

ラットおよびヒト精巣 hCG レセプターの hCG による down-regulation

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

健康保険組合連合会大阪中央病院 (部長: 藤岡秀樹)

高 英哲, 近藤 宣幸, 土井 康裕*, 松井 孝之*

藤末 洋*, 竹山 政美**, 藤岡 秀樹

DOWN-REGULATION OF RAT AND HUMAN TESTICULAR HCG RECEPTORS BY HCG

Mikio NAMIKI, Masahiro NAKAMURA and Akihiko OKUYAMA

From the Department of Urology, Osaka University Medical School

(Director: Prof. T. Sonoda)

Eitetsu KOH, Nobuyuki KONDOH, Yasuhiro DOI, Takayuki MATSUI,

Hiroshi FUJISUE, Masami TAKEYAMA and Hideki FUJIOKA

From the Department of Urology, Osaka Central Hospital

(Chief: H. Fujioka)

Changes in rat and human testicular human chorionic gonadotropin (hCG) binding sites induced by hCG were estimated *in vivo* and *in vitro*. After a single administration of hCG, the specific hCG binding sites were significantly reduced for 7 and 5 days in rat and human testes, respectively. However, hCG binding sites had recovered to pretreatment values by the 14th day after the administration. Occupied hCG binding sites measured in both rat and human testes accounted for about half of the reduced binding sites on the day after administration of hCG, but thereafter the number of sites occupied was not correlated with the reduction of the binding sites. In *in vitro* experiments using the organ culture technique, an exposure to hCG for 24 hours induced a dose-related significant loss of the specific hCG binding sites for 7 and 5 days in rat and human testes, respectively. Thereafter, the number of binding sites gradually increased. These patterns of change in hCG binding sites *in vitro* were similar to those *in vivo*.

These findings suggest that the reduction in hCG binding sites in rat and human testes by hCG is due not only to occupancy but also down-regulation of the binding sites. In conclusion, the present testicular organ culture method is useful to study hormonal regulation of testicular function, especially in human testes.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1771-1775, 1988)

Key words: Testis, hCG receptor, Down-regulation

緒 言

Peptide hormone が自身の hormone receptor を制御していることはよく知られており, 精巣に存在する LH/hCG receptor についても LH/hCG 投

与後, receptor 含有量が変化することが示されてきた¹⁻⁷⁾. しかし, これらの研究の大部分は実験動物に限定されており, ヒト精巣における LH/hCG receptor のホルモン制御に関する報告は少ない^{3,5)}. また LH/hCG が自身の receptor を制御しているメカニズムも未だ明らかではない.

今回われわれは, ラットおよびヒト精巣 hCG receptor の hCG 自身による制御機構を, *in vivo* および

*現: 兵庫医科大学泌尿器科学教室

**現: 市立堺病院泌尿器科

in vitro において、それぞれ検討した。

対象および方法

(1) *in vivo* での検討

ラットを用いた実験では、adult wistar 系ラットを用い、hCG 100 IU を筋肉注射した後1, 3, 5, 7, 10または14日目に屠殺し、精巣組織中の total および unoccupied hCG binding sites を測定した。なお生理食塩水を筋肉注射したラットの精巣組織を control として用い、各グループのラット数は6匹とした。

ヒトでの検討には不妊男性の生検精巣組織を用いた。すなわち本研究に同意を得た52名の特発性男子不妊症患者に対し hCG 5,000 IU を筋肉注射し、1, 3, 5, 7または14日後に精巣生検を1回行い、生検組織の一部は Bouin 氏液固定後 Hematoxylin and Eosin 染色を行い組織学的検討を行い、残余組織で hCG binding sites を測定した。ただし組織学的検討で高度の造精障害を示した症例では hCG receptor が存在する Leydig cell の単位重量当たりの割合が増加すると考えられたので除外し、結局対象は35例となった。内訳は hCG 投与1日後6例(25~38歳)、3日後6例(24~40歳)、5日後5例(27~35歳)、hCG 非投与(control) 8例(26~37歳)であり、全症例とも hCG receptor に影響をおよぼす可能性のある血清 LH, FSH, prolactin は hCG 投与前に正常範囲内であった。

Spare (unoccupied) hCG binding sites の測定はすでに報告した方法⁹⁾に従い行い、total hCG binding sites 測定の場合は内因性の LH/hCG を receptor より dissociate⁹⁾した後 binding study を行うことにより求めた。

(2) *in vitro* での検討

ラットおよびヒト精巣を hCG を含む medium で24時間器管培養し、その後の精巣組織 hCG binding sites の変化を検討した。ラット精巣組織は5匹の adult wistar 系ラットより、ヒト精巣は5名の無治療前立腺癌患者の去勢術に際して得られた。それぞれの精巣を3群に分け、第1群は50 IU/ml hCG を含む medium で、第2群は0.5 IU/ml hCG を含む medium で、第3群(control)は hCG を含まない basal medium で24時間培養した後、いずれの群の medium も basal medium と交換し、以後 basal medium で培養を続け経時的(24時間の培養直後、1, 3, 5, 7, 10および14日後)に培養精巣組織の hCG binding sites を測定した。なお精巣器管培養

は既に報告した方法¹⁰⁾に従い行った。

結 果

(1) *In vivo* での検討

hCG 100 IU 投与のラット精巣組織の total および spare (unoccupied) hCG binding sites の変化を control 精巣の total hCG binding sites との比で示した (Fig. 1). spare hCG binding sites は hCG 投与1日後には control の約20%にまで減少し、有意な減少は7日間続いた。その後 spare hCG binding sites は増加し始め、14日後には control level にまで回復した。hCG により occupied された hCG binding sites (total より spare hCG binding sites を差し引いて求める)は hCG 投与1日後には binding sites の減少の約半分を占めたが、3日後以後の binding sites の減少に occupancy はあまり関与していなかった。

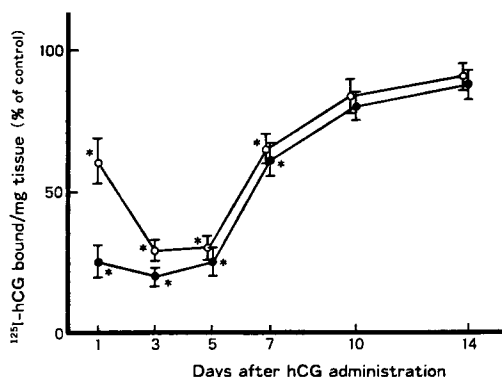


Fig. 1. Changes in spare (●) and total (○) hCG binding sites in rat testes after a single injection of 100 IU hCG. Each point expressed as percent of total hCG binding sites in control testes treated with saline is the mean $\pm$ standard error of six estimations. * $p < 0.05$ vs control (by t-test).

hCG 5,000 IU 投与後のヒト精巣組織の total および spare hCG binding sites の変化を hCG 非投与の精巣組織 (control) の total hCG binding sites との比で示した (Fig. 2). hCG 投与1日後には spare hCG binding sites は control の約40%に減少、有意な減少は5日間続いた。hCG 投与7日後より、spare binding sites は回復し始め、14日後には control level に達した。occupied hCG binding sites は hCG 投与1日後は減少した binding sites の約半分を占めたが、その後の減少には occupancy はあまり関与していなかった。

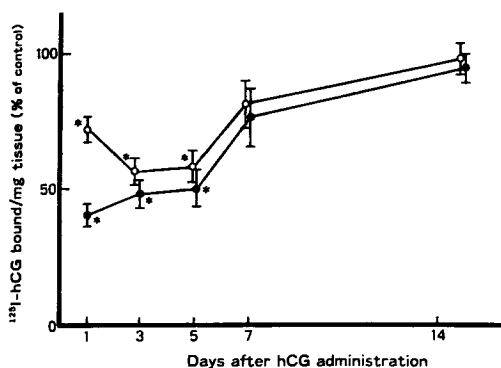


Fig. 2. Changes in spare (●) and total (○) hCG binding sites in human testes after a single injection of 5,000 IU hCG. Each point expressed as percent of total hCG binding sites in controls (before administration) is the mean $\pm$ standard error of five to eight estimations. * $p < 0.05$ vs testes before administration (control) (by t-test).

(2) *In vitro* での検討

hCG を含む medium で 24 時間培養した後のラット精巣 hCG binding sites (spare binding sites のみ) の変化を control との比で示した (Fig. 3). 24 時間培養直後では 50 IU/ml hCG を含む medium

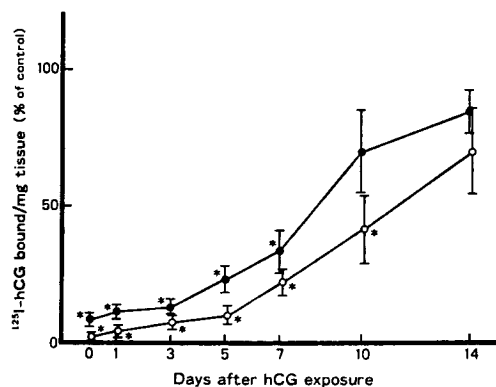


Fig. 3. Changes in the specific hCG binding sites in rat testes after exposure to hCG for 24 hours in organ culture. Medium containing hCG was removed at day 0, and testicular tissue washed. The specific hCG binding sites were measured immediately, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days after the treatment with hCG. Each point expressed as percent of control exposure of pre-incubation without hCG is the mean $\pm$ standard error of five estimations. * $p < 0.05$ vs control (by paired t-test). (○) hCG 50 IU/ml medium pre-incubation; (●) hCG 0.5 IU/ml medium pre-incubation.

で培養した精巣の hCG binding sites は control より 98%, 0.5 IU/ml hCG を含む medium で培養した精巣の hCG binding sites は control より 90% 減少していた. control と比し有意な hCG binding sites の減少は 7 日間続いた. そしてその減少の程度は hCG を高濃度含んだ medium で培養した場合の方が著明であった. 14 日後にはそれぞれの hCG binding sites は control level に回復した.

Fig. 4 に hCG を含む medium で 24 時間培養した後のヒト精巣 hCG binding sites (spare binding sites のみ) の変化を示した. 培養後の hCG binding sites の減少および回復のパターンはラット精巣の場合と同様であったが, 減少の程度および期間はラット精巣の場合ほど著明ではなかった.

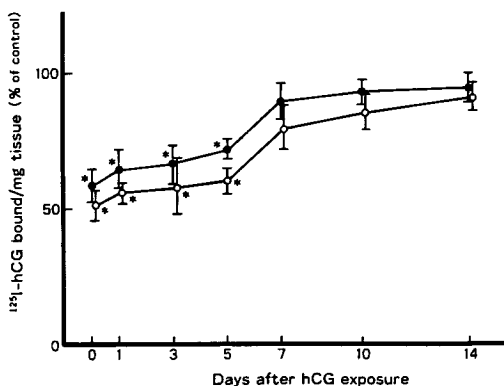


Fig. 4. Changes in the specific hCG binding sites in human testes after exposure to hCG for 24 hours in organ culture. Medium containing hCG was removed at day 0, and testicular tissue washed. The specific hCG binding sites were measured immediately, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days after the treatment with hCG. Each point expressed as percent of control exposure of pre-incubation without hCG is the mean $\pm$ standard error of five estimations. * $p < 0.05$ vs control (by paired t-test). (○) hCG 50 IU/ml medium pre-incubation; (●) hCG 0.5 IU/ml medium pre-incubation.

考 察

本研究においては, hCG 投与後のラットおよびヒト精巣 hCG binding sites の変化を *in vivo* のみならず, 器管培養を用いた *in vitro* の実験においても検討した. 精巣のホルモン制御や他の機能の研究をする場合, *in vitro* の実験ではしばしば Sertoli cell や Leydig cell などの個々の細胞を用いて行われてきた. しかし最近 gonadotropin-releasing hormone

like substance などの intratesticular mediators の存在が明らかになるに従い^{11,12)}, 精巣内のホルモン制御は従来考えられていた以上に複雑で, 精巣内の細胞間物質がその制御機構に重要な役割を果たしているらしいことが判明してきた。このため本研究では細胞培養より *in vivo* の状態に近く, いくつかの点ですぐれていると考えられる器管培養法を用いて *in vitro* の実験を行った。 *in vitro* の実験結果は hCG binding sites の減少の程度において *in vivo* の実験結果とやや異なっていたが, hCG 投与後の hCG binding sites の減少および回復のパターンは *in vivo* の実験結果と相似していた。よって, 精巣器管培養は精巣機能のホルモン制御の研究に有用であり, とりわけ *in vivo* の実験が比較的行い難いヒト精巣の研究には非常に有力な手段となると考えられる。

hCG 投与後精巣 hCG binding sites はラットでは7日間, ヒトでは5日間, それぞれ有意に減少したが, ラット精巣の実験結果は他の報告者の所見と一致した^{2,4,6)}。ヒト精巣に関しては hCG 投与後の LH/hCG receptor の変化に関する論文はわずかしかない^{3,5)}。すなわち Sharpe ら³⁾は hCG 投与 (1,000~4,000 IU) 1日後の不妊男性の精巣 hCG binding sites は未治療不妊男性のそれより低値であることを示しているが, Läckgren ら⁵⁾は停留精巣を有する少年の精巣 LH binding sites は hCG (500~1,000 IU) 投与1~4日後で増加すると報告している。hCG 投与後, 一方では LH/hCG receptor が減少, 他方では増加した原因は, hCG の投与量や Leydig cell 機能の年齢による相違などによると考えられるが, 本研究の結果は 5,000 IU の hCG 投与にて不妊男性の精巣 hCG binding sites が5日間有意に減少することを示した。よって, 比較的大量の hCG 投与にて成人男性の精巣 hCG receptor は一定期間はしばしば治療剤として hCG を用いる特発性男子不妊症¹³⁾ や hypogonadotropic hypogonadism¹⁴⁾ などにおいて hCG の投与方法を決定する上で大変参考となると考えられる。

hCG 投与後の長期間にわたる精巣 hCG binding sites の減少は, binding sites の occupancy や down-regulation などのいくつかのメカニズムによると考えられる。occupancy がどの程度 binding sites の減少に関与しているかを明らかにするため, *in vivo* の実験では内因性の hCG を binding sites より dissociate する操作⁹⁾を行った後 binding sites (total hCG binding sites) を測定した。hCG 投与1日後ではラット, ヒト精巣とも hCG binding sites

の減少分の約半分を occupancy が占めていた。しかし, その後の hCG binding sites の減少には occupancy はあまり関与しておらず, down-regulation などのメカニズムの介在が推測された。spare (unoccupied) hCG binding sites は hCG 投与後5日間は減少したままで回復傾向を示さなかった。この事実は hCG receptor の合成や再活性化がこの期間抑制されていたことを示すと考えられる。

結 語

(1) hCG 投与後, ラットおよびヒト精巣 hCG receptor が7日間および5日間, それぞれ有意に減少することが判明した。

(2) この hCG receptor の減少は binding sites の hCG による occupancy のみならず, down-regulation など他のメカニズムに起因すると推測された。

(3) 器管培養を用いた *in vitro* の実験結果は *in vivo* の実験結果と相似していた。よって精巣器管培養法は精巣機能のホルモン制御などの研究に有用で, 特に *in vivo* の実験が比較的行い難いヒト精巣に関する研究に有力な手段であると考えられる。

本研究の一部は昭和62年度文部省科学研究費一般研究 C (課題番号62570724) によった。

文 献

- 1) Sharpe RM: hCG-induced decrease in availability of rat testis receptors. *Nature* **264**: 644-646, 1976
- 2) Hsueh AJW, Dufau ML and Catt KJ: Regulation of luteinizing hormone receptors in testicular interstitial cells by gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* **72**: 1145-1152, 1976
- 3) 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 Endocr* **86**: 117-125, 1980
- 4) Jahnsen T, Purvis K, Torjesen PA and Hansson F: Temporal relationship between hCG induced desensitization of LH/hCG responsive adenylyl cyclase and downregulation of LH/hCG receptors in the rat testis. *Arch Androl* **6**: 155-162, 1981
- 5) Läckgren G, Plöen L, Berg AA and Hansson V: Receptors for luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in the human undescended testis and the effect

- of hCG-treatment. *Int J Androl* **6**: 520-532, 1983
- 6) Kolena J and Seböková E: Hormonal regulation of testicular LH/hCG receptors in rat. *Exp Clin Endocr* **82**: 1-7, 1983
- 7) Mombrial FC, Begeot M, Leduque P, Dubois P, Saez J and Haour F: Gonadotropin receptor complexes and free receptors in porcine Leydig cell cultures during recovery from hCG stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* **118**: 206-211, 1984
- 8) Namiki M, Nakamura M, Okuyama A, Sonoda T, Nishimune Y, Takatsuka D and Matsumoto K: Influence of temperature on the function of Sertoli and Leydig cells of human testes. *Fertil Steril* **47**: 475-480, 1987
- 9) Chen YDI and Payne AH: Regulation of testicular LH receptors by homologous hormone: *In vitro* studies on receptor occupancy and receptor loss. *Biochem Biophys Res Commun* **74**: 1589-1596, 1977
- 10) Namiki M, Nakamura M, Okuyama A, Sonoda T, Itatani H, Sugao H, Sakurai T, Nishimune Y and Matsumoto K: Reduction of human and rat testicular follicle stimulating hormone receptors by human menopausal gonadotrophin *in vivo* and *in vitro*. *Clin Endocrinol (Oxf)* **26**: 675-684, 1987
- 11) Sharpe SM, Fraser HM, Cooper I and Rommerts FFG: Sertoli-Leydig cell communication via an LH-RH like factor. *Nature* **290**: 785-787, 1981
- 12) Benahmed M, Reventos J, Tabone E and Saez JM: Cultured Sertoli cell mediated FSH stimulatory effect on Leydig cell steroidogenesis. *Am J Physiol* **248**: E176-E181, 1985
- 13) Schill WB, Jüngst D, Unterburger P and Braun S: Combined hMG/hCG treatment in subfertile men with idiopathic normogonadotrophic oligozoospermia. *Int J Androl* **5**: 467-477, 1982
- 14) Finkel DM, Phillips JL and Snyder P: Stimulation of spermatogenesis by gonadotropins in men with hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* **313**: 651-655, 1985

(1987年12月7日受付)