

ミトコンドリア阻害剤誘発性の細胞死に対する活性型ビタミン K₂ 誘導体の効果

土岐 衣梨奈

福岡大学薬学部創剤学研究室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Suppressive effect of active form of vitamin K₂ derivatives on mitochondrial inhibitor-induced cell death

Erina TOKI

Department of Formulation Design, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Mitochondria, which synthesize ATP, are particularly concentrated in highly energy-dependent tissues such as the brain and muscle, and their dysfunction is involved in the development of Alzheimer's and Parkinson's disease. Menaquinone-4 (MK-4), a vitamin K₂ homolog, is involved in the mitochondrial electron transport chain. In our previous study, we synthesized the menahydroquinone-4 (MKH) ester derivative and reported that it exhibits better intracellular delivery than MK-4. In this study, we investigated the effects of MKH derivatives on mitochondrial inhibitor-induced cell death. Both MK-4 and MKH derivatives suppressed cell death induced by rotenone (ROT, complex I inhibitor) and decreased mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) overproduction, and intracellular CoQ₉ levels. In addition, MKH derivatives functioned as MKH prodrugs in NIH/3T3 cells. Furthermore, MK-4 and MKH derivatives attenuated the cytotoxicity induced by 3-nitropropionic acid (3-NP, complex II inhibitor) and carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP, uncoupler). In conclusion, MK-4 and MKH derivatives protect NIH/3T3 cells by suppressing mitochondrial dysfunction, using delivered MKH.

Keywords : Mitochondria, NIH/3T3 cells, Rotenone, Vitamin K₂, Menaquinone-4, Menahydroquinone-4, Prodrug

【緒言/目的】

ミトコンドリアは生命維持に不可欠な細胞内小器官であり、電子伝達系の働きにより脂質二重膜の膜間腔に形成されるミトコンドリア膜電位 (MMP) を駆動力に ATP 合成を行う。脳や筋肉などのエネルギー依存度の高い組織にミトコンドリアは特に集中しており、その機能不全はアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの発症に関与していると考えられている¹⁻³。したがって、ミトコンドリアに焦点を当てることは、不治の病への効果的な治療薬の開発に繋がるのが期待できる。

ビタミン K₂ の一種であるメナキノン-4 (MK-4) は、2 電子還元されてメナヒドロキノン-4 (MKH) となり、血液凝固や骨形成に関与する γ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補因子として機能し⁴、MK-4 エポキシド (MKO) に変換される (Fig. 1)。この機能により、MK-4 は骨粗鬆症治療薬や血液凝固薬として臨床使用されている。最近の研究では、MK-4 がミトコンドリア電子伝達系に関与し得ることが報告されているが^{5,6}、一方で、MK-4 はミトコンドリア電子伝達系でコエンザイム Q (CoQ) の機能を代替

できないことが報告されている⁷。依然として、ミトコンドリア機能不全に対するMK-4の有効性には議論の余地がある。

MK-4は骨粗鬆症患者への長期投与による安全性が確認されている⁸。よって、ミトコンドリア機能不全に対する有効性を証明できれば、それらが要因となる疾患をターゲットとした安全かつ有効な治療・予防薬開発に貢献できることが期待される。しかしMK-4の活性体は還元型のMKHであり、従来のMK-4の投与では、効果が不十分であることが予測される。

これまでに我々は、MKHのエステル誘導体、MKH-1,4-bis-N,N-dimethylglycinate hydrochloride (MKH-DMG) およびMKH-1,4-bis-hemi-succinate (MKH-SUC) を合成し、培養細胞と動物においてMKHプロドラッグとして機能し、MK-4より優れた細胞内送達性を示すことを報告している⁹⁻¹²。本研究では、ミトコンドリア阻害剤誘発性細胞死に対するMKH誘導体の効果を検討した。

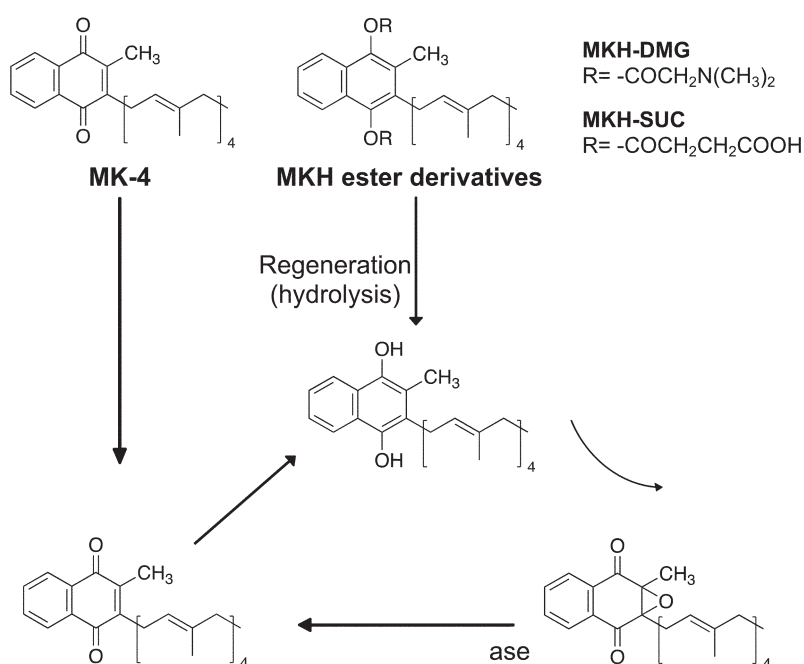


Fig. 1 Schematic illustration of the vitamin K cycle.

VK, vitamin K; MK-4, menaquinone-4; MKH, menahydroquinone-4; MKO, menaquinone-4 epoxide; VKDP, vitamin K-dependent protein; GGCX, γ -glutamyl carboxylase.

【実験方法】

細胞生存試験

マウス線維芽細胞NIH/3T3を 1.0×10^4 /wellの密度で96-well black plateに播種し24時間培養した。次にロテノン (ROT, 10 μ M), 3-ニトロプロピオン酸 (3-NP, 2.5 mM), カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP, 10 μ M) をそれぞれ0.03–3 μ MのMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUCと24時間併用処理した。細胞生存率は、CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (CTB) を使用して測定した。

ミトコンドリア膜電位 (MMP) の測定

NIH/3T3細胞をcollagen- I coated glass dish (IWAKI, AGC TECHNO GLASS株式会社) に 2.5×10^5 cell/wellの密度で播種し24時間接着させ、10 μ M ROT存在下で3 μ MのMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUC

を6時間処理した。MMPの測定はJC-1 MitoMP Detection Kitを使用して評価した。

細胞内活性酸素種 (ROS) 量の測定

NIH/3T3細胞をcollagen- I coated 96-well black plateに 1.0×10^4 cell/wellの密度で播種し24時間培養した。その後、ROTの存在下で $3 \mu\text{M}$ のMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUCを6時間処理した。細胞内ROS量は2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)を使用して測定し、CTB試薬により算出した細胞生存率で標準化した。

細胞内MKH量およびCoQ₉/CoQ₉H₂量の測定

NIH/3T3細胞を6-well plate (TPP)に 3.0×10^5 cells/dishの密度で播種し24時間培養した。次に、 $10 \mu\text{M}$ のROTと $3 \mu\text{M}$ のMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUCを6時間併用処理した。培地を除去しPBSで2回洗浄後、細胞をPBS中1 mLに集めて氷上で超音波処理を行った。細胞懸濁液を等量のエタノールおよび3倍量のn-ヘキサンと混合して2分間ボルテックスし、 $1750 \times g$ で10分間遠心分離した。窒素ガスで濃縮後、残留物をエタノールで再溶解し、LC-MS/MSにより分析した。

【結果】

ROT誘発性NIH/3T3細胞死に対するMK-4およびMKH誘導体の抑制効果

ROTはミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの阻害剤であり、ラットに慢性投与するとドーパミン作動性ニューロンの変性を引き起こし、パーキンソン病の病理学的特徴を再現する¹³。したがって、ROTはミトコンドリア機能障害治療薬を探索するための実験モデル作製に広く用いられている。

MK-4およびMKH誘導体のミトコンドリア機能障害に対する有効性を検証するため、ROT誘発性細胞死に与える影響を評価した。その結果、ROT単独添加群では細胞生存率の有意な減少がみられ、MK-4およびMKH誘導体併用群では $0.3 \mu\text{M}$ の濃度でROT誘発性の細胞生存率減少が抑制された (Fig. 2)。

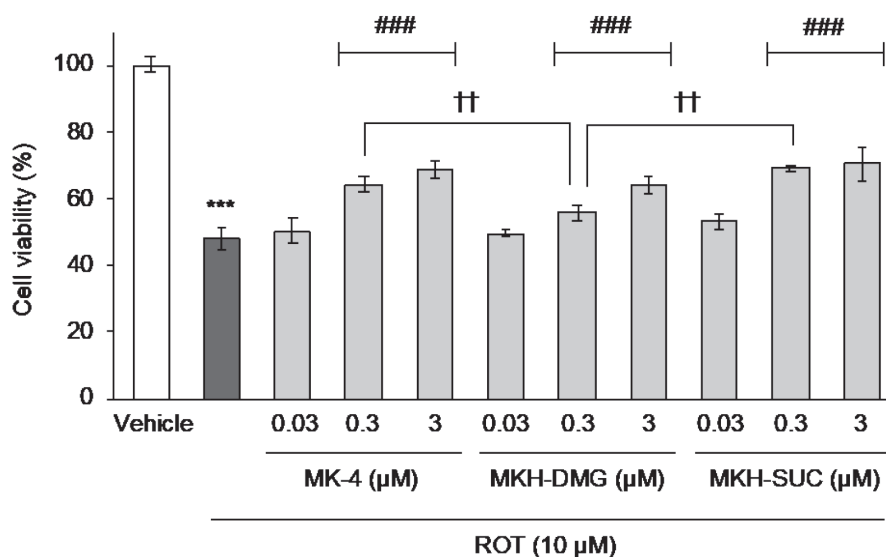


Fig. 2 Suppressive effect of MK-4 and MKH derivatives on ROT-induced cell death.

NIH/3T3 cells were treated with 0.03-3 μM MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 24 h in the presence of 10 μM ROT. *** $p < 0.001$ vs vehicle; ### $p < 0.001$ vs ROT; †† $p < 0.01$ vs 0.3 μM MKH-DMG (Tukey's test). Mean \pm SD (n=3).

ミトコンドリア機能障害と酸化ストレスに対するMK-4およびMKH誘導体の影響

正常なミトコンドリアでは、内膜を境に形成される高いMMPを駆動力にATPが産生されている。また、ATP産生過程では、常時ROSが発生しており、細胞に備わる抗酸化機能により恒常的に調整されている。ROTは呼吸鎖複合体Iの阻害により、ミトコンドリア機能に障害を与え、MMP低下やROSの過剰産生による酸化ストレスを引き起こす¹⁴。そこで、MK-4およびMKH誘導体がMMPやROSに対して及ぼす影響を評価した。ROT単独添加によりMMPの低下とROS量の増加が認められたが、MK-4およびMKH誘導体はMMP低下とROS量の増加を抑制した (Fig 3 a, 3b)。

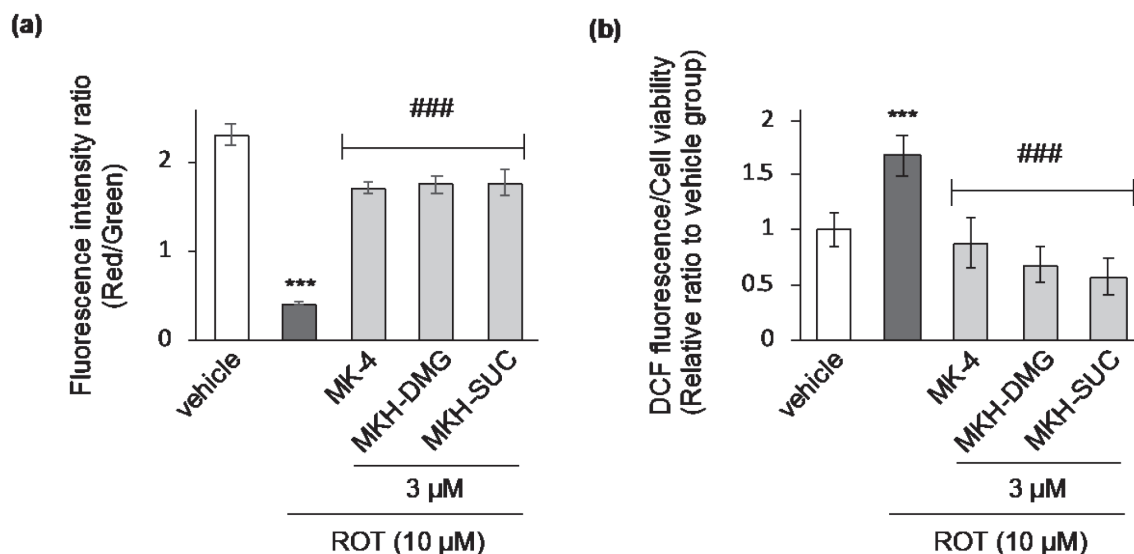


Fig. 3 Influence of MK-4 and MKH derivatives on ROT-induced MMP depression and ROS overproduction. NIH/3T3 cells were treated with 3 μM MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 6 h in the presence of 10 μM ROT. MMP was evaluated by JC-1 staining (a), intracellular ROS levels were determined by DCFH-DA staining (b). *** p<0.001 vs vehicle; ### p<0.001 vs ROT (Tukey's test). Mean ± SD (n=3).

MKHの細胞内送達性と内因性CoQ₉/CoQ₉H₂量の変化

MK-4の活性型はMKHであり、細胞内に送達されたMKHがミトコンドリアに対して効果を発揮していると考えられる。NIH/3T3細胞に対するMKH細胞内送達性を評価するために、細胞内MKH量をLC-MS/MSにて測定した。ただし、MKHは酸化されやすく直接測定するのは困難であるため、MKO量を細胞内に送達されたMKH量として評価した。MK-4およびMKH誘導体によるMKHの細胞内送達は、薬物処理6時間後にMKH-SUC > MK-4 > MKH-DMGの順で高かったのに対し (Fig. 4a), 24時間後はMKH-DMG > MK-4 ≒ MKH-SUCであった (Fig. 4b)。NIH/3T3細胞内で、MKH-SUCのエステル加水分解が速く、MKH-DMGは緩徐であることが影響していると考えられた。

また、ROTは呼吸鎖複合体IにおいてNADHデヒドロゲナーゼと結合し、CoQからCoQH₂への還元を阻害する¹⁵。CoQH₂は生体にとって重要な抗酸化物質である^{16,17}。そこで、マウスの内因性CoQ₉に与えるROTとMK-4およびMKH誘導体の影響を評価するために、細胞内CoQ₉量とCoQ₉H₂量をLC-MS/MSで測定した。ROT単独添加群の細胞内CoQ₉量およびCoQ₉H₂量はROT非添加群と比較して著しく低下した (Fig. 4c, 4d)。MK-4およびMKH誘導体は、細胞内CoQ₉量の減少を有意に抑制したが (Fig. 4c), 一方でCoQ₉H₂量にほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 4d)。この結果から、MK-4およびMKH誘導体はCoQ₉H₂の抗酸化作用とは無関係に、ミトコンドリア機能を正常な状態に維持することが示唆された。

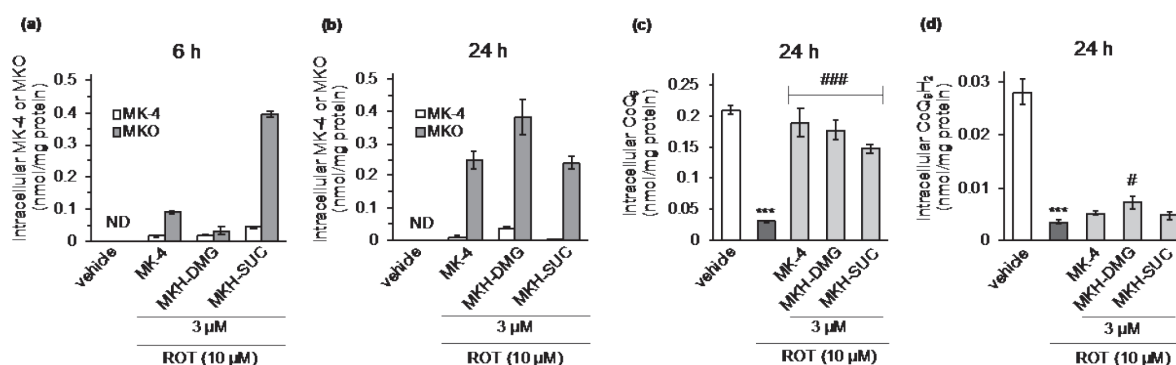


Fig. 4 Intracellular MK-4, MKO, and native CoQ₉/CoQ₉H₂ levels.

NIH/3T3 cells were treated with 3 μM MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 6 h or 24 h in the presence of 10 μM ROT. Intracellular MK-4 or MKO levels at 6 h (a) and 24 h (b), CoQ₉ levels (c) and CoQ₉H₂ levels (d) at 24 h.*** p < 0.001 vs vehicle; ### p < 0.001 vs ROT; # p < 0.05 vs ROT (Tukey's test). Mean ± SD (n = 3).

呼吸鎖複合体II阻害剤および脱共役剤誘発性細胞死に対するMK-4およびMKH誘導体の抑制効果

ROT以外のミトコンドリア阻害剤として、3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) およびカルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) を用いて検討を行った。3-NPは呼吸鎖複合体IIのコハク酸脱水素酵素を不可逆的に阻害し、ラットへの投与で選択的な線条体病変が生じることから、ハンチントン病のモデル作製に用いられる¹⁸。CCCPは脱共役剤であり、ミトコンドリア膜間腔のH⁺をマトリックスへ流入させることでMMPを消失させ、電子伝達系とATP合成酵素の共役を阻害する。各阻害剤とMK-4およびMKH誘導体 (0.03-3 μM) を併用処理し、24時間後の細胞生存率を測定したところ、3-NP (2.5 mM) およびCCCP (10 μM) の細胞毒性をMK-4およびMKH誘導体は有意に軽減した (図5a,5b)。

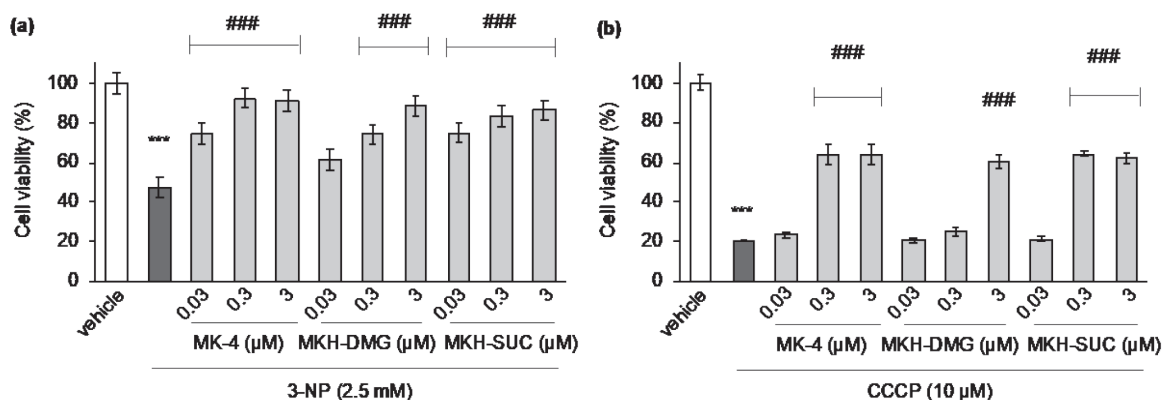


Fig. 5 Suppressive effect of MK-4 and MKH derivatives on cell death induced by complex-II inhibitors and uncoupler. NIH/3T3 cells were treated with 0.03-3 μM MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 24 h in the presence of 2.5 mM 3-NP (a), 10 μM CCCP (b). *** p < 0.001 vs vehicle; ### p < 0.001 vs 3-NP or CCCP (Tukey's test). Mean ± SD (n = 3).

【考察】

MK-4およびMKH誘導体は、呼吸鎖複合体 I 阻害剤 ROT によって誘導される細胞死に対して部分的な抑制効果を示した。ROTはCoQ₉の絶対量低下に伴うROSの過剰産生によりMMP低下を誘発することでミトコンドリア機能障害を与え、MK-4およびMKH誘導体はその一連の反応を抑制することによりROT毒性から細胞を保護したと推測される。呼吸鎖複合体 II 阻害剤 3-NP および脱共役剤 CCCP によって誘導される細胞死に対しても、MK-4 および MKH 誘導体は部分的な抑制効果を示すが、これらに対する効果がROSレベルの正常化に起因するかさらなる検証が必要である。

本研究により、NIH/3T3細胞を用いてMKH誘導体のミトコンドリア機能不全に対する効果を評価し、その詳細なメカニズムを解明したことで、様々な臓器由来の細胞を用いた、より発展的な開発研究の基盤を構築できたと考える。

【参考文献】

- 1 Henchcliffe, C. & Beal, M. F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology* **4**, 600-609, doi: 10.1038/ncpneuro0924 (2008).
- 2 Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N. & Brouillet, E. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1802**, 52-61, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.012 (2010).
- 3 Yan, M. H., Wang, X. L. & Zhu, X. W. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine* **62**, 90-101, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014 (2013).
- 4 Tie, J. K. & Stafford, D. W. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **14**, 236-247, doi: 10.1111/jth.13217 (2016).
- 5 Vos, M. *et al.* Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science* **336**, 1306-1310, doi: 10.1126/science.1218632 (2012).
- 6 Bhalerao, S. & Clandinin, T. R. Vitamin K-2 Takes Charge. *Science* **336**, 1241-1242, doi: 10.1126/science.1223812 (2012).
- 7 Cerqua, C. *et al.* Vitamin K2 cannot substitute Coenzyme Q (10) as electron carrier in the mitochondrial respiratory chain of mammalian cells. *Scientific Reports* **9**, doi: 10.1038/s41598-019-43014-y (2019).
- 8 Orimo, H. *et al.* Effects of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: A double-blind placebo-controlled study. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **16**, 106-112, doi: 10.1007/s007740050034 (1998).
- 9 Setoguchi, S. *et al.* Enhanced Antitumor Effects of Novel Intracellular Delivery of an Active Form of Menaquinone-4, Menahydroquinone-4, into Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Prevention Research* **8**, 129-138, doi: 10.1158/1940-6207.capr-14-0292 (2015).
- 10 Setoguchi, S. *et al.* Antitumor Effects and Delivery Profiles of Menahydroquinone-4 Prodrugs with Ionic or Nonionic Promoiety to Hepatocellular Carcinoma Cells. *Molecules* **23**, doi: 10.3390/molecules23071738 (2018).
- 11 Goto, S. *et al.* Prodrugs for Skin Delivery of Menahydroquinone-4, an Active Form of Vitamin K-2 (20), Could Overcome the Photoinstability and Phototoxicity of Vitamin K-2 (20). *International Journal of Molecular Sciences* **20**, doi: 10.3390/ijms20102548 (2019).
- 12 Yamakawa, H. *et al.* Growth Inhibitory Effects of Ester Derivatives of Menahydroquinone-4, the Reduced Form of Vitamin K-2 (20), on All-Trans Retinoic Acid-Resistant HL60 Cell Line. *Pharmaceutics* **13**,

- doi: 10.3390/pharmaceutics13050758 (2021).
- 13 Betarbet, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* **3**, 1301-1306, doi: 10.1038/81834 (2000).
 - 14 Condello, S. *et al.* Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF-kappa B activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* **116**, 67-75, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07085.x (2011).
 - 15 Singer, T. P. & Ramsay, R. R. THE REACTION SITES OF ROTENONE AND UBIQUINONE WITH MITOCHONDRIAL NADH DEHYDROGENASE. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1187**, 198-202, doi: 10.1016/0005-2728(94)90110-4 (1994).
 - 16 Takayanagi, R., Takeshige, K. & Minakami, S. NADH-DEPENDENT AND NADPH-DEPENDENT LIPID-PEROXIDATION IN BOVINE HEART SUB-MITOCHONDRIAL PARTICLES - DEPENDENCE ON THE RATE OF ELECTRON FLOW IN THE RESPIRATORY-CHAIN AND AN ANTIOXIDANT ROLE OF UBIQUINOL. *Biochemical Journal* **192**, 853-860, doi: 10.1042/bj1920853 (1980).
 - 17 Quinn, P. J., Fabisiak, J. P. & Kagan, V. E. Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q. *Biofactors* **9**, 149-154, doi: 10.1002/biof.5520090209 (1999).
 - 18 Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K. & Sanberg, P. R. 3-nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **21**, 289-293, doi: 10.1016/s0149-7634(96)00027-9 (1997).