[PRESS　RELEASE]

2020 年 10 月 13 日

京都府公立大学法人
京都府立医科大学
KYOTO PREFECTURAL UNIVERSITY OF MEDICINE

キノホルムが神経伝達物質の生合成を阻害することを発見

～薬害スモンの発症メカニズムの一端が明らかに～

本研究成果のポイント
〇薬害スモン（亜急性脊髄視神経障害）を引き起こしたキノホルム（クリオキノール）が培養神経芽細胞腫において亜鉛の流入と銅の蓄積（代謝不全）を引き起こすことを発見
〇キノホルムが銅シャペロン ATOX1 を酸化型（不活性型）に変換することを発見
〇キノホルムが銅依存性酵素であるドパミンβ水酸化酵素の成熟・分泌を阻害することを発見
〇キノホルムがノルアドレナリンの生合成を阻害することを発見

京都府立医科大学大学院医学研究科　中央研究室 RI 部門　研究教授　勝山真人らの研究グループは、薬害スモン（亜急性脊髄視神経障害）を引き起こしたキノホルム（クリオキノール）が、銅シャペロン ATOX1 を酸化型（不活性型）に変換し細胞内銅輸送を阻害することにより、ノルアドレナリンの生合成を阻害することを解明しました。本件に関する論文が、ドイツの科学雑誌『Archives of Toxicology』に現地時間 2020 年 10 月 9 日付けで掲載されましたのでお知らせします。

1960 年代に我が国で多発したスモンは、当時整腸剤として多用されていたキノホルム製剤（一般名クリオキノール）による薬害であることが 1970 年に確定しましたが、その発症機構については解明されないまま今日に至っています。一方キノホルム誘導体をアルツハイマー病や多系統萎縮症の治療薬として臨床応用しようという動きがあり、新たな薬害を阻止するためにも、キノホルムの神経毒性発生メカニズムの解明が重要です。

今回研究グループは培養細胞を用い、キノホルムが銅を運搬するタンパク（シャペロン）である ATOX1 を酸化型（不活性型）に変換して銅輸送を阻害し、銅依存性酵素であるドパミンβ水酸化酵素の成熟を阻害することで、神経伝達物質であるノルアドレナリンの生合成を阻害することを見出しました。スモンと銅欠乏による脊髄神経障害には、臨床症状と神経解剖学的病巣分布において共通点があることが知られていました。本研究成果はキノホルムが銅代謝を阻害し、神経の機能障害を引き起こす可能性を細胞レベルで示したものであり、キノホルムによるスモン発症のメカニズムの一端を明らかにしたものであると考えています。

【論文基礎情報】

掲載誌情報	雑誌名：Archives of Toxicology 発表媒体　■オンライン速報版　□ ペーパー発行　□ その他 雑誌の発行元国：ドイツ オンライン閲覧　可（有料） https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-020-02894-0 掲載予定日　現地時間 2020 年 10 月 9 日
論文情報	論文タイトル（英・日） 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 （クリオキノールはヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、ATOX1 の酸化還元状態と銅輸送に悪影響を及ぼすことにより、ドパミンβ水酸化酵素の分泌とノルアドレナリン合成を阻害する） 代表著者　所属・氏名： 京都府立医科大学　大学院医学研究科　中央研究室 RI 部門・勝山真人　研究教授 共同著者　無・有（有の場合→所属・氏名）： 前・国立精神・神経医療研究センター　トランスレーショナル・メディカルセンター臨床研究支援部　木村円　早期・探索的臨床試験室長 （現・社会福祉法人 はまゆう療育園 内科） 京都府立医科大学　大学院医学研究科　病態分子薬理学・衣斐督和　講師 京都府立医科大学　大学院医学研究科　病態分子薬理学・岩田和実　研究准教授 京都府立医科大学　大学院医学研究科　病態分子薬理学・松本みさき　講師（学内） 京都府立医科大学　大学院医学研究科　病態分子薬理学・浅岡希美　助教 京都府立医科大学　大学院医学研究科　病態分子薬理学・矢部千尋　教授

【論文概要】

１　研究分野の背景や問題点

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します。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りました。

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ました。当時の患者数は 9000 人以上でしたが､現在なお 1000 人以上の方々が後遺症に苦しんでおられます。スモン発症の原因の詳細については、ビタミン B12 の欠乏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ます。

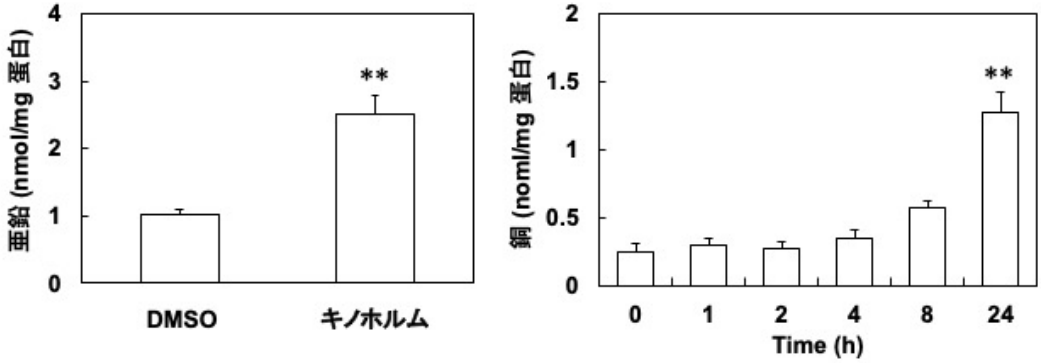
一方キノホルムは金属イオンを介する蛋白の凝集を抑制することから、近年海外において神経変性疾患に対する改善効果が注目され、その類縁化合物をパーキンソン病や多系統萎縮症に応用しようとする動きがあります。キノホルムおよびその類縁化合物の臨床への再応用に警鐘を鳴らし、新たな薬害を阻止するため、研究グループではキノホルムの神経毒性の分子基盤の解明に取り組んできました。これまでにキノホルムが①DNA 二本鎖切断を引き起こし、リン酸化酵素 ATM の活性化とそれに続く p53 の活性化を引き起こすこと、②転写因子 c-Fos の発現誘導を介して、痛み反応に関わる神経ペプチドの前駆体 VGF の発現を誘導すること､③転写因子 GATA-2､GATA-3 の発現抑制を介して神経炎への関与が考えられるインターロイキン 8 の発現を誘導すること、を見出し報告しています。

２　研究内容・成果の要点

キノホルムは､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ましたが、これはキノホルムが細胞内に亜鉛イオンを導入する作用を利用していたものと考えられます。また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があります。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、今回の研究を行いました。

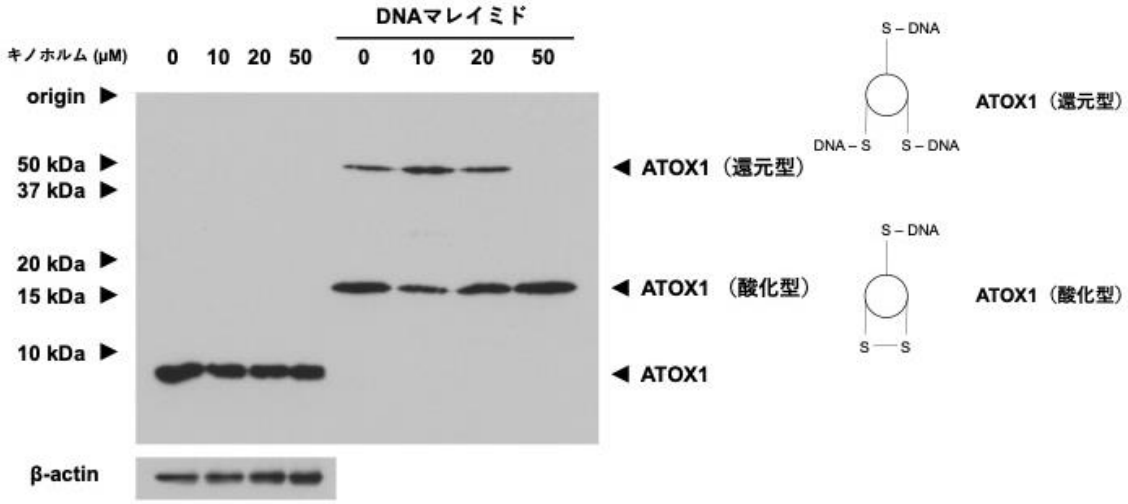
ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い、定量キットを用いて細胞内の亜鉛・銅イオン量を測定しました。キノホルム刺激 1 時間で細胞内の亜鉛レベルは上昇しましたが、銅レベルは刺激 24 時間で上昇しました（図 1)。

図1　キノホルムによる細胞内亜鉛レベル（左）および銅レベル（右）の上昇



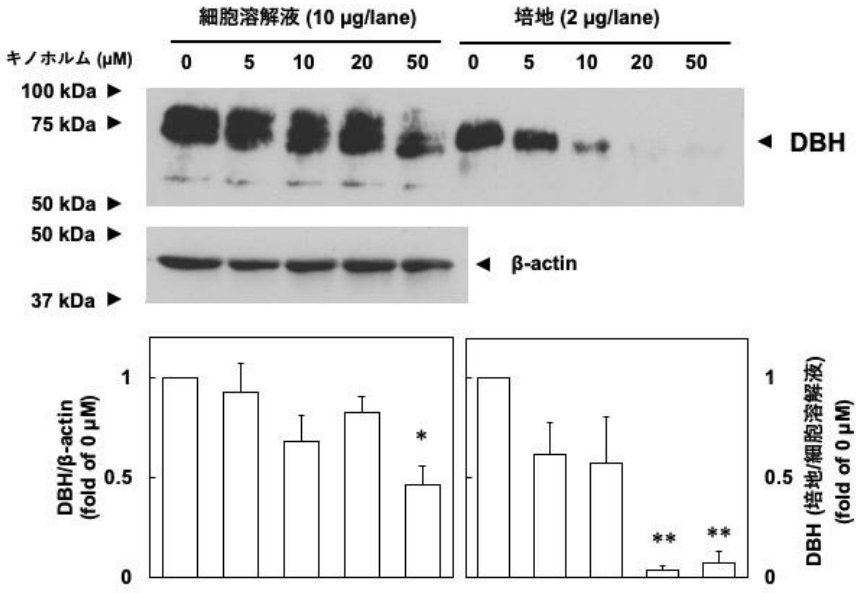
亜鉛についてはキノホルムによる細胞内への流入と考えられましたが、銅については流入ではなく蓄積であると考えられました。そこで細胞内の銅輸送を司るタンパク「銅シャペロン」のひとつである ATOX1 に着目しました。DNA マレイミドという、システイン残基に結合してタンパクの酸化還元状態をモニターする試薬を用いてウエスタン解析を行ったところ、キノホルム存在下では還元型（活性型）のバンドは消失し、キノホルムが ATOX1 を酸化型（不活性型）に変換することがわかりました（図 2)。

図2　キノホルムによるATOX1の酸化



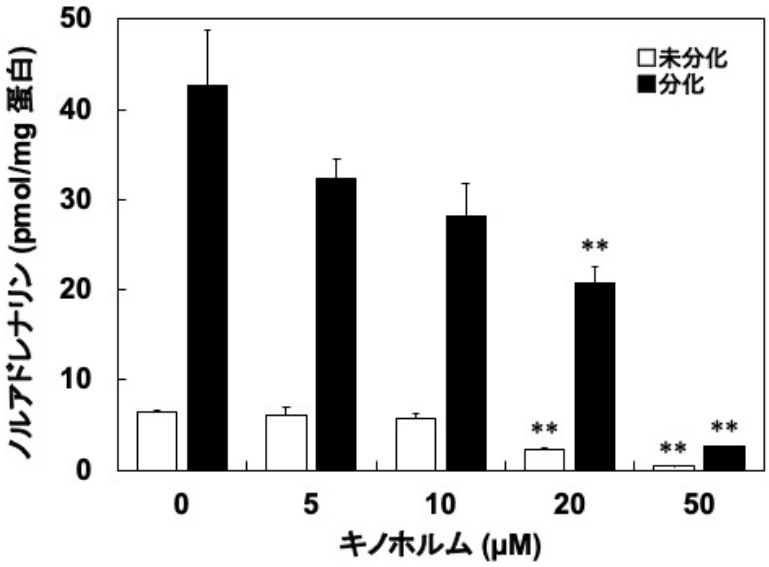
この結果から、ATOX1 の酸化により細胞内銅輸送が阻害され、銅依存性酵素の機能的成熟が阻害されることが予想されました。そこで分泌型銅依存性酵素であるドパミンβ水酸化酵素(DBH)の培地中への分泌を調べたところ、キノホルムは DBH の分泌を阻害することがわかりました（図 3)。

図3　キノホルムによるDBHの分泌阻害



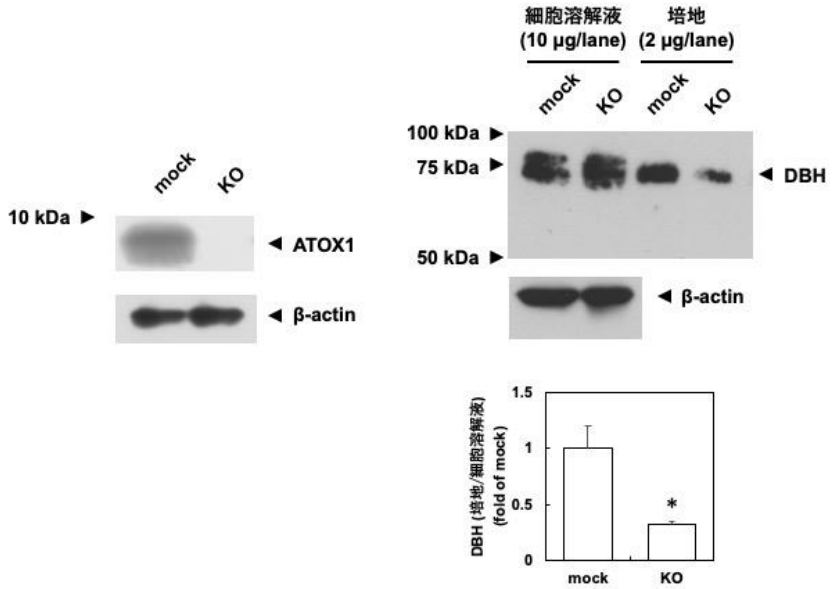
DBH はドパミンをノルアドレナリン（NA）に変換する酵素ですので、DBH の成熟阻害により NA の生合成が阻害されているのではないかと考え、細胞内 NA 量を測定しました。未分化の SH-SY5Y 細胞、また NA 神経様に分化させた細胞のどちらにおいても、キノホルムは細胞内 NA 量を減少させました（図 4）。

図4　キノホルムによる細胞内NA量の減少



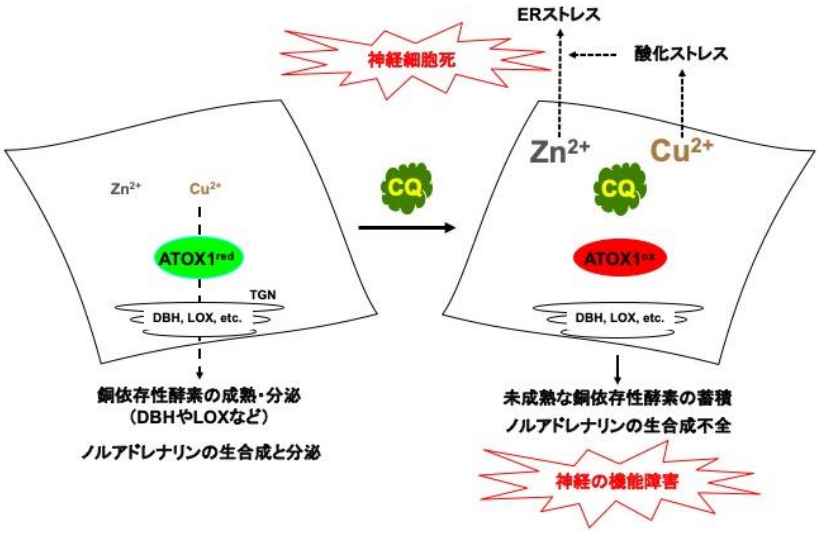
また、ゲノム編集により ATOX1 をノックアウトした細胞を樹立したところ、培地中への DBH の分泌は有意に抑制されました（図 5）。

図5　ATOX1のノックアウトによるDBHの分泌抑制



以上の結果、キノホルムは ATOX1 の酸化型への変換により銅の代謝阻害を引き起こし、DBH の成熟阻害を介して NA の生合成を阻害することがわかりました（図 6）。NA 合成の阻害は交感神経系や下行性疼痛抑制系の機能障害につながります。スモンの初期症状である猛烈な腹痛が、副交感神経系の過剰亢進による腸管収縮に由来する可能性が考えられました。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につながる可能性も考えられました。

図6　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



３　今後の展開と社会へのアピールポイント

本研究は「スモンは亜鉛の過剰・銅代謝障害による神経障害である」ことを細胞レベルで証明した成果で、キノホルムによるスモン発症メカニズムの一端を説明するものと考えています。

本研究が後遺症に苦しんでおられるスモン患者さんの治療に直接結びつくわけではなく、またキノホルムの場合、同じく薬害を引き起こしたサリドマイドのように、単一のタンパクとの相互作用で発症メカニズムのすべてを説明できるものでもないと考えていますので、まだまだ解明すべき点は多々残されています。今後もキノホルムによるスモン発症メカニズムの全容解明のため、研究を続けていく所存です。

【研究資金】
本研究は、以下の研究費の支援を受けて行われました。
厚生労働行政推進調査事業費補助金　難治性疾患政策研究事業　スモンに関する調査研究

＜研究に関すること＞	＜広報に関すること＞
京都府立医科大学　大学院医学研究科 中央研究室 RI 部門　研究教授　勝山真人 電　話：075-251-5381 E-mail：mkatsuya@koto.kpu-m.ac.jp	広報センター［事務局：企画・研究支援課］土屋 電　話：075-251-5804 E-mail：kouhou@koto.kpu-m.ac.jp