

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580392

研究課題名(和文) 卵巣におけるプロゲステロンとエイコサノイドの協調的及び拮抗的相互作用の機序の解明

研究課題名(英文) Cooperative and antagonistic interaction between progesterone and eicosanoid in the ovary

研究代表者

久留主 志朗 (Kurusu, Shiro)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50215076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1) 排卵直前の成熟卵胞でのCOX-2誘導にP4をはじめとするステロイド代謝のクロストーク、GIVA PLA2の産生物がfeedforward/feedback的に調節している可能性を示した。顆粒層のPGE合成酵素については不明点が浮き彫りにされた。2) 性周期黄体の自発的退行に、GIVA PLA2の下流で作用するautotoxinという新たな蛋白質が誘導され、退行後期の組織リモデリングに作用することを発見した。この蛋白質は妊娠黄体にも誘導され、またFasの発現動態からも性周期黄体と偽妊娠黄体のそれは、妊娠黄体のそれとは違うことを示した。

研究成果の概要(英文)：Our findings are as follows. 1) COX-2 induction by the preovulatory mature follicles could be regulated by a crosstalk with the metabolism of steroid including P4 and by a feedforward/feed back mechanism involving GIVA PLA2 metabolites. 2) PGE synthase in the granulosa layers remains undefined. 3) In naturally regressing CL of cycling rats, autotoxin was identified to be a novel factor that was induced and contributed to tissue remodeling via function downstream of GIVA PLA2. 4) This protein was also induced in CL of pregnancy and supposed to have distinct roles in CL regulation. With this fact and the nature of Fas expression, there is a fundamental difference among CL of pregnancy, pseudopregnancy, and the cycling.

研究分野：応用動物科学

科研費の分科・細目：基盤研究C

キーワード：卵巣 ステロイド エイコサノイド 排卵 黄体退行

## 1. 研究開始当初の背景

排卵と黄体退行は、哺乳類の卵巣における主要な生理機能であり、その機能と構造の周期性を規定している。2大生理活性脂質群であるステロイドとエイコサノイドはそれぞれコレステロールとアラキドン酸(AA)という前駆物質を材料とし、代謝生成システムも基本的に異なる。そしてプロゲステロン(P4)とエイコサノイドは、下垂体の LH サージによって誘起される前者では協調的に、子宮からの PGF<sub>2a</sub> 刺激で誘起される後者では拮抗的に作用する。この異なるステロイド・エイコサノイド相互作用についての着眼並びに研究は皆無の状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、脂溶性 mediator とみなされるこの両者の相互作用の変化が、局所における卵巣機能及び周期性調節機構の鍵と捉え、その生成と作用の機序を明らかにすることを試みた。

以下、当初の計画と得られた成果について、4つの項目毎に記していく。

## 3. 研究の方法

1) P4 シグナリングが、COX-2 (PG 合成)、StAR (P4 合成)、MMPs (蛋白分解による卵胞壁崩壊)の発現と活性に及ぼす影響

約 25 日齢の幼若ラットに eCG と hCG を投与して誘起排卵モデルを用いた。経時的に卵巣を採取し、定法にて固定・薄切後、免疫染色にて P4 の産生と作用部位の半定量的評価を行った。また排卵に及ぼす P4 シグナリングの影響を調べるために、hCG 投与と同時、もしくは 4 時間後に P4 の合成阻害薬、受容体拮抗薬、あるいは作用薬を投与し、hCG 投与の 8 時間後における、P4 とエイコサノイド合成プロフィールと 24 時間後における排卵数を測定した。

また P4 が黄体の細胞死(特にアポトーシス)にどのように影響するかについて、性周期、偽妊娠、及び妊娠ラットを作出し、Fas

と活性型 caspase-3 の発現を形態計測学的に検討した。また実験的に P4 の合成阻害薬、受容体拮抗薬、あるいは作用薬を卵巣内に投与し、同様に検討した。

2) COX/LOX の代謝物が、COX-2、StAR、MMPs の発現と活性に及ぼす影響

排卵前後の顆粒層での P4 や PG 合成に関する酵素蛋白の誘導に、転写因子である PPAR と LXR の関与する可能性を調べるために、上記の誘起排卵モデルを用い経時的にサンプリングした後、Western blotting 及び免疫組織化学的に StAR、COX-2、PPAR 群の発現を調べた。in vivo において PPAR $\gamma$  の agonist/antagonist を投与した状態での hCG に対する COX2 と StAR の発現を調べた。

3) COX-2 の代謝物が、20aHSD、アポトーシス関連因子、マクロファージ・好中球誘因因子の発現と活性に及ぼす影響

偽妊娠ラットを作出し、PGF<sub>2a</sub> による黄体退行を誘起した時に、COX-1 あるいは-2 の選択的阻害薬を投与して、アポトーシスやマクロファージ・好中球の浸潤への効果を調べた。それぞれ TUNEL 法と各血球細胞の特異的マーカーを免疫染色することにより、形態計測学的検討を行なった。

4) GIVA/GVIA PLA2 の代謝物が、StAR、20aHSD、アポトーシス関連因子の発現と活性に及ぼす影響

上記の 3) のテーマの結果とも関連するが、黄体の退行にアラキドン酸の COX 経路の寄与は少ないことが判明したので、PLA2 のもう一つの代謝産物であるリゾリン脂質の方面に焦点をシフトした。新たな脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸(LPA)を産生する autotaxin (ATX)、並びにそれに対する 4 種類の GPCR (LPA1-4) について、性周期回帰ラットの卵巣で検討した。少なくとも 4 世代の黄体が混在する卵巣において、上記の蛋白質の局在を免疫組織化学的に調査した。さらに ATX の中和抗体や特異的阻害薬を投与

して、アポトーシス、貪食細胞の浸潤、そして間質線維芽細胞の増殖を調べた。

また機能的及び構造的にさらに賦活化される妊娠黄体での発現、これに関連して胎盤、子宮、胎膜などの妊娠関連組織での発現量と活性をそれぞれ Western blot 法と色素定量法により測定した。

#### 4. 研究成果

1) P4 シグナリングが、COX-2 (Eico 合成)、StAR (P4 合成)、MMPs (蛋白分解による卵胞壁崩壊)の発現と活性に及ぼす影響

成熟卵胞で合成される P4 の産生部位として、排卵に選抜される卵胞の顆粒層という定説が支配的であるのに対し、筆者らの少なくとも幼若ラットの誘起排卵モデルでの成績では、排卵に至らない卵胞も含めた卵胞膜に StAR と 3 $\beta$ -HSD の強い発現を認めた。すなわち P4 の受容する部位は顆粒層であるが、産生部位の主体は顆粒層であるという説を支持する。

また成熟卵胞における、P4 合成と作用の経路と、COX-2/PGE<sub>2</sub> の経路は独立的であるとの説が有力であったが、それを覆す証拠を得た。hCG 投与直後や 4 時間後に P4 の合成や作用を薬理的にブロックすると、8 時間後の COX-2 の発現量と卵巣 PGE<sub>2</sub> 含量が有意に低下した。この時、StAR の発現と P4 の分泌量も低下した。このことから、LH サージを受けた卵胞では P4 の自律的増幅が作動し始め、この作用は COX-2 の誘導と PGE<sub>2</sub> の合成に正の調節をすることを初めて示した。

また P4 が高度に維持されるラット妊娠黄体では、性周期黄体や偽妊娠黄体とは異なり、ステロイド産生細胞の Fas 発現が全く見られず、定説であるアポトーシス依存的細胞死は主要な機構ではないことを改めて示唆するデータを得た。したがって空胞変性とオートファジーに関わるマーカー蛋白質 LC3 についての研究を開始している。当初の計画である PLA<sub>2</sub> の下流の COX や LOX がどの程度発現し機

能しているかは懐疑的になってきており、AA ではないもう一つの PLA<sub>2</sub> 代謝物経路の方にシフトした。

2) COX/LOX の代謝物が、COX-2、StAR、MMPs の発現と活性に及ぼす影響

COX と LOX の活性が、COX-2 の誘導に貢献していることは、それぞれの特異的阻害薬の投与実験によって確認されていたので、その酵素代謝物と、当該遺伝子の発現に至る因果関係の解明を試みた。顆粒層での P4 や PG 合成に関わる酵素蛋白の誘導に、PPAR $\alpha$  と LXR の関与する可能性を調べたところ、排卵成熟卵胞の PPAR 発現は hCG 投与直後の顆粒層と卵丘では PPAR $\gamma$  と PPAR $\alpha$  であり、前者については発現量が hCG4h 以降、低下した。そして in vivo において PPAR $\gamma$  の agonist/antagonist を投与した状態での hCG に対する COX2 反応は、antagonist は無効で agonist で発現が抑制された。当初の予定期間内に十分に有意な成績を得ることができなかったが、現在さらに時間的及び転写因子特異的な制御によって影響を受けるかを検討継続中である。

3) COX-2 の代謝物が、20aHSD、アポトーシス関連因子、マクロファージ・好中球誘因因子の発現と活性に及ぼす影響

ラット黄体の退行時には、GIVA PLA<sub>2</sub> の発現と活性が高まることを筆者らは示しており、さらに下流の COX 代謝(物)の役割を調べた。しかしながらこの酵素の阻害薬は、TUNEL 反応やマクロファージ・好中球の退行組織内への流入はそれほど顕著ではなかった。この結果と合わせて、COX-1 や -2 の発現はあまり認められず、AA もしくはそれ以外の代謝物が関与する可能性を示唆した。

4) GIVA/GVIA PLA<sub>2</sub> の代謝物が、StAR、20aHSD、アポトーシス関連因子の発現と活性に及ぼす影響である。

上記の 3) の結果とも関連して、LysoPLD 活性を発揮する ATX という物質に焦点をシフトした。本酵素は GIVA PLA<sub>2</sub> の下流で LPA を

産生し、この脂質メディエーターはこれまでに6種類のGPCR (LPA1-6)を有し、がんや炎症などで重要な役割を果たすことが明らかにされてきている。そしてまず、性周期黄体の自発的退行に本蛋白質が誘導されることを発見した。受容体については、炎症様部位の遊走細胞にLPA3が、黄体周囲の比較的大きな動静脈平滑筋にLPA3と4が発現していた。ATXの中和抗体や特異的阻害薬の投与により、ATX/LPAは、退行時の好中球やマクロファージの浸潤を抑制的に調節し、間質線維芽細胞の増殖と走化性へは促進的に影響した。このことは、GIVA PLA2の脂肪酸以外のリゾリン脂質からLPA経路を経て、組織リモデリングの方に寄与していることを世界に先駆けて示すことができた。

さらに興味深いことに、ATXは妊娠後半期の妊娠黄体にも特異的に誘導されることも見つけ、局所でのP4合成や血管新生の促進作用を想定しその証明に取り組んでいる。ATXは、胎盤、子宮、胎膜などの妊娠関連組織でも発現し、発現量と活性は概ね分娩直前に増加した。これらの知見は、ヒト妊婦の知見にも外挿できる重要な知見であり、全身性の何らかの機能を仮定しており、さらなる検討を進めている。

以上のように3カ年にわたる本研究は当初の計画に関しては約60%の達成度に留まったが、ATXという新たな研究の糸口となる因子を発見することができ、この因子は卵巢局所のみならず、妊娠の各所で発現しまた時間的に変動することから妊娠や分娩のメカニズムを探る上でキー物質になるのではないかと思われた。以下に、期間内に掲載までに至った論文を記載する。

#### 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 3件)

Masuda K, Haruta S, Orino K, Kawaminami M, Kurusu S. Autotaxin as a novel, tissue-remodeling-related factor in regressing corpora lutea of cycling

rats. FEBS Journal 280(24):6600-6612:2013 doi: 10.1111/febs.12565

Satoh H, Watanabe K, Kawaminami M, Kurusu S. A comprehensive immunohistochemistry of prostaglandins F2 and E2 synthetic enzymes in rat ovary and uterus around parturition. Prostaglandins Other Lipid Mediat 106:23-28:2013 doi: 10.1016/j.prostaglandins.2013.07.005

Kurusu S, Sapirstein A, Bonventre JV. Group IVA phospholipase A<sub>2</sub> optimizes ovulation and fertilization in rodents through induction of and metabolic coupling with prostaglandin endoperoxide synthase 2. FASEB Journal 26(9):3800-3810:2012 doi: 10.1096/fj.12-203968

〔学会発表〕(計 7件)

Kurusu S, Masuda K, Haruta S, Kawaminami M. Autotaxin as a novel, tissue remodeling-associated factor in regressing corpora lutea of cycling rats. GEM/GERLI Lipidomics Meeting Saint-Jean-Cap-Ferrat, France 2013/11/12

白坂美貴、戸田素弘、増田加奈子、治田悟、寺島涼太、米澤智洋、久留主志朗、汾陽光盛 妊娠ラットの生殖組織におけるAutotaxinの発現と活性 第156回日本獣医学会 岐阜(岐阜県) 2013/9/20

Kurusu S, Sapirstein A, Bonventre JV. Group IVA PLA2 cooperates with cyclooxygenase-2 to optimize ovulation and fertilization in rodents.

OVARIAN CLUB II Prague, Czech  
2012/11/9

吉尾 啓、佐藤弘法、米澤智洋、久留主志朗、汾陽光盛 ラットの黄体退行における Fas 及び関連因子の発現と局在 盛岡(岩手県) 2012/9/16

Kurusu S, Sapirstein A, Kawaminami M, Bonventre JV. Role of group IVA phospholipase A2 in testosterone biosynthesis and male reproductive function in rodents. the Faseb summer conference Vermont USA 2012/7/19

久留主志朗、澤田治美、汾陽光盛 げっ歯類の雄性生殖における Group IVA phospholipase A2 の役割 第54回日本脂質生化学会 福岡(福岡県) 2012/6/8

Kurusu S, Sapirstein A, Bonventre JV. Group IVA phospholipase A2 regulates hCG-induced cyclooxygenase-2 expression in rodent preovulatory follicles. 第104回日本繁殖生物学会 盛岡(岩手県) 2011/9/15

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
久留主志朗 (KURUSU Shiro )  
北里大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：50215076

(2)研究分担者  
折野宏一 (ORINO Koichi )  
北里大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：60214235