

培養ヒト子宮筋細胞における細胞内 arachidonic acid,
palmitic acid 遊離に関する検討
—cortisol, progesterone の作用—

奈良県立医科大学産婦人科

大月 知子 奥 正 孝

A Study on the Effect of Cortisol and Progesterone on
Cytosolic Arachidonic and Palmitic Acid Concentrations in
Cultured Human Myometrial Cells

Tomoko OTSUKI and Masataka OKU

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara

概要 近年における細胞内各種情報伝達系の研究に伴い、細胞膜構成に携わる磷脂質は、分解と再構成が常に行われることにより、その構造はダイナミックに変動しているものと考えられるようになった。さらに分解に伴い遊離された脂肪酸の一部は、各種 prostaglandin などの生理活性物質として、引き続き情報伝達系活性化に重要な役割を担っていることも知られるようになった。

我々は以前より子宮筋情報伝達系に対するステロイドホルモンの作用を検討しており、現在までに妊娠末期に大量に存在する cortisol (F), progesterone (P) が, oxytocin による子宮筋収縮に対し、その調節因子として作用することを報告した。今回我々は培養ヒト子宮筋細胞を用い、各種濃度の F, P の存在が子宮筋細胞内脂肪酸濃度にいかなる影響を及ぼすかを高速液体クロマトグラフィーを用いて検討した。

10^{-7} ~ 10^{-6} M の F24時間負荷後における細胞内 arachidonic acid, palmitic acid 濃度 (非刺激群), ならびに30秒間の oxytocin 刺激後における各脂肪酸濃度を測定した結果, FCS 存在下非刺激群における palmitic acid 濃度は, 10^{-7} M F 投与群において減少することが確認された。一方 FCS 非存在下では, arachidonic acid, palmitic acid いずれも高濃度 F 負荷により著明な増加傾向が確認された。また oxytocin 添加による細胞内脂肪酸濃度を検討した結果, arachidonic acid 濃度は F による変動を認めず, palmitic acid 濃度は, 10^{-6} M F 添加群において軽度減少することが確認された。

同様に P に関し検討した結果, FCS 存在下非刺激群においては P 10^{-5} M 添加群において palmitic acid の軽度減少を認めたのに対し, arachidonic acid は, P による変動を認めなかった。また, FCS 非存在下では両脂肪酸とも有意な増加が確認された。一方, oxytocin 添加群においては, arachidonic acid で P 濃度依存性の著明な減少がまた, palmitic acid で有意な減少が確認された。

以上の成績は、妊娠末期に生体内に大量に産生される F, P が、細胞内脂肪酸濃度の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る。

Synopsis Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis in several cell types, presumably by inhibiting arachidonic acid deacylation from phospholipids. We studied the effects of cortisol (F) and progesterone (P) on fatty acid release from cultured human myometrial cells.

Confluent monolayer cultures of myometrial cells were adapted to steroids containing medium for 24 hours and the intracellular arachidonic acid and palmitic acid concentrations were determined.

In the presence of fetal calf serum (FCS), the palmitic acid concentration significantly decreased after the addition of 10^{-7} M F. In the absence of FCS, the concentrations of both fatty acids were markedly increased after the addition of F. During oxytocin stimulation, the arachidonic acid concentration did not change but the palmitic acid concentration decreased slightly after the

addition of F.

A similar evaluation was done with P. The palmitic acid concentration decreased slightly after the addition of 10^{-5} M P in the presence of FCS but increased markedly in the absence of FCS. During stimulation with oxytocin, the fatty concentrations of fatty acids decreased significantly in a dose-dependent manner.

These results suggest that both F and P are implicated as regulatory factors in the activation of arachidonic acid cascade.

Key words: Phospholipase A₂ • Myometrial cell • Arachidonic acid • Steroid hormone • Oxytocin

緒言

一般的に、細胞内脂肪酸濃度は低値であると考えられているが、近年における各種情報伝達機構の研究に伴い、細胞膜においてはその構成磷脂質の分解と再構成が常に行われることにより、定常性ならびに機能が維持されていると考えられるようになった。また、分解に伴い細胞内に遊離される脂肪酸の一部は、各種 prostaglandin などの生理活性物質に転換され、引き続き情報伝達系の活性化に重要な役割を担っているものと考えられている。

細胞膜より脂肪酸の遊離に関与する酵素としては、phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC)、ならびに phospholipase A₂ (PLA₂) などが主たる系であると考えられており、PI-PLC を介する系は oxytocin など各種 agonist 刺激を介する遊離系として捉えられているのに対し¹⁾、PLA₂ による遊離系は agonist 刺激を伴わない場合においても発現しうる系であると考えられている²⁾。特に PLA₂ に関しては、近年各種 isoform の存在が報告されており、中でも細胞質に存在する高分子細胞内在型 PLA₂ は、既知の分泌型 PLA₂ とは異なり、その活性が低 Ca 濃度領域においても発現することが報告されており³⁾、その酵素活性は arachidonic acid cascade の律速因子として注目されている。

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 cortisol (F)、progesterone (P) は、子宮筋収縮に関与する各種 PG 産生の調節因子として作用することが報告されており⁴⁾、これらステロイドホルモンの作用点を明らかにするため、今回培養ヒト子宮筋細胞を用い、各濃度の F、P の負荷が非刺激群ならびに oxytocin 刺激時に

における細胞内脂肪酸濃度変動にいかなる影響を及ぼすかを、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて検討した。

研究材料および研究方法

1. 研究材料

1) 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、閉経前良性疾患患者より摘出したものを用いた。

対象症例は36歳より48歳までの(平均44歳)排卵周期を有する子宮筋腫患者であり、合計8症例より得た子宮筋組織を実験に供した。

2) 器具および試薬

培養に際し24well culture plate は Nunc 社のものを、また oxytocin および各試薬は Sigma 社のものを用いた。また脂肪酸蛍光ラベル化剤である 9-anthryldiazomethane (ADAM) はフナコシ社より入手した。

2. 研究方法

1) ヒト子宮筋細胞培養

ヒト子宮筋細胞の培養は Casey et al.⁵⁾の方法に準じて行った。閉経前良性疾患患者より摘出した子宮より子宮体部前壁組織を採取し、Hank's balanced salt solution (HBSS) 中で約1mm³に細切した後、collagenase type I (1mg/ml), type IA (1mg/ml), DNase (0.2mg/ml), penicillin (200 U/ml), streptomycin (200μg/ml), fungizone (0.5 μg/ml) にて37°C, 90分間振盪することにより子宮筋細胞を分散した。ガーゼにて濾過後、600×g, 10分間遠心し、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600×g, 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24 well culture plateに10⁵個ずつ分注し、先のWAYMOUTH MEDIUM MB 752/1中でconfluentになるまで約7日間培養を継続した。

2) 非刺激群遊離脂肪酸濃度に関する検討

(1) FCS存在下におけるF, Pの作用

24well culture plateより上清を吸引し、10⁻⁵~10⁻⁸MのF, Pを含むWAYMOUTH MEDIUM MB 752/1 (10% FCS) 500μlを添加しさらに37°Cにおいて24時間培養を継続した。培養終了後、上清を吸引除去し氷冷した100% methanol 500μlを添加することにより反応を停止した。再度上清を吸引除去した後、methanol:DW=1:1溶液500μlを添加し、氷冷下sonication(5秒×3)することにより細胞を破碎した。細胞破碎液を15,000rpm, 10分間遠沈することにより得られた上清を-20°Cで保存した。

(2) FCS非存在下におけるF, Pの作用

24well culture plateより上清を吸引し、10⁻⁵~10⁻⁸MのF, Pを含むassay medium (0.4% fatty acid free albumin, 25mM HEPES, WAYMOUTH MEDIUM MB 752/1:pH 7.4) 500μlを添加し、さらに37°Cにおいて24時間培養を継続した。培養終了後、先述と同様の方法により反応を停止し、sonication・遠沈により得られた分画を-20°Cにおいて保存した。

3) oxytocin刺激による細胞内遊離脂肪酸濃度変化に関する検討

24well culture plateより上清を吸引し、10⁻⁵M~10⁻⁸MのF, Pを含むassay medium (0.4% fatty acid free albumin, 25mM HEPES, WAYMOUTH MEDIUM MB 752/1:pH 7.4) 500μlを添加し、24時間培養を継続した。培養終了後、assay mediumにより細胞を2度洗浄し、10⁻⁸Mのoxytocinを含むassay medium 500μl添加することにより反応を開始した。37°Cにおいて30秒間incubationした後、反応を停止し先述と同様の方法により細胞内成分を回収した。

4) HPLCによる遊離脂肪酸の定量

(1) 酢酸エチル溶液(ADAM)による脂肪酸の蛍光ラベル化

試料200μlに0.1% ADAM100μlおよび内部標準物質として10μM margaric acid 50μlを添加し、Vortexにて攪拌後、暗所において約1時間静置した。反応終了後蒸留水1mlおよびn-hexan 5mlを添加し、Vortexにて強攪拌の後、3,000rpm, 10分間遠沈し、n-hexan層を回収しこれを試験管evaporatorにより減圧乾固した。これを50μl tetrahydrofuranにより再溶解したものをHPLC sampleとした。

(2) HPLC condition

HPLCカラムは、YMC-Pack C8 A-203(山村研究所)を用い、acetonitrile:DW(pH 4.1)=88:12, flow rate 1.5ml/minによるisocratic elutionにより分離を行った。蛍光分光光度計はHitachi F-1000を用い、Ex 365nm, Em 412nmによる蛍光強度変化をHitachi D-2500 Chromato Integratorにより記録し、内部標準法により定量した。

3. 蛋白量の測定

蛋白量の測定はBioRad社Protein assay kitを用いて行った。

4. 統計処理

上記検討は、各症例ごとduplicateで行い、8症例の子宮筋より得られた測定結果をANOVA PSLD's methodを用いて検定した。

研究成績

1. 非刺激群遊離脂肪酸濃度に関する成績

1) FCS存在下におけるF, Pの作用

FCS存在下において24時間10⁻⁷~10⁻⁵MのFを負荷した細胞における細胞内arachidonic acid濃度は、controlの1,064ng/mg proteinに対し、F10⁻⁶~10⁻⁵M添加群ではそれぞれ1,168, 1,193と軽度増加傾向を認めたが有意差は認められなかった。また同様にpalmitic acidの濃度を測定した結果、10⁻⁷Mにおいて有意な減少を認めたものの、他の濃度においてはcontrolとの差は認められなかった(図1)。

同様に10⁻⁷~10⁻⁵MのPを負荷した細胞における細胞内arachidonic acid濃度は、controlに

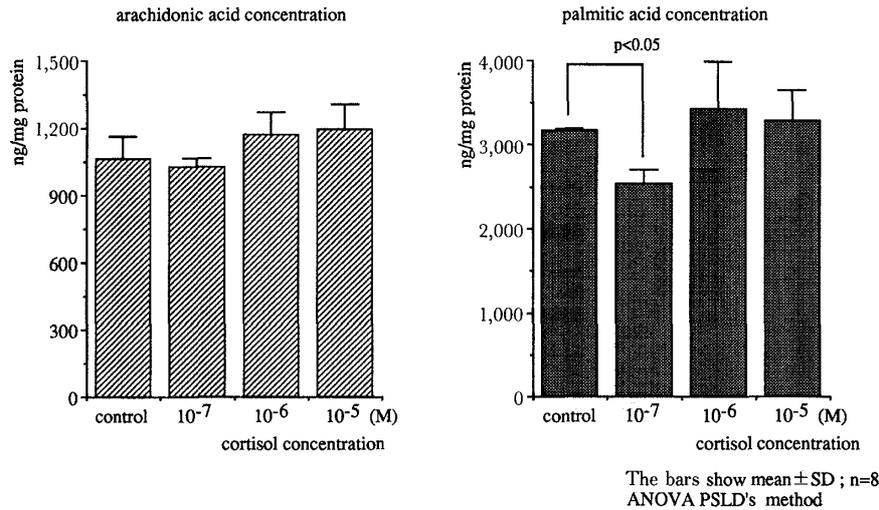


図1 Cortisol effect on myometrial cytosolic arachidonic and palmitic acid concentrations—FCS containing medium—

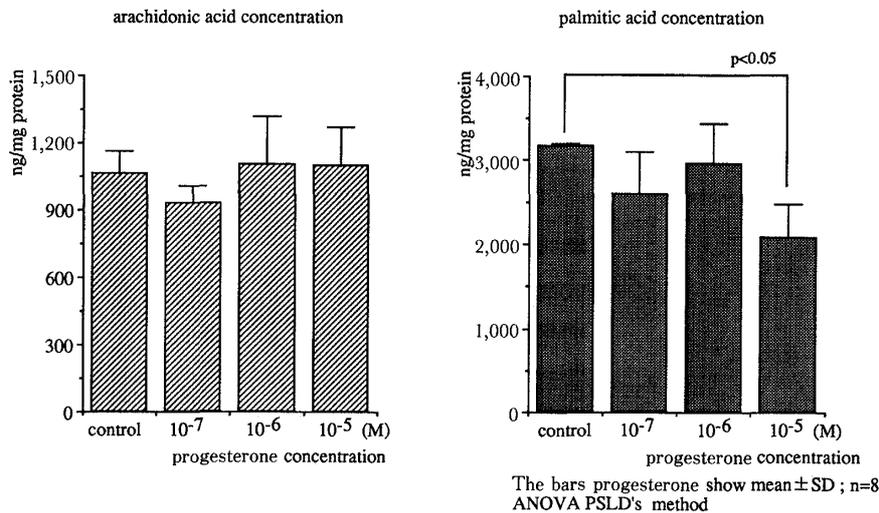


図2 Progesterone effect on myometrial cytosolic arachidonic and palmitic acid concentrations—FCS containing medium—

対し、いずれの濃度においても有意差は認められなかった。一方 palmitic acid 濃度は、control の 3,163ng/mg protein に対し、 10^{-5} M 添加群では 2,082 と有意な減少が認められた (図 2)。

2) FCS 非存在下における F, P の作用

0.4% fatty acid free albumin を含む medium において 24 時間 10^{-7} ~ 10^{-5} M の F を負荷した細胞における細胞内 arachidonic acid 濃度は、control の 275ng/mg protein に対し、 10^{-6} ~ 10^{-5} M 添加群ではそれぞれ 342, 562ng/mg protein と濃度依存性の増加傾向を示し、 10^{-5} M 添加群において有意差を認めた。同様に palmitic acid に関して

も control の 1,631ng/mg protein に対し 10^{-5} M 添加群においては 3,089 と有意な増加を認めた (図 3)。

また、 10^{-7} ~ 10^{-5} M の P を負荷した細胞における細胞内 arachidonic acid 濃度および palmitic acid 濃度を測定した結果、F 添加時と同様、 10^{-5} M 添加群において両脂肪酸の有意な細胞内増加を認めた (図 4)。

2. oxytocin 刺激時遊離脂肪酸濃度に関する成績

0.4% fatty acid free albumin を含む medium において 24 時間 10^{-7} ~ 10^{-5} M の F および P を負

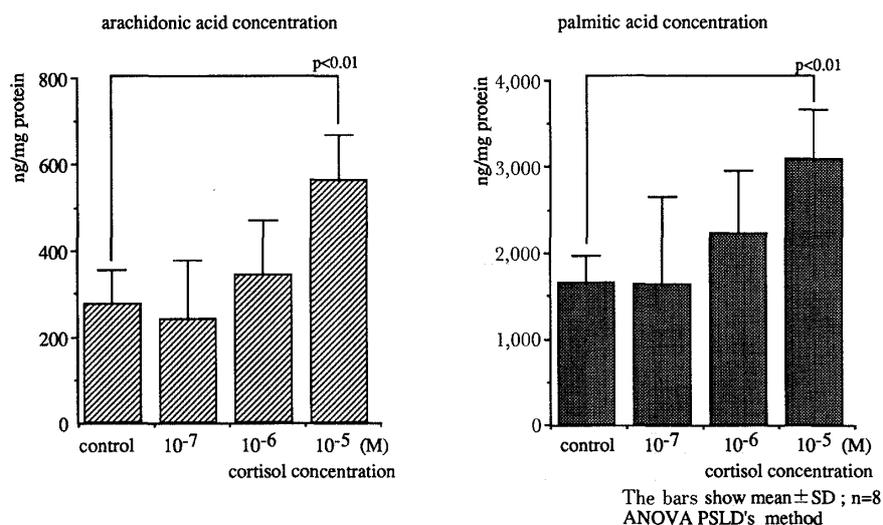


図3 Cortisol effect on myometrial cytosolic arachidonic and palmitic acid concentrations—0.4% fatty acid free albumin containing medium—

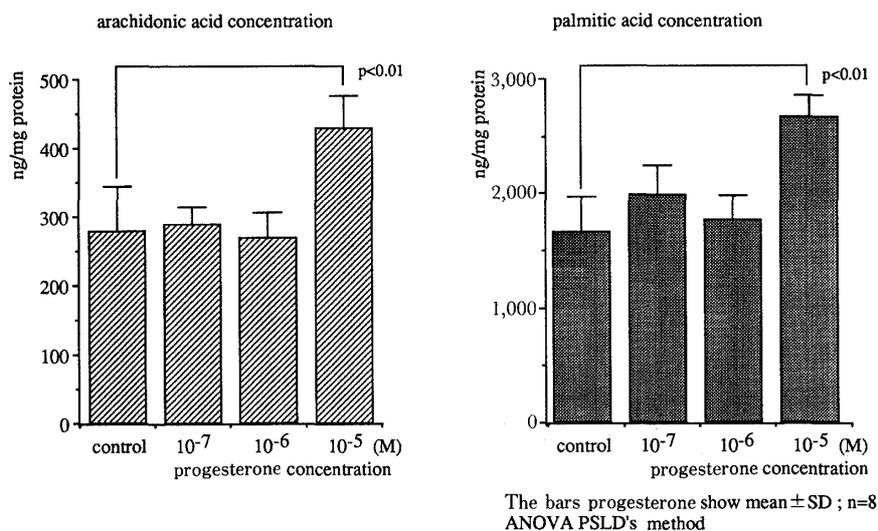


図4 Progesterone effect on myometrial cytosolic arachidonic and palmitic acid concentrations—0.4% fatty acid free albumin containing medium—

荷した細胞に、10⁻⁸Mの oxytocin を添加し、30秒後における細胞内遊離脂肪酸濃度を測定した結果、F添加群ではいずれの濃度においても細胞内 arachidonic acid 濃度の変動は認められなかった。一方 palmitic acid 濃度は F 添加により 10⁻⁶M 以上において減少傾向を示し、有意差は 10⁻⁶M 添加群において認められた (図 5)。

また、同様に P 添加細胞における oxytocin の作用を検討した結果、細胞内 arachidonic acid 濃度は、control の 603ng/mg protein に対し、P10⁻⁷

～10⁻⁵M 添加群ではそれぞれ 337, 329, 229ng/mg protein と oxytocin 非添加群以下にまで著明に減少することが確認された。また palmitic acid も、control の 3,492ng/mg protein に対し、P10⁻⁷～10⁻⁵M 添加群ではそれぞれ 2,494, 2,419, 1,744 ng/mg protein と有意な減少が確認された (図 6)。

考 察

近年、各種細胞内情報伝達系の研究に伴い、膜構成磷脂質の分解に伴う各種脂肪酸の遊離機転

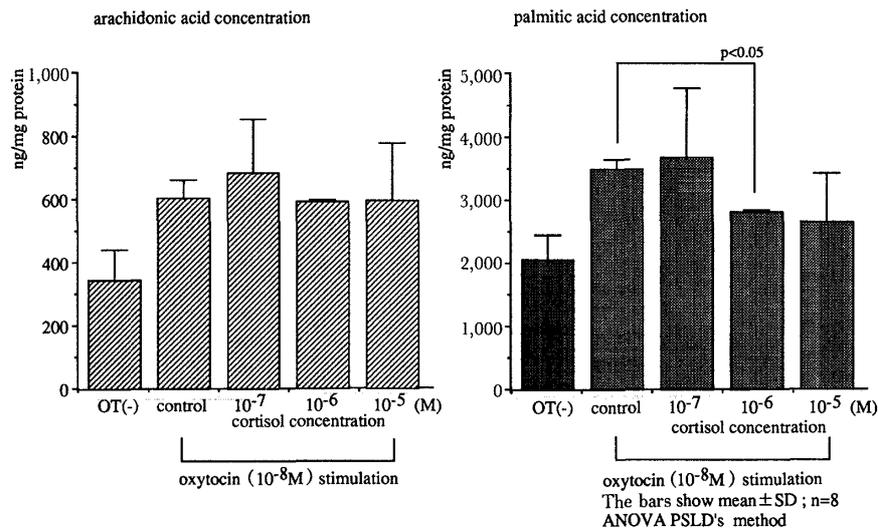


図5 Cortisol effect on myometrial cytosolic arachidonic and palmitic acid concentrations after 30 seconds oxytocin (10^{-8} M) stimulation

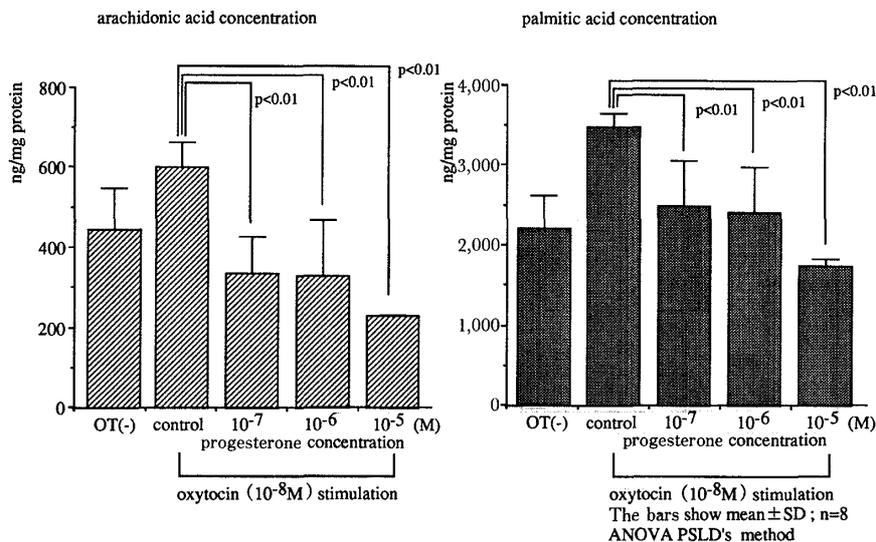


図6 Progesterone effect on myometrial cytosolic arachidonic and palmitic acid concentrations after 30 seconds oxytocin (10^{-8} M) stimulation

は、acyl化による膜の再構成のみならず、arachidonic acid cascade 活性化の律速段階として、引き続き生理活性物質産生機構の重要な位置にあるものと考えられるようになった。細胞膜よりの脂肪酸遊離機構としては、oxytocinなどの各種 agonist 刺激に伴う PI-PLC を介する系と、PLA₂ を介する系が知られており⁶⁾、これら相互協調により細胞内情報伝達系が制御されているものと考えられている。現在、一般的には細胞内脂肪酸濃度は非常に低値であり、各種 agonist 刺激が加

わった際に急速に遊離されるものと考えられているが、agonist 刺激を伴わない子宮筋においても多量の prostaglandin の産生が認められていること⁷⁾、さらに Bonney and Wong⁸⁾が子宮筋において Ca 濃度非依存性の高分子細胞内在型 PLA₂ の存在を報告していることより、子宮筋細胞においても細胞内への脂肪酸の遊離機構は、常に発現しているものと考えられる。

我々は以前よりステロイドホルモンの子宮筋収縮に及ぼす作用を細胞内情報伝達系の点より検討

しており、現在までに prostaglandin 産生に関し P, F, DHAS がその非刺激群ならびに oxytocin 刺激時において産生量調節因子として作用することを報告してきた⁴⁾。細胞内脂肪酸遊離と各種ステロイドホルモンとの関連性に関し, Morishita et al.⁹⁾は Rabbit の卵管上皮における PLA₂活性に対し, P は抑制的に, また estradiol は促進的に作用することを報告しており, また Casper et al.¹⁰⁾は rat mesangial cell において, IL-1による PLA₂の活性化に対し, dexamethazone は阻害作用を有することを報告している。しかしながら膜構成磷脂質の脂肪酸分子種の定常化には24時間以上必要とすることが知られており, 既報の数時間の isotope 取り込みによる成績は, 生理的膜構造における実験系とは異なることが予測される。そこで今回我々は, HPLC を用い, prostaglandin の前駆物質である arachidonic acid と, 膜構成脂肪酸の主因子である palmitic acid の細胞内濃度を, 培養ヒト子宮筋細胞を用いて検討した。

培養細胞に各濃度の F, P を添加することによる細胞内 arachidonic acid, palmitic acid 濃度の変動を検討した結果, 細胞外に十分な脂肪酸供給源の存在する FCS 存在下における arachidonic acid 濃度は, いずれのステロイドホルモン投与においても有意な変動は認められなかった。一方 palmitic acid 濃度は F10⁻⁷M および P10⁻⁵M 存在下において有意な減少を認めた。この減少は FCS 非存在下において認められなかったことより, 細胞外より膜への取り込みに対し抑制的な作用を示したものと考えられるが, この作用が濃度依存性を示さなかったことより今後の検討が必要と考えられる。

次に, 外部よりの脂肪酸の供給が行われない FCS 非存在下で作用を検討した結果, F では両脂肪酸濃度に関し濃度依存的な増加は認められるものの, 10⁻⁵M の非生理的高濃度においてのみ有意差が確認された。一般的に F は PLA₂阻害により脂肪酸遊離を抑制するものと考えられていたが, 今回の成績はこれとは異なるものであった。この要因としては, PLA₂の isoform の相違が主因であるものと考えられ, 現在酵素誘導に関し検討中

である。一方, P に関しては10⁻⁶M 以下では変動は認められず, 10⁻⁵M においてのみ著明な増加が確認された。この要因に関しては不明であるが, 本来生体内ではあり得ない高濃度であることより, 薬理学的見地より現在検討中である。

一方, oxytocin 添加における脂肪酸濃度を検討した結果, F 添加細胞における arachidonic acid 濃度は, FCS 非存在下非刺激群において増加を示した10⁻⁵M を含むすべての濃度において control との差は認められなかった。一方, palmitic acid は F10⁻⁵M 添加群が FCS 非存在下において著明な増加を示したことを考慮すると, 濃度減少作用を有するものと考えられる。またこの減少要因としては, 膜よりの遊離の減少あるいは膜より一旦遊離された palmitic acid の再取り込みの促進が関与しているものと考えられる。今回の成績の中で最も興味深いのは P 添加細胞における oxytocin の作用であり, 濃度依存性の著明な濃度減少が確認された。oxytocin による脂肪酸遊離機構としては, 主として PLC, DG lipase の二つの酵素を介する系が考えられており, P はこれらの代謝酵素活性に対し抑制的な作用を有するものと考えられる。

これら F, P の作用に関しては, 今後各々の酵素誘導および膜取り込み作用に関する検討が必要であるが, 今回の成績は F, P が情報伝達系に関与する脂肪酸の, 細胞内濃度調節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と考えられる。

文 献

1. Schrey MP, Cornford PA, Read AM, Streer PJ. A role for phosphoinositide hydrolysis in human uterine smooth muscle during parturition. *Am J Obst Gynecol* 1988; 159: 964-970
2. Ahmad K, Colin TJ. Change in phospholipase A₂ in myometrium of the guinea pig uterus during pregnancy. *J Developmental Physiology* 1992; 18: 271-277
3. Nalefski EA, Sultzman LA, Martin DM, Kriz RW, Towler PS, Knopf JL, Clark JD. Delineation of two functionary distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca²⁺-dependent lipid-binding domain and Ca²⁺-independent catalytic domain. *J Biol Chem*

- 1994; 269: 18239—18249
4. 森本圭子, 奥 正孝, 足立 聡, 藤井絵里子, 大月知子, 一條元彦. 各種ステロイドホルモンのPGE₂産生および代謝に及ぼす影響. *Journal of Smooth Muscle Reserch* 1991; 27: 361—363
 5. 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
 6. Poyser NL. Effect of various factors on prostaglandin synthesis by the guinea-pig uterus. *J Reprod Ferti* 1987; 81: 269—276
 7. Les WM, Paul CM, Leon MM, Linette C. Prostacyclin biosynthesis by cultured human myometrial smooth muscle cells: Dependency on arachidonic or linoleic acid in the culture medium. *Am J Obstet Gyencol* 1988; 159: 1365—1372
 8. Bonney RC, Wong W. The measurement of phospholipase A₂ activity in human myometrium: Physiological and pathological implications. *Prost Leuk Essen Fatty Acid* 1988; 34: 1—8
 9. Morishita T, Nozaki M, Sano M, Yokoyama M, Nakamura G-I, Nakano H. Change in phospholipase A₂ activity of rabbit ampullary epithelium by ovarian steroids. *Prost Leuk Essen Fatty Acid* 1993; 48: 315—318
 10. Casper GS, Margriet V, Pfeilschifter J, van den Bosch H. Interleukin-1 β -induced cytosolic phospholipase A₂ activity and protein synthesis is blocked by dexamethazone in rat mesangial cells. *Fed Eur Biochem Soc* 1993; 333: 339—343 (No. 7626 平7・3・17受付)
-