

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591837
研究課題名（和文） ノックアウト動物を用いた下部尿路 $\alpha$ 1L アドレナリン受容体の分子実体の解明
研究課題名（英文） Molecular identification of $\alpha$ 1L adrenoceptor in the mouse lower urinary system using $\alpha$ 1 adrenoceptor knock-out mice
研究代表者 森島 繁 (MORISHIMA SHIGERU) 福井大学・医学部・准教授 研究者番号：50290911

研究成果の概要：下部尿路 $\alpha$ 1L アドレナリン受容体は、前立腺肥大症の治療薬のターゲットとして大変重要である。しかし、 $\alpha$ 1L アドレナリン受容体の分子実体は未だクローニングされていない。我々は、 $\alpha$ 1A アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは $\alpha$ 1L アドレナリン受容体の発現が、結合法でも、機能実験でも消失することを発見した。 $\alpha$ 1B や $\alpha$ 1D アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは、野生型と変化しなかったことなどから、 $\alpha$ 1L アドレナリン受容体は、 $\alpha$ 1A アドレナリン受容体遺伝子からできる $\alpha$ 1A アドレナリン受容体とは異なった表現型を持つ受容体であることを示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：前立腺,  $\alpha$ 1 アドレナリン受容体, ノックアウト動物,  $\alpha$ 1L アドレナリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) アドレナリン受容体

交感神経系において、神経伝達物質であるノルアドレナリンや、副腎より分泌されるアドレナリンは、アドレナリン受容体に結合して作用をします。アドレナリン受容体には、大きく分類して、 $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 受容体の3つに分類されますが、以前より、下部尿路系、とくに前立腺や輸精管の収縮において、 $\alpha$ 1 アドレナリン受

容体がかつとも重要な働きをしていることが、よく知られています。また、近年、前立腺肥大症(BPH)の治療に、 $\alpha$ 1 アドレナリン受容体遮断薬が有効であることが明らかになってきました (Andersson, *World J. Urol.*, 19:390, 2002)。

(2)  $\alpha$ 1 アドレナリン受容体は、 $\alpha$ 1 アドレナリン受容体の遺伝子をクローニングする過程で、この受容体はさらに3つのサブタイプに分類できることが分かってきました。3つの受容体は、 $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1B,  $\alpha$ 1D と呼ばれて

おり、薬理的にはっきりと異なった性質を有しています。

ところが、これまでの私たちや多くの人の研究により、下部尿路系には、薬理的に上記の3つのサブタイプのどれにも当てはまらない、 $\alpha 1L$  受容体というサブタイプが発現していることが、細胞生物学的・薬理的な研究から分かってきました(Morishima, *J. Urol.*, 2007)。右上の表に、サブタイプごとの代表的な薬物に対する感受性を示します。

### (3) 下部尿路特異的アドレナリン受容体

ノルアドレナリンによるヒト前立腺の収縮は、シロドシンで抑制されますが、低濃度のプラゾシンでは抑制されないことから、前立腺の $\alpha 1$  受容体は $\alpha 1L$  サブタイプであることがわかります。同じように、輸精管や、膀胱頸部でも収縮を司る $\alpha 1$  受容体は $\alpha 1L$  サブタイプであることが、ほぼ明らかになっています。このサブタイプは、血管など他の部位にはほとんど発現していないことが分かっています。BPH 治療のために大量に $\alpha 1$  受容体遮断薬を投与すると、血圧が低下したり、立ちくらみが起こることが知られていますが、 $\alpha 1L$  サブタイプに選択的な薬物であれば、他の臓器に影響を与えることなく、下部尿路の機能を調節することができます。このように $\alpha 1L$  サブタイプの研究は、下部尿路の機能の調節や、前立腺肥大症の治療にたいへん重要です。

## 2. 研究の目的

### (1) $\alpha 1L$ 受容体は $\alpha 1A$ 受容体と同じ遺伝子から作られるのか？

ところが、他の $\alpha 1$  受容体サブタイプと異なり、 $\alpha 1L$  アドレナリン受容体は、遺伝子がクローニングされておらず、その分子の実体が不明です。 $\alpha 1$  受容体のサブタイプが新たに存在する可能性は、ゲノムプロジェクトが完成した今となっては、まず見つかることはないと思われます。スプライスバリエーションも、多くの研究者によって網羅的に検討されましたが、 $\alpha 1L$  アドレナリン受容体の薬理的性質を示すものは同定できませんでした。

一方、薬理的に $\alpha 1L$  アドレナリン受容体の発現が認められる前立腺の mRNA を *in situ hybridization* や RT-PCR にて同定すると、 $\alpha 1A$  アドレナリン受容体の発現が多いことの最近我々は、ラットの脳で、 $\alpha 1L$  受容体が発現していることを、組織をそのまま使う薬理的結合法（組織結合法）を用

いて明らかにしました。ホモジュネートを用いる従来の結合法では、 $\alpha 1L$  受容体は見つかりません。（2006 年国際薬理学会にて発表）。このことから、 $\alpha 1L$  受容体は $\alpha 1A$  受容体に変化したことを示唆しています。我々は、 $\alpha 1L$  受容体と $\alpha 1A$  受容体は同じ遺伝子から発現するが、右の図に示すように正常の組織環境でのみ $\alpha 1L$  受容体は存在することができ、膜の環境または、ある種の補助蛋白が共存出来なくなると、 $\alpha 1L$  受容体は $\alpha 1A$  受容体に変化してしまうという仮説を立てました。

## 3. 研究の方法

### (1) 放射性同位元素 ( $[^3H]$ ) ラベルリガンドを用いた結合実験

結合実験を用いれば、受容体の薬理的な性質を明らかにし、また受容体の発現量を定量することができる。従来の結合法は、細胞や組織をホモジュネートし、膜分画を用いて結合実験を行ってきた。私たちは、この方法に加えて、組織や細胞をそのまま結合実験に供する組織片結合法を用いた。

### (2) 前立腺などの収縮刺激に対する等尺性張力の検討

$\alpha 1L$  受容体は、主として機能実験で同定されてきた。生体内の実際の組織がどのように反応するかを調べる上で、収縮を調べる機能実験が重要である。

### (3) ノックアウトマウスを用いた研究

$\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1D$  アドレナリン受容体ノックアウトマウスを用いて、結合実験ならびに機能実験で $\alpha 1L$  の同定を、行いました。

## 4. 研究成果

### (1) 機能実験

ノルアドレナリン刺激に対するラットやマウス前立腺や輸精管の収縮は、低濃度のシロドシン ( $\alpha 1A$  と $\alpha 1L$  に対するアンタゴニスト) にて抑制されるが、低濃度のプラゾシン ( $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1D$  に対するアンタゴニスト) にて抑制されないことなどから、他のほ乳類と同様、マウスにても、下部尿路系の交感神経系収縮は、 $\alpha 1L$  受容体を介するものであることが明らかになった。

### (2) 組織片結合法を用いた結合実験

ラットやマウス脳及び下部尿路系(前立腺・輸精管など)において、 $[^3H]$ -silodosin 500

pM-1000 pM の結合部位にたいして、プラゾシンは 2 相性に競合した。 $\alpha$ 1L 受容体が同定された。一方、従来の膜分画を用いた結合実験では、 $\alpha$ 1L は検出されなかった。

### (3) 膜標品を用いた結合実験

組織片結合法を用いた結合実験と異なり、組織をホモジュネートすると、組織片結合法とはことなり、 $^3\text{H}$ -silodosin 結合サイトはすべて、prazosin に対して高親和性となり、 $\alpha$ 1L 受容体は検出されませんでした。

興味深いことに、定量的な測定により、ラット大脳皮質に発現する $\alpha$ 1L 受容体は、ホモジュネートでは、消失した量の $\alpha$ 1L 受容体と等量の $\alpha$ 1A 受容体が増加することが明らかになりました。すなわち、 $\alpha$ 1L 受容体は、ホモジュネートによって、正常組織・受容体環境が壊されると、 $\alpha$ 1A 受容体に変換するらしいことを明らかにしました (Morishima, et al., Br. J. Pharmacol., 2008)。このことは、なぜ、これまで組織片結合法や機能実験でのみ $\alpha$ 1L 受容体が発見され、遺伝子レベルや、細胞をホモジュネートすると $\alpha$ 1L 受容体が消失するように見えるという事実とよく合致していました。

### (4) ノックアウト動物を用いた研究

続いて、 $\alpha$ 1A 受容体ノックアウトマウスを用いて、組織片結合法にて実験を行ったところ、野生型とは異なり、 $\alpha$ 1L 受容体が発現する全ての組織・臓器 (脳や下部尿路系) において、 $\alpha$ 1L 受容体が消失していることを明らかにしました。他の $\alpha$ 1B,  $\alpha$ 1D 受容体に対するノックアウト動物では、 $\alpha$ 1L 受容体の発現量、薬理的性質、分布などに変化は認められませんでした (Muramatsu, et al., Br. J. Pharmacol., 2008)。

$\alpha$ 1L 受容体の例に見られるように、組織により受容体の薬理的性質・表現型が異なることは、ほかにも見られることが我々の研究などによって明らかになっています (Anisuzzaman et al., J Pharmacol. Sci., 2008; Sathi et al., Eur. J. Pharmacol., 2008)。このことは、受容体をターゲットとした薬物療法において、遺伝子だけに依存する受容体分類に基づいた受容体をターゲットとしていては、生体に適合した薬物を発見できない可能性があることを意味します。

## 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 11 件)

- ① Muramatsu I., Suzuki F., Nishimune A., Anisuzzaman ASM., Yoshiki H., Su T.H., Chang C.K., Morishima S. Expression of distinct  $\alpha$ 1L adrenoceptor phenotypes in pigmented and albino rabbit iris. Br. J. Pharmacol., in press. (査読有り)
- ② Horinouchi T., Morishima S., Tanaka Y., Koike K., Miwa S., Muramatsu I. Pharmacological evaluation of ocular  $\beta$ -adrenoceptors in rabbit by tissue segment binding method. Life Sci., 84:181-187, 2009. (査読有り)
- ③ Anisuzzaman A.S.M., Morishima S., Suzuki F., Tanaka T., Yoshiki H., Muramatsu I. Identification of M1 muscarinic receptor subtype in rat stomach using a tissue segment binding method, and the effects of immobilization stress on the muscarinic receptors. Eur. J. Pharmacol. 599:146-151, 2008. (査読有り)
- ④ Muramatsu I., Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman A.S.M., Tanaka T., Rodrigo M.C., Myagmar B.E., Simpson P.C. Identification of  $\alpha$ 1L-adrenoceptor in mice and its abolition by  $\alpha$ 1A-adrenoceptor gene knockout. Br. J. Pharmacol. 155:1224-34, 2008. (査読有り)
- ⑤ Su T.H., Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman A.S.M., Tanaka T., Cheng J.T., Muramatsu I. Native profiles of  $\alpha$ 1A-adrenoceptor phenotypes in rabbit prostate. Br. J. Pharmacol. 155:906-12, 2008. (査読有り)
- ⑥ Horinouchi T., Miyake Y., Nishiya T., Nishimoto A., Morishima S., Muramatsu I., Miwa S. Functional Role of NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger in Ca<sup>2+</sup> Influx Mediated via Human Endothelin Type A Receptor Stably Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. J Pharmacol. Sci. 107:456-459, 2008. (査読有り)
- ⑦ Sathi Z.S., Anisuzzaman A.S.M., Morishima S., Suzuki F., Tanaka T., Yoshiki H., Muramatsu I. Different affinities of native  $\alpha$ 1B-adrenoceptors for ketanserin between intact tissue

segments and membrane preparations. Eur. J. Pharmacol. 584:222-28, 2008.

(査読有り)

- ⑧ Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman A.S.M., Sathi Z. S., Tanaka T., Muramatsu I. Identification of alpha-1L adrenoceptor in rat cerebral cortex and possible relationship between alpha-1L and alpha-1A adrenoceptors. Br. J. Pharmacol. 153:1485-94, 2008.

(査読有り)

- ⑨ Anisuzzaman A.S.M., Morishima S., Suzuki F., Tanaka T., Yoshiki H., Sathi Z.S., Akino H., Yokoyama O., Muramatsu I. Assessment of muscarinic receptor subtypes in human and rat lower urinary tract by tissue segment binding assay. J. Pharmacol. Sci. 106:271-279, 2008. (査読有り)

- ⑩ Horinouchi T., Morishima S., Tanaka T., Suzuki F., Tanaka Y., Koike K., Miwa S., Muramatsu I. Different changes of plasma membrane  $\beta$ -adrenoceptors in rat heart after chronic administration of propranolol, atenolol and bevantolol. Life Sci. 81:399-404, 2007. (査読有り)

- ⑪ Suzuki F., Morishima S., Tanaka T., Muramatsu I. Snapin, a new regulator of receptor signaling, augments  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor-operated calcium influx through TRPC6. J. Biol. Chem. 282:29563-29573, 2007. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 森島繁,  $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体ノックアウトマウスにおける  $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体の発現消失, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日, 横浜市
- ② 森島繁, ウサギ虹彩筋に対する  $\alpha_1$  アドレナリン受容体遮断薬長期投与の影響, 第 28 回日本眼薬理学会, 2008 年 9 月 20 日, 岡山市
- ③ 森島繁, Snapin を介する  $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体の受容体作動性  $Ca^{2+}$  流入 (ROC) 増強機構, 第 113 回日本薬理学会近畿部会, 2008 年 6 月 20 日, 岡山市
- ④ 森島繁, ヒト前立腺における蛍光リガンド Alexa-488-silodosin を用いた  $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体の組織学的同定, 第 8

1 回日本薬理学会年会, 2008 年 3 月 18 日, 横浜市

- ⑤ 森島繁, Snapin を介する  $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体の受容体作動性  $Ca^{2+}$  流入 (ROC) 増強メカニズム, 第 3 回 TRP チャネル研究会 (TRP channel conference), 2007 年 7 月 20 日, 岡崎市

- ⑥ Shigeru Morishima, Molecular and functional characterization of alpha-1L adrenoceptor, 第 5 回国際受容体シンポジウム, 2007 年 5 月 10 日, 静岡市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森島 繁 (MORISHIMA SHIGERU)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50290911

### (2) 研究分担者

村松 郁延 (MURAMATSU IKUNOBU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 10111965

鈴木 史子 (SUZUKI FUMIKO)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 80291376

横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 90242552

秋野 裕信 (AKINO HIRONOBU)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90159335

田中 高志 (TANAKA TAKASHI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40313746

### (3) 連携研究者

なし