

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 前田 尚之

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 成雄ラットにおけるステロイドホルモンの代謝と局所生合成

審査委員

主査教授 横田 博（獣医生化学）

副査教授 加藤 清雄（獣医生理学）

副査教授 谷山 弘行（獣医病理学）

# 学位論文要旨

## 成雄ラットにおけるステロイドホルモンの代謝と局所合成

酪農学園大学大学院 獣医学研究科

前田 尚之

ステロイドホルモンは内的要因や外的な刺激に対応して主に精巣、卵巣、副腎、性腺や抹消内分泌腺から分泌され、血液によって標的器官に運ばれ様々な生理作用を発現するといわれている。ステロイドホルモンは生理作用と構造からアンドロゲン、エストロゲン、コルチコイドに分類されコレステロールから合成される。ステロイドホルモンの合成は、様々な酵素やタンパク質が関与しており、かつ、その存在量は微量であることから合成過程や生体内動態やその役割については、いまだ解明されていないことが多い。そこで本研究では、ステロイドホルモンの代謝動態に及ぼす内分泌攪乱物質の影響を明らかにし、さらに局所合成について検討し、ステロイドホルモンの本来的役割について考察した。第I章でステロイドホルモンとその代謝物である抱合体同時分析法の開発を目的として、生体組織内に存在する微量ステロイドホルモンやそのグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体の固相カラムを用いた抽出方法とLC-MSを用いた分析方法を開発した。第II章では第I章で開発した方法を用いて、成雄ラット臓器中ステロイドホルモンとその抱合体を臓器別に調査し、ステロイドホルモンの体内動態について明らかにした。第III章では、内分泌攪乱化学物質ジエチルstilbestrol (DES) を投与した成雄ラットの臓器中への移行調査を行い、これまで未解明であった成雄ラット精巣毒性の初期段階であるテストステロン (TS) 低下機序の一部を解明した。第IV章では、これまで報告のない成雄ラット精巣中でのコルチコステロン (CCS) 合成に関与するP450酵素活性を調査した。

第I章ではLC-MSによるステロイドホルモンとその抱合体同時分析法の開発を目的とした。生体内のステロイドホルモンは微量でもその効果は大きく影響を及ぼす。そのため生体反応を観察する指標として有用であるため、微量分析方法の開発が数多く報告されている。これら生体ステロ

イドホルモンの測定は、一般に血液内濃度を HPLC-UV、RIA、ELISA を用いて行なわれてきたが、組織内に微量に含まれているステロイドホルモン濃度を正確に定量した報告は少ない。しかし、LC-MS/MS の登場以来、急速に微量分析法の開発が進められ、近年では LC-TOF MS による精密質量や同位体パターンによる解析や LC-MS/MS による Selected Reaction Monitoring (SRM) 法により飛躍的に高感度でかつ選択的に測定することが可能となった。また、生体内ステロイドホルモンとその抱合体をより微量測定するために臓器中に多く存在する夾雑成分、いわゆるマトリックスを除去するために、固相カラムを使用して精製する方法を開発した。今までは水質や尿、血清、プラズマ、胆汁での報告はあるが、この方法を用いることで、これまで報告の少ない臓器中からの微量ステロイドホルモンの定量が可能となった。さらに、測定において誘導体処理も行わないことから、代謝物や抱合体の測定も同時に測定することで、生体内の様々な微量ステロイドホルモンの変化を分析することが可能となった。

第Ⅱ章では成雄ラット臓器中ステロイドホルモンとその抱合体の定量を目的とした。薬物や毒物、生体内の老廃物は肝臓によって代謝されて尿中や胆汁中へ排泄される。これらは Cytochrome P450 による代謝反応を受けて、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) などの抱合酵素により抱合体を形成し、胆管や血中を介して排泄される。これまで、ステロイドホルモンの抱合体は排泄に関わっていると考えられており、ステロイドホルモン抱合体として標的臓器へ輸送するという報告はなかった。成雄ラットの各臓器中ステロイドホルモンとその抱合体を調査したところ、TSとCCSとその前駆物質は肝臓以外の全ての臓器から検出された。また、プレグネノロン (PGN) はステロイド合成臓器である精巣や副腎だけでなく、肝臓、筋肉から高濃度で検出されたが、脳や血液からは検出限界以下であった。プレグネノロン-グルクロン酸抱合体 (PGN-G) は、調査した臓器全てから検出された。一方、硫酸抱合体はステロイド合成臓器である精巣と副腎からは定量限界値以下であった。肝臓では PGN の抱合体のみ検出されており、コレステロールから PGN を合成した後、抱合体として血液によって標的臓器へ運ばれており、その標的臓器である脳、筋肉、精巣、代謝臓器である肝臓において脱抱合に関係する酵素、 $\beta$ -グルクロニダーゼとスルファターゼ活性が確認され、ステロイドホルモン硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体は標的臓器で脱抱合された。以上のこ

とから、一部のステロイドホルモンはグルクロン酸抱合体として各標的臓器に運ばれており、脱抱合して使用された後、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体として再び再抱合されて血液によって運ばれ、腎臓で排出されると考えられる。

第Ⅲ章では内分泌攪乱化学物質 DES を投与した成雄ラット精巣 P450scc 発現抑制による TS 合成阻害の解明を目的とした。DES は、非ステロイド性合成エストロゲンとして、かつては流産防止薬として使用されていた。現在は使用されていないがその毒性のメカニズムは不確定のままとなっており、内分泌攪乱物質のモデル物質として研究分野に用いられている。これまで、長期間高濃度の DES を投与した成雄ラット精巣において、精巣組織の破壊、TS の減少などが観察された。ステロイドホルモン合成の律速段階であるミトコンドリアへのコレステロール輸送およびその代謝には、ミトコンドリアへのコレステロール輸送調整タンパク質である StAR やステロイド合成組織のミトコンドリアに多く存在しコレステロール輸送を調整する PBR、ミトコンドリア内膜に存在しコレステロールを PGN へ変換する P450scc が関与している。本章では、精巣に対する DES の毒性の初期反応がミトコンドリアへのコレステロール輸送およびその代謝にあると考え、これらのタンパク質発現量、遺伝子発現量、ミトコンドリアへのコレステロール動態を調べた。SD 系 8 週齢成雄ラットを用いて、オリーブオイルのみの投与を Control 群、オリーブオイルに溶かした DES を 0.1 mg/ml 投与した群を DES 投与群とし、1、2 週間隔日胃内強制投与した。また、投与後経時的に各臓器を採取して、DES とそのグルクロン酸抱合体の分布を調査した。精巣はタンパク質発現の変化を解析するために SDS-PAGE、WB、遺伝子発現の変化を解析するために mRNA 発現量測定、ミトコンドリアへのコレステロール輸送の定量的変化を調べるために、遊離コレステロール濃度の測定を行った。その結果、DES は投与後すぐに血液を介して全身に運搬されており、特に副腎と下垂体において高濃度で検出された。2 週間 DES 投与した群では、ミトコンドリア分画の遊離コレステロール濃度が投与後 1、2 週間ともに有意差が見られない時期に、PBR、StAR と P450scc いずれのタンパク質においても顕著に減少しており、1 週間投与では P450scc のみで減少傾向が観察された。また、P450scc の mRNA 発現に減少傾向がみられた。さらに、コレステロールを基質とした精巣ホモジネートによる PGN 合成確認試験では、1 週間 DES 投与群で PGN 合成は確認されなかつ

った。以上のことから、DES 投与によって、精巣ミトコンドリア内の P450<sub>scc</sub> の発現抑制が原因となり、TS 合成の抑制につながると考察された。

第IV章では成雄ラット精巣中での CCS 生合成の検出を目的とした。CCS は生体にとって重要なステロイドホルモンであり、その働きについては盛んに研究されている。これまでにリンパ組織、小腸、皮膚、脳において、CCS の合成が明らかになっているが、精巣についてはあまり研究されていない。これまでに、ラット精巣ライディッシュ細胞における P450 11 $\beta$  の存在と、その活性が報告されている。しかしながら、精巣における P450 21 $\alpha$  の存在はマウス胎子においてのみの報告にとどまり、成体における精巣 P450 21 $\alpha$  の存在や、精巣での PGT から DCC への反応は確認されていなかった。本研究により、初めて成雄ラット精巣における P450 21 $\alpha$  活性が確認され、P450 21 $\alpha$  に相当する遺伝子が存在することが明らかになった。今回の実験で、精巣において PGT から CCS が合成されることがわかった。精巣が CCS を合成する生理的意味については、様々なことが考察される。一つは、副腎が障害を受け CCS を合成できなくなった際、精巣中の CCS の急激な減少を防ぎ、精子や TS 合成を滞らせないようにするために CCS を自己合成しているのではないかと考えられる。また、ストレスに敏感に反応する HPA 軸の影響を受けにくい、比較的安定な CCS 合成臓器として、日常的に CCS を合成しているのではないかと考えられる。精巣はステロイドホルモンの原料であるコレステロールや PGT までのステロイドホルモン合成酵素を備えている点から、都合が良いと考えられ、精巣組織での CCS 合成によって直接的に副腎コルチコイドや ACTH 濃度を減少させていると考えられる。CCS は抗ストレス作用だけでなく、脳や精巣において様々な働きをしていることが報告されており、CCS 合成酵素を自ら備えている生理的意味については今後、非常に興味深いテーマである。

本研究では第 I 章で開発した抽出法と質量分析法を用いることで、生体内微量ステロイドホルモンとその抱合体を同時に分析することが可能となった。この手法は様々な試験に応用することができる。薬物投与した生体内の動態を観察するだけでなく、薬物投与による影響を観察する材料としてステロイドホルモンとその抱合体の調査に応用できる分析法である。第 II 章では、一部のステロイドホルモンは主たる合成臓器である精巣、副腎からグルクロン酸抱合体として、標的臓器

へ血液を介して運ばれており、脱抱合されていることが予測された。第Ⅲ章では内分泌攪乱化学物質 DES を投与した成雄ラット精巣 P450<sub>scc</sub> 発現抑制による TS 合成阻害を解明した。また、第Ⅳ章では副腎以外の臓器、精巣での CCS 合成を確認した。以上のことから、ステロイドホルモンの一部は抱合体として運ばれ、標的臓器で脱抱合されて利用されており、同時にステロイドホルモンを局所的に自ら合成することで、主たる生産臓器からの endocrine だけでなく paracrine、autocrine として機能することで、基本的な生命現象の維持を行っていると考えられる。

## 論文審査の要旨および結果

本論文の審査は、研究の目的が明確であるか、材料および方法が適切であるか、結果が明確で合理的に整理されているか、さらに科学および獣医学の発展に寄与するものであるかについて行った。

### <論文の概要について>

ステロイドホルモンのこれまでの測定法（RIAやELISA）は、抗体の特異性や感度に左右され、再現性のある値が得られない場合が多かった。特に、生体組織中には様々な抗体反応阻害物質や抗原類似物質が存在し、RIAやELISA法では正確な測定が困難であった。申請者は血液中や組織中に微量存在するステロイドホルモンを質量分析計を用いることによって、再現性の高い高感度な測定法を開発した。特に、1) 生体試料を2つの性質の異なるカラムを用いて精製し夾雑物質を除去したこと、2) 数種の質量分析機を駆使して、分量と同定を厳密に行った。上記2つの改善により従来の測定法よりおよそ1500倍の感度を得ることができた。次に、この測定法を用いて以下のことを明らかにした。1) ステロイドホルモンの合成と血中動態、さらに標的臓器での代謝について新たな知見を得た。2) 内分泌攪乱物質DESの生殖毒性機序について、精巣への初期標的蛋白質（ステロイド合成酵素の一つ）について明らかにした。3) これまで副腎で合成されていたコルチコステロンが精巣でも自ら合成されていること明らかにした。

### <本論文の科学的意義>

ステロイドホルモンは生体の代謝調節の根幹を担い、病態の原因や指標マーカーとして重要な意味を持っている。しかし、生体組織中に微量に存在するステロイドホルモンの値を正確に知ることは困難であった。本論文により、質量分析計を用いて微量定量する方法が確立し、生体の代謝状態を直接各組織毎に知ることが可能となった。よって、病態解析や病気治療後の経過を詳しく把握することが可能となり、医学/獣医学への貢献は大きいと云える。さらに、本論文では抱合体が運搬体である可能性を示し、局所生合成も明らかにした。これらの成果は、ステロイドホルモンの生理的役割についても、従来の認識を超え、更なる根本的解釈に発展する可能性が出て来た。よって、本論文は科学的面においても重要な意義を有している。

### <本論文の獣医学的意義>

1) 本論文の成果により、組織中に存在するステロイドホルモンの存在量を知ることにより、各組織細胞の代謝状態をつぶさに知ることが可能となった。

このことは、生体代謝調節システムの機序を知る上で大きな貢献となる。

2) 本論文により、ステロイドホルモンが関与した炎症や腫瘍における病態を各組織細

胞毎に把握することが可能となり、病態解析や診断／治療に於いても大きな知見を得られる。

3) 本論文により推察された局所生合成ステロイドホルモンの役割が解明されれば、病態解析に革新的進歩をもたらす。

以上の点において、本論文は獣医学的にも重要な意義を認める。

以上のことから、本論文は、科学的にも獣医学的にも意義が大きいと判断でき、博士（獣医学）の学位を授与する価値を認める。

2014年2月19日

審査員

主査	教授	横田	博
副査	教授	加藤	清雄
副査	教授	谷山	弘行