

Full Paper

Presence of GABA_B Receptors Forming Heterodimers With GABA_{B1} and GABA_{B2} Subunits in Human Lower Esophageal Sphincter

Yasuhiro Torashima¹, Yasuhito Uezono^{2,4}, Masato Kanaide^{2,3}, Yuko Ando^{2,3}, Akihito Enjoji¹, Takashi Kanematsu¹, and Kohtaro Taniyama^{2,*,*}

Divisions of ¹Surgery, ²Pharmacology, and ³Anesthesiology, Department of Translational Medical Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8523, Japan

⁴Cancer Pathophysiology Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

Received February 25, 2009; Accepted August 31, 2009

Abstract. Baclofen, a GABA_B-receptor (GABA_BR) agonist has been proposed to be useful as therapeutic agent for the management of gastro-esophageal reflux disease, but whether the compound acts directly at the lower esophageal sphincter (LES) remains to be elucidated. We performed the present study to assess the presence of GABA_BR in human LES. Western blot analysis showed that both proteins of GABA_{B1(a)}/GABA_{B1(b)} and GABA_{B2} subunits were present in the muscle layer of LES. Immunohistochemical findings showed that both GABA_{B1}- and GABA_{B2}-subunit proteins were located on the neurons within the myenteric plexus, and furthermore, both proteins were observed in the same neurons. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis also revealed the presence of mRNAs for both subunits of GABA_BR and also mRNAs for 6 isoforms of GABA_{B1} subunits, from GABA_{B1(a)} to GABA_{B1(g)}, except GABA_{B1(d)}, in human LES. Thus, the functional GABA_BR-forming heterodimers with subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} are located on the myenteric neurons in human LES, suggesting that GABA_BR agonists and antagonists act at least, at the level of the peripheral nervous system.

Keywords: heterodimeric GABA_B receptor, GABA_{B1} subunit, GABA_{B2} subunit, human lower esophageal sphincter (LES), gastro-esophageal reflux disease

Introduction

Several reviews have described the presence of γ -aminobutyric acid (GABA)-ergic neurons and two types of GABA receptors, GABA_A receptor (GABA_AR) and GABA_B receptor (GABA_BR) in the mammalian intestine (1–3). In vivo studies indicate that GABA acts more predominantly on the GABA_BR than the GABA_AR in intestinal motility (4, 5). Baclofen, a GABA_BR agonist, has been previously shown to inhibit intestinal motility (4, 5), and baclofen has been detected to inhibit the transient relaxations of the lower esophageal sphincter (LES) in dogs (6), ferrets (7), and humans (8). Further-

more, the compound has been proposed to be useful as a therapeutic agent for the management of reflux disease (9). The mechanism underlying the effect of GABA_BR agonist has been proposed based on functional studies showing that involvement of GABA_BR in transient LES relaxations is attributed to the presence of GABA_BR in the dorsal vagal complex (10, 11), vagal mechanosensitive afferent neurons (11–13), and vagal motor neurons innervating the LES (14). However, it is not known if GABA_BR is present in the LES itself; therefore it remains to be determined whether the GABA_BR agonists act at the central nervous system and/or the level of the periphery. In the present study, we found for the first time that the functional GABA_BR forming functional heterodimers with GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits is located on the neurons in the human LES, using Western-blot analysis and immunohistochemical methods. GABA_BR is the first G protein-coupled receptor discovered to form heterodimers consisting of two different

[#]Present address: Department of Electrical and Electronic Engineering, Nagasaki Institute of Applied Science, Nagasaki 851-0193, Japan

*Corresponding author. taniyama_kohtaro@nias.ac.jp

Published online in J-STAGE on November 6, 2009 (in advance)

doi: 10.1254/jphs.09062FP

GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits (15–19). The GABA_{B1} subunit is necessary for agonist binding and the GABA_{B2} subunit activates the G protein-coupled signaling system (19–23), resulting in the expression of functional GABA_BR. There are seven isoforms of splice variants of GABA_{B1}R, from GABA_{B1(a)} to GABA_{B1(g)}R (19, 24–30); and the localization and function of the GABA_BR may vary with the different isoforms of GABA_{B1}. Therefore, we also attempted to elucidate the subtype of GABA_{B1}R in human LES using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis.

Materials and Methods

Specimens

Specimens of the esophagus and stomach were obtained from patients undergoing surgical resection for esophageal cancer (3 patients) and gastric cancer (4 patients). Each specimen was obtained from an area more than 3 cm from the edge of the cancer. Patients consisted of 6 males and 1 female, aged 61–81 years (median, 71 years). Use of the specimens for the present study was approved by The Ethical Committee of Nagasaki University School of Medicine, based on the informed consent of the patients. The tissues of the LES were rapidly separated into muscle and mucosal layer.

Western blot analysis

Tissues were homogenized in 4 ml of protein extraction buffer, included in the protein extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), followed by centrifugation at $1,700 \times g$ for 10 min. The resultant supernatant was centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min, and the pellet was resuspended in 50–100 ml of the protein extraction buffer. Protein extracts were stored at -20°C until analysis. The samples of protein extracts (50–100 μg) were subjected to electrophoresis in a 7.5% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes using an electrophoretic gel-transfer apparatus (ATTO, Tokyo). The blots were incubated for 1 h at room temperature in a blocking buffer (Blocking One; Nacalai Tesque, Kyoto), followed by a 2-h incubation with guinea-pig anti-GABA_{B1(a)}, GABA_{B1(b)}, or GABA_{B2}R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:10,000. After a 1-h exposure to the goat anti-guinea pig secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase, blots were developed using chemiluminescence markers following the manufacturer's protocol (Nacalai Tesque). The blots were apposed to X-ray film, and densitometric images were generated and analyzed using a scanning densitometer with Adobe Photoshop software (Adobe Systems Japan, Tokyo).

Analysis for muscle and mucosal tissues

α -Smooth muscle actin (SMA) and mucin MUC5AC were employed as a localization marker of smooth muscle and epithelial cells of the digestive tracts, respectively; and the preparations divided into smooth muscle and epithelial cells were assessed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of mRNAs for SMA and MUC5AC. Total RNA was extracted from the muscle and mucosa of the LES, using a Qiagen Mini Kit (Qiagen GmbH). RT-PCR of SMA and MUC5AC were done according to the methods of Ueda et al. (31) and Guzman et al. (32), respectively. RT-PCR of SMA was carried out with 2 μg of total RNA using the reaction mixture in the presence of 0.2 mg of primer.

Histochemical and immunohistochemical studies

The tissue sections were prepared as follows: Briefly, the tissues were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer. After postfixation with the same fixative for 24 h, the tissues were immersed in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer for 2 days and embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut into 5- μm -thick sections. For histochemical analysis, 5- μm sections were stained with the hematoxylin and eosin reagent, with the general methodology for light microscopy. For immunohistochemistry, slides after deparaffinization were heated in the presence of 0.01 M citric acid (pH 6.0) in a hot water for 30 min. After cooling to room temperature, slides were washed in Tris-buffered saline (TBS) and then incubated overnight with primary antibodies. Primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-GABA_{B1}R antibody (Santa Cruz Biotechnology, diluted 1:50) and anti-GABA_{B2}R antibody (Santa Cruz Biotechnology, diluted 1:50). For GABA_{B1} and GABA_{B2}R staining, sequential sections were incubated for 40 min with anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (diluted 1:200; Molecular Probes, Tokyo). The sections were observed and photographed under a light microscope (Axioplan II; Carl Zeiss, Jena, Germany). The fluorescence of GABA_{B1}-Alexa Fluor 488 and GABA_{B2}-Alexa Fluor 488 was observed with a confocal laser scanning fluorescent microscope (LSM 510Meta, Carl Zeiss) at 488-nm excitation and emission at 510 nm.

RT-PCR of mRNAs for GABA_BR subunits

Total RNA was extracted from the muscle and mucosa of the LES and stomach cardia by using a Qiagen Midi Kit (Qiagen GmbH), and RT-PCR was performed using a thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) and an RT-PCR kit (Toyobo, Osaka). Seven independent forward and reverse primers

Table 1. Individual GABA_B-subunit primers for RT-PCR

| Primers | Sources ^a | Sequences (5' to 3') | Predicted length | |
|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|-----|
| GABA _{B1(a)} | S | AJ01285 | AACATGACATCCCAGGAATTTG | 387 |
| Human | AS | | TCAGGTTGGGCTGTGAGTTC | |
| GABA _{B1(b)} | S | AJ01286 | CACTGCCGCTTCTGGTTGTG | 274 |
| Human | AS | | TCACACTTGCTGTCGTGGTG | |
| GABA _{B1(c)} | S | AJ01287 | AGTGGAGGAAGACTCTGGAA | 470 |
| Human | AS | | ATCTTGGGCACAAAGAGCACAA | |
| GABA _{B1(d)} | S | AB016161 | TGAAACGCAGGACACCATGA | 850 |
| Rat | AS | | TCACTTGTAAGCAAATGTACT | |
| GABA _{B1(e)} | S | AF301005 | AACATGACATCCCAGGAATTTG | 420 |
| Human | AS | | TCAGGTTGGGCTGTGAGTTC | |
| GABA _{B1(f)} | S | AF283276 | ATGTGACCCCGACTTCCATCTG | 119 |
| Rat | AS | | GAAACAGCGCCCGATGTATAC | |
| GABA _{B1(g)} | S | AF312319 | CTCTTCTCTGATCCCCGTCTT | 213 |
| Rat | AS | | TGCTGTCGTGGTGGATAAGCTTG | |
| GABA _{B2} | S | AJ012188 | AAGTTCCACGGGTACGCCTACGA | 287 |
| Human | AS | | GTGTCGGCCACAGCGTTGTACT | |

^aSources are described by the accession number in GenBank. S, sense; AS, antisense.

specific for GABA_{B1} subunits and a pair of primers for GABA_{B2} subunit were designed on the basis of cloned human or rat GABA_BR subunits appearing in GenBank and are shown in Table 1. The expected sizes of PCR products using each primer pair are also shown in Table 1. Reverse transcription was performed in a final volume of 20 μ l using random primers and a reverse transcriptase supplied with the RT-PCR kit. PCR was done in a final volume of 50 μ l containing 1 mM primers, 1 mM of each DNTP, 2.5 U of recombinant KOD dash DNA polymerase, 10 units of RNase inhibitor, and the RT-PCR buffer supplied with the kit. PCR was done under the following conditions: 30 cycles of 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; and 72°C, 90 s. At the end of PCR, samples were kept at 72°C for 10 min for final extension and then stored at 4°C. The amplification products were separated by electrophoresis (2.5% agarose gel) and visualized by using SYBR Green nucleic acid gel stain (Molecular Probes) with an FMBIO-II luminescent system (Hitachi, Tokyo).

Statistical analyses

Statistical significance was tested according to a parametric (Student's *t*) test for paired or unpaired data using a commercial statistical analysis program (Stat-View; Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). All other statistical significances were evaluated using Wilcoxon, Mann-Whitney U, and/or Kruskal-Wallis

nonparametric tests and repeated measures ANOVA. Probability (*P*) values of <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Western blot analysis of GABA_BR

The Western blot analysis was performed using antibodies raised against subunits of GABA_{B1(a)}/GABA_{B1(b)} and GABA_{B2}. The bands corresponding to GABA_{B1(a)}/GABA_{B1(b)} and GABA_{B2} subunits were detected in the muscle layers of the LES and stomach cardia and corpus

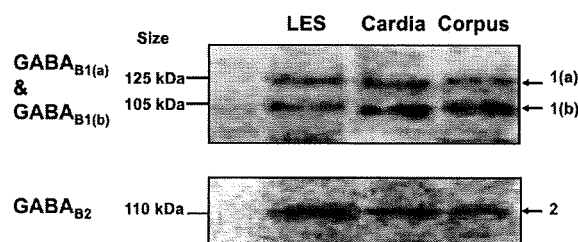


Fig. 1. Western blot analysis of subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} in the preparations from human LES, stomach cardia, and corpus. The blots were incubated for 1 h at room temperature in a blocking buffer (Blocking One), followed by a 2-h incubation with guinea-pig anti-GABA_{B1(a)}/GABA_{B1(b)} or GABA_{B2} diluted 1:10,000. After a 1-h exposure to the goat anti-guinea pig secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase, blots were developed using chemiluminescence markers following the manufacturer's protocol.

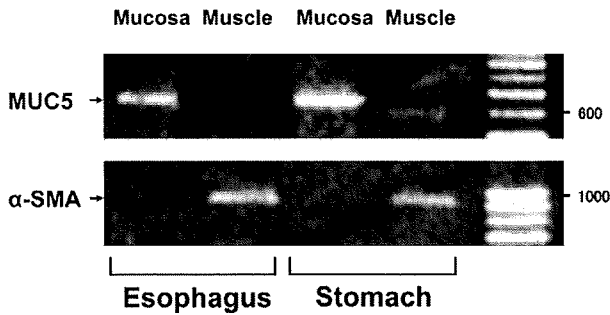


Fig. 2. RT-PCR analysis of mRNAs for SMA and mucin MUC5AC (MUC5) in the preparations from the human LES and stomach cardia. To identify the SMA and MUC5AC mRNAs, total RNA from the tissues was reverse-transcribed following DNAase treatment and then amplified by PCR with each primer pair described in Methods. Amplification products were electrophoresed on 2.5% agarose gel and visualized by SYBR Green staining.

(Fig. 1), thereby indicating that both GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits are present in the muscle layers of these tissues.

RT-PCR analysis of mRNAs for SMA and mucin MUC5AC

SMA and MUC5AC are markers of smooth muscle and epithelial cells of the digestive tract, respectively. Whether the preparations used in the Western blot analysis correspond mainly to the muscle and mucosal tissues was assessed by RT-PCR of mRNAs for SMA and MUC5AC. Expressions of SMA and MUC5AC were detected in the preparations used as the muscle layer and mucosal layer, respectively (Fig. 2).

Histochemical and immunohistochemical studies of subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} in human LES and stomach corpus

As shown in Fig. 3, A and D, neuronal plexus in the human LES and stomach corpus were stained with hematoxylin/eosin staining. Immunostaining with specific antibodies against subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} was studied in the sections of the human LES and stomach corpus. The fluorescences of GABA_{B1}-Alexa Fluor 488 and GABA_{B2}-Alexa Fluor 488 were detected in the neuronal cells within the myenteric plexus of the LES (Fig. 3: B and C) and stomach corpus (Fig. 3: E and F). The fluorescence of GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits was observed in the same neuronal cells in the myenteric plexus of the sequential sections. Intense fluorescence was observed in the cellular membrane (arrow heads in the Fig. 3: B, C, E, and F) and cytoplasm of neurons.

RT-PCR analysis of mRNAs for subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2}

mRNAs for subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} in the muscle and mucosa of LES were analyzed using RT-PCR and compared with those for stomach cardia and corpus, brain tissue, and individual cloned receptor. mRNAs for 2 isoforms of GABA_{B1}, GABA_{B1(a)} and GABA_{B1(b)}, and GABA_{B2}, which are considered to form functional GABA_BR in the heterologous expression system (15–18), were detected in the muscle layer of the LES (Fig. 4A). When mRNAs for other 5 isoforms of GABA_{B1} were analyzed in these tissues, mRNAs for 4 isoforms of GABA_{B1}, GABA_{B1(c)}, GABA_{B1(e)}, GABA_{B1(f)},

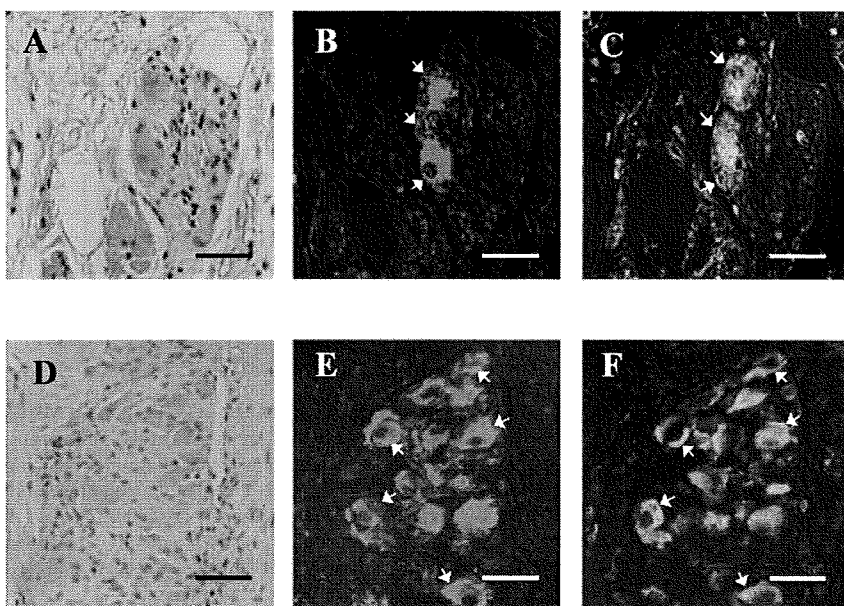


Fig. 3. Localization of subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} in human LES and stomach corpus. Histochemistry and immunostaining of subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} were performed in the sequential sections from preparations embedded in paraffin. Hematoxylin and eosin staining of neuronal plexus of human LES (A) and stomach corpus (D). Immunofluorescence of subunits of GABA_{B1} and GABA_{B2} in the LES (B, C) and stomach corpus (E, F), respectively. GABA_{B1}-receptor immunoreactivity (green) and GABA_{B2}-receptor immunoreactivity (orange) were presented with pseudo-color. Intense fluorescence was observed in the cellular membrane (arrowhead) and cytoplasm in the neuron within the neuronal plexus. Bar = 50 μm.

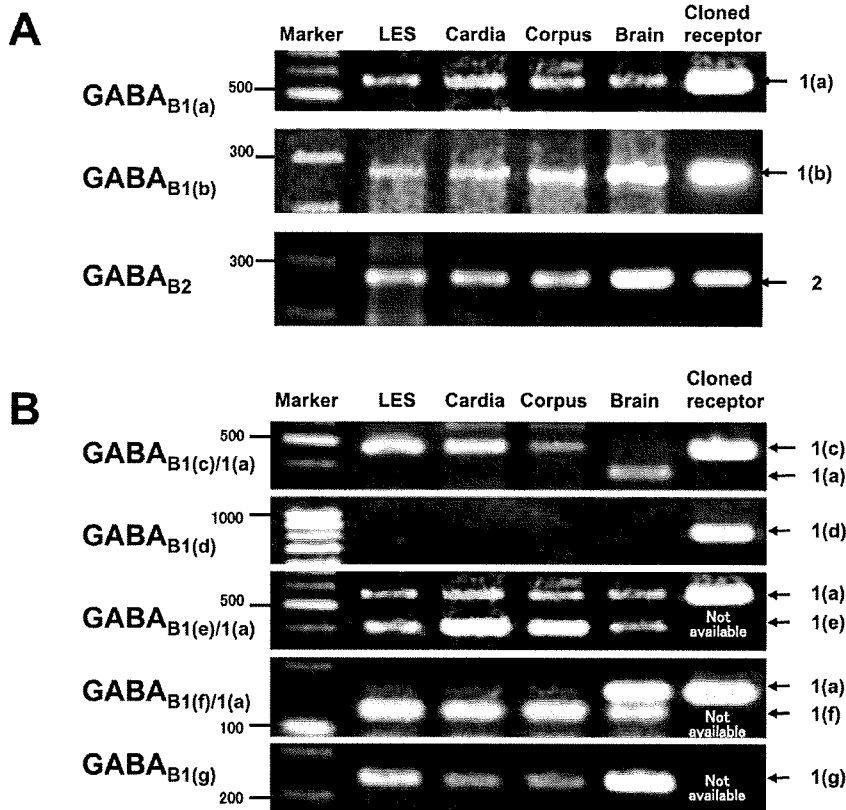


Fig. 4. RT-PCR analysis of mRNAs for subunits of GABA_{B1} isoforms and GABA_{B2} in the preparations from human LES, stomach cardia, and corpus and brain. **A)** RT-PCR analysis of subunits of GABA_{B1(a)}, GABA_{B1(b)}, and GABA_{B2}R. **B)** RT-PCR analysis of several isoforms of GABA_{B1} subunit. To identify mRNA for the GABA_B subunits, total RNA from the tissues was reverse-transcribed following DNAase treatment and then amplified by PCR with each primer pair described in Table 1. Amplification products were electrophoresed on a 2.0% agarose gel and visualized by SYBR Green staining.

and GABA_{B1(g)}, but not GABA_{B1(d)}, were detected in the tissue (Fig. 4B). Levels of mRNAs for GABA_{B1(c)}, GABA_{B1(e)}, and GABA_{B1(f)} were greater in the LES (Fig. 4B). The bands for GABA_{B1} and GABA_{B2} receptors were sequenced and found to be identical to the reported human GABA_BR in levels of nucleotide sequences (data not shown).

Discussion

The present study provided the first evidence for the presence of GABA_BR proteins and mRNAs in human LES as well as in human stomach corpus. Western blot analysis showed that both GABA_{B1(a)/GABA_{B1(b)}- and GABA_{B2}-subunit proteins were present in the muscle layer of the LES. Separation into the muscle and mucosal layer preparations were confirmed by RT-PCR using SMA and mucin MUC5AC, and thus the result of the Western blot analysis indicates that the GABA_BR protein was present in the muscle layer of human LES. Since the muscle layer contains not only smooth muscle cells but also neuronal plexus and nerve terminals of motor and afferent neurons, it should be determined whether the GABA_BR is located on the neuronal tissue and/or muscle tissue. Histochemical and immuno-}

histochemical findings provided an obvious fact that both GABA_{B1}- and GABA_{B2}-subunit proteins were located on the neurons within myenteric plexus, indicating that the functional GABA_BR forming heterodimers with GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits is located on the neurons in the myenteric neurons in the LES in addition to stomach corpus. The functional GABA_BR has been shown to form heterodimers with GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits (15–18). Whilst GABA_{B1} is responsible for the binding of agonist, GABA_{B2}R is considered to be responsible not only for the correct trafficking of the receptor to the cell surface (21, 23, 33), but also absolutely required for downstream of G protein signaling (20, 23, 34, 35). The GABA_BR in human LES forms heterodimers consisted of GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits and may express a fully functional GABA_BR.

There are some reports in the literature describing the mechanism underlying transient relaxations of LES by functional studies. The involvement of GABA_BR in the inhibition of transient LES relaxations is attributed to activation of GABA_BR present in the dorsal vagal complex (10, 11), vagal mechanosensitive afferent neurons (11–13), and vagal motor neurons innervating LES (14). In ferret LES, baclofen has been shown to reduce vagal output at two peripheral sites, presynapti-

cally on preganglionic neurons and on a not-identified site other than LES smooth muscle and inhibitory enteric neurons innervating smooth muscle (36). These studies did not resolve whether GABA_BR was located on the nerve terminals of motor and afferent neurons in addition to the myenteric neuronal cell body. Thus, the present study elucidated the presence of GABA_BR in the neuronal tissues of human LES. The property of these neurons possessing the GABA_BR seems to be different from those in the intestine, in which the GABA_BRs are located on the enteric cholinergic neurons and their stimulations lead to an inhibition of intestinal motility mediated by inhibition of acetylcholine release (9). In the LES, GABA_BR activated by baclofen could be located on the neurons that directly or indirectly modulate the inhibition of transient relaxation of LES.

The isoforms of the GABA_{B1} subunit were examined with RT-PCR. mRNAs for GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits were observed in the LES. The GABA_{B1} subunit has been identified to have seven isoforms of splice variants (24–30). mRNAs for 6 isoforms of GABA_{B1} subunits: GABA_{B1(a)}, GABA_{B1(b)}, GABA_{B1(c)}, GABA_{B1(e)}, GABA_{B1(f)}, and GABA_{B1(g)}, excluding GABA_{B1(d)}, were detected in the LES and stomach. Similar results have been obtained in colon of dogs (9) and the humans (37). mRNAs for GABA_{B1(c)}, GABA_{B1(e)}, and GABA_{B1(f)} were detected at high levels in the LES and stomach, as compared with the human brain. The GABA_{B1(e)} isoform has been shown to be the primary isoform detected in the peripheral tissues, and it is a minor component in the central nervous system (28). There are some reports on the different localization, presynaptic site and/or postsynaptic site, of GABA_{B1(a)} and GABA_{B1(b)} isoforms in the brain (38). Other isoforms of splice variants of GABA_{B1} (24–30) may be expressed with different expression patterns in different tissues; the affinity of each GABA_BR subtype may be dependent on the expression levels of each GABA_{B1} isoform. One report has shown the presence of two kinds of GABA_BR in ferret LES, one is sensitive to and the other is insensitive to GABA_BR antagonists (36). This may be attributable to a difference of GABA_{B1} isoform, and thus what isoform is predominantly localized at the different tissues or cells remains the subject of our ongoing studies. Furthermore, mRNAs and proteins for GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits were detected in the stomach, so the detailed localization of GABA_BR protein in the stomach also remains to be assessed in our ongoing studies.

In conclusion, the GABA_BR forming heterodimers with GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits is present in human LES and is located on the neurons in the myenteric plexus. These findings indicate that GABA_BR agonists act on the level of peripheral tissues and could be

available for the treatment of gastro-esophageal reflux diseases, by inhibiting transient relaxation of the LES.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; Smoking Foundation; Naito Foundation; and Daiichi-Sankyo Pharmaceuticals.

References

- 1 Erdo SL. Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 1985;6:205–208.
- 2 Tanaka C. γ -Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci.* 1985;37:2221–2235.
- 3 Jessen KR, Mirsky R, Hills M. GABA as an autonomic neurotransmitter: studies on intrinsic GABAergic neurons in the myenteric plexus of the gut. *Trends Neurosci.* 1987;6:255–262.
- 4 Giotti A, Luzzi S, Spagnesi S, Zilletti L. GABA_A and GABA_B receptor-mediated effects in guinea pig ileum. *Br J Pharmacol.* 1983;78:469–478.
- 5 Kawakami S, Uezono Y, Makimoto N, Enjoji A, Kaibara M, Kanematsu T, et al. Characterization of GABA_B receptors involved in inhibition of motility associated with acetylcholine release in the dog small intestine: possible existence of a heterodimer of GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits. *J Pharmacol Sci.* 2004;94:368–375.
- 6 Lehmann A, Antonsson M, Bremner-Danielsen M, Flårdh M, Hansson-Bränden L, Kärrberg L. Activation of the GABA_B receptor inhibits transient lower esophageal sphincter relaxations in dogs. *Gastroenterology.* 1999;117:1147–1154.
- 7 Blackshaw LA, Staunton E, Lehmann A, Dent J. Inhibition of transient LES relaxations and reflux in ferrets by GABA_B receptor agonists. *Am J Physiol.* 1999;277:G867–G874.
- 8 Lidmus I, Lehmann A, Checklin H, Dent J, Holloway RH. Control of transient lower esophageal sphincter relaxations and reflux by the GABA_B agonist baclofen in normal subjects. *Gastroenterology.* 2000;118:7–13.
- 9 Zhang Q, Lehmann A, Rigda R, Dent J, Holloway RH. Control of transient lower oesophageal sphincter relaxations and reflux by the GABA_B agonist baclofen in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Gut.* 2002;50:19–24.
- 10 McDermott CM, Abrahams TP, Partosoedarso E, Hyland N, Ekstrand J, Monroe M, et al. Site of action of GABA_B receptor for vagal motor control of the lower esophageal sphincter in ferrets and rats. *Gastroenterology.* 2001;120:1749–1762.
- 11 Partosoedarso ER, Young RL, Blackshaw LA. GABA_B receptors on vagal afferent pathways: peripheral and central inhibition. *Am J Physiol.* 2001;280:G658–G668.
- 12 Blackshaw LA. Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies: IV. GABA_B receptors in the brain-gastroesophageal axis. *Am J Physiol.* 2001;281:G311–G315.
- 13 Andrews PLR, Sanger GJ. Abdominal vagal afferent neurons: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Cur Opin Pharmacol.* 2002;2:650–656.
- 14 Smid SD, Blackshaw LA. Vagal neurotransmission to the ferret lower oesophageal sphincter: inhibition via GABA_B receptors. *Br J Pharmacol.* 2000;131:624–630.

- 15 Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, et al. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature*. 1998;396:674–679.
- 16 Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, et al. GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. 1998;396:683–687.
- 17 White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature*. 1998;396:679–682.
- 18 Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science*. 1999;283:74–77.
- 19 Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, et al. International union of pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*. 2002;54:247–264.
- 20 Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA_B receptor heterodimerization. *Neuron*. 2000;27:97–106.
- 21 Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, et al. The C-terminal domains of the GABA_B receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci*. 2001;21:1203–1210.
- 22 Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, et al. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA_B receptor function. *EMBO J*. 2001;20:2152–2159.
- 23 Uezono Y, Kanaide M, Kaibara M, Barzilai R, Dascal N, Sumikawa K, et al. Coupling of GABA_B receptor GABA_{B2} subunit to G proteins: evidence from *Xenopus* oocytes and baby hamster kidney cell expression system. *Am J Physiol*. 2006;290:C200–C207.
- 24 Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, et al. Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 1997;386:239–246.
- 25 Isomoto S, Kaibara M, Sakurai-Yamashita Y, Nagayama Y, Uezono Y, Yano K, et al. Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABA_B receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253:10–15.
- 26 Pfaff T, Malitschek B, Kaupmann K, Prezeau L, Pin JP, Bettler B, et al. Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA_BR1 receptor. *Eur J Neurosci*. 1999;11:2874–2882.
- 27 Calver AR, Medhurst AD, Robbins MJ, Charles KJ, Evans ML, Harrison DC, et al. The expression of GABA_{B1} and GABA_{B2} receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience*. 2000;100:155–170.
- 28 Schwarz DA, Barry G, Eliasof SD, Petroski RE, Conlon PI, Maki RA. Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABA_{B(1c)}, a GABA_{B(1)} splice variant encoding a truncated receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:32174–32181.
- 29 Wei K, Eubanks JH, Francis J, Jia Z, Snead OC. Cloning and tissue distribution of a novel isoform of the rat GABA_BR1 receptor subunit. *Neuroreport*. 2001;12:833–837.
- 30 Wei K, Jia Z, Wang YT, Yang J, Liu CC, Snead OC. Cloning and characterization of a novel variant of rat GABA_BR1 with a truncated C-terminus. *Brain Res*. 2001;89:103–110.
- 31 Ueda T, Araki N, Mano M, Myoui A, Joyama S, Ishiguro S, et al. Frequent expression of smooth muscle markers in malignant fibrous histiocytoma of bone. *J Clin Pathol*. 2002;55:853–858.
- 32 Guzman K, Gray TE, Yoon J-H, Nettesheim P. Quantification of mucin RNA by PCR reveals induction of both MUC2 and MUC5AC mRNA levels by retinoids. *Am J Physiol*. 1996;271:L1023–L1028.
- 33 Filippov AK, Couve A, Pangalos MN, Walsh FS, Brown DA, Moss MJ. Heteromeric assembly of GABA_BR1 and GABA_BR2 receptor subunits inhibits Ca²⁺ current in sympathetic neurons. *J Neurosci*. 2000;20:2867–2874.
- 34 Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin JP, et al. A single subunit (GB2) is required for G protein activation by the heterodimeric GABA_B receptor. *J Biol Chem*. 2001;277:3236–3241.
- 35 Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, et al. GABA_{B2} is essential for G-protein coupling of the GABA_B receptor heterodimer. *J Neurosci*. 2001;21:8043–8052.
- 36 Blackshaw LA, Smid SD, O'Donnell TA, Dent J. GABA_B receptor-mediated effects on vagal pathways to the lower oesophageal sphincter and heart. *Br J Pharmacol*. 2000;130:279–288.
- 37 Uezono Y, Kaibara M, Hayashi H, Kawakami S, Enjoji A, Kanematsu T, et al. Characterization of GABA_B receptor in the human colon. *J Pharmacol Sci*. 2004;94:211–213.
- 38 Princivalle AP, Spreafico R, Bowery NG, de Curtis M. Layer-specific immunocytochemical localization of GABA_BR1a and GABA_BR1b receptors in the rat piriform cortex. *Eur J Neurosci*. 2000;12:1516–1520.

がん対策基本法と がん疼痛基礎医学研究

国立がんセンター研究所がん患者病態生理研究部部长 上園 保仁

はじめに

国民の念願であった、「がん対策を充実させてほしい!」という思いが、2007年4月に「がん対策基本法」を施行させ、同年6月には「がん対策推進基本計画」が策定されました。策定より2年あまりが経過し、何とんでも今までと違うと感じるのは、がん患者さんやその家族の思い、意向を取り上げその実現に取り組むという流れができ、それが推進されていることです。がん予防から適切な検査法の開発実践、治療の進歩、そして緩和ケアに至るまでの総合的対策が以前とは違って実感される場所であると思います。緩和ケアの推進にあたっては、日本緩和医療学会をはじめとして、さまざまな学会組織、研究会、そしてNPO組織が緩和ケアの推進を目指して頑張っておられます。

その一方で、逆に緩和ケアの充実に伴って、もはや(一般的な)治療が期待できなくなった患者さんを優しく緩和ケアへといざない、その結果実は患者さんはまだまだ治療を受けたいと思っても、充実してきた緩和ケアの世界へ追いやられる—そのような風潮に懸念を感じる患者さんが増えてきているという指摘もあります¹⁾。緩和ケアの普及を目指す方々のゴールは、「がん患者さんの価値観を尊重し、医療のプロフェッショナルとして必要ながん治療とケアを必要な場で提供すること」²⁾だと思います。ただわかっている、そこに達するためには何が必要なのか? まだまだ

試行錯誤が続いているところだと思います。

このたび基礎医学を行っている研究者として、緩和ケアと基礎医学との関係を紹介する機会をいただきました。今回は「がん対策基本法とがん疼痛基礎医学研究」ということでお話したいと思います。

WHO方式がん疼痛治療法と 基礎医学

進行がんの約7割の方は、がんの痛みが最もつらい症状であると訴え、患者さんのquality of life (QOL)を最も低下させているのが痛みであるといわれます。おそらく緩和ケアの第1の対策は、がん患者さんを痛みから解放することであると思います。幸いにして本邦でも、1986年に世界保健機関(WHO)により発表されたWHO方式がん疼痛治療法に沿った適切ながん疼痛対策が行われるようになってきました。1段進むとさらにみえてくるものが「もっと工夫できないか」、「まだまだよい方法があるのではないか」といった、がん患者さんの痛みをもっととることができないかという思いです。このWHO方式がん疼痛治療法を適切に用いるとおおよそ85~90%の方の痛みが改善するとのデータがあります。裏を返すとまだ10~15%の方のがんの痛みは上手にとれていないこととなります。

WHO方式の除痛法に従うと、痛みの強さに応じて非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)またはアセトアミノフェンからリン酸コデインなどの弱オピオイド、そしてモルヒネなどの強オピオイドと



順次症状に応じて選択が行われます。加えて鎮痛補助薬といわれる薬剤が必要に応じて用いられます²⁾。これまでに治療を行ったさまざまな臨床例から、痛みの種類や強さが分類され、それに合わせて各種薬剤を選択するというスキームが作成されています²⁾。ただ、そのようにやってみてもまだ15%は痛みがとれません。それはもちろん、痛みを起こすメカニズムがかなり複雑であること、言い換えると、私たちの体の中には、医療用麻薬(オピオイド)が効くオピオイド受容体に限らず、他にも痛みを発生させるもの、あるいは痛みを抑える機構がたくさん存在するという事です。痛みを制御する因子が数多くあるため、またそれらが複雑に絡み合っているために、まだまだその深遠なるメカニズム解明に至っていないというのが現状です。そうすると、そのメカニズムを基礎医学で解明し、結果を臨床にフィードバックすることが求められます。

基礎医学の進展と臨床との関わり

最近の分子生物学や遺伝子工学、電気生理学の進歩、また痛みに関与する細胞膜受容体やイオンチャンネルを体から遺伝的になくしてしまったノックアウトマウスを用いて研究を行うことにより、痛みに関与する生体内物質の研究は格段の進歩をみせました。特に生体に μ 、 δ 、 κ と3種類あるそれぞれのオピオイド受容体活性化による鎮痛機構は、分子レベルでかなりよくわかってきました。その結果、モルヒネ、オキシコドン、フェンタニルといった本邦で用いられているオピオイド製剤の鎮痛作用の違いや耐性メカニズムの違いなどがわかってきつつあります。さらに基礎研究を進めることで、オピオイド受容体の機能に限らず、さまざまな鎮痛補助薬が生体のどの受容体やイオンチャンネルを、さらに他の生体構成物質に作用して痛みをとっているのかという問題についても解明が進んでくると思います。この数年でさらにクリ

アな、オピオイド製剤や鎮痛補助薬の選択の根拠を明らかにできるようになると思います。問題点は、細胞レベルでわかったことがどれだけ動物モデルやヒトでもいえるのか、そして臨床に当てはまるかということです。このリンクをしっかりとつないでいかないと、臨床での疑問を基礎医学レベルで証明しそして還元するというにはなりません。その意味でも、臨床の先生方の処方で、この痛みにはこの薬剤が効くようだとか、詳しい作用点は不明だがこの薬剤はこの種類の痛みによく効くといった現場の声を取り上げ、それを基礎医学で実験し、メカニズムを解明し、その結果を臨床へフィードバックするという双方向での流れを作ることが重要になってきます。

がん研究において重要となるのは、さまざまながんについてそのモデル動物がいかにかに上手にできるかです。がんに限らず、たとえばアルツハイマー病の研究では、いかにしてヒトのアルツハイマー病を表現するモデル動物を作ることができるかということが大変重要になります。痛み研究も同じです。がん疼痛で苦しんでいる患者さんの痛みを再現できる動物モデルをどのように作製するか？分子生物学的な手法を用いて、細胞レベルで発見できた痛み制御メカニズムを動物モデルでいかに再現できるか、さらにはそれをヒトにどのように応用していくかというのは大きな課題となります。この溝を埋めていかないことには臨床の疑問を基礎実験の知見を基に還元していくことにはならないのです。ここが基礎実験の難しいところです。

何事においても、その分野が成長し発展していくにはその基礎的部分が充実していることが重要となります。たとえば、現在脚光を浴びつつある電気自動車は、燃料電池の基礎的開発が格段に進んできたからこそ実用化に至ったわけです。拍手喝采といたいところですが、量産し流行させるには、さらに充電機能をもつスタンドを全国津々浦々に配備しないとイケません。ガソリン車を凌

駕するにはまだまだ総合力が必要となります。基礎研究をベースとして薬剤選択の基準や新薬が作られたとしても、それを臨床のスタンダードにするには、薬剤の投与方法や剤形の工夫をしたり、安価で提供するという総合的な対応が必要ということかもしれません。

がん患者さんのQOL向上を目指して

「がん対策基本法」で謳われている、患者さんのQOLの向上を早期から目指すという点において、がん患者さんのQOLを下げるものは痛みだけではなく他にもたくさんあります。システマティックレビュー³⁾において、がん患者さんは37以上もの耐えられない苦しみが存在するとの報告があります。全がん患者さんの中で感じる苦しみを上位から挙げると、疲労感74%、痛み71%、倦怠感69%、衰弱感60%、食思不振53%などです。痛みに関しては基礎的研究もだんだん進み、臨床での薬剤選択などにおいてその根拠となるデータを紹介できるところまできつつあります。

一方、上位から4、5番目に症状の多い、衰弱感と食思不振という症状の1群は、がん患者さん特有の悪液質と呼ばれる症状から起こる場合が多いことが知られています。悪液質の改善はかなりの患者さんのQOLを向上させると考えられます。悪液質の原因、治療についての基礎研究は、行われてきてはいますがまだその本態についてはわからないことが数多く残っています。悪液質の原因を解明し、衰弱感、食思不振などを改善させる治療法があれば4、5番目の主症状は改善されるわけです。このように、痛みの基礎研究以外にも基礎研究として重要な課題があることがわかりだと思えます。

おわりに

WHOは緩和ケアを、「生命を脅かす疾患によ

る問題に直面している患者ならびにその家族に対し、疾患の早期から全人的苦痛について適切な評価を行い、QOLを向上させること」と定義しています。この全人的苦痛(身体的苦痛、精神的苦痛、社会的苦痛、スピリチュアルペイン)からの解放のためには、緩和ケア医、精神科医、薬剤師、看護師、地域の在宅医、ソーシャルワーカー、ボランティアなど、多くの方々の支援が必要となります。その中で、痛み研究、悪液質研究などを行う基礎医学研究者も、QOL向上を目指すための適切な治療を行える基盤となるデータを提供しているという意味で、全人的苦痛からの解放に取り組んでおられる方々と同様に、緩和ケアを支えているといってもよいかと思います。むしろその思いをもって研究に取り組むことが重要であると考えます。

患者さんのQOLを向上させるために、基礎医学研究者も積極的に痛み研究などに携わり、そこで生まれたデータを活かして、適切な薬剤選択方法やあるいは新薬などが臨床の現場まで運ばれ、実際にそれが使われるというところまでをみずえた研究を行うことができると願っています。そのような下支え研究を続けることができる環境の構築は「がん対策基本法」の進展を別サイドからフォローすることになると確信しています。

今回はその具体的な研究について述べさせていただきます。

文献

- 1) 本田麻由美：患者・家族の立場から—がん病変治療も緩和ケアもがん治療として、患者の必要に応じ、望む場で、提供を、がん患者と対療 20：42-47, 2009
- 2) 的場元弘：がん疼痛治療のレシピ(2007年版)、東京、春秋社、2006
- 3) Teunissen SC, Wesker W, Kruitwagen C, et al : Symptom prevalence in patients with incurable cancer ; A systematic review. J Pain Symptom Manage 31 : 94-104, 2007

自律神経の薬理

上園保仁

キーワード：自律神経, ノルアドレナリン, アセチルコリン, アゴニスト, アンタゴニスト
autonomic nervous system, norepinephrine, acetylcholine, agonist, antagonist

抄録：自律神経は交感神経, 副交感神経よりなる。交感神経節後線維はノルアドレナリン (NE) 作動性神経であり, 副交感神経節後線維はアセチルコリン (ACh) 作動性神経である。

多くの臓器は交感神経と副交感神経の二重支配を受ける。通常は両者がバランスよく生体調節を行っているが, ときにバランスがくずれ自律神経失調となる。自律神経機能を正常に復帰させる有効な方法は, 自律神経生理機能に立脚した薬物療法である。

副交感神経にはたらく薬物, すなわち ACh 作動性神経にはたらく薬物としては, シナプス後膜の受容体に作用する薬物, アセチルコリンエステラーゼ活性を阻害する薬物がある。交感神経にはたらく薬物, すなわち NE 神経にはたらく薬物としては, NE 受容体の活性薬および遮断薬, さらに, NE 取り込みを阻害する薬物などがある。

自律神経を調節する薬物は, ACh, NE の生合成から貯蔵, 遊離, 分解に至る過程で働くもの, 多様化した受容体のアゴニスト, アンタゴニストとしてはたらくものなど多様である。これらの薬物の作用点をしっかり理解し, 拮抗する交感・副交感神経のどちらの反応を促進(抑制)すれば自律神経機能が回復するかを考えて薬物治療を行う。

(自律神経, 46:139~146, 2009)

はじめに

交感神経, 副交感神経はそれぞれ節前線維, 節後線維の2つの神経からなる。中枢神経より起始する節前線維は自律神経節で節後線維とシナプスを形成し, 節後線維は諸臓器に分布してその機能を調節する。両神経の節前線維, および副交感神経の節後線維はコリン作動性神経であり, 神経伝達物質はアセチルコリン (acetylcholine: ACh) である。交感神経の節後線維はノルアドレナリン (norepinephrine: NE) を神経伝達物質とするアドレナリン作動性神経である。

多くの臓器は交感神経と副交感神経の二重支配を受け, 通常両神経系は諸臓器を互いに拮抗的に支配する。

二重支配を受ける臓器ではどちらかの神経支配が優勢であり, 自律神経節に作用する薬物の効果はいずれか一方の神経系に対する効果として発現される。本教育講演では, コリン作動性・アドレナリン作動性シナプスの伝達機構とその作用薬について概説する^{1)~3)}。

1. コリン作動性神経伝達

1. コリン作動性シナプスにおける神経伝達機構

コリン作動性シナプスは自律神経系における交感神経・副交感神経の自律神経節と, 副交感神経節後線維と効果器の間に存在する。他に運動神経筋接合部にも存在する。ACh は図1のように, コリンとアセチル CoA (coenzyme A) からコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase: ChAT) によって生合成される。神経刺激により神経終末から遊離された ACh は, シナプス後膜のアセチルコリン受容体に結合

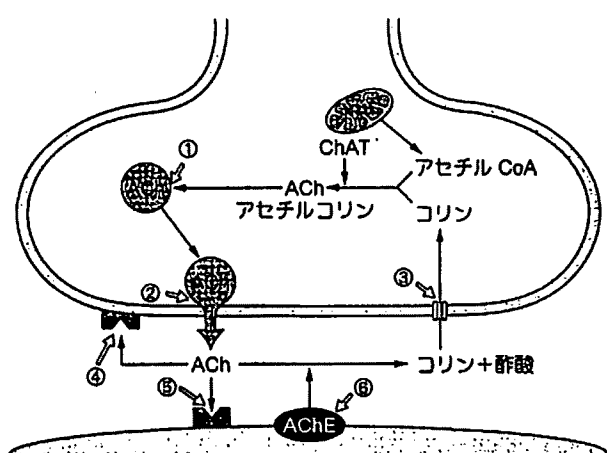


図1 コリン作動性シナプスにおける神経伝達
 AChはコリンとアセチルCoAから合成され、小胞に取り込まれる。小胞は神経終末膜と融合し、AChが開口放出される。放出されたAChはシナプス前膜および後膜のACh受容体に結合して作用を発現する。また、放出され、受容体に作用したAChは、アセチルコリンエステラーゼにより分解されてコリンと酢酸になる。分解産物のコリンはシナプス前部に取り込まれる。①～⑥に作用する薬物は表1, 2に記述する。
 ACh: アセチルコリン, AChE: アセチルコリンエステラーゼ, ChAT: コリンアセチルトランスフェラーゼ, CoA: coenzyme A (文献3より)

し神経伝達を行うと、瞬時にアセチルコリンエステラーゼによりコリンと酢酸に分解される。コリンエステラーゼ (cholinesterase: ChE) には、シナプス膜や神経筋接合部に存在する特異的アセチルコリンエステラーゼと、グリア細胞、血漿、肝臓などに存在し、非特異的なエステラーゼであるブチリルコリンエステラーゼがある。

コリン作動性シナプスに作用する薬物は、作用部位によりシナプス前部とシナプス後部にはたらくものに分けられるが、実際に臨床薬物として用いられるものはシナプス後膜の受容体に作用するもの、およびアセチルコリンエステラーゼ活性を阻害する薬物である。

2. シナプス前部に作用する薬物(図1①～④, 表1)

神経終末で合成されたAChは小胞に貯蔵されるが、ベサミコールは小胞へのAChの取り込みを阻害する(図1①)。細菌性食中毒を起こすボツリヌス菌から放出されるボツリヌス毒素は、神経終末からのACh遊離を抑制する(図1②)。米国においてはこのボツリヌス毒素が顔のしわをとる美容外科治療に用いられている⁹⁾。ACh合成系へのコリンの能動的取り込みを阻害する薬物にヘミコリニウムがある(図1③)。コリン

作動性神経終末から遊離したAChは、それ自身の神経終末に存在するムスカリン性受容体に結合して負のフィードバックによりACh遊離を抑制する(図1④)。

3. シナプス後部に作用する薬物(図1⑤, ⑥, 表1)

シナプス後膜に存在するACh受容体の活性薬と阻害薬(図1⑤)、およびACh分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼの活性阻害薬物(図1⑥)はともに臨床に应用されている。

1) アセチルコリン受容体(表2)

ACh受容体は、ニコチン性受容体とムスカリン性受容体に分類される。ニコチン性受容体は交感、副交感神経節のシナプス後膜、および副腎髄質細胞、さらに神経筋接合部、中枢神経に存在する。ムスカリン性受容体は副交感神経節後線維が分布する効果器(シナプス後部)、およびシナプス前部のコリン作動性神経終末と、神経節のシナプス後膜にも存在する。

ニコチン性受容体は、受容体そのものが陽イオン透過性チャネルを内蔵しており、神経終末から遊離されたAChがニコチン性受容体に結合すると、受容体内在する陽イオンチャネルが開口し、Na⁺やCa²⁺が流入する。自律神経節のニコチン性受容体は、神経筋接合部のニコチン性受容体とは異なる遺伝子によりコードされており、薬物に対する感受性が異なる。自律神経節のニコチン性受容体(N_N)はヘキサメトニウム(C6)感受性で、α・βサブユニットと呼ばれる2種類のサブユニットから構成される五量体である。一方、神経筋接合部の受容体(N_M)はデカメトニウム(C10)感受性で、α(2個)・β・γ(ε)・δサブユニットから構成される五量体である。ニコチン性受容体活性薬の治療用途については、アルツハイマー病の症状緩和や禁煙に用いるための薬物として開発が進んでいる。N_Nの遮断薬として臨床に用いられている薬はトリメタファンである。N_Mの遮断薬は臨床においては筋弛緩薬として用いられている。

ムスカリン受容体はG蛋白共役型7回膜貫通型受容体であり、M₁₋₅の5種類のサブタイプに分類される。種々の作用薬、拮抗薬に対する親和性に差があるが、いずれもG蛋白質と共役して細胞内に情報を伝える。M₁, M₃, M₅受容体はG_{q/11}蛋白質と、M₂, M₄受容体はG_{i/o}蛋白質と共役している。M₁, M₅受容体は中枢神経や自律神経節に発現しており、AChがM₁, M₅受容体に結合すると、共役しているG_{q/11}蛋白質を介してホスホリパーゼCが活性化され、ホスファチジルイ

自律神経の薬理

表1 コリン作動性シナプスに作用する薬物

| | 活性化薬 | 阻害薬 |
|--|-------------------------------|---|
| シナプス前部 AChの小胞への取り込み (①) AChの遊離 (②) | ベサミコール βブングロトキシン 黒後家グモ毒 | ボツリヌス毒素 |
| コリンの取込み (③) 前膜受容体 (④) | ムスカリン オキソトレモリン | ヘミコリニウム アトロピン スコポラミン |
| シナプス後部 後膜受容体 (⑤) ニコチン性受容体 ムスカリン性受容体 ACh エステラーゼ活性 (⑥) | 表2 参照 表2 参照 | 表2 参照 表2 参照 可逆：フィゾスチグミン ネオスチグミン 不可逆：パラチオン |

①～⑥：図1参照, ACh：アセチルコリン

(文献3より一部改変)

表2 アセチルコリン受容体の局在と作用薬

| サブタイプ | 局在 | アゴニスト | アンタゴニスト |
|--|--|----------------------------|---|
| ニコチン性 神経型 (N _N) | 自律神経節 | ニコチン | ヘキサメトニウム (C6) トリメタファン メカミラミン ネオスルガトキシン |
| 筋肉型 (N _M) | 神経節接合部 | ニコチン | ツボクラリン デカメトニウム (C10) バンクロニウム |
| ムスカリン性 M ₁ M ₂ M ₃ M ₄ M ₅ | 中枢神経, 自律神経節 心臓ペースメーカー, 心筋 副交感神経効果器官 (心臓以外) 中枢神経 中枢神経 | ピロカルピン ベタネコール ベタネコール | ピレンゼピン AFDX116 4DAMP |

(文献3, 4より一部改変)

ノシオール (phosphatidylinositol : PI) が分解され, IP₃, DAG がセカンドメッセンジャーとして産生され, シナプス伝達が促進される。M₂受容体は心臓ペースメーカー細胞や心筋にあり, ACh が M₂受容体に結合すると, 共役している G_{i/o}蛋白質を介して心臓ペースメーカー細胞では K⁺チャネルの開口→過分極→陰性変時作用が発現し, 心筋ではアデニル酸シクラーゼの抑制→cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 産生の低下→陰性変力作用が発現する。M₄受容体は中枢神経系に発現し, G_{i/o}蛋白質を介して作用を発揮していると考えられている。M₃受容体は心臓以外の副交感神経効果器官にあり, ACh が M₃受容体に結合すると, ホ

スホリパーゼCの活性化, PI分解促進, DAG, IP₃産生促進の結果, 平滑筋収縮や腺分泌亢進が発現する。

臨床に用いられているムスカリン性受容体活性化薬はベタネコール (術後の胃腸管運動促進, 術後や神経障害による尿閉の治療, 唾液分泌障害の治療など), ピロカルピン (点眼薬) などである。ムスカリン性受容体遮断薬は散瞳薬, 鎮痛薬, 気管支拡張薬, パーキンソン病治療薬などさまざまな疾患に用いられている (アトロピン, スコポラミン, プロバンテリン, ピレンゼピン, イプラトロピウム, トリヘキシフェニジルなど)。

2) アセチルコリンエステラーゼ (図1⑥, 表1)
シナプス前部から遊離されたAChは, 受容体に結

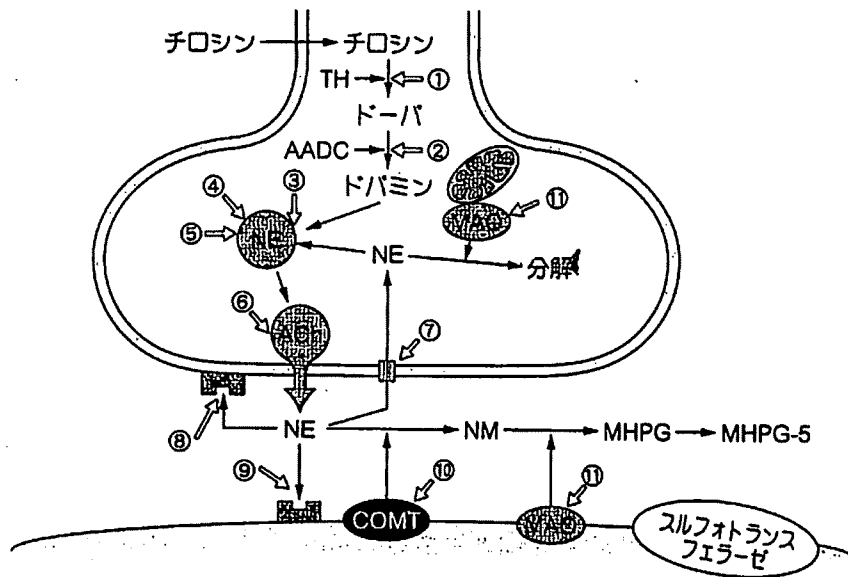


図2 アドレナリン作動性シナプスにおける神経伝達

NEはチロシンから合成されたドーパミンが小胞に取り込まれ、小胞内で合成される。小胞は神経終末膜と融合し、NEが開口放出される。放出されたNEはシナプス前膜および後膜のNE受容体に結合して作用を発現する。放出されたNEの大半は再び神経終末に取り込まれ、残りは酵素的に不活性化される。①～⑪に作用する薬物は表3, 5に記述する。

TH: チロシン水酸化酵素, AADC: 芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素, NE: ノルアドレナリン, NM: ノルメタネフリン, MHPG: 3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルグリコール, MAO: モノアミン酸化酵素, COMT: カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (文献3より)

合して反応を起こすと同時に、アセチルコリンエステラーゼによって瞬時に分解されてコリンと酢酸になる。この分解によってAChによるシグナル伝達は速やかに終了する。

ChE活性阻害薬には、可逆的なものと、不可逆的なものがあり、可逆的ChE阻害薬(フィソスチグミン, ネオスチグミン, エドロホニウム, アンペニウム)は緑内障の治療や重症筋無力症の治療と診断、およびアルツハイマー型痴呆症の症状改善(ドネペジル)に用いられる。不可逆的ChE阻害薬には強力な殺虫剤(パラチオン, マラチオン)や神経性毒ガス(タブン, サリン, ソマン)がある。

II. アドレナリン作動性神経伝達

1. アドレナリン作動性シナプスの神経伝達機構

交感神経節後線維の伝達物質の大部分はノルアドレナリン(norepinephrine: NE)である。図2のようにNE生合成の主な経路はチロシン→ドーパ→ドーパミン→NEである。神経刺激によってアドレナリン作動性

神経終末から遊離されたNEは、大部分が再び神経終末内に取り込まれる(図2⑦)。一部のNEは、シナプス後膜のαおよびβ受容体(図2⑨)、あるいはシナプス前膜のα受容体(図2⑧)に結合する。遊離されたNEはカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ(catechol-O-methyl transferase: COMT)によりノルメタネフリンに代謝される(図2⑩)。

2. シナプス前部に作用する薬物(図2①～⑧, 表3)

1) ノルアドレナリンの生合成に影響する薬物(図2①～④, 表3)

①チロシン→ドーパ(図2①)

チロシンは能動輸送により神経終末内に取り込まれ、そこで細胞内に存在するチロシン水酸化酵素(tyrosine hydroxylase: TH)によってドーパに変換される。THは基質特異性が高く、L-チロシンを基質としてL-ドーパを生成する。TH阻害薬であるα-メチル-p-チロシンは交感神経終末のNE量を著明に減少させる。

②ドーパ→ドーパミン(図2②)

ドーパは芳香族L-アミノ酸デカルボキシラーゼ

表3 アドレナリン作動性シナプスに作用する薬物

| | 活性化薬 | 阻害薬 |
|------------------|---------|--------------|
| シナプス前部 | | |
| ドーパ合成 (①) | | α-メチル-p-チロシン |
| ドパミン合成 (②) | | α-メチル-ドーパ |
| ドパミンの小胞への取込み (③) | | フザリン酸 |
| NEの合成 (④) | ドロキシドーパ | レセルピン |
| NEの貯蔵 (⑤) | アンフェタミン | |
| NEの遊離 (⑥) | チラミン | |
| | エフェドリン | デシプラミン |
| NEの取込み (⑦) | | イミプラミン |
| | | コカイン |
| | | ヨヒンビン |
| 前膜受容体 (⑧) | クロニジン | |
| シナプス後部 | | |
| 後膜受容体 (⑨) | | |
| α受容体 | 表5参照 | 表5参照 |
| β受容体 | 表5参照 | 表5参照 |
| COMT活性 (⑩) | | トロボリン |
| MAO活性 (⑪) | | パーズリン |

①~⑪：表2参照，NE：ノルアドレナリン，COMT：カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ，MAO：モノアミン酸化酵素（文献3より一部改変）

(aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) によってドパミンに変換される。高血圧治療薬であるα-メチルドーパはこの酵素によって脱炭酸され、さらにβ-水酸化反応を受けα-メチルノルアドレナリンに転じる。これはアドレナリン作動性神経終末で、NEと置換し、神経刺激により遊離される。

③ドパミン→NE (図2③)

細胞質中で生成されたドパミンは顆粒中に取り込まれ、顆粒内に存在するドパミンβ-水酸化酵素 (dopamine-β-hydroxylase : DBH) によりNEに変換され顆粒内に貯えられる。交感神経終末からのNEの遊離に伴い、DBHも同時に放出され、血中DBH濃度が上昇するので、血中DBHの測定は交感神経活性あるいは副腎髄質機能の異常の検索に応用されている。

④NE前駆物質 (図2④)

NEの生体内前駆物質ではないが、ドロキシドーパを生体に投与すると、ドーパデカルボキシラーゼで直接NEを生成する。ドロキシドーパはMAO (monoamine oxidase) の基質とならないので、持続的経口昇圧薬として用いられる。

2) ノルアドレナリンの貯蔵に影響する薬物 (図2⑤, 表3)

交感神経終末のシナプス小胞は、小胞膜に存在するモノアミントランスポーターを介してドパミンを取り

込み、DBHによって生成されたNEを貯蔵するのみならず、細胞外から取り込まれたNEも小胞内へ取り込み、細胞内での代謝酵素による不活性化からNEを保護している。

レセルピンは、アドレナリン作動性神経終末の小胞モノアミントランスポーター (vesicular monoamine transporter : VMAT) を阻害することにより、①ノルエピネフリンの貯蔵顆粒への取り込みを阻害し、ノルエピネフリンを神経終末内に遊離させる。遊離されたノルエピネフリンはMAOによって分解される。また、②ドパミンの貯蔵顆粒への取り込みを阻害する。その結果、貯蔵顆粒内のドパミンβ-ヒドロキシラーゼによるドパミンノルエピネフリンへの生合成が阻害され、細胞質内のドパミンはMAOによって分解される。

3) ノルアドレナリンの遊離に影響する薬物 (図2⑥, ⑧, 表3)

神経刺激により活動電位がアドレナリン作動性神経終末に達すると、Ca²⁺チャネルを介して、Ca²⁺が流入する。神経終末細胞内のCa²⁺濃度が高くなると、NEの開口分泌 (exocytosis) が起こる。

①NE遊離を促進する薬物

チラミン、アンフェタミンは、交感神経終末に作用してNEを遊離させ、間接的に交感神経刺激様作用を示す。チラミンはアドレナリン作動性神経終末に取り

表4 アドレナリン性受容体の特徴

| | α受容体 | | β受容体 | | |
|----------|---|--|--|-----------------------------|-----------------------------|
| | α1 | α2 | β1 | β2 | β3 |
| 細胞内情報伝達系 | Gq/11 IP ₃ /DAG 産生促進 細胞内 Ca ²⁺ 上昇 | G _{i/o} cAMP 産生抑制 K ⁺ チャネル活性化 Ca ²⁺ チャネル抑制 | G _s cAMP 産生促進 | G _s cAMP 産生促進 | G _s cAMP 産生促進 |
| 局在と主な機能 | シナプス後膜 血管収縮 | シナプス前膜と後膜 NE 遊離抑制 | シナプス後膜 心機能亢進 脂肪分解 胃腸管弛緩 グリコーゲン分解 | シナプス後膜 気管支拡張 血管弛緩 | シナプス後膜 脂肪分解 血管弛緩 |

cAMP: サイクリックアデノシン・1リン酸

(文献3, 4より一部改変)

込まれて、シナプス小胞の NE と置換することにより NE を放出する。チラミンを多く含む食物 (チーズ, チョコレート, ヨーグルト, ビール, にしん, 鶏肝など) を, MAO 阻害薬使用時に摂取すると高血圧発作を起こしやすい。アンフェタミンも, チラミンと同様に NE を置換放出させることにより間接的に作用する。交感神経刺激様作用よりも強力な神経興奮作用を持ち, 覚醒剤として使用される。エフェドリンは NE 遊離作用に加え, 直接アドレナリン受容体に結合して作用を発現する。エフェドリンは麻黄に含まれるアルカロイドで, β 受容体刺激作用を持つことから気管支喘息の予防と治療に用いられる。

② NE 遊離を抑制する薬物

グアナチジンとブレチリウムがあるが, 現在, 臨床では使用されていない。グアナチジンの NE 遊離抑制作用は速効性で, かつ持続的である。レセルピンと異なり, 血液脳関門を通過しにくいので中枢神経系に対する作用はなく, また副腎髄質に対する作用も著明でない。

ブレチリウムは電位依存性 K⁺チャネルを阻害し活動電位を延長することで神経終末からの NE の遊離を抑制する。グアナチジンやレセルピンと異なり, 神経終末の NE を枯渇させる作用がないので, 作用の発現は速いが, 持続は短い。

クロニジンなどの α₂ 受容体作用薬は, アドレナリン作動性神経終末から遊離した NE 自身が, 神経終末に存在する α₂ 受容体に結合して, 負のフィードバックにより NE 遊離を抑制する (次項「3. アドレナリン受容体」の項参照)。

4) NE の取り込みに影響する薬物 (図2⑦, 表3)⁶⁾

神経刺激により遊離された NE は局所で効果的に代謝, 不活性化されるため, 血中への放出はあまり見られない。局所的な不活性化機構には, 主として神経終末への取り込みによるものと, 代謝酵素による分解がある。NE の取り込みは高親和性 (アドレナリン作動性神経終末) と低親和性 (平滑筋や腺細胞などの神経外組織) 取り込みにより行われる。高親和性取り込みはモノアミントランスポーター (分子量約 69,000 の蛋白質で 12 回の膜貫通部位を有する) を介して行われる⁶⁾。NE の取り込み過程を阻害すると, シナプス間隙での NE 濃度は上昇し, NE 作用が増強される。コカイン, 三環系抗うつ薬 (デシプラミン, イミプラミン, アミトリプチリンなど) がその代表的な薬物である。イミプラミン, アミトリプチリンは NE とともにセロトニンの取り込みも阻害する。

5) NE の代謝過程に影響を及ぼす薬物 (図2⑩, ⑪, 表3)

NE の不活化機構のひとつに酵素による代謝がある。細胞内では主として MAO によって, 酸化的脱アミノ化され, 細胞外では COMT によって代謝される。MAO, COMT はドパミン, NE, アドレナリンのカテコールアミン類の他にセロトニンの代謝的分解も行っている。

COMT は神経外ばかりでなく神経内にも存在するが, COMT の阻害薬であるピロガロールやトロロロン誘導体は, 外来性カテコラミンの作用を著明に増大する。しかし, 臨床薬として用いられることはない (図2⑩)。

MAO は神経外にも存在するが, カテコラミン代謝に重要なのは, 神経内に存在する MAO である。MAO

表5 アドレナリン受容体に作用する薬物

| | α受容体 | | β受容体 | | |
|---------|--|----------------------------|--|--|----------------|
| | α ₁ | α ₂ | β ₁ | β ₂ | β ₃ |
| アゴニスト | フェニレフリン メトキサミン ナファゾリン | クロニジン グアンファシン グアナベンズ | ドブタミン デノバミン | プロカテロール テルブタリン フェノテロール サルブタモール トリメトキノール ヘキソプレナリン リトドリン | カラゾール |
| アンタゴニスト | ブラゾシン テラゾシン ドキサゾシン タムスロシン | ヨヒンビン | アセプトロール アテノロール メトプロロール | プトキサミン | プロプラノロール |
| | フェントラミン, トラゾリン, 変角アルカロイド (エルゴタミン, エルゴメトリン) | | プロプラノロール, アルプレノロール, ビンドロール, チモロール, カルテオロール, ナドロール, ニブラジロール | | |

(文献3, 4より一部改変)

にはAおよびBタイプの2種類が存在する。MAO_Aはノルエピネフリンやセロトニンを基質とし、クロルジリン (clorgyline) やハルマリン (harmaline) で特異的に阻害される。一方、MAO_Bは細胞外でのドバミン、チラミンの分解に関与し、セレギリン (selegiline) で特異的に阻害される。セレギリンはパーキンソン病の治療に用いられる。非特異的 MAO 阻害薬のトラニルシプロミンやフェネルジンなどは抗うつ薬として、パーズリンは高血圧症や狭心症に用いられたこともある (図2⑩)。

3. アドレナリン性受容体 (図2⑧, ⑨, 表4, 5)

交感神経終末から遊離された NE は、効果器の細胞表面に存在する受容体と結合し効果器の機能を調節する。加えて交感神経終末シナプス前膜に存在する受容体とも結合して、NE 遊離を抑制する。

1) α受容体 (表4)

α₁受容体はアドレナリン作動性神経終末の分布する効果器の細胞膜に存在し、α₂受容体は交感神経終末シナプス前膜やシナプス後部、および血小板や膵ランゲルハンス島β細胞膜上に存在する。α₁受容体の刺激によって、①共役している G_{q/11}蛋白質を介してPIの代謝回転が亢進し、②細胞膜および細胞内 Ca²⁺貯蔵部位からの Ca²⁺の遊離、細胞膜での Ca²⁺の透過性の増大などによって細胞質内の Ca²⁺を増加させ、その Ca²⁺がプロテインキナーゼCやCa²⁺-カルモジュリンプロテインキナーゼによる蛋白質リン酸化反応を介して、血管

の収縮反応などを引き起こす。α₂受容体の刺激は共役している G_{i/o}蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し、cAMPを低下させる。さらにCa²⁺チャネルを抑制し、K⁺チャネルを開口させ、神経活動を抑制することによりアドレナリン作動性神経終末からのNE遊離を抑制する。

2) β受容体 (表4)

β受容体はβ₁, β₂, β₃のサブタイプに分類されているが、すべての受容体はG_s蛋白質と共役している。β受容体が活性化されると、G_s受容体を介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、細胞内cAMPが上昇した結果、個々の臓器において反応が現れる。最近、β₃受容体が特に脂肪組織に発現しているのが判明し、受容体刺激により脂肪分解が促進されることから、β₃刺激薬が肥満の治療薬になるのではと研究が進められている⁴⁾。

4. アドレナリン受容体に影響を及ぼす薬物 (表5)

1) α受容体に作用する薬⁴⁾

① α₁アゴニスト

α₁作用薬は心臓に対する直接作用がなく、ほとんどすべての血管を収縮するので、昇圧薬、鼻粘膜充血の除去薬として用いられる。メトキサミンは、ベンゼン環の水酸基がメチル化されているので、COMTに影響されず作用持続が長い。

② α₂アゴニスト

クロニジンはアドレナリン作動性神経終末に存在す

るシナプス前 α_2 受容体に作用して、交感神経興奮による NE 遊離を抑制する。高血圧治療薬として用いられるが、降圧作用は主として脳幹部に作用して、中枢性に交感神経活性を抑制することによる。

③ α アнтаゴニスト

α_1 受容体遮断薬の最も顕著な作用は、カテコールアミンの血管収縮作用を抑制し、心臓作用には影響しないことである。アドレナリンの血圧上昇作用は α_1 受容体遮断により血圧下降に転ずる。これはアドレナリン反転 (adrenaline reversal) と呼ばれ、 α_1 受容体遮断により血管拡張作用 (β 作用) が優位になったためである。シナプス前膜に存在する α 受容体は主に α_2 受容体であり、交感神経興奮にともなう NE の遊離をする負のフィードバック機構に関与すると考えられている。

2) β 受容体に作用する薬⁴⁾

① β_1 アゴニスト

代表的な薬物はドパミンである。ドパミンの誘導体で選択的に β_1 受容体に作用し、血管の α 受容体に対して軽度の刺激作用を有するが、腎血管のドパミン受容体には作用しない。ドパミンより強い心機能亢進作用を有するが、陽性変時作用よりは陽性変力作用を強く現す。

② β_2 アゴニスト

心臓刺激作用がない気管支拡張薬として、選択的に β_2 受容体に作用する薬物が開発され、気管支喘息の治療に用いられている。

③ β アнтаゴニスト

代表的薬物はプロプラノロールである。主として、イソプロテレノールの構造を修飾することによって開発されてきた。 β 遮断薬はカテコールアミンによる心臓作用を遮断する目的で、抗不整脈薬や狭心症予防薬として、高血圧薬として広く臨床に応用される。 β_1 遮断

薬は気管支喘息患者の循環器疾患を治療するのに比較的安全的な薬物である。 β_2 遮断薬は臨床に応用されていない。

おわりに

自律神経を調節する薬物は、ACh, NE の生合成から貯蔵、遊離、分解に至る過程ではたらくもの、多様化した受容体のアゴニスト、アンタゴニストとしてはたらくものなどさまざまなものが臨床薬として用いられている。これらの薬物の作用点をしっかり理解し、拮抗する交感・副交感神経のどちらの反応を促進 (抑制) すれば自律神経機能が回復、強化、あるいは抑制されるかを考えて薬物治療を行うと、作用点に基づいた理論的治療法を行うことができる。臨床の先生方におかれては、用いる薬物の作用点を常に考えた臨床をめざしていただければと願っている。

§ 文 献

- 1) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, tenth edition. Hardman JG, Limbird LE, ed. McGraw-Hill: New York: 2001.
- 2) 田中千賀子, 加藤隆一編. NEW 薬理学, 改訂第 5 版. 南江堂: 東京: 2007.
- 3) 後藤由夫, 本郷道夫編. 自律神経の基礎と臨床, 改訂第 3 版. 医薬ジャーナル社: 東京: 2006.
- 4) 濱野 裕編. 病態生理に基づく臨床薬理学. メディカルサイエンスインターナショナル: 東京: 2006.
- 5) Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels. British Journal of Pharmacology 2006; 147 supplement 3.
- 6) Amara SG, Sonders MS, Zahniser NR, et al. Molecular physiology and regulation of catecholamine transporters. Adv Pharmacol 1998; 42: 164-168.

急速に世界に広まった TRPV6 チャネル変異体のチャネル特性の解析
—TRPV6 クローン発現細胞を用いての解析—

上園保仁 須藤結香

自律神経 第46巻 第3号 別刷

(2009年6月15日)

急速に世界に広まった TRPV6 チャネル変異体のチャネル特性の解析 —TRPV6 クローン発現細胞を用いての解析—

上園保仁^a 須藤結香^b

キーワード：TRPファミリー、アフリカツメガエル卵母細胞、TRPV6変異、FRETアッセイ、
ポジティブセレクション
TRP Family, Xenopus oocyte, TRPV6 mutation, FRET assay, Positive selection

抄録：TRP (Transient receptor potential) チャネルファミリーは、6回膜貫通型で中央にポアを有する4量体陽イオン輸送チャネルである。その中でカプサイシンや熱に反応するTRPがTRPVファミリーである。TRPVチャネルの中でCa²⁺を選択的に透過するチャネルがTRPV5、TRPV6である。

TRPV6は、主に小腸に発現しており、4量体の中心よりCa²⁺を透過する。食物からのカルシウム吸収に重要な働きを担っており、生体内カルシウムホメオスタシスの律速段階としてはたらいっている。

TRPV6には、アフリカに分布する「祖先型TRPV6」とそれ以外のアジア・ヨーロッパ地域で見られる「獲得型TRPV6」の2つの遺伝子型が存在する。遺伝子解析により、3塩基変異を持つ獲得型TRPV6は祖先型TRPV6から変異し、アフリカより急速に全世界に広がってきたことが判明した。変異期間が急速であることは、おそらくこの変異型TRPV6を持つ人類がアフリカ以外で生息するのに都合がよかったからと想像される。

今回の研究では、獲得型TRPV6が急速に広まった原因を明らかにするために、獲得型TRPV6の特性を祖先型のそれと比較し機能的解析を行った。

①祖先型ならびに獲得型TRPV6をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、卵母細胞に内在するCa²⁺により活性化されるCl⁻チャネル活性を測定することにより両チャネルのCa²⁺透過能の比較を行った。その結果、獲得型TRPV6は祖先型と比較し、大きなCl⁻カレントを引き起こすことがわかった。

②Baby hamster kidney (BHK) 細胞にCa²⁺濃度変化を検出できる可視化蛋白G-CaMP2-NTとTRPV6を共発現させ、Ca²⁺を負荷した際の細胞内Ca²⁺濃度変化を測定した。その結果、獲得型TRPV6は祖先型と比較し多くの細胞外Ca²⁺を取り込むことがわかった。

③それぞれのTRPV6に蛍光蛋白を付加したクローンを作成し、TRPV6チャネルのBHK細胞での発現様式を比較したところ、両者とも発現様式、細胞内分布に変化は見られなかった。またFluorescence resonance energy transfer (FRET) アッセイにより、祖先型と獲得型TRPV6の4量体形成能には違いが見られなかった。

以上の結果より、獲得型TRPV6は祖先型と比べて高いCa²⁺透過能を有することがわかった。

獲得型TRPV6がなぜ高いカルシウム透過性を示すのか、塩基配列変異からは不明である。TRPV6はビタミンD3ならびに紫外線によりその発現が増加することがわかっている。獲得型TRPV6が増えた当時は氷河期回復期に当たり、アフリカ以外のヨーロッパ・アジア地域は紫外線が強くなかったと考えられる。その条件下では、TRPV6蛋白の発現誘導はかかりにくいため、少ない発現量を補うことのできる高いCa²⁺透過性の「獲得型TRPV6」を持つ人類が優位に生き残ったのではと推測された。

(自律神経, 46: 190~197, 2009)

はじめに

TRP (transient receptor potential) チャネルは6回膜貫通型の陽イオンチャネルであり、4量体を形成し機能する。また大きなスーパーファミリーを形成し、

^a 国立がんセンター研究所・がん患者病態生理研究部
〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1

^b 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学
〒852-8523 長崎県長崎市坂本1丁目12-4