

ヒト精巣 FSH レセプター測定法について

大阪大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 園田孝夫教授)

並木 幹夫, 中村 正広, 奥山 明彦, 園田 孝夫

A METHOD OF MEASUREMENT OF HUMAN TESTICULAR FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTORS

Mikio NAMIKI, Masahiro NAKAMURA,
Akihiko OKUYAMA and Takao SONODA

From the Department of Urology, Osaka University Medical School
(Director: Prof. T. Sonoda)

We established the assay conditions for human testicular FSH receptors using testicular tissues obtained from ten patients with prostate cancer. Based on the results of the time course study on specific FSH binding with increasing concentrations of the testicular homogenate at various temperatures, we found that the incubation was suitable at 25°C for 20 hours using 10 mg wet tissue per tube. Scatchard analysis of specific FSH binding sites showed that FSH receptors in the human testicular tissue consisted of two classes of binding sites, one with a high affinity (K_a , $10^9 M^{-1}$) and the other with a low affinity (K_a , $10^8 M^{-1}$).

(Acta Urol. Jpn. 34: 945~949, 1988)

Key words: Human testis, Follicle-stimulating hormone, Receptor

緒 言

精巣におけるステロイド合成や精子形成に follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), prolactin, androgen や gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) などが関与していることは, 実験動物では解明されつつあるが^{1,2)}, ヒト精巣におけるこれらホルモンの作用機序については未だ不明な点が多い³⁾. 精巣のゴナドトロピンレセプターについても最近その局在やレセプター制御機構などの検討が実験動物において多く行われているが^{4,7)}, ヒト精巣のゴナドトロピンレセプターについての研究は未だ少ない^{8,11)} この理由は高純度のヒト由来ゴナドトロピンレセプターの入手が難しく, またその radioiodination が容易でないことや, 得られることができるヒト精巣組織に限られていることなどによると考えられる.

今回われわれはヒト精巣 FSH レセプターの測定法を確立するため, 以下の検討を行った.

材料および方法

高純度の human FSH (hFSH; National Insti-

tute of Arthritis, Metabolism and Digestive Disease [NIAMDD]hFSH-I-1) は National Pituitary Program Dr. Paiti の好意により提供された. human FSH の radioiodination は Myachi ら¹²⁾ の lactoperoxidase 法に従って行った. radiolabeled human FSH と free ¹²⁵I の分離は concanavalin A-sepharose を用いた affinity chromatography に行なった.

ヒト精巣は, 10名の無治療前立腺癌患者 (57~75歳, 平均67.7歳) の去勢術に際し得られ, FSH レセプター測定まで -80°C で保存した. レセプター測定に用いる精巣ホモゲネートの作製は氷冷中にて以下の手順で行った. まず精巣組織をハサミで細切後, teflon glass homogenizer で穏やかにホモゲナイズし, ナイロンメッシュ (No. 60) を通した後 10,000 g で30分間遠心した. そして沈渣を, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 5 mM MgCl₂ および 0.1 M sucrose を含む 0.01 M phosphate buffered saline (pH 7.5) に suspend し, binding assay に使用した.

Binding assay の際の incubation condition を決定するために, 25°C および 37°C で24時間一定

量の精巣ホモゲネートと $[^{125}\text{I}]$ hFSH を incubate し、経時的に $[^{125}\text{I}]$ hFSH の specific binding を測定した。また incubation に用いる適当な組織量を知るために、5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg, 160 mg と組織量を増加させて、25°C で20時間一定量の $[^{125}\text{I}]$ hFSH と incubation を行い、その specific binding を測定した。なお total incubation volume は 500 μl とし、incubation 終了後 3 ml の buffer を加え反応を止め、bound hormone と free hormone の分離は 10,000 g, 10分間遠心にて行い、沈渣の放射活性を測定、total binding とした。non-specific binding は上記 incubation を $[^{125}\text{I}]$ hFSH の 200 倍量の human menopausal gonadotropin

(hMG) を加えて行い求めた。total binding と non-specific binding の差より specific binding をもとめた。種々の濃度の $[^{125}\text{I}]$ hFSH における specific binding を Scatchard plots より分析し HFS レセプターの親和定数 (K_a) と最大結合部位数 (B_{max}) をそれぞれ求めた。

結 果

Lactoperoxidase 法にて hFSH の radioiodination を行った後の, concanavalin A-sepharose による affinity chromatography の elution pattern を Fig. 1 に示す。0.5M PBS-BSA の elution では free ^{125}I のみ溶出され、0.2 M methyl mannopyra-

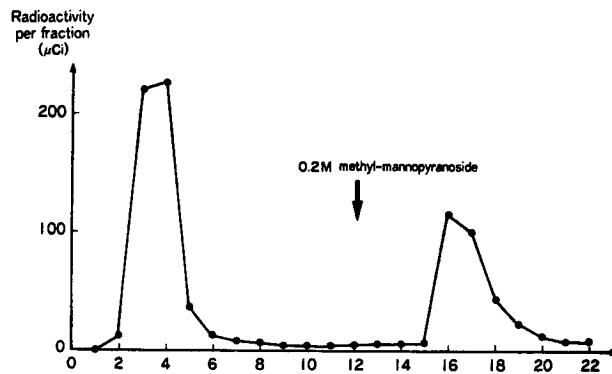


Fig. 1. Purification by group-specific affinity chromatography on Concanavalin A-Sepharose of $[^{125}\text{I}]$ -hFSH prepared by lactoperoxidase iodination. The labeled hFSH is eluted as the second peak of radioactivity by buffer containing 0.2 M methyl-mannopyranoside.

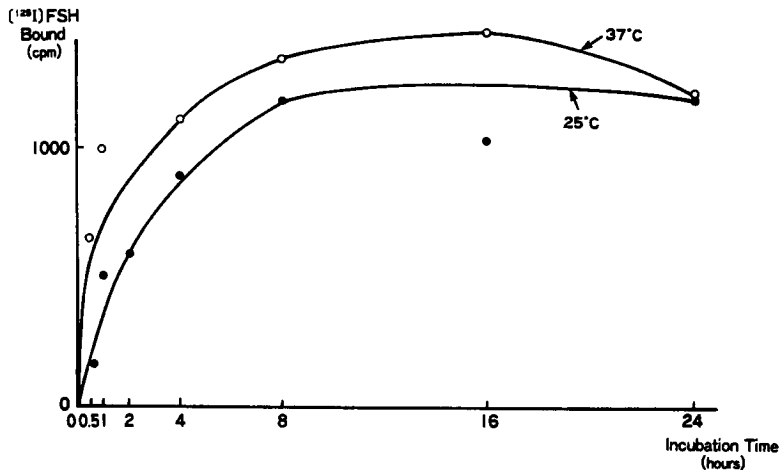


Fig. 2. Time course study on specific FSH binding with 10 mg testicular tissue at 25°C (●—●) and 37°C (○—○).

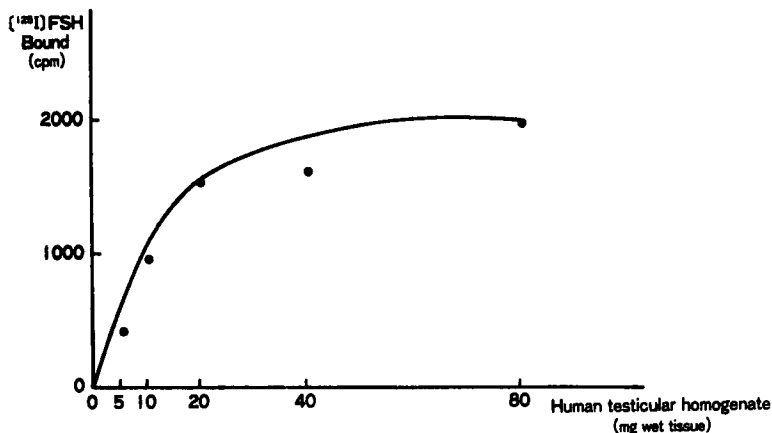


Fig. 3. Effect of increasing concentrations of human testicular homogenates on specific FSH binding. Incubation was carried out at 25°C for 20 hours.

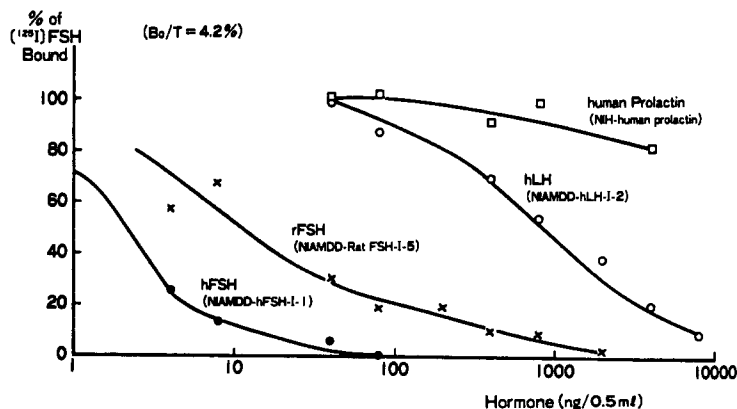


Fig. 4. Inhibition curves for specific binding of [¹²⁵I]hFSH to human testicular homogenates by hFSH, rFSH, hLH and human prolactin. Testicular homogenates (10 mg wet tissue) were incubated with purified 2 ng [¹²⁵I] hFSH and increasing amounts of hFSH (●), rFSH (x), hLH (○) or human prolactin (□). Incubation was performed at 25°C for 20 hours.

noside の elution で [¹²⁵I] hFSH が溶出されてくる。よって第2ピークの fraction 16~18 を [¹²⁵I] hFSH として FSH レセプター測定に使用した。self-dislocation analysis¹²⁾にて求めた [¹²⁵I] hFSH の specific activity は 8.0~14.3 μCi/μg hFSH (n=3)であった。

25°C または 37°C で 10 mg の精巣ホモゲネートを [¹²⁵I] hFSH と incubate した場合の specific FSH binding の time course を Fig. 2 に示す。37°C で incubate した方が binding は早く平衡状態に達するが、16時間を過ぎるとレセプターの degradation のため binding は減少してくる。一方、

25°C で incubate した場合の specific FSH binding を Fig. 3 に示す。20 mg までは、使用する精巣ホモゲネートが増加するに従って specific FSH binding が増加している。

Human FSH (NIAMDD-hFSH-I-1) の specificity をみるため、種々の non-labeled ホルモンを用いて、binding inhibition study を行った (Fig. 4)。hFSH による 50% inhibition は 2 ng であるのに対し、rat FSH (NIAMDD-rat FSH-I-5) による 50% inhibition は 10 ng であった。また human LH (NIAMDD-hLH-I-2) および human prolactin (NIH-human prolactin, Batch No. 5, AFP 1582

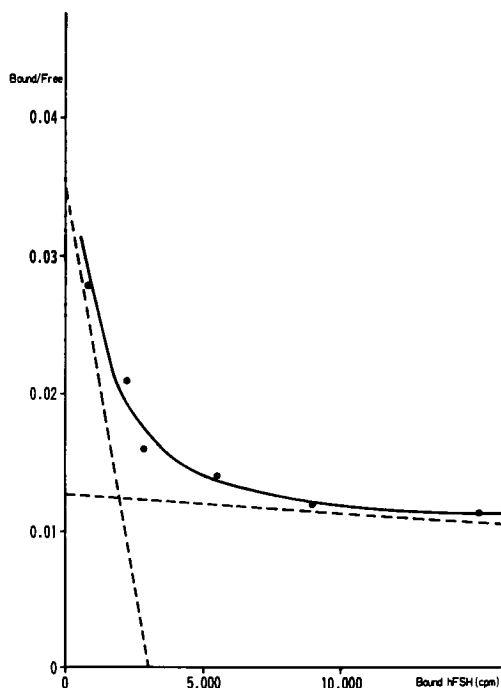


Fig. 5. Scatchard analysis of specific FSH binding sites in testicular tissues from a patient with prostatic cancer. Two classes of binding sites are found.

C) は 100 ng にても、ほとんど $[^{125}\text{I}]$ hFSH の binding を阻害せず、今回の study に用いた human FSH は高度の specificity を有していることが判明した。

以上の予備的実験の結果から binding assay に用いる精巣ホモゲネートは 10 mg が適当であり、incubation 温度および時間は 25°C 20 時間で安定であることが判明し、以後はこの条件でヒト精巣 FSH レセプター測定を行った。Fig. 5 はヒト精巣組織を種々の濃度の $[^{125}\text{I}]$ hFSH と incubation したさいに得られた specific FSH binding の Scatchard curve (実線) であり、直線とならないことにより、単一の binding site を有さず、破線で示すごとく affinity の異なる 2 つの binding site を有することが推測された。

10 例の未治療前立腺癌患者より得られた精巣組織の FSH レセプターの K_a と B_{max} を Table 1 に示す。いずれの症例も affinity の異なる 2 つの binding site を有していた。

考 察

精巣のホルモン制御機構の解明にはレセプターの測

Table 1. Estimated values of maximum binding number (B_{max}) and association constant (K_a) of FSH receptors in 10 patients with untreated prostatic cancer.

Patient	High affinity binding site		Low affinity binding site	
	B_{max} (f moles/mg prot.)	K_a ($\times 10^6 \text{M}^{-1}$)	B_{max} (f moles/mg prot.)	K_a ($\times 10^6 \text{M}^{-1}$)
1	65.0	1.12	500	0.67
2	50.7	1.20	338	0.42
3	45.0	1.28	376	0.46
4	55.7	1.22	377	0.45
5	42.2	1.40	422	0.57
6	38.5	1.51	560	0.38
7	47.7	1.35	452	0.42
8	56.5	1.18	388	0.50
9	70.5	1.11	299	0.55
10	60.7	1.15	502	0.37
Mean \pm SD	53.3 \pm 12.2	1.25 \pm 0.08	421 \pm 78	0.48 \pm 0.12

定は重要であり、ゴナドトロピンレセプターの測定も近年実験動物では多数報告されている^{4,7)}。しかし、ヒト精巣組織のゴナドトロピンレセプター測定は報告は未だ多くなく^{8,9)}、特に FSH レセプター測定は、わずかに 2 つの報告があるのみである^{10,11)}。この理由として、前述したごとく①高純度 human FSH の入手が難しいこと、②その radioiodination が容易でないこと、③ヒト精巣があまり利用できないことなどが挙げられる。われわれは米国 National Pituitary Program の Dr. Raiti の好意により human FSH を入手し、その specificity (LH や prolactin と cross-reactivity が無いこと) を binding study にて確認した。LH や FSH の radioiodination は従来 chloramin T 法にて行われる場合が多かったが、この方法では反応条件によってはホルモンの生物学的活性が低下することがあるため、より mild な条件で反応できる lactoperoxidase 法¹²⁾ を用いた。また affinity chromatography にて、free ^{125}I や破壊された hFSH を排除したため高純度の $[^{125}\text{I}]$ hFSH が得られ、binding assay に際し non-specific binding を 10% 程度にとどめることができた。incubation 温度および時間は 25°C 、20 時間が安定であり、binding study に用いる組織量は 10 mg が適当と判定したが、これらは他の報告者の方法とあまり異ならず、今回の assay における intraassay variation はそれぞれ 8.5% および 9.5% と良好であった。

精巣組織に affinity の異なる 2 つの FSH binding site が存在することは、ヒト精巣においても実験動物

においても報告されているが¹⁰⁾, 報告者によっては単一の binding site しか認めていない¹¹⁾. われわれの測定した10例の前立腺癌患者の精巣組織にはいずれも2つの binding site をみとめた. このこと (binding site が1つとする報告と2つとする報告がある) は binding study に用いる radioligand の範囲によると推測されるが, 種により FSH レセプターの性質が異なる可能性もあり, また同一種においては種々の病態によりレセプターの性質や量に変化することも否定できない. これらの事項や FSH レセプターの精巣内局在¹⁴⁾などについて, 今後解明されねばならない.

結論として, 今回われわれが行ったヒト精巣 FSH レセプター測定法は, 非常に少量の組織量でレセプター測定が可能であり, 正常および病的状態での精巣 (特にセルトリ細胞) 機能の評価や精子形成のメカニズムの解明などに有用となると考えられる.

結 語

(1) Human FSH の radioiodination を lactoperoxidase 法にて行い, ヒト精巣 FSH レセプター測定に用いた.

(2) ヒト精巣 FSH レセプターは 10 mg 相当の精巣ホモゲネートを 25°C で20時間, 種々の濃度の [¹²⁵I] human FSH と incubate することにより測定できた.

(3) Scatchard analysis にて FSH レセプターの K_a と B_{max} を求めたが, 10例の未治療前立腺癌患者の精巣はいずれも affinity の異なる2つの binding site を有することが判明した.

稿を終えるに当たり, human FSH, human LH, human prolactin, rat FSH を御提供頂いた National Pituitary Program Dr. Raiti および, 前立腺癌患者の精巣を御提供いただいた大阪中央病院泌尿器科, 大阪厚生年金病院泌尿器科, 大阪府立成人病センター泌尿器科, 大阪労災病院泌尿器科, 大阪船員保険病院泌尿器科, 国立大阪病院泌尿器科, 財団法人住友病院泌尿器科の諸先生方に心から謝意を表したいと思います. 本論文の要旨は第28回日本不妊学会 (於: 名古屋) で発表した.

文 献

- 1) Swerdloff RS and Heber D: Endocrine control of testicular function from birth to puberty. In *The Testis* (Edited by Burger H and Dekretser D), pp. 107~126, Raven Press, New York, 1981
- 2) diZerega GS and Sherins RJ: Endocrine control of adult testicular function, In *The Testis* (Edited by Burger H and DeKretser D), pp. 127-140, Raven Press, New York, 1981
- 3) 藁和田 滋, 岩動孝一郎: 性ホルモン—男子性腺. *Annual Review 内分泌*, 代謝 (清水直容・岡 博・赤沼安夫・岩動孝一郎編), pp. 113-117, 中外医学社, 東京, 1986
- 4) Catt KJ, Tsuruhara T and Dufau ML: Gonadotrophin binding sites of rat testis. *Biochim Biophys Acta* **279**: 198-201, 1972
- 5) Cheng KW: Properties of follicle-stimulating hormone receptor in cell membranes of bovine testis. *Biochem J* **149**: 123-132, 1975
- 6) Davies TF, Walsh PC, Hodgen GD, Dufau ML and Catt KJ: Characterization of primate luteinizing hormone receptor in testis homogenate and Leydig cells. *J Clin Endocrinol Metab* **48**: 680-685, 1979
- 7) Dias JA and Reeves JJ: Testicular FSH receptor numbers and affinity in bulls of various ages. *J Reprod Fertil* **66**: 39-45, 1982
- 8) Hsu A, Stratico D, Hosaka M and Troen P: Studies of the human testis. X. Properties of human chorionic gonadotropin receptor in adult testis and relation to intratesticular testosterone concentration. *J Clin Endocrinol Metab* **47**: 529-536, 1978
- 9) Sharpe RM, Wu FCW and Hargreave TB: Binding of human chorionic gonadotrophin to testicular biopsy tissue from infertile men and the effect of prior treatment with human chorionic gonadotrophin. *J Endocrinol* **86**: 117-129, 1980
- 10) Wohlström T, Huhtaniemi I, Hovatta O and Seppälä M. Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radio-receptor assay. *J Clin Endocrinol Metab* **57**: 825-830, 1983
- 11) Berman MI and Sairam MR: Studies on primate gonadotropin receptors: Comparison of follitropin and lutropin receptors in human testis. *Canad J Biochem* **61**: 561-568, 1983
- 12) Miyachi Y, Vaitukaitis JL, Nieschlag E and Lipsett MB: Enzymatic radioiodination of gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 23-28, 1972
- 13) Ketelslegers JM, Knott GD and Catt KJ: Kinetics of gonadotropin binding by receptors of the rat testis. Analysis by a non-linear curve fitting method. *Biochemistry* **14**: 3075-3083, 1975
- 14) Orth J and Christensen K: Autoradiographic localization of specifically bound ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis. *Endocrinology* **103**: 1944-1951, 1978

(1987年5月1日受付)