

シンポジウム1 子宮収縮機能とその制御

## G 蛋白結合受容体を介する子宮抑制因子とその制御

昭和大学医学部産科婦人科

盛 本 太 郎

### Regulation of Uterine Quiescence and Contraction through G-protein Coupled Receptors

Taro MORIMOTO

*Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, Tokyo*

**Key words :** G-protein · Parturition · Uterus · Receptor

#### はじめに

##### 1. 研究の背景と目的

本研究では子宮筋収縮機構を検討するにあたりヒト分娩発来機序の解明を目的として実験を行った。図1には MacDonald が提唱した分娩発来の概念図を示すが<sup>1)</sup>、重要なことは分娩発来と陣痛発来のタイミングが異なることであり、妊娠中安静を保っていた子宮筋が陣痛と定義される律動的な収縮を引き起こすまでの間に phase 1 と呼ばれる期間が存在することである。すなわち、妊娠末期、陣痛発来直前の時期に子宮環境で起きている変化の開始が分娩発来であり、一度その変化が起きるといえば坂道をころがり落ちるように陣痛発来・分娩へと推移していくものと思われる。したがって phase 1 での変化を捉えることが分娩発来機序を研究するうえでは重要と思われるが、ヒトでは検体の採取が困難であることに加え、phase 0 から phase 1 への移行を明確にすることは不可能である。一方、陣痛の有無によれば、症例を2群に分けることは可能であるが、分娩進行中に子宮局所で産生される大量の炎症性サイトカインやプロスタグランジンのために陣痛発来後の症例で認められた変化が分娩発来の原因を表しているのか、陣痛が存在したことによる結果としての変化なのかを判断することは困難である。今回の検討ではなるべく phase 1 における子宮筋での生化学的変化

を捉えることを一つの目的とした。

ヒト陣痛発来に向かい子宮筋局所ではオキトシン、プロスタグランジンなどの子宮収縮調節因子による受容体の刺激から細胞内情報伝達を経て子宮筋収縮に至る一連のカスケードが形成されていると考えられる(図2)。これら一連の変化に影響を及ぼすものとしては胎児成長に伴う子宮腔の物理的伸展や胎児胎盤系からのステロイドホルモンに代表される生理活性物質の産生が、関与しているものと思われるが、ヒトでは羊で証明されたような明確な分娩発来機序は証明されてはおらず<sup>2)~4)</sup>、それぞれのステップに関して更なる基礎的研究が必要であると考えられる。本研究では特に受容体からの刺激が子宮筋細胞に伝えられる過程において、多くの子宮収縮調節物質のシグナル伝達に関わる G 蛋白質に注目し検討を行った。

##### 2. 3量体 G 蛋白質共役受容体について

近年、生理活性物質受容体のクローニングが進んだ結果、細胞膜受容体がいくつかのグループに分けられ、そのなかでも受容体蛋白質が細胞膜を7回貫通するタイプの受容体ファミリーが存在することが明らかとなった。図3には受容体と G 蛋白質の模式図を示すが、7回膜貫通型受容体と共役する3量体 G 蛋白質は分子量の大きい順に  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の3つのサブユニットから構成される。G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットは定常状態では GDP と

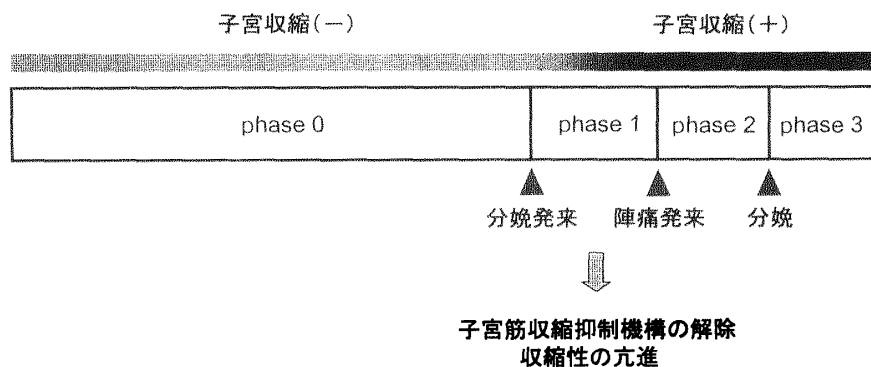
(PC MacDonald et al.<sup>1)</sup> 改変)

図1 分娩発来からみた妊娠各期間

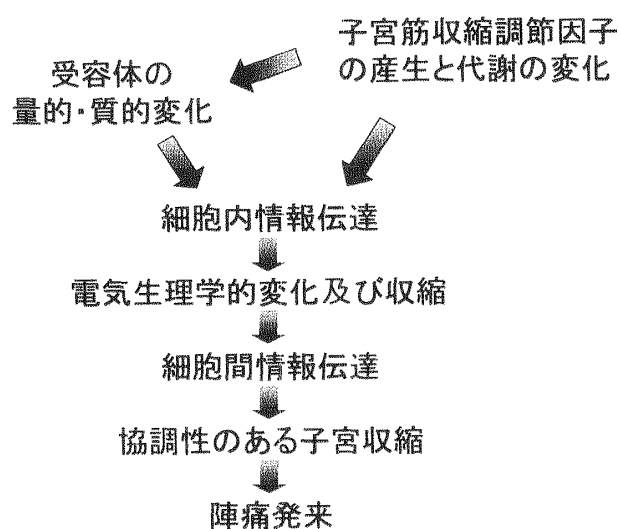


図2 陣痛発来へ向けてのカスケード

結合しているが受容体がアゴニストで刺激を受けると  $\alpha$  サブユニットは活性化され GDP と GTP を交換する。GTP が結合した  $\alpha$  サブユニットは  $\beta$ ,  $\gamma$  サブユニットから解離しアデニル酸シクラーゼ、フォスホリパーゼ C などの活性化を介し刺激の伝達を行うとされる(図4)<sup>5)6)</sup>。

最近,  $\beta$ ,  $\gamma$  サブユニットの生理作用も報告されているが<sup>7)</sup>, 7回膜貫通型受容体を介する情報伝達には G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットが最も重要であると考えられる。

興味深いことに図5に示したようにオキシトシン<sup>8)</sup>, プロスタグランジン F2 $\alpha$ <sup>9)</sup>, 血小板活性化因子<sup>10)</sup>などの子宮筋収縮因子をはじめとして,  $\beta$ -作動薬<sup>11)</sup>, プロスタサイクリン<sup>12)</sup>, 副甲状腺ホル

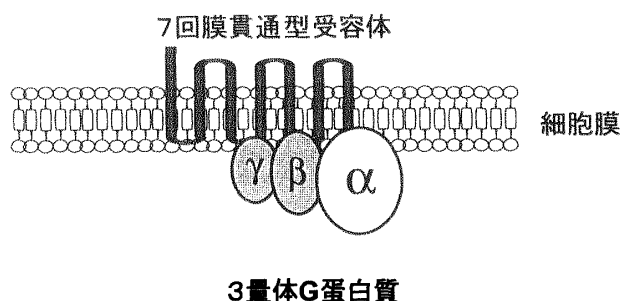


図3 7回膜貫通型受容体と共役する3量体G蛋白質

モン関連蛋白 (PTHrP)<sup>13)</sup> などの子宮筋弛緩因子など, 従来, 子宮筋の収縮や弛緩に関与するといわれていた物質の多くの受容体が, この7回膜貫通型受容体ファミリーに属している。G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットには多くのサブタイプが存在することが知られているが<sup>14)</sup>, 特に  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha q}$  サブユニットが子宮筋の収縮調節には重要と思われる。すなわち,  $G_{\alpha s}$  サブユニットを有する G 蛋白質と共役している受容体にリガンドが結合すると  $G_{\alpha s}$  サブユニットは GTP と結合し,  $\beta$ ,  $\gamma$  サブユニットから離れ, アデニル酸シクラーゼに結合し活性化させる。アデニル酸シクラーゼは ATP から cAMP の産生を触媒するが, 細胞内 cAMP 濃度が上昇すると細胞内  $Ca^{2+}$  の低下, ミオシン軽鎖リン酸化酵素の不活性化などを介し, 子宮筋は弛緩することが知られている。一方,  $G_{\alpha i}$  と共役した受容体が刺激を受けると, 活性化した  $G_{\alpha i}$  はアデニル酸シクラーゼの  $G_{\alpha s}$  結合部位に

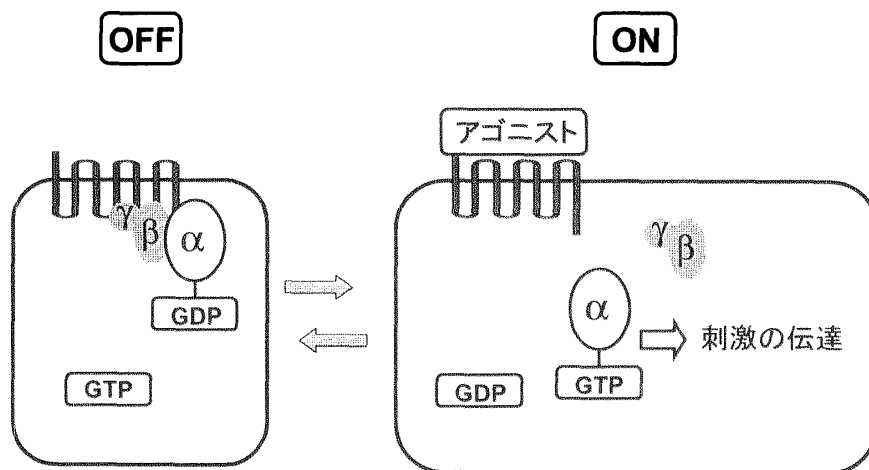


図4 3量体G蛋白質と情報伝達

収縮への関与が報告されているもの

弛緩への関与が報告されているもの

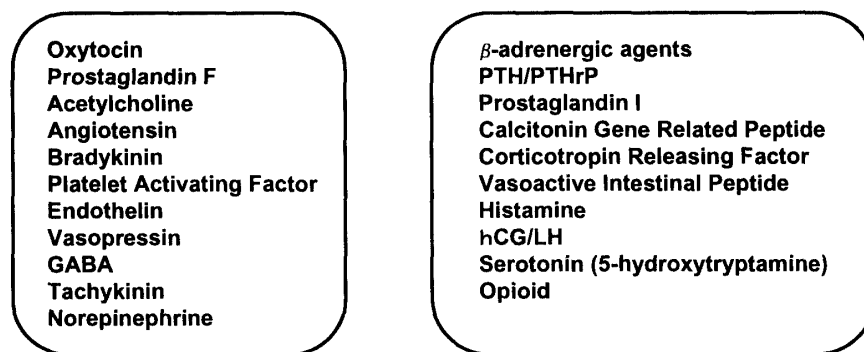


図5 7回膜貫通型G蛋白質共役受容体を介する子宮収縮調節因子

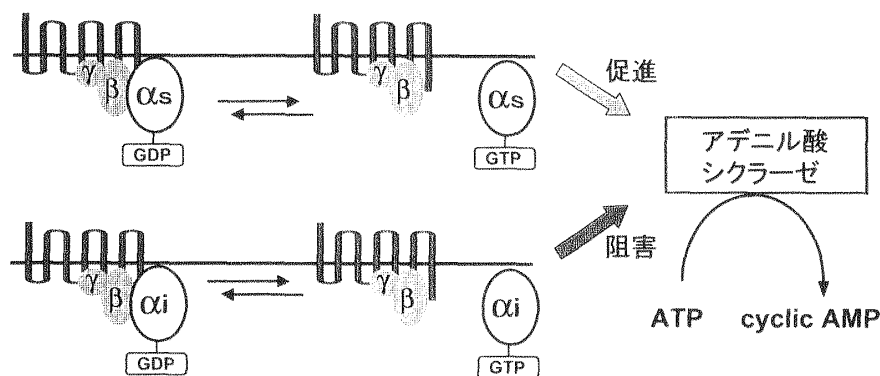


図6 G蛋白質共役受容体と細胞内情報伝達

競合的に結合し、アデニル酸シクラーゼ活性を低下させる。したがって  $G_{\alpha i}$  が活性化されると子宮筋の場合は収縮の方向に働くと考えられる(図6)。また、 $G_{\alpha q}$  が活性化された場合、 $G_{\alpha q}$  はフォスホリパーゼ C と結合し活性化することが知

られている。フォスホリパーゼ C はイノシトールリン脂質をイノシトールリン酸とダイアシルグリセロールに加水分解し、小胞体からのカルシウムイオンの放出を促進、C キナーゼを活性化することが知られており(図7)、 $G_{\alpha q}$  サブユニットが

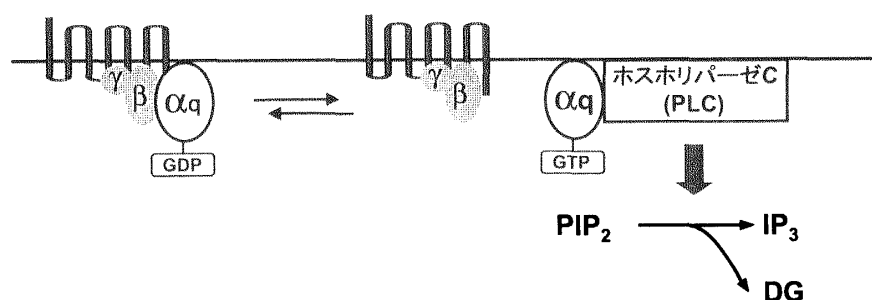


図7 G 蛋白質共役受容体と細胞内情報伝達

活性化されると子宮筋は収縮の方向に働くと考えられる。以上のように受容体と共役した G 蛋白質はリガンド刺激による細胞内情報伝達への接点であり、異なるリガンドと受容体からの刺激も G 蛋白質という共通の刺激伝達分子により情報伝達が行われていることが、特徴的である。これまでも、7 回膜貫通型受容体を介する子宮筋収縮調節物質に関しては多くの報告がなされているが、共通の刺激伝達物質である G 蛋白質を中心とした子宮筋収縮調節機構に関しては不明な点も多い。そこで今回、G 蛋白質共役受容体を介する子宮収縮調節因子、とくに収縮の抑制に働いている因子の情報伝達に関し検討を加えた。

なお、今回の実験にあたり帝王切開時に得られたヒト子宮筋を検体として用いたが、検体の採取と実験にあたってはテキサス大サウスウェスタンメディカルセンターおよび昭和大学医学部倫理委員会の承認のもと患者さんより同意を得たうえで行った。

## 方 法

1. ヒト妊娠子宮組織：妊娠36週から42週に帝王切開となった97症例において患者さんの同意のもと帝王切開時子宮体部下切開創上縁より子宮平滑筋を採取した。症例の内訳は陣痛発来後帝王切開となった24例(IL 群)と陣痛未発来の選択的帝王切開症例54例(NL 群)であった。

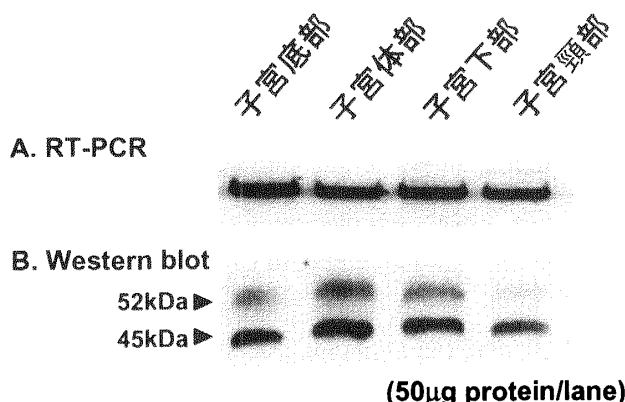
2. G 蛋白質 α サブユニット蛋白質及び mRNA 発現の検討：子宮筋組織をポリトロンにてホモジネート後、分別遠沈にて膜標本を作成しウエスタンブロット法にて G 蛋白質 α サブユニットの同定を行った。また、子宮筋組織から total RNA を抽

出し、RT-PCR 法にて  $G\alpha s$ ,  $G\alpha i$ ,  $G\alpha q$  mRNA 発現の同定を行った。

3. G 蛋白質活性の測定：子宮筋組織より調整した細胞膜標本を、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  の存在下にリガンドと共にインキュベートし、反応終了後、ガラスフィルターを用いてバウンドとフリーの放射性 GTP を分離し、リガンド刺激による  $G\alpha$  サブユニットの活性化を測定した。また、活性化された G 蛋白質 α サブユニットサブタイプを認識するために、細胞膜標本をリガンドにて刺激し、活性化された G 蛋白質 α サブユニットを  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP azidoanilide}$  にて標識した。紫外線照射にてクロスリンクを行った後、各 α サブユニット特異的抗体にて免疫沈降を行い、SDS-PAGE にて分離した。それぞれの G 蛋白質 α サブユニットに一致するバンドの放射活性を phosphorimager により測定した。

4. mRNA 発現の評価：mRNA 発現は competitive RT-PCR 法と Northern blot 法を用いた。Competitive RT-PCR 法では目的遺伝子と同一のプライマーで増幅される50から100bp 長さの異なる competitor RNA を合成し、既知量の competitor RNA をサンプル中に加え RT-PCR を行い、あらかじめ作成した検量線から目的遺伝子のコピー数を算出した。同様に β-アクチンの測定も行い、サンプル間の補正を行った。

5. マクロアレイ：クロンテック社 ATLAS システムを用いて実験を行った。2 群のサンプルより poly A<sup>+</sup> RNA を抽出し cDNA の合成と同時に  $^{32}\text{P}$  によりラベリングを行い、2 つの群から作成されたプローブをそれぞれ human 1.2II メンブレン

図8 ヒト妊娠子宮筋組織での  $G\alpha s$  発現

とハイブリダイズした。結果は phosphorimager と Array Vision を用いて解析し、両者のシグナル強度に4倍以上の差が認められたものを2群間で発現の異なる遺伝子の候補とした。

6. 培養子宮平滑筋を用いたアデニル酸シクラーゼ活性測定：ヒト子宮平滑筋初代培養細胞に PTHrP, オキシトシン等のリガンドを添加し、細胞内 cAMP 濃度の変化を Biotrack cAMP EIA system にて測定した。

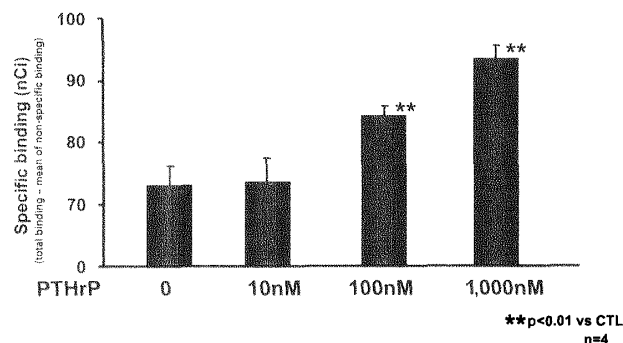
今回の実験を行うにあたり、子宮筋収縮抑制因子もしくは収縮因子を用い G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの機能の解析を行ったが収縮抑制因子としては PTHrP を、収縮因子としてはオキシトシンを主に用いた。

### 結果及び考察

#### 1. ヒト妊娠子宮筋での G 蛋白質 $\alpha$ サブユニットの発現

妊娠38週に前置胎盤にて帝王切開を行い、癒着胎盤にて子宮全摘を行った症例より得た子宮筋より細胞膜分画、RNA を抽出し G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの発現に関して検討した。RT-PCR にて  $G\alpha s$  サブユニット mRNA の発現が認められ、ウェスタンブロットでは45kDa と52kDa に  $G\alpha s$  蛋白の発現を認めたが、子宮頸部に比し、体部に強い発現を認めた(図8)。免疫組織染色においても子宮平滑筋に  $G\alpha s$  の局在を認めた。

$G\alpha q$ ,  $G\alpha i$  サブユニットに関しても同様の検討を行ったが、 $G\alpha q$ ,  $G\alpha i$  mRNA, 蛋白共に主に子宮体部筋での発現が認められた。

図9 子宮筋細胞膜 G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットへの  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  結合に対する PTHrP の影響

#### 2. 子宮筋収縮調節因子による G 蛋白質活性化

ヒト妊娠子宮筋での G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの発現が確認されたが、これらの G 蛋白質が、リガンドの刺激により活性化されるかどうかについて検討を加えた。子宮筋細胞膜標本を PTHrP で刺激したことによる G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットへの GTP 結合性の変化を検討したところ、PTHrP 添加により G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットへの GTP 結合性の増加が認められた(図9)。同様にオキシトシン添加によっても G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットへの GTP 結合性の増加が認められ、これらのリガンドが G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの活性を増加することにより情報伝達を行っていることが示された。以上の実験手法は多数の検体を用いて G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの活性化を測定するのには適しているが、G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットのうち  $G\alpha s$ ,  $G\alpha i$ ,  $G\alpha q$  のどのサブタイプが活性化されたかを判別することは不可能である。そこで、各 G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットに特異的な抗体を用い免疫沈降を行うことによりサブタイプに特異的な活性化を検討した。図10に示したように PTHrP 添加により抗  $G\alpha s$  抗体で沈降される放射活性が強くなっており、このことは PTHrP 添加により子宮筋細胞膜  $G\alpha s$  サブユニットへの GTP の結合が増加したことを示している。一方、抗  $G\alpha q$ , 抗  $G\alpha i$  抗体で沈降される放射活性は PTHrP の有無により差を認めなかったことから子宮筋での PTHrP の作用は主に  $G\alpha s$  を介していることが示された。同様にオキシトシンの添加によっても  $G\alpha q$  サブユニットへの GTP 結合性が増加した。以上よりヒ

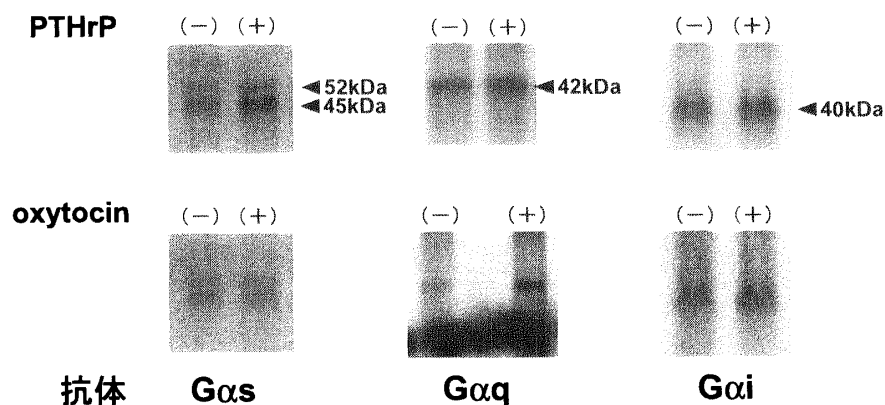


図10 アゴニストにより活性化されたG蛋白質 $\alpha$ サブユニットの免疫沈降を用いた同定

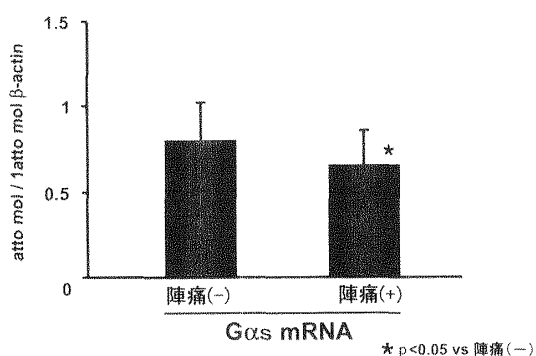


図11 子宮筋組織でのG $\alpha$ s mRNA発現と陣痛の関連

ト子宮筋においてPTHrPやオキシトシンなどの7回膜貫通型受容体のリガンドは特異的なG蛋白質 $\alpha$ サブユニットを介して情報伝達を行っていることが示された。

### 3. G蛋白質発現及び活性と子宮筋収縮性との関連

妊娠38週から41週までの間に行われた78例の帝王切開症例において、G蛋白質 $\alpha$ サブユニットの発現や活性と子宮筋の収縮性の関連性を検討した。

まず、子宮筋組織よりRNAを抽出しG蛋白質 $\alpha$ サブユニットmRNA発現をcompetitive RT-PCR法にて行ったところ、G $\alpha$ s mRNA発現は陣痛のなかった症例に比べ、陣痛のあった症例において有意に低下していた(図11)。一方、G $\alpha$ q、G $\alpha$ i mRNAの発現量は陣痛の有無により差を認めなかった。ウェスタンブロットによる検討において

も、陣痛発来後帝王切開となった症例では陣痛発来前の症例に比べ、G $\alpha$ s蛋白の発現が低下していた。以上より陣痛発来後の子宮筋ではG $\alpha$ sサブユニットの発現が低下していることが明らかになったが、さらに陣痛発来前に帝王切開となった症例の群分けを試み、陣痛発来前にG $\alpha$ sサブユニットの発現が変化している可能性について検討した。選択的帝王切開症例において手術当日の朝に外計測法にて40分間子宮収縮をモニターし子宮収縮が認められなかった群をNL(-)群とし、1回以上認められたものをNL(+)群とした。また、陣痛発来後帝王切開となった症例をIL群とした。興味深いことに陣痛発来前であっても子宮収縮が認められた群はすでに陣痛発来後と同レベルまでG $\alpha$ s mRNAの発現が低下していた。さらに子宮筋細胞膜でのG $\alpha$ sサブユニット活性を検討したところ、陣痛発来前に子宮収縮が認められた症例ではPTHrPによりG $\alpha$ sサブユニットへのGTP結合促進作用が子宮収縮を認めなかった症例に比し低下していることが示された。今回の結果より、陣痛発来直前の子宮筋でのG $\alpha$ sサブユニットの発現と機能の低下がG $\alpha$ sを介する子宮筋収縮抑制物質の情報伝達の効率を低下させ、ひいては子宮筋収縮抑制の解除に働いている可能性が示唆された(図12)。

### 4. マクロアレイを用いた子宮筋収縮に関与する遺伝子の検討とregulator of G-protein signaling (RGS)発現の検討

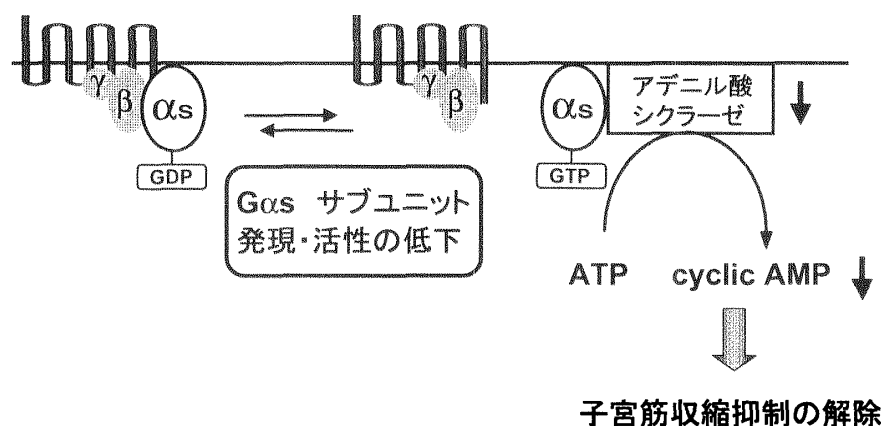


図12 Gαs 発現・活性の低下と子宮筋収縮抑制の解除

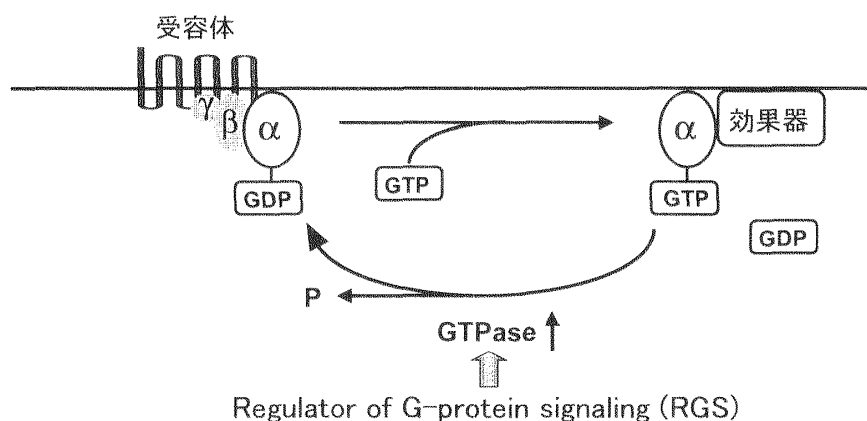


図13 受容体刺激による G 蛋白質活性化と GTPase, RGS による不活化

陣痛発来前で子宮収縮の認められた群と認められなかった群での遺伝子発現の相違をマクロアレイを用いて検討したところ、いくつかの候補が抽出されたが、特に、RGS に注目し検討を行った。RGS は1996年に酵母と線虫において発見され<sup>15)</sup>、G 蛋白質シグナル伝達系の負の調節因子と考えられている。G 蛋白質共役受容体が刺激を受けると G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットは GDP と GTP の交換反応を行うことにより活性化され情報伝達を行うが、このシグナルが ON のままでは生体にとって不都合であるので、活性化された G 蛋白質  $\alpha$  サブユニット自身も GTP 加水分解酵素の働きにより GTP は GDP となり定常状態に戻るとされる (図13)。RGS は G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの GTP 加水分解活性を促進し、G 蛋白質を介するシ

グナル伝達を調節していると考えられている。RGS は主に  $G\alpha_q$  と  $G\alpha_i$  サブユニットの不活性化を行うことが知られており、 $G\alpha_s$  に対しては作用が認められないとする報告が多い<sup>16)17)</sup>。RGS には現時点で20数種類のサブタイプが存在し、その発現には組織・部位特異性を認めるが<sup>18)</sup>、それぞれの生理的意義はまだ明らかではない。しかし、一部の癌や神経疾患において RGS 遺伝子の変異が報告されている<sup>19)</sup>。生殖生理の領域において RGS に関する研究報告は少ないが Tashima et al.<sup>20)</sup> は早産前期破水の経膈分娩例と帝王切開例の卵膜でサブトラクション RT-PCR 法を行い両群の遺伝子発現の差を検討したところ早産前期破水例で RGS の発現が増強していたことを報告している。

RGS のヒト子宮筋での発現に関しては報告が

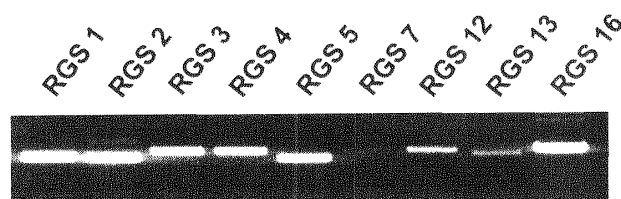


図14 ヒト子宮筋組織での RGS mRNA の発現

ないため、まず RT-PCR 法にて RGS サブタイプ mRNA の発現を検討したところ、いくつかの RGS サブタイプの発現がヒト子宮筋で認められた(図14)。さらに子宮収縮性と RGS 発現について competitive RT-PCR 法にて検討したところ、RGS2 及び RGS16 では陣痛発来前で子宮収縮のなかったものに比べ、子宮収縮の認められた症例では RGS mRNA 発現が有意に増加していた。興味深いことに両者とも子宮収縮が認められた群での RGS 発現は陣痛発来後の群とは差を認めなかった。

RGS が G 蛋白質による情報伝達の制御を介し子宮収縮にどのように関与しているかは不明だが、RGS が主に  $G\alpha_q$  と  $G\alpha_i$  サブユニットの不活性化に関与していることを考えると子宮筋収縮因子の作用が過度にならないよう調節しているとも考えられる。

#### 5. アデニル酸シクラーゼ活性からみた G 蛋白質機能調節

次いで、培養子宮筋細胞でのアデニル酸シクラーゼ活性を指標として子宮筋収縮抑制因子の G

蛋白質を介する情報伝達の調節因子を検討した。

培養子宮筋細胞に PTHrP を添加し15分間インキュベーションしたところ、PTHrP は濃度依存性に細胞内 cAMP 濃度を増加させた(図15)。一方、PTHrP による cAMP 増加作用は PTHrP 受容体アンタゴニストである PTHrP(7~34)amide により阻害を受けた<sup>21)</sup>。以上とこれまでの実験結果から PTHrP が受容体に結合し  $G\alpha_s$  サブユニットの活性化を介しアデニル酸シクラーゼ活性を増加させるという一連の情報伝達経路が示された。基礎実験では他の子宮筋収縮抑制因子であるプロスタサイクリン、イソプロテレノール、塩酸リトドリンも同様のメカニズムで細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが確かめられたが、in vitro の実験を行ううえで PTHrP による作用が最もばらつきが少なく安定していたので、以後の実験では PTHrP が培養子宮筋細胞での細胞内 cAMP を増加させる作用を modulation している物質に関して検討した。培養子宮筋細胞を各種生理活性物質とプレインキュベーションした後 PTHrP を添加し細胞内 cAMP 濃度を測定し生理活性物質が PTHrP のアデニル酸シクラーゼ活性増加作用に及ぼす影響を検討した。

培養子宮筋細胞をサイトカイン、成長因子にて30分間前培養を行った後、PTHrP を添加すると、TGF- $\beta$  とのプレインキュベーションにより PTHrP のアデニル酸シクラーゼ活性促進作用は

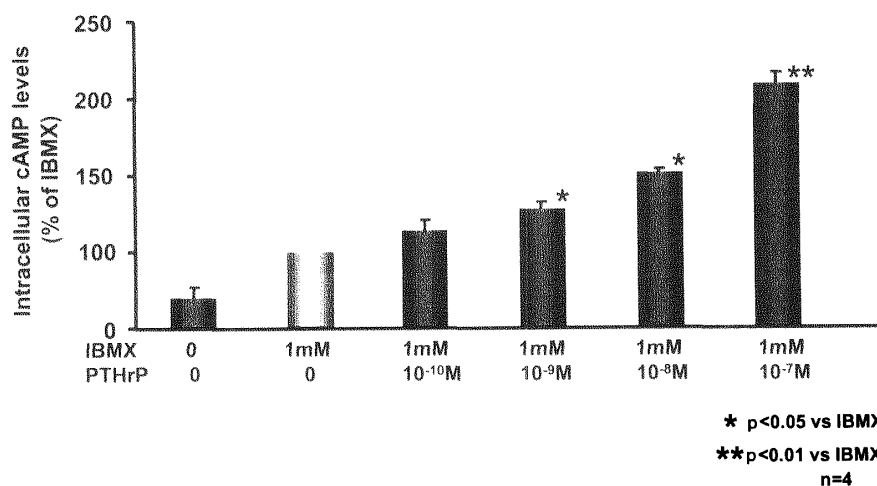


図15 培養子宮筋細胞での細胞内 cAMP 濃度に及ぼす PTHrP の影響



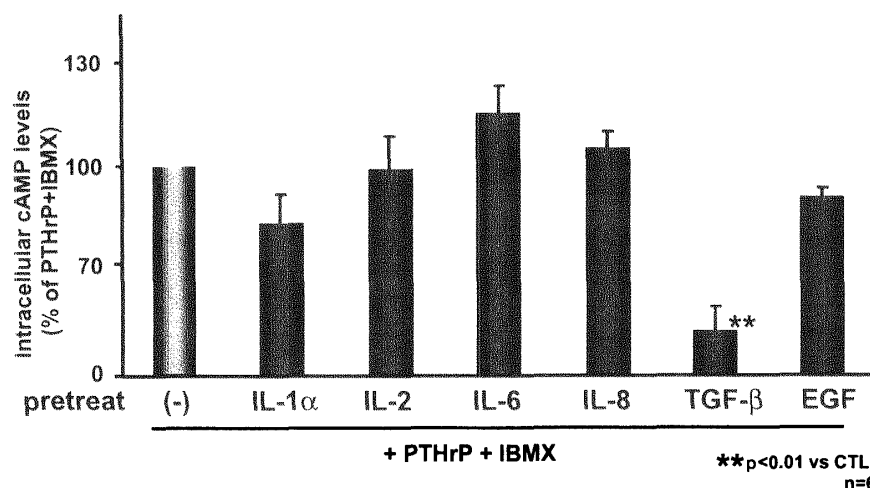


図16 PTHrPによる細胞内cAMP増加効果に対する生理活性物質の作用

有意に抑制された(図16)。このことからTGF-βがPTHrP受容体からG蛋白質αサブユニットを介し、アデニル酸シクラーゼに至る情報伝達経路を修飾している可能性が示された。TGF-βの作用はPTHrPと同様にG蛋白質共役受容体を介し、子宮筋弛緩作用を有することが知られているカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)のアデニル酸シクラーゼ促進効果に対しても認められた。Gαsサブユニットを介してアデニル酸シクラーゼ活性を促進することにより子宮筋収縮抑制を行っているPTHrPとCGRPの作用が、共にTGF-βにより抑制を受けたことは、異なるリガンドの生理作用がG蛋白質αサブユニットの修飾により共通の制御を受ける可能性を示唆している。続いて、TGF-βの作用に関しさらに検討を加えた。百日咳毒素はGαiサブユニットのシステイン残基をADPリボシル化することによりGαiの作用を阻害することが知られているが、TGF-βとのブレインキューベーション実験においてTGF-βの作用は百日咳毒素の添加により阻害を受けた(図17)。このことより、TGF-βがPTHrPのアデニル酸シクラーゼ活性を阻害した機序としてGαiを介する作用である可能性が示唆された。

以上の結果から妊娠末期子宮筋でのTGF-βの発現の変化を検討したが、TGF-β並びにTGF-β受容体の発現には子宮収縮の有無、陣痛の有無によって一定の傾向は認めなかった。そこで、TGF-

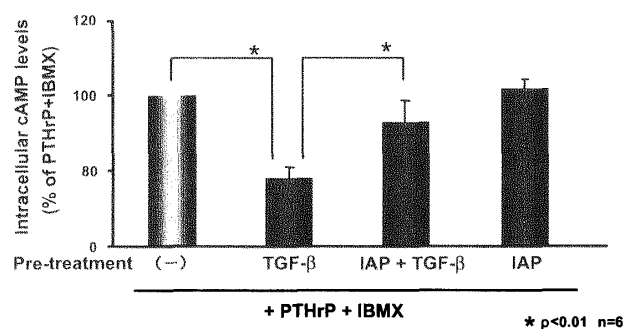


図17 百日咳毒素(IAP)によるTGF-βのPTHrP作用抑制効果の阻害

βの活性化因子としてのトロンボスポンジン1(TSP-1)に着目し検討を行った。TGF-βは細胞から産生される際、生理的に非活性の潜在型TGF-βとして分泌されるが、TSP-1は潜在型TGF-βの活性化作用を有することが知られている<sup>22)</sup>。妊娠子宮筋でのTSP-1発現を検討したところ、TSP-1 mRNAは陣痛発来後の症例において著明にその発現が増強しており<sup>23)</sup>、さらに陣痛発来前の帝王切開症例での子宮筋TSP-1 mRNAを測定したところ妊娠週数とともに発現量の増加が認められた(図18)。

以上より、妊娠末期子宮筋で発現の増加したTSP-1はTGF-βを活性型に変換し、さらにTGF-βはGαi活性を促進することにより競合的にアデニル酸シクラーゼ活性の抑制を行っている可能性が示唆され、これらの一連の変化により子宮筋

収縮抑制の解除が起きている可能性も考えられる(図19)。

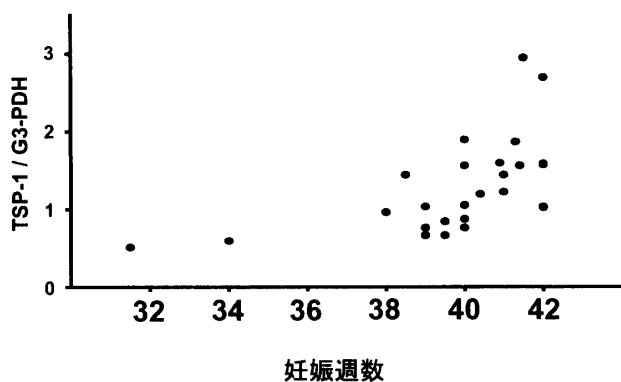


図18 陣痛発来前帝王切開症例における子宮筋組織での TSP-1 mRNA 発現

## 6. ステロイドホルモンによる G 蛋白質機能調節

ヒトでは Liggins et al.が羊で証明したようなプロゲステロン濃度の低下による分娩発来機構に関しては否定的である。しかし、矢内原<sup>24)</sup>は分娩発来前に同一人で16種類のステロイドホルモン値を追跡測定し多変量解析を行うと分娩発来15日前、8日前、分娩発来前日の3群におけるステロイド環境が異なっていることを報告しており、ヒトにおいても分娩前のステロイドホルモンは一定の規則性をもって変化し分娩発来に重要な役割を担っていると考えられる。

しかし、培養子宮筋細胞はエストロゲン受容体を欠失してしまうため<sup>25)</sup>培養系を用いてステロイ

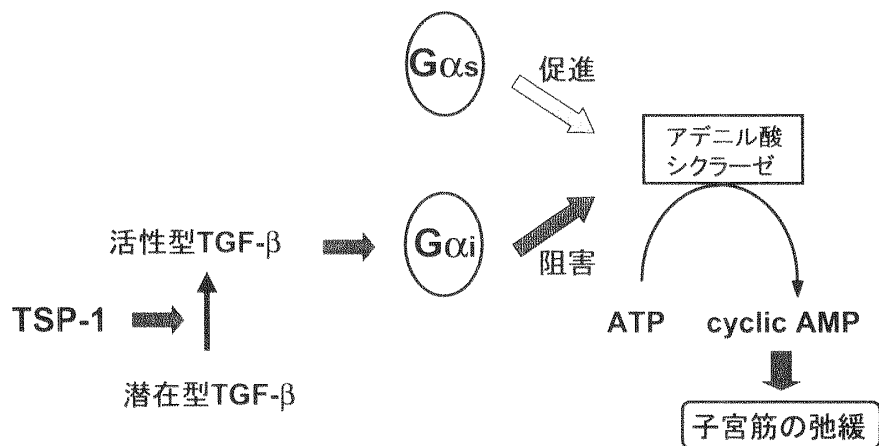


図19 TGF-β, Gαi を介する TSP-1によるアデニル酸シクラーゼ活性抑制作用

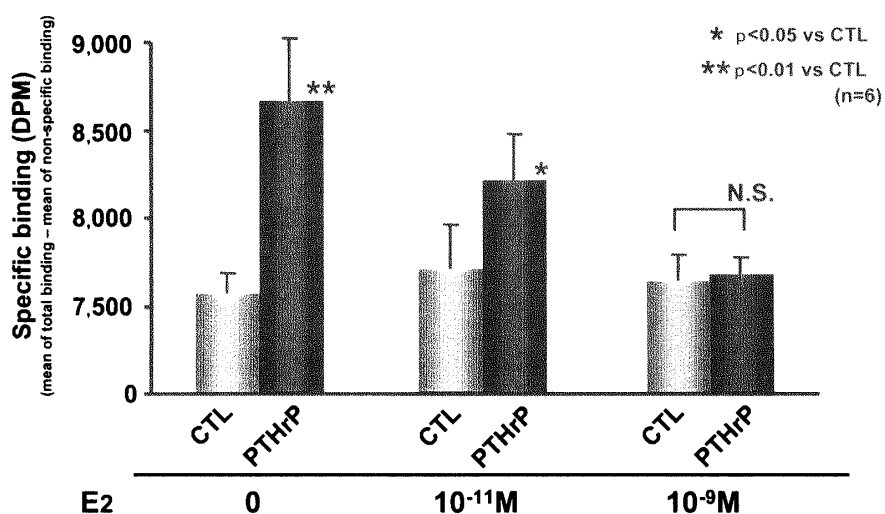


図20 PTHrP による子宮筋細胞膜 G 蛋白質 α サブユニットへの GTP 結合促進作用に対する E<sub>2</sub>の影響

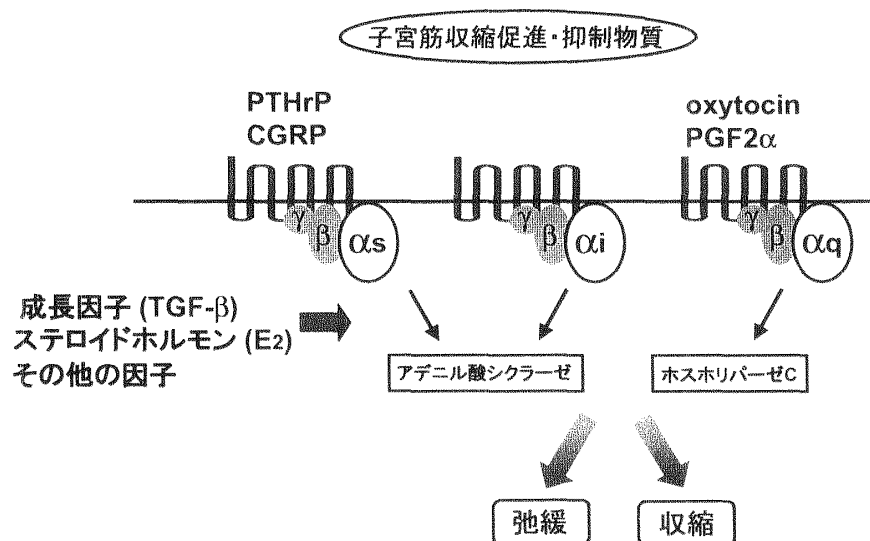


図21 G 蛋白質と子宮筋収縮調節

ドホルモンの影響を検討することは困難であり、子宮筋組織から分離した膜標本を用いて G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットに対するエストラジオール ( $E_2$ ) の影響の検討を行った。PTHrP による G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットへの放射性 GTP 結合促進作用に対して  $E_2$  の添加を同時に行うと PTHrP の作用は濃度依存性に抑制された(図20)。  $E_2$  が PTHrP の作用を減弱させた機序については不明であるが、ステロイドホルモンが G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの機能調節因子の一つである可能性が示唆された。

### まとめ

今回の検討によりヒト妊娠子宮筋での G 蛋白質  $\alpha$  サブユニット発現が示され、PTHrP、オキシトシン等の子宮収縮調節因子は G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの活性化を介し、アデニル酸シクラーゼやフォスホリパーゼ C 等のセカンドメッセンジャーへの情報伝達を行っていることが示された。また、子宮筋収縮抑制物質の情報伝達を行っていると考えられる  $G\alpha_s$  サブユニットは、陣痛発来に向け子宮筋での発現が減少し、リガンド刺激に対する GTP 結合性の低下傾向も認められ図1に示した phase 1 における  $G\alpha_s$  サブユニットの発現と活性の低下が子宮筋の収縮抑制機構の解除に関与している可能性が示唆された。また、in vitro において PTHrP をはじめとする子宮収縮抑制因

子の G 蛋白質を介した情報伝達は TGF- $\beta$ 、 $E_2$  により修飾され、TGF- $\beta$  の作用は  $G\alpha_i$  を介することが示された。

子宮筋において多くの収縮促進・抑制因子は G 蛋白質共役受容体を介して作用しており、子宮収縮調節に関する情報が、G 蛋白質を介して子宮筋細胞内へと伝達されると考えられる。G 蛋白質を介する情報伝達において共通の調節因子が存在するならば、異なるリガンドの作用を同時に修飾することにより、合目的にヒト陣痛発来・子宮筋収縮をコントロールし得ると考えられ(図21)、今後更なる検討が必要と思われる。

また、GnRH、LH、FSH 受容体を含む G 蛋白質共役受容体は子宮筋のみならず、生殖器官を含む多くの組織に発現していることが知られている。ヒトゲノムの解析により人体には2,000種類を越す G 蛋白質共役受容体が存在すると推定されているが、そのほとんどのリガンドや生理作用は不明である。今後、G 蛋白質共役受容体と G 蛋白質の発現及び機能調節の解析が、分娩発来機構のみならず、病態の解明や治療法の開発に寄与すると考えられる。

### 謝 辞

第52回日本産科婦人科学会のシンポジウムにおいて発表の機会をお与え下さいました会長の青野敏博教授及び座長の労をお取り頂きました村田雄二教授、瓦林達比古教

授に深謝致します。また、本研究をご指導頂きました恩師矢内原巧教授及び、昭和大学産科婦人科学教室員各位に深く感謝します。

### 共同研究者

齋藤 裕, 鈴木 真, 市塚清健, 佐々木康, 三橋裕一, 土屋直子, 星 真一, 千葉 博, 岩崎真理子, 湯浅朋子, 根岸桃子, 赤羽智子

木内祐二(昭和大学薬学部病態生理学教室)

PC Macdonald, ML Casey, J Smith, B Mayhew, P Keller (University of Texas Southwestern Medical Center)

### 研究協力者

生水真紀夫(金沢大学医学部産科婦人科学教室)

河野康志(大分医科大学産科婦人科学教室)

### 文 献

1. MacDonald PC. Parturition. In : Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, eds. Williams Obstetrics, 20th ed. Connecticut ; Appleton & Lange, 1997 ; 261—317
2. Liggins GC, Fairclough RJ, Grieves SA, Kendall JZ, Knox BS. The mechanism of initiation of parturition in the ewe. Recent Prog Horm Res 1973 ; 29 : 111—59
3. Olson DM, Mijovic JE, Sadowsky DW. Control of human parturition. Semin Perinatol 1995 ; 19 : 52—63
4. Liggins GC, Fairclough RJ, Grieves SA, et al. Parturition in the sheep. In : Knight J, Connor MO, eds. The Fetus and Birth. Ciba Foundation Symposium, vol 47. North-Holland ; Amsterdam Elsevier 1977 ; 5—25
5. Gilman AG. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. Biosci Rep 1995 ; 15 : 65—97
6. Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. Trends Pharmacol Sci 1993 ; 14 : 303—307
7. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma dimers in transmembrane signalling. Nature 1993 ; 365 : 403—406
8. Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. Nature 1992 ; 356 : 526—529
9. Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, Rushmore TH, Bayne MA, Metters KM, Slipetz DM, Grygorczyk R. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. J Biol Chem 1994 ; 269 : 2632—2636
10. Kunz D, Gerard NP, Gerard C. The human leukocyte platelet-activating factor receptor. cDNA cloning, cell surface expression, and construction of a novel epitope-bearing analog. J Biol Chem 1992 ; 267 : 9101—9106
11. Emorine LJ, Marullo S, Delavier-Klutcho C, Kaveri SV, Durieu-Trautmann O, Strosberg AD. Structure of the gene for human beta 2-adrenergic receptor : expression and promoter characterization. Proc Natl Acad Sci USA 1987 ; 84 : 6995—6999
12. Katsuyama M, Sugimoto Y, Namba T, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. FEBS Lett 1994 ; 344 : 74—78
13. Schipani E, Karga H, Karaplis AC, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Segre GV, Abou-Samra AB, Juppner H. Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. Endocrinology 1993 ; 132 : 2157—2165
14. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins : organizers of transmembrane signals. Cell 1995 ; 80 : 249—257
15. Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. Nature 1996 ; 379 : 311—319
16. Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR. Structure of RGS4 bound to AlF<sub>4</sub>-activated G (i alpha 1) : stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. Cell 1997 ; 89 : 251—261
17. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC. p115 RhoGGE, a GTPase activating protein for G<sub>12</sub> and G<sub>13</sub>. Science 1998 ; 280 (5372) : 2109—2111
18. De Vries L, Gist Farquhar M. RGS proteins : more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. Trends Cell Biol 1999 ; 9 : 138—144
19. Hepler JR. Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. Trends Pharmacol Sci 1999 ; 20 : 376—382
20. Tashima LS, Millar LK, Bryant-Greenwood GD. Genes upregulated in human fetal membranes by infection or labor. Obstet Gynecol 1999 ; 94 : 441—449
21. Morimoto T, Head JR, MacDonald PC, Casey ML. Thrombospondin-1 expression in human myometrium before and during pregnancy, before and during labor, and in human myometrial cells in culture. Biol Reprod 1998 ; 59 : 862—870
22. Souchevitskiy S, Chambaz EM, Feige JJ. Thrombospondins selectively activate one of the two latent forms of transforming growth factor-beta present in adrenocortical cell-conditioned medium. Endocrinology 1995 ; 136 : 5118—5126
23. Morimoto T, Devora GA, Mibe M, Casey ML, MacDonald PC. Parathyroid hormone-related protein and human myometrial cells : action and regulation. Mol Cell Endocrinol 1997 ; 129 : 91—99
24. 矢内原巧. 産婦人科医のDHA-S研究 東京 : 医科学出版社 1993 ; 60—69
25. Takamoto N, Morimoto T, Casey ML, MacDonald PC. Reconstitution of hormonal responsiveness in human myometrial cells in culture by transient expression of estrogen receptor- $\alpha$ . Journal of the Society for Gynecologic Investigation 1998 ; 5 (Suppl) : 63

**Abstract**

The G-protein signaling pathway is one of the most important mechanisms for signal transduction. Receptor activation facilitates nucleotide exchange and dissociation of the G-protein, releasing the  $G\alpha$  subunit in its GTP-bound state from the  $G\beta\gamma$  complex. Activated  $G\alpha$  subunit can stimulate a variety of target enzymes, including phospholipase C and adenylyl cyclase, which are known to modulate myometrial quiescence and contraction. Hundreds of G-protein coupled receptors have been identified. These receptors share a common architecture containing seven membranes-spanning segments. The seven trans-membrane spanning G-protein coupled receptors distributed large variety of tissues, including reproductive organs. Interestingly, many agents, which are thought to modulate myometrial activities (e.g.,  $\beta$ -adrenergic agents, parathyroid hormone related protein (PTHrP), oxytocin, and prostaglandin) act thorough G-protein coupled receptors. In this investigation, we evaluated the regulation of expression and function of G-proteins in human myometrial tissues. Myometrial tissues were collected from the patients who agreed to participate in this study at the time of cesarean section. RT-PCR and Western blot analysis indicated that human myometrium in pregnancy express several G-protein alpha subunit isoforms,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$ , and  $G\alpha_i$ . Incubation of myometrial membrane with PTHrP and oxytocin increased radio labeled GTP binding to  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_q$  subunit respectively. Our findings also indicated that isoproterenol, ritodrine hydrochloride, carbinonin gene related protein, and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  act thorough activation of G-protein alpha subunits. Expression and GTP binding activity of  $G\alpha_s$  subunit decreased according to increase of uterine activity, even before on set of labor. Administration of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) followed by PTHrP on myometrial cells in culture diminished adenylyl cyclase activity, relative to cells treated with PTHrP only. The effect of TGF- $\beta$  blocked by pertussis toxin, which indicate that TGF- $\beta$  act on adenylyl cyclase thorough activation of  $G\alpha_i$  subunit. In the preliminary study, estradiol down-regulated the activity of PTHrP stimulated [ $^{35}$ S] GTP- $\gamma$ S bindings to  $G\alpha_s$  subunit in myometrial membrane.

The present study suggests that the seven trans-membrane spanning G-protein coupled receptors and heterotrimeric G-proteins modulate signal transduction of various agents, which affect myometrial quiescence and contraction. The elucidation of the molecular mechanism that control the expression and function of G-proteins may, in the future, lead to better therapies in the treatment of labor-associated disorders.

---