シンポジウムⅡ： ホルモンレセプター

2. 正常並びに病的標的組織系における
ステロイドホルモン受容体とその意義

帝京大学医学部産婦人科学教室

加 藤 順 三

Steroid Hormone Receptors and Their Significance
in Normal and Pathologic Target Tissues

Junzo KATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University, School of Medicine
Tokyo 173

i) Brain receptors: Specific progesterone(P) receptors have been demonstrated in estrogen(E)-primed rat hypothalamus and anterior hypophysis, suggesting that P acts upon the brain through its receptors(R). Along with the presence of R for E, androgens(A) and corticoids in the brain, this may validate the hypothesis of the "one to one correspondence" relationship between the steroid hormone and its R.

ii) Chromatin binding: Binding of estradiol (E_2) cytosol R complexes to chromatin prepared from E sensitive (hypothalamus, hypophysis and uterus) and non-sensitive (cerebral cortex and spleen) tissues was examined to elucidate the regulative mechanism of specificity of the E sensitive cells in the brain and hypophysis. Chromatin binding depended roughly upon the amount of the cytosol Rs contained in the cells. The specificity of the target cells seemed also to be regulated at the chromatin level to some extent. In this context it is worthy that E cytosol receptors(ER) obtained from rat hypothalamus and anterior hypophysis were very similar, suggesting possible absence of organ specificity of the ERs in the hypothalamo-hypophyseal-uterine system. Differential effects of E in the target tissues may be ascribable to the events after cytosol R.

iii) ER in the target system of primates and humans: The concentrations of ER in human uterine cytosols were the endometrium > the cervix > the myometrium ≧ the tube. ER was isolated by gradient centrifugation from anterior hypophyseal cytosols from the Rhesus monkey. Furthermore, on sucrose density gradients of normal anterior hypophyseal cytosols obtained from a patient with advanced metastatic breast cancer, there was distinct binding of P and dexamethasone, suggesting the presence of possible Rs for steroid hormones in human central targets.

iv) Applicability of newly synthetic steroids for receptor assay: R5020, R1881 and

R2858 were employed for analysis of P-, A- and E Rs, respectively, in human breast cancer, human endometrial cancer, rat pituitary tumors and fetoneonatal rat brain. Decreasing concentrations of ER and PR were found in endometrial cancer with increasing grade of undifferentiation. These synthetic steroids have been found as valuable tools for the receptorassay, basically or clinically.

結 言

ステロイドホルモン結合特異性で、結合親和性がきわめて大きく、また一定の結合部位数をもつ蛋白性巨大分子receptor(R) が標的組織に高濃度に存在する。そして末梢ならびに中枢レベルにおいて、単純化した作用モデルとして、ステロイドホルモン結合→レセプター変換・核転移→クロマチン結合chromatin binding の三段階が基本的ステップであろうと考えられている。

I. 中枢性および末梢性標的細胞における クロマチン結合に関する検討

クロマチン結合はプロゲステロンやアンドロゲンではよく検討されているが (O'Malley, Liao), エストロゲン (E) では尚確定的でない (King)。

標的細胞のホルモン結合特異性がどのレベルで規定されるかを検討する目的で、細胞質 R レベルの“クロマチン”結合をミリポアフィルター法によって検討した。

71日令ウィスター系卵巣摘除ラットより得られた各組織のクロマチンの調整は、子宮および脾からは Spelsberg ら¹⁾ および King²⁾ らの方法によって、視床下部、下垂体前葉 および大脳皮質からは Shaw & Huang³⁾ の方法によった。

ラット子宮と脾とを組み合わせた場合、子宮細胞質のレセプター複合体は脾のクロマチンにもかなり結合しないし附着するが、子宮クロマチンにより多く結合する。それに対して脾細胞質の結合はいずれのクロマチンとも極めて少い。従って、クロマチン結合は細胞質のER量に依存していることは明らかであり、またクロマチンレベルでの細胞質 R 複合体結合の選択も認められる。

視床下部・下垂体前葉及び大脳皮質cytosol 及びクロマチンを相互にかけ合わせると、やはり cytosol receptor の一義的重要性がみられた(図1)。

図1. エストロゲン標的および非標的組織におけるクロマチン結合の検討。

II. エストロゲン標的系における E R の相似性

A. 細胞質 R の器官特異性の検討

同一種属動物の E 標的系の細胞質 E R の器官特異性が存在するか否かを検討する目的で、ラット視床下部と下垂体前葉の E R の特性を、種々パラメーターで比較検討した結果、表 1 の如く、両標的細胞でも相互類似性が高いことが判明した。ラットでの下垂体前葉と子宮 (Notides)⁴⁾、モルモットで視床下部と子宮とのエストロゲン・レセプターの類似性からみて、視床下部、下垂体前葉、子宮の E 標的系における E R 分子の類似性が推定される。^{5,6)}

B. エストロゲン標的内でのかけ合せ実験

下垂体と視床下部、大脳皮質、子宮、脾との組み合わせをみると、i) クロマチン結合は細胞質 E R 量に依存するが、ii) 下垂体前葉由来細胞質 R 複合体は、子宮クロマチンよりは視床下部、下垂体前葉、大脳皮質由来のクロマチンに 2 倍以上結合するのであって、クロマチンレベルでの結合選択がみられた。夫々の標的組織において細胞質 E₂R の類似性を裏づける一つの実験的根拠ともいえよう。

従って、E の種々の標的細胞での効果的発現の差は、細胞質 R 分子そのものにあるのではなくて、R 反応によって惹起される反応に基づくものと推定される、少くともその一部はクロマチンレベルで規定されるようである。

Table 1. ラット視床下部と下垂体前葉のエストラジオール・レセプターの類似性と特性

	視 床 下 部	下 垂 体 前 葉
沈 降 定 数 (S)	8.7±0.22(SE)(4)	8.3±0.32(5)
分子量 (×10 ⁴ ダルトン)	15.5~16.0	14.0~16.0
解 離 定 数	7.7±0.20×10 ⁻¹⁰ M (3)	1.1±0.05×10 ⁻⁹ M (3)
結 合 部 位 数 (moles/mg 蛋白)	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹³ ~10 ⁻¹⁴
ステロイド特異性	非常に高い	非常に高い
エストロゲン、抗エストロゲンとの結合競合性	E2 ^{a)} , DES>E1>E3 clomiphene で抑制	視床下部と同じ
質 性	蛋 白 性	蛋 白 性
安 定 性	熱 不 安 定 性	熱 不 安 定 性
E 2 至 適 pH	7 と 8 の 間	7 と 8 の 間
pH 活 性 曲 線	両方とも同じ曲線	両方とも同じ曲線
高 塩 効 果	解 離 (4S)	解 離 (4S)
SH-blocking agent の効果	あ り	あ り
ディスクゲルと、スラブレッドゲル電気泳動の両組織のパターン	に て い る	に て い る

a) E₂, 17β-エストラジオール; DES, diethylstilbestrol; E₁, エストロン; E₃ エストリオール
(J. Kato: *Proc. Vth Intern. Congr. Endocrinology, Symposium, Hamburg, July, 1976, Excerpta Medica*)

III. エストロゲン標的系における induced protein (I P)

E によってラット子宮で誘導される induced protein (I P) はごく早期に検出可能で、図 2 の如く、もっとも早い生化学反応の一つであり、ホルモン効果発現のよい指標と考えられている。

図2. エストロゲンによって惹起される "プログラミング"(ラット子宮)
(Katzenellenbogen and Gorski よりadaptしたもの)

1. ラット及びマウス子宮での検討

ラット子宮IPの細胞内生成を検討した結果、顆粒分画でのIP合成はないか、あるいはまた検出以下であるものと考えられる。核内でのKIP合成(Baulieu)を支持しない成績を得た。⁸⁾

EによるIP誘導は、マウスではみられないと報告されているが、マウスではIP誘導を認めた。ハムスター、兎では認めなかった。EによるIP誘導は可成り特異な反応であるという見解を支持している。

2. 中枢レベルでのIPの検討

卵巣ステロイドが、脳・下垂体(中枢レベル)での核酸、蛋白合成に影響を与えることを示す多くの根拠がみられるので、ラット中枢レベルでのIP誘導の問題は興味がある。しかしながら、成熟卵巣摘除ラットで脳および下垂体でのEによるIP誘導は検出できなかった。何らかの誘導蛋白の検出はpostchromatin過程の分析に必須であろう。

IV. ステロイドの中枢性標的受容性とレセプター——1対1の対応の存在——

1. 脳・視床下部・下垂体プロゲステロン・レセプター分子の分離

脳、視床下部および下垂体前葉から種々のステロイドホルモン・レセプター蛋白分子が分離同定されているが、プロゲステロン(P)の存在は確立していなかった。ラット視床下部、下垂体で、³H-Pそのものの特異的結合を証明できなかったが、⁹⁾ごく最近、新しい強力な標識合成ゲスターゲン³H-R5020を用いて、PR分子の存在を実証した。^{5,10)}

脳ことに視床下部や下垂体における該R分子の存在は、PがPRをへて作用する分子機作を示唆する。そしてまた、ステロイドホルモンの中枢作用上、基本的にはステロイドとRの間にone to one correspondenceの存在するものと考えられる。

2. アンドロゲン(A)の中枢作用

雄動物における視床下部へのAのフィードバック機序は、aromatizationによる統一理論だけで説明されていたが、^{5,9-13)}testosterone及5 α -ジヒドロテストステロン(DHT)の細胞質並びに核レセプターの存在より、Aを介する経路の存在が考えられる。¹³⁾どのルートが生理的に優位であるかなどについては尚明らかでない。

V. ヒト及び霊長類標的系における E R

ヒト標的器官におけるE作用の基礎的な並びに臨床的知見を理解するため、ヒト及び霊長類の感受性標的系における本Rについて検討した。

1. 人子宮における E R

ヒト子宮同一標本における該8S E Rについて比較検討すると、その濃度は子宮内膜・頸部(体筋)卵管の順であった。子宮頸部での高含量は予想外の成績であり、該部が頸癌の好発部位であることも関連して興味深い。⁸⁾

2. 猿の下垂体前葉性 E R

霊長類下垂体前葉におけるE Rの生化学的な意味での分離についての報告はほとんどみられない。アカゲザル新鮮前葉の細胞質より、超遠心法で E_2 R を単離した。

3. 人下垂体前葉 ステロイドレセプターの分離

図3は、転移性乳癌患者から外科的に剔出された新鮮正常下垂体前葉の cytosol の蔗糖密度勾配超遠心パターンで、エストロゲン結合ははっきりしないが、progesterone binding (R5020) は明瞭な peak を示している。また dexamethasone 結合も認められる。ヒトの下垂体のレセプターについては殆んど報告が見当たらないが、その存在は明らかとなったものと考えられる。

4. 猿の睾丸性 E R

ラット睾丸に多量の E_2 R 分子が存在することを報告したが、猿の睾丸における存在が明らかとなった。他の種々の動物(マウス、モルモット、ハムスター、猫、犬)よりも分離できたので、本Rは生理的意義を有するものと考えられる。

図3. ヒト下垂体前葉細胞質のエストロゲン、プロゲステロン及びグルココルチコイド結合。

VI. 新しい標識合成ステロイドのreceptor分析への応用と価値

Roussel — Uclaf 研究所で合成された強力なステロイドのうち、R5020, R1881, 及びR2858について検討した。

図4. R 5020, R 1881, R 2858の構造式。

人乳癌，子宮内膜癌，下垂体腫瘍系について，R 5020を用いて progesterone receptor (P R) を，R 1881を用いて androgen receptor (A R)，R 2858を用いて estrogen receptor (E R) についてレセプター分析を検討した。これらの合成ステロイドはレセプター結合特異性の点で極めて価値あることが分った。図4はそれらの構造式を示している。

A) R 5020を用いたprogesterone receptor (P R) の分析

$^3\text{H-P}$ は CBG, CBG-like progesterone binding proteins やcorticoid receptor とも結合するが，R 5020はP Rにのみ特異的に結合すると共に，Pより数倍結合が強力であり，またレセプターcomplexの安定性が高いことから， $^3\text{H-P}$ でnegativeの場合でも，P Rを検出できるという特徴をもっている。^{14,15)}

1) 人乳癌

人乳癌のホルモン依存性の判定はE Rレベルで検討され，Rの有無によって外科的内分泌療法の適応がきめられるようになってきているが，E R(+)でもホルモン療法無効例があるわけで，本当の意味でのE依存性の欠如していることが考えられる。

McGuire はエストロゲンのホルモン依存性のmarkerとしてprogesterone receptorsが誘導されているか否かに注目して検討して，両レセプターの測定によって，responderとnon-responderを分別できると報告している。

従って，ホルモン依存性が本当に存在するか否かは両方のレセプターを測定する必要がある，P R検出のためには，R 5020は，まさに好都合のものといえる。

人乳癌の蔗糖密度勾配沈降図でE R(+), P Rも(+)の例であり，図5はE R(+)P R(-), 両方とも(-)の例である。

図5. 人乳癌のエストロゲン、プロゲステロンレセプターの超遠心パターン. 左図ER, 右図PR.

図6. 人子宮内膜癌のエストロゲン(上図左右), プロゲステロンレセプター(下図左右)の超遠心パターン.

左図は分化型, 右図は未分化型.

図7. 人子宮内膜増殖症及び内膜癌の組織型（増殖症，分化型，未分化型）とプロゲステロンレセプターの相関。

2) 人子宮体癌

人子宮内膜癌PR分析について検討した。図6は代表例で、分化型の内膜癌ではER及びPR(+)で、未分化型ではER及びPR(-)であることが分る。

人子宮内膜癌の組織像とPR量は図7の如くで、未分化への偏向に伴ってRの減少がみられ、ホルモン依存性の喪失が裏づけられる。これらの臨床応用はこれからの問題であるが、ホルモン依存性の有力な基準となりうるものと考えられる。¹⁸⁾

B) R1881

R1881はBonne & Raynaudによると、androgen receptorに特異的に結合し、最も特徴的なことはhuman sex steroid binding proteins (HSBP)に結合しない。人子宮内膜cytosolのandrogen bindingにはspecific androgen BPの他に多量のHSBPが含まれていることが分る。従って単に³H-DHTや³H-Tを使用した場合にはHSBPの結合もみていることになるので、R1881はAR分析に有用であるといえる。しかしながらR1881はPRにも結合するので、非放射性R5020をR分析系に加える必要がある。¹⁹⁾

図8. エストロゲン誘発ラット下垂体腫瘍組織細胞質のプロゲステロン (R5020), アンδροゲン (DHT, T, R1881) 及びグルコルチコイド (DX) 結合。

図9. 新生仔ラット視床下部細胞質におけるエストロゲン・レセプターとfetoneonatal estrogen binding proteins (fEBP)

エストロゲンで誘発されたラット下垂体腫瘍には、図8のように、R5020, DHT, T及びR1881のspecific binding が認められ、P及びAのR蛋白が明瞭に証明できる。

C) R2858

1) fetoneonatal EBP (α -fetoprotein) と新生仔脳エストロゲン・レセプター

生后早期のラット脳 cytosol には、少量の8SのERの他に、4Sに多量のE binding proteins (EBP)が存在することを、1971年に報告した¹⁶⁾(Kato et al.), その後、この4S因子は α -fetoproteinであることがPlapinger によって同定され、母体から移行する多量のエストロゲンから、胎児・新生仔の脳を“保護”する働きをもつことが明らかにされている。

図9で明らかなように、R2858は8S ERに結合するが、4S fEBPには全く結合せず、両者は全く異ったentitiesと考えられる。

図10. 脳fEBP (α -フェトプロテイン) の保護作用.(図の上半はMcEwen¹⁷⁾より)

模式図10の上半は、胎児・新生仔の脳へのエストロゲンの作用を示したMcEwen¹⁷⁾の図であるが、著者らの実験成績ではアンドロゲン受容体も明瞭に分離できるので、下半の作用経路も関与すると考えられる。

このように、新しく導入されたR5020, R1881及びR2858は、天然のステロイドと異って、1つにはreceptorのみに結合する性質をもつこと、2つには、そのホルモン作用はより強力で結合親和性が高い、という特性をもつものであって、基礎的並びに臨床的receptor分析の極めて有力な武器となるものと考えられる。

R2858, R1881を頂いたDr.J.P.Raynaud, R5020の入手に便宜を頂いた阪大松本圭史教授並びに御協力を頂いた東京都駒込病院脳外科寺尾部長に深謝すると共に、小野内常子学士並びに高松みつ子嬢の協力に深く感謝する。なほ、文部省科研費(がん特定、一般)の補助をうけた。

文 献

- 1) Spelsberg, T.C., A.W. Steggle, F. Chytil and B.W. O'Malley, J. Biol. Chem., 247: 1368, 1972.
- 2) King, R.J.B., D. Sömjen, A.M. Kaye and H.R. Lindner, Mol. and Cell. Endocrinology 1: 21: 1974.
- 3) Shaw, L.M.J. and R.C. Huang, Biochemistry 9: 4530, 1970.
- 4) Notides, A.G., Endocrinology 87: 987, 1971.
- 5) Kato, J., Endocrinology (Ed. by V.H.T. James) Excerpta Medica ICS No. 402, Proc. V Intern. Congr. Endocrinology, Hamburg, July, 1976, Vol. I, Excerpta Medica., Amsterdam, pp. 12-17, 1977.
- 6) Kato, J., Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormones Part II (Ed. by J.R. Pasqualini) Marcel Dekker, New York, Basel, 1977, pp. 603-671.
- 7) Katzenellenbogen, B.S. and J. Gorski, Biochemical Actions of Hormones (Ed. by G. Litwack) Academic Press, 1975, pp. 188-245.
- 8) 加藤順三: ホルモンと臨

- 床 13: 1185, 1975. 9) Kato, J., J. steroid Biochem., 6: 979, 1975.
- 10) Kato, J. and T. Onouchi, Endocrinology, 101: 920, 1977.
- 11) Kato, J. and T. Onouchi, Endocr. jap. 20: 429, 1973. 12) Kato, J. and T. Onouchi, Endocr. jap. 20: 641, 1973. 13) Kato, J., J. steroid Biochem., 7: 1179, 1976. 14) Philibert, D. and J. P. Raynaud, Steroids 22: 89, 1973.
- 15) Horwitz, K.B. and W.L. McGuire, Steroids 25: 497, 1975. 16) Kato, J., Y. Atsumi and M. Inaba, Endocrinology 94: 309, 1973. 17) McEwen, B.S., Prog. Brain Res. (Ed. by E. Zimmerman et al.), Elsevier, p. 87, Amsterdam, 1976.
- 18) 加藤順三他: 日産婦誌29(12): 1769, 昭52(1977)印刷中. 19) Cowan, R.A., S.K. Cowan and J.K. Grant, J. Endocr. 74: 281, 1977.