

オキシトシン研究の進歩

大阪大学医学部産科婦人科学教室
教授 谷 澤 修

Advances in the Research of Oxytocin and Its Receptor

Osamu TANIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Medical School, Osaka

緒 言

下垂体後葉に含まれる物質が強い子宮収縮能をもつことは、1906年 Dale¹⁾がはじめて発表し、その後1954年 du Vigneaud et al. のグループは下垂体後葉のペプチドホルモンを精力的に解析し、オキシトシンならびにバソプレッシンという二つのホルモンの構造を決定し、化学合成に成功した²⁾。これ以降、オキシトシンは陣痛誘発、促進剤として、予定日超過、微弱陣痛、遷延分娩の管理に日々使用されている。オキシトシンは主に視床下部の室傍核、視索上核でニューロフィジンと共に生合成され、下垂体後葉へ軸索内を輸送され、下垂体門脈系を介して体循環に放出される。そして子宮平滑筋を収縮させて陣痛を起こし、また乳腺筋上皮細胞に作用して射乳を起こす。一方、膣や子宮頸管の開大 (Ferguson 反射)、乳頭の触覚刺激といった求心性刺激がオキシトシンの産生、分泌を促進する(図1)。これらがオキシトシンに関する一般的かつ古典的な理解かと考えるが、その作用や、特に分娩との関係について、不明な点もまだ多数存在する。そこでオキシトシンに関する研究の進歩を産科の最大の問題の一つである陣痛発来機序に関する点を中心に述べてみたい。

1. オキシトシン血中濃度と分娩

オキシトシンは体循環を流れるホルモンなので、その血中濃度が上昇して陣痛が発来する、と考えるのは極めて自然である。我々はオキシトシンの血中濃度測定のためにラジオイムノアッセイ (RIA) 系の作成を試みた。抗原の分子量が小さいため、BSA と結合し、家兎に脾内注射法にて免疫

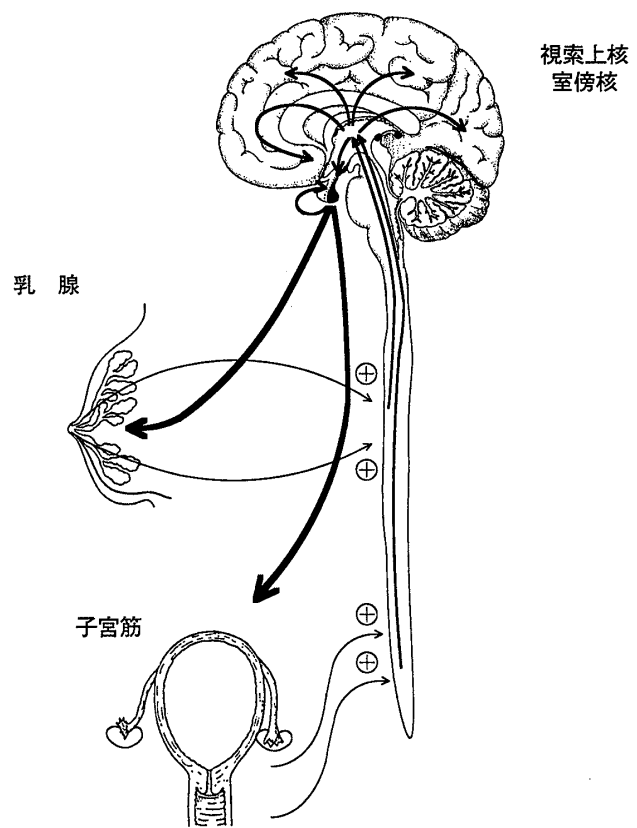
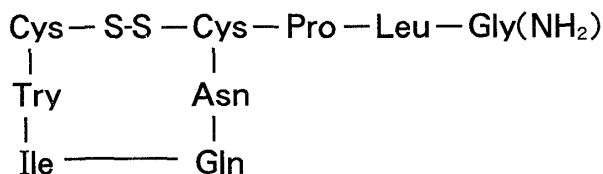


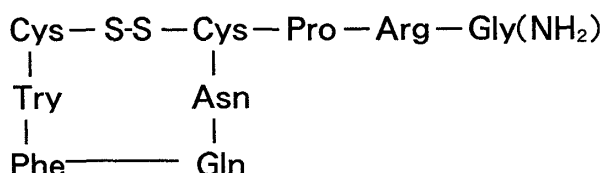
図 1

することにより得た抗体で、二つのアミノ酸の差しかない Arg⁸-バソプレッシン、Lys⁸-バソプレッシンと交叉率が低く、かつ2 μ U/mlの感度をもつRIA系を確立した³⁾(図2)。これを用いて、妊婦血中のオキシトシン濃度を測定すると、妊娠後期となるに従い血中濃度は上昇し、またスパイク状分泌が観察され、その高さは妊娠後期に高くなっていた。しかし自然陣痛発来例と未発来例を比べても、その血中濃度間に有意差は認められず、ス

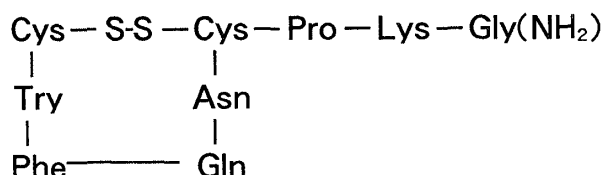
オキシトシン (oxytocin)



アルギニン バソプレッシン (AVP)



リジン バソプレッシン (LVP)



下垂体後葉ホルモン

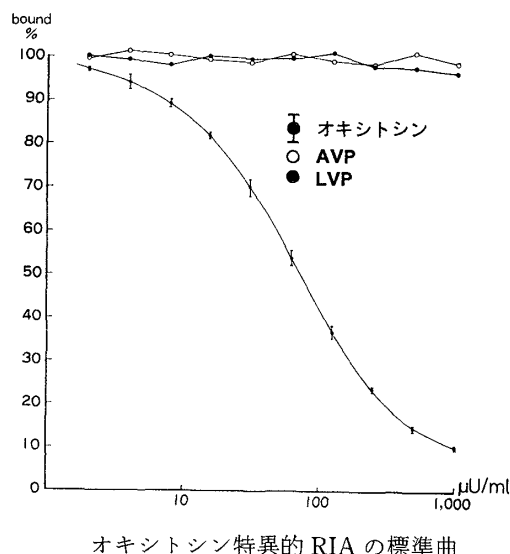


図 2

パイクと陣痛の個々の子宮収縮の間にも相関は見出せなかった⁴⁾。また一時胎児由来オキシトシンと分娩の関連が話題となったが⁵⁾、我々は無脳児症例で臍帯動脈血中のオキシトシン濃度が感度以下であることを示し⁶⁾、無脳児でも遅れるが自然陣痛は発来するので胎児性オキシトシンの関与も否定的と考えられた。したがって血中濃度の測定からはオキシトシンの分娩に係る役割を明らかにし得なかった。

2. オキシトシン受容体と分娩

我々が産科臨床で誘発分娩にオキシトシンを使用する際、その有効投与量の個人差にはいつも驚かされる。オキシトシンの臨床上の投与は点滴にて1mIU/分よりはじめ、最大量20mIU/分とされている。誘発時にこの最大投与量でも何の変化もない人もいれば、1mIU/分でも十分な有効陣痛を得ることもある。また、昨日全く反応しなかった妊婦が一日たつとうって変わってよく反応することもしばしば経験する。オキシトシンの体内での代謝はさほど大きな個人差はないので⁷⁾、この子宮のオキシトシン感受性の差は子宮筋のオキシト

シン受容体の差に依存するという考え方が出てきた。事実、Soloff et al. は³H-オキシトシンを用いたラット子宮筋細胞膜分画との結合実験からその特異的結合部位数は陣痛発来日直前から急激に増加していることを示した⁸⁾。これ以降同様の知見がヒト、マウス、ウシ、ヒツジ等さまざまな動物で得られた。そこで我々は、この増加した結合部位が本当に細胞内に情報を伝達する受容体であるかどうかを細胞内 Ca^{++} ($[\text{Ca}^{++}]_i$) の変動を通して調べてみた。分娩時ヒト子宮筋を培養し、カルシウム依存性蛍光色素をとりこませてオキシトシンを作用させると速やかに $[\text{Ca}^{++}]_i$ が上昇し、数分のうちに元のレベルに戻ることをコンピュータを用いた画像解析により認められた。この $[\text{Ca}^{++}]_i$ の変動量はオキシトシン濃度に依存し、かつ細胞外カルシウムを除いても $[\text{Ca}^{++}]_i$ の上昇は観察できた。したがって、分娩時子宮筋に増加するオキシトシン結合部位は確かに情報伝達能をもつ受容体であり、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ の上昇は細胞外よりのカルシウムチャンネルを介した Ca^{++} の流入と細胞内貯蔵部位からの放出の二つの経路に依存しているこ

とを明らかにした⁹⁾¹⁰⁾。

続いて細胞レベルで解析したオキシトシン受容体を今度は分子レベルで解析しようと考えた。今日では、すべての蛋白質はDNAという大元の設計図からメッセンジャーRNA(mRNA)に核内で転写され、それが細胞質に出ていき翻訳してつくられると考えられている。オキシトシン受容体も蛋白質なので、それが増えているときは、そのコピー設計図であるmRNAも増えている可能性が大である。そこで我々はアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、オキシトシン受容体mRNAの評価を試みた。アフリカツメガエル卵母細胞は、発生のためにリボゾームを大量に準備しており、外からmRNAを注入すると、それを効率よく翻訳し、蛋白質を合成する。しかも出来上がった蛋白が分泌蛋白なら卵母細胞から分泌され¹¹⁾、受容体のような膜蛋白は膜上に配列することが知られている。そこで、非妊娠、妊娠13週及び満期産分娩時の各子宮筋手術標本よりmRNAを抽出、精製して、アフリカツメガエル卵母細胞に微量注入した。オキシトシン受容体の検出は、卵母細胞の膜電位を固定し、オキシトシンを灌流すると受容体と結合して細胞内カルシウムが先の子宮筋と同様上昇し、カルシウム依存性塩素イオン(Cl⁻)チャンネルが開いて膜電流が流れる、という現象を利用して電気生理学的に行った。コントロールとして純水を注入した卵はオキシトシンに対して何の反応も示さないが、満期産分娩時の子宮筋由来のmRNAを注入すると、特徴ある内向きの膜電流パターンが観察された。またその電流の大きさは卵母細胞が合成したオキシトシン受容体の量、ひいては、それをコードするmRNAの量に依存すると考えられる。各サンプルを微量注入した卵母細胞で膜電流の大きさを比較すると、満期産分娩時の子宮筋由来mRNAを微量注入した卵母細胞で観察されたものが圧倒的に大きかった¹²⁾。これらの事実は、満期産分娩時に大量のmRNAがDNAから転写され、それが翻訳されて子宮筋のオキシトシン受容体数が増え、子宮のオキシトシン感受性を増やすことを示していると考えられた。

3. オキシトシン受容体の構造と発現

このように細胞レベルでのオキシトシン受容体の[Ca⁺⁺]_i変化を用いた解析ならびに分子レベルでのmRNA量の増減の評価ができると、更に細かく受容体の構造や発現を検討するために、オキシトシン受容体のクローニングが必要となった。分子生物学的手法の発展に伴いさまざまな分子がクローニングされてきたが、その原則はできるだけ多くの求める分子をコードするmRNAを含む組織や細胞からmRNAを精製し、それを逆転写酵素を使ってcDNAとし、ベクターに組み込んで大腸菌で増やしてcDNAライブラリーをつくりそのライブラリーを順次スクリーニングして特定のクローンを選択する、というものである。幸い、分娩時子宮筋のmRNAには、オキシトシン受容体をコードするものが大量に存在することがわかったので、それを元にcDNAライブラリーを作成した。これを小分けして、各々のプールより試験管内転写(In vitro transcription)法を用いて翻訳活性のある合成mRNAをつくり、アフリカツメガエル卵母細胞に注入した。そして、卵母細胞内で、蛋白を合成させ、電気生理学的にオキシトシン受容体を検出した。最初に調べた10万クローン、16プールの中でただ一つ陽性プールがあったので、これを更に小分けしていくことにより最終的に単一のクローンpOTRを得た(図3)。オキシトシン受容体をコードするpOTRのcDNA部分の塩基配列を常法に従って解読すると4,100個の塩基よりなり、その配列をコンピュータに入れて蛋白質に翻訳可能な部分を検索すると、391アミノ酸よりなるポリペプチドであることがわかった。糖鎖を除く推定分子量は約43kDであった。この二次構造をアミノ酸疎水性スコアを元に予測すると膜を7回貫通する構造となった¹³⁾。同じ7回膜貫通型の分子でオキシトシン受容体とホモロジーが高く既に立体構造の推定されているロドプシンを元に三次構造を推定すると図4のような立体構造となった。我々がこのオキシトシン受容体を発表するのとほぼ同時に、類縁の下垂体後葉ペプチドホルモンであるArg⁸-バソプレシンのラット血管、肝臓型V_{1a}受容体、腎臓型

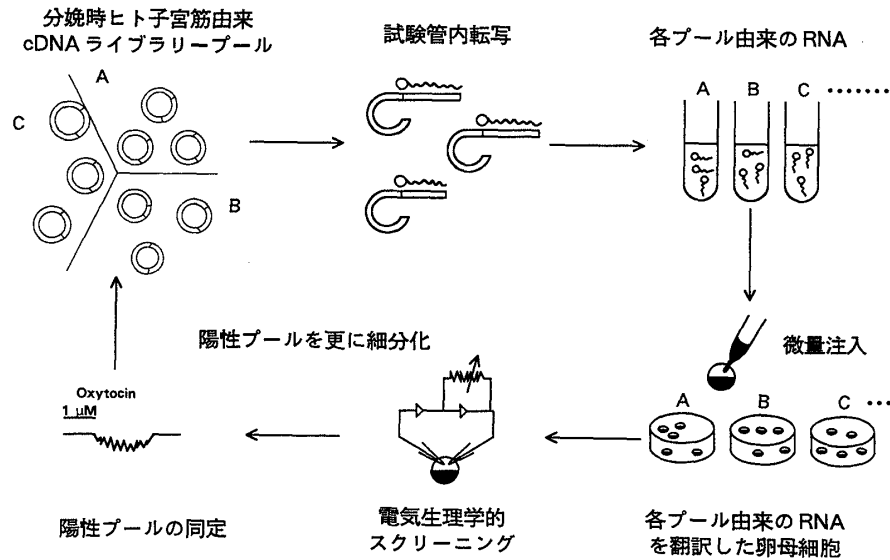


図3 オキシトシン受容体クローニングの戦略

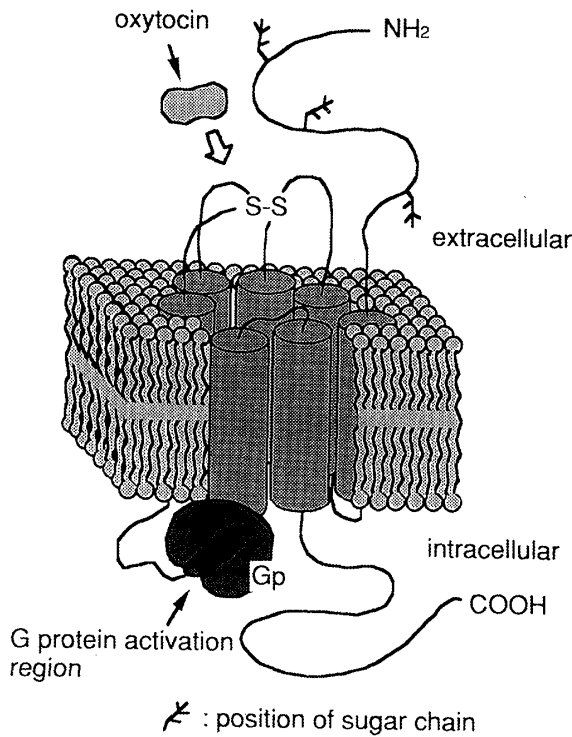


図4 オキシトシン受容体の予測3次構造

V₂受容体ならびにヒト腎臓型ADH受容体のクローニングがなされ、そのアミノ酸配列が報告された。これらはいずれも7回膜貫通型でオキシトシン受容体と50%以上のホモロジーを有していた。他の7回膜貫通型受容体であるアセチルコリンM₂受容体、アドレナリンβ₂受容体、サブスタンスP受容体、トロンボキサンA₂受容体、ロドプシ

ンとは膜貫通領域に20~30%のホモロジーがあるのみであった。

このクローン化されたオキシトシン受容体の薬理学的特性をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に発現させた受容体を使って調べてみると、Arg⁸-バソプレッシンで同濃度のオキシトシンの20~50%程度の反応を認めた。これはリガンド、受容体両方の面でオキシトシンとバソプレッシンがよく似ていることを示している。しかし、バソプレッシンV₁特異的アゴニスト ([Phe², Ile³, Orn⁸] -バソプレッシン) には全く反応せず、オキシトシンの反応はその特異的アンタゴニスト ([d(CH₂)₅Tyr(OMe)², Orn⁸] -バソトシン) で抑制されており、このクローンが確かにオキシトシン特異的受容体をコードしていることが確認された。また、このcDNAをプローブとして、ヒトの各臓器より抽出したmRNAを用いたノーザンプロットを行うと、乳腺、卵巣、子宮内膜でオキシトシン受容体mRNAは発現しており、分娩時子宮筋では極めて大量のmRNAの発現が証明された。したがって、分娩時の子宮のオキシトシン感受性の増加はその遺伝子の転写によって制御されていることが明らかになった¹³⁾。

4. オキシトシン研究の今後

オキシトシン研究は受容体の分子クローニングにより新しい展開をみせはじめた。

分娩時にオキシトシン受容体が大量に転写されていることが示されたが、この調節は、DNA上のオキシトシン遺伝子の一番上流の部分(5'上流領域)で行われているはずである。すなわちこの転写調節機構を明らかにするためにはオキシトシン遺伝子そのものの構造を明らかにする必要がある。我々はまず共同研究によってヒト染色体上の3p26.2の位置にオキシトシン受容体遺伝子が存在することを証明した。続いてヒト遺伝子ライブラリーをオキシトシン受容体cDNAをプローブとしてスクリーニングし、遺伝子クローンをつくり上げ現在その塩基配列を解読している。5'上流領域の塩基配列がわかれば、今後どのような刺激がオキシトシン遺伝子の転写を活性化するかが明らかになり、なぜ陣痛が起こるのか、という根本的な問への答の一部となる可能性が出てきた。

また陣痛発来以外のオキシトシン作用の解析も更に進むと思われる。中枢神経系でオキシトシンは性行動、摂食、記憶などに影響を与えることがいわれてきたが、本学第二解剖学教室のTohyama et al. は、ラット中枢神経系でオキシトシン受容体産生細胞をin situハイブリダイゼーション法を用いて調べ、広い範囲でオキシトシン受容体を有する神経細胞が分布していることを示した¹⁴⁾。これはオキシトシンが中枢で更に多様な作用を有する可能性を示唆している。子宮内膜では上皮がオキシトシン受容体を発現し、しかもその発現量は性周期によって変化していることが示された¹⁵⁾。また分娩時脱落膜での発現も認められており、Lefebvre et al. の分娩時ラット子宮内膜でのオキシトシン産生の報告¹⁶⁾とあわせると、オキシトシンの子宮筋への直接作用以外の重要な分娩に係る役割が推察される。また乳腺でも筋上皮細胞のみでなく、乳腺上皮細胞にもオキシトシン受容体mRNAは発現しており、その詳細な機能解析が待たれる。このほか卵巣、精巣におけるオキシトシンの役割の研究も進んでおり、分娩、射乳のみでない多彩なオキシトシンの生理作用の解明が今後進んでいくものと考えている。またこれらの極めて基礎的な知見がやがて安全な陣痛の制御や不妊・精神面などで臨床の場に役立つ時代が

来ることを期待してやまない。

文 献

1. Dale HH. On some physiological action of engot. *J Physiol (Lond)* 1906; 34: 163—206
2. du Vigneaud V, Ressler C, Swan JM, Roberts CW, Katsoyannis PG, Gordon S. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J Am Chem Soc* 1953; 75: 4879—4880
3. Yamaji K, Fujita M, Otsuki Y, Tanizawa O. Development of a radioimmunoassay for oxytocin and measurement of oxytocin in the spinal cord and brain of rats. *Psychoneuroendocrinology* 1981; 6: 347—353
4. Otuki Y, Yamaji K, Fujita M, Takagi T, Tanizawa O. Serial plasma oxytocin levels during pregnancy and labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1983; 62: 15—18
5. Dawood MY, Wang CF, Gupta R, Fuchs F. Fetal contribution to oxytocin in human labor. *Obstet Gynecol* 1978; 52: 205—209
6. Otuki Y, Tanizawa O, Kurachi K. Feto-maternal plasma oxytocin levels in normal and anencephalic pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1983; 62: 235—237
7. Leake RD, Wetzman RE, Fisher DA. Pharmacokinetics of oxytocin in the human subject. *Obstet Gynecol* 1980; 56: 701—704
8. Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom H. Oxytocin receptor: Triggers for parturition and lactation? *Science* 1979; 204: 1313—1315
9. Tasaka K, Masumoto N, Miyake A, Tanizawa O. Direct measurements of intracellular free calcium in cultured human puerperal myometrial cells stimulated by oxytocin: Effects of extracellular calcium and calcium channel blockers. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 101—106
10. Masumoto N, Tasaka K, Miyake A, Tanizawa O. Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 22533—22536
11. Azuma C, Miyai K, Saji F, Kamiura S, Tokugawa Y, Kimura T, Ohashi K, Koyama M, Iijima Y, Kashiwai T, Hayashizaki T, Tanizawa O. Site-specific mutagenesis of human chorionic gonadotropin (hCG)- β subunit: Influence of mutation hCG production. *J Mol Endocrinol* 1990; 5: 97—102
12. Kimura T, Azuma C, Saji F, Takemura M, Tokugawa Y, Miki M, Ono M, Mori K, Tanizawa O. Estimation by an electro-

- physiological method of the expression of oxytocin receptor mRNA in human myometrium during pregnancy. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992 ; 42 : 253—258
13. *Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H.* Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 1992 ; 356 : 526—529
 14. *Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Tanizawa O, Araki T, Maeno H, Tohyama M.* Localization of oxytocin receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* 1993 in press
 15. *Takemura M, Nomura S, Kimura T, Inoue T, Onoue H, Azuma C, Saji F, Kitamura Y, Tanizawa O.* Expression and localization of oxytocin receptor gene in human uterine endometrium in relation to the menstrual cycle. *Endocrinology* 1993 ; 132 : 1830—1835
 16. *Lefebvre DL, Giaid A, Bennett H, Larivière H, Zingg HH.* Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science* 1992 ; 256 : 1553—1555
-