

胎盤 Corticotropin Releasing Factor (CRF)

発現動態に関する分子生物学的研究

神戸大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 望月真人教授)

北川 勝 大谷 徹郎 望月 真人

Molecular Biological Studies on Expression of
Placental CRF Gene and its Product

Masaru KITAGAWA, Tetsuo OTANI and Matsuto MOCHIZUKI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University School of Medicine, Kobe**(Director : Prof. Matsuto Mochizuki)*

概要 最近注目をあびている胎盤における CRF 産生について, Northern blot 並びに in situ hybridization を用いてその mRNA の発現動態並びに産生部位を検討し, また CRF, ACTH, cortisol の血中動態を妊娠週数および分娩様式との比較において検討した。

その結果, CRF mRNA の産生は妊娠週数の進行とともに増加することが明らかとなった。また in situ hybridization により, CRF mRNA は syncytiotrophoblast に局在することが判明した。

さらに, 母体血中・胎児血中の CRF, ACTH, cortisol 値を測定したところ, これらのいずれもが妊娠週数とともに増加し, 特に妊娠末期において急増した。また, 自然分娩例・予定帝王切開例の比較では, cortisol 値は自然分娩例で高値であつたのに対し, CRF 値は逆に帝王切開例において高値であつた。さらに, DHAS 濃度は母体側に比し胎児側において有意に高く, CRF-ACTH 系は胎児副腎での DHAS 産生を促進していることがうかがわれた。

今回の研究により, CRF の産生部位を mRNA の転写レベルで明らかにすることができ, またその生物学的意義は, 母児の分娩への準備, さらには分娩発来への関与等にある可能性が示唆された。

Synopsis Corticotropin releasing factor, a neuropeptide secreted by the hypothalamus, was recently found to be also secreted by the placenta. However, the biological role of placental CRF is obscure. In this study, we performed Northern blots and in situ hybridizations to determine the time course and site of placental CRF production. Then we measured maternal and fetal CRF, ACTH, cortisol and DHAS levels during the course of pregnancy.

The results of these studies indicated that placental CRF mRNA is 1.5kb in size and its expression increases dramatically near term. It was shown that placental CRF is transcribed in the cytotrophoblast layer. Both maternal and fetal CRF, ACTH and cortisol increased near term. The DHAS level was significantly higher on the fetal side than in the maternal plasma. It was assumed that on the maternal side, placental CRF activates the basal level of the pituitary-adrenal axis to produce more corticosteroids. The increased corticosteroids may compete with progesterone receptors and cause the removal of a progesterone block of uterine muscle contraction. On the fetal side, placental CRF activates the pituitary-adrenal axis to produce corticosteroids and DHAS. The increased corticosteroids may again compete with progesterone receptors. The increased DHAS directly affects the uterine cervix to cause ripening of it.

Key words: Corticotropin releasing factor • DHAS • Placenta • Gene expression

緒 言

CRF は視床下部の nucleus paraventricularis において合成される neuropeptide であり, 視床下部・下垂体・副腎系を活性化させ, cortisol の分泌に作用していると考えられている。またその分泌調節は acetylcholine や serotonin により分泌が

促進され, noradrenalin, dopamin や GABA により抑制される。また vasopressin は変化した CRF とも考えられ ACTH の分泌を亢進させ, また, negative feedback 機構も存在する。ところで, 近年本物質が胎盤にも存在することが報告され²⁾³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾, さらにその分子量および一次構造が視

床下部由来の CRF と同等であることが判明し、現在胎盤 CRF の fetomaternal unit における役割が注目をあびている⁵⁾⁹⁾。そこで我々は、まず本物質の胎盤絨毛における mRNA の発現を確認し、さらに in situ hybridization を用いて胎盤における CRF mRNA の産生部位を組織学的に同定した。また本物質が fetomaternal unit において果たしている機能の一端を明らかにする目的で、母体ならびに胎児血中 CRF の推移を ACTH・cortisol・DHAS との比較において検討を加えた。

研究方法

1. 血液採取

午前 9 時～12 時の間に informed consent の得られた妊婦の cubital vein より採血した。また、分娩直後に臍帯動・静脈血を採取した。分娩時の採血については分娩直前に、帝王切開例においては術前薬投与前に採血した。採取した血液はただちに血漿に分離し、 -20°C で凍結保存した。

2. radioimmuno assay

CRF (Suda et al. の方法¹⁷⁾)、ACTH (DPC ACTH kit, Diagnostic Products Corporation, CA, U.S.A.), cortisol (SPAC-S cortisol kit, Daiichi Radioisotope Laboratory, Tokyo, Japan), DHAS (DHAS test set, Wien Laboratories) をそれぞれの RIA にて同時系統的に測定した。

3. Northern blot

1) RNA の抽出

妊娠初期・中期・末期の胎盤組織から Chirgwin et al.⁶⁾ の guanidine thiocyanate 法により RNA を得た。

2) Northern blotting

RNA $20\mu\text{g}$ を formaldehyde gel 上にて電気泳動し、nitrocellulose filter に転写した。

3) pre-hybridization

RNA を吸着した filter を 50% formamide, $6\times$ SSC, 40mM phosphate buffer pH 7.0, $1\times$ Denhardt's solution, 0.1% SDS, 1mM EDTA を含む pre-hybridization buffer 中にて、 42°C 12 時間留置した。

4) hybridization

$[^{32}\text{P}]$ にて標識した CRF cDNA probe を用いて、 42°C , 24 時間 hybridization を行い、その後 filter を $1\times$ SSC, 0.1% SDS 中にて洗浄後、 -70°C にて autoradiogram を施行した。

4. in situ hybridization

絨毛組織の凍結切片を作成し、paraformamide にて固定した。この切片上に $[^{35}\text{S}]$ で標識した CRF probe を含んだ hybridization buffer (50% formamide, 0.3M NaCl, 10mM Tris Cl pH 8, 1mM EDTA, $1\times$ Denhardt's solution, $500\mu\text{g}/\text{ml}$ yeast tRNA, $500\mu\text{g}/\text{ml}$ poly A, 50mM DTT, 10% polyethylene glycol) をのせ 52°C にて 3 時間 incubate した。その後これらの切片を $2\times$ SSC 中で洗浄し、ethanol で脱水した後、autoradiography を行つた。

研究成績

1. CRF mRNA の胎盤絨毛組織における発現

妊娠初期、中期、末期の胎盤より得られた RNA を用い、CRF cDNA をプローブとして Northern blot を施行したところ、妊娠 11 週の絨毛由来の RNA においてすでに約 1.5kb の大きさの CRF mRNA の発現を認め、妊娠の進行に伴って増加し 40 週では densitometry 上 11 週の値の約 30 倍となることが判明した (図 1)。また妊娠末期胎盤組織切片上での CRF cDNA プローブを用いた in situ hybridization では、CRF mRNA の存在を示す silver grain は trophoblast cell layer のみに局在することが認められた (図 2)。さらに妊娠初期絨毛では CRF mRNA はそのほとんどが syncytiotrophoblast において産生されていることが判明した (図 3)。

2. 母体ならびに臍帯血中における CRF, ACTH, cortisol 値の推移

母体ならびに胎児血中 CRF を妊娠週数の推移との関連において検討したところ、母体血中 CRF は妊娠初期には極微量 ($10.70\pm 2.76\text{fmol}/\text{ml}$) しか認められなかつたものの、妊娠週数の経過とともに次第に増量し、特に妊娠末期には顕著な増加を示し $351.75\pm 46.2\text{fmol}/\text{ml}$ のレベルに達した。しかしながら分娩の終了とともに 24 時間後には正

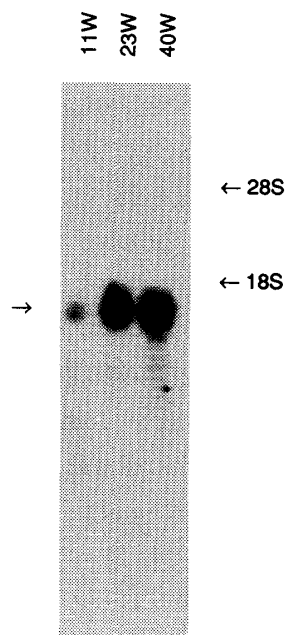


図1 妊娠11週・23週・40週の絨毛組織由来 RNA を用いた CRF 特異的プローブによる Northern blot hybridization

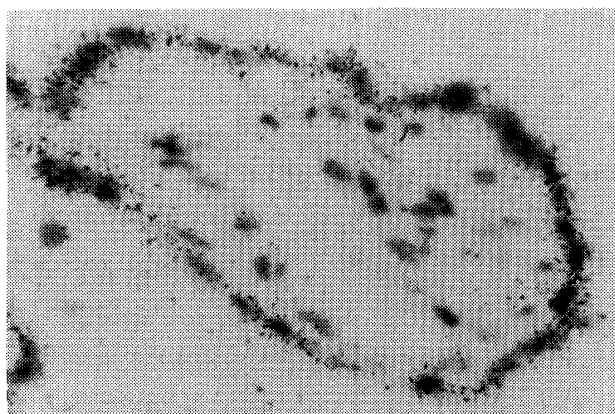


図2 妊娠末期の絨毛組織における CRF 特異的プローブによる in situ hybridization

常非妊時レベルに低下した。胎児血中の CRF は母体血中ほどではないものの、妊娠初・中期 ($3.76 \pm 1.32 \text{ fmol/ml}$) に比しやはり妊娠末期 ($7.78 \pm 1.50 \text{ fmol/ml}$) に向かつて増加の傾向を示した (図4)。

母体血中 ACTH 値は、妊娠初・中期では $5.49 \pm 1.29 \text{ pg/ml}$ であったのに対し、妊娠末期では $17.62 \pm 2.06 \text{ pg/ml}$ と増加傾向を示し、胎児血中 ACTH 値も妊娠初・中期では $3.74 \pm 1.09 \text{ pg/ml}$ 、妊娠末期には $20.56 \pm 3.07 \text{ pg/ml}$ と同様の傾向が

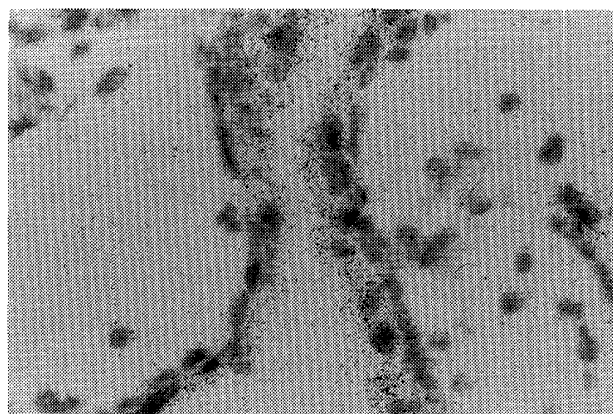


図3 妊娠初期の絨毛組織における CRF 特異的プローブによる in situ hybridization

認められた (図5)。母体血中 cortisol 値は、妊娠初・中期には $18.08 \pm 2.19 \mu\text{g/dl}$ であったものが、妊娠末期には $41.15 \pm 7.38 \mu\text{g/dl}$ と増加した。胎児血においても妊娠初・中期 ($5.30 \pm 1.52 \mu\text{g/dl}$) に比し、妊娠末期 ($12.68 \pm 1.80 \mu\text{g/dl}$) に上昇する傾向がみられた (図6)。

3. 臍帯動・静脈間における CRF の濃度差

臍帯動・静脈血における CRF の濃度差について比較検討したところ、有意差は認められなかったものの、臍帯静脈における CRF 値 ($7.84 \pm 2.32 \text{ fmol/ml}$) は臍帯動脈中 ($6.89 \pm 1.93 \text{ fmol/ml}$) よりやや高値をとる傾向にあった (図7)。

4. 分娩様式と CRF, ACTH, cortisol 値の相関

分娩様式と母体血中 CRF, ACTH, cortisol 値の相関に関する検討においては、cortisol は自然分娩例 ($58.15 \pm 2.98 \text{ mg/dl}$) で帝王切開例 ($27.14 \pm 7.12 \text{ mg/dl}$) に比し有意に高値をとったのに対し、ACTH (自然分娩例 $13.61 \pm 1.71 \text{ pg/ml}$ 、帝王切開例 $11.51 \pm 1.81 \text{ pg/ml}$) には有意差を認めず、CRF は逆に自然分娩例 ($351.75 \pm 46.66 \text{ fmol/ml}$) に比し帝王切開例 ($577.99 \pm 92.83 \text{ fmol/ml}$) の方が高値をとることが認められた (図8)。

5. 母体血中ならびに胎児血中 DHAS 濃度の検討

胎児血中の DHAS 濃度 ($1,798.0 \pm 212.0 \text{ ng/ml}$) は母体血中のそれ ($937.2 \pm 177.7 \text{ ng/ml}$) に比し、有意に多量であった (図9)。

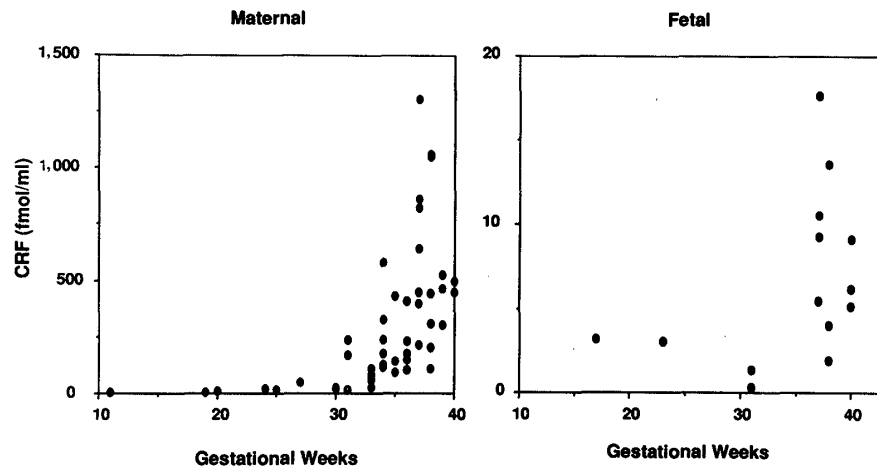


図4 妊娠週数の推移による母体および胎児血中 CRF 値の変化

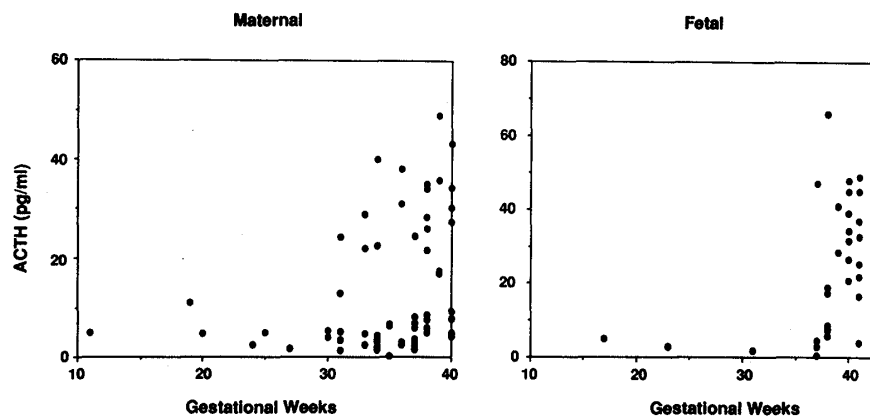


図5 妊娠週数の推移による母体および胎児血中 ACTH 値の変化

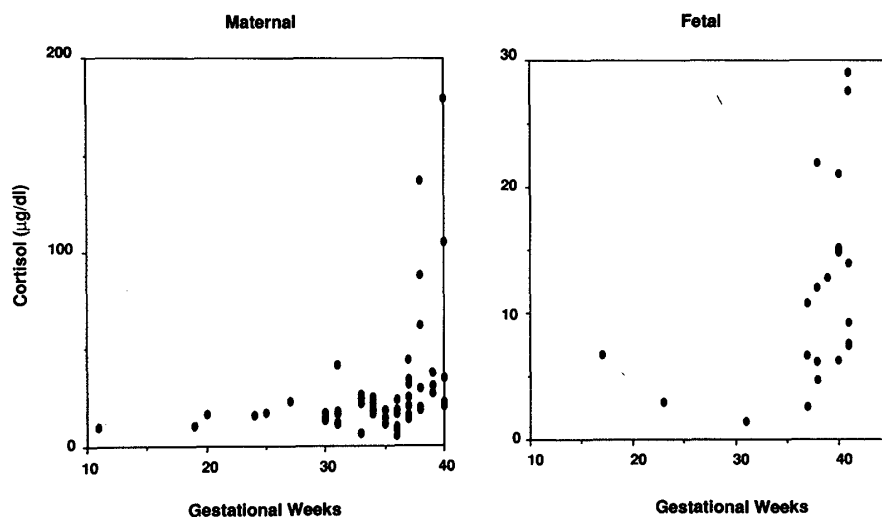


図6 妊娠週数の推移による母体および胎児血中 cortisol 値の変化

考 案

胎盤絨毛組織で CRF が産生されていることが最近報告されており、また in vitro 培養系におい

ては cytotrophoblast で CRF の産生分泌が確認されている¹¹⁾。我々はまず胎盤で CRF 遺伝子が発現していることを確認する目的で、胎盤より得

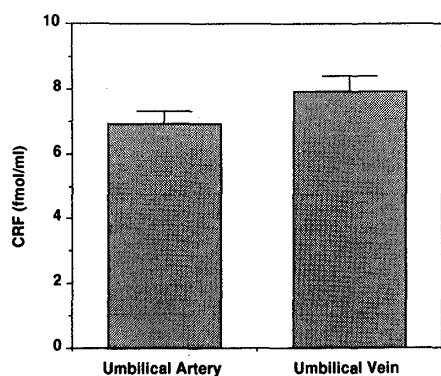


図7 自然分娩例における臍帯動・静脈血中のCRF値

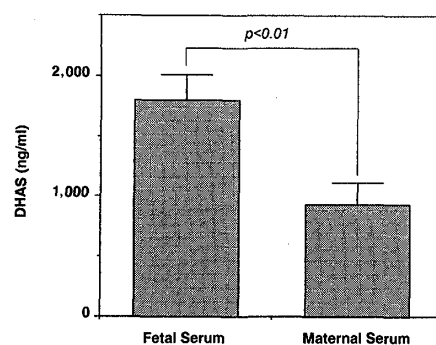


図9 自然分娩例における母体および胎児血中DHAS値

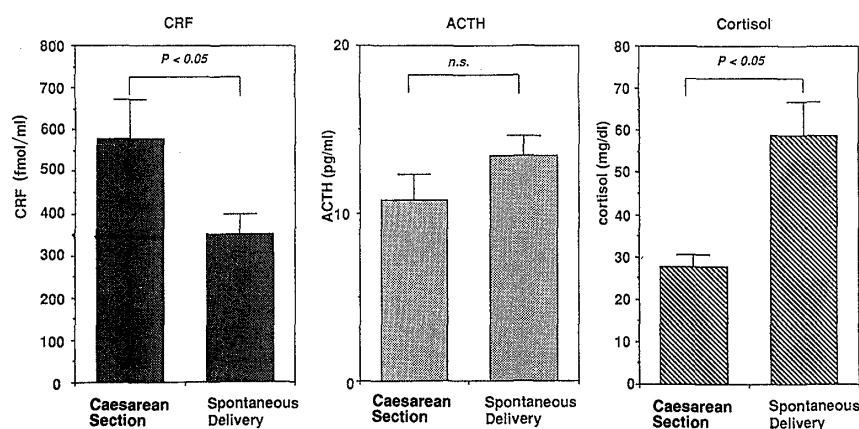


図8 選択的帝王切開例と自然分娩例における母体血中CRF, ACTH, cortisol値の比較

られたRNAを用いてCRF cDNAをプローブとしたNorthern blotを施行したところ約1.5kbの大きさのCRF mRNAの発現を認めた。このCRF mRNAの発現量は妊娠の進行とともに漸増し、末期において急激に増加することが認められた。この結果はMajzoub et al.の報告⁷⁾に一致しており我々の実験系においてCRF mRNAをspecificに検出していることが証明された。さらに胎盤におけるCRFの産生部位を確定せんとしてin situ hybridizationを用いてCRF mRNAの発現部位を検討したところ、妊娠末期絨毛においてその発現はtrophoblast layerに局在することが判明した。妊娠末期絨毛はそのほとんどがsyncytiotrophoblastからなっており組織学的にcytotrophoblastを同定することは不可能である。CRFがtrophoblastを構成するいずれの細胞

で産生されているのかを検討するために、妊娠初期絨毛を用いて同様にin situ hybridizationを行ったところ、CRF mRNAの発現はsyncytiotrophoblast layerに局在することが判明した。すでに述べたようにin vitroにおけるcytotrophoblast培養系においてもCRFが産生されていることが報告されているが、cytotrophoblastは培養開始24時間後を境にして形態的にsyncytiotrophoblast類似細胞へと変形していくとされている¹⁴⁾。したがって、cytotrophoblast培養系において産生されるCRFは実際にはこのsyncytiotrophoblastにおいて合成されている可能性が強い。我々が示したsyncytiotrophoblastにおけるCRF mRNAの発現の局在は、実際の胎盤におけるCRF mRNAの発現部位を確認したものとして画期的な結果であるといえよう。

胎盤より産生される CRF が母体循環に大量に分泌されていることは明らかであるが、その生物活性、また生理学的意義についてはまだよく判っていない。そこで我々は妊娠週数における経時的な測定を行い、妊娠初期母体血中にはほとんど存在しない CRF が妊娠の継続とともに急増し、特に妊娠末期母体血中に大量に存在することになること、またその後妊娠の終了とともに急激に減少し分娩24時間後には正常非妊時のレベルに戻ることを確認した。このことは妊娠末期母体血中に高値に認められる CRF が胎盤由来であることを傍証するものである。さらに ACTH, cortisol においても妊娠の継続とともに同様の傾向が認められることを確認した。妊婦におけるデキサメサゾン抑制試験が不完全であること¹³⁾、さらには ACTH 値の cortisol による抑制も不完全であること⁸⁾も報告されているので、胎盤より産生・分泌される大量の CRF は ACTH, cortisol 系を活性化している可能性が強い。

ところで、分娩様式の相異（自然分娩・予定帝王切開）による CRF, ACTH, cortisol の母体血中値の差異の検討では、CRF 分泌動態と cortisol 値とは相応せず、cortisol は自然分娩例で帝王切開例に比し有意に高値をとつたのに対し、CRF は帝王切開例に比し自然分娩例においてむしろ低値を示した。したがって妊娠末期に上昇する CRF は分娩という急峻なストレスに対して直接的には相応せず、cortisol の基礎値を上昇させることにより indirect なかたちで分娩の準備状態を作り上げる方向に働いている可能性が示唆される。臍帯静脈血中の CRF 値も胎盤での産生・分泌が増大する妊娠末期に急増する傾向が認められ、また有意差はなかつたものの臍帯静脈において CRF 値が臍帯動脈より高い傾向を認めたことは、母体循環と同様に胎児循環にも胎盤 CRF が流入している可能性を強く示唆するものである。また胎児 ACTH, cortisol 値も妊娠末期に急増するが、ACTH は胎盤を通過しないとされていることから、胎児 ACTH 値の上昇は臍帯静脈血中に分泌された CRF が胎児の下垂体に作用し分泌を増大させたものと考えられる。さらに、胎児副腎皮質

は妊娠中期まではそのほとんどが胎児層で占められており、末期以後の成人層の発育に伴って cortisol の産生能を有するようになる。臍帯静脈 cortisol が妊娠末期以降に急増していることは、胎児副腎皮質成人層の発育ならびに血中 CRF, ACTH の増加に促されたものであると考えられよう。こうして増大した cortisol は胎児臓器成熟を促すとともに、肝のグリコーゲン貯蔵や脂肪の合成など分娩時の過大なるストレスに対する準備状態を形成する作用を示すものと考えられる。

ところで、羊においては胎仔において妊娠末期に向かつて視床下部一下垂体一副腎系を主とした CRF-ACTH axis が活性化され、産生された cortisol が prostaglandin の産生亢進等の系を介して分娩の発来に関与しているとされている¹⁰⁾。一方、ヒトにおいては妊娠末期において CRF-ACTH axis の主役を占めるのは胎盤由来の CRF と考えられる。この CRF が羊におけると同様に分娩の発来に関与している可能性、すなわち CRF の作用によつて増加した cortisol が胎盤その他における prostaglandin の産生を促し、さらには progesteron と receptor レベルで拮抗して子宮収縮に対する progesteron block を解除し分娩の発来を誘導している可能性が考えられる。また分娩末期には胎児副腎は多量の DHAS を産生するようになるが、ここにも胎盤 CRF の関与している可能性が考えられる。今回のデータでも胎児血中 DHAS は母体血中より有意に高く、胎児において DHAS 産生の亢進していることは明らかである。DHAS は胎児肝で 16α -DHAS となり、さらに胎盤において Estriol と変化し妊娠末期における重要なエストロゲンとなることは周知のとおりである。DHAS の産生は ACTH によつてコントロールされており、したがって胎盤 CRF もこの ACTH を介して DHAS の産生増加に働いている可能性が考えられる。増加した DHAS はエストロゲンに変換される前にも、我々が以前に報告したように、直接子宮頸管に働き子宮頸管の軟化ならびに熟化に作用している¹²⁾。胎児由来の DHAS が代謝を受けずに直接子宮頸管に到達することは矢内原が重水素標識 DHAS を用いて示

しており⁴⁾、また子宮頸管に DHAS receptor が存在することや DHAS がコラゲナーゼの活性化を促すことなどは平川らにより報告されている¹⁾。

これらの事実を統合して勘案すると、胎盤 CRF は ACTH-corticosteroid 系を介して分娩のストレスに対する準備状態を作るだけでなく、分娩の発来機転に大きな役割を果たしている可能性が強く示唆される。

なお本研究の一部は文部省科学研究費、課題番号 03670785 によった。

文 献

1. 平川 舜, 油田啓一, 伊東 晃: 妊娠家兎子宮頸部の dehydroepiandrosteron sulfate (DHAS) 結合蛋白. 日産婦誌, 35: 1351, 1983.
2. 佐々木厚, 吉永 馨, Krieger, D.T.: Characterization of human placental corticotropin-releasing factor (CRF). 日内分泌誌, 61: 302, 1985.
3. 臼井 健, 中井義勝, 深田順一, 高橋英雄, 辻井 悟, 井村裕夫, 沼 正作, 矢内原昇: ヒト胎盤及び各組織, 腫瘍における CRF mRNA の存在について. 日内分泌誌, 62: 948, 1986.
4. 矢内原巧: 分娩発来時期の胎児・胎盤・母体系ホルモンの動態. 日産婦誌, 34: 1138, 1982.
5. Campbell, E.A., Linton, E.A., Wolfe, C.D.A., Scraggs, P.R., Jones, M.T. and Lowry, P.J.: Plasma corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 1054, 1987.
6. Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Macdonald, R.J. and Rutter, W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry, 18: 5294, 1979.
7. Frim, D.M., Emanuel, R.L., Robinson, B.G., Smas, C.M., Adler, G.K. and Majzoub, J.A.: Characterization and gestational regulation of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in human placenta. J. Clin. Invest., 82: 287, 1988.
8. Genazzani, A.R., Fraioli, F., Hurlimann, J., Fioretti, P. and Felber, J.P.: Immunoreactive ACTH and cortisol plasma levels during pregnancy. Detection and partial purification of corticotropin-like placental hormone. Clin. Endocrinol. (Oxf.), 4: 1, 1975.
9. Goland, R.S., Wardlaw, S.L., Stark, R.I., Brown, L.S. and Frantz, A.G.: High levels of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 63: 1199, 1986.
10. Challis, J.R.G., and Brooks, A.N.: Maturation and activation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in fetal sheep. Endocrine Reviews, 10: 182, 1989.
11. Liotta, A.S., Osathanandh, R., Ryan, J. and Krieger, D.T.: Presence of corticotropin in human plasma; demonstration of *in vitro* synthesis. Endocrinology, 101: 1552, 1977.
12. Mochizuki, M. and Tojo, S.: Effect of dehydroepiandrosterone sulfate on softening and dilatation of the uterine cervix in pregnant women. Dilatation of the Uterine Cervix (ed. F. Naftorin), 267. Raven Press, New York, 1980.
13. Noltén, W.E., Lindheimer, M.D., Oparil, S. and Ehrlich, E.N.: Deoxycorticosterone in normal pregnancy. Sequential studies of the secretory patterns of deoxycorticosterone, aldosterone and cortisol. Am. J. Obstet. Gynecol., 132: 419, 1978.
14. Robinson, B.G., Emanuel, R.L., Frim, D.M. and Majzoub, J.A.: Glucocorticoid stimulates expression of corticotropin-releasing hormone gene in human placenta. Medical Sciences, 85: 5244, 1988.
15. Sasaki, A., Liotta, A.S., Luckey, M.M., Margioris, A.N., Suda, T. and Krieger, D.T.: Immunoreactive corticotropin-releasing factor is present in human maternal plasma during the third trimester of pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 59: 812, 1984.
16. Shibasaki, T., Odagiri, E., Shizumi, K. and Ling, N.: Corticotropin-releasing factor-like activity in human placental extracts. J. Clin. Endocrinol. Metab., 55: 384, 1982.
17. Suda, T., Tomori, N., Tozawa, F., Mouri, T., Demura, H. and Shizumi, K.: Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. J. Clin. Endocrinol. Metab., 59: 861, 1984.

(No. 7196 平4・3・13受付)