

キノホルムのミトコンドリア毒性に関する解析

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すことを見出し、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解析する過程で、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 mRNA レベルで抑制することを明らかにし、昨年度報告した。そこでキノホルムのミトコンドリア毒性について、さらに解析を進めた。

「方法」

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を定法により培養した。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) 活性は、細胞をキノホルムで 24 時間処理した後、アブカム社の Complex IV Human Enzyme Activity Microplate Assay Kit を用いて測定した。また細胞をキノホルム存在下、グルコースまたはガラクトースを含有する培地で 2 時間培養し、プロメガ社の Mitochondrial ToxGlo Assay を用いてミトコンドリア毒性 (ATP 産生の阻害) と細胞毒性 (細胞膜の完全性の破綻) の分離検出を行った。

「結果」

キノホルムは 20 μ M 以上の濃度でミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 活性を低下させた。またガラクトース含有培地で培養することにより酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を測定したところ、キノホルムは 10 μ M 以上の濃度で ATP 産生を有意に抑制した。しかしキノホルムはグルコース含有培地で培養した際の ATP 産生能には影響を及ぼさず、また 2 時間の刺激では細胞膜の完全性にも影響を及ぼさなかった。

「結論」

キノホルムがミトコンドリア毒であることが証明された。キノホルムは長時間刺激で細胞毒性を発揮する以前に、より低濃度かつ短時間の刺激でミトコンドリア毒性を発揮することが明らかとなった。

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、下肢の痙縮や脱力をきたし、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、多くの患者で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た。キノホルム製剤の使用禁止以降新たな患者の発生が止まったことから、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、その類縁化合物として開発された ATH434 は多系統萎縮症の希少疾病用医薬品となっている。こうした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 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、その発現変化について解析したところ、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 mRNA レベルで抑制することが明らかとなった。そこでキノホルムのミトコンドリア毒性について、さらに解析を進めた。

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。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た。対照のサンプルには DMSO を添加した。

【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) 活性の測定】

細胞を 6 ウェルプレートに播種し、翌日キノホルムで 24 時間刺激した。PBS で洗浄後、細胞を回収した。アバカム社の Complex IV Human Enzyme Activity Microplate Assay Kit を用いて lysate を調製した後タンパク定量を行い、プロトコールに従ってマイクロプレート上への吸着と酵素反応を行い、550nm の吸光度の変化を測定した。最初の 5 分間における吸光度の減少から酵素活性を算出した。実験は N=4 で行い、4 回の実験の平均を求めた。

【ミトコンドリア毒性の検出】

細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5,000 個ずつ播種し、翌日 4.5g/l の D-glucose または D-galactose を含む DMEM : F-12 培地 (血清不含) に置換してキノホルムで 90 分間刺激した。プロメガ社の Mitochondrial ToxGlo Assay に含まれる蛍光基質 (bis-AAF-R110) を添加してさらに 30 分間刺激した。プロメガ社のマルチプレートリーダー GloMax Discover System を用い、485nm の励起波長で 520-530nm の蛍光を測定することにより、細胞毒性 (細胞膜の完全性の破綻) の検出を行った。その後 ATP 検出試薬を添加し、細胞を溶解して ATP を蛍光検出することにより、ミトコンドリア毒性 (ATP 産生の阻害) を評価した。実験は N=4 で行い、3 回の実験の平均を求めた。

C. 研究結果

【ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 活性への影響】

24 時間の刺激によるキノホルムのミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 活性への影響を調べたところ、キノホルムは 20 μ M 以上の濃度でミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 活性を低下させた (図 1)。

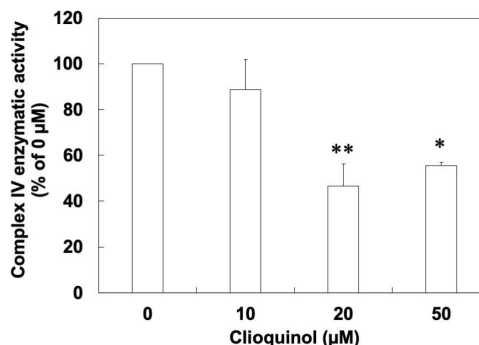


図 1 キノホルムによるミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 活性の抑制

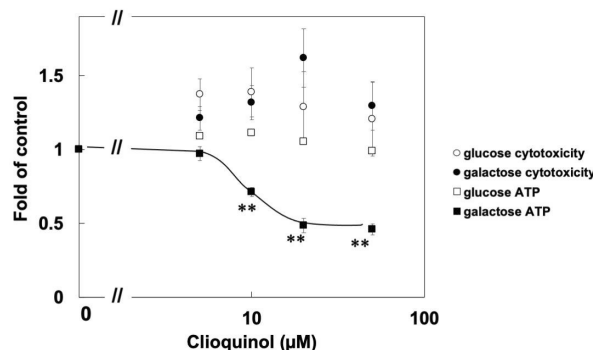


図 2 キノホルムによる酸化的リン酸化に依存した ATP 産生の抑制

【ミトコンドリア毒性】

ガラクトース含有培地で培養することにより酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を測定したところ、キノホルムは 10 μ M 以上の濃度で ATP 産生を有意に抑制した。しかしキノホルムはグルコース含有培地で培養した際の ATP 産生能には影響を及ぼさなかった。また 2 時間の刺激では細胞毒性 (細胞膜の完全性の破綻) は増加傾向を示したが、有意なものではなかった (図 2)。

D. 考察

キノホルムがミトコンドリア毒であることが証明された。

昨年度、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 (SCO1, SCO2, COX18) の発現を抑制することを報告した。これらの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ものが推測されていた。今回、24時間刺激によって複合体 IV の活性が低下することが確認できた。キノホルムによって実際に複合体 IV 構成タンパク群の会合が阻害されるかは、実験系の難しさもあり未だ再現性のある結果を得られていない。また複合体 IV 会合因子群に共通した、キノホルムによる転写抑制のメカニズムも未解明である。

一方今回、2時間という短時間刺激でキノホルムが酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を抑制することを見出した。この時点で有意な細胞毒性（細胞膜の完全性の破綻）は観察されず、また昨年度の結果によると、刺激3時間では複合体 IV 会合因子群の mRNA の発現低下は非常に軽度であった。すなわちキノホルムのミトコンドリア毒性は細胞毒性に先立って観察され、また 20 μ M 以上で観察される細胞増殖の抑制に対して 10 μ M という、より低濃度で観察された。このことは複合体 IV 会合因子群の転写抑制とは別に、キノホルムが直接ミトコンドリアに対して毒性を及ぼす機構が存在することを示唆している。

キノホルムのミトコンドリアへの作用については「スモン調査研究協議会研究報告書 NO. 9 昭和 46 年度キノホルム部会研究報告」に八木国夫や田村善蔵らにより報告され、後に英文誌にも掲載されている¹¹⁾。キノホルムがミトコンドリアの酸化的リン酸化に対して脱共役剤として作用するというものであるが、この実験ではラット肝臓の単離ミトコンドリアに対して 400 μ M という高濃度のキノホルムを使用している。今回の実験では、培養細胞に対して 10 μ M という濃度でキノホルムが酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を抑制することを示しており、*in vitro* とはいえより生体に近い条件であっても、キノホルムがミトコンドリア毒として作用することを証明できたと考えている。ただし、無血清培地かつグルコース非存在下という特殊な条件での測定であり、生理的条件下でも同様の現象が起きるかどうかは不明である。また ATP 産生の抑制がせいぜい 50% 程度であること、さらに有意差が付かないとは言え細胞毒性が増加傾向を示していることから、ミトコンドリア毒性の寄与が小さくネクローシスが主体である可能性も捨てきれない。

今後はキノホルムがミトコンドリア複合体 IV の複合体形成に及ぼす影響を解析するとともに、短時間でミトコンドリア毒性を発現するメカニズム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毒であることが証明された。キノホルムは長時間刺激で細胞毒性を発揮する以前に、より低濃度かつ短時間の刺激でミトコンドリア毒性を発揮することが明らかとなった。

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 勝山真人. 薬害スモンの発症メカニズムの完全解明に向けて. 公募シンポジウム「クスリのリスクを科学する：基礎から臨床、過去から未来へ」第 96 回日本薬理学会年会. 2022 年 12 月 2 日. 横浜.

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. Clotrimazole 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) Yamanaka N, Imanari T, Tamura Z, Yagi K. Uncoupling of oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria by chionoform. *J Biochem*. 1973; 73: 993-998.