ラット前立腺に存在する Estramustine Binding Protein の 内因性アンドロジェン依存性についての検討

群馬大学医学部泌尿器科学教室

湯 浅 久 子, 鈴 木 孝 憲, 今 井 強 一, 山 中 英 寿

三菱化成総合研究所

神 野 英 毅

Dependency of Estramustine Binding Protein (EMBP)
from Rat Prostate to Endogeneous Androgen

**Hisako YUASA*, Takanori SUZUKI*, Kyoichi IMAI*,
Hidetoshi YAMANAKA* and Hideki KOHNO****

*Department of Urology, Gunma University School of Medicine, Maebashi, 371, Japan

**Mitsubishi Chemical Industries Ltd. Research Center, Yokohama, Japan

In this study, we investigated the dependency of estramustine binding protein (EMBP) from rat prostate on endogeneous androgen. The EMBP content of the dorsolateral prostate markedly decreased 14 days after castration and increased again after the cessation of the weekly subcutaneous administration of 2 mg of Estradiol-17 β valerate, in accordance with the recovery of prostate weight and serum testosterone concentration. This result clearly demonstrated that EMBP, which was present in very small quantities in the dorsolateral prostate, had a dependency on endogeneous androgen as well as on the ventral prostate EMBP. We investigated the changes in prostate weights, EMBP concentration and serum testosterone level throughout life. The ventral prostate weight began to increase rapidly at 7 weeks of age and showed a broad peak from 11 to 14 weeks of age and then gradually decreased. On the other hand, the dorsolateral prostate weight began to increase rapidly at 7 weeks of age and continued to increase very gradually even after 10 weeks of age. There was a remarkable difference in the changes in EMBP concentration between the ventral prostate and the dorsolateral prostate.

In the ventral prostate, EMBP concentration increased markedly from 4 to 9 weeks of age. Thereafter it continued to increase very gradually. On the other hand, in the case of the dorsolateral prostate, EMBP demonstrated higher and fluctuating concentration from 4 to 15 weeks of age. After 16 weeks of age, EMBP showed lower and stable concentration, although the weight of dorsolateral prostate showed gradual increase. These results suggested that there exist, beside androgens, some factors that participated in the regulation of growth and functional metabolism in the dorsolateral prostate after 16 weeks of age.

緒 言

ラット前立腺は腹葉, 側背葉, 前葉 (凝固腺ともいう) から成り, それぞれの葉には独自の分泌様式および分泌蛋白が存在する。本研究の対象である Estramustine Binding Protein (EMBP) は分泌糖蛋白であり, 成熟ラットでは腹葉の可溶性蛋白の20-30%を占め³⁾, その生合成および EMBP の3つの subunits である C1, C2および C3の mRNA はアンドロジェンによって調節されていることが報告されている²⁾。EMBP は腹葉だけでなく側背葉にも微量ではあるが存在する⁴⁾¹³⁾¹⁵⁾。側背葉 EMBP のホルモン依存性については現在までのところ報告されていない。今回, 我々は側背葉 EMBP の内因性アンドロジェン依存性について腹葉のそれと対比して検討を加えたので報告する。

実験材料および方法

1) 動物・薬剤

全実験を通じて雄性ウイスター系ラットを使用した。ラットは照明時間7:00-19:00, 室温22±3℃に調節された部屋で飼育された。実験終了時に採取した前立腺腹葉および側背葉は重量測定後ただちに液体窒素中で凍結し, 次の実験まで-70℃の deep freezer 中に保存した。Estradiol-17 β valerate はシグマ社 (米国) より購入した。

2) 抗 EMBP 抗体

抗 EMBP 抗体は, ラット Sprague Dawley 10週令の腹葉サイトソールから精製した 45KDa EMBP を家兎に免疫して得た抗血清を用いた。作製方法は既に報告した¹⁶⁾。この抗体は, Western blotting 法によりラット前立腺腹葉及び側背葉 EMBP の3つの subunits C1, C2及び C3を各々認識する。又, ³H-estramustine binding protein と結合する性質がある。

3) 前立腺サイトソールの調整

-70℃で保存されていた前立腺を短時間液体窒素に入れた後, 粉末状にする。粉末前立腺に3倍量の10mM Tris-HCl Buffer (pH7.2) -1mM EDTA-0.1mM dithiothreitol (DTT) -10% glycerol を加え, polytron PT-10 (Kinematica, Switzerland) を用いてホモジナイズした。ホモジネートを日立 RP80T ローターにて105,000×g, 60分間遠心し, サイトソールを得た。

4) 前立腺 EMBP の測定

前立腺 EMBP の測定は Laurell のロケット免疫電気泳動法⁵⁾によって行った。支持体として 0.167% (v/v) 家兎抗 EMBP 抗体を含有する1% Agarose gel を用いた。一定量のサイトソール (5 μ l) を添加後, 定電圧 (10v/cm) で3時間泳動した。泳動終了後, 0.5% Coomassie Brilliant blue R250 in ethanol/acetic acid/water (9:2:9) で染色した。次に試料添加孔から沈降ロケット先端までの距離を求め, EMBP 標準液のロケットの高さから作製した検量線を用いて EMBP を定量した。本法による測定限界は25ng であり, アッセイ間変動係数 (再現性) は10.6%以下である。

5) 核酸及び蛋白質の測定

前立腺からの核酸抽出は Huchinson らの方法⁵⁾を用いた。DNA は diphenylamine 反応により, RNA は orcinol 反応によって測定した¹⁴⁾。蛋白質の定量は Lowry らの方法⁸⁾によって行った。

6) 血清テストステロンの測定

血清テストステロンの測定は牧野の方法⁹⁾を用いて行った。

結 果

1) 去勢後の前立腺及び血清テストステロンの変化

9週令ラットの前立腺腹葉 (Ventral prostate) と側背葉 (Dorsolateral prostate) の重量および DNA, RNA, サイトソール蛋白, EMBP 含量の去勢による経時的変動を Fig.1-a) 及び Fig.1-b) は示している。腹葉についてみると, 去勢後3日には DNA 含量を除いて重量, RNA, サイトソール蛋白, EMBP 含量は有意に減少し, 去勢後14日にはこれら全てが有意の減少を示した。去勢後14日時点で, それぞれ, 去勢前値の10.2%, 14.6%, 1.9%, 5.2%, 8.9%であった。次に側背葉についてみると重量および DNA, RNA, サイトソール蛋白, EMBP 含量は去勢後, 経時的に減少し, 去勢後14日には腹葉と同様にこれら全てが有意の減少を示した。去勢後14日時点で, それぞれ去勢前値の27.8%, 44.5%, 16.8%, 15.5%, 1.9%であった。重量, DNA, RNA, サイトソール蛋白含量の去勢後14日時点での減少率は腹葉に比べて小さかった。それに反して, 側背葉 EMBP 含量の去勢後14日時点での減少率は重量, DNA, RNA, サイトソール蛋白の同時点での減少率に比較して, より大きかった。Fig.1-c) は血清テストステロンの去勢後の経時的変動を示している。去勢後24時間では有意に減少していた。これらの結果より, 側背葉は腹葉と比較して, 前立腺重量, 核酸含量, 可溶性蛋白量の変動からみると, 内因性アンドロジェンへの依存性がやや弱いようであるが, EMBP は腹葉と同様アンドロジェンに大きく依存していると思われる。

2) Estradiol-17 β valerate 投与中及び投与中止後の前立腺と血清テストステロンの変化

9週令ラットに2 mg の Estradiol-17 β valerate 週1回の皮下注射を2回行い, 2回目の皮下注射から1週後, 4週後, 6週後にそれぞれラットを剖殺して前立腺の重量, DNA, RNA, サイトソール蛋白, EMBP 含有を測定した (Table.1)。対照群として, 1つは無処理9週令ラット群 (Group I), もう1つは Estradiol-17 β valerate の代わりに vehicle を皮下注射し, 剖殺時16週令のラット群 (Group V) である (Fig.2)。まず, 前立腺腹葉をみると, 2回目の Estradiol-17 β valerate 注射から1週後 (Group II) には, 重量, DNA, RNA, サイトソール蛋白, EMBP 含量のすべてが有意に減少した。エストロジェン処理前 (Group I) の値を100%とすると, それぞれ22.4%, 55.5%, 12.3%, 13.7%, 4.4%であった。4週後 (Group III) には, 重量, DNA, RNA, サイトソール蛋白, EMBP 含量は全て有意に回復し始め, 6週後 (Group IV) にはこれら全ての値は対照群の9週令ラットの値 (Group I) を越え, 16週令ラット (Group V) の値に近づいた。次に前立腺側背葉についてみると, 2回目の Estradiol-17 β valerate 注射から1週後 (Group II) には, 重量, DNA, RNA, サイトソール蛋白, EMBP 含量はともに有意に減少し, それぞれエストロジェン処理前 (Group I) の52.8%, 84.6%, 57.5%, 51.0%, 7.1%であった。EMBP 含量の減少率は腹葉と比べ同等であったが, 重量, DNA, RNA, サイトソール蛋白の減少率は腹葉より小さかった。2回目エストロジェン注射から4週後 (Group III) には全ての値は1週後 (Group II) に比べ有意に増加し, 6週後 (Group IV) にはその増加の程度が更に増した。特に EMBP 含量の増加が著しく, 1週後 (Group II) の値の82.8倍にまで達した。なお対照群16週令ラット (Group V) の EMBP 含量は9週令ラット (Group I) と比較して有意の低値 ($p < 0.001$) を示したが, この現象は腹葉には見られなかった。Fig.2-c) は各群ラットの剖殺時の血清テストステロン値を示している。1週後

a) Ventral Prostate

Fig. 1

Effect of castration on rat prostate and serum testosterone.

9 week old rats were castrated and sacrificed at 1, 3 and 14 days after castration. Each bar represents mean $\pm$ S.E.

vs 9 week old rats (0 day),
 a = $p < 0.05$, b = $p < 0.01$,
 c = $p < 0.001$.

b) Dorsolateral Prostate

c) Serum Testosterone

(Group II) のテストステロン値はエストロゲン処理前 (Group I) の値に比べて有意に減少している。実測値は $0.271 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$ であった。4週後 (Group III) にはエストロゲン処理前値の 57.6% にまで回復し、6週後 (Group IV) にはほぼエストロゲン処理前値にもどっていた。

3) 前立腺重量, EMBP 含量, 血清テストステロン値の週令による変動

Fig.2で示したように、前立腺腹葉では16週令ラット (Group V) のEMBP 含量が6週令ラット (Group I) のそれに比べて有意な増加 ($p < 0.05$) を示し、前立腺側背葉では16週令ラットの EMBP 含量は9週令に比べ有意に低下していた ($p < 0.001$)。このことより前立腺 EMBP 含量は週令によって大きく変動すること、及び変動の様式が腹葉と側背葉では異なることが予測された。そこで、前立腺重量, EMBP 含量, 血清テストステロン値の週令による変動を詳細に検討した (Fig. 3)。前立腺重量についてみると、腹葉では生後7週より急激に増加し生後11週から14週にかけてピークを形成した後に、少しずつ減少し始め、生後44週には12週令の74.2% となった。これは最高値を示した12週令の値に比べて有意の減少であった ($p < 0.01$)。一方、側背葉重量は生後7週より急激に増加するが、生後10週以降は、腹葉とは異なり、減少することなく緩徐な増加傾向を示した。このように週令による前立腺重量の変動は腹葉と側背葉で大きく異なっていた。Fig.3-b) は前立腺 EMBP 含量の週令による変動を示している。腹葉の EMBP 含量は生後9週までは比較的急激に増加し、以後ゆっくりと増加し続け、生後44週には4週令の216% であった。前立腺側背葉の EMBP 含量は、腹葉とは全く異なった変動を示した。即ち、生後15週までは大きく変動しながら高値をとり、生後16週以降は15週以前とは対照的に、全く変動せずに低値を取りつづけた。血清テストステロン値 (Fig.3-c) は生後8週をピークとし、以後週令を経るにつれ漸減し、44週令血清テストステロン値は最高値の28% であった。

Table 1 Experimental schedule.

Fig. 2

The involution of rat prostates after estrogen treatment and the recovery process after cessation of estrogen treatment. Each bar represents mean $\pm$ S.E.

Group I: Intact 9 week old rats.

Group II: One week after the second injection of E_2 -17 β valerate.

Group III: Four weeks after the second injection of E_2 -17 β valerate.

Group IV: Six weeks after the second injection of E_2 -17 β valerate.

Group V: Intact 16 week old rats.

a = $p < 0.05$ vs Group I.

b = $p < 0.01$ vs Group I.

c = $p < 0.001$ vs Group I.

d = $p < 0.05$ vs Group I.

e = $p < 0.01$ vs Group II.

f = $p < 0.001$ vs Group II.

Fig. 3

Changes in the prostate weight, EMBP concentration and serum testosterone level throughout life. Each point represents mean $\pm$ S.E.

考 察

今回、我々はラット前立腺腹葉および側背葉の EMBP への内因性アンドロジェンの影響について、重量、DNA、RNA、サイトソール蛋白含量を対比させつつ、検討を加えた。前立腺腹葉 EMBP への去勢および外因性アンドロジェンの影響については D. Bossyns らが詳細に検討している²⁾。それによると、EMBP の生合成は正常群に対し、去勢3日後には30%、去勢7日後には5.5%にまで低下した。去勢により低下した生合成は0.5mg testosterone propionate を連日皮下注射することによって、5日目には正常群の70%にまで回復した。又、EMBP は各々が分子量約20,000の2つの subunits (A と B) から成り、2つの subunits は3つの components から成っている ($A=C1+C3$, $B=C2+C3$)⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。これら3 components に対応する mRNA はすべて去勢7日後には約2%にまで減少するが、テストステロンを投与することにより速かに増加を開始する²⁾。このように、前立腺腹葉 EMBP のアンドロジェン依存性については明らかになってきているが、微量ながら存在する側背葉 EMBP のアンドロジェン依存性については、今の所報告がない。今回の我々の検討結果は、側背葉 EMBP 含量が去勢により低下し、エストロジェン投与中止後に前立腺重量、血清テストステロン濃度の回復に伴って、再増加してくることを明らかにした。このことは、側背葉 EMBP もまたアンドロジェン依存性を明らかに有していることを示し、内因性アンドロジェンにより生合成が調節を受けていることを示している。生後16週以降の前立腺側背葉では EMBP 含量が減少してきている。細胞内においてアンドロジェン依存性の種々の代謝活性が低下してきているにもかかわらず、側背葉重量は減少してこない。むしろ増加の傾向さえみられるということ (Fig.3) は、生後16週以降の前立腺側背葉の増殖および機能の調節にアンドロジェン以外の因子が存在することを示唆している。このようにラット前立腺腹葉と側背葉の増殖および機能の調節機構には若干異なる所があることを予測させる。最近、Belis と Durham¹⁾は、去勢ラットにエストロジェンとプロゲステロンの同時投与は側背葉重量を回復させるが、腹葉重量には全く影響を与えず、また同時投与は側背葉のみにプロテインカイネース活性と内因性プロテイン磷酸化に変化をおこすことを観察している。このことより、彼等はラット前立腺側背葉には、アンドロジェン非依存性の細胞内代謝活性、細胞増殖の調節機構も存在しているのではないかと推測している。今回の我々の研究結果および他の研究者によって報告されている結果は、前立腺腹葉と側背葉の比較検討を基礎においた前立腺における細胞増殖および機能の調節機構について答えを与えてくれる可能性があることを示唆している。

結 語

- 1) 側背葉 EMBP 含量は腹葉と同様に、去勢により低下し、エストロジェン投与中止後の前立腺重量、血清テストステロン濃度の回復に伴って再増加する。このことは、側背葉に微量存在する EMBP もアンドロジェン依存性を有していることを示している。
- 2) 前立腺重量の週令変動は、腹葉では生後7週より急激に増加し始め、11週から14週にかけてピークを形成し、その後徐々に減少する。側背葉では生後7週より増加し始めるが、10週以降は、減少することなく、緩徐な増加傾向を示す。
- 3) 週令による EMBP 含量の変動は腹葉と側背葉では大きく異なる。腹葉は生後9週までは比較的急激に増加し、以後緩徐に増加しつづけ、生後44週には4週令の216%である。一方側背葉は、生後

15週までは大きく変動しながら高値をとり、生後16週以降は全く変動せずに低値をとりつづける。血清テストステロン値の変動をみると、生後8週をピークとし、以後週令を経るに従って漸減し44週令の値は最高値の28%である。

4) 上記の結果(2.3)は生後16週以降の側背葉の増殖および機能の調節にはアンドロゲン以外の因子が存在することを示唆している。

謝 辞

本研究に要した経費の一部は文部省科学研究費(02454367)によった。なお、本論文の一部はSatellitesymposium “sex steroid dependent tumors” in 8th international congress of endocrinology, 1988. で発表した。

文 献

- 1) Belis, J.A. and Durhum, J.P.: Estradiol-progesterone-induced growth of the rat dorsolateral prostate: effects on protein phosphorylation. *Prostate*, 14: 221-236, 1989.
- 2) Bossyns, D., Delaey, B., Rombauts, W. and Heyns, W.: Influence of castration and androgen treatment on the synthesis of prostatic binding protein and the concentration of its mRNA in the rat ventral prostate. *J. Steroid Biochem.*, 24: 661-668, 1986.
- 3) Forsgren, B., Bjork, P., Carlstrom, K., Gustafsson, J.A., Pousette, A. and Horgberg, B.: Purification and distribution of a major protein in rat prostate that binds estramustine, a nitrogen mustard derivative of estradiol-17 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3149-3153, 1979.
- 4) Hogberg, B.: Estramustine-binding protein. *Acta Urol. Belgica*, 48: 123-132, 1980.
- 5) Huchinson, W.C., Downie, E.D. and Muro, H.N.: Factors affecting the Schneider procedure for estimation of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 55: 561-570, 1962.
- 6) Laurell, C.B.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 15: 45-52, 1966.
- 7) Liao, S., Chen, C. and Huang, I-Y.: Prostate α -protein. Complete amino acid sequence of the component that inhibits nuclear retention of the androgen-receptor complex. *J. Biol. Chem.*, 257: 122-125, 1982.
- 8) Lowery, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.F. and Radall, R.J.: Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 9) 牧野拓雄, 稲富顕二, 吉田孝雄, 田 根培, 高木繁夫, 神戸川明: 性ステロイドホルモンの radioimmunoassay (その4). *ホルモンと臨床*, 21: 867-873, 1973.
- 10) Peeters, B., Rombauts, W., Mous, J. and Heyns, W.: Structural studies of rat prostatic binding protein. The primary structure of its glycosylated component C3. *Eur. J. Biochem.*, 115: 115-121, 1981.
- 11) Peeters, B., Heyns, W., Mous, J. and Rombauts, W.: Structural studies of rat prostatic binding protein. The primary structure of component C1 from subunit F. *Eur. J. Biochem.*, 123: 55-62, 1982.
- 12) Peeters, B., Heyns, W., Mous, J. and Rombauts, W.: Structural studies of rat prostatic binding protein. The primary structure of component C2 from subunit S. *Eur. J. Biochem.*, 132: 669-679, 1983.
- 13) Pousette, A.,

Bjork, P., Forsgren, B. and Carlstrom, K.: Mouse monoclonal antibodies against rat estramustine binding protein. *J. Steroid Biochem.*, 26: 509-512, 1987.

14) Schneider, W.C.: Determination of nucleic acids in tissue by pentose analysis. *Methods Enzymol.*, 3: 680-684, 1960.

15) 山中英寿, 湯浅久子, 小屋 淳, 中井克幸, 上原尚夫, 古作 望, 松村嘉夫, 志田圭三: ラット前立腺 EMBP の性状. *ホルモンと臨床*, 30: 1113-1117, 1982.

16) Yuasa, H., Yamanaka, H., Imai, K., Mashimo, T. and Kohno, H.: Purification of 45KDa estramustine binding protein (EMBP) and preparation of its antibody. *Acta Urol. Jpn.*, 36: 121-125, 1990.

(受付日: '90.10. 6)

(採択日: '90.12.20)