正常ラット副腎およびヒト副腎における カテコールアミン α 受容体の研究

富山医科薬科大学泌尿器科学教室 (主任: 片山 喬教授)

古 田 秀 勝

DIRECT EVIDENCE OF α -ADRENOCEPTOR BINDING IN RAT AND HUMAN ADRENAL GLANDS

Hidekatsu Furuta

Department of Urology, Faculty of Medicine, Toyama Medical & Pharmaceutical
University, Toyama, Japan

In order to determine whether or not α -adrenoceptors are present in adrenal glands, radioligand receptor binding assay was performed in both Sprague-Dawley (SD) rat and human adrenal gland membranes.

Radioligand binding assay using ^3H -prazosin as an α_1 -adrenoceptor ligand and ^3H -yohimbine as an α_2 -adrenoceptor ligand, clearly demonstrated α_1 and α_2 receptors present in both rat and human adrenal gland membranes. Maximal binding capacity (Bmax) and dissociation constant (Kd) of ^3H -prazosin binding to the rat adrenal gland were 12.5 fmol/mg protein, and 0.11 nM, respectively. Those for the membrane preparations from adrenal cortex and medulla of the normal human were 16.3 fmol/mg protein, 0.34 nM and 16.3 fmol/mg protein, 0.27 nM, respectively. And those of the human pheochromocytoma were 25.6 fmol/mg protein, 0.15 nM, respectively. On the other hand, Bmax and Kd of ^3H -yohimbine binding in the rat adrenal gland to were 22.9 fmol/mg protein, and 4.28 nM, respectively. Those for the membrane preparations from adrenal cortex and medulla of the normal human were 40.4 fmol/mg protein, 5.15 nM and 12.2 fmol/mg protein, 5.39 nM, respectively. And those of the human pheochromocytoma were 35.8 fmol/mg protein, and 1.08 nM, respectively.

Bmax (35.8 fmol/mg protein) of ^3H -yohimbine binding in the pheochromocytoma was significantly ($p < 0.01$) greater than that (12.2 fmol/mg protein) in the human normal adrenal medulla, while Kd (1.08 nM) of this binding in the human pheochromocytoma was significantly ($p < 0.01$) lower than that (5.39 nM) in the human normal adrenal medulla. Our data suggest that the α_2 receptor had greater affinity and binding site density to its agonist in the human pheochromocytoma than in the human normal adrenal medulla.

Key words: adrenal gland, pheochromocytoma, adrenoceptors

要旨: ラットおよびヒト副腎の細胞膜分画にカテコールアミン受容体が存在するか否かを, radioligand binding assay により検索した。ラット副腎細胞膜分画における ^3H -prazosin binding (α_1 受容体)は, 最大結合部位密度 (Bmax) が12.5fmol/mg protein, 解離定数 (Kd) は0.11nM であった。ヒト正常副腎皮質, ヒト正常副腎髄質と褐色細胞腫の膜分画への最大結合部位密度はそれぞれ, 16.3 ± 3.3 fmol/mg protein, 16.3 ± 2.92 fmol/mg protein, 25.6 ± 3.7 fmol/mg protein であり, 解離定数はそれぞれ 0.34 ± 0.02 nM, 0.27 ± 0.04 nM, 0.15 ± 0.02 nM であった。一方, ラット副腎における ^3H -yohimbine binding (α_2 受容体)は Bmax が22.9fmol/mg protein, Kd は4.28nM であった。ヒト正常副腎皮質, ヒト正常副腎髄質と褐色細胞腫膜分画における ^3H -yohimbine 結合の Bmax は, それぞれ 40.4 ± 3.44 fmol/mg protein, 12.2 ± 3.0 fmol/mg protein, 35.8 ± 3.2 fmol/mg protein であり, Kd ではそれぞれ 5.15 ± 0.22 nM, 5.39 ± 0.33 nM, 1.08 ± 0.21 nM であった。以上の結果よりラット副腎およびヒト副腎にはそれぞれ α_1 お

よび α_2 受容体が存在することが確認された。ヒト正常副腎髄質細胞とヒト褐色細胞腫を比較した場合、 ^3H -yohimbine 結合の B_{max} は12.2に対し35.8fmol/mg protein と後者で有意に高く ($p < 0.01$)、 K_d 値は5.39に対し1.08nM と後者で有意に低値を示した ($p < 0.01$)。ヒト褐色細胞腫の、 α_2 受容体は、数、親和性が正常副腎髄質細胞より高いことが示された。

キーワード：副腎、褐色細胞腫、カテコールアミン受容体

緒 言

副腎髄質から分泌されるカテコールアミンは、標的臓器の血管平滑筋のカテコールアミン受容体と結合し、主として vasoactive な効果を発現する。カテコールアミン受容体は、様々な組織に幅広く存在すると考えられている。副腎皮質においては α 受容体刺激によりアルドステロン分泌が増強することから¹⁾ α 受容体が存在する可能性が推測されている。交感神経節後線維末端では、カテコールアミン分泌に対する negative feedback 機構にシナプス前アドレナリン作動性 α_2 受容体が関与するといわれている²⁾。交感神経線維と副腎髄質のクローム親和性細胞は、その発生原基が同一であることから³⁾、副腎髄質からのカテコールアミン分泌を modulate する α 受容体が副腎においても存在することが推測される。そこで、われわれは、 ^3H -prazosin、 ^3H -yohimbine を用いた radioligand receptor assay という直接的な方法によりラットならびにヒト副腎において α_1 、 α_2 受容体が存在するか否かを検討した。

材料および方法

1. ラット副腎の摘出

普通固形飼料と水を自由に摂取できる条件下で飼育した生後8週の Sprague-Dawley 系成熟雄ラット (SD ラット) を用いた。体重260~280g のラットに sodium pentobarbital (30mg/kg) の腹腔内注射後開腹した。腹部大動脈および腹部大静脈を露出し、腹腔動脈の直上で、これらの動脈および静脈に鉗子をかけてクランプした。腹部大動脈の最下部からカニューレを挿入し、同時に腹部大静脈の最下部を切開した。カニューレから氷冷した生理食塩水を約30ml 緩徐に注入し腎および肝が灰白色を呈するまで灌流し、副腎を摘出した。

2. ヒト副腎の摘出

ヒト正常副腎は、腎細胞癌患者から得られた2例と、脳血管障害患者で死亡後3時間以内に autopsy により得られた1例の計3例を使用した。腎細胞癌患者には total nephrectomy により腎、副腎を一塊として摘出せざるを得ないことを説明し承諾を得た。また副腎は腎癌が被膜をこえていないものを使用した。副腎は

皮質と髄質とに分離し使用した。褐色細胞腫については手術により摘出した腫瘍3例を用いた。いずれも、遠隔転移を認めない副腎原発で片側性のものを使用した。

3. 副腎受容体標本の作製

SD ラット副腎ではその被膜を剝離後、全副腎を細切した。1回の assay につき、10匹分のラット副腎をプールして使用した。

ヒト正常副腎は、副腎を薄くスライスした。これを実体顕微鏡下にて皮質と髄質に切断分離した。褐色細胞腫組織は、肉眼的に明らかな腫瘍組織の部分を選択し細切した。これらの試料は320mM sucrose を含む、25mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を10~20倍量を加えて Potter 型ガラスホモジェナイザーで粉碎均等化した。1,000×g で10分間遠沈後、上清を50,000×g で20分間遠沈した。得られた沈渣に25mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 31ml を加え、ソニケーターにて攪拌浮遊させ50,000×g で10分間遠沈した (洗浄)。同様な操作で計3回沈渣膜分画を洗浄した後、50mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) に浮遊させ、これを受容体粗標本として用いた。

4. radioligand binding assay の方法

radioligand binding assay は Williams ら⁴⁾の方法に従った。Bradford 法⁵⁾により受容体粗標本の蛋白質定量を行い、一定濃度に調整した。ラット副腎粗標本の蛋白濃度は0.3mg/ml 前後となるようにした。受容体浮遊液400 μ l に放射性リガンド溶液 ^3H -prazosin 50 μ l または ^3H -yohimbine 50 μ l を加え全量を450 μ l とした。放射性リガンド溶液の濃度は最終濃度として、 ^3H -prazosin で0.05nM から1.0nM までの範囲で、 ^3H -yohimbine では0.4nM から20nM までの範囲で測定した。total binding としてこの試験管浮遊液に50mM, Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を50 μ l 加えて総量を500 μ l とした。non-specific binding 測定には、 ^3H -prazosin に対する cold ligand として phentolamine を、 ^3H -yohimbine に対しては norepinephrine をそれぞれ使用した。hot ligand の1,000倍以上の高濃度の cold ligand をこの試験管浮遊液に50 μ l 加えて総量を

図1 本実験における receptor assay の手順

500 μl とした。それぞれの non-specific binding preparationと total binding preparationを25°C, 30分間 incubateした。この incubation mixtureに冷却した50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4)を5ml 加え反応を停止させた後 incubation mixtureを Whatman GF/B glass filter にかける結合受容体分画を分離採取した。次いでこの glass filter をカウンティングバイアルに移し Clear-sol 液体シンチレーター8mlを加え、室温にて一晩放置しシンチレーションカウンターにて標識トリチウム量を測定した(図1)。総結合より非特異的結合をさしひくことにより特異的結合を求めた。Scatchard 解析は LINEAR (LIFESCIENCE 社)を用いて行い求められた Bmax と Kd は、平均値 $\pm$ SD で表現した。有意差検定は、Student's t test を使用し $p < 0.01$ を有意とした。

結 果

1. ラット副腎膜分画結合の time course
ラット 副腎膜分画への ^3H -prazosin 結合の time course については、蛋白量0.13mg/tube, ^3H -prazosin 濃度0.43nMで行った。incubation 後20分で plateau に達した。 ^3H -prazosin 結合に対して10 μM phentolamineを加えることにより結合の低下が認められ specific binding の存在が確認された (図2A)。 ^3H -yohimbine 結合の time courseは蛋白量0.1mg/tube, ^3H -yohimbine 濃度4.6nMで行った。incubation 後20分で plateau に達することが確認された。 ^3H -

図2 ラット副腎膜分画への ^3H -ligand 結合の time course (A) (B)。

yohimbine 結合に対して1mM norepinephrineを加えることにより低下が認められ、specific binding の存在が確認された(図2B)。これらの結果から、30分の incu-

図3 ラット副腎膜分画にたいする ^3H -prazosin 結合の saturation binding curve (A), Scatchard plot (B) と ^3H -yohimbine 結合の saturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例

bation time で充分飽和状態が得られるものと結論した。

2. ラット副腎膜分画の saturation binding curve

ラット副腎の ^3H -prazosin の saturation binding から得られた Scatchard plot は一直線上にのり、結合部位は1種類であると結論された。最大結合部位密度 (B_{max}) は $12.5 \text{ fmol/mg protein}$ で解離定数 (K_d) は 0.11 nM であった。 K_d 値における, non-specific binding に対する specific binding の比 (S/N 比) は約70% であった(図 3A, 3B)。一方 ^3H -yohimbine 結合については10点の濃度で測定した。この saturation binding より得られた Scatchard plot も直線になり、結合部位は1種類であると結論された。最大結合部位密度 (B_{max}) は、 $22.9 \text{ fmol/mg protein}$ で解離定数 (K_d)

は 4.28 nM であった。 K_d 値における S/N 比は約25% であった (図 3C, 3D)。

3. ラット副腎膜分画への radioligand binding に対する置換曲線

a. ^3H -prazosin 結合に対する norepinephrine を使用した置換曲線

ラット副腎膜分画への ^3H -prazosin 結合に対し、 ^3H -prazosin 濃度は 0.11 nM で、蛋白量は 0.23 mg/tube 、総量を 1 ml で norepinephrine による置換を行った。置換曲線は1相性を呈した(図 4A)。 IC_{50} は $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ であった。slope factor は0.8であった (図 4B)。

b. ^3H -yohimbine 結合に対する clonidine を使用した置換曲線

ラット副腎膜分画への ^3H -yohimbine 結合に対し、

図4 ラット副腎膜分画にたいする ^3H -prazosin 結合の置換曲線 (A) およびその pseudo Hill plot (B) と ^3H -yohimbine 結合の置換曲線 (C) およびその pseudo Hill plot (D).

^3H -yohimbine 濃度は 4.5 nM , 蛋白量 0.26 mg/tube , 総量を 1 ml で clonidine による置換を行った。置換曲線は1相性を呈した。 IC_{50} は $1.25 \times 10^{-4} \text{ M}$ であった(図4C)。slope factorは1.5であり Cheng and Prusoff の補正式⁶⁾から K_i 値は $6.09 \times 10^{-5} \text{ M}$ であった(図4D)。これらの薬剤による濃度依存的な置換が認められ、ラット副腎において α_1 , α_2 受容体への radioligand binding site が存在することが確認された。

4. ヒト副腎ならびにヒト褐色細胞腫膜分画の saturation binding assay

a. ヒト副腎皮質膜分画にたいして

ヒト副腎膜分画ならびにヒト褐色細胞腫膜分画について、ラット副腎膜分画と同様な方法で実験を行った。ヒト副腎皮質膜分画にたいする、 ^3H -prazosin の saturation binding から得られた Scatchard plot は一直線にのり結合部位は1種類であると結論された。non-specific binding に対する specific binding の比 (S/N 比) は約38%であった(図5A, 5B)。一方 ^3H -yohimbine

の saturation binding から得られた Scatchard plot も直線になり結合部位は1種類であると結論された。 K_d 値における S/N 比は約12%であった(図5C, 5D)。

b. ヒト副腎髄質膜分画にたいして

ヒト副腎髄質膜分画に対する ^3H -prazosin の saturation binding より得られた Scatchard plot は一直線にのり、結合部位は1種類であると結論された。non-specific binding に対する specific binding の比 (S/N 比) は約39%であった(図6A, 6B)。一方 ^3H -yohimbine の saturation binding から得られた Scatchard plot も同様に直線になり、結合部位は1種類であると結論された。 K_d 値における S/N 比は約14%であった(図6C, 6D)。

c. ヒト褐色細胞腫膜分画にたいして

ヒト褐色細胞腫膜分画に対する ^3H -prazosin 結合の saturation binding から得られた Scatchard plot は一直線にのり結合部位は1種類であると結論された。non-specific binding に対する specific binding の比

図5 ヒト副腎皮質膜分画にたいする ^3H -prazosin 結合の saturation binding curve (A), Scatchard plot (B) と ^3H -yohimbine 結合の saturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例.

(S/N 比)は約25%であった(図7A, 7B)。一方 ^3H -yohimbine の saturation binding から得られた Scatchard plot は直線になり, 結合部位は1種類であると結論された。Kd 値における S/N 比は約28%であった(図7C, 7D)。

これらの結果を表1に示す。ヒト褐色細胞腫ではヒト正常副腎髄質に比べ, ^3H -yohimbine 結合による Bmax が有意に大きく, Kd 値が低値を示した ($p < 0.01$)。またヒト副腎皮質ではヒト副腎髄質に比べ ^3H -yohimbine 結合による Bmax が有意に大きかった ($p < 0.01$)。

考 察

副腎皮質, 髄質に α 受容体の存在することを radioligand binding assay により証明した。受容体と同定されるには radioligand binding assay において, その binding site が証明されることにより存在の可能

性を示し (possible existence) 次いでこの作動薬と共役する機能が証明され (probable existence), 最終的に, 受容体の単離, 生理活性の同定, またその1次構造決定にいたって, 初めて受容体の存在が確定される (definite existence)。従って, この実験で行った binding assay は possible existence について検討したものである。ラットやヒト副腎膜分画は ^3H -prazosin, ^3H -yohimbine を特異的に結合し, さらにこの結合は一定濃度以上の ligand で飽和された (saturable)。また, 特異的結合に対して agonist, antagonist により結合阻害が認められ (displacement), その解離定数が低いことから受容体 (receptor binding site) が存在するものと考えられる。我々は, SD ラット腎を用い, 腎皮質膜分画の ^3H -prazosin 結合について検討したが⁷⁾, これらの結果では, SD ラット腎皮質における Bmax ならびに Kd 値は既に報告されている他者の値⁸⁾とほぼ同

図6 ヒト副腎髄質膜分画にたいする³H-prazosin 結合の saturation binding curve (A), Scatchard plot (B) と³H-yohimbine 結合の saturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例.

表 1 ヒト正常副腎, ヒト褐色細胞腫膜分画への³H-prazosin 結合および³H-yohimbine 結合による最大結合部位密度, 解離定数

tissue	No.	³ H-prazosin		³ H-yohimbine	
		receptor concentration (Bmax)	equilibrium dissociation constant (Kd)	receptor concentration (Bmax)	equilibrium dissociation constant (Kd)
		fmol/mg protein	nM	fmol/mg protein	nM
human adrenal cortex	(1)	14.5	0.33	37.3	4.91
	(2)	14.2	0.36	39.8	5.33
	(3)	20.1	0.32	44.1	5.21
	mean ± SD	16.3 ± 3.3	0.34 ± 0.02	40.4 ± 3.44	5.15 ± 0.22
human adrenal medulla	(1)	14.8	0.24	8.8	5.02
	(2)	14.5	0.26	13.4	5.51
	(3)	19.7	0.32	14.3	5.64
	mean ± SD	16.3 ± 2.92	0.27 ± 0.04	12.2 ± 3.0	5.39 ± 0.33
human pheochromocytoma	(1)	23.0	0.16	34.0	0.96
	(2)	24.0	0.13	33.9	0.95
	(3)	29.8	0.17	39.5	1.32
	mean ± SD	25.6 ± 3.7	0.15 ± 0.02	35.8 ± 3.2	1.08 ± 0.21

Asterisks show statistically significant differences
: **P<0.01

図7 ヒト褐色細胞腫膜分画にたいする ^3H -prazosin 結合の saturation binding curve (A), Scatchard plot (B) と ^3H -yohimbine 結合の saturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例.

様な結果が得られており、副腎で得られた実験手技結果は信頼性が充分高いものと考えられる。SDラット腎皮質では、 ^3H -prazosin 結合の B_{max} は $93 \text{ fmol/mg protein}$, K_d は 0.36 nM で、 ^3H -yohimbine 結合の B_{max} は $239 \text{ fmol/mg protein}$, K_d は 20 nM であるとの報告がある⁸⁾。SDラット腎皮質に比べてSDラット副腎では、 B_{max} は低値であり、 K_d 値は小さく親和性は高かった。副腎における α 受容体の存在部位については、副腎皮質細胞や副腎髄質細胞膜以外に副腎の血管も考えられるが、今回の実験では局在の同定はできない。しかしながら、SDラット副腎皮質の glomerulosa cell suspension を使用した実験で、norepine-

phrine や epinephrine が aldosterone 遊離を有意に増強させ、この増強した aldosterone の遊離が、prazosin や yohimbine で濃度依存性に抑制されるといわれる¹⁾。また灌流実験で、 α_2 受容体が副腎髄質からのカテコールアミン遊離を modulate するとの報告もある⁹⁾。以上のことから血管だけではなく実質細胞膜にも α 受容体が存在する可能性が充分考えられる。ヒト正常副腎髄質に比べて、ヒト褐色細胞腫の α_2 受容体の B_{max} , K_d に有意差がある原因についてはつぎの可能性が考えられる。副腎髄質細胞において α_2 受容体を介したカテコールアミン分泌の negative feedback 機構の存在を仮定した場合、褐色細胞腫ではカテコールア

ミンが制御されることなく、病的に分泌されているため、 α_2 受容体数が増加し、その親和性が増強することによりその分泌を抑えようとする合目的な変化 (up-regulation) が考えられる。また、褐色細胞腫では受容体の turnover が変化している可能性も考えられる。一般的に受容体は、伝達物質と複合体を形成し、その一部が細胞内へ移行するといわれる (internalization)。一方で、細胞内で新しく合成された受容体がゴルジ体を介して細胞膜に組み込まれ再生すると考えられている¹⁰⁾。褐色細胞腫では、この受容体の生合成が亢進している可能性や、受容体の合成過程だけではなく細胞膜への組み込みにもなんらかの異常が生じている可能性も推測される。

結 語

radioligand binding assay によりラット副腎、ヒト副腎細胞の α_1 および α_2 受容体を測定しつぎの結果を得た。

1. ラット副腎、ヒト副腎皮質およびヒト副腎髄質に α 受容体が存在することを明らかにした。

2. ヒト褐色細胞腫の α_2 受容体はヒト副腎髄質のそれに比べ、最大結合部位密度ならびに親和性が有意に高かった ($p < 0.01$)。

副腎髄質に α_1 および α_2 受容体が存在するという結果は、副腎髄質からのカテコールアミン分泌に関して、交感神経節後線維末端における類似の feedback 機構や、血管収縮などによる髄質からのカテコールアミン分泌を modulate する機構が存在することを強く示唆するものと考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた恩師片山 喬教授に深謝いたします。さらに、本実験を御指導くださいました中田英浩助教授、preliminary study の段階で本研究に参加した小池 宏先生に深謝いたします。

尚、本論文の要旨は第21回国際泌尿器科学会で発表した。

文 献

- 1) Horiuchi, T., Tanaka, K. and Shimizu, N.: Effect of catecholamine on aldosterone release in isolated rat glomerulosa cell suspensions.

Life Science, 40, 2421—2428, 1987.

- 2) Langer, S.Z.: Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. Br. J. Pharmacol., 60, 481—497, 1977.
- 3) Weston, J.A.: The migration and differentiation of neuronal crest cells. Adv. Morphol., 8, 41—114, 1970.
- 4) Williams, L.T., Mullikin, D. and Lefkowitz, R. J.: Identification of α -adrenergic receptor in uterine smooth muscle membrane by ^3H -dihydroergocryptine binding. J. Biol. Chem., 251, 6915—6923, 1976.
- 5) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248—254, 1976.
- 6) Cheng, Y. and Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol., 22, 3099—3108, 1973.
- 7) 古田秀勝, 中田英浩, 片山 喬: 正常 SD ラット腎におけるカテコールアミン α_1 受容体の研究: ドーパミンがおよぼす影響について, 日泌尿会誌, 81, 82—88, 1990.
- 8) Sanvely, M.D. and Insel, P.A.: Characterization of alpha-adrenergic receptor subtypes in the rat renal cortex. Mol. Pharmacol., 22, 532—546, 1982.
- 9) Sakurai, S., Wada, A., Izumi, F., Kobayashi, H. and Yanagihara N.: Inhibition of α_2 -adrenoceptor agonists of the secretion of catecholamines from isolated adrenal medullary cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 324, 15—19, 1983.
- 10) Hollenberg, M.D.: Receptor models and the action of neurotransmitters and hormones: Some new perspectives. In Neurotransmitter receptor binding, 2nd ed., edited by Yamamura, H.I., p.1—39, Raven Press, New York 1985.

(1989年10月17日受理, 特別掲載)