

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590092

研究課題名(和文)血管平滑筋の異型 β 受容体：表現型の可塑性と交感神経支配の関連性の検討

研究課題名(英文) Atypical beta-adrenoceptor in vascular smooth muscle: studies on the sensitivity to propranolol and the effects of sympathetic nerve denervation

研究代表者

田中 芳夫 (TANAKA YOSHIO)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：60188349

研究成果の概要(和文)：ラット腸間膜動脈の弛緩反応に関与する β -アドレナリン受容体(β -受容体)の薬理的性質と交感神経の除神経効果について検討して、以下の新知見を得た。1) プロプラノロールに感受性を示すものと感受性を示さない2種類の β -受容体が関与する。2) 前者は主として β 1、後者は β 3で、これまでの報告とは異なる薬理的性質を有する可能性がある。3) 交感神経の除神経処置は、 β 1、 β 3のいずれを介した弛緩反応も減弱させる。

研究成果の概要(英文)：The present study was carried out to pharmacologically identify the subtype of beta-adrenoceptor that mediates relaxation of rat mesenteric artery, and to clarify the effects of chemical denervation of sympathetic nerve on beta-adrenoceptor functions, and the following new findings were obtained. 1) Beta-adrenoceptors that mediate relaxation of rat mesenteric artery are composed of two types: propranolol-sensitive and propranolol-insensitive beta-adrenoceptors. 2) Propranolol-sensitive beta-adrenoceptor is mainly beta-1 and propranolol-insensitive beta-adrenoceptor is beta-3. Beta-3 may have new pharmacological characteristics that are different from previous reports. 3) Chemical denervation of sympathetic nerves reduces the relaxant responses mediated through both beta-1 and beta-3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード： β -アドレナリン受容体、異型 β -アドレナリン受容体、 β 3-アドレナリン受容体、血管平滑筋、腸間膜動脈、プロプラノロール、ブプラノロール、交感神経除神経

1. 研究開始当初の背景

(1) Gs 蛋白質共役型受容体を代表する β -アドレナリン受容体(β -受容体)は、心筋細胞・平滑筋細胞・骨格筋細胞に高密度に発現し、これらの細胞が構成する組織/器官の神経性・ホルモン性の機能調節において重要な役割を担っていると考えられている。 β -受容体は、Landsらにより β 1-受容体と β 2-受容体に分類され、その後、Emorineらが脂

肪細胞においてアミノ酸の一次構造を決定した β 3-受容体に加わり、現在では、 β 1~ β 3の3つのサブタイプが存在が知られている(Tanaka Y et al., Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 32(7):503-514, 2005)。

(2) β -受容体は、各種疾患治療薬の重要な標的蛋白でもある。一般に、疾患治療薬の開発では、組織/器官選択性が最も重要な要因

となるが、 β -受容体においては、 $\beta 1$ と $\beta 2$ に関する発現量の器官差 (特に、心筋と気管) が明確にされていたため、サブタイプ特異的作用薬 (活性化薬・遮断薬) の開発が器官選択性治療薬の創製に直結し、循環系疾患 (高血圧・狭心症・不整脈・心不全) ($\beta 1$ -作用薬)、喘息発作・切迫性早産 ($\beta 2$ -活性化薬) に対する治療薬が数多く創られてきた。また、両サブタイプの発現分布や受容体機構の解明も飛躍的に進展した。しかし、 $\beta 3$ -受容体については、脂肪細胞で同定されたという経緯もあり、平滑筋を含む筋組織での発現と機能はほとんど注目されていなかった。

(3) 一方、申請者の研究グループは、気管・子宮平滑筋以外の平滑筋における β -受容体研究を進捗させる目的で、盲腸紐標本 (消化管平滑筋の一種) を用いた研究に取り組んでいたが、その過程で、 β -受容体には、プロプラノロール (古典的な β -遮断薬) により拮抗されるサブタイプ (プロプラノロール感受性 β -受容体, typical β -受容体) に加え、これにより全く影響を受けないサブタイプ (プロプラノロール非感受性 β -受容体, atypical β -受容体) が存在することを見出した。また、ブプラノロール ($\beta 3$ 遮断作用を有する β -遮断薬) の拮抗効果から、これが、脂肪細胞の $\beta 3$ -受容体と同一であることを突き止め、盲腸紐以外の消化管 (胃底・十二指腸) や膀胱などの平滑筋における発現も明らかにした。その後、科学研究費補助金 (基盤研究 (C)、2006-2007 年度、NO. 18590242、分担) の助成により、 $\beta 3$ -受容体研究を血管組織において展開させ、 $\beta 3$ -受容体は、胸部から腹部に亘る大動脈 (導管動脈) に発現していること、 $\beta 3$ -受容体を介した弛緩反応には、「組織 cAMP 量の上昇を伴わない新しい機構」が関与する可能性も見出した (Tanaka Y et al., *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32(7):503-514, 2005; Tanaka Y et al., *Current Topics in Pharmacology* 10(1):33-42, 2006; Matsushita M et al., *Journal of Smooth Muscle Research* 42(6):217-225, 2006)。即ち、異型 β -受容体のひとつである $\beta 3$ -受容体は、脂肪細胞のみならず、平滑筋から構成される様々な生体器官に広範囲に発現しており、その機能制御に関与している可能性が明らかとなった。

(4) これら血管平滑筋の β -受容体研究を推進する過程で、申請者は、これまでの予想とは異なる現象に遭遇した。即ち、大動脈の $\beta 3$ -受容体とは明らかに異なる薬理的性質を有した新しいサブタイプ (atypical βx) が存在する可能性を見出した。つまり、大動脈 (胸部、腹部) での解析を終えた後、血圧レベルの決定に寄与すると考えられている抵抗性血管 (腸間膜動脈) におけるイソ

プレナリンの弛緩作用を解析したところ、大動脈と同様、プロプラノロール感受性成分とプロプラノロール非感受性成分から構成されていた。しかし、後者 (プロプラノロール非感受性弛緩成分) は、ブプラノロールに対する感受性が極めて高く、大動脈で算出された $pA2$ 値 (受容体遮断薬の解離定数) よりも概算で 10 倍以上大きな値 (但し、 $\beta 1$ -や $\beta 2$ -受容体に対する値よりも 100 倍小さい値) であった。このような薬理的性質を有する β -受容体は、これまでに報告されていない。(5) この結果の解釈としては、 $\beta 1 \sim \beta 3$ のいずれにも該当しない新しいサブタイプが存在する、 $\beta 1 \sim \beta 3$ のいずれかのファルマコーム (同一遺伝子・同一タンパク由来の生体における複数の表現型) である、の 2 つの可能性が想定され、このうち、後者の可能性が高いものと予想された。つまり、大動脈と腸間膜動脈の最大の相違は交感神経の支配密度 (大動脈: 非常に低い; 腸間膜動脈: 極めて高い) であるが、ブプラノロール感受性 $\beta 3$ -受容体は表現型の可塑性が高いサブタイプであると考え、交感神経支配に依存してその薬物感受性が亢進する、あるいは、除神経により薬物感受性が低下するのではないかという仮説が成立した。この仮説は、atypical βx はノルアドレナリンが結合しうる受容蛋白であるとするならば、ノルアドレナリンによる $\alpha 1$ -受容体を介した収縮反応が腸間膜動脈よりも大動脈で亢進しているというこれまでの実験結果に合致したものであった。

2. 研究の目的

- (1) 腸間膜動脈平滑筋を対象として、ブプラノロールに高い感受性を有する異型 β -受容体 (atypical βx) の探索ならびに同定を行い、これまでに同定された $\beta 3$ -受容体との差異を解明する。
- (2) 腸間膜動脈の交感神経の除神経により、 β -受容体を介した弛緩反応がどのように影響されるのかを吟味する。

3. 研究の方法

実験にはラットから摘出し、内皮を除去した腸間膜動脈標本を用いた。

- (1) フェニレフリン ($\alpha 1$ -受容体活性化薬) により収縮させた標本において、イソプレナリンの弛緩作用に対するプロプラノロールの影響を調べ、プロプラノロール非感受性 β -受容体の関与の可能性を検討した。
- (2) イソプレナリンの弛緩作用に関与するプロプラノロール感受性 β -受容体の薬理的な同定を行った。
- (3) イソプレナリンの弛緩作用に関与するプロプラノロール非感受性 β -受容体の薬理的な同定を行うとともに、 $\beta 3$ -受容体活性化

の弛緩作用との対比も行った。

(4) 交感神経の化学的除神経を行う目的で、ラットに6-hydroxydopa処置を施し、摘出した腸間膜動脈標本での β -受容体を介した弛緩反応を薬理的に解析した。

4. 研究成果

(1) イソプレナリンの弛緩作用に対するブ プロラノロールの影響

イソプレナリンの濃度反応曲線に対するブプロラノロール(非選択的 β 1-、 β 2-受容体拮抗薬)の影響を検討した。ブプロラノロール(3×10^{-9} - 10^{-8} M)は、イソプレナリンの濃度反応曲線を右方に平行移動させた。シルドプロット解析の回帰直線の傾き(0.85、95%信頼限界: 0.46 - 1.25)は1と有意な差はなく、 pA_2 値は9.10(95%信頼限界: 8.81 - 9.85, $n = 4$)であった。しかし、イソプレナリンの濃度反応曲線は、 10^{-8} Mより高濃度のブプロラノロールによってそれ以上平行移動せず、シルドプロット解析による回帰直線の傾きも、0.29(95%信頼限界: 0.17 - 0.41, $n = 4 - 8$)となり、1より有意に小さな値となった。

以上の結果から、イソプレナリンによる弛緩反応には、ブプロラノロール感受性 β -受容体とブプロラノロール非感受性 β -受容体の2種類の β -受容体が関与することが示された。

(2) ブプロラノロール感受性 β -受容体の 薬理的な同定

アテノロール(10^{-7} - 10^{-6} M)は、単独では、イソプレナリンの濃度反応曲線に影響を与えなかった。しかし、ICI-118,551(3×10^{-8} M)存在下では、イソプレナリンの濃度反応曲線は、アテノロール(10^{-7} - 10^{-6} M)により右方に平行移動した。シルドプロット解析の結果では、回帰直線の傾き(0.92、95%信頼限界: 0.62 - 1.22)は1と有意な差はなく、 pA_2 値は6.79(95%信頼限界: 6.65 - 7.00, $n = 6$)となり、 β 1受容体に対する値と一致した。

また、イソプレナリンの濃度反応曲線に対するICI-118,551の影響を検討したところ、 β 2-受容体に対して選択的な拮抗作用を示す濃度範囲(10^{-9} - 10^{-8} M)では、イソプレナリンの濃度反応曲線に対して全く影響を与えなかった。しかし、 β 1-受容体に対しても拮抗作用を示すような濃度範囲(10^{-7} - 10^{-6} M)では、イソプレナリンの濃度反応曲線を右方に平行移動させた。シルドプロット解析の回帰直線の傾き(0.88、95%信頼限界: 0.51 - 1.25)は1と有意な差はなく、 pA_2 値は7.29(95%信頼限界: 7.01 - 7.91, $n = 6$)となり、 β 1受容体に対する値と一致した。

以上の結果から、イソプレナリンによる弛

緩反応に関与するブプロラノロール感受性 β -受容体は、主として β 1-受容体であることが示された。

(3) カテコラミンの効力順位

フェニレフリン(10^{-5} M)で収縮させた腸間膜動脈標本において、3種類のカテコラミン(イソプレナリン・アドレナリン・ノルアドレナリン)による弛緩反応を得た。 pD_2 値に基づいて求めた3つのカテコラミンの効力順位は、イソプレナリン(pD_2 値=7.21) > アドレナリン(pD_2 値=6.08) = ノルアドレナリン(pD_2 値=6.22)の順となり、 β 1-受容体に対する順位と一致した。

この結果も、ブプロラノロール感受性 β -受容体が、主として β 1-受容体であることを強く示唆するものであった。

(4) イソプレナリンの弛緩作用に対するブ プロラノロールの影響

ブプロラノロールは、 10^{-6} Mより高い濃度範囲では、 β 1-、 β 2-受容体の他に、 β 3-受容体に対しても拮抗作用を示すことが報告されている。ブプロラノロール(10^{-7} M)存在下、イソプレナリンの濃度反応曲線は、ブプロラノロール(3×10^{-7} - 2×10^{-6} M)によって、右方に平行移動し、シルドプロット解析による回帰直線の傾き(1.11、95%信頼限界: 0.86 - 1.36)は1と有意な差はなく、競合的拮抗作用が示された。しかし、 pA_2 値は6.49(95%信頼限界: 6.38 - 6.63; $n = 6$)となり、これまでの報告値よりも最大で1.0大きな値となった。

この結果は、ラット腸間膜動脈の β 3-受容体が、ブプロラノロールに高い親和性を有するもの(pA_2 値は6.5付近)と、ブプロラノロールに低い親和性を有するもの(pA_2 値は5.5~6.0付近)の2つの β 3-受容体に分類される可能性を示唆するものであった。

(5) CGP-12177Aの弛緩作用に対するブ プロラノロールの影響

CGP-12177Aは、 β 1-、 β 2-受容体には拮抗作用を有し、 β 3-受容体には活性薬として作用する非定型(ノンコンベンショナル) β -受容体アゴニストである。ブプロラノロール(10^{-7} M)存在下、CGP-12177Aの濃度反応曲線は、ブプロラノロール(10^{-6} - 3×10^{-6} M)により右方へ平行移動した。シルドプロット解析の回帰直線の傾き(1.00、95%信頼限界: 0.39 - 1.62)は1と有意な差はなく、 pA_2 値は5.76(95%信頼限界: 5.61 - 5.92, $n = 4 - 6$)となった。この pA_2 値は、これまでに報告された β 3-受容体に対する pA_2 値に一致しており、イソプレナリンに対する pA_2 値6.49よりも小さな値であったことから、(4)での結果の妥当性を支持するものであった。

(6) 6-ハイドロキシドパミンを用いた化学的除神経効果の影響

生理食塩水を投与したラット由来の腸間膜動脈標本では、電気刺激により刺激頻度(1-16 Hz)に依存した収縮反応が誘発された。この収縮反応は、テトロドトキシン (3×10^{-7} M)、フェントラミン (10^{-5} M) によってほぼ消失したことから、交感神経刺激によりもたらされたものであることが強く示された。

一方、6-ハイドロキシドパミンを投与したラット由来の標本では、電気刺激による収縮反応は誘発されなかった。このことから、6-ハイドロキシドパミン処置により、腸間膜動脈標本での交感神経の化学的除神経が施されていたことが確認された。

(7) α 1-受容体を介した収縮反応に対する影響

6-ハイドロキシドパミン処置ラット由来の腸間膜動脈標本では、予想されたように、ノルアドレナリンとフェニレフリンによる収縮反応が、顕著に増強され、 pD_2 値、最大反応のいずれも増加していた。この結果も、6-ハイドロキシドパミン処置により、腸間膜動脈標本での交感神経の化学的除神経が施されていたことを強く示すものであった。

(8) β -受容体を介した弛緩反応に対する影響

プロプラノロール非存在下、プロプラノロール存在下のいずれにおいても、6-ハイドロキシドパミンを投与したラット由来の標本では、イソプレナリンの弛緩作用は減弱する傾向にあった。つまり、最大反応は有意に減弱し、 pD_2 値も有意ではないものの、対照と比較して小さな値になった。この結果は、交感神経の除神経が、 β 1-受容体、 β 3-受容体のいずれを介した弛緩反応に対しても、これを減弱させる可能性を示唆するものであった。しかし、CGP-12177A による弛緩反応は、6-ハイドロキシドパミン処置による影響を受けなかったため、交感神経の除神経が影響を与えるのは、プロプラノロールに高い親和性を有する β 3-受容体である可能性が示唆され、この結果も、 β 3 受容体が2つのサブクラスに分類される可能性を支持するものとなった。

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9件)

- ① Li M, Tanaka Y, Alioua A, Wu Y, Lu R, Kundu P, Sanchez-Pastor E, Marijic J, Stefani E, Toro L. Thromboxane A_2

receptor and MaxiK-channel intimate interaction supports channel trans-inhibition independent of G-protein activation. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 107(44), 2010, 19096-19101.

- ② Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Miyauchi N, Mizutani R, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Enhanced vascular contractility in α 1-adrenergic receptor-deficient mice. Life sciences, 査読有, 84(21-22), 2009, 713-718.

[学会発表] (計13件)

- ① 重松舞衣、柴田さゆり、佐藤恭輔、通川広美、粕谷善俊、田中芳夫、ラット腸間膜動脈平滑筋の弛緩反応には、プロプラノロール(Prop)感受性ならびに非感受性の2種類の β -アドレナリン受容体(β -ADR)が関与する、第52回日本平滑筋学会総会、2010年7月1日、仙台市情報・産業プラザ(アエル)(仙台市)
- ② 重松舞衣、柴田さゆり、佐藤恭輔、相川直己、通川広美、粕谷善俊、田中芳夫、ラット腸間膜動脈のイソプレナリン(Iso)による弛緩反応に関与する β -アドレナリン受容体(β -ADR)サブタイプの薬理的同一性、日本薬学会第130年会、2010年3月30日、岡山桃太郎アリーナ(岡山市)

[その他]

東邦大学薬学部薬理学教室紹介ページ
<http://www.phar.toho-u.ac.jp/lab/yakuri.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 芳夫 (TANAKA YOSHIO)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：60188349

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

粕谷 善俊 (KASUYA YOSHITOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70221877