

Title	Androgen receptor levels in patients with isolated hypospadias
Author(s)	寺川, 知良
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37835
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	寺	川	知	良
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9810	号	
学位授与の日付	平成3年5月28日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文名	Androgen receptor levels in patients with isolated hypospadias (単純型尿道下裂のアンドロゲンレセプターレベルにおける検討)			
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〕

尿道下裂は比較的高頻度に見られる外性器の奇形であり、その病因にはアンドロゲン依存性の異常が関与していると考えられている。今回アンドロゲンレセプター (AR) のレベルでその病因を検索することを目的として、合併奇形のない尿道下裂患者の外陰部皮膚および索組織由来の培養線維芽細胞のAR活性を測定し、またその温度不安定性について検討した。

〔対象と方法〕

対象症例：年齢が2歳から8歳までで、停留精巣や男子小子宮などの合併奇形のない、また胎児期に黄体ホルモン投与の既往のない尿道下裂患者を対象とした。対象症例は外尿道口の開口部より、亀頭部 (2例)、陰茎部 (8例)、陰茎陰嚢部 (4例) および陰嚢部尿道下裂 (2例) に分類し、前2者を mild degree 群 (計10例、平均年齢 4.0 ± 1.0 歳)、後者を severe degree 群 (計6例、平均年齢 4.7 ± 1.0 歳) とした。手術時に外陰部皮膚を採取し、その線維芽細胞を培養した。また種々の程度の尿道下裂患者 (10例、平均年齢 3.5 ± 1.0 歳) の索組織由来の線維芽細胞も培養した。正常対照として、内分泌学的に異常のないと考えられる包茎患者 (10例、平均年齢 3.9 ± 1.9 歳) の包皮由来の培養線維芽細胞を用いた。ARの温度不安定性を検討するにあたって、不完全型アンドロゲン不応症の男性 (16歳) およびAR陽性の完全型アンドロゲン不応症の女性 (24歳) の外陰部皮膚の培養線維芽細胞を internal quality control として用いた。

細胞培養：外陰部皮膚片、索組織片を約1mm角に細切し、組織培養フラスコに植え付け、15%新

生犢血清 (FCS), 1mM non-essential amino acids, 4mM L-glutamine および 20mg/L gentamycin を添加した培養液 (Eagle's minimum essential medium) を加えて, 5% CO₂ と 95% 空気のもとで, 37°C にて培養した。継代培養には 10% FCS を用いた。

Whole cell binding assay: レセプターアッセイは Eil の方法 (1980) に準拠した。実験の 48 時間前より FCS を除いた培養液にて線維芽細胞を培養したのち, trypsin-EDTA を用いて細胞を採取した。この細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 3 回洗浄したのち, 25mM tricine を加え pH を 7.4 に調整した培養液に線維芽細胞を $0.5 - 1.0 \times 10^6$ 個/ml 程度の濃度になるように浮遊させた。リガンドには $0.3125 - 10$ nM の濃度の [³H] DHT と, [³H] DHT に 500 倍量の methyltrienolone (R-1881) を加えたものを使用した。

細胞浮遊液 0.8ml とリガンド溶液 0.2ml を 37°C 45 分間ガラス試験管で混和したのち, 細胞を PBS で 3 回洗浄し遠心した。上清を除いた細胞塊に 0.2ml の PBS を加え, さらに無水エタノール 1ml を加えて混和したのち, 液体シンチレーションカウンターで [³H] DHT の放射活性を計測した。AR の最大結合能 (Bmax) および解離定数 (Kd) は Scatchard プロットにより求め, 平均値 ± S.D. で表示した。

AR 温度不安定性の検討: 線維芽細胞を 2nM [³H] DHT および 2nM [³H] DHT + 1 μM R-1881 のリガンドとともに 22°C, 20 分間混和したのち, whole cell binding assay と同じ操作を行い, [³H] DHT の放射活性を計測した。別の 1 組の試験管は 22°C 20 分間の混和後さらに 42°C で 20 分間混和したのち, 直ちに室温に戻した。42°C でのインキュベーション後に残存している [³H] DHT の放射活性を AR 温度不安定性の指標として百分率で表現した。

[成績]

- 1) 尿道下裂の程度による AR 活性の比較: 尿道下裂 mild degree 群 (10 例), severe degree 群 (6 例) および対照群 (10 例) における外陰部皮膚の AR の Bmax は, おのおの 11750 ± 2410 , 10720 ± 2680 , 11570 ± 3830 sites/cell であり, Kd はそれぞれ 1.09 ± 0.29 , 0.93 ± 0.22 , $1.22 \pm 0.41 \times 10^{-10}$ M であった。各群間に統計学的有意差を認めなかった。
- 2) 索組織における AR 活性: 索組織 (10 例) における Bmax および Kd は 16100 ± 7570 sites/cell, $1.20 \pm 0.31 \times 10^{-10}$ M であり, 尿道下裂および正常対照の外陰部皮膚と比較して有意差は認めなかった。
- 3) AR の温度不安定性試験: 正常対照群 (7 例) では, 42°C のインキュベーション後, $81.6 \pm 9.8\%$ の [³H] DHT の AR 結合能が見られ, 高度の尿道下裂症例 (5 例) でも $80.4 \pm 10.0\%$ と正常と変わらない結合能を示した。完全型及び不完全型アンドロゲン不応症の症例では 6.6% および 26.7% と [³H] DHT の残存結合能は低く, 温度不安定性を示した。

[総括]

- 1) 単純型尿道下裂の AR レベルにおける検討を, 外陰部皮膚および索組織由来の培養線維芽細胞を用いて行った。

- 2) 尿道下裂の程度が高度であっても、 $[^3\text{H}]$ DHTのAR最大結合能や解離定数は正常対照と比較して差異が見られなかった。
- 3) 尿道海綿体遺残物である索組織においても外陰部皮膚と同等のAR活性が見られた。
- 4) 高度の尿道下裂患者にARの温度不安定性は見られなかった。
- 5) 以上より尿道下裂の成因に、ARは第一義的な役割を果たしていないと推察された。

論文審査の結果の要旨

尿道下裂の病因をアンドロゲンレセプターのレベルで検索することを目的として、合併奇形のない単純型尿道下裂患者16例の外陰部皮膚、10例の索組織を手術時に採取し、培養線維芽細胞のアンドロゲンレセプター活性をdispersed whole cell methodを用い測定し、またその温度不安定性について検討した。正常対照として、内分泌学的に異常のない包茎患者10例の包皮由来線維芽細胞を用いた。

尿道下裂の程度が高度であっても、アンドロゲンレセプターの最大結合能および解離定数は正常対照と比較して差異は見られず、尿道海綿体の遺残物である索組織においても、外陰部皮膚と同等のアンドロゲンレセプター活性が見られ、また高度の尿道下裂患者にレセプターの温度不安定性は見られなかった。

以上の結果より、単純型尿道下裂においては、アンドロゲンレセプターは量的にも質的にもその病因に関与していないことを明らかにしたもので、学位論文に値する。