

心筋細胞における誘導型  
NO合成酵素の発現調節  
とその機能的意義

絹川弘一郎

①

【書名】  
心筋細胞における誘導型NO合成酵素の  
発現調節とその機能的意義

指導教官 小俣政男教授

平成5年4月入学

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程

内科学専攻

絹川弘一郎

## 【背景】

本来、血液系細胞において重要な役割を有すると考えられていたcytokineのなかに心筋直接作用を有するものがあることが近年報告されている。これらの知見は1992年のFinkelらのSyrian Hamsterの乳頭筋における実験(1)にその端を発するが、我々もcytokineの1つであるinterleukin (IL)-6がニワトリ胚培養心筋細胞において心筋収縮抑制作用を有することを過去に報告した(2)。Finkelらの報告に見られる如く、また我々の知見においても、cytokineの心筋収縮抑制作用はNO合成酵素(NOS)の阻害薬である $N^G$ -monomethyl-L-arginine (L-NMMA)の前投与により有意に抑制された。このようにcytokineの心筋直接作用がNOを介するということが示唆されてきた。

NOSがcloningされる以前からNOS活性の測定により、心筋には $Ca^{2+}$ 依存性かつ構成的に発現しているNOSとcytokineにより誘導される $Ca^{2+}$ 非依存性のNOSの2種類が存在することがわかっていた(3)。心筋のNOSもその後cloningされ、構成的な(constitutive) NOS (cNOS)の方は内皮細胞型NOSすなわちNOS3と同一の酵素であり(4)、また誘導型(inducible) NOS (iNOS)の方はmacrophage型NOSすなわちNOS2と同一であることが分かった(5-7)。心筋のcNOSはacetylcholineによるmuscarinic receptorを介した心筋収縮抑制作用を制御していると考えられる(4, 8)。この心筋cNOSによる心筋作用は収縮抑制の他に細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度減少作用(2)、L-type  $Ca^{2+}$ 電流の抑制作用(4)、陰性変時作用(2, 8)などを含むものと考えられており、先に述べたcytokineの陰性変力作用を担うものと考えられる。これらのcytokineによる心筋収縮抑制作用は、たとえば敗血症においてはその機序が働いていることが十分に考えられる。敗血症においては循環血液中のIL-6とtumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ はかなり高濃度であると報告されており(9)、Finkelらや我々が実験的に使用したcytokineの濃度とも合致する。しかし、それほどの高濃度が循環血中に存在しなくても、心筋近傍において炎症が存在する疾患においては、浸潤したリンパ球やmacrophageから分泌されるcytokineの局所的濃度が上昇していることが示唆される。そのような疾患としては急性心筋炎(10)、stunned myocardiumを含む虚血後再灌流障害(11)、急性心筋梗塞(12)、移植後拒絶心(13, 14)、拡張型心筋症(15)などが考えられている。さらにこのような疾患においても、IL-6とTNF  $\alpha$ の発現が他のcytokineと比較してもかなり選択性を持って亢進しているという報告が多い(11-15)。IL-6のみならず、TNF  $\alpha$ もNO非依存性ながら心筋収縮抑制作用を

有することが報告されており (16), 我々の研究においてもそのことが確認された (17).

しかし, このような疾患においても心筋収縮抑制作用は短期間では終わらず, cytokineによるcNOSの活性化などの急性作用のみでは説明することが困難である場合が多い. Cytokineは時間依存的に心筋細胞においてiNOSを誘導することが知られているが (5, 6), このような疾患においても局所の高濃度のcytokineの存在を考えれば, 時間依存的に心筋細胞内にiNOSの誘導が生じ, その産生するNOが慢性的に心筋収縮力を抑制している可能性があると考ええる. 近年, 拡張型心筋症を含む心不全患者の心筋 (18, 19) や移植後拒絶心 (20, 21) において, iNOSの発現が見られたという報告がある.

iNOSが心筋細胞において誘導されることは1993年頃より確立されてきた. その誘導因子としては, IL-1 $\beta$  (5, 6), IL-6 (2), TNF $\alpha$  (6), interferon $\gamma$  (6), lipopolysaccharide (LPS) (7) などであり, in vivoにLPSを腹腔内注入しても (6), in vitroで心筋細胞にcytokineを直接作用させても (2, 5-7), 心筋細胞にiNOSが誘導され, cNOSの活性化などとは比較にならない大量のNOを産生する.

iNOSの誘導による心筋細胞の機能に対する影響は, 従って, この産生された大量のNOの作用はいかにということになる. これまでの報告ではNO donorは心筋細胞において収縮力を抑制するというものが多い (22). また, NOの増加に伴うcGMPの産生増加もまた心筋に対しては抑制的に働くという報告もある (23). 我々も予備的な実験においてNO donorや8-bromo cGMPが心筋細胞の収縮を抑制することを見出ししている. iNOSの誘導された心筋細胞または心臓は収縮機能が低下しているという報告が多いが (2, 6, 24-27), NOによる作用を明瞭に分離した研究は少ない. また, 心筋収縮力と細胞内Ca<sup>2+</sup>動態を同時に観察した研究も見当たらない. これまで我々の研究室では心筋の機能をin vitroで検討するために培養細胞において細胞収縮と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の同時測定することにより, 様々な知見を得た (2, 7, 17, 28-32). この研究ではiNOSを心筋細胞に誘導し, その産生するNOの心筋における直接作用を細胞収縮と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の同時測定により検討した (7).

心筋細胞におけるiNOSはその発現様式がまったく存在しない状態から時間依存的に誘導されるというものであり, ある種のprotooncogene (c-fosなど) の発現パターンによく似ている (28). その意味でiNOSの転写調節を検討することは比較的困難で

なく、また信頼すべき結果が得られ易い。iNOSの転写制御に関してはマウス (33), ヒト (34, 35), およびニワトリ (36) でiNOS遺伝子の5'上流領域がcloningされ、転写因子結合部位について検討が行われてきた (37-39)。しかし、この研究において使用した系はラットであるため、まずラットiNOS遺伝子の5'上流領域のcloningから行った。さらに転写調節にかかわる因子について検討した結果ではiNOSの転写を調節する因子は数多くある (40)。臨床において頻用される薬剤もiNOSの転写レベルを変化させるものがあるようで、iNOSによる心筋不全の病態形成を修飾する可能性がある。また、心筋不全の病態からiNOSの発現にいたる経路を研究する上で、iNOSの誘導に関与する各種の転写因子について検討することは重要な手がかりを与える可能性がある。これらの意味でもiNOSの心筋細胞における転写調節様式を検討することは有用であると考えた。

## 【方法】

### 〔新生仔ラット培養心筋細胞の調整 (7, 28, 29) 〕

1日齢のWistar ratの心室を80 unit/mlのcollagenase (Class II, Worthington Biochemicals Co.) を含むHanks氏液のなかに37℃10分incubateすることを4回繰り返して、細胞を分離した。分離した細胞は6%の牛胎仔血清を含む培養液 (40% medium 199, 0.1% penicillin-streptomycin, 116 mM NaCl, 1.0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 26.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.9  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Glucose) に移し、30分間preplateした。その後、上清をbromodeoxyuridine (0.1 mM, Sigma) を含む培養液中で5%  $\text{CO}_2$ および37℃の条件で3日間培養した。4日目に無血清培地 (20% medium 199, 20% F-12 Ham, 0.1% penicillin-streptomycin, 116 mM NaCl, 1.0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 26.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.9  $\text{CaCl}_2$ , 0.6 mM KCl, 5  $\mu\text{g/ml}$  insulin-transferrin-selenium [Sigma]) に変更し、さらに24時間以上培養した。

### 〔新生仔ラット培養非心筋細胞の調整 (7, 28) 〕

上記の新生仔ラット心筋細胞の培養の過程でpreplateしたときに得られる付着細胞をbromodeoxyuridineを含まない10%牛胎仔血清を加えた培地で培養した。その細胞を2回passageした後に、1-2日血清加培地で培養した後、無血清培地に変更し、さらに24時間以上培養した。

### 〔成ラット心筋細胞の単離 (31) 〕

成体のWistar rat (250-300 g) をpentobarbital (200 mg/kg) 腹腔内注入により麻酔した後、取り出した心臓を37℃の溶液で逆行性に灌流した。冠灌流圧は60 mmHgとした。最初に $\text{Ca}^{2+}$ を含まないHEPES溶液 (126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 12.5 NaOH, 5 mM sodium pyruvate, 24 mM HEPES, 22 mM glucose, 20 mM taurine, 5 creatine) で5分間灌流し、次に0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mg/ml collagenase (class II, Worthington), および0.1 mg/ml protease (Sigma) を含むHEPES溶液で15分間灌流した。最後にcollagenaseもproteaseも含まない0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ のHEPES溶液で灌流した後、心筋を小片に分割し、37℃で10分間incubateした。これにより得られた細胞懸濁液に前述の無血清培地を加え、6時間培養した後、実験に使用した。

### 〔成ラット培養非心筋細胞の調整 (7, 41) 〕

成体のWistar rat (250-300 g) をether麻醉し、取り出した心臓を0.1% penicillin-streptomycinを含むphosphate-buffered saline で洗浄した後、0.1% trypsinと0.1% collagenaseを含むHanks氏液内で20分間incubateした。これにより得られた細胞を血清加培地で1時間培養した後、上清を捨て、接着した細胞を10%牛胎仔血清を含む培地で4-5日間培養した。1回passageした後、さらに1-2日間培養した後、無血清培地に変更し、24時間培養した。

#### [エンドトキシンテスト]

無血清培地中のendotoxinの含量をLIMUTESTERキット(フナコシ)で測定した。無血清培地中のendotoxinのレベルは約10 pg/mlであった。

#### [免疫細胞染色と2次元画像解析 (7, 28)]

免疫染色の際には細胞をcoverslipの上に培養した。細胞を100% acetone または3% paraformaldehydeで固定した。使用した1次抗体は1) マウスiNOS蛋白のC末端に対応する合成ペプチドに対するウサギpolyclonal抗体 (Affinity BioReagent), 2) ウサギ骨格筋の $\alpha$ -actinに対するマウスmonoclonal抗体 (Sigma), 3) 平滑筋 $\alpha$ -actinのN末端に対応する合成ペプチドに対するマウスmonoclonal抗体 (Sigma)の3種類である。2次抗体は、fluorescein isothiocyanateで標識されたものを使用した。細胞の蛍光画像はコンピュータ解析システム (ARGUS-50, 浜松ホトニクス) により、2次元画像として解析した。

#### [混在する内皮細胞の同定 (7, 42)]

培養細胞中の内皮細胞の混在を同定するために、coverslip上の細胞を1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorateで標識された1  $\mu$  g/mlのacetylated low density lipoprotein (Biomedical Technologies) とともに培養した。4時間培養後、3% paraformaldehydeで固定した。蛍光画像はARGUS-50により、解析した。

#### [細胞生存率測定 (6, 7)]

新生仔ラット心筋細胞を、200  $\mu$  g/mlのMTT (Sigma) を含む無血清培地で4時間培養し、HCl/isopropanolで細胞を回収した。コントロールの細胞における(570 nmでの吸光度) - (630 nmでの吸光度) を100%とし、パーセンテージにより表示した。

[硝酸塩/亜硝酸塩濃度の測定 (7)]

培養液中の硝酸塩/亜硝酸塩の濃度はNitrate/Nitrite Assay Kit (Cayman Chemical Co.) を用いて測定した。また、上清を除去した培養細胞を4時間MTTを含む無血清培地で培養した後、前項にしたがって、MTT assay用に回収した。NOx濃度はMTT assayにより求めたコントロールの細胞に比較した細胞生存率のパーセンテージで補正して表示した。

[cGMPおよびcAMP含量の測定 (2, 7)]

培養細胞中のcGMPおよびcAMPの含量をYAMASA Cyclic GMP/Cyclic AMP Assay Kit (ヤマサ醤油) で測定した。cGMP/cAMP含量は蛋白含量で補正して表示した。

[NOS活性の測定]

新生仔ラット心筋細胞のNOS活性はNOSdetect™ Assay Kit (Stratagene) により測定した。この活性は蛋白含量により補正して表示した。

[ラット心筋iNOSのcDNA probeの調整 (7)]

LPS (*Escheria coli* serotype 055:B5;DIFCO Laboratories) を6時間投与した新生仔ラット培養心筋細胞から抽出したtotal RNAに対してラット平滑筋iNOS (43) の1から8番のアミノ酸に対応するoligonucleotide (5'-ATGGCTTGCCCCTGGAAGTTTCTC-3') を上流primerに、268から276番のアミノ酸に対応するoligonucleotideを下流primer (5'-CCTCTGATGGTGCCATCGGGCATCTG-3') に設定して、RT-PCRを施行した。約830 bpのRT-PCR産物をpCR™ II (TA Cloning™ Kit, Invitrogen) に組み込み、subcloningした。

[Northern blot解析 (7, 28, 30, 32)]

Total RNA (20  $\mu$ g) を1% agarose gelで分画し、Zeta-Probe™ membrane (Bio-Lad Laboratories) に転写した。膜は42℃、1昼夜 prehybridizationした後、前述のiNOS cDNAとヒト  $\beta$ -actin cDNAを<sup>32</sup>Pで標識したものと42℃、1昼夜incubateした。洗浄の最終条件は0.1x SSC/0.1% SDSで65℃、15分とした。iNOSのmRNAに相当するバンドの濃度は $\beta$ -actinのそれにより、補正して定量化した。

[Western blot解析 (7, 32)]

培養細胞を2% SDSで回収し, 8% acrylamide gel上で電気泳動し, Clear Blot P™ (ATTO) にsemi-dry法で転写した. Blockingは4% skimmed milkと1% bovine serum albuminで行い, その後, 前述の抗iNOS polyclonal抗体とincubateした. Horseradish peroxidaseで標識された2次抗体とさらにincubateした後, chemiluminescence method (ECL™, Amersham) により, 発生した蛍光をX線フィルム上に感光させた.

[細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度と細胞収縮の同時測定 (2, 7, 28-32)]

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) はindo 1を用いて測定した. coverslip上に培養した細胞を5 μMのindo 1-acetoxymethyl ester (同仁化学) を含む培養液内で37°C 15分間incubateした. Coverslipは連続灌流できるchamber上でHEPES溶液 (137 mM NaCl, 3.7 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5.6 mM glucose, 4.0 mM HEPES [pH 7.35]) により37°Cで灌流した. 測定された蛍光強度の比 (R, 400 nm/500 nm) から以下の式を用いて[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を計算した.

$$[Ca^{2+}]_i = 250 \times (R - 0.314) \div (0.882 - R) \times 1.492 \text{ (nM)}$$

心筋細胞の収縮は培養心筋細胞の表面に直径5 μmのplastic microsphere (Latex beads, Sigma) を貼り付け, これにvideo motion detector (Crescent Electronics) のraster lineを合わせてtrackingすることで測定した. コントロールの収縮の振幅を100%として正規化した.

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>と細胞収縮の振幅のデータは5つ以上の連続する収縮において安定している部分から求めた. 1回の実験においては, 5-7枚のcoverslip上の細胞からデータを採取し, 平均的なものをその実験のデータとして採用した. 各実験において, それぞれ別の日に培養した細胞から得たデータが3つ以上あるように留意した.

[ラットiNOS遺伝子の5'上流領域のcloning]

Rat genomic DNAは新生仔ラット培養心筋細胞からQIAGEN Genomic DNA Purification Kit (QIAGEN) を用いて調整した. つぎに, すでにcloningされていたマウスiNOSの5'上流領域 (33) に相関なprimerを設定し, PCRによりrat genomic DNAを増幅した. ここで得られた約1100 bpのバンドをsubcloningし, 自動DNA sequencer (model 373A, Applied Biosystems) により, 塩基配列を解析した.

#### [核蛋白の抽出 (32)]

新生仔ラット心筋細胞をTris-buffered salineで回収し, nonidet NP-40 (Fluka) を使用して, 核蛋白を分離した. この上清5  $\mu$  lあたり約10  $\mu$  gの核蛋白が得られた.

#### [DNase I foot printing解析]

上記の1.1 kbのinsertを挿入されたpCR II vectorをまず*EcoR* Iと*Xba* Iで切断し, すべて*EcoR* I-*Xba* I末端を有するvectorと約500 bpおよび600 bpのDNA断片を得た. それぞれのDNA断片をvectorとligationし, 約500 bpおよび600 bpのinsertを持つpCR II vectorを得た. つぎに, それぞれのplasmid (15  $\mu$  g = ~10 pmol) を*Hind* IIIで切断し, <sup>32</sup>Pで標識した. *Xba* I切断を行い, 570 bpおよび660 bpの標識されたinsertを分離し, probeとした. この場合, 570 bpのprobeではnoncoding strandの上流側が, 660 bpのprobeではcoding strandの下流側がそれぞれ標識された.

このprobeと先に抽出した核蛋白を37°C 30分incubateした後, RNase-free DNase (Promega) を0.15 unit加え, 室温で1分incubateした. それらをphenol/sevaqで除蛋白およびDNA抽出を行った後, 6%尿素polyacrylamide gel上に展開した. また, サイズマーカーとして, Marker 9 (ニッポンジーン) を<sup>32</sup>Pで標識したものを使用した.

#### [一過性遺伝子導入によるenhancer/promoter活性の解析]

上記の1.1 kbの断片をpCAT basic vector (Promega) の*Hind* III-*Xba* I部位にligationした. この1.1 kb断片を挿入されたpCAT basic vectorのdeletion mutantはKilo Sequence Deletion Kit (宝酒造) で作成した. これらのdeletion mutantの塩基配列は前述のautomated DNA sequencerにより, 解析した.

pCAT vectorの培養心筋細胞への遺伝子導入はlipofection法で施行した. pCAT vector 5  $\mu$  gとpSV  $\beta$  gal (Promega) 2  $\mu$  gをtransfectam (Promega) 40  $\mu$  gとともに無血清培地内に混合し, 6時間培養した. その後, 無血清培地を新しいものに変更し, 各種interventionを加えた. Intervention後48時間で細胞を回収し, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assayと $\beta$ -galactosidase assayを施行した. CAT assayにより得られた放射活性は細胞抽出液を含まないサンプルのバックグラウンドの値を差し引いた後, 蛋白含量と内因性の活性を除いた $\beta$ -galactosidase活性の吸光度で補正した.

#### [Gel shift解析 (electrophoresis mobility shift assay [EMSA]) (32)]

EMSAに使用した2本鎖oligonucleotideは次のとおり、太字部分の配列は転写因子が結合するのに必要な場所である。CREはcAMP-responsive element, IRFはinterferon regulatory factor, SIEは*sis*-inducible element, GASは $\gamma$ -interferon activation siteをそれぞれ表わす。<sup>32</sup>Pで標識されたこれらの2本鎖のoligonucleotideと前述の核蛋白とを室温にて30分間incubateし、4% acrylamide gel上で電気泳動した。

1. NF- $\kappa$ B site : 5'-GATCGAGGGG**ACTTCC**CCTAGC-3'  
3'-CTAGCT**CCCCGAAAGGG**ATCG-5'
2. CRE : 5'-GATTGGCT**GACGTC**AGAGAGCT-3'  
3'-CTAACCG**ACTGCAGT**CCTCTCGA-5'
3. CAAT box : 5'-AGCTTCCATAGG**TTACACA**ACTGGGATA-3'  
3'-AGGTAT**CCAATGTGTTG**ACCCCTATTCGA-5'
4. IRF site : 5'-TCG**AAGTGAAAGT**GAAAGT**GAGACT**CTAGA-3'  
3'-**TCACTTTCACTTTC**ACTCTGAGATCTCCTAG-5'
5. SIE/GAS : 5'-GTCGACAT**TTCCCGTAA**TCGTCGA-3'  
3'-G**TAAAGGCATTT**AGCAGCTGC-5'

#### [統計]

各実験のnは独立した培養から得たデータの数を示す。データはすべて平均±SEMで表示した。多群間の比較に際しては2-way ANOVAを使用し、F testにより有意差があるとされた場合、それぞれの2群間の比較にt-testを使用した。また、危険率5%以下を統計学的に有意であるとした。

## 【結果】

### [培養中の細胞種の同定]

この実験で使用した培養細胞は新生仔ラット心筋細胞と非心筋細胞、および成ラット非心筋細胞の3種類である。図1に示すように、sarcomeric  $\alpha$ -actin陽性細胞の比率は新生仔ラット心筋細胞の培養では95%以上、新生仔ラット非心筋細胞の培養では10%前後、成ラット非心筋細胞の培養では2%以下であった。この抗sarcomeric  $\alpha$ -actin抗体は心筋と骨格筋の $\alpha$ -actinを認識するが、これらの培養系への骨格筋の混入はまず考え難いので、このsarcomeric  $\alpha$ -actin陽性細胞は心筋細胞であるとして妥当と思われる。これら3種類の培養系において、平滑筋 $\alpha$ -actin陽性の細胞はまったく存在しなかった。また、acetylated low density lipoproteinを取り込んだ細胞はmacrophageか内皮細胞であると考えられる(42)。ただし、この培養系へのmacrophageの混入は考えにくい。図1に示すように新生仔ラット心筋細胞の培養ではまったく内皮細胞の混在はなかったが、新生仔ラット非心筋細胞の培養と成ラット非心筋細胞の培養では2-3%の細胞は内皮細胞であった。

これらの結果からこの実験で使用した新生仔ラット心筋細胞に培養はほぼ心筋細胞からなるものと考えられた。また、新生仔ラットの非心筋細胞の培養および成ラットの非心筋細胞の培養はその大部分は心筋、血管平滑筋、内皮細胞以外の細胞、すなわち心筋線維芽細胞であると考えられた。

### [各種の細胞におけるLPSによるiNOSの誘導]

10  $\mu$ g/mlのLPSを6時間投与した新生仔ラット培養心筋細胞からRT-PCRにより得たiNOS cDNA断片をprobeにしてNorthern blot解析を行った。図2に示すようにNorthern blot解析においてiNOSは約4.4 kbの単一のバンドとして認められた。10  $\mu$ g/mlのLPSは心筋細胞において時間依存的にiNOSを誘導した。mRNAのレベルで云うとLPS投与後2時間から誘導が認められ、6時間をピークとし、24時間後も誘導が認められた。心筋線維芽細胞においては新生仔においてはiNOSの誘導はやや少なめであり、成体においてはほとんど認められなかった。新生仔ラット非心筋細胞の培養における若干のiNOSの誘導は混在する10%前後の心筋細胞によるものと考えられた。また、いずれの細胞においても非刺激時にはiNOSの発現は全く認められなかった。

Western blot解析によれば、LPS投与後心筋細胞において約130 kDのiNOS蛋白が

誘導された。図3に示すようにLPS投与後6時間から有意に誘導が認められ、24時間後に最高となった。線維芽細胞における誘導はNorthern blot解析の結果と同様に少ないものであった。いずれの細胞においても非刺激時にはiNOS蛋白の存在は全く認められなかった。また、培養液中の亜硝酸塩の濃度および細胞内cGMP含量は各種の培養細胞においてiNOS蛋白の誘導レベルと平行して上昇した。

さらに図4に示すように抗iNOS抗体による細胞免疫染色によれば、iNOS蛋白はほぼ心筋細胞に限局して誘導された。線維芽細胞においてはiNOS蛋白が誘導された細胞はほとんど認められなかった。新生仔ラット培養心筋細胞において図5に示すように非刺激時に比べて、LPS投与24時間後において著明なCa<sup>2+</sup>非依存性のNOS活性の増加を認めた。したがって、心筋細胞において誘導されたNOSはCa<sup>2+</sup>非依存性の酵素活性を有することが示された。

また、成ラットの心筋細胞を単離し、6時間LPS (10 μg/ml) を投与した細胞からtotal RNAを調整し、培養細胞と同じiNOS cDNA probeを用いてNorthern blot解析を行ったものを図6の左に示す。レーン2に見られるようにコントロールでは見られないiNOS mRNAの誘導が認められる。さらにrod shapeの成ラット単離心筋細胞の免疫染色を同じ抗iNOS抗体を用いて行ったところ、図6の右レーン2に示すようにLPS投与6時間においてiNOS蛋白の発現も認められた。

以上のようにラットの心筋においてはLPSによるiNOSの誘導は発達段階を問わず、線維芽細胞にはほとんど生じず、ほぼ心筋細胞に限局していた。このiNOSについて以後検討する上で成ラットの単離心筋細胞では定量的な評価が技術的に困難であるため、以下の実験はすべて新生仔ラット培養心筋細胞を対象として施行した。

#### [L-NMMAが新生仔ラット培養心筋細胞におけるiNOS誘導に与える影響]

図7Aに示すように、L-NMMA (100 μM, Sigma) の前投与はLPS投与6時間により誘導されたiNOS mRNAに有意な影響を与えなかった。図7BはLPS投与24時間後のiNOS蛋白の誘導にもL-NMMA (100 μM) の前投与が有意な影響を与えなかったことを示す。

図8Aに示すように、L-NMMAとLPSの同時投与のみならずL-NMMAやLPSの単独投与も投与後24時間において心筋細胞のviabilityに何らの影響を与えなかった。このことは、培養液中の亜硝酸塩の濃度と細胞内cGMP含量を蛋白含量で補正すること

が妥当であると考えられる根拠となる。iNOS蛋白の産物である培養液中の亜硝酸塩の濃度(図8B)と細胞内cGMP含量(図9A)の上昇はL-NMMAとLPSを24時間同時投与した細胞では有意に抑制された。したがって、このL-NMMAとLPSを同時投与した心筋細胞はiNOS蛋白を発現しながらもNOをまったく産生しない状態にあると思われる。このL-NMMAによるNO合成の抑制が可逆的であることを示すために、100倍量のL-arginine(10 mM, Sigma)を追加投与した。図8Bに示すようにL-arginineはL-NMMAとLPSを同時投与していた心筋細胞において5分以内にNOの産生を回復させた。このようにL-NMMAのiNOSに対する抑制作用は可逆的であり引き続いて投与したL-arginineは十分な量のNOを産生させることができる。一方、D-arginine(10 mM, Sigma)はL-NMMAの抑制作用を逆転することはできなかった。図9Aに示すようにcGMP含量の測定からもL-arginineの追加投与がL-NMMAの抑制作用を5分以内に逆転し、cGMPの含量の増加をもたらすことがわかった。非特異的phosphodiesterase(PDE)阻害薬である3-isobutyl-1-methyl xanthine(IBMX, Sigma)を100  $\mu$  Mの10分間の前投与することによってcGMP含量の基礎値は有意に上昇したが、L-arginineの追加投与によりcGMPの含量はさらに増加した。一方、図9Bに示すようにcAMP含量はLPSやL-NMMAの投与ではまったく変化しなかった。L-arginineを5分間追加投与しても、cAMP含量の変化はなかった。またIBMXを前投与するとcAMPの基礎値は著明に上昇したが、L-arginineの追加投与では特にcAMP含量の変化は認められなかった。

#### [誘導されたiNOSが新生仔ラット培養心筋細胞の機能に与える影響]

誘導されたiNOSの心筋細胞の機能に対する影響を調べるとき私の使用するシステムではiNOSが誘導されるまでの少なくとも数時間の時間的経過を追うことは不可能である。したがって、NOをiNOSによって短時間で産生させるような系を用いる必要がある。前項で述べたようにL-NMMAとLPSを同時投与した心筋細胞においてはNOの産生を伴わないiNOSの発現を認める。この細胞においてL-arginineの追加投与は短時間のうちにL-NMMAの作用を逆転し、有意にNOやcGMPのレベルを上昇させる。この短期的なNOやcGMPの上昇はiNOSの心筋細胞の機能に及ぼす影響を検討する上で有用であると考えられた。

L-NMMA(100  $\mu$  M)とLPS(10  $\mu$  g/ml)を同時投与した心筋細胞にL-NMMA(100  $\mu$  M)を含む無血清培地中でendo 1を負荷し、さらにL-NMMAを含む無血清培地で洗浄

した。その後、灌流装置にcoverslipを移し、L-NMMA (100  $\mu$  M) の灌流に引き続いて100-倍量のL-arginine (10 mM) を灌流した。L-arginineの灌流により図10Aおよび表1に示すように収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅および自発収縮の回数は有意に低下した。拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ もやはりL-arginineの投与により低下したが、 $Ca^{2+}$  transientの振幅は低下した。このように誘導されたiNOSにより産生されたNOは $[Ca^{2+}]_i$ を減少させ、陰性変力作用、陰性変時作用を呈した。さらに心筋細胞の拡張期の位置もL-arginineの投与により、下方に移動した。それに反して、図10Bに示すように同容量のD-arginineの投与 (n=3) は収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$  (824  $\pm$  44  $\rightarrow$  815  $\pm$  24 nM) と細胞収縮 (100  $\rightarrow$  108.6  $\pm$  10.3%) および自発収縮の回数 (135  $\pm$  11  $\rightarrow$  128  $\pm$  18回/分) にまったく影響を与えなかった。図10Cに示すように心筋細胞を2.5 Hzで電気刺激した場合 (n=3)、L-arginineの投与はやはり収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$  (856  $\pm$  37  $\rightarrow$  680  $\pm$  40 nM,  $P < 0.05$ ) と細胞収縮の振幅 (100  $\rightarrow$  66.9  $\pm$  13.8%,  $P < 0.05$ ) を低下させたが、拡張期の $[Ca^{2+}]_i$ の低下は有意なものではなかった (288  $\pm$  21  $\rightarrow$  250  $\pm$  14 nM)。したがって、自発収縮時のL-arginine投与後に見られる拡張期 $[Ca^{2+}]_i$ の低下は主として収縮回数の減少によるものと考えられる。

つぎにmethylene blue (MB, Sigma) の作用を同様に検討した。L-NMMAを灌流しているときに10  $\mu$  MのMBを投与しても有意な効果は認められなかった。図11Aおよび表2に示すようにL-arginineの灌流に変えてもMB投与中は $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮および自発収縮回数に変化はなかった。さらにcGMP-dependent protein kinase (PKG) に比較的特異的な阻害薬として知られるKT5823 (Carbiochem) の作用を検討した。1  $\mu$  MのKT5823の投与自体は心筋細胞の機能にまったく影響を与えなかった。KT5823の前投与は図11Bおよび表3に示すようにL-arginineの作用をほぼ完全に抑制した。したがって、iNOSの産生したNOによる心筋細胞の機能抑制はPKGの活性化によるものと考えられた。

非刺激の心筋細胞における $[Ca^{2+}]_i$ と自発収縮回数は表4に示すようにLPSとL-NMMAを24時間同時投与した細胞に比べて有意な差はなかった。非刺激の心筋細胞にL-NMMAやL-arginine (表4)、MB (表5)、またはKT5823 (表6)などを投与しても $[Ca^{2+}]_i$ や細胞収縮および自発収縮回数に有意な変化はなかった。

L-NMMA (100  $\mu$  M) 単独を24時間投与した心筋細胞 (n=3) にL-arginineを追加投与しても図12Aに示すように収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$  (814  $\pm$  24  $\rightarrow$  811  $\pm$  46 nM) と細胞収縮 (100  $\rightarrow$  97.7  $\pm$  6.9%) および自発収縮の回数 (139  $\pm$  9  $\rightarrow$  126  $\pm$  19回/分) に変化は見ら

れなかった。

LPS (10  $\mu$  g/ml) 単独を24時間投与した心筋細胞において、収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ や拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ および自発収縮の回数は表7に示すように非刺激細胞に比べると低下傾向にあった。これらの細胞にL-NMMAを投与しても心筋細胞の機能はまったく変化しなかった。また、MB (表8) やKT5823 (表9) の投与も同様に有意な効果はなかった。さらにこのLPS単独投与の心筋細胞にL-arginineを投与しても有意な作用は見られなかった(図7)。この実験に使用した無血清培地は約270  $\mu$  MのL-arginineを含有するので誘導されたiNOSが最大量のNOを産生するのに十分なL-arginineがすでに存在していると考えられる(図8Bおよび9A参照)。

[各種の薬剤が新生仔ラット培養心筋細胞におけるiNOSの誘導に与える影響]

つぎに、さまざまな細胞内情報伝達経路に作用する薬剤のiNOS誘導に与える効果を検討することにより、iNOS mRNAの誘導に必要な因子の解析を試みた(図13)。

Forskolin (FSK, 100  $\mu$  M, 和光純薬) またはisoproterenol (ISO, 100  $\mu$  M, 和光純薬) はLPSによるiNOSの発現を有意に増大させた。FSKやISO単独の投与はiNOSを誘導しなかった。一方、cAMP-dependent protein kinase (PKA) の選択的阻害薬であるH-89 (和光純薬) はLPSによるiNOSの誘導を有意に抑制した。

非特異的なserine/threonine kinaseの阻害薬であるstaurosporine (ST, 1  $\mu$  M, 和光純薬) やH-7 (10  $\mu$  M, 和光純薬) はLPSによるiNOSの誘導を有意に抑制した。しかし、特異的protein kinase C (PKC) 阻害薬としてしられるcalphostin C (Cal, 250 nM, Sigma) の前投与はLPSによるiNOSの誘導に有意な影響を与えなかった。さらにPKCのdown regulationのためにphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 2  $\mu$  M, Sigma) の前投与を24時間行ったあと (prePMA), LPSを投与したがiNOSの誘導には有意な変化はなかった。また逆にPKCの刺激薬であるPMA (200 nM) やangiotensin II (A II, 100 nM, Sigma) とLPSを同時投与してもiNOSの誘導を促進する作用は認められなかった。以上より、LPSによるiNOSの誘導にはPKCの活性化は主たる役割を演じていないと考えられる。

L-NMMA (100  $\mu$  M) の前投与は先に示したとおり、LPSによるiNOS mRNAの発現に関しては有意な影響はなかった。また、sodium nitroprusside (SNP, 100  $\mu$  M, Sigma) の投与はLPSと同時投与してもiNOSの発現に影響を与えなかった。Carbachol (Carb, 10  $\mu$  M, Sigma) の前投与もまたLPSによるiNOSの誘導に有意な影響を与えなかった。

Dexamethasone (DEX,  $1 \mu\text{M}$ , Sigma)およびpyrrolidine dithiocarbamate (PDTC,  $100 \mu\text{M}$ , Sigma)の前投与はLPSによるiNOSの発現を著明に抑制した。また、蛋白合成阻害薬cycloheximide (CHX,  $100 \mu\text{g/ml}$ , 和光純薬)の前投与もLPSによるiNOSの発現を抑制した。CHX単独の投与はiNOSを誘導しなかった。選択的tyrosine kinase阻害薬であるherbimycin A (Herb,  $2 \mu\text{M}$ , 和光純薬)の前投与は有意にiNOSの誘導を抑制した。

新生仔ラット培養心筋細胞においてはIL-6 ( $2,000 \text{ U/ml}$ , 味の素)単独の投与ではiNOSは誘導されなかったが、TNF  $\alpha$  ( $500 \text{ U/ml}$ , Sigma)との同時投与は低いレベルながらも有意なiNOSの誘導を認めた。TNF  $\alpha$ の単独投与はやはりiNOSを誘導しなかった。この2種類のcytokineの投与においてFSKの前投与はiNOSの誘導を促進した。

これらの各種薬剤によるiNOSの転写の変化は図14にその定量化したレベルを示した。また、図15に示すように蛋白レベルにおいても同様な変化を示した。蛋白レベルの変化は図16に見られるようにその産物である亜硝酸塩の産生の変化に相関した。さまざまなinterventionの中には24時間の投与においては細胞のviabilityを変化させるものがある。したがって、この亜硝酸塩の濃度はMTT assayにより求めた細胞生存率で補正したものである。

#### [ラットiNOS遺伝子の5'上流領域のcloning]

図17にラットiNOS遺伝子の5'上流領域約1.1 kbの塩基配列を示す。GenBankに登録されている(RRNOS2P, 登録No. X95629)塩基配列(44)との違いは図中に太字で示した。すでに報告されているマウスiNOS遺伝子の相同領域との相同性は70.4%であった。図中に示したように相同性85%以上の領域(枠線で囲った部分)が2つとそれに挟まれた相同性がほとんどない部分とに分けられた。図中にはさらに各種転写因子の結合する可能性のある塩基配列を下線で示した。それによれば、相同性の高い領域にのみ転写因子結合配列が存在するようであり、この2つの領域がiNOSの転写調節に重要であることを示唆した。この研究においては転写開始部位を同定しなかったが、マウスのiNOSのexon 1の開始部分とまったく相同な部分が存在するため、その部分を転写開始位置と想定し、この部分を起点に上流をマイナス、下流をプラスと考えて塩基の番号を特定した。図中にはexon 1をitalicで表わした。なお、図中にはsequencingに使用したprimerの位置および制限酵素による切断部位も示した。

#### [iNOS遺伝子の5'上流領域における転写因子結合部位の推定]

この5'上流領域において転写因子の結合する部位を検討するため、DNase I footprintingを施行した。図18に示すようにコントロールの新生仔ラット培養心筋細胞から調整した核蛋白とprobeをincubateした場合、-75 (レーン2の約220 bp相当のバンド)と-880 (レーン6の約200 bp相当のバンド)付近にDNase Iにhypersensitiveな部分を認めた。これが図17の中で▽で示した場所である。この部分より標識末端に近位の部分である-75から+40および-990~-880はDNase Iによる分解から保護されていた。LPS (10- $\mu$ g/ml)で刺激した細胞から抽出した核蛋白とincubateした場合、コントロールに比べ、-270~-75 (レーン3-4の220~420 bp) および-880~-680 (レーン7-8の200~400 bp)の部分にDNase Iに対して強く保護される領域を認めた。この結果からTATA box (-38~-33)より下流、IRF結合部位 (-909~-885)、GAS (-936~-918)にはコントロールの状態からこれらの部分に結合する蛋白の存在が示唆される。一方、LPSによる刺激は前記の部分に加えて、NF- $\kappa$ B結合部位 (-101~-87)やCAAT box (-163~-155および-87~-78)に結合する蛋白の誘導または増加を生じると考えられる。また、LPSによる-885~-685 (レーン7-8の200~400 bp)の部分のDNase I耐性の出現は $\gamma$ -interferon response elementに結合する転写因子の関与を示唆する。

#### [新生仔ラット培養心筋細胞におけるiNOS遺伝子のpromoter活性の解析]

1.1 kbのiNOS遺伝子5'上流領域のdeletion mutantを図19に示す。これらの作成したdeletion mutantを有するconstructを新生仔ラット培養心筋細胞にtransfectionし、LPS (10  $\mu$ g/ml)で刺激した。図20Aに示すようにCATの酵素活性は1.1 kbのinsertを有するconstruct 1の場合コントロールに比べて著明な増加を認めた。Deletion mutantを挿入されたconstructの場合、enhancer領域に存在するGASおよびIRF結合部位 (-1045~-893)が脱落しただけで著明なCAT活性の低下を認める。したがって、この部分のiNOS転写活性に対する重要性が示唆される。Construct 4においては、construct 2または3に比べて、さらにCAT活性が低下するため、-163~-155の存在するCAAT boxの重要性が示唆された。また、promotor領域をも脱落させたconstruct 5の場合、CAT活性はほぼコントロールと変わらない程度にまで低下した。

1.1 kbの5'上流領域を含むconstruct 1をtransfectionし、各種の薬剤の作用を検討した。図20Bに示すようにFSK (100  $\mu$ M)、IL-6 (2,000 U/ml)、TNF  $\alpha$  (500 U/ml)のLPS (10  $\mu$ g/ml)との同時投与はLPS単独投与に比べて、CATの酵素活性を増加させた。これ

はiNOS mRNAのLPSによる誘導をこれらの薬剤が促進することと合致し、またその転写促進機構はこのconstructのinsert部分すなわち5'上流1.1 kbの間に存在することが示唆される。一方、DEX (1  $\mu$  M) およびHerb (2  $\mu$  M) の前投与はLPSによるCAT酵素活性の増加を抑制した。これはiNOS mRNAのLPSによる誘導をこれらの薬剤が抑制することと合致し、またその転写抑制機構はこのconstructのinsert部分すなわち5'上流1.1 kbの間に存在することが示唆される。

#### [新生仔ラット培養心筋細胞における転写因子活性の解析]

以上のようにiNOSの転写にはその5'上流1.1 kbの部分が必要であり、この部分に結合する転写因子について次にEMSAにより検討した。

まずNF- $\kappa$ B結合部位に対するEMSAを図21に示す。コントロールの状態ではNF- $\kappa$ B部位に結合する核蛋白を認めなかったが、LPS (10  $\mu$  g/ml) の投与はこの部位に対する結合活性の著明な増加を認めた。この結合活性はLPS投与後30分から生じ、新たな蛋白合成の必要はない。NF- $\kappa$ B結合活性はLPS投与後6時間で最大となり、LPSによるiNOS mRNAの誘導の時間的経過と合致する。DEXはLPSによるNF- $\kappa$ B結合活性の増加を有意に抑制した。このことがDEXによるiNOS誘導の抑制に関与していることが示唆される。FSKによるNF- $\kappa$ B結合活性の増加はなく、またLPSによるNF- $\kappa$ B結合活性の増加はH-89の前処置により変化を受けなかったため、PKAの経路はNF- $\kappa$ Bの活性化には無関係のようであった。iNOSの誘導と同様に選択的PKCの抑制薬であるCalはLPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化に対してほとんど影響がなかったが、STは著明に抑制した。Tyrosine kinase inhibitorであるHerbも有意な抑制作用を示した。さらにPDTCはLPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化をほぼ完全に抑制した。これらの結果はiNOS誘導の抑制作用を有する薬剤の機序をNF- $\kappa$ Bによってよく説明しうるようであった。TNF  $\alpha$  はNF- $\kappa$ Bを活性化したが、IL-6は有意な作用はなかった。

つぎにCAAT boxに対するEMSAを行った。図22に示すようにCAAT boxのEMSAはコントロールの状態ではspecific bindingが一本存在する。これをB1と表わして示した。LPSの投与はこのB1に加えて、B2と仮に命名したより遅い移動度を有する新しい結合活性を生じた。B2はLPS投与後2時間から出現し、6時間後に最大となり、24時間後も持続している。この時間的経過はiNOSの誘導にきわめて良く似ている。また、B2の誘導には新たな蛋白合成を必要とするようであった。このB1およびB2の両者は100-

倍モル相当量の未標識のCAAT box oligonucleotideの同時incubationにより、まったく認められなくなった。一方、未標識のCRE probeとのincubationはB1に変化を与えなかったが、B2を有意に減少させた。また、FSKの投与はB2を出現させた。さらにラットCRE binding protein (CREB)に対するウサギpolyclonal抗体 (Upstate Biotechnology) とのincubation後B2はほぼ完全に消失した。H-89, Herb, STの前投与はこのLPSにより誘導されるB2の活性を有意に抑制した。TNF  $\alpha$  およびIL-6はB2の誘導をきたさなかった。このB2結合活性の誘導がLPSまたはFSKによるiNOS mRNA転写促進の機序として重要であることが示唆された。

CREに対するEMSAにおいてFSKおよびLPSの投与後、図23に示すように結合活性の増加を認めた。CRE結合活性はCRE特異的であり、抗CREB抗体とのincubation後明らかなsupershiftを認めた。また、このLPSによるCRE結合活性の増加の時間的経過はほぼCAAT boxに対するEMSAのB2のそれと一致していた。H-89, Herb, STの前投与はLPSによるCAAT boxへのB2結合活性とまったく同様にCRE結合活性を減少させた。TNF  $\alpha$  およびIL-6はCRE結合活性の増加をきたさなかった。

IRF結合部位に対するEMSAを図24に示す。IRF部位に対するEMSAにおいてコントロールの状態からB3に相当する結合活性が認められる。一方、LPSの投与後6時間において、より遅い移動度を有する新たな蛋白合成を必要とするB4の誘導が認められた。B4の誘導はHerb, ST, またはDEXの前投与により有意に減少した。TNF  $\alpha$  はB4を誘導しなかったが、IL-6による誘導を認めた。

このIRF-1の誘導にも必要と考えられるGAS/SIEはiNOSの5'上流領域にも存在する。図25にGAS/SIEに対するEMSAを示す。コントロールから結合活性が見られるものの(B5)、LPSとIL-6投与後30分において、新たな結合活性の誘導が認められる(B6およびB7)。Foot printing解析によれば、コントロールの状態からGAS/SIE部位に結合蛋白の存在が示唆されている。

## 【考察】

NOは成体における心機能を制御する因子の一つとして注目を浴びてきた(45, 46). Muscarinic agonist (4, 8) やcytokine (1, 2, 17) によるcNOSの活性化は心筋細胞においてNOの産生を増加させ、このようなNOの産生は心筋の機能を抑制する. 同様にiNOSの誘導は心筋細胞においてNOの産生を増加させ、その増加したNOは心筋細胞の収縮機能を抑制することが報告されている(6, 24-27). 私はこの研究においてiNOSにより増加したNOが心筋細胞の収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅を低下させることを示した. 成ラット心筋細胞をin vitroでendotoxinとincubateするとNO依存性に心筋の収縮力が低下することが報告されている(26). この研究においてもLPSを24時間投与した心筋細胞において $[Ca^{2+}]_i$ と自発収縮の頻度が非刺激の細胞に比べて低下していることを示した. このような現象もiNOSによる心機能の低下と考えてよいのかもしれないが, LPSはNO依存性の経路以外にも心機能に影響を与えるシグナル伝達経路を活性化すると考えられ, 単純にiNOSのみにその原因を帰することはできない. この研究においてはL-arginineの灌流によりL-NMMAのiNOSに対する抑制作用を急激に逆転させることのほうがiNOSのNO依存性の経路を検討するのに適当であると思われた. NO donorの心筋細胞に対する投与は陰性変力作用を呈するという見解が支持されつつある(22). したがって, iNOS誘導による心筋細胞内で増大したNOは周囲に拡散して隣接する心筋細胞に対してparacrineに働くことが示唆される.

さらにこの研究においてNOの産生はcGMP含量の増加を伴うことを示した. cGMPは過去に陰性変力作用を呈する物質として報告されている(23). また同時にmethylene blueによるguanylyl cyclaseの抑制が有意にNOの陰性変力作用を阻害することも示した. したがって, iNOSの誘導はNO/cGMP依存性の経路を介して心筋細胞の機能を抑制すると考えられた. 近年, methylene blueがsuperoxideを産生することが報告された(47). NOが活性酸素と反応することは良く知られているが, methylene blueはsuperoxideを産生することにより生物学的に活性を有するNOを減少させる機序がある可能性がある. その他, methylene blueが直接NOSを阻害する機序も報告があり(48), この研究におけるmethylene blueの作用はNOに対する阻害作用のみを見ている可能性がある. しかし, PKG阻害薬であるKT5823を用いた実験を考慮するとcGMPの増加がiNOSによる心筋細胞の機能抑制に大きな役割を演じていると考えざるを得ない.

以前の研究によれば、cGMPは心筋の収縮蛋白のCa<sup>2+</sup>感受性を低下させるとされている(23)。この研究においてもiNOSの誘導された心筋細胞におけるNO/cGMPの上昇は拡張期の細胞位置を下方に移動させ、Ca<sup>2+</sup>感受性の低下もこのiNOSの場合も心筋収縮力の低下に関与している可能性が示唆された(7)。先の研究においてcGMPが心筋の収縮蛋白のCa<sup>2+</sup>感受性を低下させる機序はPKGの活性化によると考えられる(23)。すなわち、PKGによる収縮蛋白のリン酸化がNO/cGMP依存性の陰性変力作用に重要であると考えられる。ただし、心筋細胞におけるPKGの基質として明確になっている収縮蛋白はほとんどなく、この点については将来の検討課題といえる。

一連の研究において、cNOS(4, 8)またはiNOS(6, 24, 26)の産生するNOは成ラット心筋細胞の収縮力を非刺激の状態では変化させないが、 $\beta$  adrenergic刺激下に収縮力が増加している条件においてのみ陰性変力作用を生じることが報告されている。しかし、この研究においては新生仔ラット培養心筋細胞において $\beta$  adrenergic刺激を加えない条件でもNOによる陰性変力作用を認めた。他の研究においても $\beta$  adrenergic刺激を加えない条件でNO donor(22)や8-bromo cGMP(23)の投与が陰性変力作用を呈することが示されている。Ca<sup>2+</sup> currentに関しても $\beta$  adrenergic刺激を加えない条件ではcGMP(49)やNO donor(50, 51)の投与により変化しないという報告もあるが、若年のラットの心筋細胞では非刺激の状態でもPKGの細胞内投与がCa<sup>2+</sup> currentを抑制したという報告もある(52)。この点に関してはいまだ議論の最中であるが、取り扱っている対象の非刺激の状態におけるPKAの活性の差がこれらの結果の差を説明しうるかもしれない。新生仔ラットの培養心筋細胞は電気刺激しなくても自発収縮する。したがって、電気刺激なくしてはまったく収縮しない成ラットの心筋細胞に比べると比較的高いレベルのPKA活性を有すると考えられる。この高いレベルのPKA活性は $\beta$  adrenergic刺激を加えた条件に類似するものと考えられる。このことに関してもう少し説明を加える。このようにPKA活性が常時高い細胞の場合、いわゆる作業仮説によればPKGの活性は低く抑えられていると考えられる。心筋収縮蛋白やCa<sup>2+</sup> channelなどのPKGによるリン酸化部位はしたがって非リン酸化された状態のものが多いと考えられる。この場合、NO/cGMPの上昇によるPKG活性の増大はそれらの非リン酸化部位をリン酸化し、その結果陰性変力作用やCa<sup>2+</sup>電流の減少をもたらすと考えられる。一方、PKA活性が低い細胞の場合、以上の逆の構図となり、PKGによる基質のリン酸化部位はすでにリン酸化されており、NO/cGMPの上昇によって新たにPKG活性が増

大しても心筋収縮蛋白やCa<sup>2+</sup> channelなどのリン酸化状態が変化することが少ないと考えられる。このような仮説が新生仔ラットの培養心筋細胞においてβ adrenergic刺激を加えなくてもiNOSの産生したNO/cGMPにより、陰性変力作用と[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>減少作用を呈したことを説明しうるものと考ええる。

これまでさまざまな研究においてNO/cGMP依存性の経路でCa<sup>2+</sup> currentが減少すると報告されている(4, 49-55)。この研究において観察した[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>と自発収縮回数の減少はそのすべてを説明しうるものではないにしろ、Ca<sup>2+</sup> currentの減少による部分が大きいと考えられる。哺乳類の心室筋細胞ではCa<sup>2+</sup> currentの減少はcGMP依存性の経路すなわちPKGの活性化によると考えられている(49, 51, 52)。しかし、NO donorによるCa<sup>2+</sup> currentの減少がcGMP-dependent PDEの活性化によるという報告もある。カエルの心室筋(50)やヒトの心房筋の細胞(53)ではNO donorを投与したさいcGMPの増加によりPDE (type II)の活性化を生じ、結果としてcAMPの減少をもたらしさらにCa<sup>2+</sup> currentの減少に至ると考えられる。このことはiNOSの場合にも同様の機序が考えられるが、この研究においては、L-arginineを投与する前も後もcAMPの含量はまったく変化がなかった。さらに非特異的にPDEを阻害すると考えられるIBMXの前投与を行ってもcAMPの基礎値を著明に増大させるものの、やはりL-arginine投与前後でcAMP含量の変化はなかった。このことはiNOSの誘導による増加したNOの作用にはPDE type-IIの活性化は大きな役割を演じていないと考えられた。一方、cGMPの上昇に伴うPDE (type III)の抑制も報告されている(23, 50, 51)。この場合、PDEの抑制はcAMPの増加をもたらし、Ca<sup>2+</sup> currentや[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加に至るという報告もある。L-arginineの投与後[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>や収縮頻度およびcAMPの増加を認めないので、このような機序もここで検討したiNOSの産生するNOの作用においては無関係であると思われる。

Muscarinic receptor agonist (54)やIL-1 (55)もCa<sup>2+</sup> currentを減少させるが、その機序は上記のものとは異なりadenylyl cyclaseを直接抑制するという報告もある。この場合、cAMP含量の減少がCa<sup>2+</sup> currentの減少に働いているが、L-arginine投与の前後でcAMP含量に変化はなく、iNOSの産生したNOによる心筋機能抑制作用にはadenylyl cyclaseの直接抑制の機序も関係ないと思われた。

一度心筋細胞内でNOまたはcGMPが増加するとその心筋細胞の機能に対する抑制作用をL-NMMA, methylene blue, およびKT5823により後から逆転させるのは困難であった。先に述べたようにPKGによる心筋収縮蛋白やCa<sup>2+</sup> channelのリン酸化が

iNOSの誘導後惹起される機能抑制に働いているとすれば、このPKGによるリン酸化の状態は通常の心筋細胞内のphosphatase活性ではこの研究において観察した短時間以内に脱リン酸化されない安定したものだと考えられる。

また、L-NMMAを単独で24時間投与された心筋細胞においてcGMPの含量はコントロールの細胞と比べて有意な差はなかった。さらに、L-NMMAを単独で24時間投与された心筋細胞においてL-arginineを追加投与してもcGMP含量の増加は認められなかった。L-NMMA単独を24時間投与した心筋細胞にL-arginineを追加投与しても $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮に変化は見られなかった。これを考えると心筋細胞のcNOSは通常では活性化されておらず、陰性変力作用や $[Ca^{2+}]_i$ 減少作用を生じる程度のNOやcGMPを産生しないものと思われる。in vitroのNOS活性の測定では有意なcNOSの存在が確認されたが、心筋細胞では細胞内の $Ca^{2+}$ のレベルは収縮時には比較的高いにもかかわらず普段は不活性化されており、活性化には別の機構が必要であると考えられた。

NOの心筋細胞に対する生理学的作用としてはその細胞傷害作用が報告されており(45, 46)、cytokineにより誘導されたNO産生が心筋細胞において細胞死をもたらすことが報告されている(56)。しかし、細胞生存率測定の結果からはLPSを24時間投与しても新生仔ラット培養心筋細胞ではまったく細胞のviabilityの変化を認めなかった。したがって、ここで観察された心筋細胞の機能の抑制作用は細胞傷害による非特異的なものではないと考えられる。その他、NOの心筋細胞に対するcGMP非依存性の経路として、mitochondriaの呼吸鎖を阻害するというものが近年報告されたが(57)、やはりMTT assayに変化がなかったことからその可能性はこの系では低いと考えられた。

iNOSのノックアウトマウスの検討において(58, 59)、LPS challengeによるshock responseが消失しており、いわゆるseptic shockの原因がiNOSであることを強く示唆する。このshockから死に至る経過において全身の血管抵抗の低下による血圧の低下が重要なfactorであるとされてきた。敗血症性ショックに際してはこのように末梢血管抵抗の低下が著しいため心機能の低下を検出するのは困難であり、かつ侵襲的な検査も施行し難いため、これまでヒトにおいて心筋自体の収縮力低下の報告は見当たらない。しかし、この研究からは、心筋自体の収縮力低下によるpump failureの要素も十分考えられる。また、septic shockの治療の点ではiNOSをtargetにしたL-NMMAの投与も有用であると思われる。実際に治験も行われ、有効性が報告されている(60)。

つぎにiNOSの転写制御機構の検討を行った。図26にその大略を示す。近年、iNOSの5'上流領域がマウス (33)、ヒト (34, 35)、およびニワトリ (36) でcloningされ、その転写制御も検討されている。この研究で使用した系はラットであるため、これまでcloningされていなかったラットiNOSの5'上流領域を1 kb程度cloningし、その塩基配列を同定した。マウスの5'上流領域と相同性の高い領域に転写因子結合部位が存在すると考えられた。マウスでもこの研究で示した転写制御とはほぼ同様の結果が得られており、enhancer領域とpromoter領域の重要性が示唆されている (33, 37-39)。マウスのiNOS-遺伝子のmethylation interference assayにより、enhancer領域とpromoter領域におけるNF- $\kappa$ B, GAS, IRF-1, CAAT box, Octに対する転写因子結合の可能性が強く示唆された (61)。ヒトでは齧歯類と異なり、7~16 kb上流の部分が転写活性促進に重要であると示唆された (35)。ニワトリの5'上流領域はヒトやマウスとは大きく異なり、転写因子結合部位と推定される配列もNF- $\kappa$ BとCAAT boxのみである (36)。このように種によってiNOSの転写制御機構はかなり違うことが示唆される。

cAMPのレベルを上昇させる物質はLPSによるiNOSの誘導を促進した。PKAの活性化によるiNOS発現に対するsynergismは他の研究においても示唆されている (62, 63)。しかし、forskolinやisoproterenol単独ではiNOSの誘導は見られなかった。最近の研究でcAMP単独の投与がiNOSを誘導するというものがある (64, 65) が、おそらくはコントロールの状態での培養液中のendotoxinの濃度の違いがその原因と思われる。cAMPによるiNOS誘導のsynergismの機序について近年iNOS mRNAのstabilityを亢進させるという研究が見られたが (66)、その詳細ははまだ明らかでない。一般にcAMPおよびPKAによる転写促進といえばser<sup>133</sup>をリン酸化されたCREBによるtransactivationが考えられる。これまでもさまざまな研究によりcAMP-PKA-CREBのcascadeがCREを介して転写を制御する機構が解明されてきた。CREBが心筋細胞に存在し、forskolinの刺激によりリン酸化され核に移行するということが確かめられている (67)。また転写因子として下流の遺伝子の転写を促進するためにはCREに結合するCREBはリン酸化されている必要がある。しかし、iNOS遺伝子の少なくとも上流1.1 kbの配列にはCREが存在せず、リン酸化CREBのhomodimerがiNOS遺伝子の5'上流領域に結合してその転写を促進するという機序は考えにくい。近年になって、CREB/ATF familyの転写因子群がCAAT box/enhancer binding protein (C/EBP) familyとの間にheterodimerを形成し得ることが示されてきた (68, 69)。CAAT boxおよびCREに対するEMSAの結果からCREBと

C/EBP familyの転写因子とがheterodimerを形成し、CAAT boxに結合し、B2を形成している可能性が示唆される。ForskolinはPKAを活性化することにより、リン酸化されたCREBが核内に移行する。したがって、CAAT boxに対するEMSAにおけるforskolin投与後のB2はリン酸化CREBとC/EBPのheterodimerと考えられる。これと同様にLPSによるB2の出現とCRE活性の増加はPKA阻害薬で消失することを考えれば、LPSも少なくとも一過性にPKAの活性化を生じ、CREBをリン酸化すると考えられる。LPSによるPKAの活性化は過去に報告がある(70)。しかし、LPS投与後6時間のCREBの活性化は蛋白合成を必要とした。CREB遺伝子はその上流にCREを有しているため、その遺伝子産物自体によって転写活性化が生じる(71)。LPSによるPKAの活性化はリン酸化CREBを核内に移行させ、さらにpositive feed backにより、多くのCREBが生じると考えられる。こうして生じたCREBが、すべてリン酸化されるとは考えにくい。LPSによるB2の形成には大きな役割を有していると考えられる。ForskolinとLPSを同時投与した場合は新たな蛋白合成を経て生じたCREBもまたリン酸化されると考えられ、CREBとC/EBPのheterodimerの中でのリン酸化CREBの割合が増加すると考えられる。したがって、リン酸化CREBとC/EBPのheterodimerがCAAT boxを介してforskolinによるiNOSの転写亢進の機序と考えられる。しかし、H-89でほぼ完全にPKAの活性化を抑制しておいてもなおiNOSの転写はある程度残存する。また、IL-6もTNF $\alpha$ もどちらもCREBを活性化しないが、2つの同時投与はある程度のiNOSの転写を誘導する。これらの結果を考えると、CREBの活性化がiNOSの転写に必須ではなく、synergisticにのみ働くと思われる。StaurosporineがCREBを抑制する機構については、staurosporineがPKAを含む広い範囲のkinaseを抑制しているためかもしれないが、LPSのCREB活性化にPKA以外のkinase cascadeが働いている可能性もある(72)。

CAAT boxのEMSAにおいてコントロールの状態から結合活性(B1)を認めた。この活性はC/EBPのhomodimerと考えられた。審良らもまた非刺激の細胞から抽出した核蛋白においてもCAAT boxに結合する活性を認めている(73)。このC/EBPがいかなるメンバーからなっているのかまたiNOSの転写にどのような働きがあるのか不明である。C/EBP $\beta$ による転写促進はthr<sup>235</sup>のリン酸化により制御されると考えられている(74-76)。LPS投与後もB1の活性は有意な変化はなかった。また、さまざまなinterventionもコントロールおよびLPS投与後のB1活性を変化させなかった。したがって、かりにC/EBP homodimerがiNOSの転写をCAAT boxを介して促進することがあったとしても、

このhomodimerの新たな誘導や核への移行の増加またはDNA結合活性の増加などによる機序は考えにくい。近年, mitogen-activated protein (MAP) kinase がC/EBP $\beta$ をリン酸化することが報告された(74)。LPSもまたMAP kinaseの活性化を誘導し(77), リン酸化されたC/EBP $\beta$ のhomodimerがiNOS遺伝子の転写促進に働いている可能性もある。田中からはC/EBP $\beta$ のノックアウトマウスにおいてcytokineとiNOSの転写は阻害されていないことを報じている(78)。彼等も論じているようにC/EBP familyの他のメンバーがC/EBP $\beta$ の代わりをしている可能性がある。

iNOSの誘導にNF- $\kappa$ Bの活性化が重要であることは過去の研究で示されてきた(39)。この研究においても新たな蛋白合成を必要としないNF- $\kappa$ Bの活性化をLPSが誘導することを示した。一般に不活性のNF- $\kappa$ Bは細胞質内でI- $\kappa$ Bと結合しており, 細胞内に活性化のシグナルが伝達されるとNF- $\kappa$ BがI- $\kappa$ Bと離れて核内に移行する。DexamethasoneはNF- $\kappa$ BのDNA結合活性を抑制するが, そのメカニズムはさまざまに提唱されている。Glucocorticoid receptorが核内でNF- $\kappa$ Bの結合部位を占拠してしまう機序(79)やglucocorticoid receptorが核内でNF- $\kappa$ Bそのものと会合してDNA結合能を喪失させてしまうもの(80)などがある。前者はDEXを投与した細胞のEMSAにおいて新たなNF- $\kappa$ B結合活性を認めないことから可能性が低いと思われる。DexamethasoneのiNOS誘導抑制については近年細胞外マトリックスの一種であるosteopectinの発現促進を介するという示唆もあるが(81), その機序やまたNF- $\kappa$ Bの活性化の抑制との関連も明らかでない。Pyrrolidine dithiocarbamateはNF- $\kappa$ BがI- $\kappa$ Bから乖離するのを防ぐ薬剤と考えられている(82)が, その機序によるNF- $\kappa$ Bの活性化の抑制はiNOS発現の抑制とよく相関している。その他, LPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害するものとしてはtyrosine kinase inhibitorやstaurosporineが知られており(83), この研究においても同様の結果を得た。また, これらのNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制するinterventionは強くiNOSの誘導を阻害した。つまり, LPSによるiNOSの誘導はNF- $\kappa$ Bの活性化によるところが大きいと考えられる。

Cytokineの中でTNF $\alpha$ はNF- $\kappa$ Bの活性化を生じるものとしてよく知られており, その機序としてPKCまたはMAP kinaseの活性化を介するものが示唆されている(84, 85)。TNF $\alpha$ のiNOS転写促進はNF- $\kappa$ Bの活性化による可能性が強く示唆される。IL-1 $\beta$ によるiNOSの誘導においてPKCを介したMAP kinaseの重要性が報告されており, IL-1 $\beta$ の場合はiNOSの誘導にはPKCを介した経路が強く働いていると考えられて

いる (86)。しかし一方、LPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化におけるPKCの役割はこの研究にも示したように、一般には大きなものではないと考えられている (83)。このことはLPSによるiNOSの誘導にPKCの阻害薬がさほど抑制作用がないことと通じることかもしれない。

IRF-1のノックアウトマウスの検討からこの転写因子のiNOS誘導における必要性が明らかとなった (87)。非刺激の状態においては、IRFの不活性化状態といえるIRF-2がその結合部位に結合している (88)。IRF部位に対するEMSAにおいてB3がIRF-2にあたる結合活性と考えられる。細胞内シグナルが伝達されるとIRF-1の転写が起り、IRF-2に代わってIRF結合部位に結合し、IRF-1はその下流の遺伝子の転写を促進する (89)。IRF部位に対するEMSAにおいてLPSとIL-6の投与がB4という新たな結合活性を生じ、これがIRF-1の誘導によるものと考えられた。ここでEMSAに用いたC13 oligomerはIRF-1とIRF-2のみ結合すると考えられている (90)。IRF-1の転写調節にはJAK (Janus kinase) -STAT (signal transducer and activator of transcription) 系の関与が示唆されている (91, 92)。また、iNOS遺伝子上流にもGASが存在し、STATの活性化がIRF-1の誘導を介した機序のみならず、直接iNOSの誘導を促進することも考えられる。IL-1 $\beta$ によるSTAT1 $\alpha$ の活性化がiNOSの発現に重要な役割をはたしている可能性が最近報告された (86)。STATの結合するconsensus配列であるGAS/SIEに対するEMSAを行ったところ、LPSとIL-6の投与のみが新しい結合活性を生じた。IL-6はJAKなどのtyrosine kinaseを経て、STAT1およびSTAT3のtyrosineリン酸化を生じその核内移行を促進すると考えられている (93, 94)。さらにはSTATのGAS/SIEへの結合にはtyrosineリン酸化のほか、staurosporine感受性のserine/threonineリン酸化も必要とされている (95)。LPSによるJAK-STAT系の活性化の検討はいまだ少ないが、IRFおよびSIEに対するEMSAにおいてherbimycinやstaurosporineがLPSによる新しい結合活性の誘導を有意に阻害することは上記の議論がそのまま当てはまるものと考えられる。

以上から、TNF $\alpha$ はNF- $\kappa$ Bを活性化し、IL-6はSTATとIRF-1を活性化ないし誘導する。これらの転写因子はiNOSの誘導には最低必要であると考えられた。したがって、それぞれのcytokine単独ではiNOSの誘導に至らないと思われる。さらにiNOS誘導に必要なものの候補としてはリン酸化されたC/EBPがあげられるが、C/EBPがMAP kinaseによりリン酸化される機序があると考えれば (74)、IL-6 (96) にもTNF $\alpha$  (84) にもその可能性はある。CREBの活性化はforskolinによるiNOS誘導の促進作用には重要

と考えられるが、必須なものとは考えにくく、synergismを有するにとどまると考えられた。

このようにLPSによるiNOSの誘導には複数の転写因子が必要であると考えられた。またiNOS発現にいたるさまざまな転写因子の活性化において、tyrosine kinaseの活性化の重要性が示唆される(97)。このようなtyrosine kinaseにはSTATを活性化するJAKやMAP kinase kinaseであるMEKなどが含まれると考えられる。

iNOSは以上のように心筋の機能に対して抑制的に働く。そして心筋炎、拡張型心筋症(18, 19)、虚血再灌流障害、急性心筋梗塞、敗血症性ショックそして移植心拒絶(20, 21)などの臨床病態において重要な役割を演じている可能性がある。このような病態ではおおむね心筋収縮力が低下しているため、心筋細胞内のcAMP含量を増加させる $\beta$  adrenergic agonistやPDE inhibitorなどの薬剤を使用することが多い。その際私の示したcAMP/PKAによるiNOSのup regulationが生じる可能性があり、短期的に心筋収縮力を改善してもiNOSの発現亢進による中長期的な収縮力低下を促進することも考えられる。したがって、これらの薬剤の心不全治療における使用にはiNOSの関与を考慮に入れるべきかもしれない。また、心不全患者の心筋におけるiNOSの発現亢進が報告されており(18, 19)、PDE inhibitorが心不全治療において予後改善効果を示さなかったことの原因の一つかもしれない(98)。また、上記の病態においてiNOSの誘導にいたる情報伝達経路は今だ明らかでないが、今回の研究から特にNF- $\kappa$ Bの活性化が重要であると考えられた。NF- $\kappa$ Bの活性化は各種の炎症性疾患で生じると考えられている。様々な心筋不全の病態における心筋局所の炎症性病変からNF- $\kappa$ Bなど各種の転写因子の活性化にいたる経路の解明が今後の検討課題と思われる。

## 【文献】

1. Finkel, M. S., C. V. Oddis, T. D. Jacob, S. C. Watkins, B. G. Hattler, and R. L. Simmons. 1992. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 257:387-389.
2. Kinugawa, K., T. Takahashi, O. Kohmoto, A. Yao, T. Aoyagi, S. Momomura, Y. Hirata, and T. Serizawa. 1994. Nitric oxide-mediated effects of interleukin 6 on  $[Ca^{2+}]_i$  and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ. Res.* 75:285-295.
3. Schulz, R., E. Nava, and S. Moncada. 1992. Induction and potential biological relevance of a  $Ca^{2+}$ -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 105:575-580.
4. Balligand, J-L., L. Kobzik, X. Han, D. M. Kaye, L. Belhassen, D. S. O'Hara, R. A. Kelly, T. W. Smith, and T. Michel. 1995. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 270:14582-14586.
5. Tsujino, M., Y. Hirata, T. Imai, K. Kanno, S. Eguchi, H. Ito, and F. Marumo. 1994. Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin-1  $\beta$  in cultured rat cardiocytes. *Circulation*. 90:375-383.
6. Balligand, J-L., D. Ungureanu-Longrois, W. W. Simmons, D. Pimental, T. A. Malinski, M. Kapturczak, Z. Taha, C. J. Lowenstein, A. J. Davidoff, R. A. Kelly, T. W. Smith, and T. Michel. 1994. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 269:27580-27588.
7. Kinugawa, K., O. Kohmoto, A. Yao, T. Serizawa, and T. Takahashi. 1996. Cardiac Inducible Nitric Oxide Synthase Negatively Modulates Myocardial Function in Cultured Rat Myocytes. *Am. J. Physiol.* in press.
8. Balligand, J-L., R. A. Kelly, P. A. Marsden, T. W. Smith, and T. Michel. 1993. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:347-351.
9. Pinskey, M. R., J. L. Vincent, J. Deviere, M. Alegre, R. J. Kahn, and E. Dupont. 1993. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. 103:565-575.
10. Satoh, M., G. Tamura, I. Segawa, A. Tashiro, K. Hiramori, and R. Satodate. 196. Expression of cytokine genes and presence of enteroviral genomic RNA in endomyocardial biopsy tissues of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Virchows Arch.* 427:503-509.
11. Kukielka, G. L., C. W. Smith, A. M. Manning, K. A. Youker, L. H. Michael, and M. L. Entman. 1995. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation*. 92:1866-1875.

12. Neumann, F. J., I. Ott, M. Gawaz, G. Richardt, H. Holzapfel, M. Jochum, and A. Schomig. 1995. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*. 92:748-755.
13. Fyfe, A., P. Daly, L. Galligan, L. Pirc, C. Feindel, and C. Cardella. 1993. Coronary sinus sampling of cytokines after heart transplantation: evidence for macrophage activation and interleukin-4 production within the graft. *J. Am. Coll. Cardiol.* 21:171-176.
14. Deng, M. C., M. Erren, L. Kammerling, F. Gunther, S. Kerber, A. Fahrenkamp, G. Assmann, G. Breithardt, and H. H. Scheld. 1995. The relation of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, IL-2, and IL-2 receptor levels to cellular rejection, allograft dysfunction, and clinical events early after cardiac transplantation. *Transplantation*. 60:1118-1124.
15. Torre-Amione, G., S. Kapadia, J. Lee, J. B. Durand, R. D. Bies, J. B. Young, and D. L. Mann. 1996. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*. 93:704-711.
16. Yokoyama, T., L. Vaca, R. D. Rossen, W. Durante, P. Hazarika, and D. L. Mann. 1993. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J. Clin. Invest.* 92:2302-2312.
17. Sugishita, K., K. Kinugawa, K. Harada, H. Ikenouchi, O. Kohmoto, T. Takahashi, and T. Serizawa. 1995. IL-6 exerts negative inotropic action via NO-dependent pathway while TNF  $\alpha$  does via NO-independent pathway in guinea pig cardiac myocytes. *Circulation* 92 (Suppl.) : I -505 (Abstract) .
18. Haywood, G. A., P. S. Tsao, H. E. von der Leyen, M. J. Mann, P. J. Keeling, P. T. Trindade, N. P. Lewis, C. D. Byrne, P. R. Rickenbacher, N. H. Bishopric, J. P. Cooke, W. J. McKenna, and M. B. Fowler. 1996. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*. 93:1087-1094.
19. de Belder, A. J., M. W. Radomski, H. J. F. Why, P. J. Richardson, C. A. Bucknall, E. Salas, J. F. Martin, and S. Moncada. 1993. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet*. 341:84-85.
20. Lewis, N. P., P. S. Tsao, P. R. Rickenbacher, C. Xue, R. A. Johns, G. A. Haywood, H. von der Leyen, P. T. Trindade, J. P. Cooke, S. A. Hunt, M. E. Billingham, H. A. Valentine, and M. B. Fowler. 1996. Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle. *Circulation*. 93:720-729.
21. Yang, X., N. Chowdhury, B. Cai, J. Brett, C. Marboe, R. R. Sciacca, and R. E. Michler. 1994. Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection. *J. Clin. Invest.* 94:714-721.
22. Brady, A. J. B., J. B. Warren, P. A. Poole-Wilson, T. J. Williams, and S. E.

- Harding. 1993. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am. J. Physiol.* 265:H176-H182.
23. Shah, A. M., H. A. Spurgeon, S. J. Sollott, A. Talo, and E. G. Lakatta. 1994. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to  $Ca^{2+}$  in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.* 74:970-978.
24. Balligand, J-L., D. Ungureanu, R. A. Kelly, L. Kobzik, D. Pimental, T. Michel, and T. W. Smith. 1993. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J. Clin. Invest.* 91:2314-2319.
25. Brady, A. J., P. A. Poole-Wilson, S. E. Harding, and J. B. Warren. 1992. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am. J. Physiol.* 263:H1963-H1966.
26. Tao, S., and T. M. McKenna. 1994. In vitro endotoxin exposure induces contractile dysfunction in adult rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 267:H1745-H1752.
27. Ungureanu-Longrois, D., J-L. Balligand, W. W. Simmons, I. Okada, L. Kobzik, C. J. Lowenstein, S. L. Kunkel, T. Michel, R. A. Kelly, and T. W. Smith. 1995. Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to  $\beta$ -adrenergic agonists. *Circ. Res.* 77: 494-502.
28. Kinugawa, K., T. Takahashi, O. Kohmoto, A. Yao, H. Ikenouchi, and T. Serizawa. 1995.  $Ca^{2+}$ -growth coupling in angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiac cells. *Cardiovasc. Res.* 30: 419-431.
29. Kinugawa, K., O. Kohmoto, T. Takahashi, and T. Serizawa. 1993. Effects of a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist (CV-11974) on  $[Ca^{2+}]_i$  and cell motion in cultured ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 235:313-316.
30. Kinugawa, K., T. Takahashi, O. Kohmoto, A. Yao, S. Momomura, and T. Serizawa. 1993. Altered  $Ca^{2+}$ -handling during cellular hypertrophy in cultured chick ventricular myocytes. In *The Adapted Heart*. M. Nagano, N. Takeda, N.S. Dhalla, editors. Raven Press, New York, 125-139.
31. Kohmoto, O., H. Ikenouchi, Y. Hirata, S. Momomura, T. Serizawa, and W. H. Barry. 1993. Variable effects of endothelin-1 on  $[Ca^{2+}]_i$ , transients,  $pH_i$ , and contraction in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 265: H793-H800.
32. Yao, A., T. Takahashi, T. Aoyagi, K. Kinugawa, O. Kohmoto, S. Sugiura, and T. Serizawa. 1995. Immediate-early gene induction and MAP kinase activation during recovery from metabolic inhibition in cultured cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 96:69-77.
33. Lowenstein, C. J., E. W. Alley, P. Raval, A. M. Snowman, S. H. Snyder, S. W. Russell, and W. J. Murphy. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two

- upstream regions mediate induction by interferon  $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9730-9734.
34. Chartrain, N. A., D. A. Geller, P. P. Koty, N. F. Sitrin, A. K. Nussler, E. P. Hoffman, T. B. Billiar, N. I. Hutchinson, and J. S. Mudgett. 1994. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 269:6765-6772.
  35. De Vera, M. E., R. A. Shapiro, A. K. Nussler, J. S. Mudgett, R. L. Simmons, S. M. Jr. Morris, T. R. Billiar, and D. A. Geller. 1996. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1054-1059.
  36. Lin, A. W., C. C. Chang, and C. C. McCormick. 1996. Molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric-oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* 271:11911-11919.
  37. Xie, Q-W., R. Whisnant, and C. Nathan. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon  $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177:1779-1784.
  38. Martin, E., C. Nathan, and Q-W. Xie. 1994. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 180:977-984.
  39. Xie, Q-W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan. 1994. Role of transcription factor NF- $\kappa$  B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269:4705-4708.
  40. Kinugawa, K., T. Takahashi, A. Yao, O. Kohmoto, and T. Serizawa. 1995 Cardiac nitric oxide synthase induction requires multiple nuclear factors. *Circulation* 92 (Suppl.) : I -572 (Abstract) .
  41. Carbos, M., M. Roth, A. W. A. Hahn, and P. Erne. 1994. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 93:2372-2378.
  42. Voyta, J. C., D. P. Via, C. E. Butterfield, and B. R. Zetter. 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated density lipoprotein. *J. Cell. Biol.* 99: 2034-2040.
  43. Nunokawa, Y., N. Ishida, and S. Tanaka. 1993. Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:89-94.
  44. Eberhardt, W., D. Kunz, R. Hummel, and J. Pfeilschifter. 1996. Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223:752-756.
  45. Moncada, S., R. M. J. Palmer, and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.

46. Kelly, R. A., J-L. Balligand, and T. W. Smith. 1996. Nitric oxide and cardiac function. *Circ. Res.* 79:363-380.
47. Kontos, H. A., and E. P. Wei. 1993. Hydroxyl radical-dependent inactivation of guanylate cyclase in cerebral arterioles by methylene blue and by LY83583. *Stroke.* 24: 427-434.
48. Mayer, B., F. Brunner, and K. Schmidt. 1993. Inhibition of nitric oxide synthase by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 45: 367-374.
49. Méry, P-F., S. M. Lohmann, U. Walter, and R. Fischmeister. 1991.  $Ca^{2+}$  current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:1197-1201.
50. Méry, P-F., C. Pavoine, L. Belhassen, F. Pecker, and R. Fischmeister. 1993. Nitric oxide regulates cardiac  $Ca^{2+}$  current. *J. Biol. Chem.* 268:26286-26295.
51. Wahler, G. M., and S. J. Dollinger. 1995. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol.* 268: C45-C54.
52. Sumii, K., and N. Sperelakis. 1995. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type  $Ca^{2+}$  current in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 77: 803-812.
53. KIRSTEIN, M., M. B. Rivet, S. Hatem, A. Benardeau, J. J. Mercadier, and R. Fischmeister. 1995. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J. Clin. Invest.* 95: 794-802.
54. Fischmeister, R., and H. C. Hartzell. 1986. Mechanism of action of acetylcholine on calcium current in single cells from frog ventricle. *J. Physiol. (London)*, 376: 183-202.
55. Rozanski, G. J., and R. C. Witt. 1994. IL-1 inhibits  $\beta$ -adrenergic control of cardiac calcium current: role of L-arginine/nitric oxide pathway. *Am. J. Physiol.* 267:H1753-H1758.
56. Pinsky, D. J., B. Cai, X. Yang, C. Rodriguez, R. R. Sciacca, and P. J. Cannon. 1995. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor  $\beta$ . *J. Clin. Invest.* 95:677-685.
57. Oddis, C. V., and M. S. Finkel. 1995. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits mitochondrial activity in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:40-44.
58. MacMicking, J. D., C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D. S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q-w. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, H. Chen, and J. S. Mudgett. 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 81:641-650.
59. Wei, X-Q., I. G. Charles, A. Smith, J. Ure, G-J. Feng, F. Huang, D. Xu, W. Muller, S. Moncada, and F. Y. Liew. 1995. Altered immune responses in mice lacking

- inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 375:408-411.
60. Petros, A., D. Bennett, and P. Vallance. 1991. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*. 338:1557-1558.
  61. Goldring, C. E. P., S. Reveneau, M. Algarte, and J-F. Jeannin. 1996. In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6. *Nucleic Acids Res.* 24:1682-1687.
  62. Oddis, C. V., R. L. Simmons, B. G. Hattler, and M. S. Finkel. 1996. Protein kinase A activation is required for IL-1 induced nitric oxide production by cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 271:C429-434.
  63. Koide, M., Y. Kawahara, I. Nakayama, T. Tsuda, and M. Yokoyama. 1993. Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 268:24959-24966.
  64. Imai, T., Y. Hirata, K. Kanno, and F. Marumo. 1994. Induction of nitric oxide synthase by cyclic AMP in rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 93:543-549.
  65. Kunz, D., H. Mühl, G. Walker, and J. Pfeilschifter. 1994. Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:5387-5391.
  66. Oddis, C. V., R. L. Simmons, B. G. Hattler, and M. S. Finkel. 1995. cAMP enhances inducible nitric oxide synthase mRNA stability in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 269:H2044-2050.
  67. Goldspink, P. H., and B. Russell. 1994. The cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 74:1042-1049.
  68. Vallejo, M., D. Ron, C. P. Miller, and J. F. Habener. 1993. C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:4679-4683.
  69. Tsukada, J., K. Saito, W. R. Waterman, A. C. Webb, and P. E. Auron. 1994. Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1  $\beta$  gene. *Mol. Cell. Biol.* 14:7285-7297.
  70. Fujihara, M., M. Muroi, Y. Muroi, N. Ito, and T. Suzuki. 1993. Mechanism of lipopolysaccharide-triggered junB activation in a mouse macrophage-like cell line (J774). *J. Biol. Chem.* 268:14898-14905.
  71. Meyer, T. E., G. Waeber, J. Lin, W. Beckmann, and J. F. Habener. 1993. The promoter of the gene encoding 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein contains cAMP response elements: evidence for positive autoregulation of gene transcription. *Endocrinology.* 132:779-780.

72. Ginty, D. D., A. Bonni, and M. E. Greenberg. 1994. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*. 77:713-725.
73. Akira, S., H. Ishii, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*. 9:1897-1906.
74. Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto, and S. Akira. 1993. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:2207-2211.
75. Wegner, M., Z. Cao, and M. G. Rosenfeld. 1992. Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP  $\beta$ . *Science*. 256:370-373.
76. Trautwein, C., C. Caelles, P. van der Geer, T. Hunter, M. Karlin, and M. Chojkier. 1993. Transcription by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*. 364:544-547.
77. Weinstein, S. L., J. S. Sanghera, K. Lemke, A. L. DeFranco, and S. L. Pelech. 1992. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J. Biol. Chem*. 267:14955-14962.
78. Tanaka, T., S. Akira, K. Yoshida, M. Umemoto, Y. Yoneda, N. Shirafuji, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, and T. Kishimoto. 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell*. 80:353-361.
79. Mukaida, N., M. Morita, Y. Ishikawa, N. Rice, S. Okamoto, T. Kasahara, and K. Matsushima. 1994. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. *J. Biol. Chem*. 269:13289-13296.
80. Ray, A., and K. E. Prefontaine. 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcriptional factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:752-756.
81. Singh, K., J-L, Balligand, T. A. Fischer, T. W. Smith, and R. A. Kelly. 1995. Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells: role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem*. 270:28471-28478.
82. Schreck, R., B. Meier, D. N. Männel, W. Dröge, and P. A. Baeuerle. 1992. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor  $\kappa$ B activation in intact cells. *J. Exp. Med*. 175:1181-1194.
83. Ishikawa, Y., N. Mukaida, K. Kuno, N. Rice, S. Okamoto, and K. Matsushima. 1995. Establishment of lipopolysaccharide-dependent nuclear factor  $\kappa$ B activation in a

- cell-free system. *J. Biol. Chem.* 270:4158-4164.
84. Kolesnick, R., and D. W. Giode. 1994. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell.* 77:325-328.
85. Schütze, S., K. Potthoff, T. Machleidt, D. Berkovic, K. Wiegmann, and M. Krönke. 1992. TNF activates NF- $\kappa$ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell.* 71:765-776.
86. Singh, K., J-L, Balligand, T. A. Fischer, T. W. Smith, and R. A. Kelly. 1996. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells: role of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/ERK2) and STAT1  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 271:1-7.
87. Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S. I. Koh, T. Kimura, S. J. Green, T. W. Mak, T. Taniguchi, J. Vilcek. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science.* 263:1612-1615.
88. Harada, H., K. Willison, J. Sakakibara, M. Miyamoto, T. Fujita, and T. Taniguchi. 1990. Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell.* 63:303-312.
89. Miyamoto, M., T. Fujita, Y. Kimura, M. Maruyama, H. Harada, Y. Sudo, T. Miyata, and T. Taniguchi. 1988. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- $\beta$  gene regulatory elements. *Cell.* 54:903-913.
90. Fujita, T., H. Shibuya, H. Hotta, K. Yamanishi, and T. Taniguchi. 1987. Interferon- $\beta$  gene regulation: tandemly repeated sequences of a synthetic 6 bp oligomer function as a virus-inducible enhancer. *Cell.* 49:357-367.
91. Harroch, S., M. Revel, and J. Chebath. 1994. Induction by interleukin-6 of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) gene response element pIRE and cell type-dependent control of IRF-1 binding to DNA. *EMBO J.* 13:1942-1949.
92. Darnell Jr., J. E., I. M. Kerr, and G. R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 264:1415-1421.
93. Lai, C. F., J. Ripperger, K. K. Morella, Y. Wang, D. P. Gearing, G. H. Fey, and H. Baumann. 1995. Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J. Biol. Chem.* 270:14847-14850.
94. Yin, T., and Y-C. Yang. 1994. Mitogen-activated protein kinases and ribosomal S6 protein kinases are involved in signaling pathways shared by interleukin-11, interleukin-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in mouse 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 269:3731-3738.

95. Zhang, X., J. Blenis, H-C. Li, C. Schindler, and S. Chen-Kiang. 1995. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science*. 267:1990-1994.
96. Daeipour, M., G. Kumar, M. C. Amarel, and A. E. Nel. 1993. Recombinant IL-6 activates p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in the IL-6 responsive B cell line, AF-10. *J. Immunol.* 150:4743-4753.
97. Corbett, J. A., G. Kwon, T. P. Misko, C. P. Rodi, and M. L. McDaniel. 1994. Tyrosine kinase involvement in IL-1  $\beta$ -induced expression of iNOS by  $\beta$ -cells purified from islets of Langerhans. *Am. J. Physiol.* 267:C48-C54.
98. Packer, M., J. R. Carver, R. J. Rodeheffer, R. J. Ivanhoe, R. DiBianco, S. M. Zeldis, G. H. Hendrix, W. J. Bommer, U. Elkayam, M. L. Kukin, G. I. Mallis, J. A. Sollano, J. Shannon, P. K. Tandon, and D. L. DeMets. 1991. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 325:1468-1475.

表1 L-arginineの投与がL-NMMAとLPSを同時投与された新生仔ラット培養心筋細胞の機能に与える影響。

	L-NMMA	L-arginine
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	790±42	551±27*
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	261±45	160±35*
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	530±25	390±55*
細胞収縮の振幅 (%)	100	72.4±5.5*
自発収縮の回数 (回/分)	146±13	85±22*

(数値はすべて平均±SEM. \*P<0.05 vs. L-NMMA, n=5. )

表2 Methylene blue (MB) の投与がL-NMMA (NMMA) とLPSを同時投与された新生仔ラット培養心筋細胞の機能に与える影響。

	NMMA	NMMA+MB	L-arginine+MB
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	811±22	802±22	800±44
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	285±23	245±33	254±29
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	536±21	557±28	546±35
細胞収縮の振幅 (%)	100	99.6±4.9	96.8±6.9
自発収縮の回数 (回/分)	131±11	136±10	133±14

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

表3 KT5823 (KT) の投与がL-NMMA (NMMA) とLPSを同時投与された新生仔ラット培養心筋細胞の機能に与える影響。

	NMMA	NMMA+KT	L-arginine+KT
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	795±42	810±25	820±22
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	248±22	230±45	260±25
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	548±31	580±33	560±28
細胞収縮の振幅 (%)	100	99.6±1.4	98.8±5.9
自発収縮の回数 (回/分)	131±19	129±18	133±22

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

表4 非刺激新生仔ラット培養心筋細胞におけるL-NMMAとL-arginineの効果。

	Control	L-NMMA	L-arginine
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	850±32	822±34	830±58
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	301±44	281±45	266±67
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	550±36	540±30	565±60
細胞収縮の振幅 (%)	100	91.3±9.8	94.7±2.5
自発収縮の回数 (回/分)	124±26	138±30	120±17

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

表5 非刺激新生仔ラット培養心筋細胞におけるmethylene blue (MB) の効果。

	Control	MB
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	821±28	839±26
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	292±25	289±25
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	530±27	550±26
細胞収縮の振幅 (%)	100	109.8±16.3
自発収縮の回数 (回/分)	132±22	128±15

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

表6 非刺激新生仔ラット培養心筋細胞におけるKT5823の効果。

	Control	KT5823
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	807±36	829±48
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	268±13	270±28
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	540±22	550±36
細胞収縮の振幅 (%)	100	96.7±9.8
自発収縮の回数 (回/分)	134±17	133±19

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

表7 LPS単独で24時間投与された新生仔ラット培養心筋細胞におけるL-NMMAとL-arginineの効果.

	Control	L-NMMA	L-arginine
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	694±22	692±18	677±29
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	211±13	220±4	211±19
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	483±26	472±16	466±14
細胞収縮の振幅 (%)	100	104.9±12.1	102.2±8.6
自発収縮の回数 (回/分)	111±14	109±22	109±22

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

表8 LPS単独で24時間投与された新生仔ラット培養心筋細胞におけるmethylene blue (MB) の効果.

	Control	MB
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	681±39	685±33
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	209±25	206±37
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	472±29	480±21
細胞収縮の振幅 (%)	100	106.8±14.6
自発収縮の回数 (回/分)	110±29	104±18

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

表9 LPS単独で24時間投与された新生仔ラット培養心筋細胞におけるKT5823の効果.

	Control	KT5823
収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	664±21	689±35
拡張終期 $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	216±24	226±27
$[Ca^{2+}]_i$ transientの振幅 (nM)	448±21	463±36
細胞収縮の振幅 (%)	100	99.1±6.4
自発収縮の回数 (回/分)	96±21	108±16

(数値はすべて平均±SEM. n=3. )

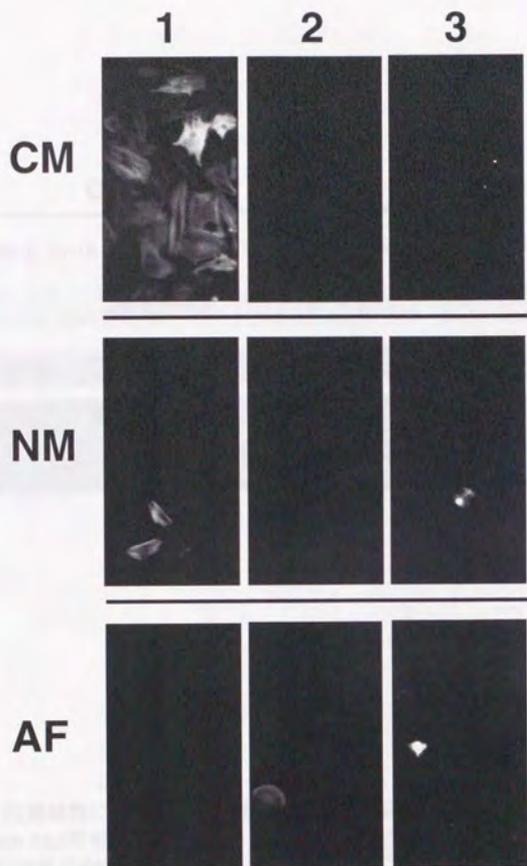


図1 この実験で使用した培養系における細胞種の同定。

培養中の細胞の種類を同定するためにsarcomeric  $\alpha$ -actin (レーン1) と平滑筋  $\alpha$ -actin (レーン2) に対する抗体を用いた免疫染色を行った。内皮細胞の混在を検討するために  $1 \mu\text{g/ml}$  の acetylated low density lipoprotein とともに培養した (レーン3)。上段に示すように新生仔ラット心筋細胞の培養 (CM) においてはほとんどが心筋細胞により構成されており、血管平滑筋細胞や内皮細胞の混在はない。中段に示すように新生仔ラット非心筋細胞の培養 (NM) においては心筋細胞が約10%内皮細胞が約2%存在したが、血管平滑筋細胞は存在しなかった。また、下段の成ラット非心筋細胞の培養 (AF) においては心筋細胞および血管平滑筋細胞の混在はなく、約2%の内皮細胞の存在を認めた。蛍光陰性の細胞は心筋線維芽細胞と考えられた。

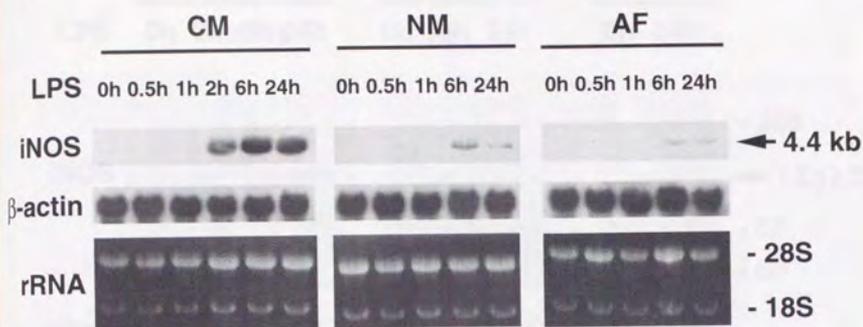


図2 培養細胞における時間依存的なiNOS mRNAの誘導.

Northern blot解析によると新生仔ラット培養心筋細胞 (CM) においてLPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) の投与はiNOS mRNAを誘導した. LPSによるiNOSの誘導は新生仔ラット非心筋細胞の培養 (NM) では少なく, また成ラット培養線維芽細胞 (AF) においてはほとんど見られなかった. コントロールの状態ではいずれもiNOS mRNAの発現を認めなかった. iNOS mRNAの最大の誘導はLPS投与後6時間で見られた. 各レーンにloadした全RNAの量および質が同じであることを確認するためにribosomal RNAのethidium bromide染色 (rRNA) を同時に示した. また, 同じ量のmRNAが転写されたことを確認するために $\beta$ -actin probeによるhybridizationのシグナルも示した.

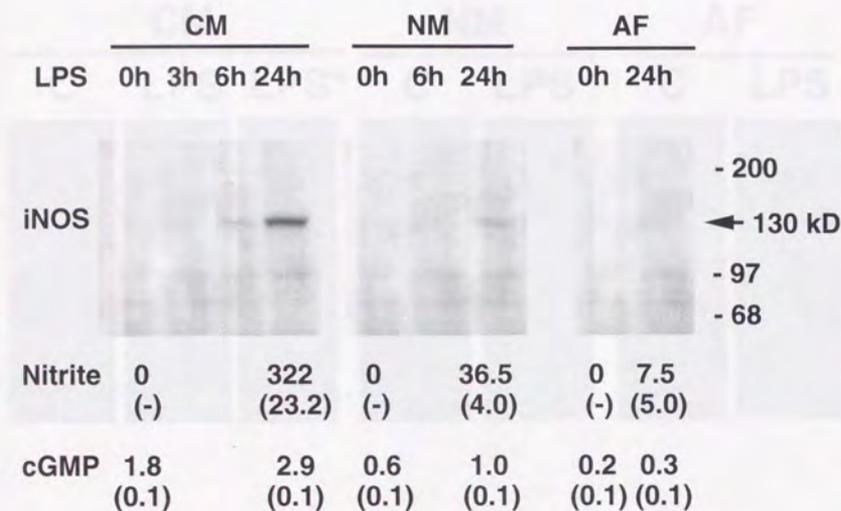


図3 培養細胞におけるiNOS蛋白の誘導とその産物の増加。

LPS (10  $\mu$ g/ml) の投与は新生仔ラット培養心筋細胞 (CM) においてiNOS蛋白を誘導したが、新生仔ラット培養非心筋細胞 (NM) や成ラット培養線維芽細胞 (AF) においてはその誘導はわずかであった。コントロールの状態ではiNOS蛋白の発現を認めなかった。この図には代表的なWestern blotを示す。LPS投与後24時間の培養液中の亜硝酸塩の濃度はiNOS蛋白の誘導に比例して増加した。細胞内cGMP含量もLPS投与後24時間においてiNOS蛋白の誘導とともに増加した。培養上清中の亜硝酸塩の蓄積 (nmol) とcGMP含量 (pmol) のデータは4回の実験から得たものであり、ともにmg蛋白あたりの値である。また、値は平均 $\pm$ SEMで表わした。

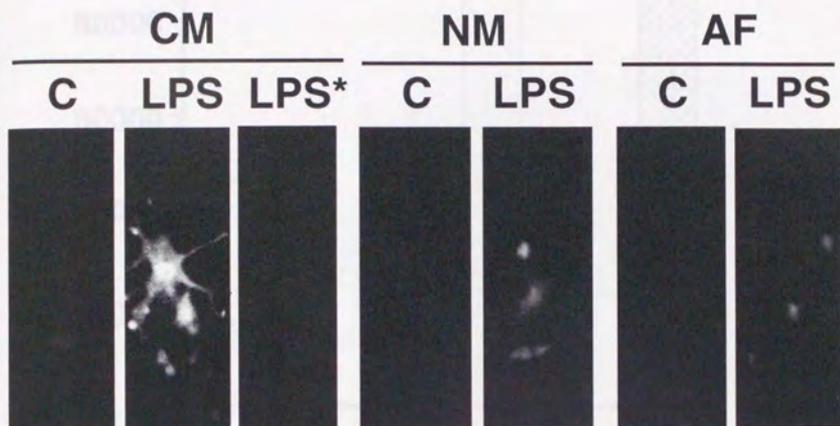


図4 培養細胞におけるiNOS蛋白の免疫染色。

LPS (10  $\mu$ g/ml) の投与後24時間において新生仔ラット培養心筋細胞 (CM) 内に iNOS蛋白の発現を認めた。非刺激心筋細胞 (C) には有意な蛍光を認めなかった。iNOS抗血清の代わりに非免疫ウサギ血清をincubateした場合、LPS投与後24時間の心筋細胞 (LPS\*) においても有意な蛍光を認めなかった。新生仔ラット培養非心筋細胞 (NM) や成ラット培養線維芽細胞 (AF) においてはLPS投与後24時間においても蛍光陽性細胞はごくわずかであった。

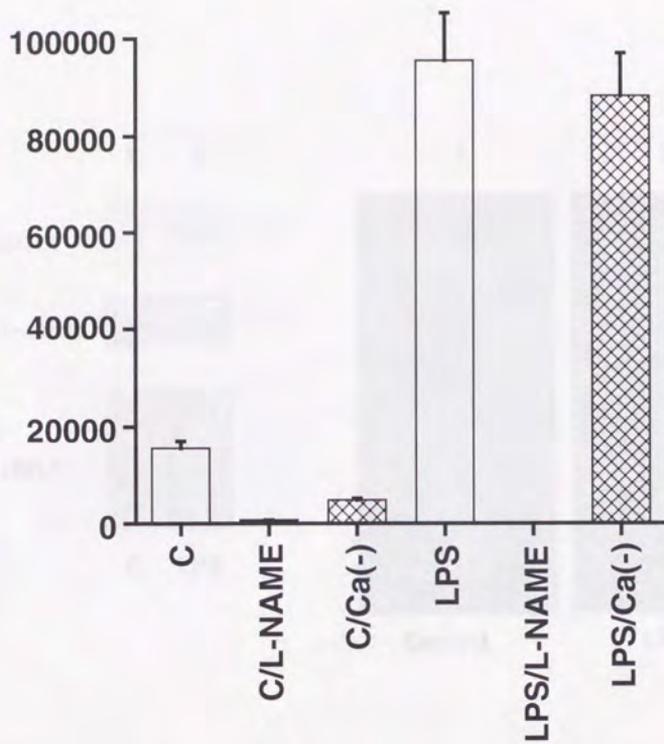


図5 新生仔ラット培養心筋細胞において誘導されたNOSの酵素活性。  
 新生仔ラット培養心筋細胞においてL-arginineからL-citrullineへの変換 (cpm/min/mg protein) を指標にしてNOSの活性を測定した。通常のNOS活性(□)は0.6 mM Ca<sup>2+</sup>を加えて反応を開始した。この活性はcNOSとiNOSの両方を含むものと考えられる。また、Ca<sup>2+</sup>を加えずに反応させた場合(Ca<sup>2+</sup>-), (▣)は主としてiNOSの活性を見ているものと思われる。N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)を1 mM加えて反応させたもの(■)はバックグラウンドと考えた。非刺激時の心筋細胞(C)においても若干のNOS活性を検出した。LPS投与24時間において培養心筋細胞内のNOS活性は著明に上昇しかつCa<sup>2+</sup>非依存性の特徴を有した。これはiNOSの誘導に合致する所見と考えられた。

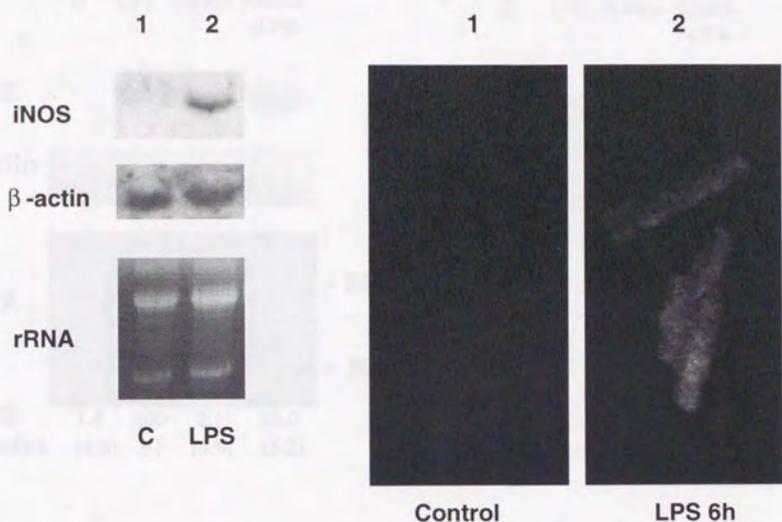


図6 成ラット単離心筋細胞におけるiNOSの誘導。  
 LPS (10  $\mu$ g/ml) 投与6時間において成ラット単離心筋細胞にiNOS mRNAの発現を認めた(左, レーン2)。Ribosomal RNAのethidium bromide染色(rRNA)と $\beta$ -actin probeによるhybridizationのシグナルも同時に示した。また, iNOS蛋白の免疫染色により, LPS投与6時間後において成ラット単離心筋細胞内にiNOS蛋白の発現を認めた(右, レーン2)。コントロールの細胞においてはiNOS mRNAおよび蛋白の発現は認めなかった。



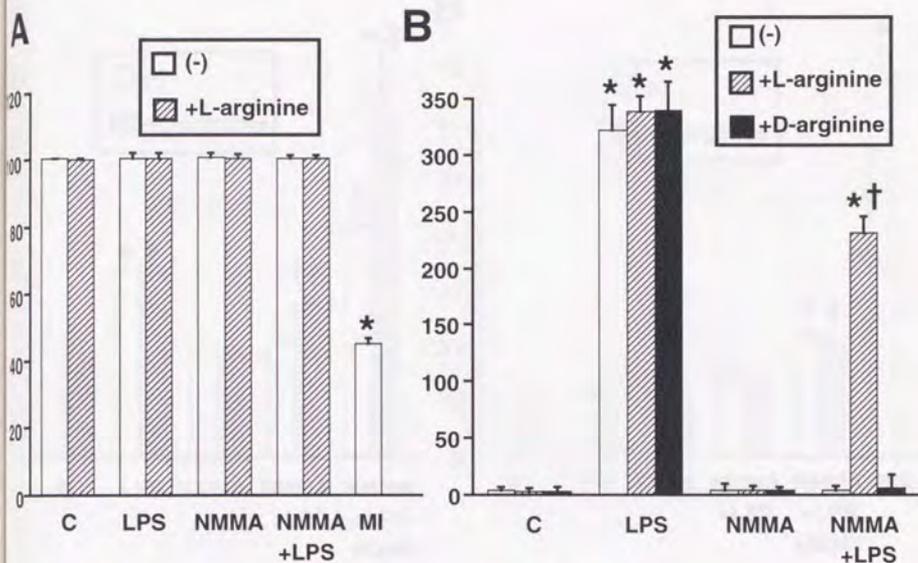


図8 L-NMMAの投与が新生仔ラット培養心筋細胞の生存率 (A) およびNO産生 (B) に与える影響。

A: LPS (10  $\mu$ g/ml) またはL-NMMA (100  $\mu$ M) の心筋細胞に対する24時間の投与はMTT assayにより測定した細胞生存率にまったく影響を与えなかった。570 nmにおける吸光度から630 nmにおける吸光度を差し引いた値を非刺激細胞のそれを100%として補正した値を示した。細胞生存率を低下させる陽性コントロールとしてNaCN (1 mM) と2-deoxy glucose (20 mM) による代謝阻害 (MI) を行った。B: LPS-投与後24時間において培養液中の亜硝酸塩の濃度は著明に上昇した。また、L-NMMA (100  $\mu$ M) の前投与はこのLPSによる亜硝酸塩の増加をほぼ完全に抑制した。L-NMMAによる抑制作用は100倍量の (10 mM) L-arginineの追加投与 (▨) により5分以内に逆転された。D-arginineの追加投与 (■) は有意な作用を持たなかった。非刺激の細胞 (C) においては有意な亜硝酸塩の蓄積を認めなかった。値はmg蛋白あたりの亜硝酸塩の蓄積 (nmol) である。棒グラフは平均をerror barはSEMを表わす。\* P<0.01 vs. C, †P<0.05 vs. L-またはD-arginineの追加投与を行わなかった細胞 (□), n=4.

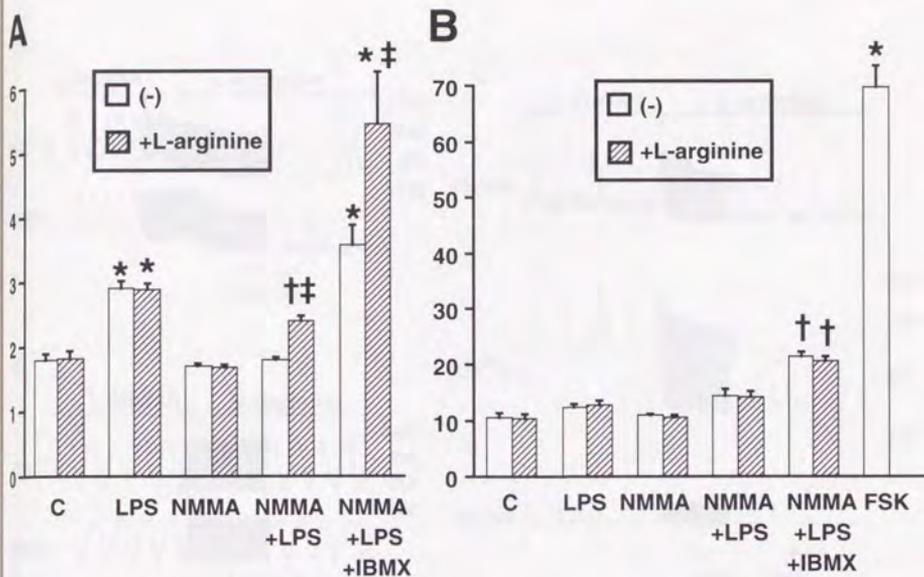


図9 L-NMMAの投与が新生仔ラット培養心筋細胞内のcGMP含量 (A) およびcAMP含量 (B) に与える影響。

A: LPS (10  $\mu$ g/ml) 投与24時間後において心筋細胞内のcGMP含量は有意に増加した。L-NMMA (100  $\mu$ M) の前投与はこのLPSによるcGMPの増加を抑制したが、L-arginineの投与 (■) により5分以内に逆転された。100  $\mu$ MのIBMXの前投与はcGMP含量の基礎値を著明に増加させたが、L-arginineを追加投与した場合はさらにcGMP-含量は増加した。B: LPS投与24時間後において心筋細胞内のcAMP含量は変化しなかった。L-arginineの投与もcAMP含量に影響はなかった。100  $\mu$ MのIBMXの前投与はcAMP含量の基礎値を著明に増加させたが、L-arginineによるcAMP含量の増加には影響を与えなかった。値はA, Bともにmg蛋白あたりの含量 (pmol) である。棒グラフは平均をerror barはSEMを表す。\*P<0.01 vs. Control, †P<0.05 vs. Control, ††P<0.05 vs. L-arginineの追加投与を行わなかった細胞 (□), n=4。

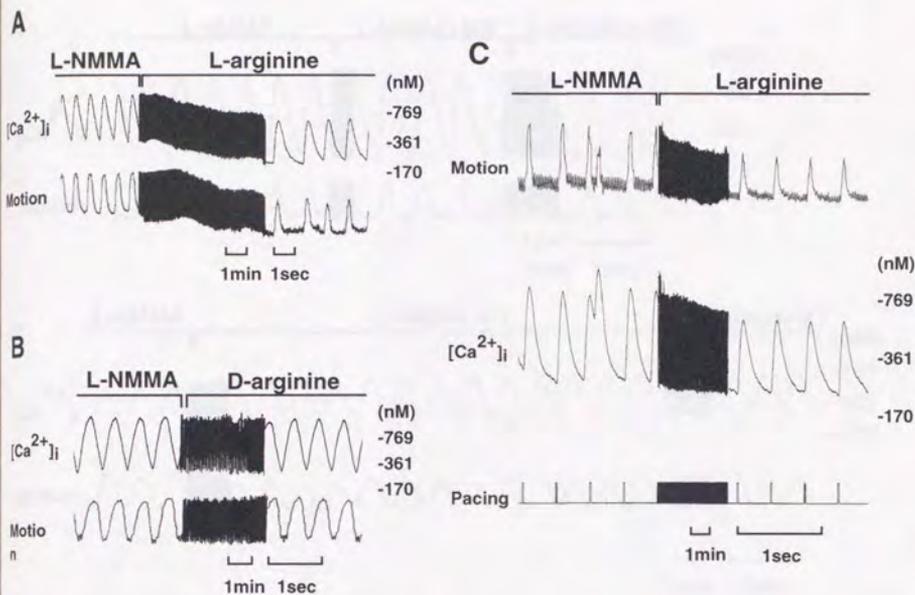


図10 L-arginine (AとC) またはD-arginine (B) の投与がL-NMMAとLPSを同時投与された新生仔ラット培養心筋細胞の機能に与える影響。

L-NMMA (100  $\mu M$ ) とLPS (10  $\mu g/ml$ ) を24時間同時投与された心筋細胞にはiNOS-が誘導されているが、有意なNOやcGMPの産生はない。A：これらの細胞にL-arginine (10 mM) を灌流すると収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅および自発収縮の回数の低下減少が認められた。L-arginineの投与は拡張期の $[Ca^{2+}]_i$ をも低下させたが、 $[Ca^{2+}]_i$  transientの振幅は低下した。また、拡張期の細胞の位置もL-arginineの投与により下方に移動した。B：これらの細胞にD-arginine (10 mM) を灌流しても心筋細胞の機能には影響がなかった。C：これらの心筋細胞を2.5 Hzで電気刺激しておくとしてL-arginineの投与は拡張期の $[Ca^{2+}]_i$ を変化させず、収縮期最大 $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅の低下をもたらした。

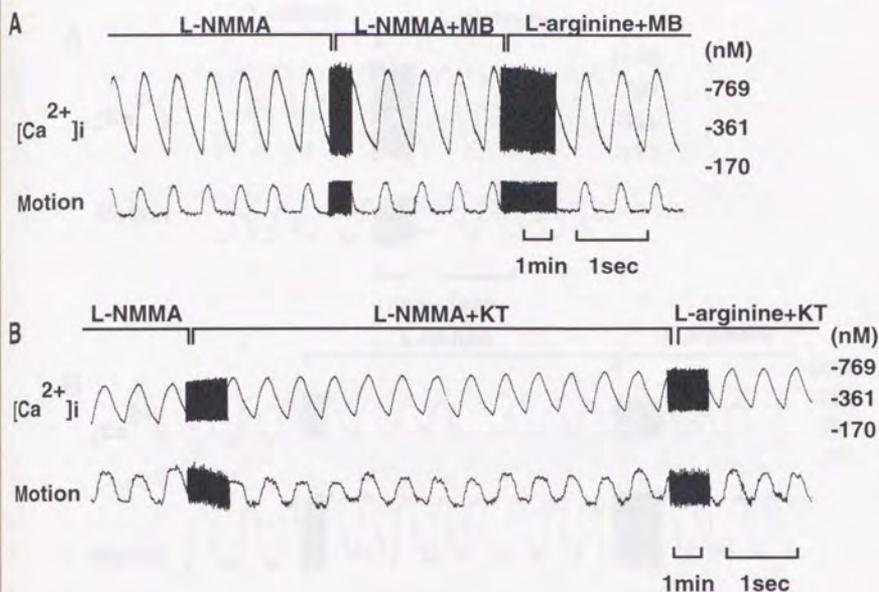


図11 Methylene blue (A) またはKT5823 (B) の投与がL-NMMAとLPSを同時投与された新生仔ラット培養心筋細胞の機能に与える影響。

A: L-NMMA (100  $\mu$ M) とLPS (10  $\mu$ g/ml) を24時間同時投与された新生仔ラット培養心筋細胞にL-NMMAと10  $\mu$ Mのmethylene blue (MB) を灌流しても有意な変化はなかった。引き続きL-arginine (10 mM) を灌流しても $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅および自発収縮の回数に変化は見られなかった。B: L-NMMAとLPSを24時間同時投与された心筋細胞にL-NMMAと1  $\mu$ MのKT5823 (KT) を灌流しても有意な変化はなかった。引き続きL-arginineを灌流してもやはり $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅および自発収縮の回数に変化は見られなかった。

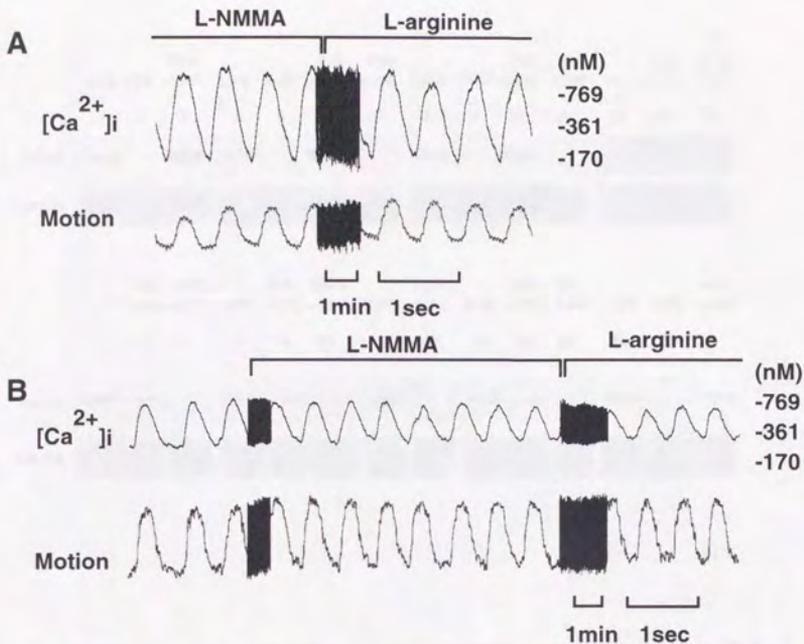


図12 L-arginineの投与がL-NMMAを単独投与された(A)またはLPSを単独投与された(B)新生仔ラット培養心筋細胞心筋細胞の機能に与える影響。

A: L-NMMA (100  $\mu$ M) だけを24時間投与された心筋細胞にL-arginine (10 mM) を灌流しても $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅および自発収縮の回数に変化は見られなかった。B: LPS (10  $\mu$ g/ml) だけを24時間投与された心筋細胞では誘導されたiNOSによりすでに大量のNOが産生されている。このような細胞においてもL-arginine (10 mM) の追加灌流は $[Ca^{2+}]_i$ と細胞収縮の振幅および自発収縮の回数に影響を与えなかった。

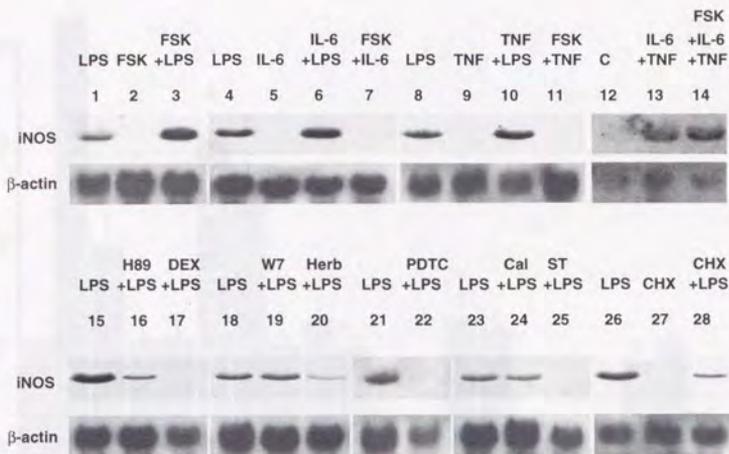


図13 各種のinterventionが新生仔ラット培養心筋細胞におけるiNOS mRNA誘導に及ぼす影響。

Forskolin (FSK, 100  $\mu$ M) はLPS投与後6時間のiNOS mRNAの誘導を有意に促進した。FSKはその単独投与ではiNOSを誘導しなかった。IL-6 (2,000 U/ml) やTNF  $\alpha$  (500 U/ml) の前投与もまたLPSによるiNOSの発現にsynergisticに働いた。IL-6やTNF  $\alpha$  単独の投与はiNOSを誘導しなかったが、両者の同時投与は低いレベルながらも有意なiNOSの発現をもたらした。このIL-6とTNF  $\alpha$  によるiNOSの発現はFSKにより促進された。H-89 (10  $\mu$ M) やherbimycin (Herb, 2  $\mu$ M), またはdexamethasone (DEX, 1  $\mu$ M) の前投与はLPSによるiNOSの誘導を有意に抑制した。Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, 100  $\mu$ M) の前投与もまたLPSによるiNOSの誘導を抑制した。Staurosporine (ST, 1  $\mu$ M) はLPSによるiNOSの誘導を著明に抑制したが、Calphostin C (Cal, 250 nM) は有意な影響はなかった。Cycloheximide (CHX, 100  $\mu$ g/ml) の投与だけでiNOSを誘導することはなくむしろLPSによるiNOSの発現を抑制した。

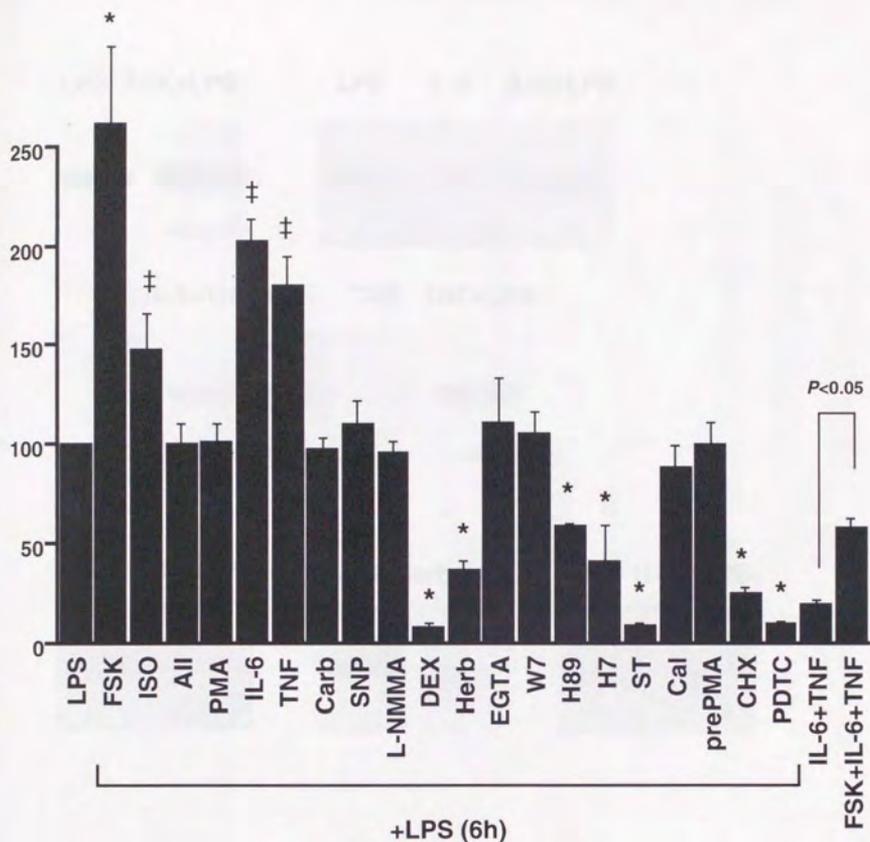


図14 新生仔ラット培養心筋細胞において誘導されたiNOS mRNAの定量的解析。Densitometryにより、誘導されたiNOS mRNAのレベルを $\beta$ -actin mRNAのレベルで補正して表示した。LPS (10  $\mu$ g/ml, 6時間) により誘導されたiNOSを100%として、その他の値を棒グラフに表わした。Error bar はSEM である。\* : P<0.01 vs LPS, †P<0.05 vs LPS, n=3.

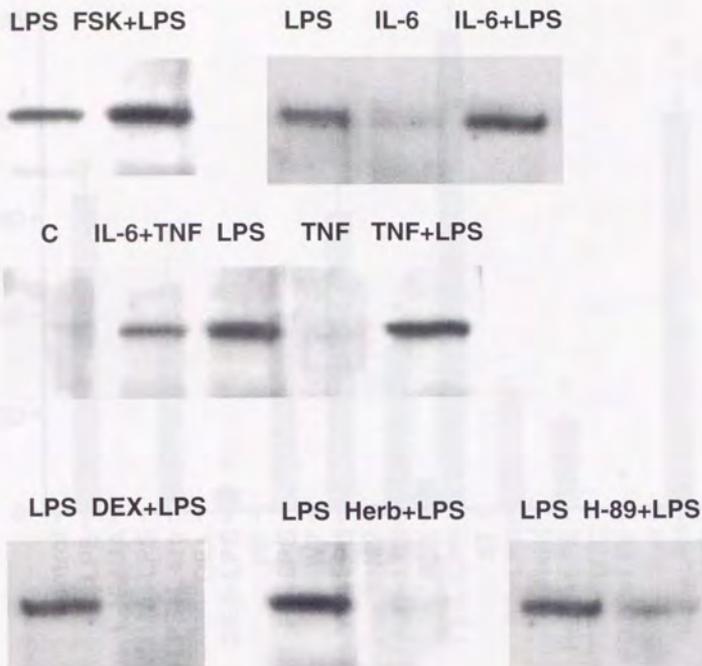


図15 各種のinterventionが新生仔ラット培養心筋細胞におけるiNOS蛋白の誘導に及ぼす影響。

Forskolin (FSK, 100  $\mu$ M) はLPS投与後24時間のiNOS蛋白の誘導を有意に促進した。FSKはその単独投与ではiNOS蛋白を誘導しなかった。IL-6 (2,000 U/ml) やTNF  $\alpha$  (500 U/ml) の前投与もまたLPSによるiNOS蛋白の発現にsynergisticに働いた。IL-6やTNF  $\alpha$  単独の投与はiNOS蛋白を誘導しなかったが、両者の同時投与はによりiNOS蛋白の誘導が認められた。H-89 (10  $\mu$ M) やherbimycin (Herb, 2  $\mu$ M), またはdexamethasone (DEX, 1  $\mu$ M) の前投与はLPSによるiNOS蛋白の誘導を有意に抑制した。以上の結果はNorthern blot解析によるiNOS mRNAの変化とほぼ比例したものであると考えられた。

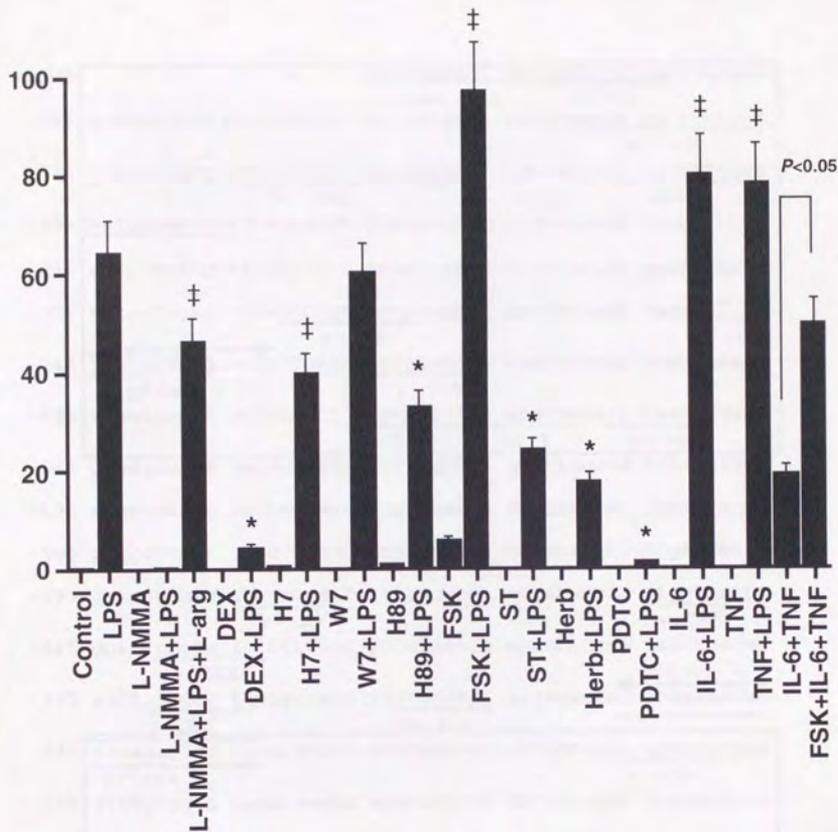


図16 各種のinterventionが新生仔ラット培養心筋細胞におけるNOの産生に及ぼす影響。

各種のinterventionにより、培養液上清中の亜硝酸塩の蓄積のレベルはiNOS mRNAまたは蛋白の誘導されたレベルに比例して変化した。いくつかのinterventionは24時間投与により細胞のviabilityを変化させたため、亜硝酸塩の蓄積 (nmol/well) はMTT assayによる細胞生存率の値 (% of control) で補正して表示した。\* :  $P < 0.01$  vs LPS, ‡  $P < 0.05$  vs LPS,  $n = 4$ 。

```

-1045 caaacatga ggctgagctg aatttgggaa
      primer 5-1      TNF-RE
-995 ccatgggatg atgagtggac cctggcggga tatgccaggg ggattttccc
      NF-κB
-945 tctctctgtt tgttctctct cccctaatac tgccaatatt tcactttcat
      ∇ GAS      IRF
-895 aatggaaaat cccatgccat gtatgaatcg ttgtaggaaa ttataatttg
-845 ctcgtttttg tttgtttttc aaaacagggt ttttctatgt agccctagtt
-795 tgtcctagaa ctcaactctgt agaccagact ggccccaaact cagggatctg
      γ-IRE      γ-IRE
-745 tctttctctg ctctctgaat cctggaagta aaggcgtgtg ccaccacacc
      primer 7      γ-IRE
-695 t-ggtagggt attataattc tgtatataag aagtcacact taattccgct
      γ-IRE      AP-1      γ-IRE
-645 gtggggggga aaaaggcttc tctcagcaca gcctacca ctatgctgcc
-595 caaactaatt tactagtagt ggggaaaatg agggtcagac agcatcccag
-545 gggccccgct gtgccacagc ttgcctttct agaaaacctc ccgatgaatg
      XbaI
-495 gttctctggc gtgttggaa attggcacca tctaacgcga ctgggtcatt
      γ-IRE      γ-IRE
-445 ggaacctgga ctttttttcc ggcatgatcc acactgccag taatccacag
      γ-IRE      primer 3r
-395 atttctggac ttctgctaca aactgcaaat gagagaacag acagaaatga
      γ-IRE      γ-IRE
-345 accagagtgc tccatgccca gaacaaaatc cccagcagct gcaagccagg
      primer 3      γ-IRE
-295 gtctgtggtg cagctaagag aagcctcct cctagttagt cccagttttc
-245 aagaggccac tcgctgccaa gggaccattg ccttggactg gggaccaggga
      γ-IRE
-195 agaggtggcc tcaccgaaga tacaccacag agtgatgtaa taatgcatac
      CAAT box
-145 agactaggag tgtccatctc gaatgagcta acttgcacac cctactgggg
      ∇ TNF-RE      NF-κB
-95 actctccctt tggaacagc gactttatgc aaaacagctc tgcagagcgt
      CAAT box      primer 4      GAS      PstI
-45 ggatgggtat aaatactga tggctactgt cagggccaca gctttacagg
      TATA box      Exon 1
+5 gagttgaaga ctgagactct ggccccacgg gacacagtgt cgctggtttg
      primer 6
+55 aaactttcca accaccttgg tgaggggact g

```

図17 ラットiNOS遺伝子5'上流領域の塩基配列

TNF-RE=TNF responsive element, γ-IRE=interferon γ response element, ∇は DNase I にhypersensitiveな部位を示す。

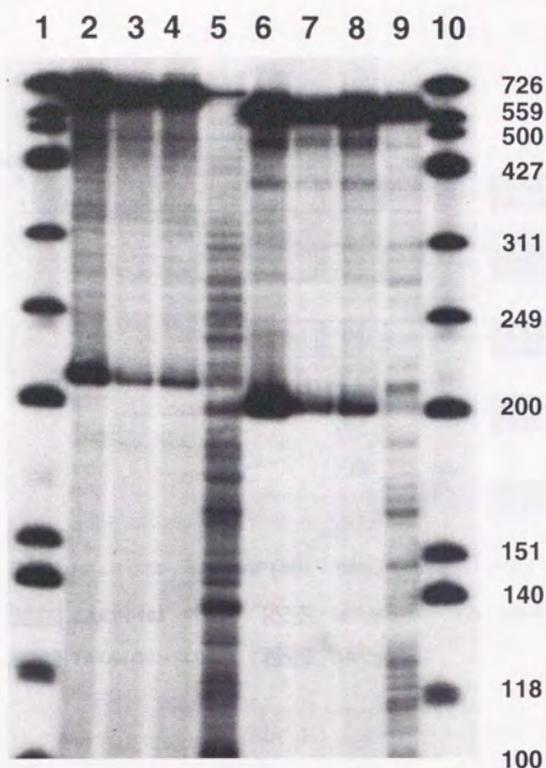


図18 DNase I foot printingによるラットiNOS遺伝子5'上流領域における転写因子結合部位の推定。

レーン1と10はラベルしたMarker 9である。レーン3と7はLPS刺激後2時間の新生仔ラット培養心筋細胞の核蛋白，レーン4と8はLPS刺激後6時間の細胞の核蛋白，レーン5と9は細胞成分を含まないものである。HindIII末端を標識したprobeはそれぞれ570 bpと660 bpのサイズに応じて各レーンの最上部に認められる。



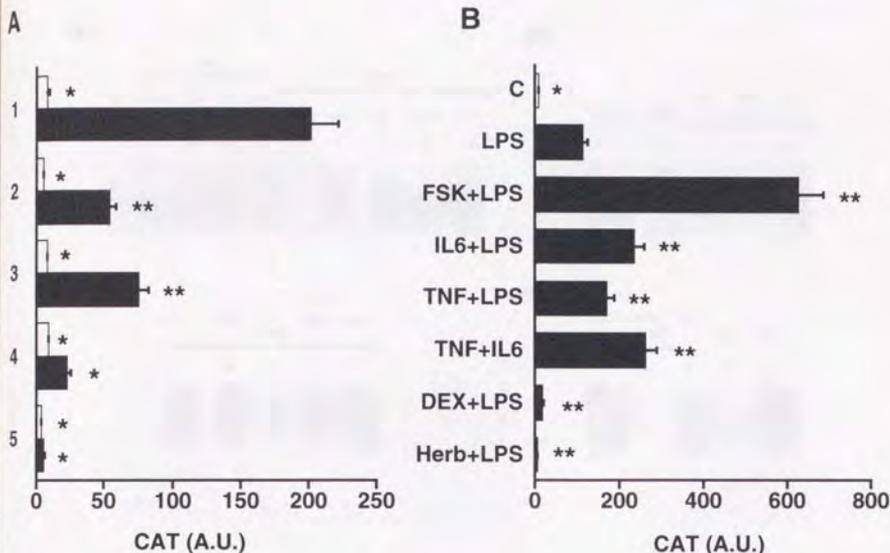


図20 一過性遺伝子導入による新生仔ラット培養心筋細胞におけるenhancer/promoter活性の解析。

A: CATの酵素活性は1.1 kbのinsertを有するconstruct 1の場合, LPS (10  $\mu$ g/ml) の投与 (■) によりコントロール (□) に比べて著明な増加を認めた。Enhancer領域のNF- $\kappa$ BとGASおよびIRF結合部位が脱落しただけで (construct 2-4), 著明なCAT活性の低下を認めることから, この部分の転写活性に対する重要性が示唆される。また, Construct 4において2または3に比べて, さらにCAT活性が低下するため, -163~-155-の存在するCAAT boxの重要性が示唆された。また, promotor領域をも脱落させたconstruct 5の場合, CAT活性はほぼコントロールと変わらない程度にまで低下した。\* $P$ <0.01 vs construct 1+LPS, \* $P$ <0.05 vs construct 1+LPS,  $n$ =3。B: Forskolin (FSK, 100  $\mu$ M), IL-6 (2,000 U/ml), TNF $\alpha$  (500 U/ml) のLPSとの同時投与はLPS単独投与に比べて, CATの酵素活性を増加させた。これはiNOS mRNAのLPSによる誘導をこれらの薬剤が促進することと合致し, またその転写促進機構はこのconstruct-1のinsert部分すなわち5'上流1.1 kbの間に存在することが示唆される。Herbimycin (Herb, 2  $\mu$ M) またはdexamethasone (DEX, 1  $\mu$ M) の前投与はLPSによるCAT酵素活性の増加を抑制した。これはiNOS mRNAのLPSによる誘導をこれらの薬剤が抑制することと合致し, またその転写抑制機構は5'上流1.1 kbの間に存在することが示唆される。\* $P$ <0.01 vs LPS, \* $P$ <0.05 vs LPS,  $n$ =3。

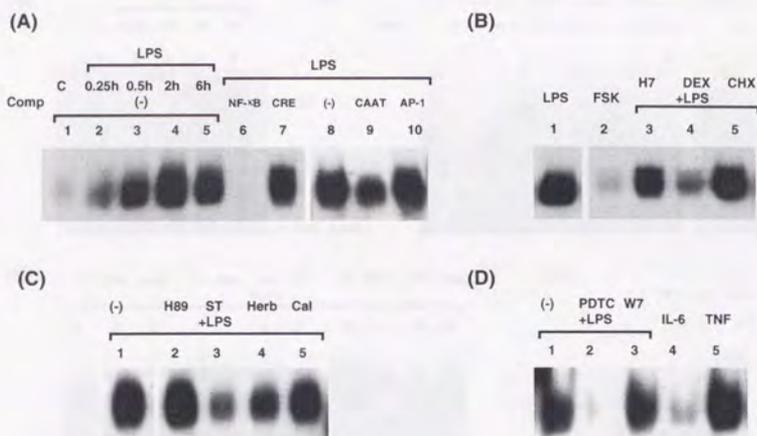


図21 新生仔ラット培養心筋細胞におけるNF- $\kappa$ B結合部位に対するEMSA.

A: LPSはNF- $\kappa$ Bに対する結合活性を増加させた。この結合活性はコントロールの状態では認められなかったが、LPS投与後30分で出現し、6時間で最大となった。B: またこの結合活性の増加には新たな蛋白合成を必要としなかった(レーン5)。Dexamethasone (DEX, 1  $\mu$ M)はこのLPS(6時間)によるNF- $\kappa$ Bの活性化をほぼ完全に抑制し、iNOSの誘導におけるDEXの転写抑制を説明する根拠となる可能性がある。Forskolin (FSK, 6時間)はNF- $\kappa$ Bを活性化しなかった。C: Herbimycin (Herb) またはstaurosporine (ST)は有意にLPS(6時間)によるNF- $\kappa$ Bに活性化を抑制したが、calphostin C (Cal)はほとんど変化をもたらさなかった。すなわち、PKC以外のprotein kinaseの活性化がLPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化に重要であると思われる。Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)もまたLPS(6時間)によるNF- $\kappa$ Bの活性化を完全に抑制した。この場合もiNOS mRNAの転写抑制作用とNF- $\kappa$ Bの抑制とが非常によく比例した。D: TNF $\alpha$ (6時間)はNF- $\kappa$ Bを活性化したが、IL-6(6時間)はまったく作用がなかった。TNF $\alpha$ のNF- $\kappa$ Bに対する活性化はiNOSの転写に促進的に働く可能性があると考えられた。

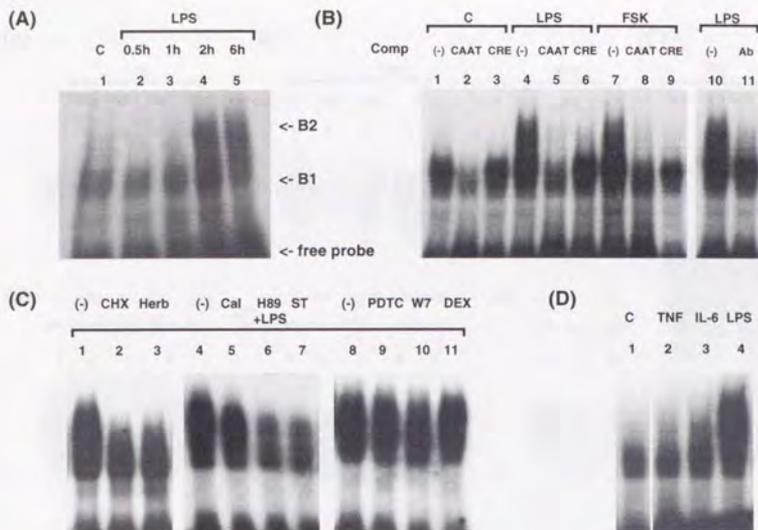


図22 新生仔ラット培養心筋細胞におけるCAAT boxに対するEMSA.

A: CAAT boxのEMSAはコントロールの状態ではspecific bindingが一本存在する。これをB1と表わして示した。LPSの投与はこのB1に加えて、B2と命名したより遅い移動度を有する新しい結合活性を生じた。B2はLPS投与後2時間から出現し、6時間後に最大となり、24時間後も持続している。B: このB1およびB2の両者は100倍モル相当量の未標識のCAAT box oligonucleotideの同時incubationにより、まったく認められなくなった。一方、未標識のCRE probeとのincubationはB1に変化を与えなかったが、B2を有意に減少させた。また、Forskolin (FSK) の投与 (6時間) はB2を出現させた。さらに抗CREB polyclonal抗体 (Ab) とのincubation後B2はほぼ完全に消失した。したがって、B1はC/EBP $\beta$ によるhomodimer、B2はC/EBP $\beta$ とCREBとのheterodimerと考えることができる。C: B2の誘導には新たな蛋白合成を必要とするようであった (レーン2)。H-89、herbimycin (Herb)、staurosporine (ST)の前投与はこのLPS (6時間) により誘導されるB2の活性を有意に抑制した。TNF $\alpha$  (6時間) およびIL-6 (6時間) はB2の誘導をきたさなかった。

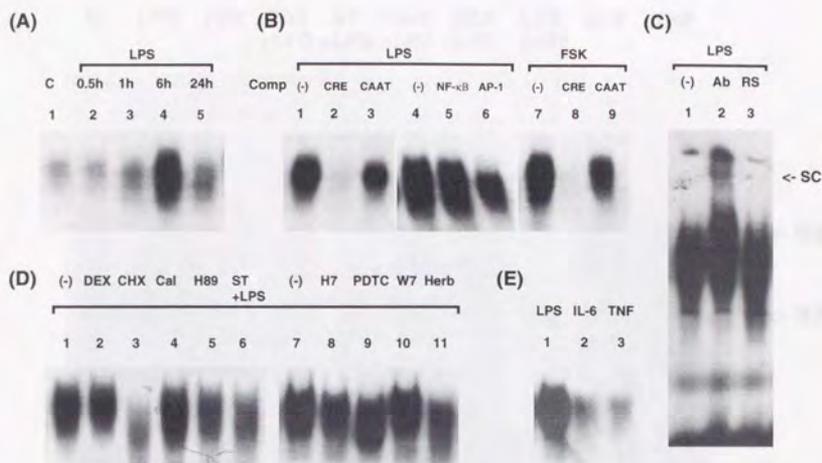
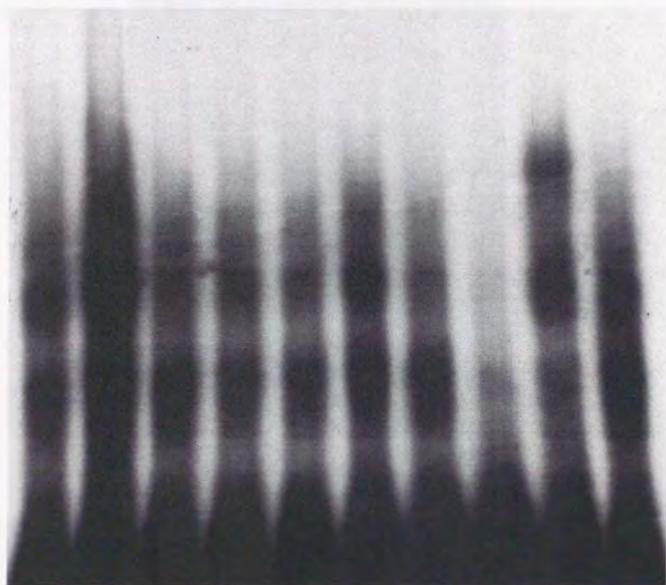


図23 新生仔ラット培養心筋細胞におけるCREに対するEMSA.

A: LPSの投与後, 時間依存的にCREに対するEMSAにおいて結合活性の増加を認めた。B: Forskolin (FSK) の投与 (6時間) もCREに対する結合活性の増加を認めた。LPSおよびFSK投与後のCRE結合活性の増加はCRE特異的であり, LPSおよびFSKにより誘導されたCRE結合活性はCAAT boxの未標識oligonucleotideとのincubationにおいて有意に減少した。C: LPS (6時間) で刺激した核蛋白と抗CREB抗体 (Ab) とのincubation後CREに対するEMSAにおいて明らかなsupershift (SC) を認めた。非免疫ウサギ血清 (RS) とのincubationは結合パターンに変化をもたらさなかった。D: LPSによるCRE結合活性の増加は新たな蛋白合成を必要とした (レーン3)。H-89, herbimycin (Herb), staurosporine (ST) の前投与はLPS (6時間) によるCAAT boxへのB2結合活性とまったく同様にCRE結合活性を減少させた。E: TNF $\alpha$ およびIL-6はCRE結合活性の増加をきたさなかった。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	LPS	FSK	CHX +LPS	ST +LPS	Herb +LPS	DEX +LPS	LPS (IRF)	IL-6	TNF



<- B4

<- B3

図24 新生仔ラット培養心筋細胞におけるIRF結合部位に対するEMSA。  
 コントロールの細胞においてIRF部位にB3に相当する結合活性が認められる。一方、LPS (6時間) の投与後、より遅い移動度を有する新たな蛋白合成を必要とするB4の誘導が認められた。この2つの活性はIRF結合部位に相当する未標識のoligonucleotideとのincubation ([IRF]) において消失し、IRF特異的であると考えられた。これまでの報告を参照すれば、B3はIRF-2、B4はIRF-1による活性と考えられる。B4の誘導はDEX, herbimycin (Herb) およびstaurosporine (ST) の前投与により有意に減少した。Forskolin (FSK) またはTNF $\alpha$  (6時間) はB4を誘導しなかったが、IL-6 (6時間) による誘導を認めた。

C FSK IL-6 LPS TNF

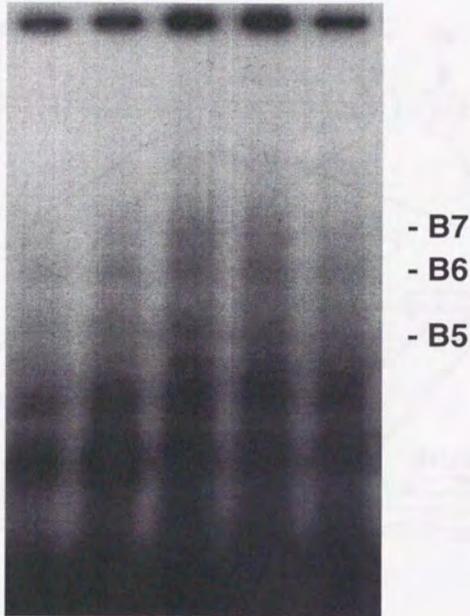


図25 新生仔ラット培養心筋細胞におけるSIEに対するEMSA。  
コントロールから結合活性が見られるものの(B5), LPSとIL-6の投与30分により, 新たな結合活性の誘導が認められる(B6およびB7)。Forskolin (FSK) またはTNF $\alpha$  (30分) はB6およびB7を誘導しなかった。

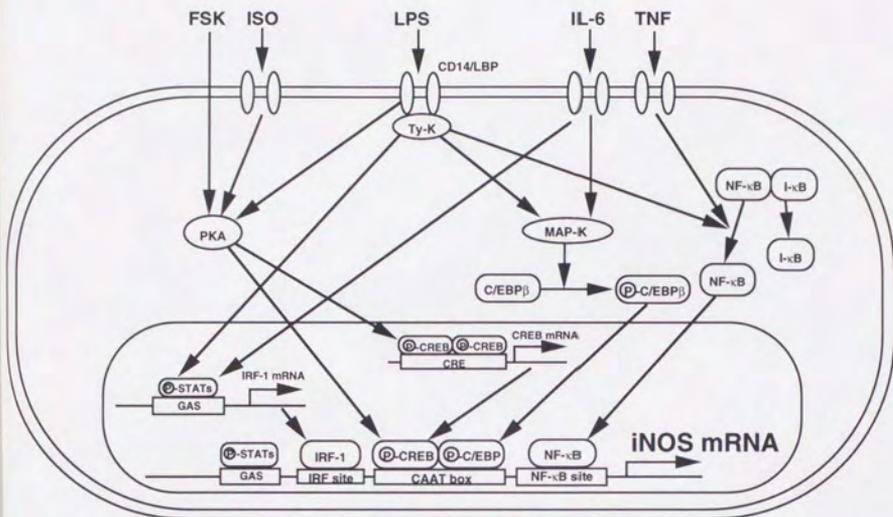


図26 新生仔ラット培養心筋細胞におけるiNOSの転写調節。  
 この図にはiNOSの転写調節機構を示した。Ty-K=tyrosine kinase.



inches  
1 2 3 4 5 6 7 8  
cm  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

