



## キノホルムによるミトコンドリア毒性誘発機構を解明

～薬害スモン発症メカニズムの全容解明に向けた新たな一歩～

### 本研究成果のポイント

○1960年代に我が国で多発した亜急性脊髄視束神経症（スモン）は、当時整腸剤として多用されたキノホルム製剤（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未解明のままです。一方近年、キノホルム誘導体が神経変性疾患に対する治療薬として期待されており、新たな薬害の阻止にはキノホルムによる神経毒性発生メカニズムの解明が必須です。

○著者らは培養神経芽細胞腫を用い、キノホルムがエネルギー（ATP）産生に重要な呼吸鎖複合体IVの形成を阻害すること、またクリステの構造維持に関わるタンパクの発現を抑えることにより、ミトコンドリア毒性を誘発することを初めて解明しました。

○本研究成果は、キノホルムによるミトコンドリア毒性誘発機構を細胞レベルで明らかにしたものであり、キノホルムによるスモン発症メカニズムの全容解明にまた一歩近づいたとともに、より安全な神経変性疾患治療薬の開発に資することも期待されます。

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、同大学大学院医学研究科 分子病態病理学 助教 矢追 毅、同大学大学院医学研究科 病態分子薬理学 教授 榎村敦詩、国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長 荒川憲昭、国立病院機構 鈴鹿病院 研究員 木村円ら研究グループは、薬害スモン（亜急性脊髄視束神経症）を引き起こしたキノホルム（クリオキノール）が、呼吸鎖複合体IVとダイナミン様GTPアーゼOPA1に悪影響を及ぼすことによりミトコンドリア毒性を誘発することを解明しました。本件に関する論文が、科学雑誌『FEBS Letters』に2025年3月24日付けでオンライン掲載されましたのでお知らせします。

本研究は、キノホルムによる薬害と確定してから半世紀以上が経過した現在でも明らかでないスモンの発症機序の一端を細胞レベルで解明したものです。本研究成果をもとに、今後はキノホルムによるスモン発症メカニズムの全容解明と、より安全な神経変性疾患治療薬の開発への応用が期待されます。

【論文基礎情報】

<p>掲載誌情報</p>	<p>雑誌名 FEBS Letters          発表媒体 <input checked="" type="checkbox"/> オンライン速報版 <input type="checkbox"/> ペーパー発行 <input type="checkbox"/> その他          雑誌の発行元国 イギリス          オンライン閲覧 可 (URL)  <a href="https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.70033">https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.70033</a>          掲載日 2025年3月24日 (日本時間)</p>
<p>論文情報</p>	<p>論文タイトル (英・日)          Clioquinol induces mitochondrial toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells by affecting the respiratory chain complex IV and OPA1 dynamin-like GTPase          (クリオキノールは神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、呼吸鎖複合体 IV とダイナミン様 GTP アーゼ OPA1 に悪影響を及ぼすことによりミトコンドリア毒性を誘発する)          代表著者          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          共同著者          国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 荒川憲昭          京都府立医科大学大学院医学研究科 分子病態病理学 矢追 毅          国立病院機構 鈴鹿病院 (En's Lab CEO) 木村 円          京都府立医科大学大学院医学研究科 病態分子薬理学          (現・和歌山県立医科大学 薬学部 病院薬学研究室) 松本みさき          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          京都府立医科大学大学院医学研究科 病態分子薬理学 楳村敦詩          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</p>
<p>研究情報</p>	<p>研究課題名 キノホルムによる薬害スモン発症機構に関する研究          代表研究者 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          共同研究者 共同著者と同様          資金的関与 (獲得資金等)  <ul style="list-style-type: none"> <li>● 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 (20FC2004、23FC2001)</li> <li>● 科学研究費補助金・基盤研究 (C) (24K10039)</li> </ul> </p>

## 【論文概要】

### 1 研究分野の背景や問題点

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す。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年にスモン患者の多くで緑色の舌苔、緑便、緑尿が認められることが注目され、緑尿の成分分析の結果、緑色物質の本体は当時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ました。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ました。しかしそれから半世紀以上が経過したにもかかわらず、キノホルムによるスモン発症のメカニズムは未解明のままです。

一方、キノホルムは金属イオンを介する蛋白の凝集を抑えることから、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が多系統萎縮症の希少疾病用医薬品として承認されています。こうした化合物による新たな薬害の阻止と、より安全な薬剤開発のためには、キノホルムの神経毒性の分子基盤の解明は必須です。

これまで著者らは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、1) キノホルムの細胞毒性には、DNA二本鎖切断によるATMの活性化及び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、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、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、4) キノホルムが細胞内に亜鉛を流入させるとともに、銅シヤペロン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神経伝達物質ノルアドレナリンの生合成を阻害することなどを見出し報告してきました。

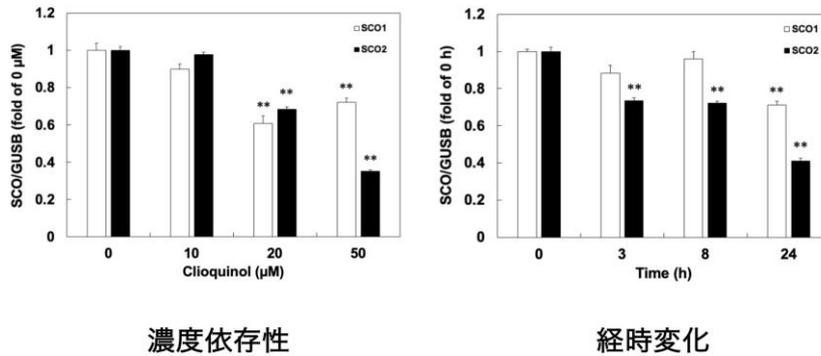
VGF由来神経ペプチドやIL-8が腹痛等のスモンの初期症状のみならず、引き続いて起こる感覚異常や視神経炎にも関与していた可能性が考えられます。ノルアドレナリン合成の阻害は、交感神経系や青斑核から脊髄後角への下行性疼痛抑制系の機能障害につながる可能性があります。スモンの初期症状である猛烈な腹痛は、副交感神経系の過剰亢進による腸管収縮に由来していた可能性が考えられます。また下行性疼痛抑制系の機能障害がスモンにおける感覚異常の一因であった可能性も考えられます。

## 2 研究内容・成果の要点

先の研究から、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ました。

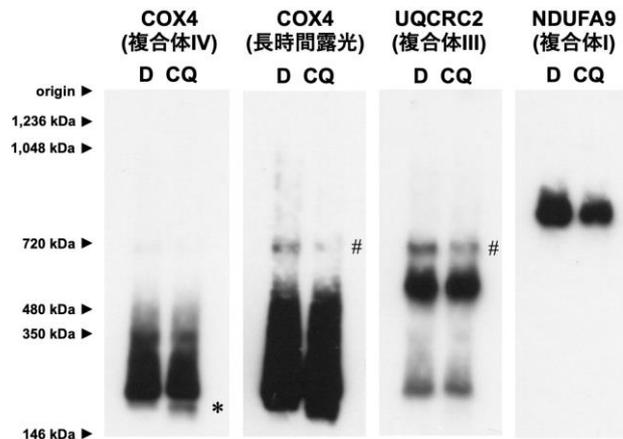
網羅的解析および定量 PCR の結果、キノホルムは 20  $\mu\text{M}$  以上の濃度でミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ) に銅を運搬し複合体形成を促す SCO1 と SCO2 の発現を mRNA レベルで抑制することがわかりました (図 1)。

図1 キノホルムによるSCO1/2 mRNAの発現抑制



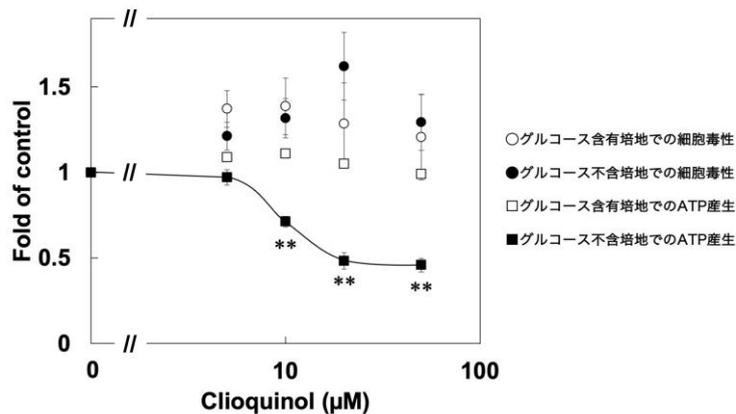
非変性条件下でタンパクを複合体として検出できる High resolution clear native PAGE において、抗 COX4 抗体で検出される複合体 IV のスミアなバンドはキノホルム刺激したサンプルでは強度が低下しました。また抗 UQCRC2 抗体でも高分子側の同じ位置に検出される複合体 III と複合体 IV の超複合体と考えられるバンドもキノホルム刺激により強度が低下しました (図 2)。また複合体 IV の酵素活性を測定したところ、キノホルムは 20  $\mu\text{M}$  以上の濃度でその活性を低下させました。

図2 キノホルムによる呼吸鎖複合体IVの形成抑制



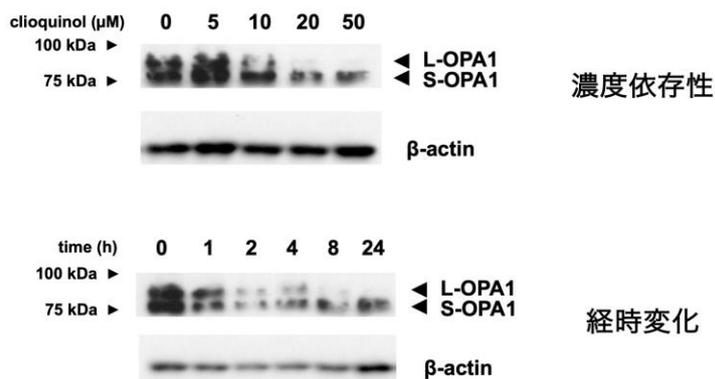
グルコース不含培地で、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を測定したところ、キノホルムは 10  $\mu\text{M}$  以上の濃度で ATP 産生を有意に抑制しました。しかし同じ 2 時間の刺激では有意な細胞毒性（細胞膜の完全性の破綻）は認められなかったことから、キノホルムがミトコンドリア毒性を示すことが明らかとなりました（図 3）。

図3 キノホルムによるATP産生の抑制



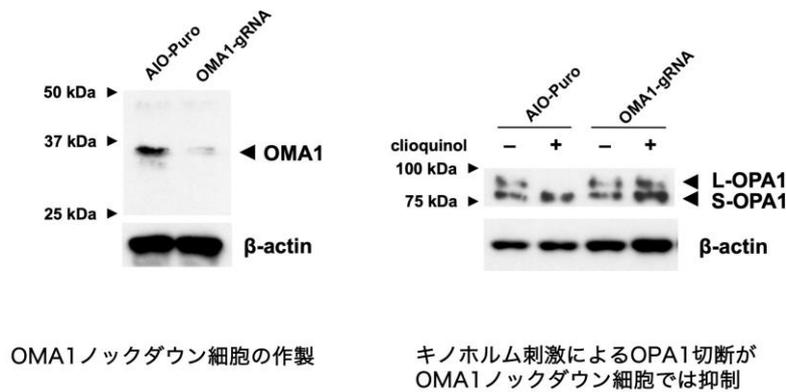
OPA1 はミトコンドリア内膜の融合とクリステの構造維持に関わるダイナミン様 GTP アーゼであり、L-OPA1 から S-OPA1 への切断によりその活性を失います。キノホルムが OPA1 の切断を引き起こすのではないかと考え、ウエスタンブロット法により解析したところ、キノホルムは 10  $\mu\text{M}$  以上の濃度で L-OPA1 から S-OPA1 への切断を引き起こしました。経時変化を観察したところ、刺激 8 時間以降で S-OPA1 への切断が観察されました（図 4）。

図4 キノホルムによるOPA1の切断



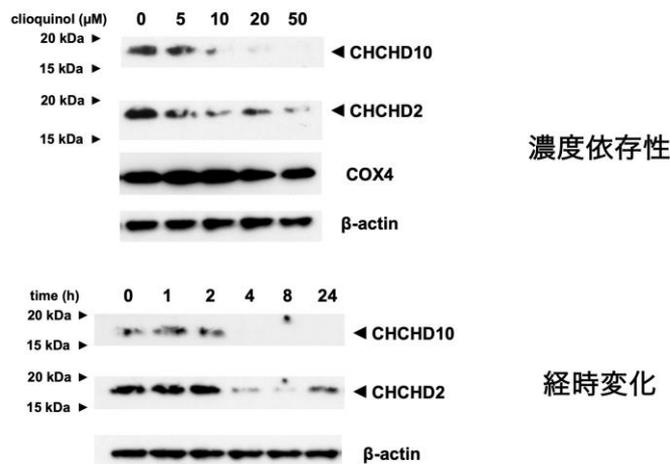
OPA1 の切断には、ミトコンドリア膜間腔に局在し、刺激によって活性化されるプロテアーゼ OMA1 の関与が知られています。そこでゲノム編集により OMA1 をノックダウンした細胞を作製したところ、キノホルムによる S-OPA1 への切断が抑制されました (図 5)。

図5 キノホルム刺激によるOPA1切断への  
OMA1の関与



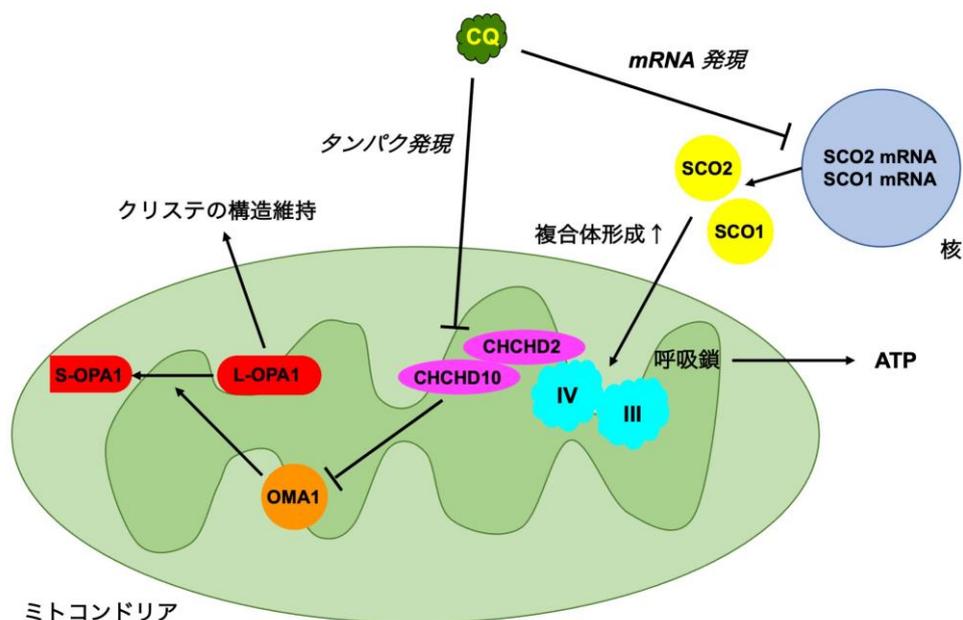
キノホルムによる OPA1 の切断に OMA1 が関与していたので、次に2つのミトコンドリアタンパク CHCHD10 と CHCHD2 に着目しました。両者は複合体 IV の活性を増強することが知られています。また CHCHD10 の変異は筋萎縮性側索硬化症並びに前頭側頭型認知症と、また CHCHD2 の変異はパーキンソン病と連関することが報告されています。さらに両遺伝子を欠損させたマウスでは OMA1 が活性化され OPA1 が切断されているとの報告があります。そこでキノホルムによる CHCHD10 と CHCHD2 の発現変化をウエスタンブロット法により解析したところ、両者とも 10 μM 以上の濃度のキノホルムで発現が抑制されました。経時変化を調べたところ、キノホルム刺激 4 時間で両者の発現は抑制されました (図 6)。

図6 キノホルムによるCHCHD10/2の発現抑制



以上のことから、キノホルムは 1) SCO1、SCO2 の発現を mRNA レベルで抑制し、呼吸鎖複合体 IV の形成と酵素活性を抑制すること、2) CHCHD10、CHCHD2 の発現をタンパクレベルで抑制し、OMA1 の活性化を介してクリステの構造維持に関わる OPA1 の切断を引き起こすこと、により、ミトコンドリア毒性を誘発することが明らかとなりました (図 7)。

図7 キノホルムによるミトコンドリア毒性



### 3 今後の展開と社会へのアピールポイント

本研究はキノホルムの神経毒性の一端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全容解明にまた一歩近づいたものと考えています。

本研究が今も後遺症に苦しんでおられるスモン患者さんの治療にすぐさま結びつくわけではありません。しかし、キノホルム誘導体が多系統萎縮症などの神経変性疾患に対して臨床応用されつつあることから、**今回発見したキノホルムによるミトコンドリア毒性発現機序は、より安全な神経変性疾患治療薬の開発に有益な情報を提供するものでもあります。**

スモン発症メカニズムの解明は、スモンが多発した我が国の研究者の責務であり、また科学立国・日本の研究者として、何としても成し遂げなければならないことだと考えています。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。

<p>&lt;研究に関すること&gt;          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</p>	<p>&lt;広報に関すること&gt;          事務局企画広報課 担当 : 堤          電話 : 075-251-5804          E-mail : kouhou@koto.kpu-m.ac.jp</p>
---	---