Lipopolysaccharide による一酸化窒素合成酵素誘導に対する interferon- γ の増強効果

独協医科大学内分泌内科教室 (主任: 下田新一教授)

服 部 幸 子

The Synergistic Effect of Interferon- γ on the Induction of Nitric Oxide Synthase by Lipopolysaccharide in Vascular Smooth Muscle

Sachiko Hattori

Department of Endocrinology, Internal Medicine, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi 321-02, Japan
(Director: Prof. Shin-Ichi Shimoda)

Bacterial lipopolysaccharide (LPS) and other immunostimulants induce an isoform of nitric oxide synthase (iNOS) in vascular smooth muscle (VSM) which produces large quantities of nitric oxide (NO) and profound vasodilation. This process has been implicated as the cause of gram-negative septic shock. It has been demonstrated that interferon- γ (IFN) markedly potentiates cytokine-induced NO synthesis in various cell types. However, little is known about the mechanism of this enhancing effect of IFN. The present study was undertaken to investigate the effect of IFN on LPS-induced NO synthesis and iNOS mRNA expression in VSM and the possibility of nuclear factor κ B (NF κ B) involvement in the effect of IFN.

LPS-induced NO synthesis is markedly potentiated by IFN in VSM. Expression of iNOS mRNA in VSM costimulated with IFN and LPS was greatly increased compared to that induced by LPS alone. IFN did not alter the lifetime of iNOS mRNA. LPS stimulated translocation into the nuclei of NF κ B which is believed to play an important role in the induction of iNOS, but IFN did not enhance NF κ B activation by LPS.

These results suggest that the enhancing effect of IFN is due to the increased transcription of the iNOS gene rather than a decreased degradation of iNOS mRNA and that the NF κ B activation pathway is not involved in this effect of IFN.

Keywords: Nitric oxide, Interferon- γ , Lipopolysaccharide, mRNA, Nuclear factor κ B

緒 言

Nitric oxide (NO) は強力な内因性血管拡張物質であり, Furchgott らによって報告された血管内皮由来血管拡張因子¹⁾と同一ないしは極めて類似したものといなされている^{2,3)}。NO は血管の緊張や血圧の調節に重要な役割を果たしており, それは生理的な機能のみならず様々な血管病態に関与していると考えられ, 事実, エンドトキシンやサイトカインによってもたらされた血圧低下は NO の過剰産生がその原因と考えられている^{4,5)}。

NO の過剰産生による血圧低下が認められるような病態においては, 血管平滑筋 (VSM) 自身での NO 産

生が究めて重要な意義を有すると考えられ、VSMでのNOの過剰産生が血管緊張の喪失や昇圧物質に対する抵抗性といったvascular failureの原因となっているものと考えられる⁹⁻¹¹⁾。よって、VSMでのNO産生機構およびその調節の理解はvascular failureの有効な治療に不可欠と思われる。

VSMではbacterial lipopolysaccharide (LPS) やサイトカインによってNO合成酵素(iNOS)が誘導されることが知られており、その結果VSMでは大量のNOの産生が可能となる⁹⁻¹¹⁾。interferon- γ (IFN) は抗ウイルス活性や細胞増殖阻止活性を有する免疫反応制御物質として知られているが、種々の細胞に働き、多様な作用を発揮することが明らかにされている。iNOSの誘導に関しては、IFNはその誘導が起こるほとんどの細胞種において単独でiNOSを誘導するか、あるいは、サイトカインによるiNOSの誘導を著明に増強することが報告されている¹⁰⁾。VSMにおいてもIFNはサイトカインによるiNOSの誘導を著明に増強することが知られており⁹⁾、また、IFNはNOを介してVSMの増殖を抑制しているという報告もみられる¹¹⁾。

そこで培養ラットVSM細胞を用いてLPSおよびサイトカインによるiNOS誘導に対するIFNの増強効果およびその分子機構について検討したので報告する。

実験方法

細胞培養

雄Wistar ratの胸部大動脈を摘出し、collagenase (Worthington) およびelastase (Boehringer) 含有Hanks液で、37℃、2時間酵素処理し、得られた細胞を10% FCS含有Dulbecco変法Eagle培地にて37℃で継代培養し、confluentに達した10から15代の細胞を用いて実験を行った。

NO₂の測定

NO産生の指標としてのnitrite (NO₂⁻) 産生はGriess assayにより測定した。96wellプレートで培養した細胞の培養上清100 μ lに当量のGriess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamide in 5% phosphoric acid) を加え、mixtureのOD₅₅₀をmicroplate readerを用いて測定し、その濃度をsodium nitriteをstandardとして示した。

MTTアッセイ

薬物のNO産生に与える影響を検討するとき、その影響が薬物による細胞障害の結果認められたものではないことを確認するために、種々の条件でインキュベーションした後の細胞のviabilityを[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT:Sigma) から産生されるformazanの量を指標として測定した。インキュベーション後の細胞にMTT (0.4mg/ml) 含有DMEMを加え37℃、1時間インキュベーション後、細胞をDMSOで融解しformazan産生量をmicroplate reader (OD₅₅₀) を用いて測定した。

ノーザンブロット解析

LPSによるiNOS mRNA誘導に与えるIFNの影響を検討するためmedium単独、LPS単独、IFN単独、およびLPS/IFNでVSM細胞を刺激し8時間インキュベートした後のそれぞれのiNOS mRNAレベルをノーザンブロットで検討した。またiNOS mRNA分解に与えるIFNの影響を検討する目的で、まずiNOS mRNAを誘導するために細胞をLPS (100 μ g/ml) で8時間刺激し、その時点で新たなiNOS mRNAの転写を阻止するためにactinomycin D (1 μ g/ml) を加え、その後のiNOS mRNAレベルの減少をIFN存在、非存在下でノーザンブロットで検討した。ノーザンブロットおよびiNOS mRNAレベルの定量は以下のように行った。Total RNAはmodified guanidinium isothiocyanate法(RNAzol:Cinna/Biotech)を用いて培養細胞より単離した。iNOS特異的primer (forward 21-mer, 5'-CTGCAGGTCTTTGACGCTCGG-3';reverse 21-mer, 5'-GTG-

GAACACAGGGGTGATGCT-3')を用いて既報のごとくRT-PCRを行い¹²⁾,得られたPCR productをrandom prime法によって[α -³²P]dCTP標識し,ノーザンブロット解析のprobeとして用いた。なお,PCR productはsubcloningしsequencingを行い,報告されているラットのVSMのNOSのsequence¹³⁾に100%一致することを確認した。RNA (10 μ g/lane)をformaldehyde含有1% agarose gelにて電気泳動後, nitrocellulose filterにトランスファーした。filterをrapid hybridization solution (QUIKHYB:Stratagene)を用いて68℃, 15分間prehybridization後, 68℃で1時間³²P標識したiNOS probeとhybridizationした。その後filterを2xSSC/0.1% SDSを用いて室温で15分洗浄し,引き続き0.1xSSC/0.1% SDSを用いて, 60℃で30分, 2回洗浄した。洗浄後filterをstrage phosphor screen (Molecular Dynamics)に室温6時間露出し, iNOS mRNAの定量を行った。

ゲルシフト解析

medium単独, LPS単独, IFN単独, およびLPS/IFNでVSM細胞を刺激した時にNFkBのactivationが起るかどうかをゲルシフトアッセイで検討した。核蛋白抽出はSchreiberらの方法に準じて行った¹⁴⁾。細胞にbuffer A (Hepes 10mM, KCl 10mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1mM, DTT 1mM, PMSF 0.5mM)を加え, 4℃, 15分インキュベート後, 最終濃度0.5%のNonident Pを添加し, 細胞膜を壊し, 得られた核をbuffer C (Hepes 20mM, NaCl 0.4M, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1mM, PMSF 1mM)中, 4℃, 30分振盪しながらインキュベートし, 15,000rpmで遠心した上清を核蛋白とした。核蛋白10 μ gと標識したoligonucleotideを室温, 20分インキュベートし, 6% non-denaturing polyacrylamide gelにて電気泳動し, ゲルを乾燥後, X線フィルムに-70℃, 一晚露出し, ゲルシフトを検討した。oligonucleotideはnuclear factor kappa B (NFkB)のconsensus sequence [-GGGGACTTTC-]を2回繰り返し含む下記の42-mer oligoを用いた。

5'GATCCAAGGGGACTTTCCATGGATCCAAGGGGACTTTCCATG3'

3'GTTCCCTGAAAGGTACCTAGGTTCCCTGAAAGGTACCTAG5'

統計分析

同じ条件の培養wellを4個ずつ作って実験を行い, 平均と標準誤差を算出した。統計学的有意水準の検討はStudent's t-testで行い, 対照群との比較でP<0.05以下を有意差とした。

結 果

LPSによるnitrite産生誘導に与えるIFNの影響

Fig.1は異なる濃度のLPS刺激24時間後のnitrite産生をIFN存在, 非存在下で検討した結果を示す。LPS単独では30 μ g/ml以上の濃度でnitrite産生が認められたが, IFN存在下ではLPS濃度が0.0001 μ g/mlでも十分なnitrite産生が認められた。一方, IFN単独ではその濃度 (1~1000ng/ml), incubation時間 (1~72h)にかかわらず, nitrite産生は認められなかった。

同様に, interleukin-1 α (IL-1) 刺激によるnitrite産生 (EC50 of 3ng/ml)をIFNは2~3倍に増強した。tumor necrosis factor- α (TNF)は単独では (~1 μ g/ml) nitrite産生刺激効果を有しなかったが, IFN存在下ではnitrite産生を刺激した。

LPS/IFNによるnitrite産生誘導に与えるdexamethasone, L-NMMAおよびcycloheximideの影響

LPS (30 μ g/ml)とIFN (50ng/ml)の同時刺激 (LPS/IFN)後のnitrite産生は約8時間のlag time後72時間まで経時的に増加した。これをdexamethasoneは軽度ではあるが有意に抑制し, またL-NMMAおよびcycloheximideはほぼ完全に抑制した (Fig.2)。

Fig. 1 Activation of nitrite production by LPS in rat aortic smooth muscle cells: concentration-dependence and potentiation by interferon- γ (IFN). 24-hour nitrite production elicited by LPS alone (CONTROL) and in the presence of 50ng/ml of IFN. All points represent the mean of 4 values $\pm$ S.E.

Fig. 2 24-hour-nitrite production in smooth muscle cells elicited by a combination of LPS (30 μ g/ml) and interferon- γ (50ng/ml)(CONTROL) and in the presence of 10⁻⁶M dexamethasone (DEX), 10⁻³M L-NMMA, or 4 $\times$ 10⁻⁶M cycloheximide (CH). *P<0.05 represents significant differences in nitrite production during incubation in the presence of DEX, L-NMMA or CH when compared to control. All bars represent the mean of 4 values $\pm$ S.E.

LPSによるiNOS mRNA誘導に与えるIFNの影響

Fig.3はcontrolすなわちmedium単独, LPS単独, IFN単独, およびLPS/IFNで刺激し8時間インキュベートした後, それぞれの細胞よりRNAを単離し, ノーザンプロットを行い, iNOSのmRNAレベルをMolecular Dynamics Phosphoimager (Molecular Dynamics) を用いて定量した結果を示す。controlおよびIFN単独刺激ではiNOS mRNAはほぼ検出されなかったが, LPS単独刺激ではiNOS mRNAの誘導が約5Kbのtranscriptとして検出され, これはIFNの共存によって約5倍に増強された。

iNOS mRNA分解に与えるIFNの影響

次にLPSによるiNOS mRNA誘導に対するIFNの増強効果がiNOS mRNAの分解の抑制によるものであるかどうかを検討した。IFNはLPS刺激後のiNOS mRNA分解速度に影響を与えなかった (Fig.4)。

Fig. 3 Northern blot analysis of the induction of iNOS mRNA in rat aortic smooth muscle cells. Effect of LPS ($30 \mu\text{g/ml}$), interferon- γ (IFN: 50ng/ml), and a combination of LPS and IFN (LPS/IFN) on the induction of iNOS mRNA. Total RNA was prepared from untreated cells or cells treated with LPS, IFN, or LPS/IFN for 8 hours and subjected to northern blot analysis using an iNOS specific probe. Quantitation was performed using a phosphoimager and data represent the mean of duplicate determinations from each of two RNA preparations.

LPSによるNF κ Bの核内移行に対するIFNの影響

NF κ Bの核内への移行をゲルシフトアッセイで検討すると、細胞をLPS/IFN刺激30分後には明らかなゲルシフトが認められ、24時間後までその状態は維持されていた。これらは過剰の非標識oligonucleotide (500倍濃度) によって消失することより、核蛋白中のNF κ Bと標識oligonucleotideの特異的結合を見ているものと考えられる。Fig.5はcontrolすなわちmedium単独、LPS単独、IFN単独、およびLPS/IFNで刺激し2時間インキュベートした後、それぞれの細胞より核蛋白を抽出し、ゲルシフトアッセイで検討した結果を示す。controlおよびIFN単独刺激では、わずかな非特異的バンドのみで、明らかなゲルシフトは認められなかった。一方、LPS刺激では著明なゲルシフトが認められたが、それに対するIFNの有意な増強効果は認められなかった。

Fig. 4 Effect of interferon- γ (IFN) on iNOS mRNA stability in rat aortic smooth muscle cells. Cells were incubated for 8 hours with LPS to increase the levels of iNOS mRNA and then exposed to 1μ g/ml of actinomycin D in the absence (filled circles:CONTROL) or presence (open circles) of 50ng/ml of IFN for 1, 2, 4, and 8 hours. Total RNA was isolated and analyzed by northern blotting using an iNOS-specific probe. Quantitation was performed using a phosphorimager and data represent the mean of duplicate determinations from each of two RNA preparations.

LPS/IFNによるnitrite産生に与えるpyrrolidine-dithiocarbamateの影響

VSMのNO産生の誘導にNFkBの活性化が必要であるかどうかを検討するために、その阻害剤であるpyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC) のLPS/IFNによるnitrite産生に与える影響について検討した。PDTCは $10\text{ }\mu\text{M}$ で有意にLPS/IFN刺激後のnitrite産生を抑制し、 $25\text{ }\mu\text{M}$ ではほぼ完全にそれを抑制した (Fig.6)。なお、PDTC ($25\text{ }\mu\text{M}$) はMTTアッセイによって測定した細胞のviabilityに有意な影響を与えなかった。

Fig. 5 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of nuclear protein in rat aortic smooth muscle cells. The cells were treated with LPS ($30\text{ }\mu\text{g/ml}$), IFN (50ng/ml), and a combination LPS (30ng/ml) and IFN (50ng/ml) for 2 hours before preparing nuclear extracts for analysis by EMSA with NFkB probe.

Fig. 6 Effect of pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC) on 24-hour-nitrite production in smooth muscle cells elicited by a combination of LPS ($30 \mu \text{g/ml}$) and interferon- γ (50ng/ml), * $P < 0.05$ represents significant differences in nitrite production during incubation in the presence of PDTC when compared to control (no PDTC). All bars represent the mean of 4 values $\pm$ S.E.

考 察

培養ラットVSM細胞を用いてLPSおよびサイトカインによるiNOS誘導に対するIFNの増強効果およびその分子機構について検討した。本研究においてはVSMのNO産生の指標として培養上清中のnitriteを測定したが、nitriteはbasalにはほとんど検出されず、immunostimulants刺激後一定のtime lagをもって経時的に増加し、かつiNOS誘導阻害薬であるdexamethasone¹⁵⁾、L-arginine analogであるL-NMMA¹⁶⁾、および蛋白合成阻害剤であるcycloheximideによって抑制されることより、誘導されたiNOSによって合成されたNOを反映するものと考えられる。

IFNはiNOSの誘導が起こるほとんどの細胞種において単独でiNOSを誘導するか、あるいは、サイトカインによるiNOSの誘導を著明に増強することが報告されている¹⁰⁾。VSMにおいてもIFNはサイトカインによるiNOSの誘導を著明に増強することが知られている⁹⁾。VSMは比較的LPSに対する感受性が低く、本研究においては $30 \mu \text{g/ml}$ 以上の濃度ではじめてNO産生の誘導が認められた。一方、IFNは単独ではVSMに対

するNO産生刺激効果を有しなかったが、IFNが共存すると、LPSはわずか0.0001 μ g/mlの濃度で100 μ g/ml LPS単独刺激時のnitrite産生を上回る刺激効果を示した。すなわち、IFNはLPSのVSMにおけるNO産生刺激効率を百万倍以上高めていると考えられた。なお、IFN存在下ではLPSによる用量依存性が明らかでなくなるが、これはIFNの最大効果量での実験のためと考えられる。

IFNは単独ではiNOS mRNAを誘導しなかったが、LPS (30 μ g/ml) 単独刺激でのiNOS mRNAレベルを約5倍に増強した。この結果はFig.1に示したIFNによるnitrite産生の増強効果とよく合致する。LPSによるiNOS mRNA誘導に対するIFNの増強効果は、IFNがiNOS mRNA分解速度に影響を与えなかったこと (Fig.4) より、iNOS mRNAの分解の抑制によるものではなく、転写の活性化によるものと考えられた。

NathanらのグループによってmacrophageのiNOS遺伝子のpromoterがcloningされ¹⁷⁾、多くの転写調節因子に対するconsensus sequenceの存在が明らかにされたが、ごく最近彼らはNFkBがiNOS遺伝子の転写の活性化に必須であることを報告している¹⁸⁾。NFkB活性化の阻害剤であるPDTCがLPS/IFNによるnitrite産生を完全に抑制する (Fig.6) ことより、VSMにおいてもiNOS遺伝子転写の活性化にNFkBが重要な役割を果たしていることが推定されたが、LPS単独でのNFkBの核内移行に対するIFNによる有意な増強効果は認められなかった。よってIFNによるiNOS遺伝子転写の活性化にNFkBの活性化をより高めると言う機序は関与していないと考えられた。なお本研究では、NFkBに関してはゲルシフトの有無を検討したのみで、抗体を用いた蛋白としてのcharacterizationを含め、さらに検討を要すると考えている。

本研究の知見は培養ラットVSM細胞におけるLPSによるiNOS遺伝子の転写の活性化にはNFkBのactivationが必須であり、IFNはLPSによるiNOS遺伝子の転写の活性化をNFkBのactivationとは独立した機序で増強していることを示唆するものと考えている。現時点では、iNOSによるNO産生はiNOS遺伝子のtranscriptional controlで決定されるものと考えられており、本研究の結果もそれを支持するものと考えられるが、これまでiNOS遺伝子の転写以降のNO産生の抑制¹⁹⁾あるいはcofactorによるNO産生の調節²⁰⁾などが明らかにされており、iNOSの誘導およびそれによるNO産生の制御機構は複雑であり、LPSおよびサイトカインによるNO産生の誘導に対するIFNの増強効果の分子機構についてもさらに詳細な検討を要すると考えられる。

結 語

培養ラットVSM細胞を用いてLPSおよびサイトカインによるiNOS誘導に対するIFNの増強効果およびその分子機構について検討した。

- ① IFNは培養VSM細胞のLPSによるNO産生の誘導をsynergisticに増強し、その効果はiNOS遺伝子発現のレベルで発揮されることが考えられた。
- ② IFNのiNOS遺伝子発現の増強効果はiNOS mRNAの分解の抑制によるものではなく、転写の活性化によるものと考えられた。
- ③ VSMにおいてもiNOS遺伝子転写の活性化にNFkBが重要な役割を果たしていることが推定されるが、IFNのiNOS遺伝子発現の増強効果にはNFkBの活性化は関与していないことが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲をいただいた下田新一教授ならびに研究室の方々
に心より深謝致します。

文 献

- 1) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376
- 2) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1987;84:9265-9269
- 3) Palmer R, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526
- 4) Thiemermann C, Vane JR. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 1990;182:591-595
- 5) Kilbourne RG, Griffith OW. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:827-831
- 6) Busse R, Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1991;275:87-90
- 7) Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM. Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;87:602-608
- 8) Schini VB, Junquero DC, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Interleukin-1 β induces the production of an L-arginine-derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta. *Biochem Res Commun* 1991;176:114-121
- 9) Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis: An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992;267:25722-25729
- 10) Drapier JC. Nitric oxide in the cytokine network. In: Moncada S, Nistico G, Higgs EA, eds, *Nitric oxide: Brain and immune system*. London: Portland Press, 1993:205-212
- 11) Nunokawa Y, Tanaka S. Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:409-415
- 12) Hattori Y, Gross SS. GTP cyclohydrolase 1 mRNA is induced by LPS in vascular smooth muscle: characterization, sequence and relationship to nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:435-441
- 13) Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:89-94
- 14) Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acid Res* 1989;17:6419
- 15) Radomski MW, Palmer R, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990;87:10043-10047
- 16) Gross SS, Stuehr DJ, Aisaka K, Jaffe EA, Levi R, Griffith OW. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by N^G-aminoarginine, N^G-nitroarginine and N^G-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:96-103.
- 17) Xie Q, Whisnant R, Nathan C. Promotor of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993;177:1779-1784
- 18) Xie Q, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994;269:4705-4708
- 19) Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie Q, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β . *J Exp Med* 1993;178:605-613

(受付日: '94. 7.13)

(採択日: '94.10. 3)