

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592365

研究課題名(和文) ヒト前立腺における  $\beta_3$  アドレナリン受容体の発現とその機能の解明

研究課題名(英文) Expression and its functional role of Beta3-adrenoceptors in the human prostate

研究代表者

大塚 篤史(Otsuka, Atsushi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：90362201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト前立腺における  $\beta_1$ -アドレナリン受容体( $\beta_1$ -AR)の各サブタイプの発現とその薬理学的機能を解明し、前立腺肥大症や神経因性膀胱などの下部尿路機能障害に対して、特に  $\beta_3$  AR作動薬が新たな治療戦略となりうるか検討した。

今後も研究の継続が必要であるが、前立腺組織は  $\beta_3$ -AR作動薬により弛緩することが明らかとなり、神経因性膀胱などの下部尿路機能障害に対して  $\beta_3$  AR作動薬が新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression of beta1-, beta2- and beta3-AR mRNA in the human prostate was confirmed by RT-PCR. On immunohistochemistry, positive staining for beta1-, beta2- and beta3-AR was identified not only in prostatic smooth muscles, but also glandular epithelium. In pharmacological study in vitro, a beta 3-AR agonist concentration-dependently decreased KCL- or EFS-induced contraction of the human normal prostatic strips. In conclusion, beta3-AR agonists may have clinical benefit for lower urinary tract symptom due to either benign prostatic hyperplasia or neurogenic bladder.

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：前立腺  $\beta_1$ -アドレナリン受容体 ヒト  $\beta_3$ -アドレナリン受容体 平滑筋

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺肥大症は泌尿器科領域において日常的に遭遇する疾患であり、その頻度は加齢とともに増加する。前立腺肥大症の症状は、尿勢低下や尿線途絶などの排尿症状から頻尿・夜間頻尿・尿意切迫感などの蓄尿症状まで多岐に渡る。その症状により多くの患者の生活の質(QOL)が損なわれているとされており、今後高齢化社会を迎える我が国において重要な疾患の一つである。

前立腺肥大症の主たる治療は薬物療法と手術療法に大別される。薬物治療は、前立腺平滑筋を弛緩させることにより症状を改善させる<sub>1</sub>。α<sub>1</sub>-アドレナリン受容体遮断薬を主体として、前立腺縮小作用を有する5-リダクターゼ阻害薬、植物エキス製剤、漢方薬などが使用されている。<sub>1</sub> α<sub>1</sub>-アドレナリン受容体遮断薬や5-リダクターゼ阻害薬、あるいはその併用療法は、エビデンスレベルの高い治療として多くの臨床試験で証明されている。しかしながら、薬物治療が奏功せずに手術療法へ移行せざるを得ない患者や、副作用にて治療を継続できない患者を比較的多く経験する。そのため、現状の薬物治療が十分臨床的に満足できる状態にあるわけではなく、新たな作用機序を有する薬剤の開発が切望されている。

(2) 一方、2003年に「過活動膀胱(Overactive Bladder; OAB)」という疾患概念が国際的に提唱された。過活動膀胱は尿意切迫感を必須症状とし頻尿や切迫性尿失禁を合併する症候群である。本邦においても40歳以上の約12%に本疾患を認めるとされ、特に男性患者での最大の成因は前立腺肥大症である。

過活動膀胱の治療の主体は抗コリン薬(アセチルコリン性ムスカリン受容体遮断薬)による薬物療法であり、この薬理学的作用は直接的な膀胱平滑筋弛緩作用とされる。しかしながら、前立腺肥大症を合併する過活動膀胱患者の場合、安易な抗コリン薬の使用は、排尿困難を増悪させたり、時に残尿量増加や尿閉といった重篤な有害事象を誘発させかねず、前立腺肥大症を合併する過活動膀胱患者に対する抗コリン薬の適応やその安全性については未だに議論が絶えない。

(3) 近年、過活動膀胱に対する新たな作用機序を有する薬剤として、β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体作動薬が開発されてきた。β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体は蓄尿期における膀胱平滑筋の弛緩に関与しており、この受容体はβ<sub>1</sub>~β<sub>3</sub>の3つのサブタイプに分類されている。特にヒトでは、その主たる弛緩作用はβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体が担っているとされている(Takeda M et al. J Pharmacol Exp Ther. 1999, Igawa Y et al. Br J Pharmacol. 1999, Otsuka A et al. Int J Urol. 2008)。さらに、ラットを用いたin vivoでの研究成果から、β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体作動薬は排尿期

における膀胱平滑筋の収縮を妨げないことが明らかとなっており(Fujimura T et al. J Urol. 1999, Takeda H et al. J Pharmacol Exp Ther. 2000)。膀胱の収縮力が低下している患者や前立腺肥大症を合併している患者にも安全に使用できるのではないかと想定されている。

(4) さて、以上の背景から、二つの解決すべき重要な問題点が浮き上がってくる。第一に、ヒトの正常前立腺におけるβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体の発現やその機能について未だ十分な解明がなされていないこと、そして第二に、病的状態(前立腺肥大症など)においてβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体の発現とその機能がどう変化しているか検討されていないことである。

ヒト前立腺におけるβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体の各サブタイプの発現やその機能は、未だにほとんど明らかにされていない。ヒト前立腺ではβ<sub>1</sub>-アドレナリン受容体よりβ<sub>2</sub>-アドレナリン受容体のタンパク量の方が多いとの報告がある(Geopel M et al. Urol Res. 1997)。しかしながら、β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体に関してはその発見が比較的近年であった経緯もあり、その存在がmRNAレベルあるいは免疫組織学的染色によるタンパクレベルで報告されているのみで(Berkowitz ED et al. Eur J Pharmacol. 1995, Chamberlain PD et al. Int J Obesity. 1999)、ヒトの前立腺におけるβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体の薬理学的機能を検討した報告は皆無である。以上から、β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体作動薬がヒト前立腺に対して弛緩作用を有するのであれば、同作動薬が前立腺肥大症に対する新たな作用機序を有する薬剤となる可能性がある。特に、過活動膀胱を合併している前立腺肥大症患者や男性低活動膀胱患者において、今までは排尿障害の増悪の可能性を考慮して躊躇していた抗コリン薬と異なり、排尿障害を増悪させることなく過活動膀胱症状と排尿症状の両者を緩和できる可能性がある。

(5) ヒト前立腺におけるβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体のサブタイプの発現とその機能を網羅的に解析した報告は現在までのところ皆無である。しかしながら、実験動物での基礎研究の成果(β<sub>2</sub>-アドレナリン受容体)や、β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体がヒト前立腺において発現していることを踏まえると、おそらくβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体作動薬はヒト前立腺を弛緩させることが想定される。本研究でヒト前立腺におけるβ<sub>3</sub>-アドレナリン受容体の薬理学的機能を解明することにより、β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体作動薬が前立腺肥大症に対して新たな薬物治療の選択枝となりうるか、さらに、過活動膀胱を合併している前立腺肥大症患者や男性低活動膀胱患者において、β<sub>3</sub>-アドレナリン受容体作動薬が前立腺に対してどのような振る舞いをするのかが明らか

となる。以上より、前立腺肥大症やそれに関連する過活動膀胱・低活動膀胱に対する今後の治療指針に重要な知見が得られる可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒト前立腺における  $\beta$ -アドレナリン受容体(特に  $\beta_3$ -アドレナリン受容体)の各サブタイプの発現とその薬理学的機能を解明し、前立腺肥大症や神経因性膀胱などの下部尿路機能障害に対する新たな治療戦略となりうるか検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象・試料作成

前立腺肥大症に対する治療のため経尿道的前立腺切除術(TUR-P)または被膜下前立腺摘除術が必要な男性患者、あるいは泌尿器悪性腫瘍(膀胱癌・尿道癌など)に対する治療のため前立腺を含む臓器の摘出手術(膀胱全摘除術など)が必要な男性患者を対象とする。前者から採取した組織を前立腺肥大症組織、後者から採取し臨床的に前立腺肥大症を認めないものを正常前立腺組織(コントロール)とする。

上記対象患者のうち、倫理委員会にて承認された同意説明文書を用いて、研究目的で前立腺組織の一部を採取することをヘルシンキ宣言に基づき十分にインフォームド・コンセントを行った上で書面にて同意を得る。ただし、前立腺癌を合併している者またその可能性がある者、放射線治療や全身化学療法を実施した既往がある者、著しい尿路感染症を合併している者、インフォームド・コンセントの取得が困難と考えられる認知症を有する者、その他主治医が不相当と判断した者は除外する。なお、摘出された前立腺の一部を試料として研究用に利用することは、すでに本学倫理委員会の承認を得ている。

ヒト前立腺の摘出標本の一部は、RT-PCRなどの分子生物学的研究に使用するため可及的速やかに処理した後に実験を行うまで  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存する。また、残りの一部から結合組織などの不要部分を切除して前立腺切片を作成し機能的実験に使用することとする。

### (2) 分子生物学的実験

凍結保存しておいた正常前立腺組織ならびに前立腺肥大症組織から Total RNA を抽出し、逆転写にて cDNA を作成する。これを PCR 反応で増幅させ PCR 産物をアガロースゲル上で電気泳動し、 $\beta$ -アドレナリン受容体の各サブタイプの mRNA の発現を確認する。なお、実験手順については、我々の過去の報告(Otsuka A, et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2008;377:473-81.)を参考にして実施する。

### (3) 免疫組織化学染色

正常前立腺組織ならびに前立腺肥大症組織のパラフィンブロックからパラフィン切片を作成する。 $\beta$ -アドレナリン受容体の各サブタイプのウサギポリクローナル抗体を一次抗体に用いて、 $\beta$ -アドレナリン受容体の各サブタイプの発現部位を同定する。なお、詳細な手順については、Otsuka A et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (2008)を参考に実施する。

### (4) 薬理学的機能実験

手術摘出標本から得られた正常前立腺組織ならびに前立腺肥大症組織の前立腺切片を栄養液(Krebs-Henseleit 液)で満たした Organ Bath 内に懸垂し、定常的な静止張力に安定させた後に等尺性弛緩実験を行う。詳細な手順については、Otsuka A et al. Int J Urol (2008) や Otsuka A et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (2008)などを参考に実施する。

塩化カリウム収縮下での等尺性弛緩実験安定した静止張力を確認後、塩化カリウム収縮による平滑筋切片の強制的収縮を引き起こし、収縮が安定したところで非選択的  $\beta$ -AR 作動薬(イソプロテレノール)、選択的  $\beta_1$ -AR 作動薬(ドブタミン)、選択的  $\beta_2$ -AR 作動薬(プロカテロール)、選択的  $\beta_3$ -AR 作動薬(Agent X\*)のそれぞれを濃度依存的に累積投与し、ヒト前立腺組織に対する弛緩作用を検討した。切片の最大弛緩(100%)は、フォルスコリン( $1\mu\text{M}$ )による弛緩とした。これにより、 $\beta$ -アドレナリン受容体のどのサブタイプにより優位に弛緩作用が行われているか検討した。

\*: Agent X については、諸般の事情によりその名称・構造式等は現在開示できない。しかしながら、ヒト  $\beta_3$ -AR に対する作動活性は、非選択的  $\beta$ -AR 作動薬(イソプロテレノール)とほぼ同等であることが判明している。そこで、本報告書ではその化合物を Agent X として記載する。

### 電気刺激下での等尺性弛緩実験

安定した静止張力を確認後、電気刺激(Electrical field stimulation, EFS)による平滑筋切片の律動的な強制収縮を引き起こさせる。収縮が安定したところで、非選択的  $\beta$ -AR 作動薬(イソプロテレノール)、選択的  $\beta_1$ -AR 作動薬(ドブタミン)、選択的  $\beta_2$ -AR 作動薬(プロカテロール)、選択的  $\beta_3$ -AR 作動薬(Agent X\*)のそれぞれを累積投与しながら律動性収縮の振幅の変化などを測定する。これにより、各種  $\beta$ -アドレナリン受容体作動薬が前立腺切片の律動性収縮を濃度依存性に低下させるかどうか検討し、 $\beta$ -アドレナリン受容体のどのサブタイプにより優位に収縮が抑制されるか検討した。

## 4. 研究成果

(1) 分子生物学的実験 (RT-PCR)

ヒトの正常前立腺組織ならびに前立腺肥大症組織において、 $\beta$ -AR の各サブタイプ ( $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR,  $\beta_3$ -AR) の mRNA の発現が確認した (図 1)。

(2) 免疫組織化学染色

ヒト摘出前立腺の顕微鏡的正常部分から作成したパラフィン切片において、 $\beta$ -AR の各サブタイプ ( $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR,  $\beta_3$ -AR) が、前立腺平滑筋ならびに前立腺上皮にも発現していることを確認した。

(3) *in vitro* での薬理学的実験

塩化カリウム収縮下での評価

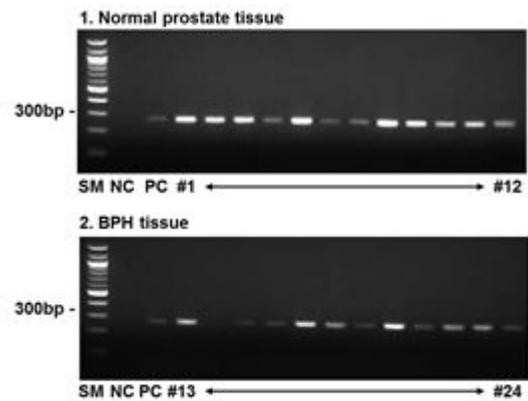
正常前立腺切片において、イソプロテレノール、Agent X ならびにプロカテロールは、濃度依存的にヒト尿管平滑筋切片に対する弛緩作用を示した。その弛緩作用の強さは、イソプロテレノール > Agent X > プロカテロール > ドブタミンの順であった (図 2A)。

電気刺激的 (EFS) 収縮下での評価

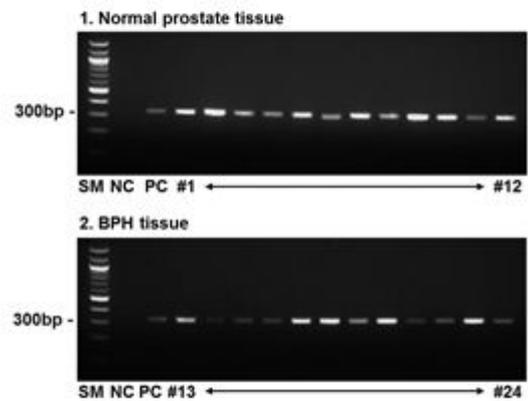
正常前立腺切片においてイソプロテレノール、ドブタミンならびに Agent X は、濃度依存的にヒト尿管平滑筋切片に対する収縮の振幅を減弱させる効果を示した。その作用の強さは、イソプロテレノール > ドブタミン > Agent X の順であった (図 2B)。

Fig 1. mRNA expression of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes

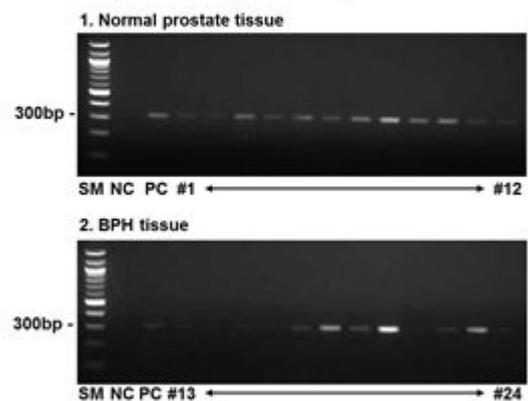
A. mRNA expression of  $\beta_1$ -adrenoceptor



B. mRNA expression of  $\beta_2$ -adrenoceptor

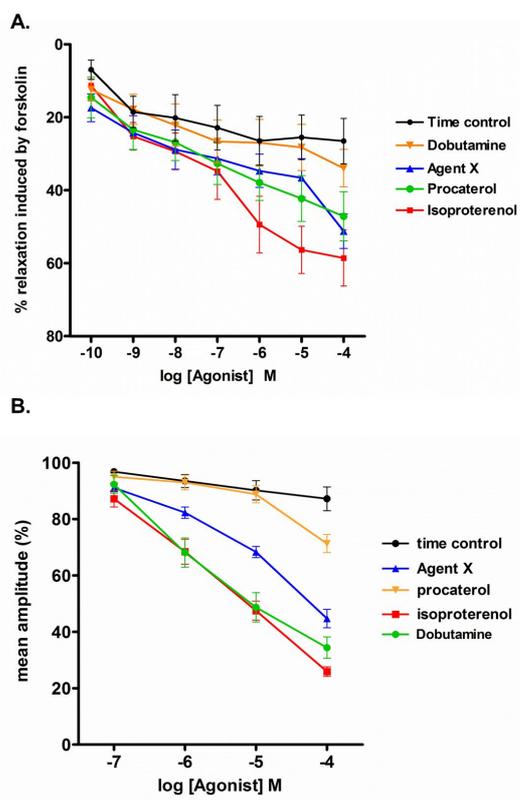


C. mRNA expression of  $\beta_3$ -adrenoceptor



SM: size marker, NC: negative control  
PC: positive control (CHO cells expressing  $\beta_1$ -AR)  
#1-24: case number from 1 to 24

Fig 2. (A) Relaxant effects of  $\beta$ -AR agonists on 40 mM KCL-induced contraction and (B) Inhibitory effects of  $\beta$ -AR agonists on electrical field stimulation (EFS)-induced contraction of human normal prostate tissue



## 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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権](計 0件)

[その他] 特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚篤史 (Atsushi Otsuka)  
 浜松医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90362201

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし