オートラジオグラフィによる前立腺組織中のアンドロゲン・ レセプター定量の試み

福島県立医科大学泌尿器科学教室 片 寄 功 一
(主任: 白岩康夫教授)

AUTORADIOGRAPHIC ANDROGEN BINDING DETECTION OF PROSTATIC TISSUE CORRELATED WITH BIOCHEMICAL ASSAY

Koichi Katayose

Department of Urology, Fukushima Medical College

(Director: Prof. Yasuo Shiraiwa)

Current methods for measurements of androgen receptors are primarily biochemical. However, the biochemical method requires relatively large amounts of tissue and is hardly applicable to the biopsy specimen. In the present study, we developed an autoradiographic technique for detection of androgen binding and compared this method with the biochemical measurement.

Human prostatic tissues were obtained from patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer at the time of operation. Each specimen was divided into two portions; one for autoradiographic analysis, the other for biochemical assay. For autoradiographic study, frozen tissue sections were incubated in PBS containing ^3H -R1881 (Synthetic androgen) and processed for microautoradiography.

The results showed that silver grains were mainly localized in the epithelium of the prostate. The number of grains was significantly decreased by addition of excess unlabelled R1881. A grain density of the epithelium was determined by counting the grain number within the unit area. This value was compared with the concentration of R1881 binding sites obtained from the biochemical assay. Statistical analysis showed a significant correlation between the two assay systems ($r=0.946$, $p<0.01$).

These results indicate that the autoradiographic technique is a useful method to determine the androgen binding sites in prostatic tissue.

要旨: オートラジオグラフィにより, ヒト前立腺組織中のアンドロゲン・レセプターの局在を検討した。また同時に dextran coated charcoal 法によるレセプター・アッセイを行い, 両者の成績を比較検討した。

手術時に得られたヒト前立腺組織(正常・肥大・癌)から凍結切片を作成, ^3H 標識 R1881 (合成アンドロゲン) を含む PBS 溶液でインキュベートし, ディッピング法によりオートラジオグラムを作成した。

R1881の結合部位を示す grain は主として前立腺上皮細胞の胞体内に局在がみられ, 過剰量非標識 R1881の添加により著明に減少した。各症例について全結合(標識 R1881のみでインキュベート)と非特異的結合(標識 R1881+過剰量非標識 R1881でインキュベート)の2枚のオートラジオグラムを作成し, 単位面積あたりの grain 数を数え, 両者の差から特異的結合を算定した。このオートラジオグラフィによる R1881の特異的結合部位数は症例により差を認め, その値はレセプター・アッセイによるサイトソール中の結合部位数と相関を認めた($r=0.946$, $p<0.01$)。これはオートラジオグラフィにより, アンドロゲン・レセプターの定量的検討も可能であることを示すものである。さらに本法は組織像と対比しながらレセプターを検索できるという利点も有しており, レセプター研究のうえで有用な方法であると考えられた。

緒 言

ステロイドホルモンは、その標的細胞内のレセプター蛋白との結合を介して、生理作用を発現すると考えられている¹⁾。ヒト前立腺はアンドロゲンの標的臓器であり、肥大症や癌などの病的状態でもアンドロゲンが重要な役割を担っているとの観点から²⁾、アンドロゲン・レセプター（以下 AR と略す）についての検討がなされてきた³⁾⁴⁾。しかし AR 測定のため、血液あるいは組織由来の sex hormone binding globulin (SHBG) の混入が問題であったが⁴⁾、近年 AR に高い親和性を有し SHBG に結合しない合成ステロイド、R1881 (Methyltrienolone) が開発された⁵⁾。そして R1881 を ligand とする receptor assay が諸家により検討され^{6)~7)}、前立腺組織ホモジネートの cytosol ならびに核抽出液 (nuclear extract) 中に AR の存在が報告されている。

これら AR に関する研究はほとんど生化学的手法によりなされているが、組織学的に追求された報告は極めて少なく⁸⁾⁹⁾、また方法論のうえでも未解決の部分が多いのが現状である。そこで著者は R1881 を用いたオートラジオグラフィにより、in vitro でヒト前立腺組織内の AR を形態学的に同定する方法を検討した。また同時に dextran coated charcoal 法による AR の receptor assay を行い、両者の成績を比較検討したので報告する。

対象および方法

1) 対象

前立腺肥大症患者 8 例、未治療前立腺癌患者 4 例および対照の正常前立腺として膀胱癌患者 3 例を対象とした。年齢は前立腺肥大症群が 61 から 78 歳 (平均 70.7 歳)、前立腺癌群が 70 から 75 歳 (平均 72.0 歳)、膀胱癌患者は 68 歳から 71 歳 (平均 69.6 歳) であった。

2) 組織採取方法

肥大前立腺組織は恥骨上式前立腺摘出術により、前立腺癌組織は経恥骨式前立腺全摘術により採取した。また正常前立腺と膀胱癌組織は膀胱全摘術時に採取した。これら採取した組織は冷却した生食水にて洗浄、ただちに凍結し使用時まで -70°C で保存した。なお組織は原則的に隣接するように二分して、一方は radio-receptor assay に、一方はオートラジオグラフィに供した。

3) 標識および非標識ステロイド

標識ステロイド ^3H -R1881 (specific activity 87Ci/mmol) および非標識 R1881 は New England Nuclear

社のものを使用した。

4) dextran coated charcoal 法

cytosol と nuclear extract の調整は、Shain⁷⁾の方法に準じた (Fig. 1)。前立腺組織を細切し、TES buffer (50mM Tris-Cl, 0.1mM EDTA, 380mM sucrose, 0.5mM β -mercaptoethanol, pH 7.4) を加え、テフロンホモジナイザーにて氷冷下でホモジナイズした。homogenate を 5,000g, 4°C , 10 分間遠心後、その上清を 106,000g で 4°C , 60 分間遠心して cytosol 分画を得た。さらに DCC (dextran coated charcoal : 5% Norit, 0.5% dextran T70, 1% human γ -globulin in TE buffer) を 2,000g, 10 分間遠心し作成したペレットと、cytosol を混合、10 分間 incubate し、2,000g で 10 分間、10,000g で 10 分間遠心して遊離型内因性ステロイドを除去した。

また nuclear extract の調整は、はじめに 5,000g で 10 分間遠心したペレットに約 2 倍量の EM buffer (10mM Tris-Cl, 1.5mM EDTA, 0.5mM β -mercaptoethanol, pH 7.4) を加えて、5,000g, 4°C , 5 分間遠心を 3 回くり返し洗浄した。このペレットに EMK buffer (0.6M KCl in EM buffer) を加え、 4°C , 15 分間 incubate し、50,000g で 5 分間遠心、その上清を nuclear extract とした。残りのペレットは EMK buffer を加え、5 分間 incubation を 2 回くり返し、そ

Fig. 1 Procedure for biochemical assay of R1881 binding sites.

の上清をはじめ nuclear extract にあわせた。

receptor assay は cytosol または nuclear extract 100 μ l, TES または EMK buffer 20 μ l, 3 H-R1881 100 μ l (最終濃度 0.55~8.8nM) の系を全結合, buffer の代わりに 100 倍過剰の非標識 R1881 を加えた系を非特異的結合として, 4 $^{\circ}$ C, 2 時間 incubate した。incubation 終了後, 遊離の 3 H-R1881 を除くため DCC 100 μ l を加え十分に混和し, 4 $^{\circ}$ C, 20 分間 incubate 後, 2,000g, 10 分間遠心した (DCC 法)。上清 200 μ l をとりシンチレータ (Aquasol-2, NEN 社) を加え, 液体シンチレーションカウンターにて 10 分間放射活性を計測した。

全結合と非特異的結合の差から特異的結合を求め Scatchard plot analysis¹⁰⁾ により結合部位数 (number of binding sites: NBS), 解離定数 (dissociation constant: Kd) を求めた。

また蛋白定量は Lowry 法¹¹⁾, DNA 定量は Webb, Levy の方法¹²⁾ で行った。

5) オートラジオグラフィ

クライオスタットで厚さ 10 μ m の凍結切片を作成し, 卵白アルブミンスライド上に貼布した後に次の incubation を行った。50nM 3 H-R1881 を含む 0.05M リン酸緩衝食水 (PBS) 50 μ l を, スライドガラス上の切片に滴下し, 湿潤容器内で室温, 1.5 時間の incubation を行った。この後 PBS で十分に洗浄し, 10% 緩衝ホルマリン (pH 7.4) で固定, 再度 PBS で 30 分間洗浄し乾燥した。

次に dipping 法によりオートラジオグラフィ用感光乳剤 NR-M2 (小西六) を塗布し, 乾燥後シリカ・ゲルの入った暗箱内に入れ室温で 4 週間露出した。露出後, エースドール (小西六) で 20 $^{\circ}$ C 5 分間現像, エースフィクス (小西六) で 10 分間定着, 精製水で洗浄した。ヘマトキシリン染色を通常のごとく行い, 脱水, 封入して組織標本を作成した。

切片内における R1881 の非特異的結合は過剰量 (1,000 倍) の非標識 R1881 を加えた 3 H-R1881・PBS 溶液で incubate した切片で検討した。対照として PBS 溶液で incubate した切片で back ground を観察した。

成 績

1) dextran coated charcoal 法

肥大前立腺組織 8 例, 未治療前立腺癌組織 4 例, 膀胱癌症例より得られた 3 例の正常前立腺組織について, dextran coated charcoal 法による receptor assay を行った。上記対象の 15 例全例に対し Scatchard plot

analysis を施行し, cytosol ならびに nuclear extract 中の R1881 結合蛋白の NBS, Kd を測定した (Fig. 2)。Table 1 には, これらの測定結果を示す。cytosol 中の NBS 値は, 全例を通じて最低 0.8 から最高 8.5 fmol/mg. protein まで変動した。これらを組織型別にみると, 正常前立腺群で 1.43 ± 0.60 fmol/mg. protein (mean $\pm$ SD), 肥大前立腺群で 3.26 ± 2.30 fmol/mg. protein, 前立腺癌群で 3.60 ± 1.72 fmol/mg. protein であった。すなわち正常前立腺組織にくらべ, 肥大および癌組織では平均値が高い傾向を示した。しかし統計学上, 有意の差を認めなかった。一方, nuclear extract 中にも R1881 結合部位は存在し, DNA 1 μ g あたり 0.03 から 0.31 fmol の値を示した。nuclear extract 中の NBS も各群間で平均値に差があるが, これも統計学上有意ではなかった。

解離定数 (Kd) についてみると, cytosol では前立腺癌群の 0.5~1.5 (0.80 ± 0.47) nM が, nuclear extract では肥大前立腺群の 0.6~2.5 (1.20 ± 0.57) nM が他群に比して低値であったが, 統計学的に有意とはいえなかった。

2) オートラジオグラフィ

オートラジオグラムにおいて tracer の局在は現象銀粒子 (grain) として同定される。正常および肥大前立腺組織における 3 H-R1881 のオートラジオグラムで, grain は主として上皮細胞にみられ間質には少ない局在様式を呈した (Fig. 3)。また上皮細胞内でも grain は主に細胞質内に集中し核には乏しいが, 各細胞間での変動は少なくほぼ一様に分布していた。この grain

Fig. 2 Scatchard plot analysis.

Table 1. Content of R1881 binding sites in cytosol and nuclear extract of prostatic tissues.

Tissue	Age	Cytosol		Nuclear extract	
		NBS (fmol/mg.protein)	Kd (nM)	NBS (fmol/ μ gDNA)	Kd (nM)
normal prostate					
1	68	1.5	1.9	0.03	2.1
2	71	2.0	0.9	0.11	2.7
3	70	0.8	1.8	0.04	1.3
		1.43 $\pm$ 0.60	1.53 $\pm$ 0.55	0.060 $\pm$ 0.043	2.03 $\pm$ 0.70
benign prostatic hyperplasia					
4	77	1.3	0.7	0.14	1.4
5	70	1.5	1.3	0.11	1.1
6	71	3.6	0.7	0.06	0.6
7	78	3.0	0.5	0.17	2.5
8	75	8.5	1.3	0.19	0.9
9	61	1.8	1.3	0.14	1.1
10	68	3.6	3.2	0.31	0.9
11	66	2.8	0.8	0.12	1.1
		3.26 $\pm$ 2.30	1.23 $\pm$ 0.86	0.155 $\pm$ 0.074	1.20 $\pm$ 0.57
prostatic cancer					
12	70	3.6	0.6	0.14	1.0
13	75	3.4	0.5	0.16	0.8
14	70	1.6	1.5	0.08	2.1
15	73	5.8	0.6	0.11	4.2
		3.60 $\pm$ 1.72	0.80 $\pm$ 0.47	0.123 $\pm$ 0.035	2.03 $\pm$ 1.56

Fig. 3 Autoradiographic localization of ³H-R1881 binding in benign hyperplastic prostate (BPH) tissue. Epithelium are mainly labelled. ×600.

Fig. 4 BPH tissue incubated with ³H-R1881 and 1,000 fold molar excess of unlabelled R1881. Few grains are seen. ×600.

は過剰量の非標識 R1881添加により著明に減少した (Fig. 4)。R1881を含まない PBS 溶液で incubate した対照切片では非特異的結合のみであった。また androgen receptor をもたない膀胱癌組織でも非特異的

結合のみであった。したがって、R1881は receptor に対し特異的に結合していることが明らかとなった。
前立腺癌組織においては、grain は実質細胞内に集中し、主にその胞体内に局在を示した (Fig. 5)。

Fig. 5 Autoradiogram of prostatic cancer tissue. Grains are seen on tumor cells. $\times 600$.

次にオートラジオグラフィで処理した組織切片上の R1881結合の定量化を試みた。顕微鏡の光学系に grid の入ったレンズを装着し、切片上で一定面積 ($625\mu\text{m}^2$) を設定してその中の grain 数を上皮細胞部、間質部のそれぞれについて算定した。方法で述べたごとく、 ^3H -R1881で incubate した切片を全結合、 ^3H -R1881に過剰量非標識 R1881を加えて incubate した切片を非特異的結合として、両者の差から特異的結合を grain 数/単位面積で表わした。なお各 grain 数は at random に20カ所を数え、その平均値をとった。

はじめに肥大症組織を用いて、上皮細胞と間質部における結合の相違を検討した。

Table 2に示すように、上皮細胞部における特異的な結合は 10.4 ± 5.8 であるのに対し、間質部では全結合と非特異的結合の差がほとんどみられず、それぞれ 5.8 ± 1.5 /単位面積、 4.5 ± 0.2 /単位面積であった。

すなわち、間質部の特異的結合はわずか 1.3 ± 0.4 /単位面積であり、上皮細胞部の高い特異的結合と比較して無視できるほど少ないものであることが明らかとなった。

そこで上皮細胞に対する特異的結合を各症例について検討を加えた (Table 2)。正常前立腺組織における特異的結合の grain 数は、2.1から6.7まで変動し平均 3.9 ± 2.4 であった。肥大症組織では、特異的な結合の grain 数が正常組織よりも多く5.7から22.3までの値を示し、平均 10.4 ± 5.8 となり正常組織群との間に有意の差を認めた ($p<0.05$)。一方、癌組織でも1例を除いて結合 grain 数が多く、2.1から18.9まで分布し平均値は正常組織よりも高い 10.5 ± 6.9 であった。

3) オートラジオグラフィ法と DCC 法による

Table 2. Autoradiographic ^3H -R1881 binding in prostatic tissue sections.

Tissue	Patient No.	R1881 Binding (Grains/Unit Area)		
		Total	Non-specific	Specific
Normal prostate	1	6.1	4.0	2.1
	2	10.8	4.1	6.7
	3	6.8	3.8	3.0
		7.9 ± 2.5	3.9 ± 0.1	3.9 ± 2.4
Benign prostatic hyperplasia	4	9.6	3.9	5.7
	5	10.4	4.1	6.3
	6	18.4	4.7	13.7
	7	14.3	4.3	10.0
	8	27.5	5.2	22.3
	9	9.9	3.9	6.0
	10	17.7	4.5	13.2
	11	10.4	4.2	6.2
		14.8 ± 6.2	4.3 ± 0.4	$10.4\pm 5.8^*$
Prostatic cancer	12	15.7	4.1	11.6
	13	14.0	4.5	9.5
	14	5.8	3.7	2.1
	15	22.8	3.9	18.9
		14.6 ± 6.9	4.0 ± 0.3	10.5 ± 6.9

* $p<0.05$

R1881結合蛋白測定と比較

R1881結合蛋白の組織化学的 (オートラジオグラフィ法) ならびに生化学的 (DCC 法) 検討の結果を以下のごとく比較した。

オートラジオグラフィで R1881結合蛋白の局在は上皮細胞部が主体であったことから、上皮部分における特異的 grain 数をもって R1881結合部位数とした (組織化学的検討)。また grain は上皮細胞内の核よりも細胞質内に認めたことから、DCC 法による cytosol 中の R1881結合部位数 (fmol/mg. protein) とオートラジオグラフィにおける特異的結合部位数 (grain 数/単位面積) の相関を検討した。

その結果、8 例の肥大前立腺組織内で両者の間には明らかな正の相関が認められた ($r=0.954$, $p<0.01$)。また 4 例の癌組織についても相関係数 r は、0.994 と十分高い値を示した。そこで、正常、肥大および癌組織を含めた15例で DCC 法とオートラジオグラフィによる R1881結合部位数の相関を検討したところ相関係数 0.946 ($p<0.01$) で有意の相関がみられた (Fig. 6)。これは肥大前立腺組織のみならず、前立腺癌や正常前立腺組織も含めて、オートラジオグラフィにより cytosol 中の R1881結合蛋白の検索が可能であること

Fig. 6 Relationship between the number of specific grains in autoradiogram (grains/unit area) and NBS in cytosol (fmol/mg. protein).

は結合部位数、解離定数など詳細な検討が可能であるが、あくまでその組織内に含まれる全細胞の平均的な結果が示されるにすぎない。従って前立腺癌におけるごとく、良性細胞と悪性細胞が混在していたり、悪性細胞でも多様性を示す場合には、radioreceptor assayの結果から組織内の実質細胞の特異性を判定するのは問題があると考えられる。一方、著者のオートラジオグラフィ法では組織内の部位別、細胞別による観察が可能であり、レセプターの研究のうえで有用な手段であると思われる。また針生検などによる極めて少量の試料で充分であり、くり返し行うことが可能であるなどの利点を有しており、前立腺癌のホルモン依存性の指標として臨床応用も可能であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をたまわりました恩師白岩康夫教授に深謝いたします。また、技術的協力をいただいた(株)相互生物医学研究所の諏訪和男氏、江頭徹氏に感謝します。

なお、本研究の一部は昭和59年度文部省科学研究費(課題番号59771106)によった。

文 献

- Liao, S.: Cellular receptors and mechanisms of action of steroid hormones. *Int. Rev. Cytol.*, **41**, 87—172, 1975.
- Siiteri, P.K. and Wilson, J.D.: Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J. Clin. Invest.*, **49**, 1737—1745, 1970.
- Mainwaring, W.I.P. and Milroy, E.J.G.: Characterization of the specific androgen receptors in the human prostate gland. *J. Endocr.*, **57**, 371—384, 1973.
- Menon, M., Tananis, C.E., McLoughlin, M.G. and Walsh, P.C.: Androgen receptors in human prostatic tissue: A review. *Cancer Treat. Rep.*, **61**, 265—271, 1977.
- Bonne, C. and Raynaud, J.P.: Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R1881). *Steroids*, **27**, 497—507, 1976.
- Shain, S.A. and Boesel, R.W.: Human prostate steroid hormone receptor quantitation. *Invest. Urol.*, **16**, 169—174, 1978.
- Shain, S.A., Boesel, R.W., Lamm, D.L. and Radwin, H.M.: Characterization of unoccupied (R) and occupied (RA) androgen binding components of the hyperplastic human prostate. *Steroids*, **31**: 541—556, 1978.
- Pertschuk, L.P., Zava, D.T., Tobin, E.H., Brigati, D.T., Gaetjens, E., Macchia, R.J., Wise, G.J., Wax, H.S. and Kim, D.S.: Histochemical detection of steroid hormone receptors in the human prostate. In: *Progress in Clinical and Biological Research, Prostate Cancer and Hormone Receptors*, Vol. 33, pp. 113—132. Editors: G.P. Murphy and A.A. Sandberg. Alan R. Liss, Inc., New York, 1979.
- 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.
- Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**: 660—672, 1949.
- Lowry, O.H., Roebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
- Webb, J.M. and Levy, H.B.: A sensitive method for the determination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms. *J. Biol. Chem.*, **213**, 107—117, 1955.
- Ghanadian, R., Auf, G., Chaloner, P.J. and Chisholm, G.D.: The use of methyltrienolone in the measurement of the free and bound cytoplasmic receptors for dihydrotestosterone in benign hypertrophied human prostate. *J. Steroid Biochem.*, **9**, 325—330, 1978.
- Shimazaki, J., Hikage, T., Sato, R., Kodama, T. and Ito, H.: Measurement of androgen receptor in cytosols from normal, benign hypertrophic and cancerous human prostates. *Endocrinol. Japon.*, **28**, 725—734, 1981.
- 森岡政明, 大橋洋三, 藤田幸利, 武田克治, 東條俊司, 大橋輝久, 大森弘之: ヒト前立腺組織内 DHT 濃度並びに Cytosol, Crude Nuclear Extract 分画中の DHT 濃度と R1881 Receptor Assay の相関について. *日泌尿会誌*, **75**, 96—103, 1984.
- 北野太路: 前立腺細胞内アンドロジェン・レセプターについて, 第1編. 各種前立腺疾患における血清中アンドロジェン, 細胞質内アンドロジェンおよび R1881 レセプターについて. *日泌尿会誌*, **75**, 1084—1097, 1984.
- 出村孝義, 坂下茂夫, 高村孝夫, 黒田一秀: オートラジオグラフィーによる人前立腺組織中 androgen receptor の同定—前立腺肥大症組織について—. *日泌尿会誌*, **73**, 1108—1115, 1982.
- Gustafsson, J.Å., Ekman, P., Pousette, Å., Snodchowski, M. and Högborg, B.: Demonstration

of a progestin receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Invest. Urol.*, 15, 361—366, 1978.

- 19) Pertschuk, L.P., Rosenthal, H.E., Macchia, R.J., Eisenberg, K.B., Feldman, J.G., Wax, S.H., Kim, D.S., Whitmore, W.F., Abrahams, J.I., Gaetjens,

E., Wise, G.J., Herr, H.W., Karr, J.P., Murphy, G.P. and Sandberg, A.A.: Correlation of histochemical and biochemical analyses of androgen binding in prostatic cancer: Relation to therapeutic response. *Cancer*, 49, 984—993, 1982.

(1985年6月24日受付, 特別掲載)