



Regulation of Steroid 21-hydroxylation by 17 β -E-storadiol in rat liver : in vivo and in vitro study

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 夏目, 博宗 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1001

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 148号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏 名	夏 目 博 宗		
論文題目	Regulation of Steroid 21-hydroxylation by 17β-Estradiol in rat liver : in vivo and in vitro study (17β-エストラジオールによるラット肝臓ステロイド 21 水酸化反応の調節 : in vivo および in vitro における研究)		

医学博士 夏目博宗

論文題目

Regulation of Steroid 21-hydroxylation by 17β -Estradiol in rat liver: in vivo and in vitro study

(17β -エストラジオールによるラット肝臓ステロイド21水酸化反応の調節: in vivo および in vitro における研究)

論文の内容の趣旨

ステロイド21水酸化反応 (steroid 21-monooxygenase; 21-hydroxylase) は主に副腎におけるステロイド生合成過程の酸素反応であるが、副腎外組織においても活性が認められている。この副腎外21水酸化反応は progesterone (P_4) を deoxycorticosterone (DOC) に転換し、局所における水・電解質の調節、あるいは妊娠時における P_4 の解毒に関与すると推測されている。この反応は E_2 による調節をうけると推測されているが、実験による基礎的検討の報告はない。本研究では、 17β -estradiol (E_2) の副腎外21水酸化反応に対する調節を、動物モデルを用いて明らかにすることを試みた。

(方法) 内因性 E_2 の影響を少なくするため雄ラットをもちい、副腎外臓器としてステロイド水酸化活性が高い肝臓を選んだ。1) in vivo; 3週齢SD系ラットを3群に分けた。 E_2 群) 精巣摘除術1週間後から、 E_2 1mg/0.02ml sesame oil/dayを7日間連日皮下注。7日目には progesterone (P_4) を同時に筋注し、2時間後に屠殺し、血液、副腎、肝臓を採取。Sesame群) E_2 群の E_2 の代わりに Sesame oil 0.2mlを皮下注。Sham群) 精巣摘除術のSham手術を行い、Sesame oil 0.2mlを皮下注。2) in vitro; SD系7週齢雄ラットの肝臓からコラゲナーゼ還流法により遊離肝細胞を採取し、24穴培養プレートに 2×10^5 cell/well ずつ培養した。 E_2 の負荷による肝細胞の21水酸化反応の活性の変化を、基礎 P_4 を加えた後に産出されたDOCを測定することにより検討した。ステロイドは、血清、ミクロソーム反応液から抽出し、高速液体クロマトグラフィーにて corticosterone (B)、DOC の分画を分集し、radioimmuno assay (RIA) にて測定した。血中 E_2 、testosterone (T) は抽出後、直接 RIA にて測定した。ミクロソーム画分での21水酸化反応は、 E_2 の効果をみるため E_2 群と Sesame 群で検討。肝臓、副腎のミクロソーム画分と NADPH 産生系をもちい、 P_4 を基質として DOC の産生を調べた。ノーザンブロットは、肝臓、副腎、培養肝細胞で検討した。肝臓、培養肝細胞では20 μ g、副腎では5 μ gの total RNA をもちい、bovine P450c21 cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。

(結果) in vivo; E_2 群の最終血清 E_2 濃度は 7.52 ± 0.54 ng/ml、他の2群では測定感度以下。 E_2 群、Sesame群、Sham群、Sham群の血清 DOC 濃度はそれぞれ 15.3 ± 0.40 、 10.7 ± 0.60 、 11.9 ± 0.78 ng/ml と E_2 群で有意に上昇していた。B濃度はそれぞれ 174.5 ± 25.0 、 202.7 ± 26.9 、 103.4 ± 40.2 ng/ml で3群間に有意差はなかった。 E_2 群、Sesame群での肝臓ミクロソーム画分で21水酸化酵素活性が認められ、 V_{max} はそれぞれ、1670、1250 pmol/mg/h、 K_m はそれぞれ0.90、0.92 μ M と E_2 群でより強い活性が認められた。これら2群での副腎のミクロソーム画分での21水酸化酵素活性に有意差は認められなかった。副腎におけるP450c21 mRNA

NA の発現は 3 群に認められ、差はなかった。肝臓では 3 群とも P450c21 mRNA の発現は認められなかった。in vitro ; 肝細胞培養では、 E_2 10^{-5} M を培養液に加えた条件で、 V_{max} 4.2 pmol/mg/h、 K_m 1.35 μ M を得た。培養液に加える E_2 濃度を control および 10^{-9} から 10^{-5} M まで変化させとき、DOC の産生は E_2 に対し用量依存性に増加した。

(考察・結論) E_2 群における血清 DOC の上昇は、血清 B の上昇をともなわず、 E_2 は副腎外での DOC 産生を刺激した。この血清 DOC の上昇の一部は、 E_2 により直接刺激された肝臓での DOC の産生に由来する。ノーザンブロットの結果は、この反応が副腎の 21 水酸化酵素とは異なる酵素による可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

副腎皮質ホルモン合成に重要な役割を演じる steroid 21-monooxygenase が、副腎以外にも存在し、妊婦や新生児の血中 progesterone が 11-deoxycorticosterone (DOC) に転換することが知られている。申請者は本研究において副腎外で行われる 21 水酸化反応が、estradiol (E_2) によって直接促進されること、又この反応が副腎に存在する P450_{c21} とは異なる酵素によって行われていることをラットの肝を用いた in vivo および in vitro の実験で証明しようとした。

本研究で用いられた手段および得られた主な結果は次の 4 点である。

1. 去勢した SD 系雄ラットに E_2 を連続投与して高 E_2 血モデルラットを作成し、これに progesterone を投与した時、血中 corticosterone 濃度は変化しないが DOC 濃度は上昇することから、estradiol が 21 水酸化反応を促進させ、しかもこの反応が副腎外で行われている可能性と推定した。
2. 高 E_2 血モデルラットの肝と副腎の組織内 steroid 21-monooxygenase 活性を測定し、肝での酵素活性が上昇していることを見出し、21 水酸化反応が肝で行われている可能性が大とした。
3. ラットヘパトサイトを培養し、培養液に E_2 を加えることにより直接 E_2 が 21 水酸化反応を促進することを証明した。
4. 高 E_2 血モデルラットおよび正常コントロールラットの副腎、肝組織内の P450_{c21} mRNA の発現を cDNA プローブを用いて検索し、肝の 21 水酸化酵素は副腎の P450_{c21} とは異なる酵素であることを間接的に示した。

審査委員会で特に本研究の独創的な所見として高く評価した点は

1. 高 E_2 モデルラットを作成しこれを実験に応用したこと。
2. 21 水酸化酵素を測定する方法を開発して肝でこの反応が行われていることを直接証明したこと。
3. 副腎と副腎外での 21 水酸化は異なる酵素により行われその調節機序も異なり、副腎外では estradiol が促進因子であることを証明したことなどがあげられ、本研究が独創的で、すぐれた研究であると判定した。

審査の過程で、次のような質疑が本研究に関して申請者になされた。

1. 高 E_2 血モデルラットを作製するにあたり、 E_2 投与期間は、投与量は適正か
2. 睾丸摘出の必要性
3. progesterone 10mg 投与の影響
4. 薬剤投与に用いる溶剤
5. 新生児モデルラットでの実験の必要性
6. monooxygenase の electron donor
7. cDNA プローブの性状
8. E_2 の酵素活性促進機序
9. E_2 の副腎皮質の steroidogenesis に及ぼす影響
10. 新生児期の血中ステロイドホルモンの動態
11. 11β -hydroxylase の臓器特異性

以上の試問に対し、申請者はおおむね適切な回答を行なったので本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと審査委員会全員一致して判定した。

論文審査担当者 主査 教授 吉 見 輝 也

副査 教授 市 山 新 副査 教授 藤 井 喜一郎

副査 教授 藤 田 道 也 副査 助教授 鈴 木 和 雄