

ヒト脱落膜細胞のPRL産生のアラキドン酸による抑制

武谷雄二、木下俊彦、水野正彦（東京大学産婦人科）

(はじめに)

下垂前葉に由来するホルモンであるprolactin(以下PRL)はヒト脱落膜組織でも産生され主に羊水中に移行し、胎児の発育分化、陣痛発来現象などと深い関連を有することが推定されている¹。脱落膜PRLは母体血への流入はわずかであり主に局所で産生されその近傍で作用するといういわば“local hormone”であろうと考えられている。それ故その産生分泌機構は当然下垂体のそれとは異なり、estrogenやthyroid stimulating hormone releasing hormone (TRH)などで分泌刺激は起こらず、また下垂体PRLの生理的分泌抑制物質であるdopamineにても分泌抑制を受けない。現在の所、脱落膜PRLの分泌調節因子は不明である。

prostaglandinのprecursorであるarachidonic acid(以下AA)は羊水中や卵膜組織に多量に存在し、種々の組織や細胞系において機構分化に影響を及ぼすという報告が相次いでいる。それ故、今回脱落膜組織におけるPRLの産生分泌にAAが関与するか否かを検討した。

(方法)

(1)in vitro incubation実験:妊娠初期(6週~10週)の人工妊娠中絶例より得たヒト脱落膜0.3gを細切し、37℃下にMedium199の2ml中に各種物質を添加し6時間のincubation後にMedium中及び組織内のPRL濃度をRIAにて測定した。PRL産生量はincubation後組織含量とMedium中濃度を合計し、それよりincubation前組織含量を減じたものとした。

添加物質は以下の通りである。

- ①Arachidonic Acid(300 μ M、100 μ M、10 μ M、3 μ M)、 γ -linoleic Acid(300 μ M、

linolenic Acid(300 μ M)、palmitic Acid(300 μ M)、oleic Acid(300 μ M、100 μ M、10 μ M)

- ②Lipoxygenase inhibitor(BW755C)(4 μ M、1 μ M)
Cyclooxygenase inhibitor(Indomethacin)(25 μ g/ml)
③ProstaglandinE₂(3 μ M、30nM)
ProstaglandinF_{2 α} (3 μ M、30nM)
④ケイ酸カラムにて抽出し精製したAA(300 μ M)
⑤Phorbol 12-myristate13acetate(PMA)(50ng/ml)
⑥Ca-Ionophore(A23187)(100 μ M、10 μ M)
⑦PhospholipaseA₂(PLA₂)(10u/ml、1u/ml)
PhospholipaseC(PLC)(1u/ml、0.1u/ml)

各添加物の溶媒にはEthanolを用いた、Ethanolの最終濃度は0.1%以下になるように調節した。

(2)mRNAの測定:脱落膜組織よりPoly(A)rich mRNAをOligo(dT)-cellulose columnにて抽出した。reticulocyte lysateを用いて翻訳し、総蛋白合成量はhot trichloroacetic acid不溶性へ取り込まれた³H-leucine量とした。PRL mRNAは免疫沈降法により定量した。

(成績)

(1)ヒト妊娠初期脱落膜は3987.4 \pm 724.3ng/g、tissueのPRLを産生した。同時に測定したH

CG、HPLには産生は認められなかった。AA添加(300 μ M)によりPRL産生は86%抑制され、抑制効果は30分で発現し、またその効果は3~30 μ M間において濃度依存性であった。

(図1)

(2)AA以外のunsaturated fatty acidである γ -linolenic acid、linoleic acidでもPRL産生は86%抑制されたが、oleic acidはいずれの濃度でも抑制効果を示さなかった。またsaturated fatty acidであるpalmitic acidも抑制効果を有しなかった。(図2)

(3)lipoxygenase inhibitorであるBW755Cは脱落膜PRL産生を変化させずAAと同時に添加した場合はAA単独と同程度の抑制がみられた。indomethacin添加でも同様の結果であった。PGE₂、PGF₂ α はPRL産生に影響しなかった。(図3)

(4)精製AAの添加により脱落膜PRL産生は84%抑制された。

(5)PMAはPRL産生に影響しなかった。

(6)Ca freeのMediumでincubationするとPRL産生はcontrolに比し97.5%抑制された。A23187(10 μ M)により150%と促進された。

(図4)

(7)PLA₂はPRL産生を90~58%抑制し、PLCでも同様に87~57%抑制した。

(8)脱落膜mRNAのtranslation分析では、AAは総蛋白合成には影響しなかった。また、総蛋白合成に対するPRLの比率は対照群0.82%でAA添加群は0.77%であり、総蛋白合成に対するPRLの比率はほぼ一定であった。

(9)AAは³H-thymidine uptakeを抑制せずcytotoxicityはなかった。

(考察)

本研究により、in vitroで脱落膜PRL産生はAAをはじめpoly unsaturated fatty acidにより抑制されることが明らかになった。

AA・ γ -linolenic acid、linoleic acidはいずれもProstaglandin系代謝物に代謝される

ことが知られており、unsaturated fatty acidの作用を検討する上ではこれらの代謝系の関与を検討する必要がある。Prostaglandin代謝物もlipoxygenaseの関与するlipoxygenase系代謝物とcyclooxygenase系代謝物に2大別されるため、それぞれに関する検討を加えた。BW755Cはlipoxygenase、cyclooxygenase両酵素を阻害する事が知られるが、この阻害剤の単独添加によっても脱落膜PRL産生は影響されず、AAと同時に添加した際にはAA単独と同程度の抑制効果を示したことから、脱落膜PRL産生抑制機序にlipoxygenase、cyclooxygenase系代謝物の関与は少ないことが示唆された。これはindomethacinによるcyclooxygenase阻害やまたPGE₂、PGF₂の添加がPRL産生に影響しなかったことから支持されよう。さらにHandwerger⁽⁹⁾やKrug⁽⁹⁾らもIndomethacin及びeicosatetraenoic acid(ETYA、lipoxygenase阻害剤)の無効性を報告している。

さて、AAは生体内では通常freeの型では存在せず、細胞膜内のリン脂質に結合して存在している。何らかの刺激が加わった際にリン脂質より遊離されるわけであるが、その経路は現在のところ2大別されている。即ち、PLA₂を介する経路とPLCを介する経路である。今回PLA₂とPLCにより脱落膜PRLの産生は著明に抑制された。PLA₂がin vitroで脱落膜PRL産生を抑制することはHandwerger¹の報告にもあるが、PLCに関しては今回の報告が初めてである。PLA₂とPLCの両酵素による脱落膜PRL産生抑制にはもちろん内因性AAの遊離が関与していると考えられるが、PLCに関してはいわゆるPhosphatidylinositol (PI) turnoverに関連した酸素であることから細胞内伝達系の関与についても若干の検討を加えた。即ち、PI turnoverとはPIがPLCによって触媒され、生成した代謝物であるDiacylglycerol(DG)がCa⁺⁺と競合しprotein kinase Cを活性化させ、またもう一つの代謝物Inositol-1,4,5-Triphosphate(IP₃)が

Ca^{++} 細胞内流入作用をもつことが明らかになったことから注目されている細胞内エネルギー経路である。⁽⁴⁾そこで、まずDGと同様にprotein kinase C活性化作用を有するPMAを添加したが、これは脱落膜PRL産生には影響しなかった。これによりprotein kinase Cの活性化は脱落膜PRL産生抑制には関与していない可能性が示唆されたわけである。AAがneutrophilにおいて直接protein kinase Cを活性化するとこの報告もあるが、⁵脱落膜PRL産生においてはAAの作用はprotein kinase Cを介していないと考えられた。

一方、 IP_3 はCa-Ionophoreと同様に Ca^{++} を細胞質内に流入させるといわれているが、Ca-Ionophoreは脱落膜PRL産生には影響しないとの報告がある。⁽⁶⁾さらに、今回の検討ではむしろCa-Ionophoreにより脱落膜PRLの産生が促進される傾向にあったことより、 IP_3 がAAの脱落膜PRL産生抑制の機序に関与している可能性は少ないといえるのではないだろうか。しかし、 Ca^{++} の動きは、多くのホルモン分泌において重要な因子であることが知られており、脱落膜PRLにおいても細胞外液中のCaがその産生に影響するとの報告がある。^(6~7)

図10からも明らかのように Ca^{++} freeでは脱落膜PRL産生は有意に抑制され Ca^{++} 2mMにより回復することから、 Ca^{++} は脱落膜PRL産生に影響する因子であると考えられる。

さらに、AAの遊離には Ca^{++} は必須と考えられている。即ち、 Ca^{++} の流入を含む一連の生化学的変化に基きAAが細胞膜より遊離されるといわれているわけである。Ca-Ionophoreは PLA_2 の活性化を促し、AAを遊離させるといわれているが、前述のように今回は脱落膜PRL産生を必ずしも抑制しなかった。このdiscrepancyについての説明は充分にはなされていないが、Ca-IonophoreがAA遊離以外の作用を介したことも推察される。また、Ca受容体阻害剤であるLanthanum、Tryfluoperazineは脱落膜PRL産生に影響しないともいわれ、⁽⁶⁾

脱落膜PRL産生においてはCaは受容体を介さずに作用している可能性もある。従って、脱落膜PRL産生に及ぼす Ca^{++} の役割についてはさらに検討を要する問題であろう。

さて、AAカスケードとホルモン分泌作用との関係については、膵、下垂体などにおいて検討されている。^(8~10)しかし、いずれの報告においても、Indomethacin、BW755CなどのAA代謝阻害剤ホルモン分泌に影響することから、AA自体の作用よりはAA代謝物の関与が示唆されている。また、下垂体においてもTRHがAAを介しPRLの分泌を促進しているとの報告もある。⁽⁶⁾従って、脱落膜においてはAAが直接PRL産生を抑制するという知見は内分泌学上極めて特色ある所見であり、さらには脱落膜と下垂体PRLの分泌調節機構における相異性を裏付ける所見といえよう。

羊水、及び脱落膜におけるPRL生理的意義については、羊水中浸透圧の調節にかかわる可能性が示唆されているにすぎず、その多くは不明である。しかし、今回脱落膜PRL分泌とAAの関連が明らかになったことはその生理的意義の追求においても興味深い知見を与えてくれる可能性がある。即ち、卵膜におけるAAの遊離はPGに代謝され、陣痛発来因子の一つを形づくっていることが知られていることから¹¹、同じ卵膜(脱落膜)におけるPRLとの関連性が推測される。また脱落膜におけるPG生成が着床に関連している可能性も示唆されており、脱落膜PRLにも何らかの関連性があるかもしれない。

最後に、AAをはじめpoly unsaturated fatty acid自体が直接脱落膜PRL産生を抑制する機序については現在のところ、全く推測の域を出ないが以下のことが考えられる。①AAは少なくともDNAのtranscriptional levelまでは影響しないことが示唆されたが、それ以後の蛋白合成経路に影響することも考えられる。②unsaturated fatty acidによる細胞膜の流動性の変化が、細胞膜透過性の変化、細胞膜表面

の各種受容体の変化、更には受容体を介しておこる細胞外からの情報伝達機構における変化などを惹起し作用している可能性などである。

- (1) 武谷雄二、水野正彦 : 脱落膜変化をおこした子宮内膜におけるプロラクチンの産生と放出; 臨床婦人科産科、:38, 535~540、1984
- (2) Handwerger S., Barry S., Barret J., Markoff E., Zeitler P., Cwikel B., Siegel M.; Inhibition of the Synthesis and secretion of decidual prolactin by arachidonic acid. *Endocrinology* 109, 2016, 1981,
- (3) E. C. Krug, A. D. Rogol, W. D Jarvis, S. Thiagarajah and C. A. Singhas.; Prolactin secretion by human chorion-decidua in vitro Influence of mode of delivery and agents that modify prostaglandin Synthesis *Am. J. Obstet. Gynecol* 147.38.1983
- (4) Yasutoni Nischizuka; The role of protein kinase C in Cell surface signal transduction and tumor promotion, *Nature* 308.693.1984
- (5) Linda C, Mcphail, Christine C. Clayton Ralph Synderman A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: Activation of Ca^{++} -dependent protein kinase *Science* 224.622.1984
- (6) Markoff, E. Bany, S and Handwerger S; Influence of Osmolality and ionic

environment on the secretion of prolactin by human decidua in vitro. *J. Endocrinol* 92.103.1982

- (7) Stephen R. Richards. Moon. H. Kim William B Mararkey: Evidence that chorion-decidua Prolactin release is calcium dependent *J. clin. Endocrinol. Metab* 54.820.1982
- (8) Jean-Louis. Charli, Beatriz gavat Gongalo Martinez-Escaleve georgina Ponce. Juan Miranda. Pamicia Joseph-Baruo. *Metabolism of thyrotropin releasing hormone and its possible relevance to Prolactin secretion Prolactin secretion : A multidisciplinary Approach academic press* 1984.
- (9) 小池浩司 青野敏博 谷沢 修 安元 健 Robert M Macleod: TRH刺激によるプロラクチン分泌—細胞内伝達機構とカルシウムおよびアラキドン酸カスケードの関与—*ホルモンと臨床* 33.843.1985.
- (10) A. Ottlecz W. K. Samson and S. M Mccann. A possible role of prostacyclin to simulate Prolactin and Growth hormone Release by Hypothalamic and Pituitary Actions, Respectively, *Endocrinology* 114.359.1984.
- (11) Okita J R. Johuson J M. Mac Donald P G. Source of prostaglandin precursor in human fetal membranes : Arachidonic acid content of amnion and chorion leave in diamniotic-dichorionic twin placentas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147.477.1983.

Effect of Concentrations of Arachidonic Acid on the Inhibition of Prolactin Synthesis in Decidual Tissue.

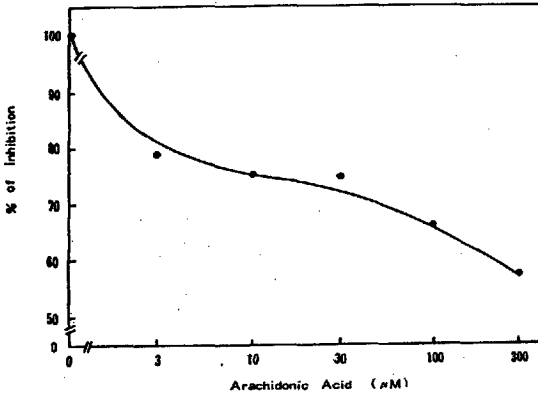


图 1

effect of PGE₂ and PGF_{2α} on the synthesis of PRL in decidual tissue

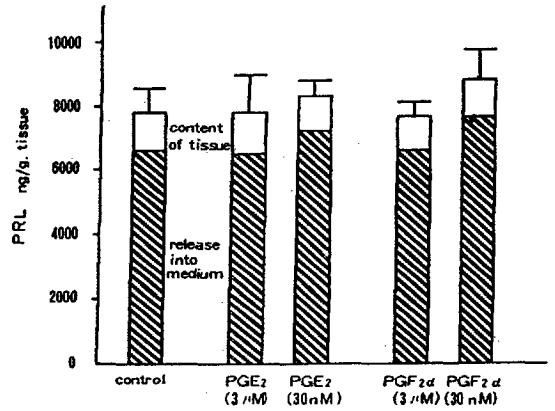


图 3

Effect of Various Fatty Acids on the Synthesis of PRL in Human Decidual Tissue

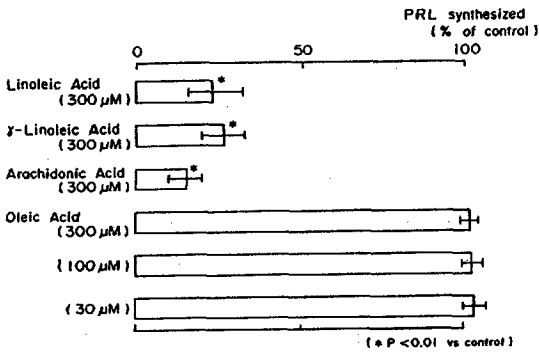


图 2

Effect of Ca²⁺-Ionophore and Ca²⁺ ion on the Synthesis of PRL in Human Decidual Tissue

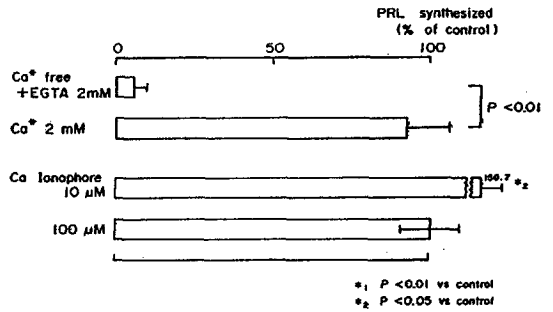


图 4



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



(はじめに)

下垂前前葉に由来するホルモンである prolactin(以下 PRL)はヒト脱落膜組織でも産生され主に羊水中に移行し、胎児の発育分化、陣痛発来現象などと深い関連を有することが推定されている¹。脱落膜 PRL は母体血への流入はわずかであり主に局所で産生されその近傍で作用するといういわば local hormone"であろうと考えられている。それ故その産生分泌機構は当然下垂体のそれとは異なり、estrogen や thyroid stimulating hormone releasing hormone(TRH)などで分泌刺激はおこらず、また下垂体 PRL の生理的分泌抑制物質である dopamine にても分泌抑制を受けない。現在の所、脱落膜 PRL の分泌調節因子は不明である。

prostaglandin の precursor である arachidonic acid(以下 AA)は羊水中や卵膜組織に多量に存在し、種々の組織や細胞系において機構分化に影響を及ぼすという報告が相次いでいる。それ故、今回脱落膜組織における PRL の産生分泌に AA が関与するか否かを検討した。