



in vitro およびin vivo
蛍光イメージングによるアミリン凝集阻 害の解析

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2025-06-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Xiaoyu, Yin メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10258/0002000340

氏名	Xiaoyu Yin (シャユ イン)
学位論文題目	Analyzing amylin aggregation inhibition through in vitro and in vivo fluorescence imaging (in vitro および in vivo 蛍光イメージングによるアミリン凝集阻害の解析)
論文審査委員	主査 教授 徳楽 清孝 教授 長谷川 靖 准教授 上井 幸司

論文内容の要旨

タンパク質のミスフォールディングと凝集は、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、プリオン病、2 型糖尿病 (T2DM) を含む多くの神経変性疾患の特徴である。これらの疾患の中で、T2DM は慢性的な代謝疾患であり、高血糖症（長期間にわたる血漿中のグルコース濃度の上昇）や標的組織でのインスリン抵抗性を伴う。現在、T2DM の発症率は世界的に流行レベルに達しており、その治療は非常に重要である。アミリンは、T2DM の治療標的として認識されている。しかし、アミリン凝集のメカニズムが明らかでないため、T2DM の治療が妨げられている。

本研究では、量子ドット (QD) イメージング法を用いてアミリンの in vitro 凝集プロセスを解析した。QD 蛍光イメージングの結果、100 μM のアミリン存在下で、12 時間のインキュベーション後に凝集体が出現し始め、24 時間後には多数の凝集体が形成されることが明らかになった。一方、50 μM のアミリンでは、12 時間のインキュベーション後には凝集体は形成されず、24 時間後に多数の凝集体が観察された。共焦点レーザー顕微鏡観察により、これらの凝集体が三次元的に堆積していることが確認された。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察では、アミリンが in vitro でミスフォールドしたフィブリルとして存在し、QD が均一にアミリンフィブリルに結合していることが明らかになった。さらに、微量ハイスループットスクリーニング (MSHTS) システムを用いて、ポリフェノールであるロスマリン酸 (RA) が 852.8 μM の 50% 効果濃度でアミリン凝集を阻害することを見出した。

In vivo 実験では、アミリンをゼブラフィッシュの胚にマイクロインジェクションし、異なる濃度の RA に曝露した。蛍光イメージングにより、ゼブラフィッシュ内のアミリン凝集をモニタリングし、蛍光強度を凝集の程度の指標とした。さらに、アミリン凝集阻害の生理学的効果を評価するために、受精後 120 時間 (hpf) のゼブラフィッシュ幼生に対して行動分析を実施した。その結果、RA への曝露によりゼブラフィッシュの蛍光強度が低下し、アミリン凝集が減少することが確認された。さらに、RA はアミリンフィブリル化毒性に関連する行動変化を軽減し、RA が in vivo でのアミリン凝集による毒性を効果的に緩和することを示唆した。今後は、アミリン凝集阻害剤を幅広くスクリーニングし、in vitro および in vivo 試験を通じて、アミリン凝集体の形成、沈着、および毒性を抑制する作用メカニズムをさらに探求する予定である。

ABSTRACT

Protein misfolding and aggregation are the hallmarks of many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and type 2 diabetes mellitus (T2DM). Among these diseases, T2DM is a chronic metabolic disease associated with hyperglycemia, elevated levels of glucose in plasma for prolonged periods, and insulin resistance in target tissues. Currently, the incidence of T2DM has reached epidemic proportions globally. Therefore, the treatment of T2DM is of great importance. Amylin has been recognized as a therapeutic target for T2DM management. The unclear mechanism of amylin aggregation has hindered the treatment of T2DM.

In this study, I analyzed the in vitro aggregation process of amylin using the quantum dot (QD) imaging method. QD fluorescence imaging revealed that in the presence of 100 μ M amylin, aggregates appeared after 12 h of incubation, while a

large number of aggregates formed after 24 h of incubation. In contrast, 50 μ M amylin did not form aggregates after 12 h of incubation but produced a large number of aggregates after 24 h. Confocal laser microscopy observations revealed that these aggregates were deposited in three dimensions. Transmission electron microscopy (TEM) revealed that amylin existed as misfolded fibrils in vitro and that QDs were uniformly bound to the amylin fibrils. In addition, using a microliter-scale high-throughput screening (MSHTS) system, I found that rosmarinic acid (RA) inhibited amylin aggregation at a half-maximal effective concentration of 852.8 μ M.

In vivo, amylin was microinjected into zebrafish embryos and exposed to different concentrations of RA. Fluorescence imaging was used to monitor amylin aggregation in the zebrafish, with fluorescence intensity serving as an indicator of the extent of aggregation. Additionally, behavioral analysis was performed on zebrafish larvae at 120 hours post-fertilization (hpf) to assess the physiological effects of amylin aggregation inhibition. The results showed that exposure to RA reduced fluorescence intensity in zebrafish, indicating a decrease in amylin aggregation. Moreover, RA exposure alleviated behavioral changes associated with amylin fibrillation toxicity, suggesting that RA effectively mitigates the toxicity induced by amylin aggregation in vivo. In the future, I plan to screen a broader range of amylin aggregation inhibitors for in vitro and in vivo testing to further explore the mechanism of action in inhibiting the formation, deposition, and toxicity of amylin aggregates.

論文審査結果の要旨

変性タンパク質の凝集は、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病、2型糖

尿病（T2DM）等の発症に関与している。アミリンは T2DM の発症に関与することが知られている凝集性タンパク質であるが、アミリンの凝集のメカニズムには不明な点が多い。本論文では、量子ドット（QD）イメージング技術を用いてアミリン凝集体を可視化し、これを凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング（MSHTS）システムへ応用することを目指した。さらに *in vitro* で凝集阻害活性を示したロスマリン酸（RA）の効果を、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 評価システムで評価した。

第1章では、QD を用いたアミリン凝集の蛍光イメージング条件の最適化を行なった。その結果、50 μ M 以上のアミリン濃度条件下、12～24時間で凝集体が形成されることを示した。透過型電子顕微鏡観察の結果、アミリンがアミロイド様線維を形成していること、形成した線維に QD が結合していることが確認された。加えて、アミリン凝集阻害物質の MSHTS システムを確立し、実際に RA によるアミリン凝集阻害活性の定量化に成功した。

第2章では、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 評価を行なった。まず、アミリンをゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションし、異なる濃度の RA に曝露した。チオフラビン T による蛍光イメージングにより、アミリン凝集体をモニタリングしたところ、RA への曝露によりゼブラフィッシュ体内のアミリン凝集が減少することが確認された。さらに、RA がアミリン凝集により誘導される行動変化を緩和することを示した。

第3章では、これまでアミロイド β 凝集阻害活性が知られているポリフェノール類を対象に、QD を用いたハイスループットスクリーニングシステムによりアミリン凝集阻害活性の評価を行ない、幾つかの活性物質を見出すことに成功した。

以上、本論文では、T2DM 予防効果が期待されるアミリン凝集阻害物質の MSHTS システムを確立し、活性が見られた RA がゼブラフィッシュによる *in vivo* アッセイにおいても効果を示すことを明らかにした。以上の成果より、本論文は学位論文として十分な水準にあると認められた。