精巢性女性化症におけるアンドロゲン受容体の 温度不安定性に関する検討

兵庫医科大学泌尿器科学教室(主任: 生駒文彦教授)

岡本 英一 島 博基 藪元 秀典 生駒 文彦

八尾徳州会病院泌尿器科(部長: 寺川知良)

寺 川 知 良

COMPLETE TESTICULAR FEMINIZATION SYNDROME ASSOCIATED WITH THERMOLABILE ANDROGEN RECEPTOR

Eiichi Okamoto, Hiroki Shima, Hidenori Yabumoto and Fumihiko Ikoma

Department of Urology, Hyogo College of Medicine

(Director: Prof. F. Ikoma)

Tomoyoshi Terakawa

Department of Urology, Yao Tokushukai Hospital

(Chief: T. Terakawa)

Radioreceptor assay and thermostability test for the androgen receptor in two cases with complete testicular feminization syndrome were performed in regard to the fibroblasts cultured from genital skin on the basis of dispersed whole cell binding assay (Eil et al., 1980). No [^3H]dihydrotestosterone binding to the androgen receptor was observed in case 1 (receptor negative), while maximum binding capacity and dissociation constant of androgen receptor for [^3H]dihydrotestosterone in case 2 were 21000 sites per cell and 1.67×10^{-10} M (receptor positive). The specific binding of [^3H]dihydrotestosterone to the androgen receptor in case 2 decreased remarkably to 6.6% after high temperature (42°C) incubation in comparison with that at 22°C incubation. The specific binding of [^3H]dihydrotestosterone to the androgen receptor in normal controls decreased down to 81.6% at high temperature incubation. Thermostability test was useful to demonstrate qualitative abnormality of androgen receptor in receptor positive testicular feminization syndrome.

Key words: testicular feminization syndrome, androgen receptor, thermostability test

要旨: 完全型精巢性女性化症の2症例の外陰部皮膚培養線維芽細胞を材料とし, [^3H]dihydrotestosteroneを用いた dispersed whole cell binding assay (Eil et al., 1980)を行った。症例1は receptor negativeであったが, 症例2は maximum binding capacity (Bmax)=21,000sites/cell, dissociation constant (Kd)= $1.67 \times 10^{-10}\text{M}$ と共に正常範囲内を示した。症例2に対し thermostability test を施行した。その結果, [^3H]dihydrotestosterone の androgen receptor に対する specific binding remaining は, 2~8歳の内分泌学的に正常と考えられる包茎患者である control 群の81.6%に比べ, 症例2では6.6%と著明に低下していた。このことから, 症例2の androgen receptor は質的異常をもつことが証明された。Thermostability test は androgen receptor の質的異常を証明するうえで有用である。

キーワード: 精巢性女性化症, アンドロゲン受容体, 温度安定性試験

緒 言

精巢性女性化症(以下 Tfs と略する)は染色体が46, XY で精巢が存在するにもかかわらず外性器が女性型

であり, Müller 管由来の臓器はなく盲端に終わる腔を持つ症例として1953年, Morris ら¹⁾によって報告された。

Androgen の標的臓器である外性器の男性化への分化、発達には、標的臓器内で testosterone (以下 T と略する) が5 α -還元酵素により還元されて生じる5 α -dihydrotestosterone (以下 DHT と略する) が主要な役割をはたす²⁾。DHT は標的臓器の細胞内にある androgen receptor (以下 AR と略する) と結合し核内で男性化作用を持つ蛋白質を合成するために遺伝子を活性化する³⁾。Tfs では T と DHT が産生されていることから AR の障害が外性器の女性化の原因として考えられ、1974年、Keenan ら⁴⁾は完全型 Tfs の外陰部皮膚の培養線維芽細胞の AR が欠損していることを証明し、本症の表現型の原因を明らかにした。しかし、完全型 Tfs のなかには AR の存在する症例も報告されるようになり、その量的異常だけで本症のすべてを説明できなくなった^{5)~7)}。1979年、Griffin⁸⁾は AR 陽性の完全型 Tfs について AR の温度不安定性を調べることによってその質的異常を明らかにする方法を呈示し、androgen 不応症を AR の量的および質的異常の観点から分類した。また、全く正常な AR をもつ症例も報告し、androgen 不応症の発症には AR の問題だけでなく、核内遺伝情報転写機構の異常も関与する可能性があることを示唆した⁹⁾。

今回われわれは AR の欠損を示す典型的な完全型 Tfs の1例と比較的まれな AR の質的異常を示す1例を経験したので合わせて報告し、本症の発症機構について考察する。

症 例

年齢：症例1は24歳、症例2は23歳。
主訴：両症例とも無月経。

家族歴：両症例とも同胞2人で妹は正常月経周期である。家系内には不妊症はない。

現病歴：両症例とも近医でホルモン剤投与うけるも月経発来を認めず来院した。

理学的所見：症例1は乳房発育良好で腋毛、恥毛を認めず、両側生殖腺を触知しない。症例2は乳房発育極めて良好で腋毛、恥毛をわずかに認め、両側生殖腺を触知しない。

外陰部所見：両症例とも正常女性型でやや発育不良。陰核肥大なく、色素沈着は正常。

内視鏡検査所見：両症例とも膣は盲端に終わり子宮頸管はなく、膣長は5cm と短い。

染色体検査所見：両症例とも Q 分染法にて46, XY, 正常男性型。

内分泌学的検査所見：LH は両症例とも、FSH は症例2でやや高値を示している。Estradiol および testosterone は両症例とも正常男性の値を示している。尿中17KS, 尿中17OHCS は両症例とも異常を認めない(表1)。

ヒト性腺刺激ホルモン (human chorionic

表1 Endocrine data

Hormones	Case1	Case2
LH (mIU/ml)	46.2	78.0
FSH (mIU/ml)	14.7	56.1
Estradiol (pg/ml)	20.0	25.4
Testosterone (ng/dl)	891	667
U-17KS (mg/day)	14.7	6.0
U-17OHCS (mg/day)	7.4	6.6

図1 hCG test

gonadotropin, hCG)試験:両症例ともTは反応し精巣間質細胞のT産生予備能は良好であることが判明した(図1)。

以上の所見より、両症例とも完全型Tfsと診断し両側腹腔内精巣摘出術を施行した。

対象および方法

手術時に大陰唇の皮膚小片を採取し、その真皮層を25cm²培養フラスコ(Falcon)の底面に付着させ、さらにminimum essential medium(Gibco Laboratories)に10%fetal calf serum(FCS)(Mitsubishi Chemical Industries), non-essential amino acids(1mmol/l)(Gibco Laboratories), l-glutamine(4mmol/l)(Sigma Chemical Co.), gentamycin(20mg/l)(Essex Japan)を加えたmedium Aを5ml加え、37℃、5%CO₂の加湿条件下で皮膚線維芽細胞を増殖させた(6~12回 passageを施行)。Assayに十分なfibroblast数(1.5~3.0×10⁶cells/ml)が得られた後、培養液をmedium B(FCS-free medium A)に交換した。Medium Bは24時間毎に交換し、2日間medium Bで培養後、0.05%trypsin-0.02%EDTA(Gibco Laboratories)でcellをharvestし、冷却phosphate-buffered saline(PBS)(Flow Laboratories)で洗浄した後、1,000×g、3分間遠沈した。次にこのcell pelletを、medium C(medium Bに25mmol/l tricine(Sigma Chemical Co.)を加えpHを7.4に調整)で攪拌した後、1,000×g、3分間遠沈し、0.5~1.5×10⁶cells/mlとなるようmedium Cでcell suspensionを作成した。Dispersed whole cell binding assayをEilら¹⁰⁾の方法に準じて行った。約1×10⁶cells/mlのcell suspensionにhot ligandとして0.125~2nmol/lの種々の濃度にmedium Cで希釈された[³H]DHT(New England Nuclear)を加えた群と、さらにそれにcold ligandとして[³H]DHTの500倍の濃度のmethyltrienolone(R1881)(New England Nuclear)を加えた群をそれぞれ37℃で10分毎に攪拌しながら45分間incubationを行った。これらを冷却PBSで洗浄、1,000×g、3分間遠沈を3回繰り返す、上清を除いたcell pelletに0.2ml PBSと1ml ethanol(Wako Chemical Industries)を加え8.5ml aqueous counting scintillant-II(ACS-II)(Amersham)とよく混和しPackard 460 CD liquid scintillation counterにて[³H]DHTの放射活性を測定した。Cell countについては、cell suspensionにmedium Cのみを加えたcontrol tubeを同様の過程を経て1ml PBSでcell suspensionとし、0.025%trypan

blue(Wako Chemical Industries)にて染色しviable cellのみduplicateでcountした。[³H]DHTのspecific bindingはhot ligandのみで得られたtotal bindingと、cold ligandを加えることにより得られたnonspecific bindingとの差で求められ、結果はScatchard plotting¹¹⁾でもって解析した。Thermostability testに関しては、前述の方法で集めたcell suspensionにhot ligandとして1nmol/lの[³H]DHTを加えた群と、さらにそれにcold ligandとして500倍の濃度のR1881を加えた群をそれぞれ22℃、20分incubation行ったものをgroup Aとし、group Aをさらに42℃、20分間incubation加えたものをgroup Bとした。Incubation timeが終了すればただちに氷冷し、冷却2ml PBSで洗浄、1,000×g、3分間の遠沈を3回繰り返した後、前述の方法で[³H]DHTの放射活性を測定した。42℃加温後にARに結合している[³H]DHTの残存放射活性(specific binding remaining)をthermostabilityとしてgroup Bとgroup Aの比の百分率で表した。

その計算式を示す。

Thermostability (%) = (group Bのspecific binding remaining) / (group Aのspecific binding remaining) × 100

結 果

症例1では[³H]DHTの皮膚線維芽細胞への特異的取り込みは無くreceptor negativeであった。症例2におけるARに対する[³H]DHTのsaturation curveを図2に示す。Viable cellは3.8×10⁵cells/mlであり、Kdは1.67×10⁻¹⁰mol/l、Bmaxは21,000sites/cellで正常範囲内である。

Thermostability testの結果を図3Aに示す。左のcolumnはcontrol群である2~8歳の内分泌学的に正常と考えられる包茎患者で、[³H]DHTのARに対するspecific binding remainingは各々、100.9%、84.0%、83.1%、80.5%、78.2%、73.9%、70.5%であり平均81.6%。右のcolumnは症例2でspecific binding remainingは6.6%であった。

以上の結果より、症例2のARにおいて、receptor siteは正常であるが、高度の温度不安定性を認めた。すなわち本症例のARは質的異常をもつことが判明した。ちなみに図3Bは1979年、Griffin⁹⁾の報告をまとめたもので、specific binding remainingはcontrol群では約99.7%、receptor deficientの完全型Tfs群では約20%である。Griffinの方法はわれわれと違い

図2 Saturation curve of specific binding of [3 H] DHT to the androgen receptor in case 2.

図3 Thermostability test

monolayer 法で, incubation 温度と時間は37℃, 42℃, 各々60分である。

考 察

従来, AR は細胞質内にあると考えられており, 細胞質と核内測定がなされてきた^{12)~14)}が, 現在では AR は核内に存在していると理解されている³⁾。

AR assay 法としては, whole cell assay 法と, 核と細胞質に分離する cell preparation 法がある。われわれは, 操作が簡便で細胞内に存在する AR を測定できる whole cell assay 法を採用した。Whole cell assay 法では receptor の存在部位の問題はなく, か

つ, 細胞が viable であるために occupied receptor も短時間に total exchange される利点がある。この whole cell assay 法には monolayer 法と dispersed 法があるが, 操作が簡便で, 放射性廃棄物が少なく, かつ測定細胞数を一定に分けることのできる dispersed whole cell binding assay 法¹⁰⁾¹⁵⁾を採用した。

AR assay 時の継代培養は 6 ~ 12 回の範囲内で行った。皮膚線維芽細胞の継代培養における [3 H]DHT の receptor 結合能に関して, 5 ~ 44 回の継代培養では安定しているとの報告¹⁶⁾があり, 実際われわれの assay 結果でも 16 回もの継代培養まで [3 H] DHT の rece-

ptor 結合能は安定していた。

1953年, Morris ら¹⁾が Tfs を報告して以来, 精巣が有り, T および DHT が存在するにもかかわらず外性器が女性型になる理由として, 1974年, Keenan ら⁴⁾は初めて AR receptor の欠損を指摘した。実際, 症例 1 は臨床的に典型的な完全型 Tfs で外性器, 腋窩は無毛で Wolff 管は発達しておらず, Müller 管も退縮しており, dispersed whole cell binding assay 法においても AR の欠損と診断できた。1976年, Griffin ら⁵⁾や Kaufman ら⁶⁾により完全型 Tfs のなかに AR の存在する症例も報告され, その量的異常だけで本症の原因を説明できなくなった。症例 2 は臨床的に外性器は典型的な女性型を示したものの, 症例 1 と異なり陰毛および腋毛を認め, かつ乳房の発育は極めて良好であった。これらの点から症例 2 の receptor assay の結果に興味を持たれたが, dispersed whole cell binding assay 法により [³H] DHT の receptor 結合能 (Kd) 及び receptor 数は正常であることが判明した(図 2)。このため, さらにわれわれは Griffin⁵⁾の報告に準じて ligand の AR 結合における培養温度を 42°C まで上昇させることにより症例 2 の AR の温度安定性を調べてみたところ, Griffin⁵⁾の報告と一致して AR は高度の温度不安定性を示した(図 3)。AR の温度不安定性はその質的異常を意味している⁸⁾。質的異常の証明は種々の角度から研究されている^{17)~19)}が, われわれの thermostability test はより簡便であると考ええる。また実験条件設定に関して, われわれは基礎実験として, 22°C, 37°C および 42°C において dispersed whole cell binding assay 法による [³H] DHT の AR に対する saturation の time course を測定している。22°C, 37°C では 20 分で saturate し, 60 分まで plateau を示し, それ以後は漸次, [³H] DHT の AR に対する binding は失活した。しかし, 42°C では 20 分以上の incubation time となると control 症例でも [³H] DHT の AR に対する binding は失活したため, 本実験では 22°C 20 分, 42°C 20 分の条件を設定した。なお, 22°C は実験室の環境温度であり, 42°C は Griffin⁵⁾に従って設定した。

最近の遺伝子工学の進歩により PCR²⁰⁾を用いて AR の steroid-binding domain 全体の gene 欠如²¹⁾や one point mutation^{22)~24)}などが complete androgen insensitivity syndrome において報告されてきた。Human androgen receptor は cDNA を用いた sequence により 910 の amino acids より成り立っており²⁵⁾, この gene は X chromosome library に位置して

いることがわかっている²⁶⁾²⁷⁾。Point mutation を起こした DNA から作られた androgen receptor protein は, androgen に結合できず, また, androgen-regulated receptor gene の転写 (mutant m-RNA の転写) を活性化できない。このため種々の androgen resistance を示すと考えられている²⁸⁾²⁹⁾。今後の課題として DNA sequence を行い, 温度不安定性を示す AR gene の解析が必要であると考ええる。

結 果

最近われわれの経験した完全型精巣性女性化症 2 例に対して, 外陰部皮膚線維芽細胞の androgen receptor (AR) assay を行い, 次の結果を得た。

1) Dispersed whole cell binding assay 法を用いると, 症例 1 では AR の完全欠損を認めたが, 症例 2 では [³H] DHT の結合能も正常, および細胞内の数も正常の AR の存在を認めた。

2) Thermostability test を用いて AR の温度安定性を検索すると, 正常児包皮の AR とは異なり, 症例 2 (AR positive testicular feminization syndrome) の AR は高度の温度不安定性を示した。

3) Dispersed whole cell binding assay 法は AR の測定には簡便で再現性があるが, AR の質的異常の検索も必要であり, そのためには thermostability test が有用である。

文 献

- 1) Morris, J.M.: The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphroditism. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 65, 1192—1211, 1953.
- 2) 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.
- 3) Walters, M.R.: Steroid hormone receptors and the nucleus. *Endocrine Reviews*, 6, 512—543, 1985.
- 4) Keenan, B.S., Meyer, W.J., Hadjian, 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.
- 5) Griffin, J.E., Punyashthiti, K. and Wilson, J.D.: Dihydrotestosterone binding by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from control subjects and from patients with hereditary male pseudohermaphroditism due to androgen resistance. *J. Clin. Invest.*, 57, 1342—1351, 1976.

- 6) Kaufman, M., Straisfeld, C. and Pinsky, L.: Male pseudohermaphroditism presumably due to target organ unresponsiveness to androgens: Deficient 5 α -dihydrotestosterone binding in cultured skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 58, 345–350, 1976.
- 7) Kaufman, M., Pinsky, L., Baird, P.A. and McGillivray, B.C.: Complete androgen insensitivity with a normal amount of 5 α -dihydrotestosterone-binding activity in labium majus skin fibroblasts. *Am. J. Med. Genetics*, 4, 401–411, 1979.
- 8) Griffin, J.E.: Testicular feminization associated with a thermolabile androgen receptor in cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 64, 1624–1631, 1979.
- 9) Griffin, J.E. and Wilson, J.D.: Medical progress: The syndromes of androgen resistance. *N. Engl. J. Med.*, 302, 198–209, 1980.
- 10) Eil, C., Lippman, M.E. and Loriaux, D.L.: A dispersed-whole cell method for the determination of androgen receptors in human skin fibroblasts. *Steroids*, 35, 389–404, 1980.
- 11) Scatchard, G.: The attraction of properties for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A.*, 51, 60–67, 1949.
- 12) Svensson, J. and Snochowski, M.: Androgen receptor levels in preputial skin from boys with hypospadias. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49, 340–345, 1979.
- 13) Mowszowicz, I., Riahi, M., Wright, F., Bouchard, P., Kuttann, F. and Mauvais-Jarvis, P.: Androgen receptor in human skin cytosol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52, 338–344, 1981.
- 14) Fichman, K.R., Nyberg, L.M., Bujnovszky, P., Brown, T.R. and Walsh, P.C.: The ontogeny of the androgen receptor in human foreskin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52, 919–923, 1981.
- 15) Terakawa, T., Shima, H., Yabumoto, H., Koyama, K. and Ikoma, F.: Androgen receptor levels in patients with isolated hypospadias. *Acta Endocrinol.*, 123, 24–29, 1990.
- 16) Lamberigts, G., Dierickx, P., Moor, P.D. and Verhoeven, G.: 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, 924–930, 1979.
- 17) Brown, T.R., Maes, M., Rothwell, S.W. and Migeon, C.J.: Human complete androgen insensitivity with normal dihydrotestosterone receptor binding capacity in cultured genital skin fibroblasts: Evidence for a qualitative abnormality of the receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55, 61–69, 1982.
- 18) Griffin, J.E. and Durrant, J.L.: Qualitative receptor defects in families with androgen resistance: Failure of stabilization of the fibroblast cytosol androgen receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55, 465–474, 1982.
- 19) Kaufman, M., Pinsky, L. and Killinger, D.W.: Ligand-specific thermal misbehavior of synthetic androgen-receptor complexes in genital skin fibroblasts of subjects with familial ligand-sensitive androgen resistance. *J. Steroid Biochem.*, 25, 323–331, 1986.
- 20) Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 263–273, 1986.
- 21) Brown, T.R., Lubahn, D.B., Wilson, E.M., Joseph, D.R., French, F.S. and Migeon, C.J.: Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: Evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 8151–8155, 1988.
- 22) Lubahn, D.B., Brown, T.R., Simental, J.A., Higgs, H.N., Migeon, C.L., Wilson, E.M. and French, F.S.: Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 9534–9538, 1989.
- 23) Sai, T., Seino, S., Chang, C., Trifiro, M., Pinsky, L., Mhatre, A., Kaufman, M., Lambert, B., Trapman, J., Brinkmann, A.O., Rosenfield, R.L. and Liao, S.: An exonic point mutation of the androgen receptor gene in a family with complete androgen insensitivity. *Am. J. Hum. Genet.*, 46, 1095–1100, 1990.
- 24) Marcelli, M., Zoppi, S., Grino, P.B., Griffin, J.E., Wilson, J.D. and McPhaul, M.J.: A mutation in the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete testicular feminization in a patient with receptor-positive androgen resistance. *J. Clin. Invest.*, 87, 1123–1126, 1991.
- 25) Faber, P.W., Kuiper, G.G.J.M., Rooij, H.C.J.,

- Korput, J.A.G.M., Brinkmann, A.O. and Trapman, J.: The N-terminal domain of the human androgen receptor is encoded by one, large exon. *Mol. Cell Endocrinol.*, 61, 257—262, 1989.
- 26) Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sullivan, P.M., Willard, H.F. and French, F.S.: Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome, *Science*, 240, 327—330, 1988.
- 27) Brown, C.J., Goss, S.J., Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Wilson, E.M., French, F.S. and Willard, H.F.: Androgen receptor locus on the human X chromosome: Regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 264—269, 1989.
- 28) Marcelli, M., Tilley, W.D., Wilson, C.M., Wilson, J.D., Griffin, J.E. and McPhaul, M.J.: A single nucleotide substitution introduces a premature termination codon into the androgen receptor gene of a patient with receptor-negative androgen resistance. *J. Clin. Invest.*, 85, 1522—1528, 1990.
- 29) Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G.J.M., Faber, P.W., Schweikert, H.U., van Rooij, H.C., Zegers, N.D., Hodgins, M.B., Degenhart, H.J., Trapman, J. and Brinkmann, A.O.: Aberrant splicing of androgen receptor mRNA results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 7866—7870, 1990.

(1992年7月16日受理, 特别掲載)