

# 論文の内容の要旨

論文題目 男性尿道における  
 $\alpha_1$  アドレナリン受容体サブタイプの検討  
—分子生物学的ならびに薬理的検討—

氏 名 深澤 立

**背景及び目的:**  $\alpha_1$  アドレナリン受容体は生体内の様々な組織に分布しそのサブタイプが同定,比較されており,生体内機能との関係が探られてきた。ヒト下部尿路においては $\alpha_1$  アドレナリン受容体は尿道及び前立腺の平滑筋に多く存在しその収縮・弛緩に参与する。

$\alpha_1$  受容体サブタイプは,現在 $\alpha_{1A}$ , $\alpha_{1B}$ , $\alpha_{1D}$  の 3 種類が生体組織レベルで確認されており,それぞれ分子生物学的にクローニングされた recombinant receptor ( $\alpha_{1a}$ , $\alpha_{1b}$ , $\alpha_{1d}$ ) がある。これらは $\alpha_1$  アドレナリン受容体拮抗薬の prazosin と高い親和性を示すため $\alpha_{1H}$  アドレナリン受容体としてまとめられ,prazosin の親和性の低いサブタイプは $\alpha_{1L}$  サブタイプといわれている。

$\alpha_{1L}$  サブタイプはヒト前立腺部尿道及び前立腺に存在し,収縮等に重要な役割を示すと推察されているが,その分布については明らかではない。またヒト男性尿道も尿禁制や排尿障害に重要な役割を持っていると推察されるが,ヒト男性尿道に対する同様の研究は必ずしも十分ではなく, $\alpha$ アドレナリン受容体サブタイプの割合,分布などを検索することは重要であると考えられた。

本研究では,男性尿道における $\alpha_1$  アドレナリン受容体サブタイプ mRNA の割合と分布を検索するため RNase protection assay 及び *in situ* hybridization を行なった。次に $[^3\text{H}]$ prazosin の結合実験と $[^3\text{H}]$ tamsulosin の prazosin による結合阻害実験で尿道及び前立腺における $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体サブタイプの分布を明らかにした。

**対象と方法:** ヒトの浸潤性膀胱癌に対する膀胱全摘除術より得られた前立腺部

尿道を用い RNase protection assay 及び *in situ* hybridization を行いサブタイプ mRNA の同定,割合を検討した。ヒトの前立腺肥大症に対する被膜下摘除術により得られた前立腺部尿道及び前立腺を binding assay に用い,  $\alpha_{1L}$  サブタイプの分布を検討した。

**RNA の準備:** RNA の抽出は Chomczynski 及び Sacchi の方法によった。Poly (A)<sup>+</sup> RNA の純化後,260 nm の吸光域で定量し,-80℃で保管した。

**RNA プローブの準備:** cDNA library から得た 3 種類の  $\alpha_1$  アドレナリン受容体サブタイプの cDNA クローンの C 末端を選択し,各サブタイプのフラグメントを pBluescript transcription vector に挿入した。アンチセンス RNA プローブは RNase protection assay に用いるために [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] で標識し,*in situ* hybridization に用いるため digoxigenin-UT で標識した。

**RNase protection assay :** 尿道から抽出した Poly (A) + RNA (5 $\mu$ g) サンプルはそれぞれ放射性同位元素でラベルした RNA プローブ (1 $\times$ 10<sup>6</sup>d.p.m) で hybridization を行った。RNase で処理後,RNA のフラグメントを電気泳動し,imaging analyser を用いて測定をした。

***in situ* hybridization :** 尿道を薄切し処理後,hybridization 溶液内で pre-incubate した。digoxigenin でラベルされたアンチセンスプローブを用い hybridization を行った。過剰なプローブを除き,抗 digoxigenin 抗体を用いて incubate し,基質溶解液で発色させ,光学顕微鏡にて観察した。

**[<sup>3</sup>H]prazosin 及び [<sup>3</sup>H]tamsulosin 結合実験:**尿道及び前立腺を摘出後ホモジナイズし,2層のガーゼにて濾過した。濾液を 40,000 g で 20 分間遠心し得られた沈渣に緩衝液を加え懸濁し,再度遠心した。最終的に得られた沈渣に 16 倍量の緩衝液を加え懸濁したものを受容体膜標品とした。ヒト  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1d}$  アドレナリン受容体を発現させた CHO 細胞を超音波破碎機で破碎し,3,000g で 10 分間遠心し,得られた上清を再度遠心し沈渣にインキュベーション用緩衝液を加えて懸濁したものを受容体膜標品とした。 [<sup>3</sup>H]tamsulosin (結合阻害実験では 0.2 nM,飽和実験では 0.02-1 nM にて用いた), [<sup>3</sup>H]prazosin (0.02 - 2 nM にて用いた) 及び被験薬物を添加し全量を 0.5 ml としインキュベートした。反応液に氷冷した緩衝液を加えた後,予め 0.1% polyethylenimine 溶液に浸しておいたガラス繊維濾紙上に吸引濾過した。この濾紙を 3 回洗浄後,放射活性を測定した。非特異的結合は 1 $\mu$ M prazosin の存在下での [<sup>3</sup>H]tamsulosin の結合量,あるいは 10  $\mu$ M phentolamine の存在下での [<sup>3</sup>H]prazosin の結合量とし,特異的結合は全結合 (被験薬物を加えないときの結合) と非特異的結合を減じて求めた。

**解析方法:** 結合阻害実験で得られた用量反応から Hill plot 法を用い IC<sub>50</sub> 値 (50%結合阻害値) を算出した。KD 値 (解離定数) は非線形最小二乗法を用いて算

出した。

**実験結果:** 1) RNase protection assay:  $\alpha_{1a}$  mRNA は尿道において優位に分布しているサブタイプ mRNA であり,  $\alpha_{1H}$  アドレナリン受容体 mRNA の 100% を占めているが,  $\alpha_{1b}$  及び  $\alpha_{1d}$  サブタイプ mRNA は全く同定できなかった。内因性コントロール mRNA である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) に対する発現レベルは各検体で変化はなかった。 2) *In situ* hybridization: 前立腺部尿道における  $\alpha_{1a}$  サブタイプ mRNA は尿道平滑筋内に明らかに局在していた。センス RNA プローブでは陰性であった。  $\alpha_{1b}$  及び  $\alpha_{1d}$  サブタイプ mRNA はかすかに平滑筋層に局在がみられた。 3) [ $^3$ H]Prazosin の結合による飽和実験: 尿道及び前立腺に対する [ $^3$ H]prazosin の特異的結合は飽和曲線を示し、その親和性は高いものであった。前立腺における [ $^3$ H]prazosin の解離定数は (0.088 nM) は尿道 (0.254 nM) と比して低値を示した。 4) [ $^3$ H]tamsulosin の結合実験: 尿道及び前立腺の [ $^3$ H]tamsulosin に対する非特異的結合は [ $^3$ H]prazosin に比して低かった。それぞれに対する [ $^3$ H]tamsulosin の特異的結合は十分飽和され高い親和性を示した。尿道及び前立腺の [ $^3$ H]tamsulosin における解離定数は 0.113 nM and 0.031 nM であった。 [ $^3$ H]tamsulosin 結合は prazosin により濃度依存的に抑制された。 [ $^3$ H]tamsulosin 結合阻害作用を指標とした尿道における prazosin の親和性 (pKi, 8.60) はヒト前立腺 (pKi, 9.61) やクローニングされた  $\alpha_1$  受容体サブタイプ (pKi, 9.36 - 9.58) に比して低かった。

**考察:** 尿道, 前立腺においては  $\alpha_1$  アドレナリン受容体が広く分布している。前立腺肥大症は肥大結節による尿排出路の機械的閉塞がその病態の一つであるが,  $\alpha_1$  アドレナリン受容体を介する平滑筋収縮による機能的閉塞も関与するため, この排尿障害の治療には  $\alpha$  アドレナリン受容体拮抗薬が汎用されている。  $\alpha_1$  受容体は薬理的に  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  が認められており, また  $\alpha_1$  受容体拮抗薬である prazosin との親和性により  $\alpha_{1H}$  及び  $\alpha_{1L}$  サブタイプに分けられている。

$\alpha_1$  アドレナリン受容体サブタイプ mRNA は様々な人体組織で検討され, 各臓器において分布が異なっている。ヒト前立腺では機能的な研究によると  $\alpha_{1a}$  サブタイプが優位に存在し, RNase protection assay による優位なアドレナリン受容体サブタイプ mRNA は  $\alpha_{1a}$  サブタイプである。ラット, ウサギ, イヌの尿道における放射性リガンド結合実験では  $\alpha_1$  アドレナリン受容体は  $\alpha_{1a}$  サブタイプが優位である。

ヒト尿道においてはサブタイプ mRNA の分布や密度については検討されておらず, また  $\alpha_{1L}$  サブタイプについては存在が示唆されているのみである。RNase protection assay と *in situ* hybridization を用いて尿道におけるサブタイプ mRNA について検討した結果, 男性尿道におけるサブタイプ mRNA は  $\alpha_{1a}$  が優位であり, 割合は  $\alpha_1$  受容体 mRNA 全体の 100% に及び, 男性尿道は  $\alpha_{1A}$  サブタイプを介して収縮を

するものと考えられた。 $\alpha_{1b}$  サブタイプ mRNA 及び  $\alpha_{1d}$  サブタイプ mRNA は検出されず、尿道の収縮に両者は関与が低いと考えられた。*in situ* hybridization 実験においては  $\alpha_{1a}$  サブタイプ mRNA は平滑筋内に存在し、尿道の部位による違いはなく、RNase protection assay の結果を支持するものと思われた。

mRNA により発現した蛋白の実際の存在状況を放射性リガンド結合実験で検討すると、 $[^3\text{H}]$ prazosin 飽和曲線からは、前立腺に比して尿道における  $\alpha_1$  アドレナリン受容体への prazosin の親和性は低く、尿道に  $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体サブタイプがより多く存在することが示唆された。更に  $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体サブタイプにも高い親和性をもつ  $[^3\text{H}]$ tamsulosin を用い、prazosin による結合阻害を測定すると、ヒト尿道における  $\alpha_1$  アドレナリン受容体の prazosin の親和性はヒト前立腺に比べて低く、 $\alpha_{1L}$  サブタイプの分布は前立腺よりも尿道に多いことが確かめられた。尿道における  $\alpha_{1A}$  と  $\alpha_{1L}$  の割合は、prazosin の  $\alpha_{1A}$  及び  $\alpha_{1L}$  に対する  $pA_2$  値は 9-10 及び  $<9$  であり、本研究におけるヒト尿道の  $pKi$  値が 8.6 であることから  $\alpha_{1L}$  が 50% 以上を占めていると考えられる。

Ford らは  $\alpha_{1a}$  受容体を発現した intact CHO 細胞が  $\alpha_{1L}$  受容体と一致する薬理学的特性を示すことを報告し、 $\alpha_{1L}$  サブタイプは  $\alpha_{1A}$  サブタイプと機能的には異なるが、これらは同一の遺伝子から産生されると示唆している。本研究でも尿道に認められたサブタイプ mRNA は  $\alpha_{1a}$  サブタイプが 100% であったが、binding assay では  $\alpha_{1a}$  サブタイプ以外に  $\alpha_{1L}$  サブタイプも認められた。このことは mRNA レベルでは  $\alpha_{1a}$  サブタイプであるが形質を発現する過程で  $\alpha_{1a}$  だけでなく  $\alpha_{1L}$  サブタイプの発現も生じている可能性を支持すると考えられる。

男性尿道においては、 $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体サブタイプは前立腺よりも多く分布することが確かめられた。 $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体サブタイプの選択的薬剤が開発されることで排尿障害への新たなアプローチが可能となると思われる。

**まとめ:** 男性尿道における  $\alpha_1$  アドレナリン受容体サブタイプについてサブタイプ mRNA を RNase protection assay 及び *in situ* hybridization にて検討し、 $\alpha_{1a}$  サブタイプが 100% であり、尿道平滑筋内に平均して存在していた。 $\alpha_{1b}$  サブタイプ mRNA、 $\alpha_{1d}$  サブタイプ mRNA はほとんど存在が確認できなく、男性尿道の収縮は  $\alpha_{1a}$  サブタイプによると考えられた。放射性リガンドの binding assay では  $\alpha_{1L}$  アドレナリン受容体サブタイプは前立腺に比して尿道の方が多く認められ、尿道収縮には  $\alpha_{1L}$  サブタイプの関与が強く示唆された。より  $\alpha_{1L}$  サブタイプに選択性をもつ薬剤の開発が新たな排尿障害の治療へとつながると思われた。