

Clioquinol の培養 astrocyte に及ぼす作用の解明⑤

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）

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 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 に対するチロシン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。また平成 28 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。さらに平成 29 年度・平成 30 年度・令和元年度は、CQ の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おける Autophagy-lysosomal system の機能異常には CQ による lysosome 酵素活性低下と autophagosome の細胞内蓄積を認め、autophagic degradation の障害を惹起する事が深く関与しており、結果 reactive oxygen species (ROS) の産生上昇などが生じることを報告した。今年度は ROS 産生の阻害剤の併用によって CQ による細胞毒性作用がどのように変化するか、さらにその際に細胞内 ROS 産生にいかなる影響がもたらされるかを詳細に調べた。

その結果、ROS 産生阻害である NAC により、細胞死も ROS 産生も有意に抑制され CQ による細胞毒性が軽減された。

A. 研究目的

Clioquinol (キノホルム、CQ) は SMON の原因物質と考えられているが、詳細な神経障害機序は現在も不明な点が多い。我々は、これまで CQ の神経系への影響について主に神経細胞を中心に検討を進めてきたが、グリア系細胞への作用については不明であった。これまでの班会議での報告で 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 水解酵素活性低下と autolysosome の形成不全を惹起する事が深く関与し

ており、結果 reactive oxygen species (ROS) レベルの上昇などが起こることを報告した。今年度は autophagy の阻害剤である chloroquine および促進剤である rapamycin を併用した場合、CQ による細胞毒性作用がどのように変化するか、さらにその際に CQ による autophagy のシグナル・細胞内 ATP レベル・ROS レベルに如何なる影響がもたらされるかを調べた。

B. 研究方法

マウス astrocyte 株 KT-5 細胞を用いて CQ が細胞毒性作用を発揮するかどうかを確認するために、さまざまな濃度の CQ を培地に加え MTT アッセイにより、細胞毒性を調べた。さらに Autophagy-lysosome 経路の障害がその細胞毒性に関与しているかどうかを確認した。また ROS 産生の阻害剤である N-acetylcysteine (NAC) を併用して細胞死、細胞内 ROS レベルに及ぼす影響を調べた。

C. 研究結果

CQ 20uM 単独処理で誘発される細胞死を NAC との共処理で細胞死は有意に抑制された。更に、この際 CQ により産生される細胞内 ROS は、NAC との共処理で CQ 単独に比し有意にその産生が抑制された。又、chloroquine の併存で、CQ による細胞死は亢進し、rapamycin では細胞死は抑制された。

D. 考察

CQ は、MTT assay においても用量依存的・時間依存的に細胞死を誘導し、autophagic degradation の障害を惹起したと考えられた。Annexin V assay や TUNEL assay でも apoptosis の機序は明らかでなかった CQ による細胞毒性発現機構には、Autophagy-lysosomal system の機能異常により細胞内 autophagosome 蓄積を来し、Autophagy 異常に関連した細胞死が深く関与している可能性を示唆している。さらに、この細胞障害機構に ROS 産生が強く関連していると推論された。

E. 結論

CQ による Autophagy-lysosomal system の機能異常を介した細胞毒性の発現機構について、ROS 産生の阻害剤を併用することで細胞毒性が軽減し、ROS 産生レベルも低減した。以上のデータは、CQ による細胞死惹起機構に於ける ROS 産生が重要な役割を果たしている事を示唆するものであり、今後の治療標的に ROS 産生抑制がなり得る可能性を示唆しているものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nanaura H, Kataoka H, Shima S, Iwasa N, Eura N, Sugie K, Mutoh T, Ueno S: A patient with encephalomyeloradiculoneuropathy exhibiting relapsing-remitting clinical course: correlation of serum and cerebrospinal fluid anti-neutral glycosphingolipids antibodies with clinical relapse. *Front Neurol* 9: 206, 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* 82: 42-48, 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: doi: 10.3389/fneur.2018.00528, 2018

Saito K, Toru S, Shima S, Mutoh T: Anti-neutral glycolipids antibody-positive combined central and peripheral demyelination mimicking encephalomyeloradiculoneuropathy phenotype. *Clin Neurol Neurosurg* 172: 90-92, 2018

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* <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01083>, 2018

Niimi Y, Ito S, Mizutani Y, Murate 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* 61: 132-137, 2019, S1353-8020 (18) 30468-1 doi:10.1016 2019

Harada M, Miura S, Kida H, Moritaka T, Irie K-i, Kamada T, Uchiyama Y, Shima S, Mutoh T, Hoshino T and Taniwaki T. Reversible Conduction Failure in Anti-lactosylceramide-antibody positive

- Combined Central and Peripheral Demyelination. *Front Neurol* 2019 doi: 10.3389/fneur.2019.00600
- Niimi Y, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, Ito S, Mutoh T. Fatigue evaluated using the 16-item Parkinson Fatigue Scale (PFS-16) predicts Parkinson's disease prognosis. *Fujita Medical Journal* 2019; 5: 45-48
- Hamano T, Mutoh T, Naiki H, Hayashi K, Shirafuji N, Ikawa M, Yamamura O, Dickson DW, Aiki K, Kuriyama M, Nakamoto Y. Subventricular glial nodules in neurofibromatosis 1 with craniofacial dysmorphism and occipital meningoencephalocele. *eNeurological Sci*
<https://doi.org/10.1016/j.ensci.2019.100213>
- Mizutani Y, Niimi Y, Mutoh T. Better neuroradiological approach for the diagnosis of early stage Parkinson's disease patients. *The Neuroscience of Parkinson's disease 2020 Chapter 18*: 297-312
- Oji Y, Hatano T, Ueno S, Funayama M, Ishikawa K, Okuzumi A, Noda S, Sato S, Satake W, Toda T, Li Y, Hino-Takai T, Kakuta S, Tsunemi T, Yoshino H, Nishioka K, Hattori T, Mizutani Y, Mutoh T, Yokochi F, Ichinose Y, Koh K, Shindo K, Takiyama Y, Hamaguchi T, Yamada M, Farrer MJ, Uchiyama Y, Akamatsu W, Wu YR, Matsuda J, and Hattori N. Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease. *Brain* 2020; 143 (4): 1190-1205.
- Niimi Y and Mutoh T. Piroheptine for treating Parkinson. P. Riederer, G. Laux et al. (eds.) , *Neuro-Psychopharmacotherapy*, https://doi.org/10.1007/978-3-319-56015-1_224-1 2020
- Niimi Y, Mizutani Y, Akiyama H, Watanabe H, Shiroki R, Hirabayashi Y, Hoshinaga K, Mutoh T. Cerebrospinal Fluid Profiles in Parkinson's Disease: No Accumulation of Glucosylceramide, but Significant Downregulation of Active Complement C5 Fragment. *J Parkinsons Dis* 2020 Nov 11. doi: 10.3233/JPD-202310. Epub ahead of print. PMID: 33216044.
- Mizutani Y, Maeda T, Murate K, Ito S, Watanabe H, Mutoh T. Clioquinol kills astrocyte-derived KT-5 cells by the impairment of the autophagy-lysosome pathway. *Arch Toxicol* 2020 Nov 6. doi: 10.1007/s00204-020-02943-8.
- Akiyama H, Ide M, Yamaji T, Mizutani Y, Niimi Y, Mutoh T, Kamiguchi H, Hirabayashi Y. Galabiosylceramide is present in human cerebral fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 2021; 536: 73-79.
- Mutoh T. Neutral Glycosphingolipids As Neuroinflammatory Signaling Molecules In Neurodegeneration. *Trends In Glycosci Glycotechnol* 2021; 33: E5-E10.
- Iriyama C, Murate K, Iba S, Okamoto A, Yamamoto H, Kanbara A, Sato A, Iwata E, Yamada R, Okamoto M, Watanabe H, Mutoh T, Tomita A. Detection of circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid prior to diagnosis of spinal cord lymphoma by flow cytometric and cytologic analyses. *Ann Hematol* 2021 Oct 2. doi: 10.1007/s00277-021-04686-7.
- Mutoh T, Niimi Y, Sakai S, Watanabe H, Ueda A, Shima S, Igarashi Y. Species-specific accumulation of ceramides in cerebrospinal fluid from encephalomyeloradiculoneuropathy patients associated with peripheral complement activation: A pilot study. *BBA Mol Cell Biol Lipids* 2022; 1862: 159092. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159092>
- Ishimaru S, Kawamura Y, Miura H, Shima S, Ueda A, Watanabe H, Mutoh T, Yoshikawa T. Detection of human herpesviruses in cerebrospinal fluids collected from patients suspected of neuroinfectious diseases. *J NeuroVirol* 2022 DOI: 10.1007/s13365-021-01040-5.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し
- I. 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

3) Mizutani Y, et al. Clioquinol kills astrocyte-derived KT-5 cells by the impairment of the autophagy-lysosome pathway. Arch Toxicol. 2020 Nov 6. doi: 10.1007/s00204-020-02943-8.