

キノホルムの神経毒性

勝山 真人（京都府立医科大学大学院医学研究科中央研究室 RI センター）

研究要旨

我が国で亜急性脊髄視神経末梢神経障害（スモン）という重篤な薬害をもたらしたキノホルム（一般名：クリオキノール）は、metal protein attenuating compounds (MPACs) の一種である。キノホルムの腸内殺菌作用は菌体内の金属酵素の金属をキレートすることにより発揮されていたと考えられるが、キノホルムによるスモン発症のメカニズムは未だ明らかではない。

本研究班では主に培養神経系細胞を用い、キノホルムの神経毒性のメカニズムについて分子レベルで明らかにしてきた。さらにスモン患者と抗酸化酵素の遺伝子多型との相関についても研究を開始した。この3年間で主に以下の点を明らかにすることができた。

- 1) キノホルムは銅・亜鉛イオンを配位するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) の活性を阻害することにより、酸化ストレスを増大させた。一方高濃度の銅・亜鉛イオンはキノホルムの細胞毒性を増強した。
- 2) キノホルムは脊髄前角における自発性興奮性シナプス後電流の頻度を増加させた。
- 3) キノホルムはアセチル化ヒストン量を減少させた。さらにミトコンドリアからのチトクローム c の遊離、カスパーゼ 9 活性化、カスパーゼ 3 活性化という一連のアポトーシスのシグナルを引き起こした一方、不完全なオートファジーのシグナルも惹起した。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤はカスパーゼ 9 活性化、カスパーゼ 3 活性化を抑制し、キノホルムによる細胞死を抑制した。
- 4) キノホルムは低酸素応答に関わる転写因子 HIF-1 を安定化し、ミトコンドリアのオートファジーに関わる BNIP3 や NIX、また低分子量 G 蛋白の Rab20 の mRNA 量を増加させた。HIF-1 の安定化はキノホルムの細胞毒性に対して保護的に作用した。
- 5) キノホルムは神経細胞特異的転写因子 Phox2b の発現を転写レベルで低下させた一方、グリア系細胞に高発現する転写因子 SOX9 の発現を転写レベルで誘導した。
- 6) キノホルムはタウ蛋白のリン酸化を抑制し、そのオリゴマー形成を阻害した。
- 7) キノホルムは軸索障害を引き起こしたが、小胞輸送の速度に直接的な影響を及ぼさなかった。
- 8) スモンと NADPH キノン酸化還元酵素 1 (NQO1) の C609T 多型との相関を解析したところ、現在の症例数では、スモン患者における C609T 多型の頻度と日本人の平均的頻度に有意な差は認められなかった。

【研究目的】

我が国で亜急性脊髄視神経末梢神経障害（スモン）という重篤な薬害をもたらしたキノホルム（一般名：クリオキノール）は、銅・亜鉛・鉄イオンに高い親和性を示す金属キレート剤・イオノフォアであり、その腸内殺菌作用は菌体内の金属酵素の金属をキレートすることにより発揮されると考えられていた。一方キノホルムによるスモン発症の原因については、酸化ストレス説やビタミンB₁₂の低下によるとする説があるものの、確固たる証拠が得られないまま今日に至っている。またスモンが我が国で多発した理由や、キノホルムを服用してもスモンを発症しなかった場合が存在する理由についても、分子レベルでの説明はなされていない。

キノホルムは metal protein attenuating compounds (MPACs) の一種である。MPACs は金属イオンを介する蛋白の凝集を抑制することから、近年海外において神経変性疾患に対する改善効果や制がん作用が注目され、医薬品としての価値が見直されている。オーストラリアの製薬企業がキノホルムを基に開発したPBT2は、アルツハイマー病とハンチントン病に対して第2相試験が行われるまでに至ったが、一定の症状改善効果が認められたとする同社の報告に対して、結果の解釈に懐疑的な意見も存在する。また同社はパーキンソン病・運動障害、および脳腫瘍に対する類縁化合物も開発しており、それぞれ前臨床試験中と報じている。

このようにキノホルム類縁化合物の医薬品としての価値が昨今見直されている。本研究班ではキノホルムおよびその類縁化合物の臨床への再応用に警鐘を鳴らし、新たな薬害を阻止するため、キノホルムの神経毒性の分子基盤の解明に取り組んでいる。

【キノホルムによるSOD1の阻害と酸化ストレスの増大】

三ツ井・川村らは、ヒト培養神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い、キノホルムの神経毒性における酸化ストレスの関与と、キノホルムのイオノフォアとしての役割について検討した。

細胞内の活性酸素種を検出する蛍光指示薬・DCFを用いて検討を行ったところ、細胞毒性を示す 50

μM のキノホルムは活性酸素種の有意な増加を引き起こした。

50 μM のキノホルム存在下に培養した細胞から調製した細胞質画分では、スーパーオキシドジスムターゼ活性が有意に減弱していた。細胞質に局在し、銅・亜鉛イオンを配位するスーパーオキシドジスムターゼ SOD1 の精製品を添加すると、キノホルムによる細胞生存率の低下が有意に抑制された。

以上のことから、キノホルムの酸化ストレスを介する細胞毒性は、銅・亜鉛イオンをキレートすることによる SOD1 の阻害を介して、スーパーオキシドの消去を抑制することにより発揮されるものと考えられた¹⁾。

一方 10 μM のキノホルムに Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺を添加すると、細胞生存率は濃度依存的に低下した。Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺の順に、低濃度から細胞毒性を示した。このことから、キノホルムは二価の金属イオンを細胞内に導入するイオノフォアとして作用することにより毒性を示すものと考えられた。

以上の結果から、キノホルムが二価の金属イオンのキレート剤としての作用とイオノフォアとしての作用という、一見相反する作用を持つようにも思えるが、二価の金属イオンを高濃度側から低濃度側へ移行させる作用と考えれば理に叶ったことである。

【キノホルムによる脊髄前角の興奮性シナプス伝達増強作用】

吉田・谷口らはラット脊髄スライス標本を用い、whole-cell patch-clamp 法による電気生理学的解析を行った。100 μM のキノホルムを 5 分間灌流投与すると、脊髄前角細胞の自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の頻度が有意に増加したが、振幅の増強は認められなかった。10 μM の ZnCl₂ 存在下では、キノホルムによる sEPSC の頻度増加率が有意に上昇した。

以上の結果もキノホルムがイオノフォアとして作用することを示す一例である。また脊髄前角運動ニューロンに投射する神経終末からのグルタミン酸放出を亢進することにより、キノホルムがグルタミン酸毒性による細胞死を引き起こす可能性を示唆している。スモンにおける痙攣性麻痺や脱力につながる一因かもしれない。

【キノホルムによるヒストン脱アセチル化とアポトーシス】

武藤・朝倉らは nerve growth factor (NGF) に対する高親和性受容体 TrkA を高発現させたラット副腎褐色細胞腫由来の PC12 細胞 (PCT 細胞) を用い、キノホルムが TrkA の NGF による自己リン酸化反応を抑制することにより細胞毒性を発揮することを明らかにした²⁾。

NGF により分化させた PCT 細胞を用い、遺伝子発現の制御に関わるヒストンのアセチル化に及ぼすキノホルムの影響を解析した。1 μM のキノホルムを添加するとアセチル化ヒストンは経時的に減少したが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) はこの減少を抑制した。キノホルムによる神経突起の退縮は、TSA 添加により軽減された。また TSA はキノホルムによる細胞死をほぼ完全に抑制した。このことから、キノホルムがヒストンの脱アセチル化を介して細胞死を引き起こすことが明らかとなった³⁾。

キノホルムによる細胞死のシグナル伝達経路をさらに解析したところ、キノホルムはミトコンドリアからのチトクローム c の遊離、カスパーーゼ 9 の活性化、カスパーーゼ 3 の活性化という一連のアポトーシスのシグナルを引き起こした。TSA はキノホルムによるカスパーーゼ 9 とカスパーーゼ 3 の活性化を抑制した。しかしキノホルムは death ligand を介して細胞死を引き起こすカスパーーゼ 8、および小胞体ストレスにより活性化されるカスパーーゼ 12 の活性化は引き起こさなかった。一方キノホルムはオートファゴソーム形成に必要な LC3-II の発現を誘導したが、TSA による阻害は認められなかった。またキノホルムはオートファゴソームの成熟に関与する p62 の発現も誘導したが、刺激 4 時間後にはほとんど消失するという一過性の反応であった。TSA はキノホルムによる p62 の発現誘導を完全に抑制した。以上のことから、キノホルムはアポトーシスを引き起こす一方で、不完全なオートファジーを引き起こすことが明らかとなった。この不完全なオートファジーが細胞死につながるのか、あるいは細胞保護的に作用するのかについては、現在のところ不明である。

【キノホルムによる低酸素応答と細胞保護効果】

著者らは DNA チップを用いて培養神経芽細胞腫においてキノホルムにより発現が変動する遺伝子を網羅的に解析し、キノホルムの細胞毒性には、DNA 二本鎖切断による ATM の活性化と、それに伴う癌抑制性転写因子 p53 の活性化が関与することを明らかにした⁴⁾。またキノホルムが転写因子 c-Fos の発現誘導を介して、痛み反応に関与する神経ペプチド前駆体 VGF の発現を誘導することを見出した⁵⁾。

網羅的解析によってキノホルムによる発現誘導が認められた BNIP3、NIX、Rab20 について、定量 PCR により発現誘導の確認を行った。SH-SY5Y 細胞では 50 μM で、また IMR-32 細胞では 20 μM 以上の濃度で、刺激 3 時間で有意な mRNA 量の増加を認めた。

BNIP3、NIX、Rab20 はすべて低酸素条件下で発現が誘導される。低酸素による遺伝子の発現誘導は、通常の酸素濃度下では分解により発現が抑制されている転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の安定化によって開始されるが、キノホルムがユビキチン化とアスパラギン残基の水酸化を抑制することにより HIF-1 を安定化するという報告が存在する⁶⁾。そこでウエスタンプロット法により、キノホルムによる HIF-1 の発現量の変化を確認した。無刺激時には HIF-1 のバンドはほとんど検出できなかつたが、50 μM のキノホルム刺激 1 時間でバンドが検出できるレベルにまで発現量の増加、すなわち安定化が認められた。

キノホルム刺激による細胞数の減少は、HIF-1 に対する RNA 干渉により有意に増強されたことから、キノホルムによる HIF-1 の安定化は、キノホルムの神経毒性に対して保護的にはたらくことが明らかとなった。他の神経変性疾患においてキノホルムが神経保護作用を示すという結果は、この低酸素応答の誘発が寄与している可能性も考えられる⁷⁾。

低酸素応答は飢餓状態に置かれている細胞の防御機構であり、キノホルムが低酸素応答を引き起こすということは、神経細胞を飢餓状態に置くことに他ならない。短期間のキノホルムへの曝露では、神経細胞を飢餓状態に置くことによる防御機構がはたらくものの、長期間の曝露ではエネルギーの枯渇などにより、

DNA 二本鎖切断などの細胞死誘発機構に抵抗しきれなくなるという可能性も考えられる。

【キノホルムによる細胞系譜特異的転写因子の発現変化】

著者らは DNA チップを用いた網羅的解析によってキノホルムによる発現低下が認められた Phox2b と、発現誘導が認められた SOX9 について、定量 PCR により発現変化の確認を行った。

Phox2b は SH-SY5Y 細胞と IMR-32 細胞において、 $50 \mu M$ のキノホルムで 3 時間刺激することにより有意な mRNA 量の減少を認めた。一方 SOX9 は SH-SY5Y 細胞においてのみ、 $50 \mu M$ のキノホルムで 3 時間刺激することにより有意な mRNA 量の増加を認めた。

転写阻害剤アクチノマイシン D は Phox2b mRNA 量を低下させたが、キノホルムによる Phox2b mRNA の発現抑制には影響を及ぼさなかった。一方キノホルムによる SOX9 mRNA の発現誘導は、アクチノマイシン D によりほぼ完全に抑制された。以上のことから、キノホルムは両 mRNA の安定性ではなく転写に影響を及ぼすものと考えられた。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) は Phox2b mRNA 量を低下させたが、キノホルムによる Phox2b mRNA の発現抑制には影響を及ぼさなかった。一方キノホルムによる SOX9 mRNA の発現誘導は TSA によりほぼ完全に抑制されたことから、キノホルムによる SOX9 mRNA の発現誘導はヒストンの脱アセチル化を介するものと考えられた。このことはキノホルムがアセチル化ヒストン量を減少させるという武藤・朝倉らの研究結果と一致する³⁾。

Phox2b はホメオドメインを持つ転写因子であり、自律神経の発生に必須であることが知られている⁸⁾。SH-SY5Y 細胞に NGF 受容体の TrkA を強制発現させると Phox2b の発現が強力に抑制されるという報告がある一方⁹⁾、PC12 細胞ではキノホルムが NGF による TrkA の自己リン酸化を抑制することを武藤・朝倉らが見出しており²⁾、キノホルムによる Phox2b の発現抑制に TrkA のシグナリングが関与する可能性もある。

一方 SOX9 は性決定に関わる転写因子 Sry の HMG

ボックスに高い相同意を示す転写因子群の一員であり、精巣や軟骨の形成に必須であることが知られている。神経系では放射状グリア細胞、アストロサイト、オリゴ денドロサイト前駆細胞に発現し、神経芽細胞には発現しない。

以上の結果は、キノホルムが神経細胞をグリア系細胞の性質に近づける「形質転換」、あるいは脱分化を引き起こす可能性を示しており、このことが神経毒性の一端を担う可能性もある。

【キノホルムによるタウ蛋白のリン酸化抑制とオリゴマー形成の阻害】

濱野らはキノホルムがアルツハイマー病などの認知機能障害に対して有効であるとされることに着目し、認知機能障害に関与するとされるタウ蛋白の重合に対するキノホルムの影響を解析した。

野生型タウ蛋白を高発現させたヒト神経芽細胞腫 M1C 細胞において、 $1 \sim 10 \mu M$ のキノホルムは総タウ蛋白量には影響しなかったが、リン酸化タウ蛋白量を有意に減少させた。キノホルムはタウ蛋白のリン酸化酵素である JNK の活性を阻害する一方、脱リン酸化酵素である PP2A を活性化した。また $1 \mu M$ のキノホルム存在下ではタウオリゴマーの減少が認められた。 $5 \mu M$ 以下の濃度では形態変化は認められず、また $10 \mu M$ 以下の濃度では細胞死も認められなかった。

以上のことから、キノホルムは JNK の不活性化と PP2A の活性化を介してタウ蛋白のリン酸化と重合を抑制することが明らかとなった。細胞毒性の認められない低濃度のキノホルムがタウオリゴマーの蓄積を抑制することは、アルツハイマー病の発症予防や進展抑制に有効であるとする説のひとつの根拠となるかもしれない。

【キノホルムによる軸索障害と小胞輸送に及ぼす影響】

豊島らはニワトリ後根神経節の初代培養神経細胞を用い、デジタル微分干渉顕微鏡 / ビデオ増強法により、軸索における小胞輸送を観察する方法を確立した。

キノホルムは $20 \mu M$ 以上の濃度で軸索障害と細胞死を誘発した。 $1 \sim 20 \mu M$ のキノホルムは軸索輸送速度に影響を与えたことから、キノホルムの毒性

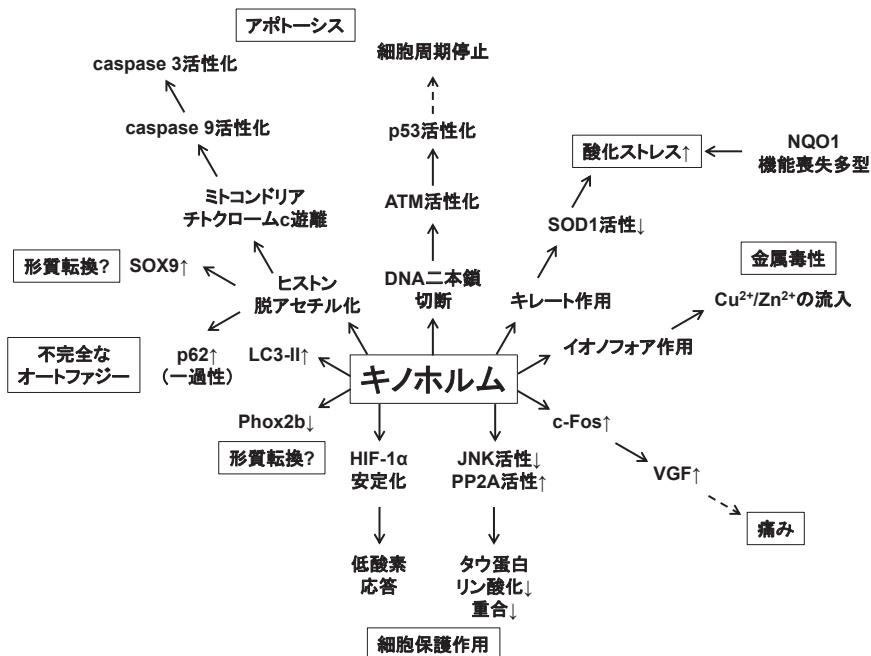


図1 キノホルムの様々な作用と神経毒性

は軸索輸送への直接作用を介するものではないことが示唆された¹⁰⁾。

【スモンと NADPH キノン酸化還元酵素 1 (NQO1) の遺伝子多型】

深尾らはスモンが日本で多発した理由、また一部のキノホルム服用者にのみスモンが発症した理由について、抗酸化酵素である NADPH キノン酸化還元酵素 1 (NQO1) の遺伝子多型に着目した。

NQO1 遺伝子には機能喪失多型 C609T が知られており、そのキノン還元活性はヘテロ (C/T) で約 30%、ホモ (T/T) で数%にまで低下する。そして日本人を含むアジア人でこの遺伝子多型の頻度が高い。そこでこの C609T 多型とスモン発症の相関の可能性について検討した。

東海 4 県のスモン検診で研究への参加の承諾を得た患者から血液を採取し、抽出した DNA から多型部位の塩基配列を決定したところ、C/C が 14 例、C/T が 24 例、T/T が 6 例であった。日本人のデータベース (Human Genomic Variation database) においては C/C が 459 名、C/T が 540 名、T/T が 197 名であり、スモン患者ではヘテロの C/T が多い傾向が認められたが、統計学的には有意な差ではなかった。またこの

多型とスモンの重症度との相関について解析したことろ、T/T 型および T/C 型では C/C 型に比べ視覚障害と歩行障害の症状が重い傾向が認められたが、統計学的有意差は得られなかった。

今回は症例数が少なかったこともあり統計学的有意差が得られなかつたが、症例数を増やすことによって NQO1 の C609T 多型が日本人の平均的頻度に比してスモン患者で高い可能性、またスモンの症状の重症度との相関が証明される可能性がある。

【結論】

キノホルムの神経毒性、および他の神経変性疾患における保護作用のメカニズムについて、その一端を明らかにする結果が得られた。また我が国においてスモンが多発した遺伝学的要因についても解析が進みつつある。これまでに得られた成果を図1にまとめた。

今後もキノホルムの神経毒性に関する基礎研究を遂行し、スモン発症のメカニズムを明らかにすることによって、薬害スモンの風化の防止と新たな薬害発生の阻止に寄与したいと考えている。

【研究発表】

1. 論文発表

- 1 . Kawamura K, Kuroda Y, Sogo M, Fujimoto M, Inui T, Mitsui T. Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452: 181-185.
 - 2 . Fukui T, Asakura K, Hikichi C, Ishikawa T, Murai R, Hirota S, et al. Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicity of clioquinol in PC12 cells. *Toxicology.* 2015; 331: 112-118.
 - 3 . Toyoshima I. Titration of clioquinol toxicity on culture cells. *Journal of Akita National Hospital.* 2016; 4: 9-15.
- 2 . 学会発表
- 1 . 泉尚史, 谷口亘, 山中学, 曽根勝真弓, 西尾尚子, 中塚映政, 吉田宗平, 吉田宗人. Clioquinolによる脊髄前角細胞の興奮性シナプス伝達増強. 第3回ニューロカンファレンス和歌山. 2015年1月10日. 和歌山.
 - 2 . 泉尚史, 谷口亘, 西尾尚子, 清行康邦, 林正貴, 中塚映政, 吉田宗平, 吉田宗人. 脊髄前角細胞におけるキノホルムの興奮性シナプス伝達増強作用. 第36回脊髄機能診断研究会. 2015年2月7日. 東京.
 - 3 . Fukui T, Asakura K, Hikichi C, Ishikawa T, Hirota S, Murate K, Murai R, Kizawa M, Ueda A, Ito S, Mutoh T. Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicity of clioquinol in PC12 cells. 第56回日本神経学会学術大会. 2015年5月22日. 新潟.
 - 4 . 勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールによるHIF-1 の安定化はクリオキノールの細胞毒性に対して保護的に作用する. 第89回日本薬理学会年会. 2016年3月11日. 横浜.
 - 5 . 朝倉邦彦, 石川等真, 島さゆり, 植田晃広, 伊藤信二, 武藤多津郎. Clioquinol induces apoptosis in PC12 cells via caspase 9 and 3 activation. 第57回日本神経学会学術大会. 2016年5月18日. 神戸.
 - 6 . 勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールによる細胞特異的転写因子の発現変化. 第90回日本薬理学会年会. 2017年3月17日. 長崎.

【文献】

- 1) Kawamura K, Kuroda Y, Sogo M, Fujimoto M, Inui T, Mitsui T. Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452: 181-185.
- 2) Asakura K, Ueda A, Kawamura N, Ueda M, Mihara T, Mutoh T. Clioquinol inhibits NGF-induced Trk autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Research.* 2009; 1301: 110-115.
- 3) Fukui T, Asakura K, Hikichi C, Ishikawa T, Murai R, Hirota S, et al. Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicity of clioquinol in PC12 cells. *Toxicology.* 2015; 331: 112-118.
- 4) Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Clioquinol induces DNA double-strand breaks, activation of ATM, and subsequent activation of p53 signaling. *Toxicology.* 2012; 299: 55-59.
- 5) Katsuyama M, Ibi M, Matsumoto M, Iwata K, Ohshima Y, Yabe-Nishimura C. Clioquinol increases the expression of VGF, a neuropeptide precursor, through induction of c-Fos expression. *J Pharmacol Sci.* 2014; 124: 427-432.
- 6) Choi SM, Choi KO, Park YK, Cho H, Yang EG, Park H. Clioquinol, a Cu (II) /Zn (II) chelator, inhibits both ubiquitination and asparagine hydroxylation of hypoxia-inducible factor-1alpha, leading to expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin in normoxic cells. *J Biol Chem.* 2006; 281: 34056-34063.
- 7) Soucek T, Cumming R, Dargusch R, Maher P, Schubert D. The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide. *Neuron.* 2003; 39: 43-56.
- 8) Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature.* 1999; 399: 366-370.
- 9) van Limpt V, Schramm A, van Lakeman A, Sluis

P, Chan A, van Noesel M, et al. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene*. 2004; 23: 9280-9288.

- 10) Toyoshima I. Titration of clioquinol toxicity on culture cells. *Journal of Akita National Hospital*. 2016; 4: 9-15.