

ヒト前立腺肥大症組織と Robaveron

II. 前立腺肥大組織の Testosterone 代謝におよぼす Robaveron の影響

鳥取大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 後藤 甫教授)

竹 中 生 昌
池 田 嘉 之

鳥取大学医学部ステロイド研究生化学部門 (主任: 清水久太郎教授)

小 原 ひ ろ み
仲 田 富 士 徳“ROBAVERON” AND HUMAN PROSTATIC TISSUE
IN HYPERTROPHYTHE EFFECT OF ROBAVERON ON TESTOSTERONE METABOLISM
(II) IN HYPERTROPHIC HUMAN PROSTATIC TISSUE

Ikumasa TAKENAKA and Yoshiyuki IKEDA

*From the Department of Urology, Tottori University School of Medicine
(Director: Prof. H. Gotō, M. D.)*

Hiromi KOHARA and Fujinori NAKADA

*From the Division of Biochemistry, Institute of Steroid Research,
Tottori University School of Medicine
(Director: K. Shimizu, M. D.)*

In order to investigate the effect of Robaveron on prostate, the prostatic tissues surgically removed were incubated with testosterone-4-¹⁴C, and then by subcellular fraction of the cultured prostatic tissues, the testosterone metabolites were analyzed.

1) Dihydrotestosterone (DHT), 5 α -androstanediol, 5 α -androstenedione and Δ^4 -androstenedione were identified as metabolites of testosterone. DHT was most identified.

2) Testosterone metabolism was a little suppressed with Robaveron. In the supernatant of the tissues, the 5 α -reduced products were increased. On the contrary, in the nucleic fraction, these were not so much promoted.

3) In view of the production of DHT, it was thought that Robaveron accelerated 5 α -reductase activities in cytoplasm, and the conjugation of receptor protein with DHT was retarded. Consequently, it was assumed that Robaveron had a kind of anti-androgenic action.

結 言

前立腺肥大症の治療薬として、最近ブタ前立腺抽出物が登場し、臨床的にも有効であることが報告されて

いる。わたくしたちもこのブタ抽出物であるロバベロン (以下 Rob と略) の基礎的研究として、ヒト前立腺肥大症組織を組織培養のもとで Rob の作用を検討し、前立腺組織構造に直接影響を与えることをすでに

報告した。今回はこれらの変化が Rob により前立腺組織自体に生じたものであるかどうかを究明するため、前立腺組織でのテストステロン (以下Tと略) 代謝を指標として Rob の作用を比較検討したので報告する。

実験方法

実験材料：前回と同様に72歳前立腺肥大症患者より手術時に摘出した前立腺組織を細片して組織培養に用いた。

組織培養：Eagle 氏 MEM 培地に10%子ウシ血清、インシュリン 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、Pc 5 $\mu\text{g/ml}$ 、T-4- ^{14}C 1.0 μC (5 μg) (Tの最終濃度 $3.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) を基礎培地として、組織学的影響がもっとも強くみとめられた Rob 1.6 $\times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ 濃度を加え、95% $\text{O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ 気相下に 37°C、24時間培養した。対照群としては Rob を加えない基礎培地のみで培養をおこなった。

生化学検査：培養後組織片をさらにスライスにして、その 0.5 g を組織の10倍量の 0.25M ショ糖を加えてホモジェネートとし、3,000 rpm で10分間遠沈し、その上清を上澄画分 (supernatant) とし、ジクロールメタンで抽出した。沈渣についてはさらに組織の15倍量の 2.4 M ショ糖を加えて懸濁し、48,000 $\times g$ で1時間高速遠沈した。その沈渣にさらに組織の10倍量の 0.25 M ショ糖を加えて、3,000 rpm で10分間遠沈し、これを核画分 (pellet) とした。核画分にふたたび 0.25 M ショ糖を加え懸濁した後、ジクロールメタンで抽出した。

培養メジウム、上澄画分ならびに核画分のジクロールメタン抽出物について、それぞれ放射能を測定後、薄層クロマトグラフィーで展開し、薄層ラジオスキャナーで放射能の分布を調べ、同時に展開した標品の位置からそれに相当する放射能のゾーンを分別して抽出した。抽出物の一部は定量的に液体シンチレーションスペクトロメーターで放射能を測定し、一部は再薄層

クロマトグラフィーで、さらに残りは非放射性標品を加えて再結晶法により同定した。

実験成績

1. 放射能のとり込み (Table 1)

培養液ならびに細胞成分についてそれぞれ放射能カウントを測定した所、Table 1 に示すようにメジウム中では対照群 75.4%、Rob 群 85.3% で、T 代謝の割合が Rob 群にやや低かった。細胞分画をおこなうと上澄画分では対照群 24.1%、Rob 群 14.5%、核画分でも対照群に放射能のとり込みが多かった。すなわち Rob 投与は T 代謝を多少抑制すると考えられる。

Table 1. 培養液および細胞分画中の放射能 (cpm)

	対 照	Robaveron
メジウム	546,500 (75.4)	759,125 (85.3)
上澄画分	174,500 (24.1)	128,650 (14.5)
核画分	3,529 (0.48)	2,735 (0.30)

() 内は全体を 100 としたときの%

2. 代謝産物の割合 (Table 2)

(1) メジウム：各標識物質を分離同定してみると、メジウム中の代謝を受けなかった T は、対照群 13.5% に対して Rob 群 18.4% と高く、代謝の割合から Rob 群が低いようである。しかし代謝産物からみると、Rob 群、対照群ともにその大半がダイハイドロテストステロン (以下 DHT と略) であったが、両群の間にはとくに有意の差はみられなかった。これについてアンドロスタンダイオール (以下 A-diol と略) が多くみとめられたが、対照群、Rob 群に差はみとめられなかった。またアンドロステンダイオン (以下 4^4 -A-dione) はきわめて少量であった。

(2) 上澄画分：T 代謝はよく進行し、対照群、Rob 群ともに 6.2~5.9% の T がみとめられたのみで、両者の間にとくに差はなかった。また代謝産物からも、両

Table 2. 代謝産物の割合 (%)

	メジウム		上澄画分		核画分	
	対 照	Robaveron	対 照	Robaveron	対 照	Robaveron
Origin	12.6	11.2	6.4	5.8	1.1	1.9
A-diol	16.3 (18.8)	15.6 (19.1)	22.7 (24.2)	23.2 (24.7)	18.9 (19.6)	15.6 (16.6)
T	13.5	18.4	6.2	5.9	2.6	4.0
DHT	50.7 (58.6)	49.4 (60.5)	59.3 (63.2)	59.7 (63.4)	40.6 (42.2)	36.8 (39.1)
4^4 -A-dione	1.6 (1.8)	0.8 (1.0)	0.4 (0.4)	0.4 (0.4)	1.5 (2.0)	2.3 (2.4)
A-dione	5.3 (6.1)	4.6 (5.6)	5.0 (5.3)	5.0 (5.3)	7.2 (7.5)	7.5 (7.9)

() 内は生成物全体を 100 としたときの%

者にほとんど差はなく、DHT が63%以上でもっとも多く、ついで A-diol 24%であった。これに対し Δ^4 -A-dione は0.4%以下であった。

(3) 核画分：Tのとり込みは少なく、対照群0.48%、Rob 群0.30%に過ぎなかったが、とり込まれたTはよく代謝され、対照群2.6%、Rob 群4.0%のTが残存したのみで、やや Rob 群にT代謝が低かった。しかし代謝産物からみると、DHT、A-diol とともに上澄画分に比べて少なく、DHT は Rob 群39.1%、対照群42.2%、A-diol は Rob 群16.6%、対照群19.6%とわずかながら差がみられた。また核画分では non-polar 部分が多く、代謝の複雑さがうかがわれる成績であった。

3. 5 α -還元体と17-ケトン体の比較 (Table 3)

T代謝における酵素の役割を検討するために、代謝産物について DHT、A-diol などの 5 α -還元体と、 Δ^4 -A-dione、アンドロステンダイオール (以下 A-dione と略) など17位の水酸基が酸化された 17-ケトン体に分けて比較した。その結果は Table 3 に示すように、5 α -還元体はメジウム、上澄画分では Rob 群に高値を示した。しかし核画分では対照群66.7%であるのに対し、Rob 群では59.9%と逆に低かった。また17-ケトン体の生成はいずれの検体においても Rob 群に生成が多くみとめられた。

Table 3. 5 α -還元体と17-ケトン体の比較 (%)

	メジウム		上澄画分		核画分	
	対照	Rob.	対照	Rob.	対照	Rob.
5 α -還元体	72.3	83.5	87.0	92.7	66.7	59.9
17-ケトン体	6.9	7.9	5.4	5.7	8.7	9.8

考 察

男性ホルモンの標的臓器である前立腺でのT代謝について近年多くの報告がみられ、前立腺での男性ホルモン作用はTそのものでなく、細胞内にとりこまれたTがまずDHTに還元され、このDHTが細胞質レセプターと結合して核にはいり、核内アクセプターと結合して遺伝子を活性化してDNA、RNAおよび蛋白合成を促進させることによって、その生理作用をあらわすことが明らかにされてきている^{1,2,12,15)}。そしてTの還元物質であるこのDHTと前立腺肥大症との関係についても、最近相次いで報告がみられ、ヒト前立腺組織においてもラット、イヌなどの動物と同じく、Tの代謝産物としてはDHTがもっとも多く、とくに肥

大症組織では正常組織に比べて3~5倍も高いとされ^{5,14)}、さらに Gloyna ら⁶⁾は去勢イヌに、McGuire ら⁹⁾はラットにDHTを投与して組織学的に前立腺の肥大をみとめたと報告しているように、DHTの前立腺局所への集積が肥大症の発生に関与しているとするものも多い^{5,14)}。このTからDHTへの変換は細胞内のミクロゾームおよび可溶性画分に存在する5 α -reductaseにより還元されてDHTとなり、さらにレセプター蛋白と特異的に結合して核内にとり込まれるとされている^{2,4,8)}。したがってDHTをはじめ各種T代謝産物の生成状況から、各種薬剤がT代謝に与える影響を検討することはきわめて有意義と思われる。そこでわたくしたちは *in vivo* の影響を受けない組織培養法を用いて前立腺肥大症組織におけるT代謝を測定した。その結果はすでに述べたように、標識Tの放射能カウントはメジウム中では Rob 群に多く残存し、さらに細胞画分によっても上澄画分ならびに核画分において放射能カウントのとり込みが高くみとめられたことから、T代謝は Rob により抑制されたと推定した。また代謝のパターンでは、代謝を受けなかった標識Tはメジウム、核画分に多くみとめられた。代謝産物としては、Lasnitzski⁷⁾、McMahon ら⁹⁾が報告しているようにDHTのほかA-diol、A-dione、 Δ^4 -A-dioneなどを同定したが、このなかでもDHTがもっとも多く、どの分画でも代謝産物中の大部分を占めた。ついでA-diolが多くみとめられた。しかし Rob 群と対照群との間にはほとんど差がみられなかったが、わずかに核画分中のDHTがRob群に低値であった。すなわち Rob 群においてT代謝の進行が遅く、核画分ではDHT、A-diolなどの5 α -還元体の生成が低かった。

Robの作用機序について、江田ら³⁾は前立腺組織呼吸、酵素活性の面から検討し、Robそのものに男性ホルモン様あるいは男性ホルモン分泌を促進させる物質は含まれていないと報告しているが、T代謝について検討した報告はみられない。また志田ら¹³⁾は同じ前立腺肥大症治療薬であるアミノ酸製剤をラットに投与したところ、組織内の5 α -reductase活性は増加したことから、アミノ酸製剤は前立腺機能を軽度ながら促進させる効果があると報告している。わたくしたちの成績においても、T代謝産物からみると、上澄画分では Rob 群にDHTなどの5 α -還元体の生成が多かったのに対し、核画分では逆に低値を示した。これはT代謝の細胞内調整者である5 α -reductaseがRobにより刺激されたためと思われるが、逆に核内にとり込まれるためのレセプター蛋白との結合は抑制されたとも

推測される。このような成績は前立腺腫瘍の治療に用いられている女性ホルモン剤による 5α -還元体生成の阻害、あるいはプロゲステロン剤のレセプターとの結合阻害による男性ホルモン作用の抑制に類似しており、Rob もまた抗男性ホルモン作用を有する物質を含むか、あるいは Rob 自体が抗男性ホルモン作用を有して、それが T 代謝とくに DHT の核内へのとり込みを抑制したとも考えられる。

前立腺肥大症の治療には、前立腺組織のホルモン依存性からまずホルモン剤が登場したが、前立腺肥大症の原因が解明されぬままにホルモン剤治療がゆきづまり、最近ではホルモン剤以外の各種の薬剤が使用されてきている。ブタ前立腺抽出物である Rob の男性ホルモン作用は否定されるが、わたくしたちの実験成績からは抗男性ホルモン作用の存在が推定され、さきに報告したように、組織学的にみとめられた前立腺構造への影響は、Rob により DHT の核内へのとり込みが抑制され、核内での DNA, RNA 合成が阻害されて蛋白合成能が低下し、組織学的にも早期に腺構造の崩壊をきたしたことを裏づけるものであり、本剤が前立腺肥大症の治療にかなり期待できると考えられる。

結 語

前立腺に対する Rob の影響を検討するため、手術的に摘出したヒト前立腺肥大症組織を Eagle 氏 MEM 培地にて T-4- ^{14}C ともにインキュベートしたのち、組織片の細胞分画をおこない、各画分の T 代謝を比較した。

1) 代謝産物としては DHT, A-diol, A-dione, 4α -A-dione を同定したが、なかでも DHT がもっとも多かった。

2) Rob 群では T 代謝はやや抑制された。代謝産物からは上澄画分に 5α -還元体の生成が促進されたが、反対に核画分では低かった。

3) DHT の生成からみて、Rob は細胞質内の 5α -reductase 活性を刺激するが、レセプター蛋白と DHT の結合は抑制されたと考えられ、Rob には一種の抗男性ホルモン作用が存在すると推定される。

文 献

- 1) Baulieu, E. E.: Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol., **15**: 723, 1970.
- 2) Bruchovsky, N. and Wilson, J. D.: J. Biol. Chem., **243**: 5953, 1968.
- 3) 江田昭英・ほか：日薬理誌, **70**: 47, 1974.
- 4) Fang, S. and Liao, S.: J. Biol. Chem., **246**: 16, 1971.
- 5) Farnsworth, W. E.: Invest. Urol., **6**: 423, 1969.
- 6) Gloyna, R. E. et al.: J. Clin. Invest., **49**: 1746, 1970.
- 7) Lasnitzski, I.: J. Endocrinol., **51**: VII, 1971.
- 8) Mainwaring, W. I. P.: ibid, **45**: 531, 1969.
- 9) McGuire, J. L. et al.: Invest. Urol., **11**: 101, 1973.
- 10) McMahon, M. J. and Thomas, G. H.: Brit. J. Surg., **58**: 869, 1971.
- 11) Morfin, R. F. et al.: Endocrinology, **87**: 394, 1970.
- 12) Shimazaki, J. et al.: Endocrinol. Jap., **16**: 453, 1969.
- 13) 志田圭三・ほか：日不妊会誌, **18**: 84, 1973.
- 14) Siiteri, P. K. and Wilson, J. D.: J. Clin. Invest., **49**: 1737, 1970.
- 15) Wilson, J. D. and Gloyna, R. E.: Res. Prog. Hormone Res., **26**: 309, 1970.

(1974年12月26日受付)