

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591918

研究課題名(和文) 活性酸素を介した生殖戦略：黄体機能調節における生理活性物質としての活性酸素の役割

研究課題名(英文) The role of reactive oxygen species as bioactive substances in the regulation of luteal function

研究代表者

杉野 法広 (SUGINO NORIHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10263782

研究成果の概要(和文)：

機能的黄体退縮において、Prostaglandin F₂α (PGF₂α)が黄体内 cyclooxygenase-2 (PTGS2) 発現と PGF₂α 産生に関与するかどうか、さらにその細胞内情報伝達経路に活性酸素が生理活性物質としてどのように関与しているかを偽妊娠ラットを用いて検討した。

偽妊娠 7 日目に PGF₂α (3 mg/kg)を皮下投与し機能的黄体退縮を誘導した。対照には phosphate buffer (PB)を投与した。投与 2、6、24 時間後の黄体内 Ptgs2 及び Ptgs1 mRNA 発現、黄体内 PGF₂α 濃度、血中プロゲステロン(P) 濃度を測定した。さらに、選択的 PTGS2 阻害剤である NS-398 (10 mg/kg)を PGF₂α と同時投与し、投与 24 時間後の黄体内 PGF₂α 濃度を測定した。PGF₂α 投与 30 分後の核内転写因子である NFκB の発現の変化を Western Blot 及び EMSA にて検討した。活性酸素種除去目的で、PGF₂α 投与直前に SOD とカタラーゼを尾静脈投与し、PGF₂α 投与 30 分後の核内 NFκB 発現および 2 時間後の黄体内過酸化脂質 (LPO) 濃度および Ptgs2 mRNA 発現を検討した。

黄体内 Ptgs2 mRNA 発現は PGF₂α 投与 2 時間後に有意に増加した。黄体内 PGF₂α 濃度は 24 時間後に有意に増加し、血中 P 濃度は有意に低下した。Ptgs1 mRNA 発現に変化はなかった。PTGS2 阻害剤投与により、24 時間後の黄体内 PGF₂α 濃度の増加は完全に抑制された。PGF₂α 投与により核内の NFκB 蛋白発現は増加し、同時に NFκB は PTGS2 プロモーターへの結合活性があることが示された。SOD とカタラーゼ投与により核内 NFκB 発現、黄体内 LPO 濃度および Ptgs2 mRNA 発現の増加は抑制された。

機能的黄体退縮において、PGF₂α による活性酸素種を介した NFκB の活性化による PTGS2-PGF₂α 産生促進という系の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：

This study was undertaken to investigate how prostaglandin F₂α (PGF₂α) increases PGF₂α synthesis and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the corpus luteum in pseudopregnant rats. We further investigated the molecular mechanism by which PGF₂α stimulates COX-2 expression. PGF₂α (3 mg/kg) or phosphate buffer as a control was injected subcutaneously on day 7 of pseudopregnancy. COX-2 mRNA expression and PGF₂α concentrations in the corpus luteum were measured 2 h, 6 h, and 24 h after PGF₂α injection. PGF₂α significantly increased COX-2 mRNA expression at 2 h and luteal PGF₂α concentrations at 24 h. PGF₂α significantly decreased serum progesterone levels at all of the times studied. Simultaneous administration of a selective COX-2 inhibitor (NS-398, 10 mg/kg) completely abolished the increase in luteal PGF₂α concentrations induced by PGF₂α. PGF₂α increased NF-κB p65 protein expression in the nucleus of luteal cells 30 min after PGF₂α injection, and electrophoretic mobility shift assay revealed that PGF₂α increased binding activities of NF-κB to the NF-κB consensus sequence of the COX-2 gene promoter. Simultaneous administration of both superoxide dismutase (SOD) and catalase to scavenge reactive oxygen species (ROS) inhibited the increases of nuclear NF-κB p65 protein expression, lipid peroxide levels, and COX-2 mRNA expression induced by PGF₂α. In conclusion, PGF₂α stimulates COX-2 mRNA expression and PGF₂α synthesis through NF-κB activation via ROS in the corpus luteum of pseudopregnant rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

機能的黄体退縮のメカニズムは複雑であり、動物種によって異なっている。プロスタグランジン F₂α (PGF₂α)は、さまざまな動物種において機能的黄体退縮の重要な因子である。PGF₂αは、退縮期に黄体内で増加し、プロゲステロン産生を抑制する。すなわち、PGF₂αが機能的黄体退縮のトリガーとして働くことや、黄体退縮を促進させることに重要な役割を果たしている。実際に、PGF₂αのレセプター欠損マウスにおいては、血中プロゲステロン濃度が低下せず、分娩が起こらない。

黄体退縮を引き起こす PGF₂αは、齧歯類や家畜においては子宮由来であるが、ヒトや霊長類においては子宮由来ではない。興味深いことに、黄体自身においても PGF₂αが産生されることが報告されており、このことは黄体自身で産生される PGF₂αが黄体機能の調節に重要な役割をもつことを示している。PGF₂αは、プロスタグランジン合成酵素である cyclooxygenase-2 (PTGS2)を介して産生される。PTGS2は、サイトカインやペプチドといった多様な刺激により誘導される。さまざまな動物種において、黄体内で PGF₂αが PTGS2発現を誘導することが報告されており、機能的黄体退縮過程において、黄体内でポジティブフィードバック機構が存在している可能性を示している。しかし、PGF₂αが PTGS2を誘導する細胞内情報伝達経路は、未だ充分には解明されていない。

活性酸素種は、機能的黄体退縮に関与することがよく知られている。活性酸素種は、退縮期に黄体内で増加し、プロゲステロン産生を抑制する。活性酸素種は、DNAや蛋白の損傷、脂質の過酸化といった有害作用だけでなく、細胞内情報伝達経路に関与する生理活性物質を活性化し細胞機能を制御する作用も持っている。実際に、活性酸素種は、さまざまな細胞において転写因子である NFκB を活性化する。興味深いことに、近年我々は、ヒトの子宮内膜間質細胞において、活性酸素種が NFκB を活性化し、さらに PTGS2発現と PGF₂α産生を増加させることを報告している。ラットの黄体においては、PGF₂αにより活性酸素種が産生される。NFκBは、PTGS2のプロモーターへ結

合することで PTGS2を発現させる。これらのことから、黄体内において、PGF₂α、活性酸素種、NFκB、そして PTGS2 の間に密接な関連があると考えられる。

2. 研究の目的

機能的黄体退縮において、PGF₂αが黄体内 PTGS2発現と PGF₂α産生に関与するかどうか、さらにその細胞内情報伝達経路に活性酸素種が生理活性物質としてどのように関与しているかを偽妊娠ラットを用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物

220-270g の Sprague-Dawley ラットを用いた。飼育環境は、室温 24°C、5時から19時まで照明をつけ、ラット用の飼料と水を自由に与えた。膣内スメアを毎朝確認し、性周期が4日間であることが少なくとも2回連続しているラットのみを用いた。子宮頸管刺激により偽妊娠を誘導した。膣内スメアが最後に estrusであった日を偽妊娠1日目とし、その後も毎日膣内スメアを確認した。この実験は、山口大学医学部動物実験倫理委員会の承認を得ている。

(2) 実験1

偽妊娠7日目に、黄体退縮を起こすため PGF₂α (3 mg/kg body weight)を皮下投与した。この実験に用いた PGF₂αの投与量は、既報に基づいて決定された。PGF₂αは、小野薬品工業株式会社から提供を受けた。コントロールラットには、溶媒であるリン酸緩衝液を投与した。投与2時間後、6時間後、24時間後に、それぞれのグループに対しエーテル麻酔下に開腹手術を行った。門脈から採血した後、既報のように脱血再還流を生理食塩水にて行い卵巣から血液を除去した。卵巣を摘出し、実体顕微鏡下に黄体を分離し、結合織を除去した後黄体重量を測定した。黄体は、-80°Cで保存し、黄体内 Ptgs2および Ptgs1 mRNA発現、黄体内 PGF₂α濃度を以下に示すように測定した。血清は、-20°Cで保存し、血中プロゲステロン濃度を測定した。

(3) 実験 2

PTGS2 の選択的阻害剤である NS-398 を PGF2 α と同時に投与し、投与 24 時間後の黄体内 PGF2 α 濃度が抑制されるかを検討した。偽妊娠 7 日目に、PGF2 α と同時に NS-398 (10 mg/kg body weight, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) を皮下投与した。この実験に用いた NS-398 の投与量は、既報に基づいて決定された。コントロールラットには、リン酸緩衝液を投与した。PGF2 α 投与 24 時間後に実験 1 と同様の方法で黄体を分離し、黄体内 PGF2 α 濃度を測定した。予備実験において、NS-398 は Ptg2 mRNA 発現に影響を及ぼさないことを確認している。また、NS-398 は Ptg2 の mRNA および蛋白発現に影響を及ぼさないことが、ラットの vivo の実験において報告されている。

(4) 実験 3

PGF2 α 投与後の核内 NF κ B p65 蛋白発現および PTGS2 のプロモーター領域への NF κ B の結合活性を検討した。偽妊娠 7 日目に、PGF2 α 投与し 30 分後に黄体を分離した。コントロールラットには、リン酸緩衝液を投与した。黄体から核抽出物を作成した後、核内 NF κ B 蛋白発現の変化を Western blot 法にて検討し、NF κ B 蛋白の PTGS2 プロモーター領域への結合活性を Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) にて検討した。

(5) 実験 4

活性酸素の代謝酵素である SOD (50 000 U/kg body weight, Sigma-Aldrich Co.) および過酸化水素の代謝酵素であるカタラーゼ (100 000 U/kg body weight, Sigma-Aldrich Co.) を投与し、PGF2 α による NF κ B および PTGS2 発現が抑制されるかを検討した。また、活性酸素種の反応産物である過酸化脂質 (LPO) の産生が抑制されるかを検討した。偽妊娠 7 日目に、PGF2 α 投与直前に尾静脈より SOD とカタラーゼを投与した。この実験に用いた SOD とカタラーゼの投与量は、既報に基づいて決定された。コントロールラットには、リン酸緩衝液を投与した。PGF2 α 投与 30 分後における核内 NF κ B p65 蛋白発現および黄体内 LPO 濃度を測定した。PGF2 α 投与 2 時間後における黄体内 Ptg2 mRNA 発現を測定した。

(6) Real-time RT-PCR

Total RNA は、TRIzol reagent (Invitrogen, Inc.) を用いて製品プロトコール通りに抽出した。3 μ g の total RNA を 42°C で 20 μ l の反応溶液 (single strength PCR buffer, 2.5 mmol/l dNTPs, 5 μ mol/l random hexamer, 1.5 mmol/l MgCl₂, and 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, NJ, USA)) と RT 反応させた。Real-time PCR は、既報のように LightCycler (Roche Diagnostics) を用いて行った。プライマーは、既報に基づく以下に示す配列を用いた。

Ptg2 (5' -GATTGACAGCCCACTT-3' and 5' -CGGGATGAAGTCTCTCTCA-3' ; 増幅産物 174bp)
Ptg1 (5' -GTACTATCCCTGAGATCTGGAC-3' and 5' -TGAGTACTTCTCGGATGAAGG-3' ; 増幅産物 132 bp)、そして Sdtg11 (5' -CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG-3' and 5' -GGACAGAGTCTTGATGATCTC-3' ; 増幅産物 194 bp)。Sdtg11 は、インターナルコントロールとして用いた。反応溶液は 20 μ l であ

り、以下の組成である。SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 10 ml、それぞれのプライマー 0.2 mM、そして cDNA 2ml。反応プログラムは、96°C、10 秒の後、96°C、5 秒を 40 サイクル、60°C 20 秒である。

(7) PGF2 α assay

プロスタグランジン類を既報のように抽出した。黄体を氷上にて PBS (pH 3.5) にてホモジネートした。ホモジネート液を C18-LRC 固相抽出カラム (Bond-Elute, Varian Co., Harbor City, CA, USA) に通した。カラムを蒸留水および 10 % アセトニトリルにてすすぎ、プロスタグランジン類をメタノールにて溶出した。メタノールを窒素にて蒸発させ、乾燥化された抽出物はエタノールと PGF2 α enzyme immunoassay kit (Assay Designs, Inc, Ann Arbor, MI, USA) に付属する溶液に溶解させた後、PGF2 α assay に用いられた。結果は、pg PGF2 α /mg protein にて表示した。抽出物の蛋白濃度は、Lowry method にて測定した。このアッセイの感度は、4.6 pg/ml であり、インターアッセイおよびインTRAアッセイはそれぞれ 7.0 %、7.8 % である。

(8) Western blot 法

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて、製品プロトコール通りに黄体から核抽出物を作成した。核抽出物蛋白 40 mg を 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。ゲル上の蛋白をニトロセルロース膜に転写した後、1 次抗体である 500 倍に希釈した anti-rabbit NF κ B p65 抗体 (Upstate, Lake Placid, NY, USA) と反応させた。さらに、ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ複合体と反応させた後、ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてバンドを検出した。Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, IL) を用いてリプロービングした後、1000 倍に希釈した anti-Histone H1 抗体 (MBL, Nagoya, Japan) と反応させた。同様に、ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ複合体と反応させた後、ECL kit を用いてバンドを検出し、インターナルコントロールとして用いた。

(9) EMSA

EMSA は、Gel Shift Assay Systems (Promega Co.) を用い、既報のように行った。オリゴヌクレオチド配列は、ラットの PTGS2 プロモーター上の NF κ B 結合配列に対応する配列 (5' -GGCAAGGGGATCCCTTAGTT-3' ; -548 から -528 bp) を用いた。二本鎖 DNA とした NF κ B オリゴヌクレオチド (10 pmol) を T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて [γ -³²P]ATP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) にて標識した。標識されたオリゴヌクレオチドに混在している非標識のオリゴヌクレオチドを、G-25 スピニングカラム (GE Healthcare, Amersham, UK) によるクロマトグラフィー法にて除去した。標識されたオリゴヌクレオチドを、gel shift buffer とともに、10 μ g の核抽出物とインキュベートした。また、過剰量の非標識オリゴヌクレオチド (\times 100; cold) を添加し、結合反応の特異性を検証した。DNA-蛋白複合体を、Tris-borate-EDTA バッファーを用いて、6% の非変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。

(10) LPO assay

黄体内のLPO濃度は、既報のようにチオバルビタール酸法により測定した。結果は、nmol マロン酸アルデヒド (MDA)/g wet tissue weight にて表示した。

(11) Progesterone assay

血中プロゲステロン濃度は、既報のようにラジオイムノアッセイにて測定した。このアッセイの感度は、100 pg/ml であり、イントラアッセイおよびインターアッセイはそれぞれ 7.0 %、14.4 % である。

(12) 統計処理

統計学的有意差は、one-way ANOVA により決定した。ANOVA 後、多群間の有意差解析には Tukey-Kramer 法を用いた。また、2群間の解析には対応のない t 検定を用いた。すべての統計処理には、SPSS Windows version 11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

PGF2 α が、黄体内で PTGS2 発現を増加させ PGF2 α 産生を増加させるかを検討するため、偽妊娠 7 日目に PGF2 α を投与し、黄体内 Ptgs2 および Ptgs1 mRNA 発現、黄体内 PGF2 α 濃度を測定した。その結果、血中プロゲステロン濃度は、PGF2 α 投与により投与 2 時間後 ($P < 0.01$)、6 時間後 ($P < 0.05$)、24 時間後 ($P < 0.01$) のいずれの時間もコントロールに比較し有意に低値を示した (図 1A)。黄体重量は、PGF2 α 投与によりいずれの時間も変化を認めなかった。黄体内 PGF2 α 濃度は、PGF2 α 投与 2 時間後、6 時間後では有意差を認めなかったが、24 時間後ではコントロールに比較し有意に高値を示した ($P < 0.05$; 図 1B)。黄体内 Ptgs2 mRNA 発現は、PGF2 α 投与 2 時間後ではコントロールに比較し有意に高値を示したが、6 時間後、24 時間後では有意差を認めなかった ($P < 0.01$; 図 1C)。その一方で、黄体内 Ptgs1 mRNA 発現は、いずれの時間も変化を認めなかった (図 1D)。

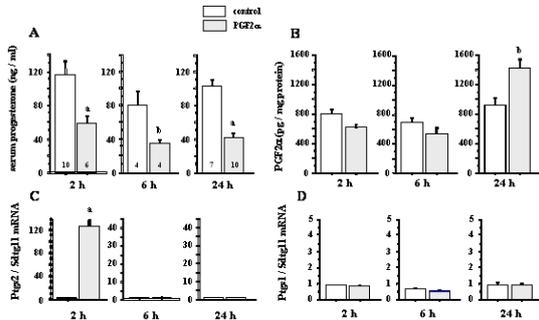


図 1. PGF2 α 投与 2 時間後、6 時間後、24 時間後の (A) 血中プロゲステロン濃度、(B) 黄体内 PGF2 α 濃度、(C) 黄体内 Ptgs2 mRNA 発現、(D) 黄体内 Ptgs1 mRNA 発現。

偽妊娠 7 日目に黄体退縮を起こすため PGF2 α (3 mg/kg body weight) を皮下投与した。コントロールラットには、リン酸緩衝液を投与した。Ptgs2 mRNA および Ptgs1 mRNA は、Sdtg11 をインターナルコントロールとした。mean \pm S.E.M. a; $P < 0.01$ VS. コントロール、b; $P < 0.05$ VS. コントロール

PGF2 α 投与による PTGS2 発現の増加が、24 時間後の黄体内 PGF2 α 濃度の増加に関与するかを検討するために選択的 PTGS2 阻害剤である NS-398 を投与した。その結果、PGF2 α 投与による 24 時間後の黄体内 PGF2 α 濃度

の増加は NS-398 により完全に抑制された ($P < 0.05$; 図 2)。その時の血中プロゲステロン濃度は、コントロール群、PGF2 α 投与群、PGF2 α と NS-398 の同時投与群ではそれぞれ 101.7 + 12.1、30.3 + 5.4、29.9 + 6.7 ng/ml (mean + S.E.M.) であった。

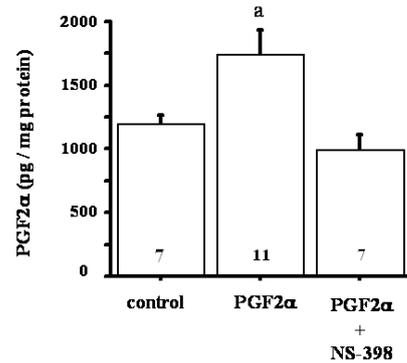


図 2. PGF2 α 投与による黄体内 PGF2 α 濃度の増加への選択的 PTGS2 阻害剤の影響。選択的 PTGS2 阻害剤である NS-398 が PGF2 α と同時に投与された。黄体内 PGF2 α 濃度は PGF2 α 投与後 24 時間後に測定した。mean \pm S.E.M. a; $P < 0.05$ VS. コントロール、PGF2 α + NS-398

PGF2 α により誘導される PTGS2 発現増加に関与する転写因子を検討した。NF κ B は、30 分以内というきわめて短時間で活性化され核内に移行することが知られているので、本研究では NF κ B に着目し、PGF2 α 投与 30 分後での核内 NF κ B 蛋白発現を検討した。その結果、核内の NF κ B p65 蛋白発現は PGF2 α 投与により増加した (図 3A)。さらに、PGF2 α 投与 30 分後の核内 NF κ B 蛋白は、PTGS2 プロモーター領域への結合活性があることが示された (図 3B)。

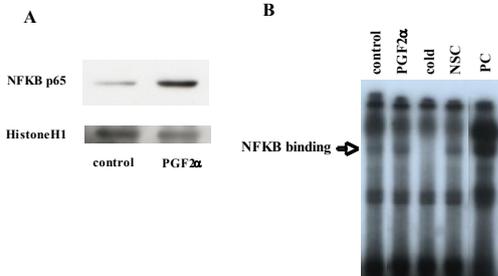


図 3. (A) PGF2 α の核内 NF κ B 蛋白発現への影響、(B) PGF2 α の PTGS2 プロモーターへの NF κ B 結合活性への影響、(A) 偽妊娠 7 日目に PGF2 α 投与 30 分後に黄体を分離した。核内 NF κ B 蛋白発現は、Western blot 法にて検討した。Western blot 法は 3 回施行し、ヒストン H1 をインターナルコントロールとして用いた。(B) NF κ B 結合活性は EMSA にて検討した。ポジティブコントロール (PC) として HeLa 細胞の核抽出物を、非特異的競合反応 (NSC) として非標識の AP-1 オリゴヌクレオチドをそれぞれ用いた。NF κ B の結合は PGF2 α 投与により増加した (レーン 2)。これは、cold の添加により競合的に阻害された (レーン 3)。また、NSC では変化を認めなかった (レーン 4)。EMSA は、3 回施行した。

PGF2 α による NF κ B の活性化に活性酸素種が関与しているかを検討するために、SOD

とカタラーゼを PGF2 α 投与直前に投与した。その結果、PGF2 α 投与 30 分後における核内 NFKB p65 蛋白発現の増加は、SOD とカタラーゼの同時投与により抑制された (図 4A)。PGF2 α 投与 30 分後における黄体内 LPO 濃度は、PGF2 α 投与により有意に増加し、SOD とカタラーゼの同時投与により有意に抑制された ($P < 0.05$; 図 4B)。PGF2 α 投与 2 時間後における黄体内 Ptgs2 発現の増加は、SOD とカタラーゼの同時投与により有意に抑制された (図 4C)。

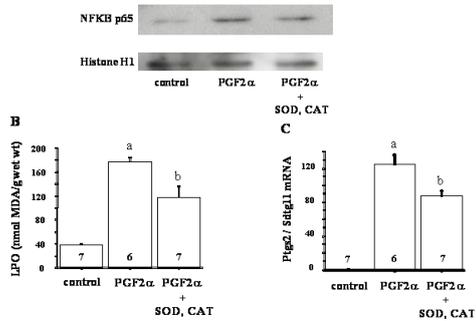


図 4. (A) SOD とカタラーゼ (CAT) による核内 NFKB p65 蛋白発現への影響、(B) SOD とカタラーゼによる黄体内 LPO 濃度への影響、(C) SOD とカタラーゼによる黄体内 Ptgs2 mRNA 発現への影響。偽妊娠 7 日目に PGF2 α 投与直前に SOD (50 000 U/kg body weight) とカタラーゼ (100 000 U/kg body weight) を同時投与した。コントロールラットにはリン酸緩衝液を投与した。PGF2 α 投与 30 分後の核内 NFKB p65 蛋白発現は、Western blot 法にて検討した。PGF2 α 投与 30 分後の黄体内 LPO 濃度、および投与 2 時間後の黄体内 Ptgs2 mRNA 発現を測定した。Western blot 法は 3 回施行した。Ptgs2 mRNA 発現は、Sdtg11 をインターナルコントロールとして用いた。mean \pm S.E.M. a; $P < 0.01$ VS. コントロール, b; $P < 0.05$ VS. PGF2 α

〔考察〕本研究の結果、PGF2 α は PTGS2 発現を誘導することで黄体内での PGF2 α 産生を増加させていることが明らかとなった。さまざまな動物種においては、PGF2 α が黄体内での PTGS2 発現を誘導すると報告されている。すなわち、黄体自身で PGF2 α が PGF2 α を産生するポジティブフィードバック機構が存在していることを示している。この機構によって、機能的黄体退縮が促進され完了することにより、次の新しい性周期の卵胞発育が開始される。本研究では、黄体内 Ptgs2 mRNA 発現と黄体内 PGF2 α 濃度の増加にタイムラグが認められたが、PGF2 α 投与により引き起こされた黄体内 PGF2 α 濃度の増加は、選択的 PTGS2 阻害剤である NS-398 により完全に抑制されたため、PGF2 α 投与 2 時間後の Ptgs2 mRNA 発現の増加は、24 時間後の黄体内 PGF2 α 濃度の増加に関与していると考えられる。この我々の結果は、ウシの顆粒膜細胞を用いた細胞培養で PGF2 α 産生に対しての PTGS2 の siRNA の効果が 24 時間後に現れるという小林らの報告と一致している。しかしながら、PGF2 α によって黄体内での PGF2 α 産生を引き起こす他の細胞内メカニズムが存在する可能性を無視することはできない。例えば、MAP キナーゼやプロテインキナーゼ C により誘導されるホスホリパーゼ A2 などである。

本研究では、PGF2 α 投与によって引き起こされる 24 時間後の黄体内 PGF2 α 濃度の増加は、NS-398 を同時投与することにより完全に抑制されているが、血中プロゲステロン濃度については、NS-398 を同時投与しても変化せず、PGF2 α 単独投与群と同様に低下したままである。その理由としては、投与した PGF2 α の影響が血中プロゲステロン濃度に対して 24 時間後でも持続している可能性が考えられる。

PGF2 α が、他臓器の何らかのホルモンや生理活性物質を介して間接的に黄体に影響を与えている可能性については、*vivo* の実験系では常に考慮に入れるべきことである。今回の結果については、PGF2 α は直接黄体に影響を与えていると考えた方が妥当である。なぜなら、NFKB の活性化が PGF2 α 投与 30 分後というきわめて短時間で起こっているからである。さらに、本研究には確立された動物実験モデルが用いられているが、PGF2 α の投与量が生理的な量であるかについては難しいところである。本研究に用いられた PGF2 α の投与量は多くの既報に基づいて決定されているのであるが、PGF2 α の薬理学的な影響を完全に無視することはできない。

黄体内の PTGS2 発現が低い場合であっても黄体内にある一定量の PGF2 α が存在するのは、PGF2 α が黄体以外の臓器に由来しているからであると考えられる。その由来として最も可能性が高いのは子宮であり、NS-398 投与後の黄体内 PGF2 α 濃度がコントロール群より、有意差はないもの、より低くなっており、NS-398 投与により子宮で産生される PGF2 α 産生も抑制され、黄体への流入量が減っている可能性が考えられる。さらに、齧歯類の子宮においては、PGF2 α 産生に PTGS1 が関与していると報告されている。しかしながら、どれぐらいの PGF2 α が子宮由来であるのか、また黄体内で PTGS2 によりどれだけの PGF2 α が産生されているのかに関しては、さらなる研究が必要である。

本研究では、黄体において PGF2 α が PTGS2 を誘導する細胞内情報伝達経路を明らかにした。Ptgs2 遺伝子は、NFKB、C/EBP、CRE、そして E-box といった多くの転写因子結合配列を有している。NFKB は、さまざまな細胞において PTGS2 発現を誘導する。本研究では、PGF2 α は核内の NFKB p65 蛋白発現を増加させ、Ptgs2 のプロモーターへの NFKB の結合活性を増加させていることから、PGF2 α は黄体において NFKB を活性化することによって PTGS2 発現を誘導すると考えられる。その一方で、ヒツジの黄体細胞培養実験においては、Ptgs2 プロモーターの E-box が C/EBP や CRE よりも PGF2 α による PTGS2 発現誘導に重要であると報告されている。さらに、排卵過程におけるラットの顆粒膜細胞での PTGS2 発現の誘導には、C/EBP が重要であるといわれている。しかしながら、我々は未発表のデータであるが、PGF2 α が Ptgs2 プロモーターの C/EBP の結合活性に対し影響を及ぼさないことを EMSA で確認している。

SOD とカタラーゼが PGF2 α 投与後の黄体内での核内 NFKB p65 蛋白発現と Ptgs2 mRNA 発現の増加を抑制するという本研究の結果によって、PGF2 α によって誘導される PTGS2 発現は、活性酸素種による NFKB の活性化によって引き起こされていることが

明らかとなった。活性酸素種によって NFκB が活性化されることは、PGF2α 投与によって核内 NFκB p65 蛋白発現と活性酸素種産生が同時に急激に増加していることから考えられる。我々の仮説は、活性酸素種がさまざまな細胞において NFκB を活性化するという報告やウシの黄体細胞やヒトの子宮内膜間質細胞において PTGS2 発現を増加させるという報告にも一致している。

本研究において、SOD とカタラーゼによって黄体内 LPO 濃度が部分的にしか減少していないことに注目すべきである。これは、活性酸素種が部分的にしか消去されていないことを示しており、黄体内での活性酸素種の由来を示唆するものとして興味深い。SOD とカタラーゼがその大きな分子量のために黄体細胞内に入り込めないとすると、黄体細胞以外に由来する活性酸素種だけが SOD とカタラーゼにより消去されたと考えられる。黄体細胞以外としては、マクロファージ、好中球、あるいは血管内皮細胞などが考えられる。実際に、偽妊娠ラットの黄体内には多くのマクロファージが存在しており、PGF2α は、ラットの黄体内の非ステロイド産生細胞での活性酸素の産生を促進させる。さらに、活性化された好中球が産生する過酸化水素などの活性酸素種が、黄体細胞内に入り込み、黄体機能に影響を及ぼすことが報告されている。加えて、ウシの機能的黄体退縮においては、PGF2α により血管内皮細胞によって産生される活性酸素種が重要性であると報告されている。それゆえに、本研究においても、PGF2α によって黄体内の血管内皮細胞による活性酸素種の産生が促進されている可能性も考えられる。

その一方で、SOD とカタラーゼにより消去されなかった活性酸素種は、黄体細胞内に由来すると考えられる。実際に vivo の実験において、ラットの黄体細胞内では、PGF2α 投与 7 分から 15 分後に活性酸素種が発生すると報告されている。SOD とカタラーゼは黄体細胞内には入り込めないために、本研究では PGF2α 投与によって黄体細胞内に発生した活性酸素種が消去されなかったのではないだろうか。

本研究は、黄体内で PGF2α が黄体内 PGF2α 産生を促進しているポジティブフィードバック機構が存在していることを示している。このシステムは退縮期の黄体にみられる PGF2α の増加のメインメカニズムではないかもしれないが、少なくとも機能的黄体退縮を促進させ完了させることに関与していると考えられる。さらに、本研究は黄体において PGF2α が PTGS2 発現を誘導する細胞内情報伝達経路を示した。すなわち、PGF2α により誘導される PTGS2 発現は、活性酸素種による NFκB の活性化によって引き起こされると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

全て査読あり

① Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells.
Taketani T, Tamura H, (2 番目) Sugino N (12 番目) 他 9 名
Journal of Pineal Research, in press. 2011

② Luteal blood flow in patients undergoing GnRH agonist long protocol.
Takasaki A, Tamura H, (8 番目) Sugino N (11 番目) 他 8 名

Journal of Ovarian Research
4:2 (doi:10.1186/1757-2215-4-2). 2011

③ Prostaglandin F2α (PGF2α) stimulates PTGS2 expression and PGF2α synthesis through NFκB activation via reactive oxygen species in the corpus luteum of pseudopregnant rats.

Taniguchi K, Tamura H, (9 番目) Sugino N (10 番目) 他 7 名

Reproduction 140: 885-892. 2010

④ Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by non-canonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells.

Matsuoka A, Tamura H, (8 番目) Sugino N (9 番目) 他 7 名

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 95: E291-E299. 2010

[学会発表] (計 30 件)

① ラット顆粒膜細胞の黄体化における Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) 遺伝子発現の epigenetic 制御の関与
李 理華, 田村博史, (9 番目) 杉野法広 (10 番目) 他 7 名

第 15 回日本生殖内分泌学会学術総会 2010 年 11 月 21 日 千里ライフサイエンスセンター

② ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化によって誘導される IGFBP-1, prolactin (PRL) 遺伝子発現における epigenetic 調節機構

田村功, 田村博史, (9 番目) 杉野法広 (10 番目) 他 7 名

第 15 回日本生殖内分泌学会学術総会 2010 年 11 月 21 日 千里ライフサイエンスセンター

③ Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) gene expression in rat granulosa cells during luteinization.
L. Lee, F. Kizuka, N. Sugino.

International Ovarian Conference 2010 October 16-17, 2010, Westin Miyako Hotel, Japan

[図書] (計 1 件)

① Characterization of "thin" endometrium and treatment with vitamin E. In: Translational research in uterine biology. Maruo T, Mardon H, and Stewart C, eds. 2008

Sugino N, Miwa I, Tamura H, 他 2 名

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉野 法広 (SUGINO NORIHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10263782

(2) 研究分担者

田村 博史 (TAMURA HIROSHI)

山口大学・医学部付属病院・准教授
研究者番号: 50379947

(3) 連携研究者

なし