

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19390421
 研究課題名（和文） α 1 アドレナリン受容体変異動物を用いた泌尿生殖機能における
 α 1 受容体の機能解析
 研究課題名（英文） Analysis of urogenital function with mutant mice lacking for single
 or multiple alpha 1 adrenergic receptor.
 研究代表者 田上昭人（TANOUE AKITO）
 国立成育医療センター（研究所）・薬剤治療研究部・部長
 研究者番号：60301800

研究成果の概要：

α 1 アドレナリン受容体変異マウスを用いて、泌尿生殖機能における α 1 アドレナリン受容体（ α 1A, B, D）の分子生物学的メカニズムを明らかにした。 α 1 アドレナリン受容体の中でも α 1A サブタイプの欠損により、射精機能の低下が見られた。さらに、 α 1A, B, D の3つのサブタイプの欠損により、射精機能がほぼ完全に障害されることが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：泌尿器科学

1. 研究開始当初の背景

α 1 アドレナリン受容体（ α 1-AR）には、3つのサブタイプ（ α 1A、 α 1B、 α 1D）が存在し、これらの受容体は主に血管に発現しアドレナリン、ノルアドレナリンによる血管収縮・血圧調節に重要な働きをしている。この受容体を標的とする α 1 アドレナリン受容体拮抗薬（ α 1 ブロッカー）は、高血圧症の治療薬として開発され臨床その有用性は証明されている。 α 1 ブロッカーには、サブタイプ非選択的なプラゾシン、ブナゾシン、ドキサゾシン、テラゾシン等の他に比較的 α 1A アドレナリン受容体に親和性の高いタムスロシンや比較的 α 1D アドレナリ

ン受容体に親和性の高いナフトビジル等が開発されている。さらに最近、前立腺肥大症における排尿困難症の治療薬として α 1A アドレナリン受容体選択的拮抗薬としてシロドシンが開発され臨床応用されている。現在前立腺肥大症患者に対する薬物療法において α 1 ブロッカーは、その有効性の高さ、安全性から第一選択薬として広く用いられている。

降圧剤や前立腺肥大症の治療薬として用いられている α 1 ブロッカーの副作用としては、起立性低血圧症などの他に射精障害が報告されている。射精障害の頻度は、ナフトビジルでは報告が少ないが、テラゾシンでは

0.3～1.4%、タムスロシンでは、4.2～18.1%と報告されており、薬剤により頻度の差がみられる傾向にある。しかしながら、 $\alpha 1$ ブロッカーによる射精障害の種類や機序に関して検討した報告や、射精障害に関与する受容体サブタイプなどについて詳細に検討した報告は少ない。このように、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体が、血管や泌尿生殖系において発現し、血圧調節や射精機能において重要な働きをしていることは、 $\alpha 1$ ブロッカーの薬物作用からも明らかであるが、血管や泌尿生殖系における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の3つのサブタイプの機能の違いや血圧調節、膀胱機能・射精機能におけるそれぞれのサブタイプの生理機能の違いについては十分明らかになっていない。

我々はこれまでに $\alpha 1A$ アドレナリン受容体欠損マウス($\alpha 1A$ -KO)、 $\alpha 1B$ アドレナリン受容体欠損マウス($\alpha 1B$ -KO)、 $\alpha 1D$ アドレナリン受容体欠損マウス($\alpha 1D$ -KO)の解析を行い、血圧調節機構における各受容体サブタイプの生理機能の違いについて明らかにしてきている。その結果、安静時の血圧維持には $\alpha 1A$ および $\alpha 1D$ -ARが関与し、高血圧の発症には $\alpha 1D$ -ARが重要な働きをし、 $\alpha 1B$ -ARの関与は少ないことを明らかにしてきている。さらに、各受容体サブタイプの生理機能、受容体特異的薬物の薬物作用を明らかにするために、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体単独欠損マウス($\alpha 1A$ -KO、 $\alpha 1B$ -KO、 $\alpha 1D$ -KO)の他に $\alpha 1$ アドレナリン受容体二重欠損マウス($\alpha 1AB$ -KO、 $\alpha 1BD$ -KO、 $\alpha 1AD$ -KO)の作成に成功し、それぞれの変異マウスを用いて循環調節機構の解析を行っている。さらに全ての $\alpha 1$ アドレナリン受容体を欠損させた三重欠損マウス($\alpha 1ABD$ -KO)の作成を試みている。それぞれの変異マウスの作成・交配・繁殖・系統維持の過程において、 $\alpha 1B$ -KOおよび $\alpha 1D$ -KOの交配・繁殖はコントロール(ワイルド)と差がみられていないが、 $\alpha 1A$ -KOや $\alpha 1A$ B-KOではコントロールおよび $\alpha 1B$ -KO、 $\alpha 1D$ -KOに比べて交配後の雌の妊娠成功率が低いことが観察され、これらの変異マウスでは生殖・受精機能において障害があることが示唆されている。

また、膀胱機能に関しては、 $\alpha 1D$ -KOマウスでは、痛覚反応が低下し、排尿間隔が延長していることより膀胱機能が変化している可能性が示唆されている。

以上のように、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異マウスで生殖能力の障害や膀胱機能の変化がみられること加えて、 $\alpha 1$ ブロッカーで射精障害や膀胱知覚の変化が観察されていることより、泌尿生殖系(膀胱機能及び生殖能)において $\alpha 1$ アドレナリン受容体が重要な

働きをしていることが考えられる。以上のような背景より、本研究では作成した変異マウスを用いて泌尿生殖系における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の機能解明を行い薬物療法における薬理作用・副作用の解明を行う。

2. 研究の目的

$\alpha 1$ ブロッカーでは、上述したように射精障害がみられることにより、射精機能における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の各サブタイプの機能について作成した変異マウス($\alpha 1$ アドレナリン受容体単独欠損マウス、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体二重欠損マウス、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体三重欠損マウス)を用いて解析を行い、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体の各サブタイプの生理作用を明らかにし、 $\alpha 1$ ブロッカーの薬物作用を明らかにする。さらに、 $\alpha 1$ ブロッカーでは膀胱刺激症状を緩和する作用が知られていることより、膀胱知覚・膀胱機能における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の各サブタイプの生理作用を明らかにし、 $\alpha 1$ ブロッカーの作用のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

$\alpha 1$ アドレナリン受容体変異マウス($\alpha 1A$ -KO、 $\alpha 1B$ -KO、 $\alpha 1D$ -KO、 $\alpha 1AB$ -KO、 $\alpha 1AD$ -KO、 $\alpha 1BD$ -KO、 $\alpha 1ABD$ -KO)およびコントロールマウス(ワイルド)を用いて、以下の解析を行う。

(1) $\alpha 1$ アドレナリン受容体三重欠損マウス($\alpha 1ABD$ -KO)の作成
 $\alpha 1A$ -KO、 $\alpha 1B$ -KO、 $\alpha 1D$ -KO、 $\alpha 1AB$ -KO、 $\alpha 1AD$ -KO、 $\alpha 1BD$ -KOは既に作成している。 $\alpha 1AD$ -KO($\alpha 1A$ -/- B +/ D -/-マウス)と $\alpha 1BD$ -KO($\alpha 1A$ +/ B -/ D -/-マウス)の交配を行い、 $\alpha 1A$ +/- B +/- D -/-マウスの作成を行う。さらに、 $\alpha 1A$ +/- B +/- D -/-マウス同士との交配により、 $\alpha 1A$ -/- B -/ D -/-マウス($\alpha 1ABD$ -KO)の作成を行う。

(2) 生殖能力に関する解析

① 妊娠成功率の解析

それぞれのマウスを交配後妊娠した雌マウスの割合を観察する。マウス交配の組み合わせは、ワイルド(雄)×変異マウス(雌)、変異マウス(雄)×ワイルドマウス(雌)、変異マウス(雄)×変異マウス(雌)をそれぞれ10～20組ずつ交配を行う。交配するマウスの組み合わせは次の通りである。

ワイルド(雄)× $\alpha 1X$ -KO(雌)

$\alpha 1X$ -KO(雄)×ワイルド(雌)

$\alpha 1X$ -KO(雄)× $\alpha 1X$ -KO(雌)

(Xは、A、B、D、AB、AD、BD、または、ABD)

この組み合わせの解析により、変異マウスの

雄雌それぞれにおける生殖能力が評価可能となる。

② 性行動の観察

性行動に異常がないかどうか上記の雄雌マウスを交配後（同じケージに移した後）1時間の性行動（マウンティング）を観察し記録する。

③ 交配後雌子宮内残存精子数の測定

3-4週齢の雌ワイルドマウスに5U PMSG（妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG）を腹腔内投与し、48時間後にhCG（ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン）を腹腔内投与を行う。

この処置により、雌マウスを交配可能な状態にする。この投与した3-4週齢の雌ワイルドマウスと8週齢の雄変異マウスを交配後、雌子宮内に残存する精子数を算出し、雄変異マウスの射精能力を評価する。

④ 雄マウスの精巣・精巣上体・輸精管における精子数の測定

8週齢の雄マウスより、精巣・精巣上体・輸精管・精囊腺を摘出し、それぞれの組織に含まれる精子数を算出する。

⑤ 雄マウスの精巣・精巣上体・輸精管の組織重量ならびに病理組織学的解析

8週齢の雄マウスより、精巣・精巣上体・輸精管・精囊腺を摘出し、組織重量の測定とともにHE染色により組織学的解析を行う。

⑥ 雄マウスの精巣・精巣上体・輸精管・精囊腺における $\alpha 1$ 受容体各サブタイプの発現量の解析（RT-PCR, 定量的PCR）

8-12週齢の雄マウスより精巣・精巣上体・輸精管・精囊腺を摘出しRNAを抽出後、cDNAを作成し、 $\alpha 1A$ -AR、 $\alpha 1B$ -AR、 $\alpha 1D$ -ARおよびP2X受容体特異的プライマーによりそれぞれの受容体の発現量を解析する。定量的PCRはTaqMan probeを用いて定量を行う。発現量の定量化はGAPDH遺伝子の発現量を指標として比較を行う。

⑦ 薬物を用いた輸精管・精囊腺の収縮反応

8週齢の雄マウスより輸精管・精囊腺を摘出し、in vitroにおける種々の薬物（ノルアドレナリン、フェニレフリン、カルバコール、ATP誘導体等）に対する反応性を検討する。

⑧ 電気刺激を用いた輸精管・精囊腺の収縮反応

8週齢の雄マウスより輸精管・精囊腺を摘出し、in vitroにおける電気刺激（Electric Field Stimulation）に対する反応性を検討する。

⑨ 人工授精による受精能力の解析

8週齢の雄マウスおよび雌マウスより精子及び卵子を採取し、ディッシュ上において人工授精を行い、受精した卵子の分化について解析を行う。

⑩ 精子活動度の解析

8週齢の雄マウスより精巣を摘出し、精子の

遊走能について評価を行う。

（3）膀胱機能の解析

① 体重、膀胱重量および組織

8週齢の雄マウスより膀胱を摘出し、重量を測定し体重あたりの組織重量比を測定し、さらにHE染色により組織学的検討を行う。

② 24時間排尿パターン

8-12週令の雌マウスを用いて代謝ケージにてマウスの24時間排尿パターンをパソコンで連続2日間記録し、1日排尿量、排尿回数と1回排尿量を記録する。

③ 膀胱内圧測定

8-12週令の雌マウスを用いて膀胱内圧測定を測定するために麻酔後、マウスを仰臥位に固定して下腹部を正中切開し膀胱を行う。膀胱頂部よりシリコンチューブ（外径0.8mm）を挿入し、縫合糸で固定し、シリコンチューブの他端は皮下をマウスの背頸部まで通して後で接続できるように留置する。切開した腹部および背頸部皮膚を縫合閉創する。2日後マウスの背頸部よりシリコンチューブ端を出し、三方活栓を用いて、1ccシリンジ、auto microシリンジとトランスジューサーに接続し、無拘束無麻酔下で膀胱内圧測定を行う。1ccシリンジをバックアップし、膀胱内残尿を除去後 auto microシリンジにて室温生食を0.01ml/min膀胱に注入し、尿道口から排尿が観察された時点で、生食の注入を停止し、膀胱容量と最大排尿時圧を記録する。注入量を膀胱容量として、膀胱内残尿量を測定する。排尿量=注入量-残尿量とする。1匹マウスごとに5分間以上の間隔をあけて膀胱内圧測定を行う。さらに、律動性膀胱収縮モデルを作成してマウスでの膀胱機能を調べる。マウスの膀胱にカテーテルを挿入し、尿道を結紮して膀胱内に0.35mlの生食水を注入したときにみられる膀胱の律動的な収縮反応を記録する。また、頻尿モデルを作成してマウスの膀胱機能を調べる。マウスの膀胱にカテーテルを挿入し、一定の割合で生食水を注入していったときの排尿間隔を調べる。

④ 尿道狭窄モデル

尿道狭窄モデルを作成して膀胱機能・膀胱の肥大に及ぼす $\alpha 1$ アドレナリン受容体各サブタイプの生理機能を明らかにする。尿道狭窄モデルの作製条件として8週令の雌マウスの尿管を弱めに狭窄し、狭窄後1, 2, 3, 4週目における膀胱を摘出し膀胱重量を測定し、さらに肥大した膀胱に発現している $\alpha 1$ 受容体各サブタイプの発現量の解析RT-PCR法並びにTaqMan probeを用いて定量を行う。また、摘出膀胱については $\alpha 1$ 受容体刺激剤であるフェニレフリンによる収縮反応に対する選択的 $\alpha 1D$ 受容体遮断剤であるBMY7378や $\alpha 1$ 受容体遮断剤であるブナゾシンの作用を検討する。

4. 研究成果

(1) $\alpha 1$ アドレナリン受容体三重欠損マウス ($\alpha 1$ ABD-KO) の作成

$\alpha 1$ A-KO, $\alpha 1$ B-KO, $\alpha 1$ D-KO, $\alpha 1$ AB-KO, $\alpha 1$ AD-KO, $\alpha 1$ BD-KOは既に作成している。 $\alpha 1$ AD-KO ($\alpha 1$ A-/-B+/+D-/-マウス) と $\alpha 1$ BD-KO ($\alpha 1$ A+/+B-/-D-/-マウス) の交配を行い、 $\alpha 1$ A+/+B+/+D-/-マウスの作成を行った。さらに、 $\alpha 1$ A+/+B+/+D-/-マウス同士の交配により、 $\alpha 1$ A-/-B-/-D-/-マウス ($\alpha 1$ ABD-KO) の作成を行った。 $\alpha 1$ AD-KOと $\alpha 1$ BD-KOの交配成功率は、約50%であった。 $\alpha 1$ A+/+B+/+D-/-マウス同士の交配により、約4%の割合で $\alpha 1$ A-/-B-/-D-/-マウス ($\alpha 1$ ABD-KO) が生まれた。

(2) 生殖能力に関する解析

① 妊娠成功率の解析

♂ $\alpha 1$ A-KO, $\alpha 1$ AB-KO, $\alpha 1$ ABD-KOと♀コントロールマウスとの交配成功率はそれぞれ約50%、50%、5%であった。この結果より雄の生殖能力又は射精機能の低下は $\alpha 1$ A受容体に依存していると推定された。

② 性行動の観察

性行動に異常がないかどうか上記の雄雌マウスを交配後(同じケージに移した後)1時間の性行動(マウンティング)を観察したが、コントロールマウスに比べて有意差は認められなかった。この結果より性行動には異常はないものと考えられた。

③ 交配後雌子宮内残存精子数の測定

交配後の雌子宮内残存精子数は、 $\alpha 1$ A-KO, $\alpha 1$ AB-KO, $\alpha 1$ ABD-KOとも有意に低下していた。

④ 雄マウスの精巣・精巣上体・輸精管における精子数の測定

$\alpha 1$ A-KO, $\alpha 1$ AB-KO, $\alpha 1$ ABD-KOとも精巣における精子数には差は認められなかったが、輸精管の精子数は有意に低下していた。

⑤ 雄マウスの精巣・精巣上体・輸精管の組織重量ならびに病理組織学的解析

病理組織学的には変化は認められなかった。

⑥ 雄マウスの精巣・精巣上体・輸精管・精囊線における $\alpha 1$ 受容体各サブタイプの発現量の解析

$\alpha 1$ A-KOマウスでは、 $\alpha 1$ Aおよび $\alpha 1$ D受容体の発現が亢進し、 $\alpha 1$ AB-KOでは $\alpha 1$ D受容体の発現の亢進が認められた。

⑦ 薬物を用いた輸精管・精囊線の収縮反応
ノルエピネフリンに対する輸精管の収縮反応は、 $\alpha 1$ A-KOおよび $\alpha 1$ AB-KOで著名に低下、 $\alpha 1$ ABD-KOでは完全に消失していた。

⑧ 電気刺激を用いた輸精管・精囊線の収縮反応

電気刺激に対する輸精管の収縮反応は、 $\alpha 1$ A-KOおよび $\alpha 1$ AB-KOで著名に低下、 $\alpha 1$ ABD-KOでは完全に消失していた。

⑨ 人工授精による受精能力の解析

人工授精による受精能力はそれぞれのマウスで差は認められなかった。

⑩ 精子活動度の解析

精子活動度はそれぞれのマウスで差は認められなかった。

(3) 膀胱機能の解析

① 体重、膀胱重量および組織

膀胱の重量、重量比(体重に対する)及び組織に変化は認められなかった。

② 24時間排尿パターン

雄性1A KOの総排尿量および排尿回数は雄性1A WTのそれらの値より有意に多かったが、一回排尿量は両群間で差を認めなかった。同様に雌性1A KOの総排尿量および排尿回数は雌性1A WTのそれらの値より有意に多かったが、一回排尿量は両群間で差を認めなかった。雄性1D KOの総排尿量および一回排尿量が雌性1D WTのそれらの値より有意に少なかったが、排尿回数は両群間で差を認めなかった。

③ 膀胱内圧測定

膀胱内圧に異常は認められなかった。

④ 尿道狭窄モデル

一部 $\alpha 1$ D-KOで作成解析を行ったが、有意差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Faber J, Szymeczek C, Cotecchia S, Thomas S, Tanoue A, Tsujimoto G, Zhang H. Alpha 1-Adrenoceptor-Dependent Vascular Hypertrophy and Remodeling in Murine Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(5): H2316-23.
2. Hosoda C, Hiroshima M, Sanbe A, Birumachi J, Kitamura T, Cotecchia S, Simpson PC, Tsujimoto G, Tanoue A. Blockade of both α_{1A} - and α_{1B} -adrenergic receptor-subtype signaling is required to inhibit neointimal formation in the mouse femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H514-9.
3. Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura

- H, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Alpha-1 adrenoceptor is required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol*. 2007; 152: 332-340.
4. Koshimizu TA, Tanoue A, Tsujimoto G. Clinical implications from studies of alpha1 adrenergic receptor knockout mice. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(8):1107-1112.
5. Bexis S, Cleary L, McGrath JC, Tanoue A, Tsujimoto G, Docherty JR. Alpha1D-adrenoceptors mediate nerve-evoked contractions in mouse vas deferens: evidence obtained from knockout technology. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2008; 28: 81-85.
6. Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Miyauchi N, Mizutani R, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Enhanced Vascular Contractility in Alpha1-Adrenergic Receptor-Deficient Mice. *Life Sci*. 2009; in press.

[学会発表] (計4件)

1. 藤原葉子、三部篤、田中芳夫、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人
アルファー1A⁻、1B⁻ および 1D⁻ アドレナリン受容体トリプルノックアウトマウスの血管収縮反応
第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋
2. 三部篤、田中芳夫、藤原葉子、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人
Alteration of male sexual function in alpha1A⁻, 1B⁻ and 1D⁻ adrenergic receptor triple knockout mouse.
第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋
3. 三部篤、田中芳夫、藤原葉子、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人
α1 アドレナリン受容体欠損マウスの雄性生殖機能
第49回日本平滑筋学会総会、7月4日～6日、2007、奈良(橿原市)
4. 奈佐吉久、及川令、岡本かおり、竹内章

子、竹尾聰、田上昭人、辻本豪三。α1D 受容体は恒常的活性型受容体として腸間膜動脈血管床に存在している 第81回日本薬理学会、3月17日～19日、2008、横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織
(1) 研究代表者
田上 昭人 (TANOUE AKITO)
国立成育医療センター (研究所)・
薬剤治療研究部・部長
研究者番号: 60301800

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし