



Title	免疫学的及び生化学的手法によるエストロゲンレセプターの亜分子種の同定
Author(s)	中尾, 誠
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35663">https://hdl.handle.net/11094/35663</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 【10】

氏名・(本籍)	中 尾 誠
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7793 号
学位授与の日付	昭和 62 年 5 月 11 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	免疫学的及び生化学的手法によるエストロゲンレセプターの亜分子種の同定
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 進 (副査) 教授 垂井清一郎 教授 松本 圭史

## 論文内容の要旨

## [目的]

エストロゲンレセプター (ER) は一般に標的細胞内にエストロゲンを特異的に認識し、高い親和性 ( $K_d 10^{-10} - 10^{-9} M$ ) をもって結合し活性化という過程を経て核との結合能を増大する蛋白性因子と定義されている。この典型的な ER とは異なる種々のエストロゲン結合因子が報告されているが ER の抗原性を指標に ER との関係を検討したものは未だ無い。そこで本研究ではヒト ERに対するモノクローナル抗体を用い、1. ヒト乳癌組織、2. エストラディオール ( $E_2$ ) 又はタモキシフエン (Tam) 投与後のラット子宮組織、3. ヒト副腎腫瘍組織を用い ER 分子の多様性を検討し、その性状を生化学的手法のみならず免疫学的手法によっても解析した。

## [方法ならびに成績]

## 1. 方法

乳癌組織、副腎腫瘍組織は手術時に得られたものを  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存、又は一部副腎組織は直ちに実験に供した。子宮組織は卵摘した SD 系若雌ラットに  $E_2$  ( $1.5\text{ug/rat}$ ) 又は Tam ( $300\text{ug/rat}$ ) を腹腔内注射し 0-24 時間後に摘出した。乳癌及び副腎は 4 vol の  $10\text{mM Tris}$ ,  $1.5\text{mM EDTA}$ ,  $2\text{mM mercaptoethanol}$ , pH7.4 (TEM) 緩衝液中でホモゲナイズ後、 $105,000\times g$  1 時間遠沈した上清をサイトゾールとした。ラット子宮は TEM +  $10\text{mM Na}_2\text{MoO}_4$  (TEMMo) 緩衝液中でホモゲナイズし同様にサイトゾールを分離した。副腎サイトゾールは各種濃度の [ $^3\text{H}$ ]  $E_2$  と  $0^{\circ}\text{C}$  5 時間ふ置、非特異的結合には大過剰の  $E_2$  を共存させ DCC 法にて B/F 分離を行い Scatchard 解析した。乳癌では非標識 DES を用いて非特異的結合を求めた。又ラット子宮サイトゾールは  $10\text{nM}$  [ $^3\text{H}$ ]  $E_2 \pm 1\text{ }\mu\text{M}$  DES と

0°C 1時間ふ置後、30°C 1時間加熱するexchange assayを行った。免疫学的測定には2つの異なるヒトERモノクローナル抗体を用いたER-EIAを用いた。5-20%ショ糖密度勾配法(SDG)はTEM又はTEMMo緩衝液中で行った。DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー(DEAE)は0-0.4M KCl linear gradientで溶出させた。一部副腎癌組織は酵素処理を行い培養後エストロゲン結合因子を検索した。

## 2. 成績

1) 乳癌サイトゾール及び無処置ラット子宮サイトゾール中のERは [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> binding assayとEIAとはよく相関した。又SDGやDEAEでサイトゾールを分画した後でも特異的 [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>結合とEIAで得たERのパターンはよく一致した。E<sub>2</sub>(1.5 μg)投与後0-24時間では幼若ラット子宮中のERの経時的变化はexchange assayとEIAにより得た値はよく相関した。しかし大量のTam(300 μg)投与後ではEIAはexchange assayにより3-5倍高値を示し解離がみられた。TEM緩衝液中のSDGでERの分子サイズを検討すると、E<sub>2</sub>投与後24時間ではexchange assayでもEIAでも9Sピークのみでよく一致した。しかしTam投与後12-24時間では特異的な [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>結合のピークを認めず、EIAでのみ測定される7Sピークを認めた。DEAEでは無処置子宮のERは [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>結合もEIAでも0.25M KClで溶出されたが、Tam投与後ではEIAでのみ認められるピークが0.13Mで溶出され、特異的 [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>結合のピークは認められなかった。無処置ラットのERはE<sub>2</sub>とpreincubationしておくと加熱に対しEIA値は著明に安定化したがTam投与後のERはホルモン添加による安定化は認められなかった。

2) 副腎癌では非標識E<sub>2</sub>により阻害される特異的 [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>結合がサイトゾール中に存在した。比較的低親和性(Kd 2-5 nM)で最大結合能は50-150fmoles/mg prot.であった。E<sub>2</sub>結合因子は副腎癌4例中に認められたが他の腺腫や正常副腎組織では認められなかった。この結合はE<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>でのみ阻害されたがDES、DHTでは抑制されなかった。TEM緩衝液中のSDGでは5Sの沈降定数であった。培養副腎癌細胞も [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>とふ置しても同様のエストロゲン結合因子を認めた。E<sub>2</sub>非存在下では25°Cで加熱するとE結合能は急速に喪失したが、 [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>と前もって結合しておくと結合は著明に安定化した。EIAでは1症例においてERモノクローナル抗体と反応する抗原性を同定し、しかもこのEIA陽性蛋白がE<sub>2</sub>結合因子であることを抗ER抗体との結合性から確認した。

## [結論]

1. 大量のTam投与によりホルモン結合能をもたず、通常のERとは物理化学的性状を異にするERが幼若ラット子宮中に誘導されたと考えられる。
2. ヒト副腎細胞中に癌化により出現し通常のERとはホルモン結合性を異にする分子の存在が明らかになった。
3. いずれの分子もERとしての抗原性をもち、ER系にも種々の亜分子種が存在することを証明した。

## 論文の審査結果の要旨

従来、エストロゲンレセプター（ER）は [ $^3\text{H}$ ] - エストラディオール ( $\text{E}_2$ ) 結合法により測定されている。しかし最近、ERに対するモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法が開発された。

本研究では上述の2つの測定法を用いて  $\text{E}_2$  や Tamoxifen 投与を受けたラット子宮、およびヒト乳癌、副腎腫瘍組織のERについて検討を加え、定型的ER以外に、それとは異なる物理化学的性状をもつER抗原陽性のER様因子が存在することを明らかにしたものである。