

Title	ヒト精巣Leydig細胞内のアンドロジェンレセプターに関する生化学的、分子生物学的および免疫組織化学的検討
Author(s)	高, 栄哲
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37755
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	高 栄 哲
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 9 8 7 6 号
学位授与年月日	平成 3 年 8 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	ヒト精巣Leydig細胞内のアンドロジェンレセプターに関する生化学的、分子生物学的および免疫組織化学的検討
論文審査委員	(主査) 教授 園田 孝夫 (副査) 教授 谷澤 修 教授 松本 圭史

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

精巣Leydig細胞におけるアンドロジェン生成は間脳一下垂体一性腺軸により制御されている。ラットや他の実験動物ではLeydig細胞自身にアンドロジェンレセプター (AR) が存在していることはすでに報告されているが、ヒト精巣Leydig細胞については定説がない。本論文は生化学的、分子生物学的および免疫組織化学的手法を用いヒトLeydig細胞におけるARの存在性について検討した。

〔方 法〕

前立腺癌患者の去勢術にて得た精巣をコラゲナーゼにて粗 (crude) Leydig細胞に分離し、さらにPercoll gradient法により精製した。これをLeydig細胞に特異的に存在している 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性をもつことを示した後、purified Leydig細胞として以下の実験に用いた。

- 1) 前立腺, 全精巣およびpurified Leydig細胞から, 核成分を含むtotal cell extractを得て, 標識R1881 (^3H -methyltrienolone)を用いDCC (dextran coated charcoal)法にてAR binding assayを施行し, Scatchard curveにてKdおよびBmaxを求めた。
- 2) 全精巣およびpurified Leydig細胞を用いWesternプロットを行った。一次抗体として抗ヒトAR (hAR)モノクローナル抗体を用いABC法にて染色した。
- 3) hAR cDNAプローブを用いNorthernプロットを行い, 前立腺, 全精巣, purified Leydig細胞および膀胱のhAR mRNAの存在を検討した。
- 4) ヒト精巣組織の凍結連続切片を抗hARモノクローナル抗体を用い, ABC法にて免疫組織化学的

染色を行った。

〔成績〕

- 1) purified Leydig 細胞のARは $K_d = 1.1 \text{ nM}$ と高親和性を認め、 $B_{\text{max}} = 9.6 \text{ fmol / mg prot.}$ であった。また、 K_d は3者間で有意差(t検定)を認めなかったが、 B_{max} については前立腺、全精巣、purified Leydig 細胞の順に有意に($p < 0.01$)高かった。
- 2) 抗hAR抗体に特異的に結合する抗原関連蛋白質は97kDaおよび80kDaと考えられ、全精巣およびpurified Leydig 細胞でこの特異バンドを認め、一次抗体を省いた系では現れなかった。
- 3) 前立腺、全精巣およびpurified Leydig 細胞に9.5 kb付近にhAR mRNAと考えられるバンドを認め、negative controlである膀胱には認めなかった。
- 4) Leydig 細胞の核に陽性所見を得た。なお、negative controlとして一次抗体の代わりにPBSおよびnormal rat IgGを用いた系では陽性所見は得られなかった。

〔総括〕

ヒト purified Leydig 細胞を分離し、その生物活性がintactであることを示した後、

- 1) AR binding assayにて高親和性ARの存在を認めた。
- 2) Western ブロットにてAR特異蛋白質を認めた。
- 3) Northern ブロットにてAR mRNAを認めた。
- 4) 免疫組織化学的方法にてLeydig 細胞の核に存在するARを認めた。

以上の結果よりヒトLeydig 細胞にARの存在が明らかとなった。

ヒトLeydig 細胞におけるAR存在の意義については今後の研究を待たねばならないが、アンドロジェンはspermatogenesisにとって必須であり、アンドロジェン産生細胞自身にそれ自身のレセプターが存在している事実は、限局した精巣内ホルモン環境の維持(たとえば、実験動物で証明されている精巣内ultrashort loop negative feedbackなどの存在)などに重要な役割を演じている可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

Percoll gradient 法で分離、純化したヒト精巣Leydig 細胞を用いてアンドロジェンレセプター(AR) binding assay 法により、高親和性ARの存在を証明し、Westernブロット法により97KDa, 80KDaのAR特異的蛋白の存在を証明した。また、Northernブロット法によりAR mRNAの存在を証明した。さらに免疫組織化学的方法を用いて、ヒト精巣Leydig 細胞の核にARが存在することを証明した。

以上の結果は、アンドロジェン産生細胞自身にアンドロジェンレセプターが存在していることを示

し、いわゆる、autocrine と呼ばれる精巣内での限局したホルモン環境の存在を明かにしたもので学位論文に値する。