

Clioquinol の培養 astrocyte に及ぼす作用の解明

武藤多津郎 (藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学)

水谷 泰彰 (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)

植田 晃広 (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)

村手健一郎 (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 を高発現する細胞を PC12 細胞より作成 (PCTrk 細胞) し、この PCTrk 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。さらに、3) 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。また昨年度は CQ 投与により神経細胞において autophagy が進行することを報告した。今年度は、近年注目を集めているグリア細胞において CQ がどのような影響を及ぼすのかを培養 astrocyte の系 (KT-5 細胞) を用いて、主に autophagy-lysosome 系への作用を中心に解析した。

その結果、CQ は astrocyte に対して dose and time-dependent に細胞死を誘導した。また CQ は KT-5 細胞に対して autophagy を誘導したが、時間経過において本来 autolysosome の形成に伴い細胞内で著減するはずの p62 が減少しなかったことから、autolysosome 形成過程に障害を与える可能性が示唆された。一方、lysosomal acid hydrolase 活性の結果から、これら水解酵素の細胞内 trafficking が CQ により障害される可能性を示唆しており、autophagy-lysosome 系に CQ が甚大な影響を与える可能性が示唆された。

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。これまで我々は培養神経系細胞を用いた解析を進めてきた。一方で近年神経系を構成するもうひとつの神経系として

グリア細胞が種々の疾患に関与する可能性が non-cell autonomous neuronal death 機序として注目を集めている。今年度は、CQ のグリア細胞に対する作用を調べる目的で培養 astrocyte の系を用いて解析を行った。

B. 研究方法

マウス astrocyte 株 KT-5 細胞を用い、CQ の同細胞に及ぼす影響を細胞生物学的・生化学的に調べた。また autophagy-lysosome 系への影響を解析するため、種々の濃度と時間で CQ を負荷し、その際出現してくる LC3-II 及び p62 蛋白の動態を各々の特異抗体を用いて Western blot 法で調べた。さらに、ライソソーム機能への作用を調べるため、粗細胞ホモジェネート、培養液、exosome 分画及培養液の 10 万 G 上清の各種ライソソーム水解酵素活性を人工基質である 4-methylumbelliferyl derivative を用いて測定した (-galactosidase, -galactosidase, -glucocerebrosidase, -hexosaminidase)。

C. 研究結果

10 μ M の CQ で 12 時間処理した KT5 細胞では、統計的に有意な細胞死の増加が認められた。Western Blot 法での解析では、CQ は LC3-II および p62 などの発現を増加させ autophagy を誘導することが明らかとなった。しかし、経時的に観察すると p62 の発現は増加したままで正常な autophagy の際に観察される急速な発現低下は観察されなかった。つまり autolysosome 形成過程を障害している可能性が示唆された。これまで神経系培養細胞である PCtrk 細胞で観察してきた activated caspase 3 の増加は検出されなかった。

一方、ライソソーム水解酵素の一部では、培養液やその 10 万 g 上清での活性低下を認め、他方細胞ホモジェネートで活性変化を認めた。

D. 考察

CQ は astrocyte に対して dose and time-dependent に細胞死を誘導した。しかし、神経系培養細胞に比し 10 倍濃度が必要であった。CQ は KT-5 細胞に対して autophagy を誘導したが、本来 autolysosome の形成に伴い細胞内で著減するはずの p62 が減少しなかった事から、autolysosome 形成過程に障害を与える可能性が示唆された。一方、lysosomal acid hydrolase 活性のデータからは、これら水解酵素の細胞内 trafficking が CQ により障害される可能性を示唆しており、

何れにしる autophagy-lysosome 系に CQ は甚大な影響を与える可能性が示唆された。

E. 結論

今回の研究により初めて CQ が神経細胞のみならずグリア細胞の機能へも影響を及ぼすことが示された。CQ による astrocyte の細胞死には、autophagy-lysosome 系を介する細胞死の情報伝達系が深く関与している可能性が高いと考えられ、今後その詳細を明らかにしていきたいと考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

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* 377: 174-178, 2017

Ishikawa T, Asakura K, Mizutani Y, Ueda A, Murate KI, Hikichi C, Shima S, Kizawa M, Komori M, Murayama K, Toyama H, Ito S, Mutoh T. MR neurography for the evaluation of CIDP. *Muscle Nerve* 55 (4): 483-489, 2017

Hoshino M, Suzuki Y, Akiyama H, Yamada K, Shima S, Mutoh T, Hasegawa Y. Efficacy of high-dose steroid pulse therapy for anti-galactocerebroside antibody-positive combined (central and peripheral demyelination). *Clin Neurol* 57 (12): 747-752, 2017

Yamagishi Y, Suzuki H, Sonoo M, Kuwabara S, Yokota T, Nomura K, Chiba A, Kaji R, Kanda T, Kaida K, Ikeda SI, Mutoh T, Yamasaki R, Takashima H, Matsui M, Nishiyama K, Sobue G, Kusunoki S. Markers for Guillain-Barre syndrome with poor prognosis: a multi-center study. *J Peripher Nerv Syst* 22 (4): 433-439, 2017

Ueda A, Nagao R, Maeda T, Kikuchi K, Murate K, Niimi Y, Shima S, Mutoh T. Absence of serum anti-NMDAR antibodies in anti-NMDAR encephalitis

mother predicts having healthy newborn. Clin Neurol Neurosurg 161: 14-16, 2017

Kuwabara S, Mori M, Misawa S, Suzuki M, Nishiyama K, Mutoh T, Doi S, Kokubun N, Kamijo M, Yoshikawa H, Abe K, Nishida Y, Okada K, Sekiguchi K, Sakamoto K, Kusunoki S, Sobue G, Kaji R; Glovenin-I CIDP Study Group. Intravenous immunoglobulin for maintenance treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial. J Neurol Neurosurg Psychiatry 88 (10): 832-838, 2017

2. 学会発表

Ito S, Ueda A, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Shima S, Mizutani Y, Niimi Y, Mutoh T. The serial D-dimer measurements predicts the prognoses of Trousseau's syndrome patients. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.18.

Niimi Y, Ito S, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Maeda T, Nagao R, Kikuchi K, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, Mutoh T. Combinatory use of 123I-FP-CIT-SPECT and cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the diagnosis of Parkinsonisms. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.18.

Ueda A, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Niimi Y, Mizutani Y, Shima S, Ito S, Mutoh T. ANTI-GM1 GANGLIOSIDE ANTIBODIES IMPAIR MEMBRANE AND RAFTS GLYCOLIPIDS METABOLISM IN PC12 CELLS. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.18.

Shima S, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Niimi Y, Mizutani Y, Ueda A, Ito S, Mutoh T. CLINICAL DETAILS OF 20 ENCEPHALOMYELORADICULONEUROPATHY CASES. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.20.

石川等真, 植田晃広, 島さゆり, 村手健一郎, 伊藤信二, 武藤多津郎. CIDP 患者末梢神経組織の画像化と定量の試み 平成 28 年度 神経免疫疾患研究班 班会議 2017.1.19 都市センターホテル

武藤多津郎, 村手健一郎, 新美芳樹, 水谷泰彰, 島さゆり, 植田晃広, 伊藤信二. Clioquinol の神経系細胞に及ぼす影響の解明 平成 28 年度 スモンに関する調査・研究班 班会議 2017.2.3 東京フクラシアステーション

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 2017.3.11 名古屋国際会議場

菊池洸一, 村手健一郎, 植田晃広, 長尾龍之介, 前田利樹, 廣田政古, 石川等真, 新美芳樹, 水谷泰彰, 島さゆり, 伊藤信二, 武藤多津郎. 変動する意識障害が診断の契機となった門脈 - 大循環シャントの 1 例 第 232 回日本内科学会東海地方会 2017.6.11 名古屋国際会議場

長尾龍之介, 前田利樹, 伊藤信二, 菊池洸一, 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, 新美芳樹, 植田晃広, 武藤多津郎. 下肢筋痛が主症状となったビタミン B1 欠乏症の 1 例 第 148 回日本神経学会東海北陸地方会 2017.7.15 名古屋国際会議場

村手健一郎, 植田晃広, 菊池洸一, 長尾龍之介, 前田利樹, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 新美芳樹, 島さゆり, 水谷泰彰, 伊藤信二, 武藤多津郎. 正常児を得た妊娠合併 NMDAR 脳炎患者治療法と免疫学的特徴の解明 第 29 回日本神経免疫学会学術集会 2017.10.6 札幌市教育文化会館

村手健一郎, 植田晃広, 菊池洸一, 長尾龍之介, 前田利樹, 新美芳樹, 島さゆり, 吉川哲史, 藤井多久磨, 武藤多津郎. 正常児を得た妊娠合併 NMDAR 脳炎患者治療法と免疫学的特徴の解明 第 49 回藤田学園医学会 2017.10.12 藤田学園

新美芳樹, 菊池洸一, 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, 水谷泰彰,

島さゆり，植田晃広，伊藤信二，武藤多津郎．パーキンソン病は全身病である：血清リソソーム酵素活性からの検討 第49回藤田学園医学会 2017.10.12 藤田学園

新美芳樹，菊池洸一，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，島さゆり，植田晃広，伊藤信二，吉川哲史，武藤多津郎．薬剤性過敏症候群（DIHS）の経過中HHV6脳炎を発症した成人男性例 第22回日本神経感染症学会総会・学術集会 2017.10.13 北九州国際会議場

石川等真，水谷泰彰，菊池洸一，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，伊藤信二，武藤多津郎．抗TNF抗体製剤導入後に複視が出現し，脱髄性病変を認めた一例 第149回日本神経学会東海北陸地方会 2017.11.3 福井市商工会議所

前田利樹，新美芳樹，菊池洸一，長尾龍之介，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，伊藤信二，武藤多津郎．食道癌治療中に出現した抗gephyrin抗体陽性stiff-person症候群と考えられた1例 第35回神経治療学会総会 2017.11.21 パレスホテル大宮

武藤多津郎，島さゆり，新美芳樹，水谷泰彰，村手健一郎，植田晃広，伊藤信二．多数例から見た脳脊髄根末梢神経炎（EMRN）の病像と抗糖脂質抗体 平成29年度神経免疫疾患研究班 班会議 2018.1.19 都市センターホテル

武藤多津郎，水谷泰彰，新美芳樹，植田晃広，島さゆり，村手健一郎．Clioquinolの培養astrocyteに及ぼす作用の解明 平成29年度スモンに関する調査研究班 研究報告会 2018.2.2 東京フクラシアステーション

G．知的財産権の出願・登録状況
なし

H．文献

1) Asakura K et al. Clioquinol 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 clioquinol in PC12 cells. Toxicology 331: 112-8, 2015