

Clioquinol の神経系細胞に及ぼす影響の解明

武藤多津郎 (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

村手健一郎 (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

新美 芳樹 (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

水谷 泰彰 (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

島 さゆり (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

植田 晃広 (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

伊藤 信二 (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

研究要旨

我々はこれまで、Clioquinol (CQ) の神経毒性の分子的基盤を求めて研究を進めてきた。その結果、1) CQ は、神経細胞の生存・分化に必須の役割を果たす神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) による高親和性 NGF 受容体である Trk の自己リン酸化反応を抑制し、Trk 発現細胞である PC12 細胞に internucleosomal DNA fragmentation を起こし apoptotic cell death を惹起させること¹⁾、2) CQ は、histone のアセチル化を阻害すること、この histone の脱アセチル化を阻害する tricostatin A (TSA) などのヒストン脱アセチル化阻害薬で細胞を処理しておくこと CQ による細胞死がほぼ完全に阻害されることを見出した²⁾。さらに、TSA は、CQ による Trk の NGF に対する自己リン酸化反応抑制にほぼ完全に拮抗した²⁾。CQ による Apoptosis へのシグナル伝達系には、caspase 9 から caspase 3 の活性化の経路が使用されていることを明らかにした。しかし、この経路の上流に位置するミトコンドリアからの cytochrome C (Cyt C) の細胞質への遊離が確かに起こっているのかは不明であった。そこで、今年度はこの点について解析を加えるとともに、CQ により神経系培養細胞で autophagy が起きるのか？ もし起きる場合この反応が細胞生存に対して有利に働くのか？あるいは不利に働くのかについてもその解明を目指した。

その結果、CQ 投与により PC12 細胞では投与 1 時間後には明らかな Cyt C の細胞質への遊離が観察される事。したがって、mitochondria からの Cyt C の遊離 Caspase 9 活性化 Caspase 3 活性化経路を通じて apoptotic cell death が起きていることを示している。又、autophagosome 形成に必要な LC3-II は、Bell 型の発現パターンを CQ は惹起させたが、maturation に関与する p62 蛋白の発現は CQ 処理により明らかに増大したが、その発現の持続は長くは続かず、処理 4 時間ではほとんど消失してしまうという不思議な反応を示した。一方、TSA 処理した細胞では、CQ による p62 蛋白発現反応は一切起きなかった。以上の結果は、CQ による細胞刺激は、一方では apoptotic cell death を惹起させるとともに他方では不完全な autophagy 反応が惹起され、autophagic cell death を来しているのではないかと推察された。

A. 研究目的

SMON が CQ によりもたらされる薬害であることが確立されてから多くの月日が流れたにも関わらず、その詳細な分子メカニズムは不明であった。神経系培養細胞における CQ によりもたらされる neurotoxicity の分子機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

高親和性 NGF 受容体 Trk を通常より 10 倍程度強発現する rat trk cDNA の stable transfectant である PC12 cells (PCT) cells の培養系を用いすべての実験を行った。Cyt C のミトコンドリアからの遊離は、定法に従い細胞分画を行いミトコンドリア画分、細胞質画分について抗-Cyt C 抗体、抗-COX 4 抗体を用いた Western blot (WB) 法で量的比較を行った。又、caspase 9 の活性化は、活性測定キットを用い CQ 1 μ M の濃度での時間経過を測定した。

一方、CQ による autophagy が起きるか否かの検討は、CQ の各濃度及び各反応時間を変化させて処理した細胞から、各々 LC3-I、LC3-II、p62 蛋白の発現をそれぞれの特異的抗体を用いてその発現量を WB 法で調べた。

C. 研究結果

PCT 細胞に CQ を加えると、caspase 9 の活性化が認められ、続いて caspase 3 の活性化が認められた。尚、caspase 8 と caspase 12 の活性化は認められなかった。TSA 添加により、CQ による caspase 9 と caspase 3 の活性化を抑制した。更に、CQ は上記 caspases の活性化の Peak に達する前からミトコンドリアからの Cyt C の遊出を促進すると共に LC3-II 及び p62 の発現増加を誘導した。LC3-II の発現誘導は Bell 型反応を呈し、TSA の存在如何に関わらずその発現増加は見られたが、p62 蛋白の発現増加は TSA 非存在下でのみ見られ、細胞死が抑制される TSA 存在下では見られなかった。

D. 考察

CQ は、PCT 細胞に対して Apoptosis を引き起こすが、この際 caspase 9 活性化 - caspase 3 の活性化が惹

起されミトコンドリアからの Cyt C の細胞質への遊出を促進し、アポトーシスへのシグナル伝達が行われている事を確認した。一方、CQ は同細胞内に LC3-II の発現を誘導し、autophagy を惹起させる可能性が想定されたが、autophagosome の maturation を促進する p62 蛋白の誘導は一定時間を経ると急に減少し lysosome との融合反応が正常に起きていない可能性を想定された。この autophagy を巡る異常な反応が細胞の生存に有利に働いているのか、あるいは細胞死に繋がっているのかは現在不明で、今後の更なる検討が必要と考えられた。只、TSA で処理し CQ による細胞死が抑制された条件下では p62 の発現増加は観察されなかったことから考察するとこのような異常な autophagy に関連する反応も細胞死へとつながるシグナル伝達系をなしている可能性も示唆しており、今後の研究でこうした点についても検討が必要と考えられた。

E. 結論

CQ は、PCT 細胞に対しデスリガンドや ER-ストレスに起因する Apoptosis の経路を活性化するのではなく、ミトコンドリア経由の Apoptosis 経路を活性化して細胞死を惹起している事が確認された。CQ は、一方で同細胞内に LC3-II の発現を誘導し、autophagy を惹起させる可能性が想定されたが、autophagosome の maturation を促進する p62 蛋白の誘導は一定時間を経ると急に減少し lysosome との融合反応が正常に起きていない可能性を想定された。いわゆる autophagic cell death の機序の関与も疑わせる結果で、今後更なる研究が必要と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukui T, Ueda A, Murate K, Hikichi C, Ito S, Asakura K, Mutoh T. Depressive state as an initial symptom for sub dural abscess. *Neurol and Clin Neurosci* 4: 31-3, 2016.

Takeuchi Y, Ochiai J, Ueda M, Mabuchi C, Shima S, Mutoh T. A case of limbic encephalitis with anti-neutral glycosphingolipid antibodies. *Neurol Clin*

- Neurosci 4: 70-72, 2016 DOI 10.1111/ncn3.12037
- Ito S, Ueda A, Murate K, Hirota S, Fukui T, Ishikawa T, Shima S, Hikuchi C, Mizutani Y, Kizawa M, Asakura K, Mutoh T. Differentiation of cancer from atrial fibrillation in patients with acute multifocal stroke. *J Neurol Sci* 368: 344-8, 2016
- Ishikawa T, Asakura K, Mizutani Y, Ueda A, Murate K, Hikichi C, Shima S, Kizawa M, Komori M, Murayama K, Toyama H, Ito S, Mutoh T. Magnetic resonance neurography for the evaluation of CIDP. *Muscle Nerve* 2016 Aug 8. doi: 10.1002/mus.25368. [Epub ahead of print]
- Mizuma A, Yamashita T, Kono S, Nakayama T, Baba Y, Ito S, Asakura K, Niimi Y, Asahi T, Kanemaru K, Mutoh T, Kuroda S, Kinouchi H, Abe K. Phase II trial of intravenous low-dose granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 25: 1451-7, 2016 DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.01.022
- Hayashi K, Hamano T, Kawamura Y, Kimura H, Matsunaga A, Ikawa M, Yamamura O, Mutoh T, Higuchi I, Kuriyama M, Nakamoto Y. Muscle MRI of the Upper Extremity in the Myotonic Dystrophy Type 1. *Eur Neurol* 76 (1-2): 87-94, 2016
- Kawai H, Morimoto S, Takakuwa Y, Ueda A, Inada K, Sarai M, Arimura T, Mutoh T, Kimura A, Ozaki Y. Hypertrophic Cardiomyopathy Accompanied by Spinocerebellar Atrophy With a Novel Mutation in Troponin I Gene. *Int Heart J*. 57 (4): 507-10, 2016
- Kawabe M, Tachi R, Hideyama T, Yagi M, Kishida Y, Maekawa R, Shima S, Mutoh T, Shiio Y. Relapsing polychondritis-associated limbic encephalitis preceding the emergence of systemic inflammation. *Neurol Clin Neurosci* 2016 DOI: 10.1111/ncn3.12060
- Mutoh T. Editorial. Current understanding of immunopathogenesis of Parkinson's disease. *Austin J Clin Neurol* 3 (3): 1097-1098, 2016
- Niimi Y, Ito S, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Maeda T, Nagao R, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, and Mutoh T. Usefulness of Combining 123I-FP-CIT-SPECT Striatal Asymmetry Index and Cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine Scintigraphy Examinations for the diagnosis of Parkinsonisms. *J Neurol Sci* (in press)
2. 学会発表
- Tatsuro Mutoh, Sayuri Shima, Akihiro Ueda, Kunihiko Asakura, Shinji Ito. Clinical and Biochemical pictures of anti-neutral glycolipids antibody-positive central and peripheral nervous system-involving disorders. American Academy of Neurology 2016 annual meeting. DC, USA 2016.4.21
- 石川等真, 水谷泰彰, 引地智加, 島さゆり, 植田晃広, 木澤真努香. CIDP 患者における末梢神経の volume 解析 第 57 回 日本神経学会学術集会 神戸 2016.5.18
- 朝倉邦彦, 石川等真, 島さゆり, 植田晃広, 伊藤信二, 武藤多津郎. Clloquinol induces apoptosis in PC12 cells via caspase 9 and 3 activation 第 57 回 日本神経学会学術集会 神戸 2016.5.18
- 伊藤信二, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 島さゆり, 水谷泰彰, 植田晃広, 木澤真努香, 武藤多津郎. The significance of serial D-dimer measurements on Trousseau's syndrome 第 57 回 日本神経学会学術集会 神戸 2016.5.19
- 島さゆり, 植田晃広, 水谷泰彰, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 新美芳樹, 木澤真努香, 伊藤信二, 武藤多津郎. 自験 16 例から分析した脳脊髄根末梢神経炎 (EMRN) の臨床像と抗体活性 第 57 回 日本神経学会学術集会 神戸 2016.5.21
- 村手健一郎, 前田利樹, 長尾龍之介, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 島さゆり, 新美芳樹, 植田晃広, 伊藤信二, 武藤多津郎. 言語障害で発症し, 脳内に MRI 異常信号が多発した 51 歳女性例 第 145 回 日本神経学会東海北陸地方会 名古屋 2016.6.25
- 植田晃広, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 島さゆり, 新美芳樹, 伊藤信二, 武藤多津郎. 抗 GM1 抗体の中性スフィンゴミエリナーゼに及ぼす影響の解明 第 28 回 神経免疫学会学術集会 長崎 2016.9.30

石川等真, 新美芳樹, 植田晃広, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 島さゆり, 伊藤信二, 武藤多津郎. CIDP 患者における末梢神経の MRI neurography を用いた定量的解析の試み 第 48 回 藤田医学会 名古屋 2016.10.6

石川等真, 伊藤信二, 長尾龍之介, 前田利樹, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 島さゆり, 新美芳樹, 植田晃広, 武藤多津郎. 反復する一過性複視を呈し神経梅毒と考えられた 1 例 第 21 回 日本神経感染症学会総会・学術大会 金沢 2016.10.21

引地智加, 伊藤信二, 長尾龍之介, 前田利樹, 村手健一郎, 廣田政古, 石川等真, 島さゆり, 新美芳樹, 植田晃広, 武藤多津郎. 抗 Th/To 抗体, 抗 SRP 抗体陽性壊死性筋炎の 1 例 第 146 回 日本神経学会 東海北陸地方会 名古屋 2016.10.29

植田晃広, 長尾龍之介, 前田利樹, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 新美芳樹, 伊藤信二, 武藤多津郎. 妊娠中に発症し免疫治療と帝王切開により健康な児を得て母体も回復し得た NMDAR 脳炎の 1 症例 第 34 回 日本神経治療学会総会 鳥取 2016.11.26

廣田政古, 伊藤信二, 植田晃広, 長尾龍之介, 前田利樹, 村手健一郎, 引地智加, 石川等真, 島さゆり, 新美芳樹, 武藤多津郎. 視神経炎を合併した抗 NMDA 受容体 (NMDAR) 脳炎の 1 例 第 147 回 日本神経学会東海北陸地方会 名古屋 2017.3.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 文献

- 1) Asakura K et al. Cloiquinol inhibits NGF-induced Trk autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. Brain Res 1301: 110-115, 2009
- 2) Fukui T et al. Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicity of cloiquinol in PC12 cells. Toxicology 331: 112-8, 2015