがって、今後の課題として、この三大病理を忠実に再現し、認知症状を呈するモデル動物を作出することがアルツハイマー病研究における大きな課題の1つである。これが可能になれば、原因に則した治療法を行うための多くの情報が得られると考える。

本研究のまとめ

本研究において、私はアルツハイマー病発症の最初期段階である APP から Aβ の切り出しを担う γ-セクレターゼの活性を簡便に評価するアッセイ系を構築

した。このアッセイ系を用いて、ヒシュカエキスに γ -セクレターゼ阻害作用があることを明らかにした。また、ヒシュカエキスを精製し、 γ -セクレターゼの活性阻害成分の一つを決定した。ヒシュカエキスは、*in vitro* 及び *in vivo* で A β 産生抑制効果を示し、記憶・学習能力の低下を抑制した。以上の結果は、「アミロイド仮説」を支持するものであり、今後さらに増大すると予想されるアルツハイマー病に対して有効な薬剤であると考えられる。

実験手法・材料

培養細胞

HEK293A 細胞は 10% fetal bovine serum、ペニシリン、及びストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose) 培地で 37 °C、5 %CO₂、湿度 90 % 下で培養した。

ルシフェラーゼアッセイ

HEK293A 細胞を 24 穴プレートに播種し、リポフェクタミン (Invitrogen) により pTK-(GalRE)_{x4}-Luciferase (Yamamoto *et al.*, 2001)、pCMX-FLAG-β CTF(V717F)-Gal4VP16 (Murrell *et al.*, 1991) または pCMX-FLAG-β CTF(V717D)-Gal4VP16 (Goate *et al.*, 1991) または pCMX-FLAG-caNotch1-Gal4VP16、pCMX-β-Galactosidase を遺伝子導入し、3 時間後に DMEM (1%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン含) に置換した。24 時間後、DAPT、ヒシユカエキス、Fraction 15 を添加し、さらにその 24 時間後、Glo lysis buffer (Promega) 100 μL にて細胞を溶解し、30 分後に回収を行った。溶解液 20 μL に対して 100 μL の Luciferase reagent buffer (20 mM Tricine-NaOH (pH7.8)、1.07mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂·5H₂O、2.67 mM MgSO₄、0.1 μM EDTA、33.3 mM DDT、0.27 mM Coenzyme A、0.47 mM D-Luciferin、0.53 mM ATP) を反応させ、ルシフェラーゼ活性を測定した (ARVO SX 1420)。インターナルコントロールとして β-ガラクトシダーゼ活性 (420 nm) を測定した。溶解液 40 μL に 100 μL の反応液 (11 mM o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノーゼ/PBS、42.3 mM 2-メルカプトエタノール) を添加した。1M Tris-HCl (pH9.0) 50 μL により反応を停止した。

ELISA

HEK293A 細胞を 24 ウェルディッシュに播種し、24 時間後に pCMX-FLAG-β CTF(V717F)-Gal4VP16 及び pCMX-β-Galactosidase をトランスフェクションし、その 24 時間後に DAPT、ヒシユカエキスを添加し、さらに 24 時間後に細胞の培養上清を回収した。培養上清をヒト β amyloid(1-40)、ヒト β amyloid(1-42) ELISA kit (WAKO) を使用した。得られた値をそれぞれの細胞の β

-Galactosidase 活性でノーマライズした。

ウェスタンブロッティング

HEK293A 細胞を 60mm ディッシュに播種し、24 時間後に pCMX-FLAG- β CTF(V717F)-Gal4VP16、pCMX-GFP (内部標準タンパク質) をトランスフェクションし、その 24 時間後に DAPT、ヒシユカエキス、Fraction 15 を添加し、さらに 24 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を SDS サンプルバッファーで調製後、90°C で 5 分間処理した。この細胞抽出液を SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して分離し、ニトロセルロース膜 (Atto) にセミドライブロッティング装置 (Atto) を用いて転写した。この膜をブロッキング溶液 (0.02% Tween20 及び 5 % low fat milk を加えた Tris-buffered saline) で 1 時間反応させた後、一次抗体を 0.02 % Tween20 及び 5 % low fat milk を加えた Tris-buffered saline で希釈した溶液で 1 時間反応させた。さらに、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識に次抗体を 0.02 % Tween20 を加えた Tris-buffered saline で希釈した溶液で 1 時間反応させ、ECL detection kit (Amersham) を用いて発光させて検出した。使用した抗体はマウス抗 FLAG M2 モノクローナル抗体 (Sigma)、ラット抗 GFP 抗体 (Nacalai)、マウス抗 Actin 抗体 (Millipore)、ラビット抗 Gal 抗体 (Abcam) である。

Bligh Dyer 法

クロロホルム : メタノール : 水 = 1 : 2 : 0.8 の溶液をヒシユカエキスに添加した。完全に溶解するまで攪拌し、さらにクロロホルム:水=1:1 の溶液を添加し、抽出を行った。1500 rpm で 10 分間の遠心分離後、上層に水溶性分画、下層に脂溶性分画を確認した (Kumari *et al.*, 2011)。上層及び下層をそれぞれ回収した後、減圧遠心機により乾固し重量を測定した。この方法を用いて、ヒシユカエキス 100 mg から水溶性分画 23 mg、脂溶性分画 76 mg を得た。

固相抽出法

Bligh Dyer 法により得た脂溶性分画を減圧遠心機により乾固した後、ヘキサン:クロロホルム=50:50 に溶解し、Sep-Pak Vac 35 cc (10 g) Silica Cartridge (Waters) に充填した。このカラムに対して 100 %クロロホルム (Fraction 1) で溶出し、次に 100 %メタノール (Fraction 2) で溶出し、2 分画に分離した。

HPLC による精製

HPLCはAlliance 2690 HPLC system (Waters)を使用し実施した。使用カラムはCOSMOSIL 5CN-MS(10 x 250mm) (Nacalai)、COSMOSIL 5C18-AR-II (10 x 250 mm) (Nacalai)、Symmetry Shield C18 (4.6 x 250 mm) (Waters), and COSMOSIL π -NAP (4.6 x 250 mm) (Nacalai)を使用した。1分ごとにFractionを回収し、減圧遠心機により乾固した。これを何回も繰り返した。

LC/MS 法 (高速液体クロマトグラフ質量分析法)

HPLC によって精製した化合物を LC/MS 法により分析した。分析器は 2795 separation module/Thermo Finnigan LCQ Deca XP plus (Waters)を使用した (Koike *et al.*, 2010)。

核磁気共鳴 (NMR)

HPLC により精製した化合物の構造決定を目的に NMR を実施した。NMR は JNM-LA 500(JEOL)を用いて行い、得られた計測データは

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.81-4.76 (m, 3H), 3.64 (m, 1H), 2.93 (dd, $J = 14.4, 10.9$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 14.4, 8.0$ Hz, 1H), 2.70-2.59 (m, 4H), 1.57 (s, 6H), 1.52 (s, 6H), 1.30 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.23 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 204.8, 202.3, 199.3, 158.1, 135.2, 135.0, 118.1, 117.7, 108.9, 102.3, 92.5, 72.0, 61.8, 39.2, 37.4, 34.9, 26.5, 25.8, 25.7, 25.1, 24.3, 20.1, 18.8, 17.9, 17.7.

であった。NMR の実施、データ解析は京都大学薬学研究科竹本教授、塚野助教の協力のもと行った。

トランスジェニックマウスの作出

脳神経細胞特異的に発現させることを目的として神経特異的エノラーゼ (neuron-specific enolase: NSE) プロモーターを用いた。プロモーターの支配下に家族性アルツハイマー病で同定された Indiana 変異(V717F)を持つ APP を発現させるトランスジーンをマウスの受精卵にインジェクションを行い、APP トランスジェニックマウス(V717F マウス)を得た。

さらに、家族性アルツハイマー病の原因となる変異 Presenilin 1(P267S) (Clark *et al.*, 1995) を導入したトランスジェニックマウスを作出し、V717F マウスと

の掛け合わせにより、V717F/P267S マウスの作出も行った。

リアルタイム定量 PCR

9 ヶ月齢のマウスの全脳を採取し、TRIsure (BIOLINE)を用い、マニュアルに従ってトータル RNA を精製した。精製した RNA 300 ng をテンプレートにランダムプライマー及び M-MLV 逆転写酵素 (Promega) で cDNA を合成した。定量 PCR は DNA Master SYBR Green I(TOYOBO)を使用し、Light Cycler System (Roche)を用いて行った。トランスジーン (ヒト APP)とハウスキーピング遺伝子としてのマウス GAPDH をターゲットとしたプライマー配列は以下の通りである。

mouse GAPDH/F: 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTA-3'

mouse GAPDH/R: 5'-TGAGCCCTTCCACAATGCCAAA-3'

human APP/F: 5'-GAAGAAGAAACAGTACACATCCAT-3'

human APP/R: 5'-CCGTTCTGCTGCATCTTGGA-3'

オープンフィールドテスト

マウスを円形のフィールドに滞在させ、5 分間マウスの移動距離・軌跡・移動速度等を測定した。これにより、新規環境での活動量及び不安行動を調べた。ビデオカメラでマウスの行動軌跡を自動的に解析することで、運動量を数値化し、それぞれの区画の滞在時間の割合を算出した。フィールドは中心からほぼ同じ面積になるよう 3 つの区画に分けており、中心部をゾーン 3、その周りをゾーン 2、壁に面した周縁部をゾーン 1 とした (Crusio, 2001)。

Morris の水迷路

本研究では、直径 75cm の円形のプールにスキムミルクで白濁させた水を溜め、プール内のある場所に直径 5cm のプラットフォームを水面下に見えないように設置する。マウスは水を嫌うため、プラットフォームを避難場所とみなす。プラットフォームにたどり着くまでの時間を測定する。プールの東西南北の水面上の壁の位置には目印 (■、☆、▲、+) を置いており、マウスはこの目印と実験室の風景を手がかりとし、プラットフォームの場所を記憶する。試行回数を重ね、プラットフォームの場所を記憶するにつれ、プラットフォームへの到達時間が短縮されていく。この試験は 6 日間のプロトコールで行った。1 日目から 5 日

目までを訓練セッション、6日目はプローブテストとした (Janus, 2010)。訓練セッション (1-5 日目) では特定の場所にプラットホームを設置し、プラットホームにたどり着くまでの時間を測定する(最長 60 秒とする)。1日3試行とし、各試行の間隔は1分以上とした。プローブテスト (6日目) ではプラットホームを取り除き、マウスがプラットホームのあった場所を覚えているかを観察する。マウスの軌跡はビデオカメラで測定し、プラットホームのあった区画に滞在した時間の割合を調べた。

Y字迷路

Y字迷路は5(幅)x40(奥行)x12(高さ)のアームがそれぞれ120°の角度で連結したY字型の装置内にマウスをアーム連結部(中央)に入れ、8分間装置内を自由に探索させた。連続して異なる3本のアームを選択した回数を交替行動回数とし、交替行動回数/(総移動回数-2)x100の計算式により自発的交替行動率を求め、短期記憶の指標とした (Conrad *et al.*, 1996 ; Sarnyai *et al.*, 2000)。

脳組織染色

今回、作出したトランスジェニックマウス (V717F) マウスにおいてどのような病理変化が見られるか免疫組織化学的解析を行った。マウスを 4%PFA によりかん流固定した後、脳を取り出した。採取した脳を 4%PFA で一晩固定し、パラフィン包埋を行った。その後、マイクロームにより厚さ 3 μ m の切片を作製した。脳のパラフィン標本の切片は伸展する際にしわがよりやすい。薄切時、通常用いられる蒸留水ではなく 1%酢酸水に浮遊させて伸展させたところしわは顕著に減少した。免疫染色ではブロッキングに 2%ヤギ血清 (S-100, Vector) を用い、一次抗体として抗アミロイド β 抗体(Clone: 6E10, COVANCE, 1:200) (Nilsson *et al.*, 2004)、二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG 抗体を用いた。

また、アミロイドに対して高い親和性をもつ FSB (化合物名: 1-Fluoro-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene) solution (DOJINDO) による染色を行った (Sato *et al.*, 2004)。パラフィン切片を 30 分間 FSB 溶液に浸した。飽和炭酸リチウム水溶液に浸し、50%エタノールで洗浄後、UV 光にて観察を行った。

統計処理

各実験は各々3回以上実施して、同様の結果が得られていることを確認した。また、有意差検定は、Student の t 検定、及び Two-way repeated measures ANOVA の *post-hoc* 検定として *Holm-Sidak* 法もしくは *Tukey* 法で行った。

(動物実験における倫理面の配慮)

動物実験は京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。また、京都大学の「動物実験講習会」を受講し、学内で動物実験を行うために必要な教育受講を終えた後に実験を行った。その他の実験に関しては、倫理的な問題が関わる実験は含まれていない。

トランスジェニックマウスの作出は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき行った。

引用文献

Braak, H., and Braak, E. (1997) Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging*. **18**, 351-357.

Capell, A. (1998) The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 3205-3211.

Clark, R.F., Hutton, M., Fuldner, R.A., Froelich, S., Karran, E., et al. (1995) The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat. Genet.* **11**, 219-222.

Conrad, C.D., Galea, L.A., Kuroda, Y., and McEwen, B.S. (1996) Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav. Neurosci.* **110**, 1321-1334.

Crusio, W.E. (2001) Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav. Brain. Res.* **125**, 127-132.

Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., et al. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* **76**, 173-181.

Extance, A. (2010) Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **9**, 749-751.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., et al. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* **366**, 2112-2117.

Fujiwara, H., Takayama, S., Iwasaki, K., Tabuchi, M., Yamaguchi, T., et al.

(2011) Yokukansan, a traditional Japanese medicine, ameliorates memory disturbance and abnormal social interaction with anti-aggregation effect of cerebral amyloid β proteins in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience*. **180**, 305-313.

Funato, H., Yoshimura, M., Kusui, K., Tamaoka, A., Ishikawa, K., et al. (1998) Quantitation of amyloid β -protein ($A\beta$) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **152**, 1633-1640.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. **349**, 704-706.

Godbolt, A.K., Cipolotti, L., Watt, H., Fox, N.C., Janssen, J.C., et al. (2004) The natural history of Alzheimer disease: a longitudinal presymptomatic and symptomatic study of a familial cohort. *Arch. Neurol.* **61**, 1743-1748.

Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., et al. (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. **359**, 322-325.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. **297**, 353-356.

Heyerick, A., Vervarcke, S., Depypere, H., Bracke, M., and De Keukeleire, D. (2006) A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Maturitas*. **54**, 164-175.

Janus, C. (2004) Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn. Mem.* **11**, 337-346.

Journals, D. (2006) Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 2938-2943.

Koike, M., Fukushi, J., Ichinohe, Y., Higashimae, N., Fujishiro, M., et al. (2010) Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. *J. Biol. Chem.* **285**, 21736-21749.

Kopan, R., and Ilagan, MX. (2004) Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 499-504.

Kumari, P., Reddy, C.R.K., and Jha, B. (2011) Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Anal. Biochem.* **415**, 134-144.

Leoutsakos, J.M., Muthen, B.O., Breitner, J.C., and Lyketsos, C.G. ; ADAPT Research Team. (2012) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug treatments on cognitive decline vary by phase of pre-clinical Alzheimer disease: findings from the randomized controlled Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **27**, 364-374.

Lu, Y.H., Wei, B.L., Ko, H.H., and Lin, C.N. (2008) DNA strand-scission by phloroglucinols and lignans from heartwood of *Garcinia subelliptica* Merr. and *Justicia* plants. *Phytochemistry.* **69**, 225-233.

Morelli, L., Perry, G., and Tagliavini, F. (2012) The contribution of the amyloid hypothesis to the understanding of Alzheimer's disease: a critical overview. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2012**, 709613.

Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M.D. (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science.* **254**, 97-99.

Nilsson, L.N., Arendash, G.W., Leighty, R.E., Costa, D.A., Low, M.A., et al. (2004) Cognitive impairment in PDAPP mice depends on ApoE and ACT-catalyzed amyloid formation. *Neurobiol. Aging*. **25**, 1153-1167.

Sarnyai, Z., Sibille, E.L., Pavlides, C., Fenster, R.J., McEwen, B.S., et al. (2000) Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **97**, 14731-14736.

Sato, K., Higuchi, M., Iwata, N., Saido, T.C., and Sasamoto, K. (2004) Fluoro-substituted and ¹³C-labeled styrylbenzene derivatives for detecting brain amyloid plaques. *Eur. J. Med. Chem.* **39**, 573-578.

Selkoe, D.J. (1996) Amyloid β -protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **271**, 18295-18298.

Selkoe, D.J. (2001) Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*. **32**, 177-180.

Selkoe, D.J. (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* **140**, 627-638.

Selkoe, D.J. (2012) Preventing Alzheimer's disease. *Science*. **337**, 1488-1492.

Thomas, P., and Fenech, M. (2007) A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis*. **22**, 15-33.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. **286**, 735-741.

Wang, X.P., and Ding, H.L. (2008) Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci. Bull.* **24**, 105-109.

Wharton, W., Baker, L.D., Gleason, C.E., Dowling, M., Barnet, J.H., et al. (2011) Short-term hormone therapy with transdermal estradiol improves cognition for postmenopausal women with Alzheimer's disease: results of a randomized controlled trial. *J. Alzheimers. Dis.* **26**, 495-505.

Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A.M., et al. (2001) Loss of presenilin 1 is associated with enhanced β -catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 10863-10868.

Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., and Kakizuka, A. (2001) Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell. Death. Differ.* **8**, 871-873.

Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D.M., et al. (1998) The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **273**, 16470-16475.

謝辞

本研究にあたりご指導して頂いた垣塚彰教授、堀清次講師に深く感謝致します。そして本研究をサポートして頂いた坂本めぐみ氏、菅みちる氏、兼森祥子氏には大変お世話になり、深く感謝の意を表します。また、博士課程から突然来た私を暖かく迎え入れて頂いた垣塚研究室の皆様には深く御礼申し上げます。皆様一人一人のサポートがなければ決してここまでたどり着けませんでした。本当にありがとうございます。

また、本研究にあたり HPLC、質量分析器による実験を御指導頂いた大泉宏氏、そして NMR の実施、データ解析において多大なる協力をして下さった本学薬学研究科の竹本佳司教授、塚野千尋助教に深く感謝致します。また、修士課程や博士課程への進学という私の進路を理解し、陰ながら支援してくれた父英明、母 稔子、弟 健二、そして友人に深謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Norio Sasaoka, Megumi Sakamoto, Shoko Kanemori, Michiru Kan,
Chihiro Tsukano, Yoshiji Takemoto, and Akira Kakizuka

Long-term oral administration of Hop flower extracts mitigates
Alzheimer phenotypes in mice.

PLoS One, 9(1), e87185, 2014

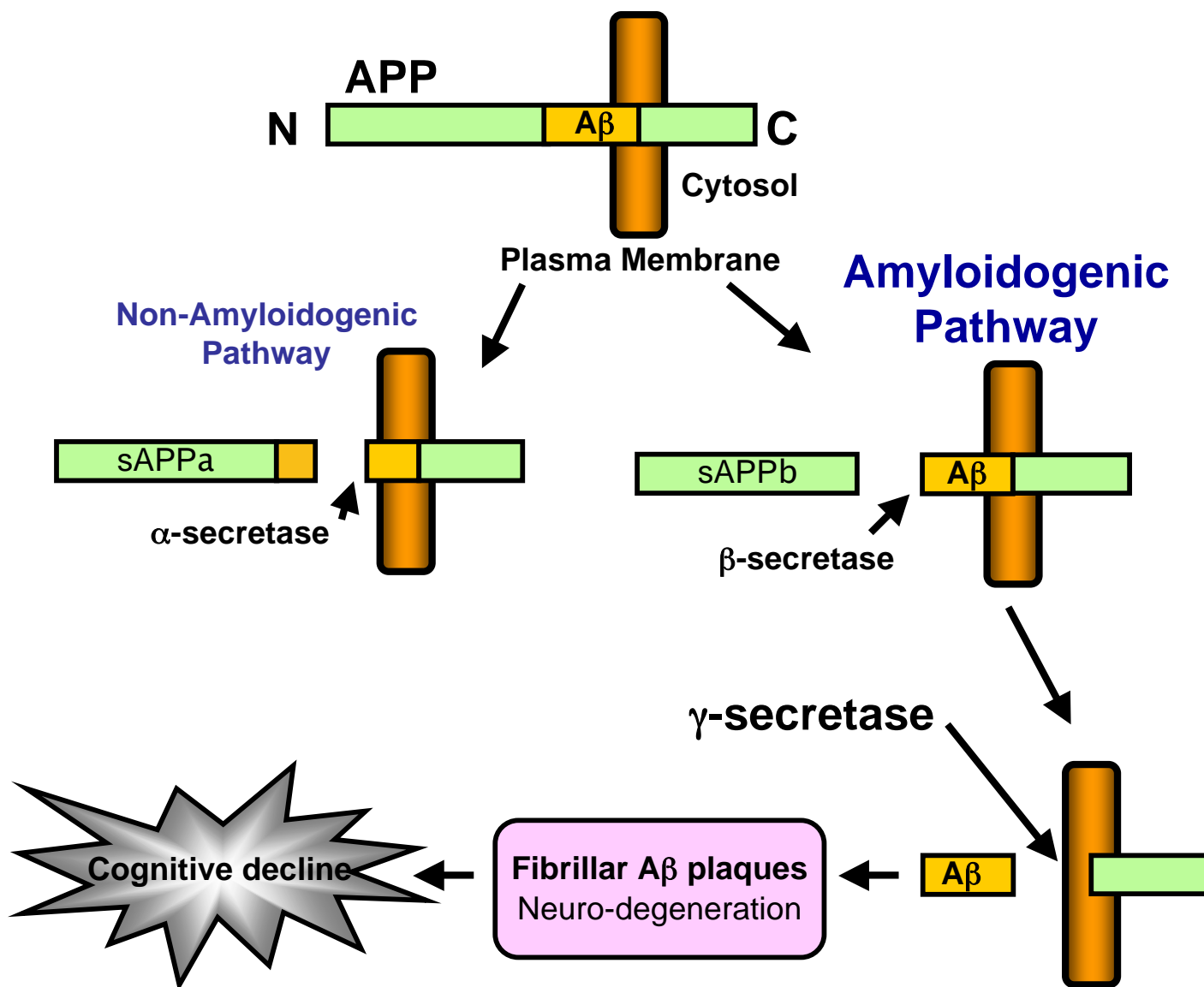


Figure 1. アルツハイマー病発症までの流れ(アミロイド仮説)

Aβは、その前駆体タンパク質であるAmyloid Precursor Protein (APP)の膜貫通近傍部分からβ-セクレターゼとγ-セクレターゼの2つのタンパク質プロセッシング酵素の働きで切り出される。アルツハイマー病認知症では、脳内Aβの集積(老人斑)や神経原繊維変化などの特徴的な病理変化がみられる。これに伴い神経細胞が破壊され、脳が萎縮することにより脳機能が低下すると考えられている。

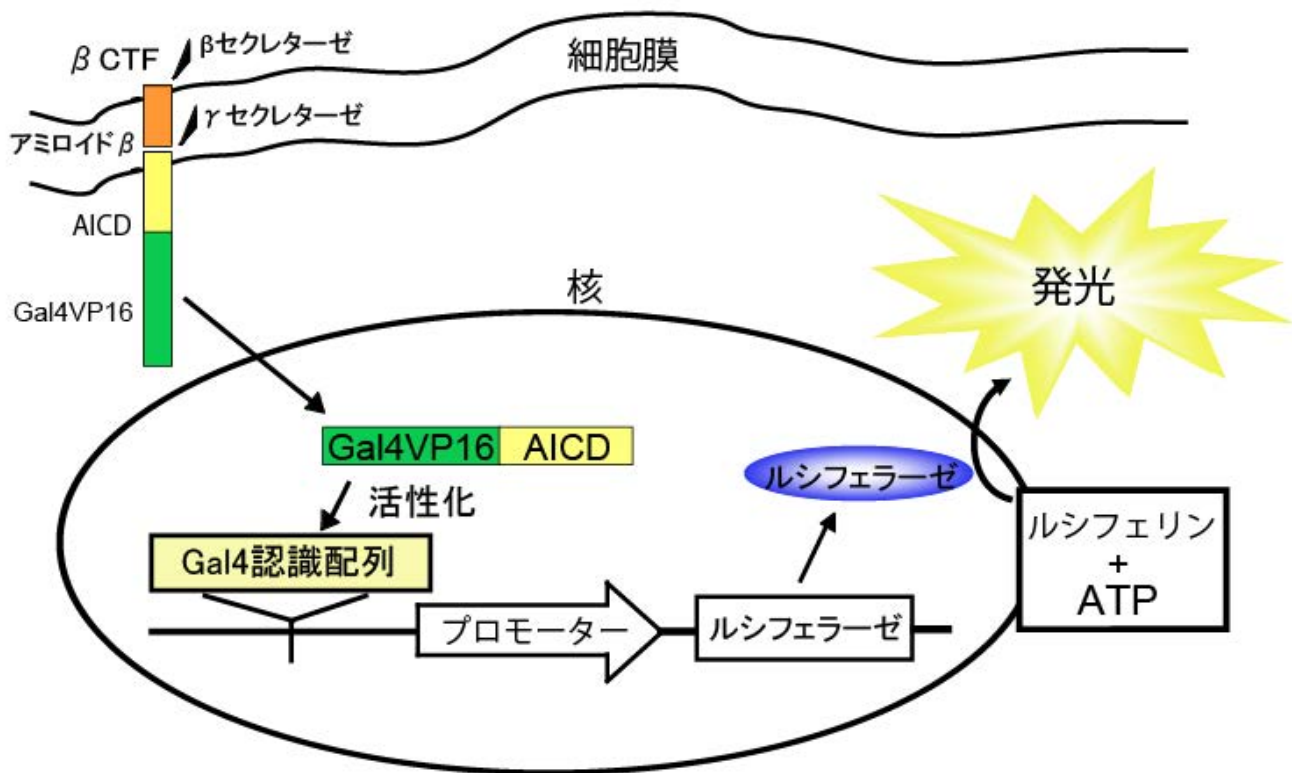


Figure 2. γ -セクレターゼ活性を評価するためのルシフェラーゼアッセイの概略図

β 切断されたAPP (β CTF) のC末端部分に酵母の転写因子であるGal4のDNA結合領域とHerpes Simplex virusの転写活性化領域を融合したGal4VP16を付加したタンパク質 (β CTF-Gal4VP16) を発現させた。 γ -セクレターゼにより切断されたAICD (APP細胞内ドメイン)-Gal4VP16は、プロモーター領域にGal4認識配列 (GalRE) を4コピー挿入したルシフェラーゼのレポーターで測定することができる。この β CTF-Gal4VP16とTK (GalREx4) LucをHEK293A細胞にトランスフェクションし、24時間後に植物エキスを添加、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。

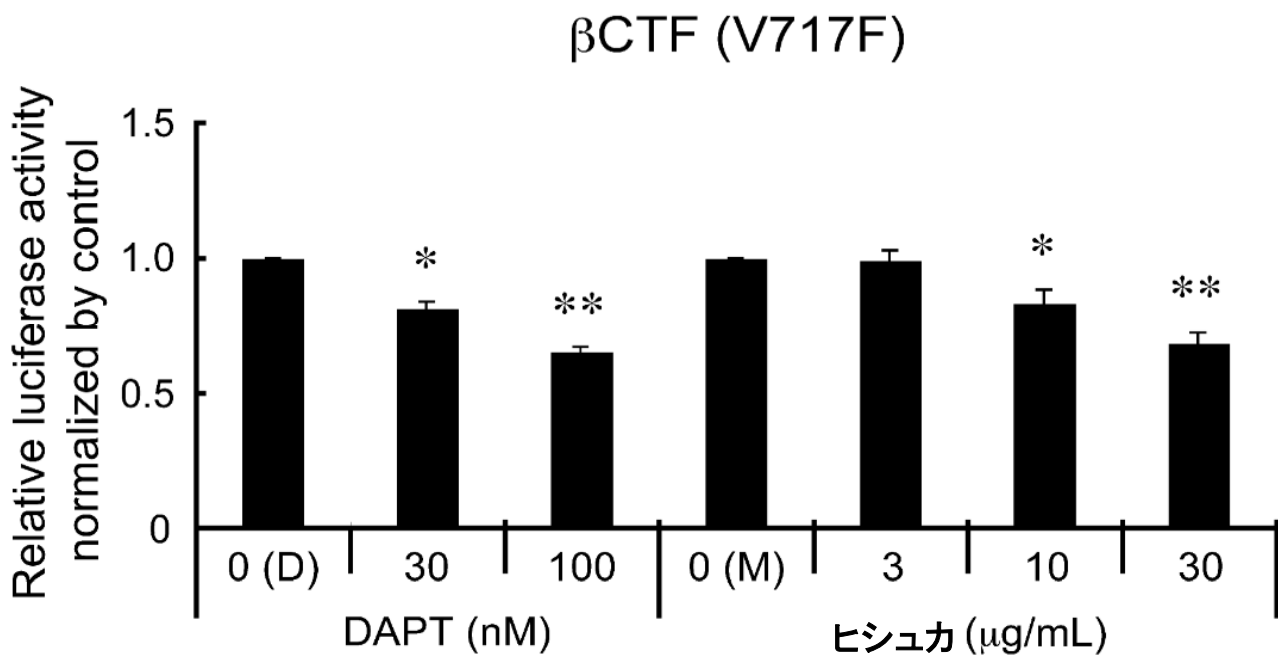


Figure 3. 樹立したアッセイ系におけるヒシユカエキスの効果

β CTF(V717F)-Gal4VP16 とTK(GalREx4)Lucと β -ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、24時間後に植物エキスを添加、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。 γ -セクレターゼ阻害薬 DAPTはDMSO(D)、ヒシユカエキスはメタノール(M)に溶解し、それぞれの濃度でアッセイした。算出した値はインターナルコントロールとして導入した β -ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加(コントロール)サンプルを1とした。非添加(コントロール)に対するStudentのt検定を行った結果、*P < 0.05、**P < 0.01であった。グラフのバーは \pm SDを示す。

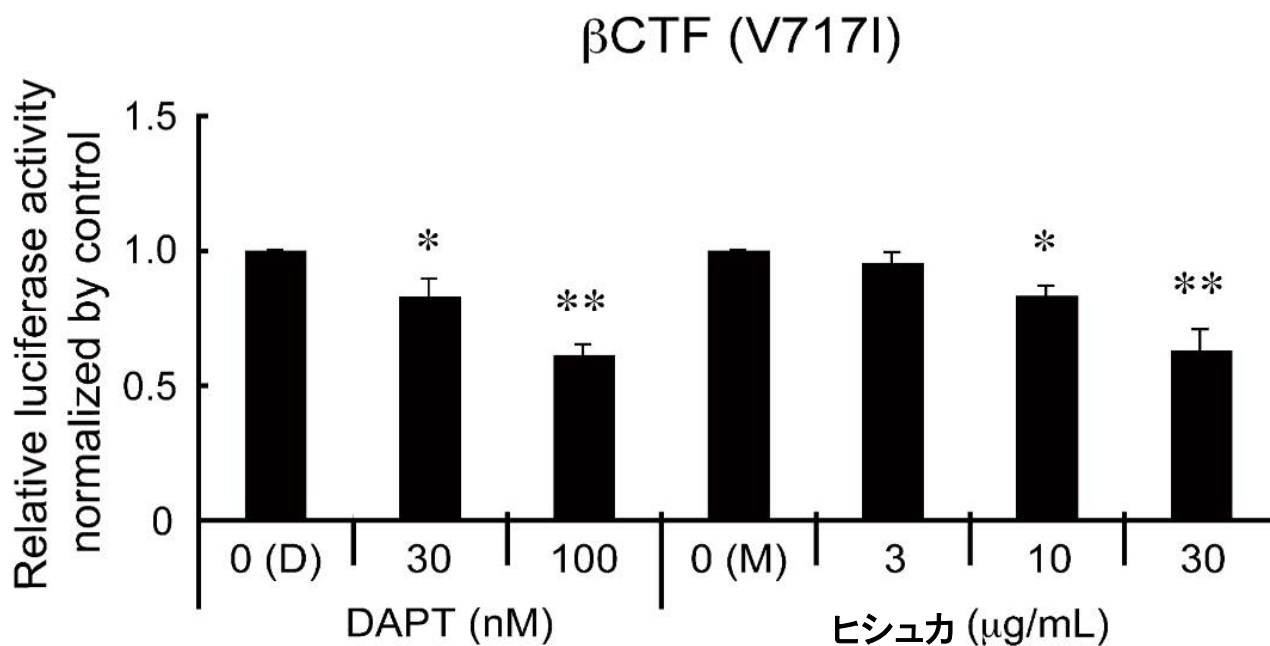


Figure 4. ヒシュカエキスはAPP(V717F)と同様にAPP(V717I)に対しても相対的な γ -セクレターゼ活性を低下させる

β CTF(V717I)-Gal4VP16 とTK(GalREx4)Luc と β -ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、24時間後にDAPT、ヒシュカエキスを添加、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。DAPTはDMSO(D)、ヒシュカエキスはメタノール(M)に溶解し、それぞれの濃度でアッセイした。算出した値はインターナルコントロールとして導入した β -ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加(コントロール)サンプルを1とした。非添加(コントロール)に対するStudentのt検定を行った結果、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ であった。グラフのバーは \pm SDを示す。

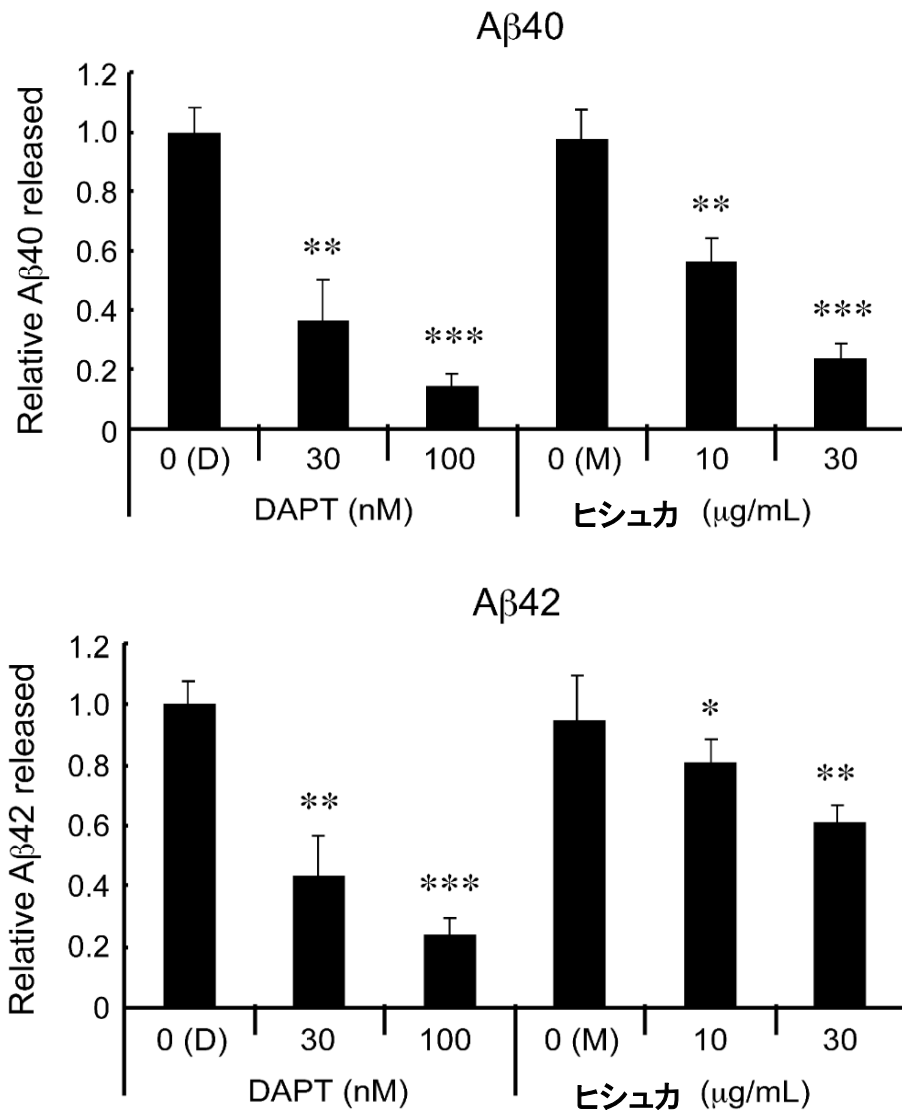


Figure 5. ヒシュカエキスによるAβ40、Aβ42の分泌抑制

β CTF(V717F)-Gal4VP16とβ-ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、24時間後にDAPT、ヒシュカエキスを添加、さらに24時間後に細胞培養液を回収し、培養液中に分泌されたAβ40、Aβ42の量をELISAで測定した。DAPTはDMSO(D)、ヒシュカエキスはメタノール(M)に溶解し、それぞれの濃度でアッセイした。算出した値は、インターナルコントロールとして細胞に導入したβ-ガラクトシダーゼ活性で分泌量の測定値をノーマライズした。Control(非添加)に対するStudentのt検定を行った結果、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.005であった。グラフのバーは±SDを示す。

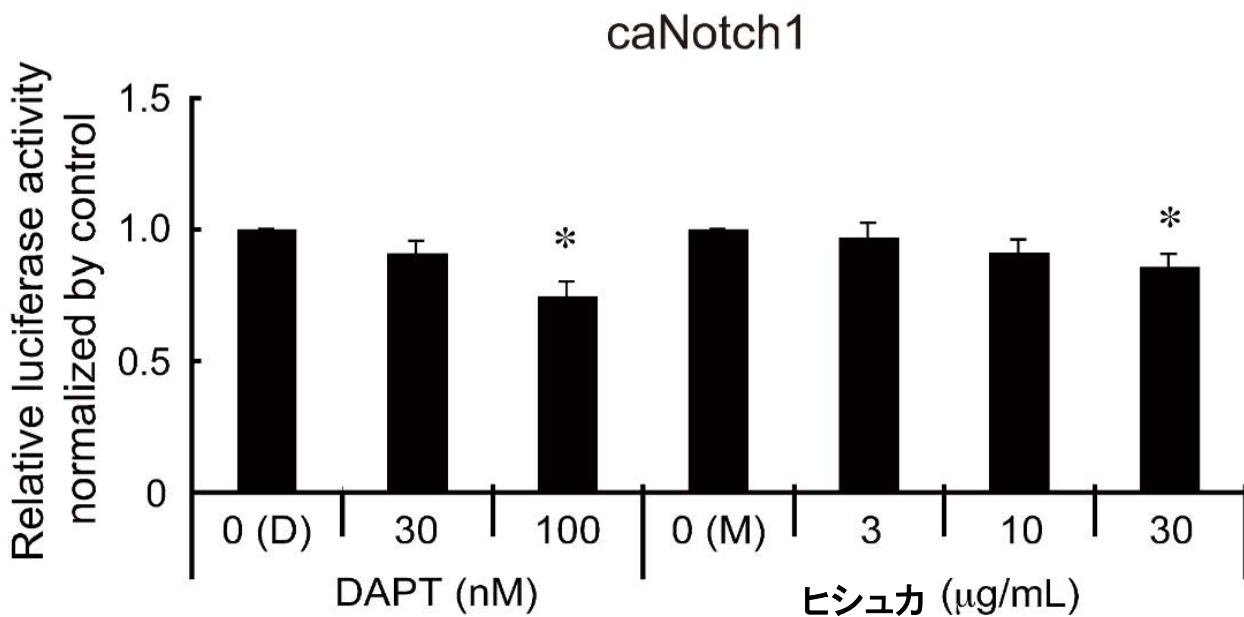


Figure 6. 活性化型Notch1におけるヒシュカエキスの効果

caNotch1-Gal4VP16とTK(GalREx4)Lucと β -ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、24時間後にDAPT、ヒシュカエキスを添加、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。DAPTはDMSO(D)、ヒシュカエキスはメタノール(M)に溶解し、それぞれの濃度でアッセイした。算出した値はインターナルコントロールとして導入した β -ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加(コントロール)サンプルを1とした。非添加(コントロール)に対するStudentのt検定を行った結果、* $P < 0.05$ であった。グラフのバーは \pm SDを示す。caNotch : constitutive active Notch.

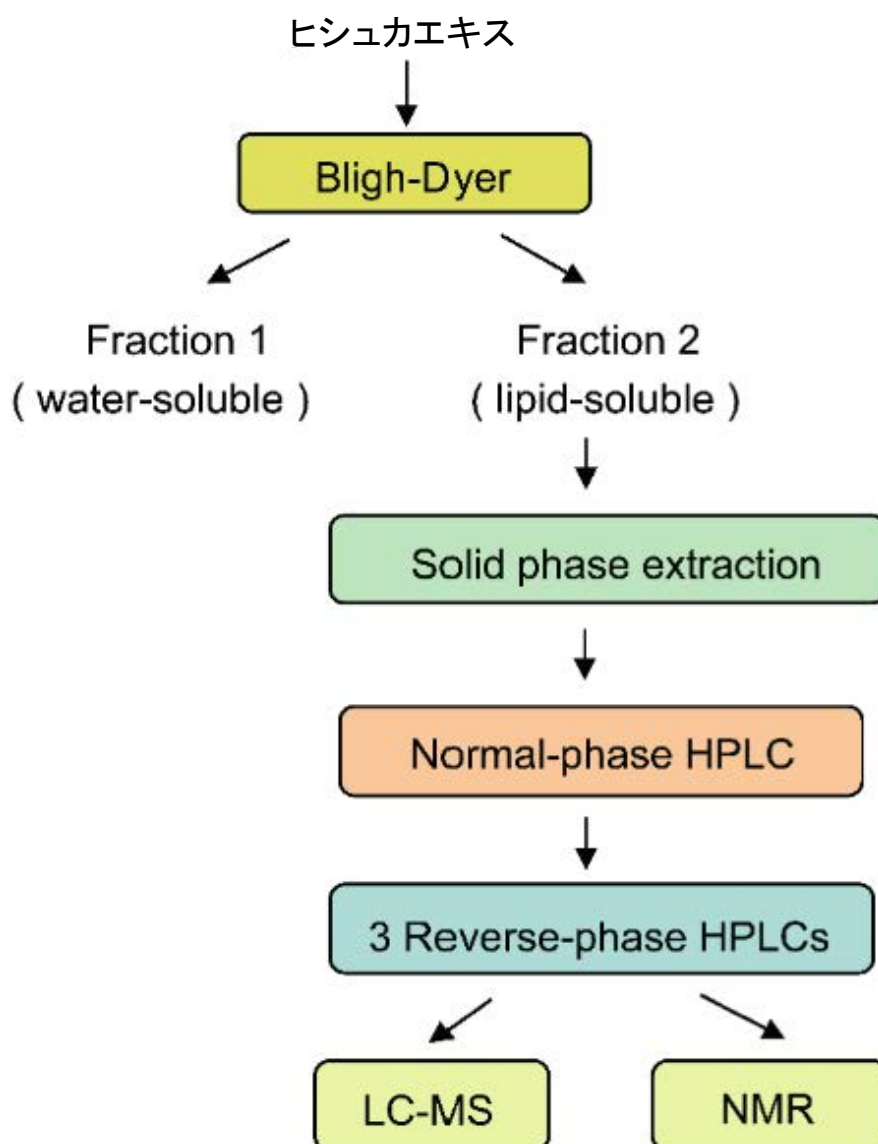


Figure 7. ヒシュカエキスの抽出・精製

ヒシュカエキスをBlighDyer法により抽出し、ルシフェラーゼアッセイにより γ -セクレターゼ阻害活性が認められた脂溶性分画をさらに抽出・精製した。順相HPLC及び逆相HPLCを繰り返して、シングルピークになるまで精製し、最終的に高純度の化合物を得た。質量分析及びNMRによって化合物を同定した。

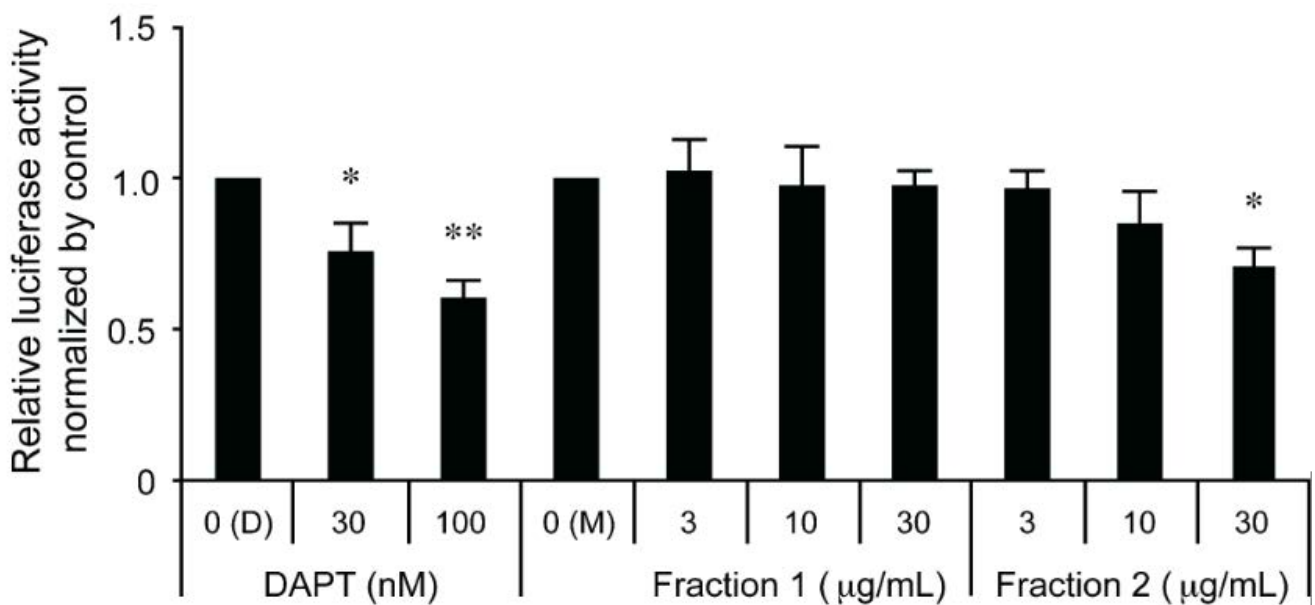


Figure 8. BlighDyer法による分離後の γ -セクレターゼ阻害活性の移行

BlighDyer法によりヒシユカエキスを水溶性分画、脂溶性分画に分離した後、ルシフェラーゼアッセイにより γ -セクレターゼ阻害活性がどちらに移行したかを調べた。

β CTF(V717F)-Gal4VP16とTK(GalREx4)Lucと β -ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、24時間後にDAPT、Fraction1、Fraction2を添加、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。DAPTはDMSO(D)、ヒシユカエキスはメタノール(M)に溶解し、それぞれの濃度でアッセイした。

算出した値はインターナルコントロールとして導入した β -ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加(コントロール)サンプルを1とした。

非添加(コントロール)に対するStudentのt検定を行った結果、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ であった。グラフのバーは \pm SDを示す。

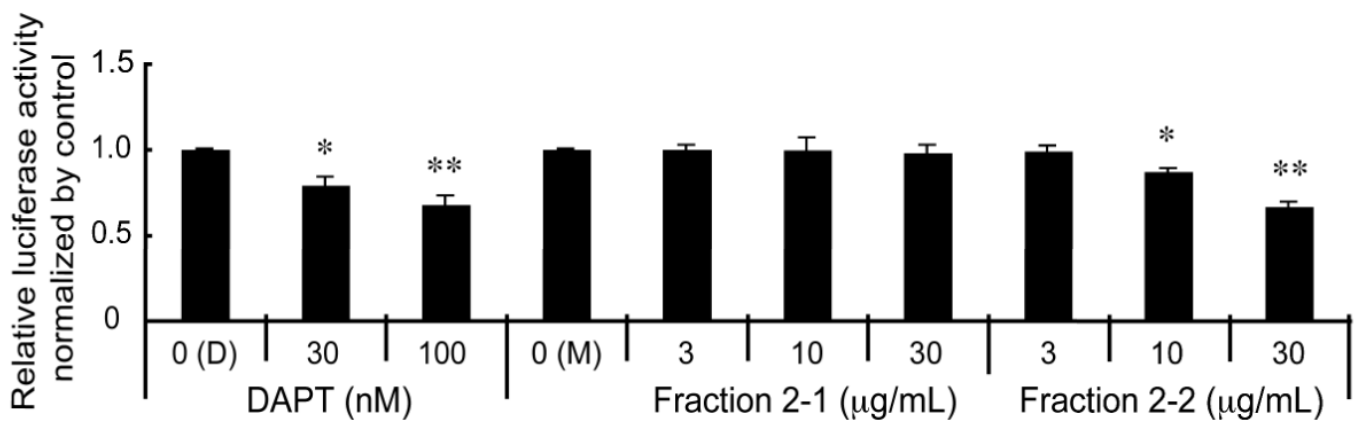


Figure 9. 固相抽出法による分離後の γ -セクレターゼ阻害活性の移行

BlighDyer法により得た脂溶性画分 (Fraction 2) を固相抽出により2分画に分離し、 γ -セクレターゼ阻害活性がどちらに移行したかを調べた。
 β CTF(V717F)-Gal4VP16とTK(GalREx4)Lucと β -ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、24時間後にDAPT、Fraction 2-1、Fraction 2-2 を添加、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。DAPTはDMSO(D)、Fraction 2-1、Fraction 2-2は乾固し、再度メタノール(M)に溶解し、それぞれの濃度でアッセイした。算出した値はインターナルコントロールとして導入した β -ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加(コントロール)サンプルを1とした。非添加(コントロール)に対するStudentのt検定を行った結果、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ であった。グラフのバーは \pm SDを示す。

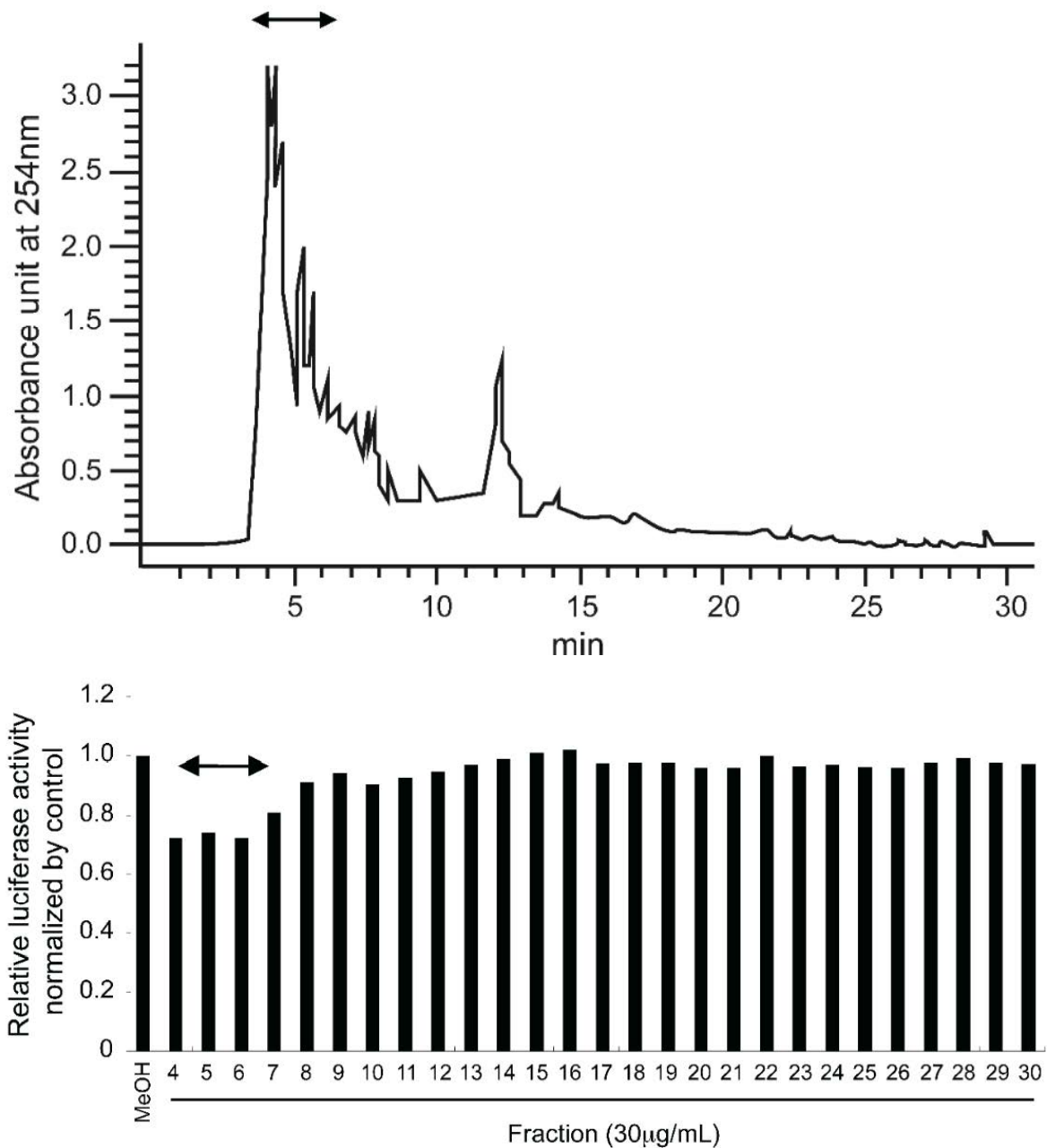


Figure 10. 順相HPLCによる分離と分離後の γ -セクレターゼ阻害活性の移行

(上図) 順相HPLCのクロマトグラム。

固相抽出により得た100%メタノール分画(Fraction 2-2)を5CN-MS順相カラムにより、ヘキサン:クロロホルム=50:50の溶媒からスタートし、毎分1%ずつメタノール濃度を上昇させるプロトコールでHPLCを実施した。

(下図) β CTF(V717F)-Gal4VP16とTK(GalREx4)Lucと β -ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、各Fractionを添加し、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。

各Fractionは乾固し、再度メタノール(M)に溶解した(30 μ g/mL)。

算出した値はインターナルコントロールとして細胞に導入した β -ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加サンプル(MeOH)の値を1とした。

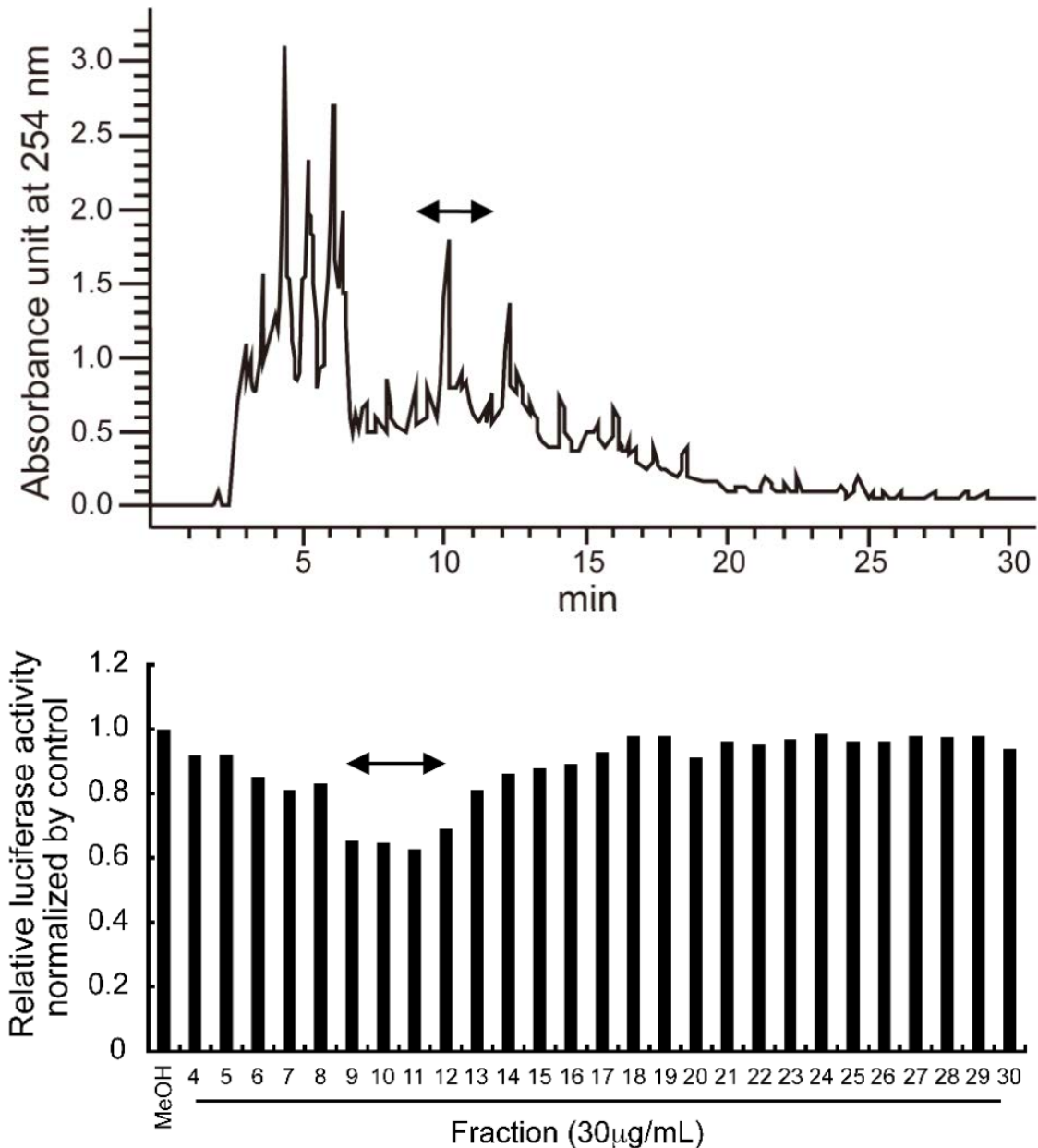


Figure 11. 逆相HPLC(5C18-AR-IIカラム)による分離と分離後の γ -セクレターゼ阻害活性の移行

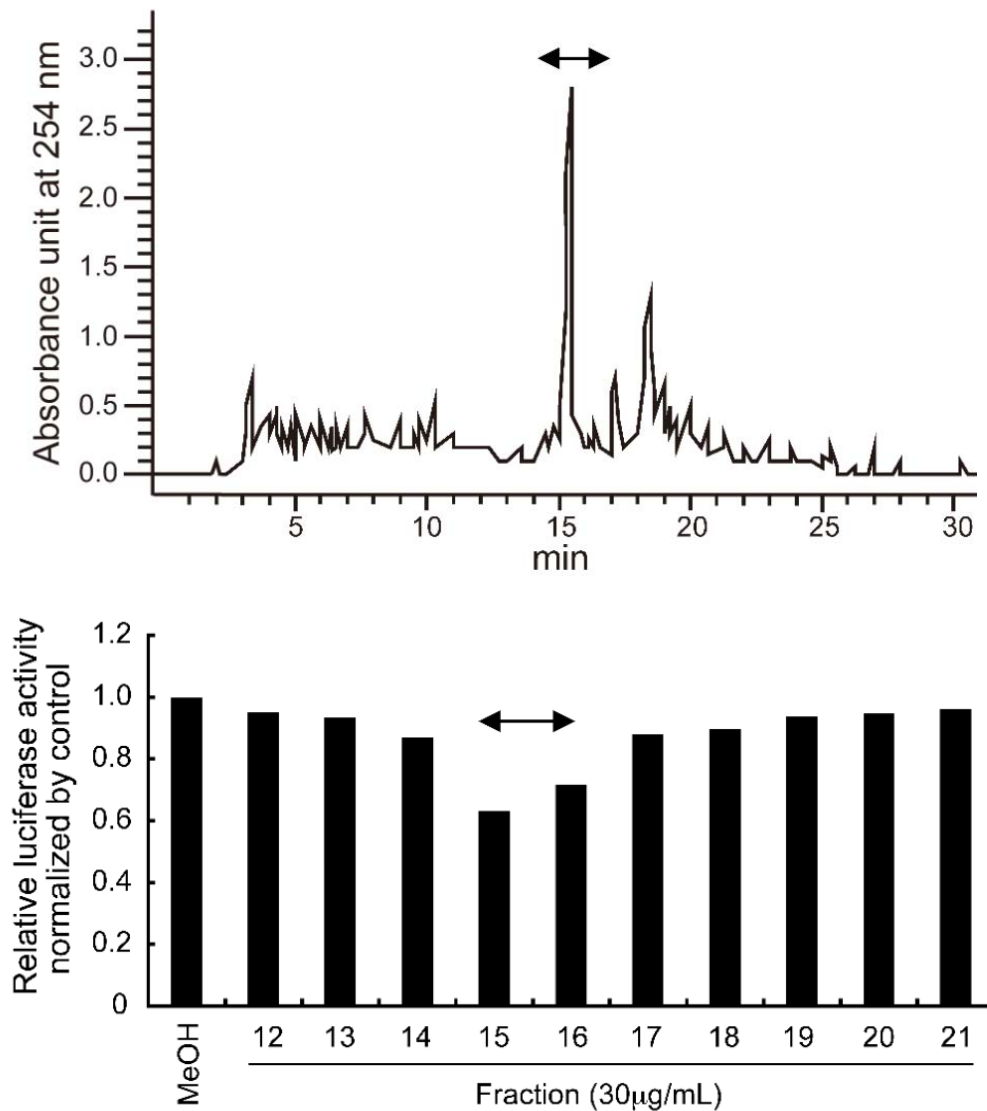
(上図) 逆相HPLCのクロマトグラム。

順相HPLCで得られたFraction4~Fraction7を回収し、5C18-AR-IIカラムにより、アセトニトリル:水 = 80 : 20の溶媒からスタートし、毎分1%ずつアセトニトリル濃度を上昇させるプロトコールで逆相HPLCを行った。

(下図) β CTF(V717F)-Gal4VP16とTK(GalREx4)Lucと β -ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、各Fractionを添加し、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。

各Fractionは乾固し、再度メタノール(M)に溶解した(30 μ g/mL)。

算出した値はインターナルコントロールとして細胞に導入した β -ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加サンプル(MeOH)の値を1とした。



**Figure 12. 逆相HPLC(symmetry shield C18カラム)による分離と分離後の
γ-セクレターゼ阻害活性の移行**

(上図) 逆相HPLC(5C18-AR-IIカラム)で得られたFraction 9~Fraction 12を回収し、5C18-AR-IIカラムにより、アセトニトリル:水= 80 : 20の溶媒からスタートし、毎分1%ずつアセトニトリル濃度を上昇させるプロトコールで2回目の逆相HPLCを行った。
(下図) βCTF(V717F)-Gal4VP16とTK(GalREx4)Lucとβ-ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、各Fractionを添加し、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。各Fractionは乾固し、再度メタノール(M)に溶解した(30 µg/mL)。算出した値は、インターナルコントロールとして細胞に導入したβ-ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加サンプル(MeOH)の値を1とした。

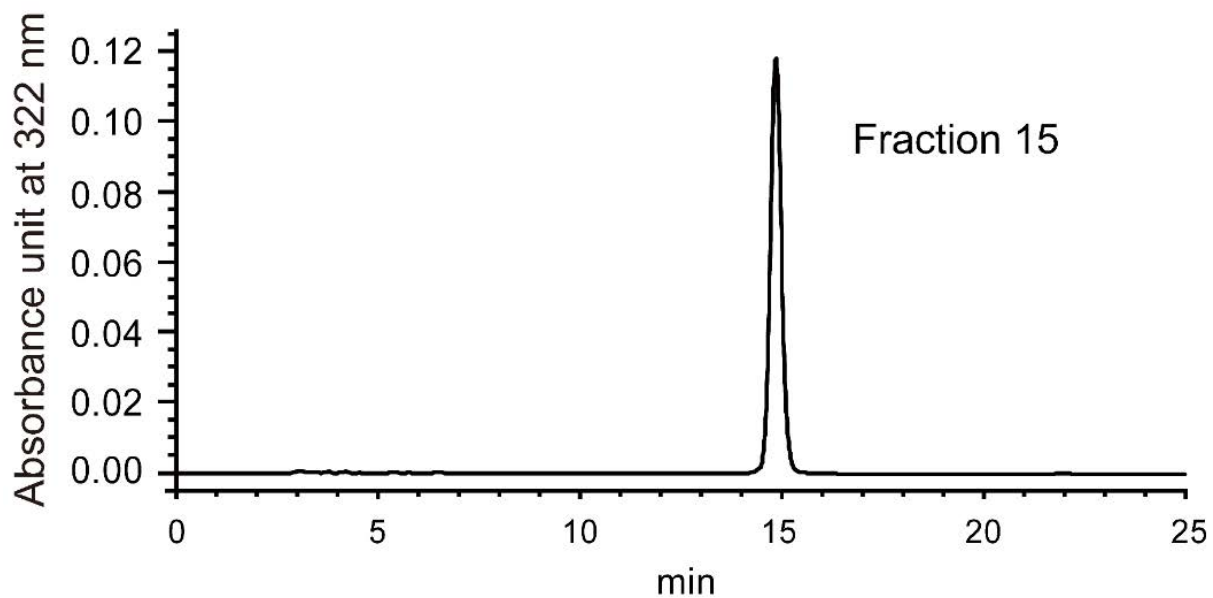


Figure 13. 逆相HPLC(π -NAPカラム)による分離と分離後の γ -セクレターゼ阻害活性の移行

逆相HPLC(symmetry shieldカラム)で得られたFraction 15~Fraction 16を回収し、 π -NAPカラムにより、アセトニトリル:水 = 65 : 35の溶媒で3回目の逆相HPLCを行った。

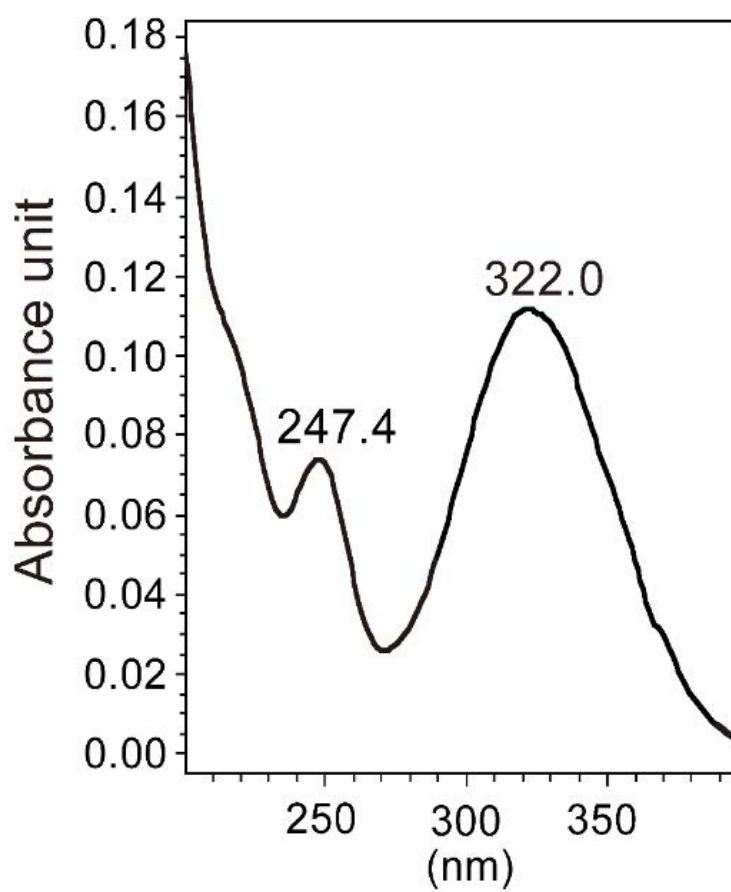


Figure 14. Fraction15の吸収波長

逆相HPLC(π -NAPカラム)で得られたFraction15の吸収極大波長は247nmと332nmを示した。

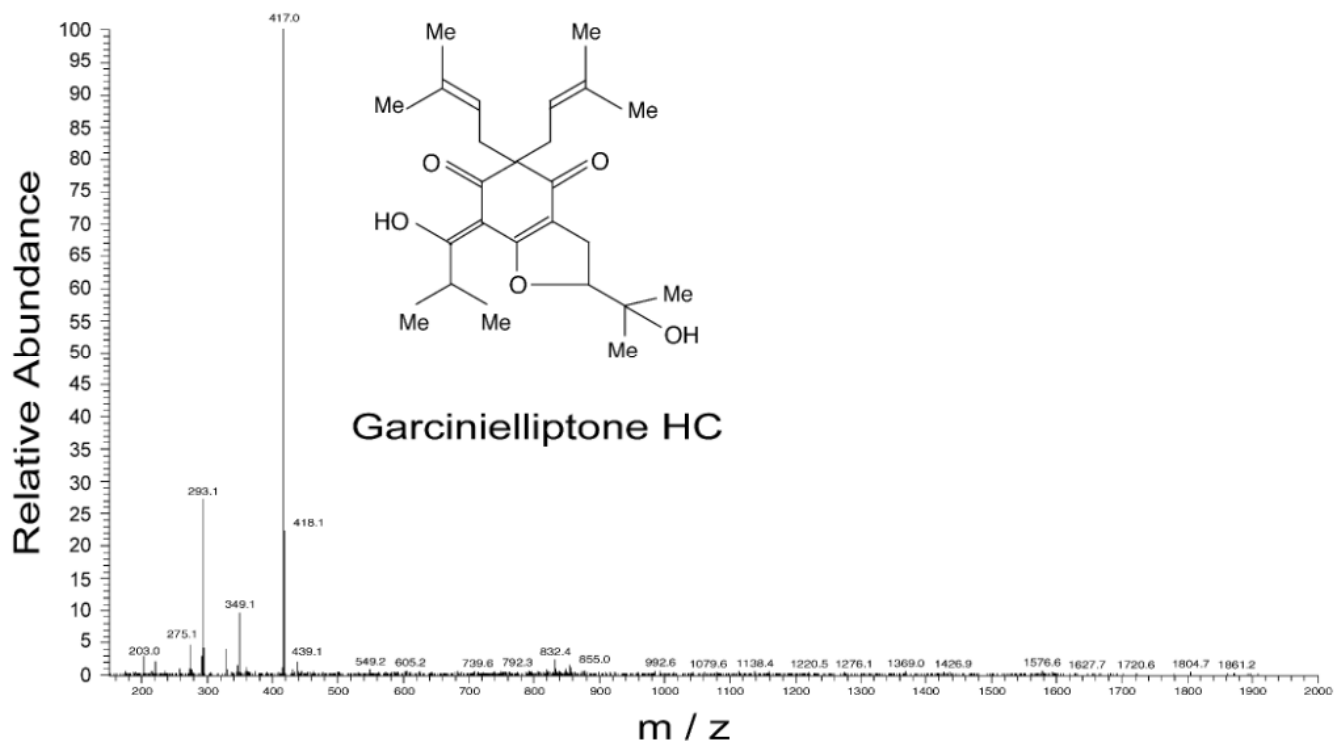


Figure 15. 質量分析によるプロファイルと、NMRによって決定した分子構造

質量分析により逆相HPLC(π -NAPカラム)で得られたFraction15の分子量は416 g/molであった。また、NMRによる解析により、Fraction15の分子式は $C_{25}H_{36}O_5$ であり、構造式(Garcinielliptone HC)であった。

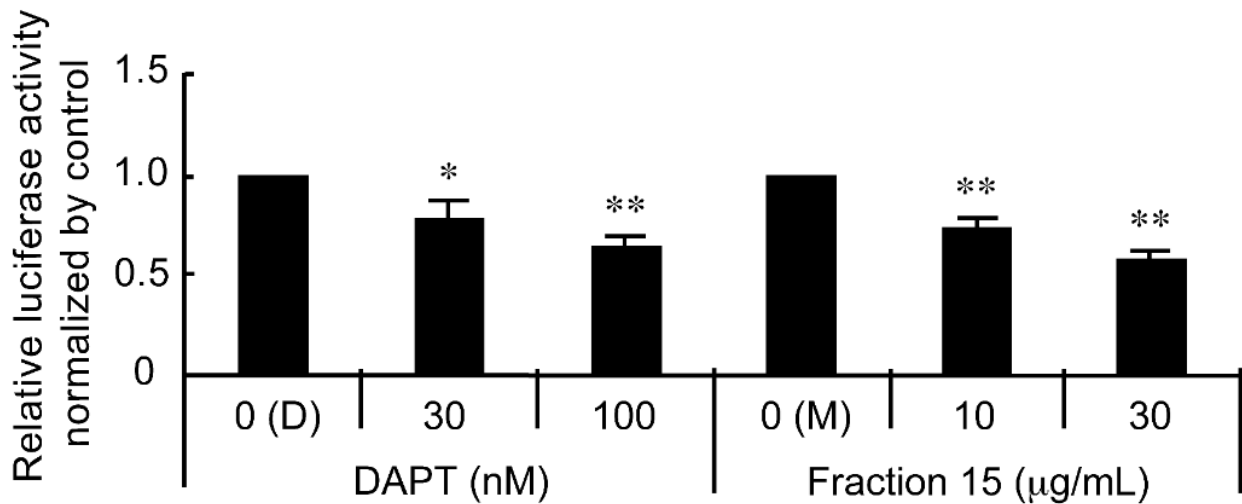


Figure 16. Fraction15のルシフェラーゼアッセイにおけるγ-セクレターゼ阻害活性

逆相HPLC(π-NAPカラム)で得られたFraction 15を回収し、ルシフェラーゼアッセイを行った。BCTF(V717F)-Gal4VP16とTK(GalREx4)Lucとβ-ガラクトシダーゼをHEK293A細胞にトランスフェクションし、各Fractionを添加し、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定する。DAPTはDMSO(D)に溶解し、Fraction 15は回収後に乾固し、再度メタノール(M)に溶解し、それぞれの濃度でアッセイした。算出した値は、インターナルコントロールとして細胞に導入したβ-ガラクトシダーゼ活性でルシフェラーゼ活性をノーマライズし、非添加サンプルの値を1とした。非添加サンプル(Control)に対するStudentのt検定を行った結果、*P < 0.05、**P < 0.01であった。グラフのバーは±SDを示す。

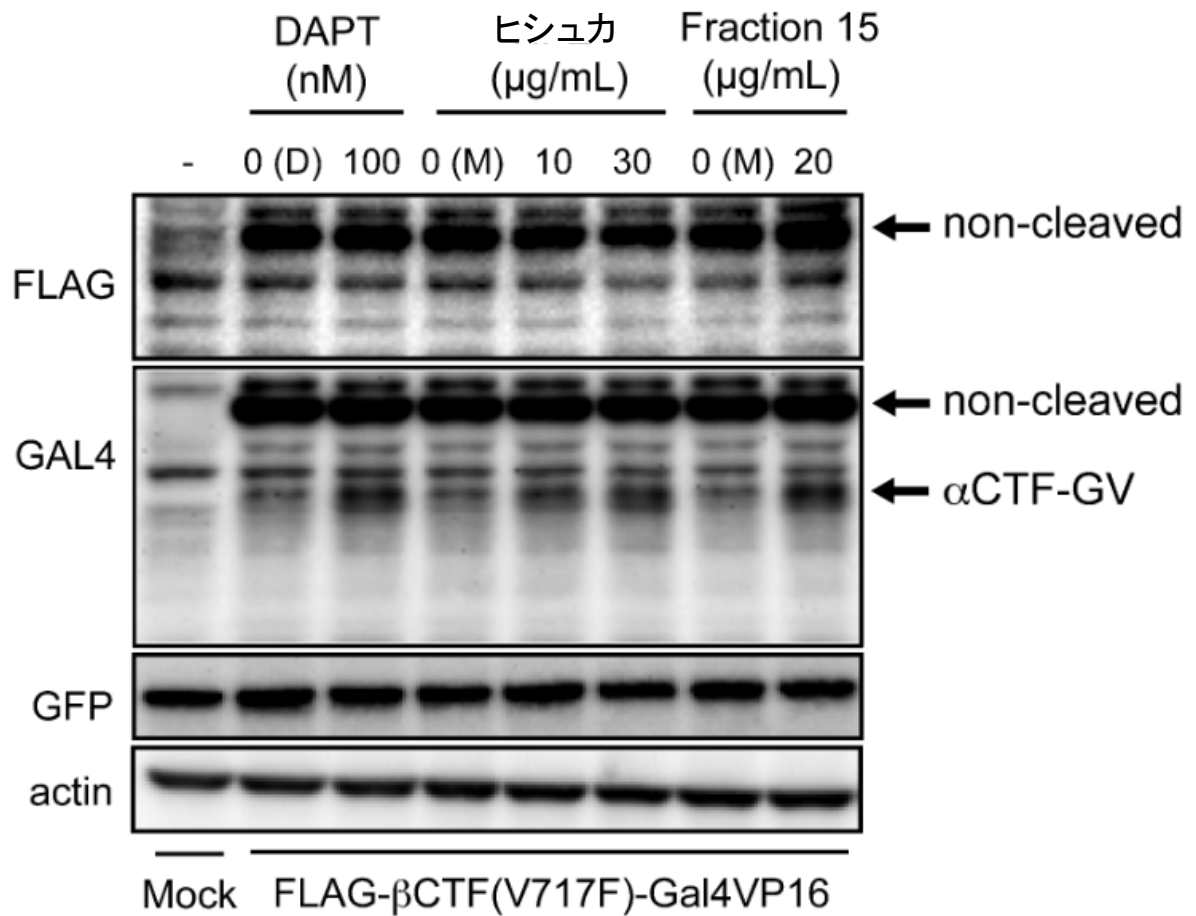


Figure 17. ウェスタンブロットティングにおける、DAPT、ヒシュカエキス、Fraction 15の $\alpha\text{CTF-Gal4VP16}$ の蓄積量の比較

HEK293A細胞にFLAG- $\beta\text{CTF(V717F)}$ -Gal4VP16を過剰発現させ、DAPT、ヒシュカエキスと Fraction 15をそれぞれの濃度で添加した。
 トランスフェクション効率の内部標準タンパク質として導入したGFPの発現量に差はほぼ無い。N末端に付加したFLAGタグ、及びC末端に付加したGal4をそれぞれFLAG抗体、Gal4抗体を用いて検出した。

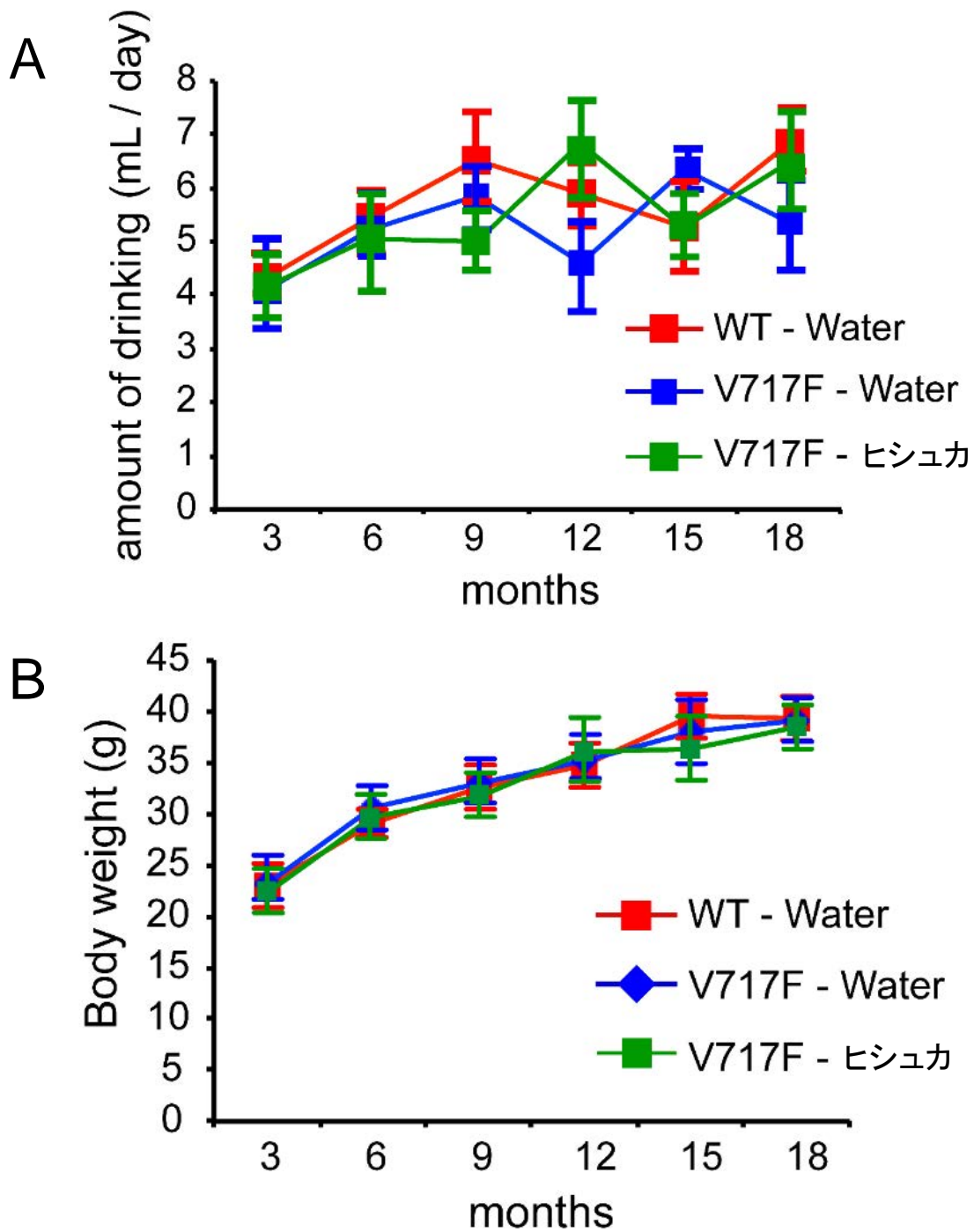


Figure 18. 野生型マウスとV717Fマウスの飲水量の比較と体重変化

(A) 野生型マウスと水投与V717Fマウス、及びヒシユカエキス投与V717Fマウスの飲水量に関して、いずれのグループも4~6 mL/day/mouseで、グループ間に有意な差は認められなかった。ヒシユカエキスの濃度は生後6週齢から2 g/Lで、かつ自由摂取で行った。
 (B) 体重変化に関しても18ヶ月齢まで有意な差はみられなかった。

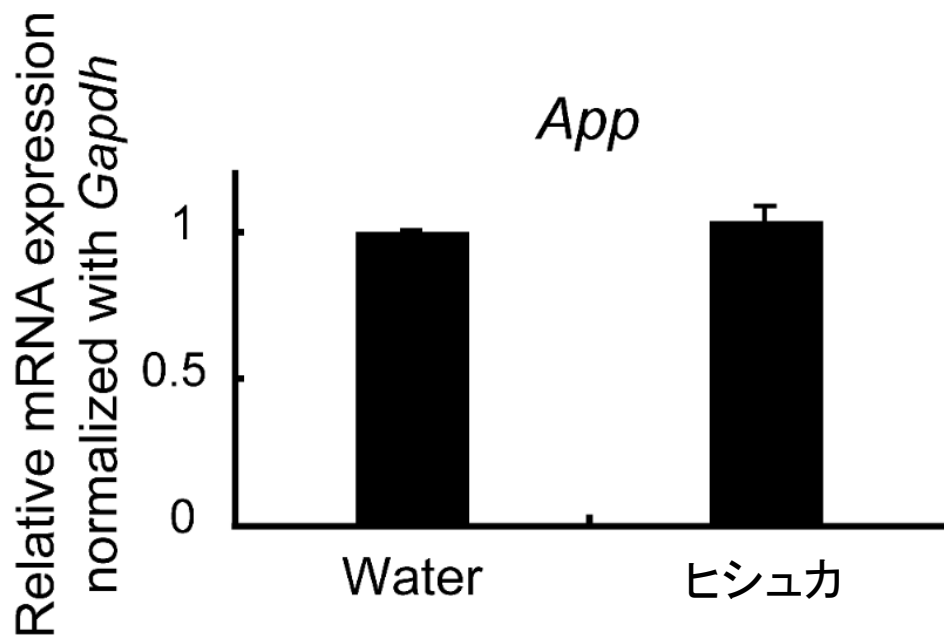


Figure 19. ヒシュカエキスによるトランスジーンの脳内のmRNA量の変化

水及びヒシュカエキスを投与した9ヶ月齢のV717Fマウスの脳内におけるトランスジーン
のmRNA量を比較するために定量PCRを行った。

水及びヒシュカエキス投与マウスとの間にトランスジーン
のmRNAの発現量に変化は認められなかった。ハウスキーピング遺伝子はマウスの *Gapdh*を用いた。

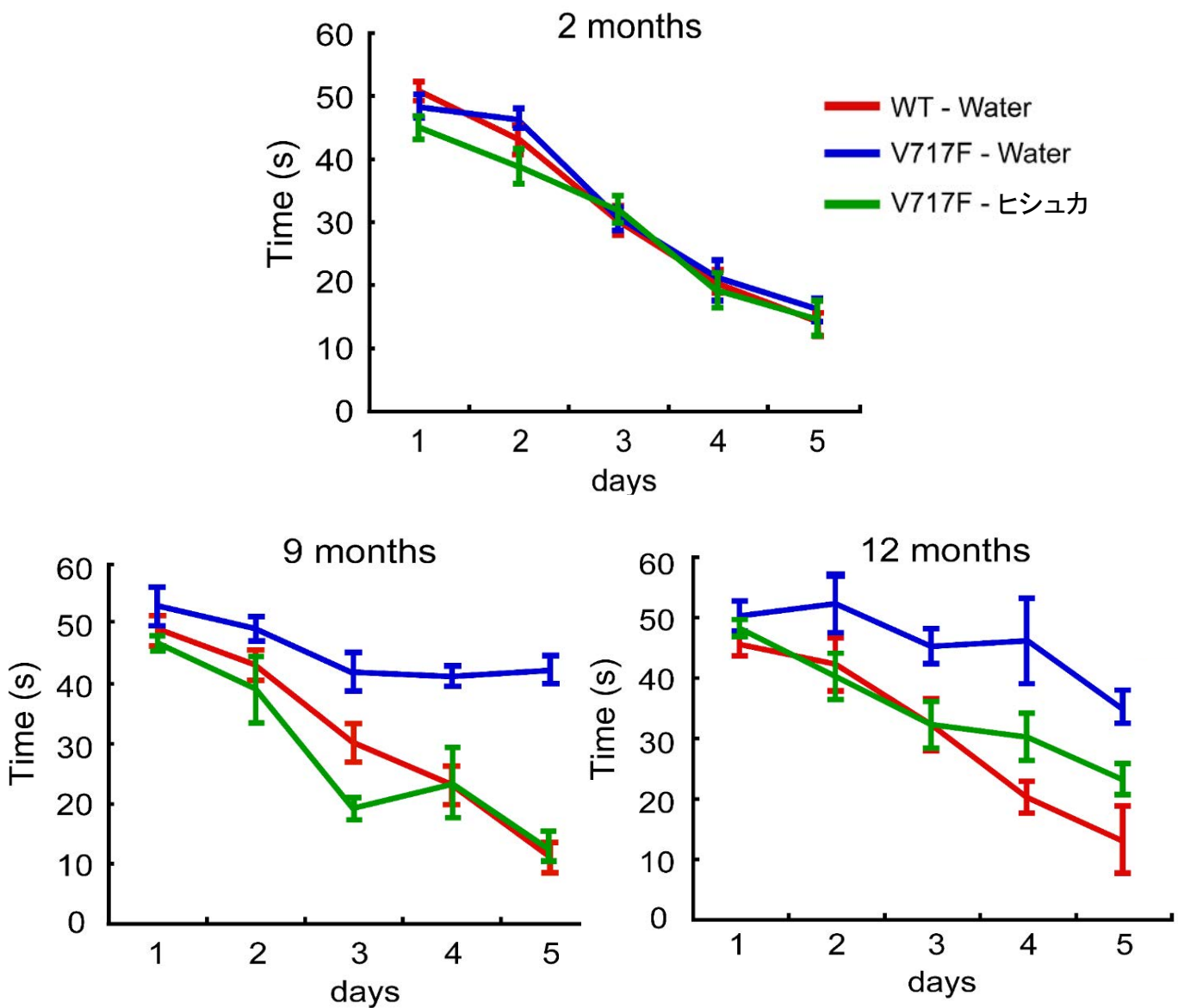


Figure 20. Water Mazeテスト(訓練セッション)におけるヒシュカエキスのアルツハイマー病モデルマウスに対する効果

1日目～5日目において、2ヶ月齢のマウスでは野生型マウスとV717Fマウスとの間にプラットホームに辿り着くまでの時間の差は認められなかった。9ヶ月齢、12ヶ月齢では有意な差が認められた。また、V717Fマウスのヒシュカエキス投与群(n=7)は非投与群(n=7)と比較して、プラットホームにたどり着くまでの時間が有意に短かった。有意差検定はtwo-way repeated measure ANOVAのpost-hoc検定としてHolm-Sidak法を用いた。9ヶ月齢のV717Fマウスのヒシュカエキス投与群は $P < 0.001$ 、12ヶ月齢のV717Fマウスのヒシュカエキス投与群は $P < 0.01$ であった。グラフのバーは±SDを示す。

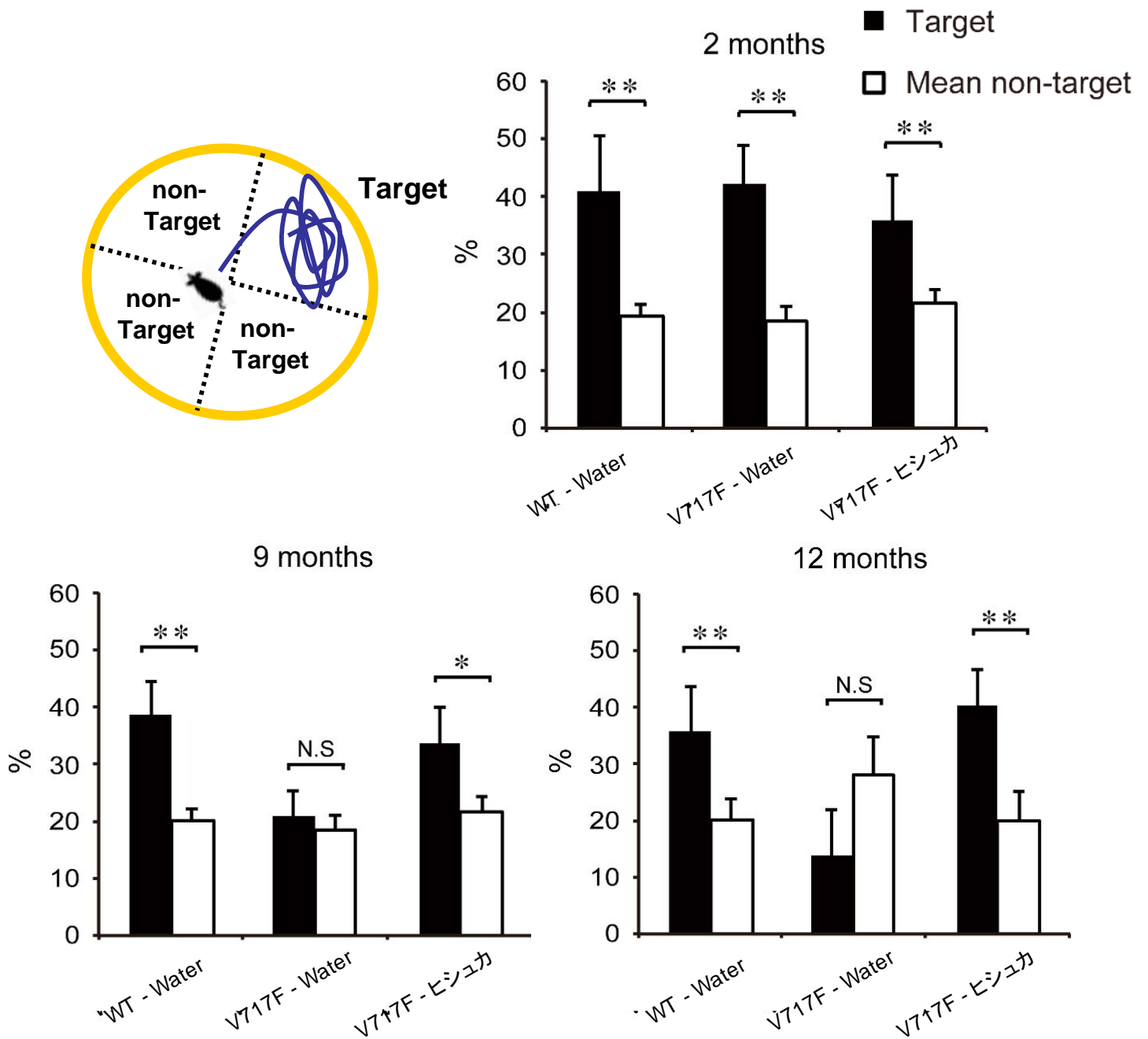


Figure 21. Water Mazeテスト(プローブテスト)におけるヒシユカエキスのアルツハイマー病モデルマウスに対する効果

訓練セッション終了後の6日目にプローブテストを実施した。
 2ヶ月齢のV717Fマウスはターゲット区間と非ターゲット区間の滞在時間に有意な差はみられず、記憶能力の低下が確認されなかったが、訓練セッションの結果と同様に9ヶ月齢、12ヶ月齢のV717Fマウス(共にn=7)で、記憶能力の低下が確認された。
 9ヶ月齢、12ヶ月齢のヒシユカエキス投与V717Fマウス(共にn=7)では野生型マウスと同様に滞在時間に有意な差を保持したままであった。
 非ターゲット区間の滞在時間の平均値に対するStudentのt検定を行った結果、*P < 0.05、**P < 0.01であった。グラフのバーは±SDを示す。

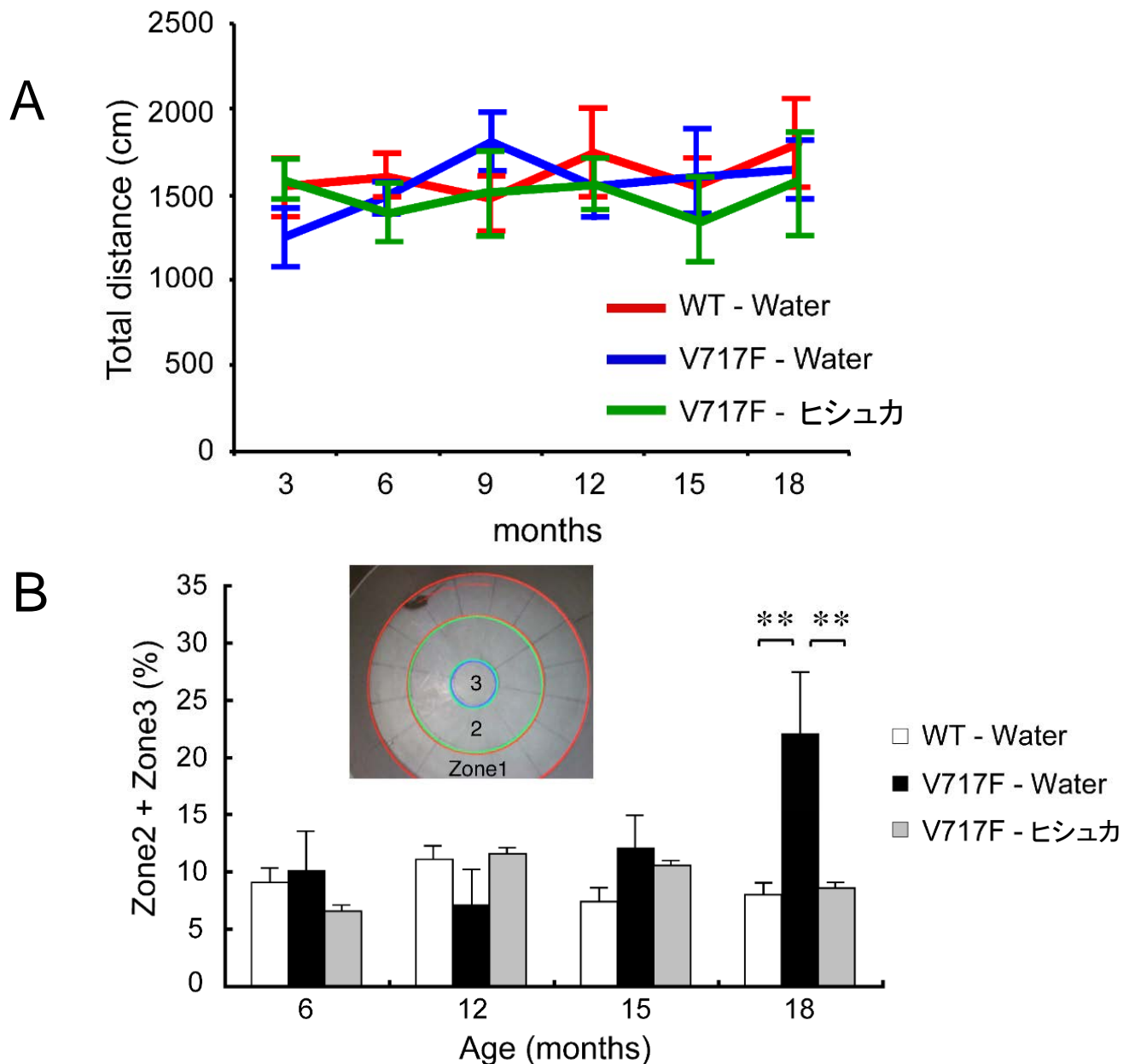


Figure 22. オープンフィールドテストにおけるヒシュカエキスの効果

(A) フィールドは中心からほぼ同じ面積になるよう3つの区画に分けており、中心部をゾーン3、その周りをゾーン2、壁に面した周縁部をゾーン1とした。3ヶ月齢から18ヶ月齢までのマウスを3ヶ月おきに円形のフィールド内に滞在させ、比較した結果、野生型マウスとV717Fマウスの5分間の総移動距離は共に1500cm前後であり、有意な差は認められなかった。

(B) マウスの不安行動を調べるため、マウスがオープンフィールド装置の中央部(ゾーン3)に滞在する割合を調べた。野生型マウスとV717Fマウスを比較し、6、12、15ヶ月齢においては不安行動に差は認められなかった。しかし、野生型マウスでは月齢を重ねるごとに中央部分への滞在時間が減少する一方で、18ヶ月の水投与V717Fマウス(n=7)では野生型マウス(n=8)、ヒシュカエキス投与のV717Fマウス(n=7)と比較して中央部分への滞在時間が有意に上昇した。また、その滞在時間はヒシュカエキスを投与することによって有意に抑えられた。

有意差検定はtwo-way repeated measure ANOVAのpost-hoc検定として

Tukey法を用いた。18ヶ月齢のV717Fマウスのヒシュカエキス投与群は

**P < 0.01であった。グラフのバーは±SDを示す。

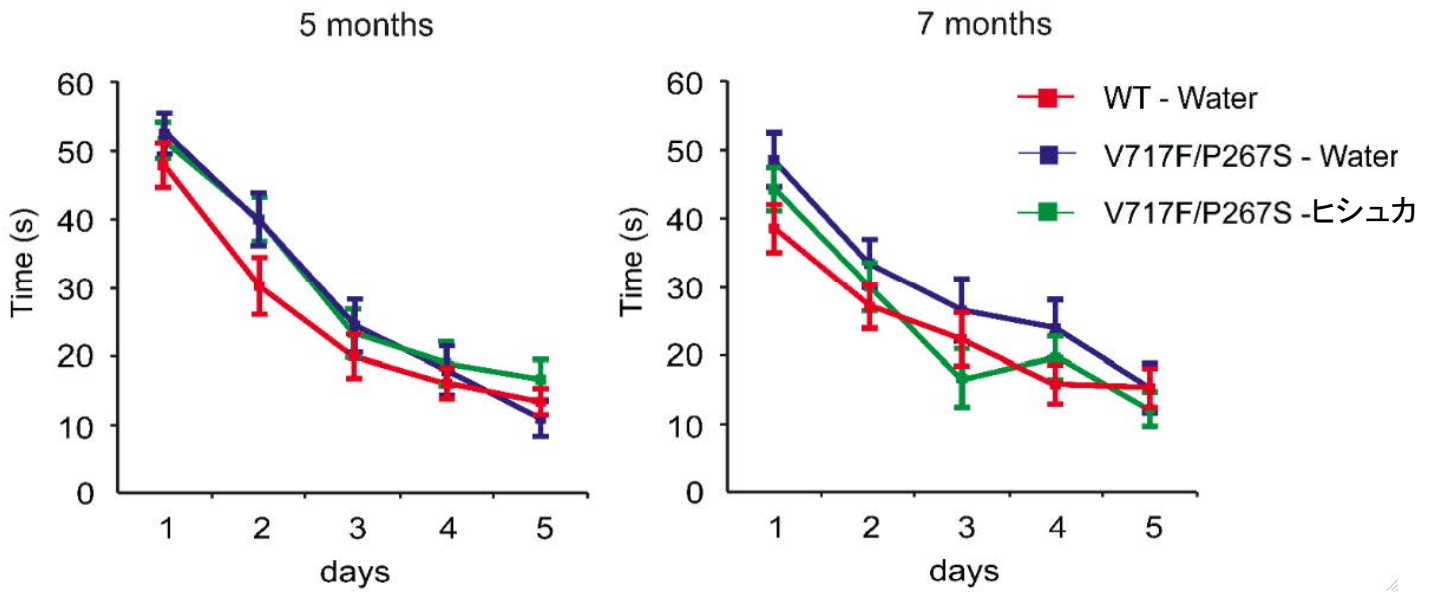


Figure 23. 5ヶ月齢、7ヶ月齢のV717F/P267SマウスにおけるWater Mazeテスト(訓練セッション)

V717F/P267Sマウスの記憶・学習能力をMorrisの水迷路によって検討した。5ヶ月齢、7ヶ月齢までは野生型マウスとの間に差はみられず、記憶・学習能力の低下は認められなかった。

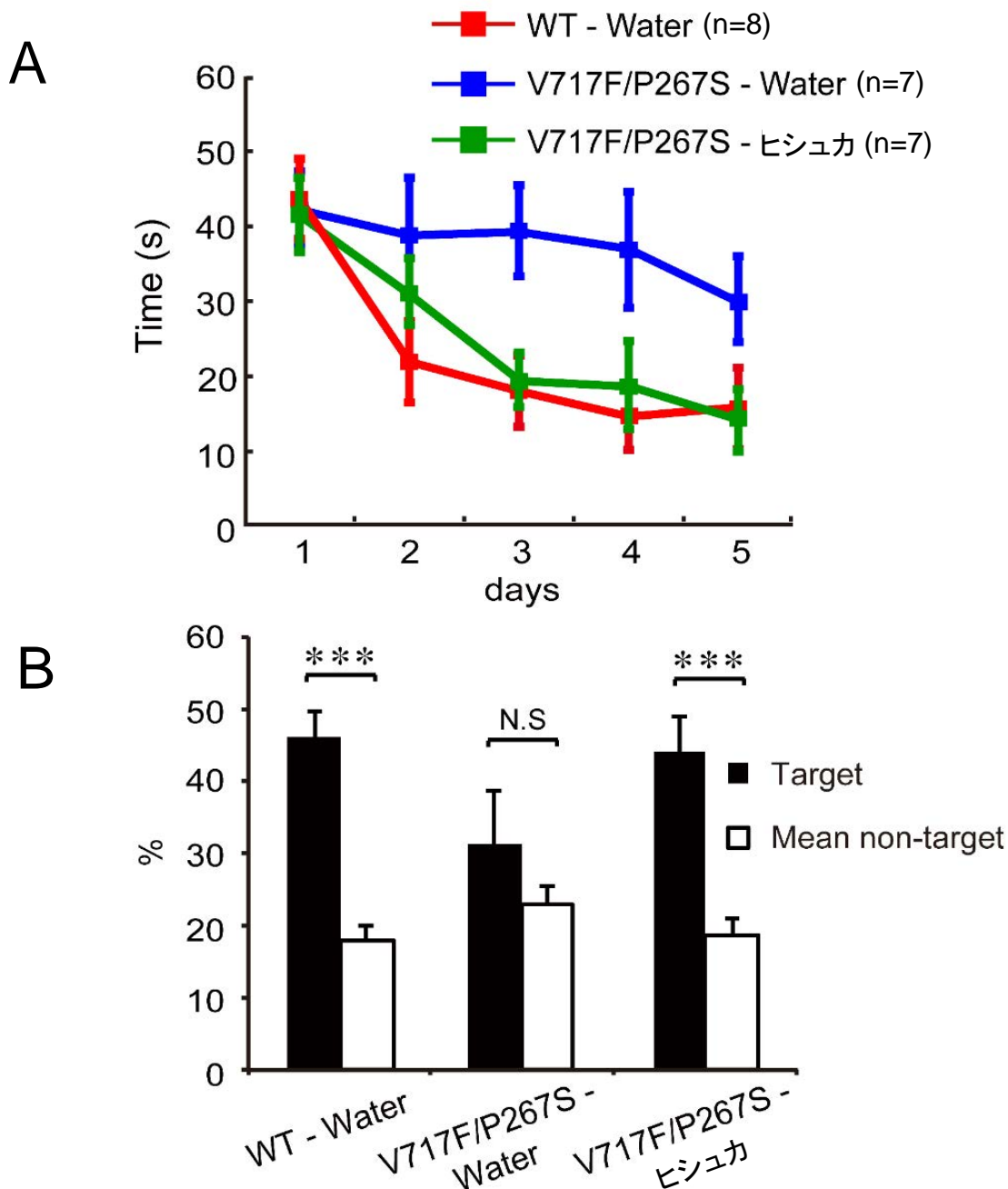


Figure 24. 9ヶ月齢のV717F/P267SマウスにおけるWater Mazeテスト

(A) Morrisの水迷路(訓練セッション)において9ヶ月齢のV717F/P267Fマウスのヒシユカエキス投与マウスは非投与マウスと比較して有意に記憶・学習能力の改善効果が見られた。有意差検定はtwo-way repeated measure ANOVAのpost-hoc検定としてHolm-Sidak法を用いた。9ヶ月齢のV717Fマウスのヒシユカエキス投与群は $P < 0.05$ であった。グラフのバーは \pm SDを示す。

(B) プローブテストにおいて、ターゲット区間と非ターゲット区間(平均)における滞在時間を比較した結果、ヒシユカエキス投与群は野生型マウスと同様に有意な差を保持したままであった。非ターゲット区間の平均値に対するStudentのt検定を行った結果、*** $P < 0.005$ であった。グラフのバーは \pm SDを示す。

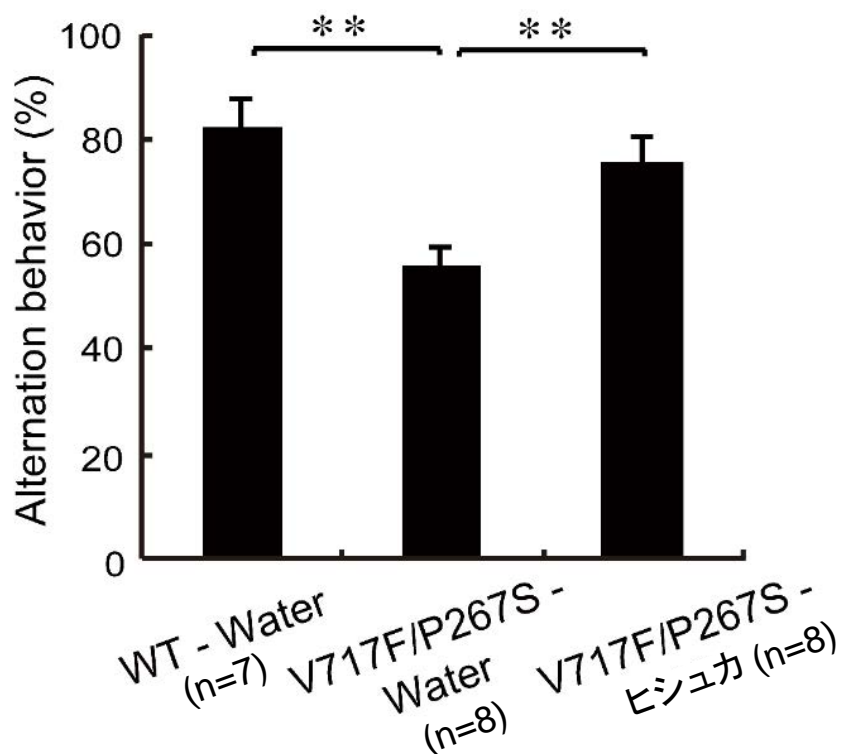


Figure 25. 9ヶ月齢のV717F/P267SマウスにおけるY字迷路

Y字迷路の装置内の異なるアームへ3回連続して進入した回数をアームへの総進入回数から1を引いた値で除した後、100を乗した数値を交替反応(alternation)として検討、比較した。その結果、9ヶ月齢マウスのV717F/P267Sマウスは記憶・学習能力に低下がみられたが、ヒシユカエキス投与マウスは野生型マウスとほぼ同じレベルで記憶・学習能力が保持されたままであった。算出した数値の平均値に対するStudentのt検定を行った結果、** $P < 0.01$ であった。グラフのバーは \pm SDを示す。

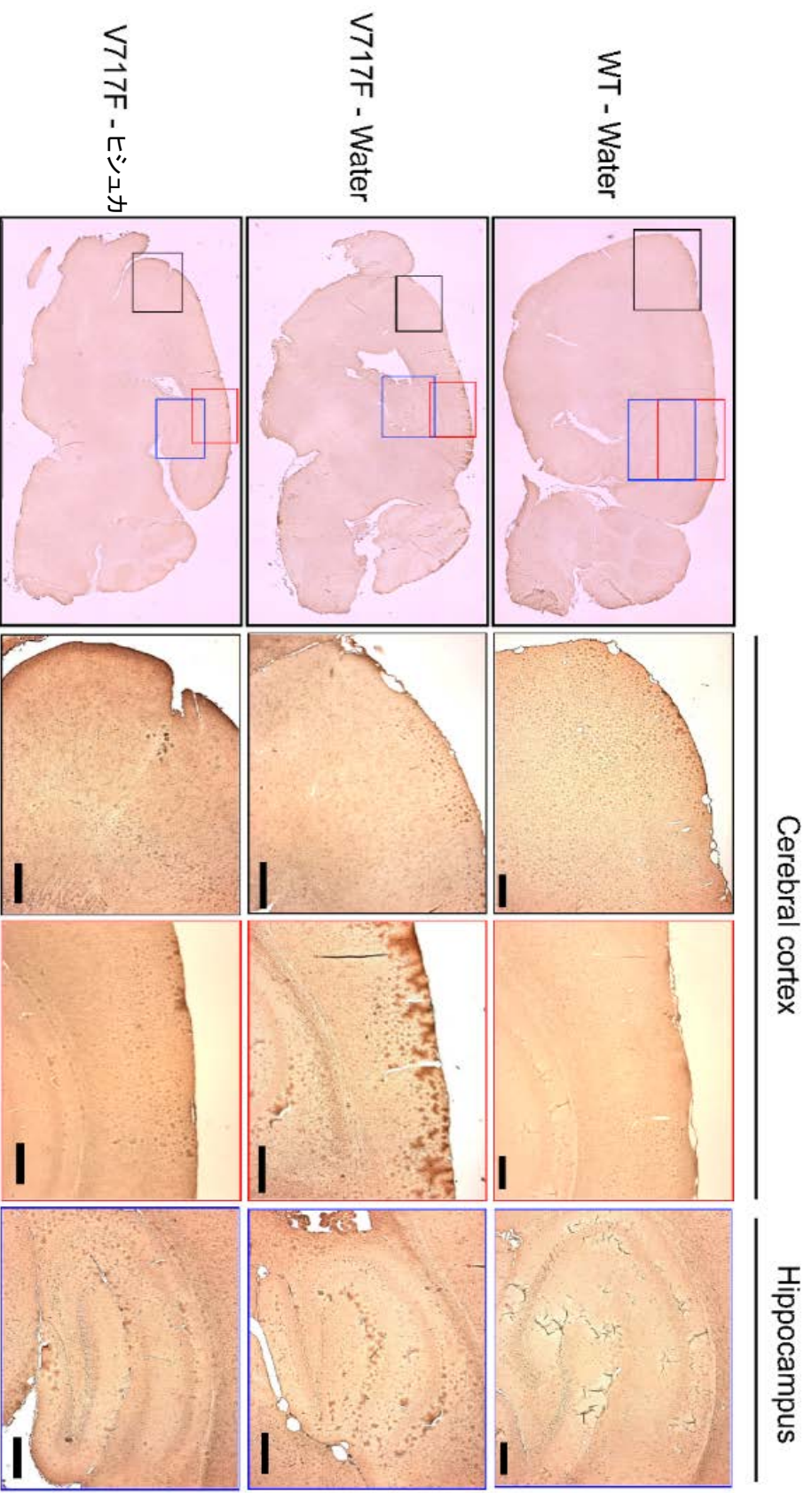


Figure 26. 16ヶ月齢のV717FマウスにおけるAβの免疫染色

16ヶ月齢のマウスの脳切片を作製し、Aβの発現を確認した。まず、抗Aβ抗体(6E10)による組織免疫染色を行い、Aβが大脳皮質及び海馬に存在しているかを検討した。Aβ沈着は16ヶ月齢で大脳皮質及び海馬に20μm以下の小さなものが多く見られた。また、V717Fマウスのヒシユカエキス投与マウスは水投与マウスと比較して大脳皮質のAβ斑が著しく減少しており、特に長径20μm以上のAβ沈着の数が減少していた。黒枠は大脳皮質前頭葉、赤枠は大脳皮質頭頂葉、青枠は海馬を示し、スケールバーは200 μm。

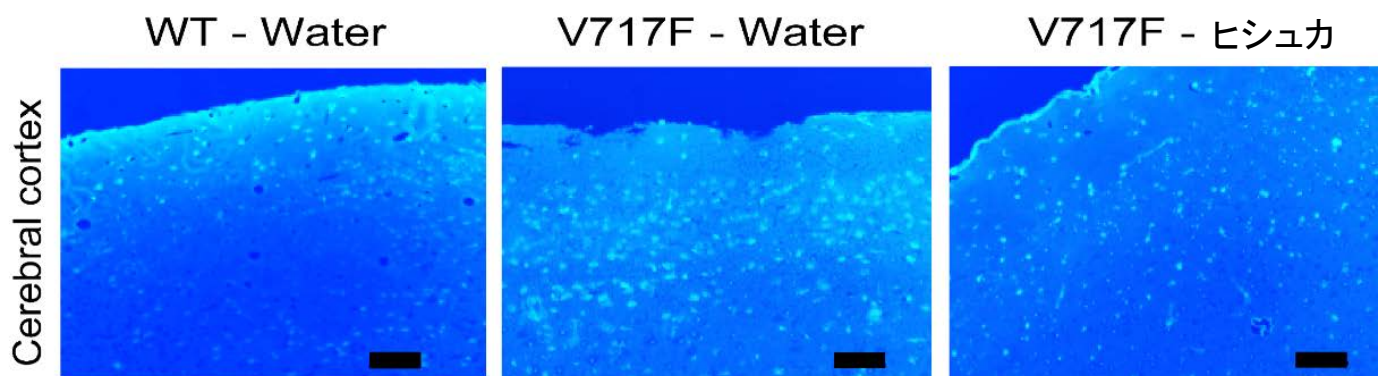


Figure 27. 16ヶ月齢のV717Fマウスにおける脳切片のFSB染色

アミロイドに高い親和性をもつFSBによる脳切片(大脳皮質)切片の $A\beta$ の蛍光染色においても、16ヶ月齢のヒシュカエキス投与マウスは非投与マウスと比較して有意に減少していることが観察された。スケールバーは200 μm 。