

氏 名（本籍）	た 田 しろ 代 あつ 敦 し 志
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 第 3 2 0 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 9 月 13 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
最 終 学 歴	昭 和 62 年 3 月 25 日 旭川医科大学医学部医学科卒業
学 位 論 文 題 目	ヒト胃粘膜における DHEA-ST の発現と活性

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教 授 本 郷 道 夫	教 授 佐 々 木 巖
	教 授 下 瀬 川 徹	

論文内容要旨

目 的

生体内で、硫酸抱合に関わる代謝酵素である Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase (DHEA-ST) は、副腎皮質網状層において ACTH の影響下で Dehydroepiandrosterone (DHEA) の硫酸抱合を行い、血中の大部分の Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) を産生する役割を持つ。

さらに、DHEA-ST はヒトにおいて、副腎以外に肝臓、小腸にもその存在が知られているが、生理的意義は明らかにされていない。近年、ラットの水浸拘束ストレス下における胃潰瘍発症に、DHEAS が防御的に作用することが報告され、胃粘膜における DHEA の代謝が推察されることからヒト胃粘膜を対象に DHEA-ST の発現と活性について検討を行った。

方 法

胃癌で摘出された胃粘膜の正常組織 23 例に関して 8%パラホルムアルデヒドで固定したパラフィン切片において、ヒト副腎、肝臓の DHEA-ST に交差性を認める anti-rat liver DHEA-ST IgG との反応を 4℃で 18 時間行い、SAB (ストレプトアビジン-ビオチン) 法により免疫染色を行なった。連続切片について anti H⁺K⁺-ATPase 抗体による免疫染色を同時に行った。一次抗体の希釈率はそれぞれ DHEA-ST が 1 : 500, anti H⁺K⁺-ATPase が 1 : 8000 であり、一次抗体に normal rabbit IgG もしくは 0.01mol/L PBS のみを用いた切片では反応は全く認められなかった。

抗原蛋白質の検出は、胃粘膜組織及び対照として副腎組織の細胞質成分を分離し、一次抗体として anti-rat liver DHEA-ST IgG と反応させ、HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) により行った。

in situ ハイブリダイゼーションは、ビオチン標識した合成オリゴヌクレオチドプローブ (ヒト DHEA-ST 遺伝子 exon V 200-210 アミノ酸) を用いて同じパラフィン切片に対して、Micro Probe staining system により行った。

DHEA-ST の酵素活性の測定は、胃粘膜組織の細胞質成分を分離し、組織に含まれる 3β-hydroxysteroid dehydrogenase を阻害した条件下で、[³H]-DHEA (0.125 μCi/tube) 及び DHEA に対する硫酸抱合を 37℃で 90 分間行い、水層に移行した [³H] DHEAS をカウント、単位蛋白量あたりの DHEA→DHEAS 変化量を DHEA-ST の酵素活性と定義して計測した。

結 果

免疫染色において、全ての症例で DHEA-ST の発現が胃底腺領域に認められた。連続切片において抗プロトンポンプ抗体により同定された壁細胞の分布とほぼ一致することから、DHEA-ST が壁細胞機能に関わる可能性が推察された。ウェスタンブロットングにおいて DHEA-ST 蛋白の分子量は、副腎由来の DHEA-ST 蛋白の分子量 35-kDa と一致した。*in situ* ハイブリダイゼーションにおいても同部位において DHEA-ST mRNA の発現が認められ、この酵素が胃粘膜において産生されていることが確認された。酵素活性の測定結果、DHEA-ST 活性は年齢、性別とは無関係に個体差を認め、6~84pmoles/mg protein/90min であり、胃体部由来の検体と比較して幽門部における酵素活性は低い傾向を示した。胃粘膜における DHEA-ST の酵素活性は、近年報告された、ラットの脳内における DHEA-ST の酵素活性に近い値を示し、肝臓、副腎と比較して低い値であった。

結 論

胃粘膜に存在する DHEA-ST は、血中に存在する DHEAS の生合成に関与している可能性は低く、末梢における DHEAS の産生を通して、生理作用を発現している可能性が高いと考えられた。消化管においては、これまでに、小腸粘膜において DHEA-ST の発現が報告されているが、今回の検討で、胃粘膜における発現は、壁細胞の分布とほぼ一致していることが明らかとなり、生理活性も有することが確認された。したがって、胃粘膜に存在する DHEA-ST は、小腸とは異なる生理作用を持つことが推測され、経口摂取した薬物の無毒化に加えて粘膜の防御機構に影響を与えている可能性が示唆された。

審査結果の要旨

本論文は、生体内で、硫酸抱合に関わる代謝酵素である DHEA-ST について胃癌で摘出された胃粘膜の正常組織23例を対象にその発現と活性について検討を行ったものである。これまで DHEA-ST は副腎以外の部位における生理的意義は十分明らかにされておらず、ヒト胃粘膜に関してはその存在の報告すらない。本論文ではヒト副腎、肝臓の DHEA-ST に交差性を認める anti-rat liver DHEA-ST IgG を一次抗体として SAB 法による免疫染色を行い、さらに連続切片について anti H^+K^+ -ATPase 抗体による免疫染色を行っている。その結果、胃底腺領域に壁細胞と一致して DHEA-ST の発現を確認している。抗原蛋白質の検出は、同じ anti-rat liver DHEA-ST IgG を用いてウェスタンブロッティングを行い副腎由来の DHEA-ST 蛋白質の分子量 35-kDa と一致することを確認している。さらに、in situ ハイブリダイゼーションは、合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて、micro probe staining system により行い、同部位における DHEA-ST mRNA の発現をセンスプローブによるものと比較検討しており、この酵素が胃粘膜において産生されていることを明らかにしている。DHEA-ST の酵素活性の測定は、 $[^3H]$ -DHEA に対する硫酸抱合を37°Cで90分間行い、水層に移行した $[^3H]$ -DHEAS を測定して、単位蛋白量あたりの DHEA から DHEAS への変化量を DHEA-ST の酵素活性と定義して行っている。測定結果は、近年報告された、ラットの脳内における DHEA-ST の酵素活性に近い値であり、副腎における酵素活性と比較して極めて低い値であることから胃粘膜に存在する DHEA-ST は、血中に存在する DHEAS の生合成に関与している可能性は低いと述べている。本論文は、ラットの水浸拘束ストレス下における胃潰瘍発症に、DHEAS が防御的に作用することが報告されていることを引用し、ヒト胃粘膜における DHEA-ST の存在意義として末梢における DHEAS の産生を通して、その生理作用を発現している可能性が高いと結論づけている。一次抗体の選定、使用したプローブ等を含め方法論、論旨の展開共に妥当性があり、これまで報告のなかったヒト胃粘膜において、生理活性を有する DHEA-ST の存在を初めて明らかにしている。よって、本論文の内容、その意義は学位論文に値すると考えられる。