



Leukemia inhibitory factor(LIF)刺激による心筋細胞肥大に至る細胞内情報伝達路におけるPI3-kinase-Akt/Protein Kinase B Pathwayの関与

平岡, 栄治
川嶋, 成乃亮
横山, 光宏

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(2/3/4):167-175

(Issue Date)

2000-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042542>



Leukemia inhibitory factor(LIF) 刺激による心筋細胞肥大に至る 細胞内情報伝達路における, PI 3-kinase-Akt/ Protein kinase B Pathway の関与

平岡 栄治, 川嶋 成乃亮, 横山 光宏

神戸大学医学部第一内科

〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1

電話: 078-382-5846

FAX: 078-382-5859

(平成11年12月28日受付)

【要 約】

gp130はIL-6関連サイトカインのシグナルトランスデューサーとして働き、心臓を始め、さまざまな組織、細胞種に発現している。培養心筋細胞のgp130をLeukemia Inhibitory factor (LIF) や、cardiotrophin-1で活性化させると、心肥大をおこすことが報告されている。一方、他の細胞系において、LIFはphosphatidylinositol (PI) 3-kinase-Akt/protein kinase B (PKB) pathwayを活性化することが報告されている。しかし、心筋細胞においてLIFによる心肥大反応におけるこの情報伝達の役割は明らかではないため、その解明を行った。ラット培養心筋細胞において、LIFはPI 3-kinase, Akt/PKBを活性化した。さらに、LIFによるAkt/PKBの活性化は、PI 3-kinaseの特異的な抑制剤LY294002による前処置、およびPI 3-kinaseのドミナントネガティブΔp85を発現するアデノウィルス (AxCA Δp85) を心筋細胞に感染させることで、抑制された。すなわちLIFは、PI 3-kinaseの活性化を通じて、Akt/PKBを活性化していることが判明した。次に、LIFは心筋細胞において蛋白合成を約1.8倍増加させた。このLIFによる蛋白合成の促進は、LY294002, AxCA Δp85により完全に抑制された。LIFによるPI 3-kinase-Akt/PKB pathwayの活性化は蛋白合成に必要であり、心筋細胞肥大に関与することが示唆された。

【緒 言】

心肥大は、本来、血行動態などの心への負荷に対する生理的な反応であり、適応過程であるが、肥大の進行とともに心機能の悪化因子となり、心不全の惹起因子となる。疫学的にも、心肥大は、心臓死に対する独立した危険因子であり、心血管死を約2倍に増加させることが明らかになっている⁽¹⁾。それゆえに、心肥大のメカニズムを解明することは、心疾患、特に心不全の治療法を考える上で非常に重要である。

心肥大を生じる刺激としては、血圧などの血行動態、機械的刺激に加え⁽²⁾、カテコラミンや⁽³⁾、エンドセリン⁽⁴⁾、アンジオテンシンⅡ^(5, 6)などの液性因子の関与が大きいことが明らかになっている。そして、最近になり新たな液性因子として、cardiotrophin-1 (CT-1) やleukemia inhibitory factor (LIF) などのサイトカインの存在が注目されてきた^(7, 8, 9)。これらはIL-6関連サイトカインであり、シグナル伝達物質であるgp130を介してその情報を細胞内へ伝達する^(7, 8, 9)。IL-6関連サイトカインとしてはこの他にもIL-6, IL-11, oncostatin Mやciliary neurotrophic factorなどがあげられる。

gp130は血液、免疫系細胞のみならず心筋細胞にも高いレベルで発現している。そして、IL-6とIL-6受容体を共発現させたトランスジェニックマウスは心肥大を呈することが明らかにされ⁽¹⁰⁾、さらにはCT-1や、LIFの刺激がラット培養心筋細胞を肥大させることが報告され^(7, 8, 9)、IL-6関連サイトカインが心筋細胞肥大の誘導因子であることが明らかになった。

Key Words: LIF, 心肥大, PI 3-kinase, Akt/PKB

IL-6 関連サイトカインによる心筋細胞肥大の細胞内情報伝達路としては、gp130を介して、MAPK (mitogen activated protein kinase) およびJAK (Janus kinase)/STAT (signal transducers and activators of transduction) へ至る伝達路の存在が報告されていたが、最近になり、IL-6 関連サイトカイン、とくにLIFが、心筋細胞においてもPhosphatidylinositol (PI) 3-kinaseを活性化することが明らかになった⁽¹¹⁾。PI 3-kinaseはイノシトールリン脂質のD3位をリン酸化する酵素であり、増殖因子やサイトカインが受容体に結合すると、PI 3-kinaseが活性化される。PI 3-kinaseの脂質産物はpleckstrin homology (PH) domainやSrc homology 2 (SH2) domainを通じ、下流因子に結合し活性化する。PI 3-kinaseの細胞内での役割は、いろいろ報告されているが、下流因子の詳細は不明である。最近、PI 3-kinaseの下流因子としてAkt/protein kinase B (PKB) が報告された。Akt/PKBはセリンスレオニンキナーゼで、N末端にPHドメイン、活性化領域がある。PDGF、EGFなどは受容体チロシンキナーゼを介し、Akt/PKBを活性化することが報告されている^(12, 13, 14, 15)。そしてこの反応は、PI 3-kinaseの活性化を介していることが報告されている。PI 3-kinase-Akt/PKB経路は、平滑筋細胞や脂肪細胞において、蛋白合成に関与していることが報告されている^(16, 17)。しかしながら、LIFによる心筋細胞肥大反応におけるPI 3-kinase-Akt/PKB経路の関与は明らかでない。

今回私達は、LIFによる心筋細胞肥大の細胞内情報伝達における、PI 3-kinase-Akt/PKB経路の関与を明らかにする目的にて、ラット培養心筋細胞を用いた検討を行った。そして、LIFがラット培養心筋細胞において、PI 3-kinase-Akt/PKB経路を活性化すること、そして心筋細胞の蛋白合成を促進することを示した。さらに、LIFによる蛋白合成の促進はPI 3-kinase-Akt/PKB経路の活性化を介していることを示した。

【方 法】

材 料

Sprague-DawleyラットはCharles River (Osaka, Japan) から入手した。培養メディアはLife technology (Geithersburg, MD) より入手したDulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) を用いた。リコンビナントLIFは、Pepro Tech (London, England) より入手した。LY294002はCalbiochem (San Diego,

CA) より入手した。Akt/PKBに対するヒツジのポリクローナル抗体はUpstate Biotechnology (Lake Placid, NY) より入手した。Protein G-Sepharose 4 Fast FlowはAmersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) より入手した。

心筋細胞培養

既報の方法にて、新生児ラットの心臓より心筋細胞を培養した^(18, 19, 20)。心筋細胞は、 $6.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の濃度で培養した。

リコンビナントアデノウイルス

PI 3-kinaseのドミナントネガティブ変異体($\Delta p85$)、Akt/PKBのドミナントネガティブ変異体(Akt-AA) および、 β -galactosidaseを発現するアデノウイルスベクターをそれぞれAxCA $\Delta p85$, AXCAAktAA, AxCALaczとする、既報の方法にて準備した^(16, 21, 22)。心筋細胞の培養開始24時間後に、これらのアデノウイルスを表に示した量 (multiplicity of infection (MOI)) を感染させ、感染後48時間で実験に使用した。

PI 3-kinase, Akt/PKBのアッセイ

PI 3-kinaseの脂質リン酸化活性、Akt/PKBのリン酸化活性を、以前報告した方法で測定した^(21, 23)。細胞抽出液を抗フォスフォチロシン抗体、または、抗Akt/PKB抗体で免疫沈降し、PI、または、ヒストンH2Bを基質にしてin vitro kinase assayをした。

蛋白合成アッセイ

蛋白合成の測定を既報の方法で測定した⁽²⁴⁾。心筋細胞を1000U/mlのLIFで24時間刺激し $[^3\text{H}]$ leucine ($0.5 \mu\text{Ci}/\text{mL}$) をかきとる4時間前に加えた。放射線活性は、液体シンチレーションスペクトロメトリで測定した。

【結 果】

LIFによる心筋細胞でのPI 3-kinaseの活性化

LIFのPI 3-kinaseに対する影響を調べるために、培養心筋細胞をLIFで刺激し、フォスファチジルイノシトールを基質にしてPI 3-kinase活性を測定した。図1に示す通り、LIFは刺激後5分以内でPI 3-kinaseを活性化し始めた。LIFは10分でPI 3-kinaseを最高約3倍活性化した。PI 3-kinaseに特異的な阻害剤LY294002を、抗フォスフォチロシン抗体による免疫沈降物質に加えると、ファチジルイノシトール1リン酸のスポットは完全に消失した。これにより、こ

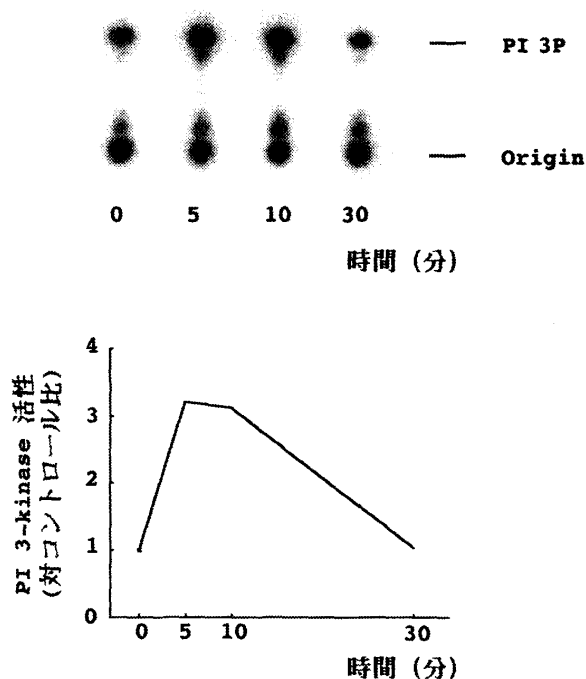


図1 LIFによる心筋細胞でのPI 3-kinaseの活性化
培養心筋細胞を1000U/mlのLIFで図に示した時間刺激した。抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行い、phosphatidylinositol (PI) を基質に in vitroキナーゼアッセイを行った (上図)。リン酸化されたPIを定量化した (下図)。量は2回の独立した実験結果の平均をグラフに示した。

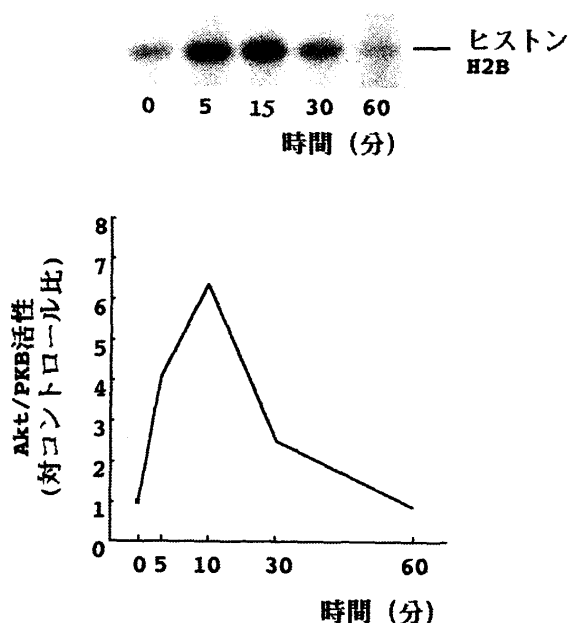


図2 LIFによる心筋細胞でのAkt/PKBの活性化
培養心筋細胞を1000U/mlのLIFで図に示した時間刺激した。抗Akt/PKB抗体で免疫沈降を行い、ヒストンH2Bを基質に in vitroキナーゼアッセイを行った (上図)。リン酸化されたヒストンH2Bを定量化した。下図は2回の独立した実験結果の平均をグラフに示した。

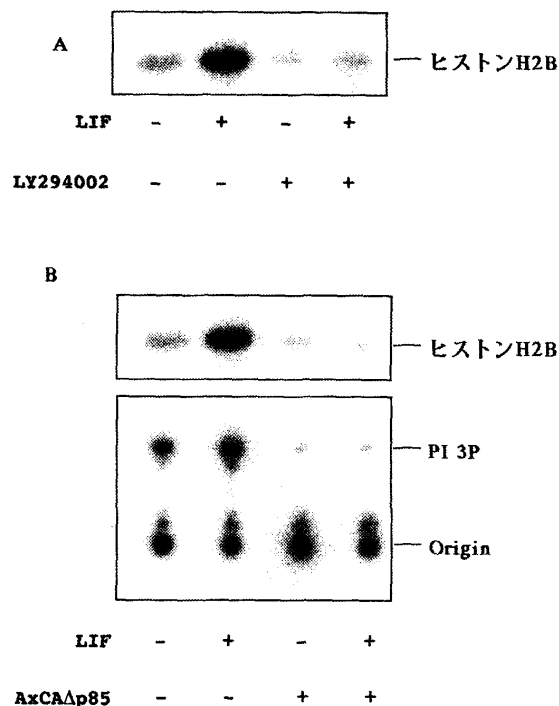


図3 LIFによるPI 3-kinase依存性のAkt/PKBの活性化

A) 培養心筋細胞を50mMのLY294002で10分間前処置した1000U/mlのLIFで15分間刺激した。抗Akt/PKB抗体で免疫沈降を行い、ヒストンH2Bを基質に in vitroキナーゼアッセイを行った。

B) 培養心筋細胞に、PI 3-kinaseのドミナントネガティブ変異体 ($\Delta p85$) を発現するアデノウイルス (AxC $\Delta p85$) を5 MOI感染させ、1000U/mlのLIFで15分間刺激した。抗Akt/PKB抗体で免疫沈降を行い、ヒストンH2Bを基質にAkt/PKBの in vitroキナーゼアッセイを行った (上図)。抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行い、phosphatidylinositol (PI) を基質にPI 3-kinaseの in vitroキナーゼアッセイを行った (下図)。

のアッセイ系における、PI 3-kinaseの特異性が証明された。 $\Delta p85$ はPI 3-kinaseの調節ユニットの変異体で、catalytic subunitに対する結合部位を欠失し、ドミナントネガティブとして広く使われている。AxC $\Delta p85$ を感染させると、完全にLIFによるPI 3-kinaseの活性化が抑制された (図3 B下)。

LIFによる心筋細胞でのAkt/PKBの活性化

次に我々は、PI 3-kinaseの下流分子と報告されているAkt/PKBの活性化に対するLIFの影響を調べた。図2に示すように、LIFは刺激後5分以内でAkt/PKBを活性化し始め、15分で最高約6倍活性化した。PI 3-kinaseに依存しない経路がAkt/PKBを活性化

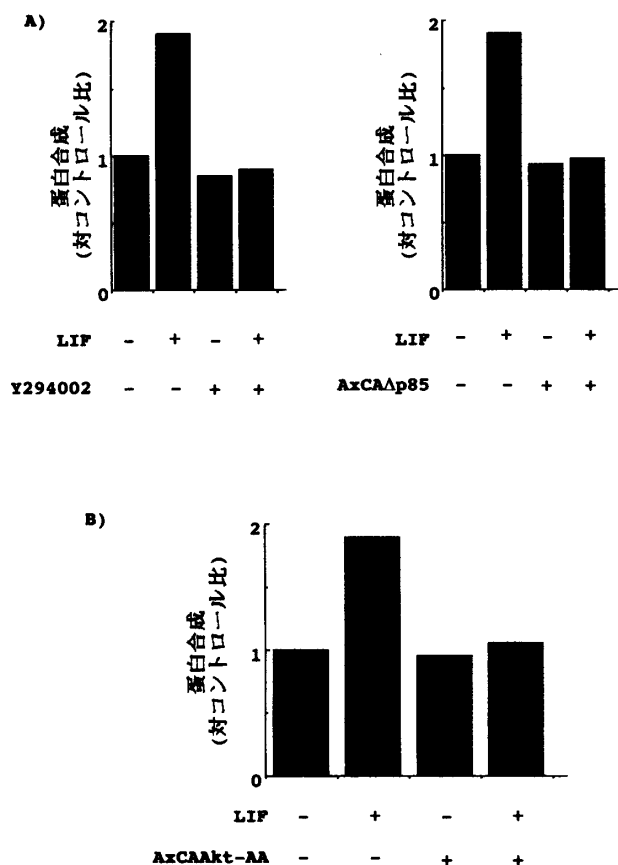


図4 LIFによるPI 3-kinase-Akt/PKB経路を介する蛋白合成の促進

A) 培養心筋細胞を50mMのLY294002で10分間前処置し、1000U/mlのLIFで24時間刺激した(左図)。また、培養心筋細胞にAxCAΔp85を5 MOI感染させ、1000U/mlのLIFで24時間刺激した(右図)。蛋白合成は ^3H leucineの細胞内への取込みを、LIF刺激後24時間で測定した。図は2回の独立した実験結果の平均をグラフに示した。

B) 培養心筋細胞にAxCAAkt-AAを200MOI感染させ、1000U/mlのLIFで24時間刺激した。蛋白合成は、 ^3H leucineの細胞内への取込みを、LIF刺激24時間で測定した。図は2回の独立した実験結果の平均をグラフに示した。

ることが報告されているため、LIFによるAkt/PKBの活性化はPI 3-kinaseを介しているかどうか検討した。培養心筋細胞をLY294002で前処置すると、LIFによるAkt/PKBの活性化が完全に抑制された。さらに、培養心筋細胞にAxCAΔp85を感染させると、LIFによるAkt/PKBの活性化が完全に抑制された(図3B上)。すなわち培養心筋細胞においては、LIFによるAkt/PKBの活性化はPI 3-kinaseを介していることが示された。

LIFによる心筋細胞の蛋白合成におけるPI 3

-kinase-Akt/PKB経路の活性化の必要性

LIFによる蛋白合成にPI 3-kinase-Akt/PKB経路の活性化が必要かどうかを検討した。LIFで培養心筋細胞を刺激すると、蛋白合成が約1.8倍に増加した(図4)。このLIFによる蛋白合成促進はLY294002により完全に抑制された。AxCALacZの感染は、LIFによる蛋白合成促進に影響を与えなかったが、AxCAΔp85の感染は、LIFによる蛋白合成促進を完全に抑制した。これらのデータは、LIFによる蛋白合成促進はPI 3-kinase依存的事であることを示している。次に、LIFによる蛋白合成促進はAkt/PKBを介しているか調べた。LIFによる蛋白合成促進はAxCAAkt-AAの感染により完全に抑制された。これらのデータは、LIFによる蛋白合成促進はAkt/PKB依存的事であることを示す。

【考 察】

今回の検討により、培養心筋細胞において、LIFはPI 3-kinaseを活性化し、それを介し、Akt/PKBを活性化することが明らかになった。さらに、LIFによる蛋白合成の促進に、PI 3-kinase-Akt/PKB経路の活性化が必要であることも判明した。

様々なPI 3-kinase活性を持つ酵素が同定されているが、それらは、4つのクラス、すなわちクラス1a、クラス2、クラス3に分類されている^(25, 26)。中でも、85kDの調節サブユニットと110kDの活性サブユニットのヘテロダイマーであるクラス1aのPI 3-kinaseは最もよく解析されており、増殖因子の情報伝達において、重要な役割をしていることが明らかになっている⁽²⁵⁾。この調節サブユニットは、2つのSH 2ドメインを有し、これらのSH 2ドメインがチロシンリン酸化された蛋白に結合することで、脂質リン酸化活性を有するようになる^(25, 26)。今回の検討にて、心筋細胞において、LIFは抗リン酸化チロシン抗体による免疫沈降物質中のPI 3-kinase活性を増加させた。このことは、LIFにより活性化されるPI 3-kinaseがクラス1aのPI 3-kinaseである可能性、ならびにLIFによるPI 3-kinaseの活性化にはチロシンリン酸化蛋白が必要であることを示唆している。LIFによる、PI 3-kinaseの活性化に必要なチロシンキナーゼと、その標的蛋白はまだ同定されていない。

我々は、培養心筋細胞において、LIFがAkt/PKBを活性化することを示した。PI 3-kinase以外の経路を介しAkt/PKBが活性化されることも報告されているが^(27, 28)、増殖因子によるAkt/PKBの活性化にはPI 3-kinaseの活性化が必要十分であると報告さ

れている。心筋細胞において、LIFによるAkt/PKBの活性化はPI 3-kinase阻害剤LY294002で抑制された。今のところ、LY294002は、我々の使った濃度では、PI 3-kinase特異的阻害剤であるが、PI 3-kinase以外の分子を抑制する可能性も否定できない。また、LY294002に対しては、クラス2のPI 3-kinaseは比較的抵抗性であるが、本薬剤はクラス1a以外のPI 3-kinaseをも抑制することが報告されている⁽²⁶⁾。そこで、我々は、分子学的手法、PI 3-kinaseのドミナントネガティブ変異体である $\Delta p85$ を発現するアデノウイルスを用いさらなる検討を行った。 $\Delta p85$ はPI 3-kinaseの活性サブユニットp110に結合サイトを欠いたPI 3-kinaseの調節サブユニットp85の変異体であり、PI-kinaseのドミナントネガティブとして広く使われている^(16, 21, 28, 29, 30)。そして $\Delta p85$ は、LIFによる培養心筋細胞のAkt/PKBの活性化を抑制した。以上より、LIFはクラス1aのPI 3-kinaseを介し、Akt/PKBを活性化することが示唆された。

LIFの受容体が心筋細胞に存在し、LIF刺激が心筋細胞肥大をもたらすことはすでに広く認められている。その細胞内情報伝達路としては、JAK/STAT系の関与が報告されており、培養心筋細胞においてLIF刺激により、早期にJAK 1, 2, そしてSTAT 3のチロシンリン酸化が生じること、さらにSTAT 3のドミナントネガティブ変異体にて、LIFによる心筋細胞の蛋白合成が抑制されることが明らかになっている。さらに、アンジオテンシンやエンドセリンなどのG蛋白質結合型受容体刺激による心肥大に深く連関するMAPKの活性化も、LIF刺激において必要であることが示されている⁽³¹⁾。

心筋細胞肥大に伴い、心筋細胞には蛋白合成の増加、アクチンフィラメントのサルコメアへの再構成、心房ナトリウム利尿ペプチド (ANP) などの胎児蛋白の遺伝子発現などの種々の変化が出現する。なかでも種々の蛋白合成の増加は心筋細胞肥大に必須である。今回の検討にてもLIFにより、心筋細胞の蛋白合成が増加した。最近、CHO細胞において、PI 3-kinase-Akt/PKB経路は、インスリンによる蛋白合成に必要であると報告された⁽¹⁶⁾。そこで我々は、心筋細胞において、LIFによる蛋白合成促進には、PI 3-kinase-Akt/PKB経路が必要かどうか調べた。LIFによる蛋白合成促進は、LY294002, $\Delta p85$ により完全に抑制された。すなわちLIFによる蛋白合成促進には、PI 3-kinaseが必要であることが示された。次に、今回、PI 3-kinaseの下流のターゲットと同一したAkt/PKBの関与を調べた。現在のところAkt/PKBの抑制剤が報告されていないので、Akt/PKBのドミナ

ントネガティブ変異体を用いた。Akt-AAは、リン酸化部位をアラニンに代えたものでドミナントネガティブとして広く用いられている^(16, 22, 32, 33)。AxCAAktAAは、LIFによる蛋白合成促進を完全に抑制した。以上により、培養心筋細胞において、LIFによる蛋白合成促進には、PI 3-kinase-Akt/PKB経路が必要であることが示された。一方、LIF刺激による心筋細胞肥大に伴い、アクチンフィラメントのサルコメアへの再構成、ANPなどの胎児蛋白の遺伝子発現も認められることが報告されているが、それらの変化におけるPI 3-kinase-Akt/PKB経路の関与に関しては、現在検討中である。

私達はすでにIL-6関連サイトカインのみならず、心不全の病態への関与が強く示唆されているTNF α が、心筋細胞の蛋白合成を促進し、その細胞内情報伝達路にもPI 3-kinase-Akt/PKB経路が関与することを見出している⁽³⁴⁾。PI 3-kinase-Akt/PKB経路は心筋細胞肥大シグナルにおいて重要な役割を果たしていることが推定される。今後、PI 3-kinase-Akt/PKB経路と、すでに報告されているJAK/STATを介する経路、MAPKを介する経路との関連、さらにはPI 3-kinase-Akt/PKB経路の上流因子、下流因子を同定することにより、心筋/心筋細胞肥大の機序の解明がさらに進むと考えられる。

【謝 辞】

AxCA $\Delta p85$ ならびにAxCAAktAAを供与して頂いた神戸大学医学部第二内科の小川渉先生、実験手法に関し助言を頂いた同第二内科北村忠弘先生、ならびに同第一内科高橋知三朗先生に感謝いたします。

【注】

1. Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B., Castelli, W.B.: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 322 : 1561-1566, 1990.
2. Yamazaki, T., Tobe, K., Hoh, E., Maemura, K., Kaida, T., Komuro, I., Tamemoto, H., Kadowaki, T., Nagai, R., Yazaki, Y.: Mechanical loading activated mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 268 : 12069-12076, 1993.

3. Simpson, P.: Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an α -adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ. Res.* 56 : 884-894, 1985.
4. Bogoyevitch, M.A., Glennon, P.E., Andersson, M.B., Clerk, A., Lazou, A., Marshall, C.J., Parker, P.J., Sudden, P.H.: Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 269 : 1110-1119, 1994.
5. Sadoshima, J., Izumo, S.: Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 77 : 1040-1052, 1995.
6. Baker, K.M., Booz, G.W., Dostal, D.E.: Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.* 54 : 227-241, 1992.
7. Matsui, F., Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K.: Leukemia inhibitory factor induces a hypertrophic response mediated by gp130 in murine cardiac myocytes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 93 : 149-162, 1996.
8. Pennica, D., King, K.L., Shaw, K.J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S.M., Darbonne, W.C., Knutzon, D.S., Yen, R., Chien, K.R.: Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 : 1142-1146, 1995.
9. Wollert, K.C., Taga, T., Saito, M., Narazaki, M., Kishimoto, T., Glembofski, C.C., Vernallis, A.B., Heath, J.K., Pennica, D., Wood, W.L., Chien, K.R.: Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcometric units in series via gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 271 : 9535-45, 1996.
10. Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T., Taga, T.: Continuous activation of gp130, a signal transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 : 4862-4866, 1995.
11. Oh, H., Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Matsui, H., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K.: Activation of phosphoinositidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 273 : 9703-9710, 1998.
12. Coffey, P.J., Jin, J., Woodgett, J.R.: Protein kinase B(Akt): a multifunctional mediator of phosphoinositidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* 335 : 1-13, 1998.
13. Downward, J.: Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 : 262-267, 1998.
14. Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C.: PI 3 K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88 : 435-437, 1997.
15. Hemmings, B.A.: Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* 275 : 628-630, 1997.
16. Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, S., Takata, M., Matsumoto, M., Maeda, T., Konishi, H., Kikkawa, U., Kasuga, M.: Requirement for activation of serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol. Cell Biol.* 18 : 3708-3717, 1998.
17. Ueki, K., Yamamoto, H., Kaburagi, Y., Yamauchi, T., Tobe, K., Burgering, B.M., Coffey, P.J., Komuro, I., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T.: Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 273 : 5315-5322,

- 1998.
18. Ueyama, Sakoda, T., Kawashima, S., Hiraoka, E., Hirata, K., Akita, H., Yokoyama: Activated RhoA stimulates c-fos gene expression in myocardial cells. *Circ. Res.* 81 : 672-678, 1997.
19. Miki, N., Hamamori, Y., Hirata, K., Suematsu, M., Kawashima, S., Akita, H., Yokoyama, M., Transforming growth factor-beta 1 potentiated alpha 1-adrenergic and stretch-induced c-fos mRNA expression in rat myocardial cells. *Circ Res.* 75 : 8-14, 1994.
20. Ueyama, T., Kawashima, S., Sakoda, T., Hirata, K., Ohashi, Y., Yamochi, W., Akita, H., Yokoyama, M., Transforming growth factor-beta and protein kinase C synergistically activate the c-fos serum response element in myocardial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30 : 551-562, 1998.
21. Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T.R., Hawkins, P.T., Dhand, R.R., Clark, A.E., Holman, G.D., Waterfield, M.D., Kasuga, M.: 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 7415-7419, 1994.
22. Takata, M., Ogawa, W., Kitamura, T., Hino, Y., Kuroda, S., Kotani, K., Klip, A., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Kasuga, M.: Requirement for Akt (protein kinase B) in insulin-induced activation of glycogen synthase and phosphorylation of 4E-BP1 (PHAS-1). *J. Biol. Chem.* 274 : 20611-2061, 1999.
23. Takahashi, T., Taniguchi, T., Konishi, H., Kikkawa, U., Ishikawa, Y., Yokoyama, M.: Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 276 : H1927-H1934, 1999.
24. Takahashi, T., Kawahara, Y., Okuda, M., Ueno, H., Takeshita, A., Yokoyama M.: Angiotensin II stimulates mitogen-activated protein kinase and protein synthesis by a Ras-independent pathway in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272 : 16018-16022, 1997.
25. Shepherd, P.R., Withers D.J., Siddle, K.: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling. *Biochem. J.* 333 : 471-490, 1998.
26. Domin, J., Waterfield, M.D.: Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 410 : 91-95, 1997.
27. Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Ono, Y., Tokunaga, C., Kuroda, S., Kikkawa, U.: Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 : 7639-7643, 1996.
28. Sable, C.L., Fillipa, N., Hemmings, B., Van-Obberghen, E.: cAMP stimulates protein kinase B in a wortmannin-insensitive manner. *FEBS Lett.* 409 : 253-257, 1997.
29. Kotani, K., Yonezawa, K., Hara, K., Ueda, H., Kitamura, Y., Sakaue, H., Ando, A., Chavanieu, A., Calas, B., Grigorescu, F., Nithiyama, M., Waterfield, M.D., Kasuga, M.: Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J.* 23 : 13-21, 1994.
30. Toker, A., Cantley, L.C.: Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387 : 673-676, 1997.
31. Kunisada, K., Tone, E., Fujio, Y., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Kishimoto, T.: Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiomyocytes. *Circulation* 98 : 346-352, 1998.
32. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399 : 601-605, 1999.
33. Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C.: Regulation of endothelium-derived nitric

oxide production by protein kinase Akt.
Nature 399 : 597-601, 1999.

34. Hiraoka, E., Kawashima, S., Takahashi, T., Rikitake, Y., Kitamura, T., Ogawa, W., Yokoyama, M.: Tumor necrosis factor- α induces protein synthesis through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/Protein kinase B pathway activation in cultured cardiac myocytes. submitted to Circ. Res.

Involvement of PI 3-kinase-Akt/Protein kinase B in the signal pathway of leukemia inhibitory factor (LIF)-induced myocardial hypertrophy

Eiji Hiraoka, Seinosuke Kawashima, Mitsuhiro Yokoyama

First Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine 7-5-2,
Kusunoki-cho, Chuo-ku Kobe 650-0017

Abstract

gp130, a signal transducer of the IL-6-related cytokines, is expressed in the heart. Recent studies revealed that activation of gp130 by stimulation of cardiotrophin-1 and leukemia inhibitory (LIF) in cardiomyocytes induces hypertrophy. It has been demonstrated that LIF activates phosphatidylinositol (PI)3-kinase and Akt/protein kinase (B) pathway in several cell types. However, the role of PI3-kinase-Akt/PKB pathway in signal transduction of cardiac hypertrophy is yet not studied. In this study, we examined the activations of PI3-kinase and Akt/PKB by LIF and their roles in protein synthesis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Treatment of cardiomyocytes with LIF resulted in rapid activations of PI3-kinase and Akt/PKB. Akt/PKB activation by LIF was inhibited by a PI3-kinase specific inhibitor LY294002 and adenovirus-mediated expression of a dominant negative mutant of PI3-kinase (AxCa Δ p85), indicating that LIF activates Akt/PKB through PI3-kinase activation. Further, LIF-induced protein synthesis was inhibited by pretreatment with LY294002, AxCa Δ p85 and expression of a dominant negative mutant of Akt/PKB, AxCAAkt. These results indicate that activation of PI3-kinase-Akt/PKB pathway plays an important role in LIF-induced protein synthesis of cardiomyocytes and, thereby, cardiac hypertrophy.