

令和元年6月13日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08076

研究課題名(和文) リゾホスファチジン酸による妊娠維持と分娩誘起の制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on control mechanism of maintenance of pregnancy and induction of parturition by lysophosphatidic acid

研究代表者

久留主 志朗 (Kurusu, Shiro)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：50215076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中期あるいは後期のラットに対するLPA産生酵素であるautotaxinの抗血清もしくは化学阻害薬(S32826)の投与は、黄体からのプロゲステロン分泌を変調させ、分娩のタイミングを早めたり、あるいは一日以上遅延させた。局所(卵巣嚢内)投与と全身(静脈内)投与では、一部異なる変化が示された。局所投与時の黄体の変化としてはステロイド産生細胞のサイズや組織内血流量が低下した。LPAは子宮収縮を促進させたが、PGF2aの産生・作用を介さないことが示唆された。胎盤におけるautotaxinとLPA受容体の蛋白質発現量、免疫反応性は共に妊娠後期に増加し、主な陽性部位は、脱落膜、巨細胞の細胞質であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母体の妊娠、並びに胎子の発育機構について格好の研究モデルであるラットを用いて、卵巣、子宮、胎盤の複数の臓器においてautotaxinが発現し、おそらくはLPAの合成・作用を介して個々の機能の発現を調節していることを示唆する基礎情報を得た。その機能は、少なくとも卵巣細胞のステロイド分泌とサイズ調節、局所の血流量、子宮の平滑筋収縮と多様である。分娩発来への循環血中ATXの影響は興味深いところである。もとより生殖は動物種差の大きい機構であり、この動物モデルでの知見が産業動物等に外挿されるかは不明であるが、例えばヒトの妊娠高血圧症候群との関連が想定され、トランスレーショナル研究への展開が求められる。

研究成果の概要(英文)：A bolus administration of antibody or chemical inhibitor (S32826) against autotaxin, an LPA-synthesizing enzyme, to mid- and late-pregnant rats resulted in altered progesterone secretion from corpus lutea and altered timing of parturition. The temporal changes are both advanced and delayed with a half- or one day. Local (ovarian bursal) and systemic (iv) injections caused partly different responses, suggesting distinct biological effects of autotaxin-generating LPA between corpus lutea and circulatory system. Local challenge resulted in decreases in steroidogenic cell size and blood flow in luteal tissues. LPA exerted a significant uterotonic effect, which was unlikely mediated by PGF2a synthesis and action. Placental expression of autotaxin and LPA receptors increased toward the end of pregnancy. The main immunoreactive sites were cytosol in decidual and giant cells. Autotaxin and LPA may play diverse roles in maintenance and termination (parturition induction) of pregnancy in rats.

研究分野：繁殖生理学

キーワード：妊娠 分娩 リゾホスファチジン酸 ラット 黄体 子宮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筆者は、新規の脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸(LPA)の産生に関わるホスホリパーゼA2(GIVA PLA2)とオートタキシン(ATX)及び2種類のLPA受容体(LPA3/LPA4)が、ラットの雌性生殖の様々な組織に時期特異的に発現している成績を得た。黄体の組織リモデリングに関する新規機能を見出したが、生殖におけるLPAの機能的意義や作用機序については殆んど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠後半期の黄体の機能及び形態維持機構、妊娠維持と分娩発来における内分泌修飾、そして子宮平滑筋の収縮への効果を調べることで、妊娠維持と分娩発来におけるATX/LPAの役割について総合的解明を目指した。

3. 研究の方法

テーマ 妊娠12もしくは18日目に卵巣嚢内にATX阻害薬を投与し、48時間後に卵巣、血液を採取後、黄体細胞の容積、P4分泌、血管内皮細胞の増殖、黄体内血流量の変化、貪食細胞の浸潤を調べた。

テーマ 市販及び受託合成した2種類の抗体を妊娠12日目、もしくは18日目に静脈内投与し、妊娠が維持あるいは中断されるか、分娩に変調が来するか否か(分娩の起こるタイミング)さらに胎児の発育への影響(娩出された新生児の生死状態や発育状態(体重、雌雄の区別))を検討する。さらにP4分泌への影響を調べた。

テーマ 分娩前後のラット子宮筋の収縮に対してLPA単独投与、PGF2aやオキシトシンとの併用投与の効果を検討した。PGF2aとの相互作用が見られたので、3種類の産生酵素阻害薬の添加効果も検討した。最後にテーマ 胎盤の発達に対するATX/LPA受容体の免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

テーマ ATXに関する筆者らの初期の研究において極めて有効であったCayman社製の抗体であったが、一時販売中止になった。そのためその抗体の作成と同じ抗原ペプチドを免疫して作成したSigma-Aldrich社製のものの使用を開始したが、精製していない分、抗体価はかなり劣っていた。それでも、濃度を高めて投与すると効果が見られるため、大量に得られた抗血清を用いて実験を行なった。Sigma-Aldrich社製の抗ATX抗血清を妊娠12日目の卵巣嚢内に局所投与したところ、 $\times 10$ 希釈濃度では変化が認められなかったが、 $\times 3.3$ 希釈濃度で72時間後の血漿P4濃度は有意に低下した。また同時点の黄体細胞のサイズ(組織切片の断面積で評価)も有意に減少した。黄体組織内の血管新生と血流量の変化の指標として組織内の血管数、並びに血管腔内の面積を形態計測学的に検討したところ、抗ATX抗血清の局所投与はIgG投与と比較して、血管数には影響しなかったが、血管腔の面積を有意に減少させた。また黄体組織内への貪食細胞の浸潤への影響を免疫組織化学的に検討すると、好中球とマクロファージの浸潤は抗ATX抗血清投与群で抑制された。分娩の発来や産仔数は通常でも個体間のばらつきが大きい事象であった。血漿P4濃度が低下したことにより分娩のタイミングや産仔数等に変化が生じると予測されたが、早産や流産などの分娩の異常や産仔数に有意な変化は認められなかった。

テーマ 上記のSigma-Aldrich社製とは異なるATX中和抗体(Cayman社製)を妊娠12日目に尾静脈内に投与すると通常、23日目の早朝に見られる分娩が、半日早まるものや逆に半日

もしくは1日遅くなる個体が見られた。次いでその投与を18日目に行なうと半日、あるいは1日遅延する個体が増加した。これらのラットでは、死産の新生仔の割合も増加した。そしてこれらの分娩遅延ラットの血中P4濃度は対照群に比べ高い値を示す傾向が見られた。最初の2年間に用いた中和抗体によるATX阻害に続いて、化学阻害薬であるS32826(1mM)を妊娠15日目に卵巣嚢内に投与し、一定時間の経過後、以下の項目を検討した。妊娠12日目あたりから21日目にかけてステロイド産生細胞のサイズは増大するが、S32826投与群のそれは溶媒(PBS)投与群に比べ有意に低下した。黄体内分泌機能の指標である血中P4濃度も有意に低下した。黄体組織内の血流量と毛細血管数はS32826処置により有意に低下し、血管への影響が強く窺われた。免疫染色で測定した好中球とマクロファージの炎症細胞数もそれらに一致して変動した。さらに分娩のタイミングと胎仔発育への影響は個体ごとのばらつきが強く見られ、分娩が全く消失し、予定日の3日後に母体の死亡が見られ、剖検したところ子宮内での胚死とその吸収が観察されるものもあった。逆に分娩が半日より長く早まるものも見られた。また新生仔の体重も分娩タイミングに併せて変化した。

テーマ 非妊娠時(発情期)及び妊娠22日目(通常分娩前日)のラットから子宮筋標本を用意し、マグヌス法にてまずはLPAの単独投与(1,10,100nM)そしてこの作用にアラキドン酸カスケードが媒介するかについて、3種類の化学的阻害薬、すなわち筆者らが同定したGroup IVA PLA2の阻害薬であるATK、COXの阻害薬であるindomethacin、COX-2の阻害薬であるNS398の前処置の効果を検討した。発情期の標本に比べ分娩前日の子宮標本は自発的収縮が亢進し、LPAはどちらの標本に対しても用量依存的に収縮強度(収縮曲線のAUC面積、integral値)を上げる傾向を示した。収縮頻度は相対的に変化なし、もしくは低下する傾向になった。摘出標本の収縮においてAAカスケード阻害薬のいずれの前処置も、LPAによる子宮収縮に有意な変化は見られなかった。上記の2つの生理的条件下のラット子宮組織標本について免疫染色を試みたところ、LPA3/LPA4の局在と一致して、平滑筋層や子宮内膜にCOX-1並びにCOX-2の発現を確認できた。続いてPGF2aがLPAの作用下で産生増加するかについて、子宮標本の短時間培養後、培養液中のPGF2a量を定量したところ、オキシトシンの促進効果に比べると軽微であり、分娩日前日の標本では効果が無かった。最後にLPA1/2/3阻害薬であるKi16425を前投与すると、収縮のintegral値が有意に低下した。

テーマ ATX、LPA受容体の蛋白質発現量と免疫反応性は共に妊娠後期に増加した。免疫反応陽性細胞は、脱落膜と巨細胞の細胞質であり、LPA1とLPA4については細胞性栄養膜細胞の細胞質にもみられた。いずれのLPA受容体もサブタイプにより局在する細胞種が異なっていた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9件)

Doungrut T, Fungbun N, Laoharatchatathanin T, Terashima R, Kurusu S, Kawaminami M. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on human chorionic gonadotropin activity in granulosa cells of immature female rats. J Reprod Dev 査読有 64(2):129-134: 2018 doi: 10.1262/jrd.2017-142

Fungbun N, Doungrut T, Terashima R, Kurusu S, Kawaminami M. Annexin A1 is a novel target gene of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in L T2 gonadotrope cells. J Vet Med Sci 査読有 80(1): 116-124:2018 doi: 10.1292/jvms.17-0569

Takeda T, Shirasaka M, Sugiyama M, Terashima R, Kawaminami M, Kurusu S. *In vivo* evidence for possible up-regulating roles of lysophosphatidic acid around fertilization in rats. J Vet Med Sci 査読有 80(1):41-48:2018 doi: 10.1292/jvms.17-0354

久留主志朗 2017. オートタキシンによる妊娠維持と分娩調節 査読無 別冊 B10 Clinica 慢性炎症と疾患「産婦人科領域と炎症」 6(4);139-144.

Funahashi R, Sakamoto T, Taguchi N, Naiki R, Terashima R, Kawaminami M, Kurusu S. Possible role of PPAR γ in the negative regulation of ovulatory cascade and luteal development in rats. J Vet Med Sci 査読有 79(6):1043-1051:2017 doi: 10.1292/jvms.17-0162.

Terashima R, Laoharatchathanin T, Kurusu S, Kawaminami M. Augmentation of gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the post-lactational mammary tissues of rats. J Reprod Dev 査読有 62(5):495-499:2016 Doi: 10.1262/jrd.2016-035

Satoh H, Yoshio H, Kawaminami M, Kurusu S. Type-dependent difference in Fas expression and phagocytes distribution in rat corpora lutea during natural regression: An immunohistochemical evidence. J Vet Med Sci 査読有 78(12):1771-1777:2016 doi:1292/jvms.16-0199.

Rieanrakwong D, Laoharatchathanin T, Terashima R, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Kawaminami M. Prolactin suppression of Gonadotropin releasing hormone initiation of mammary gland involution in female rats. Endocrinology 査読有 157(7):2750-2758:2016 Doi:10.1210/en.2016-1180

〔学会発表〕(計 39件)

浅川晃士, 石渡友梨, 大石泰彰, 岡 翔太, 杉山真言, 寺島涼太, 汾陽光盛, 久留主志朗 ラットの妊娠黄体におけるオートファジー機構の発現とその役割 (2018) 第111回日本繁殖生物学会

Kurusu S, Ishiwata Y, Oishi Y, Oka S, Yoshio H, Terashima R, Kawaminami M. Autophagy in corpus luteum as a possibly critical mechanism for rodent pregnancy and parturition (2018) FEBS Congress 2018

Shirasaka M, Masuda K, Toda M, Sugiyama M, Terashima R, Kawaminami M, Kurusu S. Autotaxin (ATX) in the circulating blood in pregnant rats: multiple sources and possible regulatory role in parturition. (2017) Fourth World Congress of Reproductive Biology

久留主志朗, 船橋諒平, 坂本貴信, 田口範人, 内木諒介, 寺島涼太, 汾陽光盛 ラットの排卵カスケードと黄体発育に対する PPAR の負の調節作用 (2017) 第160回日本獣医学会

Kurusu S, Terashima R, Kawaminami M. Lysophosphatidic acid may contribute to increasing the fertilization rate in the microenvironment of rat oviducts. (2016) Ovarian Club VIII

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：汾陽 光盛

ローマ字氏名：KAWAMINAMI Mitsumori

所属研究機関名：岡山理科大学

部局名：獣医学部

職名：教授

研究者番号：00153007

研究分担者氏名：杉山 真言

ローマ字氏名：SUGIYAMA Makoto

所属研究機関名：北里大学

部局名：獣医学部

職名：助教

研究者番号：30648225

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。