

サイトカインによるメタロチオネイン誘導とメタロチオネインによる サイトカイン発現の修飾

伊藤 徳夫,^{*,a} 木村 朋紀^b

Cytokine-induced Metallothionein Expression and Modulation of Cytokine Expression by Metallothionein

Norio ITOH^{*,a} and Tomoki KIMURA^b

^aDepartment of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamada-oka, Suita City 565-0871, Japan, and ^bDepartment of Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Nagaotoge-cho, Hirakata City 573-0101, Japan

(Received January 5, 2007)

A multifunctional protein metallothionein (MT) is induced by various chemicals and cytokines. We have found novel functions of MT as follows: 1) Cytokine expression such as IL-1 α , IL-6, and TNF α responding to lipopolysaccharide is reduced in MT-deficient macrophages compared with in wild-type cells. 2) Nitric oxide production responding to TNF α and LPS is reduced in MT-deficient macrophages compared with in wild-type cells. 3) M-CSF expression responding to zinc is reduced in MT-deficient fibroblasts compared with in wild-type cells, and increased in MT-overexpressed fibroblasts compared with in control cells. 4) LIF, a STAT3 activating cytokine, protects the heart from ischemia/reperfusion injury. Transgenic mice overexpressing STAT3 have tolerance to ischemia/reperfusion-induced damage, whereas MT-null mutation cancels the myocardial protection. In this review, we discuss the relation of MT and stress responses from the point of view of cytokine-induced expression of MT and modulation of cytokine expression by MT.

Key words—metallothionein; cytokine; interleukin-6; tumor necrosis factor; nuclear factor κ B; signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

1. はじめに

多機能生体防御タンパク質メタロチオネイン (MT) は重金属のみならずいくつかのサイトカインで誘導される。われわれは、このような調節を受ける MT が、これまで知られていない新たな作用を有することを明らかにしてきた。本総説では、サイトカイン応答性 MT 誘導と MT によるサイトカイン発現修飾の視点から、MT が多くの局面でストレス応答に係わり、防御因子として機能することについて議論したい。

2. 急性期応答としての MT 誘導—インターロイキン -6 による誘導—

MT を誘導する因子としては、カドミウムなど重

金属がよく知られているが、リポ多糖 (LPS)、テルペン油などの起炎剤、有機溶剤など種々の化学物質が肝臓において MT を誘導することが、1980 年代には知られていた。¹⁻³⁾ しかしながら、その誘導機構は長い間不明であった。われわれは、MT の誘導パターンと急性期タンパク質の誘導パターンが酷似していること、及び、起炎剤刺激後に認められる肝臓 MT 誘導に先立って、血中インターロイキン -6 (IL-6) レベルの上昇が認められ、IL-6 中和抗体が急性期タンパク質の誘導のみならず MT 誘導をも阻害することを見出した。⁴⁻⁶⁾ われわれの知見を支持する結果は、IL-6 欠損マウスを用いる系で Lee らにより得られている。⁷⁾ 次に、われわれは、この IL-6 をメディエーターとする MT 誘導の細胞内シグナル伝達系の解明を目指した。解析はラット由来肝細胞株 H4IIEC3 細胞と、マウス MT-I プロモーターにルシフェラーゼを連結したコンストラクトを用いたレポーターアッセイで行った。マウス MT-I

^a大阪大学大学院薬学研究科毒理学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6), ^b摂南大学薬学部毒理学研究室 (〒573-0101 枚方市長尾峠町 45-1)

*e-mail: n-itoh@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。

プロモーター上には、IL-6 応答配列 (IL-6RE) のタイプ 1 とタイプ 2 が存在する。これら配列への点変異導入及び転写因子の強制発現系を用いた検討により、MT 誘導に必須のエレメントはタイプ 2 (別名: acute phase response element (APRE)) であることを明らかにした。また、IL-6 依存的 MT 誘導には微量のグルココルチコイドが必要であり生理的濃度のグルココルチコイドは IL-6 の作用を十分にサポートできること、さらに APRE のすぐ 3' 側に存在するグルココルチコイド応答配列 (GRE) が関与することが明らかとなった (Fig. 1).⁸⁾ さらに、APRE-GRE 間に 16 bp の配列を挿入することで IL-6 依存的 MT 誘導が認められなくなることから、各応答配列に結合する転写因子、signal transducer and activator of transcription 3/acute phase response factor (STAT3/APRF) とグルココルチコイド受容体 (GR) とがプロモーター上でなんらか

の相互作用をしていると予想された。

では、誘導された MT の役割は何なのであろうか? 起炎刺激に伴う血中亜鉛濃度の減少と肝臓亜鉛濃度の上昇は、起炎刺激による MT 誘導現象が明らかにされる以前から知られており、MT 誘導が見出されると亜鉛代謝と関連付けて研究が行われた。¹⁻³⁾ Philcox らは起炎刺激による肝臓亜鉛量増加に MT が関与していることを MT 欠損マウスを用いて明らかにしている。⁹⁾ IL-6 により MT と亜鉛取込輸送体 Zip14 の発現が肝臓で誘導されることが、その分子機構であろう。¹⁰⁾ われわれは LPS/D-ガラクトサミン (GalN) 誘発肝障害・致死¹¹⁾ 感受性を MT 欠損マウスで検討した。急性期には肝臓で顕著な MT 誘導が認められることから、急性肝障害を引き起こすこのモデルが MT の役割を調べるのに最適であると判断したためである。LPS 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, GalN 700 mg/kg 腹腔内投与 24 時間後の生

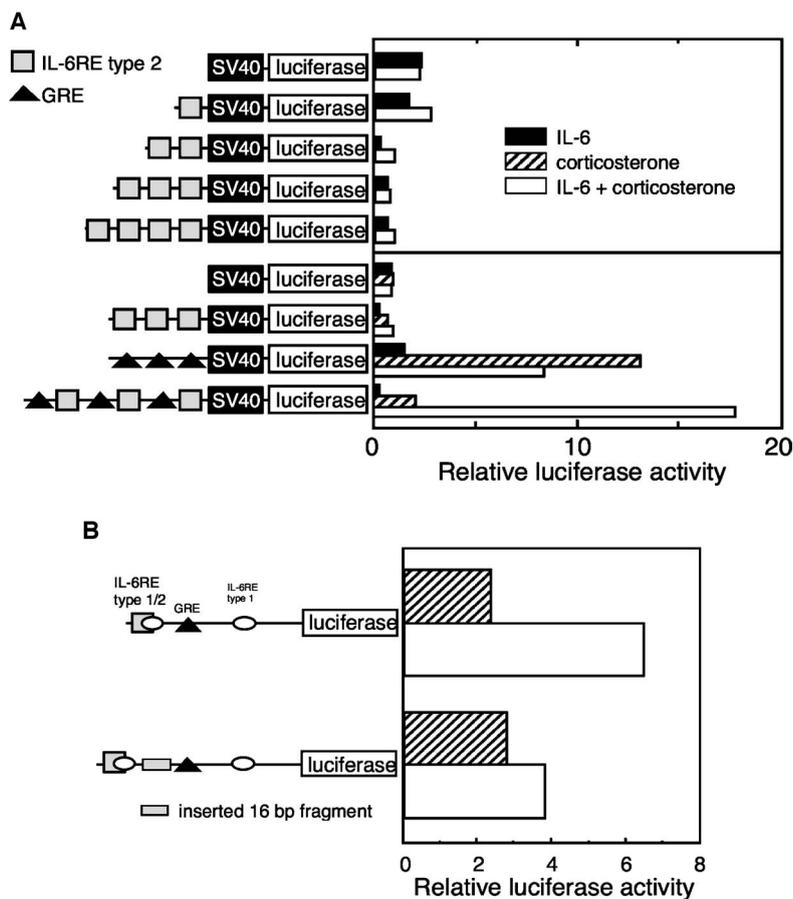


Fig. 1. Synergistic Response of IL-6RE and GRE in the Mouse MT-I Promoter to IL-6 and Glucocorticoid

A: Putative type 2 IL-6RE, GRE, or the region containing both elements of the mouse mMT-I promoter were cloned into a SV40 promoter-containing reporter plasmid. Transfected cells were stimulated with IL-6 (500 U/ml) and/or corticosterone (1 μM). B: A nonsense 16 bp fragment was inserted between -247 and -246 in the mMT-I promoter. Transfected cells were stimulated with IL-6 and/or corticosterone.

存率は、野生型マウスで75%であるのに対し、MT欠損マウスではわずか29%であった (Fig. 2)。また、MT欠損マウスで顕著な肝障害が観察された。¹²⁾ このモデルと類似の機序で肝障害・致死を誘発すると考えられる TNF- α /GalN を用いたモデルがあり、急性期タンパク質の一種、 α 1 酸性糖タンパク質 (AGP) の投与が肝障害と致死を防御することが報告されている。¹³⁾ AGP の発現は、IL-6 とグルコシルチコイドで協調的に制御される一方で、亜鉛により誘導される。AGP 遺伝子のプロモーターには metal responsive element (MRE) のコンセンサス配列が存在する。MT の有無でこの AGP の発現に違いが認められるか否かを検討すると、MT が AGP の発現を促進的に調節することが明らかとなった。¹⁴⁾ この分子機構は興味あるところであり、AGP 遺伝子プロモーターの MRE と MRE-binding transcription factor-1 (MTF-1) を介する反応と想定される。亜鉛前投与により LPS/GalN 致死感受性が低下するというわれわれの結果¹⁵⁾も、この想定を支持している。Inoue らによって LPS 感受性が MT 欠損マウスで亢進していることも報告されている。¹⁶⁾ 彼らは凝固線溶系に注目し、MT 欠損マウスで LPS 投与後のプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間延長が顕著なることを

見出した。われわれも MT 欠損マウスにおけるプロトロンビン時間の延長を LPS/GalN モデルで観察している。¹²⁾ また、Rofe らは、LPS 投与によるエネルギー代謝変化を MT 欠損マウスと野生型マウスとで比較している。¹⁷⁾ MT 欠損マウスでは、LPS 投与によって顕著な肝臓グルコース濃度の低下、グリコーゲン濃度の低下及び糖新生活性を反映するケトン体濃度の上昇が観察されたと報告している。起炎刺激にตอบสนองして肝臓に貯蔵されているグリコーゲンの分解によるグルコース供給が活性化される。グリコーゲンの備蓄が低下すると、糖新生系が活性化されグルコース供給を維持しようとする。つまり「MT 欠損により緊急時のエネルギー代謝変化への対応能が低下する」という興味深い報告である。どのような機序で MT 欠損により凝固線溶系やエネルギー代謝が影響を受けるのかについては、今後の詳細な検討が待たれる。

このように、MT は急性期応答において防御的な役割を担っていると考えられる。しかしながら、どのような機構で MT が防御作用を発揮しているのかについては、いまだはっきりしていない部分が多い。免疫系での MT による防御機構を解析することが今後の重要な課題であろう。

3. MT による NF- κ B 活性化と線維芽細胞の M-CSF 発現

われわれは免疫系において MT の関与する応答を検索することとし、多くの免疫応答に係わる転写因子、NF- κ B に注目した。ロイシンジッパー型転写因子である NF- κ B は、シスエレメントである κ B モチーフへの結合に L1 ループのシステイン残基への亜鉛結合を必要とする。¹⁸⁾ MT が亜鉛酵素やジンクフィンガー型転写因子と亜鉛を授受できることはいくつかの研究グループにより示されている。¹⁹⁻²²⁾ したがって、MT が亜鉛の供給源として作用して NF- κ B 活性を調節する可能性がある。Abdel-Mageed と Agrawal は MT が核内で NF- κ B に結合し、NF- κ B 活性を上昇すると報告している。²³⁾ われわれはキレーターである diethylenetriaminepenta-acetic acid がサイトメガロウイルス (CMV) の複製を阻害する分子機構を解析する中で、CMV 主要前初期遺伝子プロモーター (MIEP) に存在する 3 つの κ B モチーフが亜鉛濃度依存的に活性化されることを見出した (Fig. 3(A)).²⁴⁾ さらに、L929 マウス織

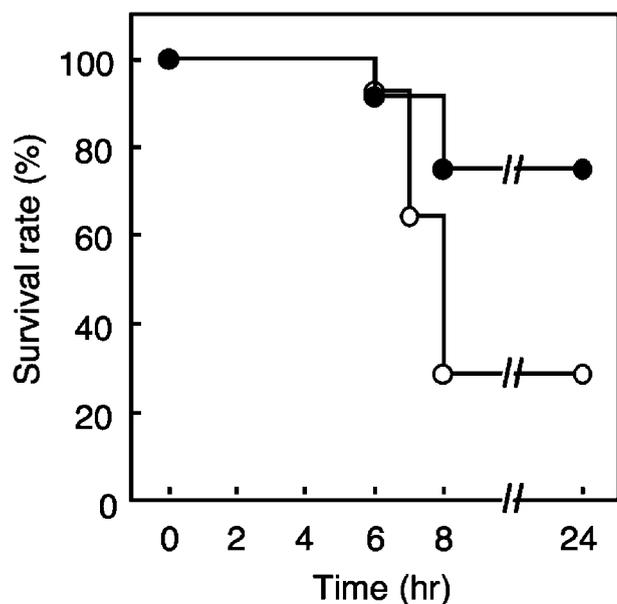


Fig. 2. LPS/D-galactosamine-induced Lethality in Mice
Control (closed circle) and MT-null mice (open circle) were received for LPS (100 μ g/kg) plus GalN (700 mg/kg).

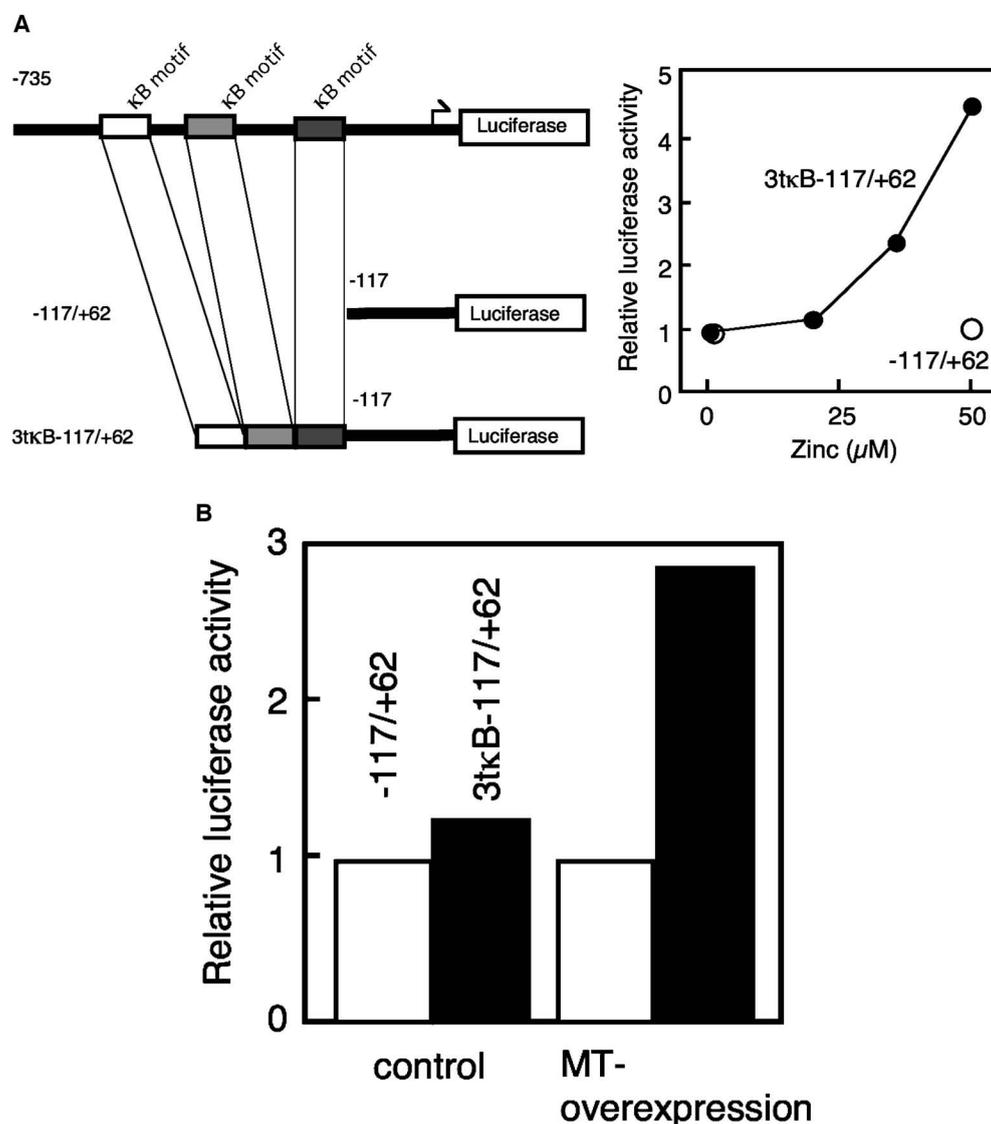


Fig. 3. Stimulation of κ B Motif in hCMV-MIE Promoter by Zinc and MT

Three κ B motifs from the CMV MIE promoter (3tkB) were cloned in the front of the luciferase reporter plasmid containing 117 bp of the 5' flanking region of the CMV MIE gene. L929 cells (A) and MT-overexpressed L929 cells (B) were transfected with reporter plasmid.

維芽細胞に MT 発現ベクターを導入して MT を約 3 倍過剰発現すると, MIEP 活性が上昇することを明らかにした (Fig. 3 (B)).²⁵⁾ NF- κ B は, Table 1 に示すように, サイトカインや細胞接着に係わる分子など数多くの遺伝子発現を調節している。²⁶⁾ MT がこれら NF- κ B 支配遺伝子の発現を調節しているのか非常に興味深い。われわれは macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 発現に対する亜鉛及び MT の関与について検討を行った。まず, 亜鉛による M-CSF mRNA 誘導を野生型及び MT 欠損線維芽細胞で比較した。野生型細胞においては時間依存的な M-CSF mRNA の増加が観察されたが, MT 欠損細胞では, M-CSF mRNA 量はほとんど変化しな

Table 1. NF- κ B-regulated Genes

Cytokines	
Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor	Interferon- β
Interleukin (IL)-1	IL-6
Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)	Macrophage inflammatory protein
Monocyte chemoattractant protein	Tumor necrosis factor (TNF)- α
Cell adhesion molecules	
Intercellular cell adhesion molecule-1	Vascular cell adhesion molecule-1

かった (Fig. 4(A)). また, MT 過剰発現 L929 細胞で, M-CSF 発現が上昇していることを Northern blot 及び M-CSF 活性測定により確認した (Fig. 4(B)). さらに, NF- κ B 活性をゲルシフトアッセイにより調べたところ, MT 過剰発現細胞で κ B モチーフ結合バンドの増加が確認された. この増加が核内 NF- κ B 量増加による可能性を考え, 核画分中の NF- κ B サブユニット, p50 量を Western blot により調べた. しかしながら, 両細胞間で核内 p50 量に差異は認められなかった. この結果は, 核内に移行した NF- κ B の κ B モチーフへの結合活性が MT により上昇したためであることを示すものである. 以上の結果より, われわれは Fig. 5 のモデルを考えた. なんらかの刺激が IKK に伝わると, I κ B が NF- κ B から解離し NF- κ B が核移行する. このとき亜鉛結合型 MT が存在すると効率よく Zn が NF- κ B へと渡され NF- κ B が κ B モチーフへの結合能を獲得する. 2004 年, Hirano らの研究グループは, ゼブラフィッシュ受精卵の初期発生における上皮-間葉転換の解析により, 亜鉛取込輸送体 Zrt- and Irt-like proteins (Zip) の 1 つ, LIV1 (Zip6) が亜鉛フィンガー型転写因子 Snail の活性を制御すると報告している.²⁷⁾ MT や亜鉛輸送体が転写因子の活性を修飾することで遺伝子発現を制御し, 細胞機能を調

節するというシグナル伝達系は MT—NF- κ B, LIV1—Snail 以外にも数多く存在する可能性がある. 今後, MT や亜鉛輸送体を介するシグナル伝達系が解明されていくことを期待する.

4. マクロファージ機能と MT

MT が NF- κ B 活性化の促進を介して線維芽細胞の M-CSF 発現を上昇することは先に述べた通りである. われわれは TNF, IL-1 α 及び IL-6 誘導に対する MT の影響についても検討を行った. LPS はマクロファージ細胞膜受容体である TLR4 に結合すると MyD88 を介して NF- κ B を活性化し, 種々サイトカイン発現を誘導する.²⁸⁾ 野生型及び MT 欠損マウスから調製したマクロファージを LPS で処理した場合, いずれのサイトカイン誘導も MT 欠損マクロファージで低下していた (Fig. 6).²⁹⁾ LPS による NF- κ B 活性化をゲルシフトアッセイにより調べたところ, MT 欠損マクロファージでは LPS による NF- κ B 活性化が減弱しており, 線維芽細胞のみならずマクロファージにおいても MT が NF- κ B 活性化に係わることが明らかとなった (Fig. 7). では他のマクロファージ機能は MT で修飾されないのだろうか? そこでマクロファージの殺菌作用に及ぼす MT の影響を以下のように検討した. 腹腔浸潤マクロファージと *Staphylococcus*

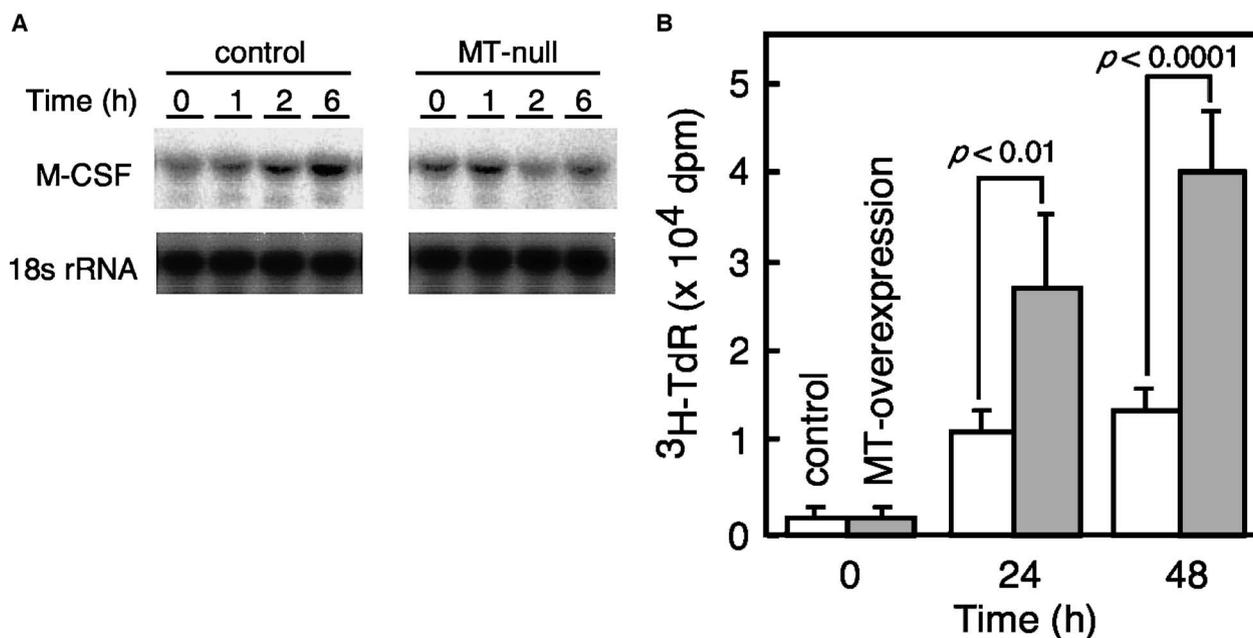


Fig. 4. Zinc and MT Stimulate M-CSF Expression

A: Murine lung fibroblasts from control and MT-null mice were incubated with 50 μ M zinc. B: M-CSF activity in conditioned medium from culture of control cells and MT-overexpressing cells were bioassayed.

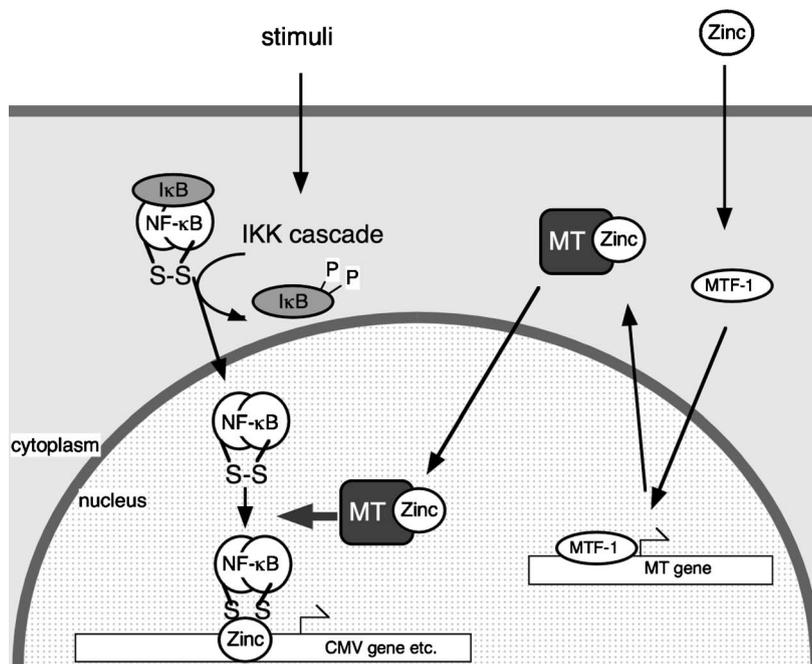


Fig. 5. A Model Explaining the Stimulating Effect of MT on NF- κ B-mediated Signaling

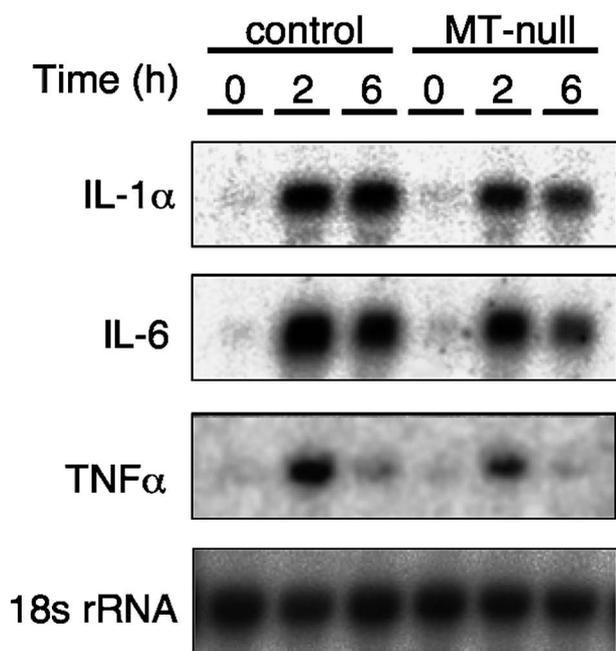


Fig. 6. Expression of Cytokine mRNA in Peritoneal Macrophages from Control and MT-null Mice
Macrophages were incubated with 100 ng/ml LPS.

aureus とを共培養し、2時間後の生菌数を調べることでマクロファージの殺菌能を評価した。その結果、MT欠損マクロファージの殺菌能は野生型に比べて有意に低いことを見出した (Fig. 8).³⁰⁾ マクロファージによる殺菌は一酸化窒素 (NO) による部分

が大きい。NO産生能を両マクロファージで比較したところ、MT欠損マクロファージでLPSあるいはTNF α 刺激応答性NO産生の低下が観察された。したがって、殺菌能の差はNO産生能の差に起因すると考えられる。ではNO産生能の差は何に起因するのであろうか？マクロファージはLPSやサイトカインに反応して誘導型NO合成酵素 (iNOS) を発現する。³¹⁾ iNOSはL-アルギニンから酵素反応によりNOとL-シトルリンを産生する。活性化されたマクロファージは、L-アルギニンを尿素とL-オルニチンに分解するアルギナーゼも発現しており、L-アルギニン代謝において両酵素は競合している。L-アルギニンの細胞内への取り込みはcationic amino acid transporter 2 (CAT2) により行われている。そこで、iNOS発現をNorthern blot及びWestern blot法により、L-シトルリン生成及びL-オルニチン生成を¹⁴C標識L-アルギニンを用いて、野生型とMT欠損マクロファージとで比較した。L-シトルリン生成及びL-オルニチン生成はNOS活性及びアルギナーゼ活性を評価するために測定した。その結果、iNOS発現及びアルギナーゼ活性には両マクロファージ間で顕著な差を認めなかったが、NOS活性がMT欠損マクロファージで明瞭に低下していた (Fig. 9)。つまり、iNOS発現に差が認められないにも係わらず、NOS活性

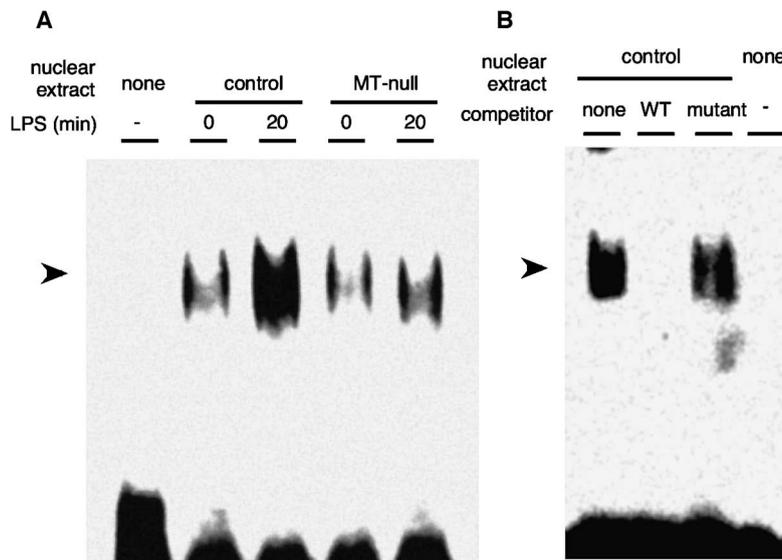


Fig. 7. NF-κB-DNA Binding in Peritoneal Macrophages from Control and MT-null Mice
 Macrophages were incubated with 1 μg/ml LPS for 20 min. A: DNA binding activity of NF-κB in nuclear extracts from control and MT-null macrophages. B: Competitive assays with unlabeled NF-κB probe and its mutant.

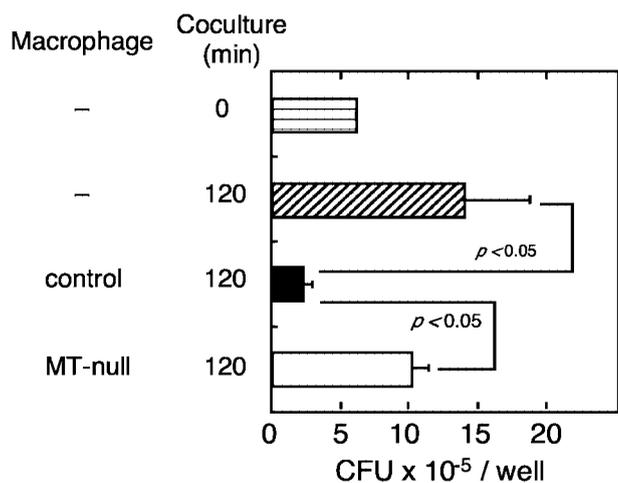


Fig. 8. Antibacterial Activity in Macrophages from Control and MT-null Mice
 After incubation of macrophages and *Staphylococcus aureus*, the number of CFU were determined.

に差が認められた。iNOS タンパク質は亜鉛を含む複合体の形で活性を発揮する。われわれは、亜鉛結合型 MT が効率よく iNOS へ亜鉛を渡すことで iNOS 活性を高めているのではないかと考えている。また、NOS 活性はコファクター、テトラヒドロピオプテリン (BH4) による調節を受けている。BH4 による NOS 活性調節が MT とカップルしている可能性も考えられる。一方、NO が亜鉛結合型 MT から亜鉛を遊離することで細胞内亜鉛量を変化させる可能性が指摘されている。^{32,33)} MT と NO や

NOS の関係を解析することで、MT の新たな機能が明らかとなるかもしれない。今後の研究成果に期待したい。

5. 虚血再灌流による心筋障害と MT

心筋障害と MT の関係については、1988 年の Satoh らの報告が最初のものである。彼らは亜硝酸ビスマスによりあらかじめ心臓 MT を誘導しておくことでドキソルピシン惹起心障害が軽減されることを見出した。³⁴⁾ われわれも亜硝酸ビスマスによるドキソルピシン惹起心障害に対する保護効果が MT 欠損マウスで認められないことを報告しており、³⁵⁾ MT がドキソルピシン惹起心障害に対する保護因子として機能していることは明白であろう。心筋障害と MT との係わりは、ドキソルピシン以外の要因でも認められる。われわれは最近虚血再灌流による心筋障害に対して STAT3/APRF が保護作用を発揮する過程に MT が関与することを明らかにした。³⁶⁾ 虚血再灌流 (I/R) 障害は、再灌流時に発生する大量の活性酸素種 (ROS) が原因の一因であることが知られている。IL-6 欠損マウスで I/R 障害が顕著に観察されること³⁷⁾ や、IL-6 ファミリーの一員である leukemia inhibitory factor (LIF) の発現ベクターを投与することで I/R による心筋障害が防御できること³⁸⁾ から、これら保護作用に STAT3/APRF が重要な役割を演じているものと考えられる。IL-6 ファミリーのサイトカインに対応する各

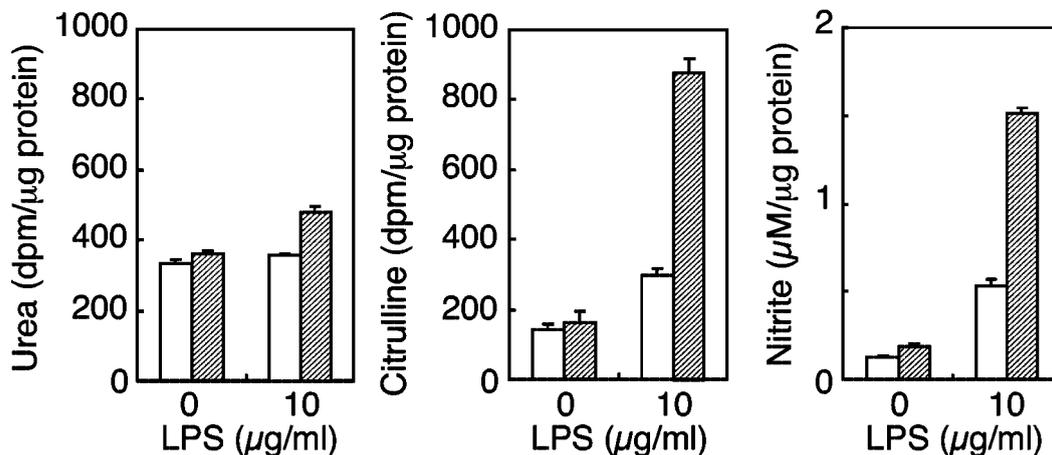


Fig. 9. L-Arginine Metabolism in LPS-stimulated Macrophages from Control and MT-null Mice

LPS-treated cells from control (hatched column) and MT-null (open column) were incubated for 6 h with [14 C]-L-arginine (urea and citrulline formation) or cold arginine (nitrite determination). Urea and citrulline formed from [14 C]-L-arginine, and nitrite from L-arginine were determined.

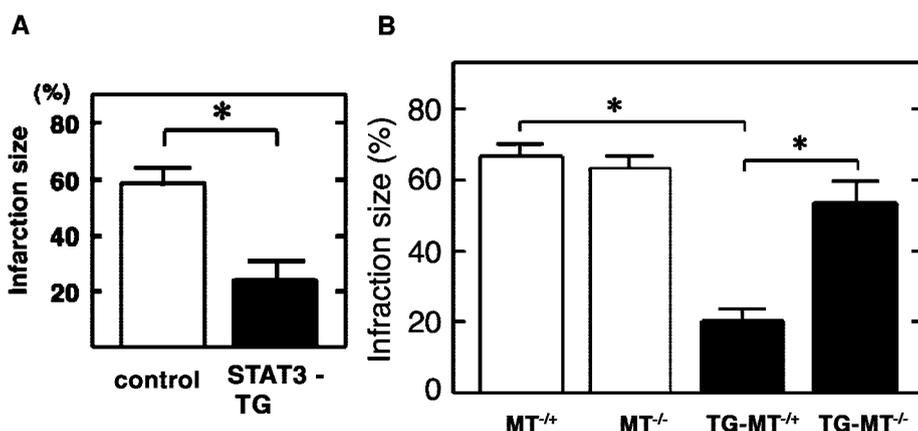


Fig. 10. MT-dependent Tolerance of STAT3 Transgenic Mice to Ischemia/Reperfusion Injury

A: Ischemia/reperfusion injury in STAT3 transgenic mice, B: Canceling effect of MT-null mutation on the protective activity of STAT3. * $p < 0.005$.

レセプターからのシグナルは、レセプターに付随する膜タンパク質 gp130 の活性化に伴って STAT3/APRF のリン酸化を引き起こす。この過程で活性化型へと変換した STAT3/APRF は核内移行することで転写活性を発揮する。STAT3/APRF は先に述べたように急性期の MT 誘導に係わる転写因子であることから、STAT3/APRF による心筋防御は MT のラジカルスカベンジ能によるものである可能性がある。われわれは、I/R 障害軽減への MT の関与を明らかにするため、心臓特異的に STAT3/APRF を高発現するトランスジェニックマウス (STAT3-TG) 及び MT 欠損マウスを用いて検討を行った。STAT3/APRF は JAK によるリン酸化を受けて活性化/核移行するタンパク質であるため、本検討で用いたマウスにはリン酸化非依存的に活性を発現す

る変異型 STAT3/APRF を導入している。STAT3-TG は、心臓 MT 発現量が高く、I/R 障害は野生型と比較して軽度であった (Fig. 10(A))。また、活性酸素種 (ROS) の蛍光指示薬である 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate を使って I/R 後の ROS 量を調べたところ、STAT3-TG で ROS 量は低値であった。しかし、MT 欠損、及び MT ヘテロ欠損 STAT3-TG で同様の検討を行ったところ、MT 欠損 STAT3-TG では STAT3/APRF による I/R 障害軽減及び ROS 量減少が認められなかった (Fig. 10(B))。軽度若しくは短時間の虚血により、引き続いて起こる長時間の虚血に対して心筋は抵抗性を示すようになることが知られている。この現象はプレコンディショニングと呼ばれ、注目を集めている。プレコンディショニング機構については、ア

デノシン受容体活性化によるプロテインキナーゼ C (PKC) を介してミトコンドリア ATP 感受性 K チャネルの開口するという経路³⁹⁾や, NO が PKC の活性化を介して Src ファミリーを活性化し, 下流転写因子を活性化するという経路⁴⁰⁾が知られている. Src は STAT3/APRF の上流因子であることから, この経路で MT が誘導されることによって I/R 障害耐性を獲得していると考えられる. また, 虚血時には MTF-1 が活性化され, MT 発現が誘導されることも知られている.⁴¹⁾ プレコンディショニングが MT 誘導によるものであるのか, また, MT の寄与はどの程度なのかなど, 今後の研究が待たれる.

6. おわりに

馬の腎臓皮質中から MT が見出されて 50 年近くもの年月が経過している. しかしながら, MT のストレス応答における役割に関しては, 重金属暴露に対する防御, 亜鉛欠乏に対する抵抗性, ROS に対する抵抗性というように MT の構造から容易に推察できるものしか明らかとなつてこなかった. 本総説では, サイトカイン応答性 MT 誘導と MT によるサイトカイン発現修飾の視点から, MT が多くの局面でストレス応答に係わり, 防御因子として機能することを概説した. また近年, Hirano らの研究グループによって, マスト細胞がアレルギー反応としてケミカルメディエーターやサイトカインを放出する過程に亜鉛が関与すること⁴²⁾や, 樹状細胞の LPS 応答の一部が TLR4-TRIF 経路により Zip6 の発現を低下して細胞内遊離型亜鉛量を減少することで引き起こされている可能性が示されている.⁴³⁾ MT はユビキタスに発現しており, これらの過程に MT が関与する可能性が考えられる. これら以外にも, MT が種々転写因子やシグナル伝達因子の活性を修飾する可能性は十二分にある. MT の多様な作用は, このタンパク質が化学的ストレスに応答して誘導されることで他の遺伝子の転写やシグナル経路を修飾することで, 最終的な化学的ストレス応答等の質的量的な反応に影響することを意味している. 今後, MT がどのような形で化学的ストレス応答に係わっているのか, 新しい作用点とその機構が解明されることに期待する.

REFERENCES

- 1) Sobocinski P. Z., Canterbury Jr. W. J., Mapes C. A., Dinterman R. E., *Am. J. Physiol.*, **234**, E399-406 (1978).
- 2) Sobocinski P. Z., Canterbury Jr. W. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **389**, 354-367 (1982).
- 3) Durnam D. M., Hoffman J. S., Quaipe C. J., Benditt E. P., Chen H. Y., Brinster R. L., Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1053-1056 (1984).
- 4) Min K. S., Terano Y., Onosaka S., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **111**, 152-162 (1991).
- 5) Itoh N., Okamoto H., Ohta M., Hori T., Min K. S., Onosaka S., Nakanishi H., Okabe M., Muto N., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **124**, 257-261 (1994).
- 6) Itoh N., Kasutani K., Muto N., Otaki N., Kimura M., Tanaka K., *Toxicology*, **112**, 29-36 (1996).
- 7) Lee D. K., Carrasco J., Hidalgo J., Andrews G. K., *Biochem. J.*, **337**(Pt 1), 59-65 (1999).
- 8) Kasutani K., Itoh N., Kanekiyo M., Muto N., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **151**, 143-151 (1998).
- 9) Philcox J. C., Coyle P., Michalska A., Choo K. H., Rofe A. M., *Biochem. J.*, **308**(Pt 2), 543-546 (1995).
- 10) Liuzzi J. P., Lichten L. A., Rivera S., Blanchard R. K., Aydemir T. B., Knutson M. D., Ganz T., Cousins R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 6843-6848 (2005).
- 11) Galanos C., Freudenberg M. A., Reutter W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5939-5943 (1979).
- 12) Kimura T., Koujitani T., Itoh N., Takehara M., Oguro I., Ishizaki J., Nakanishi T., Tanaka K., *J. Health Sci.*, **47**, 310-313 (2001).
- 13) Libert C., Brouckaert P., Fiers W., *J. Exp. Med.*, **180**, 1571-1575 (1994).
- 14) Kimura T., Itoh N., Takehara M., Oguro I., Ishizaki J. I., Nakanishi T., Tanaka K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 358-362 (2001).
- 15) Kimura T., Itoh N., Takehara M., Oguro I., Ishizaki J., Nakanishi T., Isobe M., Tanaka K., *J. Health Sci.*, **49**, 40-44 (2003).

- 16) Inoue K., Takano H., Shimada A., Wada E., Yanagisawa R., Sakurai M., Satoh M., Yoshikawa T., *FASEB J.*, **20**, 533–535 (2006).
- 17) Rofe A. M., Philcox J. C., Coyle P., *Biochem. J.*, **314**(Pt 3), 793–797 (1996).
- 18) Siebenlist U., Franzoso G., Brown K., *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 405–455 (1994).
- 19) Li T. Y., Kraker A. J., Shaw 3rd C. F., Petering D. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 6334–6338 (1980).
- 20) Zeng J., Heuchel R., Schaffner W., Kagi J. H., *FEBS Lett.*, **279**, 310–312 (1991).
- 21) Cano-Gauci D. F., Sarkar B., *FEBS Lett.*, **386**, 1–4 (1996).
- 22) Jacob C., Maret W., Vallee B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 3489–3494 (1998).
- 23) Abdel-Mageed A. B., Agrawal K. C., *Cancer Res.*, **58**, 2335–2338 (1998).
- 24) Kanekiyo M., Itoh N., Mano M., Kawasaki A., Tanaka J., Muto N., Tanaka K., *Antiviral Res.*, **47**, 207–214 (2000).
- 25) Kanekiyo M., Itoh N., Kawasaki A., Tanaka J., Nakanishi T., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **173**, 146–153 (2001).
- 26) Ghosh S., May M. J., Kopp E. B., *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 225–260 (1998).
- 27) Yamashita S., Miyagi C., Fukada T., Kagara N., Che Y. S., Hirano T., *Nature*, **429**, 298–302 (2004).
- 28) Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Akira S., *Immunity*, **11**, 115–122 (1999).
- 29) Kanekiyo M., Itoh N., Kawasaki A., Matsuyama A., Matsuda K., Nakanishi T., Tanaka K., *Biochem. J.*, **361**, 363–369 (2002).
- 30) Itoh N., Shibayama H., Kanekiyo M., Nampung D., Nakanishi T., Matsuyama A., Odani T., Tanaka K., *Toxicology*, **216**, 188–196 (2005).
- 31) MacMicking J., Xie Q. W., Nathan C., *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 323–350 (1997).
- 32) Katakai K., Liu J., Nakajima K., Keefer L. K., Waalkes M. P., *Toxicol. Lett.*, **119**, 103–108 (2001).
- 33) Spahl D. U., Berendji-Grun D., Suschek C. V., Kolb-Bachofen V., Kroncke K. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 13952–13957 (2003).
- 34) Satoh M., Naganuma A., Imura N., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **21**, 176–178 (1988).
- 35) Kimura T., Fujita I., Itoh N., Muto N., Nakanishi T., Takahashi K., Azuma J., Tanaka K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 299–302 (2000).
- 36) Oshima Y., Fujio Y., Nakanishi T., Itoh N., Yamamoto Y., Negoro S., Tanaka K., Kishimoto T., Kawase I., Azuma J., *Cardiovasc. Res.*, **65**, 428–435 (2005).
- 37) Dawn B., Xuan Y. T., Guo Y., Rezazadeh A., Stein A. B., Hunt G., Wu W. J., Tan W., Bolli R., *Cardiovasc. Res.*, **64**, 61–71 (2004).
- 38) Zou Y., Takano H., Mizukami M., Akazawa H., Qin Y., Toko H., Sakamoto M., Minamino T., Nagai T., Komuro I., *Circulation*, **108**, 748–753 (2003).
- 39) Ardehali H., *Circ. Res.*, **99**, 798–800 (2006).
- 40) Dawn B., Bolli R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **962**, 18–41 (2002).
- 41) Murphy B. J., Andrews G. K., Bittel D., Discher D. J., McCue J., Green C. J., Yanovsky M., Giaccia A., Sutherland R. M., Laderoute K. R., Webster K. A., *Cancer Res.*, **59**, 1315–1322 (1999).
- 42) Kabu K., Yamasaki S., Kamimura D., Ito Y., Hasegawa A., Sato E., Kitamura H., Nishida K., Hirano T., *J. Immunol.*, **177**, 1296–1305 (2006).
- 43) Kitamura H., Morikawa H., Kamon H., Iguchi M., Hojyo S., Fukada T., Yamashita S., Kaisho T., Akira S., Murakami M., Hirano T., *Nat. Immunol.*, **7**, 971–977 (2006).