

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 妊娠初期のヒト胎児における下垂体-副腎系の働きとその性分化に及ぼす影響

氏 名 後藤正博

【研究目的】女性胎児においても、胎生早期の未分化な外内性器がアンドロゲンに曝露されるとその男性化(女性仮性半陰陽)が起こる。その代表的な疾患である 21 水酸化酵素欠損症では同酵素の欠損によって副腎皮質におけるコルチゾールの合成が低下し、下垂体へのネガティブ・フィードバックが障害されるために ACTH の分泌が亢進し、これが副腎におけるアンドロゲンの合成を亢進させ、外内性器の男性化が起こると考えられている。

この男性化を予防する目的で、海外で行なわれている妊娠初期(first trimester)の 21 水酸化酵素欠損症の高リスク妊婦へデキサメサゾンを投与する胎児治療は、糖質コルチコイドが下垂体-副腎系のネガティブ・フィードバックを回復させることを前提としている。

しかしながら胎児治療の開始時期として推奨されている胎生 6 週の時点では胎児の下垂体は口腔側のラトケ嚢と中枢側の漏斗突起に分かれたままであり、胎児下垂体がいつ頃からホルモン分泌能を有し、副腎を制御しているのかは明らかでない。

ヒト胎児の副腎がステロイド合成を開始する時期も不明であり、特にコレステロールからコルチゾールやアルドステロンの合成に必須な HSD3B2 (3β ステロイド水酸化脱水素酵素) の発現する時期については諸説があり結論が出ていない。また、ヒト胎児の副腎ではその内側に見られる胎児層がアンドロゲンを産生するが、この胎児層の存在は霊長類の副腎のみに限られており、マウスなどの胎児層を有さない副腎ではアンドロゲンは産生されず、女性仮性半陰陽のモデル動物とはなり得ない。さらに、脊椎動物のあいだで互いに相同すると考えられている胚発生期でも、種によって各臓器が形成される時期や、形成された臓器の機能を規定する mRNA や蛋白が発現する時期は異なる。

他方、ヒトの 21 水酸化酵素欠損症女児における外内性器の男性化やそれを予防する胎児治療については、妊娠初期の限定された時期にホルモンが作用することが必須である。

以上のような理由から、当研究では実際に妊娠初期のヒト胎児の副腎、下垂体組織を用いて下垂体-副腎系の機能とその開始時期を検討し、女性仮性半陰陽の成因や胎児治療の妥当性についての考察を行なった。

【対象】 中絶の処置に関する同意が胎児組織の研究使用に関する同意の前に予め取得してあることを主旨とした the Polkinghorne committee のガイドラインに従い、Southampton & South West Hampshire Local Ethics Committee および New Castle Health Authority からの承認を得た上でヒト胎児組織の収集と使用を行った。薬物療法または手術による中絶を受けることに同意した女性から、あらかじめ書面でインフォームド・コンセントを取得し、中絶施行後に胎児組織を収集した。

ヒト胎児組織の胎齢は Carnegie stage または足のサイズをもとに決定した。収集した胎児組織の胎齢は胎生 33 日から 14 週であった。

【方法】 得られた胎児組織を顕微鏡下で各臓器に剥離、同定したのち、免疫染色はスライドグラス上に貼り付けた切片に、ステロイド合成酵素、ACTH、Ki67、CD34、NGF1-B、糖質コルチコイドレセプター (GR) などの一次抗体、ビオチン標識二次抗体、streptavidin-horseradish peroxidase conjugate を順次加えて反応させ、0.1%過酸化水素水を含んだジアミノベンジジンで発色させた。二重染色ではアルカリフォスファターゼ標識二次抗体も用いた。

RT-PCR は冷凍保存した組織から全 RNA を分離、抽出し、続いて cDNA を合成した。目的とする各遺伝子の mRNA に特異的なプライマーを作成して PCR 反応を行ない、PCR 産物を 1%アガロースゲルで分離し特異的バンドを検出した。

組織培養は副腎については一對の胎児副腎を培養液に入れ、一方の溶媒にはアゴニストとして ACTH または

forskolin を加えて一晩培養したのちに溶媒中のコルチゾールを測定し、アゴニストを加えなかった対照群と比較した。溶媒中のアンドロゲン(アンドロステンジオン、テストステロン)についても測定し、ACTH または forskolin の投与による増加や、デキサメサゾン投与による抑制の有無を検討した。

下垂体については胎児下垂体組織を正中で二分し、2 つの外植片をデキサメサゾン投与群と対照群に分けて個々に培養し、デキサメサゾン投与の前後における ACTH 濃度の変化を対照群との比較で標準化した。

胎児副腎中のステロイドについてはジクロロメタンを加えて抽出したのちに、また、溶媒中のステロイドと ACTH については直接に、化学発光免疫測定 (CLIA) 法にて分析した。測定値は Student の両側 t 検定を用いて解析した。

CLIA 法により検出されたステロイドの存在を確認するためにガスクロマトグラフィ/質量分析法 (GC/MS) を行ない、副腎培養後の溶媒中のアンドロステンジオン、テストステロン、コルチゾールそれぞれの保持時間における波形を校正用サンプルと比較検討した。

【結果】 ヒト胎児の副腎皮質は胎生 33 日で未分化性腺から形態的に区別できるようになり、その後急速に成長するが、細胞分裂の指標である Ki67 は definitive zone と呼ばれる外層に発現していた。胎生 41 日には血管新生を示す CD34 陽性の細胞が大動脈と中腎のあいだに位置する発生初期の副腎に進入していた。

ステロイド合成酵素である steroid acute regulatory protein (StAR)、CYP11A、CYP17、CYP21、CYP11B は胎生 50~52 日より胎児副腎の胎児層に発現が見られた。HSD3B2 とそれを制御する orphan 核受容体 NGFI-B も胎生 50~52 日より definitive zone に一過性に出現し、胎生 14 週までに消失した。胎生 8 週の胎児副腎における RT-PCR でも同様のステロイド合成酵素の発現が見られた。

胎生 8 週以降の副腎はコルチゾールを分泌し、ACTH または forskolin の投与により増加したが、胎生 10 週における分泌量は 8、9 週に比べて有意に減少していた。

下垂体も胎生 50~52 日より ACTH、糖質コルチコイド受容体を発現していた。胎生 8 週の胎児下垂体を培養した溶媒からは ACTH が検出され、デキサメサゾンの投与によって抑制された。

胎生 8 週の胎児副腎はアンドロステンジオン、テストステロンなどのアンドロゲンも分泌し、ACTH または forskolin の投与により増加した。

GC/MS を用いて、溶媒中で検出されたコルチゾール、アンドロステンジオン、テストステロンの波形を校正用サンプルと比較検討したが、同一物質であることを確認した。

【考察】 以上の結果は、胎生 7 週頃の胎児副腎がステロイド合成酵素のうち StAR、CYP11A、CYP17、CYP21、

CYP11B ばかりでなく、これまで妊娠初期における存在が疑問視されていた HSD3B2 も一過性に発現していることを示した。この HSD3B2 の発現は、妊娠後期においてそれを制御することが知られている orphan 核受容体である NGFI-B の発現時期や、胎生 8~9 週にピークとなる胎児副腎におけるコルチゾールの合成とも同期していた。また、胎児副腎においてはコルチゾールばかりでなく、アンドロステンジオンやテストステロンなどのアンドロゲンの合成も、ACTH の投与によって上昇した。

同時期の胎児下垂体は ACTH と GR を発現し、デキサメサゾンの投与によって ACTH の分泌が抑制されたことから、下垂体-副腎系とそのネガティブ・フィードバックは胎生 7~8 週の胎児においてもすでに十分に機能し始めていると推測される。このことは 21 水酸化酵素欠損症の胎児治療に用いられるデキサメサゾンの投与が胎児の下垂体に直接作用することを示唆し、副腎がアンドロゲンを産生し始める前の早期に開始する胎児治療の理論的根拠になると考えられた。

さらに本研究の結果から、妊娠初期の胎児副腎に見られた HSD3B2 の一過性の発現は、第 1 には CYP17 と競合することによって、第 2 にはコルチゾールを合成して下垂体からの ACTH の分泌を抑制することによって副腎におけるアンドロゲンの産生を抑え、この時期にはまだ胎盤のアロマターゼ活性が低いために副腎で産生されるアンドロゲンの影響を受けやすい女性胎児の外内性器が正常女性型へ分化するのを保護するという、これまでに提唱されていない胎児副腎の新たな役割を示唆していると考えられた。