

プロスタノイドによる誘導型一酸化窒素合成酵素の発現調節

山田 武宏

Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase by Prostanoids

Takehiro YAMADA

Department of Hospital Pharmacy & Pharmacology, Asahikawa Medical College,
2-1-1-1 Midorigaoka-higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan

(Received June 18, 2009)

Circulatory failure in septic shock is due to vascular hyporesponsiveness, in which a massive amounts of nitric oxide (NO) derived from inducible NO synthase (iNOS) plays a major role. In response to various inflammatory stimuli, prostanoids are also derived from inducible isoform of cyclooxygenase-2 (COX-2). Several reports on the cross talk between NO and prostanoids have been published; vasodilator prostanoids such as prostacyclin (PGI₂) and prostaglandin E₂ enhance iNOS expression in cultured cells. However, the details of the cross talk between prostanoids and the iNOS-NO system remains unknown. We examined inflammatory cytokine-induced iNOS expression and NO production in cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs) and cytokine-induced hyporesponsiveness of the aorta from mice lacking the thromboxane A₂ (TXA₂) receptor (TP^{-/-} mice). The cytokine-induced iNOS expression and NO production were significantly augmented in TP^{-/-} VSMCs. Furthermore, U-46619, a TP agonist, inhibited the cytokine-induced iNOS expression and NO production. The cytokine-induced hyporesponsiveness of aortas to vasoconstrictor was significantly augmented in TP^{-/-} aorta. Finally, U-46619 significantly suppressed lipopolysaccharide-induced NO production *in vivo* in wild-type mice, however, this effect was not observed in TP^{-/-} mice. These results suggest that TXA₂ has a protective role against the development of the vascular hyporesponsiveness *via* its inhibitory action on iNOS-NO system under pathological conditions such as sepsis. Thus, it seems that the cross-talk between PG and NO works to maintain the vascular homeostasis in the systemic inflammatory reactions such as sepsis.

Key words—thromboxane; prostaglandin; inducible nitric oxide synthase; sepsis

1. はじめに

敗血症などの全身性炎症状態においては、著明な血圧低下が認められるが、この原因の1つとして、血管平滑筋細胞での誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現誘導によりもたらされる多量の一酸化窒素(NO)産生が挙げられる。¹⁾ NOは通常、血管拡張因子として血管張力の恒常性維持に関与しているが、この際のNO供給源は恒常的に血管内皮細胞に発現している内皮型NOS(eNOS)である。一方で、iNOSから産生される多量のNOは、カテコラミン等の昇圧物質に対する血管収縮反応性の低

下を引き起こし、循環不全(septic shock)に至る原因となる。²⁻⁴⁾ 炎症性刺激により同様に産生増大するものとして、プロスタグランジン(PG)とトロンボキサン(TX)からなるプロスタノイドがある。主要なプロスタノイドとしてPGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXA₂が知られている。これらの産生酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)には2種類のアイソフォームがあり、恒常的に発現しているCOX-1と、種々の炎症性サイトカインにより多量に発現誘導されるCOX-2が知られている。^{5,6)} 最近、NOとプロスタノイドが、互いの産生を調節、いわゆる「クロストーク」という報告がみうけられるようになってきた。

2. プロスタノイドによるiNOS発現調節とその機構

プロスタノイドによるNO産生調節については、これまでにいくつか報告されている⁷⁻¹¹⁾が、

旭川医科大学病院薬剤部 (〒078-8510 旭川市緑が丘東2-1-1-1)

現住所: 北海道大学病院薬剤部 (〒060-8648 札幌市北区北14条西5丁目)

e-mail: yamadat@huhp.hokudai.ac.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

PGI₂ や PGE₂ のような「血管弛緩性プロスタノイド」は、血管平滑筋細胞において、iNOS の発現を正に調節することが知られている。⁷⁾ これらの受容体である IP, EP₂, EP₄ は、Gs タンパク質と共役しており、アゴニスト刺激により細胞内 cAMP の上昇、続いてプロテインキナーゼ A (PKA) 活性化が惹起される。1993 年、小出らはラット血管平滑筋細胞において、IP アゴニストや、PKA 活性化作用を有するフォルスコリン刺激に伴う細胞内 cAMP 上昇が、炎症性サイトカインによる iNOS 発現誘導を亢進させることを報告した。¹⁰⁾ その後、cAMP による iNOS 発現調節に関する報告が相次いだ。細胞種によって発現調節の結果が異なるものとなっている。これは種々のアゴニストに対する受容体発現や、iNOS 発現調節に関わる転写因子の発現などの違いも起因していると考えられる。⁷⁾ 細胞内 cAMP 上昇により、マクロファージでは iNOS 発現が亢進あるいは抑制され、肝細胞や脳グリア細胞では抑制され、脂肪細胞や血管平滑筋細胞などでは亢進を示すことが認められている。したがって、PGE₂ や PGI₂ は、炎症時に iNOS 発現を更に亢進させ、敗血症時のショック等の病態悪化に関与する可能性も考えられるが、COX 阻害薬投与によるショックの改善は事実上困難であり、他の種々の炎症メディエーターも関与した複雑な機構が存在すると思われる。

一方で、強力な血管収縮作用や血小板活性化作用、血管平滑筋細胞増殖作用^{12,13)}などを示す TXA₂ については、iNOS 発現への影響についてはよく知られていなかった。TXA₂ と同様に血管収縮作用を有する生体内物質として知られているエンドセリン、アンジオテンシン-II が、血管平滑筋細胞においてサイトカイン誘発性の iNOS 発現を負に調節することが報告されている。^{14,15)} エンドセリン受容体 (ET_A 受容体) やアンジオテンシン-II 受容体 (AT1 受容体) は、アゴニスト刺激により、Gq タンパク質を介した細胞内カルシウム濃度上昇、プロテインキナーゼ C 活性化がもたらされるが、TXA₂ の受容体である TP も同様の反応を有する。¹⁶⁾ すなわち、これらの昇圧物質は共通した細胞内シグナル伝達機構を有している。敗血症に合併する播種性血管内凝固 (DIC) 発症時などでは、生体内での TXA₂ 産生亢進が惹起されることが知られており、TXA₂

による iNOS 発現への影響を理解することは、全身性炎症状態において問題となる iNOS 発現制御の機構を解明する上で重要であると考えられた。

3. 血管平滑筋細胞における iNOS 発現に及ぼす TXA₂ の影響

循環器系におけるプロスタノイドの役割として、炎症性頻脈への TXA₂ や PGF_{2α} の関与、¹⁷⁾ 心筋虚血-再灌流障害モデルでの EP₄ を介した PGE₂ の心臓保護作用¹⁸⁾などが、受容体欠損マウスを用いた研究により明らかとされてきた。また、プロスタノイドによる iNOS 発現調節に関して、これまで報告されてきたものは培養細胞での検討のみであり、生体レベルでの検討はほとんど行われていなかった。そこで、全身性炎症時の iNOS の発現調節を介した血管緊張における TXA₂ の役割解明を目指し、受容体である TP を欠損したマウスを用いた検討を行った。¹⁹⁾ 全身性炎症状態における血管収縮反応の低下には、血管平滑筋細胞における iNOS 発現誘導により過剰に産生される NO が原因の 1 つと言われている。⁴⁾ 野生型マウス大動脈から血管平滑筋細胞を調製し、炎症性サイトカインで刺激すると、iNOS タンパク質の発現誘導が経時的に認められた [Fig. 1(A)]。ついで、野生型マウス及び TP 欠損マウス由来血管平滑筋細胞間での比較を行った結果、TP 欠損マウスの血管平滑筋細胞では、サイトカイン刺激に伴う iNOS 発現量及び NO 産生量が野生型に比し有意に増加していた [Figs. 1(B) and (C)]。すなわち、内因性に産生される TXA₂ が iNOS 発現を抑制していることが示唆された。また、野生型マウス由来血管平滑筋細胞に、TP アゴニストである U-46619 を添加すると、サイトカイン誘発 iNOS 発現誘導と NO 産生が濃度依存的に抑制された [Fig. 1(D)]。したがって、TXA₂ がサイトカインによる iNOS 発現誘導を抑制することにより、全身性炎症時の血管反応性調節に関与する可能性が示唆された。



山田武宏

旭川医科大学病院薬剤部 薬剤師。東北薬科大学薬学部卒業、北海道大学大学院薬学研究科修士課程、旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程修了。2004 年より現職。研究・専門領域はプロスタノイドの循環器系における役割に関する薬理学的研究、健康食品の肝機能への影響に関する研究など。

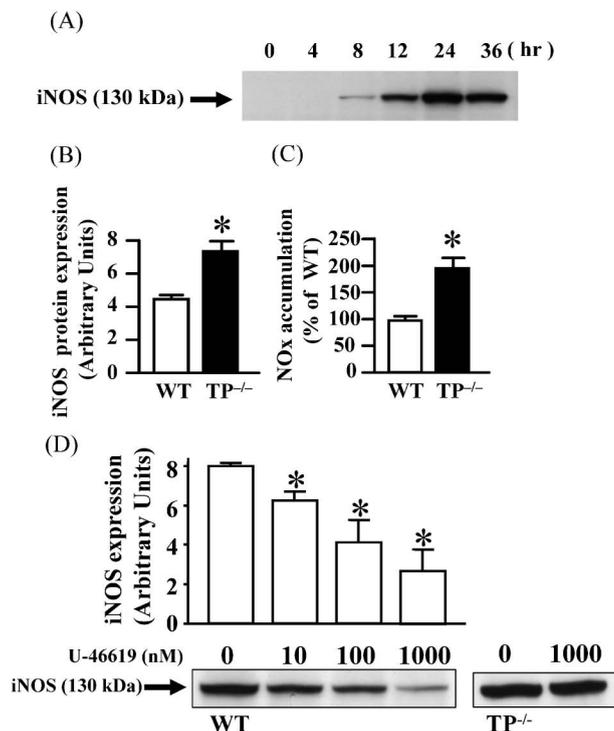


Fig. 1. Expression of iNOS Protein and NO Production in VSMCs

(A) Time course of cytokine-induced expression of iNOS protein in VSMCs from wild-type mice. VSMCs were stimulated for indicated periods with cytokine mixture: IL-1 β (20 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml), and IFN- γ (10 ng/ml). (B) Expression level of iNOS protein and (C) NO production after 24 hours of treatment with cytokines in VSMCs from wild-type (WT) and TP^{-/-} mice. * p <0.05 vs. VSMCs from WT mice. (D) Inhibitory effects of U-46619 on cytokine-induced expression of iNOS protein in VSMCs. VSMCs were incubated with vehicle or U-46619 in the presence of cytokines and indomethacin for 24 h. * p <0.05 vs. VSMCs treated with cytokines alone.

4. 摘出血管（胸部大動脈）の収縮反応及び LPS 投与による敗血症モデル動物での NO 産生に対する TXA₂ の影響

ついで、野生型マウスより大動脈を摘出し、炎症性サイトカイン存在下でインキュベート後の NO 産生量を定量するとともに、血管収縮物質であるフェニレフリンに対する血管収縮反応を解析した。その結果、TP 欠損マウス大動脈では、NO 産生量が有意に増加し [Fig. 2(A)], これは内因性 TXA₂ が iNOS 発現に対し抑制的に作用した結果と考えられた。同時に、サイトカイン処理した摘出大動脈の収縮反応低下は、TP 欠損マウス大動脈ではより顕著となっていた。これら大動脈の反応性低下は iNOS 阻害薬（アミノグアニジン）添加により、完全に回復した [Fig. 2(B)]. LPS 投与による全身性炎症モデルを用いた解析では、血漿 NO 濃度は LPS 投与によって著明に上昇し、U-46619 はこの NO 濃度の

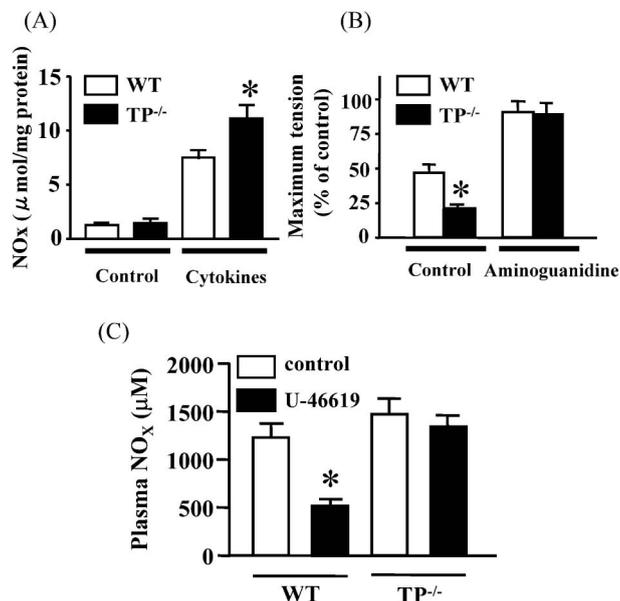


Fig. 2. Roles of Endogenous TXA₂ in Cytokine-induced NO Production and Hyporesponsiveness of Aorta *ex Vivo*, and Effect of TXA₂ in a Septic Model *in Vivo*

(A) Increased production of NO in cytokine-stimulated aorta from TP^{-/-} mice. Aortas were treated with vehicle or cytokines for 24 h. * p <0.05 vs. cytokine-treated aorta from WT mice. (B) Effects of aminoguanidine on cytokine-induced decrease in maximum tension of phenylephrine-contracted aortas. Values are percentage of maximum tension obtained in respective cytokine-untreated aorta. * p <0.05 vs. respective aorta from WT mice. (C) Inhibitory effect of U-46619 on LPS-induced NO production in a septic model *in vivo*. Plasma levels of NO_x were determined 20 h after injection of LPS alone or LPS plus U-46619. * p <0.05 vs. mice group treated with LPS alone.

上昇を著明に抑制した [Fig. 2(C)].

5. おわりに

プロスタノイドは炎症時に NO 同様多量に産生されるが、これまでの種々の報告から、Gs タンパク質と共役した受容体に作用する PGI₂, PGE₂ などの血管弛緩性プロスタノイドは、iNOS 発現を増強し、血管拡張作用が更に増強する方向に作用する一方で、血管収縮性プロスタノイドである TXA₂ は、iNOS 発現を負に調節することが今回明らかとなった。したがって、TXA₂ は、血管に対する直接作用に加え、iNOS 発現抑制という間接的作用によって血管緊張の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました旭川医科大学大学院医学系研究科薬理学講座牛首文隆教授、旭川医科大学病院薬剤部松原和夫教授、京都大学大学院医学系研究科神経薬理学講座成宮周教授に深謝いたします。また、本研究は

旭川医科大学大学院医学系研究科薬理学講座において行われたものであり、実験にご協力いただいた先生方、並びに関係者の皆様に心より感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Macmicking J. D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D. S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q.-W., Sokol K., Hutchinson N., Chen H., Mudgett J. S., *Cell*, **81**, 641–650 (1995).
- 2) Petros A., Lamb G., Leone A., Moncada S., Bennett D., Vallance P., *Cardiovasc. Res.*, **28**, 34–39 (1994).
- 3) Wei X.-Q., Charlies I. G., Smith A., Ure J., Feng G.-J., Huang F.-P., Xu D., Muller W., Moncada S., Liew F. Y., *Nature*, **375**, 408–411 (1995).
- 4) Titheradge M. A., *Biochim Biophys Acta*, **1411**, 437–455 (1999).
- 5) Okusawa S., Gelfand J. A., Ikejima T., Conolly R. J., Dinarello C. A., *J. Clin. Invest.*, **81**, 1162–1172 (1988).
- 6) O'Banion M. K., Winn V. D., Young D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4888–4892 (1992).
- 7) Galea E., Fenstein D. L., *FASEB J.*, **13**, 2125–2137 (1999).
- 8) Salvemini D., Misko T. P., Masferrer J. L., Seibert K., Currie M. G., Needleman P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7240–7244 (1993).
- 9) Swierkosz T. A., Mitchell J. A., Warner T. D., Botting R. M., Vane J. R., *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1335–1342 (1995).
- 10) Koide M., Kawahara Y., Nakayama I., Tsuda T., Yokoyama M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 24959–24966 (1993).
- 11) Pang L., Hoult J. R. S., *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 493–500 (1997).
- 12) Hanasaki K., Nakano T., Arita H., *Biochem Pharmacol.*, **40**, 2535–2542 (1990).
- 13) Fujino T., Yuhki K., Yamada T., Hara A., Takahata O., Okada Y., Xiao C.-Y., Ma H., Karibe H., Taniguchi T., Narumiya S., Ushikubi F., *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 530–539 (2002).
- 14) Nakayama I., Kawahara Y., Tsuda T., Okuda M., Yokoyama M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 11628–11633 (1994).
- 15) Ikeda U., Yamamoto K., Maeda Y., Shimpo M., Kanbe T., Shimada K., *Hypertension*, **29**, 65–69 (1997).
- 16) Sellers M. M., Stallone J. N., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, 1978–1986 (2008).
- 17) Takayama K., Yuhki K., Ono K., Fujino T., Hara A., Yamada T., Kuriyama S., Karibe H., Okada Y., Takahata O., Taniguchi T., Iijima T., Iwasaki H., Narumiya S., Ushikubi F., *Nat. Med.*, **11**, 562–566 (2005).
- 18) Xiao C. Y., Yuhki K., Hara A., Fujino T., Kuriyama S., Yamada T., Takayama K., Takahata O., Karibe H., Taniguchi T., Narumiya S., Ushikubi F., *Circulation*, **109**, 2462–2468 (2004).
- 19) Yamada T., Fujino T., Yuhki K., Hara A., Karibe H., Takahata O., Okada Y., Xiao C.-Y., Takayama K., Kuriyama S., Taniguchi T., Shiokoshi T., Ohsaki Y., Kikuchi K., Narumiya S., Ushikubi F., *Circulation*, **108**, 2381–2386 (2003).