

黄体と子宮の機能調節におけるアポトーシスの役割とその制御

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	奥田, 潔 上野山, 賀久
巻/号	22巻7号
掲載ページ	p. 27-32
発行年月	1999年7月

黄体と子宮の機能調節におけるアポトーシスの役割とその制御

奥田 潔・上野山賀久

岡山大学 大学院自然科学研究科

哺乳動物の妊娠が成立し維持されていくためには、黄体および子宮が正常に機能していることが必要である。黄体の主たる機能は、妊娠の成立と維持に必須のプロゲステロンを分泌することである。一方、妊娠が成立しなかった場合、次の妊娠の機会のために黄体を退行（退縮）させ一定の間隔で排卵を繰り返すための機構が働く。黄体が退行するという現象は、急激な黄体機能の消失と形態的な消失の2段階からなり、黄体の形態的な消失がアポトーシスによることが証明されつつある。しかし、主要な黄体退行因子であるプロスタグランジン (PG) $F_2\alpha$ とアポトーシスとの関連については不明な点が多く残されている。また、ヒト子宮内膜において分泌期中期から後期にかけてアポトーシス細胞死が示されている。しかし、脱落膜形成の顕著でない家畜における子宮内膜のアポトーシスの意義については十分研究が進んでいない。本稿では、卵巣周期が成立するために必須の黄体退行のメカニズムと子宮機能の周期的変化についてアポトーシスの観点から概説するとともに、アポトーシスを誘起する事で知られるサイトカインの一つである腫瘍壊死因子 (TNF α) の黄体ならびに子宮内膜におけるアポトーシス以外の生理的役割についても話題を提供したい。

1. 黄体退行とアポトーシス

1) 黄体におけるアポトーシスの発見

1972年にKerrらによりアポトーシスの概念が提唱されると、その数年後には退行過程にあるヒツジの黄体で、アポトーシス細胞死に特徴的な形態変化すなわち、クロマチンの凝集、細胞の縮小等が認められている。しかしながら、アポトーシスの指標となるDNAの断片化を解析する生化学的手法が開発されるまで、黄体退行におけるアポトーシスの役割についてはほとんど検討されることはなかった。近年、ようやくそのような手法を用いて、発情周期末期の退行黄体でDNAの断片化が確認され、黄体におけるアポトーシス誘導のメカニズムとその意義が注目されている。

2) 黄体退行因子

多くの哺乳動物において黄体退行（退縮）はPGF 2α によって誘起されることが知られている (Auletta and Flint,1988)。家畜（ウシ、ヒツジ、ブタ）では子宮を除去すると黄体期が延長されることから、黄体退行因子であるPGF 2α は子宮由来であることが明らかにされている。黄体退行はPGF 2α を投与することによって人為的に誘起することも可能であり、黄体期中期のウシにPGF 2α を筋肉内に投与すると、まずはじめに黄体のプロゲステロン分泌機能が失われ、血中のプロゲステロン濃度が減少し（機能的退行）、続いて、黄体組織が消失する（構造的退行）。このPGF 2α の黄体退行作用は、黄体組織を構成している大型黄体細胞の細胞膜上に存在するPGF 2α に対する特異的なレセプターを介して、次に述べるような細胞内シグナル伝達機構の活性化の結果として発現する。

3) 細胞内シグナル伝達機構

PGF_{2α}が黄体細胞膜上のPGF_{2α}レセプターと結合すると、レセプターと共役するフォスホリパーゼCが活性化され、フォスファチジル・イノシトールから、プロテインキナーゼC (PKC)の活性化に關与するジアシルグリセロールと、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に關与するイノシトール・トリフォスフェイトという二種類のセカンドメッセンジャーが生じる(Niswender et al., 1994)。

ヒツジではホルボル・エステルによるPKCの活性化が大型黄体細胞のプロジェステロン分泌を抑制すること、カルシウムイオンフォアによる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が大型黄体細胞の生存性を低下させることが明らかにされている。しかし、培養黄体細胞にPGF_{2α}を添加しても、大型黄体細胞のプロジェステロン分泌は減少するが、生存率は変化しないことから、PGF_{2α}による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が直接的に細胞死を誘導するのではないと考えられている。

最近の研究では以下に述べるように、PGF_{2α}刺激により黄体内で産生される種々の生理活性物質(それらは黄体内局所機能調節因子として作用する)によってアポトーシス細胞死や黄体の構造的退行が誘起されるのではないかと推察されている。

4) 黄体内局所機能調節因子によるアポトーシスの誘導

最近、Hoyer (1998)は培養ヒツジ黄体細胞のDNA断片化におよぼすPGF_{2α}とオキシトシンの影響について検討し、オキシトシンが大型黄体細胞におけるDNAの断片化を誘導することを明らかにした。黄体由来のオキシトシンは黄体退行期にPGF_{2α}刺激に反応して大型黄体細胞から分泌され、子宮のPGF_{2α}分泌を促進する物質として知られてきたが、黄体にもオキシトシンに対する特異的なレセプターが存在し、黄体内に

おけるオキシトシンの生理的役割が注目されていた。Hoyer (1998)の研究結果は黄体内局所機能調節因子が黄体のアポトーシスに關与しているかも知れないという仮説を支持するはじめての報告であるが、オキシトシン以外にも、他の組織、細胞においてアポトーシス誘導作用を有することが知られているエンドセリン-1、アンギオテンシンIIといったペプチドホルモンが黄体退行機構に關与する可能性が明らかにされつつある。

しかし、実際にDNAを断片化させる酵素であるエンドヌクレアーゼの活性化と、オキシトシンをはじめ黄体で産生される局所機能調節因子との関係は全く明らかにされておらず、今後の詳細な検討が期待される。

5) アポトーシスの実行と抑制に關する因子

アポトーシスはネクローシスとは異なり、細胞損傷などに起因する受動的な細胞の崩壊ではなく、プログラムされた能動的な細胞死であり、その実行と抑制に關与する多くの因子の存在が明らかにされている。哺乳動物における代表的な因子はBcl-2に代表される一連の物質であり、それらはBcl-2ファミリーと呼ばれ、互いに類似した構造を有する。Bcl-2ファミリーにはBcl-2, Bcl-x_{long}に代表されるアポトーシスの抑制に關連する因子と、Bax, Bcl-x_{short}のようなアポトーシスの実行に關連するものがある。さらに、BaxはBcl-2に結合して、そのアポトーシス抑制作用を阻害することが知られており、細胞内におけるBax等の実行因子と、Bcl-2等の抑制因子のバランスによってアポトーシスの誘導が制御されていると考えられている。

実際に、退行黄体と妊娠黄体におけるBax遺伝子あるいは、interleukin-1β-converting enzyme (Ice; 活性酸素やTNFαによるアポトーシスの誘導に關連する) 遺伝子の発現について検討した最近の報告では、アポトーシスの実行因子であるBaxやIceの遺伝子発現は妊娠初期黄体

に比べ、退行黄体で高いことが明らかにされている (Rueda et al., 1997)。したがって退行黄体ではアポトーシス実行因子 (Bax, Ice等)が増加し、それまで保たれていた抑制因子 (Bcl-2等)とのバランスが変化することによって、アポトーシスの発現を抑制する機構が阻害され、アポトーシスが実行されると考えられる。しかし、これらの遺伝子発現を調節しているメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。上述の黄体内局所機能調節因子がアポトーシスの実行あるいは抑制因子の遺伝子の発現に関与しているかどうかは今後の重要な研究課題である。

6) 妊娠黄体におけるアポトーシスの抑制機構

妊娠が成立すれば黄体は退行せず、妊娠黄体として維持されるが、どのようなメカニズムにより黄体はアポトーシスを回避するのだろうか。最近、ヒト黄体ではDNAに断片化が、黄体期の中期から出現し始め、末期には強く認められるが、妊娠黄体では初期黄体と同様に、ほとんど認められないことが明らかにされた (Nakano, 1997)。ヒトでは妊娠にともない、絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) が産生され、黄体形成ホルモン (LH) レセプターを介して、妊娠黄体の機能維持に関与することが知られている。hCGはラット卵胞やウサギ黄体のDNAの断片化を抑制する作用を有することから、ヒト黄体においてもhCGがアポトーシスを抑制し、妊娠黄体として存続、機能させると推察されている。

しかし、ウシでは妊娠した場合にhCGなどの特殊な性腺刺激ホルモンは産生されず、どのような機構により妊娠黄体がアポトーシスを免れ、その機能を維持していくかについては全く明らかにされていない。

7) TNF α の黄体機能におよぼす影響

TNF α は腫瘍細胞の溶解に関与するマクロファージから検出されたサイトカインの一種であり、そのレセプターの構造からアポトーシス誘導に関与することが強く示唆されている生理活性物質である (Terranova, 1997)。TNF α のレセプターは二種類 (TNFR1とTNFR2) 報告されており、TNFR1はFasと同様にアポトーシス誘導に必須のアミノ酸配列であるdeathドメインを有することが明らかにされている。実際、マウス黄体ではTNF α がアポトーシスを誘導することが明らかにされている。しかし、ウシでは黄体退行期の末期に黄体組織中のTNF α 濃度が増加することが知られているが、TNF α によるアポトーシス誘起の報告はまだない。

一方、ウシ黄体でTNF α が黄体形成ホルモンで刺激されたプロジェステロン分泌を抑制することが知られており、黄体の機能的退行への関与が示唆されている (Pate, 1994)。最近、著者らはウシ黄体にTNFR1 mRNA (図1)と¹²⁵I標識TNF α に対する特異的結合部位がウシ黄体細胞膜上に存在することをはじめて明らかにし、これまでに知られてきたTNF α の生理作用が、deathドメインを有するTNFR1を介している可能性を示すとともに、ウシ黄体におけるアポトーシスへのTNF α の関与を強く示唆した。しかし、著者らは退行黄体だけでなく、初期黄体、中期黄体さらには、妊娠黄体にもTNF α レセプ

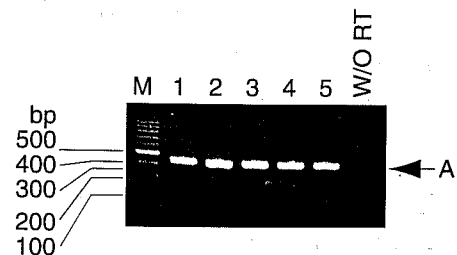


図1 RT-PCRによる黄体期の各ステージにおけるウシ黄体のTNFR1 mRNAの発現

矢印Aは予想サイズである439bpの付近に検出されたPCR産物(レーン1;形成初期,レーン2;形成後期,レーン3;中期,レーン4;後期,レーン5;退行期,M;分子量マーカー(bp),W/O RTは中期黄体から得たRNAをreverse transcriptaseを含まない条件下で反応させた場合)(奥田・川手:未発表)

ターが存在することを見いだしており、TNF α はウシ黄体においてその機能的、構造的退行だけでなく、機能維持にも何らかの役割を果たしていると推察される。実際にTNF α 刺激によりウシ黄体から分泌されるPGF $_{2\alpha}$ 、PGE $_2$ 、PGI $_2$ といった黄体由来のPGsは、いずれも黄体刺激因子として作用することが知られており、PG産生の盛んな初期黄体においてTNF α はPGsを介して間接的に黄体の形成と維持を支持しているのかもしれない。TNF α は様々な作用をもつことが知られており、黄体におけるTNF α の生理的役割の究明には更なる研究が必要である。

2. 子宮の周期的変化とアポトーシス

1) 月経とアポトーシス

子宮は胚の発育にともなって着床に適した環境をつくるが、その変化は卵巣の周期的変化に呼応しており、卵巣に由来するステロイドホルモンにより支配されていると考えられている。ヒトを含む霊長類では月経周期にともない、子宮の内膜上皮細胞と間質細胞が増殖し、脱落膜が形成される。形成された脱落膜はその後、胚が着床すればそのまま胎盤の一部として維持されるが、胚のない場合には崩壊し、月経として排出される。1976年には、HopwoodとLevisonにより月経期の子宮内膜上皮細胞にアポトーシス小体の出現することが報告されており、さらに近年、TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法による *in situ* での子宮内膜細胞におけるDNAの断片化が確認されている (Tabibzadeh, 1995)。ヒト子宮においてアポトーシスを起こした細胞は増殖期にはほとんど存在せず、分泌期に増えはじめ、月経的に最大となるが、アポトーシスの実行あるいは抑制因子の発現パターンもこれに一致している。すなわち、アポトーシスの抑制に関与するBcl-2は増殖期に強く発現し、分泌期に消失するのに対し、アポトーシスの実行因子であるBaxは増殖期に弱く、月経期に強く発現する。これらの知

見は月経が子宮内膜のアポトーシスによって誘起されることを強く示唆している。

2) ステロイドによるアポトーシスの誘導

上述のようにアポトーシス細胞とその関連因子の発現が月経周期にともない変化することから、子宮内膜におけるアポトーシスの発現にはステロイドホルモンの関与が推察されている。実際にマウスを用いた実験では、エストラジオール投与により子宮内膜上皮細胞の増殖が促進され、その投与停止によりアポトーシスが誘導されることが明らかにされている。また、偽妊娠ウサギにおいてはプロゲステロン投与がアポトーシスを抑制し、プロゲステロンアンタゴニストであるRU486がアポトーシスを誘起することが知られている。しかし、ステロイドとアポトーシス関連因子の発現との関係はまだ十分に明らかにされておらず、ステロイドによるアポトーシス誘導のメカニズムについては更なる研究が必要である。

3) Fas - Fasリガンドによるアポトーシスの誘導

ヒト子宮内膜上皮にFasを発現する細胞が確認されており (Tabibzadeh, 1995)、Fas-Fasリガンドによるアポトーシスの誘導が子宮内膜の周期的変化に対して重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、Fasの発現にはBcl-2やBaxのような周期性は認められておらず、増殖期から月経期にかけてのアポトーシス細胞の増加がFasの発現量の変化により調節されているとは考えにくい。一方、Fasリガンドは細胞障害性T細胞あるいはナチュラルキラー細胞の細胞膜上に発現し、それらの細胞がFas発現細胞とFas-Fasリガンドを介して接合することにより、Fas発現細胞に対しアポトーシス細胞死を誘導する。T細胞等の免疫系細胞は子宮内膜に多数認められているが、まだFasリガンド発現細胞の周期的変化については明らかにされていない。

4) TNF α によるアポトーシスの誘導

ヒト子宮内膜上皮にTNFR1が存在することも明らかにされている (Tabibzadeh, 1995)。子宮内膜上皮細胞のTNFR1もFasと同様に周期的な変動は認められないが、そのリガンドであるTNF α mRNA発現は増殖期に低く、分泌期に増加することが明らかにされている。したがって、マクロファージあるいは子宮内膜上皮細胞において産生されるTNF α が月経期における子宮のアポトーシスの誘導に関与することが考えられる。

しかしながら、TNF α とそのレセプターの発現は月経期の子宮だけでなく、妊娠期の子宮の正常な機能を有する胎盤や胚にも確認されている (Hunt et al., 1996)。さらに、ヒト胎盤では増殖が停止し、分化をはじめた細胞にTNF α mRNAとそのタンパクが強く発現しており、TNF α は胎盤細胞の分化にも関与すると推察される。これまでの研究から、TNF α の生理的役割はアポトーシスの誘導だけでなく、細胞の増殖の促進および抑制・細胞分化の誘導など多岐にわたることが知られており、妊娠子宮において胚・胎児の発育ならびに母体との相互作用を制御する因子としてTNF α が作用しているのかもしれない。

5) 家畜における子宮のアポトーシス

霊長類のような脱落膜形成の見られない家畜では、子宮の周期的変化とアポトーシスの関係についての研究はほとんど行われていない。

我々は、以前に正常な発情周期を繰り返しかつ受胎可能なウシの子宮内膜について形態学的に検討するとともに、正常牛とリピートブリーダー牛の子宮内膜を形態学的に比較検討し、リピートブリーダー牛の子宮で観察される組織像が正常な子宮で観察される組織像と異なることを明らかにした。この結果をアポトーシスの観点から考えると、TNF α 等で誘起されるアポトーシスの発現時期の変化が、子宮内膜の周期

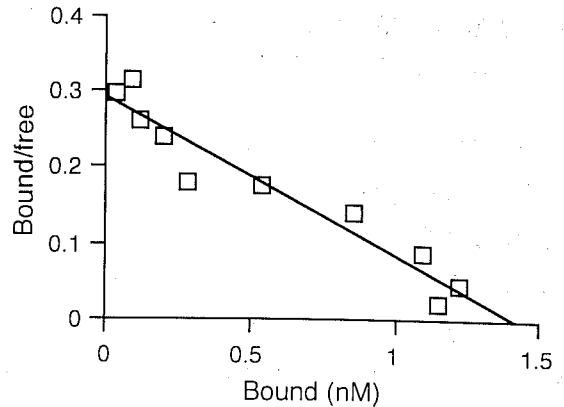


図2 ウシ子宮内膜(後期)における腫瘍壊死因子(TNF α)レセプターのScatchard解析
親和性: 6.4 ± 0.65 nM, 濃度: 13.3 ± 0.86 pmol/mg protein (奥田: 未発表)

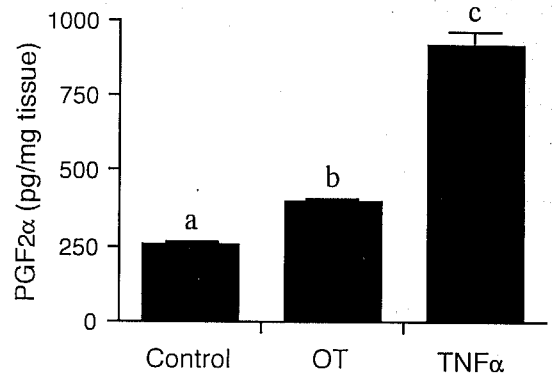


図3 腫瘍壊死因子(TNF α)あるいはオキシトシン(OT)添加によるウシ子宮内膜組織片のプロスタグランジン(PG)F $_{2\alpha}$ 分泌の変化
PGF $_{2\alpha}$ 分泌量は100ng/mlのTNF α およびOTの添加により有意に増加した($P < 0.001$ 対無処理区) (奥田: 未発表)

的变化の異常を誘起していることが推察される。そこで最近我々はウシ子宮におけるTNF α レセプターの存在について検討し、高親和性の一種のレセプターの存在を明らかにした(図2)。さらに、我々はTNF α が子宮のPGF $_{2\alpha}$ 分泌の強力な刺激因子として作用することを見いだしており(図3)、ウシ子宮の機能ならびに形態の周期的な変化におけるアポトーシスの役割ならびに、TNF α の生理的役割の解明を今後の課題としている。

3 家畜の生殖制御技術開発のためのアポトーシス研究の意義

本稿では、高等哺乳動物の卵巣と子宮には妊娠が成立しない場合の規則正しい卵巣周期の発現、すなわち発情が回帰するための巧妙なメカニズムが存在しており、その要所においてアポトーシスが大きな役割を果たしている可能性を概説した。この事実を逆に考えれば、妊娠が成立するときにはアポトーシスを抑制する機構が働いていることは明らかである。したがって、黄体および子宮におけるアポトーシスに関する研究は、異常な発情周期を示す家畜の原因の究明、治療法、予防法の確立のための基礎研究として極めて重要であるばかりでなく、母体内に起こりうる種々の不妊症の原因を追及し、受胎率の向上を目指すための基礎研究として重要な意義がある。

参考文献

- Auletta, F.J. and Flint, A.P.F. (1988) *Endocr. Rev.*, 9 : 88 - 105.
- Hopwood, D. and Levison, D.A. (1976) *J. Pathol.*, 119 : 159 - 166.
- Hoyer, P.B. (1998) *J. Soc. Gynecol. Invest.*, 5 : 49 - 57.
- Hunt, J.S. et al. (1996) *Biol. Reprod.*, 54 : 554 - 562.
- Kerr, J.F.R. et al. (1972) *Br. J. Cancer*, 26 : 239 - 257.
- Nakano, R. (1997) *Semin. Reprod. Endocrinol.*, 15 : 335 - 344.
- Niswender, G.D. et al. (1994) *Biol. Reprod.*, 50 : 239 - 247.
- Pate, J.L. (1994) *J. Anim. Sci.*, 72 : 1884 - 1890.
- Rueda, B.R. et al. (1997) *Biol. Reprod.*, 56 : 186 - 193.
- Tabibzadeh, S. (1995) *Human Reprod. Update*, 4 : 303 - 323.
- Terranova, P.F. (1997) *Dom. Anim. Endocrinol.*, 14 : 1-15.

〒700 - 8530 岡山市津島中3-1-1

コーヒーブレイク

“アホウ” は力なり

今年(1999)琉球大学で開催された日本応用動物昆虫学会の大会で、弘前大学名誉教授の正木進三さんの講演は、いつもながら会場に入りきれないくらいの盛況であった。

八重山諸島にミナミマダラスズという小さなコオロギが棲息していて、卵で越冬休眠するものとしめないものの二つのタイプがある。また前者にも休眠期間には長短の個体差がある。正木さんはこれを休眠の長さ(深度)別に累代淘汰し、自然界の緯度の差による勾配変異を人為選択で再現できるかどうか調べている。5年間の子備試験の後、1984年からこの試験を始め、今日までの15年間に休眠の深いものでは25世代、非休眠では65世代を飼いつづけた。1世代が長いコオロギ類でこれほど息の長い継続研究は世界的にも例を見ない。

正木さんは冒頭で「ほくがしてきたのは実験ではなく、単調な作業にすぎないからアホウにしか続けられない。ただ、“継続は力なり”というから、三段論法を適用すれば“アホウは力なり”ということになる」といって

笑わせた。が、当初の試験設計を変更することなく長期継続することは、よほど理論構成が確立され、強固な意思と情熱がなければできないことではない。分析機器の急速な進歩もあって短期決着型の研究が急増し、実用志向型の研究ばかりが歓迎されている今こそ“アホウ”の意義は大きい。なにしろ、わずか数百万年の歴史のヒトが、億年単位で数える生物を相手にしているのである。

ちなみに、正木さんは世界的に知られる昆虫研究者である。主としてコオロギ類の休眠現象を主題に、昆虫の気候適応と分化の問題に取り組み、大学を定年退職したのちも自宅にエアコン室を作り、膨大な個体数のコオロギを飼いつづけている。「自然界での進化に比べてこの仕事の何と短いことか。余命を考えるとあと何年データが取れるだろうか」といしながら、古希を越え、手伝う学生もいない今も、彼は毎日コオロギに囲まれてひたすら“アホウ”のように研究を続けているはずである。

(梅谷献二)