

ヒト毛乳頭細胞における androgen receptor, 5 α -reductase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase の発現

大阪大学 医学部皮膚科学教室

板 見 智

In order to know whether adrenal and gonadal weak androgens are utilized to form active androgens in human hair, we studied the expression of androgen receptor (AR), 5 α -reductase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) in cultured dermal papilla cells(DPCs) from various body sites. AR was expressed with the order being male axillary hair $\approx$ female axillary hair>Beard> occipital scalp hair. The expression of Type I 5 α -reductase is a ubiquitous property of DPCs. In DPCs from beard, a high level mRNA of type II 5 α -reductase was observed, which is in contrast to the undetectable level in DPCs from occipital scalp hair and axillary hair. Type II 17 β -HSD mRNA was strongly expressed in outer root sheath cells (ORSCs). DPCs except for male axillary hair, expressed no type II 17 β -HSD. On the other hand, type III 17 β -HSD mRNA was strongly expressed in beard and axillary DPCs, and was equally expressed in axillary DPCs from both sexes. ORSCs showed low level of the expression. mRNA Expression of type III 17 β -HSD in DPCs was not regulated by androgen in axillary DPCs. These results suggest that the sensitivity of hairs to androgen is partially controlled by the cell-site specific expression of AR, 5 α -reductase, and 17 β -HSD in DPCs.

1 緒 言

ヒトの毛組織は、主に外胚葉由来の上皮系毛包と中胚葉に由来する結合織性毛包により構成されている。毛包の下部では基底膜を境に未分化な毛母細胞と間葉系の毛乳頭細胞が合い接して存在しこれらの細胞間の相互作用により毛の発育分化がなされる。ヒトの毛の発育が男性ホルモンに影響を受けることはよく知られているが、その反応性は部位によって異なり、髭毛、胸毛は通常思春期以後の男性においてのみ軟毛より終毛への変化を認めるが、腋毛、恥毛では両性に認められるようになる。また、遺伝的に決められた特定の男性においては、男性型脱毛の発症にも関与する。これらの毛周期の変化が男性ホルモンが毛乳頭細胞に作用して生じることが明らかとなってきた¹⁻⁶⁾。これまでに髭、腋毛の毛乳頭細胞では後頭部の毛乳頭細胞に比べ男性ホルモン受容体は豊富に存在

しており、髭の毛乳頭細胞は後頭部の毛乳頭細胞に比べ5 α -reductaseの活性が数倍高く^{1, 5, 7)}、至適pHよりⅡ型の5 α -reductaseであり⁵⁾、男性の腋毛の毛乳頭細胞における5 α -reductaseは活性の低いⅠ型の5 α -reductaseであることが明らかになっている^{7, 8)}。

一方、女性においては思春期発来の数年前より恥毛や腋毛が成長してくる⁹⁾。副腎由来の男性ホルモンであるdehydroepiandrosterone (DHEA)、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S)、androstenedione (Δ^4 -A)は思春期の数年前からすでに増加し始めている^{10, 11)}。これらのことは副腎由来の男性ホルモンが末梢組織において強力な男性ホルモンに変換されることを示唆している。弱い性ステロイドホルモンと強力な性ステロイドホルモンの相互変換作用を有する17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD)は、性ステロイドホルモンが働くための鍵となる酵素である¹²⁾。Ⅱ型の17 β -HSDはテストステロン(T)を Δ^4 -Aに不活化し、Ⅲ型の17 β -HSDは Δ^4 -AをTに活性化する¹³⁻¹⁵⁾。

そこでわれわれは、ヒト毛乳頭細胞における男性ホルモン作用メカニズムの性差や部位間差を知るために、男性ホルモン受容体、Ⅰ型、Ⅱ型の5



Expression of androgen receptor, 5 α -reductase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells

Satoshi Itami

Department of Dermatology,
Osaka University Medical School

α -reductase および II 型、III 型の 17 β -HSD の発現について比較した。

2 実験

2.1 毛乳頭細胞培養

毛乳頭細胞の採取と細胞培養はこれまでに記載されている方法で行った^{1, 16)}。皮膚標本は形成外科的に入手し、毛乳頭細胞は男性 17 歳から 47 歳、女性 18 歳から 40 歳の皮膚標本から単離した。髭、腋毛、後頭部毛の各々 5 サンプルを用いた。これらはダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に 10 % 子牛血清 (FCS) を加えた培地で 95 % O₂、5 % CO₂、37°C の条件下で培養した。サブコンフルエントになった時点で 2 % FCS を加えた DMEM 培地で 48 時間培養し全 RNA を抽出した。すべて 3 代から 6 代まで継代した細胞を用いた。外毛根梢細胞は髭の抜去毛包を用い、以前に記載されている方法で培養した^{4, 7)}。培養外毛根梢細胞の培地は MCDB153 に 0.4 μ g/mL hydrocortisone、5 μ g/mL insulin、50 μ g/mL ampicilin、6.1 μ g/mL

ethanolamine、14.1 μ g/mL phosphoethanolamine、5 ng/mL の表皮細胞成長因子 (EGF) と 0.1mM Ca²⁺を加えた KGM 培地で培養した。

2.2 RT-PCR 法

回収した細胞より全 RNA を acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform 法で抽出した。それぞれの総 RNA の 1 μ g を用いて 2.5 M random hexamer、5mM MgCl₂、50mM KCl、10mM Tris - HCl、pH8.3、1 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP)、1.0U/ μ L RNase inhibitor (Takara, Tokyo, Japan) と 2.5U/ μ L M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL, MD) の条件で逆転写反応を行った。PCR は得られた cDNA 100 μ g を用い 0.5 μ M プライマー、2mM MgCl₂、50mM KCl、10mM Tris-HCl、pH8.3、0.025U/ μ L recombinant Taq DNA polymerase (Takara, Tokyo, Japan) の条件で行った。PCR のオリゴヌクレオチドプライマーは公表されている cDNA シークエンスに基づいたも

表1 オリゴヌクレオチド プライマー

		プライマー	位置	サイズ(bp)
I 5 α -R	Sense	5'-TTACCCGTTTCTGATGCGAG	333 -352	1024
	Anti-sense	5'-GTTCTCCACTTACACACAGC	1337 -1356	
II 5 α -R	Sense	5'-GGCCTCTTCTGCGTACATTA	280 -299	803
	Anti-sense	5'-CTAAGAAGCAACTGTCGCCA	1063 -1082	
AR	Sense	5'-GGTAAGGGAAGTAGGTGGAA	324 -343	998
	Anti-sense	5'-CCTTCTAGCCCTTTGGTGTA	1302 -1321	
II 17 β -HSD	Sense	5'-CAAATGGACATCACGAAGCCAGTGC	489-513	827
	Anti-sense	5'-CCGAGTTTCCCAGTTTCCCTTTCAT	1291-1315	
III 17 β -HSD	Sense	5'-TTCTGGGATAGCCCTGTTTCCTTGG	600-624	459
	Anti-sense	5'-TGGTCTGCTCCTCTGGTCCTCTTCA	1034-1058	
G3PDH	Sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAG	250 -267	577
	Anti-sense	5'-CCTGCTTCACCACCTTCT	809 -826	

I 5 α -R, I型 5 α -reductase ; II 5 α -R, II型 5 α -reductase ; AR, 男性ホルモン受容体 ; II 17 β -HSD, II 型 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase ; III 17 β -HSD, III型 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase ; G3PDH, glyceralde-3-phosphate dehydrogenase

のを使用し、それを表1にまとめた。I型の 5α -reductaseは30サイクルで、II型の 5α -reductase及び男性ホルモン受容体は35サイクルで、II型、III型の 17β -HSDは38サイクルでPCRを行った。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)を内部コントロールとした。これらの増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動で分析した。

3 結果

3.1 PCR増幅産物の同定

RT-PCR法で得られた男性ホルモン受容体、 5α -

α -reductase、 17β -HSDのそれぞれの産物を特異的な制限酵素の切断パターンで確認した。図1に示すように切断されたサンプルはアガロースゲル電気泳動法により予測されるサイズと一致した。

3.2 男性ホルモン受容体、 5α -reductaseの発現

髭、後頭部毛、男女の腋毛の培養毛乳頭細胞で 5α -reductaseと男性ホルモン受容体のmRNA発現を比較した(図2)。男性ホルモン受容体は、男性腋毛 = 女性腋毛 > 髭 > 後頭部毛の毛乳頭細胞の

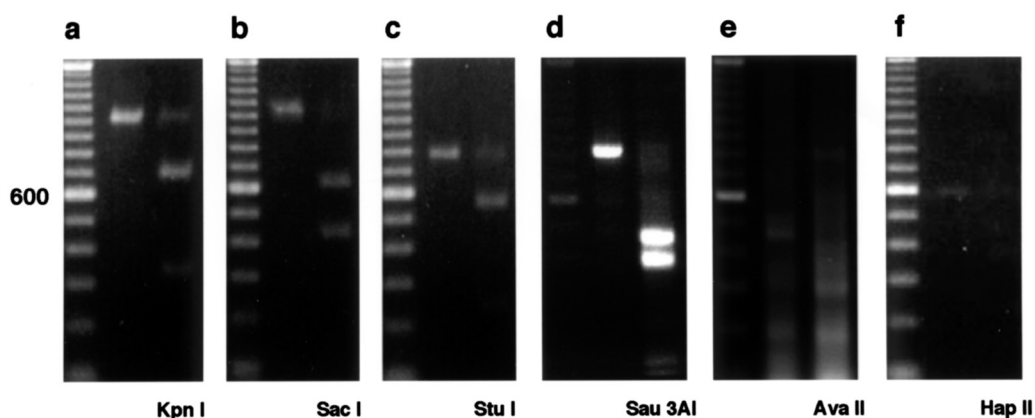


図1 PCR産物の制限酵素による同定

(a) 型 5α -reductase、(b) 型 5α -reductase、(c) 男性ホルモン受容体、(d) 型 17β -HSD、
(e) 型 17β -HSD、(f) G3PDH

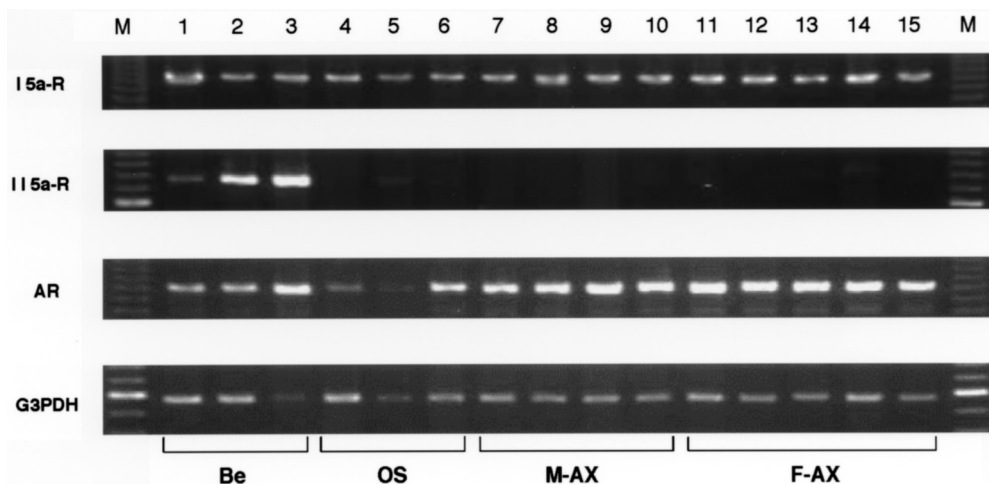


図2 身体各部の毛乳頭細胞における型 5α -reductase、型 5α -reductase、男性ホルモン受容体の発現
Be、髭； OS、後頭部毛； M-A、男性腋毛； F-AX、女性腋毛

順に強く発現していた。I型の5 α -reductaseはすべての毛乳頭細胞で発現を認めた。II型の5 α -reductaseは髭の毛乳頭細胞で強く発現していたが、腋毛と後頭部毛では発現していなかった。

3.3 17 β -HSDの発現

毛乳頭細胞や髭の外毛根鞘細胞における17 β -HSDの発現についても検討した。II型の17 β -HSDは外毛根鞘細胞で強く発現しており、毛乳頭細胞においては男性腋毛の一部で発現を認めたのみであった(図3)。一方、III型の17 β -HSDは髭及び男女の腋毛で強く発現しており、その発現に性差を認めなかった(図4)。III型の17 β -HSD

の発現は外毛根鞘細胞では弱く、身体各部位における外毛根鞘細胞でも発現に違いは認めなかった。III型の17 β -HSDの発現に対する男性ホルモンの影響についても検討した。細胞は10⁻⁹Mの合成男性ホルモンである methyltrienolone (R1881)とそれに抗男性ホルモン剤である10⁻⁶Mの cyproterone acetateを加えた培地で48時間培養し全RNAを抽出した。これらの処理によってもIII型の17 β -HSDのmRNAの発現は特に影響を受けなかった(図5)。

4 考 察

われわれは、髭、男女の腋毛、後頭部毛の培

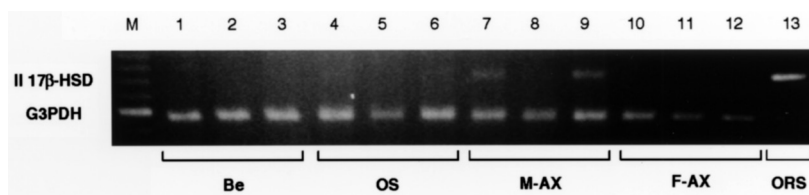


図3 身体各部の毛乳頭細胞と髭の外毛根鞘細胞における型17 β -HSDの発現
Be、髭； OS、後頭部毛； M-AX、男性腋毛； F-AX、女性腋毛； ORS、外毛根鞘細胞

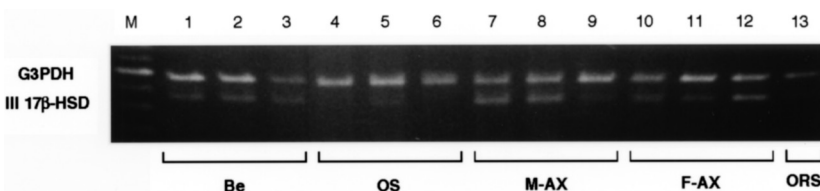


図4 身体各部の毛乳頭細胞と髭の外毛根鞘細胞における型17 β -HSDの発現
Be、髭； OS、後頭部毛； M-AX、男性腋毛； F-AX、女性腋毛； ORS、外毛根鞘細胞

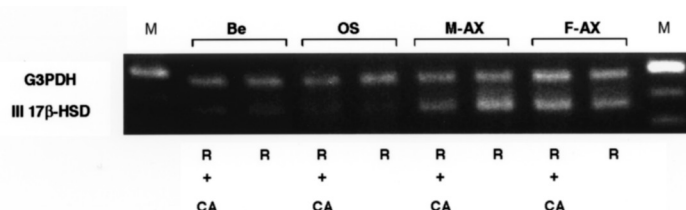


図5 身体各部の毛乳頭細胞における型17 β -HSDの発現に対する男性ホルモンの影響
Be、髭； OS、後頭部毛； M-AX、男性腋毛； F-AX、女性腋毛； R、10⁻⁹MR1881； R+CA、10⁻⁹MのR1881及び10⁻⁶Mのcyproterone acetate。

養毛乳頭細胞における男性ホルモン受容体、5 α -reductase、17 β -HSD mRNA の発現を検討した。髭の毛乳頭細胞は男性ホルモン受容体、5 α -reductase mRNA を発現しており、特にⅡ型の5 α -reductase の発現を強く認めた。これらの結果は我々がこれまで報告してきた髭の毛乳頭細胞における男性ホルモン受容体蛋白の発現や5 α -reductase 活性の結果と一致した^{1~7)}。また、腋毛の毛乳頭細胞ではⅡ型の5 α -reductase の発現は強くないが、男性ホルモン受容体の発現は強く認めた。Ⅰ型の5 α -reductase はすべての毛乳頭細胞で発現を認めた。Ⅱ型の5 α -reductase 欠損症では思春期に腋毛は正常に認めざ瘡も発症するが、髭の発育は認めず男性型脱毛も発症しない¹⁷⁾。髭や男性型脱毛のような強い男性化徴候の発来には男性ホルモン受容体とⅡ型の5 α -reductase の両方が必要だが、腋毛やざ瘡の発症にはT自体が男性ホルモン受容体に結合して作用するのか⁸⁾、もしくは脂腺や外陰部の線維芽細胞のようにⅠ型の5 α -reductase を利用してTをDHTに変換して働くものと考えられる^{18, 19)}。

これまでに4タイプの17 β -HSDが確認されている^{12, 20, 21)}。Ⅰ型の17 β -HSDはヒトの胎盤や卵巣、乳房で発現しており、estroneを生物活性の強いestradiolに変換する^{22, 23)}。Ⅱ型の17 β -HSDは前立腺、胎盤、肝臓、腸管、子宮内膜、腎臓、脾臓、結腸で発現しており、estoradiolをestroneへ、Tを Δ^4 -Aへ不活化させる^{13, 14)}。精巣のみで認められるⅢ型の17 β -HSDは、 Δ^4 -AをTへ活性化させる¹⁵⁾。最近同定されたⅣ型の17 β -HSDはestrogenを活性化するのに重要な働きをする¹²⁾。またⅤ型の17 β -HSDも発見されたが、その作用は確定されていない²⁴⁾。

われわれは、毛乳頭細胞と外毛根梢細胞における男性ホルモン代謝酵素であるⅡ型の17 β -HSDとⅢ型の17 β -HSDのmRNAを検討した。Ⅱ型の17 β -HSDのmRNAは外毛根梢細胞で強く発現しており、毛乳頭細胞においては男性腋毛の一部で発現を認めたのみでその他は認めなかった。

これらの結果は、表皮細胞や髭の培養外毛根梢細胞ではTは主に Δ^4 -Aに変換されるという結果と一致する²⁵⁾。おそらく皮膚の上皮系の細胞は男性ホルモンを不活性化することでホメオスタシスを保つ作用があると推測される。一方、Ⅲ型の17 β -HSDのmRNAは髭及び男女の腋毛で強く発現しており、その発現は性差を認めなかった。Ⅲ型の17 β -HSD発現を精巣以外の組織で認めたのはこれが初めてである。思春期数年以前の副腎の男性ホルモンが急激に増加する時期はadrenarcheと呼ばれ、思春期発来に先だって腋毛や恥毛の発育を認める^{10, 11)}。これは副腎由来の男性ホルモンが末梢組織において Δ^4 -Aに代謝され、さらに腋毛や恥毛の毛乳頭細胞内でⅢ型の17 β -HSDによりTへ変換されることにより活性の高い男性ホルモンとして作用するものと考えられる。

以上、毛乳頭細胞における男性ホルモン感受性は男性ホルモン受容体、5 α -reductase、17 β -HSDの発現によっても制御されていることが示唆された。

参考文献

- 1) Itami S, Kurata S, Takayasu S. 5 α -reductase activity in cultured human dermal papilla cells from beard compared with reticular dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 150-2.
- 2) Randall VA, Thornton MJ, Messenger AG. Cultured dermal papilla cells from androgen-dependent human hair follicles (e.g. beard) contain more androgen receptors than those from non-balding areas of scalp. *J Endocrinol* 1992; 133: 141-7.
- 3) Choudhry R, Hodgins MB, Van der Kwast TH et al. Localization of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry: implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. *J Endocrinol* 1992; 133: 467-75.
- 4) Itami S, Kurata S, Sonoda T et al. Interaction

- between dermal papilla cells and follicular epithelial cells in vitro: effect of androgen. *Br J Dermatol* 1995; 132: 527-32.
- 5) Itami S, Kurata S, Sonoda T et al. Characterization of 5 α -reductase in cultured human dermal papilla cells from beard and occipital scalp hair. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 57-60.
 - 6) Hibberts NA, Howell AE, Randall VA. Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp. *J Endocrinol* 1998; 156: 59-65.
 - 7) Itami S, Kurata S, Sonoda T et al. Mechanism of action of androgen in dermal papilla cells. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 642: 385-95.
 - 8) Hamada K, Thornton MJ, Laing I et al. The metabolism of testosterone by dermal papilla cells cultured from human pubic and axillary hair follicles concurs with hair growth in 5 α -reductase deficiency. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1017-22.
 - 9) Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969; 44: 291-303.
 - 10) Prader A. Growth and development. In: *Clinical Endocrinology Theory and Practice* (Labhart A, ed), 3rd edn., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1978; 1013-53.
 - 11) Odell WD. Endocrinology of sexual maturation. In: *Endocrinology* (DeGroot LJ, Besser M, Burger HG et al., eds), 3rd edn., Vol. 2., Philadelphia: Saunders, 1995; 1938-52.
 - 12) Labrie F, Luu The V, Lin SX et al. The key role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 1997; 62: 148-58.
 - 13) Wu L, Einstein M, Geissler WM et al. Expression cloning and characterization of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 1993; 268: 12964-9.
 - 14) Casey ML, MacDonald PC, Andersson S. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium. *J Clin invest* 1994; 94: 2135-41.
 - 15) Geissler WM, Davis DL, Wu L et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 1994; 7: 34-9.
 - 16) Messenger AG. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br J Dermatol* 1984; 110: 685-9.
 - 17) Wilson JD. Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod* 1992; 46: 168-73.
 - 18) Thiboutot D, Harris G, Iles V et al. Activity of the type 1 5 α -reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 209-14.
 - 19) Mestayer C, Berthaut I, Portois MC et al. Predominant expression of 5 α -reductase type 1 in pubic skin from normal subjects and hirsute patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1989-93.
 - 20) Adamski J, Leenders F, Carstensen JF et al. Steroids, fatty acyl-CoA, and sterols are substrates of 80-kDa multifunctional protein. *Steroids* 1997; 62: 159-63.
 - 21) Andersson S, Moghrabi N. Physiology and molecular genetics of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* 1997; 62: 143-7.
 - 22) Peltoketo H, Isomaa V, Maentausta O et al. Complete amino acid sequence of human placental 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett* 1988; 239: 73-7.
 - 23) Martel C, Rheaume E, Takahashi M et al. Distribution of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in

- rat and human tissues. J Steroid Biochem Mol Biol 1992; 41: 597-603.
- 24) Zang Y, Dufort I, Soucy P et al. Cloning and expression of human type V 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. 77th Annual Meeting of the Endocrine Society 1995; 622 (P3-614). Abstract.
- 25) Sonoda T, Itami S, Kurata S et al. Testosterone metabolism by cultured human beard outer root sheath cells in comparison with epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci 1993; 6: 214-8.