

Clioquinol の培養 astrocyte に及ぼす作用の解明

武藤多津郎（藤田医科大学病院脳神経内科、藤田医科大学中部国際空港診療所）

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 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 年度から令和 4 年度までは、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 水解酵素活性低下と 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³⁾。今年度はこの ROS 産生の細胞内主要な産生場所を特定する為、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤の影響を調べ本薬剤のミトコンドリア機能の及ぼす影響を調べた

その結果、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤である Mito-TEMPO で細胞を前処理すると CQ による ROS 産生が著明に抑制され、CQ による細胞内情報伝達系への影響も著明に抑制された。

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。今年度は mitochondria targeted antioxidant である Mito-TEMPO を種々の濃度で 1 時間前処理した際の CQ の影響を細胞生物学的および生化学的に調べた。細胞 ROS 産生に関しては、DCF-DA を用い測定した。

B. 研究方法

マウス astrocyte 株 KT-5 細胞を用いて CQ による同細胞系に及ぼす影響を形態学的、生化学的に調べた。細胞内 MAPK リン酸化、NQO1 発現、LC3 - II 発現等を western blot 法で確認すると共に、細胞内 ROS 産生を DCF-DA を用いて測定した。

C. 研究結果

CQ 20 μ M 単独処理で誘発される細胞内 MAPK リン酸化、NQO1 発現、LC3 - II 発現の変化が、Mito-

TEMPO 100 μM の 1 時間前処理で著明にキャンセルされた。更に、CQ による細胞内 ROS 産生もほとんど 100% 抑制されると同時に細胞形態変化もキャンセルされた。

D. 考察

Mito-TEMPO は、CQ による cytotoxicity をその前処理により著明に抑制する事が判明した。更に、同薬剤は CQ により細胞内に発生する ROS 産生をほぼ 100% 抑制した。これらの事実は、CQ により発生する ROS の大部分がミトコンドリア由来である可能性を示唆する。更に、CQ により細胞内に惹起される種々のシグナル伝達分子のリン酸化や発現状態の変化がこの Mito-TEMPO の処理によりキャンセルされることから、こうした細胞内シグナル伝達分子の変化はミトコンドリア障害に由来している可能性も示唆するものと考えられた。

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、ミトコンドリア由来の ROS 産生が細胞内 ROS 産生の主要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後の治療標的にミトコンドリア由来の 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

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 encephalomyeloneuropathy patients associated with peripheral complement activation: A pilot study. *BBA Mol Cell Biol Lipids* 2022; 1862:159092.

<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.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

Sasaki A, Hayakawa I, Mutoh T, Abe Y. The first pediatric anti-lactosylceramide antibody-positive encephalomyeloradiculoneuropathy. *Heliyon* 2022 8, e10198.

Mutoh T, Niimi Y, Ito S, Akiyama H, Shiroki R, Hirabayashi Y, Hoshinaga K. A pilot study assessing sphingolipids and glycolipids dysmetabolism in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Biochem Biophys Res Commun* 2023 639, 84-89.

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.* 95: 631-640, 2021 doi: 10.1007/s00204-020-02943-8.