

キノホルムによるインターロイキン8の発現誘導

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 センター)

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。我々は DNA チップを用い、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た。これまでにキノホルムが DNA 二本鎖切断による ATM-p53 経路の活性化を引き起こすことや、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。今回、キノホルムが好中球走化因子であ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、そのメカニズムについて解析した。

方法：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を定法により培養した。RNA を単離して逆転写を行い、定量 PCR によりキノホルムによる IL-8 mRNA 量の変化を測定した。培地中に放出される IL-8 量は ELISA キットを用いて定量した。ヒト IL-8 遺伝子のプロモーター領域を単離し、ルシフェラーゼベクターに挿入し、SH-SY5Y 細胞に導入して転写活性を測定した。

結果：SH-SY5Y 細胞において、50 μ M、24 時間のキノホルム刺激で IL-8 mRNA 量および IL-8 分泌量は有意に増加した。ヒト IL-8 遺伝子の転写開始点の上流約 -1.5 kb までを含むプロモーター領域で、キノホルムにตอบสนองして転写活性を示す配列は、転写開始点の上流 -152 塩基から -144 塩基の間に存在した。詳細な検討の結果、-152/-147 の GATA 結合配列と、-126/-120 の AP-1 サイトがキノホルムによる転写活性化に重要であることが判明した。

結論：キノホルムが IL-8 の発現誘導を引き起こすことが明らかとなった。IL-8 は好中球の遊走による炎症惹起や痛み反応に関わることで、キノホルムの神経毒性の一端を担う可能性が示唆された。

A. 研究目的

我が国で亜急性脊髄視神経ニューロパチー (スモン) という重篤な薬害をもたらしたキノホルム (一般名：クリオキノール) は、metal protein attenuating compounds (MPACs) の一種である。その腸内殺菌作用は菌体内の金属酵素の金属をキレートすることにより発揮されると考えられていた。一方キノホルムによるスモン発症の原因についてはビタミン B₁₂ の低下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る。

スモン患者に見られた緑色舌苔・緑尿・緑便の成分

がキノホルムの鉄イオンキレート化合物だったことから、スモン発症の原因に関しても、キノホルムが高い親和性を示す銅・亜鉛・鉄イオンに対するキレート作用を介する可能性もある。しかし一方、キノホルムの細胞毒性がこれらの金属イオンの添加で増強されることから、キノホルムはキレート剤ではなく細胞内にイオンを導入するイオノフォアであるとの考え方も存在する¹⁾。

MPACs である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や制がん作用が注目され、

医薬品としての価値が見直されている。オーストラリアの製薬企業がキノホルムを基に開発したPBT2はアルツハイマー病とハンチントン病に対して第2相試験が行われるまでに至ったが、一定の症状改善効果が認められたとする同社の報告に対して、結果の解釈に懐疑的な意見も存在する。また同社はパーキンソン病・運動障害、および脳腫瘍に対する類縁化合物も開発しており、それぞれ前臨床試験中と報じている。

このようにキノホルム類縁化合物の医薬品としての価値が見直されている昨今、キノホルムの神経毒性の分子基盤の解明は、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も必須である。

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²⁾。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前駆体VGFの発現を誘導することを見出した³⁾。さらにキノホルムが低酸素応答を引き起こすこと、神経細胞特異的に発現する転写因子Phox2bの発現を抑制すること、グリア系細胞に高発現する転写因子SOX9の発現を誘導することも見出している。

網羅的解析において、無刺激時には検出限界以下であった好中球走化因子・インターロイキン8 (IL-8)の発現が、キノホルム刺激により顕著に誘導されることを見出した。本研究ではその発現誘導のメカニズムについて解析した。

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。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。

【定量 PCR】

キノホルム存在下で培養した細胞とコントロールの細胞から、QIAGEN社のRNeasy Plus Mini Kitを用いてtotal RNAを抽出した。TOYOBO社のReverTra Ace qPCR RT Master MixとKOD SYBR qPCR Mixを用いて逆転写とPCR反応を行った。反応と解析はサーモサイエンティフィック社のStepOnePlusを用いて行った。段階希釈したプラスミドを対照に絶対定量を行い、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) の発現量を指標に補正を行った。

【IL-8 分泌量の測定】

SH-SY5Y 細胞 (1×10^5 cells/well) を24ウェルプレートで24時間培養した後、DMSOまたは50 μ Mのキノホルムを含有した500 μ lの新たな培地でさらに24時間培養した。培養上清中に分泌されるIL-8量をQuantikine ELISA Human IL-8/CXCL8 Immunoassay kit (R&D Systems社)を用いて定量した。

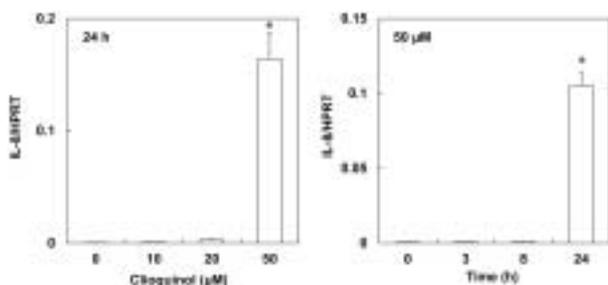
【転写活性の測定】

SH-SY5Y 細胞からIL-8遺伝子のプロモーター領域をPCRにより単離し、ルシフェラーゼベクターpNL1.2 (プロメガ社)に組み込んだ。24ウェルプレートで培養したSH-SY5Y細胞にTransIT-LT1 試薬 (Mirus社)を用いてベクターと導入効率補正用ベクターpGL4.54 (プロメガ社)を導入し、24時間後にキノホルムを添加してさらに24時間培養した。Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System (プロメガ社)を用い、細胞抽出液の転写活性を発光測定器 (Centro LB960、ベルトールド社)で測定した。GATA結合配列およびAP-1サイトへの変異を導入したレポーター遺伝子の作製は、変異を入れたPCRプライマー (GATA結合配列は5'-TGATAA-3'を5'-TctTAA-3'に、AP-1サイトは5'-TGACTCA-3'を5'-TGACTtg-3'に)を用いて行った。

C. 研究結果

【キノホルムによるIL-8 mRNAの発現誘導】

網羅的解析によってキノホルムによる顕著な発現誘導が認められたIL-8について、定量PCRにより発現



HPRT: hypoxanthine phosphoribosyl transferase

図1 キノホルムによるインターロイキン8 mRNAの発現誘導

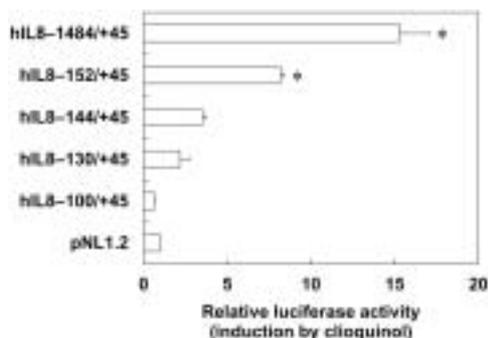


図3 キノホルムによるIL-8遺伝子の転写活性化

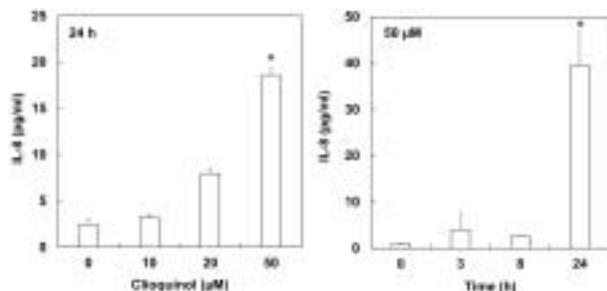


図2 キノホルムによるインターロイキン8の培養上清中への分泌

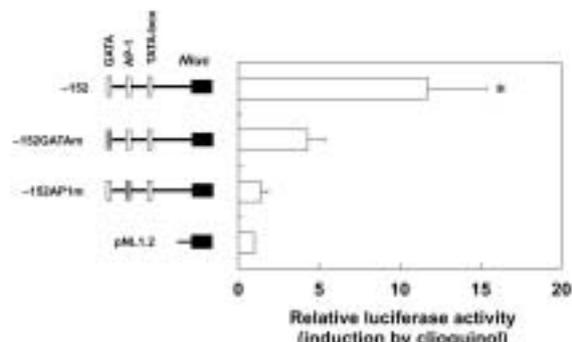


図4 GATA結合配列、AP-1サイトへの変異導入によるIL-8遺伝子のキノホルム応答性転写活性化の消失

変化の確認を行った。刺激24時間で用量依存性を調べたところ、10 μM以下の濃度では検出限界以下であったが、50 μMで有意なIL-8 mRNA量の増加を認めた。また50 μMのキノホルムで経時変化を調べたところ、刺激8時間までは検出限界以下であったが、24時間で顕著なIL-8 mRNA量の増加を認めた(図1)。

【キノホルムによるIL-8分泌量の増加】

キノホルム刺激により培養上清中に分泌されるIL-8量をELISA法により測定した。刺激24時間で用量依存性を調べたところ、50 μMで有意な分泌量の増加を認めた。また50 μMのキノホルムで経時変化を調べたところ、刺激24時間で顕著な分泌量の増加を認めた(図2)。

【キノホルムによるIL-8遺伝子の転写活性化】

ヒトIL-8遺伝子のプロモーター領域約1.5kbを単離してSH-SY5Y細胞における転写活性を測定した。キノホルムによる転写活性化に関与する領域は、転写開始点の上流-152から-144の間に存在した(図3)。-152/-147に存在するGATA結合配列、また-126/-120に存在するAP-1サイトに変異を導入したところ、キ

ノホルムによる転写活性化はほぼ認められなくなった(図4)。

D. 考察

キノホルムがIL-8の発現を転写レベルで誘導することが明らかとなった。

過去に述べたように、本研究で用いたキノホルムの濃度(50 μM)はスモン患者における血中濃度と乖離するものではない^{4,5)}。

IL-8は好中球走化因子であり、好中球の炎症部位への集積に中心的役割を果たすケモカインである。腸炎においてIL-8が粘膜下層神経から分泌されることが報告されている⁶⁾。また急性前部虚血性視神経症の患者において血中IL-8レベルが上昇していること⁷⁾、さらに抗がん剤パクリタキセルの副作用である末梢神経障害にIL-8が関与することが報告されている⁸⁾。これらの報告は、キノホルムによるIL-8の発現誘導が、腹痛・下痢といったスモンの初期症状に加え、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を示唆している。

今回の検討で、IL-8 遺伝子のプロモーター領域に存在する GATA 結合配列および AP-1 サイトが、キノホルムによる IL-8 の発現誘導に重要であることが明らかとなった。我々はキノホルムが AP-1 転写因子である c-Jun と c-Fos の発現を誘導することを報告している³⁾。一方 6 種類存在する GATA 転写因子のうち、GATA-2、GATA-3、GATA-4 の 3 種類が SH-SY5Y 細胞に発現することが報告されている⁹⁾。これらの転写因子のうちのどれが IL-8 の発現誘導に関与するのか、今後明らかにしていく予定である。

E. 結論

キノホルムが IL-8 の発現誘導を引き起こすことが明らかとなった。IL-8 は好中球の遊走による炎症惹起や痛み反応に関わることで、キノホルムの神経毒性の一端を担う可能性が示唆された。

G. 研究発表

2. 学会発表

勝山真人, 矢部千尋. 薬害スモンを引き起こしたクリオキノールによる遺伝子発現の変化とその意義. ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会合同大会). 2017 年 12 月 7 日. 神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Ding WQ, Liu B, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res.* 2005; 65: 3389-3395.
- 2) 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.
- 3) Katsuyama M, Ibi M, Matsumoto M, Iwata K, Ohshima Y, Yabe-Nishimura C. Clioquinol increases the expression of VGF, a neurotrophic

precursor, through induction of c-Fos expression. *J Pharmacol Sci.* 2014; 124: 427-432.

- 4) Egashira Y, Matsuyama H. Subacute myelo-optico-neuropathy (SMON) in Japan. With special reference to the autopsy cases. *Acta Pathologica Japonica.* 1982; 32 Suppl 1: 101-116.
- 5) Jack DB, Riess W. Pharmacokinetics of iodochlorhydroxyquin in man. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1973; 62: 1929-1932.
- 6) Tixier E, Lalanne F, Just I, Galmiche JP, Neunlist M. Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. *Cell Microbiol.* 2005; 7: 1798-1810.
- 7) Goldenberg-Cohen N, Kramer M, Bahar I, Monselise Y, Weinberger D. Elevated plasma levels of interleukin 8 in patients with acute anterior ischaemic optic neuropathy. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 1538-1540.
- 8) Brandolini L, Benedetti E, Ruffini PA, Russo R, Cristiano L, Antonosante A, et al. CXCR1/2 pathways in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Oncotarget.* 2017; 8: 23188-23201.
- 9) Wallach I, Zhang J, Hartmann A, van Landeghem FK, Ivanova A, Klar M, et al. Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells. *Pediatr Res.* 2009; 65: 619-624.