

ヒト前立腺肥大組織のアンドロゲン 結合蛋白に関する実験的研究

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任：石神襄次教授)

富 岡 収*

STUDIES ON THE ANDROGEN-BINDING PROTEINS IN HUMAN BENIGN PROSTATIC HYPERTROPHY

Osamu TOMIOKA

From the Department of Urology, School of Medicine Kobe University

(Director: Prof. J. Ishigami)

Androgen-binding proteins in the cytosol of human benign prostatic hypertrophic tissue were studied with ^3H -dihydrotestosterone (DHT) and ^3H -methyltrienolone (R 1881) as ligands. In the prostatic cytosol, saturable binding proteins with high affinity to ^3H -DHT or ^3H -R1881 were found by Scatchard analysis. The dissociation constant (K_d) for ^3H -DHT was $9.4 \times 10^{-10}\text{M}$, and the maximum number of binding sites (B_{max}) was 55 fmoles/mg protein; the K_d for ^3H -R1881 was $5.1 \times 10^{-9}\text{M}$, and the B_{max} was 25.5 fmoles/mg protein.

Competitive binding assay for each binding protein with various non-labeled steroids, demonstrated a specificity for DHT or R1881.

The binding of prostatic cytosol and ^3H -DHT was eluted by Sephadex G-200 column chromatography in 2 places, one in the void volume and one near the IgG fraction. The binding with ^3H -R1881 was eluted in the void volume, the elution near the IgG fraction being very small, which suggests a non-specific binding.

The binding of prostatic cytosol and ^3H -DHT increased with increase in the concentration of Ca^{2+} or Mg^{2+} (0–12 mM), but the binding with ^3H -R1881 decreased conversely. This change was studied with Sephadex G-200 column chromatography; the binding with ^3H -DHT showed a decrease of the peak in the void volume and marked increase of the peak near the IgG fraction with increase in the concentration of both ions, whereas the binding with ^3H -R1881 only showed a decrease of the peak in the void volume. Ca^{2+} had a greater influence than Mg^{2+} on the change of these bindings.

These results indicate a change of binding protein due to ionic action, suggesting also the possibility of the presence of a substance in the cytosol which changes the properties of the binding protein dependent on Ca^{2+} .

Key words: Prostatic hypertrophy, Androgen binding proteins, DHT, R1881, Ca^{2+}

緒 言

ステロイドホルモンは、その標的細胞中に存在する特異的レセプター蛋白質と結合し、さらにそれが核内に移行しクロマチンと結合してその作用を発揮するも

のと理解されている。前立腺に対するアンドロゲンの作用も、ほかのステロイドホルモン標的組織における場合と同様に、微量の dihydrotestosterone (以下 DHT) を特異的に感知する細胞質受容体を介しておこなわれる¹⁾。前立腺はアンドロゲン依存性のたかい臓器であり、その形態的ならびに機能的側面において

*現 姫路赤十字病院泌尿器科

アンドロゲンの消長をよく反映することが古くから知られており²⁻⁴⁾, アンドロゲン作用機序の研究は主として前立腺における testosterone の作用について進められてきた。

1968年 Liao ら⁵⁾ および Wilson ら⁶⁾ によって, testosterone はほかのステロイドホルモンと異なり, 標的組織内で DHT に還元され, それがアンドロゲン作用を発揮することが示唆され, この考えがアンドロゲンレセプター発見の糸口となった。

ヒトにおける前立腺肥大症は, 老齢期における前立腺内腺の良性増殖によるもので, その病因論については古くからさまざまな説が述べられているがいまだその原因は不明といえる⁷⁾。しかしながら, 前立腺肥大結節中の DHT の有意の蓄積⁸⁾ ならびに肥大結節の可溶性分画中に DHT と特異的に結合する蛋白が証明された⁹⁻¹³⁾ ことにより, 前立腺肥大結節がアンドロゲン依存性であることが1つの事実として確認されている¹⁴⁾ がその作用様式の詳細については不明の点も少なくない。たとえば Ca^{2+} をはじめとするいくつかの二価金属イオンは, ステロイドレセプターになんらかの影響を与えることが認められている¹⁵⁻²²⁾, ヒト前立腺組織についての報告はない。そこで, 著者は手術的に摘除されたヒト前立腺肥大組織における細胞質内のアンドロゲン結合蛋白の基礎的検討をおこなうとともに, この結合蛋白とアンドロゲンとの結合に

おける Ca^{2+} および Mg^{2+} の影響を検討し, 若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

実験には神戸大学医学部附属病院泌尿器科で, 前立腺被膜下摘除術の際に得られた前立腺肥大組織を用いた。切除した組織はただちに冷水上で周囲の結合織をとり除いてハサミで細切, 生食にて洗滌し, ただちに実験に用いるかまたは -70°C にて保存した。なお摘除組織は病理組織学的に前立腺肥大症であることが確認されている。

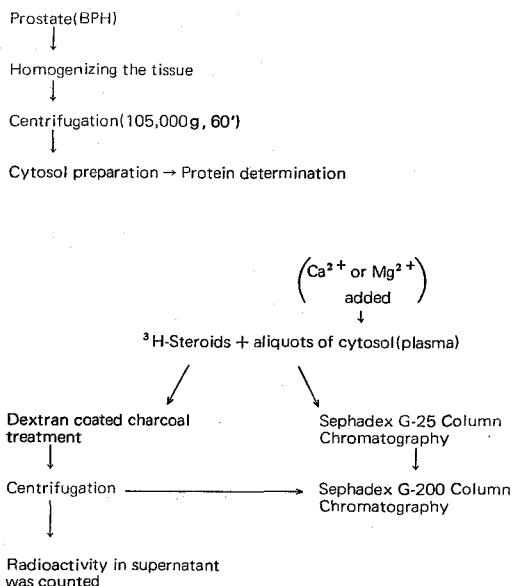
実験のあらましは Table 1 に示されている。

細切した組織は 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA を含む pH 7.4 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (Tris-EDTA buffer) を約 4 倍量加え, ポリトロンでホモジナイズしたのち, 超遠沈器にて 105,000 g で60分間遠沈し, 上清をサイトゾール分画として実験に用いた。

サイトゾール中の蛋白濃度はウシ血清アルブミン (BSA) を標準濃度とした Lowry 法²³⁾ により測定され, 通常の実験には蛋白濃度が 2 mg/ml になるように希釈して用いた。

ステロイドと testosterone binding globulin (以下 TBG) の結合実験に用いたヒト血漿は, 健康成人男子の静脈血をヘパリン加採血によって得, -70°C にて使用まで保存した。

Table 1. Assay procedure for the binding of dihydrotestosterone (DHT) or methyltrienolone (R1881) to human plasma and cytosol from human benign hyperplastic prostatic tissue in vitro



標識ステロイドとして、New England Nuclear (NEN) 社製の合成アンドロゲンである ^3H -methyltrienolone (^3H -R1881, 87.0 Ci/m mol) および ^3H -dihydrotestosterone (^3H -DHT, 50.6 Ci/m mol) を用いた。非標識ステロイドは Sigma 社より、そして合成プロゲステンである promegestone (R 5020) は NEN 社より購入した。

標識ステロイドとサイトゾールを 4°C で 7 時間インキュベートし、目的に応じてデキストラン炭末法あるいは Sephadex G-25 column chromatography (G-25 カラム) により結合・非結合分画を分離した。さらに 100 倍量の非標識ステロイドを加えた系列を作製し、同一の分離操作により得た結合量を非特異的結合量とし、これを非標識ステロイド非添加群の結合量より差し引いたものを真の結合量とした。

つぎに前述した操作の詳細について述べる。

デキストラン炭末法は、標識ステロイドとインキュベートしたサイトゾールまたは血漿 0.5 ml にデキストラン炭末液 (0.05% w/v デキストラン 500, 0.5% w/v Norit A, を含む Tris-EDTA buffer) を 0.5 ml 加え、ボルテックスで 10 秒間振盪し、 4°C で 10 分間静置したのち 3,000 g で 15 分間遠沈した上清の 0.5 ml を正確にカウンティングバイアルに移し、トルエンシンチレーター (PPO 10 g, methanol 20 ml, toluene

980 ml) を 10 ml 加えて液体シンチレーションカウンターにて放射性活性を計測し、結合量を求めた。

G-25 カラムによる結合分画と非結合分画の分離操作には、内径 1 cm 高さ 25 cm のカラムを用い、インキュベーション後のサンプルを乗せて、Tris-EDTA buffer で溶出した。

Sephadex G-200 column chromatography (G-200 カラム, 内径 2.5 cm, 高さ 100 cm, Pharmacia, Sweden) は、Tris-EDTA buffer にて流速 15 ml/h の上行式で溶出し、フラクションコレクターにて 5 ml ずつ採取した。この場合のサンプルは、あらかじめデキストラン炭末法または G-25 カラムにて非結合分画を除去した後の結合分画を使用した。

サイトゾール中におけるカルシウムまたはマグネシウムイオンの各モル濃度の作製は、蛋白濃度 1 mg/0.4 ml のサイトゾールを作り、これに、目的とする濃度の 5 倍のモル濃度のカルシウムまたはマグネシウムイオンを含む Tris-EDTA buffer の 0.1 ml を添加することによってなした。

なおウシ血清アルブミン (BSA), ヒトガンマグロブリン, Norit A, デキストラン 500 は Sigma 社より, Sephadex G-25 chromatography, Sephadex G-200 chromatography, Blue dextran は Pharmacia Fine Chemical 社より購入したものである。

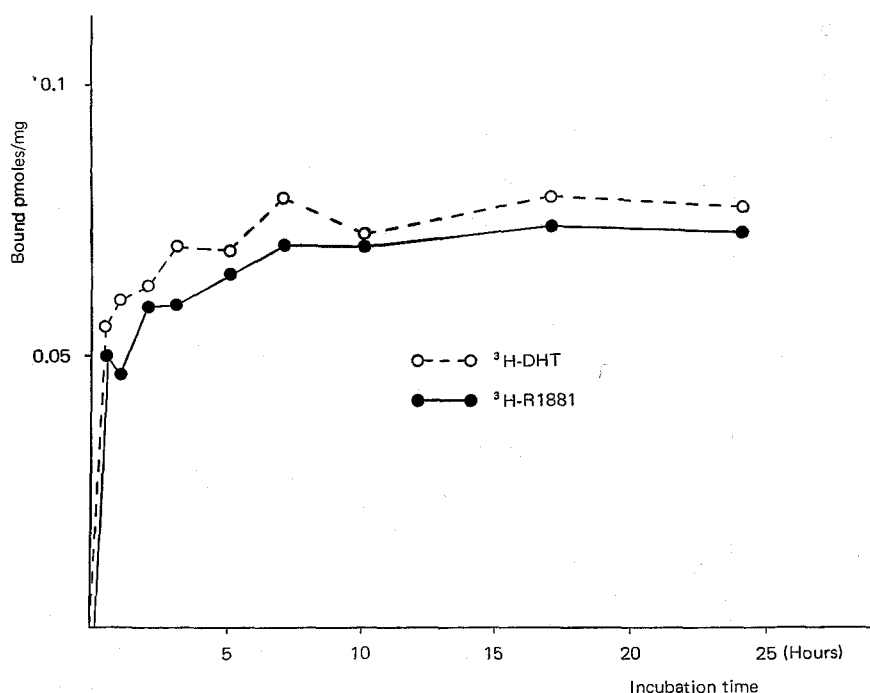


Fig. 1. Time course of binding of ^3H -DHT or ^3H -R1881 to human benign hyperplastic prostatic cytosol

実験成績

1) アンドロゲン結合蛋白の基礎的検討

前立腺サイトゾールに ^3H -DHT または ^3H -R1881 ($2 \times 10^{-8}\text{M}$) を加え、24時間後までの結合能の経時変化をデキストラン炭末法で観察した結果、インキュベ

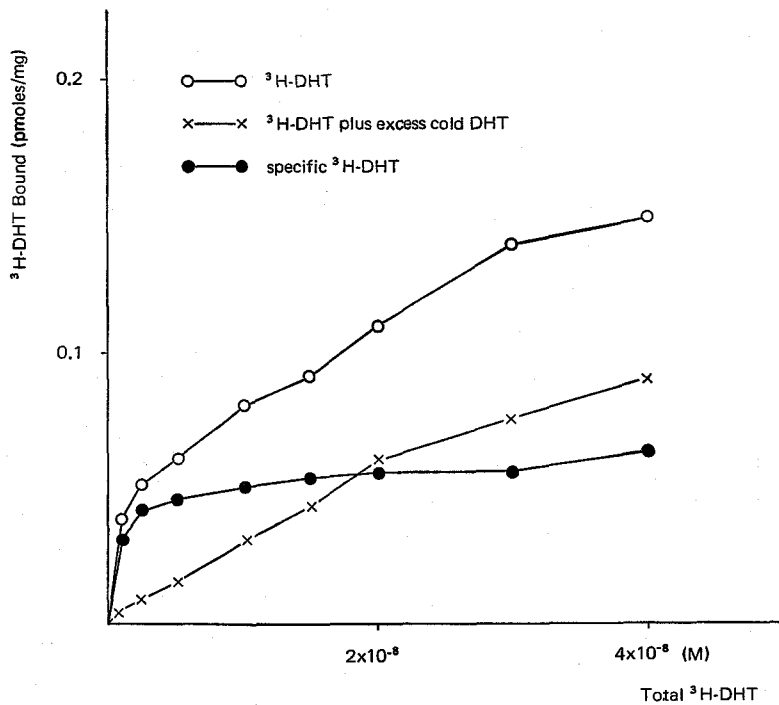


Fig. 2. Binding to prostatic cytosol as a function of ^3H -DHT concentration

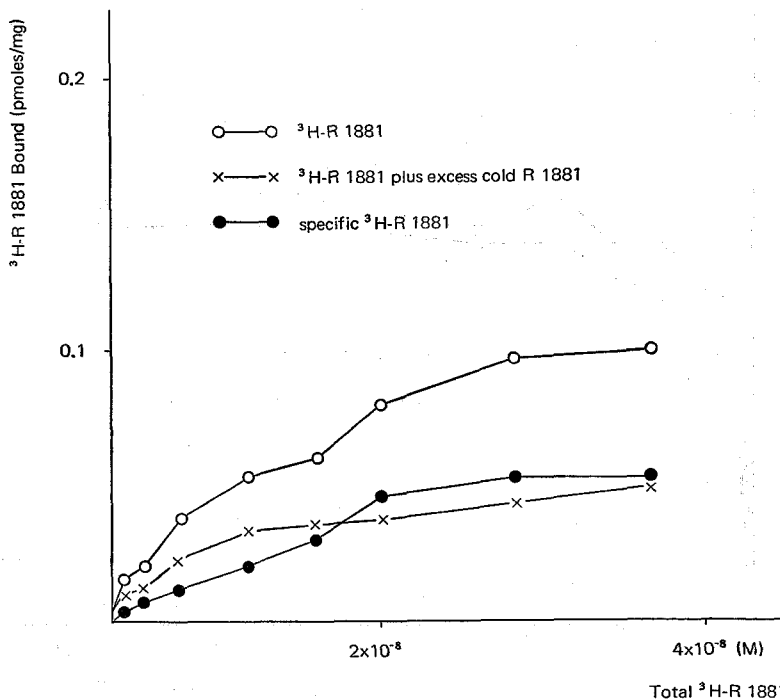


Fig. 3. Binding to prostatic cytosol as a function of ^3H -R1881 concentration

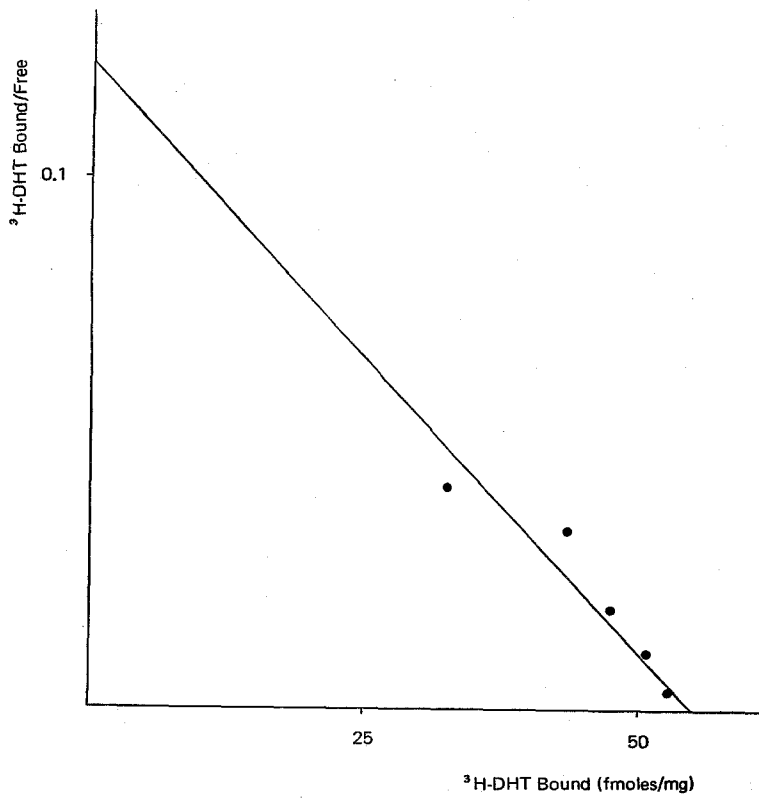


Fig. 4. Scatchard plot of ^3H -DHT binding to prostatic cytosol
 $K_d = 9.4 \times 10^{-10}\text{M}$, $B_{\text{max}} = 55 \text{ fmol/mg}$

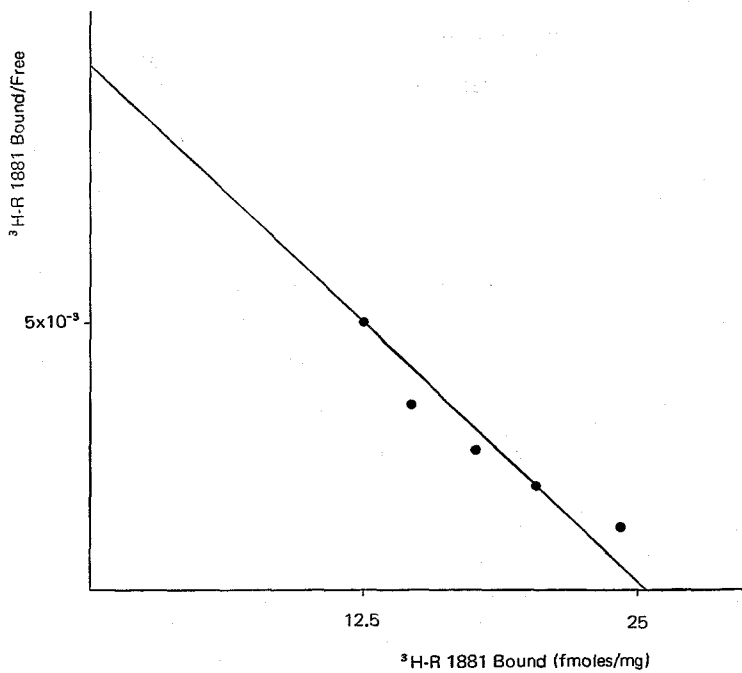


Fig. 5. Scatchard plot of ^3H -R1881 binding to prostatic cytosol
 $K_d = 5.1 \times 10^{-9}\text{M}$, $B_{\text{max}} = 25.5 \text{ fmol/mg}$

ション開始7時間後までの結合量の増加は著しく、その後24時間までは不変であった (Fig. 1)。インキュベーションの際に添加する $^3\text{H-DHT}$ または $^3\text{H-R1881}$ の濃度を種々変えて結合能におよぼす影響を検討した結果、 $10^{-8}\text{M} \sim 2 \times 10^{-9}\text{M}$ 前後で両者とも平衡に達した (Fig. 2, 3)。したがって以後 $^3\text{H-DHT}$ または $^3\text{H-R1881}$ を用いてアンドロゲン結合蛋白の分析をおこなう際には、蛋白濃度 2 mg/ml のサイトゾール 0.5 ml に $2 \times 10^{-8}\text{M}$ の $^3\text{H-DHT}$ または $^3\text{H-R1881}$ を加えて、 4°C で7時間インキュベイトした。

上記方法にしたがってヒト前立腺肥大組織サイトゾール中の $^3\text{H-DHT}$ あるいは $^3\text{H-R1881}$ に対する結合蛋白を Scatchard plot²⁴⁾ により分析した。

DHT に対する解離定数は $9.4 \times 10^{-10}\text{M}$ 、最大結合部位数は $55\text{ fmoles/mg protein}$ (Fig. 4)、いっぽう R1881 に対する解離定数は $5.1 \times 10^{-9}\text{M}$ 、最大結合部位数は $25.5\text{ fmoles/mg protein}$ (Fig. 5) となり、サイトゾール中に DHT および R1881 に対する高親和性でかつ飽和性のある結合蛋白が証明された。

サイトゾール中のアンドロゲン結合蛋白の特異性を検討する目的で、 $^3\text{H-DHT}$ または $^3\text{H-R1881}$ の100倍量の濃度の各種非標識ステロイドを添加し、 $^3\text{H-DHT}$ あるいは $^3\text{H-R1881}$ とサイトゾールとの結合がいか

に影響されるかを観察した。

非標識ステロイド非添加時の、標識ステロイドと結合蛋白との結合をコントロール (100%) とし、各種非標識ステロイドがその結合におよぼす影響を、コントロールに対する百分率で示した (Table 2)。 $^3\text{H-DHT}$ に対する影響は、DHT はもちろん、testosterone と

Table 2. Steroid binding specificity of cytosol protein as steroid with $^3\text{H-DHT}$ or $^3\text{H-R1881}$

Competing steroids	% of control	
	Ligands	
	$^3\text{H-DHT}$	$^3\text{H-R1881}$
DHT	27	53
R 1881	84	32
Estradiol	47	68
R 5020	92	41
Testosterone	34	61
Dexamethasone	97	96
Cortisol	94	98

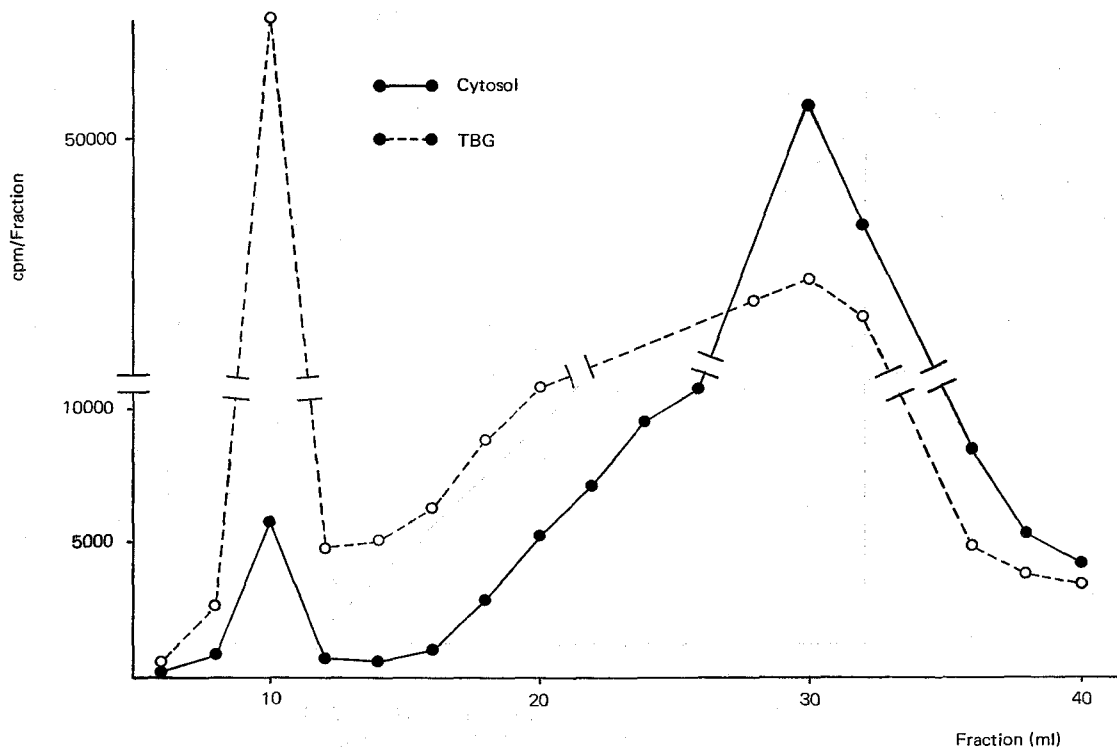


Fig. 6. Gel filtration on Sephadex G-25 column of cytosol and TBG bound to $^3\text{H-DHT}$

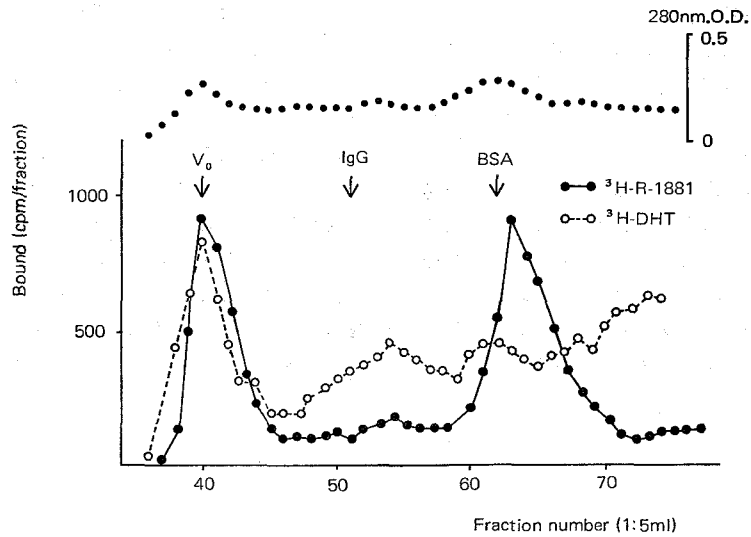


Fig. 7. Gel filtration on Sephadex G-200 column of cytosol incubated with 2×10^{-8} M 3 H-DHT or 3 H-R1881. Dotted line shows the optical density at 280 nm

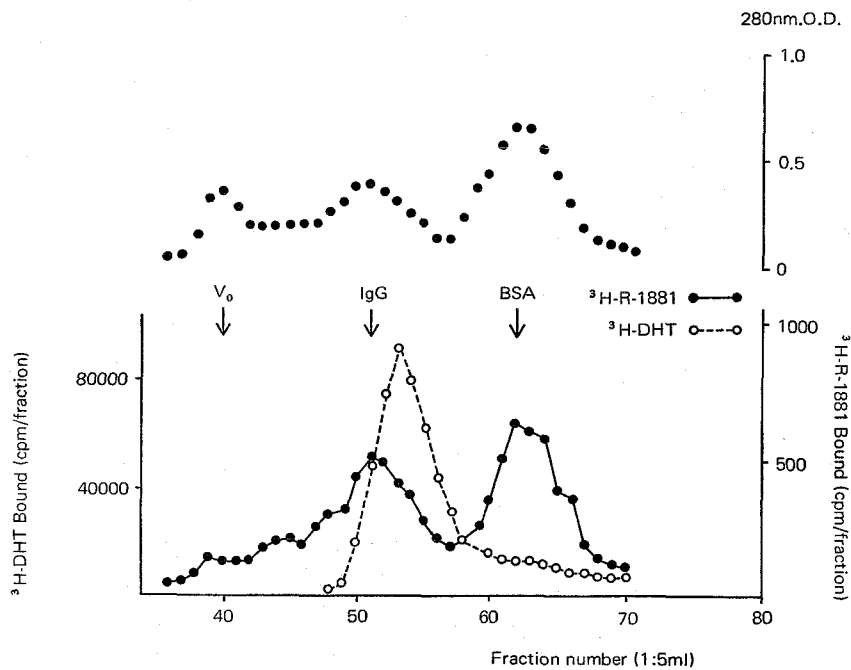


Fig. 8. Gel filtration on Sephadex G-200 column of human plasma incubated with 2×10^{-8} M 3 H-DHT or 3 H-R1881. Dotted line shows the optical density at 280 nm.

も強く競合し、estradiol もかなり競合する成績で、R1881 も軽度影響したが、R5020, dexamethasone, cortisol については競合しなかった。 3 H-R1881 の結合に対する競合は、R1881 でもっとも強く、ついで R5020, DHT および testosterone と続き、estra-

diol もある程度競合したが、dexamethasone, cortisol ではほとんど影響しなかった。

2) アンドロゲン結合蛋白の性状

前立腺サイトゾールまたはヒト血漿と 3 H-DHT とを 4°C にて7時間インキュベートし、それぞれを

G-25 カラムを用いて溶出した成績を Fig. 6 に示した。両者とも結合分画は 6~12 ml の間に溶出され、非結合分画との分離は良好であった。なお、結合分画を容易に区別できるように検体に Blue dextran を加え、着色された分画を採取した。

ヒト血漿と ^3H -DHT あるいは ^3H -R1881, 前立腺サイトゾールと ^3H -DHT あるいは ^3H -R1881 をそれぞれインキュベイトしたものを、G-25 カラムで結合分画のみを分離して、これをさらに G-200 カラムで分析した。前立腺サイトゾールと ^3H -DHT の結合体については、あきらかに分子量の異なる 2 つのピークが得られた。すなわち void volume (V_0) に 1 つと、ヒトガンマグロブリンが溶出される位置 (IgG 分画) 付近に小さなピークが 1 つ溶出された。サイトゾールと ^3H -R1881 の結合体については V_0 に 1 つのピークを得たが、IgG 分画付近のピークはごくわずかであった (Fig. 7)。ヒト血漿と ^3H -DHT または ^3H -R1881 との結合体を G-200 カラムで分析すると、ともに IgG 分画付近にピークをみとめたが、 ^3H -R1881 との結合はごくわずかであった (Fig. 8)。

^3H -DHT および ^3H -R1881 の血漿に対する結合を Scatchard plot により解析した。DHT の解離定数は 10^{-8}M のオーダーとなったが、R1881 についてはこの実験条件下では測定しえず、R1881 と血漿との結合は非特異的な結合と考えられた。

前立腺サイトゾールの DHT 結合蛋白について種々のステロイドの交叉反応性を検討した。

すなわち G-200 カラムで結合蛋白を 2 つの分画に分離、採取し、各種非標識ステロイドを添加して競合反応をおこない、デキストラン炭末法で結合分画を分

離した。非標識ステロイド非添加時の結合分画の計測値を 100% とし、標識ステロイドの 100 倍量 ($2 \times 10^{-6}\text{M}$) の各種ステロイドを加えた際の結合分画の計測値を前者に対する % で示した (Table 3)。

DHT 結合蛋白の V_0 および IgG 分画の 2 つの分画における、各種ステロイドの ^3H -DHT 結合に対する影響のしかたは異なっており、全般的に IgG 分画における非標識ステロイドの競合は、 V_0 における競合よりも大きくなったが、それぞれの分画における各種ステロイドによる競合順位は一致した。また Table 2 の各種ステロイドの ^3H -DHT の結合に対する阻害率の方が、これら 2 つの分画における阻害率より大きかった。

^3H -DHT あるいは ^3H -R1881 と前立腺サイトゾールの結合に対する Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} の影響を検討した。0.5~12 mM の CaCl_2 あるいは MgCl_2 を含むサイトゾール (蛋白濃度 1 mg/0.5 ml) の系列を作製し、これと $2 \times 10^{-8}\text{M}$ の ^3H -DHT または ^3H -R1881 とを 4°C で 7 時間インキュベイトし、デキストラン炭末法にて結合分画を分離し、イオンを含まないときの結合分画の計測値を 100% として、それらの増減を比較検討した。 ^3H -DHT の結合におよぼす Ca^{2+} の影響は、その濃度の増加にともなって ^3H -DHT との結合は増加し、 CaCl_2 濃度が 4~6 mM のあたりではほぼ最大となり、12 mM で平行となった。 CaCl_2 を含まないときの ^3H -DHT との結合量をコントロールとし、 CaCl_2 各濃度におけるその結合量との差を t 検定したところ、 CaCl_2 2 mM で危険率 $p < 0.01$, 12 mM で $p < 0.05$, その他の濃度でも $p < 0.025$ と有意に高い結合を示した (Fig. 9)。同様に ^3H -R1881 と前立腺サイトゾールとの結合に対する Ca^{2+} の影響をみたが、この場合 CaCl_2 濃度の増加にともなってその結合は漸減し、 CaCl_2 8 mM で $p < 0.05$, 10 mM および 12 mM で $p < 0.025$, と、コントロール (CaCl_2 を含まないときの結合) に比し、有意に低い結合となった (Fig. 9)。

前立腺サイトゾールと ^3H -DHT または ^3H -R1881 との結合に対する Mg^{2+} の影響を Fig. 10 に示した。 MgCl_2 濃度の増加にともない ^3H -DHT の結合は増加し、4~6 mM で平行となった。t 検定では 2 mM で $p < 0.025$, 4 mM で $p < 0.01$, 6 mM で $p < 0.05$, 8~12 mM で $p < 0.005$ とコントロールに比し有意の増加を示した。 ^3H -R1881 の結合は MgCl_2 濃度の増加にともなって減少傾向を示したが、12 mM のみ $p < 0.025$ と有意の低下であった。

いっぽう ^3H -DHT および ^3H -R1881 とヒト血漿

Table 3. ^3H -DHT binding specificity of the macromolecular fractions from cytosol eluted by Sephadex G-200 column chromatography

Competing steroids	% of control	
	V_0 Fraction	IgG Fraction
DHT	76	52
Estradiol	89	72
R 5020	95	93
Testosterone	82	68
Dexamethasone	96	99
Cortisol	97	98

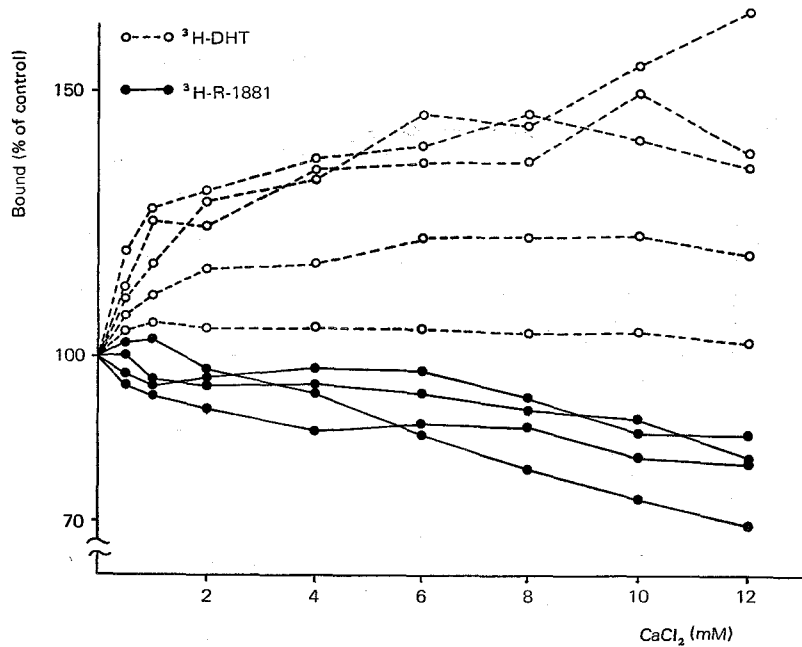


Fig. 9. Effect of addition of CaCl_2 (0-12 mM) on ^3H -DHT or ^3H -R1881 binding to cytosol

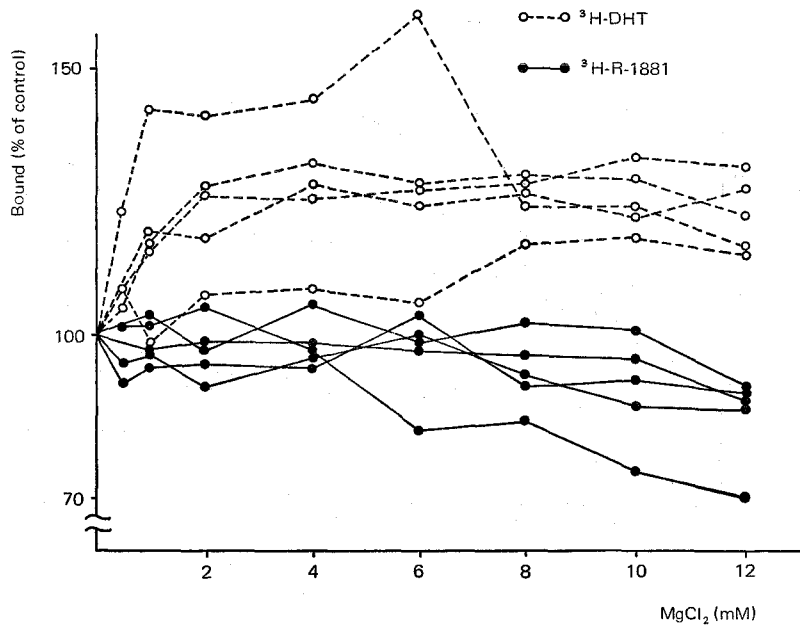


Fig. 10. Effect of addition of MgCl_2 (0-12 mM) on ^3H -DHT or ^3H -R1881 binding to cytosol

との結合についても、前立腺サイトゾールの場合と同様に CaCl_2 あるいは MgCl_2 の濃度を変化させ、その結合の変化を観察した。 ^3H -DHT の結合は CaCl_2 濃度の増加に伴って増加し、4~6 mM では最大となってあとは平行となった。その増加率は ^3H -

DHT とサイトゾールの結合におけるよりも全般的に大となった。t 検定では CaCl_2 0.5 mM で $p < 0.05$, 2~6 mM で $p < 0.025$, 8~12 mM で $p < 0.01$, と有意な増加であることを示した (Fig. 11)。 ^3H -DHT とヒト血漿の結合に対する Mg^{2+} の影響も同様であ

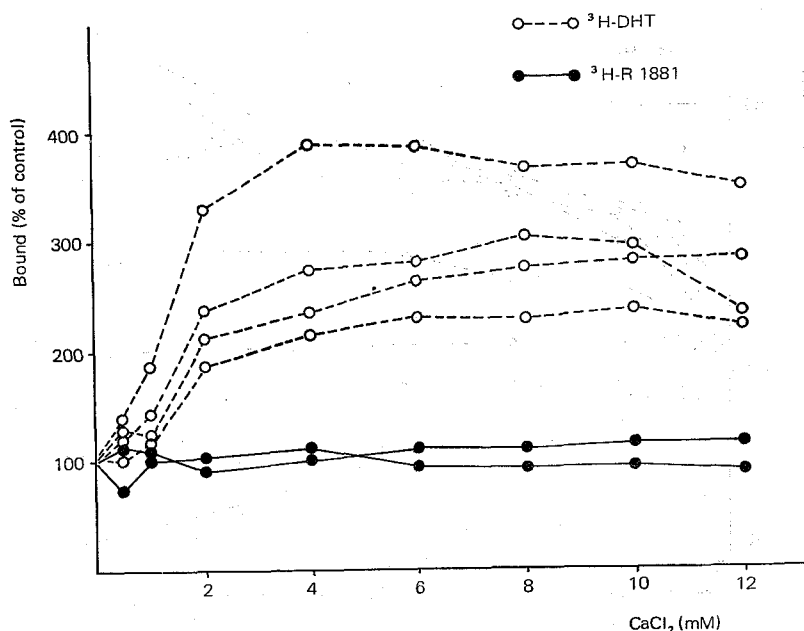


Fig. 11. Effect of addition of CaCl_2 (0–12 mM) on ^3H -DHT or ^3H -R1881 binding to human plasma

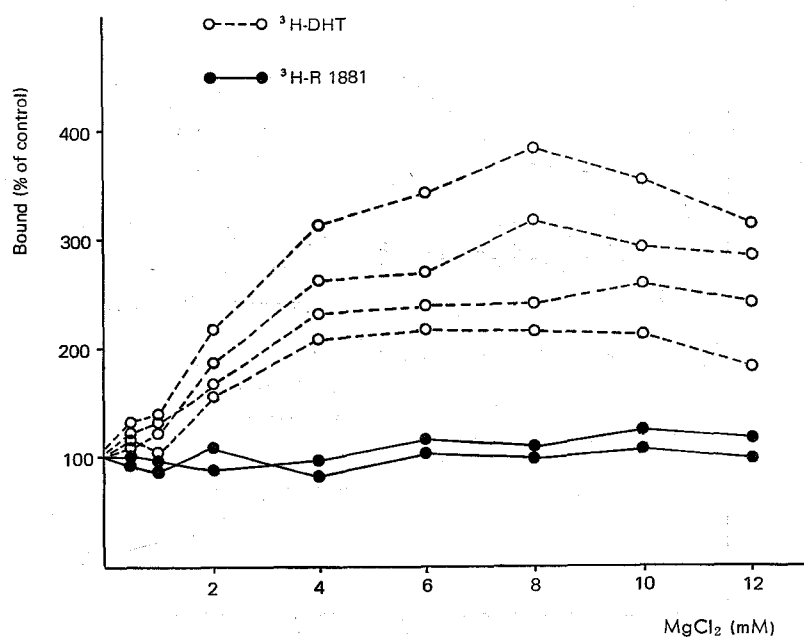


Fig. 12. Effect of addition of MgCl_2 (0–12 mM) on ^3H -DHT or ^3H -R1881 binding to human plasma

り、 MgCl_2 6~8 mM でその結合もほぼ最大となった。またその増加率はサイトゾールにおけるよりも大きかったが、 Ca^{2+} の ^3H -DHT とヒト血漿の結合に対する効果より小さかった。t 検定では MgCl_2 0.5, 8, 12 mM で $p < 0.025$, 2, 4, 6, 10 mM で $p < 0.01$ と有意の増加であることが示された (Fig. 12)。 ^3H -

R 1881 とヒト血漿との結合については、ごくわずかであり、Scatchard plot による分析ができず非特異的結合と考えられることを先に述べたが、 CaCl_2 および MgCl_2 の濃度による変化もなく、どの濃度においてもコントロールに比し有意な結合の変化は見られなかった (Fig. 11, 12)。

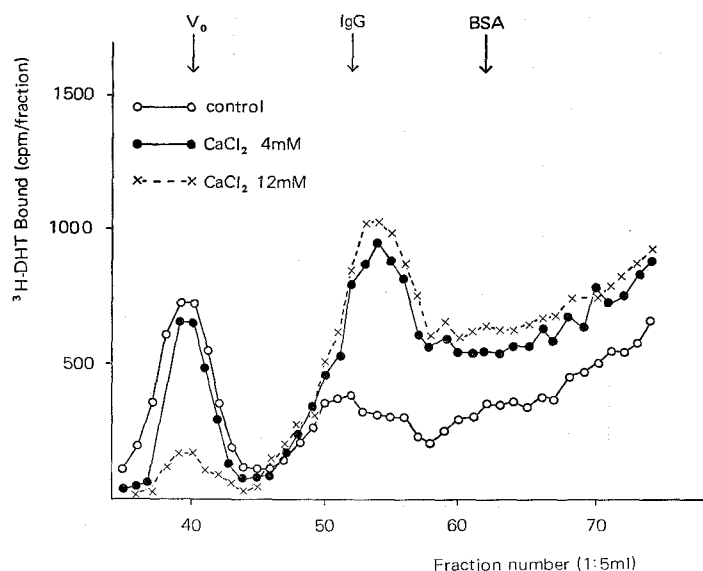


Fig. 13. Effect of addition of CaCl_2 (4, 12 mM) on gel filtration on Sephadex G-200 column chromatography of cytosol incubated with ^3H -DHT

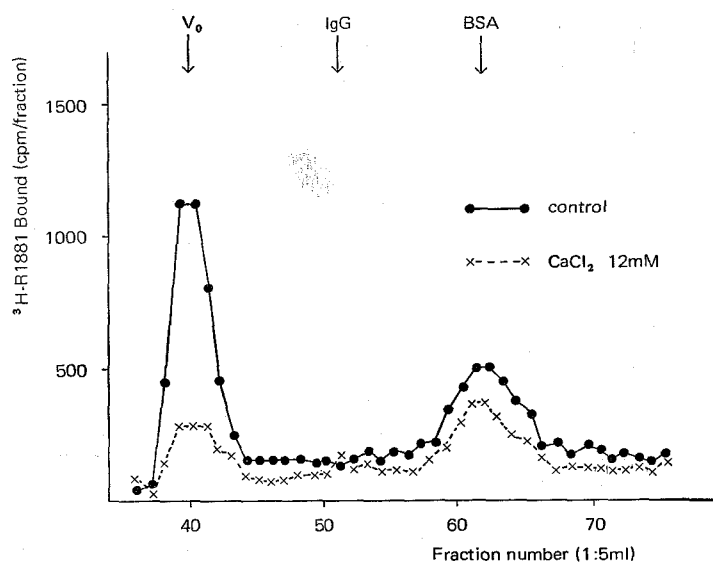


Fig. 14. Effect of addition of CaCl_2 (12 mM) on gel filtration on Sephadex G-200 column chromatography of cytosol incubated with ^3H -R1881

^3H -DHT あるいは ^3H -R1881 と前立腺サイトゾールとの結合に対する Ca^{2+} および Mg^{2+} の影響を G-200 カラムを用いてさらに詳しく検討した。

^3H -DHT と前立腺サイトゾールとの結合で、 CaCl_2 を加えないときの G-200 カラムによる溶出パターンをコントロールとして、 CaCl_2 4 mM および 12 mM とした場合の溶出パターンを Fig. 13 に示した。コントロールでは V_0 の大きなピークと IgG 分画付

近の小さなピークを認めたが、 CaCl_2 4 mM の条件下では V_0 のピークはコントロールに比してやや低下し IgG 分画付近のピークは著明な増加をみとめ、 CaCl_2 12 mM の場合ではこれらのピークの変化はさらに顕著となった。 ^3H -R1881 と前立腺サイトゾールとの結合に対する Ca^{2+} の影響 (Fig. 14) は、コントロールに比し CaCl_2 12 mM の場合に V_0 のピークが著明に減少したが、ほかの分画では変化はみられな

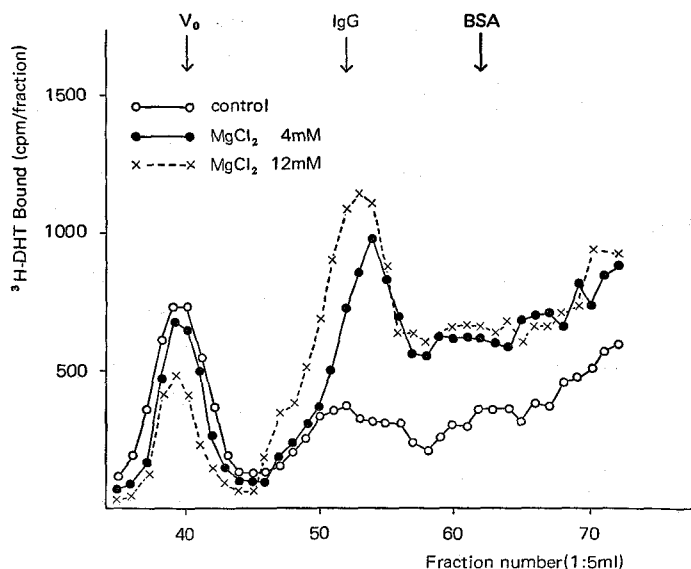


Fig. 15. Effect of addition of MgCl_2 (4, 12 mM) on gel filtration on Sephadex G-200 column chromatography of cytosol incubated with ^3H -DHT

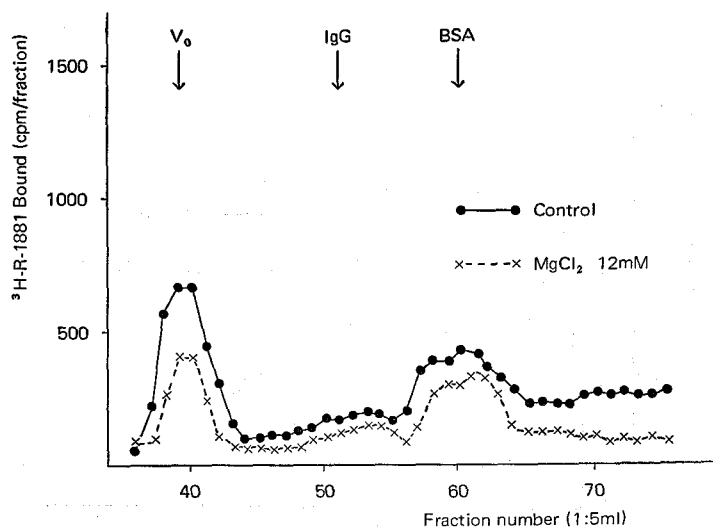


Fig. 16. Effect of addition of MgCl_2 (12 mM) on gel filtration on Sephadex G-200 column chromatography of cytosol incubated with ^3H -R1881

かった。 ^3H -DHT と前立腺サイトゾールとの結合に対する Mg^{2+} の影響 (Fig. 15) は, Ca^{2+} の影響と同様にコントロールに比し MgCl_2 を 4 mM, 12 mM と変化させると V_0 のピークの減少およびその減少分より大きな IgG 分画付近のピークの増大をみとめたが, Ca^{2+} の影響に比べ V_0 のピークの変動は少なかった。Fig. 16 は ^3H -R1881 と前立腺サイトゾールとの結合におよぼす Mg^{2+} の影響を示したもので, MgCl_2 12 mM の場合に V_0 のピークの低下がみら

れるのみで, ほかにほぼ同一のパターンであった。この低下は Fig. 14 における Ca^{2+} による V_0 のピークの低下より少なかった。

また, Fig. 11 で示したような CaCl_2 濃度の上昇にともなう ^3H -DHT とヒト血漿との結合の増加を G-200 カラムで分析すると, IgG 分画のピークの増加を認めるのみであった (Fig. 17)。

以上のように Ca^{2+} , Mg^{2+} は, ^3H -DHT および ^3H -R1881 の前立腺サイトゾールまたはヒト血漿への

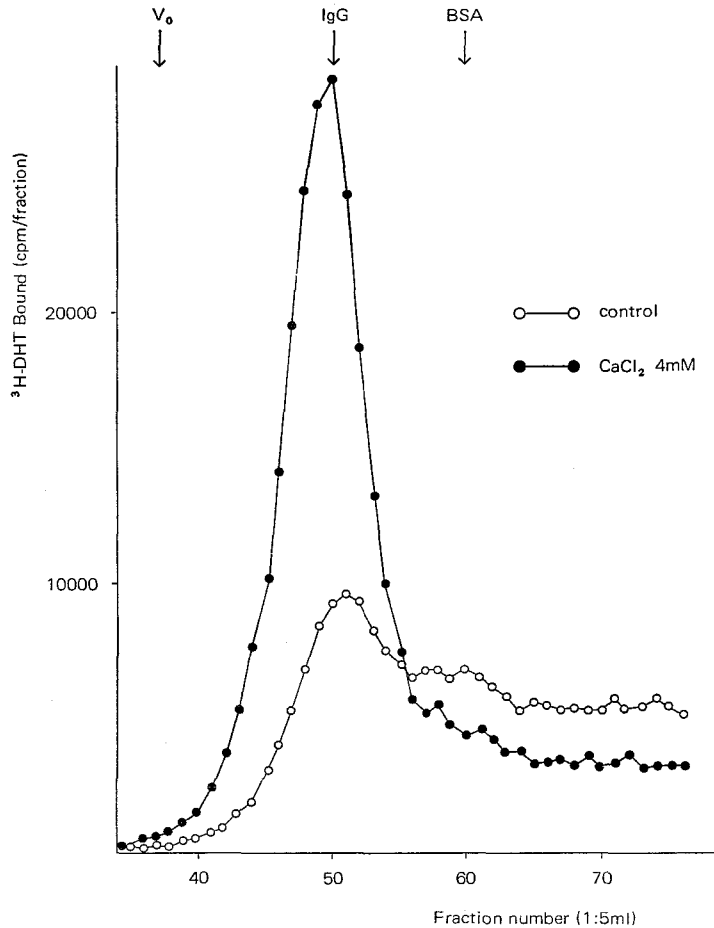


Fig. 17. Effect of addition of CaCl_2 (4 mM) on gel filtration on Sephadex G-200 column chromatography of human plasma incubated with ^3H -DHT

結合に対し同様の影響を与えたが、その作用の強さは Ca^{2+} の方が Mg^{2+} よりも大きかった。

考 察

ステロイドホルモンの標的細胞内に、特定のステロイドホルモンを識別して結合する蛋白質性の受容体があり、ホルモンと受容体との複合体は核へ移行し、遺伝子活性化機構を介して一連の複雑な作用が発揮されと考えられている。

Toft, Gorski らによるラット子宮可溶性分画からのエストロゲン結合蛋白分子の分離^{25,26)}が事実上のホルモンレセプターの生化学的研究のはじまりとなり、Jensen らによって提唱されていた子宮エストロゲンレセプターの仮説²⁷⁾が支持された²⁸⁾。

いっぽう、アンドロゲンに対するこの種の研究は前立腺と testosterone との関係において進められ、1968

年 Liao ら⁵⁾および Wilson ら⁶⁾によって testosterone の還元型である DHT がその活性型であることが報告され、その後 DHT の作用発現にさいしてアンドロゲンレセプターの存在が示唆されるにいたった。すなわち1969年以降 Liao²⁹⁻³¹⁾, Tveter^{32,33)}, Mainwaring³⁴⁾, Baulieu³⁵⁾ らにより齧歯類の前立腺細胞可溶性分画に DHT と特異的に結合する蛋白分子の存在が相ついで報告され、その性質および核への取り込み実験から DHT レセプターの存在が確認され、作用機序が解明されるようになった。

さてヒトにおいては、本来の前立腺（外腺）がアンドロゲンの存在下に雄性副性器として重要な働きを持っており、加齢にともなうアンドロゲンの低下とともに萎縮する。いっぽう、成年期には痕跡的存在にすぎなかった内腺には老齢化と共に良性的増殖がおこり、尿道を圧迫して排尿障害をきたすようになるのが前立

腺肥大症である。前立腺肥大症の病因はいまだあきらかではないが、肥大結節が組織学的に外腺と類似し、去勢した男子や類臣官症には本症が発症しない事実³⁶⁾もあって、アンドロゲンとの関係が注目されてきた。本疾患の血中ホルモンレベルでの特徴ある一定の見解は認められないが³⁷⁻⁴⁰⁾、肥大結節組織中の testosterone および DHT の有意の蓄積ならびに 5 α -reductase 活性の上昇、さらにはアンドロゲン結合蛋白の証明により、本症のアンドロゲン依存性が確認され⁴¹⁾、本症の誘因として DHT が考えられている⁴¹⁾。

前立腺肥大結節中におけるアンドロゲン結合蛋白はさまざまな方法で証明されている。

すなわちシヨ糖密度勾配法^{9,10)}、ゲル濾過法^{11,12)}、電気泳動法¹³⁾などが用いられている。

今回の実験では手技が簡便で受容体の定量的解析が可能で再現性に富むことから、*in vitro* の系を用いた。すなわち、肥大結節をホモジナイズし、超遠沈をおこなって細胞質に相当する上清分画すなわちサイトゾール分画を調製し、一定量の標識ステロイドとインキュベイトし、その結合量を測定した。受容体結合・非結合分画の分離法としてはデキストラン炭末法、G-25 カラム法を用い、さらに詳しい分析には G-200 カラム法を用いて検討した。

さて、この *in vitro* の測定系でヒト前立腺肥大組織を材料とする場合、もっとも問題となるのは受容体蛋白以外の結合、とくにサイトゾールを調製する際に混入する血中 testosterone binding globulin (TBG) の影響である。強力な作用を持つ合成アンドロゲンである methyltrienolone (R1881) は、ラット前立腺やヒト前立腺肥大組織のアンドロゲンレセプターに高親和性に結合するが、ヒト血清中の TBG には結合せず、TBG の混入が問題となる腫瘍やアンドロゲン依存性の組織におけるアンドロゲンレセプターの検討にきわめて有用であることが Bonne, Raynaud によって示された⁴²⁻⁴⁴⁾。今回の実験では、DHT および R 1881 を ligand として使用し検討した。

一般に受容体の特性は、標的組織局在性、ステロイドに対する結合親和性、結合容量、結合特異性によって示される。ヒト前立腺肥大組織ホモジネートより得たサイトゾールについて DHT および R 1881 の結合親和性、結合容量を検討したが、DHT の場合、解離定数 (Kd) は 9.4×10^{-10} M, 最大結合部位数 (B max) は 55 fmoles/mg protein となり、R1881 を使用すると Kd = 5.1×10^{-9} M, B max = 25.5 fmoles/mg protein, となり、きわめて親和性が高く、その結合は飽和性であることが認められた。解離定数では諸家の

報告⁴⁵⁻⁴⁸⁾ とよく一致したが、結合部位数で差がみられたのはサンプルが臨床材料であることからその性状が一定していないこと、またこの種の結合蛋白はきわめて不安定⁴⁹⁾なため操作の過程で変性し減少していくので、実験系のちがいによりその減少度が異なること、あるいは熱に対しても不安定⁵⁰⁾であることも原因と考えられる。

DHT のヒト前立腺肥大組織の細胞質結合蛋白は、シヨ糖密度勾配法では沈降係数が 8S と 4S の2種類が認められており⁵⁰⁾、G-200 カラムによっては Vo および IgG 分画付近の2カ所に DHT 結合蛋白の溶出をみとめている^{48,50)}。

今回の実験で著者も G-200 カラムを用いるゲル濾過により、DHT および R1881 結合蛋白の性状を検討し、DHT 結合蛋白は Vo および IgG 分画付近の2カ所にみとめ、R1881 のあきらかな結合蛋白は Vo の1カ所のみで、IgG 分画付近にはごくわずかなピークをみとめるにすぎなかった。いっぽうヒト血漿と ³H-DHT の結合を G-200 カラムにて分析すると、ピークは IgG 分画にみとめられ、ヒト血漿と ³H-R 1881 の場合も同様で IgG 分画に小さなピークをみとめ TBG との結合がごく僅かであるが認められ、Bonne, Raynaud の報告^{42,43)} とは異なる結果であった。しかしながら ³H-R1881 のヒト血漿に対する結合を Scatchard plot により分析したが、高親和性と飽和性のある結合が得られず、非特異的な結合と考えられた。

Steins ら⁵¹⁾によると、ヒト前立腺肥大結節サイトゾール中にはラットにおいて証明されているアンドロゲンレセプターはなく、アンドロゲン結合蛋白は TBG であると述べている。

Cowan ら⁵²⁾によると、TBG が前立腺肥大結節の stroma にも存在するとしており、Mobbs ら⁵³⁾ の意見は、ヒト前立腺肥大結節サイトゾールのステロイド結合特異性はラット前立腺のアンドロゲンレセプターより TBG に近い、としており、前立腺肥大結節中には TBG のみでアンドロゲンレセプターは存在しない、という意見である。しかしながら今回の実験では G-200 カラムにより Vo および IgG 分画付近に溶出される2つのアンドロゲン結合蛋白を証明できた。

これら2種の結合蛋白のうち Vo に溶出される分子の大なるものが真のレセプターと考えられ、第2の結合蛋白は TBG が G-200 カラムにより溶出される IgG 分画付近に出現するため、TBG の混入とも考えられる。

Tsuboi ら⁵⁴⁾ は、ヒト脳サイトゾール中のグルココ

ルチコイド結合蛋白に関する研究で、コルチゾール結合蛋白を G-200 カラムにより Vo および IgG 分画付近の2カ所に認め、corticosteroid binding globulin (CBG) と考えられる IgG 分画付近のピークは、抗ヒト血清蛋白血清をカップリングした CNBr-Sepharose 4B affinity column chromatography による観察から、単に CBG の混入でなく、CBG 様蛋白がヒト脳サイトゾール中に存在する可能性を示唆した。さらにラットの生食灌流により、血液混入を除いた脳組織を用いたグルココルチコイドレセプターに関する研究⁵⁵⁾においても、この CBG 様蛋白を証明している。ヒト前立腺肥大結節においても脳におけると同様、Steins ら⁵¹⁾ および Cowan ら⁵²⁾ が述べているように G-200 カラムによる IgG 分画付近のアンドロゲン結合蛋白は単に TBG の混入だけでなく、組織内に存在している TBG 様蛋白と考えられる。この結合蛋白は真のレセプターとは考えられておらず、生理学的意義は不明だが、アンドロゲンの保持や代謝の調節を演じているとされ⁵⁶⁾、ステロイドの作用機序に重要な因子と考えられる。

アンドロゲン結合蛋白の結合特異性を検討する目的で各種ステロイドによる競合をおこなった。100 倍の濃度の各種非標識ステロイドの添加により、³H-DHT の結合は、DHT はもとより、testosterone, estradiol, R1881 によっても置換をうけ、³H-R1881 の結合は、R1881 はもとより、R5020, DHT, testosterone, estradiol などによっても置換されることが判明した。³H-DHT と ³H-R1881 の両者の結合に対する、各種非標識ステロイドによる競合の割合が異なるのは、R1881 がプロゲステン結合蛋白にも結合する^{44,57,58)}ためと考えられる。また結合蛋白を G-200 カラムで Vo 分画および IgG 分画に分取して、³H-DHT に対する結合を各種非標識ステロイドで競合させると、IgG 分画での競合は Vo 分画での競合より強くあらわれたが、各種ステロイドの競合順位は両分画で同一であり、ほかの報告⁵⁹⁾と一致した。

さて Ca²⁺ をはじめとするいくつかの二価金属イオンはステロイドホルモンの作用機序でなんらかの役割を有すると考えられている。

Mo²⁺ はアンドロゲンレセプターの安定化をおこし^{20,21)}、Zn²⁺ はレセプターとステロイドとの結合を阻害することが認められている²²⁾。エストロゲンレセプターと Ca²⁺ の関係を述べたいくつかの報告^{15~19)}があり、De Sombre ら¹⁵⁾ はウシ子宮のエストロゲン結合蛋白の精製において Ca²⁺ により安定な 4S 結合蛋白を得、Rocheffort ら¹⁷⁾ も同様の実験で、非可逆

性 4S 結合蛋白の生成が Ca²⁺ 依存性の proteolysis によることを推測した。

また Notides ら¹⁹⁾ はヒト子宮の、Schneider ら¹⁸⁾ はヒト乳癌組織のサイトゾール中に、エストロゲン結合蛋白に対する protease をみとめ、その作用が Ca²⁺ によって増強されることをみとめているが生理的意義は不明である。Puca ら¹⁶⁾ はウシ子宮を用いた実験で、エストロゲン・レセプター複合体が核内にとりこまれて作用を発現する過程で、5.3S から 4.5S への変換の際に働く Ca²⁺ 依存性の protease 作用を示す物質をみとめ、これを Receptor Transforming Factor と称した。

今回の実験ではサイトゾール中に含まれる Ca²⁺ および Mg²⁺ が、アンドロゲンと肥大結節サイトゾール中の結合蛋白との結合にいかに関与するかを検討した。Ca²⁺ 濃度の上昇にともない ³H-DHT との結合は増加し、³H-R1881 との結合は減少した。Mg²⁺ についても同様の作用がみとめられたが Ca²⁺ ほど強くはなかった。

³H-DHT との結合を G-200 カラムにより分析すると、Vo のピークの減少と IgG 分画付近のピークのより大なる増加をみとめ、³H-R1881 との結合の場合は Vo のピークの減少のみをみとめた。³H-DHT との結合で、両イオン濃度の上昇により全結合量が増加したのは Vo のピークの低下分より以上に IgG 分画付近の結合量の増加がみとめられたためと考えられる。³H-R1881 との結合では Vo のピークの低下のみをみとめたことから、全結合量の低下が生じたものと考えられる。このような Ca²⁺ あるいは Mg²⁺ による結合の変化は、前立腺サイトゾール中のアンドロゲン結合蛋白がイオン強度 (0.5 M KCl) により 8S から 4S に解離するという報告¹⁰⁾があるため、単にイオン作用によるサブユニットへの解離であるとの可能性も考えられるが、それに対する異論⁴⁹⁾もあり、かつ今回の実験結果で同じ二価金属イオンである Ca²⁺ と Mg²⁺ の作用に差がみられたこと、またイオン濃度も低いことから、上記の変化は単なるイオン作用によるものとは考えがたく、サイトゾール中には、Ca²⁺ 依存性に結合蛋白分子に変化を与える物質が存在する可能性も示唆されたことになる。

血清中 TBG に対する ³H-DHT の結合が Ca²⁺ および Mg²⁺ により著明に増加することから、³H-DHT と結合蛋白の結合での Ca²⁺ および Mg²⁺ による IgG 分画付近の結合量の増加は、TBG ないし TBG 様蛋白に対する Ca²⁺ および Mg²⁺ のイオン作用により ³H-DHT との結合量が増加したためのものとも

考えられ、Voでの結合量の低下を考えあわせると、その結合蛋白の有するDHTもしくはR1881との結合面がイオン作用により変異する可能性も示唆されるが、前立腺肥大症の病態にどのように干渉しているかはいまだ結論を得るに至っていない。

前立腺肥大症におけるアンドロゲンの関与については、アンドロゲン結合蛋白の重要性が一般に認められている^{14,56)}がその詳細についてはいまだ議論が多い。アンドロゲン作用機序における結合蛋白の役割に Ca^{2+} がなんらかの関わりを持つことが本研究によりあきらかにされたが、この点についてはさらに Mg^{2+} の作用も含めて今後の検討が必要である。

結 語

ヒト前立腺肥大組織を用いて、細胞質アンドロゲン結合蛋白についての基礎的検討をおこなった。

1) Scatchard plotにより前立腺サイトゾールの反応を解析したところ、DHTに対する解離定数(K_d)= $9.4 \times 10^{-10} \text{M}$ 、最大結合部位数(B_{max})= $55 \text{ fmoles/mg protein}$ 、R1881に対しては $K_d=5.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $B_{\text{max}}=25.5 \text{ fmoles/mg protein}$ 、とこのサイトゾール中に高親和性でかつ飽和性のある結合蛋白を認めた。

2) 前立腺サイトゾール中のアンドロゲン結合蛋白を、 ^3H -DHTまたは ^3H -R1881の結合下に、100倍量の非標識ステロイド(DHT, R1881, estradiol, R5020, testosterone, dexamethasone, cortisol)と競合させた結果、DHTあるいはR1881に対し特異性を有することが証明されたが、両者の結合に対する各非標識ステロイドの阻害率には差がみとめられた。

3) 前立腺サイトゾールと ^3H -DHTとの結合体はG-200カラムを用いたゲル濾過法で、VoおよびIgG分画付近の2カ所に溶出されたが、 ^3H -R1881との結合体はVoに溶出され、IgG分画付近には溶出されなかった。

4) 前立腺サイトゾール中の結合蛋白と ^3H -DHTまたは ^3H -R1881との結合に対する Ca^{2+} および Mg^{2+} の影響を調べた。 ^3H -DHTとの結合は、両イオン濃度の上昇にともなって増加し、 Ca^{2+} では4~6 mMまで、 Mg^{2+} では6~8 mMまで著明な増加を示したが、その後(12 mMまで)の増加は緩減となった。 ^3H -R1881との結合は、両イオン濃度の増加にともなって減少傾向を示した。

5) ^3H -DHTとTBGとの結合でも Ca^{2+} および Mg^{2+} はその結合量を増加させたが、両イオンによる差はほとんどなかった。 ^3H -R1881とTBGとの結合

はG-200カラムでIgG分画にわずかのピークとして溶出されたが非特異的な結合と考えられ、 Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} でも影響されなかった。

6) ^3H -DHTあるいは ^3H -R1881と結合蛋白との結合に対する Ca^{2+} または Mg^{2+} の影響をG-200カラムにより分析した。 ^3H -DHTの結合では両イオン濃度の増加にともない、Voのピークの減少およびIgG分画付近のピークの増加をみとめたが、 ^3H -R1881の場合はVoのピークの減少をみとめたのみであった。これら一連の実験を通じて、 Mg^{2+} よりも Ca^{2+} の影響が大きかった。

これらの変化は二価金属イオンの影響によるものとも考えられるが、サイトゾール中には Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} の存在下で結合蛋白分子に作用をおよぼす物質が存在する可能性も考えられた。

本論文の要旨は、第52回日本内分泌学会総会において発表された。

稿を終わるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師石神襄次教授に感謝の意を捧げ、また直接御指導をいただいた守殿貞夫助教授ならびに本学国際交流センター坪井誠吉助教授に深謝するとともに、御協力をいただいた教室の諸先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Liao S, Tymoczko JL, Castaneda E and Shao TC: Receptor mechanism for androgens in rat ventral prostate, normal and abnormal growth of the prostate, ed. by Martin Golland, M.E., LL.D., 563-576, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1975
- 2) Moore CR, Price D and Gallagher TF: Rat-prostate cytology as a testis-hormone indicator and the prevention of castration changes by testis-extract injections. *Am J Anat* 45: 71~107, 1930
- 3) Huggins C, Masina MH, Eichelberger L and Wharton JD: Quantitative studies of prostatic secretion. I. Characteristics of the normal secretion; the influence of thyroid, suprarenal, and testis extirpation and androgen substitution on the prostatic output. *J Exper Med* 70: 543~556, 1939
- 4) Herbert Brendler: Physiology of the prostate and seminal vesicle, Urology, ed. by Campbell, M.F. and Harrison, J.H., 3rd ed., Vol. I, 137-160, W.B. Saunders, Philadelphia, 1970

- 5) Anderson KM and Liao S: Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. *Nature* **219**: 277~279, 1968
- 6) Bruchovsky N and Wilson JD: The intranuclear binding of testosterone and 5α -androstane- 17β -ol-3-one by rat prostate. *J Biol Chem* **243**: 5953~5960, 1968
- 7) Mostofi FK: Benign hyperplasia of the prostate gland, *Urology*, ed. by Campbell MF and Harrison JH, 3rd ed., Vol. II, 1065~1129, WB Saunders, Philadelphia, 1970
- 8) Siiteri PK and Wilson JD: Dihydrotestosterone in prostatic hyperplasia. I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J Clin Invest* **49**: 1737~1745, 1970
- 9) Hasson V, Tveter KJ, Unhjem O and Djöseland O: Studies on the interaction between androgen and macromolecules in male accessory sex organ of rat and man. *J Steroid Biochem* **3**: 427~439, 1972
- 10) Mainwaring WIP and Milroy EJJ: Characterization of the specific androgen receptors in the human prostate gland. *J Endocr* **57**: 371~384, 1973
- 11) Hasson V, Tveter KJ, Attramadal A and Torgersen O: Androgenic receptors in human benign nodular prostatic hyperplasia. *Acta Endocr* **68**: 79~88, 1971
- 12) Reed MJ and Stith SR: The uptake of testosterone and zinc *in vitro* by the human benign hypertrophic prostate. *J Endocr* **58**: 405~419, 1973
- 13) Wagner RK, Schulze KH and Jungblut PW: Estrogen and androgen receptor in human prostate and prostatic tumor tissue. *Acta Endocr Suppl* **193**: 52, 1975
- 14) 志田圭三・伊藤善一・山中英寿：性ステロイドに関する最近の問題点—アンドロゲン。ホと臨 **23**: 1203~1219, 1975
- 15) De Sombre ER, Puca GA and Jensen EV: Purification of an estrophilic protein from calf uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* **64**: 148~154, 1969
- 16) Puca GA, Nola E, Sica V and Bresciani F: Estrogen binding proteins of calf uterus. Inter-relationship between various forms and identification of a receptor-transforming factor. *Biochemistry* **11**: 4157~4165, 1972
- 17) Rochefort H and Baulieu E-E: Effect of KCl, CaCl_2 , temperature and oestradiol on the uterine cytosol receptor of oestradiol. *Biochimie* **53**: 893~907, 1971
- 18) Schneider SL and Dao TL: Effect of Ca^{2+} and salt on forms of estradiol cytoplasmic receptor in human neoplastic breast tissue. *Cancer Res* **37**: 382~387, 1977
- 19) Notides AC, Hamilton DE and Rudolph JH: The action of a human uterine protease on the estrogen receptor. *Endocrinology* **93**: 210~216, 1973
- 20) Gaubert CM, Tremblay RR and Dubé JY: Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptors in rat prostate. *J Steroid Biochem* **13**: 931~937, 1980
- 21) Noma K, Nakao K, Sato B, Nishizawa Y, Matsumoto K and Yamamura Y: Effect of molybdate on activation and stabilization of steroid receptors. *Endocrinology* **107**: 1205~1211, 1980
- 22) Donovan MP, Schein LG and Thomas JA: Inhibition of androgen-receptor interaction in mouse prostate gland cytosol by divalent metal ions. *Mol Pharmacol* **17**: 156~162, 1980
- 23) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265~275, 1951
- 24) Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **51**: 660~672, 1949
- 25) Toft D and Gorski J: A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Nat Acad Sci USA* **55**: 1574~1581, 1966
- 26) Gorski J, Toft D, Shyamala G, Smith D and Notides A: Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with uterus. *Rec Progr Horm Res* **24**: 45~80, 1968
- 27) Jensen EV and Jacobson HI: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Progr Horm Res* **18**: 387~414, 1962

- 28) Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW and De Sombre ER: A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Nat Acad Sci USA* **59**: 632~638, 1968
- 29) Fang S and Liao S: Androgen receptors. *J Biol Chem* **246**: 16~24, 1971
- 30) Liao S and Fang S: Receptor-proteins for androgens and the mode of action of androgens on gene transcription in ventral prostate. *Vitam Horm* **27**: 17~90, 1969
- 31) Fang S, Anderson KM and Liao S: Receptor proteins for androgens. *J Biol Chem* **244**: 6584~6595, 1969
- 32) Unhjem O and Tveter KJ: Localization of an androgen binding substance from the rat ventral prostate. *Acta Endocr* **60**: 571~578, 1969
- 33) Tveter KJ: Effect of 17 α -methyl- β -nortestosterone (SK & F 7690) on the binding in vitro of 5 α -dihydrotestosterone to macromolecular components from the rat ventral prostate. *Acta Endocr* **66**: 352~356, 1971
- 34) Mainwaring WIP: The binding of [1,2- 3 H]-testosterone within nuclei of the rat prostate. *J Endocr* **44**: 323~333, 1969
- 35) Baulieu E-E, Alberga A, Jung I, Lebeau M-C, Mercier-Bodard C, Milgrom E, Raynaud J-P, Raynaud-Jammet C, Rochefort H, Truong H and Robel P: Metabolism and protein binding of sex steroids in target organs: An approach to the mechanism of hormone action. *Rec Progr Horm Res* **27**: 351~419, 1971
- 36) Deming CL and Wolf JS: The anatomical origin of benign prostatic enlargement. *J Urol* **42**: 566~580, 1939
- 37) Mahoudeau JA, Delassalle A and Bricaire H: Secretion of dihydrotestosterone by human prostate in benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocr* **77**: 401~407, 1974
- 38) Habib FK, Lee IR, Stitch SR and Smith PH: Androgen levels in the plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. *J Endocr* **71**: 99~107, 1976
- 39) Becker H, Kaufmann J, Klosterhalfen H and Voigt KD: In vivo uptake and metabolism of 3 H-testosterone and 3 H-5 α -dihydrotestosterone by human benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocr (Kbh)* **71**: 589~599, 1972
- 40) Vermeulen A and Desy W: Androgens in patients with benign prostatic hyperplasia before and after prostatectomy. *J Clin Endocr Metab* **43**: 1250~1254, 1976
- 41) Tveter KJ: Some aspects of the pathogenesis of prostatic hyperplasia. *Acta Path Microbiol Scand Sect A Supple* **248**: 167~174, 1974
- 42) Bonne C and Raynaud JP: Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors. *Steroids* **26**: 227~232, 1975
- 43) Bonne C and Raynaud JP: Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R 1881). *Steroids* **27**: 497~507, 1976
- 44) Asselin J, Labrie F, Gourdeau Y, Bonne C and Raynaud JP: Binding of 3 H-methyltrienolone (R 1881) in rat prostate and human benign prostatic hypertrophy (BPH). *Steroids* **28**: 449~459, 1976
- 45) Bonne C and Raynaud JP: Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R 1881). *Steroids* **27**: 497~507, 1976
- 46) Snochowski M, Pousette Å, Ekman P, Bression D, Andersson L, Högberg B and Gustafsson J-Å: Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Clin Endocr Metab* **45**: 920~930, 1977
- 47) Sirett DAN and Grant JK: Androgen binding in cytosols and nuclei of human benign hyperplastic prostatic tissue. *J Endocr* **77**: 101~110, 1978
- 48) Kodama T, Honda S and Shimazaki J: Androphilic proteins in cytosols of human benign prostatic hypertrophy. *Endocrinol Japon* **24**: 565~573, 1977
- 49) Geller J, Cantor T and Albert J: Evidence for a specific dihydrotestosterone-binding cytosol receptor in the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* **41**: 854~862, 1975
- 50) Attramadal A, Tveter KJ, Weddington SC, Djöseland O, Naess O, Hansson V and Torgersen O: Androgen binding and metabolism in the human prostate. *Vitam Horm* **33**: 247~264,

- 1975
- 51) Steins P, Krieg M, Hollmann HJ and Voigt KD: In vitro studies of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone binding in benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocr* **75**: 773~784, 1974
- 52) Cowan RA, Cowan SK, Giles CA and Grant JK: Prostatic distribution of sex hormone-binding globulin and cortisol-binding globulin in benign hyperplasia. *J Endocr* **71**: 121~131, 1976
- 53) Mobbs BG, Johnson IE and Connolly JG: In vitro assay of androgen binding by human prostate. *J Steroid Biochem* **6**: 453~458, 1975
- 54) Tsuboi S, Kawashima R, Tomioka O, Nakata M, Sakamoto N and Fujita T: Glucocorticoid binding proteins of human brain cytosol. *Brain Research* **179**: 181~185, 1979
- 55) 坪井誠吉：脳内グルココルチコイドレセプターに関する実験的研究. *日内分泌会誌* **54**: 966~979, 1978
- 1978
- 56) 島崎 淳・小玉孝臣：ホルモン受容体—研究の進歩とその臨床—アンドロゲン. *日本臨床* **39**: 2999~3004, 1981
- 57) Cowan RA, Cowan SK and Grant JK: Binding of methyltrienolone (R 1881) to a progesterone receptor-like component of human prostatic cytosol. *J Endocr* **74**: 281~289, 1977
- 58) Gustafsson J-Å, Ekman P, Pousette Å, Snochowski M and Högborg B: Demonstration of a progestin receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Invest Urol* **15**: 361~366, 1978
- 59) Kodama T, Honda S and Shimazaki J: Inhibition by various steroids on dihydrotestosterone binding to androphilic protein in human benign prostatic hypertrophy. *Endocrinol Japon* **25**: 453~460, 1978

(1982年11月17日受付)