

キノホルムによるミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 会合因子群の発現抑制

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 部門)

研究要旨

「目的」

キノホルムによるスモン発症のメカニズムについて、中心的な役割を果たす分子や経路は未だ解明できていない。スモンと銅欠乏による脊髄神経障害の臨床症状・神経解剖学的病巣分布に共通点があることから、「スモンは亜鉛の過剰・銅欠乏による神経障害ではないか」という仮説が成り立つ。著者らはキノホルムが細胞内に亜鉛を流入させるとともに、銅シャペロン ATOX1 の酸化型への変換により銅の代謝障害を引き起こし、ドパミンβ水酸化酵素の成熟阻害を介してノルアドレナリンの生合成を阻害することを見出し、この仮説の一端を証明した。他の銅関連タンパク群についてもキノホルムによる影響があるのではないかと考え、その発現変化について解析した。

「方法」

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を定法により培養した。ノルアドレナリン神経様細胞への分化は、Neurobasal 培地に抗酸化剤不含 B-27 supplement と 1 mM dibutyryl cyclic AMP を添加して 3 日間培養することにより行った。RNA を単離して逆転写を行い、定量 PCR によりキノホルムによる標的 mRNA 量の変化を測定した。細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ウエスタンブロット法により標的タンパクの発現を検出した。

「結果」

DNA チップを用いた網羅的解析の結果、キノホルムはミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ) に銅を運搬するシャペロン SCO1 と SCO2、および複合体 IV 構成タンパクのミトコンドリア内膜への挿入活性を持つ COX18 の発現を抑制すると考えられた。定量 PCR により確認したところ、未分化の細胞と分化させた細胞のどちらにおいても、キノホルムは 20 μM 以上の濃度で 24 時間後の SCO1、SCO2、COX18 の mRNA レベルを有意に低下させた。また未分化の細胞で経時変化を確認したところ、50 μM のキノホルムにより SCO2 と COX18 は刺激 3 時間で、SCO1 は刺激 24 時間で有意に mRNA レベルが低下した。ウエスタンブロット法により SCO2 蛋白量の変化を確認したところ、50 μM のキノホルムは刺激 24 時間で SCO2 レベルを有意に低下させた。

「結論」

キノホルムがミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の複合体形成に関わるタンパク群の発現を抑制することが明らかとなった。キノホルムがシトクロム c オキシダーゼ活性の低下を介して ATP 産生を低下させ、神経細胞死や機能障害を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

亜急性脊髄視束神経症（スモン）は猛烈な腹痛に引き続き、特有のしびれ感が足先から下肢全体、あるいは腹部・胸部にまで上行する神経疾患であり、下肢の痙攣や脱力をきたし、重症例では視力障害や失明、さらには脳幹障害による死亡例まで存在する。1960年代に我が国で多発し、同時に各地で集団発生したことから新たな感染症が疑われ、大きな社会問題となった。1970年に、多くの患者さんに見られた緑色の舌苔、緑尿、緑便の成分分析が行われた結果、整腸剤として多用されたキノホルム（一般名：クリオキノール）と鉄イオンのキレート化合物であることが判明し、キノホルム製剤の使用禁止以降新たな患者の発生がストップしたことから、スモンはキノホルムによる薬害と確定した。

キノホルムは metal protein attenuating compounds (MPACs) の一種であり、キレート作用により金属酵素の活性中心から金属を奪い失活させるという性質を持つ。これがキノホルムの抗菌作用のメカニズムであった可能性が高い。そして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が注目され、その類縁化合物をパーキンソン病や多系統萎縮症に応用しようとする動きがある。これらの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には、キノホルムの神経毒性の分子基盤の解明は必須である。

一方キノホルムはかつて、腸性肢端皮膚炎（小腸上皮細胞に発現する亜鉛取り込み輸送体 ZIP4 の遺伝子異常による亜鉛欠乏症）の治療薬として使用されていた。キノホルムが亜鉛補充による症状の改善を増強することから、キノホルムが細胞内に亜鉛イオンを導入するイオノフォアとしての作用を利用していたものと考えられる¹⁾。そして胃切除術後に銅欠乏による脊髄視神経障害が見られた事例²⁾や、過剰な亜鉛を含有する入れ歯安定剤の使用により銅欠乏による脊髄多発神経障害が発生した事例³⁾が存在する。さらにスモンと銅欠乏による脊髄神経障害の臨床症状・神経解剖学的病巣分布に共通点があることから⁴⁾、「スモンは亜鉛の過剰・銅欠乏による神経障害ではないか」との仮説が成り立つ。

これまで著者らは DNA チップを用いて培養神経系細胞株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、1) 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⁵⁾、2) 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⁶⁾、3) キノホルムが転写因子 GATA-2 および GATA-3 の発現抑制を介して、腸炎、視神経炎、神経因性疼痛への関与が報告されているインターロイキン-8 (IL-8) の発現誘導を引き起こすこと⁷⁾、4) キノホルムが細胞内に亜鉛を流入させるとともに、銅シャペロン ATOX1 の酸化型への変換により銅の代謝障害を引き起こし、ドパミン β 水酸化酵素の成熟阻害を介してノルアドレナリンの生合成を阻害すること⁸⁾ などを見出し報告してきた。ノルアドレナリン合成の阻害は、交感神経系や、青斑核から脊髄後角への下行性疼痛抑制系の機能障害につながる可能性がある。スモンの初期症状である猛烈な腹痛は、副交感神経系の過剰亢進による腸管収縮に由来していた可能性が考えられる。また下行性疼痛抑制系の機能障害がスモンにおける感覚異常の一因であった可能性も考えられる。さらに VGF 由来神経ペプチドや IL-8 が腹痛等のスモンの初期症状のみならず、引き続いて起こる感覚異常や視神経炎にも関与していた可能性も考えられる。

ATOX1 以外の銅関連タンパク群についてもキノホルムによる発現や機能への影響があるのではないかと考え、今回その発現変化について解析した。

B. 研究方法

【細胞培養】

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞はハム F-12: EMEM (アール塩含有) (1:1) (1% 非必須アミノ酸と 15% ウシ胎仔血清を添加) で培養した。ノルアドレナリン (NA) 神経様細胞への分化は、Neurobasal 培地 (抗酸化剤不含 B-27 supplement を添加) に 1 mM dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) を添加した培地で 3 日間培養することにより誘導した。キノホルムはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、培地中に 1000 倍希釈となるよう添加し、刺激 24 時間における濃度

依存性と、50 μ M における時間経過を測定した。対照のサンプルには DMSO を添加した。

【定量 PCR】

キノホルム存在下で培養した細胞とコントロールの細胞から、QIAGEN 社の RNeasy Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。TOYOBO 社の ReverTra Ace qPCR RT Master Mix と KOD SYBR qPCR Mix を用いて逆転写と PCR 反応を行った。反応と解析はサーモサイエンティフィック社の StepOnePlus を用いて行った。段階希釈したプラスミドを対照に絶対定量を行い、 β -グルクロニダーゼ (GUSB) の発現量を指標に補正を行った。

【ウエスタンブロット】

細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、SCO2 の検出をウエスタンブロット法 (定法) により行った。検出後 strip を行い、内部標準として β -actin の検出を行った。

C. 研究結果

【キノホルムによる SCO1、SCO2、COX18 の mRNA レベルの低下】

DNA チップを用いた網羅的解析の結果、キノホルムはミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ) に銅を運搬するシャペロン SCO1 と SCO2⁹⁾、および複合体 IV 構成タンパクのミトコンドリア内膜への挿入活性を持つ COX18¹⁰⁾ の発現を抑制すると考えられた。

定量 PCR により確認したところ、未分化の細胞と分化させた細胞のどちらにおいても、キノホルムは 20 μ M 以上の濃度で 24 時間後の SCO1、SCO2、COX18 の mRNA レベルを有意に低下させた (図 1、2)。また未分化の細胞で経時変化を確認したところ、50 μ M のキノホルムにより SCO2 と COX18 は刺激 3 時間で、SCO1 は刺激 24 時間で有意に mRNA レベルが低下した (図 3)。

【キノホルムによる SCO2 の発現低下】

ウエスタンブロット法により SCO2 タンパク量の変

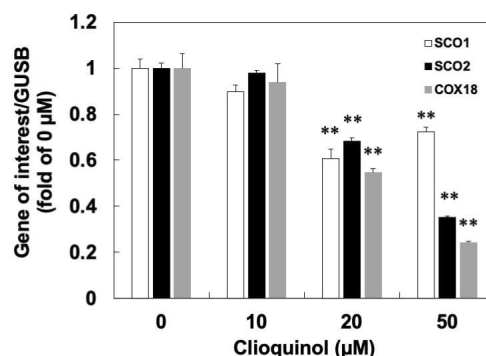


図 1 キノホルムによる複合体 IV 会合因子の発現抑制 (未分化 SH-SY5Y 細胞)

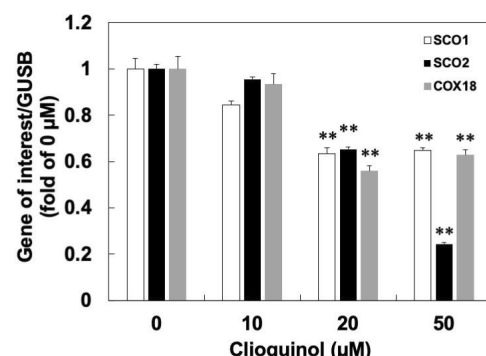


図 2 キノホルムによる複合体 IV 会合因子の発現抑制 (分化 SH-SY5Y 細胞)

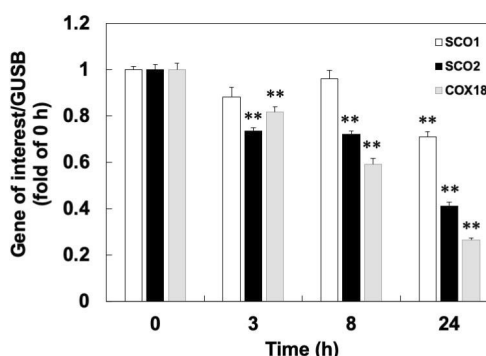


図 3 キノホルムによる複合体 IV 会合因子の発現抑制 (未分化 SH-SY5Y 細胞、経時変化)

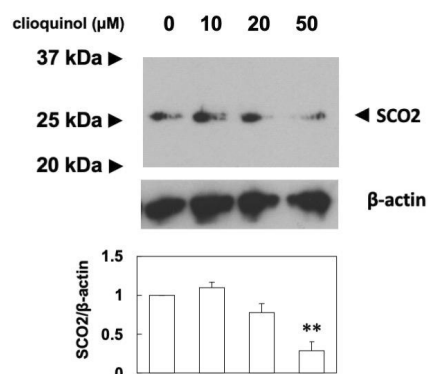


図 4 キノホルムによる SCO2 の発現抑制

化を確認したところ、50 μ M のキノホルムは刺激 24 時間で SCO2 レベルを有意に低下させた (図 4)。

D. 考察

キノホルムがミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ) の複合体形成に関わるタンパク群の発現を抑制することが明らかとなった。

SCO1 と SCO2 は複合体 IV に銅を運搬するシャペロンである⁹⁾。著者らはキノホルムが細胞質の銅シャペロン ATOX1 の酸化型への変換により銅の代謝障害を引き起こすことを見出したが⁹⁾、キノホルムは SCO1 と SCO2 の発現抑制によりミトコンドリアにおける銅輸送にも影響を及ぼしているものと考えられる。SCO2 遺伝子の変異は、末梢神経障害による四肢遠位部優位の筋力低下や感覚低下が起こるシャルコー・マリー・トゥース病 (CMT) の中でも脱髄型で常染色体劣性遺伝の CMT4 の一因であることが知られており¹¹⁾、キノホルムによる SCO2 の発現抑制とスモンの神経症状との関係を考える上で興味深い。

銅関連タンパクではないが、複合体 IV 構成タンパクのミトコンドリア内膜への挿入活性を持つ COX18¹⁰⁾ の発現もキノホルムにより抑制された。これらのいわゆる会合因子の発現抑制により複合体 IV 構成タンパク群の会合が阻害され、シトクロム c オキシダーゼ活性が低下することで ATP 産生が低下し、神経細胞死や機能障害につながる可能性が考えられる。

複合体 IV を構成するサブユニットやその会合因子群には、遺伝子のプロモーター領域上に oxygen responsive element (ORE) という酸素濃度に応答して転写調節を行う配列が存在する場合が多いとされる¹²⁾。DNA チップを用いた網羅的解析では、これらのタンパクの中でキノホルムにより発現が抑制されるものは SCO1、SCO2、COX18 以外にも 6 種類存在した。これらの遺伝子の転写抑制に共通するメカニズムが存在するものと考えられ、関与する転写因子がキノホルムの直接の標的タンパクである可能性もある。今後はキノホルムがシトクロム c オキシダーゼ活性や複合体 IV の複合体形成に及ぼす影響を解析するとともに、SCO2 遺伝子の転写抑制機構を解析する予定である。

E. 結論

キノホルムがミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の複合体形成に関わるタンパク群の発現を抑制することが明らかとなった。キノホルムがシトクロム c オキシダーゼ活性の低下を介して ATP 産生を低下させ、神経細胞死や機能障害を引き起こす可能性が示唆された。

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 勝山真人. 薬害スモンを引き起こしたクリオキノール (キノホルム) によるノルアドレナリン合成阻害. 第 48 回日本毒性学会学術年会. 2021 年 7 月 7 日. 神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Geiser J, De Lisle RC, Finkelstein D, Adlard PA, Bush AI, Andrews GK. Clioquinol synergistically augments rescue by zinc supplementation in a mouse model of acrodermatitis enteropathica. PLoS One. 2013; 8: e72543.
- 2) Spinazzi M, De Lazzari F, Tavolato B, Angelini C, Manara R, Armani M. Myelo-optico-neuropathy in copper deficiency occurring after partial gastrectomy. Do small bowel bacterial overgrowth syndrome and occult zinc ingestion tip the balance? J Neurol. 2007; 254: 1012-1017.
- 3) Hedera P, Peltier A, Fink JK, Wilcock S, London Z, Brewer GJ. Myelopolyneuropathy and pancytopenia due to copper deficiency and high zinc levels of unknown origin II. The denture cream is a primary source of excessive zinc. Neurotoxicology. 2009; 30: 996-999.
- 4) Kimura E, Hirano T, Yamashita S, Hirai T, Uchida Y, Maeda Y, et al. Cervical MRI of subacute myelo-optico-neuropathy. Spinal Cord. 2011; 49: 182-185.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Katsuyama M, Ibi M, Iwata K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Clioquinol increases the expression of interleukin-8 by down-regulating GATA-2 and GATA-3. *Neurotoxicology*. 2018; 67: 296-304.
- 8) Katsuyama M, Kimura E, Ibi M, Iwata K, Matsumoto M, Asaoka N, et al. Clioquinol inhibits dopamine-beta-hydroxylase secretion and noradrenaline synthesis by affecting the redox status of ATOX1 and copper transport in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol*. 2021; 95: 135-148.
- 9) Leary SC, Kaufman BA, Pellecchia G, Guercin GH, Mattman A, Jaksch M, et al. Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet*. 2004; 13: 1839-1848.
- 10) Bourens M, Barrientos A. Human mitochondrial cytochrome c oxidase assembly factor COX18 acts transiently as a membrane insertase within the subunit 2 maturation module. *J Biol Chem*. 2017; 292: 7774-7783.
- 11) Rebelo AP, Saade D, Pereira CV, Farooq A, Huff TC, Abreu L, et al. SCO2 mutations cause early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease associated with cellular copper deficiency. *Brain*. 2018; 141: 662-672.
- 12) Gladys S, Aras S, Huttemann M, Grossman LI. Regulation of COX Assembly and Function by Twin CX9C Proteins-Implications for Human Disease. *Cells*. 2021; 10.