

ヒト前立腺肥大症組織の腺上皮および間質における
男性ホルモン受容体と 5α -リダクテース活性について

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

大 石 賢 二

岡 田 謙 一 郎

吉 田 修

オランダ・エラスムス大学泌尿器科学教室

J. C. ROMIJN, J. BOLT de VRIES and F. H. SCHRÖDER

ANDROGEN RECEPTOR AND 5α -REDUCTASE ACTIVITY IN
THE EPITHELIUM AND THE STROMA OF HUMAN BENIGN
PROSTATIC HYPERPLASIA

Kenji OISHI, Kenichiro OKADA and Osamu YOSHIDA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University**(Director: Prof. O. Yoshida)*

J. C. ROMIJN J. Bolt de VRIES and F. H. SCHRÖDER

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands.**(Director: Prof. F.H. Schröder)*

An average of 20×10^6 nucleated cells were obtained from 1 g tissue of human benign prostatic hyperplasia by mechanical separation technique. Of these cells, 96.2 % showed acid phosphatase activity and this was 10 times higher than the remaining stromal fraction on a protein base.

The total activity of 5α -reductase was 81 times higher in stroma than epithelium and the total activity of 3 (β)-oxidoreductase was 29 times higher in stroma.

Androgen receptor amount measured in total tissue, epithelium and stroma were 100, 29 and 62 fmol R1881/mg DNA, respectively.

These results suggest that androgen metabolism takes place mainly in the stroma of human BPH tissue, and that BPH is probably the disease of prostatic stroma.

Key words: BPH, Cell separation, Androgen receptor, 5α -reductase

ま え が き

前立腺組織の器官発生においては、アンドロジェンの存在と間質組織の作用が必須であることはすでに明らかにされており^{1,2)}、いっぽう、ヒト前立腺肥大症においては、傍尿道腺組織が間質との関連を保ちつつ増生し、結果的に前立腺肥大症結節へと導かれることも知られている³⁾。さらに 5α -リダクテースは、前立

腺肥大症組織では、正常前立腺組織および、前立腺癌組織よりも活性が高く、組織培養で得られた線維芽細胞中の 5α -リダクテース活性は、前立腺肥大症の線維芽細胞では前立腺癌組織および正常前立腺組織のそれよりも高いことが報告されている^{4,5)}。

このように、上皮と間質の相互関係は、前立腺組織の誘導と前立腺肥大症の発生の制御においてきわめて重要であるが、この関係をより深く理解するためには、

上皮と間質の特性をそれぞれさらに詳細に研究することが必要である。

われわれは、前立腺肥大症組織を上皮と間質に分離する簡単な方法を開発し、その分離された上皮と間質を用いて男性ホルモン受容体ならびに 5 α -リダクテース活性を検索したので報告する。

対象と方法

上皮と間質の分離

前立腺肥大症組織を上皮と間質に分離する方法についてはすでに報告したが⁶⁾、以下簡単に説明する。手術的に得られたヒト前立腺肥大症組織を、ハサミを用い、直径 2 mm 以下に細切し、その組織を手動的に圧搾したのちつぎに述べるような方法で上皮と間質に分離した。まず5分間の静置ののち、上皮細胞と血球細胞とを含む上清を30分間静置し、上皮細胞を沈澱させ、主に血球細胞を含む上清を分離した。間質を含む沈澱物より上皮をできるだけ除去するために、組織細切機 (Mickle Lab. Engineering Co. England) にて直径 0.5 mm 以下に細切し、100 μ m のナイロンガーゼを用いて濾過し、フィルター上に残った組織を間質組織とした (Fig. 1)。これらの操作は 4°C 以下に冷却した培養液中 [Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) + 10% Fetal Calf Serum (FCS)] においておこなった。

得られた上皮細胞を 10⁻² モルの Sodium ethylene

diamine tetra-acetic acid (EDTA, Merck, West Germany) を含み、Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を含まないリン酸緩衝液中に浮遊させ、10分間、37°C に放置し、得られた細胞浮遊液を血球算定盤にて計数した。生細胞比率は trypan blue を用いて測定した⁷⁾。

上皮細胞中の酸性フォスファターズの染色法は Serrano らの方法⁸⁾に従った。

酸性フォスファターズの定量的測定は次のごとくおこなった。上皮部分は 0.05モルの酢酸緩衝液に浮遊させたものを用い、間質部分は液体窒素内にて凍結させ、Micro-dismembrator にて粉碎し (45分間, Micro-dismembrator B. Braun Melsungen Co, type 853 062), 両部分を超音波にてさらに処理し (MSE 150 watt Ultrasonic Disintegrator), これを 25,000 g で30分間遠沈, 上清を採取し, サンプルとした。サンプルをフォスフォリルコリンと反応させ、遊離した無機リンの量を測定し、酸性フォスファターズの活性とした⁹⁾ (Phosphorus Auto/Stat kit, Pierce Chemical Co.).

DNA, RNA および蛋白質の測定は、両部分を、1規定の NaOH にて液化したのち、それぞれ、Giles and Myers¹⁰⁾, Mijbauw¹¹⁾ and Lowry¹²⁾ の方法で測定した。

5 α -リダクテース活性

5 α -リダクテース活性の測定は、上皮部分と間質部分をそれぞれ凍結粉碎ののち、pH 7 にて、NADPH

Standard separation technique

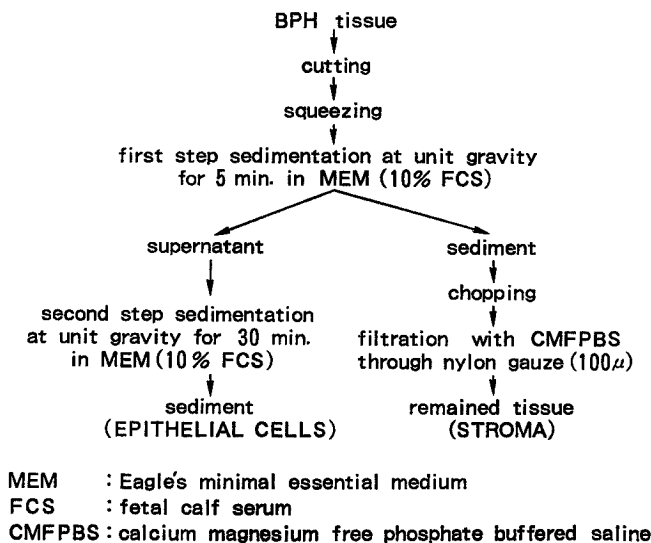


Fig. 1

産生系とともに、³H-テストステロンを反応させ、産生物を抽出したのち、代謝産物をシリカゲルの薄層クロマトグラフィーにて分離し、液体シンチレーションカウンターにて比活性を測定した⁵⁾。

男性ホルモン受容体

男性ホルモン受容体の測定は、上皮部分と間質部分をそれぞれ凍結粉碎のち、緩衝液 (2 m mol/l・phosphate buffer (pH 8) + 1 g/l・heparin) を加え、1時間放置したのち、100,000 g・30分にて遠沈し、上清をサンプルとした。この上清を 10 °C で20時間、³H-R1881 のみか、または100倍の R1881 の存在下で反応させ、活性炭で遊離のステロイドを吸着のち、寒天ゲル電気泳動、硫酸プロタミン沈降法、または蔗糖勾配遠沈法にて、定量的に男性ホルモン受容体を分析した¹³⁾。

結 果

上皮と間質の分離

Table 1 に示すように BPH 1 g あたり約 20×10⁶

個の有核細胞が得られた。そしてこの96.2%の細胞に酸性フォスファターゼの活性が証明され、また赤血球の混入も少なく、生細胞の比率も高い結果が得られた。

上皮細胞および間質より測定された蛋白量、RNA、DNA を Table 2 に示した。蛋白は上皮部分に 3.2 %、間質部分に66%、RNA は上皮部分に 5.3 %、間質部分に48%、また、DNA は上皮部分に16%、間質部分に77%回収された。酸性フォスファターゼ活性は間質部分には上皮部分に比べ約10分の1の活性が認められ、两部分の酸性フォスファターゼ活性からみても上皮細胞と間質の分離は効率よくおこなわれたといえる。

5 α -リダクターゼ活性

5 α -リダクターゼ活性および3 α (β)-オキシンドリダクターゼ活性は Table 3 に示すとおり、上皮においてそれぞれ 0.6 nM/mg protein/hour, 0.36 nM/mg protein/hour であり、間質においてはそれぞれ 2.4 nM/mg protein/hour, 0.54 nM/mg protein/hour で

Table 1. Isolation of epithelium from tissue of human BPH

	(n=15)			
	Nucleated cells ($\times 10^6$ /g)	RBC ($\times 10^6$ /g)	Viability of Nucleated cells (%)	Acid phosphatase Positive cells (%)
average	22.5 $\pm$ 9.0	0.62 $\pm$ 0.41	94.5 $\pm$ 4.8	96.3 $\pm$ 1.7
range	7.5 ~ 34.6	0.01 ~ 1.22	78.2 ~ 98.7	92.8 ~ 98.7

Table 2. Recovery of protein, RNA and DNA in separated epithelial cells and stroma of BPH (average of 3 experiments)

(average of 3 experiments)

	total tissue	epithelium	stroma
No. of cells (10 ⁶ /g of tissue)	—	18.6 $\pm$ 2.6	—
protein (mg/g of tissue)	102 $\pm$ 26 (100%)	3.3 $\pm$ 0.9 (3.2%)	67 $\pm$ 8 (66%)
RNA (mg/g of tissue)	6.5 $\pm$ 0.7 (100%)	0.34 $\pm$ 0.13 (5.3%)	3.1 $\pm$ 0.3 (48%)
DNA (mg/g of tissue)	1.3 $\pm$ 0.3 (100%)	0.21 $\pm$ 0.02 (16%)	0.97 $\pm$ 0.27 (77%)
acid phosphatase activity. (n mole / μ g protein/hour)	—	330 $\pm$ 49	13 $\pm$ 11

あった。上記2酵素の上皮および間質における総活性の比はそれぞれ1:81, 1:29となる。男性ホルモンの標的臓器における代謝酵素のうち5 α -リダクテース, 3 α (β)-オキシンドリダクテースは重要な役割を担うものと考えられているが、男性ホルモンの代謝はほとんどが間質で営まれていることを示唆した。

男性ホルモン受容体

Fig. 2 に示すように、上皮と間質に分離するすべてのステップで男性ホルモン受容体量を測定し、その結果を Table 4 に示した。分離前の前立腺肥大症組織 (T₀)、上皮 (E₀)、および間質 (S₀) にはそれぞれ男性ホルモン受容体が 100 f mol R 1881/mg DNA, 29 f mol R 1881/mg DNA, 62 f mol R 1881/mg DNA 検出された。T₀, E₀, S₀ を比較すると、男性

ホルモン受容体は、DNA を基準にみるとむしろ間質に多く存在した。

考 察

前立腺 肥大症 組織を 上皮と 間質に 分離する 試みは 1970年 Franks ら¹⁴⁾ により 器械的に 分離する 方法で 始ったが、 分離された 上皮では DNA 合成が 起らないと 述べている。つまり 間質の 支持が 上皮の 増殖に 必要であらうと 結論している。Cowan らは 器械的に 組織を 細切した のちナイロン フィルターを用いて、 両組織を 分離し、 生化学的に 分析しているが¹⁵⁾ 純度の 点において 満足すべき ものではない。また Helms らは 器械的に 組織を 細切した のち蛋白分解 酵素にて 細胞浮遊液を作り これを濃度 勾配の Ficall 液中で 遠沈し、 上

Table 3. Enzyme activity of two fractions of BPH
(n=3)

	5 α -reductase		3 α (β)- oxidoreductase (3-hydroxy group)	
	Ep.	St.	Ep.	St.
nM/mg protein/hour	0.6 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.6	0.36 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.06
ratio of total activity (St/Ep)	1	81 $\pm$ 9	1	29 $\pm$ 4

Ep.: epithelium

St.: stroma

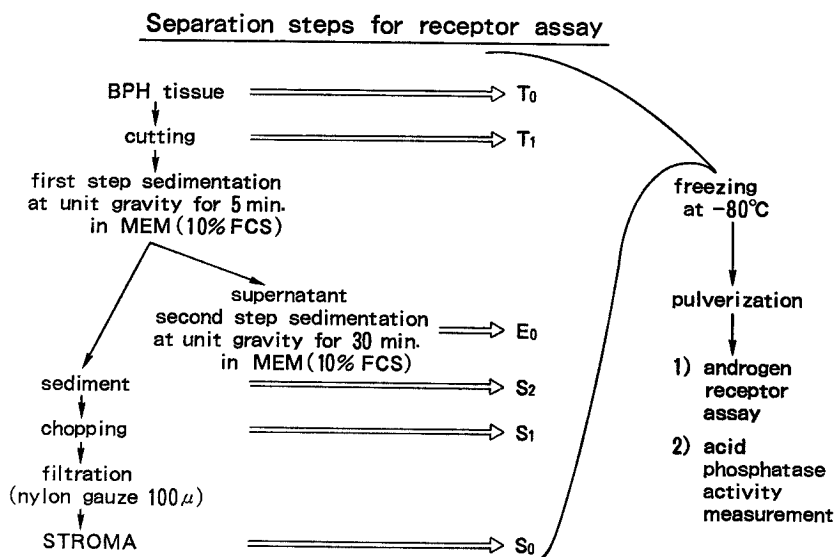


Fig. 2

Table 4. Amount of androgen receptor (average of 4 experiments)

	protein base (fmol R1881 /mg protein)	DNA base (fmol R1881 /mg DNA)	acid phosphatase base (fmol R1881 /1. U. acid phosphatase)
T ₀	9 $\pm$ 4 (6~16)	100 $\pm$ 43 (54~160)	4 $\pm$ 3 (1~9)
T ₁	17 $\pm$ 2 (14~23)	88 $\pm$ 9 (69~100)	7 $\pm$ 2 (1~9)
E ₀	15 $\pm$ 4 (10~21)	29 $\pm$ 3 (23~43)	2 $\pm$ 1 (1~2)
S ₀	16 $\pm$ 6 (10~26)	62 $\pm$ 33 (33~112)	8 $\pm$ 3 (5~12)
S ₁	28 $\pm$ 15 (17~55)	170 $\pm$ 110 (76~360)	13 $\pm$ 9 (7~29)
S ₂	29 $\pm$ 19 (17~62)	150 $\pm$ 87 (94~300)	10 $\pm$ 8 (7~26)

皮を分離しているが¹⁶⁾、回収率が悪く、生化学的検索をおこなうには適さないとされる。

われわれの分離方法では前立腺肥大症組織 1g あたり平均 2 千万個の有核細胞が得られ、そのうち 96% に酸性フォスファターゼ活性が認められた。間質は組織標本にて上皮細胞をほとんど認めず、酸性フォスファターゼは単位蛋白あたり上皮部分の 25 分の 1 であった。すなわち、われわれの方法は今までの方法と比較し¹⁴⁻¹⁶⁾ 有核細胞収率、酸性フォスファターゼ活性比率、および蛋白、核酸の生化学的検索よりみて、分離効率はきわめて高い。われわれの得た結果では 5 α -リダクターゼ活性のほとんどが間質に含まれているが、これは Cowan, Sirett の結果とよく一致する^{16,17)}。Bruckowsky らはテストステロンの還元酵素である 5 α -リダクターゼと、5 α -ジヒドロテストステロンの非活性化酵素である 3 α (β)-オキシンドリダクターゼの活性の比に注目すると、前立腺肥大症組織においては正常前立腺、前立腺癌にくらべ高いことを述べており、これが肥大症組織における 5 α -ジヒドロテストステロンの蓄積に寄与しているであろうと推論している¹⁸⁾。前立腺肥大症が上皮よりむしろ間質系の疾患であることを思えば、5 α -リダクターゼが間質の酵素であることは意味深いと考えられる。

男性ホルモン受容体は上皮にのみ存在すると考えられていたし、分離された間質には少量しか検出できなかったが^{15,16)}、われわれは間質にむしろ多くの男性ホルモン受容体を検出した。間質に存在する男性ホルモン受容体の生物学的意義についての研究が今後の重要な課題になろう。

以上述べたごとくわれわれの結果、すなわち前立腺間質において 5 α -リダクターゼ活性が高く、かつ男性ホルモン受容体が豊富に存在すること、疾患別の前立腺間質における男性ホルモン代謝に差^{4,5,16,17)} のあること、さらに疾患別の前立腺間質における膜表現形式に差がみられること¹⁹⁾ などより、前立腺肥大症の発生

に間質が重要な役割を担っていると示唆される。

結 語

ヒト前立腺肥大症の組織を上皮と間質に分離する方法を改良し、上皮細胞は組織 1g あたり平均 2 千万個得られ、95% 以上の細胞に酸性フォスファターゼ活性のあることが組織化学的に証明された。間質は、酸性フォスファターゼ活性が上皮に比べ、単位蛋白あたり約 10 分の 1 以下であった。また 5 α -リダクターゼはそのほとんどが間質に存在し、男性ホルモン受容体は、むしろ間質に多いという結果が得られた。

以上のことは、前立腺肥大症発生における間質の役割の重要性を示唆するものであり、今後この点での一層の研究が必要である。

文 献

- 1) Lasnitzki I and Mizuno T: Induction of the rat prostate gland by androgens in organ culture. *J Endocr* 44: 47, 1977
- 2) Cunha GR: Tissue interactions between epithelium and mesenchyme of urogenital and integumental organ. *Anat Rec* 172: 529, 1972
- 3) McNeal JE: Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 15: 340, 1978
- 4) Cowan RA, Cook B, Cowan SK, Grant JK, Sirett DAN and Wallace AM: Testosterone 5 α -reductase and the accumulation of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *J. Steroid Biochem* 11: 609, 1979
- 5) Schweikert HU, Hein HJ and Schröder FH: Testosterone metabolism of fibroblasts grown from prostatic carcinoma, benign prostatic hypertrophy and urogenital skin. *J Urol* 127: 361~367, 1982

- 6) Oishi K, Romijn JC and Schröder FH : Cell separation and characterization of epithelial cells from human benign prostatic hyperplasia. *The Prostate* 2: 281~289, 1981
- 7) Boyse EA, Old LJ and Thomas G : A report on some observations with a simplified cytotoxicity test. *Transplantation Bulletin* 29 : 435, 1962
- 8) Serrano JA, Shannon Jr WA, Sternberger NJ, Wasserkrug HL, Serrano AA and Seligman AM : The cytochemical demonstration of prostatic acid phosphatase using a new substrate, phosphorylcholine. *J Histochem Cytochem* 24: 1046, 1976
- 9) Helms SR, Brattain MG, Pretlow II TG and Kreisberg JI : "Prostatic Acid Phosphatase?" *Am J Pathol* 88: 529, 1977
- 10) Giles KW and Mijers A : An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206 : 93, 1965
- 11) Mijbauw W : Estimation of small amounts of pentose especially in derivatives of adenylic acid. *Z Physical Chem* 258 : 117, 1939
- 12) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265, 1951
- 13) Foekens JA, Bolt-de Vries J, Mulder E, Blankenstein MA, Schröder FH and van der Molen HJ : Nuclear androgen receptors in human prostatic tissue. Extraction with heparin and estimation of the number of binding sites with different methods. *Clinica Chemica Acta* 109: 91~102, 1981
- 14) Franks LM, Riddle PN, Carbonell AW and Gey GO : A comparative study of the ultrastructure and lack of growth capacity of adult human prostate epithelium mechanically separated from its stroma. *J Pathol* 100: 113, 1970
- 15) 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, 1976
- 16) Sirett DA, Cowan SK, Janeczko AE, Grant JK and Glen ES : Prostatic tissue distribution of 17-beta-hydroxy-5-alpha-androstan-3-one and of androgen receptors in benign hyperplasia. *J Steroid Biochem* 13 : 723~728, 1980
- 17) Cowan RA, Cowan SK, Grant JK and Elder HK : Biochemical investigations of separated epithelium and stroma from benign hyperplastic prostatic tissue. *J Endocr* 74 : 111, 1977
- 18) Bruchowsky N, Lieskovsky G : Increased ratio of 5 α -reductase : 3 α (β)-hydroxysteroid dehydrogenase activities in the hyperplastic human prostate: *J Endocr* 80 : 289~301, 1979
- 19) Oishi K, Romijn JC and Schröder FH : The surface character of separated prostatic cells and cultured fibroblasts of prostatic tissue as determined by Concanavalin-A hemadsorption. *The Prostate* 2: 11~21, 1981

(1984年10月15日受付)