

[論文内容の要旨]

論文題目  $\alpha_1$  アドレナリン受容体の生理機能解析

指導教官 北村唯一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 細田千尋

**目的:** 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体(GPCR、G-protein Coupled Receptor)の構造を有する代表的受容体の一つであるアドレナリン受容体(adrenergic receptor, adrenoceptor, 以下 AR)は交感神経終末や副腎髄質から遊離されるカテコールアミンの受容体として標的細胞、組織において重要な役割を演じている。AR は  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 つのサブタイプに分類され、さらに  $\alpha$  アドレナリン受容体は、2 つのサブタイプ ( $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ ) に分類される。 $\alpha_1$  アドレナリン受容体(以下  $\alpha_1$ -AR )は、主に血管平滑筋に分布し、血管収縮・血圧調節に重要な役割をはたし、3 つのサブタイプ ( $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{1B}$ 、 $\alpha_{1D}$ ) が存在することが報告されているが、それぞれの  $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{1B}$ 、 $\alpha_{1D}$  サブタイプの各血管における発現分布、血管収縮・血圧調節機能については明らかになっていなかった。今回、 $\alpha_1$ -AR 各サブタイプの組織における発現分布と生理機能を明らかにするために  $\alpha_{1B}$ -AR サブタイプ遺伝子欠損マウス(以下、 $\alpha_{1B}$ -Knoch Out mouse、 $\alpha_{1B}$ -KO)、 $\alpha_{1D}$ -AR サブタイプ遺伝子欠損マウス(以下、 $\alpha_{1D}$ -Knoch Out mouse、 $\alpha_{1D}$ -KO)から  $\alpha_{1B}$ -AR、 $\alpha_{1D}$ -AR サブタイプ遺伝子 2 重欠損マウス(以下、 $\alpha_{1BD}$ -Double Knoch Out mouse、 $\alpha_{1BD}$ -KO)を作製し上記 3 つの遺伝子欠損マウスを用いて血管収縮、血圧調節および高血圧発症における  $\alpha_{1D}$ -AR および  $\alpha_{1B}$ -AR の機能的役割を検討すると共に  $\alpha_1$ -AR 各サブタイプの血管収縮における役割と発現分布との相関を解析した。

**対象と方法:**  $\alpha_{1B}$ -KO (129Sv/C57Bl6) と  $\alpha_{1D}$ -KO(129Sv/C57Bl6) の交配によりヘテロ接合性F1マウスを作製し、さらにヘテロ接合性F1マウス同士の交配により、F2マウスのWild type (以下WT)とホモ接合性の $\alpha_{1BD}$ -KOマウスを作製した。よって、今回の実験で使用するWT、 $\alpha_{1B}$ -KO、 $\alpha_{1D}$ -KO、 $\alpha_{1BD}$ -KOはいずれも遺伝的背景は同一である。すべての実験において 7週齢から9 週齢雄マウスを使用した。RNA発現量の定量解析では、通常のRT-PCRで得られたDNA産物にTaqMan probeとリアルタイムPCR装置を使用してmRNA発現の定量的解析を行った。各マウス胸部大動脈と腸管膜動脈の摘出標本にて1mmリングを作製し恒温槽内でNorepinephrine (以下NE)を用いて刺激し等張性に収縮圧を記録した。またNEによるマウス血管を刺激する時に選択的拮抗薬を前処置し選択的拮抗薬の各血管に対する親和性を観察した。血圧の測定はtail cuff 法で収縮期圧(SBP)と心拍数(HR) を覚醒下、拘束状態で観察し、この時に測定された血圧、心拍数を安静時血圧、安静時心拍数と定義した。また、右頸動脈留置カテーテルを介して覚醒下に平均動脈圧(mean arterial pressure; MAP)とHRの測定を行い、さらに $\alpha_1$ -ARの作動薬および拮抗薬の投与後の血圧反応を観察した。またマウス腸管膜動脈を回腸と共に摘出し腸管膜動脈血管床を作成し、この腸管膜動脈血管床の灌流圧を記録した。食塩水負荷高血圧モデルの作製は7週齢から9週齢、体重18.3g ~ 23.1gのWT マウス(16匹)、 $\alpha_{1B}$ -KOマウス(15匹)、 $\alpha_{1D}$ -KO マウス(16匹)、 $\alpha_{1BD}$ -KO マウス(15匹)を使用した。マウス左腎の部分切除の術後7日目に右腎全摘除を行い、さらに翌日から1%食塩水を負荷し食塩水負荷後35日間血圧測定を行った。血圧測定は前述のtail cuff法を用いてSBPを1~3日毎に測定した。術後33、34、35日目に3日間連続測定したSBPの平均値をEndpoint SBPとし、術前の各マウスのコントロールのSBPおよびHRをBaseline SBP、Baseline HRとしEndpointの値と比較した。

**結果:** WTマウス血管における $\alpha_1$ -ARサブタイプmRNAの発現状況について解析した。WTマウスでは胸部大動脈、腸管膜動脈いずれにおいても $\alpha_{1D}$ -ARの発現が優位であった。ただしWTマウス腸管膜動脈における $\alpha_1$ 受容体のRNA総発現量はWTマウス胸部大動脈の約半分程度であった。WTマウス胸部大動脈の $\alpha_1$ -ARサブタイプmRNAの発現量は胸部大動脈では $\alpha_{1D}$ -AR $\gt$  $\alpha_{1B}$ -AR $\gt$  $\alpha_{1A}$ -ARの順位でありWTマウス腸管膜動脈の $\alpha_1$ -ARサブタイプmRNAの発現量の順位は $\alpha_{1D}$ -AR $\gt$  $\alpha_{1A}$ -AR $\gt$  $\alpha_{1B}$ -ARであった。また $\alpha_{1B}$ -KOマウス、 $\alpha_{1D}$ -ARマウス、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウスにおいて残存する $\alpha_1$ -ARサブタイプの統計学的に有意な代償性発現増加は認められなかった。次に摘出した各マウス胸部大動脈と腸管膜動脈に対してNEを投与した時の収縮反応を観察した。胸部大動脈のNE濃度反応曲線ではいずれの曲線も統計学的に有意差( $p<0.05$ )を有していた。NEへの感受性はWTマウス( $pD_2$ 値 $8.42 \pm 0.05, n=16$ )、 $\alpha_{1B}$ -KOマウス( $pD_2$ 値 $8.28 \pm 0.04, n=10$ )、 $\alpha_{1D}$ -KOマウス( $pD_2$ 値 $6.72 \pm 0.08, n=13$ )、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウス( $pD_2$ 値、算定できず、 $n=11$ )の曲線の順に低下し $\alpha_{1BD}$ -KOマウスではNEいずれへの反応も消失していた。腸管膜動脈のNE濃度反応曲線ではWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスの曲線間に統計学的有意差が無く、同様に $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスの曲線の間にも有意差は無かった。しかしWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスの曲線に対して $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスの曲線は統計学的に有意差( $p<0.05$ )を有し、かつNEへの感受性(WTマ

ウス $pD_2$ 値 $6.52 \pm 0.22, n=10$ ;  $\alpha_{1B}$ -KOマウス $pD_2$ 値 $7.12 \pm 0.14, n=10$ ;  $\alpha_{1D}$ -KOマウス $pD_2$ 値 $6.19 \pm 0.07, n=10$ ;  $\alpha_{1BD}$ -KOマウス $pD_2$ 値 $6.29 \pm 0.06, n=10$ )、最大収縮反応のいずれに関してもWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスに対して $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスが有意( $p<0.05$ )に低い結果となった。ただし胸部大動脈と異なり $\alpha_{1BD}$ -KOマウスの曲線においても明らかな収縮反応が認められた。またWTマウスの胸部大動脈はNEに対する感受性が有意( $p<0.05$ )に腸管膜動脈より高かった。次に各マウス血管のNE誘発血管収縮に対する各 $\alpha_1$ -AR拮抗薬の親和性を薬理的に解析したところWTマウスの胸部大動脈および腸管膜動脈は主に $\alpha_{1D}$ -ARを介した収縮と考えられた。各マウス群の安静時SBPは、WTマウス $99 \pm 2$ mmHg( $n=10$ )、 $\alpha_{1B}$ -KOマウス $99 \pm 3$ mmHg( $n=9$ )、 $\alpha_{1D}$ -KOマウス $93 \pm 2$ mmHg( $n=9$ )、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウス $92 \pm 2$ mmHg( $n=9$ )でWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスの安静時SBPに対して $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスの安静時SBPが統計学的に有意( $p<0.05$ )に低い結果となった。また右頸動脈留置カテーテルを介した直接測定によるMAPでは、WTマウス $118 \pm 3$ mmHg( $n=14$ )、 $\alpha_{1B}$ -KOマウス $111 \pm 5$ mmHg( $n=10$ )、 $\alpha_{1D}$ -KOマウス $109 \pm 3$ mmHg( $n=11$ )、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウス $103 \pm 6$ mmHg( $n=9$ )でWTマウスのMAPは $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスと比較して統計学的有意に高く( $p<0.05$ )、 $\alpha_{1B}$ -KOマウスのMAPは $\alpha_{1BD}$ -KOマウスのMAPにそれぞれ統計学的有意に高かった( $p<0.05$ )。いずれの測定法においてもHRは各マウス間に有意差は認められなかった。マウス大腿静脈から経静脈的に受容体作動薬を投与した時の各マウスのMAPの変化を観察した。 $\alpha_1$ -ARの特異的作動薬であるPhenylephrine (以下PE)を投与した場合は各マウス群ともPEの濃度依存性にMAPが上昇した。この時、このPE濃度反応曲線で統計学的有意差を生じたのはWTと $\alpha_{1BD}$ -KOのマウス間のみであったがNE投与の場合のNE濃度反応曲線が全マウス間で統計学的有意差( $p<0.05$ )を示しWTと比較して $\alpha_{1B}$ -KO、 $\alpha_{1D}$ -KO、 $\alpha_{1BD}$ -KOの順に昇圧反応が低下した。次に $\alpha_{1A}$ -ARの特異的作動薬であるA61603投与の場合 $\alpha_{1BD}$ -KOマウスのNE濃度反応曲線とWTマウスの曲線の間には統計学的に有意差を認めなかった。またマウス大腿静脈から経静脈的に $\alpha_1$ -AR選択的拮抗薬プラゾシン、 $\alpha_{1D}$ -AR選択的拮抗薬BMY7378 (以下BMY)を前処置した後、NEを投与しMAP測定を行ったところWTマウスの血压反応と比較して $\alpha_{1B}$ -KOマウスは最大反応に有意差はなかったが、BMYによる拮抗作用が有意( $p<0.05$ )に増強していた。 $\alpha_{1D}$ -KOマウスでは最大反応がWTマウスと比較して有意( $p<0.05$ )に低下していた。 $\alpha_{1BD}$ -KOマウスでは有意なNE誘発血压反応を認めなかった。各マウス食塩水負荷高血圧モデルにおける各マウスのSBP、HRの推移を観察した。SBPの経過表では $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスのSBPがWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスのSBPに対して有意( $p<0.05$ )に低下していた。また1%食塩水負荷21日目後から $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスの平均SBPはWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスの平均SBPと比較して有意( $p<0.05$ )に低値を示した。Endpoint SBPはWTマウス $144 \pm 3$ mmHg( $n=10$ )、 $\alpha_{1B}$ -KOマウス $141 \pm 4$ mmHg( $n=9$ )、 $\alpha_{1D}$ -KOマウス $124 \pm 4$ mmHg( $n=9$ )、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウス $120 \pm 4$ mmHg( $n=9$ )といずれもBaseline SBPより有意( $p<0.05$ )に上昇していたが $\alpha_{1D}$ -KOマウス、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウスのEndpoint SBPはWTマウス、 $\alpha_{1B}$ -KOマウスのEndpoint SBPに対して有意( $p<0.05$ )に低い値であった。同様にEndpointのMAPもWTマウス $145 \pm 6$ mmHg( $n=16$ )、 $\alpha_{1B}$ -KOマウス $144 \pm 5$ mmHg( $n=10$ )、 $\alpha_{1D}$ -KOマウス $126 \pm$

5mmHg(n=13)、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウス $119 \pm 7$ mmHg(n=9)といずれもBaselineMAPより有意( $p < 0.05$ )に上昇していたが $\alpha_{1D}$ -KOマウス、 $\alpha_{1BD}$ -KOマウスのEndpoint MAPはWTマウス、 $\alpha_{1B}$ -KOマウスのEndpoint MAPに対して有意( $p < 0.05$ )に低い値であった。HRはTail-cuff測定においても留置カテーテルからの直接測定においても各マウス間において有意差なく、各マウス間毎のBaselineとEndpoint間においても有意差は認められなかった。各マウスの腸管膜動脈血管床のPE灌流圧をEndpointとBaselineで測定、比較した。各マウスはいずれもBaselineの灌流圧曲線と比較して有意( $p < 0.05$ )に圧反応が増強していたがEndpointの各マウス間では $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスの灌流圧曲線はWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスの灌流圧曲線より有意( $p < 0.05$ )に圧反応が低下していた。Endpointの各マウス間で週齢、体重、体重に対する腎切除重量体重比、クレアチニン等ではいずれも有意差なかったが $\alpha_{1D}$ -KOマウスと $\alpha_{1BD}$ -KOマウスの血中カテコールアミン値がWTマウスと $\alpha_{1B}$ -KOマウスと比較して有意に低い結果となった。

**考察:** 今回我々は $\alpha_{1B}$ -KOマウスおよび $\alpha_{1D}$ -KOマウスから $\alpha_{1BD}$ -KOマウスを作製しWT、 $\alpha_{1B}$ -KO、 $\alpha_{1D}$ -KOおよび $\alpha_{1BD}$ -KOマウスを使用した薬理的、分子生物学的解析を行った。WTマウス胸部大動脈及び腸管膜動脈における $\alpha_1$ -AR各サブタイプのmRNAの発現量の順位は、胸部大動脈: $\alpha_{1D}$ -AR  $>$   $\alpha_{1B}$ -AR  $>$   $\alpha_{1A}$ -AR、腸管膜動脈: $\alpha_{1D}$ -AR  $>$   $\alpha_{1A}$ -AR  $>$   $\alpha_{1B}$ -ARであった。この結果は各マウス胸部大動脈および腸管膜動脈の薬理的解析から推測したマウス胸部大動脈および腸管膜動脈のNE誘発収縮反応への各 $\alpha_1$ -ARサブタイプの関与の順位、胸部大動脈: $\alpha_{1D}$ -AR  $>$   $\alpha_{1B}$ -AR  $\gg$   $\alpha_{1A}$ -AR  $\approx 0$ 、腸管膜動脈: $\alpha_{1D}$ -AR  $>$   $\alpha_{1A}$ -AR  $\gg$   $\alpha_{1B}$ -AR  $\approx 0$ とも矛盾しないものだった。これらの結果は $\alpha_1$ -AR各サブタイプのNE誘発収縮反応への関与の順位はmRNAの発現順位と相関性が高いことを示した。また各マウスの血圧反応の解析結果はマウス血圧調整にはすべての $\alpha_1$ -ARサブタイプが関与することを示唆したが $\alpha_{1B}$ -ARサブタイプと $\alpha_{1D}$ -ARサブタイプを比較した場合は $\alpha_{1D}$ -ARサブタイプが血圧維持により重要な役割を演じていると考えられた。また各マウスを使用した食塩水負荷高血圧モデルマウスの解析からマウスの食塩水負荷高血圧発症には $\alpha_{1D}$ -ARは重要な役割を演じているが $\alpha_{1B}$ -ARはその関与は乏しいことが示された。