



真核微生物からのアミロイド $\beta$ 凝集阻害活性の高い  
抽出物のスクリーニングと抽出物による細胞外アミロイド $\beta$ 凝集の  
減少

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: Gegentuya メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10258/0002000346">http://hdl.handle.net/10258/0002000346</a>

氏名	Gegentuya (ゲゲントヤ)
学位論文題目	Screening of an extract with higher amyloid $\beta$ aggregation inhibitory activity from eukaryotic microorganisms and the reduction of extracellular amyloid $\beta$ aggregation by the extract (真核微生物からのアミロイド $\beta$ 凝集阻害活性の高い抽出物のスクリーニングと抽出物による細胞外アミロイド $\beta$ 凝集の減少)
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

アルツハイマー病 (AD) は、進行性の認知機能障害や行動障害を特徴とする中枢神経系の変性疾患である。AD は認知症患者の 60~70%を占める最も一般的な認知症のタイプである。AD の主な病理学的特徴は、脳内にアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) を含む細胞外プラークが蓄積することである。 $A\beta$  を標的とした免疫療法薬には大きな進展が見られており、米国食品医薬品局 (FDA) は Leqembi™ (レカネマブ) および Kisunla™ (ドナネマブ) を承認した。これらの薬は臨床応用で一定の成果を上げているものの、AD を完全に治癒することは依然として困難であり、さまざまな副作用を伴う。

近年、世界中の研究者たちにより  $A\beta$  凝集阻害剤のスクリーニングが著しく進展し、天然抽出物が強力な  $A\beta$  凝集阻害活性を示すケースが増えている。そのため、これらの天然抽出物を日常の食事に取り入れることは、AD の予防に向けた安全な手段を提供する可能性がある。

本研究では、強力な  $A\beta$  凝集阻害剤をスクリーニングするために、200 種類以上のキノコ類からなるライブラリを選んだ。キノコエキスをスクリーニングするために、量子ドットイメージングを用いた自動化微量ハイスループットスクリーニング (MSHTS) システムを使用した。210 種類のキノコ抽出物のうち、11 種類が  $A\beta$  凝集阻害活性を示した。その中で、コフキサルノコシカケとカバノアナタケがより優れた阻害活性を示した。

次に、MSHTS 結果に基づいて、コフキササルノコシカケのメタノール抽出物の分画を行った。最初に、極性および非極性溶媒を用いてメタノール抽出物を分画した。エーテルおよび酢酸エチル画分が A $\beta$  凝集阻害活性を示した。酢酸エチル画分はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いてさらに分画され、MSHTS アッセイにより評価した。最終的に、EC<sub>50</sub> が 2.30  $\pm$  0.859  $\mu$ g/ml の阻害活性を有する活性画分を得ることができた。しかし、さらなる分画に伴い活性が低下したため、未解明の複数の化合物による相乗効果があるのかもしれない。将来、この阻害活性のメカニズムを解明したいと考えている。

また、MSHTS システムを使用していくつかの変形菌類の A $\beta$  凝集阻害活性を評価したところ、モジホコリが高い活性を示した。さらに、50 種類のカビ類の A $\beta$  凝集阻害活性を評価し、そのうち 18 種類が活性を示した。

全体として、本研究は、真核微生物が AD 予防において潜在的な価値を持つことを示唆している。MSHTS システムはハイスループットスクリーニングにおいてその可能性を示し、キノコ類、変形菌類、カビ類からの潜在的な活性化合物の評価を可能にした。真核微生物を AD 研究に取り入れることで、革新的な治療法や機能性食品の探索に新たな道が開かれ、神経変性疾患が引き起こす課題の解決に役立つ可能性がある。

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disease of the central nervous system characterized by progressive cognitive dysfunction and behavioral disorders. AD is the most common type of dementia, accounting for 60-70% of dementia cases. The main pathological feature of AD is the accumulation of extracellular plaques containing amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) in the brain. Significant progress has been made in immunotherapeutic drugs targeting A $\beta$ . The U.S. Food and Drug Administration (FDA) has approved Leqembi™ (lecanemab-irmb) and Kisunla™ (donanemab-azbt). Although these drugs have achieved certain results in clinical applications, they are still

unable to effectively cure AD and are associated with various side effects.

In recent years, significant progress has been made by researchers worldwide in screening for A $\beta$  aggregation inhibitors, with natural extracts showing increasingly potent A $\beta$  aggregation inhibitory activity. Therefore, incorporating these natural extracts into daily diets may offer a safe approach for the prevention of AD.

In this study, I chose a library of mushrooms (over 200) to screen potent A $\beta$  aggregation inhibitors. To screen mushroom extracts, I used quantum dot imaging based automated microliter-scale high throughput screening (MSHTS) system. Out of 210 mushroom extracts, 11 extracts showed A $\beta$  aggregation inhibition. Among them *Ganoderma applanatum* and *Fuscoporia obliqua* showed better inhibition activity. I went ahead to perform MSHTS assay guided fractionation of methanol extract *Ganoderma applanatum* (200 grams). Initially, methanol extract was fractionated using polar and non-polar solvents. Ether and ethyl acetate fractions displayed A $\beta$  aggregation inhibitory activity. The ethyl acetate fraction was subjected to sub fractionation using silica gel column chromatography followed by MSHTS assay. Finally, I was able to get active fraction with inhibitory activity and EC<sub>50</sub> is  $2.30 \pm 0.859 \mu\text{g/ml}$ . However, the activity decreased with further purification, so there may be a synergistic effect of multiple compounds that has not yet been elucidated. In future, I would like to elucidate the mechanism behind its inhibitory activity.

I also evaluated the A $\beta$  aggregation inhibitory activity of some myxomycetes using the MSHTS system, among which *Physarum* showed high activity. Furthermore, I evaluated the A $\beta$  aggregation inhibitory activities of 50 molds, of which 18 showed

activities.

Overall, this study indicates that eukaryotic microorganisms hold potential value in the prevention of AD. The MSHTS system demonstrated its prospects in high-throughput screening, enabling the evaluation of potential active compounds from mushrooms, myxomycetes, and molds. Incorporating eukaryotic microorganisms into AD research opens new avenues for exploring innovative therapies and functional foods, which may help address the challenges posed by neurodegenerative diseases.

### 論文審査結果の要旨

アルツハイマー病（AD）は認知機能障害や行動障害を特徴とする神経変性疾患の一種であり、認知症患者の6～7割を占める最も一般的な認知症のタイプである。ADの主な病理学的特徴は、脳内へのアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の凝集と沈着である。近年  $A\beta$  やその凝集体を標的とした免疫療法薬が一定の成果をあげているが、これらの医薬品は非常に高価であり副作用を伴うこと、また AD を完全に治癒することも未だ困難である。本論文では、AD 予防に効果を示すことが期待される  $A\beta$  凝集阻害活性物質について、真核微生物を対象として広くスクリーニングを行ない、得られた活性画分が神経細胞への  $A\beta$  凝集沈着を抑制するかどうか明らかにすることを目的とした。スクリーニングには、当研究室で開発された、量子ドットイメージングを用いた微量ハイスループットスクリーニング（MSHTS）システムを用いた。

第 1 章では、北海道産キノコ 210 種の抽出物を自動化 MSHTS システムで評価し、11種の  $A\beta$  凝集阻害活性を示すエキスを見出した。その中で  $A\beta$  凝集阻害活性が高く、 $A\beta$  による細胞毒性の抑制効果が確認された *Ganoderma applanatum* および *Fuscoporia obliqua* を選定し、高活性画分の分画を行なった。最終的に、以前報告された北海道産植物 504 種類の抽出物で最も高い活性を示したサンプルより高活性の画分を得ることができた。さらに得られた画分が、モデル神経細胞 SH-SY5Y への  $A\beta$  凝集沈着を抑制することを確認した。

第 2 章では、変形菌に対する凝集阻害活性を評価し、*Physarum polycephalum* の変形体から得られた 3 kDa 以上の画分が活性を示すことを明らかにした。

第 3 章では、50 種類のカビ類に対して  $A\beta$  凝集阻害活性を評価し、18 種類が活性を示すことを明らかにした。

以上、本論文では、真核微生物から AD 予防において潜在的な価値を持つことが期待される  $A\beta$  凝集阻害活性の高い画分を得ることに成功した。これらの画分は、

モデル神経細胞に対して効果を示したことから、今後革新的な治療法や機能性食品の開発が進展する可能性が期待される。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。