



## P-glycoprotein expression in human adrenal adenomas and bovine adrenocortical cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 豊見永, 辰美 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1070">http://hdl.handle.net/10271/1070</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 217号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	豊見永 辰 美		
論文題目	P-glycoprotein expression in human adrenal adenomas and bovine adrenocortical cells (ヒト副腎腺腫および牛副腎皮質細胞における P-glycoprotein の発現について)		

博士(医学) 豊見永 辰 美

論文題目

P-glycoprotein expression in human adrenal adenomas and bovine adrenocortical cells  
(ヒト副腎腺腫および牛副腎皮質細胞における P-glycoprotein の発現について)

論文の内容の要旨

【目的】 P-glycoprotein (Pgp) は、化学療法施行時に腫瘍細胞において薬剤抵抗性を来す原因蛋白として知られているが、また同時に、副腎、腎、胎盤、肝、腸管、脳などの正常組織にも豊富に発現していることが確認されている。なかでも副腎は多量の Pgp が発現していることが知られており、ステロイドの分泌に関与している可能性が示唆されている。副腎における Pgp の発現を調節する機序について明らかにする目的で、副腎腺腫組織および牛副腎皮質細胞を用いて検討を行った。

【方法】 副腎性 Cushing's syndrome、primary aldosteronism (PA)、sub-clinical Cushing's syndrome (SCCS) の手術摘出組織よりその膜蛋白を抽出し、Western blotting 法にて Pgp 発現量について検討した。また、副腎腺腫組織中ステロイド含量についても検討を行った。次に、牛副腎皮質細胞を collagenase、DNase を用い分離後、各シャーレに  $5 \times 10^6$  個ずつ細胞をまき、10%FCS を含んだ DMEM 培地で 24 時間培養後、cortisol ( $10^{-7}$  M)、ACTH ( $10^{-9}$  M)+metyrapone ( $5 \times 10^{-6}$  M)、ACTH+2-aminoglutethimide (2-AG,  $5 \times 10^{-4}$  M)、PMA ( $10^{-6}$  M)、8-Br-cAMP ( $5 \times 10^{-9}$  M)、progesterone ( $10^{-7}$  M)、11-deoxycortisol ( $10^{-7}$  M)、pregnenolone ( $10^{-7}$  M)、17-hydroxypregnenolone ( $10^{-7}$  M)、17-hydroxyprogesterone ( $10^{-7}$  M)、11-deoxycorticosterone (DOC,  $10^{-7}$  M) を含んだ無血清 DMEM 培地で 24 時間培養後、細胞膜を取り出し Pgp 発現量について Western blotting 法にて検討を加えた。その際、ACTH、ACTH+metyrapone、ACTH+2-AG、PMA、8-Br-cAMP 負荷に関しては cortisol の分泌についても検討した。

【結果】 Pgp は、Cushing's syndrome において PA、SCCS と比較しその発現がそれぞれ 66% と 61% 低下していた。PA と SCCS の間に Pgp の発現は差は見られなかった。Cushing's syndrome、PA、SCCS の間で組織中 cortisol、11-deoxycortisol、DOC、17-hydroxyprogesterone、および DHEA の含量に差は認められなかった。

Cushing's syndrome では、組織中 progesterone 含量は SCCS と比べ有意に低下していた。

牛副腎皮質細胞での実験では、ACTH 負荷にてコントロールと比較し cortisol は有意に増加した ( $7.5 \pm 1.7$  vs.  $2975.9 \pm 225.1$  nmol/L;  $P < 0.01$ )。ACTH+metyrapone 負荷では ACTH 単独負荷と比較し cortisol 分泌は有意に抑制された ( $2975.9 \pm 225.1$  vs.  $553.0 \pm 62.4$  nmol/L;  $P < 0.01$ )。ACTH+2-AG 負荷で、ACTH による cortisol 分泌は完全に抑制された ( $14.5 \pm 1.4$  vs.  $1653.6 \pm 162.9$  nmol/L;  $P < 0.01$ )。同じ条件で Pgp の発現について検討した結果は、cortisol、ACTH 負荷にて Pgp 発現量はコントロールと比較し有意な増加が認められた (それぞれ  $1912 \pm 114$ 、 $3077 \pm 190$ 、 $680 \pm 103$  arbitrary units;  $P < 0.01$ )。ACTH+metyrapone 負荷では ACTH 単独負荷と比べ差は認められなかった ( $2850 \pm 153$  vs.  $3077 \pm 190$  arbitrary units;  $P > 0.05$ )。また、ACTH+2-AG 負荷でも、ACTH による Pgp 発現は ACTH 単独と比較し差は見られなかった ( $1613 \pm 71$  vs.  $1934 \pm 209$  arbitrary units;  $P > 0.05$ )。8-Br-cAMP、PMA の負荷についての検討では、PMA 負荷では、cortisol 分泌と Pgp 発現の両者を増加させた。8-Br-cAMP+2-AG の負荷では、8-Br-cAMP による cortisol 分泌は完全に抑制されたが ( $14.5 \pm 1.4$  vs.  $1653.6 \pm 162.9$  nmol/L;  $P < 0.01$ )、Pgp 発現は 8

-Br-cAMP 単独と差は認められなかった ( $421 \pm 311$  vs.  $1486 \pm 286$  arbitrary units;  $P > 0.05$ )。検討した cortisol 前駆物質の中では progesterone のみが Pgp の発現を増加させた ( $1877 \pm 264$  vs.  $330 \pm 59$  arbitrary units;  $P < 0.001$ )。

【考察】牛副腎皮質細胞において cortisol、progesterone が Pgp 発現を増加させること、および ACTH+2-AG 負荷で ACTH 単独負荷と比べ Pgp 発現に変化が見られないことより、ACTH による Pgp 発現増加は、細胞内ステロイドの増加を介する機序と ACTH の直接作用の2つの機序が存在することが示唆された。また、ACTH により Pgp 発現を増加させる情報伝達機構としては、cAMP-PKA 系が関与しているものと考えられた。

ヒト副腎腺腫組織において Cushing's syndrome で他の疾患群と比べ Pgp の発現が低下していたことの機序としては、(1)組織中 progesterone 含量が Cushing's syndrome では他の疾患群と比べ少ないこと、(2)Cushing's syndrome では腺腫による自律的 cortisol の過剰分泌があり2次的に血漿 ACTH が抑制されており、長期の ACTH 低下による cAMP 系の活性低下が関与しているものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

P-glycoprotein (Pgp) は腫瘍細胞が、薬剤抵抗性を獲得する際、mdr1遺伝子の発現により産生される膜蛋白の一種である。この際、Pgp は抗癌剤を細胞外へ運び出す役割を演ずるが、正常組織に存在する Pgp の意義についてはなお不明の点も多い。申請者は Pgp が多量に存在する副腎皮質について、その産生、調節因子を明らかにする目的で人の副腎皮質腺腫および牛副腎皮質細胞を用いて以下の検討を行った。

### (方法と結果)

#### 1. 人の副腎皮質腺腫を用いた研究

手術時に得られた Cushing's syndrome (CS)、primary aldosteronism (PA)、subclinical Cushing's syndrome (SCCS) の病態を示した副腎腺腫組織より遠沈法により、膜蛋白分画を抽出し、Western blotting 法にて Pgp の定量を行った。また、組織中各種ステロイド含量を定量した。その結果、Pgp は CS において PA、SCCS と比較し有意に低下していた。cortisol、11-deoxycortisol、DOC、17-hydroxyprogesterone、DHEA の含量には差がなく、CS における progesterone の低下と PA における aldosterone の高値が観察された。Pgp は cortisol を大量に分泌している CS においてのみ低下が認められた。血漿 ACTH は CS 全例について検出感度 (5 pg/ml) 以下であるので、この結果は CS において多量の cortisol が分泌され、内因性 ACTH が抑制されているため、二次的に組織中の Pgp が低下していることが推論された。

#### 2. 牛副腎皮質による調節因子の研究

牛副腎皮質細胞の遊離細胞培養系を用いて ACTH、ACTH+metyrapone (P450,  $\beta$  阻害剤)、ACTH+2-aminoglutethimide (2-AG、P450,  $\alpha$  阻害剤)、4 $\beta$ -phorbol12 $\beta$ -myristate13 $\alpha$ -acetate (PMA)、8-Br-cAMP および各種ステロイド (cortisol、11deoxycortisol、progesterone、pregnenolone、DOC、17-hydroxyprogesterone、17-hydroxypregnenolone) の添加実験を行い、培養液中の cortisol、細胞中の Pgp を測定した。

その結果、(1)ACTH は cortisol、Pgp をともに増加させる。(2)ACTH+metyrapone、ACTH+2-AG 添加は cortisol 分泌を完全に抑制するが、Pgp は ACTH 単独と同様に増加させる。(3)8

-Br-cAMP は cortisol、Pgp をともに増加させる。8-Br-cAMP+2-AG の添加は cortisol 分泌を完全に抑制するが Pgp は 8-Br-cAMP 単独と同様に増加が見られる。(4)PMA 添加では cortisol、Pgp とともに対照と有意の変化がない。(5)各種ステロイドのうち、cortisol と progesterone は Pgp を有意に増加させた。

以上の結果より ACTH、cortisol、progesterone は Pgp を増加させ、ACTH は cyclic AMP 系の活性化を経ることが推論された。従来 Y-1 cell を用いた研究では、ACTH は corticosteroid の上昇を介して Pgp を増加させるとしているが、この研究の ACTH+metyrapone、ACTH+2-AG の結果からは ACTH の直接作用により Pgp の増加が認められ、また副腎内ステロイド濃度の増加も別の機序により Pgp を増加させるという新しい見解が得られた。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

1. 人の副腎腺腫と牛副腎皮質遊離細胞系の研究結果の相似性について
2. Western blotting の手法と arbitrary unit の 算出と妥当性
3. ステロイド分泌自律性のある腺腫でも Pgp については反応性があるのか
4. CS と SCCS の違い
5. Pgp 産生に対する ACTH と cortisol、progesterone の作用機序の相違

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も充分理解しており、本論文が博士（医学）の学位授与にふさわしい内容を備えているものと審査委員全員一致で判断した。

論文審査担当者 主査 教授 五十嵐 良 雄

副査 教授 菅 野 剛 史      副査 教授 中 島 光 好

副査 教授 藤 田 道 也      副査 講師 中 村 浩 淑