

## 論文の内容の要旨

論文題目 細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>による卵巣機能調節機構の解析

氏 名 久留主志朗

哺乳類の卵巣機能は主に下垂体や胎盤により制御されているが、近年卵巣自身による局所での調節機構の重要性が指摘されてきている。プロスタグランジン (PG) に代表されるエイコサノイドはその局所調節因子の一つであり、排卵における PGE<sub>2</sub> や黄体退行における PGF<sub>2</sub>α の役割はよく知られている。PG は、必要時に生成され、作用を発現した後、速やかに代謝・分解されるので、その生物学的意義を理解するためには産生機構を解析することが重要である。PG 合成系には、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) による膜リン脂質からのアラキドン酸 (AA) の遊離と、シクロオキシゲナーゼ (COX) による AA から PGH<sub>2</sub> への変換の 2 つの律速段階がある。COX は 2 つのイソタイプしか存在しないために、この酵素に関する研究は非常に進展しているのに対し、PLA<sub>2</sub> は 10 を越える種類が存在することから、個々のイソ酵素の発現と生理的役割はもちろんのこと、その全体像についても解明が遅れている。PLA<sub>2</sub> の中でも細胞質型 PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) は、AA 含有リン脂質に基質選択性を示し、μM 以下のカルシウム濃度及び mitogen-activated protein kinase によるリン酸化で活性化されることから、特に重要視されている。本研究ではこの cPLA<sub>2</sub> に着目し、ラット卵巣における本酵素の発現と生理的役割についての解析を行った。

### ラット卵巣における cPLA<sub>2</sub> の発現と細胞局在

これまで cPLA<sub>2</sub> が、生体内のほとんどの臓器・組織に発現していることはノーザンあるいはウエスタンブロット分析により示されていたが、細胞レベルでの発現・局在を示す免疫組織化学、あるいは in situ hybridization 法を用いた成績は極めてわずかであつ

た。様々な細胞種から成り、また生理的状态に伴いダイナミックに変化する卵巣での働きを知るためにまず、細胞局在を調べることを試みた。最初にラット卵巣の cPLA<sub>2</sub> mRNA の検出を RT-PCR 法により試みた。cPLA<sub>2</sub> cDNA の一部 (+304 ~ +1199, 896bp) が増幅されるようにプライマーを設計し、サイクル数 40 で増幅反応を起こさせたところ、脾臓や腎臓と同様に卵巣総 RNA から約 900bp の DNA 断片が増幅され、卵巣における cPLA<sub>2</sub> 遺伝子の発現を確認した。また対照として用いた GAPDH (30 サイクル数) と比べ、その発現量の極端に低いことが示唆された。

次いで性周期を回帰している卵巣における蛋白質の分布を免疫組織化学的に検討したところ、本酵素が細胞種特異的に、また時期特異的にその分布の変化することが示された。最も強い免疫シグナルは、卵子と閉鎖卵胞や退行黄体に見られた。健常卵胞の顆粒層細胞では成熟前には陰性であるのに対し、排卵直前においても、わずかながら cPLA<sub>2</sub> 免疫反応が増強した。卵巣に存在する 3~4 世代の黄体はいずれも陽性であり、古い世代の黄体ほど、さらに黄体の中心部よりも周辺部において陽性反応が強まることが明らかとなった。そして黄体内において大及び小黄体細胞、血管系の細胞のいずれもが陽性であった。このことより、cPLA<sub>2</sub> はハウスキーピング様に発現しているのではなく、積極的な発現調節を受け、生殖活動の発現のためにダイナミックに変動する卵巣の形態と機能の調節に寄与している可能性が示された。中でも卵子と排卵前後の顆粒層細胞の免疫反応の知見より、卵子成熟及び排卵過程への役割の可能性と、加えて組織の再構築の盛んな卵巣でのアポトーシスへの関与が示唆された。

#### 排卵に対する cPLA<sub>2</sub> の関与

次に、排卵過程の解析に汎用される幼若ラットの誘起排卵モデルを用いて、cPLA<sub>2</sub> の発現動態と機能的役割を調べた。その結果、ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) 刺激により卵胞膜での免疫反応が増強し、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 投与後は顆粒層細胞が黄体細胞へ分化しつつあるところで増強する傾向が観察された。卵巣のサイトゾルを調製し、その PLA<sub>2</sub> 活性を経時的に測定したところ、eCG 刺激後若干の増加が見られるが、hCG 投与の少なくとも 8 時間後までは低く推移し、排卵後の黄体化にもなって増加した。この活性は、cPLA<sub>2</sub> の特異的阻害薬である arachidonyl trifluoromethylketone (ATK, 10 $\mu$ M) の添加で、約 20-30% にまで低下し、分泌型 PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) の阻害薬である dithiothreitol 5mM においても若干減少した。卵胞局所の PG 濃度が最も高まることが明らかにされている hCG 投与 8 時間後に、ATK 0.3-3.0mg を卵巣嚢内に投与すると、卵巣 PGE<sub>2</sub> 含量が半減し、また排卵数も用量依存的に減少し、3.0mg では対照群の 35% にまで減少した。このことから、卵巣における PLA<sub>2</sub> 活性は一部 sPLA<sub>2</sub> に由来するものの、主体は cPLA<sub>2</sub> であり、排卵卵胞において cPLA<sub>2</sub> 活性の急激な増加は伴わないが、PG (E<sub>2</sub>) 産生を介して排卵過程に関与していることが示された。cPLA<sub>2</sub> とその下流の COX-2 は、共に核膜や小胞体膜に局在し、PLA<sub>2</sub>-COX において機能的にも関連していることが示されている。cPLA<sub>2</sub> は、排卵卵胞の PG 合成において唯一

律速酵素であろう COX-2 に、効率よく AA を供給するように働いていることが推測される。

#### 黄体における cPLA<sub>2</sub> の発現と機能的役割

前述の性周期を回帰する卵巢での免疫組織化学的成績から、黄体は cPLA<sub>2</sub> の発現部位であり、加齢に伴って発現の増加することが示された。そこで、機能黄体における、本酵素の活性発現と機能的役割について検討した。黄体の加齢に伴う発現量を免疫プロット法あるいは免疫組織化学法で調べたところ、成熟ラットの妊娠 6 日目から 12 日目にかけては明らかな変化は認められなかったが、偽妊娠黄体において機能的退行の起こる 12 日目で発現が増強し、これは幼若偽妊娠ラットモデルにおいても同様であることが確認された。すなわち黄体の cPLA<sub>2</sub> 発現は、黄体のプロゲステロン分泌能に関連して変動することが示された。そして黄体のサイトゾル PLA<sub>2</sub> 活性を測定したところ、同じく成熟及び幼若ラットの両方において血中プロゲステロン濃度が低下する偽妊娠 6 日目から 12 日目にかけて酵素活性が上昇した。またこの活性は ATK 感受性であったことから、主に cPLA<sub>2</sub> に由来していることが推定された。ATK は、偽妊娠黄体の分散細胞系において AA 遊離を抑え、PGE<sub>2</sub> 産生はほぼ完全に阻害した。すなわちラット黄体細胞の主要な PLA<sub>2</sub> は cPLA<sub>2</sub> であると考えられた。強力な黄体退行因子である PGF<sub>2</sub>α の成熟偽妊娠ラットの黄体での含量は、PLA<sub>2</sub> 活性の推移にはほぼ一致して増加した。またプロゲステロン濃度が基底レベルにまで低下した 12 日目以降も少なくとも 15 日目までは黄体の PLA<sub>2</sub> 活性と PGF<sub>2</sub>α 含量は共に高い値で維持されることが明らかとなった。

続いて、妊娠ラットの黄体退行における PLA<sub>2</sub> 活性の推移を、PGF<sub>2</sub>α 含量と併せて検討した。血中プロゲステロン濃度が妊娠 21 日目 (PRG21) の 140ng/ml 前後から約 85ng/ml に下がり始めた PRG22 に黄体 PLA<sub>2</sub> 活性が上昇し始め、PGF<sub>2</sub>α 含量もこの日に急激に上昇した。さらに PLA<sub>2</sub> 活性は分娩後の黄体においても 5~8 日間は高いレベルを維持しており、この変動に一致するように黄体の PGF<sub>2</sub>α 含量も変化した。すなわち PLA<sub>2</sub> 活性は妊娠黄体の機能的退行に伴って上昇し、その後の形態的退行過程においても高いレベルで推移した。以上の結果から、cPLA<sub>2</sub> 活性はラットの機能的退行、さらには形態的退行時において亢進し、黄体退行を誘導並びに促進するよう機能していると考えられる。

そこで幼若偽妊娠ラットを用いて、cPLA<sub>2</sub> 及び PLA<sub>2</sub>-2A の遺伝子発現を抑制することが知られている dexamethasone を卵巢嚢内に 36 時間おきに 4 回投与した時の黄体のプロゲステロン分泌に及ぼす影響を検討した。偽妊娠 2 日目から投与した場合、末梢プロゲステロン濃度は対照群に比べ変化しなかったが、4 日目から投与を開始すると、血中プロゲステロン濃度の低下が遅延した。さらに 2 日遅らせて 6 日目から開始すると、黄体の機能的退行は約 5 日間延長した。すなわち、黄体局所の PLA<sub>2</sub> 活性を抑えて PG 産生を抑制すれば、黄体退行が遅延すると考えても矛盾のない結果となった。逆に偽妊娠末期に活性の上昇する cPLA<sub>2</sub> は PG 産生を介して黄体退行を誘導及び促進させていること

が強く示唆された。

以上を総合すると、1) 黄体には cPLA<sub>2</sub> が発現し、黄体の PG 合成系において主要な役割を担っていること、2) 黄体期末期にその発現が増強され、黄体内での PGF<sub>2</sub>α 合成系が増幅していくことにより、黄体退行が誘導かつ遂行されていくものと考えられた。PGF<sub>2</sub>α は黄体に作用するとカルシウム濃度の上昇と蛋白質キナーゼを活性化すると共に、過酸化脂質の生成も惹起させる。これらはいずれも cPLA<sub>2</sub> 活性の増強因子であることが示されていることから、cPLA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α による positive feedback の系が発動することが予想される。そして持続した cPLA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α 産生は、黄体の機能的退行のみならず、形態的退行にも関与しているのであろう。

本研究により、ラットの卵巣には cPLA<sub>2</sub> が発現し、卵子、退行黄体や閉鎖卵胞のアポトーシス過程の組織に多く局在することが明らかとなり、少なくとも排卵と黄体の機能的退行において発現の制御されていることが示唆された。本酵素は、排卵時に PG 合成のための AA 供給を介して排卵に寄与しており、さらに、黄体の退行過程において発現と活性が増強し、黄体退行を誘導していると考えられた。