

## 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)

渡辺 宏久 (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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>。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を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 autophagic degradation の障害を惹起する事が深く関与しており、結果ミトコンドリア機能障害、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 autophagy の阻害剤や促進剤の併用によって 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 ATP レベルや ROS シグナル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、Autophagy 反応の阻害剤・促進剤の併用により、前者は細胞死を促進し、後者は細胞死を抑制すること、その際に ATP レベルおよび ROS のレベルについても一致する変化が起こっていること、さらに autophagy は KT5 細胞に対して本来細胞保護的作用を有している事が示唆された。

### 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 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のか、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 が細胞毒性作用を發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 autophagy 阻害剤である chloroquine や促進剤である rapamycin を併用して細胞死、autophagy のシグナル及び細胞内 ATP レベル・ROS レベルに及ぼす影響を調べた。

## C. 研究結果

Chloroquine 単独処理では細胞死を誘導しなかったが、chloroquine と CQ による共刺激では CQ 単独処理に比べ更なる細胞死が誘導された。また chloroquine と CQ の共処理の場合 CQ 単独と比べより ATP レベルの低下と ROS レベルの上昇が増強することが確認された。一方、rapamycin と CQ による共刺激では、CQ 単独処理に比べ細胞死が軽減された。さらに rapamycin と CQ の共処理の場合 CQ 単独と比べより ATP レベルの上昇・ROS レベルの低下が起こり、rapamycin の併用が細胞保護的に作用していることが判明した。

## 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 を負荷した細胞のホモジネートでは、測定したすべてのライソソーム水解酵素活性の低下が認められたがその pH には影響しなかった。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 Autophagy 異常と関連した細胞死が

深く関与している可能性が示唆された。Autophagy 反応の阻害剤・促進剤の併用により、前者は細胞死を促進し、後者は細胞死を抑制し、autophagy は本来細胞保護的作用を有している事が明らかとなった。

## 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、autophagy の阻害剤・促進剤を併用することで細胞毒性が変化し、その際に ATP レベルや ROS レベルでも変化が起こることが判明した。今後は上記の結果を踏まえた上で、細胞毒性発現における ROS レベル上昇について、その阻害剤などを用いて CQ による細胞毒性がどのように変化するなど治療的アプローチの検討もさらに進めたい。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

Niimi Y, Ito S, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Maeda T, Nagao R, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, Mutoh T: Usefulness of combining 123I-FP-CIT-SPECT striatal asymmetry index and cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy examinations for diagnosis of parkinsonisms. *J Neurol Sci* 377: 174-178, 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: Intravenous immunoglobulin for maintenance treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88: 832-838, 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 motherpredicts having healthy newborn. *Clin Neurol Neurosurg* 161: 14-16, 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* 4: 433-439, 2017
- 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](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.

## 2. 学会発表

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. 大腸菌性髄膜炎に下垂体腫瘍を合併し, 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
- Mizutani Y, Maeda T, Niimi Y, Nagao R, Murate K, Shima S, Ueda A, Mutoh T. Clioquinol kills cultured astrocytes by inducing the impairment of autophagy-lysosome pathway. 第60回日本神経学会学術大会 2019.05 国内
- Maeda T, Niimi Y, Hayashi K, Banno F, Kato K, Higashi A, Kikuchi K, Nagao R, Murate K, Mizutani Y, Shima S, Ueda A, Ito S, Watanabe H, Mutoh T. Fatigue evaluated with the 16-item Parkinson Fatigue Scale (PFS-16) in Parkinson's disease. 第60回日本神経学会学術大会 2019.05 国内
- 植田晃広, 武藤多津郎. 神経免疫疾患と膜ラフト 第60回日本神経学会学術大会シンポジウム 2019.05 国内
- 石川等真, 坂野文彦, 加藤邦尚, 東篤宏, 長尾龍之介, 前田利樹, 菊池洗一, 村手健一郎, 廣田政古, 島さゆり, 新美芳樹, 水谷泰彰, 植田晃広, 伊藤信二, 渡邊宏久, 武藤多津郎. 抗 NMDA 受容体 (NMDAR) 抗体陽性を示した再発性脳炎の中年男性例 第154回日本神経学会東海北陸地方会 2019.06 国内
- 植田晃広, 加藤邦尚, 長尾龍之介, 石川等真, 植田高弘, 新美芳樹, 水谷泰彰, 島さゆり, 村山和宏, 武藤多津郎, 渡辺宏久. 明瞭な両耳側半盲と視力低下を呈し速やかな病変の特定と治療により視野・視力共に回復した NMO の一例 第31回日本神経免疫学会学術大会 2019.09 国内
- 植田晃広, 菊池洗一, 長尾龍之介, 前田利樹, 村手健一郎, 新美芳樹, 水谷泰彰, 島さゆり, 伊藤信二, 武藤多津郎, 渡辺宏久. 中咽頭後壁から内頸動脈周囲のアスペルギルス感染症から多発脳神経麻痺を来した1例 第24回神経感染症学会 2019.10 国内
- 坂野文彦, 新美芳樹, 林和孝, 加藤邦尚, 東篤宏, 長尾龍之介, 前田利樹, 菊池洗一, 村手健一郎, 廣田政古, 石川等真, 水谷泰彰, 島さゆり, 植田晃広, 伊藤信二, 渡辺宏久. 帯状疱疹に伴う橈骨神経単独の運動神経障害を呈した1例 第155回日本神経学会東海北陸地方会 2019.10 国内
- 長尾龍之介, 島さゆり, 林和孝, 坂野文彦, 加藤邦尚, 東篤宏, 菊池洗一, 前田利樹, 村手健一郎, 廣田政古, 石川等真, 新美芳樹, 水谷泰彰, 植田晃広, 伊藤信二, 渡辺宏久. 広範小腸切除後17年後にビタミン B12 欠乏症による亜急性脊髄連合変性症をきたした1例 第155回日本神経学会東海北陸地方会 2019.10 国内
- 植田晃広, 長尾龍之介, 前田利樹, 菊池洗一, 坂野文彦, 加藤邦尚, 東篤宏, 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, 伊藤信二, 武藤多津郎, 渡辺宏久. 心肺停止を伴った高度の乳酸アシドーシスを透析療法で救命し得た MELAS の1例 第37回神経治療学会 2019.11 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 令和元年度 スモンに関する調査研究班. 研究報告会 2020.01 国内
- Clioquinol Elicits Cytotoxic Effects on Cultured Astrocytes Through The Impairment of The Autophagy-Lysosome Pathway

Mizutani Y, Murate K, Mutoh T. American Academy of Neurology Annual Meeting, May 1st, 2020, Toronto (海外)

Failure in autophagic cytoprotective responses elicited by Clioquinol kills astrocytic KT-5 cells

Yasuaki Mizutani, Toshiki Maeda, Kenichiro Murate, Hirohisa Watanabe, Tatsuro Mutoh.

2020.08 国内 第61回日本神経学会学術大会.

#### 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, 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.