骨芽細胞UMR106-01の 5α -reductase活性に対する estradiolの影響

昭和大学産科婦人科学教室

諏訪 八大, 藤川 浩, 下平 和久,
大倉 史也, 斎藤 裕, 矢内原 巧

Effect of Estradiol on 5α -reductase Activity in Osteoblast-like Cell (UMR106-01)

Hachidai SUWA, Hiroshi FUJIKAWA, Kazuhisa SHIMODAIRA,
Fumiya OOKURA, Hiroshi SAITO and Takumi YANAIHARA

Department of Gynecology and Obstetrics, Showa University School of Medicine

Bone is known to be a target organ of not only estrogens, but also androgens. The mechanism by which these steroids exert their action on bone cells is still poorly understood. In the present study, the effect of 17β -estradiol (E_2) on 5α -reductase activity, converting testosterone (T) to a more potent biological androgen, dihydrotestosterone (DHT), was assessed in an osteoblast-like cell line of rat origin (UMR106-01). Cells were incubated under standardized conditions with varying concentrations of E_2 (10^{-12} - 10^{-6} M) for 48 hours. Incubation medium was replaced when the cells were confluent and thereafter at 24 hour intervals. Then the cells were harvested. Each cell homogenate was incubated with $[4-^{14}C]$ -T. DHT was detected as a single metabolite on silicagel thin layer chromatography. 5α -reductase activity was determined by measuring the amount of labeled DHT from T. The radiochemical purity of DHT recovered after incubation was confirmed by recrystallization to constant specific activity. Under the conditions used, no estrogen was detected. Production of insulin-like growth factor-I and alkaline phosphatase in UMR106-01 was increased when E_2 was added into the culture medium, however, 5α -reductase activity was significantly decreased by the addition of 10^{-12} M to 10^{-6} M of E_2 . Maximum inhibition was noticed at 10^{-10} M. Our results demonstrate that UMR106-01 cells have a capacity to transform T into the biologically more potent androgen, DHT. The result, that the enzyme activity was influenced by E_2 , suggests the regulatory mechanism of both sex steroids on the steroid metabolism in osteoblasts.

Keywords: osteoblast-like cell, androgen metabolism, estradiol, UMR106-01, 5α -reductase

緒 言

近年, 退行性骨粗鬆症の発症は閉経後の女性のQuality of lifeを左右させる原因の一つとして注目されている。従来より女性では閉経を期に急激に骨塩量が減少することから, 骨の吸収に卵巣性ステロイドであるエストロゲンの消退が強く関与することが知られている。さらに閉経後の骨粗鬆症患者にエストロゲン¹⁾を補充したり蛋白同化ステロイド²⁾を投与することにより, 骨塩量が増加し骨粗鬆症が改善される一方, 性腺不全症による骨粗鬆症男性³⁾に対してのtestosterone (T) 投与の有効性⁴⁾が報告されており, エストロゲンのみ

ならずアンドロゲンの骨代謝における役割は重要なものとなっている。

近年, 骨芽細胞に性ステロイドに対する受容体が証明され^{4)~7)}, 性ステロイドの標的臓器としてその機能に直接関与している可能性が考えられている。一方, 骨芽細胞においてアンドロゲンよりエストロゲンへの生成を司るaromatase活性⁸⁾⁹⁾の存在が報告されており, 他方, androstenedione (A) からより生物学的活性の強いアンドロゲンであるdihydrotestosterone (DHT) への転換に関与する5 α -reductase活性が骨芽細胞様細胞で確認された¹⁰⁾ことから, 骨芽細胞はステロイド生成代謝能を有し, 細胞の機能調節に積極的に関与すると考えられている。

骨芽細胞の培養細胞にエストロゲンを投与することによりalkaline phosphatase (ALP) 活性が上昇し¹¹⁾¹²⁾, insulin-like growth factor-I (IGF-I) やtransforming growth factor- β (TGF- β) のmRNAの発現が促進するなど¹³⁾¹⁴⁾, エストロゲンは骨形成に対して促進的に働くことが知られている。しかしながらエストロゲンが骨芽細胞自身のステロイド代謝にどのように影響するかは不明である。今回, ラット骨肉腫由来の骨芽細胞株UMR106-01を用いた培養実験にて5 α -reductase活性の有無を検討し, さらに本酵素活性に対する17 β -estradiol (E₂) の影響を検討した。

方 法

1) 試薬

細胞培養に用いたfetal bovine serum (FBS) およびDulbecco's modified Eagle's medium (dMEM) はGIBCO社より, phosphate-buffered saline (PBS) は, 宝酒造より購入した。標識ステロイド[4-¹⁴C]-T (SA=2.2GBq/mmol) および [1, 2, 4, 5, 6, 7-³H (N)]-DHT (SA = 4.55TBq/mmol) は, New England Nuclear Corp. (Boston, MA) より入手した。各種ステロイドの標準品はSIGMA社製を, ステロイドの分離には薄層クロマトグラフィーsilicagel 60F (MERCK社) を用いた。IGF-Iは, IGF-I [¹²⁵I] RIAセット (Amersham社) により測定した。その他の有機溶媒などの試薬は特級を用いた。

2) 細胞培養

UMR106-01細胞は10% (v/v) FBS, penicillin (0.1unit/ml) およびstreptomycin (100 μ g/ml) を含むdMEMにて, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-95% airの条件で直径10cmのplastic dish (Nunc社) に継代培養した。5~8日間培養の後, confluentになった状態で培養液上清を除去し, 細胞を機械的にスクレープした。得られた細胞は0.05M tris-HCl buffer (pH = 7.4) を加え氷冷中にて超音波破砕器 (IWAKI HOM-100, 出力10Wで5秒間3回) でホモジェネートした後, -80 $^{\circ}$ Cにて実験まで凍結保存した。次にE₂添加による影響を見るために, 継代後約5日目の細胞の上清を除去しPBSにて2回洗浄した後に, 各濃度 (10⁻¹²~10⁻⁶M) のE₂を含むdMEM培地 (FBS, phenol red無添加条件) に交換し培養した。24時間後に各濃度の新しい培地に交換し, さらに24時間培養した後に細胞を回収, 冷凍保存した。

3) インキュベーション

基質として [4-¹⁴C]-T (300,000dpm, 50 μ M) を用い, cell free homogenateを酵素源 (600 μ g蛋白) として加え, NADPH存在下で37 $^{\circ}$ C, 120分インキュベーションを行った。酵素反応は水飽和ジクロロメタン3mlを加えて停止させた。標準T, DHTさらに純水200 μ lを加え, 回収率補正用の [³H]-DHTを250,000dpm添加して十分に振盪混和した後に遠心分離し, ジクロロメタン層を回収, N₂ガスにて蒸発乾固させた。抽出した放射性代謝物はメタノールにて溶解した後, 薄層クロマトグラフィー (ベンゼン:メタノール=9:1) にて展開分離し, その検出はオートラジオグラフィーによった。標準物質はI₂ガスにより発色させ, 標準DHTと同Rf値の放射性代謝物を薄層プレートよりかき取り, 測定した放射能よりDHT生成量を求め酵素

活性とした。放射能の測定はAloca LSC-651 液体シンチレーションカウンターを用いた。放射性代謝生成物の同定は再結晶法によった。蛋白量は色素法¹⁹を用いて測定した。

4) 培養液中のIGF-I濃度およびALP活性の測定

24時間の細胞培養で培養液中に産生されたIGF-I濃度はRIA kitにて、ALP活性はベッシー・ローリーの変法により測定した。

統計の処理はStudentのt-testを用いた。

結 果

1) UMR106-01細胞における5 α -reductase活性

UMR106-01細胞のホモジェネートを酵素源とし、[¹⁴C]-Tとインキュベーションした際の放射性代謝物はオートラジオグラム上、単一のスポットとして検出され、本実験条件ではDHTが単一生成物として生成されることが確認された(図1)。放射性代謝生成物の同定は再結晶法によった。生成物DHTは3段階の結晶のspecific activityがほぼ5%以内に一致したことにより同定された(表1)。

Fig. 1 Autoradiogram of TLC
Substrate ; Testosterone
Solvent System ; Benzene : MeOH = 9 : 1

Table 1 Radiochemical purity of labeled steroids derived from incubation experiment of UMR106-01

^{14}C labeled product	original	Crystallization			
		X-1	X-2	X-3	ML-3
Dihydrotestosterone	1,171	1,258	1,165	1,268	1,237
Solvent used		Methanol	Ethanol	Isopropyl Alcohol	

Specific activities expressed as dpm/mg

Fig. 2 Production of dihydrotestosterone from testosterone in UMR106-01

Table 2 Effect of estradiol on 5 α -reductase activity, ALP and IGF-I production in UMR106-01

estradiol concentration (M)	5 α -reductase activity (pmol/mg protein/hour)	ALP accumulation (IU/10 ⁵ cells)	IGF-I concentration (ng/10 ⁵ cells)	
0	14.70 $\pm$ 0.37	15.3 $\pm$ 2.0	107.8 $\pm$ 14.1	
10 ⁻¹²	10.20 $\pm$ 0.53**	20.1 $\pm$ 0.4*	115.3 $\pm$ 23.1	
10 ⁻¹⁰	9.21 $\pm$ 0.02**	22.3 $\pm$ 4.3*	142.7 $\pm$ 7.4*	
10 ⁻⁸	9.60 $\pm$ 0.26**	15.5 $\pm$ 4.4	122.0 $\pm$ 15.7	*(p<0.05)
10 ⁻⁶	10.17 $\pm$ 1.18*	18.4 $\pm$ 3.2	146.3 $\pm$ 27.5	** (P<0.001)
(mean $\pm$ SD)				

Cell culture was repeated three times in 5 dishes of each concentration of estradiol.
Culture media was combined and ALP and IGF-I concentration was measured.
Cells were harvested and incubation was performed triplicate.

インキュベーション時間を15から240分まで変化させたときのDHT産生量の変化を図2 左に、蛋白量を0.25から1.25mgまで変化させたときのDHT産生量を図2 右に示す。DHTの生成量はインキュベーション時間が60分まで、また蛋白量が0.5mgまで時間および用量依存性に直線的に増加した。

2) E₂添加によるUMR106-01の5 α -reductase活性、培養液中IGF-IとALP産生への影響

各種濃度のE₂を培養液中に添加し48時間培養した際のUMR106-01の5 α -reductase活性と細胞培養液中に産生されたALPおよびIGF-I濃度の変化を表2に示した。E₂無添加時の5 α -reductase活性は14.7 $\pm$ 0.4pmol/mg protein/hourであったが、E₂添加にて本酵素活性は抑制され、10⁻¹⁰MのE₂添加では9.2 $\pm$ 0.1pmol/mg protein/hourと無添加時の約63%まで有意 (p<0.001) に低下した。

また、E₂を培養液中に添加し培養液中に産生されたIGF-I、ALP濃度をE₂無添加群と比較すると、ALP濃度はE₂の添加10⁻¹²Mから10⁻¹⁰Mにかけて有意 (p<0.05) に上昇し、またIGF-I濃度は10⁻¹⁰MのE₂添加により有意 (p<0.05) に増加し、両者とも生理的濃度範囲でのE₂添加によりその産生増加がみられた。

考 察

1988年、骨芽細胞にエストロゲン続いてアンドロゲン受容体が証明されて以来⁴⁻⁷⁾、骨芽細胞の機能に性ステロイドが積極的に関与することが明らかとなった。従来の骨におけるsteroidogenesisの有無を検討した報告では、Vittekkら¹⁰⁾はラットの下顎骨ホモジェネートを用いてTを基質としてインキュベートした際いくつかの放射性代謝物を認めたが、主生成物は5 α -reduced compoundsであったと報告している。一方、Turnerら¹¹⁾はラット脛骨より得た骨芽細胞の単層培養において、TよりDHTの産生は認められなかったと報告しているが、近年Bruchら¹⁰⁾は閉経期女性の骨盤骨より得られた骨芽細胞の培養系において、medium中に添加したAよりTおよびDHTへの転換、すなわち17 β -hydroxysteroid dehydrogenaseと5 α -reductase活性

の存在を初めて報告した。またDHTは骨芽細胞の細胞数を用量依存性に増加させ¹⁸⁾, α_1 (I)-procollagenとTGF- β のmRNAのレベルを有意に増加させるという報告¹⁹⁾があることを考え合わせると, 骨芽細胞自体がアンドロゲンの代謝能を有し, アンドロゲンが骨形成に関与していることを示唆している。今回, 我々はラット骨肉腫由来の骨芽細胞株UMR106-01の細胞ホモジェネートを用いて本細胞株が5 α -reductase活性を有することを初めて示した。また, その生成量は時間および容量依存性に増加した。ヒト骨芽細胞培養株HOS, MG-63を用いた細胞培養系でaromatase活性を認めたとする報告があるが^{8,9)}, 今回UMR106-01を用いた本実験条件下ではDHTが単一の生成物として認められたのみでエストロゲンの産生はみられなかった。これらの成績の差異は用いた細胞培養系や実験方法の違いによると考えられるが, これは骨芽細胞のステロイド産生能における多様性を示唆するものと思われる。

次に培養液をphenol red freeの無血清培地に交換し, 各種濃度のE₂を添加して5 α -reductase活性, 培養液中へのIGF-IおよびALPの放出の影響を検討したところ, E₂添加により本酵素活性は抑制され, E₂の生理的濃度と目される10⁻¹⁰M添加で無添加時の約63%と有意に減少した。今回培養液中に放出されたIGF-IおよびALP濃度を測定したところ, 生理的濃度のE₂添加によりそれらの産生が有意に増加するという従来の報告と同様¹¹⁾⁽¹²⁾⁽²⁰⁾10⁻¹⁰MのE₂添加によりIGF-I, ALPは共に産生増加を示した。本成績は本条件下でのUMR106-01細胞培養が本来の骨芽細胞としての機能を保っていることを意味しており, E₂添加による本酵素活性に対する抑制作用がcytotoxicなものではないと考えられた。従来より5 α -reductaseは生理活性の強いアンドロゲンであるDHTの生成を司る酵素として知られており, 前立腺, 外陰皮膚などのアンドロゲン標的臓器のみならず, 線維芽細胞, 肝などの各種臓器に局在が認められる^{21)~28)}。E₂の5 α -reductase活性に対する影響については, ラットおよびヒトの前立腺の5 α -reductase活性はE₂により抑制されるか²³⁾⁽²⁴⁾変化を認めないか²¹⁾⁽²²⁾, ラット肝の本酵素活性はE₂添加により増加する²⁷⁾⁽²⁸⁾など種々の報告がある。近年, ヒト前立腺と皮膚由来線維芽細胞における5 α -reductaseのcDNAが別々にクローニングされ, 両酵素はisozymeであり, さらにラットのそれと異なることより種差が存在することが明らかにされている²⁹⁾⁽³⁰⁾。ラット骨芽細胞においての5 α -reductaseがどのような性質を有しているのかについては今後の検討課題であるが, 今回の成績よりUMR106-01細胞はアンドロゲン代謝能を有することが明らかとなり, さらに, その酵素活性はエストロゲンによって調節されている可能性が示され, 新たな骨芽細胞の機能調節機構への性ステロイドの関与が推察された。5 α -reduced steroidはもはやエストロゲンに転換しないことから, 骨芽細胞におけるアンドロゲンの代謝能はエストロゲンを介したものでない可能性を本実験成績は示唆している。DHTが骨芽細胞の増殖亢進作用を有しているという報告¹⁸⁾から骨形成に関与していることが考えられるが, エストロゲンの骨形成に及ぼす影響については明らかでない。Banksonら¹²⁾はUMR106-01を用いた培養実験でE₂添加により細胞数の増殖が抑制されたことを報告している。一方卵巣摘出ラットの骨梁から分離した骨芽細胞¹³⁾, および新生児ラット頭蓋冠細胞³¹⁾ではE₂は細胞増殖作用を有すると言われる。

臨床的には閉経期に代表されるエストロゲン欠乏状態では破骨細胞と共に骨芽細胞の増殖が亢進し, 骨代謝回転は促進すると言われている³²⁾⁽³³⁾。生理的濃度のエストロゲンが骨芽細胞の5 α -reductase活性を抑制する本成績は, 閉経期以降のエストロゲン低下が本酵素活性の抑制を解除するとも考えられる。骨における性ステロイドの生理作用については不明な点が多く, このステロイド自体による代謝調節のもつ意味については今後さらに検討を要するものと考えられる。

本論文の要旨は第67回日本内分泌学会学術総会で発表した。

文 献

- 1) Barzel US. Estrogens in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: A review. *Am J Med* 1988;85:847-850
- 2) Chesnut III CH, Ivey JL, Gruber HE, Matthews M, Nelp WB, Sisom K, Baylink DJ. Stanozolol in postmenopausal osteoporosis: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. *Metabolism* 1983;32(6):571-580
- 3) Baran DT, Bergfeld MA, Teitelbaum SL, Avioli LV. Effect of testosterone therapy on bone formation in an osteoporotic hypogonadal male. *Calcif Tiss Res* 1978;26:103-106
- 4) Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988;241:84-86
- 5) Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 1988;241:81-84
- 6) Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:854-857
- 7) Orwoll ES, Stribrka L, Ramsey EE, Keenan EJ. Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcif Tissue Int* 1991;49:183-187
- 8) Tanaka S, Haji M, Nishi Y, Yanase T, Takayanagi R, Nawata H. Aromatase activity in human osteoblast-like osteosarcoma cell. *Calcif Tissue Int* 1993;52:107-109
- 9) Purohit A, Flanagan AM, Reed MJ. Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology* 1992;131(4):2027-2029
- 10) Brunch HR, Wolf L, Budde R, Romalo G, Schweikert HU. Androstenedione metabolism in cultured human osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75(1):101-105
- 11) Gray TK, Flynn TC, Gray KM, Nabell LM. 17β -estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6267-6271
- 12) Bankson DD, Rifai N, Williams ME, Silverman LM, Gray TK. Biochemical effects of 17β -estradiol on UMR106 cells. *Bone and Mineral* 1989;6:55-63
- 13) Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 1989;125(2):825-833
- 14) Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, Spelsberg TC. Modulation of transforming growth factor- β production in normal human osteoblast-like cells by 17β -estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1991;129(6):3313-3320
- 15) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254
- 16) Vittek J, Altman K, Gordon GG, Southren AL. The metabolism of 7α - 3 H-testosterone by rat mandibular bone. *Endocrinology* 1974;94:325-329
- 17) Turner RT, Bleiberg B, Colvard DS, Keeting PE, Evans G, Spelsberg TC. Failure of isolated rat tibial periosteal cells to 5α reduce testosterone to 5α -dihydrotestosterone. *J Bone Mineral Res* 1990;5(7):775-779
- 18) Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 1989;124(3):1576-1578
- 19) Benz DJ, Haussler MR, Thomas MA, Speelman B, Komm BS. High-affinity androgen binding and androgenic regulation of $\alpha_1(I)$ -procollagen and transforming growth factor- β steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1991;128(6):2723-2730
- 20) Gray TK, Mohan S, Linkhart TA, Baylink DJ. Estradiol stimulates in vitro the secretion of insulin-like growth factors by the clonal osteoblastic cell line, UMR106. *Biochem Biophys Res Comm* 1989;158(2):407-412
- 21) Faredin I, Toth I, Oszlanczy J, Scultety S. In vitro study of rat prostate 5α -reductase activity and its inhibition. *International Urology and Nephrology* 1992;24(2):145-154
- 22) Moore RJ, Wilson JD. The effect of androgenic hormones on the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Δ^4 -3-keto-steroid 5α -oxidoreductase of rat ventral prostate. *Endocrinology* 1973;93(3):581-592
- 23) Krieg M, Schlenker A, Voigt KD. Inhibition of androgen metabolism in stroma and epithelium of the human benign prostatic hyperplasia by progesterone, estrone, and estradiol. *Prostate* 1985;6:233-240
- 24) Makela S, Santti R, Martikainen P, Nienstedt W, Paranko J. The influence of steroidal and nonsteroidal estrogens on the 5α -reduction of testosterone by the ventral prostate of the rat. *J Steroid Biochem* 1990;35(2):249-256

- 25) Schweikert HU, Hein HJ, Romijn JC, Schroder FH. Testosterone metabolism of fibroblasts grown from prostatic carcinoma, benign prostatic hyperplasia and skin fibroblasts. *J Urol* 1982;127:361-367
- 26) Beckmann MW, Wieacker P, Dereser MM, Flecken U, Breckwoldt M. Influence of steroid hormones on 5α -reductase activity in female and male genital skin fibroblasts in culture. *Acta Endocrinol* 1993;128:161-167
- 27) Schriefers H. Factors regulating the metabolism of steroids in the liver. *Adv Biosci* 1969;2:69-90
- 28) Schriefers H. Factors regulating the metabolism of steroids. *Vitam Horm* 1967;25:271-314
- 29) Wilson JD. Metabolism of testicular androgens. *Handb Physiol* 1975;5(7)chapt25:491-508
- 30) Moore RJ, Griffin JE, Wilson JD. Diminished 5α -reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudo-hermaphroditism, type 2. *J Biol Chem* 1975;250(18):7168-7172
- 31) Ernst M, Schmid Ch, Froesch ER. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2307-2310
- 32) Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 1989;45:360-366
- 33) Malluche HH, Frugere MC. Role of calcitriol in the management of osteoporosis. *Metabolism* 1990;39(Suppl 1):24-26

(受付日: '95. 1.25)

(採択日: '95. 2.24)

特 別 掲 載