

Title	Diethylstilbestrol慢性刺激によるエストロゲンレセプターの変動とマウス睪丸間質細胞腫発生との関係
Author(s)	寺川, 直樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/33478">http://hdl.handle.net/11094/33478</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	寺 川 直 樹
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5882 号
学位授与の日付	昭和 58 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	<b>Diethylstilbestrol 慢性刺激によるエストロゲンレセプターの変動とマウス睾丸間質細胞腫発生との関係</b>
論文審査委員	(主査) 教授 倉智 敬一 (副査) 教授 松本 圭史 教授 園田 孝夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

マウスにエストロゲンを長期間持続投与すると、ある系では睾丸に間質細胞腫が発生するが、別の系では発生しないことが知られており、またマウス睾丸間質細胞はエストロゲンの標的組織であることもすでに明らかにされている。そこでエストロゲンに感受性を有し、最終的に睾丸間質細胞腫を形成するBALB/c系とエストロゲンに抵抗性を示し間質細胞腫を形成しないC<sub>3</sub>H系マウス間において、間質細胞のエストロゲンレセプター (ER) システムに差異が認められるかどうかについて検討するとともに、ホルモン依存性癌の発生機構に検討を加えようと試みた。

#### 〔方法ならびに成績〕

エストロゲンの慢性投与は、生後6週の雄マウスの皮下に10%のdiethylstilbestrol (DES) を含む10mgのcholesterolペレットを移植することにより行なった。各実験群は8個の睾丸を材料とし、間質細胞はDufauらの方法に準じcollagenase digestion methodによって採取した。この方法により、8個の睾丸から得られた細胞数は約 $3.5-4.5 \times 10^7$ 個であり、90%以上がviableであること、全細胞数の30-40%が間質細胞よりなることを $3\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase活性の測定により確認した。間質細胞作製後の実験操作はすべて4℃でおこなった。細胞を1.0mlのTE(0.01MTris, 1.5mMEDTA, pH7.4) bufferでホモゲナイズしたのち核分画と細胞質分画を採取した。核はTE bufferにて洗浄した後に、細胞質は0.2mlの5%charcoal-0.05%dextranと15分間incubateしたのちにERの測定に供した。なおERの測定は15nM [<sup>3</sup>H]-estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) を用いた exchange assayによりおこなったが、細胞質は20℃で1時間incubateしたのちSephadex G-25カラムにより、

核は37°Cで30分間 incubate し、0.25% Triton X-100にて懸濁したのち TE buffer で洗浄後 ER を分離した。そのほか 5—20% 蔗糖密度勾配法および KCl 抽出法を用いて ER の性状を検討した。

① 初めに BALB/c と C<sub>3</sub>H マウス間で DES のとり込みに差異があるかどうかを知るため、30  $\mu$  Ci の [<sup>3</sup>H]-DES を含む 5  $\mu$ g DES をゴマ油に溶かし 7 日間連日皮下に注射したのち、 辜丸を 0.28 M sucrose, TE buffer でホモゲナイズして DES 含量を測定した。両者とも DES 含量は 29 fmole/mg 辜丸組織であり、DES のとり込みに全く差異がなかった。また両者とも得られた total radioactivity のうちの約 60% が代謝されずに DES として存在することを thin layer chromatography を用いて確認した。

② 次いで無処置の両系マウスより得られた間質細胞を使って Scatchard 分析をおこなうと、最大結合部位数は BALB/c の方が C<sub>3</sub>H より大きかったが、解離定数は細胞質分画、核分画とも 4.0—4.6 nM であり、ほぼ同程度の親和性を示した。なお細胞質 ER のステロイド特異性の検討では、両者とも E<sub>2</sub> と DES のみに結合を示し、progesterone, testosterone, cortisol との結合はみられなかった。

③ 無処置時の細胞質 ER (以後 ER 値は 10<sup>7</sup> 間質細胞数当たりで表わす) は BALB/c 201.7  $\pm$  15.5, C<sub>3</sub>H 164.3  $\pm$  12.0 fmole, 核 ER は BALB/c 29.8  $\pm$  2.5, C<sub>3</sub>H 17.3  $\pm$  1.0 fmole であるが、DES ペレットにより慢性刺激をおこなうと 1—2 週間後には両者の細胞質 ER (BALB/c 302.7  $\pm$  25.6, C<sub>3</sub>H 250.0  $\pm$  25.2 fmole) ならびに核 ER (BALB/c 69.5  $\pm$  14.6, C<sub>3</sub>H 30.8  $\pm$  8.6 fmole) はともに無処置時に比して有意な (P < 0.05) 増加を示した。しかしながら BALB/c の核 ER の上昇は C<sub>3</sub>H の上昇に比べると有意に (P < 0.01) 大きかった。C<sub>3</sub>H マウスでは DES ペレット移植後 10 週に至るまで両分画 ER の有意な増加はなく、ほぼこの値を維持した。一方、BALB/c マウスでは前癌状態ともいふべき間質細胞の過形成が認められた DES ペレット移植後 10 週まで、細胞質 ER と核 ER はともに反応性の増加を示し、細胞質 ER は 460.0  $\pm$  55.3, 核 ER は 157.7  $\pm$  18.3 fmole に達した。

④ 5—20% 蔗糖密度勾配法をおこなうと、DES による刺激の有無にかかわらず、またペレット移植後のどの時期においても、両者とも細胞質 ER は 7—8 S に、核 ER は高イオン濃度下、5—6 S にピーク形成した。

⑤ ER と核クロマチンとの結合の程度を調べるため、[<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub> と核 ER 複合体を作製後に 0.4 M KCl による抽出操作を行なうと、DES による刺激後のどの時期においても radioactivity の抽出が C<sub>3</sub>H の方により多く認められたため、BALB/c の方が C<sub>3</sub>H よりも ER との結合が強いことが示された。

#### 〔総括〕

BALB/c と C<sub>3</sub>H マウスはともに辜丸間質細胞にほぼ同様な性状のエストロゲンレセプターを有しながら、エストロゲンによる慢性刺激に対して、BALB/c マウスにみられたレセプターのより著しい増加と、E<sub>2</sub>-ER 複合体の核クロマチンとの結合能の高いことが究極的に間質細胞腫を形成することに重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

エストロゲン刺激下で、睪丸間質細胞腫を形成するBALB/c系マウスと、形成しないC<sub>3</sub>H系マウスの睪丸間質細胞エストロゲンレセプターについて、間質細胞比の高い検体を用いて検討した結果、両者とも同様な性状のレセプターを有しながら、エストロゲンによる慢性刺激下では、BALB/cはC<sub>3</sub>Hに比してレセプター結合部位数のより著しい増加と同時に核クロマチンとのより高い結合能が認められ、このことが間質細胞腫の発生に重要な役割をもつ可能性を明らかにした。本研究はホルモン依存性癌の発生機序の解明に貢献するもので、極めて価値が高く学位論文に値する。