

キノホルムによる転写因子 GATA-2/3 の発現抑制を介した 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ところ、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た。プロモーター解析の結果、GATA 結合配列と 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。今回、キノホルムによる IL-8 の発現誘導のメカニズムについてさらに詳細に解析した。

「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。ウエスタンブロット法により転写因子の発現を、ゲルシフトアッセイにより転写因子の結合を検出した。レンチウイルスベクターを用い、ゲノム編集を利用した転写因子のノックダウン細胞、および転写因子の強制発現細胞を樹立した。

「結果」

転写因子 GATA-2 と GATA-3 の発現量はキノホルム刺激により減少した。ゲルシフトアッセイでは、キノホルム刺激により c-Jun と c-Fos の AP-1 サイトへの結合は増加し、GATA-3 の GATA 結合配列への結合は減少した。GATA-2 または GATA-3 のノックダウンにより、キノホルムによる IL-8 mRNA の発現誘導が増強された。一方 GATA-2 または GATA-3 の強制発現により、キノホルムによる IL-8 の分泌が抑制された。

「結論」

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 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 は腸炎、視神経炎、神経因性疼痛への関与が報告されており、キノホルムにより発現が誘導された 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分子レベルでの究明がなさ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。また同社は別のキノホルム類縁化合物・PBT434について、パーキンソン病・運動障害に対して第1相試験を実施中である。

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⁾。

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。昨年度報告したように、50 μ M、24時間のキノホルム刺激で有意なIL-8 mRNA量の増加と培養上清中へのIL-8分泌の増加が認められた。またプロモーター解析の結果、*IL-8* 遺伝子の転写開始点の上流-152/-147に存在するGATA結合配列と、-126/-120に存在する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明らかとなった。

本研究ではその発現誘導のメカニズムについてさらに詳細に解析した。

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。

【ウエスタンブロット】

細胞から総蛋白を抽出し、定法により SDS-PAGE とウエスタンブロットを行った。転写因子を検出した後 strip を行い、 β -actin の検出を行った。

【ゲルシフトアッセイ】

ヒト *IL-8* 遺伝子の -152/-147 の GATA 結合配列と -126/-120 の AP-1 サイトを含むオリゴヌクレオチドを合成し、アニールさせて二本鎖のプローブを作製した。センス鎖の配列は 5'- CCGTATTTGATAAGGAACA AATAGGAAGTGTGATGACTCAGGTTTGC-3' とし、GATA 結合配列と AP-1 サイトの一方または両方に変異 (GATA 結合配列は 5'-TGATAA-3' を 5'-TctTAA-3' に、AP-1 サイトは 5'-TGA CTCA-3' を 5'-TGA CTtg-3' に) を導入したプローブも作製した。5' 末端を [32 P]-ATP で標識し、SH-SY5Y 細胞の核抽出液と 25 で 30 分間反応させ、4% ポリアクリルアミドゲルで分離した。解析はイメージングアナライザー Fujix BAS 5000 を用いて行った。

【ゲノム編集】

転写因子に対するガイド RNA (gRNA) は CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp>) を利用して作製した。そのセンス鎖の配列は 5'-GTTGGCGTTTTCG GCGCCATA-3' (GATA-2)、5'-GATGGGGTGGTGGG TCGACG-3' (GATA-3)、5'-GGGCTCGCCTGTCAAC GCGC-3' (GATA-4)、5'-GCCTGCCACCGAGGCTAC CGC-3' (c-Jun)、5'-GGGCTCGCCTGTCAACGCGC-3' (c-Fos) とした。gRNA の配列に相当するオリゴヌクレオチドをレンチウイルスベクター pLentiCRISPR-E (Addgene 社) に組み込み、定法によりパッケージングを行い、SH-SY5Y 細胞へ感染させた。ピューロマイシン耐性細胞のプールをロックダウン細胞として用いた。標的転写因子のロックダウンはウエスタンブロット法により確認した。

【GATA-2/3 の安定発現細胞の樹立】

ヒト GATA-2/3 をコードする cDNA を PCR により増幅し、レンチウイルスベクター pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro (System Biosciences 社) に組み込んだ。SH-SY5Y 細胞への感染は上述の通り行った。

C. 研究結果

【キノホルムによる GATA-2/3 の発現抑制】

キノホルムによる *IL-8* 遺伝子の転写活性化への関与が示唆された AP-1 転写因子について、我々は既にキノホルムが c-Jun、c-Fos の発現を誘導することを報告している³⁾。一方 SH-SY5Y 細胞に発現する 3 種類の GATA 転写因子のうち、GATA-2 と GATA-3 はキノホルム刺激 (50 μ M、24 時間) により発現が有意に減少した (図 1)。

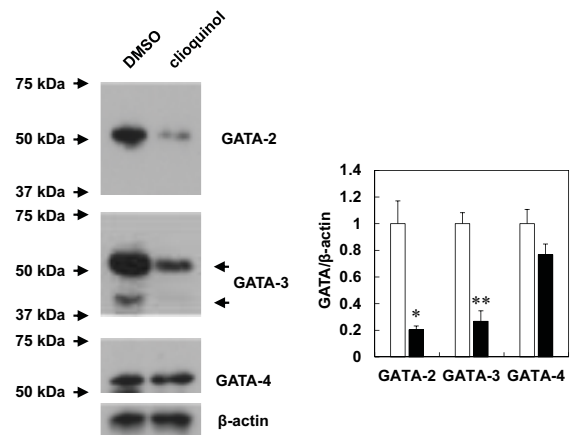


図 1 キノホルムによる GATA-2 と GATA-3 の発現抑制

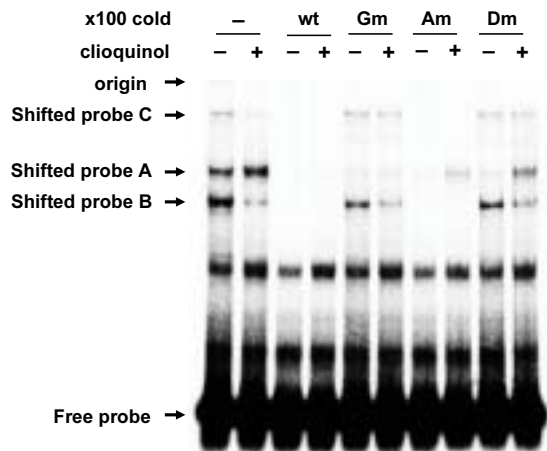


図 2 *IL-8* 遺伝子プロモーター領域への GATA 転写因子、AP-1 転写因子の結合

【キノホルムによる *IL-8* 遺伝子の AP-1 サイトへの c-Jun、c-Fos の結合促進と GATA-3 の GATA 結合配列への結合抑制】

ヒト *IL-8* 遺伝子の -152/-147 の GATA 結合配列と -126/-120 の AP-1 サイトを含むプローブを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、核蛋白の結合により高分子側にシフトするバンドが3本確認された (図2)。キノホルム刺激した細胞の核抽出液ではバンド A の強度は上昇したが、バンド B とバンド C の強度は低下した。変異を導入した非標識プローブの過剰添加実験を行ったところ、バンド A は AP-1 サイトへの、バンド B、C は GATA 結合配列への核蛋白の結合を反映するものであった。抗体を用いてスーパーシフトバンドの検出を試みたところ、キノホルム刺激により c-Jun と c-Fos の AP-1 サイトへの結合は増加し、GATA-3 の GATA 結合配列への結合は減少した (図3)。

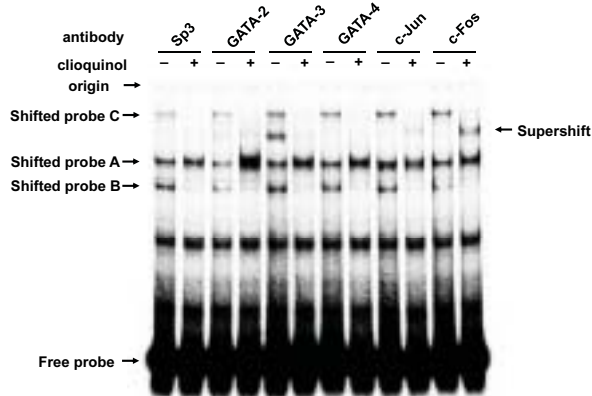


図3 *IL-8* 遺伝子プロモーター領域への GATA-3、c-Jun、c-Fos の結合

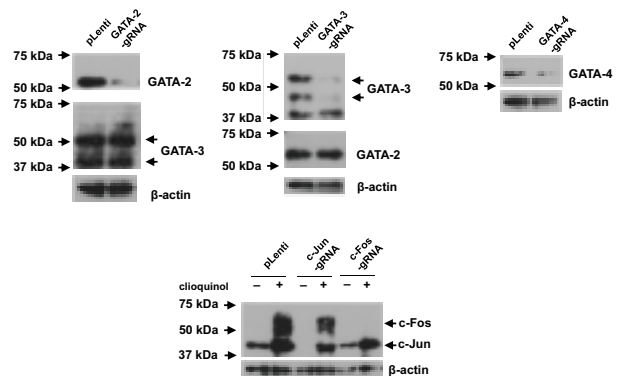


図4 GATA 転写因子、AP-1 転写因子のノックダウン

【GATA-2/3 のノックダウンによるキノホルム依存性 *IL-8* mRNA 発現誘導の増強】

GATA-2/3/4、c-Jun、c-Fos をそれぞれノックダウンした SH-SY5Y 細胞を樹立した (図4)。GATA-2 または GATA-3 のノックダウンによりキノホルムによる *IL-8* mRNA の発現誘導は有意に増強されたが、GATA-4、c-Jun、c-Fos のノックダウンは有意な変化をもたらさなかった (図5)。

【GATA-2/3 の過剰発現によるキノホルム依存性 *IL-8* 分泌の抑制】

GATA-2 または GATA-3 の過剰発現細胞を樹立したところ、キノホルムによる *IL-8* の分泌亢進が有意に抑制された (図6)。

D. 考察

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 *IL-8* の発現誘導を引き起こすことが明らかとなった。

GATA 転写因子は転写の活性化と抑制の両方にはたらくことが知られている。本研究結果は GATA-2/3

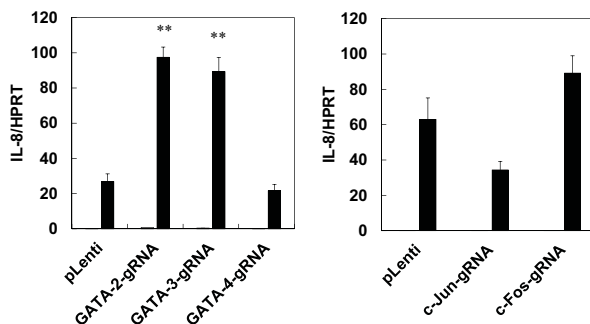


図5 GATA-2 または GATA-3 のノックダウンによるキノホルム依存性 *IL-8* mRNA 発現誘導の増強

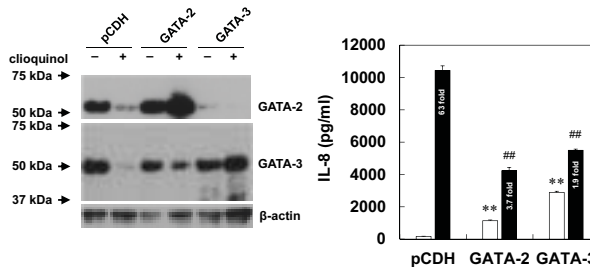


図6 GATA-2 または GATA-3 の過剰発現によるキノホルム依存性 *IL-8* 分泌の減弱

が IL-8 の発現に対して転写抑制因子としてはたらくことを示唆している。

プロモーター解析とゲルシフトアッセイの結果から、AP-1 転写因子もキノホルムによる IL-8 の発現誘導に関与することが示唆されたが、c-Jun/c-Fos のノックダウンでは IL-8 の発現誘導は抑制されなかった。このことから、キノホルムによる IL-8 の発現誘導に対しては、c-Jun/c-Fos の発現誘導よりも、転写抑制因子としてはたらく GATA-2/3 の発現抑制の方が寄与が大きいものと考えられる。

GATA-2/3 は神経発生に必須であり⁴⁾、GATA-3 は自発運動において、また交感神経系で重要な役割を果たすことが示唆されている^{5,6)}。このようにキノホルムによる GATA-2 および GATA-3 の発現抑制それ自体が神経の本質的な機能に悪影響を及ぼす可能性がある。また神経特異的転写因子 Phox2b を欠失させたマウスでは、GATA-2/3 の神経系での発現が見られないという報告がある⁷⁾。我々はキノホルムが Phox2b の発現を抑制することを見出しており、Phox2b の発現抑制が GATA-2/3 の発現抑制につながることも考えられる。

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⁸⁾。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⁹⁾。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¹⁰⁾、抗がん剤パクリタキセルが *IL-8* 遺伝子の転写を引き起こすこと¹¹⁾、さらに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¹²⁾。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。

E. 結論

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 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 は腸炎、視神経炎、神経因性疼痛への関与が報告されており、キノホルムにより発現が誘導された 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示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

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* 67, 296-304, 2018.

2. 学会発表

Katsuyama M, Yabe-Nishimura C. Clioquinol increases the expression of interleukin-8 by suppression of GATA-2 and GATA-3. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. July 5, 2018. Kyoto, Japan.

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 neuropeptide precursor, through induction of c-Fos expression. *J Pharmacol Sci.* 2014; 124: 427-432.
- 4) Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY, Orkin SH. Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol.* 1999; 210: 305-321.
- 5) Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y,

- Grosveld F, Engel JD. Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet.* 2000; 25: 209-212.
- 6) van Doorninck JH, van Der Wees J, Karis A, Goedknecht E, Engel JD, Coesmans M, et al. GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. *J Neurosci.* 1999; 19: RC12.
- 7) Tsarovina K, Pattyn A, Stubbusch J, Muller F, van der Wees J, Schneider C, et al. Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development.* 2004; 131: 4775-4786.
- 8) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1045-1049.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Lee LF, Haskill JS, Mukaida N, Matsushima K, Ting JP. Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol) -responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 5097-5105.
- 12) 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.