

平成21年 6月 4日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580316

研究課題名（和文）血小板活性化機構におけるイミダズリン受容体の役割

研究課題名（英文）ROLE OF IMIDAZOLINE RECEPTORS IN THE PLATELET ACTIVATION SYSTEM

研究代表者

日笠 喜朗（HIKASA YOSHIKAI）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30165071

研究成果の概要：血小板活性化機構におけるイミダズリン受容体(I-受容体)の役割を解明するために、ウシ、ウマ、ラットの血小板における I-受容体および $\alpha_2$ -アドレナリン受容体( $\alpha_2$ -受容体)のサブタイプとその情報伝達経路を検討し、I-受容体を介する血小板凝集能を解析した。その結果、ウシ、ウマおよびラット血小板には $\alpha_2$ -受容体がなく、I-受容体の2つのサブタイプの存在を明らかにした。ウマの血小板 I-受容体数はイヌとネコに比べ多く、I<sub>1</sub>-受容体はGTP結合蛋白質に共役していることを明らかにした。さらに、血小板凝集の解析より、ウシ血小板凝集を抑制する作用は I<sub>1</sub>-受容体を介することを示唆した。このような動物種による血小板の種類や数の相違は I-受容体の作用の解明に有用である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：血小板・薬物受容体・イミダズリン・細胞膜・凝集・アドレナリン・GTP結合蛋白質・ウシ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 血小板の活性化は、血栓症、止血機能などの循環系疾患や免疫学的機能に極めて重要な役割を有している。血小板には多くの受容体の存在が認められており、その活性化経路も多様である。 $\alpha_2$ -アドレナリ

ン受容体( $\alpha_2$ -受容体)は中枢と末梢のニューロンのみならず、血小板、血管内皮細胞のような神経以外の細胞にも広く存在し、循環調節、血小板凝集などの極めて重要な生理的役割を担っている。 $\alpha_2$ -アドレナリン受容体( $\alpha_2$ -受容体)作用薬の多くはイミ

ダズリン誘導体であるが、動物種、組織間での感受性や作用にかなりの相違があり、この点について薬理学的および分子生物学的手法を用いてその受容体解析が行われた結果、新たにイミダズリン受容体(I-受容体)が中枢および末梢に広く存在することが明らかにされた。

(2) 現在、I-受容体は少なくとも2つの主要なサブタイプ  $I_1$ -受容体と  $I_2$ -受容体に分類されることが確認されている。クロニジン親和性の  $I_1$ -受容体は細胞膜に存在し、脳幹、腎臓、クロマチン細胞および血小板などに分布し、主に血圧調節や心筋の収縮に影響を与えている。 $I_1$ -受容体は細胞膜上に位置し、GTP 結合蛋白との共役を有していると推定されている。一方、クロニジン低親和性、イダズキサン高親和性の  $I_2$ -受容体は主にミトコンドリア膜に存在し、その体内分布は脳皮質、星状膠細胞、腎臓、肝臓、副腎髄質、血小板、脂肪細胞、膵臓、血管など広範囲であり、その作用はモノアミンオキシダーゼ活性の調節への関与が示唆されている。この他にも、膵臓  $\beta$  細胞のインスリン分泌や心血管系の交感神経終末におけるノルエピネフリンの放出抑制へのI-受容体の関与も示唆されている。この点に関して、筆者はイヌとネコの利尿作用および糖代謝におけるイミダズリン誘導体および非イミダズリン誘導体  $\alpha_2$ -受容体作用薬の反応解析からインスリン、カテコラミン、バソプレシン分泌におけるI-受容体の関与を示唆している。このように、イミダズリン受容体は生体にとって極めて重要な役割を担っている可能性が考えられ、その作用から、高血圧、血栓症などの循環器疾患、うつ病などの精神疾患、糖尿病などの代謝疾患への臨床応用が期待できる。

(3) 最近、血小板にもI-受容体が存在することがヒトで明らかにされたが、各種動物におけるI-受容体の存在とその機能の詳細は明らかでない。一方、血小板の受容体と脳の受容体との相関性も認められており、精神性疾患や老化、遺伝、ストレス、炎症などの様々な要因における受容体異常の臨床診断および治療への応用が考えられている。 $\alpha_2$ -受容体およびI-受容体において、脳と血小板の受容体には、うつ病、アルツハイマー病、パーキンソン病などの精神疾患、うつ血性心不全や血栓症などの循環器疾患においてその相関性も認められている。

(4) 本研究は、新規I-受容体を介する新しい血小板活性化機能を明らかにすることにより、血栓症に代表される循環系疾患の病態、免疫機能への影響、各種疾患の臨床診断に役立てようとするもので、最終的には血小板活性化にかかわる新しい薬物療法の確立を目指すものである。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、血小板活性化機構におけるI-受容体受容体の役割を解明することを目的とした。

(2) この目的に対して、各種動物(ウシ、ウマ、ラット、イヌ、ネコ)の血小板におけるイミダズリン受容体および $\alpha_2$ -アドレナリン受容体の存在とそのサブタイプを明らかにし、血小板活性化経路の一端を明らかにした。

(3) さらに、血小板凝集能に及ぼすイミダズリンおよび $\alpha_2$ -アドレナリン受容体活性の変化を解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 各種動物の血小板におけるイミダズリン受容体および $\alpha_2$ -アドレナリン受容体の存在とサブタイプの解析

① イヌとネコ血小板における $\alpha_2$ -受容体とI-受容体の存在とサブタイプは既に明らかにしているため、ウシ、ウマおよびラットの血小板における解析を行う。各動物の頸静脈から採血を行い、遠心分離法により多血小板浮遊液を作成した後、ホモゲナイズと超遠心分離法により血小板粗膜を分離・精製した。この精製した血小板粗膜溶液を用いて、以下のラジオレセプターアッセイを行った。

②  $\alpha_2$ -受容体への結合実験では、非特異結合にノルエピネフリンを用い、 $[^3\text{H}]$ -ヨヒンビンおよび $[^3\text{H}]$ -クロニジンの特異結合に対する飽和実験と各種薬物による置換実験を行った。I-受容体への結合実験では、標識リガンドはイミダズリン  $I_1$ ,  $I_2$  サイトにそれぞれ親和性の高い、 $[^3\text{H}]$ -クロニジンと $[^3\text{H}]$ -イダズキサンを用い、飽和実験と置換実験を行った。競合薬には過去に報告されているイミダズリン受容体への親和性ランクオーダーを基に、11種類のイミダズリンおよび非イミダズリン薬物を選択して実験を実施した。イミダズリン受容体への標識リガンドの飽和実験では、標識リガンドの $\alpha_2$ -受容体への結合を阻止するために、ノルエピネフリンを添加した。

③以上の方法により、各種動物の血小板における $\alpha_2$ -受容体とイミダゾリン受容体のサブタイプおよびそれぞれの受容体数と親和性を比較した。

(2) 血小板上のイミダゾリン受容体と GTP 結合蛋白質との共役に関する解析

①イミダゾリン  $I_1$ -,  $I_2$ -受容体のラジオレセプターアッセイによる飽和実験および置換実験に対するグアニンヌクレオチド添加の効果、すなわちGTP-シフト効果を検討した。

②各種動物の血小板膜における受容体結合実験の標識リガンドには、イミダゾリン  $I_1$ -および  $I_2$ -受容体にそれぞれ親和性の高い、 $[^3H]$ -クロニジンおよび  $[^3H]$ -イダゾキサンを用いる。グアニンヌクレオチドには、GTP、GTP $\gamma$ S および Gpp(NH)p を用いた。

(3) イミダゾリン受容体および $\alpha_2$ -アドレナリン受容体作用薬の血小板凝集能に及ぼす影響

①ウシの血小板凝集について、血小板凝集能はクエン酸加多血小板血漿を用いて透光度法により測定した。

②イミダゾリンおよび非イミダゾリン誘導体の各 $\alpha$ -アドレナリン受容体作動薬単独での血小板凝集能を調べた後、凝集惹起物質の ADP、コラーゲンおよびトロンビン凝集に対する血小板凝集促進効果または凝集抑制効果を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) ウシ、ウマおよびラットの血小板上のイミダゾリン受容体(IR)、 $\alpha_2$ -アドレナリン受容体( $\alpha_2R$ )の存在とそのサブタイプおよびそれを介する情報伝達経路について

①ウシにおける血小板膜受容体の飽和実験において、 $\alpha_2R$ に対する標識薬物の特異結合は認められなかった。しかし、ノルエピネフリン存在下での標識薬物飽和実験から非アドレナリン受容体結合部位の存在が確認された。 $I_1R$  選択的標識薬物の結合置換実験において高親和性と低親和性の二相性の置換曲線を示し、親和性は Guanabenz  $\geq$  oxymetazoline  $>$  moxonidine  $\gg$  idazoxan の順位を示した。 $I_2R$  選択的標識薬物の結合は 1-site 結合性の置換曲線を示し、その親和性は Oxymetazoline  $>$  guanabenz  $\geq$  clonidine  $>$  moxonidine の順位を示した。このことから、ウシ血小板には $\alpha_2R$ がなく、IRの存在が示された。ウシ IR には、薬物親和性の違いから2つのサブタイプ ( $I_1R$  と  $I_2R$ ) の存在が示唆された。

②ウマにおける血小板膜についてもウシと同様な実験を行ったところ、ウマ血小板にはウシと同様に $\alpha_2R$ がなく、IRの存在が示され

た。ウマ IR には、薬物親和性の違いから2つのサブタイプ ( $I_1R$  と  $I_2R$ ) の存在が示唆された。ウマの血小板 IR 数はイヌとネコに比べ多く、ウマの  $I_2R$  数はウシに比べ多かった。

③ラット血小板では、 $\alpha_2R$  に対する  $[3H]$ -Yohimbine および  $[3H]$ -Clonidine の結合はほとんど認められなかった。非アドレナリン受容体では Norepinephrine 存在下で  $[3H]$ -Clonidine の結合はほとんど認められず、 $[3H]$ -Idazoxan の結合のみ飽和曲線が得られた。 $[3H]$ -Idazoxan の結合において、Bmax (fmol/mg protein) と Kd (nM) の平均はそれぞれ 264 と 8.9 を示した。置換実験において、 $[3H]$ -Idazoxan 結合に対する置換曲線は一相性を示し、その親和性は  $K_i$  値により Naphazoline  $>$  Moxonidine の順になり、Naphazoline の方が 100 倍以上の高親和性を示した。このことから、ラット血小板には $\alpha_2R$ が少なく、非アドレナリン受容体が存在することがわかった。また、ラット血小板の  $I_1R$  は Clonidine 非親和性であり、このことから  $I_1R$  が存在しないか、他の動物種とは薬理的親和性が異なる可能性が示唆された。

④ $\alpha_2R$  が存在しないウシ血小板を用いて、IR における GTP 結合蛋白質への関与についての検討を行った。 $I_1R$  では GTP、GTP $\gamma$ S、Gpp(NH)p の添加群全てにおいて、対照群と比較して高親和性領域の  $I_1R$  に対する薬物親和性が有意に低下した。 $I_2R$  では、GTP、GTP $\gamma$ S の添加群全てにおいて、対照群と比較して  $I_2R$  に対する薬物親和性に有意差は見られなかった。このことから、 $I_1R$  は GTP 結合蛋白質に共役している可能性が高く、 $I_2R$  は GTP 結合蛋白質に関与していないと考えられた。

(2) ウシ血小板上のイミダゾリン受容体(IR)を介する血小板機能の一端

①イミダゾリンおよび非イミダゾリン誘導体 $\alpha$ -アドレナリン受容体遮断薬がウシ血小板凝集に及ぼす影響を検討した結果、6種類の薬物はすべてADPによる一次凝集の促進効果あるいはADPによる完全凝集の抑制効果を示さなかった。

②フェントラミンはコラーゲン凝集を用量依存性に有意に抑制した。ヨヒンビン、アチパメゾール、トラゾリンでもコラーゲン凝集の抑制がみられた。しかし、イダゾキサン、プラゾシンはコラーゲン凝集の抑制を示さなかった。

③今回の薬物がADP凝集の抑制は示さず、数種の薬物でコラーゲン凝集の抑制が示したことは、ヒト、イヌ、ネコと比較するとウシだけで見られる反応であった。

④ I<sub>2</sub>-R 選択性の高いイダゾキサンの抑制が起きず、非選択的 I-R 結合活性を持つフェントラミン、アチパメゾール、トラゾリンでコラーゲン凝集の抑制が認められたことから、ウシ血小板凝集を抑制する作用は I<sub>1</sub>-R を介して起きている可能性が考えられた。(3) 以上のような動物種による血小板の種類や数の相違は I-R の作用の解明に有用である。今後は I-R の作用機序の研究を進め、I-R 作用薬の諸作用を明らかにしていくことによって血小板だけでなく全身諸臓器への臨床応用に発展していくことが期待される。さらに、本研究成果は I-R を介した血小板凝集における情報伝達経路の基礎的情報となると考えられる。

#### 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 Talukder M. H., Hikasa Y., Takahashi H., Sato K. and Matsuu A.: Antagonistic effects of atipamezole and yohimbine on medetomidine induced diuresis in healthy dogs. Can. J. Vet. Res. (in press, October), 2009, 査読有
- ② Talukder M. H. and Hikasa Y.: Diuretic effects of medetomidine compared with xylazine in healthy dogs. Can. J. Vet. Res. (in press, July), 2009, 査読有
- ③ Talukder M. H., Hikasa Y., Matsuu A. and Kawamura H.: Antagonistic effects of atipamezole and yohimbine on xylazine induced diuresis in healthy dogs. J. Vet. Med. Sci. 71, 539-548, 2009, 査読有
- ④ Kanda T. and Hikasa Y.: Effects of medetomidine and midazolam alone or in combination on the metabolic and neurohormonal responses in healthy cats. Can. J. Vet. Res. 72, 332-339, 2008, 査読有
- ⑤ Kanda T. and Hikasa Y.: Neurohormonal and metabolic effects of medetomidine compared with xylazine in healthy cats. Can. J. Vet. Res. 72, 278-286, 2008, 査読有
- ⑥ Ueoka N, and Hikasa Y.: Antagonistic effects of atipamezole, flumazenil, and 4-aminopyridine against anaesthesia with medetomidine, midazolam, and ketamine combination in cats. J. Feline Med. Surg. 10, 47-54, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① M.H. Talukder、佐藤加奈子、松鶴彩、且笠喜朗: 犬におけるメデトミジンの利尿作用に対するアチパメゾールおよびヨヒンビンの拮抗効果、平成 20 年度日本小動物獣医学会 [中国]、講演要旨集 p. 57、米子市、2008 年 10 月
- ② 且笠喜朗、松田 彬、松鶴 彩、伊藤宏泰: 組織ドブラ法を用いたイヌの心機能に及ぼす各種自律神経作用薬の影響、平成 19 年度日本小動物獣医学会 [中国]、講演要旨集 p. 44、山口市、2007 年 10 月
- ③ Talukder M.H., Hikasa Y., Takahashi H.: Diuretic effects of medetomidine and xylazine in healthy dogs. Proceedings of 13<sup>th</sup> International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium (IVECCS), pp. 928, Hilton Riverside Hotel, New Orleans, USA, Sep. 27, 2007
- ④ Hikasa Y., Talukder M.H., Sato K.: Antagonistic effects of atipamezole and yohimbine against medetomidine induced diuresis in healthy dogs. Proceedings of 13<sup>th</sup> International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium (IVECCS), pp. 919, Hilton Riverside Hotel, New Orleans, USA, Sep. 27, 2007
- ⑤ Talukder Hasanuzzaman、高橋 元、佐藤加奈子、且笠喜朗: 犬におけるキシラジンおよびメデトミジンの利尿効果の比較、第 144 回日本獣医学会学術集会、講演要旨集 p. 153、酪農学園大学、江別市、2007 年 9 月
- ⑥ 神田鉄平、松鶴 彩、且笠喜朗: 猫におけるメデトミジンとミダゾラムの併用が神経内分泌および代謝に及ぼす影響、第 144 回日本獣医学会学術集会、講演要旨集 p. 153、酪農学園大学、江別市、2007 年 9 月

[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

日笠 喜朗 (HIKASA YOSHIAKI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30165071

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

松田 浩珍 (MATSUDA HIROSHI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究  
部・教授

研究者番号：80145820

佐藤耕太 (SATO KOTA)

北海道大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50283974

### (4) 研究協力者

松鶴 彩

鳥取大学農学部獣医内科学准教授

M. H. Talukder、神田鉄平、伊藤宏泰

山口大学大学院連合獣医学研究科臨床獣  
医学専攻生

高橋 元、佐藤加奈子、松田 彬

鳥取大学農学部獣医内科学講座専攻生