

原

著

Tumor necrosis factor- α によるモルモット 心室筋遅延整流性カリウム電流の抑制

新潟大学医学部第一内科学教室 (主任: 相澤義房教授)

畑 田 勝 治

TNF- α Inhibits Slow Component of Cardiac Delayed Rectifier
K Currents in Guinea Pig Ventricular Myocytes

Katsuharu HATADA

*First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

BACKGROUND: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is an essential mediator of cardiovascular changes observed during the bacterial sepsis, myocardial infarction, and heart failure and it decreases myocardial contractility. However, its electrophysiological property is unknown. We here report that TNF- α inhibits cardiac delayed rectifier potassium current (IK).

METHOD: Ventricular myocytes isolated from guinea pig hearts were voltage-clamped by conventional whole-cell mode (34–36°C). Amplitudes of tail and steady-state (2 s pulse) currents were measured as IK. Intracellular and extracellular K concentrations are 150 mM (pCa = 8) and 5.4 mM, respectively. To minimize L-type Ca currents, nisoldipine (2 μ M) was usually added to extracellular solution.

RESULTS: TNF- α suppressed the IK by $98.4 \pm 1.9\%$ that had been enhanced to ~ 2 -fold by isoproterenol (ISO; 20 nM), although it did not affect the basal IK. The action was dose-dependent with IC_{50} of 11.6 ± 0.69 ng/ml ($n=23$). TNF- α antagonized histamine- and forskolin-enhanced IK ($n=4$), but failed to inhibit that enhanced by internal application of cyclic AMP ($n=4$). Preincubation of myocytes with PTX (5 μ g/ml for >120 min) abolished the inhibitory action of TNF- α on ISO-enhanced IK

Reprint requests to: Katsuharu HATADA,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
Niigata City, 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第一内科教室 畑田勝治

($n=4$). Preincubation of myocytes with N-oleylethanolamine (NOE), ceramidase inhibitor, abolished the inhibitory action of TNF- α on ISO-enhanced IK ($n=4$), and C₂-ceramide inhibited ISO-enhanced IK as well as TNF- α did.

CONCLUSION: TNF- α inhibited IK in a dose-dependent manner by modulating cAMP concentration, and PTX-sensitive G protein and sphingomyelin pathway were concerned with the inhibitory action on ISO-enhanced IK. Under pathological conditions, TNF- α may prolong the action potential duration, thereby leads to intracellular Ca overload.

Key words: TNF- α , delayed rectifier K current, sphingosine-1-phosphate
腫瘍組織壊死因子, 遅延整流カリウム電流, スフィンゴシン 1 リン酸

緒 言

代表的炎症性サイトカインの一つである tumor necrosis factor- α (TNF- α) は、心筋梗塞¹⁾、心筋炎²⁾³⁾、拡張型心筋症²⁾⁴⁾、慢性心不全^{5)–8)}などの病的状態では循環血中に増加し、心血管系の重要な調節因子として作用している。心肥大への関与や心筋収縮力抑制⁹⁾をきたすことも報告されているが、この心筋収縮力抑制の機序としては直接作用⁹⁾や誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現の亢進によるグアニル酸シクラーゼを介した作用¹⁰⁾、また、 β 受容体刺激に対する反応性を低下させることにより細胞内 cyclic AMP (cAMP) 濃度を低下させ収縮力を減弱させる作用¹¹⁾が考えられている。また、冠循環の低下による心機能の低下も一因と考えられている¹²⁾。

一方、TNF- α は心筋イオンチャネルの調節も報告されており、ウサギ¹³⁾、およびラット¹⁴⁾ 心室筋細胞では basal の L 型 Ca 電流を減少させることや、protein kinase A 系 (PKA) を抑制してモルモット心室筋 PKA 依存性 Cl 電流を減少させることが報告され

ている。また、TNF- α は ceramide, sphingosine, sphingosine-1-phosphate といった膜脂質を介した細胞内情報伝達系を制御し¹⁵⁾、実際モルモット心室筋では sphingosine-1-phosphate による、百日咳毒素感受性 G 蛋白 (Gi) の活性化を介したアセチルコリン感受性 K 電流の活性化が報告されている¹⁶⁾。このように TNF- α は心筋収縮や心筋イオンチャネル調節に重要な役割を果たす PKA の活性化への抑制効果を持つと考えられる。しかし、心筋活動電位再分極相を規定し、かつ PKA により調節される遅延整流 K 電流 (IK) への影響は不明である。今回我々は、TNF- α のモルモット心室筋 IK に対する作用を検討したので報告する。

実験材料及び方法

モルモット (体重 250 ~ 350 g) 左心室より既報のごとく¹⁷⁾¹⁸⁾ 酵素処理法により得られた単離心室筋細胞を用い実験をおこなった。すなわち、pentobarbital (50mg/kg: 腹腔内投与) 麻酔下に開胸し、心臓を切り出し、ランゲンドルフ還流装置を用い、大動脈より逆行性還流を 36℃で行った。まず Tyrode 液 (表 1) を 5

表 1 Tyrode 液組成及び KB 液組成

Tyrode 液		KB 液	
(mmol/L)		(mmol/L)	
NaCl	140	L-glutamic acid	70
NaH ₂ PO ₄	0.33	KCl	25
KCl	5.4	taurine	20
MgCl ₂	0.5	KH ₂ PO ₄	10
CaCl ₂	1.8	MgCl ₂	3
HEPES	5	HEPES	10
glucose	5.5	EGTA	0.5
		glucose	11

表 2 バイレット内溶液組成

mmol/L	
L-asparatic acid	110
KCl	20
MgCl ₂	7
K ₂ ATP	5
Na ₂ CrP	5
EGTA	5
HEPES	5

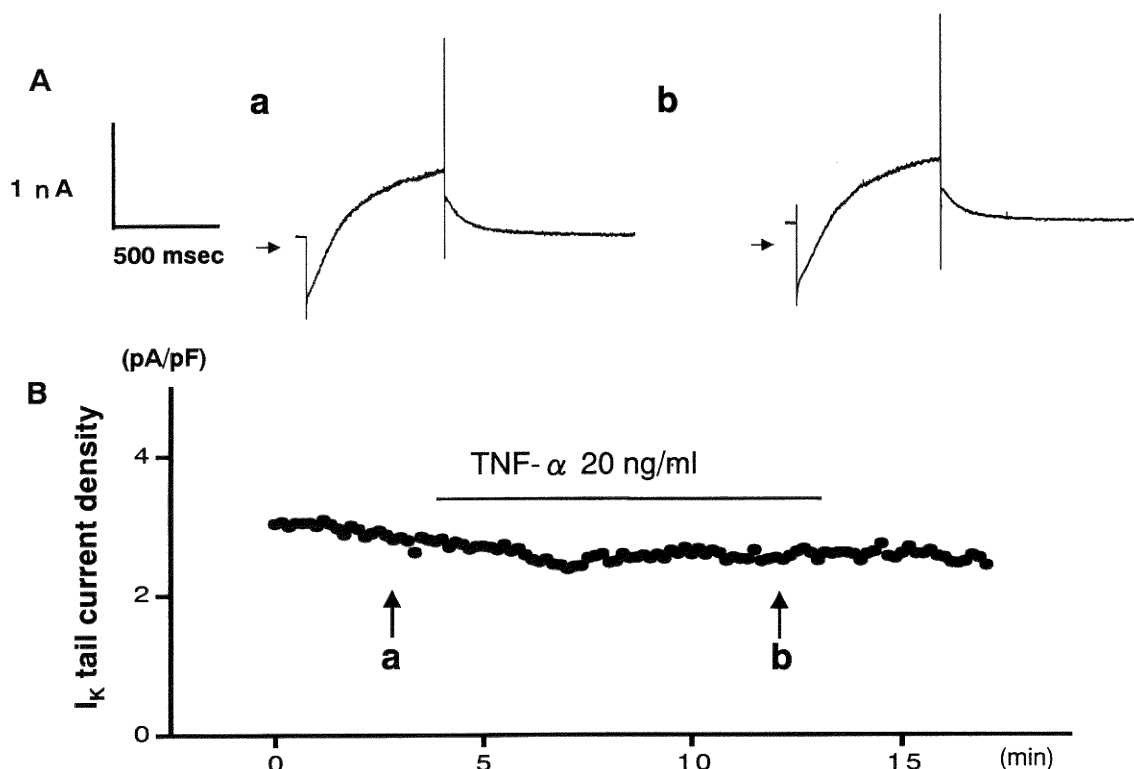


図1 無刺激時 IK に対する $\text{TNF-}\alpha$ の効果

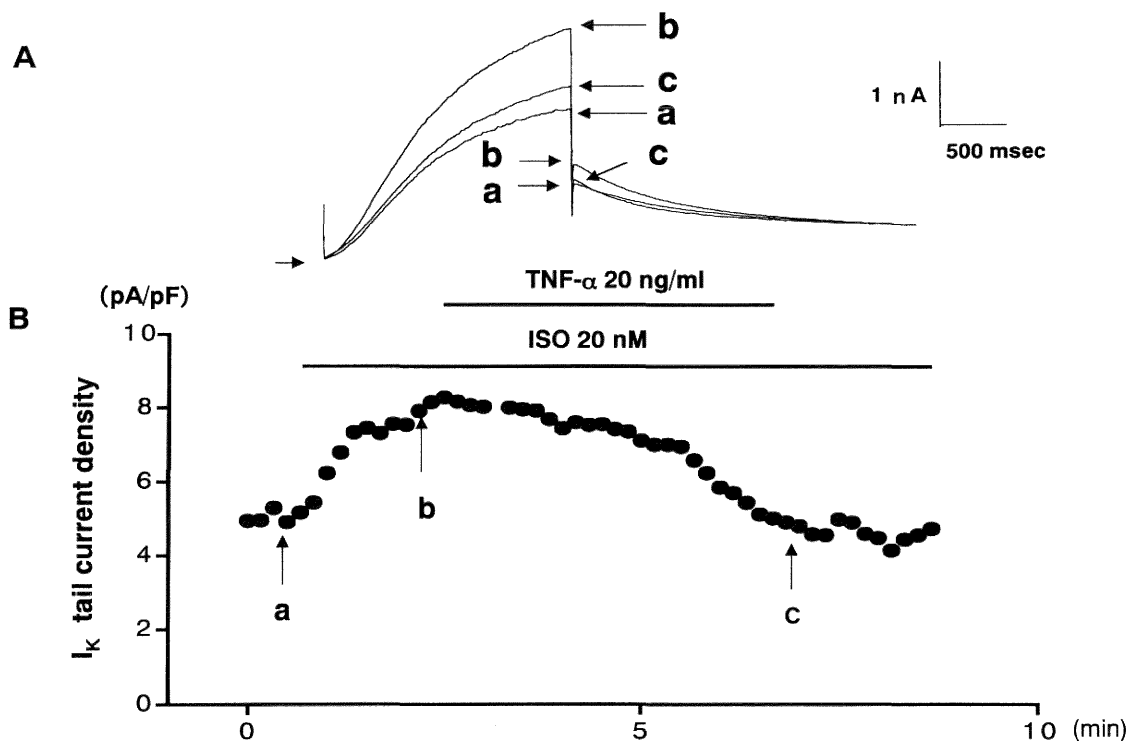
A : $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/ml) 投与前後の全細胞型電流の実記録. a, b は B の各矢印に対応

B : $\text{TNF-}\alpha$ 投与前後の末尾電流密度

$\text{TNF-}\alpha$ 投与前後に有意差はなかった.

分間還流した後に心筋の拍動が停止するまで Ca free Tyrode 液にて還流を行った. さらに 0.4 mg/ml の collagenase (type 1, sigma 社製) 入り Tyrode 液にて 15~20 分還流を行った. その後室温の KB 液¹⁸⁾ (表 1) を還流し, collagenase を除去した後に, KB 液中にて細胞を単離した. パッチクランプ実験で用いたパイペット溶液の組成は表 2 に示すとおりで, $\text{pCa}=8.0$ とした. すべての実験は 36°C で行い, 細胞外液には Tyrode 液を用い $2\mu\text{M}$ の nisoldipine (Bayer 社製) を加え L 型 Ca 電流を抑制した. carbachol (CCh), isoproterenol (ISO), histamine (His), forskolin (Fsk), cyclic AMP (cAMP), $\text{TNF-}\alpha$ (Sigma 社製) はストック液を作成し測定直前に調整した. 百日咳毒素 (Sigma 社製) は KB 液にて溶解し, $5\mu\text{g/ml}$ に調整し, 実験の際には心筋細胞を 36°C にて 120 分以上反応させ用いた.

IK の測定は, 全細胞型パッチクランプ法により行った. 電流測定は先端抵抗 $2-5\text{M}\Omega$ のパイペット (ナリシゲ社製) を用い, パッチクランプ増幅器 (Axopatch 200 B, Axon 社製) を用いて行った. ギガシールを Tyrode 液還流下に作成し, パイペット内に陰圧 ($-20\text{cmH}_2\text{O}$) をかけてパッチ下膜を破壊し whole cell を作成した後に電流測定用の細胞外液に変更し電流測定を行った. IK の測定は通常, 保持電位 -40mV から 2 秒間の脱分極パルス 10ms ごとに種々の膜電位に与え, -40mV まで再分極させた際の末尾電流を測定し, 電流値は細胞容量にて補正した電流密度として表した. データの解析は pCLAMP 6.0 ソフトウェア (Axon 社製) を用いて行った. 数値データは平均 \pm 標準誤差にて示し, 有意差検定は student t-検定により行い, $p < 0.05$ を有意とした.


 図2 Isoproterenol (ISO) にて増強された IK に対する TNF- α の効果

 A: ISO, TNF- α 投与前後の実記録

 B: ISO20nM にて増強した末尾電流密度に対する TNF- α の効果

 IK は ISO20nM にて $179 \pm 34\%$ 増加したが, TNF- α 20ng/ml にて $61.5 \pm 9.3\%$ 抑制された.

結 果

1. 無刺激時及び β 刺激により増強した IK に対する TNF- α の影響

図1は無刺激時及び TNF- α 投与時の IK 電流の実記録と IK 末尾電流の時間経過を示す. IK 電流は保持電位-40mV より2秒間の+40mV までの脱分極パルスを与えた後に-40mV まで再分極させ記録した. IK は TNF- α (20ng/ml) 投与前 (a) 及び後 (b) で変化は認められなかった.

図2は, ISO による β 刺激にて増強された IK に対する TNF- α 投与前後の IK の実記録と末尾電流の実記録例である. 20nmol/l の ISO にて, IK 末尾電流値は $179 \pm 34\%$ に増加した ($n=22$). TNF- α (20 ng/ml) の追加投与により ISO にて増加した IK 末尾電流成分の $62 \pm 10\%$ が減少した ($n=8$). 図に示す

様に多くの実験では TNF- α の washout 効果は認めなかった.

図3Aは-60mV より+60mV までの10mV 毎の脱分極ステップパルスを与えた際の IK の実記録で, 上より無刺激時, ISO20nmol/l 投与時, TNF- α 20ng/ml 追加投与時の記録を示している. その際の IK 末尾電流を縦軸に, 脱分極電圧を横軸にとりプロットした電流電圧関係を図3Bに示す. ISO 投与により IK 末尾電流は増大し, TNF- α 追加投与により抑制が認められるが, IK の活性化の閾電位に変化は認めなかった. 同様の実験を異なる5個の細胞で行い, 各々の脱分極パルスでの末尾電流を+60mV の脱分極パルスを与えた際の末尾電流により除すことにより標準化したものが図3Cである. 曲線は Boltzmann 式に fit した. TNF- α 投与前後で $V_{0.5}$ 及び slope factor (k) に変化は認められなかった.

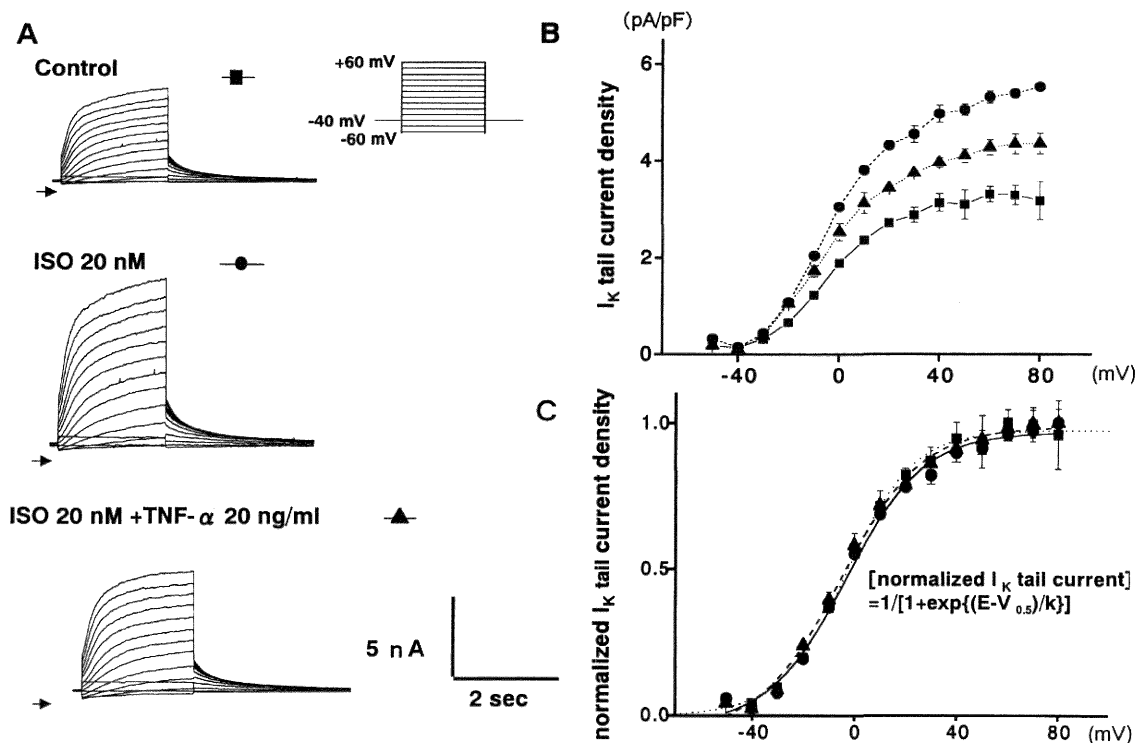


図3 TNF- α のIK抑制効果の電位依存性

A: -60mV より +60mV までの test pulse による電流の実記録

■ control

● ISO20nM

▲ ISO20nM + TNF- α 20ng/ml

B: 各条件下での電流電圧関係

C: 各条件下での標準化電流電圧関係

Boltzmann 式に fit した.

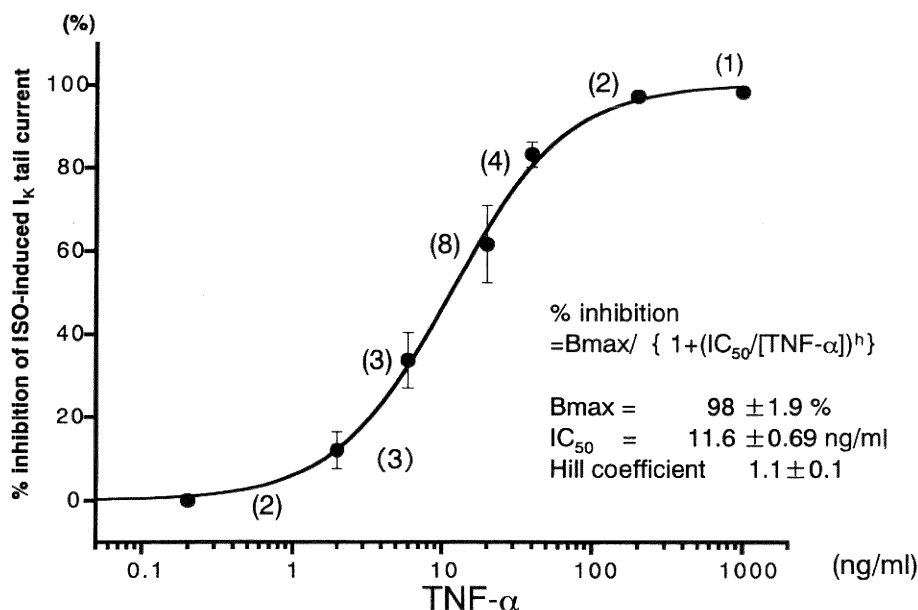
$[\text{normalized IK tail current}] = 1 / [1 + \exp\{(E - V_{0.5})/k\}]$

図3Dは20nmol/lのISOにより増強されたIKに対するTNF- α の抑制の濃度依存性曲線を示す($n=23$). 曲線はHill式にfitし, TNF- α はISO(20nmol/l)にて増加したIKを最大 $98 \pm 2\%$ 抑制し, IC_{50} は 11.6 ± 0.69 ng/mlであり, Hill常数は 1.1 ± 0.1 であった.

2. TNF- α のIK抑制機序の検討

このTNF- α のIK抑制は無刺激時には認められず, β 刺激により増強したIKにのみ認められること, IKの β 刺激による増強は β 受容体-刺激性G蛋白(Gs)/アデニレートシクラーゼ-cAMP系を介し

PKAを活性化することによるものであることから, このTNF- α のIK抑制はPKAの活性化に拮抗する作用によるものと考えられる. そのため上記の細胞内情報伝達系のどの部位にTNF- α が関与しているのかを明らかにするために, 次にIKをISOと同様に増強する種々の薬剤を用いて検討を行った. histamineはモルモット心室筋において H_2 レセプターを介し, Gs/アデニレートシクラーゼを活性化し, cAMPを増加させIKを増強する事が知られているが¹⁹⁾, histamine(250 nmol/L)にて増加したIKの末尾電流($170 \pm 69\%$)はTNF- α (20ng/ml)によりその $37 \pm 13\%$ が抑制された($n=4$)(図5A). forskolinは麦角ア


 図4 TNF- α の抑制効果の濃度依存性

横軸に TNF- α 濃度, 縦軸に ISO にて増加した IK に対する TNF- α の抑制率を示す.

Plot は Hill 式に Fit した.

$$\% \text{inhibition} = B_{\max} / \{ 1 + (IC_{50} / [TNF-\alpha])^h \}$$

ルカロイドの一種であり, アデニレートシクラーゼを直接刺激し, 細胞内 cAMP を増加させることが知られている²⁰⁾. forskolin (500 nmol/l) にて増加した IK の末尾電流 ($175 \pm 4.7 \%$) は TNF- α (20 ng/ml) によりその $58 \pm 13\%$ が抑制された ($n=4$). 次に cAMP により増強した IK に関しても同様の検討を行った. パイペット溶液に直接 cAMP (1 mmol/l) を添加し, 細胞内を cAMP にて還流した. cAMP 添加により, パッチ下膜が破壊されるとほぼ同時に, IK は ISO (20 nmol/l), histamine (250 nmol/l), forskolin (500 nmol/l) とほぼ同等に IK を増強したが, TNF- α (20 ng/ml) は増強された IK を抑制しなかった ($8 \pm 1 \%$, $n=4$) (図5C). これらの結果より, TNF- α はアデニレートシクラーゼを活性化し cAMP が増加するレベルでこの作用に拮抗することが明らかとなった. Gs を介したアデニレートシクラーゼの活性化には百日咳毒素 (PTX) 感受性 G 蛋白 (G_i) が拮抗することが知られている. TNF- α の IK 抑制作用への G_i の関与の有無の検討をするために PTX にて前処理 (5

$\mu\text{g/ml}$, 36°C , 120 min) し, G_i の効果を消失させた細胞を用いて, 同様の実験を行った. 図6に示すように PTX にて前処理を行った細胞では ISO により増強した IK にたいする TNF- α 及びムスカリン受容体を介して G_i を活性化するカルバコールの抑制作用²¹⁾ は消失していた. 以上の結果より TNF- α は G_i を介して, IK を抑制していることが示唆された.

しかし, TNF- α 受容体と G_i との coupling は報告されておらず, また, 構造自体, 膜7回貫通型の G 蛋白共役型受容体とは異なるため, 次に TNF- α と G_i との連関の検討を行った. TNF- α は TNF- α 受容体を介して sphingomyelinase を活性化し, sphingomyelin を分解し, ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate 経路を活性化し apoptosis, 炎症性ホルモンの誘導などの反応を起こす²²⁾ ことが知られているが, モルモット心房筋では sphingosine-1-phosphate による G_i を介した Ach 感受性 K 電流の活性化¹⁶⁾ も報告されており, 本検討での TNF- α により G_i との連関について ceramide-sphingosine

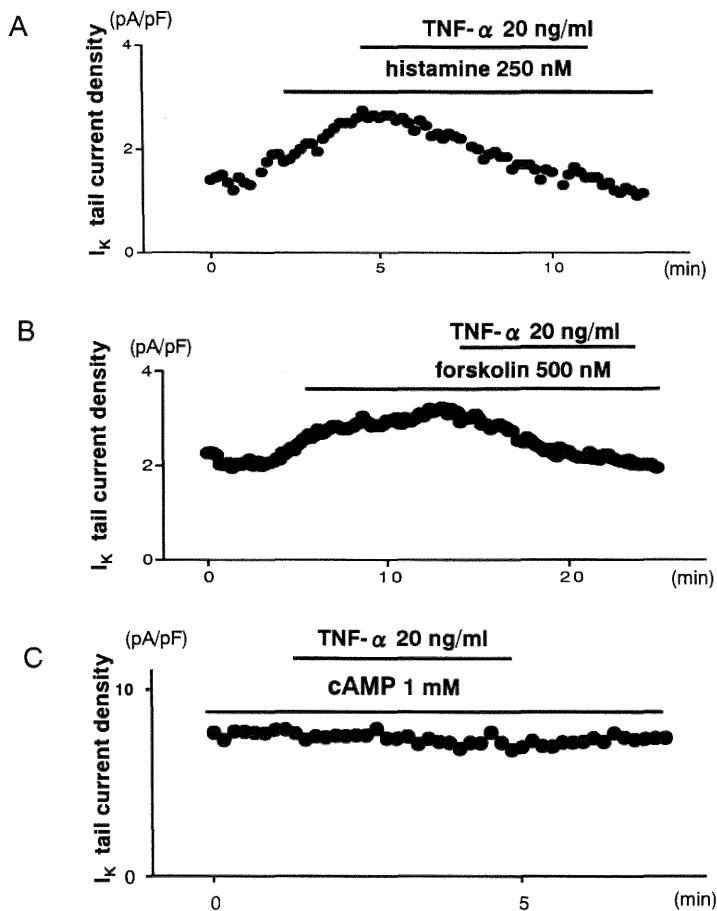


図 5

A : Histamine にて増強された I_K 電流に対する $\text{TNF-}\alpha$ の効果

Histamine 250 nM により $170 \pm 69\%$ 増加し, $\text{TNF-}\alpha$ 20ng/ml にて $37 \pm 13\%$ 抑制された. (n = 4)

B : Forskolin により増強された I_K 電流に対する $\text{TNF-}\alpha$ の効果

Forskolin 500 nM により $175 \pm 4.7\%$ 増加し, $\text{TNF-}\alpha$ 20ng/ml にて $58 \pm 13\%$ 抑制された. (n = 4)

C : cAMP 細胞内投与にて増強された I_K に対する $\text{TNF-}\alpha$ の効果

cAMP 1 mM にて増強した I_K は $\text{TNF-}\alpha$ 20ng/ml にてコントロールと比べ $8 \pm 1\%$ とほとんど抑制しなかった.

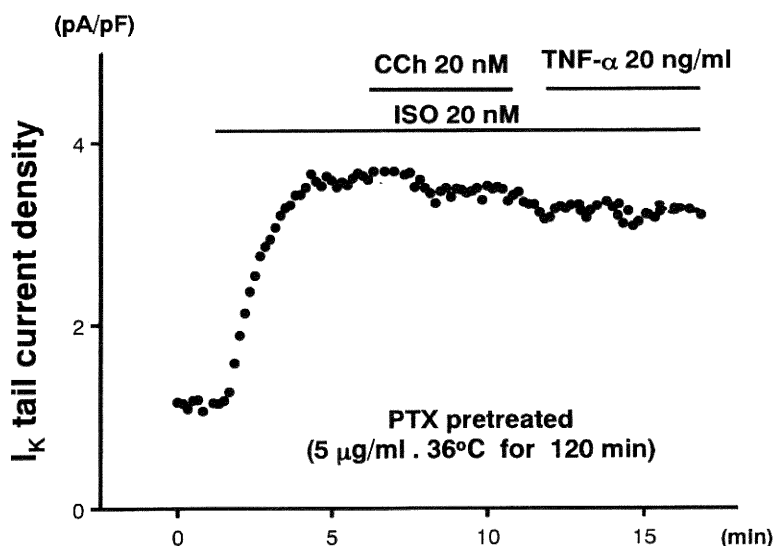


図6 PTX 前処理をされた細胞に対する TNF- α の抑制効果
PTX にて前処理した細胞には Carbachol による IK の抑制は消失しているが同様に TNF- α による ISO 増強 IK 電流の抑制効果も消失した。

系が関与しているかについての検討を行った。

N-oleoylethanolamine (NOE) は ceramidase 阻害薬の一つであり、細胞外より反応させることにより sphingosine, sphingosine-1-phosphate の合成が阻害される。NOE (5 μ mol/l, 36°C, 60min) による前処置を行った後に、同様の実験を行い ceramide-sphingosine 系の関与についての検討を行った。なお、NOE 単独では IK に変化は認めなかった。図 6 A に示すように、ISO にて増加した IK に対し TNF- α (20ng/ml) を作用したところ、IK には有意な変化は認めず、NOE 前処理により TNF- α の抑制効果は消失した (n=4)。また、sphingosine による ISO 依存性 IK に対する効果も細胞膜透過性の sphingosine である N-acetyl-D-sphingosine (C2-ceramide) を用いて行った。C2-ceramide (2 μ mol/l) は、ISO にて増強した IK を TNF- α と同様に抑制した (68 \pm 27%, n=4) (図 6 B)。

以上のことから TNF- α による ISO 依存性 IK の抑制には ceramide-sphingosine 系の関与が明らかとなった。

考 案

今回の検討では、TNF- α によりモルモット心室筋細胞で無刺激時の IK は抑制されなかったが、初めて PKA 誘発性 IK が抑制されることが明らかとなった。この抑制の機序に関しては、無刺激時の IK は TNF- α により抑制されなかったこと (図 1), histamine (250 nmol/l, 図 5 A) や forskolin (500 nmol/l, 図 5 B) によって増強した IK も TNF- α は同様に抑制すること、Gi を抑制する PTX にて処理した場合 (図 6) や細胞内に直接 cAMP を投与した場合 (図 5 C) にこの反応が打ち消されることより、Gi/アデニレートサイクレーズの経路が関与していると考えられた。TNF- α 受容体と Gi 蛋白との連関については、TNF- α により活性化される ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate の系の sphingosine-1-phosphate と Gi との連関がモルモット心筋筋で報告されており¹⁶⁾、ceramide を分解し sphingosine にする酵素である ceramidase を阻害する NOE による前処置にて TNF- α の IK 抑制作用は消失し、以上のことから、この PKA 誘発性 IK の抑制には ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate/

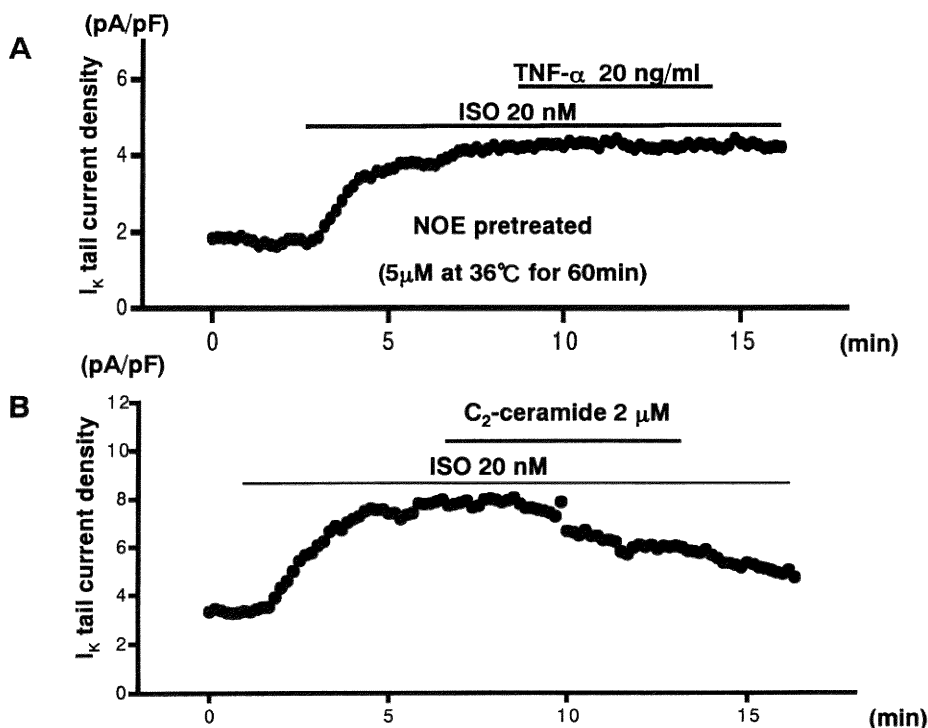


図7 TNF- α の抑制効果への ceramidase 阻害薬及び sphingosine の作用

A : N-oleoylethanolamine の TNF- α の作用に対する効果

ceramidase 阻害薬である, N-oleoylethanolamine (NOE) 前処理 (5 μ M, 60min) にて, ISO にて刺激された I_K ($159 \pm 17\%$) に対して TNF- α の抑制効果は $10 \pm 4\%$ と認められなかった. ($n=4$)

B : N-acetyl-D-sphingosine (C₂-ceramide) の ISO 刺激 I_K に対する効果

ISO により $155 \pm 52\%$ 増加された I_K は C₂-ceramide 2 μ M にてと TNF- α と同様に $68 \pm 27\%$ 抑制された.

Gi/アデニレートサイクレーズの経路が関与していることが明らかとなった.

TNF- α が心筋細胞の調節に果たす役割に関しては, 現在までさまざまな経過が報告されている. ラット心室筋細胞やハムスターの単離乳頭筋標本では TNF- α によりカテコラミンに対する反応性の低下や収縮力抑制が報告されており²⁵⁾²⁶⁾, その反応は NO の合成阻害薬である L-NMMA により TNF- α の抑制が完全に阻止されるので NO の産生, したがって, グアニル酸シクラーゼの活性化により惹起されるものと考えられた²⁵⁾. また, 細胞内 Ca ホメオスタシスの変化に直接起因する反応や細胞内の Gi/アデニレートシクラーゼを介した反応が報告されている. 前者は成熟ネコ心筋細

胞標本で, 収縮中に生じる細胞内 Ca トランジェントが細胞をあらかじめ TNF- α にて処置しておくとき著明に減少する. この反応は L-NMMA では阻止されないことより, 細胞内 Ca ホメオスタシスの変化が原因と考えられている²⁵⁾²⁶⁾. 後者ではラットの培養心筋細胞で Gi 蛋白を介した cAMP の減少による収縮力低下も報告されている²⁸⁾. 本検討でも TNF- α の抑制作用が PTX 前処置により阻害されることより Gi を介した PKA 系の抑制による反応であり同様の現象をみている可能性がある. また, データは示していないが, NO 合成酵素阻害薬である L-NMMA 前投与にてもこの反応は阻害されなかったことより NO を介する反応ではないと考えられた.

一方, TNF- α と Gi との連関については ceramide-sphingosine 系の関与が報告されている. TNF- α が sphingomyelinase を活性化し, 膜蛋白リン脂質である sphingomyelin を細胞内に放出させ, ceramide-sphingosine 系を活性化することにより, 細胞内 sphingolipids が増加し, 種々の作用を示すことが知られている. ラット心室筋細胞では sphingosine による L 型 Ca チャネル電流の抑制及びそれによる小胞体よりの Ca 放出が減少しにより心筋の収縮力の低下をおこすことが報告されている^{15), 27)–30)}. また, モルモット心房筋では sphingosine の分解産物である sphingosine-1-phosphate による Gi の活性化によるアセチルコリン感受性カリウム電流の活性化が報告されている¹⁶⁾. 本研究でも ceramidase 阻害薬である N-oleoylethanolamine 投与により TNF- α の抑制作用が阻害されることより, sphingosine 以降の sphingolipid が IK の抑制に関与していると考えられる. 膜透過性の sphingosine である C₂-ceramide にて同様の IK の抑制が見られていることもこれを支持する所見と考えられる. 過去の報告では sphingosine の Gi との coupling は報告されておらず, モルモット心房筋と同様に, sphingosine-1-phosphate による Gi を介した作用と考えられた.

結 語

心不全時, 心筋梗塞後などの病的環境において TNF- α , カテコラミンはともに上昇することが知られているが, その際に TNF- α は ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate/Gi を介しカテコラミンに拮抗し, 心筋収縮力抑制や IK の抑制による活動電位の延長及びそれによる Ca overload により催不整脈的及び心筋障害的に働くと考えられた.

謝 辞

本稿を終えるにあたり, ご指導を賜りました新潟大学医学部第一内科相澤義房教授, 研究協力をいただきました京都大学医学部循環病態学堀江稔先生, 新潟大学医学部第一内科鷺塚隆先生に深謝いたします.

なお本研究の一部は平成10年度循環器学研究振興財団研究助成金及び文部省平成11年度科学研究費補助金(課題番号 11770021)の助成により行われた.

参 考 文 献

- 1) Gurevitch, J., Frolkis, I., Yuhás, Y., Paz, Y., Matsa, M., Mohr, R. and Yakirevich, V.: Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **28**: 247–252, 1996.
- 2) Matsumori, A., Yamada, T., Suzuki, H., Matoba, Y. and Sasayama, S.: Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br. Heart J.*, **72**: 561–566, 1994.
- 3) Henke, A., Nain, M., Stelzner, A. and Gerns, D.: Induction of cytokine release from human monocytes by coxsackievirus infection. *Eur. Heart J.*, **12** Suppl D: 134–136, 1991.
- 4) Satoh, M., Nakamura, M., Saitoh, H., Satoh, H., Maesawa, C., Segawa, I., Tashiro, A. and Hiramori, K.: Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme and tumor necrosis factor-alpha in human dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **99**: 3260–3265, 1999.
- 5) Kubota, T., Miyagishima, M., Alvarez, R.J., Kormos, R., Rosenblum, W.D., Demetris, A.J., Semigran, M.J., Dec, G.W., Holubkov, R., McTiernan, C.F., Mann, D.L., Feldman, A.M. and McNamara, D.M.: Expression of proinflammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent-onset and end-stage congestive heart failure. *J. Heart Lung Transplant.*, **19**: 819–824, 2000.
- 6) Torre-Amione, G., Kapadia, S., Benedict, C., Oral, H., Young, J.B. and Mann, D.L.: Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J. Am. Coll. Cardiol.*, **27**: 1201–1206, 1996.
- 7) Bachetti, T., Comini, L., Agnoletti, L., Gaia, G., Milanese, B., Curello, S., Corti, A., Ferrari, R. and Visioli, O.: Activation and role of the tumor necrosis factor-alpha in congestive heart failure. *Cardiologia*, **41**: 343–347, 1996.
- 8) Zhao, S.P. and Xu, T.D.: Elevated tumor necrosis factor alpha of blood mononuclear cells in patients with congestive heart failure. *Int. J. Cardiol.*, **71**:

- 257~261, 1999.
- 9) **De Meules J.E.:** Tumor necrosis factor and cardiac function. *J Trauma.*, **32**: 686~692, 1992.
 - 10) **Satoh M.:** Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in myocardium in human dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **29**: 716~724, 1997.
 - 11) **Gulick, T., Chung, M.K., Pieper, S.J., Lange, L.G. and Schreiner, G.F.:** Interleukin-1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 6753~6757, 1989.
 - 12) **Edmunds N.J., and Woodward B.:** Effects of tumor necrosis factor- α on the coronary circulation of the rat isolated perfused heart: a potential role for thromboxane A₂ and sphingosine. *Br. J. Pharmacol.*, **124**: 493~498, 1998.
 - 13) **Goldhaber, J.I., Kim, K.H., Natterson, P.D., Lawrence, T., Yang, P. and Weiss, J.N.:** Effects of TNF- α on $[Ca^{2+}]_i$ and contractility in adult rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, **271**: H1449~1455, 1996.
 - 14) **Krown, K.A., Yasui, K., Brooker, M.J., Dubin, A.E., Nguyen, C., Harris, G.L., McDonough, P.M., Glembotski, C.C., Palade, P.T. and Sabbadini, R.A.:** TNF α receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF α inhibition of L-type Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients. *FEBS Lett.*, **376**: 24~30, 1995.
 - 15) **Oral, H., Dorn, G.W., 2. n. d. and Mann, D.L.:** Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.*, **272**: 4836~4842, 1997.
 - 16) **Bunemann, M., Brandts, B., zu Heringdorf, D.M., van Koppen, C.J., Jakobs, K.H. and Pott, L.:** Activation of muscarinic K^+ current in guinea-pig atrial myocytes by sphingosine-1-phosphate. *J. Physiol. (Lond)*, **489**: 701~777, 1995.
 - 17) **Hwang, T.C., Horie, M., Nairn, A.C. and Gadsby, D.C.:** Role of GTP-binding proteins in the regulation of mammalian cardiac chloride conductance. *J. Gen. Physiol.*, **99**: 465~489, 1992.
 - 18) **Isenberg, G. and Klockner, U.:** Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflugers. Arch.*, **395**: 6~18, 1982.
 - 19) **Tanaka, H., Furukawa, T., Hayafuji, M. and Habuchi, Y.:** Modulation of the delayed rectifier K^+ current by histamine in guinea pig ventricular myocytes. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, **344**: 582~588, 1991.
 - 20) **Greengard, P., Robinson, G.A. and eds.:** Forskolin: its biological and chemical properties. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research.*, **20**: 150~150, 1986.
 - 21) **Rardon, D.P. and Pappano, A.J.:** Carbachol inhibits electrophysiological effects of cyclic AMP in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, **251**: H601~611, 1986.
 - 22) **Kwiatkowska, J.:** Sphingomyelin pathway in signal transduction. *Postepy Biochem.*, **40**: 130~134, 1994.
 - 23) **Finkel, MS., Oddis, CV., Jacob, TD., Watkins, SC., Hattler, BG. and Simmons, RL.:** Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.*, **257**: 387~389, 1992.
 - 24) **Schulz, R., Panas, D.L., Catena, R., Moncada, S., Olley, P.M. and Lopaschuk, G.D.:** The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . *Br J Pharmacol.*, **114**: 27~34, 1995.
 - 25) **Yokoyama, T., Vaca, L., Rossen, R.D., Durante, W., Hazarika, P. and Mann, D.L.:** Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart. *J. Clin. Invest.*, **92**: 2303~2312, 1993.
 - 26) **Yokoyama, T., Arai, M., Sekiguchi, K., Tanaka, T., Kanda, T., Suzuki, T. and Nagai, R.:** Tumor necrosis factor- α decreases the phosphorylation levels of phospholamban and troponin I in spontaneously beating rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.*, **31**: 261~273, 1999.
 - 27) **McDonough, P.M., Yasui, K., Betto, R., Salvati, G., Glembotski, C.C., Palade, P.T. and Sabbadini, R.A.:** Control of cardiac Ca^{2+} levels. Inhibitory actions of sphingosine on Ca^{2+} transients and L-type Ca^{2+} channel conductance. *Circ. Res.*, **75**: 981~989, 1994.

- 28) **Sharma, C., Smith, T., Li, S., Schroepfer, G.J. Jr. and Needleman, D.H.:** Inhibition of Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) activity by sphingolipid bases: mechanism of action. *Chem. Phys. Lipids.*, **104**: 1 ~ 11, 2000.
- 29) **Yasui, K. and Palade, P.:** Sphingolipid actions on sodium and calcium currents of rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, **270**: C645 ~ 649, 1996.
- 30) **MacDonell, K.L., Severson, D.L. and Giles, W.R.:** Depression of excitability by sphingosine 1-phosphate in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, **275**: H2291 ~ 2299, 1998.

(平成13年 1 月26日受付)
