



## Effect of erythromycin on ATP-induced intracellular calcium response in A549 Cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 趙, 冬梅 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1162">http://hdl.handle.net/10271/1162</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 309号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏名	趙 冬 梅		
論文題目	Effect of erythromycin on ATP – induced intracellular calcium response in A549 Cells (A549細胞における ATP 誘起性 Ca <sup>2+</sup> 応答に対するエリスロマイシンの影響)		

博士(医学) 趙 冬 梅

論文題目

Effect of erythromycin on ATP-induced intracellular calcium response in A549 Cells

(A549細胞におけるATP誘起性Ca<sup>2+</sup>応答に対するエリスロマイシンの影響)

論文の内容の要旨

[はじめに]

14員環マクロライド系抗生剤のエリスロマイシン(EM)はびまん性汎気管支炎や多くの慢性感染症に有効であるが、その作用機構は明かにされていない。EMが気道における粘液糖蛋白やCl<sup>-</sup>、水分の分泌を減少させることが*in vitro*の系で観察されており、一方細胞内Ca<sup>2+</sup>はこれらの分泌に関与する細胞内調節因子である。本研究ではヒト類気道上皮細胞であるA549細胞を用いて、EMがCa<sup>2+</sup>動態に与える影響とその作用部位を検討し、シグナル伝達の角度からEMの作用機構解明を試みた。

[材料ならびに方法]

1. 細胞の培養、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の測定 —— 10%胎児牛血清添加のDMEMを用いてA549細胞を培養し、Fura 2 / AMを負荷した後、刺激物質による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変動をARGUS50 / CAを用いて観測した。
2. イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)の生成 —— EMやU73122で前処置したA549細胞にATPやUTPを添加し、0-60秒後に過塩素酸除蛋白液中のIP<sub>3</sub>を免疫定量法にて測定した。
3. P2受容体サブタイプの同定 —— A549細胞からPoly(A)<sup>+</sup>RNAを抽出し、cDNAを合成した。P2XとP2Y各サブタイプの高度保存領域のアミノ酸配列に基づきP2XとP2Yにそれぞれ共通したプライマーを設計し、PCRを行った。増幅したPCR断片をTAクローニングベクターに組み入れ、陽性コロニーを選別し、プラスミドDNAに挿入されたP2受容体断片の塩基配列を解析した。

[結果]

1. ATP誘起性[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>応答に対するEMの抑制効果 —— 1.2mM Ca<sup>2+</sup>を含む培地において、100 μM ATPは[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>スパイクとそれに続くプラトーの二相性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>応答を誘起した。30分前処置でEMは濃度依存的に[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>スパイクを抑制した。EMの阻害効果は部分的で(約40%)、且つ細胞外液Ca<sup>2+</sup>(Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>)に依存することから、EMは細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入を遮断すると推定した。
2. ATP誘起性IP<sub>3</sub>生成に対するEMの効果 —— A549細胞にはP2U受容体の発現が報告されている。本実験でもATP、UTPは濃度依存的にほぼ同程度のIP<sub>3</sub>蓄積(5秒刺激で最大蓄積)を誘起した。このATP(UTP)-誘起性IP<sub>3</sub>蓄積はG蛋白によるホスホリパーゼCの活性化を阻害するU73122によりほぼ完全に抑制されたが、EMによっては全く影響を受けなかった。
3. L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル(VDCC)に対するEMの効果 —— A549細胞は非興奮細胞であるにもかかわらずKClによる脱分極とL型VDCCの特異的なアゴニストであるBAY K8644に対する[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>応答を示した。この応答はL型VDCCの特異的阻害剤であるベラパミルによって完全に抑制されたが、EMによっては影響を受けなかった。
4. P2X経由のCa<sup>2+</sup>流入に対するEMの効果 —— P2XはATP作動性イオンチャンネル型のP2受容体

であり、 $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を示す。P2Xの選択的なアゴニストであるBzATPにより誘起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答は $\text{Ca}^{2+}_o$ 依存的で、EMによる前処置で完全に阻害された。BzATP誘起性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答は細胞外液 $\text{Na}^+$ に依存しないことやVDCCの阻害剤によって遮断されないことからP2X経由の $\text{Ca}^{2+}$ 流入自身が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答を誘起したと考えられる。以上の結果により、EMはP2X経由の $\text{Ca}^{2+}$ 流入を選択的に遮断すると結論した。

5. 容量性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入に対するEMの効果——細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアの枯渇による容量性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入は非興奮性細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答のプラトー相として観察される。EMはATP誘起性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ スパイクを阻害したが、同時にプラトーの低下も観察された。しかし、タブシガーギン前投与と細胞外液 $\text{Ca}^{2+}$ 再添加により誘起された容量性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入は、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの非特異的阻害剤である $\text{Ni}^{2+}$ によっては完全に遮断されたが、EMによっては影響を受けなかった。

6. A549細胞におけるP2受容体の発現——A549細胞にはP2XとP2Yが共発現していることがRT-PCRにより明らかになった。増幅されたPCRフラグメントのDNA塩基配列解析によりP2XはP2X4サブタイプのみであるが、P2Yに関しては三つのサブタイプ(P2Y2、P2Y4、P2Y6)が発現していることが分かった。

#### [考察ならびに結論]

本研究の結果、A549細胞はP2X(P2X4)、P2Y(P2Y2、P2Y4、P2Y6)、 $\text{IP}_3$ 受容体、L型VDCC、容量性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルなど多くの $\text{Ca}^{2+}$ 関連受容体、チャンネルを備えており、EMはP2Xを介する $\text{Ca}^{2+}$ の流入を選択的に阻害することが明らかになった。呼吸器系におけるP2Xの生理機能が $\text{Cl}^-$ 分泌と関連しているという報告を考え合わせると、EMのP2X経由 $\text{Ca}^{2+}$ 流入に対する阻害作用は慢性気道炎症時の気道過剰分泌等に有効なこの抗生剤の作用機構の一つと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

マクロライド系抗生剤のエリスロマイシン(EM)はDNAの転写酵素の阻害により抗菌作用を現すとされている。他の抗生剤に比してびまん性気管支炎や慢性感染症の治療に広く使われている割には、その薬理効果は完全には理解されていない。そこで申請者は、ヒト気道上皮細胞に類似するA549細胞を用い、その細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 反応に対するEMの効果を調べ、その作用点を解明することを目指した。

A549細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成し、P2XとP2Y型受容体のアミノ酸シーケンスの保存領域のプライマーをつくり、PCRにかけてからベクターに入れて細胞に注入し、クローン化させてDNAのシーケンスを解析した。この結果、A549細胞にはP2XとP2Yの両方の受容体が発現していることがわかった。

細胞外に $\text{Ca}^{2+}$ がある条件で、両方の受容体をATPで刺激して、Fura 2/AMを用いて測定した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 反応は、スパイクとプラトーの二相性を示した。EMで細胞を前処理すると、その濃度に依存して $\text{Ca}^{2+}$ 反応のスパイクが部分的に抑制された。この抑制された分は細胞外の $[\text{Ca}^{2+}]_o$ にも依存し、細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入を反映すると考えられた。

P2X受容体だけをBzATPで選択的に刺激したときの $\text{Ca}^{2+}$ 反応はEMで完全に抑制された。BzATPによる $\text{Ca}^{2+}$ 反応は、細胞外 $[\text{Na}^+]$ に依存せず、電圧依存性Caチャンネル阻害剤によっては抑えられないので、P2X受容体がCaチャンネルとして活性化されることによって生ずるものであると結論された。

P2Y受容体をUTPで刺激した細胞を過塩素酸に漬け、溶出した液中に含まれる $\text{IP}_3$ を免疫的手法により

