

キノホルムの神経毒性に関する基礎研究

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 部門)

研究要旨

我が国で亜急性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。キノホルム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ていたと考えられるが、キノホルムによるスモン発症のメカニズムは未だ明らかではない。

本研究班では主に培養神経系細胞を用い、キノホルムの神経毒性のメカニズムについて分子レベルで明らかにしてきた。またスモン患者と抗酸化酵素の遺伝子多型との相関についても研究を遂行している。さらにスモンのバイオバンクの構築にも着手した。

この3年間で得られた主な成果は以下の通りである。

- 1) 培養神経芽細胞腫において、キノホルムが転写因子 GATA-2/3 の発現抑制を介してインターロイキン 8 の発現を誘導することを明らかにした。
- 2) 培養神経芽細胞腫において、キノホルムが銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の発現やレドックス状態を変化させることを明らかにした。
- 3) 培養アストロサイトにおいて、キノホルムが引き起こすオートファジーが、autolysosome の形成不全を伴うものであることを見出した。
- 4) キノホルムが細胞障害を引き起こす濃度は、初代培養神経細胞においても体細胞や腫瘍細胞と同等であることが判明した。
- 5) キノホルムによる脊髄の興奮性シナプス伝達増強作用に関わるグルタミン酸放出に、電位依存性 N 型カルシウムチャンネルが関与することを明らかにした。
- 6) キノホルムはタウ蛋白のリン酸化とオリゴマー形成を抑制するとともに、オートファジーとユビキチン-プロテアソーム系の活性化を引き起こすことを見出した。
- 7) スモンとキノホルム酸化還元酵素 1 (NQO1) の C609T 多型との相関を解析したところ、現在の症例数では、スモン患者における C609T 多型の頻度と日本人の平均的頻度に有意な差は認められなかった。一方海外から発表された cAMP の輸送体である ABCC4、ABCC11 の日本人に多い遺伝子多型とスモンの発症頻度との相関の可能性については、完全に否定される結果が得られた。

【研究目的】

我が国で亜急性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の発症機構については分子レベルでの解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。一方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・運動障害に対する第1相試験を完了し、多系統萎縮症に対する希少疾病用医薬品（オーファンドラッグ）としての承認をアメリカ食品医薬品局（FDA）から既に取得している。

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昨今見直されている。本研究班では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、キノホルムの神経毒性の分子基盤の解明に取り組んでいる。

【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】

著者らは網羅的解析によって、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。

定量 PCR により発現変化の確認を行ったところ、検出限界以下であったものが 50 μ M、24 時間のキノホルム刺激で有意な IL-8 mRNA 量の増加を認めた。また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 法により測定したところ、50 μ M、24 時間のキノホルム刺激で顕著な分泌量の増加が観察された。

ヒト IL-8 遺伝子のプロモーター領域約 1.5 kb を単離して SH-SY5Y 細胞における転写活性を測定したところ、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。-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。

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、著者ら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²⁾。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。ヒト IL-8 遺伝子の -152/-147 の GATA 結合配列と -126/-120 の AP-1 サイトを含むプロンプ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。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ンプ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。

GATA-2/3/4、c-Jun、c-Fos をそれぞれノックダウンした SH-SY5Y 細胞を樹立したところ、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。一方 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。

以上のことから、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

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³⁾、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^{4,5)}。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⁶⁾。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⁷⁾。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⁸⁾。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⁹⁾、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¹⁰⁾、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¹¹⁾。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¹²⁾。

【キノホルムによる銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の発現とレドックス状態の変化】

著者らはキノホルムが銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の発現に与える影響を解析した。

キノホルムは、金属結合蛋白であり重金属から生体を防御する役割を持つメタロチオネインの 4 つのアイ

ソフォームのうち、MT-1 の 7 つのサブクラスと MT-2A の発現を顕著に増加させた。次に亜鉛トランスポーターに着目したところ、亜鉛排出輸送体 ZnT ファミリーのうち、細胞膜上に局在して細胞外に亜鉛を排出する SLC30A1 (ZnT1) の発現がキノホルムにより顕著に増加していた。一方亜鉛取り込み輸送体 ZIP ファミリーのうち、細胞膜上に局在して細胞内に亜鉛を取り込む SLC39A10 (ZIP10) の発現がキノホルムにより顕著に抑制されていた。定量 PCR により確認したところ、SH-SY5Y 細胞、IMR-32 細胞のどちらにおいても、キノホルム刺激 3 時間で既に SLC30A1 (ZnT1) mRNA の発現が顕著に誘導されていた。

これらの遺伝子発現の変化は、過剰な亜鉛により活性化される重金属依存性転写因子 MTF1 に依存するものと考えられる¹³⁻¹⁵⁾。重金属から生体を防御する役割を持つメタロチオネインの発現誘導は、キノホルムの亜鉛イオノフォア作用により細胞内に流入した過剰な亜鉛に対する防御機構と考えられる。また細胞膜上に局在して細胞外に亜鉛を排出する ZnT1 の発現誘導と、細胞外から亜鉛を取り込む ZIP10 の発現抑制についても、キノホルムにより過剰に流入した亜鉛の濃度を低下させようとする生体防御機構と考えられる。

次に銅の恒常性維持に関わる蛋白群の発現変化に着目したが、DNA チップを用いた網羅的解析において認められた顕著な発現変動は、SCO2 の発現低下のみであった。一方キノホルムは銅シャペロンのひとつである ATOX1 のチオール基の酸化を引き起こした。

ATOX1 の活性中心である metal binding domain のシステインが酸化されると銅イオンを配位できなくなる。ATOX1 の機能不全により、トランスゴルジネットワークへの銅イオンの運搬が阻害され、細胞外で機能する銅要求性のエクト型酵素の成熟・分泌阻害につながると考えられる¹⁶⁻¹⁸⁾。キノホルムが実際にこのような銅輸送障害を引き起こすのか、今後検討していく予定である。

【キノホルムによるアストロサイトのオートファジー】

武藤・水谷らはマウスアストロサイト株 KT-5 細胞を用い、キノホルムがアストロサイトのオートファジーに及ぼす作用を解析した。

キノホルムによる細胞死には、以前神経細胞のモデルとして用いていたラット PCtrk 細胞に比して 10 倍の濃度 (10 μ M) が必要であった。また PCtrk 細胞で観察されたカスパーゼ 3 の活性化は認められず、明確なアポトーシスは観察されなかった。一方キノホルムはオートファジーのシグナルである LC3-II、p62 の発現を誘導したが、p62 のその後の発現低下が観察されなかったことから、autolysosome の形成不全を引き起こしているものと考えられた。実際キノホルムはリソソーム水解酵素活性の低下を引き起こしたが、リソソームの pH には影響を及ぼさなかった。さらにキノホルムは活性酸素種の産生亢進とミトコンドリア膜電位の低下を引き起こした。以上のことからキノホルムによるオートファジー・リソソーム系の機能異常を介する細胞毒性発現には、リソソーム酵素活性の低下といった機能低下と、それに引き続くミトコンドリア膜電位の低下、活性酸素種の産生亢進が関わるものと考えられた。

オートファジー阻害剤 3-methyladenine (3-MA) を用いて実験を行ったところ、3-MA 単独では細胞死を誘導しなかったが、キノホルムとの共刺激ではキノホルムによる細胞死を増強した。このことからキノホルムにより誘導されたオートファジーのシグナル自体は細胞保護的にはたらくことが示唆された。

【キノホルムによる軸索障害と小胞輸送に及ぼす影響】

豊島らはニワトリ後根神経節の初代培養神経細胞を用い、デジタル微分干渉顕微鏡/ビデオ増強法により、軸索における小胞輸送を順行性と逆行性に分けて観察した。

対照軸索においては、順行性輸送は逆行性輸送に比して有意に速度が速かった。キノホルムは逆行性輸送の速度を 15 μ M では上昇させたが、20 μ M では有意に低下させた。一方キノホルムは 15 μ M では順行性輸送の速度上昇を引き起こさず、20 μ M では計測可能な小胞輸送が認められなくなった。これらの結果、キノホルムは初代培養神経細胞においても、他の体細胞や腫瘍細胞で細胞障害を引き起こす 20 μ M の濃度で細胞障害を引き起こすことが明らかとなった。

【キノホルムによる脊髄の興奮性シナプス伝達増強作用のメカニズム】

吉田・谷口らはラット脊髄スライス標本を用いた whole-cell patch-clamp 法による電気生理学的解析により、キノホルムによる興奮性シナプス伝達増強作用のメカニズムを検討した。

記録した自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) は AMPA/カイニン酸受容体拮抗薬の 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX) 存在下では完全に消失したことから、グルタミン酸を介する反応であった。100 μ M のキノホルムを 5 分間灌流投与すると脊髄前角細胞の sEPSC の頻度の有意な増加が観察されたが、カルシウムイオンを含まない人工脳脊髄液を用いた場合にはそのような増加は観察されなかった。また電位依存性 N 型カルシウムチャネルのブロッカーである ω -conotoxin (0.5 μ M) 存在下でも、キノホルムによる sEPSC の頻度の有意な増加は観察されなかった。以上の結果、キノホルムによるグルタミン酸放出の増強には、脊髄前角細胞に入力するシナプス前終末部の膜上に存在する電位依存性 N 型カルシウムチャネルが関与するものと考えられた。

一方脊髄後角においてもキノホルムによる EPSC の頻度の有意な増強が観察され、塩化亜鉛存在下ではさらに頻度が増強された。次にキノホルムのシナプス前作用を解析するため、ナトリウムチャネル拮抗薬のテトロドトキシン (TTX, 1 μ M) で活動電位を阻害して微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を観察したところ、キノホルムはその発生頻度を有意に増加させ、振幅には影響を与えなかった。

スモンの主症状に疼痛、異常感覚障害といった下肢感覚障害があるが、キノホルムにより神経終末部からのグルタミン酸放出が増加した結果、脊髄後角細胞における sEPSC が増強し興奮が持続することにより、何らかの下肢感覚障害を呈している可能性が考えられる。

【キノホルムによるタウ蛋白のリン酸化抑制とオリゴマー形成の阻害】

濱野らはキノホルムがアルツハイマー病などの認知機能障害に対して有効であるとされることに着目し、

認知機能障害に関与するとされるタウ蛋白のリン酸化と重合に対するキノホルムの影響を解析した。

野生型タウ蛋白を高発現させたヒト神経芽細胞腫 M1C 細胞において、1~10 μ M のキノホルムはリン酸化タウ蛋白量を有意に減少させたが、10 μ M 以下の濃度では細胞死は認められなかった。キノホルムはタウ蛋白のリン酸化酵素である JNK と p38 の活性を阻害する一方、脱リン酸化酵素である PP2A を活性化した。またキノホルム存在下ではタウオリゴマーの減少が認められた。キノホルムは p62 のレベルを減少させたことから、オートファジーを引き起こすと考えられた。さらにキノホルムはユビキチン化タウ蛋白量を減少させたことから、ユビキチン-プロテアソーム系の活性化を引き起こすことが考えられた。

以上のことから、キノホルムはリン酸化酵素の不活性化と脱リン酸化酵素の活性化を介してタウ蛋白のリン酸化と重合を抑制するとともに、オートファジーとユビキチン-プロテアソーム系の活性化を介してタウオリゴマーの分解を促進する可能性が考えられた。細胞毒性の認められない低濃度のキノホルムがタウオリゴマーの蓄積を抑制することは、アルツハイマー病の発症予防や進展抑制に有効であるとする説のひとつの根拠となるものであり、キノホルムによるオートファジーの活性化が細胞保護作用を示すという点は、先の武藤・水谷らの研究とも一致する結果である。

【スモンとキノン酸化還元酵素 1 (NQO1) の遺伝子多型】

深尾らはスモンが日本で多発した理由、また一部のキノホルム服用者にもスモンが発症した理由について、抗酸化酵素であるキノン酸化還元酵素 1 (NQO1) の遺伝子多型に着目している。

NQO1 遺伝子には機能喪失多型 C609T (rs1800566) が知られており、そのキノン還元活性はヘテロ (C/T) で約 30%、ホモ (T/T) で数%にまで低下する。そして日本人を含むアジア人でこの遺伝子多型の頻度が高い。そこでこの C609T 多型とスモン発症の関連の可能性について検討した。

全国から計 120 名のスモン患者の血液を採取し、抽出した DNA から多型部位の塩基配列を決定したとこ

ろ、C/C が 39 例、C/T が 63 例、T/T が 18 例であった。日本人のデータベース (Human Genetic Variation Database) においては C/C が 471 名、C/T が 542 名、T/T が 197 名であり、スモン患者ではヘテロの C/T が多い傾向が認められたが、統計学的には有意な差ではなかった。またこの多型と視力、運動機能といったスモンの重症度との関連について解析したが、有意な相関は認められなかった。さらに症例数を追加することが必要であると考えられる。

また NQO1 遺伝子の転写活性に影響するとされるプロモーター領域の -1221 (A>C) 多型 (rs689455) については、上述の C609T 多型と完全に一致し、連鎖が考えられた。

一方 Perez らは cAMP の輸送体である ABCC4 と ABCC11 の日本人に多い遺伝子多型 ABCC4 (G2269A) (rs3765534)、ABCC11 (G538A) (rs17822931) がスモンの発症頻度と相関があるかのような報告をしている¹⁹⁾。そこでこれらの遺伝子多型の頻度についても解析したが、スモン患者における頻度と Human Genetic Variation Database における頻度に全く差がなかった。外国からこのようなスモンに関して誤った印象を与えかねない論文が発表されたことは非常に残念なことである。

【スモンのバイオバンクの構築】

ゲノム医療の導入がスモンの病態解明や治療につながる可能性があると考え、国立病院機構鈴鹿病院 (南山、小長谷、久留)、国立長寿医療研究センター (鷺見、徳田)、岐阜大学 (深尾) を中心に、スモンのバイオバンクの構築に着手した。

岐阜大学において深尾らがキノホルム感受性遺伝子に関する研究の際に採血した検体を、患者から文書による同意を得た上で国立長寿医療研究センターバイオバンクに移管することを計画している。またこれまで国立長寿医療研究センターにおいて鷺見らはスモン検診時の血液検査・尿検査を実施しており、1 名からバイオバンク保存検体が得られた。

スモン患者の平均年齢が 80 歳を越え、生体試料の収集が可能な時間、また研究成果を患者に還元できる時間は限られている。患者数が減りつつある今、スモ

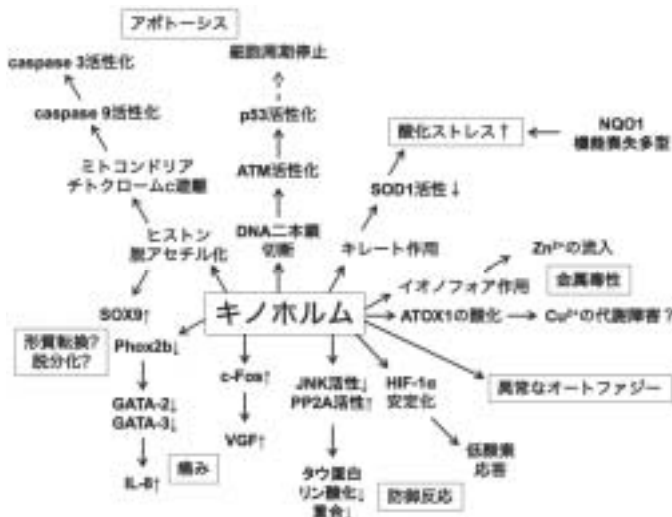


図1 キノホルムの様々な作用と神経毒性

ンの病態解明の基盤となるバイオバンクの整備は急務である。

【結論】

キノホルムの神経毒性、および他の神経変性疾患における保護作用のメカニズムについて、その一端を明らかにすることができた。また腹痛、感覚異常、視神経炎といったスモンの症状発現に関与する可能性のあるケモカインの発現をキノホルムが誘導することを見出した。これまでに得られた成果を図1にまとめた。

スモン発症のメカニズムを明らかにするにはキノホルムの神経毒性に関する基礎研究を遂行するとともに、我が国でスモンが多発した理由を明らかにするためにキノホルム感受性遺伝子を同定することが必要である。そのためにはなるべく多くのスモン患者の生体試料が必要であるが、患者数が減りつつある今、スモンのバイオバンクの構築は喫緊の課題である。

このような取り組みによって、薬害スモンの風化の防止と新たな薬害発生の阻止に寄与したいと考えている。

【研究発表】

1. 論文発表

1) 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. 2018; 67: 296-304.
 2) Toyoshima I. Toxic effect of clioquinol on vesicular transport in axons of dorsal root ganglion cells. J Akita National Hospital. 2017; 5: 19-23.

2. 学会発表

1) 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.
 2) Mizutani Y, Maeda T, Niimi Y, Nagao R, Murate K, Shima S, Ueda A, Mutoh T. Effects of clioquinol on autophagy-lysosome system in cultured astrocytes. 第59回日本神経学会学術大会. 2018年5月23日. 札幌.
 3) 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.
 4) Mizutani Y, Maeda T, Niimi Y, Nagao R, Murate K, Shima S, Ueda A, Mutoh T. Clioquinol kills cultured astrocytes by inducing the impairment of autophagy-lysosome pathway. 第60回日本神経学会学術大会. 2019年5月22日. 大阪.
 5) 泉尚史, 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曾根勝真弓, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏, 吉田宗平. 脊髄後角におけるキノホルムの興奮性シナプス伝達増強作用. 第41回日本疼痛学会. 2019年7月12日. 名古屋.
 6) Izumi N, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Taiji R, Murata S, Tsutsui S, Nakatsuka T, Yamada H. Clioquinol enhances excitatory synaptic transmission in spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1. International Symposium on TRP Ion Channel at Wakayama. January 26, 2020. Wakayama, Japan.
 7) 泉尚史, 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曾根勝真弓, 太地良, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏, 吉田宗平. 脊髄後角における興奮性シナプス伝達に対するキノ

ホルムの作用. 第41回脊髄機能診断研究会. 2020年2月1日. 東京.

- 8) 勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールによる銅・亜鉛関連蛋白の発現とレドックス状態の変化. 第93回日本薬理学会年会. 2020年3月18日. 横浜.

【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, 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) van Doorninck JH, van Der Wees J, Karis A, Goedknegt 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.* 2018; 67: 296-304.
- 13) Grzywacz A, Gdula-Argasinska J, Muszynska B, Tyszka-Czochara M, Librowski T, Opoka W. Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level. *Acta Biochim Pol.* 2015; 62: 491-498.
- 14) Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem.* 2000; 275: 34803-34809.
- 15) Lichten LA, Ryu MS, Guo L, Embury J, Cousins RJ. MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction. *PLoS One.* 2011; 6: e21526.
- 16) Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, Gitlin JD. The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 6848-6852.
- 17) Hatori Y, Yan Y, Schmidt K, Furukawa E, Hasan NM, Yang N, et al. Neuronal differentiation is

associated with a redox-regulated increase of copper flow to the secretory pathway. *Nat Commun.* 2016; 7: 10640.

- 18) Schmidt K, Ralle M, Schaffer T, Jayakanthan S, Bari B, Muchenditsi A, et al. ATP7A and ATP7B copper transporters have distinct functions in the regulation of neuronal dopamine-beta-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2018; 293: 20085-20098.
- 19) Perez DR, Sklar LA, Chigaev A. Clioquinol: To harm or heal. *Pharmacol Ther.* 2019; 199: 155-163.