

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	笹岡 紀男
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>超高齢化の進む我が国において、今後認知症患者の急激な増加が予想され、特にその約半数を占めるアルツハイマー病(AD)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 <math>\beta</math>-、<math>\gamma</math>-セクレターゼが作用し産生される不溶性のアミロイド <math>\beta</math> (<math>A\beta</math>) が、脳内に蓄積し、最終的に神経細胞死を引き起こすことで発症する。これまでに多くの <math>\beta</math>-、<math>\gamma</math>-セクレターゼ阻害薬の研究開発がなされてきたが、未だ臨床試験で有効性を示した薬剤は存在しない。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。申請者は、安全性の観点から漢方薬の原料として使われている植物エキスに着目し、<math>A\beta</math> 産生の阻害活性を有する植物エキスを同定し、実際に AD 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の発症予防効果を検証した。</p> <p>申請者は、まずアルツハイマー病発症の最初のイベントである <math>A\beta</math> 産生を担う <math>\gamma</math>-セクレターゼの活性を簡便に測定するためのアッセイ系を構築した。次に、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、その中で強い阻害活性を有するエキスとしてホップエキス (生薬名ヒシユカ) を同定した。また、ELISA により細胞培養液中の <math>A\beta</math> 量を定量し、ホップエキス添加群は非添加群と比較して有意に <math>A\beta</math> の産生量が減少していることを確認した。続いて申請者は、ホップエキス中の <math>\gamma</math>-セクレターゼ阻害活性をもつ主要成分を Bligh Dyer 法、固相抽出法、HPLC (順相、逆相) により精製し、さらに、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、それが <b>Garcinielliptone HC</b> として報告されている物質であることを明らかにした。さらに申請者は、<math>A\beta</math> 産生抑制効果を認めたホップエキスの AD モデルマウスに対する発症予防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 <b>Indiana</b> 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 週齢からヒシユカを含む飲水を摂取させ、記憶、学習能力を Morris の水迷路を用いて評価した。結果、ホップエキスを摂取させた 9 ヶ月齢及び 12 ヶ月齢の V717F マウスは非摂取マウスと比較して有意に記憶・学習能力の低下が抑制された。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、ホップエキス摂取群は非摂取群と比較して脳内 <math>A\beta</math> 蓄積量の減少を認めた。さらに、家族性アルツハイマー病変異として同定された <b>P267S</b> 変異のある <b>Presenilin 1</b> を V717F マウスに共発現させた 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を行った。結果、前述の V717F マウスと同様、ホップエキスを摂取させた 9 ヶ月齢の V717F/P267S マウスは非摂取群と比較して、有意に記憶・学習能力の低下が抑制されていた。</p> <p>以上、申請者は <math>\gamma</math>-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、植物エキスのスクリーニングを行った。その結果、<math>\gamma</math>-セクレターゼ阻害活性を持つエキスとしてホップエキスを同定し、さらに、その主要成分の決定に成功した。また、ホップエキスには、<i>in vivo</i>においても <math>A\beta</math> 産生を有意に抑制し、アルツハイマー病モデルマウスにおける記憶・学習能力の低下を抑制することを示した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

現在、アルツハイマー病の発症機構として最も広く受け入れられているアミロイド仮説によると、アルツハイマー病は脳内で産生される不溶性のアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) が、凝集、蓄積し、最終的に神経細胞死を引き起こすことでその病態を惹起すると考えられている。これまでに世界中の製薬会社で  $\beta$ -、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬の研究開発がなされてきたが、未だ有効性を示す薬剤は認可されていない。また、アルツハイマー病の治療及び予防については、かなり早期から長期間行う必要が想定されるため、いかに副作用の少ない治療薬・予防薬を開発するかが極めて重要となる。本論文では、安全性の観点から漢方薬の原料として用いられている植物エキスに着目し、治療効果が期待できる植物エキスの同定を試みた。漢方薬は既にヒトに使用されている実績があり、大幅に摂取量を間違わない限り安全であると想定される。申請者はまず、細胞内の  $\gamma$ -セクレターゼ活性を評価できるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を樹立した。次に申請者は、このアッセイ系を用いて、約 1,600 種類の植物エキスの中から  $\gamma$ -セクレターゼ阻害活性を有するエキスとして、ホップエキスを同定した。ELISA 法による細胞培養液中の  $A\beta$  量の定量結果から、ホップエキス添加群は非添加群と比較して有意に培養液中の  $A\beta$  量が減少することを確認した。さらに、申請者は、ホップエキス中の  $\gamma$ -セクレターゼ阻害活性の主要成分の精製を行い、それが、**Garcinielliptone HC** と呼ばれる物質であることを見いだした。さらに、申請者は 2 種類のアルツハイマー病のモデルマウスを新規に作成した。1 つは、家族性アルツハイマー病を引き起こす変異型 **APP** を発現させた **V717F** マウスであり、もう一つは、この **APP(V717F)** と同時に別の家族性アルツハイマー病の原因となる **P267S** 変異を持つ **Presenilin 1** を発現させた **V717F/P267S** マウスである。続いて申請者は、これらのマウスに対し、ホップエキスを含む飲水を摂取させアルツハイマー病の発症予防効果を **Morris** の水迷路試験等を用いて検証した。その結果、ホップエキスを生後 6 週齢より飲水摂取した 9 ヶ月齢及び 12 ヶ月齢の **V717F** マウスは、非摂取マウスと比較して有意に記憶・学習能力の低下が抑制された。さらに、脳切片の免疫染色の結果から、ホップエキス摂取群は非摂取群と比較して脳内  $A\beta$  蓄積量の減少を認めた。また、**V717F/P267S** マウスにおいても、ホップエキス摂取群は非摂取群と比較して、有意に記憶、学習能力の低下が抑制された。

以上、本論文は、ホップエキスに  $\gamma$ -セクレターゼ阻害活性があり、 $A\beta$  産生を有意に抑制すること、さらに、ホップエキスにはアルツハイマー病モデルマウスの発症を有効に抑制する作用があることを明解に示したもので、極めて独創的で新規性の高いものである。従って、本論文は、博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認め、平成26年1月24日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日：平成 26 年 3 月 24 日