

Clioquinol の培養 astrocyte に及ぼす作用の解明

武藤多津郎 (藤田医科大学医学部脳神経内科学)

水谷 泰彰 (藤田医科大学医学部脳神経内科学)

植田 晃広 (藤田医科大学医学部脳神経内科学)

島 さゆり (藤田医科大学医学部脳神経内科学)

村手健一郎 (藤田医科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 inter-nucleosomal 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 trichostatin 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。また一昨年度は 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。さらに昨年度は、グリア細胞に対する作用について培養 astrocyte の系を用いて解析し、CQ による細胞毒性発現機構に autophagy-lysosomal system の機能異常が関与している可能性を報告したが、今年度はさらに reactive oxygen species (ROS) 産生やミトコンドリア機能に及ぼす影響を調べた。

その結果、CQ は用量依存的・時間依存的に細胞死および autophagy のシグナルである LC3-II, p62 の発現増加を誘導したが、p62 蛋白のその後の減少は観察されず autolysosome 形成不全を惹起したと考えられた。CQ を負荷した細胞のホモジネートでは測定したすべての lysosome 水解酵素活性の低下が認められたが lysosome の pH には影響を及ぼさなかった。さらに CQ を負荷した細胞では ROS の産生が増加しており、ミトコンドリア膜電位差の低下も認められた。以上から、CQ による細胞毒性発現機構における autophagy-lysosomal system の機能異常には CQ による lysosome 酵素活性の低下などその機能低下と引き続きミトコンドリア機能障害を招来させて、結果 ROS の産生上昇が引き起こされることが示唆された。

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。今年度も昨年度に引き続き、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進めた。

B. 研究方法

昨年度の報告後、CQ の負荷条件に関して培養液中のウシ胎児血清を 1% にすることで autophagy 系の変化が起こることが判明したため今年度の検討は培養液中のウシ胎児血清は 10% とした。その条件下でマウス astrocyte 株 KT-5 細胞を用い、CQ による細胞死の誘導の有無や Western blot 法による autophagy シグナル (LC3-II, p62 など) を中心とした細胞死に関する分子メカニズムを調べた。同時に CQ を負荷した細胞の lysosome 機能への作用を調べるため、CQ で処理した細胞のホモジネートを作成し lysosome 酵素活性を測定した (Cathepsin B; -galactosidase, -Gal; -galactosidase, -Gal; -glucocerebrosidase, -Glu; -hexosaminidase, -Hex)。さらに CQ による lysosome の pH の変化の有無、ROS 産生やミトコンドリア膜電位の変化についても調べた。

C. 研究結果

CQ は用量依存的・時間依存的に細胞死および autophagy のシグナルである LC3-II, p62 の発現増加を誘導したが、p62 蛋白のその後の減少は観察されなかった。ま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 の増加は検出されず、Annexin V assay でも apoptotic cell death の増加は明らかでなかった。CQ を負荷した細胞のホモジネートでは測定したすべての lysosome 水解酵素活性の低下が認められた。さらに CQ を負荷した細胞では ROS の産生が増加しており、ミトコンドリア膜電位差の低下も認められた。

D. 考察

CQ は用量依存的・時間依存的に細胞死および autophagy のシグナルである LC3-II, p62 の発現増加を誘導したが、p62 蛋白のその後の減少は観察されず autolysosome 形成不全を惹起したと考えられた。さらに CQ によるグリア細胞の細胞死ではこれまで神経系培養細胞である PCtrk 細胞で観察されてきた apoptotic cell death の機序は明らかでなく、autophagy に関連した細胞死の機序が想定された。CQ を負荷した細胞のホモジネートでは測定したすべての lysosome 水解酵素活性の低下が認められ、さらに CQ を負荷した細胞では ROS の産生が増加しており、ミトコンドリア膜電位差の低下も認められた。以上から、CQ による細胞毒性発現機構における autophagy-lysosomal system の機能異常には CQ による lysosome 酵素活性の低下などその機能低下と引き続きミトコンドリア機能障害を招来させて、結果 ROS の産生上昇が引き起こされることが示唆された。

E. 結論

CQ による細胞毒性発現機構における autophagy-lysosomal system の機能異常には CQ による lysosome 酵素活性の低下が autolysosome の形成不全をもたらすことが深く関与しており、結果 ROS の産生上昇などが起こることが示唆された。今後はこれらの細胞毒性発現への治療的アプローチを進めたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Murate K, Mizutani Y, Maeda T, Nagao R, Kikuchi K, Shima S, Niimi Y, Ueda A, Ito S, Mutoh T. A Patient With Thiamine Deficiency Exhibiting Muscle Edema Suggested by MRI. *Front Neurol.* 9: 1083, 2018

Ito S, Kikuchi K, Ueda A, Nagao R, Maeda T, Murate K, Shima S, Mizutani Y, Niimi Y, Mutoh T. Changes in Serial D-Dimer Levels Predict the Prognoses of Trousseau's Syndrome Patients. *Front Neurol.* 9: 528, 2018

Ueda A, Shima S, Murate K, Kikuchi K, Nagao R,

- Maeda T, Muto E, Niimi Y, Mizutani Y, Mutoh T. Anti-GM1 ganglioside antibodies modulate membrane-associated sphingomyelin metabolism by altering neutral sphingomyelinase activity. *Mol Cell Neurosci*. 89: 42-48, 2018
- Niimi Y, Ito S, Mizutani Y, Mutare K, Shima S, Ueda A, Satake W, Hattori N, Toda T, Mutoh T. Altered regulation of serum lysosomal acid hydrolase activities in Parkinson's disease: A potential peripheral biomarker? *Parkinsonism Relat. Disord*. 2018 (Epub ahead of print)
- Saito K, Toru S, Shima S, Mutoh T. Anti-neutral glycolipids antibody-positive combined central and peripheral demyelination mimicking encephalomyeloradiculoneuropathy phenotype. *Clin Neurol Neurosurg*. 2018 172: 90-92
- Nanaura H, Kataoka H, Shima S, Iwasa N, Eura N, Sugie K, Mutoh T, Ueno S. A Patient With Encephalomyeloradiculoneuropathy Exhibiting a Relapsing-Remitting Clinical Course Correlation of Serum and Cerebrospinal Fluid Anti-Neutral Glycosphingolipids Antibodies With Clinical Relapse. *Front Neurol*. 2018 89: 42-48.
- 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 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-Barré 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

- 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 国内
- 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 国内
- 菊池洸一, 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, 島さゆり, 水谷泰彰, 新美芳樹, 伊藤信二, 武藤多津郎. 無事拳児を得た CADASIL の 1 例 第 150 回日本神経学会東海北陸地方会 2018.3 国内
- Niimi Y, Mizutani Y, Ito S, Shima S, Ueda A, Mutoh T. Altered Serum Lysosomal Hydrolase Activities in

- Parkinson's Disease. *American Academy of Neurology annual meeting*, Los Angeles 2018.4 海外
- Mizutani Y, Maeda T, Niimi Y, Nagao R, Shima S, Ueda A, Mutoh T. Effects of clioquinol on autophagy-lysosome system in cultured astrocytes. 第59回日本神経学会学術集会 2018.5 国内
- Niimi Y, Maeda T, Kikuchi K, Nagao R, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Mizutani Y, Ueda A, Ito S, Satake W, Hattori N, Toda T, Mutoh T. Altered regulation of serum lysosomal hydrolase activity in Parkinson's disease. 第59回日本神経学会学術集会 2018.5 国内
- 長尾龍之介, 石川等真, 新美芳樹, 菊池洗一, 前田利樹, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 水谷泰彰, 島さゆり, 植田晃広, 伊藤信二, 村山和宏, 外山宏, 武藤多津郎. ALS患者におけるMRIを用いた末梢神経系の可視化・定量の試み. 第59回日本神経学会学術集会 2018.5 国内
- 前田利樹, 伊藤信二, 坂野文彦, 加藤邦尚, 東篤宏, 菊池洗一, 長尾龍之介, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 新美芳樹, 水谷泰彰, 島さゆり, 植田晃広, 武藤多津郎. 髄液中の抗中性糖脂質抗体が経過中に陽性になったEMRN(脳脊髄根末梢神経炎)の1例. 第151回日本神経学会東海北陸地方会 2018.6 国内
- 松本雄志, 岩永育貴, 池添浩二, 島さゆり, 武藤多津郎. 髄液糖の低下が持続し, 再発を繰り返したEncephalomyeloradiculoneuropathy (EMRN)の1例. 第104回日本神経学会中国・四国地方会 2018.6 国内
- 廣田政古, 伊藤信二, 植田晃広, 坂野文彦, 加藤邦尚, 東篤宏, 菊池洗一, 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, 水谷泰彰, 新美芳樹, 中根俊成, 安東由喜雄, 武藤多津郎. 肺小細胞癌への化学療法が自律神経症状に有効であった, 抗ganglionicアセチルコリン受容体抗体陽性の自己免疫性自律神経節障害の1例. 第30回日本神経免疫学会学術集会 2018.9 国内
- 桐山敬生, 小原啓弥, 七浦仁紀, 西森裕佳子, 江浦信之, 岩佐直毅, 形岡博史, 島さゆり, 武藤多津郎, 杉江和馬. 意識障害, 四肢筋力低下, 自律神経障害を呈し, 抗SS-B抗体, 血清・髄液中の抗LacCer抗体陽性であった脳脊髄根末梢神経炎の症例. 第30回日本神経免疫学会学術集会 2018.9 国内
- 前田利樹, 坂野文彦, 加藤邦尚, 東篤宏, 菊池洗一, 長尾龍之介, 村手健一郎, 廣田政古, 石川等真, 新美芳樹, 水谷泰彰, 島さゆり, 植田晃広, 伊藤信二, 武藤多津郎. 左真菌性中耳炎・錐体骨炎から両側の肥厚性硬膜炎と脳神経麻痺を来した1例感染症 第23回日本神経感染症学会総会・学術大会 2018.10 国内
- 菊池洗一, 坂野文彦, 加藤邦尚, 東篤宏, 前田利樹, 長尾龍之介, 村手健一郎, 廣田政古, 石川等真, 新美芳樹, 水谷泰彰, 島さゆり, 植田晃広, 伊藤信二, 武藤多津郎. 大腸菌性髄膜脳炎に下垂体膿瘍を合併し, 汎下垂体機能低下症を呈した成人例. 第23回日本神経感染症学会総会・学術大会 2018.10 国内
- 七浦仁紀, 形岡博史, 島さゆり, 小原啓弥, 福島功士, 岩佐直毅, 江浦信之, 武藤多津郎, 杉江和馬. 髄液中の抗中性糖脂質抗体を追跡し得たEncephalomyeloradiculoneuropathy (EMRN)の2例. 第23回日本神経感染症学会総会・学術大会 2018.10 国内
- 植田晃広, 村手健一郎, 島さゆり, 武藤多津郎. 抗GM1抗体は細胞膜上の中性スフィンゴミエリナーゼ活性を低下させ, スフィンゴミエリン代謝を制御する. 第16回神経科学研究会 2018.10 国内
- 東篤宏, 水谷泰彰, 坂野文彦, 加藤邦尚, 菊池洗一, 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, 新美芳樹, 植田晃広, 伊藤信二, 海田賢一, 武藤多津郎. 血清抗体価がステロイド療法により経時的に減少した抗NF155抗体陽性CIDPの1例. 第152回日本神経学会東海北陸地方会 2018.11 国内
- 島さゆり, 水谷泰彰, 植田晃広, 村手健一郎, 前田利樹, 長尾龍之介, 菊池洗一, 加藤邦尚, 坂野文彦, 東篤宏, 廣田政古, 石川等真, 引地智加, 新美芳樹, 伊藤信二, 武藤多津郎. 経過中抗中性糖脂質抗体の抗体価が変動した脳脊髄根末梢神経炎. 第36回日本

本神経治療学会学術集会 2018.11 国内

西森裕佳子, 岩佐直毅, 江浦信之, 桐山敬生, 島さゆり, 武藤多津郎, 杉江和馬. 呼吸苦を契機に入院し, 免疫治療が奏功した抗中性糖脂質抗体陽性脳脊髄根末梢神経炎 (EMRN) の一例. 第 222 回日本内科学会近畿地方会 2018.12 国内

武藤多津郎, 植田晃広, 水谷泰彰, 島さゆり抗 GM1 抗体が及ぼす神経系培養細胞の細胞膜への影響の解明. 平成 30 年度 神経免疫疾患のエビデンスによる診断基準・重要度分類・ガイドラインの妥当性と患者 QOL の検証班 研究報告会 2019.1 国内

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 30 年度 スモンに関する調査研究班. 研究報告会 2019.2 国内

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