

ヒト前立腺アンドロゲン・レセプター精製に関する研究

第1編：affinity chromatography を使用した精製法

広島大学医学部泌尿器科学教室（主任：仁平寛巳教授）

中 原 満

PURIFICATION OF HUMAN PROSTATE ANDROGEN RECEPTOR

I. PURIFICATION OF ANDROGEN RECEPTOR BY
AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Mitsuru NAKAHARA

*From the Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine**(Director: Prof. H. Nihira)*

The androgen receptor (AR) was purified to establish a new method for measuring AR after producing the antibody for the purified AR. AR was purified from 1,700 g of benign prostatic hypertrophic tissue by combining affinity chromatography of heparin Sepharose CL-6B and of 17α -carboxy-hexamethyl-17-hydroxy-4-androstane-3-one Sepharose 4 B. The final purification fraction had the high affinity, low capacity binding to ^3H -R 1881 in the presence of 1,000-fold molar excess of triamcinolone acetonide with a dissociation constant of 2.3 nM, showing the binding specificity of AR. Polyacrylamide gel electrophoresis did not reveal any albumin or TeBG mixed in the final purification fraction. These results showed that AR was partially purified, even though the degree of purification was low, around 38 fold calculated by the binding capacity per mg protein.

Key words: Prostate, Androgen receptor, Purification

結 言

前立腺癌はアンドロゲン依存性腫瘍であり、Huggins らの研究により抗男性ホルモン療法が提唱された^{1,2)}。前立腺癌は診断時にすでに遠隔転移を有する進行例が大半を占め、しかも高齢者に多いことより、その初期治療は内分泌療法である抗男性ホルモン療法が主体をなしている。内分泌療法は症例の70—80%に効果がみられることが報告^{3,4)}されているが、治療の初めから抵抗性を示す症例が存在すること、初期治療は有効でも間もなく治療効果が消失して早期より再燃する場合があること、さらに合成エストロゲン剤の副作用として心血管系障害が高率に起きることなどの問題点がある⁵⁾。そこで内分泌療法に対する反応性を予測する指標があれば、治療の選択に有用と考えら

れる。同様にホルモン依存性腫瘍である乳癌においてエストロゲン・レセプター (ER) の多寡が内分泌療法に対する反応性、および治療後の指標として有用^{6,7)}であることから、前立腺癌においてもアンドロゲン・レセプター (AR) の存在の有無が治療予後を予測する指標として期待がもたれた。しかし AR の有無は治療予後と関連するという報告^{8—10)}がある一方で、両者は関連しないとする報告^{11,12)}もみられ、この問題に関してはいまだ十分な評価は得られていない。この原因として前立腺癌では AR 測定に必要な充分量の組織が得難いこととともに、従来から行なわれている測定法が繁雑で技術を要することなど、現在の測定法にも関係していると考えられる。

そこで著者は AR を精製し、この生化学的特性を検討するとともに、AR に対する抗体を作製して新し

い測定法の確立を目的とした。今回はヒト前立腺肥大症の腺腫組織より affinity chromatography などを用いて AR の精製を試みたので、その成績を報告する。

材料ならびに実験方法

1. 試薬

^3H -methyltrienolone (^3H -R1881), および非標識 R1881 は New England Nuclear より購入した。Trizma-base, 5α -dihydrotestosterone (DHT), triamcinolone acetone (TA), bovine serum albumin (BSA) は Sigma 社製を用いた。heparin Sepharose CL-6B, Sepharose 4B, Sephabex G-50 medium, dextran T-70 は Pharmacia 社製を使用した。charcoal は Merk 社製を使用した。他は片山化学社製特級試薬を使用した。

2. 材料

62歳から83歳までの前立腺肥大症患者63人に対して被膜下前立腺摘除術を行ない、得られた腺腫をすみやかに液体窒素で凍結し、 -80°C で保存して合計 2,100 g を実験に使用した。

3. 実験方法

a. 細胞質分画 (cytosol) の作製

凍結保存した前立腺の腺腫組織を cytosol 作製の2週間前より少量ずつ液体窒素の存在下に粉碎し、再度 -80°C で保存した。こうして約 1,700 g の粉末状組織を得た。これに3倍量の TEM buffer (Tris-HCl 10mM, EDTA- Na_2 1 mM, 2-Mercaptoethanol 1 mM, pH 7.4, 4°C) を加え、glass homogenizer で homogenize した。homogenize は15秒間作動、45秒間水冷を3回繰り返す、ついで冷却超遠沈機 (L₈-55, angle rotor 50 Ti Beckman 社) を用い、 4°C , 105,000 G, 60分間超遠沈、最上層の脂肪層を除いた上清を cytosol とした。

b. AR の精製 (Fig. 1)

Puca ら¹³⁾ の ER の精製法に準じて、上記の cytosol より AR の精製を試みた。すなわち heparin Sepharose CL-6B affinity chromatography (以下 heparin Sepharose) と 17α -carboxy-hexamethyl-17-hydroxy-4-androstane-3-one Sepharose 4B (以下 T-Sepharose) の2つの affinity chromatography を用いた。以下に各精製段階について詳述する。なおこれらの精製操作はすべて 4°C 以下で実施した。

1) 1st-heparin Sepharose

TEM buffer で平衡化した heparin Sepharose 200 ml を cytosol と batchwise に60分間反応させた

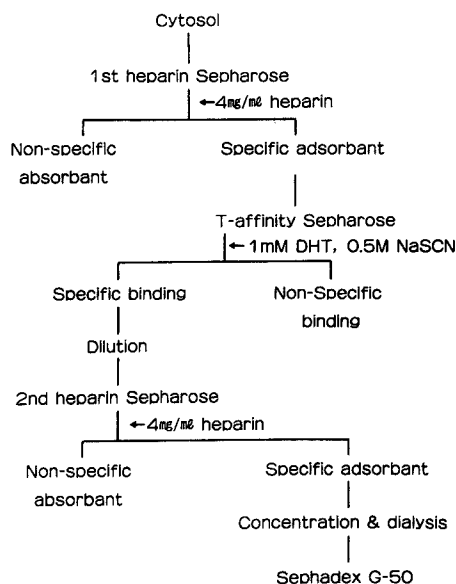


Fig. 1. Purification procedure of androgen receptor from human benign hyper-trophic prostate.

後に Buchner funnel (coarse) に移し、光電比色計 (島津製作所 UV-200) でモニターし、O.D. 280 が 0.03 まで TEM buffer で洗浄して非特異的吸着分画を除去した。ついで gel を column (3×45 cm) に移し、4 mg/ml heparin を含む TEM buffer で特異的吸着分画を溶出した。

2) T-Sepharose

Heparin Sepharose より得られた特異的吸着分画を T-Sepharose gel 100 ml と 24 時間 batchwise に反応後、0.5M KCl を含む TEM buffer 2,000 ml で洗浄して非特異的吸着分画を溶出した。ついで 1 mM DHT および 0.5M NaSCN を含む TEM buffer 400 ml 中に gel を移し、batchwise に 24 時間反応後 Buchner funnel でろ過して特異的結合分画をえた。

3) 2nd-heparin Sepharose

T-Sepharose の特異的結合分画 450 ml を 6 倍量の TEM buffer で希釈し、NaSCN 濃度を 0.1 M 以下として heparin Sepharose gel 100 ml と columnwise に反応させた。TEM buffer で O.D. 280 が 0 になるまで洗浄後、特異的吸着分画は 4 mg/ml heparin 加 TEM buffer 400 ml で溶出した。

4) 濃縮および透析

2nd-heparin Sepharose より得られた特異的吸着分画を Amicon hollow fiber concentrator, および Amicon diaflow PM10 (Amicon 社) で 10 ml まで濃縮し、TEM buffer で透析した。

5) Sephadex G-50 column chromatography

上述の操作で得られた検体を 0.01% heparin 加 TEM buffer で平衡化した Sephadex G-50 column chromatography (2.6 × 90 cm) に移し、0.01% heparin 加 TEM buffer で溶出して最終精製分画を得た。

3. 精製 AR の定性

精製 AR の定性は ^3H -R1881 との結合能、および polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) で検討した。

a. ^3H -R1881 との結合能の検討

1) Competitive inhibition

最終精製分画の 200 μl と ^3H -R1881 5 nM とを 0°C, 20 時間反応させた。 ^3H -R1881 5 nM と TA 5 μM に、それぞれ R1881 の 250 nM, 500 nM, 2.5 μM , 5 μM を加えた場合も同様に反応させた。これらに DCC buffer (0.05% Dextran T-70, 0.5% charcoal, TEM buffer) 1 ml を加え、0°C, 15 分間反応後、3,000 rpm, 15 分間遠沈して AR と結合しない遊離 ^3H -R1881 (Free) を、AR と結合した ^3H -R1881-AR 複合体 (Bound) より分離除去 (B/F 分離) した後、Brays scintillation fluid (dioxan 2,200 ml, ethyleneglycol 50 ml, methanol 250 ml, PPO 10 g, POPOP 0.5 g, ナフタリン 150 g) 5 ml を加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka 社) で放射活性を測定した。最終精製分画の ^3H -R1881 との結合能およびその結合に対する TA あるいは R1881 による結合抑制の程度を検討した。

2) Scatchard plot 解析

Cytosol, 1st-heparin Sepharose の特異的溶出分画、および最終精製分画の各精製段階で得られた検

体について検討した。1,000 倍量 TA 存在下に ^3H -R1881 (1 nM~10 nM) との結合能を 500 倍量非標識 R1881 を加えた場合と、加えない場合の 2 系列でそれぞれ 0°C, 20 時間反応させ、先と同様に B/F 分離の後、非標識 R1881 を加えない結合数から非標識 R1881 を加えた場合の結合数を差し引いたものを特異的結合とし、scatchard plot による解析¹⁴⁾で各精製段階における解離定数 (Kd)、および最大結合部位数 (Bmax) を求めた。

b. PAGE による検討

7.5% T, 5% C の polyacrylamide gel (5 × 60 mm) に cytosol 50 μl , 1st-heparin Sepharose 特異的溶出分画 100 μl , 最終精製分画 150 μl をそれぞれおせ、4°C, 2 mA/tube, 2 時間の条件で泳動した。蛋白染色は coomassie blue を用いた。

4. 蛋白量測定

Lowry 法¹⁵⁾で BSA を標準蛋白として測定した。

結 果

1. AR の精製

前立腺肥大症の腺腫組織 1,700 g より 4,500 ml の cytosol が得られた。これを heparin Sepharose と反応後 gel を O.D. 280 でモニターしながら洗浄すると、4,500 ml 洗浄で O.D. 280 が 0.03 となった。つぎに 4 mg/ml heparin を含む TEM buffer 800 ml で特異的吸着分画を溶出すると、高い O.D. 280 のピークが得られた (Fig. 2)。つぎの T-Sepharose の精製段階は、溶出物に大量の DHT を含んでいるため結合能は検査していない。2nd-heparin Sepharose での affinity chromatography の溶出相は 1st-heparin Sepharose と同様であったが、特異的溶出

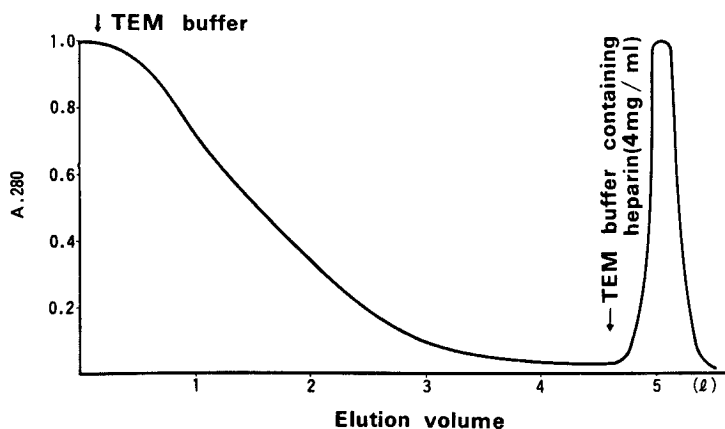


Fig. 2. Elution profile of 1st-heparin Sepharose CL-6B affinity chromatography

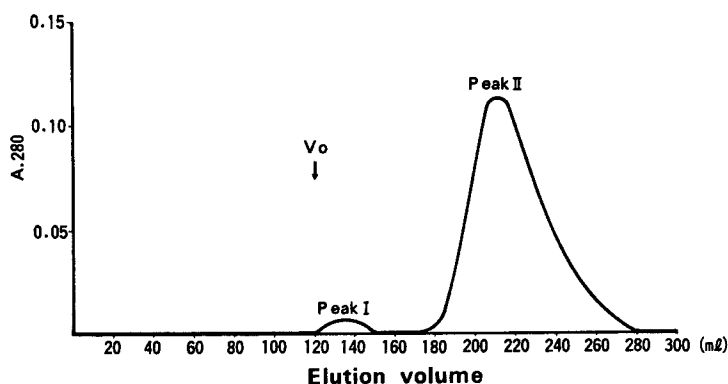


Fig. 3. Elution profile of Sephadex G-50 column chromatography

のピークは O.D. 280 で 0.02 と低かった。最終精製段階の Sephadex G-50 column chromatography の溶出相は void volume に一致する低いピーク（ピーク I）と、それに続く高いピーク（ピーク II）の 2 峰性となった。ピーク I に ^3H -R1881 との特異的結合が認められたが、ピーク II には特異的結合は認められなかった。このピーク I の 25 ml を最終精製分画とした (Fig. 3)。

2. 精製 AR の性質

a. Competitive inhibition

最終精製分画は 5 nM ^3H -R1881 との結合能を有し、この結合は 1,000 倍量の TA では抑制されなかったが、非標識 R1881 では添加量の増加とともに減少し、500 倍量の R1881 で完全に抑制された (Fig. 4)。

b. Scatchard plot 解析

Cytosol, 1st-heparin Sepharose 特異的吸着分画、最終精製分画の解離定数 (K_d) はそれぞれ、2.0 nM、

2.2 nM, 2.3 nM といずれも R1881 に対して高い親和性を示し、蛋白量あたりの結合部位数は cytosol 32.3 fmol/mg protein, 1st-heparin Sepharose 57.3 fmol/mg protein, 最終精製分画 1,263.9 fmol/mg protein であった (Fig. 5)。以上の精製の成績をまとめると、精製倍率は蛋白量あたりの結合能で計算すると 1st-heparin Sepharose で 1.7 倍、最終精製分画で約 38 倍となった (Table 1)。

c. PAGE による検討

今回の実験条件では gel 内に AR は泳動されず、contamination の存在の有無の検討に利用した。cytosol では多数の染色バンドが認められたが、1st-heparin Sepharose では albumin が軽度存在するのみで、最終精製分画には albumin や testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) などの混入は認めなかった (Fig. 6)。

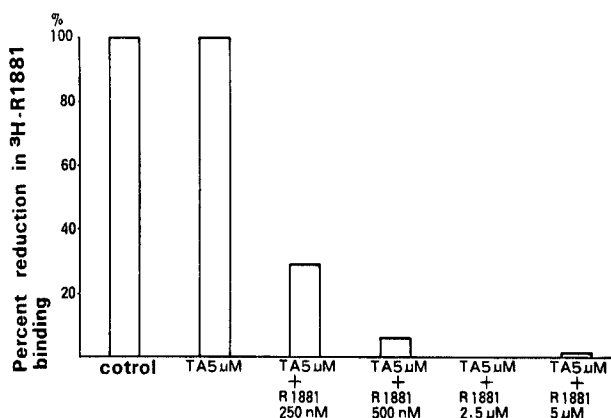


Fig. 4. Competitive inhibition of ^3H -R1881 binding to purified androgen receptor by R1881 in the presence of 1,000-fold molar excess of triamcinolone acetonide

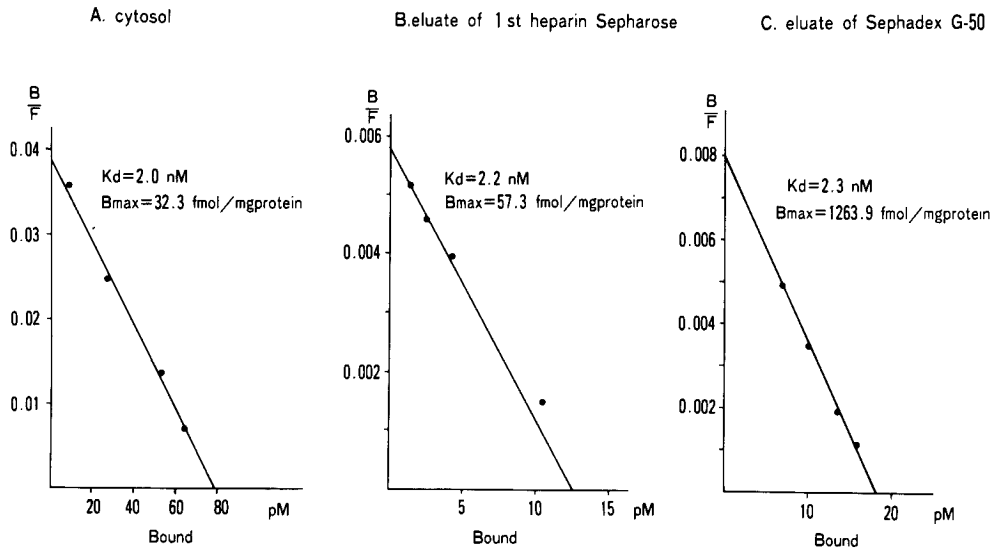


Fig. 5. Scatchard plot analysis of the specific binding of ^3H -R1881 to cytosol, eluate of 1st-heparin Sepharose, eluate of Sephadex G-50 in the presence of 1,000-fold molar excess of triamcinolone acetoneide

Table 1. Purification scheme of androgen receptor from human benign hypertrophic prostate.

Purification step	Volume (ml)	Protein (mg)	Specific binding (d. p. m. $\times 10^6$)	Specific activity (d. p. m. $\times 10^3$ /mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Cytosol	4,500	26,308	171.31	6.51	100	1
Ist heparin Sepharose	800	445	5.03	11.31	4.56	1.74
T-affinity	450	82	n. m. *	n. m.	n. m.	n. m.
IInd heparin Sepharose	400	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.
Sephadex G-50	25	0.9	0.23	250.10	0.13	38.42

n. m. *: not measurable

考 察

前立腺癌は除手術により萎縮するが、アンドロゲンの補充により再び増殖することから、アンドロゲン依存性臓器とされている¹⁶⁾。一方で標的臓器におけるステロイドホルモンの作用機構は、現在では細胞内に存在するレセプターを介して行なわれると考えられている。すなわち ^3H -estradiol をラットに投与すると、非標的臓器に比較して標的臓器である子宮などへの取り込み率が高く、長く貯留されることより組織内に estradiol に特異的なレセプターが存在することが推定された¹⁷⁾。そのレセプターは蔗糖密度勾配超遠心法により分離したラット子宮 cytosol 分画中に、沈降

係数 9.5 S の高分子蛋白として認められた¹⁸⁾。そしてエストロゲンは cytosol レセプターと結合した後に、核内へ移行することにより作用を発現すると考えられた¹⁹⁾。他のステロイド・レセプターについても、それぞれのステロイドと特異的に結合するレセプターが報告されてきた。

AR は 1960 年代末にラット前立腺 cytosol から相次いで分離^{20,21)}され、標的臓器におけるアンドロゲンの AR を介する作用機構は次のように考えられている²²⁾。testosterone (T) は血清中の蛋白と結合して運搬されるが、何らかの機構で遊離 T として細胞内に入り、(2) T は 5α 還元酵素によって 5α -dihydro-testosterone (DHT) に変換され、(3) DHT は

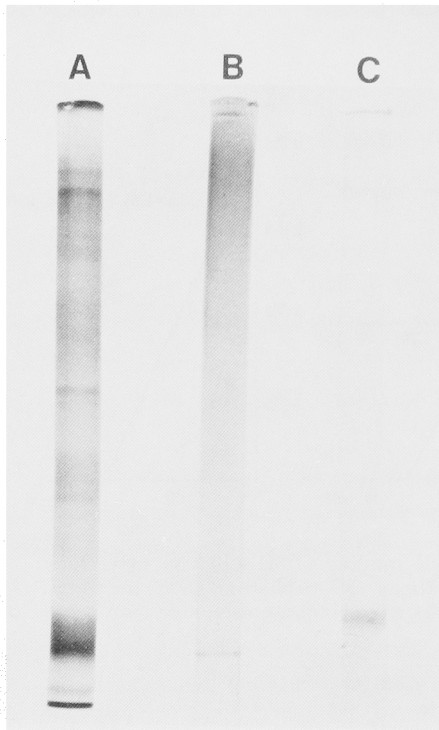


Fig. 6. Polycrylamide gel electrophoresis of cytosol (A), eluate of 1st-heparin Sepharose (B), eluate of Sephadex G-50 (C).

cytosol レセプターと結合して複合体を形成、(4)この複合体は核内へ移行し、(5)複合体とクロマチンとの結合の後に DNA を介してアンドロゲン作用を発現する。ヒト前立腺においても AR の存在が報告されて以来²³⁾、AR の定性、定量に関して多くの研究がなされ、臨床的には AR は内分泌療法に対する前立腺癌症例の反応性の有無を判定する指標として注目された²⁴⁾。すなわち AR の作用機構からアンドロゲン依存性腫瘍は AR を有し、非依存性腫瘍は AR を必要とせず、AR の有無はアンドロゲン依存性の指標の一つと考えられる。また同様にホルモン依存性腫瘍である乳癌では ER の多寡が内分泌療法の指標として有用であることから、前立腺癌においても AR の測定が試みられ、臨床成績との関係が報告されてきた^{8~12, 25~27)}。

しかし、ヒト前立腺 AR 測定には種々の問題点が存在した。アンドロゲンとレセプターとの特異的結合能を利用したレセプター測定法において、使用する ligand はレセプターと特異的高親和性に結合し、かつ安定でなければならない²⁸⁾。Ligand として DHT

を使用すると、DHT が AR 以外に血液中の TeBG とも親和性を有するため、AR のみならず cytosol に混入した TeBG をも同時に測定してしまう結果となる²⁹⁾。また DHT は cytosol 内 3 α -ケト環元酵素により androstenediol に転換されることが知られ、反応中に DHT が代謝されて真の値を示さないという問題があった²⁴⁾。しかしこれらの問題点は合成ステロイドである R1881 の出現により解決された^{29, 30)}。すなわち R1881 は DHT とは同程度の AR 結合親和性を有するが TeBG とは結合せず、また代謝も受けない。さらにプロゲステロン・レセプター (PgR) との高親和性を有する欠点も、測定系に TA を同時に加えることにより阻害されることが判明した^{31, 32)}。

つぎに AR が非常に不安定で、容易に失活することが問題である。ヒト前立腺 AR の大部分が内因性 DHT と結合した状態で存在するため、測定にはこの内因性 DHT と標識ステロイドとの交換による exchange assay が必要となる^{33, 34)}。そのために低温度下に長時間の反応が不可欠で、バッファー組成、検体中の蛋白濃度、反応時間、B/F 分離法、組織の保存法など種々の条件の違いが測定値に影響することが知られ、本測定法の再現性に問題がある^{35~37)}。さらにいまだ統一された測定法がなく、したがって施設により成績が異なる結果となっている³⁸⁾。

また前立腺癌症例では乳癌と異なってレセプター測定に必要な十分量の組織が得にくいことも大きな問題である。最も安定したレセプター測定法である飽和分析法を厳密に行なうと最低限 1 g の組織が必要である³⁹⁾。これに対して前立腺癌針生検法では、最大限 0.2 g の組織が採取できるだけである。電気メスを使用した経尿道的な前立腺切除術は、採取された組織が熱変性のためレセプター量が減少するので測定には不適である⁴⁰⁾。そこで経尿道的に採取するには cold punch 法が必要になるが、この方法では尿道周囲前立腺組織が主として採取されるため、尿道周囲にまで浸潤した腫瘍でないと腫瘍組織が採取できない欠点が残る。そこで少量の組織を使用した測定法として microassay 法⁴²⁾などが工夫されてきたが、組織量が少ないと再現性に問題が残る⁴¹⁾。

つぎに前立腺癌では組織構築が多様性を示すことが多いので、一定量の組織を homogenize して測定した AR 量は種々の組織中の AR 量の平均値となる。すなわちアンドロゲン依存性細胞や非依存性細胞、良性前立腺細胞や間質などが混在した組織の一部を採取して測定した AR 値から、内分泌療法に対する反応性を予測するのは不正確になる^{39, 39, 42)}。最近では蛍光

法を使用した免疫組織学的な AR 測定が報告^{43,44)}され、この方法は測定が簡便で細胞構築を同時に検討できる点で興味深い、反応の特異性に問題がある^{45,46)}。そこで AR そのものに対する抗体が得られれば免疫組織学的方法によるレセプターの研究、ラジオイムノアッセイ法によるレセプター測定の見簡易化などの可能性が考えられ、臨床的には有用である^{38,47)}。

従来ステロイド・レセプターの精製は、(1) レセプターが非常に不安定で容易に失活すること、(2) レセプター量が非常に少ないこと、(3) レセプター以外に同じステロイドに結合する蛋白が同じ組織内に大量に存在することなどの点で非常に困難なものとされてきた⁴⁸⁾。さらに AR を高濃度に含有しており、かつ大量に採取できる適当な組織がないことも障害となってきた⁴⁹⁾。しかし他のステロイド・レセプターにおいては、ステロイドを ligand とする affinity chromatography を使用した精製の報告がなされている^{13,50,51)}。特に ER の場合は充分量の組織からの精製の報告¹³⁾に加えて、精製レセプターに対する抗体の作製⁵²⁾、さらにモノクローナル抗体の作製⁵³⁾、それを利用して組織化学的なレセプターの検索⁵⁴⁾、ラジオイムノアッセイ法による測定⁵⁵⁾の報告などがなされている。

AR の精製の報告は DNA cellulose と等電点電気泳動とを組み合わせた方法^{48,56)}、gel chromatography と DNA cellulose を組み合わせた方法⁵⁷⁾、hydrophobic interaction chromatography を使用した方法⁵⁸⁾、heparin Sepharose を使用した方法⁵⁹⁾、heparin Sepharose と等電点電気泳動を組み合わせた方法⁶⁰⁾、硫酸分画、ADP Sepharose、gel chromatography などを使用した方法⁴⁹⁾などがみられる。しかしこれらの報告はいずれも少量の組織を用いた動物実験で、充分量の AR を精製した報告はみられない。

従来の方法による AR の精製にはレセプターの結合特異性と精製率に限界があって、効率よく充分量のレセプターを精製するには、ER と同様に AR においてもステロイドを ligand とする affinity chromatography が重要と考えられる⁶¹⁾。そこで著者は Puca ら¹³⁾の牛幼若子宮よりの ER の精製の方法に準じて、affinity chromatography による AR の精製を行なった。AR 40 μ g を精製するには 1 kg のラット前立腺組織が必要とする報告⁴⁸⁾、100 μ g の AR を得るのにヒト前立腺肥大症組織で 560 g が必要とする報告⁶²⁾などのごとく、レセプター精製の材料となる生体組織はかなり大量が必要である。そこで著者は

抗体作製に必要な量の約 3 倍量の 1,700 g の前立腺組織から AR の精製を始めた。

精製の第 1 段階の heparin Sepharose は、heparin がステロイド・レセプターと特異的に吸着することを利用したものである。この操作はレセプターの精製に有用であるばかりでなく、レセプターを失活させることなく凝集阻止効果があること、albumin や蛋白分解酵素を除去することができるなどの利点を ER の精製において認めた⁶³⁾。この操作が AR の精製にも有効とする報告もあって、レセプターの凝集を阻止して 20—34 倍の精製倍率が得られており、回収率も 55—75 % と高い^{59,60)}。しかし今回の成績では精製倍率は 1.7 倍と低く、回収率も 5 % と低いものであった。この成績はヒト子宮筋層からの ER の精製において、heparin Sepharose からの特異的溶出を heparin 自身で行なった場合のレセプターの回収率が 7 % にすぎなかったとする報告に一致した⁶⁴⁾。この理由として、1—10 mg/ml の heparin はエストロゲンと ER の結合能を減少させるとしている。今回の実験においても結合親和性には影響しなかったが、結合容量減少の可能性があって今後の検討を必要とした。また cytosol 作製から heparin Sepharose chromatography 終了までに長時間を要し、その間にレセプターの失活が起ったことも精製効率が悪い大きな要因と考えられた。

精製の第 2 段階はアンドロゲンを ligand とする affinity chromatography である。AR は DHT と高結合親和性を有するので、これを ligand とする 17 α -carboxymethyl-17-hydroxy-5 α -androstane-3-one Sepharose 4B を試みたが、ligand が不安定なために十分な成績が得られなかった。一方 17 α -carboxy-hexamethyl-17-hydroxy-4-androstane-3-one Sepharose 4B は、³H-R1881 で標識した AR と結合することが確認できたので精製の第 2 段階に使用した。この gel は血清中の TeBG の精製に成功している 17-carboxy-ethynyl-17-hydroxy-4-androstane-3-one Sepharose 4B に、スペーサーとして hexamethyl 基をつけたものである⁶⁵⁾。AR は低温では解離速度が遅く、高温では逆に解離速度が速くなるものの失活しやすいという性質を有している。そこで低温度下に affinity gel に結合したレセプターをすみやかに解離させる目的で、大量の DHT と同時に NaSCN を使用した。この NaSCN はレセプターを失活させることなく解離速度を促進させることが、ER の測定において認められている⁶⁶⁾。

一般にホルモン・レセプターの基準として、(1) 結合特異性 specificity, (2) 高親和性 high affinity, (3) 一

定の結合部位数 low capacity, (4) 標的細胞局在 target cell localization などの条件が設けられている⁶⁷⁾。今回の成績はアンドロゲンの標的臓器であるヒト前立腺肥大症の腺腫組織を材料とし、最終精製分画は AR とは特異的に結合するが血清中の TeBG とは結合しない R1881 に対して、 $K_d = 2.3 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 1264 \text{ fmol/mgprotein}$ と高結合親和性と一定結合部位数の結合能を有し、さらにその結合は TA を 1,000 倍量加えても抑制されないことよりプロゲステロン結合蛋白による結合でなく、AR による結合であることが証明された。また PAGE での検討では、albumin や TeBG の混入を認めなかった。以上の結果は上記のホルモン・レセプターの基準を満たしており、ヒト前立腺の腺腫組織から albumin や TeBG の混入がない AR を部分的に精製したことを示すものである。

今回の AR 精製倍率は蛋白量あたりの $^3\text{H-R1881}$ との結合能でみると約 38 倍で、Puca ら¹³⁾の成績に比して低いものである。これは上述の精製過程の諸条件が異なるとともに、以下の点にも関係があるものと考えられる。まず精製材料であるが、牛幼若子宮はほとんど内因性のエストロゲンを含まず、レセプターがエストロゲンと結合しない状態で存在している。これに対してヒト前立腺肥大症の腺腫組織では AR の大部分が DHT と結合した状態で存在するため、affinity chromatography による分離操作において不利であることが考えられる。つぎに Puca ら¹³⁾は精製レセプター量の定量的算定を、精製の第 2 段階の estradiol を ligand とする affinity chromatography の溶出に使用した $^3\text{H-setradiol}$ の回収量により行なっているのに対して、著者の実験では精製 AR 量をレセプター測定法による結合能で求めている点異なる。また著者の実験で得られた最終精製分画の蛋白濃度は、 0.04 mg/ml ときわめて低い。一般に DCC 法でレセプター測定を行なう場合に、 0.4 mg/ml の蛋白量では 1 mg/ml 以上の蛋白量の場合と比較して半分以下の結合能になることが報告³⁰⁾されており、この点からも著者の実験の最終精製分画の結合能が低くなった可能性がある。さらに目的とする精製レセプターそのものの性質の違いもあろう。AR は最も不安定なレセプターで、affinity chromatography による分離が困難とする報告もある⁶⁰⁾。しかし最近の発表では子牛精のう腺やラット前立腺から T を ligand とする affinity chromatography で AR の精製が報じられているので affinity chromatography は AR 精製においても有用な手段と考えられる^{68,69)}。また molybdate や

蛋白分解酵素阻害剤がレセプターの安定性に有効とする報告もみられ、精製への応用も考えられる^{37,51,70)}。

今回の成績の問題点をまとめると、

(1) AR が非常に微量で、かつ不安定であることが精製を困難にしている。そこでこれを解決するには特異的で、しかも効率的な精製法が望まれる。さらにレセプターそのものの安定化への必要性が考えられた。

(2) Heparin Sepharose はヒト前立腺の AR 精製にも有効と考えられるが、今回の成績は動物実験の成績と比較して悪く、特に AR の結合能に対する heparin の影響の有無は検討を要する。

(3) T-affinity Sepharose に結合した AR の解離促進に MaSCN を用いたが、ヒト前立腺 AR の結合能に対する NaSCN の影響の有無に関する報告はないので、これについて検討の余地がある。

(4) 精製レセプターの定性、定量法についても検討の余地がある。

今回の実験においてはヒト前立腺肥大症の腺腫の材料として AR の精製に成功したが、精製効率が期待したほど高くなかった。この理由を検討して精製過程における問題点を明らかにしたので、これらの改善によって十分量の AR の精製が期待される。

結 語

前立腺肥大症の腺腫組織 1,700 g より affinity chromatography を用いてアンドロゲン・レセプター (AR) の精製を試み、以下のごとき結果を得た。

1. 最終精製分画は $^3\text{H-R1881}$ と結合能を有し、その結合は 1,000 倍量の triamcinolone acetonide (TA) でも抑制されなかった。

2. Scatchard 法による検討では最終精製分画の解離定数は 2.3 nM と高親和性の結合能を有し AR の結合特異性を残していた。

3. 精製倍率は蛋白量あたりの結合能で計算すると約 38 倍であった。

4. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) による検討では albumin や testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) の混入は認められなかった。

本論文の要旨は、第 55 回日本内分泌学会総会 (東京) において発表した。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜った恩師仁平寛已教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御指導を頂いた宮地幸隆博士、碓井亜博士、貴重なる症例を提供して頂いた関連病院諸先生方に心より感謝致します。

文 献

- 1) Huggins C and Hodges CV: Studies on prostatic cancer. I. The effect on castration, of estrogen, and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1: 293~297, 1941
- 2) Huggins C, Stevens RE Jr and Hodges CV: Studies on prostatic cancer. II. The effect of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg* 43: 209~223, 1941
- 3) Gaeta JF, Asirwatham JE, Miller G and Murphy GP: Histological grading of primary prostatic cancer: A new approach to an old problem. *J Urol* 123: 689~693, 1980
- 4) Resnick MI and Grayhack JT: Treatment of stage IV carcinoma of the prostate. *Urol Clin North Am* 2: 141~161, 1975
- 5) The Veterans Administration Co-operative Urological Research Group: Treatment and survival of patients with cancer of the prostate. *Surg Gyneco Obstet* 124: 1011~1017, 1967
- 6) McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH and Segaloff A: Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 39: 2934~2947, 1977
- 7) Jensen EV: Hormone dependency of breast cancer. *Cancer* 47: 2319~2326, 1981
- 8) Ekman P, Snochowski M, Zetterberg A, Hogberg B and Gustafsson JP: Steroid receptor content in human prostatic carcinoma and response to endocrine therapy. *Cancer* 44: 1173~1181, 1979
- 9) Mobbs BG, Johnson IE, Connolly JG and Clark AF: Androgen receptor assay in human being and malignant prostatic tumor cytosol using protamine sulphate precipitation. *J Steroid Biochem* 9: 289~301, 1978
- 10) 北野大路：前立腺細胞内アンドロゲン・レセプターについて。第2編 前立腺細胞内アンドロゲン・レセプターと抗男性ホルモン療法の治療効果および治療の及ぼす影響について。日泌尿会誌 75: 1098~1108, 1984
- 11) Wagner RK and Schulze KH: Clinical relevance of androgen responses of androgen receptor content in human prostate carcinoma. *Acta Endocrinol* 87: 139~140, 1978
- 12) De Voogt HJ and Dingjam P: Steroid receptors in human prostate cancer. *Urol Res* 6: 151~158, 1978
- 13) Puca GA, Sica V, Nola E and Bresciani F: Purification and properties of native oestradiol receptor. *J Steroid Biochem* 11: 301~306, 1979
- 14) Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 51: 660~672, 1949
- 15) Lowry OH, Rosebrough NJ, Far AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
- 16) Bruchovski N, Lesser B, Van Doorm E and Craven S: Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. *Vitam Horm* 33: 61~102, 1975
- 17) Jensen EV and Jacobson HI: Basic guide to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18: 387~414, 1962
- 18) Toft D and Gorski J: A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Biochemistry* 55: 1574~1581, 1966
- 19) Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stampf WE, Jungblut P and DeSombre ER: A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 59: 632~638, 1968
- 20) 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
- 21) Mainwaring WIP: A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. *J Endocrinol* 45: 531~541, 1969
- 22) Mainwaring WIP: The model for the mechanism of action of androgens. *The Mechanism of action of androgens*, Gross F, Grumbach MM, Labhart A, Lipsett MB, Mann T, Samuels LT and Zander J.P. 8~9, Springer-Verlag, New York, 1977

- 23) Hasson V, Tveter KJ, Attramadal A and Torgersen O: Androgenic receptors in human benign nodular prostatic hyperplasia. *Acta Endocrinol* **68**: 79~88, 1971
- 24) Bradlow HL and Gasparini FJ: Current status of prostate androgen receptors. *Ann Clin Lab Sci* **9**: 299~313, 1979
- 25) Trachtenberg J and Walsh PC: Correlation of prostatic nuclear androgen receptor content with duration of response and survival following hormonal therapy in advanced prostatic cancer. *J Urol* **127**: 466~471, 1982
- 26) Concolino G, Marocchi A, Margiotto G, Conti, C, Disilverio F, Tenaglia R, Ferrano F and Bracci V: Steroid receptors and hormone responsiveness of human prostatic carcinoma. *The Prostate* **3**: 471~482, 1982
- 27) Barrack ER, Bujnovszky P and Walsh PC: Subcellular distribution of androgen receptors in human normal, benign hyperplastic, and malignant prostatic tissue: characterization of nuclear salt-resistant receptors. *Cancer Res* **43**: 1107~1116, 1983
- 28) 西澤恭子・松本圭司: ステロイドホルモン, レセプタ, 馬場茂明, 戸部隆吉, p 374~380, 金原出版, 東京, 1983
- 29) Snochowski M, Pousette A, Ekman P, Bression D, Anderson L, Hogberg B and Gustavsson JA: Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **45**: 920~930, 1977
- 30) Bonne C and Raynaud JP: Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors. *Steroids* **26**: 227~232, 1975
- 31) Zava DT, Landrum B, Horwitz KB and McGuire WL: Androgen receptor assay with [^3H -] methyltrienolone (R1881) in the presence of progesterone receptors. *Endocrinology* **104**: 1007~1012, 1979
- 32) Hicks LL and Walsh PC: A microassay for the measurement of androgen receptors in human prostatic tissue. *Steroids* **33**: 389~406, 1979
- 33) Albert J, Geller J, Geller S and Lopez D: Prostate concentration of endogenous androgens by radioimmunoassay. *J Steroid Biochem* **7**: 301~307, 1976
- 34) Traish AM, Muller RE and Wotiz HH: A new procedure for the quantitation of nuclear and cytoplasmic androgen receptors. *J Biol Chem* **256**: 12028~12033, 1981
- 35) Smith T, Sutherland F, Chisholm GD and Habib FK: Factors affecting the reproducibility of androgen receptor determination in human prostate. *Clinica Chimica Acta* **131**: 129~141, 1983
- 36) Trachtenberg J, Hicks LL and Walsh PC: Methods for the determination of androgen receptor content in human prostatic tissue. *Invest Urol* **18**: 349~354, 1981
- 37) Hechter O, Mechaber D, Zwick A, Campfield LA, Eychenne B, Baulieu EE and Robel P: Optimal radioligand exchange conditions for measurement of occupied androgen receptor sites in rat ventral prostate. *Archives of Biochem Biophys* **224**: 49~68, 1983
- 38) De Voogt HJ and Rao BR: Present concept of the relevance of steroid receptors for prostatic cancer. *J Steroid Biochem* **19**: 845~849, 1983
- 39) Ekman P: The application of steroid receptor assay in human prostate cancer research and clinical management (Review). *Anti-cancer Research* **2**: 163~172, 1982
- 40) Kitano T, Nakahara M, Usui T, Nihira H, Yasukawa A and Miyachi Y: Androgen receptor in electroresected and cold punch-resected specimens. Usefulness of Kaplan cold punch resectoscope. *Urology* **21**: 119~122, 1983
- 41) Benson Jr RC, Utz DC, Holicky E and Veneziani CM: Androgen receptor binding activity in human prostatic cancer. *Cancer* **55**: 382~388, 1985
- 42) Buttyan R and Olsson C: Androgen receptor assays in advanced prostatic cancer. *Urol Clin North Am* **11**: 311~317, 1984
- 43) Partshuk LP, Rosenthal HE, Macchia RJ, Eisenberg KB, Feldman JG, Wax SH,

- Kim DS, Whitmore Jr WF, Abrahams JI, Gaetjens E, Wise GI, Herr HW, Karr JP, Murthy GP and Sandberg AA: Correlation of histochemical and biochemical analyses of androgen binding in prostatic cancer: Relation to therapic response. *Cancer* **49**: 984~993, 1982
- 44) Naito H, Ito H, Wakisaka M, Kambegawa A and Shimazaki J: Histochemical observation of R1881 binding protein in human benign prostatic hypertrophy. *Invest Urol* **18**: 337~340, 1981
- 45) Chamness GC, Mercer WD and McGuire WL: Are histochemical methods for estrogen receptor valid: *J Histochem Cytochem* **28**: 792~798, 1980
- 46) Lammel A, Krieg M and Klotzl G: Are fluorescein-conjugated androgens appropriate for a histochemical detection of prostatic androgen receptors? *The Prostate* **4**: 271~281, 1983
- 47) Ghanadian R: Analysis of steroid receptors in the prostate. The endocrinology of prostate tumors, Ghanadian R., p.191, MTP Press Ltd., Boston, 1983
- 48) Irving R and Mainwaring WIP: Partial purification of steroid-receptor complexes by DNA-cellulose chromatography and isoelectric focusing. *J Steroid Biochem* **5**: 711~716, 1974
- 49) Foekens JA, Mulder E, Vrij L and Van der Molen HJ: Purification of androgen receptor of sheep seminal vesicles. *Biochem Biophys Res Comm* **104**: 1279~1286, 1982
- 50) Sica V, Parikh I, Nola E, Puca GA and Cuatrecasas P: Affinity chromatography and the purification of estrogen receptors. *J Biol Chem* **248**: 6453~6558, 1973
- 51) Renoir JM, Yang CR, Formstecher P, Lustenberger P, Wolfson A, Redeuilh G, Mester J, Richard-foy H and Baulieu EE: Progesterons receptor from chick oviduct: Purification of molybdate-stabilized form and preliminary characterization. *Eur J Biochem* **127**: 71~79, 1982
- 52) Coffey AI and King RJB: Antibodies to estradiol receptor from human myometrium. *J Steroid Biochem* **14**: 1229~1235, 1981
- 53) Green GL, Nolan C, Engler JP and Jensen EV: Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 5115~5119, 1980
- 54) King WJ and Greene GL: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nucleic of target cells. *Nature* **307**: 745~747, 1984
- 55) 小林俊三・佐本常男・小林 学・岩瀬弘敬・柄松章司・伊藤由加利・正岡 昭：ヒト乳癌エストロゲンレセプター，測定用モノクロナル EIA キットの基礎的，臨床的検討. *ホと臨* **33**: 1175~1179, 1985
- 56) Mainwaring WIP and Irving R: The use of deoxyribonucleic acid-cellulose chromatography and isoelectric focusing for the characterization and partial purification of steroid-receptor complexes. *Biochem J* **134**: 113~127, 1973
- 57) Hu A-Li, Loo RM and Wang TY: Purification of a 3S cytosol androgen receptor from rat prostate that stimulates DNA-dependent RNA synthesis in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* **65**: 1327~1333, 1975
- 58) Bruchovsky N, Rennie PS and Comeau T: Partial purification of nucleic androgen receptor by micrococcal nuclease digestion of chromatin and hydrophobic interaction chromatography. *Eur J Biochem* **120**: 399~405, 1981
- 59) Mulder E, Foekens JA, Peters MJ and Van der Molen HJ: A comparison of heparin agarose and DNA cellulose for the characterization and partial purification of androgen receptors from rat prostate. *FEB LETTERS* **97**: 260~264, 1979
- 60) Mainwaring WIP and Johnson AD: Use of affinity label 17 β -bromoacetoxy-testosterone in the purification of androgen receptor proteins. *Perspectives in steroid receptor research*, Bresciani, F. P. 89~97, Raven Press, New York, 1980
- 61) Mainwaring WIP: Purification of receptor proteins. The mechanism of action of an-

- drogens, Gross F, Grumbach MM, Labhart A, Lipsett MB, Mann T, Samuels LT, Zander J, p.74~77, Springer-Verlag, New York, 1977
- 62) Pousette A, Borgstrom E, Hogberg B and Gustafson JA: Analysis of the androgen receptor in needle biopsies from human prostate tissue. *Prog Clin Biol Res* **75**: 299~311, 1981
- 63) Sica V and Bresciani F: Estrogen-binding proteins of calf uterus. Purification to homogeneity of receptor from cytosol by affinity chromatography. *Biochemistry* **8**: 2369~2378, 1979
- 64) Ratajczak T and Hahnel R: Investigation of method of estradiol receptor purification prior to affinity chromatography. *J Steroid Biochem* **13**: 439~444, 1980
- 65) 碓井 亜・北野大路・安川明広・中原 満・仁平 寛巳・宮地幸隆: Testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) に関する研究. 第1報 牛 TeBG の精製およびその免疫学的検討. 日内分泌会誌 **57**: 1609~1615, 1981
- 66) Sica V, Puca GA, Molinari AM, Buonagure FM and Bresciani F: Effect of chemical perturbation with NaSCN on receptor-estradiol interaction. A new exchange assay at low temperature. *Biochemistry* **19**: 83~88, 1980
- 67) 浜名康栄: ステロイドホルモンレセプター 基礎と臨床, 吉田 博, 井村裕夫, p162~199, 中外医学社, 東京, 1981
- 68) Chang CH, Rowley DR, Lobl TJ and Tindall DJ: Purification and characterization of the androgen receptor from steer seminal vesicles. *Biochemistry* **21**: 4102~4109, 1982
- 69) Chang CH, Rowley DR and Tindall DJ: Purification and characterization of the androgen receptor from rat ventral prostate. *Biochemistry* **22**: 6170~6175, 1983
- 70) 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

(1986年7月31日迅速掲載受付)