

キノホルムによる銅シャペロン ATOX1 の酸化を介した ノルアドレナリン合成阻害

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)

矢部 千尋 (京都府立医科大学大学院医学研究科病態分子薬理学)

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は未だ不明である。キノホルムは亜鉛欠乏症である腸性肢端皮膚炎の治療薬として用いられていたが、これは亜鉛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。一方過剰な亜鉛を含有する入れ歯安定剤の使用で銅欠乏による脊髄多発神経障害が発生した事例が存在する。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、「スモンは亜鉛の過剰・銅欠乏による神経障害ではないか」という仮説を立て、キノホルムが細胞内の銅・亜鉛イオンの挙動に与える影響を解析した。

「方法」

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を定法により培養した。細胞内の銅・亜鉛イオンの定量は、キットを用いた比色定量により行った。蛋白のシステイン酸化は細胞抽出液を DNA マレイミドで標識した後、また培地中に分泌された蛋白は遠心による限外濾過で濃縮した後、それぞれ電気泳動・ウエスタンブロットを行うことにより検出した。ゲノム編集はニッカーゼ発現ベクターに gRNA 配列を挿入後、細胞に電氣的に導入し、薬剤選択後細胞クローンを樹立することにより行った。

「結果」

キノホルムは金属応答配列に依存した転写活性化を引き起こした。キノホルム刺激 1 時間で細胞内亜鉛濃度は上昇したが、銅濃度は刺激 24 時間後に上昇した。キノホルムは銅シャペロンである ATOX1 のチオール基の酸化を引き起こし、銅依存性酵素であるドパミン水酸化酵素 (DBH) およびリジルオキシダーゼの分泌を抑制し、さらに細胞内ノルアドレナリン濃度を低下させた。ATOX1 ノックアウト細胞では DBH の分泌が低下していた。

「結論」

キノホルムが細胞内に亜鉛を流入させるとともに、ATOX1 の酸化型への変換により銅の代謝障害を引き起こし、DBH 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がわかった。キノホルムによるノルアドレナリンの合成阻害は、副交感神経系の過剰亢進や下行性疼痛抑制系の機能障害につながる可能性があり、初期の猛烈な腹痛や、感覚異常といったスモンの症状への関与が示唆された。

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、下肢の痙縮や脱力をきたし、重症例では視力障害による失明、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。しかしキノホルムによるスモンの発症機構については分子レベルでの解明がなされないまま今日に至っている。

一方キノホルムは metal protein attenuating compounds (MPACs) の一種であり、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。

我々は 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、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¹⁾。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の前駆体・VGF の発現を誘導することを見出した²⁾。さらに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を見出した³⁾。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する可能性が考えられる。

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⁴⁾。一方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⁵⁾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⁶⁾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⁷⁾、「スモンは亜鉛の過剰・銅欠乏による神経障害ではないか」という仮説を立て、今回の研究を行った。

B. 研究方法

【細胞培養】

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞はハム F12 : 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。NA 神経様に分化させた SH-SY5Y 細胞に対するキノホルムの細胞毒性は、未分化の細胞と同様に 20 μ M 以上の濃度で観察されることを確認した (発表論文参照)。

【細胞内の銅及び亜鉛の定量】

SH-SY5Y 細胞の細胞抽出液に 6N 塩酸を添加して蛋白から金属イオンを解離させ、Metallo Assay LS kit (メタロジェニクス社) を用いて銅および亜鉛イオンを定量した。

【ウェスタンブロット】

蛋白の酸化還元状態のモニタリングのため、細胞が

ら抽出した総蛋白 (2 μ g) のシステイン残基を -Sulfo Biotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus (同仁化学) を用いてマレイミド化した。SDS ポリアクリルアミド電気泳動後、紫外線照射によりマレイミドに結合する DNA を切断した後膜転写した。培地中に分泌される蛋白は、細胞をキノホルム存在下で 24 時間刺激した後培地を除去し、PBS で洗浄した後、キノホルム存在下でさらに 8 時間、血清を含まない培地で培養することにより調製した。培地を回収し、遠心で細胞成分を除去した後、遠心フィルター (Amicon Ultra-4, 10kDa cut-off、メルク社) で濃縮した。ウエスタンブロットは定法により行った。検出後 strip を行い、b-actin の検出を行った。

【NA の定量】

細胞内の NA レベルの定量は ELISA キット (ImmuSmol 社) を用いて行った。

【ATOX1 のゲノム編集】

ニッカーゼ発現ベクター AIO-puro (Addgene 社) に ATOX1 に対する gRNA 配列に相当するオリゴヌクレオチドを挿入し、4D-Nucleofector System (Lonza 社) を用いて SH-SY5Y 細胞に電氣的に導入した。ピューロマイシン存在下でシングルセルクローニングを行うことにより、ATOX1 ノックアウト細胞を樹立した。

C. 研究結果

【キノホルムによる亜鉛の流入】

我々が以前行った DNA チップによる遺伝子の網羅的発現解析では、SH-SY5Y 細胞をキノホルムで刺激した際に、亜鉛などの金属イオン濃度の上昇により転写が促進されるメタロチオネイン類の発現誘導が認められていた。そこで細胞内の亜鉛レベルを測定したところ、50 μ M のキノホルムで 1 時間刺激すると、細胞内の亜鉛レベルは有意に上昇した (図 1)。

【キノホルムによる銅の蓄積】

キノホルムが銅代謝に影響を与える可能性を考え、細胞内の銅レベルを刺激 24 時間まで測定したところ、

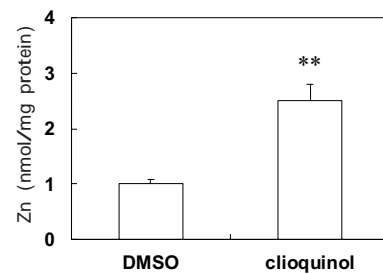


図 1 キノホルム刺激 1 時間後の亜鉛レベルの上昇

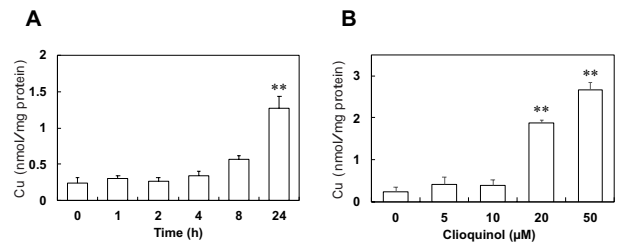


図 2 キノホルム刺激 24 時間後の銅レベルの上昇

50 μ M のキノホルムは刺激 24 時間で有意に銅レベルを上昇させた (図 2A)。濃度依存性を調べたところ、キノホルムは 20 μ M 以上の濃度で刺激 24 時間後の銅レベルを有意に上昇させた (図 2B)。

【キノホルムによる銅シャペロン ATOX1 の酸化】

キノホルム刺激 1 時間で細胞内に流入する亜鉛とは対照的に、刺激 24 時間でレベルが上昇する銅は代謝障害により蓄積すると考えられたことから、銅輸送に重要な役割を果たす銅シャペロン ATOX1 に着目した。ATOX1 は分子内に 3 つのシステイン残基を持ち、そのうちの 2 つは銅イオンを配位する活性中心 metal binding domain を形成している⁸⁾。そこでキノホルム刺激により ATOX1 の活性中心のシステインが酸化され失活するのではないかと考え、DNA マレイミド試薬を用いてシステイン残基のレドックス状態のモニタリングを行った。

DNA マレイミド処理を行わない場合、ATOX1 は約 7kDa のバンドとして検出され、キノホルムによる蛋白量の変動は認められなかった。DNA マレイミドで処理したサンプルでは、DNA マレイミドが 1 つ結合した「酸化型」と考えられる 20kDa 弱のバンドと、DNA マレイミドが 3 つ結合した「還元型」と考えられる約 40kDa のバンドが検出された。50 μ M のキノホルム刺激により約 40kDa のバンドは消失した。経

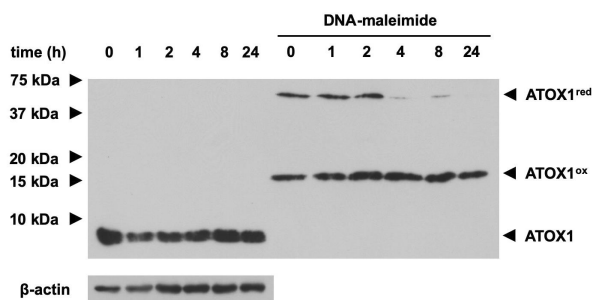


図3 キノホルムによる ATOX1 の酸化

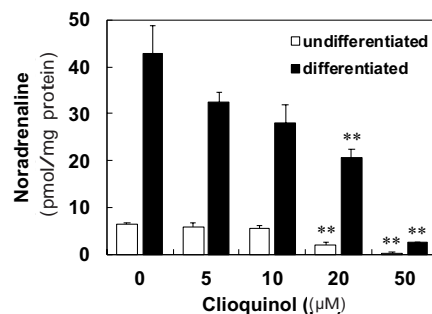


図5 キノホルムによる細胞内 NA 量の減少

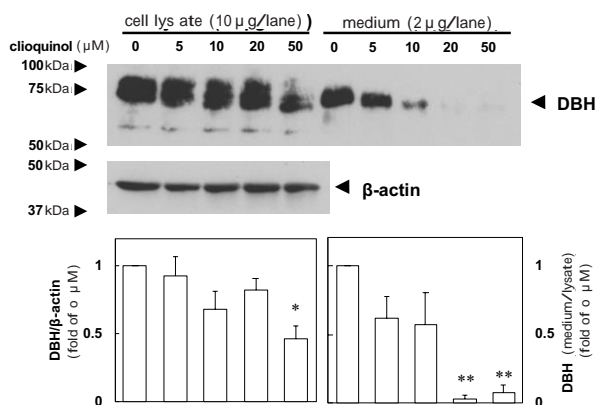


図4 キノホルムによる DBH の分泌阻害

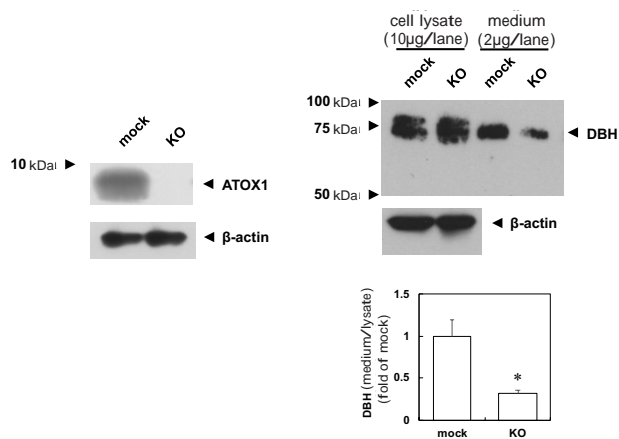


図6 ATOX1 のノックアウトによる DBH の分泌抑制

時変化を確認したところ、キノホルム刺激4時間で約40 kDaのバンドは消失した(図3)。

【キノホルムによる銅依存性酵素の分泌阻害】

銅の代謝障害により、ドパミン水酸化酵素(DBH)やリジロキシダーゼ(LOX)といった銅依存性分泌酵素の成熟・分泌が阻害されると考えられるため、これらの酵素の培地中への分泌をウエスタンブロット法により解析した。50 μMのキノホルム刺激により、細胞中のLOX前駆体蛋白量は有意に増加した。DMSOを添加した場合に培地中に検出されたDBHや成熟型LOXは、50 μMのキノホルムで刺激した場合には検出されなくなった(発表論文参照)。DBHの培地中への分泌は、20 μM以上の濃度のキノホルムにより有意に抑制された(図4)。

【キノホルムによる細胞内NAレベルの低下】

DBHはドパミンをNAに変換する酵素である。キノホルムによるDBHの成熟・分泌阻害によりNA合成が阻害されるものと考え、細胞内のNAレベルを

ELISA法により測定した。未分化のSH-SY5Y細胞およびdbcAMPでNA神経様に分化させた細胞のどちらにおいても、20 μM以上の濃度のキノホルムにより細胞内のNAレベルは有意に低下した(図5)。

【ATOX1のゲノム編集によるDBHの分泌抑制】

ATOX1の酸化による活性低下がDBHの成熟・分泌阻害に関わることを証明するため、ゲノム編集によりATOX1ノックアウト細胞を樹立した。ATOX1ノックアウト細胞ではmock細胞に比してDBHの分泌が抑制されていた(図6)。

D. 考察

キノホルムは亜鉛の流入とATOX1の酸化による銅の代謝障害を引き起こし、DBHなどの銅依存性酵素の成熟・分泌を阻害することにより、NAの生合成を阻害することが明らかとなった。キノホルムは亜鉛の流入によるERストレスや銅の蓄積による酸化ストレスの亢進といった神経細胞死の原因となる現象ととも

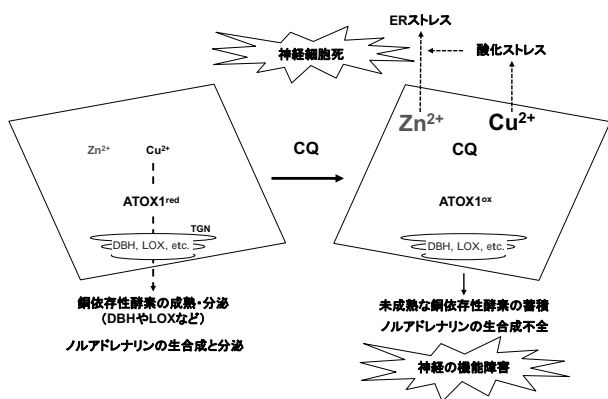


図7 亜鉛の流入と銅の代謝障害を介するキノホルムの神経毒性

に、NA合成の阻害といった神経の機能障害を引き起こすことが示唆された(図7)。

キノホルムは銅・亜鉛イオノフォアとして知られているが、短時間での銅の流入は観察されなかった(図2)。血清を含む培地中の銅の95%程度はセルロプラスミンに結合しており、遊離している銅の濃度は亜鉛濃度の1/10程度であることが理由と考えられる。ヒトの血中においても同様であり、キノホルムは人体に対しても亜鉛イオノフォアとして機能するものと考えられる。

キノホルムがATOX1を酸化するメカニズム、および亜鉛の流入がATOX1の活性に与える影響は現在のところ不明であるが、亜鉛が銅と競合してATOX1からATP7Aへの銅輸送を阻害する可能性が考えられる⁹⁾。

DBHの成熟・分泌阻害によるNA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。一方LOXはコラーゲンとエラスチンの架橋形成を担う酵素であるが、神経系では筋萎縮性側索硬化症患者の脊髄で発現が亢進していること¹⁰⁾、またLOXのプロペプチドの過剰発現でブルキンエ細胞の樹状突起の分枝が抑制されることが報告されている¹¹⁾。キノホルムによるLOX前駆体の発現誘導と成熟・分泌阻害がスモンの発症に関与するかについては、さらなる検討が必

要である。

E. 結論

キノホルムは亜鉛の流入とATOX1の酸化による銅の代謝障害を引き起こし、DBHなどの銅依存性酵素の成熟・分泌を阻害することにより、NAの生合成を阻害することが明らかとなった。この経路がキノホルムの神経毒性の一端を担っているものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Katsuyama M, Kimura E, Ibi M, Iwata K, Matsumoto M, Asaoka N, Yabe-Nishimura C. Clioquinol inhibits dopamine-β-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.

2. 学会発表

1) 勝山真人. キノホルムによる神経毒性発現のメカニズムに関する研究. シンポジウム; スモン原因解明から50年. 第74回国立病院総合医学会. 2020年10月17日. 新潟.

2) 勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールは銅シャペロンATOX1の酸化還元状態を変化させドパミン水酸化酵素の分泌とノルアドレナリン合成を阻害する. 第94回日本薬理学会年会. 2021年3月10日. 札幌.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

1) 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.

2) 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.
- 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Hatori Y, Lutsenko S. The Role of Copper Chaperone Atox1 in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution. *Antioxidants (Basel).* 2016; 5.
 - 9) Badarau A, Basle A, Firbank SJ, Dennison C. Crosstalk between Cu (I) and Zn (II) homeostasis via Atox1 and cognate domains. *Chem Commun (Camb).* 2013; 49: 8000-8002.
 - 10) Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem.* 2001; 77: 132-145.
 - 11) Li J, Gu X, Ma Y, Calicchio ML, Kong D, Teng YD, et al. Nna1 mediates Purkinje cell dendritic development via lysyl oxidase propeptide and NF-kappaB signaling. *Neuron.* 2010; 68: 45-60.