

## クリオキノールはタウ蛋白リン酸化、およびオリゴマー化を抑制する

濱野 忠則 (福井大学医学部脳神経内科)

竺 飛燕 (福井大学医学部脳神経内科、浙江省立同徳医院神経内科)

林 高平 (福井大学医学部脳神経内科、浙江省人民医院神経内科)

勝木 歩 (福井大学医学部脳神経内科)

佐々木宏仁 (福井大学医学部脳神経内科)

榎本 崇一 (福井大学医学部脳神経内科)

白藤 法道 (福井大学医学部脳神経内科)

上野亜佐子 (福井大学医学部脳神経内科)

井川 正道 (福井大学医学部脳神経内科)

山村 修 (福井大学医学部脳神経内科)

Nicolas M Kanaan (Michigan State University, Department of Translational Science and Molecular Medicine)

Yen Shu-Hui (Mayo Clinic Jacksonville, Department of Neuroscience)

### 研究要旨

近年クリオキノール (CQ)、およびその誘導体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。基礎研究ではアミロイド 蛋白 (A $\beta$ ) に対する効果は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。1~5  $\mu$ M の CQ は形態変化、および生存細胞数の変化はきたさなかった。さらに 1 から 10  $\mu$ M の CQ はリン酸化タウの減少をきたした。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  $\mu$ 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)、および p38MAP kinase (p38MAPK) 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。さらにプロテアソーム、およびオートファジーの活性化を示唆する所見もみられた。以上より、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<sup>1,2)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3-5)</sup>、臨床研究<sup>6)</sup>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<sup>7)</sup>、いまだ定説に至っていない。AD の病理学的所見は A $\beta$  から構成される老人斑<sup>3,8)</sup>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)<sup>5,9-13)</sup>

である。CQ は血液脳関門を通過し<sup>14)</sup>、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 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 の沈着が 49% 減少することが示された<sup>3)</sup>。これは A 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 を可溶化する、という仮説に基づく<sup>3)</sup>。また、近年 CQ は Cu 依存性に A オリゴマー形成を著しく抑制することが示された<sup>4)</sup>。次に Cu, Zn のタウ蛋白に対する効果としては、Cu<sup>2+</sup> はタウの過剰リン酸化をきたしタウの重合を促進する<sup>5)</sup>。Zn は Raf/MAPkinase の活性化によりタウのリン酸化を亢進させる<sup>16)</sup>とともに、protein phosphatase2A (PP2A) を不活性化する<sup>17)</sup>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、臨床研究では、36 例に対する検討では、Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive component (ADAS) 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<sup>6)</sup>。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、CQ が我々の野生型タウ (4R0N) を発現するヒト神経芽細胞種細胞を用い、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・p38MAPK) 活性、およびタウ脱リン酸化酵素 (PP2A) 活性について検討した。さらにタウオリゴマー量についても検討を加えた。

## 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  $\mu$ 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 JNK・p38MAPK 活性、脱リン酸化酵素 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<sup>9,12,13)</sup>。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

Morphological study では 5  $\mu$ 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  $\mu$ M の CQ では細胞死は生じなかった。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  $\mu$ 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  $\mu$ 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、サルコシル可能性画分では、TOC1 陽性のタウオリゴマーの減少も示された。またタウ分解に重要とされるオートファジー、およびプロテアソームの活性化を示唆する所見も認められた。

## D. 考察

CQ はタウ蛋白リン酸化酵素 JNK, p38MAPK 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。また少なくとも 5  $\mu$ M 以下であれば著しい細胞毒性は示さなかった。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が考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hamano T, Shirafuji N, Yen SH, Yoshida H,

- Kanaan NM, Hayashi K, Ikawa M, Yamamura O, Fujita Y, Kuriyama M, Nakamoto Y. Rho-kinase ROCK inhibitors reduce oligomeric tau protein. *Neurobiol Aging*. 2020 in press
- 2) Hamano T, Hayashi K, Shirafuji N, Nakamoto Y. The Implications of Autophagy in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2018; 15 (14): 1283-1296.
- 3) Shirafuji N, Hamano T, Yen SH, Kanaan NM, Yoshida H, Hayashi K, Ikawa M, Yamamura O, Kuriyama M, Nakamoto Y. Homocysteine Increases Tau Phosphorylation, Truncation and Oligomerization. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 17; 19 (3).
- 4) Kitazaki Y, Ikawa M, Yamaguchi T, Enomoto S, Kishitani T, Shirafuji N, Hayashi K, Yamamura O, Nakamoto Y, Hamano T. Autoimmune Encephalitis Associated with Anti-gamma-aminobutyric Acid B Receptor Antibodies Mimicking Syncope: A Case Report. *Intern Med*. 2019 Dec 6. doi: 10.2169/internalmedicine.
- 5) Hamano T, Mutoh T, Naiki H, Shirafuji N, Ikawa M, Yamamura O, Dickson DW, Aiki S, Kuriyama M, Nakamoto Y. Subventricular glial nodules in neurofibromatosis 1 with craniofacial dysmorphism and occipital meningoencephalocele. *eNeurological-Sci*. 2019 Nov 18; 17: 100213.
- 6) Matsunaga A, Ikawa M, Kawamura Y, Kishitani T, Yamamura O, Hamano T, Kimura H, Nakamoto Y, Yoneda M. Serial brain MRI changes related to autoimmune pathophysiology in Hashimoto encephalopathy with anti-NAE antibodies: A case-series study. *J Neurol Sci*. 2019 Nov 15; 406: 116453.
- 7) Enomoto S, Shigemi H, Kitazaki Y, Ikawa M, Yamamura O, Hamano T, Tai K, Iwasaki H, Koizumi H, Hasegawa M, Takeda K, Nakamoto Y. *Cladophialophora bantiana* infection mimicking neuromyelitis optica. *J Neurol Sci*. 2019 Apr 15; 399: 169-171.
- 8) Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, Arishima H, Kikuta KI, Yamashita T, Inoue Y, Ueda M, Ando Y, Wilson MR, Hamano T, Nakamoto Y, Naiki H. Apolipoprotein E and clusterin inhibit the early phase of amyloid- aggregation in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Jan 28; 7 (1): 12.
- 9) Kajinami K, Tsukamoto K, Koba S, Inoue I, Yamakawa M, Suzuki S, Hamano T, Saito H, Saito Y, Masuda S, Nakayama T, Okamura T, Yamashita S, Kagawa T, Kaneyama J, Kuriyama A, Tanaka R, Hirata A; Statin Intolerance Clinical Guide Working Group; The Japan Society of Hepatology, Japanese Society of Neurology, Japan Atherosclerosis Society, The Japanese Society for the Study of Xenobiotics. *Statin Intolerance Clinical Guide 2018*. *J Atheroscler Thromb*. 2019 Oct 4. doi: 10.5551/jat.50948.
2. 学会発表
- 1) Enomoto, S., Hamano T., Jiang, P., Shirafuji, N., Sasaki, H., Yamaguchi, T., Nakamoto, Y. (2019). ALPHA-SYNUCLEIN PHOSPHORYLATION BY HOMOCYSTEINE. Alzheimer's Association International conference AAIC 2019, Los Angeles, USA *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 15 (7), P294.
- 2) Ueno, A., Hamano T., Enomoto, S., Shirafuji, N., Nagata, M., Yamaguchi, T., ... Kuriyama, M. (2019). VITAMIN B12 SUPPLEMENTATION IMPROVES HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND COGNITIVE IMPAIRMENT IN PATIENTS WITH VITAMIN B12 DEFICIENCY. Alzheimer's Association International conference AAIC 2019, Los Angeles, USA *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 15 (7), P586.
- H. 知的財産権の出願・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, 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.
- 13) Shirafuji N, Hamano T, Yen SH, Kanaan NM, Yoshida H, Hayashi K, Ikawa M, Yamamura O, Kuriyama M, Nakamoto Y. Homocysteine Increases Tau Phosphorylation, Truncation and Oligomerization. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 17; 19 (3).
- 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, Filiz G, Perez KA, Nurjono M, Caragounis A, Du T, Laughton K, Volitakis I, Bush AI, Li QX, Masters CL, Cappai R, Cherny RA, Donnelly PS, White AR, Barnham KJ. Increasing Cu Bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci US A* 2009; 106: 381-386.
- 16) Kim I, Park EJ, Seo J, Ko SJ, Lee J, Kim CH. 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, Sun XY, Qiu M, Cao FY, Lu YM, Liu R, Wang JZ. Zinc induces protein phosphatase 2A inactivation and tau hyperphosphorylation through Src dependent PP2A (tyrosine 307) phosphorylation. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 745-756.