

Title	Identification of Estrogen Receptor in Human Adipose Tissue and Adipocytes
Author(s)	水谷, 隆洋
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40352
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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	水 谷 隆 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 8 1 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 1 月 31 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	Identification of Estrogen Receptor in Human Adipose Tissue and Adipocytes (ヒト脂肪組織および脂肪細胞におけるエストロゲンレセプターの同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村 田 雄 二 (副査) 教 授 松 沢 佑 次 教 授 奥 山 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

エストロゲン (E) は, rodents においては体脂肪の蓄積を抑制することが知られている。このメカニズムとして, E の摂食抑制作用や自発的運動増加という中枢作用と, E が脂肪組織での脂肪蓄積を抑制する末梢作用が推定されている。実際, rodents では脂肪組織・細胞にエストロゲンレセプター (ER) の存在が証明されており, E の脂肪組織への直接作用が示唆される。私も, 卵巣摘除 (Ovx) による肥満ラットで, 脂肪組織中の ER 量が増加し, Ovx 後 E の補充で肥満を抑制すると, この ER 量の増加も抑制されることを報告した。最近, ヒトにおいても, E が脂質代謝に重要な意義を持つことが明らかとなってきたが, ヒトの脂肪組織における ER の存在は未だ証明されていない。私は, ヒトの脂肪組織における ER の存否について検討した。

【対象および方法】

- 1) ヒト皮下脂肪組織からの細胞質・核分画蛋白の調製：正常な月経周期を有する患者の手術時に, 同意を得た上で, 皮下脂肪を無菌的に採取した。組織の一部から RNA を抽出した。残りの組織は, 直ちに mince, homogenization ののち, 遠心にて 3 層に分離した。上層の lipid 層を除去後, 中間層を超遠心して細胞質分画を得た。Pellet は洗浄ののち, 核分画として Western blotting に用いた。超遠心で得られた細胞質分画は, ammonium sulfate で蛋白を析出させた後透析し, この精製した細胞質分画を用いて結合実験と Western blotting を行った。
- 2) [³H]-estradiol (E₂) binding assay：上記のごとく精製した細胞質分画 (n=3) で, 1-15 nM の [³H]-E₂ をリガンドとして binding assay を行った。リガンドの 200 倍量の diethylstilbestrol を assay 系へ加えることにより non-specific binding を求めた。
- 3) Western blotting：細胞質分画および核分画 (各 n=3) を SDS-PAGE の後, サンプルを nitrocellulose filter 上へ転写した。Filter を抗ヒト ER モノクローナル抗体と反応させ, 発色させた。
- 4) Northern blotting：脂肪組織から total RNA (n=3) を抽出し, サンプル RNA 20 μg を電気泳動ののち, nitrocellulose filter へ転写し, ³²P でラベルした rat ER cDNA をプローブとして Northern blot hybridization を行

った。

- 5) RT-PCR：脂肪細胞そのものでの ER mRNA の存在を確認するために、成熟した脂肪細胞のみを単離し、これから RNA (n=2) を抽出して RT-PCR で ER mRNA の発現を確認した。まず、ヒト皮下脂肪を mince しコラゲナーゼで消化したのち遠心にて、浮遊する成熟した脂肪細胞のみを単離した。この成熟脂肪細胞から RNA を抽出し、逆転写ののち 2 種類の ER に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。ER の存在が確認されている子宮内膜癌細胞 (IK cell) と ER が発現していないことが確認されている子宮内膜癌細胞 (HHUA cell) から得られた RNA を、各々陽性および陰性対照とした。

【成績】

- 1) [³H]-E₂ binding assay：[³H]-E₂ 各濃度において、total binding の20-30%の specific binding は認められるものの、nonspecific binding が高く、またリガンド濃度を上昇させても saturation がみられず ER の存在を示すには不十分な結果であった。
- 2) Western blotting：脂肪組織から部分精製した細胞質および核分画にはいずれにも、抗 ER 抗体と反応する 66 kDa の単一バンドが認められた。このバンドの位置は、positive control として用いたヒト子宮内膜のものと同じ位置であった。また、抗 ER 抗体を nonimmune IgG で置換するとこのバンドは消失した。
- 3) Northern blotting：ヒト脂肪組織より抽出した RNA 中には、positive control として用いたラット脂肪組織およびラット下垂体 RNA と同様に、6.2 kb の ER mRNA の存在が確認された。
- 4) RT-PCR：陰性対照の HHUA cell では 2 種類の ER プライマーいずれを用いた場合にも増幅産物がみられなかったが、陽性対照の IK cell と脂肪細胞では 2 種のプライマーいずれを用いた場合も、特異的な増幅産物が観察された。この結果から、脂肪細胞に ER mRNA が存在することが示された。

【総括】

[³H]-E₂ をリガンドとする結合実験では明らかな ER の存在が証明し得なかったが、Northern blot ではヒト脂肪組織中に、RT-PCR ではヒト脂肪細胞中に、ER mRNA の存在が確認された。さらに Western blot では、66 kDa の ER 蛋白の存在が細胞質および核分画ともに認められた。以上の結果は、エストロゲンがヒト脂肪組織においても、脂肪の代謝やその蓄積の制御に直接的に関与している可能性を示唆するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

ヒト脂肪組織ではエストロゲンレセプター (ER) の存在が証明されておらず、本研究ではヒト脂肪組織中の ER の存否について検討された。方法としては、ヒト脂肪組織で binding assay, Western blot, Northern blot を、脂肪細胞で、RT-PCR を用いて行われ、分子生物学的な手法を含め異なった数種類の方法で解析された。Western blot では、ヒト脂肪組織中に ER 蛋白の存在が示された。また Northern blot でヒト脂肪組織中に、RT-PCR でヒト脂肪細胞中に ER mRNA の発現が確認された。これらの結果より、ヒト脂肪組織にはじめて ER の存在が証明され、エストロゲンがヒト脂肪組織での脂肪蓄積の制御に直接関与している可能性が示唆された。本研究は、今まで証明されなかったヒト脂肪の ER の存在をはじめて証明し、結果は明確で、かつ十分な考察がなされ、今後の脂肪代謝の研究に大きく寄与すると考えられ、学位の授与に値すると考えられる。