

現マウスは、筋線維の変性、るいそう、寿命の短縮、骨密度の低下、酸化ストレスの増強を示した。これらの病態は、過剰な defensin に長期間暴露することによる、慢性的な生体反応をみているといえる。

一方、多くの細胞実験や動物実験において、老化と癌化は、相反し、老化の促進に働く分子が、癌に対しては防御的に働くことが予想される。

さらに、我々が、培養細胞に hBD-3 を投与すると、極めて短時間に細胞膜破壊を主因とする細胞死が惹起された。また、今回、5・20 µg/ml の低濃度でも、腫瘍細胞に対する細胞傷害性が確認された。本ペプチドが、2 µg/ml の濃度では、大腸菌に対する抗菌活性が確認されなかったことを考慮すると、hBD-3 の細胞傷害性は、上記の炎症性疾患における重要性に加えて、何らかの生理的意義を有している可能性も示唆される。今回、マウス個体においても、hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 が、腫瘍の増殖を抑制したことは、抗腫瘍効果としての新しい意義の根拠となる。また、呼吸器疾患において、肺癌は、極めて重要な位置を占め、さらなる治療の進歩が期待される領域である。hBD-3 の抗腫瘍効果の研究の発展は、新たな創薬につながる可能性も含む、重要な知見であると考えられる。

一方、気管支喘息は世界で年間およそ 3 億人が罹患する common disease であり、遺伝的素因よりはむしろ環境因子の方が疾患の発症因子として重要であると考えられる。吸入ステロイド剤の開発・普及により、年々気管支喘息による死亡率は低下の傾向にあるものの、今日でもおよそ

3000 人が気管支喘息により死亡している。喘息死に至った患者の気道は、気道上皮剥離と気道内過分泌、気管支平滑筋の増生・肥厚といったリモデリングの所見を呈している。リモデリングを来たした気道は気管支拡張剤に対する反応性が減弱するため、気管支喘息が重症化・難治化する原因として極めて重要である。実際、重症気管支喘息患者では線維芽細胞数、コラーゲン III 沈着量、粘膜下腺および平滑筋の占有面積、平滑筋の肥大が有意に認められるという報告がなされている。したがって、このリモデリングを抑制しうる有効な治療が開発できれば、喘息の難治化・重症化を防ぎ、喘息による死亡率を低下させることに役立つと考えられる。リモデリングを防ぐ方策として、副腎皮質ステロイドホルモンによる早期治療介入が提唱されているが、その長期成績は今のところ示されていない。画期的な新薬開発による治療的手段の発展が急務である。

今回の研究結果は ADM の減少が気道過敏性の亢進に関与することを、遺伝子改変マウスを用いて証明した初めての報告である。

さらに、そのメカニズムについて検討した結果、好酸球性気道炎症の関与、免疫グロブリン、サイトカインといった炎症性メディエーターの関与、杯細胞の過形成、気道粘液過分泌の関与等を支持する所見は認められなかった。

一方、注目すべきことに、気道平滑筋層の面積は mutant 群で有意に増加しており、気道平滑筋細胞の増殖や肥大に ADM が関与している可能性が示唆された。

喘息気道に生じる気道の損傷が修復される過程で、もし修復ミスが起こると、上皮の損傷や細胞外マトリックスの増生、血管新生や平滑筋細胞の増殖といった現象が生じることがわかっている。この過程・結果を気道リモデリングと呼ぶが、リモデリングした気道はきわめて壁が肥厚し、気管支拡張剤に対する反応が生じにくくなり、気管支喘息が重症化、難治化する原因となる。したがって、ADMの不足が気管支平滑筋細胞の増殖を促し、気道リモデリングを促すことは、極めて画期的な知見と考える。ADMが気管支平滑筋細胞の増殖を抑えるという報告は *in vitro* においても *in vivo* においてもこれまでになされていないが、血管平滑筋細胞の増殖が ADM により抑制されることを考慮すると気管支平滑筋においても同様の機序で ADM が気管支平滑筋細胞の増殖を抑制するものと推定される。

今回の知見より、ADMを投与することによって気道修復の際に生じる平滑筋細胞の増殖を抑え、リモデリングを生じにくくする可能性があり、今後 ADM が気管支喘息の気道リモデリングを防ぐ薬剤として臨床応用できる可能性が示唆された。また、今日使用可能な気管支拡張剤、すなわち β_2 受容体刺激薬やキサントリン製剤がいずれも心負荷を増大させる薬剤であることを考えると、ADMのような降圧ペプチドは心負荷を増大させないユニークな気管支拡張剤として利用することができるであろう。

E. 結論

Defensin の中でも、hBD-3 は、細胞傷

害性が強く、この作用は、マウス個体での腫瘍増殖の抑制効果として確認された。これらの知見は、defensin の新たな生理的意義を示すとともに、創薬への可能性も示唆している。

また、我々は、アドレノメデュリンの遺伝子改変マウスを用いて、アドレノメデュリンの減少が、気道過敏性の亢進を促進させることを実証した。特記すべきことに、そのメカニズムとして、平滑筋細胞の過形成の関与が示された。気管支喘息に伴う気道のリモデリングの機序の解明と新たな治療戦略につながる、重要な知見であると思われる。

H. 健康危険情報

I. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamamoto H et. al. Adrenomedullin insufficiency increases allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *J Appl Physiol.* 102:2361-2368, 2007.

2. 学会発表

1) 山口泰弘 ら、高濃度 beta-ディフェンシンによる気道上皮由来細胞の細胞死と P2X 受容体の関与、第 48 回日本呼吸器学会学術講演会

2) 山口泰弘 ら、シンポジウム“細胞分子呼吸器学から臨床へ” 抗菌ペプチド defensin の新しい病態生理学的意義

第 48 回日本呼吸器学会学術講演会

3) 花岡陽子 ら、 β -defensin 6 過剰発現マウスの肺機能評価

第 48 回日本呼吸器学会学術講演会

J. 知的財産権の出願・登録状況

筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳動物、及びその製造方法 (申請中)

20 年度分担研究報告書

新規リゾホスファチジン酸受容体p2y₅の同定と機能解析

研究分担者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座 准教授

研究要旨

p2y₅ はリガンドが未同定の G タンパク質共役型受容体受容体（オーファン GPCR）である。アミノ酸配列がリゾホスファチジン酸(LPA)の第 4 受容体 (LPA₄) と最も相同性の高いことから、我々は p2y₅ の LPA 受容体としての可能性を検討した。LPA 無応答性の細胞である RH7777 細胞と B103 細胞に p2y₅ を発現させて解析したところ、LPA は Ca²⁺ 応答やアデニル酸シクラーゼの活性に作用を及ぼさない一方、Rho を介すると考えられる著しい細胞形態変化を引き起こすことが明らかとなった。p2y₅ 発現 B103 細胞に G_s と G₁₃ タンパク質のキメラ融合タンパク質をさらに発現させたところ、LPA 依存的なサイクリック AMP 産生が観察されるようになった。また、p2y₅ を発現する RH7777 細胞の膜画分においては、p2y₅ への [³H]-LPA の特異的結合、LPA による [³⁵S]-GTPγS 結合 (G タンパク質における GDP/GTP 交換反応) の促進も観察された。ヒト臍帯静脈内皮細胞では、内在的に発現する p2y₅ mRNA を RNA 干渉法で発現抑制したところ、LPA によって惹起される細胞形態変化が起きなくなった。我々はさらに p2y₅ のリガンド選択性も検討し、グリセロール骨格の sn-2 位に脂肪鎖を持つ 2-アシル型 LPA が 1-アシル型 LPA に比べて p2y₅ のより強いアゴニストとして機能することを明らかにした。本研究でオーファン GPCR の一つである p2y₅ が LPA の第 6 番目の受容体であることを確認したことになることから、私はこの受容体を LPA₆ と命名することを提案したい。

A. 研究目的

7 回の膜貫通部位を持つ G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は哺乳動物では数百種類存在し、タンパク質の中で最大のスーパーファミリーを形成している。細胞膜上に存在して多彩な細胞内シグナルを惹起する GPCR は、匂いやフェロモン、味、光など外来刺激に反応するものと、脂質やペプチド、

アミン、核酸など生体の代謝産物（天然リガンド）に反応するものに大別される。後者の GPCR はヒトの生理現象や病態に重要な役割を果たしていると考えられている。事実、現在販売されている薬の多くは天然リガンドに反応する GPCR をターゲットとしており、その割合は 30% と 50% とも言われている。

ヒトゲノム解析の結果から100を超えるリガンド不明のGPCR、いわゆるオーファンGPCRの存在が明らかになった。そこで、生理活性脂質を長年研究してきた私は、一部のオーファンGPCRは脂質を認識する可能性が高いのではないかと考えた。オーファンGPCRの脂質リガンドを見つける（脱オーファン化）研究は、脂質が関与する生理機能や疾患を理解することに加え、新規薬剤の開発を介して疾患治療にも役立つ可能性を持っている点で意義深い。我々はこの作業仮説に基づき研究を進め、2003年にオーファンGPCRの一つであるp2y₉/LPA₄をリゾホスファチジン酸(LPA:図2)に対する第4番目の受容体として同定することができた。

LPAは多彩な生理機能（細胞増殖促進、細胞死抑制、細胞遊走促進、神経突起退縮等）を発揮する脂質メディエーターであるが、複数存在するとされる受容体の全貌は当時も今も明らかになっていない。p2y₉/LPA₄と最も高い相同性(56%)を示すオーファンGPCRであるp2y₅（図1参照）については、細胞内シグナル伝達の観察（Ca²⁺応答とアデニル酸シクラーゼの活性変化）やLPA結合実験の結果などからLPAの受容体である可能性は低いと我々は考えていた。しかしながら、その後の検討によりp2y₅が他のLPA受容体に比べて例外的な性質を有するLPA受容体であること、すなわちCa²⁺応答やアデニル酸シクラーゼの活性に作用を及ぼさず、またLPAに対する親和性が

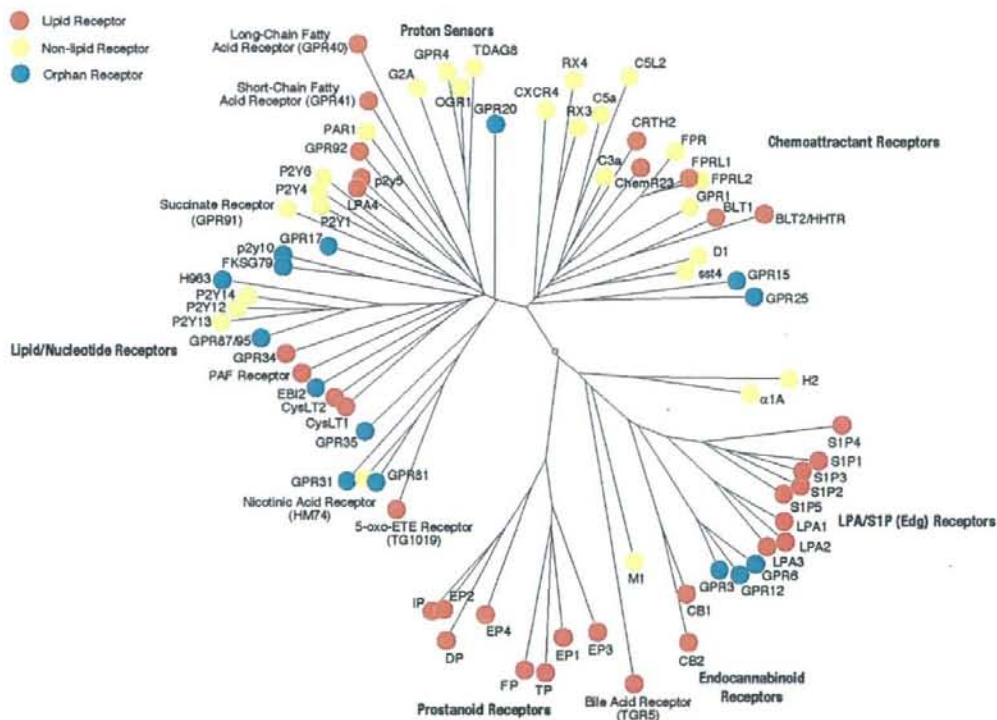


図1 種々のヒト GPCR のアミノ酸配列をもとに構築した系統樹。任意の2つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いは近縁でアミノ酸相同性が高い。リガンドが同じまたは類似の化学構造をもつ GPCR どうし、また機能が類似する GPCR どうしはこの系統樹上で集まる傾向がある。

低い受容体であることを突きとめたのでここに報告する。

B. 研究方法

p2y₅ 安定発現細胞株の樹立

ヒト p2y₅ 遺伝子のオープンリーディングフレーム内にはイントロンが存在しない。そこでヒトゲノム DNA を鋳型とした入れ子 PCR により、p2y₅ をコードする DNA をクローニングした。この際、N 末端に 9 アミノ酸より成る HA エピトプタグを付加した。このクローンを、強力な mRNA 発現を可能にする CAG プロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現用プラスミドベクター (pCXN2.1) に挿入し、ラット神経芽細胞腫由来の B103 細胞とラット肝細胞由来の RH7777 細胞にトランスフェクションした。その後、1 mg/ml の G418 で薬剤選択をかけ、トランスフェクションの 20 日後に G418 耐性細胞群を得た。GPCR は 7 回膜貫通型構造をとっており、その N 末端は空間配置的には細胞膜の外側に位置する。従って、HA エピトプタグが細胞膜表面に多く検出される細胞株は、受容体を高発現していると考えられる。この理論に基づき、この G418 耐性細胞株群について抗 HA 抗体 (3F10; Roche 社) で蛍光染色して蛍光強度の強い細胞を選択的に、ポリクローナルな状態で p2y₅ の安定高発現細胞群を分取した。この分取には、

抗体磁気ビーズを利用した Miltenyi 社の autoMACS システムを用いた。この細胞群はモノクローナルな細胞と比べ、細胞機能に偏りがないと考えられるので、導入した p2y₅ の機能を観察するのに適している。N 末に HA タグを付加したヒト LPA₁ と LPA₃ をコードする DNA は、オープンリーディングフレーム内にイントロンが存在するため、ゲノム DNA ではなく cDNA を鋳型に上記と同様の方法でクローニングした。これらの DNA を pCXN2.1 に組み込み、受容体の安定発現細胞株を樹立した。

LPA 受容体の一過性発現と膜画分調製

コラーゲンでコートした 10 cm ディッシュに RH7777 細胞 (4 × 10⁴ 個) を播種し、リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen 社) を用いて LPA 受容体発現プラスミドをトランスフェクションした。0.1% BSA を含む無血清 DMEM 培地で 24 時間培養した後に PBS で細胞を 2 回洗い、細胞をディッシュから剥がし取った。さらに細胞を結合バッファー (25 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 10 mM MgCl₂, 0.25 M シュークロス) で洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete; Roche 社) を加えた結合バッファーで懸濁してソニケーションによって細胞を破碎した。4℃にお

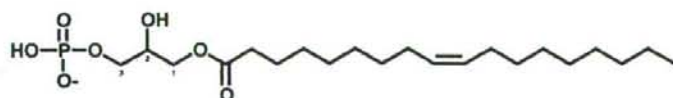


図 2 LPA の化学構造。LPA は 3 価のアルコールであるグリセロールに脂肪酸が sn-1 位または sn-2 位に、そしてリン酸が sn-3 位に結合したリン脂質の総称である。この図では sn-1 位にオレイン酸が結合した 1-オレオイル LPA を示したが、断りのない限り以降の実験ではこの LPA を用いた。

いて $8000 \times g$ で 60 分間の遠心によって得られた上清を、さらに 4°C において $100,000 \times g$ で 60 分間遠心して膜面分沈殿を得た。これを氷冷した結合バッファーでホモゲナイズし、タンパク濃度を決定後に実験に供した。

放射性リガンド結合実験

上記の方法で調製した $20 \mu\text{g}$ の膜面分タンパク質を 1-オレオイル [^3H]-LPA (57 Ci/mmol ; PerkinElmer 社) とともに、 0.25% BSA を含む結合バッファー中で 4°C において 70 分間インキュベートした (計 $200 \mu\text{l}$)。膜に結合した [^3H]-LPA は Unifilter-96-GF/C (PerkinElmer 社) でろ過して吸着させ、非結合状態のものとは分離した。GF/C フィルターはその後、氷冷した結合バッファーで 10 回リンスした。GF/C フィルターを 50°C で 12 時間乾燥させ、 $25 \mu\text{l}$ の MicroScint-0 シンチレーターカクテル (PerkinElmer 社) の存在下で、フィルター上の放射能を TopCount マイクロプレートシンチレーションカウンター (PerkinElmer 社) で測定した。非特異的結合は、 $10 \mu\text{M}$ の非放射ラベル化 1-オレオイル LPA の存在下での値とした。

[^{35}S]-GTP γS 結合実験

上記の方法で調製した $5 \mu\text{g}$ の膜面分タンパク質を、 0.5 nM [^{35}S]-GTP γS と種々の濃度の 1-オレオイル LPA (Avanti 社) とともに GTP γS 結合バッファー (20 mM Tris-HCl [$\text{pH } 7.5$], 100 mM NaCl , 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA , 1 mM DTT , $0.3 \mu\text{M GDP}$,

0.1% BSA) 中で 30°C において 30 分間インキュベートした (計 $100 \mu\text{l}$)。膜に結合した [^{35}S]-GTP γS は Unifilter-96-GF/C (PerkinElmer 社) でろ過して吸着させ、非結合状態のものとは分離した。GF/C フィルターはその後、氷冷した TMN バッファー (10 mM Tris-HCl [$\text{pH } 7.5$], 25 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl) で 10 回リンスした。GF/C フィルター上の放射能は上記と同様の方法で測定した。

G_s/G₁₃ キメラタンパク質発現プラスミドの構築

ヒト G_s タンパク質をコードする cDNA を鋳型にして C 末のアミノ酸 5 残基 (QYELL) を G₁₃ のもの (QLMLQ) へと、PCR による変位導入法により置換した。用いたプライマーは以下の通りである: センスプライマー, $5\text{'-ATTAATACGACTCACTATAGG-3'}$; アンチセンスプライマー, $5\text{'-GGTCTAGATTACTGTAGCATAAGCTGACGAAGGTGCATGCGCTGA-3'}$ 。得られた DNA を KpnI と XbaI で切断し、pcDNA3.1 ベクターに挿入した。そこから G_s/G₁₃ をコードする DNA を含む NheI-XbaI 断片を切り出し、pRL-CMV ベクター (Promega 社) の Renilla ルシフェラーゼをコードする DNA と置き換えた。

cAMP 濃度の測定

コラーゲンでコートした 96 ウェルプレートに細胞 (4×10^4 個) を播種し、 100 ng/ml の百日咳毒素 (PTX) 含有または非含有無血清培地で 12 時間培養した。バッファー A (25 mM

HEPES-NaOH [pH 7.4]と0.1% BSAを含む HBSS) で二回洗い、0.5 mM IBMX を含む 100 μ l のバッファーA で常温において 20 分間処理した。その後、10 μ M フォルスコリンの存在下で細胞を種々の濃度の LPA で常温において 30 分間刺激し、反応を停止するために終濃度 0.625% Tween 20 を加えた。4°C で一晩静置した後、上清に含まれる cAMP 濃度を PerkinElmer 社の AlphaScreen cAMP Functional Assay Kit と Fusion システムで検出した。

LPA によって誘導されるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の形態変化の計測

Roche 社の xCELLigence システムを用いて、LPA によって誘導される HUVEC の細胞形態変化を、"Cell Index" を計測することで定量的に捉えた。Cell Index は E-プレート上に設けられた電極間の抵抗に相当するパラメーターであり、電極間で培養される細胞の接着や形態の変化に応じてこのパラメーターも変化する。

E-プレートと呼ばれる専用の 96 穴プレートをポリ-D-リジンでコートし、HUVEC を 8000 個ずつ播種した。Endothelial cell growth medium (Cell Applications 社) 中で 12 時間の培養の後、培地を 0.1% BSA を含む Endothelial cell basal medium (Cell Applications 社) に交換し、細胞を血清飢餓状態で 4 時間培養した。LPA 刺激後は 15 秒毎に Cell Index を測定し続けた。siRNA を用いた実験では、コラーゲンコートした 12 穴プレートに

HUVEC を播種し、5 nM のヒト p2y₅ siRNA (Silencer Select siRNA: s19796 と s1978) またはコントロール siRNA (Silencer Select negative control 1) をリポフェクトアミン RNAiMAX (Invitrogen 社) でトランスフェクションした。24 時間の培養後、8000 個の細胞をポリ-D-リジンでコートした E-プレートに播種し直し、上記と同様の実験に供した。

定量的 PCR

siRNA をトランスフェクションした実験において、LPA₁、p2y₅、 β -アクトチンの mRNA 発現レベルを、Roche 社の LightCycler システムを用いて定量した。

siRNA をトランスフェクションした細胞から抽出した RNA を鋳型に逆転写した cDNA を 2 μ l に 1 \times FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche 社) と 0.5 μ M のセンス及びアンチセンスプライマーを加え計 20 μ l とした。PCR 反応は以下の通りである: 95°C · 3 分 (1 サイクル) \rightarrow 95°C · 15 秒 / 65°C · 5 秒 / 72°C · 7 秒 (45 サイクル)。LPA₁ 用のプライマー配列は: センスプライマー, 5'-GGCTATGTTCCGCCAGAGGACT AT-3'; アンチセンスプライマー, 5'-TCCAGGAGTCCAGCAGATGAT AA-3'であり、135 bp の DNA 断片が増幅された。p2y₅ 用のプライマー配列は: センスプライマー, 5'-GGTAAGCGTTAACAGCTCCCA CT-3'; アンチセンスプライマー, 5'-TTTGAGGACGCAGATGAAAAT GT-3'であり、139 bp の DNA 断片が

増幅された。 β -アクチン用のプライマー配列は：センスプライマー、5'-CAGGATGCAGAAGGAGATCAC TG-3'; アンチセンスプライマー、5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACA T-3'であり、153 bp の DNA 断片が増幅された。各サンプル中の cDNA レベルは、LightCycler 解析ソフトウェアでの"Fit Point Method"により定量した。

統計解析

図中のすべての値は平均±標準誤差で示した。統計学的な有意さは、t 検定または分散分析で値を比較することによって判定した。 $p < 0.05$ のときを「有意差有り」と判定した。

(倫理面への配慮)

すべて試験管内における研究であり、またヒトのサンプルは研究者本人のもの若しくは試薬として購入したものなので、倫理的問題発生しないと判断し特別な措置は講じていない。

C. 研究結果

LPA による B103-p2y₅ 細胞の神経突起退縮と RH7777-p2y₅ 細胞の膜小疱形成

p2y₅ を安定発現する B103 細胞と RH7777 細胞 (それぞれ B103-p2y₅ 細胞、RH7777-p2y₅ 細胞と命名) のそれぞれに対して約 200 種類の脂質分子を作用させ、細胞に及ぶ変化を観察した。具体的には、細胞内カルシ

ウムや細胞内サイクリック AMP (cAMP) という GPCR の活性化に伴って濃度が増加するセカンドメッセンジャーに加え、細胞形態も変化の指標とした。その結果、リゾホスファチジン酸(LPA: 図 2)が神経突起の退縮と細胞膜上に小疱形成を B103-p2y₅ 細胞と RH7777-p2y₅ 細胞に引き起こすことが明らかとなった (図 3)。LPA が p2y₅ を介して引き起こす細胞形態変化は、Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 の前処理によってほぼ抑制できたことから (図 3)、低分子量 G タンパク質の一種である Rho が関与す

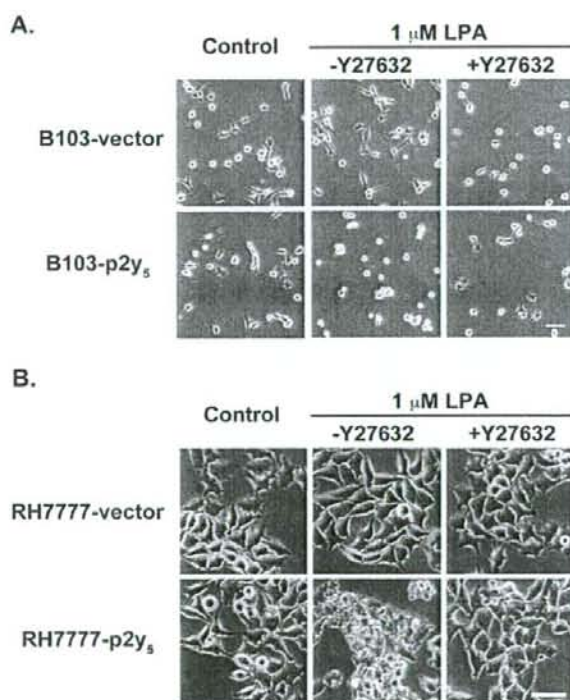


図 3 LPA による B103 細胞の神経突起退縮と RH7777 細胞の小疱形成。A. p2y₅ 安定発現 B103 細胞を血清飢餓条件下で 12 時間培養した後に、1 μM LPA で 15 分間刺激した。2% パラホルムアルデヒドで固定した細胞を写真撮影した。Rho キナーゼを阻害した実験では、5 μM Y27632 で予め 10 分間処理した。横向きのバーは 50 μm を表す。B. p2y₅ 安定発現 RH7777 細胞を A と同じ実験条件下で処理した。横向きのバーは 50 μm を表す。

る現象であると考えられた。なお、LPA はどの細胞に対しても細胞内カルシウムや cAMP 濃度に影響を及ぼさなかった。

RH7777-p2y₅細胞膜画分へのLPAの結合

以前の我々の検討では、p2y₅を一過性に発現した RH7777 細胞の膜画分

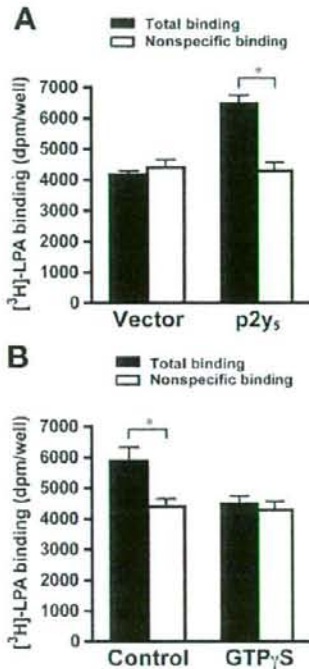


図 4 RH7777-p2y₅細胞膜画分へのLPAの結合。A. RH7777-p2y₅細胞とRH7777-Vector細胞由来の細胞膜画分へのトリチウムラベル化 1-オレオイル LPA の結合。30 nM の³H]-1-オレオイル LPA を膜画分と4°Cで70分間インキュベートした。反応液をガラスフィルターでろ過し、洗浄した後にフィルターに吸着している放射能を計測した(総結合)。非特異的結合を検出するために10 μM のトリチウムラベルしていない1-オレオイル LPA を共存させた実験も平行して行った。「特異的結合」とは「総結合」から「非特異的結合」を差し引いた値を指す。*n* = 3, **P* < 0.05 (t検定)。B. GTPγS への感受性。100 μM の GTPγS で30分間処理したRH7777-p2y₅細胞由来の膜画分をA.と同じ条件で³H]-1-オレオイル LPA への結合実験を行い、特異的結合を観察した。*n* = 3, **P* < 0.05 (t検定)。

には、LPA を特異的に結合する活性は認められなかった(データ略)。本研究では、樹立した p2y₅安定発現 RH7777 細胞 (RH7777-p2y₅細胞) から膜画分を調製し、これをトリチウムで放射ラベル化した 1-オレオイル LPA (³H]-LPA) と反応させた。その結果、LPA の特異的結合を僅かではあるが観察することができた(図 4A)。ネガティブコントロールのベクターのみをトランスフェクションした細胞 (RH7777-Vector 細胞) から調製した膜画分では LPA の特異的結合は認められなかった。また、100 μM GTPγS で膜画分を前処理することにより、³H]-LPA の特異的結合が大きく減少することが観察された(図 4B)。この

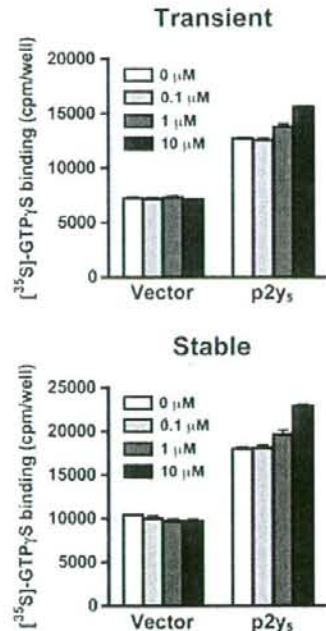


図 5 p2y₅を介した LPA による GTPγS の細胞膜画分への結合。一過性(上)または安定的(下)に p2y₅を発現させた RH7777 細胞から膜画分を調製し、0.5 nM [³⁵S]-GTPγS と種々の濃度の 1-オレオイル LPA を加え、30°Cで30分間インキュベーションした。*n* = 3, *p* < 0.001 for Vector vs p2y₅ (2-way ANOVA)。

ことは、 $[^3\text{H}]$ -LPA の膜画分への結合が GPCR を介していることを示唆する。

p2y₅を介したLPAによるGTPγSの細胞膜画分への結合

さらに、p2y₅を一過的にまたは安定的に発現させた RH7777 細胞の膜画分に対し、LPA によって濃度依存的に $[^{35}\text{S}]$ -GTPγS が結合する現象 (G タンパク質 α サブユニットにおける GDP/GTP 交換反応の促進) が観察された (図 5)。この結果も LPA が GPCR を介して細胞を刺激していることと矛盾しない。

G_s/G₁₃ キメラタンパク質を介した p2y₅ によるアデニル酸シクラーゼの活性化

G タンパク質にはいくつかの種類があり、GPCR によって共役する G タンパク質は異なることが知られている。p2y₅ の場合、低分子量 G タンパク質 Rho の活性化に伴う形態変化を細胞に惹起したが、過去の報告を考慮すると p2y₅ は G₁₂ または G₁₃ タンパク質と共役することが予想された。そこで、B103-p2y₅ 細胞にさらに G_s/G₁₃ キメラタンパク質を発現させて 1-オレオイル LPA で刺激した。このキメラタンパク質の存在下で G₁₃ タンパク質と共役する GPCR が活性化すると、アデニル酸シクラーゼが活性化されるために cAMP 産生量が

増加することが知られている。今回の実験でも予想通り、LPA 濃度依存的な cAMP 産生の亢進がこのキメラタンパク質発現 B103-p2y₅ 細胞で観察された (図 6)。ただし、この現象を観察するには細胞を PTX で処理することが必須であった。この理由を明らかにするには、p2y₅ が Gi/Go に共役する可能性を含め今後の検討が必要であると考えている。

p2y₅ のリガンド選択性

最近、遺伝学的アプローチにより p2y₅ がヒトの毛髪成長異常原因遺伝子であることが報告され、p2y₅ が LPA の受容体であることも併せて示唆され

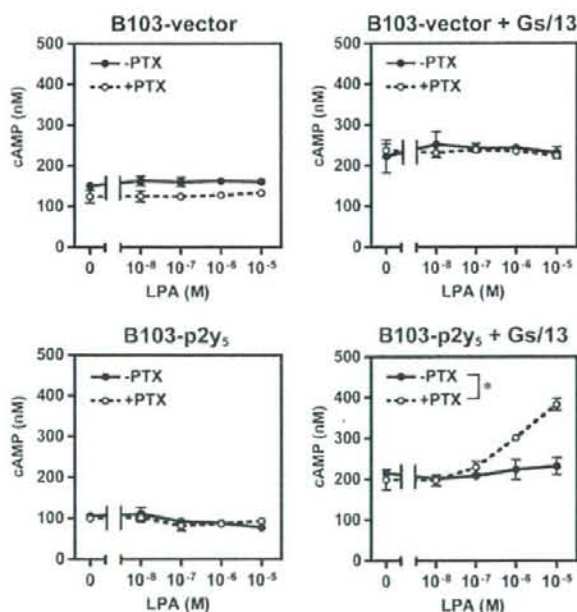


図 6 G_s/G₁₃ キメラタンパク質を介した p2y₅ によるアデニル酸シクラーゼの活性化。B103-Vector 細胞と B103-p2y₅ 細胞に G_s/G₁₃ キメラタンパク質発現ベクターまたはコントロールベクターをトランスフェクションした。この細胞を 100 ng/ml PTX 存在下または非存在下、血清飢餓培地で 12 時間処理した。その後、種々の濃度の 1-オレオイル LPA で 30 分間、室温で刺激した。細胞溶解液中の cAMP 濃度を示す。n = 3, *P < 0.001 (2-way ANOVA)。

た (Pasternack *et al.* (2008) *Nat Genet* 40, 329-334)。グリセロール骨格の *sn*-2 位に脂肪酸を結合した 2-アシル LPA の産生酵素である mPA-PLA1 の変異も p2y₅ の変異と同様の毛髪異常につながることから、p2y₅ の天然アゴニストとして 2-アシル型 LPA は 1-アシル LPA よりも強力である可能性が高い。そこで、上述した G_s と G₁₃ のキメラタンパク質を発現させて cAMP 産生を観察するアッセイ系を利用して、この点についての検討を行った。図 7 に示すように、2-オレオイル LPA が 1-オレオイル LPA に比べて p2y₅ のより強いアゴニストと

して機能することがわかった。

オレイン酸以外の脂肪酸が結合した LPA について、p2y₅ のアゴニストとしての活性を検討したところ、1-アシル LPA でも 2-アシル LPA でもアラキドン酸が結合した LPA はオレイン酸が結合した LPA よりも活性弱く、逆にリノール酸が結合した LPA はより強いことが明らかになった(データ略)。

HUVEC 内在性の p2y₅ を介した LPA による細胞形態変化

ここまでの実験では培養細胞に外来性の p2y₅ を発現した条件で行い、この GPCR の機能を解析してきた。そこで次に、細胞に内在的に発現する p2y₅ の機能を解析することとした。HUVEC は LPA 刺激により Rho の活性化を起こすことが論文報告されている。これに加え、トランスクリプトームデータベース(東京大学システム生物医学データベースシステム)には HUVEC における p2y₅ mRNA の高い発現が示されている。このことから私は、p2y₅ を内在的に発現する細胞として HUVEC を解析対象に選び、この細胞の形態に対する p2y₅ の機能を調べた。もともと扁平型の HUVEC は LPA に反応して球形に細胞形態を急速に変化させた(図 8A)。細胞の形態変化を客観的に評価するために Roche 社の xCELLigence というシステムで細胞とディッシュの間の抵抗値に相当する "Cell Index" を計った。LPA 刺激後に Cell Index 値は急速に低下し、しかも細胞形態変化観察のときと同等の時間経過を辿った(図 8B)。この LPA による細胞形態変化は、先に述べた p2y₅

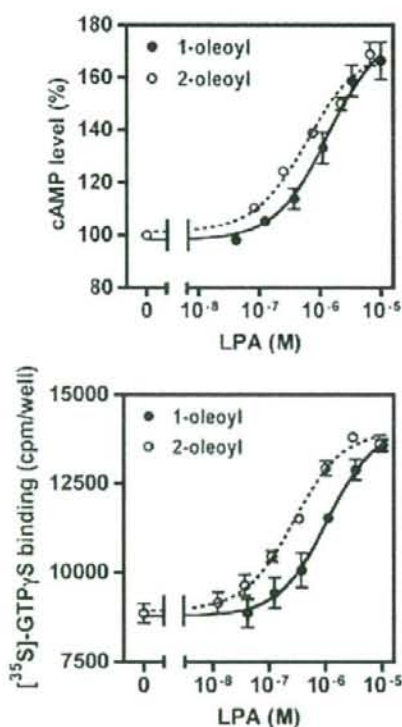


図 7 p2y₅ のリガンド選択性。1-オレオイル LPA と 2-オレオイル LPA のアゴニストとしての活性を、G_s/G₁₃ キメラタンパク質を発現する B103-p2y₅ 細胞における cAMP 産生(上)と RH7777-p2y₅ 細胞の細胞膜面分への GTPγS 結合(下)について検討した。n = 3。

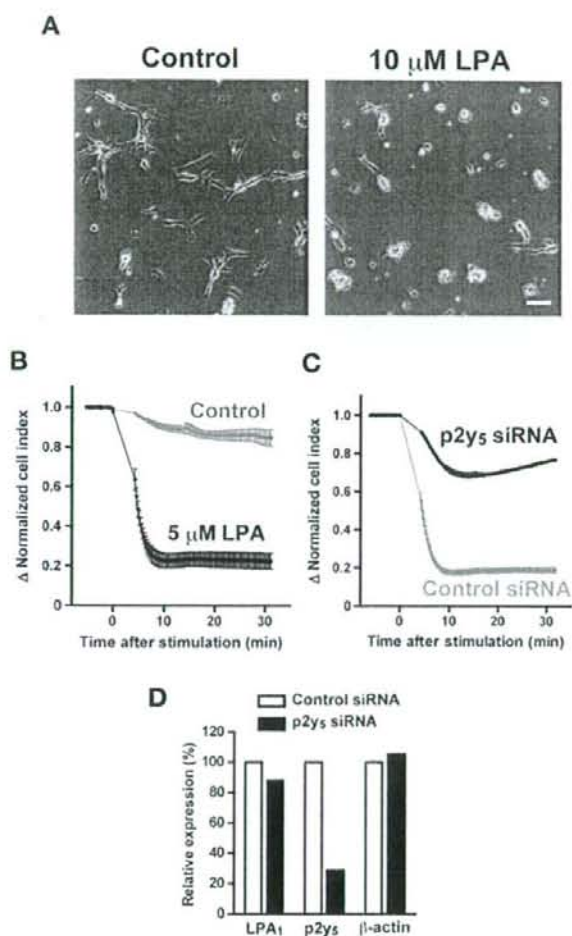


図 8 A. HUVEC 内在性の p2y₅ を介した LPA による細胞形態変化。3% BSA に溶解した 5 mM 1-オレオイル LPA を血清飢餓状態の HUVEC に加え、LPA の終濃度 10 μ M で刺激した。30 分後に 2% パラホルムアルデヒドで固定したときの細胞の退縮の様子を示す。“Control”には溶媒(3% BSA)のみを投与した。横方向のバーは 50 μ m を表す。B. xCELLigence システムを用いた細胞形態変化の定量的解析。血清飢餓状態で培養した HUVEC を 5 μ M LPA で刺激したときの“Cell Index”の時間変化。“Control”には溶媒(3% BSA)のみを投与した。 $n = 6$ 。C. siRNA による p2y₅ の関与の検討。p2y₅ siRNA またはコントロール siRNA をトランスフェクションした HUVEC を血清飢餓状態で培養し、B. と同様の実験を行った。 $n = 6$ 。D. siRNA が LPA 受容体 mRNA 発現レベルへ及ぼす影響。p2y₅ siRNA をトランスフェクションした HUVEC の LPA1、p2y₅、 β -アクチンの mRNA レベルを、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞のレベルと比較した値を示す。mRNA レベルは定量的 PCR 法で求めた。 $n = 2$ 。

を発現する B103 細胞で観察されたものと似ており(図 3A)、p2y₅ が関わる

可能性が考えられた。そこで、siRNA によって HUVEC 内の p2y₅ mRNA レベルを低下させたときの LPA への反応を xCELLigence システム観察した。ネガティブコントロールの siRNA を導入された HUVEC では、LPA によって細胞が球形になることに起因すると思われる抵抗値の急激な低下が起きた(図 8C)。一方で p2y₅ の siRNA を導入された HUVEC では LPA による抵抗値の低下は大きく抑制された。この結果は内因性の p2y₅ もまた細胞の形態を調節する機能をもつことを強く示唆する。なお、p2y₅ siRNA のトランスフェクションにより、HUVEC における p2y₅ mRNA の発現レベルが大きく低下した一方で、LPA₁ mRNA の発現量はほとんど影響を受けなかったことを定量的 PCR によって確認した(図 8D)。

D. 考察

本研究では、[³H]-LPA の結合実験及び [³⁵S]-GTP γ S 結合実験により、オーファン GPCR の p2y₅ が新規 LPA 受容体であることを明らかにした。図 1 に示すように p2y₅ は LPA₄ と最も高い相同性

(56%)を示すオーファン GPCR であったことから、LPA 受容体であることが期待されたが、我々の以前の細胞内シ

グナル伝達の観察 (Ca^{2+} 応答とアデニル酸シクラーゼの活性変化) や ^3H -LPA 結合実験の結果がすべてネガティブであったため、LPA の受容体である可能性は低いと考えていた。本研究での詳細な解析によりはじめて、 $\text{p}2\text{y}_5$ は G_{13} タンパク質と共役して細胞形態を調節するが、 Ca^{2+} 応答やアデニル酸シクラーゼの活性変化を引き起こさず、LPA に対する親和性も低いという独特の特徴を持つ LPA 受容体であることが明らかになった。

以前に行った ^3H -LPA 結合実験では、 $\text{p}2\text{y}_5$ を一過性に発現する RH7777 細胞の膜画分を用いて、特異的結合は検出できなかった。ちなみに、 LPA_3 を除く 4 つの LPA 受容体については、同じ実験条件で ^3H -LPA の特異的結合は明確に検出できている (Kd 値: 60-100 nM; データ略)。一方、今回は $\text{p}2\text{y}_5$ を高いレベルで安定発現する細胞を用いたところ、 ^3H -LPA の特異的結合が僅かではあるが観察できた。今回の実験の方が受容体の発現レベルの高いからなのか、それとも安定発現した $\text{p}2\text{y}_5$ の方が一過性発現したものよりも親和性が高いからなのか、その明確な理由は明らかでない。いずれにせよ $\text{p}2\text{y}_5$ の LPA 親和性は低く、Kd 値の算出はできなかった。

^{35}S -GTP γ S 結合は G タンパク質における GDP/GTP 交換反応に基づいた現象であり、GPCR がアゴニストによって活性化されたことを意味する。一過性発現と安定発現のどちらの実験条件においても、 $\text{p}2\text{y}_5$ が LPA 依存的に ^{35}S -GTP γ S を細胞膜画分へ結合させたことは、 $\text{p}2\text{y}_5$ が LPA 受容体であ

ることを支持した結果であると考えられる。

$\text{p}2\text{y}_5$ が G_{13} タンパク質と Rho を介して細胞形態を調節することを、 $\text{p}2\text{y}_5$ を安定発現させた B103 細胞や RH7777 細胞で示した。これと矛盾しない結果が、内在的に $\text{p}2\text{y}_5$ を発現する HUVEC の解析でも得られた。すなわち、 $\text{p}2\text{y}_5$ の活性化は HUVEC の退縮に至った。この結果は、 $\text{p}2\text{y}_5$ が血管内皮細胞における形態変化を通して血管透過性の調節因子として働く可能性を示している。

$\text{p}2\text{y}_5$ のリガンド指向性に関しては 2-アシル LPA の方が 1-アシル LPA よりも高く、この結果は毛包の内根鞘に発現する $\text{p}2\text{y}_5$ の欠損が毛髪成長異常に至ることと矛盾しないと思われた。加えて、やはり毛包の内根鞘に発現し、2-アシル LPA を産生する酵素 mPA-PLA1 の欠損が同様の毛髪成長異常に至ることとも矛盾しない。毛包の内根鞘に含まれる LPA が実際にどのような組成なのかを明らかにすることは興味深い。

E. 結論

LPA は多彩な生理機能を発揮する脂質メディエーターであるが、現在までに 5 種類の GPCR (LPA_1 - LPA_5) が明らかになっていった。本研究の結果は $\text{p}2\text{y}_5$ の生物学的機能の一端を明らかにしたと同時に、 $\text{p}2\text{y}_5$ が第 6 番目の LPA 受容体 LPA_6 と命名できる分子であることを示した。今後の更なる LPA_6 の解析によって毛髪の成長や血管透過性に関する詳細なメカニズムはもとより、この GPCR の別の生物学的機能を解明することを目指したい。

研究協力者

- ・清水孝雄 東京大学大学院医学系研究科 生化学分子生物学講座 教授
- ・柳田圭介、真砂佳代、木原泰行、浜野文三江 東京大学大学院医学系研究科 生化学分子生物学講座 大学院生
- ・田口良 東京大学大学院医学系研究科メタボローム講座 教授
- ・中西広樹、田島陽子 研究員

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

英文原著

1. Hikiji H., Takato T., Shimizu T., and *Ishii S. (2008) The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog. Lipid Res.** 47, 107-126.
2. Jiang, W., Hall, S.R., Moos, M.P.W., Cao, R.Y., Ishii, S., Ogunyankin, K.O., Melo, L.G., and Funk, C.D. (2008) Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor (CysLT2R) expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury. **Am. J. Pathol.** 172, 592-602.
3. Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., Ishii, S., and Shimizu, T. (2008) Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. **J. Immunol.** 181, 5008-5014.
4. Moos, M.P.W., Mewburn, J.D., Kan, F.W.K., Ishii, S., Abe, M., Sakimura, K., Noguchi, K., Shimizu, T., and Funk, C.D. (2008) Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability via transendothelial vesicle transport. **FASEB J.** 22, 4352-4362.
5. Welch, E.J., Naikawadi, R.P., Li, Z., Lin, P., Ishii, S., Shimizu, T., Tirupathi, C., Du, X., Subbaiah, P.V., and Ye, R.D. (2009) Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet activating factor on neutrophil and platelet activation. **Mol. Pharmacol.** 75, 227-234.
6. Mogi, C., Tobo, M., Tomura, H., Murata, N., He, X.-d., Sato, K., Kimura, T., Ishizuka, T., Sasaki, T., Sato, T., Kihara, Y., Ishii, S., Harada, A., and Okajima, F. (2009) Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of pro-inflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. **J. Immunol.** in press.

和文総説

1. 石井聡 遺伝子改変マウスの問題点 呼吸と循環, vol. 56, 913-918 (2008)
 2. 石井聡 気管支喘息とGタンパク質共役型受容体 Annual Review 呼吸器 2009, 1-6 (2009)
- 2) 学会発表
1. 石井聡 脂質メディエーター受容

体の病態機能 --- ベンチサイドからの呼吸器研究 第5回東京レスピレーションフロンティア（東京）
（2008年11月7日）

2. 石井聡、柳田圭介、住田隼一、木原泰行、野口響子、木原泰行、浜野文三江、清水孝雄、阿部学、崎村建司 非EDG型リゾホスファチジン酸受容体の生体機能 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム（神戸）（2008年12月9日）
3. 石井聡、井原裕一郎、木原泰行、国田朱子、北芳博、浜野文三江、柳田圭介、油谷浩幸、深山正久、清水孝雄 細胞外pH感知性G蛋白質共役型受容体TDAG8の癌の進展における役割 第3回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム（東京）
（2009年1月31日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T. Effect of dexamethasone on voltage-gated Na⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci* 82:1210-1215, 2008.
2. Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull* 31: 1434-1438, 2008.
3. Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Multiple renal cysts with concentration defects and pulmonary emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol* 294: F542-53, 2008.
4. Kage H, Kohyama T, Kitagawa H, Takai D, Kanda Y, Ohishi N, Nagase T. Non-Infectious Bronchiolitis as an Early Pulmonary Complication of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Internal Medicine* 47: 61-64, 2008.
5. Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Kato J, Nagase T. Clarithromycin inhibits fibroblast migration. *Respir Med* 2008: in press
6. Kihara Y, Yanagida K, Masago K, Kita Y, Hishikawa D, Shindou H, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. *J Immunol* 181: 5008-5014, 2008.
7. Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog Lipid Res* 47: 107-126, 2008.
8. Kikuchi K, Kohyama T, Yamauchi Y, Kato J, Takami K, Desaki M, Okazaki H, Nagase T, Rennard SI, Takizawa H C reactive protein modulates human lung fibroblast migration. *Experimental Lung Research* 35: 48-58, 2009.
9. Nakajima T, Kubota N, Tsutsumi T, Oguri A, Imuta H, Jo T, Oonuma H, Soma M, Meguro K, Takano H, Nagase T, Nagata T. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels

and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 2009 in press

10. Kikuchi Y, Tateda K, Fuse ET, Matsumoto T, Gotoh N, Fukushima J, Takizawa H, Nagase T, Standiford TJ, Yamaguchi K. Hyperoxia exaggerates bacterial dissemination and lethality in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Pulm Pharmacol Ther* 2009 in press.
11. Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, Ando M, Yamazaki K, Saijo Y, Genma A, Miyazawa H, Tanaka T, Ikebuchi K, Nukiwa T, Morita S, Hagiwara K. First-line gefitinib for patients with advanced non small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol* in press.
12. Azuma A, Hagiwara K, Kudoh S. Basis of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in Japanese patients. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1397-8, 2008.
13. Koyama N, Zhang J, Huqun, Miyazawa H, Tanaka T, Su X, Hagiwara K. Identification of IGFBP-6 as an effector of the tumor suppressor activity of SEMA3B. *Oncogene* 27: 6581-9, 2008.
14. Miyanaga A, Gemma A, Ando M, Kosaihiro S, Noro R, Minegishi Y, Kataoka K, Nara M, Okano T, Miyazawa H, Tanaka T, Yoshimura A, Kobayashi K, Iwanami H, Hagiwara K, Tsuboi E, Kudoh S. E-cadherin expression and epidermal growth factor receptor mutation status predict outcome in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Oncol Rep* 19: 377-83, 2008.
15. Kobayashi T, Takaku Y, Yokote A, Miyazawa H, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Interferon-beta augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. *Eur Respir J* 32: 1540-7, 2008.
16. Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog. Lipid Res* 47: 107-126, 2008.
17. Jiang W, Hall S R, Moos M P W, Cao R Y, Ishii S, Ogunyankin K O, Melo L G, Funk C D. Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor (CysLT2R) expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Pathol* 172: 592-602, 2008.
18. Kihara Y, Yanagida K, Masago K, Kita Y, Hishikawa D, Shindou H, Ishii S, Shimizu T.

Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. *J. Immunol* 181: 5008-5014, 2008.

19. Moos M P W, Mewburn J D, Kan F W K, Ishii S, Abe M, Sakimura K, Noguchi K, Shimizu T, Funk C D. Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability via transendothelial vesicle transport. *FASEB J*, in press. 2008.
20. Welch E J, Naikawadi R P, Li Z, Lin P, Ishii S, Shimizu T, Tirupathi C, Du X, Subbaiah P V, Ye R D. Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet activating factor on neutrophil and platelet activation. *Mol. Pharmacol*, in press. 2008.



Effect of dexamethasone on voltage-gated Na⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells

Toshiaki Nakajima^{a,*}, Taisuke Jo^b, Kentaro Meguro^c, Hitoshi Oonuma^b, Ji Ma^a, Nami Kubota^a, Hiroyuki Imuta^a, Haruhito Takano^a, Haruko Iida^a, Takahide Nagase^b, Taiji Nagata^b

^a Department of Ischemia Circulatory Physiology, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan

^b Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan

^c Department of Cardiovascular Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 December 2007

Accepted 11 April 2008

Keywords:

Voltage-gated sodium channels
Cultured human smooth muscle cells
Dexamethasone
SCN9A, RT-PCR
Human bronchial smooth muscle cells

ABSTRACT

Voltage-gated Na⁺ channel (I_{Na}) encoded by SCN9A mRNA is expressed in cultured human bronchial smooth muscle cells. We investigated the effects of dexamethasone on I_{Na} , by using whole-cell voltage clamp techniques, reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR), and quantitative real-time RT-PCR. Acute application of dexamethasone (10^{-6} M) did not affect I_{Na} . However, the percentage of the cells with I_{Na} was significantly less in cells pretreated with dexamethasone for 48 h, and the current-density of I_{Na} adjusted by cell capacitance in cells with I_{Na} was also decreased in cells treated with dexamethasone. RT-PCR analysis showed that α and β subunits mRNA of I_{Na} mainly consisted of SCN9A and SCN1 β , respectively. Treatment with dexamethasone for 24–48 h inhibited the expression of SCN9A mRNA. The inhibitory effect of dexamethasone was concentration-dependent, and was observed at a concentration higher than 0.1 nM. The effect of dexamethasone on SCN9A mRNA was not blocked by spironolactone, but inhibited by mifepristone. The inhibitory effects of dexamethasone on SCN9A mRNA could not be explained by the changes of the stabilization of mRNA measured by using actinomycin D. These results suggest that dexamethasone inhibited I_{Na} encoded by SCN9A mRNA in cultured human bronchial smooth muscle cells by inhibiting the transcription via the glucocorticoid receptor.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Glucocorticoids are the most effective therapy currently available for the treatment of asthma. They act primarily as anti-inflammatory agents to inhibit recruitment of inflammatory cells and suppress the release of pro-inflammatory mediators and cytokines from activated inflammatory and airway epithelial cells (Barnes, 1996). They also have other several effects in asthma managements including inhibition of proliferation of smooth muscle (Stewart et al., 1995; Dixon et al., 1999), reducing airway hyperresponsiveness (Kim et al., 2004), and preventing or reversing structural remodeling in airways (Kumar et al., 2003). Thus, airway smooth muscle cells play essential roles in the effects of steroids (Hirst and Lee, 1998), but little is known about the action of glucocorticoids on the function of airway smooth muscle cells.

Ionic channels play essential roles in regulating intracellular Ca²⁺ ions of smooth muscle cells, smooth muscle tone, and then proliferation and hypertrophy of the cells. Glucocorticoids have been known to affect Na⁺-K⁺ ATPase (Chalaka et al., 1999) and several ion

channels such as K_v1.5, a non-inactivating K⁺ current (Takimoto et al., 1993; Takimoto and Levitan, 1994). The voltage-gated Na⁺ channel (I_{Na}) exists in a wide variety of excitable cells including nerves, heart and skeletal muscle. In response to depolarizing stimuli, the channels open and play an essential role in the rising phase of action potential, which is important for impulse generation and conduction. Until now, ten different types of α -subunit Na⁺ channel genes denoted as SCN1A to SCN11A have been identified (Goldin, 1999; Goldin, 2002), and are distributed among a wide variety of mammalian cells. I_{Na} is expressed in several types of freshly isolated phasic smooth muscle cells including vascular, urinary and gastrointestinal muscle (Xiong et al., 1993; Hollywood et al., 1997; Belevych et al., 1999), while it appears to be rarely expressed in tonic smooth muscle cells such as bronchial smooth muscle. However, I_{Na} is identified in cultured human smooth muscle cells such as bronchial, and coronary arterial smooth muscle cells (Snetkov et al., 1996; Quignard et al., 1997; Cox et al., 1998; Boccarda et al., 1999; Choby et al., 2000a; Choby et al., 2000b; Jo et al., 2004). We have previously reported that I_{Na} expressed in cultured human smooth muscle cells is mainly composed of Na_v1.7 encoded by SCN9A mRNA (Jo et al., 2004). The physiological significance of I_{Na} remains unsettled, but may be related to the cultured conditions, where cellular dedifferentiation and proliferation are involved (Snetkov et al., 1996; Quignard et al., 1997; Cox et al., 1998; Boccarda

* Corresponding author. Department of Ischemia Circulatory Physiology, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan. Tel.: +81 3 3815 5411; fax: +81 3 3814 0021.

E-mail address: masamasa@pb4.so-net.ne.jp (T. Nakajima).

et al., 1999; Choby et al., 2000a; Choby et al., 2000b). These changes may occur under various pathophysiological conditions such as asthma (Hirst et al., 2000; Johnson et al., 2001; Vignola et al., 2001). Therefore, it is interesting to examine the effects of dexamethasone, a potent glucocorticoid, on I_{Na} in cultured human bronchial smooth muscle cells.

The purpose of the present study is to investigate the effects of dexamethasone on I_{Na} in cultured human bronchial smooth muscle cells. Here, we provided novel evidence that acute application of dexamethasone did not affect I_{Na} , but dexamethasone inhibited I_{Na} encoded by SCN9A mRNA in cultured human bronchial smooth muscle cells by inhibiting the transcription via the glucocorticoid receptor.

Materials and methods

Cell preparation

Culture cells isolated from normal adult human bronchus ($n=4$) were purchased from the Clonetics Corporation (San Diego, U.S.A.) as previously described (Jo et al., 2004). These cells were cultured in the culture medium supplemented with 5% fetal bovine serum, human epidermal growth factor (0.5 $\mu\text{g/ml}$), insulin (5 mg/ml), human fibroblast growth factor (1 $\mu\text{g/ml}$), gentamycin (50 $\mu\text{g/ml}$), and amphotericin B (0.05 $\mu\text{g/ml}$) [SmGM-2 Buffer-Kit, Clonetics] in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% air at 37 °C. When cells became confluent, they were subcultured in the same medium. At confluence, the cells were passaged using 0.05% trypsin in 0.02% EDTA. Medium was replaced twice weekly. Cells before confluence at passages 3–7 were detached from culture dish with 0.25% trypsin in 0.02% EDTA, and used for later experiments. The cells were identified as smooth muscle cells, by which the expression of α -actin was confirmed by immunostaining with biotin-conjugated antibody as shown previously (Oonuma et al., 2002; Jo et al., 2004).

Solutions and drug

The composition of the control extracellular Tyrode solution was as follows (in mM): NaCl 136.5, KCl 5.4, CaCl_2 1.8, MgCl_2 0.53, glucose 5.5 and HEPES–NaOH buffer 5.5 (pH 7.4). To block K^+ currents, the patch pipette contained (in mM): CsCl 140, EGTA 10, MgCl_2 2, Na_2ATP 3, guanosine-5'-triphosphate (GTP, sodium salt, Sigma) 0.1, and HEPES–CsOH buffer 5 (pH 7.2). In addition, 4-aminopyridine (4-AP, 4 mM), tetraethylammonium (2 mM), and Ba^{2+} (1 mM) were added to the control solution to block K^+ currents and record I_{Na} . Nifedipine, 4-AP, TEA, tetrodotoxin (TTX), actinomycin D and dexamethasone were obtained from Sigma Chemicals Co. Spironolactone and mifepristone were also purchased from Sigma.

Recording technique and data analysis

Membrane currents were recorded with tight-seal whole-cell clamp techniques using a patch-clamp amplifier (EPC-7, List Electronics, Darmstadt, Germany) (Hamill et al., 1981; Nakajima et al., 1999). The heat-polished patch electrode had tip resistance of 3–5 M Ω . All data were acquired, stored, and analyzed on Power Macintosh 7100/80 using the PULSE+PULSEFIT software (HEKA Electronic) and Igor PRO (Wave Metrics, Lake Oswego, OR) as previously described (Terasawa et al., 2002).

RNA extraction and quantitative real-time reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total cellular RNA was extracted using ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo). For RT-PCR, complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μg of total RNA with reverse transcriptase with random primers

(Toyobo, Osaka, Japan) as shown previously (Jo et al., 2004). The reaction mixture was then subjected to PCR amplification with specific forward and reverse oligonucleotide primers consisting of heat denaturation, annealing, and extension. PCR products were size-fractionated on 2% agarose gels, and visualized under UV light. Primers were chosen on the basis of the sequence of human genes as follows: SCN9A (403 bp), sense, GAGGCTGTTTCACAGATGG; antisense, TGGGGCCAAGATCTGAGTAG; GAPDH (906 bp), sense, GAGTCAACG-GATTGGTCGT; antisense, TGACAAAGTGGTCGTGAGG. Total RNA of human fetal brain and adult human left ventricle (Toyobo, Osaka) were used for positive control.

The quantitative real-time RT-PCR was performed with the use of real-time Taq-Man technology and a sequence detector (ABI PRISM Φ 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described (Jo et al., 2004). Gene-specific primers and Taq-Man probes were used to analyze transcript abundance. The 18S ribosomal RNA level was analyzed as an internal control and used to normalize the values for transcript abundance of SCN1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 8A, 9A and SCN β 1–4.

Statistical analysis

Data were expressed as the means \pm S.E.M. Student's *t*-test and 2 \times 2 Chi square test were used for statistical analysis and $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

Effects of dexamethasone on voltage-gated Na^+ channels (I_{Na})

Fig. 1A shows I_{Na} in cultured human bronchial smooth muscle cells. The cells were held at -80 mV, and the command voltage pulses (100 ms in duration) were applied to +0 mV. A fast transient inward current was elicited. TTX (1 μM , Fig. 1A) completely abolished it, indicating that the transient inward current is composed of TTX-sensitive Na^+ channels (I_{Na}) as previously reported (Snetkov et al., 1996; Jo et al., 2004). Fig. 1A also shows the effects of dexamethasone on I_{Na} . The acute application of dexamethasone (1 μM) for ~ 5 min did not affect the I_{Na} significantly. Similar results were observed in 5 experiments tested. The effects of dexamethasone (1 μM) on I_{Na} were shown at various command voltage steps in Fig. 1B–D. The current-voltage relationships for I_{Na} obtained from 5 different cells are indicated in Fig. 1E. Dexamethasone (1 μM , Fig. 1C) did not affect the amplitude of I_{Na} peak at any command voltage pulses significantly, compared with the control (Fig. 1B), but TTX completely abolished it (Fig. 1D). These results suggest that acute application of dexamethasone did not affect I_{Na} . Then, we investigated chronic effects of dexamethasone on I_{Na} . The expression of I_{Na} was compared in between cells treated with dexamethasone (1 μM) for 48 h and cells untreated with dexamethasone (control cells), by using the whole-cell voltage clamp techniques. In control cells, I_{Na} was detected in 44% of the total cells tested ($n=50$), while the percentage of the cells with I_{Na} were significantly less in cells treated with dexamethasone (24% of the total cells tested ($n=50$, $P < 0.05$ vs. control cells). The current-density of I_{Na} adjusted by cell capacitance in cells with I_{Na} was significantly decreased in cells treated with dexamethasone (4.3 ± 2.5 pA/pF in control and 1.3 ± 0.4 pA/pF ($n=20$) in dexamethasone-treated cells, $P < 0.05$) as shown in Fig. 1F.

Effects of dexamethasone on SCN9A and Na^+ channel β subunit mRNA expression

To identify the gene of I_{Na} expressed in these cells, conventional RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR analysis were applied (Fig. 2). By using RT-PCR, the expression of SCN9A mRNA was observed (Fig. 2A). The amplitude of SCN9A cDNA fragments was of predicted