

ヒト前立腺における α_1 -受容体の同定とその局在の検討

—特に前立腺の領域による分布の差異について—

学位論文内容の要旨

I 研究目的

前立腺は精路と尿路の接点であり、射精、排尿という二つの動的現象に関与している。前立腺の神経支配については従来より様々な視点から検討されているが、特に組織化学的及び薬理学的検討から、ヒト前立腺間質には交感神経が分布し、これが間質平滑筋の収縮に対し何らかの役割を担っていることが推察されている。一方、Leporらは標識化合物受容体結合実験によりヒト前立腺における α_1 -受容体の同定を行い、受容体レベルで、交感神経系の存在を指摘しているが、前立腺における α_1 -受容体の局在については未だ明らかではなく、また前立腺の領域別にその差異を検討した報告は見られない。本研究では、まず標識化合物受容体結合実験によりヒト前立腺における α_1 -受容体の同定を行い、ついで autoradiography により前立腺の領域別にその局在を検討するとを目的とした。

II 実験材料および方法

1. 標識化合物受容体結合実験

前立腺肥大症患者から前立腺摘除術により得られた11例の前立腺組織を用いた。 -80°C に凍結した組織を細切し、Tris 緩衝液 (50mM Tris, 10mM MgCl_2 , pH7.5) を加えて超高速ホモジナイザーにて摩砕を行った。これを600gで10分間遠心分離し上清を得、その上清を25,000gで30分間遠心分離し、得た沈澱をTris 緩衝液に浮遊させ膜標品とした。 α_1 -受容体の同定には標識化合物として prazosin, [7-methoxy- ^3H] - ([^3H] - prazosin) (82.0Ci/mmol) を用いた。膜標品を0.0625~8 nM [^3H] - prazosin, $\pm 4 \mu\text{M}$ prazosin と温室で30分間反応させた後、オートマチックセルハーベスターを用い、Tris 緩衝液にて吸引ろ過による

洗浄を行ったのち、フィルター上に残っている放射性活性を測定し、総結合量及び非特異的結合量とした。また一定濃度の $[^3\text{H}]$ -prazosin 存在下に種々の濃度の α -受容体遮断薬を加え、結合飽和実験と同様の操作を行って α -受容体遮断薬の $[^3\text{H}]$ -prazosin 結合に対する阻害を検討した。

2. autoradiography

膀胱癌患者から膀胱前立腺全摘術により得た6例のヒト前立腺組織を用いた。得られた前立腺に尿道を通る矢状断を加えると、射精管の両側に central zone (CZ) をその遠位部に peripheral zone (PZ) を、近位部に preprostatic region (PR) を同定できた。これらの領域より得られた小組織片を -80°C で凍結保存したのちクライオスタットマイクロトームにて厚さ $10\mu\text{m}$ の凍結切片に薄切し、スライドグラス上で室温乾燥させた。 α_1 -受容体の標識には、標識化合物として (\pm) - β - $([^{125}\text{I}])$ Iodo-4-hydroxyphenyl-ethyl-aminomethyl-tetralone ($[^{125}\text{I}]$ -HEAT) を用いた。 $0.2\text{ nM } [^{125}\text{I}]$ -HEAT $\pm 8\ \mu\text{M}$ prazosin $100\ \mu\text{l}$ をスライドグラス上の組織切片に滴下し、室温にて30分間反応させ総結合、及び非特異的結合とした。反応後の組織切片は Tris 緩衝液にて1分間1回、10分間2回の洗浄を行った後室温乾燥させ、暗室にて autoradiography 用感光乳剤に浸した後再び乾燥させた。暗箱内で3日間露出した後、現像、定着し、ヘマトキシリン、エオジンにて染色した。組織切片は光学顕微鏡にて観察を行い、繊維筋性部分としては CZ、PZ の繊維筋性部分および PR に認められる preprostatic sphincter (PS) の3カ所を、腺性部分としては CZ、PZ の腺性部分および PR に認められる periurethral gland (PG) の3カ所を観察対象とした。 α_1 -受容体の分布は一定面積内の silver grain の数を数えることによって行った。マイクロメーターを装着した顕微鏡にて1,000倍で観察し、 $2,500\ \mu\text{m}^2$ の枠内の grain 数を、総結合と非特異的結合のそれぞれにおいて算定し、これらの間に有意差を認めた場合に特異的結合が認められたと判定した。また特異的結合の認められた観察対象領域間でその量的な差を検討した。

III. 結 果

1. 標識化合物受容体結合実験

前立腺細胞膜標品において、 $[^3\text{H}]$ -prazosin は 4 nM 以上の濃度で結合飽和を示した。Scatchard の方法で解析すると、直線的関係が認められ、 $[^3\text{H}]$ -prazosin 結合部位は単一であることが示唆された。結合解離定数(Kd)は $1.00 \pm 0.19\text{ nM}$ (mean \pm SE, $n=11$)、最大結合量(Bmax)は $20.8 \pm 3.56\text{ fmol/mg prot.}$ (mean \pm SE, $n=11$)であった。 α -受容体遮断薬を用

いた結合阻害実験では, prazosin と bunazosin が同程度に強く結合を阻害し, ついで phentolamine, yohimbine の順序で阻害した。各々の阻害薬の IC_{50} より求めた解離定数 K_i は prazosin が $1.18 \times 10^{-9} M$, bunazosin が $1.82 \times 10^{-9} M$, phentolamine が $4.63 \times 10^{-8} M$, yohimbine が $4.08 \times 10^{-6} M$ であり, これらの結果から $[^3H]$ -prazosin 結合部位は α_1 -受容体であると判断された。

2. autoradiography

α_1 -受容体に対する特異的結合は PZ の線維筋性部分 ($P < 0.001$), CZ の線維筋性部分 ($P < 0.001$), PS ($P < 0.01$), および CZ の腺上皮部分 ($P < 0.002$) に認められ, PZ の腺上皮部分, PG には認められなかった。特異的結合の認められた部位間の特異的結合量を比較すると, 線維筋性部分においては, CZ および PS が PZ に比べ有意 ($P < 0.001$ および $P < 0.02$) な高値を示した。また CZ の腺上皮部分は, PZ の線維筋性部分に比べ有意 ($P < 0.001$) な低値を示した。

IV 考 案

$[^3H]$ -prazosin を用いた受容体結合実験では, ヒト前立腺組織における $[^3H]$ -prazosin の結合は高親和性で, 結合部位は単一であり, さらに種々の α -受容体遮断薬の $[^3H]$ -prazosin 結合阻害順序から, その結合部位は α_1 -受容体であることが示された。本法により前立腺組織における α_1 -受容体の同定が可能であったが, 同定された α_1 -受容体が間質平滑筋部に局限しているのか, また, 前立腺の領域によってその分布に差がみられないのかという点は明かではなかった。 $[^{125}I]$ -HEAT を用いた autoradiography の検討より, ヒト前立腺における α_1 -受容体は, 主として CZ, PZ の線維筋性部分および PS に存在し, 腺上皮においては, PZ 領域, および PG には認めないが, CZ 領域に若干認められるという結果であった。PS については従来より α 交感神経系の関与が大きいとされてきた領域であるが, 受容体結合実験あるいは autoradiography により同領域に α_1 -受容体を同定したのは本研究が最初であると思われる。McNeal は CZ と PZ の腺構造の違いについて触れた中で, CZ は PZ と異なり, 射精管および精囊腺と形態学的に類似していることから, CZ は他の前立腺とは異なり発生学的に Wolffian duct 由来である可能性があるとして述べている。このように, 領域による腺の形態学的な異なりを指摘した報告はあるが, 機能的な差異について検討した報告はほとんど見られない。本研究で認められた CZ, PZ 間における α_1 -受容体の量的な差は両領域の機能的な差異を反映している可能性がある。McNeal が指摘した組織学的な特徴から機能的差異を類推するとすれば, CZ は射精機能とより密接に関係し, 一方 PZ は同じ泌尿生殖器洞由来の尿道括約筋とともに尿道遠位部

の持続的な緊張により尿禁制機能に寄与していると考えられることもできよう。言いかえれば CZ 間質は genital sphincter としての機能を PZ 間質は urethral sphincter の一部としての機能を果たしているということで、このような機能的差異が両領域間の α_1 -受容体の量的な差異として表現された可能性も考えられる。

V 結 語

標識化合物を用いた受容体結合実験によりヒト前立腺組織における α_1 -受容体の同定を行い、autoradiography によりその局在を検討した。ヒト前立腺における α_1 -受容体の分布に領域による差異を認め、前立腺の領域に機能的な差異の存在する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦
副 査 教 授 阿 部 和 厚
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

前立腺の神経支配については従来より様々な視点から検討されているが特に組織化学的及び薬理学的検討から、ヒト前立腺間質には交感神経が分布し、これが間質平滑筋の収縮に対し何らかの役割を担っていることが推察されている。Lepor らは標識化合物受容体結合実験によりヒト前立腺における α_1 -受容体の同定を行い、受容体レベルで交感神経系の存在を指摘しているが、 α_1 -受容体の局在については未だ明かではない。本研究ではまず標識化合物受容体結合実験によりヒト前立腺における α_1 -受容体の同定を行い、ついで autoradiography により前立腺の領域別にその局在を検討することを目的とした。

標識化合物受容体結合実験は前立腺肥大症患者から前立腺摘除術により得た11例の前立腺組織を用いて行った。組織はホモジナイズ後、遠心分離にて粗細胞膜分画を得、Tris 緩衝液に浮遊させ膜標品とした。 α_1 -受容体の同定には標識化合物として prazosin, [7-methoxy- ^3H]-([^3H]-prazosin) (82.0Ci/mmol) を用いた。膜標品を0.625~8 nM [^3H]-prazosin $\pm 4 \mu\text{M}$ prazosin と室温で30分間反応させ、洗浄後、フィルター上の放射性活性を測定し、総結合及び非特異的結合とした。また α -受容体遮断薬の [^3H]-prazosin 結合に対する阻害を

検討した。autoradiography は膀胱癌患者から膀胱前立腺全摘術により得た6例のヒト前立腺組織を用いて行った。前立腺に尿道を通る矢状断を加え central zone(CZ), peripheral zone (PZ), preprostatic region (PR)から組織切片を得、組織を10 μ mの凍結切片に薄切した。 α_1 -受容体の標識には、標識化合物として(\pm)- β -([125 I]) Iodo-4-hydroxyphenyl-ethyl-aminomethyl-tetralone ([125 I]-HEAT)を用いた。0.2nM [125 I]-HEAT \pm 8 μ M prazosin100 μ lをスライドガラス上の組織切片に滴下し、室温にて30分間反応させ総結合、及び非特異的結合とした。十分洗浄した組織切片は、autoradiography 用感光乳剤に浸し暗箱内で3日間露出した後、現像、定着し、ヘマトキシリン、エオジンにて染色した。組織切片は光学顕微鏡にて観察を行い、線維筋性部分としてはCZ, PZの線維筋性部分およびPRに認められる preprostatic sphincter(PS)の3カ所を、腺性部分としてはCZ, PZの腺性部分およびPRに認められる periurethral gland(PG)の3カ所を観察対象とした。 α_1 -受容体の分布はマイクロメータを装着した顕微鏡にて1,000倍で観察し、2,500 μ m 2 の枠内の grain 数を、総結合と非特異的結合のそれぞれにおいて算定し、これらの間に有意差を認めた場合に特異的結合が認められたと判定した。

前立腺細胞膜標品において、[3 H]-prazosin は4 nM以上の濃度で結合飽和を示した。Scatchardの方法で解析すると、直線的関係が認められ、[3 H]-prazosin 結合部位は単一であることが示唆された。結合解離定数(Kd)は1.00 \pm 0.19nM (mean \pm SE, n=11), 最大結合量(B max)は20.8 \pm 3.56fmol/mgprot. (mean \pm SE, n=11)であった。 α -受容体遮断薬を用いた結合阻害実験では、prazosin と bunazosin が同程度に強く結合を阻害し、ついで phentolamine, vohimbine の順序で結合を阻害した。これらの結果から、[3 H]-prazosin 結合部位は α_1 -受容体であると判断された。autoradiography における [125 I]-HEAT の α_1 -受容体に対する特異的結合はPZの線維筋性部分(P<0.001), CZの線維筋性部分(P<0.001), PS(P<0.01), およびCZの腺上皮部分(P<0.02)に認められ、PZの腺上皮部分、PGには認められなかった。特異的結合の認められた部位間の特異的結合量を比較すると、線維筋性部分においては、CZおよびPSがPZに比べ有意(P<0.001およびP<0.02)な高値を示した。またCZの腺上皮部分は、PZの線維筋性部分に比べ有意(P<0.001)な低値を示した。

本研究ではまず受容体結合実験によりヒト前立腺組織における α_1 -受容体の同定を行い、ついで autoradiography によりその局在を前立腺の領域別に検討した。 α_1 -受容体は主として線維筋性部分に存在し、さらに領域による量的な差を認めた。PSについては従来より α 交感神経系の関与が大きいとされてきた領域であるが、同領域に α_1 -受容体を同定したのは本研究が

最初であると思われる。McNeal は CZ と PZ の腺構造の違いについて触れた中で CZ は PZ と異なり、射精管および精嚢腺と形態学的に類似していると述べているが、機能的な差異について検討した報告はほとんど見られない。本研究で認められた CZ, PZ 間における α_1 -受容体の量的な差異は両領域に機能的な差異の存在する可能性を示唆した唯一の研究であり学位授与に値するものと考えられた。