

## 培養ヒト子宮筋細胞における prostaglandin 産生能に対する検討 progesterone, cortisol および DHAS の影響

大阪府立羽曳野病院産婦人科

森 本 圭 子

奈良県立医科大学産婦人科

奥 正 孝

### Effect of Progesterone, Cortisol and Dehydroepiandrosterone-sulfate on Prostaglandin Production by Cultured Human Myometrial Cells

Keiko MORIMOTO

*Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka Prefectural Habikino Hospital, Osaka*

Masataka OKU

*Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara*

**概要** 子宮筋より産生される各種 prostaglandin (PG) は、妊娠経過における局所収縮調節因子として、重要な役割を担っていると考えられる。一方、妊娠末期に大量に産生されるステロイドホルモンは妊娠維持・胎児発育・分娩発来に密接に関与しているものと考えられている。今回子宮筋収縮に対するこれらの相互作用を明確にするため、培養ヒト子宮筋細胞を用い、progesterone (P), cortisol (F) および dehydroepiandrosterone-sulfate (DHAS) 存在下における PGE<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 産生能を検討した。

**実験方法**：患者同意のもと閉経前良性疾患より採取した子宮筋細胞を培養し、無血清培地における経時的 PG 産生量、ならびに各濃度の P, F, DHAS 存在下における PG 産生量を EIA 法により測定した。

**実験成績**：1) 培養子宮筋細胞上清中における PGE<sub>2</sub>ならびに6-keto-PGF<sub>1α</sub> 濃度の経時的変動を測定した結果、上清交換後10分における PGE<sub>2</sub>および6-keto-PGF<sub>1α</sub> 濃度は1,410.4pg/ml, 600pg/ml であり、30～60分の時点で一過性の減少を示した後、24時間まで増加した。

2) 各種濃度の P とともに24時間培養継続後の PGE<sub>2</sub>および6-keto-PGF<sub>1α</sub> 産生量を検討した結果、PGE<sub>2</sub>は P 10<sup>-7</sup>M 以上存在下では産生が抑制され、6-keto-PGF<sub>1α</sub> は逆に P 濃度依存性の有意な増加傾向を示した。

3) F 存在下における PGE<sub>2</sub>産生量は、10<sup>-6</sup>M 以上の高濃度領域においては濃度依存性の増加現象を示した。また6-keto-PGF<sub>1α</sub> 産生量は10<sup>-6</sup>M 以上において著明な減少を示した。

4) DHAS 存在下における PGE<sub>2</sub>産生量は、10<sup>-6</sup>M 以上において著明に増加することが確認された。

以上の成績は、妊娠経過におけるステロイドホルモンの変動が、子宮筋における PG 産生の調節要因として作用することを解明した成績である。

**Synopsis** Prostaglandins (PGs) are considered to play important roles as contraction regulating factors in the mechanism of human uterine contraction. On the other hand, steroid hormones released in large amounts in late pregnancy appear to be closely related to the maintenance of pregnancy, fetal growth, and onset of delivery. To clarify the interactions between PGs and steroid hormones, we studied PGE<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> production on human myometrial cell culture. Cultures of myometrial cells from premenopausal patients with benign uterine diseases were established, and PG production in serum-free media and in the presence of various concentrations of progesterone (P), cortisol (F) and dehydroepiandrosterone-sulfate (DHAS) was studied.

The following results were obtained:

1) The PGE<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> concentrations were 1,410.4pg/ml and 600pg/ml at 10 minutes

after changing the medium, decreased transiently at 30–60 minutes, and increased thereafter.

2) When the cells were cultured with various concentration of P for 24 hours, PGE<sub>2</sub> production was suppressed in the presence of P at 10<sup>-7</sup>M or above, but 6-keto-PGF<sub>1α</sub> production showed a significant dose-dependent increase.

3) In the presence of F, PGE<sub>2</sub> production shows a dose-dependent increase at high doses, but 6-keto-PGF<sub>1α</sub> production markedly decreases at 10<sup>-6</sup>M or above.

4) In the presence of DHAS, PGE<sub>2</sub> production increased markedly at 10<sup>-6</sup>M or above.

These findings indicate that steroid hormones are regulatory factors in the production of PG by the myometrium.

**Key words:** Myometrial culture • Prostaglandin production • Cortisol • Progesterone • Dehydroepiandrosterone-sulfate

## 緒言

ヒトの分娩発来機転において、下垂体後葉より分泌される oxytocin は、その中心的役割を担っているものと考えられている。一方、oxytocin と同様強力な子宮筋収縮作用を有する prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, および子宮筋収縮抑制作用を有する PGI<sub>2</sub> は、生体内各種臓器における産生が知られており、循環性あるいは局所的な収縮調節因子として、妊娠期間における収縮抑制ならびに陣痛発来時における子宮筋収縮に重要な役割を果たしているものと考えられる。

一方、妊娠経過に伴い、胎児・胎盤・母体より大量に産生される各種ステロイドホルモンは、妊娠維持・胎児発育・分娩発来に密接に関与しているものと考えられているが、子宮筋収縮に対する、個々のステロイドホルモンの作用に関してはほとんど報告が認められていない。そこで今回我々は、培養ヒト子宮筋細胞を用い、妊娠末期に胎児・母体において大量に産生されている progesterone (P), cortisol (F)<sup>1)</sup> および dehydroepiandrosterone-sulfate (DHAS) が、子宮筋におけるPG産生にいかなる影響を及ぼすかを検討した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 実験材料

ヒト子宮筋は日本産科婦人科学会倫理規定に従い患者同意のもと、閉経前の良性疾患患者より採取した。培養に際し culture plate は Nunc 社のものを用い、oxytocin およびステロイドホルモンさらに培養関連試薬は Sigma 社より入手した。

PGE<sub>2</sub> および 6-keto-PGF<sub>1α</sub> の定量に用いた Enzyme immunoassay kit は CAYMAN

CHEMICAL 社のものを用いた。

### 2. 実験方法

#### 1) ヒト子宮筋細胞培養

ヒト子宮筋細胞培養は Casey et al.<sup>2)</sup>の方法に準じた。閉経前良性疾患患者より、摘出した子宮体部前壁組織を、Hank's balanced salt solution (HBSS) 中で安全剃刀にて約1mm<sup>3</sup>に細切した後、collagenase type I (1mg/ml), type IA (1mg/ml), DNase (0.2mg/ml), penicillin (200U/ml), streptomycin (200μg/ml), fungizone (0.5μg/ml) を含む HBSS 中で37°C, 90分間振とうし、子宮筋細胞を分散した。ガーゼにて濾過後、600g, 10分間遠心分離し、沈渣を10% fetal calf serum (FCS), 1% sodium pyruvate, MEM amino acid, MEM NE amino acid, MEM vitamins, penicillin (200U/ml), streptomycin (200μg/ml), neomycin (400μg/ml) を含む WAYMOUTH MEDIUM MB 752/1 (HEPES (25mM), pH 7.4) 中に再浮遊させ、再度600g, 10分間遠心することにより細胞を回収した。この子宮筋細胞を culture plate に10<sup>5</sup>個ずつ分注し、10% FCS を含む WAYMOUTH MEDIUM MB 752/1 中で約7日間、confluent になるまで培養を継続した。

#### 2) PG 産生量の経時的検討

culture plate より上清を吸引・洗浄後、assay medium (0.4% fatty acid free human albumin, 25mM HEPES, WAYMOUTH MEDIUM MB 752/1: pH 7.4) 500μl を添加した。37°C にて incubation を開始し、10, 20, 30, 60, 120分さらに24時間の時点で上清を採取した。採取した上清はただちに凍結し測定まで-20°C 以下において保存し

た。

### 3) P, F および DHAS 存在下における PG 産生量に関する検討

先と同様, culture plate より上清を吸引し, assay medium にて2度洗浄し, 最終濃度として  $10^{-8}$ M より  $10^{-5}$ M の P, F および DHAS を含む assay medium  $500\mu\text{l}$  を添加し, 24時間培養を継続した. 培養終了後上清を回収し, 測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  にて保存した.

なお, 培養上清中エタノール濃度は, いずれのステロイドホルモンに関しても0.1%未満になるように調製した.

### 4) PG の定量法

$\text{PGE}_2$  および  $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$  の定量は CAYMAN CHEMICAL 社の Enzyme immunoassay kit を用いて行った. mouse monoclonal antibody を coating した plate に PG specific antiserum, acetylcholinesterase linked PG とともに先に採取した上清  $50\mu\text{l}$  を添加し室温にて24時間静置した. incubation 終了後, Tween20 により plate を洗浄し, Ellman's reagent にて発色させ,  $412\text{nm}$  の吸光度を SLT LABINSTRUMENT ERA-340 を用いて測定した. 本 kit による測定領域は,  $3.9\sim 500\text{pg/ml}$  であり, 再現性は良好であった.

### 5) 統計処理

経時的変動に関しては8症例の, また各ステロイドホルモンの作用に関しては4~9症例の子宮筋より得られた培養細胞を用いて検討した (control 群9症例, 各 steroid 添加群;  $10^{-8}$ M 4症例,  $10^{-7}$ M 8症例,  $10^{-6}$ M 8症例,  $10^{-5}$ M 4症例). また, 各々の検討は毎回 duplicate にて行い, 有意差検定は Fisher's protected least significant difference (Fisher's PLSD) 法により行った.

### 実験成績

#### 1. PG 産生量の経時的検討

##### 1) $\text{PGE}_2$ 産生量 (図1)

培養子宮筋細胞上清中における  $\text{PGE}_2$  濃度の経時的変動を検討した結果, 上清交換後10分における  $\text{PGE}_2$  濃度は  $1,410.4\text{pg/ml}$  であり, その後60分において  $430.3\text{pg/ml}$  と有意に減少したのち再上昇に転じ, 以降24時間での濃度は, 約  $1,800\text{pg/ml}$  に達することが確認された.

##### 2) $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 産生量 (図2)

一方,  $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$  の濃度は, 上清交換後10分において  $600\text{pg/ml}$  であり  $\text{PGE}_2$  の3分の1以下であった. 以降  $\text{PGE}_2$  と同様一過性の減少を示した後, 24時間における濃度は, 約  $600\text{pg/ml}$  であった.

##### 2. P の PG 産生に及ぼす影響 (図3)

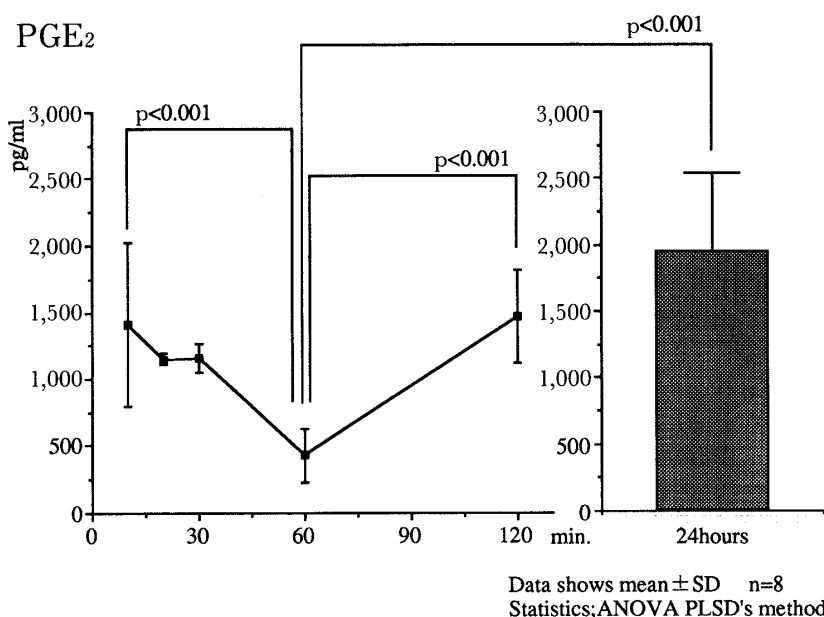


図1 Culture supernatant  $\text{PGE}_2$  concentration—time course—

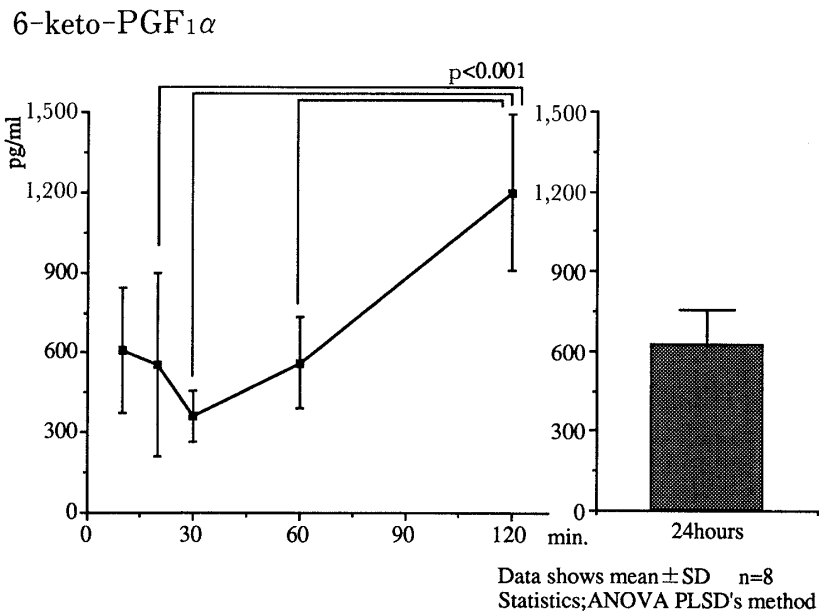


図2 Culture supernatant 6-keto-PGF<sub>1α</sub> concentration—time course—

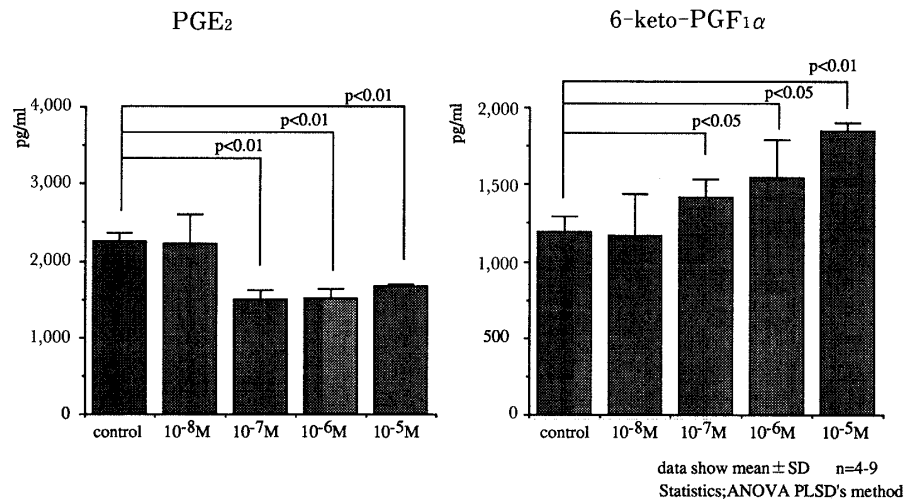


図3 Progesterone effect on myometrial culture supernatant PGE<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> concentration

#### 1) PGE<sub>2</sub>産生に対する作用

各濃度のPとともに24時間培養継続後のPGE<sub>2</sub>産生量を検討した結果, control 2,216pg/mlに対しP 10<sup>-7</sup>M以上存在下では有意に産生が抑制され, 妊娠末期到達濃度である10<sup>-6</sup>Mにおいて約30%以上産生が抑制されることが確認された。

#### 2) 6-keto-PGF<sub>1α</sub>産生に対する作用

各濃度のP存在下における6-keto-PGF<sub>1α</sub>産生量を検討した結果, PGE<sub>2</sub>の場合とは逆に濃度依存性の有意な増加傾向を示し, 10<sup>-5</sup>Mにおいては

control (1,141pg/ml) の約1.3倍の産生量であることが確認された。

#### 3. FのPG産生に及ぼす影響 (図4)

##### 1) PGE<sub>2</sub>産生に対する作用

F存在下におけるPGE<sub>2</sub>産生量は, 10<sup>-7</sup>Mにおいて約30%の産生抑制が観察されたが, より高濃度においては逆に濃度依存性の有意な増加を示すことが確認された。

##### 2) 6-keto-PGF<sub>1α</sub>産生に対する作用

F存在下での6-keto-PGF<sub>1α</sub>産生量は10<sup>-6</sup>M以

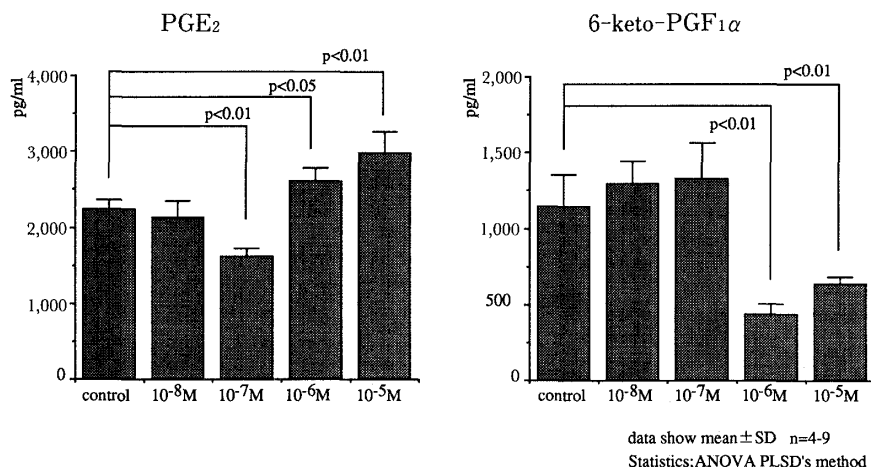


図4 Cortisol effect on myometrial culture supernatant PGE<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> concentration

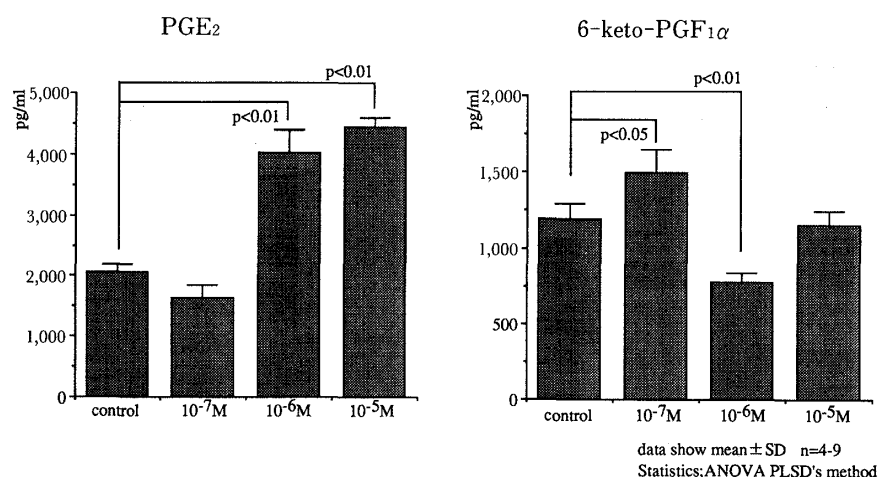


図5 DHAS effect on myometrial culture supernatant PGE<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> concentration

上において著明な減少を示し、10<sup>-6</sup>Mにおける産生量は437pg/mlとcontrolの約40%であることが確認された。

#### 4. DHASのPG産生に及ぼす影響(図5)

##### 1) PGE<sub>2</sub>産生に対する作用

DHAS存在下におけるPGE<sub>2</sub>産生量を検討した結果、10<sup>-6</sup>M以上において著明な産生増加が確認され、10<sup>-5</sup>Mにおける濃度は4,439pg/mlとcontrolの約2倍であった。

##### 2) 6-keto-PGF<sub>1α</sub>産生に対する作用

DHAS存在下での6-keto-PGF<sub>1α</sub>濃度は、10<sup>-7</sup>Mにおいては増加を示すものの、10<sup>-6</sup>Mにおいては逆に約25%の有意な減少を認めた。

#### 考 察

ヒトの子宮筋収縮機構に関しては、種々の生理

活性物質の関与が報告されており、それぞれの多様なクロストークにより分娩発来機構が構築されているものと考えられる。

中でも局所性および循環性生理活性物質であるPGは、その作用が強力でありさらにその半減期が短時間であること、さらに子宮筋自身もその産生臓器であることより<sup>3)~5)</sup>、陣痛発来時における収縮調節因子として重要な役割を担っているものと考えられる。

培養子宮筋細胞におけるPG産生に関しては、Casey et al.<sup>2)</sup>がagonist刺激を伴わない培養上清中に、大量のPGI<sub>2</sub>が産生されていることを報告しており、妊娠維持期間における収縮抑制との関連性を示唆している。今回、同様の培養系を用いてPGE<sub>2</sub>ならびに6-keto-PGF<sub>1α</sub>産生量を検討した結

果、上清交換後10分の時点で  $\text{PGE}_2$  濃度の大量の PG 産生を認めた。その後興味深いことにいずれの PG も30~60分において、一過性の減少傾向を示した後、再度増加することが確認された。この一過性減少の要因に関しては、現在検討中であるが何らかの negative feedback もしくは脱感作機構の介在によることが考えられる。

一方、妊娠に伴い、胎児・胎盤・母体より大量に産生される P, F, DHAS は、妊娠維持・胎児発育のみならず、子宮筋収縮に対しても直接的あるいは間接的に関与していることが報告されている<sup>67)</sup>。

これらステロイドホルモンの子宮筋 PG 産生に対する作用としては、現在までに F および dexamethazon の 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  の産生抑制作用、ならびに P の産生増加作用が報告されているのみ<sup>69)</sup>、 $\text{PGE}_2$  産生に関する報告はほとんど認められていない。

一般的には、ステロイドホルモンの作用機序としては、細胞内に存在する各種 receptor を介する酵素誘導量調節によるものと考えられており、その作用発現には数時間を要するものと考えられている。また日内変動は認められるものの、妊娠末期においては非妊娠時に比べ、母体血中ステロイドホルモン濃度は常に高濃度であることが知られていることより、今回、各濃度のステロイドホルモンを、その作用発現に十分な時間として、24時間添加した際における、培養上清中  $\text{PGE}_2$  ならびに 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  濃度を検討した。その結果、6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  濃度に関しては、先の報告と同様 P  $10^{-7}$ M 以上における有意な産生量増加と、F 存在下における著明な産生抑制現象が確認された。一方、 $\text{PGE}_2$  濃度に関しては、P による有意な産生抑制、および  $10^{-6}$ M 以上の F, DHAS による濃度依存性の産生増加現象が確認された。このように、P, F それぞれの作用が  $\text{PGE}_2$  産生系と 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  産生系に対しては逆転しており、妊娠末期に大量に存在する P, F が<sup>1)</sup>、PG 産生系を介し、子宮筋収縮の調節因子として作用することが示唆された。

これらステロイドホルモンの作用点に関しては

現在検討中であるが、Davidge et al.<sup>10)</sup> は、 $\text{PGI}_2$  産生に関し、妊娠末期において  $\text{PGH}_2$  synthetase は増加するのに対し、 $\text{PGI}_2$  synthetase は減少することを報告しており、また多様な産生系が示唆されている  $\text{PGE}_2$  に関しても、近年、各臓器 cytosol 中に存在する PG H-E isomerase がその産生に関する key enzyme であることが示唆されており<sup>11)</sup>、これら酵素誘導に対し、各種ステロイドホルモンが関与しているものと考えられる。

以上の成績は、培養ヒト子宮筋における PG 産生能を P, F, DHAS などのステロイドホルモンが産生調節因子として作用していることを明らかにしたものであり、妊娠経過におけるステロイドホルモンの変動が、子宮筋収縮の制御因子として作用していることを明らかにした成績である。

#### 文 献

1. 奥 正孝. 妊娠維持・胎児発育・分娩発来に及ぼす各種ステロイドホルモンの動態. 日内分泌会誌 1988; 64: 51-67
2. Casey ML, MacDonald PC, Mitchell MD, Synder JM. Maintenance and characteristics of human myometrial smooth muscle cells in monolayer culture. *In vitro Cell Dev Biol* 1984; 20: 396-403
3. Dubin NH, Blake DA, Ghodgaonkar RB, Egner PG. Thromboxane B<sub>2</sub>, 6keto-prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub> , and prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  production by contracting pregnant rat uteri in vitro. *Biology of reproduction* 1982; 26: 281-288
4. Abel MH, Kelly RW. Differential production of prostaglandins within the human uterus. *Prostaglandins* 1979; 18: 821-828
5. Rehnstrom J, Ishikawa M, Fuchs F, Fuchs A. Stimulation of myometrial and decidual prostaglandin production by amniotic fluid from term, but not midtrimester pregnancies. *Prostaglandins* 1983; 26: 973-981
6. MacKenzie LW, MacDonald PC, Milewich L, Casey ML. Prostacyclin biosynthesis by cultured human myometrial smooth muscle cells: Dependency on arachidonic or linoleic acid in the culture medium. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 1365-1372
7. 藤井絵里子, 奥 正孝, 足立 聡, 大月知子, 一條元彦, 森本圭子. Oxytocin によるヒト子宮筋培養細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変動ならびに oxytocin receptor に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響とその作用機構. 日産婦誌 1993; 45: 636-642

8. Casey ML, MacDonald PC, Mitchell MD. Despite a massive increase in cortisol secretion in women during parturition, there is an equally massive increase in prostaglandin synthesis. *J Steroid Biochem* 1985 ; 75 : 1852—1857
  9. Peplow PV, Hurst PR. Prostaglandin production by isolated cells of rat uterus incubated with or without progesterone. *Prostaglandins Leucotrienes and essential fatty acid* 1989 ; 35 : 57—62
  10. Davidge ST, Everson WV, Parisi VM, McLaughlin MK. Pregnancy and lipid peroxide-induced alterations of eicosanoid-metabolizing enzymes in the aorta of the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 169 : 1338—1344
  11. Ogorochi T, Ujihara M, Narumiya S. Purification and propertise of prostaglandin H-E isomerase from the cytosol of human brain: Identification as anionic forms of glutathione S-transferase. *J Neurochemistry* 1987 ; 48 : 900—909  
(No. 7599 平6・12・16受付)
-