

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

論文要旨

β -アドレナリン受容体を介した血管弛緩反応機構に関する研究

薬理学教室 椎名俊介

【背景と目的】

β -アドレナリン受容体 (β -受容体) は、心筋や血管平滑筋を含む多くの平滑筋に広く発現している薬物受容体であり、神経性やホルモン性の生理機能の制御に重要な役割を果たしている受容体のひとつである。 β -受容体は、現在、 β_1 - β_3 の3種類のサブタイプに分類されている。このうち、血管平滑筋の弛緩反応に関与するサブタイプは、Landsらによる分類以後、一般には、 β_2 であると認識されている。しかし、既報論文を調べてみると、脳血管や冠血管においては β_1 の優位性を報告しているものも多く、血管部位や種差によりサブタイプの分布が異なる可能性が示唆されている。その一方で、受容体サブタイプの薬理的同定の根拠となるサブタイプ選択的拮抗薬の使い方に適正を欠く研究や拮抗薬が作用しているサブタイプの解釈が妥当とは考えられない研究も少なくなく、これが血管平滑筋の弛緩反応に関与する β -受容体サブタイプの同定に困難さを与える要因のひとつとなっている。

さて、 β -受容体は、基本的には、いずれのサブタイプもGs蛋白質共役型受容体と考えられており、本受容体を介した平滑筋の弛緩反応にはアデニル酸シクラーゼの活性化を介して産生が増加する組織cAMPが重要な役割を担うと考えられている。しかし、近年、気管や消化管の平滑筋では、 β -受容体を介した弛緩反応に組織cAMP量の増加を伴わない機構(cAMP非依存性機構)も関与することが示されたことから、その生理的役割の解釈については議論の余地はあるものの、 β -受容体機構の多様性の解明が進みつつある状況にある。

本研究では、導管動脈を代表する血管であり薬理学研究で汎用される大動脈に焦点を当て、これまでの研究では必ずしも報告は少ないものの未だに明確な結論が示されていない β -受容体サブタイプの薬理的同定を試みた。また、本アドレナリン受容体を介した弛緩反応について、特に組織cAMP量の増加との関連性を検討することによりcAMP非依存性機構の関与の可能性を検証するとともに、その機序についても検討することにした。

【実験方法】

1. 筋の機械的反応の記録: Wistar系雄性ラット(8~9週齢)より胸部大動脈を摘出し、内皮除去標本(らせん状標本)を作製した。標本は、Krebs-Henseleit液を満たした器官槽内に

懸垂して、張力変動を等尺性に記録した。弛緩反応の算出に際しては、 β -受容体活性薬の投与直前の張力水準を 0%弛緩、収縮薬の投与直前の張力水準を 100%弛緩として評価した。

2. 組織 cAMP 量及び組織 cGMP 量の定量：酵素免疫測定法 (EIA) により定量し、BCA 法により求めた蛋白量あたりの含量 (pmol/mg protein) として表示した。

【結果 および 考察】

1. ラット胸部大動脈の弛緩反応に関与する β -受容体サブタイプ

フェニレフリン (α -アドレナリン受容体活性薬) により持続収縮を惹起した標本に対する各種 β -受容体活性薬および拮抗薬の影響を検討した。1) カテコラミン (イソプレナリン (ISO)、アドレナリン (AD)、ノルアドレナリン (NA)) による弛緩反応の pD_2 値を基にした効力順位は、ISO > AD > NA の順となり、 β_2 -受容体サブタイプの優位性が示された。2) 非選択的 β_1 -、 β_2 -受容体拮抗薬であるプロプラノロール (Prop) は、 10^{-8} - 10^{-7} M の濃度範囲で ISO の弛緩作用に対して競合的に拮抗し、Schild plot 解析より算出された pA_2 値は 8.44 であった。一方、 10^{-7} M より高濃度の Prop (3×10^{-7} - 10^{-6} M) は、ISO の弛緩作用をそれ以上抑制しなかった。3) 選択的 β_1 -受容体拮抗薬であるアテノロール ($\leq 10^{-6}$ M) は、ISO の弛緩作用を抑制しなかった。一方、選択的 β_2 -受容体拮抗薬である ICI-118,551 は、アテノロール (10^{-6} M) 存在下において、ISO の弛緩作用に対して競合的に拮抗し、その pA_2 値 (8.99) は β_2 -受容体に対する値と一致した。4) 非選択的 β -受容体拮抗薬であるブプラノロールは、Prop (10^{-6} M) 存在下での ISO 及び CGP-12177A (β_3 -受容体の部分活性薬) の弛緩作用に対して競合的に拮抗し、算出された pA_2 値はそれぞれ 6.02 と 5.95 となり、 β_3 -受容体に対する値と一致した。以上の結果から、ラット胸部大動脈の ISO による弛緩反応には、Prop 感受性 β -受容体に加え Prop 非感受性 β -受容体に関与することが明らかとなった。また、Prop 感受性 β -受容体が主として β_2 -受容体であるのに対して、Prop 非感受性 β -受容体の一部は β_3 -受容体であることも示された。

2. β -受容体を介した血管弛緩反応に対する cAMP の役割

ラット胸部大動脈の β -受容体を介した弛緩反応に対する cAMP の役割を明らかにする目的で、 β_2 -及び β_3 -受容体刺激による組織 cAMP 量の変動を測定して弛緩反応の大きさと比較した。1) 胸部大動脈標本を完全に弛緩させる 10^{-6} M ISO は組織 cAMP 量を有意に増加させたが、Prop (10^{-7} M) もしくはアデニル酸シクラーゼ阻害作用を有する SQ 22,536 (10^{-4} M) 存在下では、ISO による組織 cAMP 量の増加は顕著に抑制された。2) Prop (10^{-5} M) 存在下では、ISO は 10^{-5} M の濃度でも組織 cAMP 量を増加させなかった。同様に、 10^{-4} M CGP-12177A は Prop (10^{-7}

M) 存在下で組織 cAMP 量を有意に増加させなかった。3) ISO による弛緩反応は、Prop (10^{-7} M) の存在の有無に関わらず SQ 22, 536 (10^{-4} M) により一部抑制されたものの、その大部分は SQ 22, 536 非感受性であった。以上の結果より、ラット胸部大動脈での β_2 -受容体を介した弛緩反応には、cAMP 依存性機構のほかに cAMP 非依存性機構が関与する可能性が示された。一方、 β_3 -受容体を介した弛緩反応は、主として cAMP 非依存性機構によりもたらされる可能性が示された。

3. β -受容体を介した cAMP 非依存性の弛緩反応機構

① NO-cGMP 経路の関与の可能性：NO-cGMP 経路は血管内皮依存性弛緩反応に関わる最も代表的な情報伝達機構であるが、 β -受容体を介した胸部大動脈での cAMP 非依存性の弛緩反応機構の一端を担う可能性が考えられたため、 β_2 -及び β_3 -受容体刺激による弛緩反応に対する NO-cGMP 系阻害薬の影響を調べることで、その可能性を検証した。1) NO 合成酵素阻害作用を有する L-NNA (3×10^{-5} M) と可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害作用を有する ODQ (10^{-5} M) は、ISO による弛緩反応、サルブタモール (選択的 β_2 -受容体活性薬) による弛緩反応のいずれにも影響を与えなかった。また、Prop (10^{-7} M) 存在下での ISO 及び CGP-12177A による弛緩反応にも影響を与えなかった。2) ISO (10^{-6} M) と NA (10^{-4} M) は、いずれも、組織 cGMP 量を増加させなかった。これに対して、NO 供与体である NOR3 (10^{-7} M) は組織 cGMP 量を約 30 倍にまで増加させた。以上の結果から、少なくともラット胸部大動脈では、 β -受容体を介した cAMP 非依存性の弛緩反応機構として NO-cGMP 経路を考慮しなくてもよいと判断された。② K^+ チャネルの関与の可能性： K^+ チャネルは神経細胞や心筋細胞と同様、血管平滑筋細胞にも高密度に存在し、静止膜電位の形成に寄与するとともに、様々な生理活性物質による弛緩反応を仲介する可能性が示唆されていることから、 β -受容体刺激による弛緩反応に対する各種 K^+ チャネル抑制薬の影響を調べることで、 β -受容体を介した cAMP 非依存性の弛緩反応機構の一端を担う可能性を検討した。なお、以下の一連の実験は、cAMP 非依存性の弛緩成分に対する影響を検討する目的で、SQ 22, 536 (10^{-4} M) 存在下で行った。1) Prop (10^{-7} M) 非存在下では、ISO による弛緩反応は高カリウム溶液 (8×10^{-2} M KCl) により強力に抑制された。また、イベリオトキシン (IbTx, 10^{-7} M; BK チャネル抑制薬)、glibenclamide (Gli, 10^{-5} M; K_{ATP} チャネル抑制薬) では抑制されず、4-AP (3×10^{-3} M; K_v チャネル抑制薬) と ML133 (5×10^{-6} M; K_{ir2} チャネル抑制薬) により強力に抑制され、4-AP と ML133 の両処置により高カリウム溶液での弛緩反応の大きさに匹敵する程度にまで抑制された。2) Prop (10^{-7} M) 存在下では、高カリウム溶液により強力に抑制されたものの、IbTx、Gli、ML133 では抑制されなかった。一方、4-AP によっては強力に抑制された。以上の結果から、ラット胸部大動脈では、 β_2 -及び β_3 -

受容体を介した cAMP 非依存性の弛緩反応に対して Kv チャネルが重要な役割を担う可能性が示唆された。また、 β_2 -受容体を介した弛緩反応では Kir2 チャネルも有意に寄与している可能性も示された。③ Gs 蛋白質による K⁺チャネルの直接活性化の関与の可能性： β -受容体の刺激が cAMP 非依存性機構を介して K⁺チャネルを活性化する機序として、Gs 蛋白質が K⁺チャネルを直接活性化する可能性が考えられたため、コレラトキシン (CTX) の弛緩作用とそれに対する各種抑制薬の影響を検討することでその妥当性を検証した。1) CTX (3 μ g/mL) は、ラット胸部大動脈標本を緩徐に弛緩させ 6 時間でフェニレフリンにて収縮させた標本をほぼ完全に弛緩させた。熱処理した CTX ではこの作用は認められなかった。2) CTX (3 μ g/mL) は組織 cAMP 量を顕著に増加させ、この増加作用は SQ 22, 536 (10^{-4} M) により有意に抑制された。しかし、CTX の弛緩作用は SQ 22, 536 により有意な影響を受けなかった。3) SQ 22, 536 存在下での CTX による弛緩反応は 4-AP (3×10^{-3} M) により強力に抑制され、ML133 (5×10^{-6} M) によっても一部抑制された。以上の結果から、 β -受容体を介した cAMP 非依存性の弛緩反応には、Kv チャネルと Kir2 チャネルの Gs 蛋白質による直接活性化が関与する可能性が示唆された。

【結 語】

本研究では、ラット胸部大動脈での β -受容体を介した弛緩反応に関わる受容体サブタイプとその弛緩反応機序を薬理的に解析し、以下の新知見を得た。

1. イソプレナリンによる弛緩反応には、 β_2 -受容体と β_3 -受容体が関与する。
2. β_2 -及び β_3 -受容体を介した弛緩反応のいずれにも cAMP 非依存性機構が関与し、特に、 β_3 -受容体を介した弛緩反応では中心的役割を担う。
3. β_2 -受容体は Kv チャネル及び Kir2 チャネルと、 β_3 -受容体は Kv チャネルと機能的共役系を形成し、cAMP 非依存性の弛緩反応に寄与する。
4. Gs 蛋白質による K⁺チャネルの直接活性化が、 β -受容体と K⁺チャネルの cAMP 非依存性の機能的共役機構の一端を担う可能性が示唆された。

【対象論文】

Shiina S, Ui R, Endo T, Obara K, Chino D, Tanaka Y. The nitric oxide-cGMP pathway does not play an essential role in β -adrenoceptor-mediated smooth muscle direct relaxation in the rat thoracic aorta. *Toho J Med*, 2(3): 95-105 (2016).

博士論文審査報告

椎名 俊介氏（論文題名： β -アドレナリン受容体を介した
血管弛緩反応機構に関する研究）

椎名俊介氏より提出された学位論文を審査し、以下のように評価する。

アドレナリンやノルアドレナリンの受容体である β -受容体は、現在、 β_1 から β_3 の3種類のサブタイプに分類されている。 β -受容体が高密度に発現している組織として最も良く知られているのは心筋であるが、血管をはじめとする平滑筋組織にも高密度に発現していて、神経性・ホルモ性の生理機能調節において重要な役割を果たしている。とりわけ、気管支平滑筋や子宮平滑筋では β_2 -受容体が高密度に発現していることが早期に明らかにされたこともあり、選択的 β_2 -受容体活性薬の開発研究が盛んに行われるとともに、 β -受容体機構の研究も進展した。

一方、血管平滑筋に眼を向けてみると、 β -受容体機構の研究が進展しているとは必ずしも言い難い状況であり、情報も整理されていない。その背景として、 β -受容体を介した弛緩反応の検出技術の困難さや β -受容体拮抗薬を用いた実験結果の解釈の複雑さが挙げられる。

椎名氏は、薬理学研究で汎用されるラット胸部大動脈に焦点を当て、弛緩反応に関与する β -受容体サブタイプ、受容体の活性化により弛緩反応がもたらされる機序を追究し、膨大な情報を蓄積した。

まず、椎名氏は、 β -受容体を介した弛緩反応を定量的に検出するための実験系を確立し、大動脈の弛緩反応に関与する主たる β -受容体サブタイプが β_2 と β_3 の2種類であることを見出した。更に、その機序として、組織cAMP量の増加を伴う機序のほかに組織cAMP量の増加を伴わない機序が関与し、とりわけ、後者は β_3 -受容体を介した弛緩反応においては中心的役割を担うと結論づけた。その他、 β_2 -受容体は内因性カテコラミンのうちアドレナリンの刺激を受容する受容体として、 β_1 -受容体はノルアドレナリンの刺激を受容する受容体として機能し、そのいずれも主として組織cAMP量の増加を伴う機序を介して弛緩反応を引き起こすことを明らかにした。

また、椎名氏は、 β -受容体を介した弛緩反応に関与する組織cAMP量の増加を伴わない機序を薬理的に解析した。その結果、 β_2 -受容体を介した弛緩反応では、KvチャネルおよびKir2チャネルの2種類の

K チャンネルの活性化が関与することを突き止めるとともに、それらが Gs 蛋白質によるチャンネル直接制御によりもたらされる可能性を見出した。一方、 β_3 -受容体を介した弛緩反応では、Kv チャンネルの活性化が関与し、これが Gi 蛋白質によるチャンネル直接制御によりもたらされる可能性を見出した。即ち、 β -受容体のサブタイプごとに弛緩反応に関与する K チャンネル分子種が異なること、また、cAMP 非依存性に K チャンネルの活性化を制御する G 蛋白質が異なる可能性を明らかにした。

薬物受容体研究というと、有機合成された選択的活性薬や拮抗薬のプロフィールの解明に焦点を当てた論文も少なくないが、椎名氏の学位論文は、検出が決して容易とは言い難い内因性カテコラミンの血管弛緩作用の解明にも積極的に取り組み、 β -受容体の生理機能を常に視野に入れた研究がなされている。また、この他、本論文は、細部に亘り実験結果に対する緻密な考察がされていて、予想と異なる実験結果が得られたときの要因や実験結果の解釈の限界など、本研究課題に関わる椎名氏の理解の深さを随所に垣間見ることができる。

これら椎名氏の一連の研究結果は学術論文として、査読のある英文誌に掲載済み、もしくは投稿中あるいは投稿準備中となっている。

以上述べてきた様に、椎名俊介氏の学位論文は、椎名氏が高度薬剤師養成プログラムを選択して研究室での研究期間が実質的に 2 年間であったことを考慮すると、質、量ともに抜きんでており、薬理学の基礎研究のみならず、臨床薬学研究にも寄与するところ大であり、博士(薬学)の学位を授与するに充分価するものと判断する。

2017年 2月 15日

薬理学教室
田中芳夫