ヒト培養皮膚線維芽細胞における dihydrotestosterone 産生 (5 α -reductase activity)

長崎大学医学部第一内科

森 本 勲 夫, 長 瀧 重 信

長崎県成人病センター多良見病院

石 丸 忠 彦

Dihydrotestosterone Formation (5 α -Reductase Activity) in Cultured Human Skin Fibroblasts

Isao MORIMOTO, Shigenobu NAGATAKI

The First Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Nagasaki University

Tadahiko ISHIMARU

Nagasaki Prefectural Preventative Medical Center,
Tarami Hospital

Testosterone secreted from the testis is converted to dihydrotestosterone (DHT) in target tissues by 5 α -reductase and DHT exerts its action on the nucleus. Since skin is one of the target tissues of androgen, we established a system for culturing human skin fibroblasts, and we investigated the conversion of testosterone to DHT in genital and nongenital skin fibroblasts obtained from males as well as from females.

In our system, fibroblasts were incubated with 0.1 μ M 1, 2-³H testosterone, and labeled metabolites were separated by thin layer chromatography. DHT formation was linear for 6 hours and the rate of DHT formation correlated with the growth phase of the fibroblasts. In the course of serial subculture, DHT formation did not change between the 3rd and 10th subculture in four cell strains. DHT formation in nongenital skin fibroblasts did not differ significantly between males and females. Fibroblasts obtained from male genital skin produced significantly greater amounts of DHT than those from male or female nongenital skin. Furthermore, DHT formation in genital skin fibroblasts did not differ between normal males and hypogonadal males.

These data suggest that genital skin is the target tissue where testosterone strongly converts to DHT and the difference of male secondary sexual characteristic appearance between males and females may not depend on the sensitivity of the target tissues to androgen but on the secretion rate of androgen.

緒 言

睾丸から分泌された testosterone は末梢標的細胞で 5 α -reductase の作用で dihydrotestosterone (DHT) に転換, 次いで核に作用する³⁾。皮膚組織は androgen の標的細胞であり, 生体の androgen の作用機序, 代謝を検討するために利用されている^{5) 7) 8) 22) 23) 26) 27) 28)}。特に継代培養の皮膚線維芽細胞はそのための有用な材料となっており, 臨床的には androgen の標的細胞レベルの異常に基づく疾患の診断および病態生理の解明に利用された^{1) 9) 10) 13) 18) 30)}。すなわち DHT と receptor との結合障害で発症する睾丸性女性化症あるいは Reifenstein 症候群の病態が Wilson³⁰⁾, Griffin⁸⁾ らにより証明された。さらに, 血中ホルモン値のみでは解明できなかった oligozoospermia の症例でも, その症例の皮膚線維芽細胞を利用して本症が androgen の作用不全に基づく可能性が明らかになった¹⁾。一方, 皮膚 slice による testosterone の代謝実験²⁷⁾で皮膚は DHT 産生のものであることが報告され, 皮膚での testosterone から DHT への転換酵素, 5 α -reductase の検討が行われた。Shanley²⁴⁾らは睾丸性女性化症の培養皮膚線維芽細胞での 5 α -reductase 活性の低下, Wilson らはこの培養細胞系を利用して 5 α -reductase 欠損症²⁹⁾を証明した。

培養皮膚線維芽細胞は脂質・蛋白・炭水化物代謝異常を証明するのに利用されるのみならず androgen の代謝異常症, 作用異常症を知るためのモデルとして有用である。本論文は培養皮膚線維芽細胞における testosterone から DHT への代謝 (5 α -reductase 活性) についての基礎的な検討と, 外陰部皮膚と非外陰部皮膚より得た培養線維芽細胞における同活性について報告する。

実 験 方 法

標識アイソトープ

1 α , 2 α - ³H-testosterone (SA 57 Ci/mmol), ¹⁴C-DHT (SA, 57.75 mCi/mmol) は New England Nuclear 社より購入した。¹⁴C-5 α -androstane-3 α , 17 β -diol (3 α androstanediol) は ¹⁴C-DHT を還元して作製した。これら標識ステロイドは Sephadex LH-20 (Pharmacia) の microcolumn (benzene: methanol, 85:15 v/v) および aluminumoxide の薄層クロマトグラフィー (Merck 社) で純化した。

皮膚線維細胞の培養

線維芽細胞は Table 1 に示した対象者より手術あるいは生検時に得た。初代培養細胞は assay を行うのに細胞数が十分でないので継代培養を行った。培養液は 10% (v/v) 牛胎児血清 (FBS), streptomycin 100 μ g/ml, penicillin 100 u/ml, NaHCO₃ 2.2 g/l を含む Eagle の minimum essential medium (MEM, Gibco 社) を使用した。線維芽細胞の継代培養 (passage) は 37°C で 0.05% trypsin, 0.05% EDTA (共に半井化学) で線維芽細胞を剥離し, 継代培養あるいは assay に必要な細胞数を dish あるいは plate に再培養した。

酵素活性の assay

培養皮膚線維芽細胞の 5 α -reductase 活性は 60 $\times$ 15 mm の petri dish (Falcon) の単層培養細胞 (10⁶個) で行った。10⁵個の線維芽細胞を dish に培養し, 第 3 日目に 10% FBS を含む MEM 培養液 5 ml, 次いで第 6 日目に MEM 液 5 ml にかえ第 7 日目に assay を行った。Assay 時の細胞数は約 10⁶個であった。Assay は MEM 液で線維芽細胞を洗浄し, 0.1 μ M の 1, 2, ³H-testosterone を溶解した 1 ml の MEM 液を dish に添加し, 5% CO₂ 下 37°C 2 時間 incubate した。Assay 終了後直ちに線維芽細胞の dish を氷上に置き, 上澄は分析のため採集, さらに生食水で 2 回 dish を洗

浄しこれらも分析用に加えた。この過程で添加した標識ステロイドの95%以上が回収された。Petri dishの線維芽細胞は0.1NのNaOH 1mlで溶解し、蛋白濃度測定のため-20℃で保存した。蛋白の測定はBio Radのkitを使用した。Blank値として線維芽細胞を含まないdishで同様の操作を行ったものを使用した。

ステロイドの純化

培養液中のステロイドの分析はまず recovery 用に ^{14}C -DHT および ^{14}C -3 α androstanediol をそれぞれ3000~4000 cpm 添加し、6 ml の ethyl ether で3回抽出した。次いで抽出物を蒸発乾固し、10 μg の cold testosterone, DHT, 3 α および 3 β androstanediol を添加、DHT は2回の silica gel 薄層クロマトグラフィー (TLC-1, CHCl_3 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 98:1.75, TLC-2, CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 85:15:3) で純化した。3 α androstanediol は上記と同じ2回の薄層クロマトグラフィーで(3 α +3 β) androstanediol を純化しその $\frac{1}{3}$ をカウント、残りはaluminium oxide による薄層クロマトグラフィーで3 α androstanediol を3 β androstanediol より分離した。

Table 1. List of 20 fibroblast cell lines.

Cell line	Site of skin	Age	Sex	Diagnosis	5 α Reductase activity (p mol/mg protein /hour)
Non-genital skin					
# 14	Abdomen	48	Male	Hydronephrose	0.62
# 15	Upper abdomen	33	Male	Duodenal ulcer	0.54
# 20	Upper arm	30	Male	Myopathy	0.49
# 31	Breast	17	Male	Mastopathy	0.59
# 35	Lower abdomen	76	Male	Benign prostatic hypertrophy	0.89
# 11	Hip	31	Female	Trauma	0.85
# 55	Upper abdomen	26	Female	Cushing's syndrome	0.70
# 59	Upper abdomen	31	Female	Cholelithiasis	0.97
# 63	Upper abdomen	41	Female	Cholelithiasis	1.90
# 65	Upper abdomen	63	Female	Cholelithiasis	1.00
Genital skin					
# 46	Penis shaft	8	Male	Hypospadia	3.93
# 47	Scrotum	33	Male	Oligozoospermia	3.01
# 48	Foreskin	2	Male	Phymosis	3.50
# 52	Scrotum	15	Male	Hypogonadism	30.91
# 71	Scrotum	7	Male	Retentio testis	13.60
# 77	Foreskin	8	Male	Retentio testis	5.67
# 78	Scrotum	3	Male	Hydrocele	26.23
# 81	Scrotum	88	Male	Benign prostatic hypertrophy	5.96
# 84	Scrotum	8	Male	Prader-Willi syndrome	10.65
# 85	Scrotum	8	Male	Hypogonadism	6.24
# 86	Penis shaft	86	Male	Benign prostatic hypertrophy	3.35

培養液中の ^3H -DHT, ^3H - 3α および 3β androstanediol は抽出時に添加した ^{14}C -DHT, ^{14}C - 3α androstanediol で補正, その specific activity よりそれぞれの濃度を求めた。この assay での ^3H - 3α androstanediol, あるいは $(3\alpha+3\beta)$ androstanediol の産生は微量で blank 値に類似するため ^3H -DHT の産生量をもって 5α -reductase 活性とした。最終的には 5α -reductase 活性としては培養液中の DHT 濃度/線維芽細胞の蛋白濃度/1時間 incubation (pmol/mg protein/hour) であらわした。シンチレーションカウンターはアロカ社 LSC-903 を使い, two channel でカウントした。Counting efficiency は ^{14}C : 70%, ^3H : 43% で ^{14}C の ^3H への% feed through は13%であった。

Acetylation および recrystallization

2 回の TLC による DHT の純度を確認するため acetylation と crystalization を行った。Acetylation は前述した 2 回の TLC 後, その一部を 0.1ml の pyridin と 0.1ml の acetic anhydride で 24 時間室温暗所で行った。Crystalization は Table 3 に示した溶媒系で行い, それぞれ ^3H / ^{14}C の ratio を求めた。2 回の TLC 後の DHT の ^3H / ^{14}C ratio は acetylation および再度の TLC 後の ^3H / ^{14}C ratio, 3 回の crystalization の mother liquor と crystal の ^3H / ^{14}C ratio に余り差はなく, 2 回の TLC で DHT は純化されるものと考えられる (Table.2)。

Table 2. Confirmation of identify of ^3H -dihydrotestosterone by recrystallization and derivative formation.

Sample	Solvent	Dihydrotestosterone $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio	
		A	B
Original mixture (After TLC)		18.6	13.4
Acetylation		18.2	13.0
Mother liquor			
1	Aceton	18.4	14.0
2	Benzen-heptane	18.5	12.9
3	Ethylacetate-cyclohexane	16.6	11.8
Final crystals		16.9	11.9

結 果

1) Assay の基礎検討

培養線維芽細胞での DHT 産生を基質である ^3H -testosterone の濃度をかえて検討したのが Fig 1 である。DHT 産生は基質濃度が $0.05\mu\text{M}$ から $0.25\mu\text{M}$ に増加するに従って直線的に増加し, 基質濃度 $0.5\mu\text{M}$ で DHT 産生は plateau に達した。この時の km 値は $0.08\mu\text{M}$ である。以下の assay は全て基質濃度として ^3H -testosterone $0.1\mu\text{M}$ を使用した。

Assay のインキュベーション時間を変えた時の DHT 産生を検討したのが Fig 2 である。基質である ^3H -testosterone を添加後 1, 2, 4, 6 時間後の DHT 産生は直線的に増加した。我々は以下の assay は 2 時間の incubation で行った。

Fig. 1. Dihydrotestosterone formation in medium after incubation of fibroblasts with various concentration of 1, 2-³H testosterone.

Fig. 2. Time course of formation of dihydrotestosterone by skin fibroblasts cultured with 0.1 M of 1, 2-³H testosterone.

次に線維芽細胞をdishにplating後の日数による5 α -reductase活性の変動について検討した。基質として0.1および0.5 μ Mの³H-testosteroneを使用したが生線維芽細胞をplating後、日数がたつに従って酵素活性は増加した。我々は酵素活性測定には線維芽細胞をplating後7日目のものを使用した (Fig.3)。

Fig. 3. Changes in dihydrotestosterone formation. On indicated day, fibroblasts were incubated with 0.1 μ M ($\circ$) and 0.5 μ M ($\bullet$) of 1, 2- 3 H testosterone.

Fig. 4. Changes in dihydrotestosterone formation over serial subcultures. Fibroblasts were incubated with 0.1 μ M of 1, 2- 3 H testosterone.

培養細胞を使った実験で問題となるのは継代培養を繰り返すことで酵素活性が変動しないかという点である。Fig 4に示したのが継代培養を繰り返した時の 5α -reductase活性である。継代培養の繰り返して本酵素活性は若干の変動がみられたが10代の継代培養ではその活性に差は余りみられなかった。我々は酵素活性が余り変動しない3～4代の継代線維芽細胞を使用して assay を行った。

2) 外陰部, 非外陰部皮膚線維芽細胞の5 α -reductase 活性

各症例の培養皮膚線維芽細胞の5 α -reductase 活性を Table 1 および Fig 5 に示した。非外陰部皮膚線維芽細胞の DHT 産生は0.1 μ M の³H-testosterone を基質とした時, 男性由来の線維芽細胞で 0.64 ± 0.19 (mean $\pm$ SD, n = 5), 女性由来のそれで 1.02 ± 0.45 (n = 5) pmol/mg protein/hour で両者の間に差はなかった。また男女合わせた時の非外陰部皮膚線維芽細胞の DHT 産生は 0.83 ± 0.40 (n=10) pmol/mg protein/hour であった。

一方, 外陰部皮膚線維芽細胞は全て男性から得たものである。このうち3例は性ホルモン分泌低下症でこれらの外陰部皮膚線維芽細胞の DHT 産生はそれぞれ6.24, 10.65, 30.91 pmol/mg protein/hour, 8例の正常男性のそれは3.01~26.23 (8.16 ± 7.55 mean $\pm$ SD) pmol/mg protein/hour で両者の間に差はみられなかった。正常男性8例の外陰部皮膚線維芽細胞の DHT 産生あるいは性ホルモン分泌低下症を含む全ての男性のそれ (10.75 ± 9.03 pmol/mg protein/hour) は, 非外陰部皮膚線維芽細胞の DHT 産生より有意 ($p < 0.01$) に高かった (Table 1, Fig 5)。

次に酵素活性と皮膚提供者の年齢との関係を検討したのが Fig 6 である。中高年齢者からの線維芽細胞の系が少なく結論的なことは云えないが非外陰部皮膚線維芽細胞では余り5 α -reductase 活性に差はなく, 外陰部皮膚線維芽細胞では若年者でやや高い酵素活性がみられた例があった。

Fig. 5. Dihydrotestosterone formation by genital and non-genital skin fibroblasts cultured with 0.1 μ M of 1, 2-³H testosterone (●: normal male, ■: hypogonadal male, ○: normal female).

Fig. 6. Dihydrotestosterone formation after incubation with 0.1 μ M of 1- 3 H testosterone in fibroblasts as a function of the age of the donor.

考 案

In vivo の実験は生体の種々の要因が加わるためにその成績を解釈することが困難ことがある。一方, in vitro の実験は必ずしも in vivo と同じ条件でない。従って, in vitro の実験では in vivo により近い実験モデルが求められる。こういう点から培養細胞による実験はより in vivo に近い実験モデルとなり得る。培養細胞でも重要な事はその細胞本来の機能を培養細胞が保ち続けるか否である。Mowszowicz²⁰, Lamberigts¹⁶らは継代培養の繰りかえして線維芽細胞の5 α -reductase 活性が増加することを報告した。Mowszowiczは2代目と12代目で5 α -reductase 活性が4~5倍の差があり継代培養で酵素活性が増加することを報告した。一方, Lamberigtsらは継代培養20代までは余り酵素活性は変わらないが, それ以後でその活性が増加することをみだした。我々の成績では継代培養の繰りかえして5 α -reductase 活性に余り大きな差がみられなかった。我々は最大10回の継代培養での酵素活性の比較であるが, 今後継代培養を続けることでその活性が変動する可能性はあるかもしれない。我々の成績では少なくとも3~6回目の継代培養では線維芽細胞での酵素活性はほとんど差がないと考えられた。

男性より得た線維芽細胞と女性のそれとで5 α -reductase 活性を比較したが少なくとも非外陰部皮膚線維芽細胞では5 α -reductase 活性にほとんど差がみられなかった。また外陰部皮膚線維芽細胞

胞の本酵素活性は性ホルモン分泌低下症の男性と正常男性の系で差がみられなかった。Wilson²⁹⁾は睾丸性女性化症でない仮性半陰陽の男性の5 α -reductase 活性は正常であったと報告している。また、Pinsky²²⁾, Wilson²⁹⁾らは外陰部皮膚線維芽細胞の本酵素活性は男性から得たものと女性のそれとの間に差がないか、むしろ女性で上昇している結果を報告した。一方、Dube⁴⁾らはラットの皮膚の5 α -reductase 活性は castration, ovariectomy あるいは androgen, estrogen の投与で変動することを報告しているが、その変動は皮膚の採取部位により異なり一定の傾向は認めていない。Mowswowicz²⁰⁾らは男性の pubic skin の酵素活性が女性のそれより高いと述べている。また、In vivo の androgen kinetic study で testosterone から DHT への末梢での転換がやや男性が女性より高い率であると報告している。我々の成績は男女の二次性徴の違いの原因として末梢の androgen 標的器官の酵素活性の差による違いよりはむしろ男女における性ホルモンの分泌量の差によるものが推定される。

外陰部皮膚線維芽細胞の5 α -reductase 活性は非外陰部皮膚線維芽細胞のそれより高いのは従来の報告^{8) 9) 20) 27) 28)}と一致している。血中 DHT の3/4は末梢組織で睾丸から分泌された testosterone が5 α -reductase により転換して産生される^{11) 14)}。Testosterone から DHT への転換の場として種々の組織がある。特に肝臓は5 α -reductase が多量に含まれており、従来 testosterone から DHT の転換の場²⁰⁾と考えられていた。しかし、double isotope による kinetic study で肝臓から DHT は全く産生されてないことが判明した^{13) 19)}。したがって testosterone から DHT の転換は肝臓を除く androgen の標的器官で行われていると考えられる。標識 testosterone 注入後の各臓器の DHT の分布をみると筋肉中への DHT の分布は非常に少なく、前立腺に多量に分布していた²⁾。また、胎生期の外性器、内性器の発達をみると urogenital sinus, urogenital swelling, urogenital tubercle の発達は睾丸から分泌された testosterone がそれらの部位で5 α -reductase の作用で DHT に転換して発達することが判明している^{6) 29)}。すなわち、上記の発生源からなる外陰部、前立腺は DHT 産生のさかんな部といえる。臨床的にも5 α -reductase 欠損症の検討で外陰部、前立腺、体毛、座瘡、temporal recession の発達には DHT が必要であることが判明している¹²⁾。以上のことから考えて外陰部皮膚は DHT 作用のさかんな部位であり、外陰部皮膚線維芽細胞での5 α -reductase 活性が高いのは当然のことと思われる。我々の外陰部皮膚は陰茎と陰囊皮膚の両者から成りたっているが、5 α -reductase 活性は両部位の線維芽細胞の間で差はなかった。Wilson の²⁹⁾結果も5 α -reductase 活性が両部位で差がないと報告しており、両部位の胎生期の発生源を考えれば陰茎と陰囊皮膚で本酵素活性に差がないことは理解できる。次に供給者の各年令と5 α -reductase 活性との関係は症例数が少なくまた若年者でその活性にバラツキがみられ、明確な結論は得られなかった。

最後に細胞培養の実験で問題となるのは同じ部位の sample でも継代培養の細胞系によりその機能に差があるのではないかという点である。このことに関しては今後の検討を待たねばならないだろう。

結 語

我々は³H-testosterone を基質としてヒト培養皮膚線維芽細胞での DHT 産生 (5 α -reductase 活性) を検討し次の結論を得た。

- 1) 培養皮膚線維芽細胞での DHT 産生は incubation 時間あるいは細胞を plating してから assay 日

迄の日数の増大と共に増加した。

- 2) 線維芽細胞の DHT 産生は10代までの継代培養で余り変動しなかった。
- 3) 非外陰部皮膚線維芽細胞での DHT 産生は皮膚提供者の性差による違いはなかった。また外陰部皮膚線維芽細胞の DHT 産生は皮膚提供者の性ホルモンの分泌量と余り関係なかった。
- 4) 外陰部皮膚線維芽細胞の DHT 産生は非外陰部のそれより高かった。
- 5) 皮膚提供者の年齢による線維芽細胞の DHT 産生については一定の結論を得ることはできなかった。

稿を終わるにあたり、西川峰子嬢の技術的協力に感謝いたします。

本論文の要旨は第7回アジア・太平洋内分泌学会で発表した。

文 献

- 1) Aiman, J., Griffin, J.E., Gazak, J.M., Wilson, J.D. and MacDonald, P.C.: Androgen insensitivity as a cause of infertility in otherwise normal men. *N. Eng. J. Med.*, 300:223–227, 1979.
- 2) Becker, H., Horst, H.J., Krieg, M., Steins, P. and Voigt, K.D.: Uptake, metabolism and binding of various androgens in human prostatic tissue: In vivo and in vitro studies. *J. Steroid. Biochem.*, 6: 447–452, 1975.
- 3) Bruchovsky, N. and Wilson, J.D.: The intranuclear binding of testosterone and 5α -androstane- 17β -ol-3-one by rat prostate. *J. Biol. Chem.*, 243: 5953–5960, 1968.
- 4) Dube, J.Y., Ngo-Thi, H. and Tremblay, R.R.: Testosterone 5α -reductase in rat skin homogenates: Measurement in the skin at various anatomical sites in male and females. *Endocrinology*, 96: 235–237, 1975.
- 5) Flamigni, C.A., Collins, W.P., Koullapis, E.N. and Sommerville, I.F.: Formation and metabolism of testosterone in rat skin. *Endocrinology*, 87: 764–770, 1970.
- 6) Gloyna, R.E. and Wilson, J.D.: A comparative study of the conversion of testosterone to 17β -hydroxy- 5α -androstane-3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29: 970–977, 1969.
- 7) Gomez, E.C. and Hsia, S.L.: In vitro metabolism of testosterone- 4 - 14 C and Δ^4 -androstane-3, 17-dione- 4 - 14 C in human skin. *Biochemistry*, 7: 24–32, 1968.
- 8) Griffin, J.E., Punyashthiti, K. and Wilson, J.D.: Dihydrotestosterone binding by cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 57: 1342–1351, 1976.
- 9) Griffin, J.E. and Wilson, J.D.: Studies on the pathogenesis of incomplete form of androgen resistance in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 1137–1143, 1977.
- 10) Hodgins, M.B.: Binding of androgens in 5α -reductase-deficient human genital skin fibroblasts: Inhibition by progesterone and its metabolites. *J. Endocr.*, 94: 415–427, 1982.
- 11) Horton, R.: Sex steroid production and secretion in the male. *Andrologia*, 10: 183–194, 1978.
- 12) Imperato-McGinley, J., Guerrero, L., Gautier, T. and Peterson, E.: Steroid 5α -reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*, 186: 1213–1215, 1974.
- 13) Ishimaru, T., Edmiston, W.A., Pages, L. and Horton, R.: Splanchnic extraction and conversion of testosterone and dihydrotestosterone in man.

- J. Clin. Endocrinol. Metab., 46: 528–533, 1978. 14) Ito, T. and Horton, R.: The source of plasma dihydrotestosterone in man. J. Clin. Invest., 50: 1621–1627, 1971.
- 15) Keenan, B.S., Meyer, W.J., Hadjian, III. A.J., Jones, H.W. and Migeon, C.J.: Syndrome of androgen insensitivity in man: Absence of 5 α -dihydrotestosterone binding protein in skin fibroblasts. J. Clin. Endocrinol. Metab., 38: 1143–1146, 1974. 16) Lamberigts, G., Dierickx, P., De Moor, P. and Verhoeven: Comparison of the metabolism and receptor binding of testosterone and 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one in normal skin fibroblast cultures: Influence of origin and passage number. J. Clin. Endocrinol. Metab., 48: 924–929, 1977.
- 17) Mahoudeau, J.A., Bardin, C.W. and Lipsett, M.B.: The metabolic clearance rate and origin of plasma dihydrotestosterone in man and its conversion to the 5 α -androstane-3-one. J. Clin. Invest., 50: 1338–1344, 1971. 18) Moore, R.J., Griffin, J.E. and Wilson, J.D.: Diminished 5 α -reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. J. Biol. Chem., 250: 7168–7172, 1975.
- 19) Morimoto, I., Edmiston, A., Hawks, D. and Horton, R.: Studies on the origin of androstane-3-one and androstane-3-one glucuronide in young and elderly men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 772–778, 1981.
- 20) Mowszowicz, I., Kirchhoffer, M., Kuttann, F. and Mauvais-Jarvis, P.: Testosterone 5 α -reductase activity of skin fibroblasts increase with serial subcultures. Mol. Cell. Endocrinol., 17: 41–50, 1980. 21) Mowszowicz, I., Riahi, M., Wright, F., Bouchard, P., Kuttann, F. and Mauvais-Jarvis, P.: Androgen receptor skin cytosol. J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 338–344, 1981.
- 22) Pinsky, L., Kaufman, M., Straisfeld, C. and Shanfield, B.: Lack of difference in testosterone metabolism between cultured skin fibroblasts of human adult males and females. J. Clin. Endocrinol. Metab., 39: 395–398, 1974.
- 23) Schweikert, H.U., Milewich, L. and Wilson, J.D.: Aromatization androstenedione by cultured human skin fibroblasts. J. Clin. Endocrinol. Metab., 43: 785–795, 1976.
- 24) Shanies, D.D., Kirschhorn, K. and New, M.I.: Metabolism of testosterone-¹⁴C by cultured human cells. J. Clin. Invest., 51: 1459–1468, 1972. 25) Siiteri, P.K. and Wilson, J.D.: Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. J. Clin. Endocrinol. Metab., 38: 113–125, 1974.
- 26) Voigt, W. and Hsia, S.L.: Further studies on testosterone 5 α -reductase of human skin. J. Biol. Chem., 248: 4280–4285, 1973. 27) Wilson, J.D. and Walker, J.D.: The conversion of testosterone to 5 α -androstane-17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man. J. Clin. Invest., 48: 371–379, 1969.
- 28) Wilson, J.D.: Metabolism of testicular androgens, p.491, Ed by R.D. Greep, and E.B. Astwood, Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology, vol. 5, Male Reproductive System, chap.25, American Physiology Society, Washington, D.C., 1975. 29) Wilson, J.D.: Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem., 250: 3498–3504, 1975.
- 30) Wilson, J.D., Harrod, M.J., Goldstein, J.L.: Familial incomplete male pseudohermaphroditism, Type 1: Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestations in a family with Reifinstein syndrome. N. Eng. J. Med., 290: 1097–1103, 1974.