

クリオキノールによるタウ蛋白リン酸化抑制機構

濱野 忠則 (福井大学 医学部 第二内科)

林 高平 (浙江省人民医院神経内科)

林 浩嗣 (福井大学 医学部 第二内科)

白藤 法道 (福井大学 医学部 第二内科)

佐々木宏仁 (福井大学 医学部 第二内科)

上野亜佐子 (福井大学 医学部 第二内科)

井川 正道 (福井大学 医学部 第二内科)

山村 修 (福井大学 医学部 第二内科)

中本 安成 (福井大学 医学部 第二内科)

研究要旨

近年クリオキノール (CQ) がアルツハイマー病 (AD) をはじめとする認知機能障害に対し有効である可能性を示唆する臨床・基礎研究がみられ、関心を持たれている。基礎研究では CQ のアミロイド 蛋白 (A β) に対する効果がマウスモデルや細胞モデルで確認されているが、タウ蛋白に対する検討はほとんどみられない。今回我々は野生型タウ蛋白を TetOff 誘導系により発現する神経系細胞を用いて CQ のタウ蛋白リン酸化、および重合に及ぼす影響につき検討した。その結果 1~10 μ M の CQ はリン酸化タウを減少させた。さらにサルコシル不溶性画分における重合したタウの減少効果も認めた。さらに細胞毒性が強いとされるタウオリゴマーの減少効果が 1 μ M の CQ により明らかに認められた。タウリン酸化酵素 c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性低下、およびタウ脱リン酸化酵素 protein phosphatase 2A (PP2A) の活性化も認められた。また CQ の細胞毒性に関しては 1~5 μ M の CQ では形態変化、および生存細胞数の変化はきたさなかった。以上の結果より、さらなる検討が必要ではあるが、低用量の CQ は AD 発症予防、あるいは進展抑制に効果を示す可能性が示唆された。

A. 研究目的

スモン病はキノホルム (CQ) の過剰摂取により発症した視神経、脊髄、末梢神経を障害する疾患である^{1),2)}。CQ は 1970 年に発売中止となり、それ以降新規の患者はみられていない²⁾。しかし近年 CQ がアルツハイマー病 (AD) をはじめとする認知機能障害に対し有効である可能性を示唆する基礎³⁾⁻⁵⁾、臨床研究⁶⁾がみられ、関心を持たれている。しかしクリオキノール非服用者と比較して差がないとする報告もみられ⁷⁾、いまだ定説に至っていない。AD の病理学的所見は A β から構成される老人斑^{3),8)}と高度にリン酸化された

タウ蛋白より形成される神経原線維変化 (NFT)^{5),9)-13)}である。CQ は血液脳関門を通過し¹⁴⁾、亜鉛や銅に対するキレート作用が強いことが知られている。また、A β に対する効果として、APP2576 トランスジェニックマウスで脳内の A β の沈着が 49% 減少することが示された³⁾。これは A β には、Cu, Zn が多く含まれるため、Cu, Zn に選択的なキレート作用を有する CQ が沈着した A β を可溶化するという仮説に基づく³⁾。また、近年 CQ は Cu 依存性に A β オリゴマー形成を著しく抑制することが示された⁴⁾。次に Cu, Zn のタウ蛋白に対する効果としては、Cu²⁺ はタウの過剰リン

酸化をきたしタウの重合を促進する¹⁵⁾。Zn は Raf/MAPkinase の活性化によりタウのリン酸化を亢進させる¹⁶⁾とともに、protein phosphatase 2A (PP2A) を不活性化する¹⁷⁾ことにより結果的にタウのリン酸化を亢進させる。さらに、計 36 例に対するランダム化比較試験では、cognitive score of the Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS-cog) の悪化が、CQ 投与群では有意に緩徐であることが示されている⁶⁾。これらの基礎・臨床研究の結果は CQ が AD の発症を予防する、あるいは軽度認知障害 (MCI) から AD への進展を予防していることを示唆するかもしれない。今回我々は、野生型タウ (4R0N) を発現する神経芽細胞腫細胞を用い、CQ がリン酸化タウを減少させるか、そしてタウリン酸化酵素 (JNK) 活性、およびタウ脱リン酸化酵素 (PP2A) 活性に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

Tet-Off 誘導系を導入し野生型タウ蛋白 (4R0N) を発現する神経系細胞 M1C を用い、5 日間タウ蛋白を発現させた。タウ蛋白発現の最終 24 時間に 0.1 ~ 10 μ M の CQ を添加し、CQ のタウ蛋白リン酸化に及ぼす影響につき PHF-1, CP13, AT270, AT180 といったリン酸化タウに対する抗体を用いて Western blot 法により検討した。同時にタウ蛋白リン酸化酵素 c-Jun N-terminal kinase (JNK)、脱リン酸化酵素 protein phosphatase 2A (PP2A) 活性についても検討した。細胞毒性が強いとされるタウ蛋白オリゴマー形成抑制についてもタウオリゴマーに特異的とされる tau oligomer complex 1 (TOC1) 抗体を用いて検討した。また細胞毒性の有無に関しては、morphological study, ならびに ATP assay により行った^{9,12)}。統計学的解析は、SPSS version 22 を用い、Student t test や one-way analysis of variance (ANOVA) につき検討し、 $P < 0.05$ を有意と判定した。

C. 研究結果

CQ 投与により総タウ蛋白量に変化はみられなかった。しかし 1 ~ 10 μ M の CQ により PHF-1, CP13, AT270, AT180 で検出されるリン酸化タウが有意に減少

した。タウ蛋白リン酸化酵素に関しては JNK の活性低下が示された。同時に脱リン酸化酵素 PP2A の活性化が示された。また 1 μ M の CQ により NFT 形成に重要と考えられるサルコシル不溶性画分でのタウの減少がみられた。さらにトリス不溶性、サルコシル可溶性画分では、TOC1 陽性のタウオリゴマーの減少も示された。Morphological study では 5 μ M までは形態の変化は認めなかった。また ATP assay では、0.1 ~ 10 μ M の CQ では細胞死は生じなかった。

D. 考察

CQ はタウ蛋白リン酸化酵素 JNK の不活性化、およびタウ脱リン酸化酵素 PP2A の活性化を介してタウ蛋白のリン酸化を抑制することが示唆された。またリン酸化タウの減少によりタウオリゴマーも減少する可能性が推察された。

E. 結論

CQ はリン酸化タウの減少、およびタウオリゴマーを減少させる効果を示した。少なくとも 5 μ M 以下であれば著しい細胞毒性はしめさなかった。今後の動物モデル等による検討を含めたさらなる検討が必要ではあるが、低用量の CQ が AD の発症予防や初期 AD の進展抑制に役立つ可能性も考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamano T, Shirafuji N, Makino C, Yen SH, Kanaan NM, Ueno A, Suzuki J, Ikawa M, Matsunaga A, Yamamura O, Kuriyama M, Nakamoto Y. Pioglitazone prevents tau oligomerization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 478: 1035-42.
- 2) 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.* 2016; 76: 87-94

2. 学会発表

- 1) Hamano T, Fujita Y, Nagata M, Ito T, Matsubara

R, Ikebata Y, Ikawa M, Yamamura O, Nakamoto Y (2016). Efficacy of a short questionnaire for screening of early stage of dementia: Trial in Fukui prefecture, Japan. Alzheimer's Association International conference AAIC 2016, Toronto 2016 Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 12(7), P577-P578

2) Fujita Y, Hamano T, Shirafuji N, Nakamoto Y. Hypoperfusion-induced Tau hyperphosphorylation extends to non-hypoperfused area in mouse brain. Alzheimer's Association International conference AAIC 2016, Toronto, 2016

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

I. 文献

1) Tsubaki T, Honma Y, Hoshi M. Neurological syndrome associated with clioquinol. *Lancet*. 1971; 1: 696-7.

2) Konagaya M, Matsumoto A, Takase S, Mizutani T, Sobue G, et al. Clinical analysis of longstanding subacute myelo-optico-neuropathy: sequelae of clioquinol at 32 years after its ban. *J Neurol Sci*. 2004; 218: 85-90.

3) Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, et al., Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 2001; 30: 665-76.

4) Matlack KE, Tardiff DF, Narayan P, Hamamichi S, Caldwell KA, et al., Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid- (A) oligomers to restore endocytosis and ameliorate A toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111: 4013-8.

5) Lin G, Hamano T, Shirafuji N, Ishida A, Hayashi K, et al., Clioquinol decreases phosphorylation levels of tau protein. *Alzheimer's Dementia* 2015; 11, Suppl 501.

6) Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane

S, Mastwyk M, et al., Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol*. 2003; 60: 1685-91.

7) 齊藤由扶子, 橋本修二, 川戸美由紀, 坂井研一, 小長谷正明, スモン患者における認知症の合併について 検診データベースに基づく検討 . 厚生労働省科学研究費補助金 [難治性疾患等克服事業 (難治性疾患克服研究事業)] スモンに関する調査研究平成 24 年度総括・分担研究報告書 . 2013, pp 224-226

8) Hamano T, Yoshimura M, Yamazaki T, Shinkai Y, Yanagisawa K, et al., Amyloid beta-protein (A beta) accumulation in the leptomeninges during aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56: 922-32.

9) Hamano T, Yen SH, Gendron T, Ko LW, Kuriyama M. Pitavastatin decreases tau levels via the inactivation of Rho/ROCK. *Neurobiol Aging*. 2012; 33: 2306-20.

10) Hamano T, Gendron TF, Ko LW, Yen SH. Concentration-dependent effects of proteasomal inhibition on tau processing in a cellular model of tauopathy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009; 2: 561-73.

11) Hamano T, Gendron TF, Causevic E, Yen SH, Lin WL, et al., Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci*. 2008; 27: 1119-30.

12) Hamano T, Shirafuji N, Makino C, Yen SH, Kanaan NM, et al., Pioglitazone prevents tau oligomerization. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 478: 1035-42.

13) 濱野忠則, 白藤法道, 栗山 勝, 中本安成. アルツハイマー病とホモシステイン. *ビタミン* 2014; 88: 92-6.

14) Padmanabhan G, Becue I, Smith JB. Clioquinol. *Analytical profiles of drug substances* 1990; 18: 57-90.

15) Crouch PJ, Hung LW, Adlard PA, Cortes M, Lal

- V, et al., Increasing Cu Bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci US A* 2009; 106: 381-6.
- 16) Kim I, Park EJ, Seo J, Ko SJ, Lee J, et al., Zinc stimulates tau S214 phosphorylation by the activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Neuroreport*. 2011; 22: 839-44.
- 17) Xiong Y, Jing XP, Zhou XW, Wang XL, Yang Y, et al., Zinc induces protein phosphatase 2A inactivation and tau hyperphosphorylation through Src dependent PP2A (tyrosine 307) phosphorylation. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 745-56.