

析は遠心分離法により調整した膜分画を用いて [125 I]ET-1および [125 I]ET-3の結合実験として行った。ANP, BNP の受容体は、膜分画を用いた ANP, BNP および C-type natriuretic peptide (CNP) による cyclic GMP (cGMP) 産生量から検討した⁸⁾。さらに、GTC-CsCl 法にて抽出した各組織の total RNA を用いてヒト ET 受容体の遺伝子発現、ならびにヒト ANP, BNP およびこれらの受容体の遺伝子発現を Northern blot 法にて検討した^{9)~11)}。また、既報の方法¹²⁾による羊膜細胞培養系を用いて ET および BNP の産生に対する cortisol, EGF, Transforming growth factor- β (TGF- β) などの影響を検討した。in vitro の PLD 活性は [3 H] 標識した PC を基質として、ethanol 存在下で PLD に特異的な phosphatidyl 基転移反応により生成した [3 H] phosphatidylethanol ([3 H]PEt) の量から算出した⁵⁾。さらに、培養羊膜細胞を用いて PLD 活性の調節機序を検討した。すなわち、培養羊膜細胞が subconfluent となった時点で [3 H] アラキドン酸 (1 μ Ci) を培養液に添加して24時間細胞を標識した。培養液を交換した後、protein kinase C (PKC) の agonist である phorbol myristate acetate (PMA) あるいは calcium ionophore である A23187などを添加し、60分後に methanol/HCl (100:1) 1ml にて反応停止した。total lipid を Bligh and Dyer 法にて抽出し thin layer chromatography (TLC) にて分離、PEt の spot の放射比活性を測定して得た PEt 産生量から PLD 活性を算出した⁵⁾。さらに、羊膜細胞 PLD の生理的作用を確認する目的で、PLD の第一産物である PA を羊膜細胞培養液中へ添加して prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生に及ぼす影響を検討した。

なお、統計検定は、student t-test 又は、analysis of variance (ANOVA) にて行った。図中*, **, および *** はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, および $p < 0.001$ を示す。また、図中に特に示さない場合は、control 群との比較を示す。

成績および考察

1. 子宮内環境調節機構における羊膜エンドセリン (ET) の役割

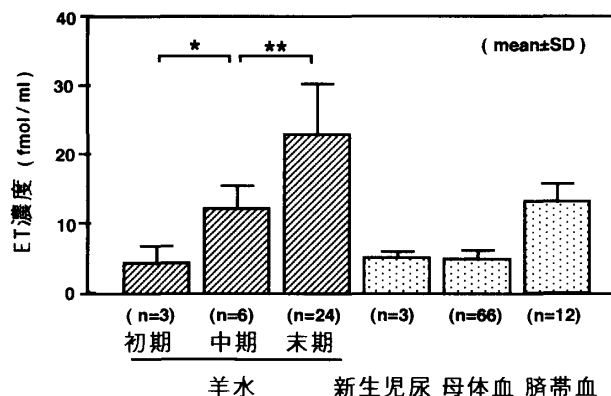


図1 妊娠各期における羊水中の ET 濃度

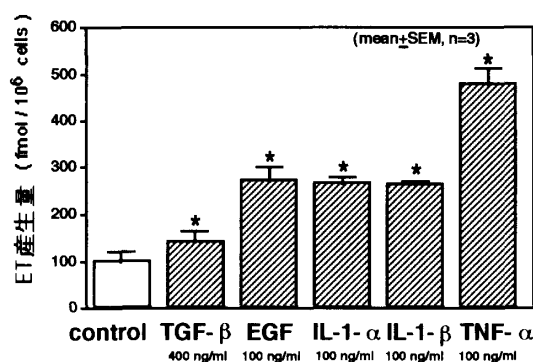


図2 各種成長因子およびサイトカインによる培養羊膜細胞の ET 産生促進作用

まず、妊娠各期の羊水中の ET 濃度を測定した。羊水中の ET 濃度は、妊娠経過と共に増加し、妊娠末期には新生児第一尿あるいは母体や胎児血中の濃度より数倍高値となった(図1)。そこで、羊水中の ET の起源を検討する目的で、羊膜細胞の培養上清中の ET 濃度を測定した。時間経過と共に ET 濃度の増加が認められ、培養24時間目には羊水中と同程度に高濃度となった。また、羊膜細胞から分泌される ET は、ゲル濾過や HPLC による検討では大部分が ET-1であった。

そこで、この培養羊膜細胞を用いて、羊膜細胞における ET の産生調節因子について検討した。羊膜細胞における ET の産生は TGF- β , EGF, interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの添加により促進された(図2)。すなわち、羊膜細胞における ET 産生は胎児由来の成長因子や母体側脱落膜由来のサイトカインなど複数の因子によって調節されていると考えられた。

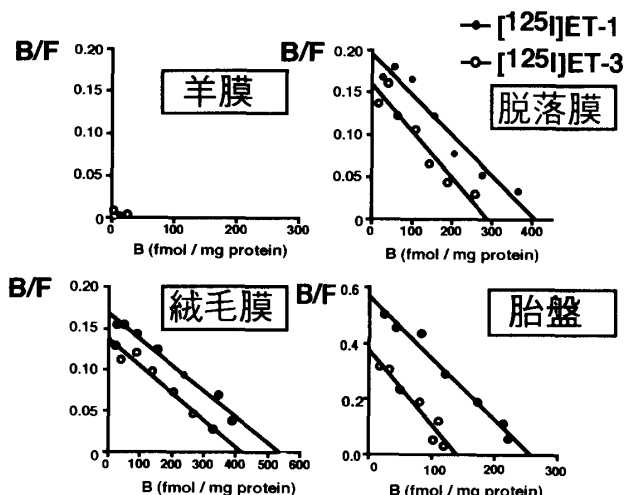


図3 妊娠末期子宮内組織におけるET受容体の解析

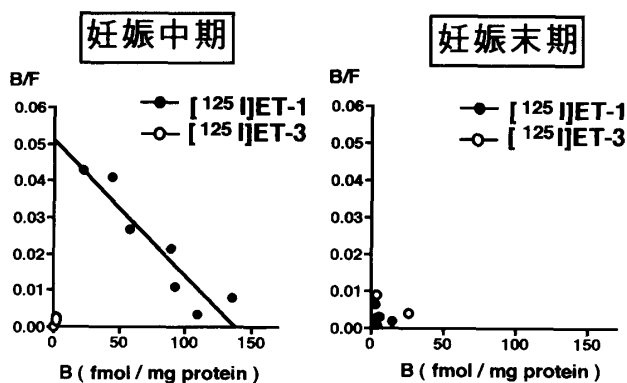


図4 羊膜組織におけるET受容体の解析
—妊娠中期と妊娠末期の比較—

このように羊膜から大量に分泌されるETが子宮内で生理的な作用を発揮するためには、ETに特異的な受容体の存在が必要である。ET受容体は、これまでにET-A受容体(ET-AR)とET-B受容体(ET-BR)の2種類が知られている。ET-1はET-ARとET-BR両者にはほぼ同程度の親和性を示すが、ET-3はET-BRにのみ親和性を示す。このような性質を利用して、ET-1とET-3の結合実験からET受容体の種類と量を推定することができる。

そこで、妊娠末期の子宮内組織のET受容体について検討した。妊娠末期の絨毛膜・脱落膜・胎盤にはET-AR、ET-BR両者が存在していたが、羊膜にはいずれの受容体も検出できなかった(図3)。Northern blot法でも、妊娠末期の絨毛膜・脱落膜にはET-ARとET-BR両者の遺伝子発現

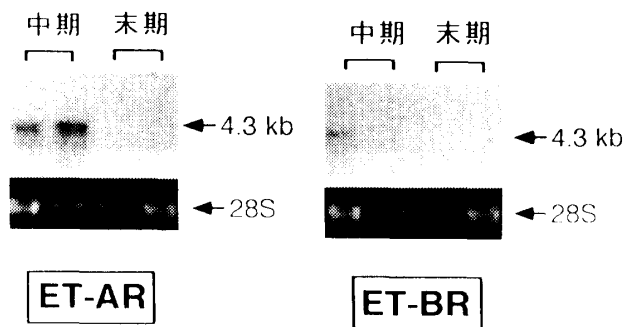


図5 羊膜におけるET受容体遺伝子発現
—Northern blot法による検討—

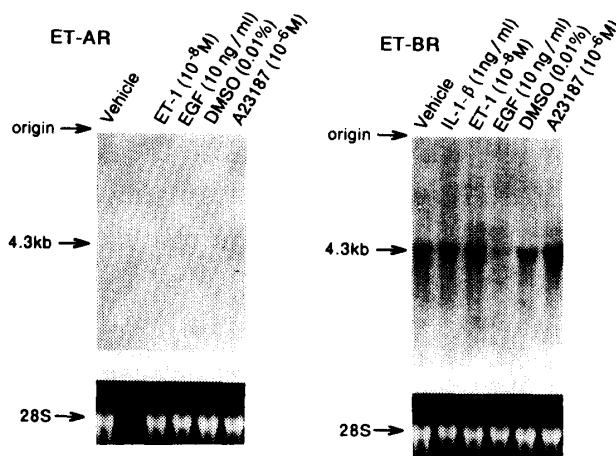


図6 羊膜細胞ET受容体遺伝子発現の調節因子
—Northern blot法による検討—

が認められたが、羊膜ではいずれも認められなかった。妊娠末期の羊膜組織にはET受容体を検出できなかったが、妊娠中期の羊膜ではET-1の結合が認められ、主にET-ARが存在すると考えられた(図4)。Northern blot法でも、妊娠中期の羊膜組織では主にET-ARが認められ、ET-BRの遺伝子発現もわずかであるが認められた(図5)。すなわち、羊膜組織のET受容体は妊娠中期から妊娠末期にかけて発現量が変化していた。

そこで、羊膜のET受容体発現の調節因子を培養羊膜細胞を用いて検討した。培養羊膜細胞では主にET-BRが発現していたが、このET-BRの発現はET-1自身やIL-1あるいはA23187では影響を受けなかった。しかし、EGF(10ng/ml)を添加するとET-BRの遺伝子発現は著明に抑制された(図6)。

このように、妊娠中期の羊膜組織はET-1を産生すると共にET受容体を発現していることか

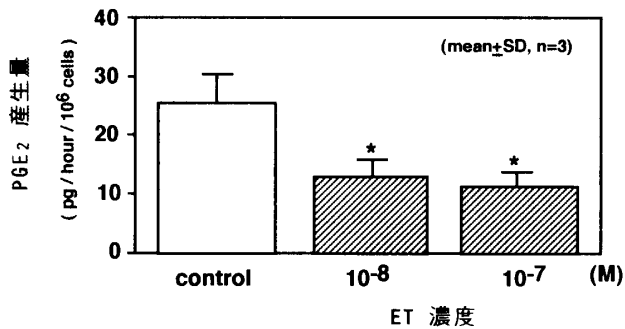
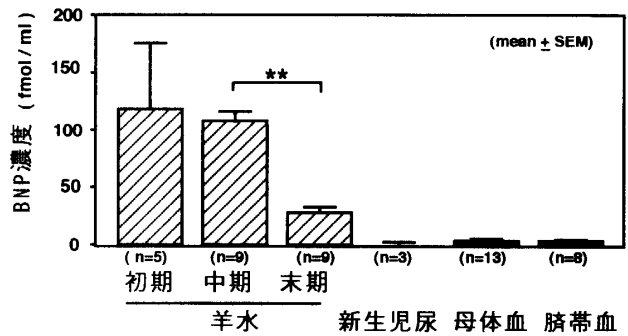
図7 培養羊膜細胞のPGE₂産生に及ぼすETの影響

図8 妊娠各期における羊水中のBNP濃度

ら、ETが何らかの生理的作用を有している可能性が考えられるが、ETの主な生理作用としては、血管平滑筋の収縮¹³⁾以外にも、細胞分化¹⁴⁾や卵巣のホルモン分泌の調節¹⁵⁾など多彩な作用が知られている。そこで、培養羊膜細胞にETを添加しPGE₂産生に対する影響を検討したところ、ET-1は羊膜細胞のPGE₂産生を有意に抑制した(図7)。すなわち、妊娠中期にはET-1はET受容体を介して、羊膜細胞自身にautocrine的に作用しPGE₂産生を低下させ、子宮収縮を抑制する方向に作用していると考えられる。そして、この子宮収縮の抑制作用は、胎児由来のEGFによってET受容体がdown regulateされる妊娠末期には解除される可能性が考えられる。

一方、脱落膜組織にもET-AR, ET-BR両者が大量に存在することからETが何らかの作用を有している可能性がある。そこで、脱落膜組織の培養系にET-3 (10⁻⁷M)を添加し、レーザーサイトメーターを用いて細胞内Ca²⁺濃度に及ぼす影響を検討した。ET-3の添加により細胞内Ca²⁺濃度が著明に上昇した。すなわち、羊膜細胞から分泌されたETはparacrine的に脱落膜細胞に作用して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、脱落膜細胞の機能を調節している可能性が考えられる。

2. 子宮内環境調節機構における羊膜 brain natriuretic peptide (BNP) の役割

まず、妊娠各期の羊水中BNP濃度の推移を検討した。妊娠初期および中期の羊水中のBNP濃度は約100fmol/mlで新生児第一尿や血中濃度の約50倍高値を示したが、妊娠末期には1/4に低下した(図8)。このBNPの起源を検討するため、子

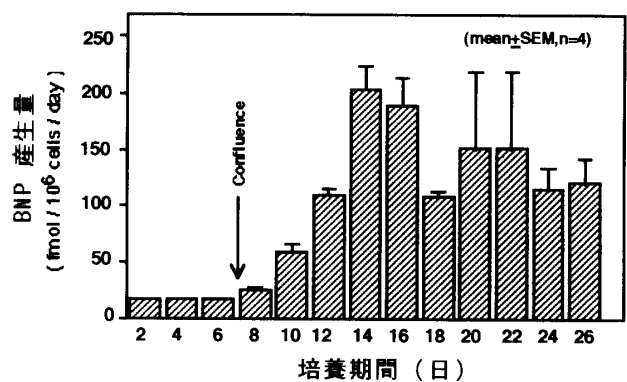


図9 培養羊膜細胞におけるBNP分泌

宮内組織についてBNP遺伝子の発現を検討すると、妊娠中期の羊膜組織でのみ心臓のBNP遺伝子と同じサイズのバンドが認められた。

つぎに、羊膜細胞におけるBNP産生をさらに確認するため、羊膜細胞の培養上清中のBNP濃度を測定した。培養6日目以降BNPの分泌が増加し、培養16日目には妊娠中期の羊水中濃度と同程度になった(図9)。そこで、培養羊膜細胞のBNP遺伝子発現をRT-PCR法にて検討した。培養6日目ではバンドを認めないが、BNPを大量に分泌している培養16日目には、心臓のBNP遺伝子と同じサイズの位置にバンドが認められた(図10)。すなわち、培養16日目の羊膜細胞は、BNP遺伝子を発現しBNPを培養液中に分泌していることが確認された。そこで、この培養系を用いて羊膜細胞のBNP産生調節因子を検討した。

まず、脱落膜組織で産生されることが報告されているTGF-βの影響を検討した。TGF-βは用量依存的に培養羊膜細胞のBNP産生を促進した(図11)。そこで、実際の羊水中にTGF-βが存在す

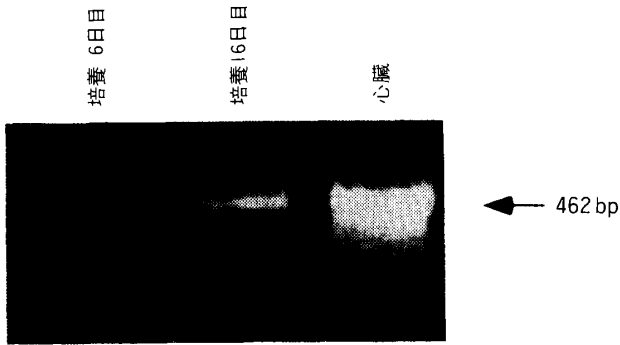


図10 培養羊膜細胞のBNP遺伝子発現
—RT-PCR法による検討—

るか否かを mink CCL 肺細胞を用いた bioassay で検討したところ、妊娠中期・末期いずれの羊水中にも約400pM相当の TGF- β 活性が検出された。これは、培養羊膜細胞で、BNP 産生を有意に促進する濃度であった。すなわち、脱落膜細胞から分泌された TGF- β は、paracrine 的に羊膜に作用して BNP 産生を促進又は維持していると考えられた。

つぎに、妊娠末期の羊水中に増加する cortisol および EGF の影響を検討した。cortisol は胎児成熟に伴い副腎からの分泌が増加し、胎児尿の形で羊水中に放出される¹⁾が、培養羊膜細胞からの BNP 産生を濃度依存的に抑制した。EGF は胎児腎臓から分泌され、やはり胎児尿の形で羊水中に放出され妊娠末期に増加すると考えられている²⁾が、EGF も BNP 産生を濃度依存的に抑制した。

そこで、TGF- β と cortisol あるいは EGF の相互作用を検討した。すなわち、TGF- β 400pM にて BNP 産生を促進した系に cortisol あるいは EGF を添加すると、いずれの場合も用量依存的に TGF- β による BNP 産生促進作用がブロックされた(図12, 図13)。これは、妊娠末期の羊水中に TGF- β が存在するにもかかわらず BNP 濃度が低下する現象と一致した成績であるといえる。

ここで、妊娠経過中の羊水中の cortisol および EGF の濃度の推移¹⁾²⁾を BNP 濃度と比較すると、妊娠中期には cortisol, EGF 共に低濃度であるため TGF- β により促進された BNP 産生が抑制を受けないが、妊娠末期に cortisol と EGF が増加してくると TGF- β の作用がブロックされ BNP

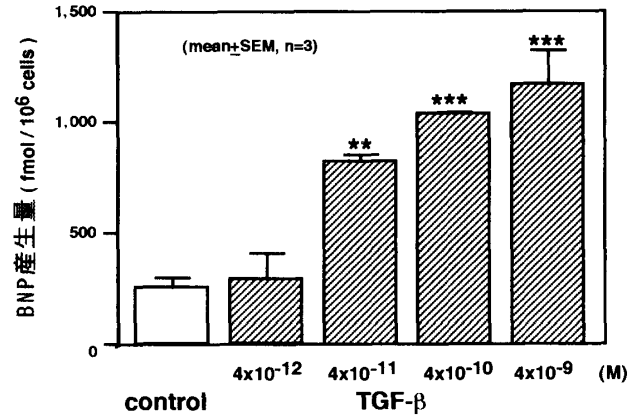


図11 TGF- β による培養羊膜細胞のBNP産生促進作用

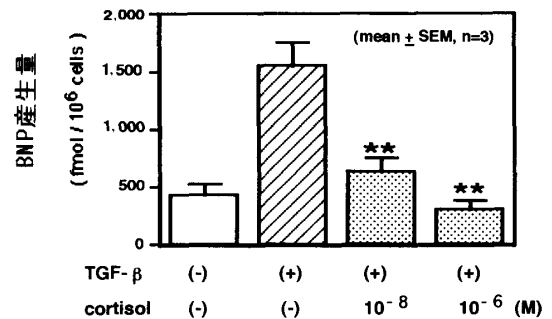


図12 TGF- β 刺激による培養羊膜細胞 BNP 産生に対する cortisol の抑制作用

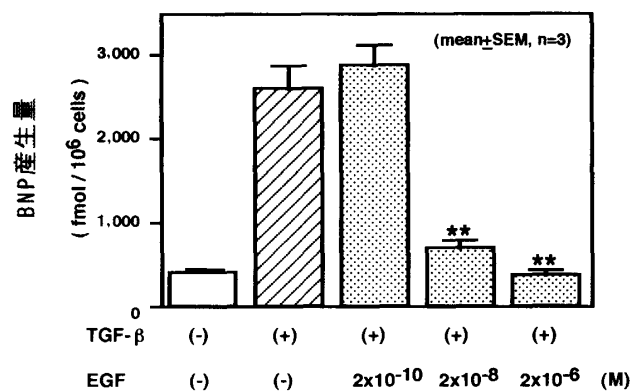


図13 TGF- β 刺激による培養羊膜細胞 BNP 産生に対する EGF の抑制作用

産生が低下すると考えられる(図14)。

このように、羊膜細胞は各種因子の調節下に大量の BNP を産生していることが明らかとなったが、この BNP が子宮内で生理作用を発揮するためには BNP に特異的な受容体の存在が必要である。ナトリウム利尿ペプチドの受容体としては、

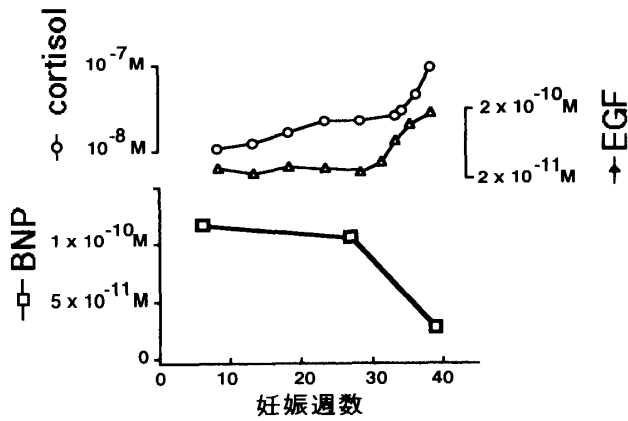


図14 ヒト羊水中の BNP, cortisol, EGF 濃度の比較

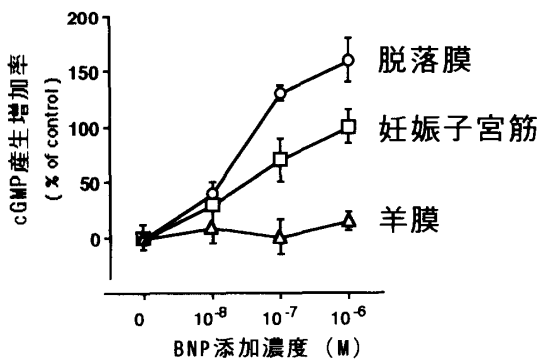


図15 BNP 刺激による cGMP 産生能の比較
—組織膜分画を用いた検討—

膜型の guanylate cyclase を細胞内 domain にもつ GC-A と GC-B の 2 種類があるが、いずれも cGMP を second messenger として細胞内作用を發揮すると考えられている¹⁶⁾。これらのうち、BNP は GC-A に高い親和性を示すことが知られている¹⁶⁾。

まず、羊膜・脱着膜および子宮筋の膜分画を調整し、これに BNP を添加して実際に cGMP が産生されるか否かを検討した。羊膜の膜分画では cGMP 産生量は増加しなかったが、子宮筋および脱着膜の膜分画に BNP を添加すると用量依存的に cGMP 産生量が増加した(図15)。この結果は、子宮筋および脱着膜には BNP によって活性化される膜型 guanylate cyclase すなわち GC-A が存在することを示している。さらに、妊娠子宮内組織における GC-A および GC-B の遺伝子発現を、Northern blot 法にて検討すると、絨毛膜・脱着膜・子宮筋では主に GC-A が発現していたが、羊膜では GC-B がわずかに発現しているものの、

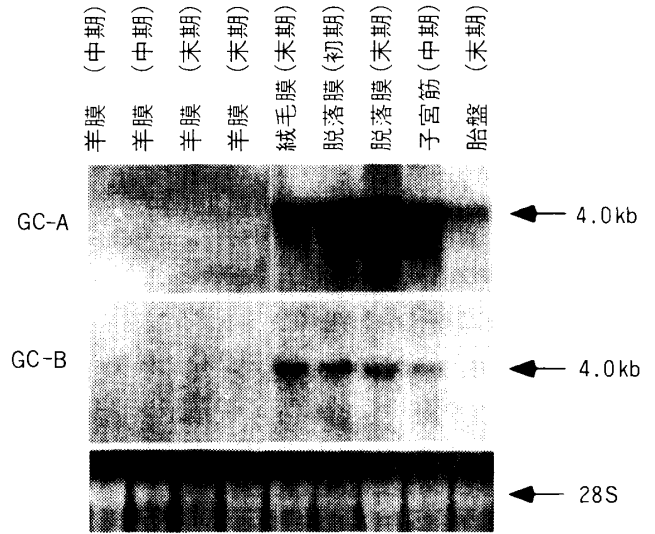


図16 妊娠子宮内組織における BNP 受容体遺伝子発現
—Northern blot 法による検討—

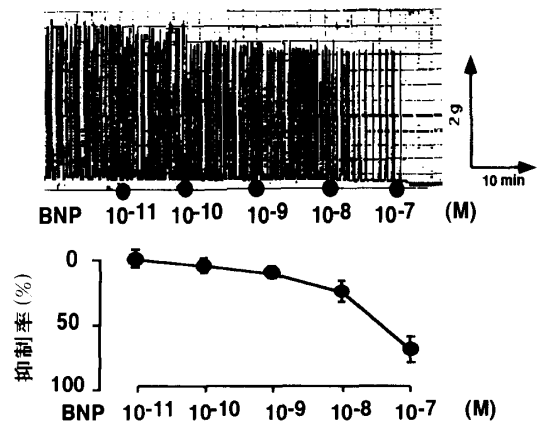


図17 BNP によるラット子宮筋収縮の抑制作用

BNP に親和性を示す GC-A の発現は認められなかった(図16)。

つぎに、BNP およびその second messenger である cGMP が実際の子宮筋の収縮に対して抑制作用を發揮しうるか否かを、妊娠ラット子宮筋を用いて in vitro で検討した。妊娠ラット子宮筋に prostaglandin F_{2α} (10⁻⁶M) を添加して子宮収縮を誘発した後に cGMP を添加すると用量依存的に収縮が抑制された。BNP を添加した場合にも同様に用量依存的に子宮筋収縮が抑制された。そして、BNP を 10⁻⁷M 添加すると子宮筋の収縮はほぼ完全に抑制された(図17)。

この結果をただちにヒトの子宮筋に当てはめる

ことはできないが、先に示したように、ヒト子宮筋および脱落膜には大量のBNPの受容体が存在し、しかもBNP添加によりcGMPの産生が増加したことを考慮すると、羊膜細胞から大量に分泌されるBNPが脱落膜あるいは子宮筋に到達すれば、cGMPを介した何らかの生理作用を発揮する可能性は十分高いと考えられる。

3. 子宮内環境調節機構における羊膜ホスホリパーゼD (PLD) の役割

まず、羊膜PLD活性のin vitroにおける特徴を検討した。羊膜のPLDはホスホリパーゼA₂ (PLA₂) やC (PLC) とは異なり、PCを基質とし、Ca²⁺要求性を示さないが、アラキドン酸など不飽和脂肪酸の添加が必要であった。また、活性の大部分は膜分画に存在していた⁵⁾。

in vitroの至適条件下で測定した羊膜・絨毛膜・脱落膜組織膜分画のPLD活性を比較すると、羊膜で最も高い活性(約35nmol/hour/mg protein)が認められたが、絨毛膜や脱落膜にも羊膜の1/2~1/3の活性が認められた。また、羊膜組織PLD活性の妊娠時期による変化を検討すると、妊娠末期の活性は、妊娠中期と比較して約2倍に増加していた。陣痛発来の前後では差がなかった(図18)。

つぎに、羊膜PLD活性の調節機序を培養羊膜細胞を用いて検討した。培養羊膜細胞のPLD活性は、PKCの活性化剤であるPMAあるいはCalcium ionophoreであるA23187の添加により著明に増加した。また、両者を同時に添加すると相乗的にPLD活性が促進された(図19)。このPMAの作用は、PKCの阻害剤であるstaurosporineあるいはcalciumキレーターであるEGTAによって抑制された。一方、A23187によるPLDの活性化はstaurosporineでは抑制されなかったがEGTAで抑制された。以上より、羊膜細胞のPLDはPKCとCa²⁺の2種類の経路によって活性が調節されていると考えられた。

つぎに、羊膜のPLD活性に及ぼす羊水中の物質の影響を検討した。図20のごとく、オキシトシン(OXT)、アラキドン酸(AA)、ACTH、arginine vasopressin (AVP)の添加によってPLD活性が有意に増加した。

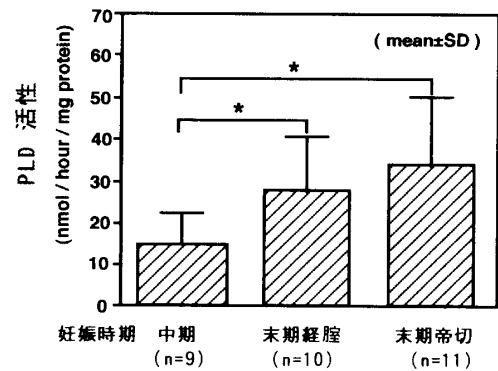


図18 妊娠各期羊膜組織のPLD活性

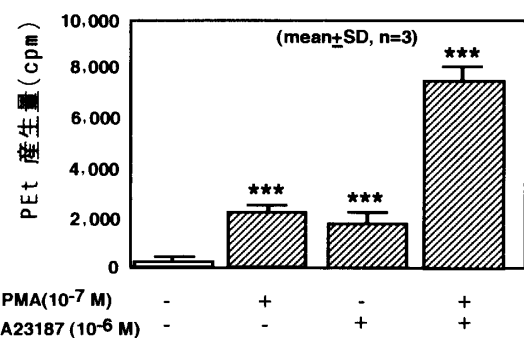


図19 培養羊膜細胞のPLD活性に及ぼすPMAならびにA23187の影響

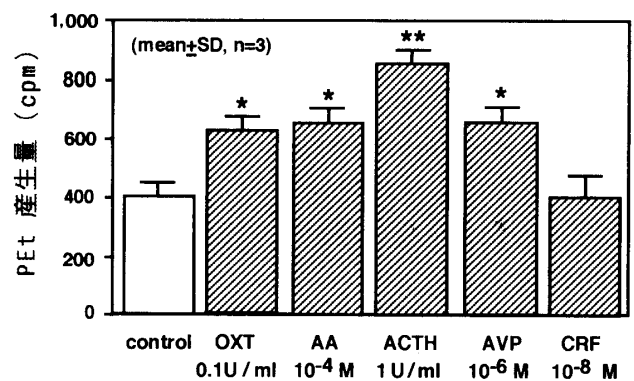


図20 培養羊膜細胞のPLD活性に及ぼす各種物質の影響

つぎに、PLDの生理作用を検討するために、培養羊膜細胞にPLDの第一産物であるPAを添加し、培養上清中のPGE₂の濃度を測定した。PAの脂肪酸組成にかかわらず、用量依存的にPGE₂の産生が増加した(図21)。このPAによるPGE₂産生促進作用は、staurosporineにてブロックされた。すなわち、PAに含まれるアラキドン酸からPGが合成されるのではなく、PAがPKCを介し

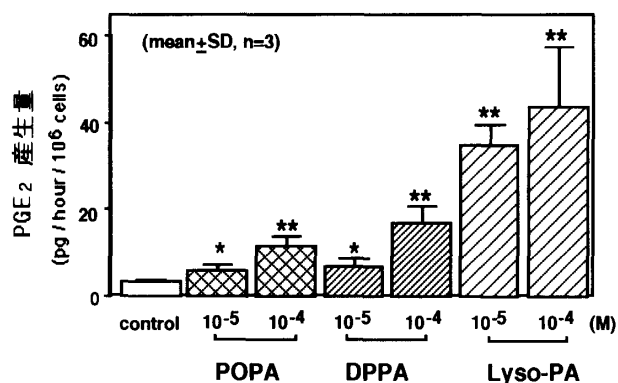


図21 培養羊膜細胞のPGE₂産生に及ぼす各種PAの影響

てPLA₂などアラキドン酸を供給する酵素を活性化させることによってPGE₂産生が増加すると考えられた。

このように羊膜細胞の重要な機能のひとつであるPGE₂産生の調節にPLDが関与していることが明らかになったが、羊膜細胞からは先に示したように、ET-1やBNPが産生されている。そこで、培養羊膜細胞におけるET-1とBNPの産生に及ぼすPLDの影響を検討した。培養羊膜細胞にPLDを添加すると、用量依存的にET産生量は増加しBNP産生量は減少した。すなわち、羊膜のPLDは、PGE₂産生だけでなくETやBNPの産生など羊膜細胞のさまざまな機能の調節に関与していると考えられた。

総括

以上の結果を総括すると、まず、羊膜は母体と胎児を区切る単なる物理的隔壁ではなく、TGF-βやIL-1など母体側因子とcortisol, EGF, AVP, ACTHなど胎児側因子両者の調節下に、PGE₂, ET, BNPなどの生理活性物質を産生していることが明らかとなった。また、羊膜にはPLDが存在し、この酵素はPGE₂の産生など羊膜細胞の生理的機能を調節していることが明らかとなった。さらに、羊膜で産生されたこれらの物質は、autocrine的あるいはparacrine的に羊膜自身および脱落膜や子宮筋に存在するそれぞれの受容体に作用して、妊娠の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

また、羊膜におけるこれらの生理活性物質の産

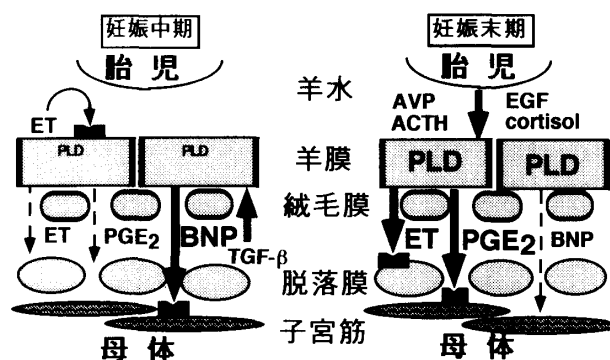


図22 胎児自身による子宮内環境調節機構
—妊娠中期と末期の比較—

生は胎児の成熟に伴って胎児から羊水中に分泌される諸因子によって巧妙に調節されている。すなわち、妊娠中期には羊膜で産生されるETはET受容体を介してPGE₂産生を抑制しているが、妊娠末期には胎児由来のEGFによって受容体発現が減少しこのPGE₂産生の抑制が解除されると考えられた。また、羊膜で産生されるBNPは妊娠中期にはTGF-βの刺激によりその産生が増加し子宮筋の収縮を抑制しているが、妊娠末期には胎児由来のcortisolやEGFによってBNP産生が低下し、子宮筋の収縮抑制が解除されると考えられる。さらに、羊膜に存在するPLDは妊娠中期には活性は低値であるが、妊娠末期には活性が倍増し、胎児から羊水中に放出されるAVPなどによって活性化されPGE₂やETの産生は促進し、BNPの産生は抑制すると考えられた(図22)。

このように、羊膜細胞の機能が胎児成熟に呼応してダイナミックに変化することは、胎盤の機能が栄養物質の供給やガス交換のように恒常的に保たれていなければならないことと対照的で、羊水・羊膜系と胎盤系が互いの機能を補う形で、極めて合理的かつ巧妙な子宮内環境の調節機構が存在することを示している。

また、以上の成績を情報の伝達という視点から見ると、羊膜の役割がより明瞭になる。すなわち、ヒト胎児はEGF, AVP, cortisol, ACTHなど自ら羊水中に産生する物質を媒介としてまず羊膜に胎児成熟という情報を伝達する。つぎに、羊膜はPLDなどを介してET, BNP, PGE₂など各種生理活性物質を産生するという形で情報の変換・増幅

を行い、さらにこの情報を絨毛膜・脱落膜・子宮筋へと伝達し、最終的に子宮内環境を合目的々に調節していると考えられる。

いい替えると、母児間には胎盤を介した相互作用だけではなく、羊水・羊膜を介した情報の伝達経路が存在し、羊膜はこの情報伝達系においてシグナルの増幅という重要な役割を果たしていると考えられる。すなわち、妊娠子宮を一個の細胞に例えると、羊膜は細胞膜に当たる重要な役割を果たしているとも考えられる。

結 論

以上、本研究のはじめに設定した作業仮説が検証されたので、「羊水・羊膜系を介した胎児自身による子宮内環境の調節機構が存在する」ことを提唱したい。しかし、羊水中には今回検討した物質以外にもさまざまな生理活性物質が存在しており、さらに複雑かつ精巧な子宮内環境の調節機構が存在する可能性がある。今後、羊水・羊膜系に加えて絨毛膜や脱落膜の機能も検討することによって、子宮内環境調節機構の全容が解明されることを期待したい。

謝 辞

本シンポジウムにおいて発表の機会をお与え頂いた寺島芳輝会長、ならびに座長の労をおとり頂いた桑原慶紀、藤本征一郎両教授に心より感謝致します。

また、本研究をご指導頂いた森 崇英教授およびご援助頂いた京都大学医学部婦人科学産科学教室員ならびに同窓会員各位に深く感謝致します。

共同研究者

京都大学医学部婦人科学産科学教室（主任：森 崇英教授）・伊原由幸，小林史典，長谷川雅明，伊東宏晃，稲森久美子，上田博久，北川京子，南野英隆

京都大学医学部第二内科学教室（主任：中尾一和教授）・吉政孝明，伊藤 裕，向山政志，菅 真一，小川佳宏

愛媛大学医学部産科婦人科学教室（主任：松浦俊平教授）・矢野樹理

研究協力者

北陸製薬株式会社研究開発部・森川宏二，橋本繁輝

文 献

1. Fencl MD, Talchinsky D. Total cortisol in amniotic fluid and fetal lung maturation. *N Engl J Med* 1975; 292: 133-136
2. Hofmann GE, Abramowicz JS. Epidermal

- growth factor (EGF) concentration in amniotic fluid and maternal urine during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1990; 69: 217-221
3. Hasegawa M, Sagawa N, Ihara Y, Okagaki A, Li XM, Inamori K, Itoh H, Mori T, Saito Y, Shirakami G, Nakao K, Imura H. Concentrations of endothelin-1 in human amniotic fluid at various stages of pregnancy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: S440-S442
4. Itoh H, Sagawa N, Hasegawa M, Okagaki A, Inamori K, Ihara Y, Mori T, Ogawa Y, Suga S, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. Brain natriuretic peptide is present in the human amniotic fluid and is secreted from amnion cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 907-911
5. Inamori K, Sagawa N, Hasegawa M, Itoh H, Ueda H, Kobayashi F, Ihara Y, Mori T. Identification and partial characterization of phospholipase D in the human amniotic membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 1270-1277
6. Liscowitch M, Amsterdam A. Gonadotropin-releasing hormone activates phospholipase D in ovarian granulosa cells. Possible roles in signal transduction. *J Biol Chem* 1989; 264: 11762-11767
7. Bollag WB, Barrett PQ, Isales CM, Liscowitch M, Rasmussen H. A potential role for phospholipase D in the angiotensin II-induced stimulation of aldosterone secretion from bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinol* 1990; 127: 1436-1443
8. Kuno T, Anderson JW, Kamisaki Y, Waldoman SA, Chang LY, Saeki S, Leitman DC, Nakane M, Murad F. Copurification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 1986; 261: 5817-5823
9. Hosoda K, Nakao K, Arai H, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; 287: 23-26
10. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 248-255
11. Arai H, Nakao K, Saito Y, Morii N, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Mukoyama M, Ohkubo H, Nakanishi S, Imura H. Augmented

- expression of atrial natriuretic polypeptide (ANP) gene in ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR-stroke prone. *Circ Res* 1988 ; 62 : 926—930
12. *Okita JR, Sagawa N, Casey ML, Snyder JM.* A comparison of human amniotic tissue and amnion cells in primary culture by morphological and biochemical criteria. *In Vitro* 1983 ; 19 : 117—126
 13. *Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988 ; 332 : 411—415
 14. *Fant ME, Nanu L, Word RA.* A potential role of endothelin-1 in human placental growth : interactions with insulin-like growth factor family of peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 ; 74 : 1158—1163
 15. *Iwai M, Hasegawa M, Sagawa N, Taii S, Mori T, Nakao K, Imura H.* Endothelins exist in porcine follicular fluid and inhibit the LH-stimulated biosynthesis of progesterone in porcine granulosa cells. *Endocrinol* 1991 ; 129 : 1909—1914
 16. *Wong SKF, Garbers DL.* Receptor guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 1993 ; 90 : 299—305

Synopsis

To elucidate the regulatory mechanism of human intrauterine milieu, the effects of various substances on the production of endothelin (ET) and brain natriuretic peptide (BNP) by amnion cells were investigated. In addition, we examined the regulation of phospholipase D (PLD) activity, which has been shown to be involved in the signal transduction in various tissues such as ovary, adrenal gland, etc.

The ET production by cultured amnion cells was stimulated by epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- β (TGF- β), or interleukin-1 (IL-1). Ligand binding analyses indicated that both ET-A receptor and ET-B receptor are present in chorion laeve, decidua vera, and myometrium, but not in the amnion tissue at term. However, amnion tissue in the second trimester showed a significant amount of binding capacity for ET-1 but not for ET-3, indicating the presence of ET-A receptor in this tissue in the second trimester. These observations were confirmed by Northern blot analyses. In cultured amnion cells, ET-B receptor was detected by Northern blot analysis. The expression of this ET-B receptor in cultured amnion cells was down-regulated by the addition of EGF, but not by ET-1, IL-1 or A23187. Moreover, ET-1 inhibited the secretion of prostaglandin E₂ (PGE₂) by cultured amnion cells. These results suggest that ET-1 secreted from amnion cells may block prostaglandin synthesis in amnion cells during the second trimester, but this block may be released at term by the action of EGF.

The BNP production by cultured amnion cells was dose-dependently stimulated by TGF- β , but was inhibited by cortisol or EGF. TGF- β (approximately 400 pM) was detected in the human amniotic fluid by a bioassay. The TGF- β augmented BNP production was blocked by the simultaneous treatment with cortisol or EGF. The receptor for BNP (particulate guanylate cyclase A-type: GC-A) was identified in chorion, decidua, and myometrium by both cGMP generation assay and Northern blot analysis. However, GC-A was not detected in amnion tissues in the second trimester and at term. In an in vitro experiment with rat pregnant uterus, both BNP and cGMP dose-dependently inhibited the prostaglandin F_{2 α} induced uterine contraction. Thus, BNP secreted from amnion cells may not act on amnion tissue, but on the decidua and myometrium, and generate cGMP, the second messenger of BNP, and finally block uterine contraction during the second trimester. Such an inhibition of uterine contraction by BNP may be attenuated at term when the BNP secretion from amnion cells are suppressed by cortisol and EGF.

PLD activity was identified in all intrauterine tissues. The specific activity of this enzyme was highest in amnion tissue. The PLD activity in amnion tissue at term (35 nmol/hour/mg protein) was almost twice higher than that in the second trimester. The PLD activity in cultured amnion cells was stimulated by 12-phorbol myristate acetate and A23187, indicating that the amniotic PLD is regulated by protein kinase C and Ca²⁺. In addition, PLD activity in cultured amnion cells was stimulated by arachidonic acid, arginine vasopressin, oxytocin, and ACTH, all of which are present in human amniotic fluid at term. Finally, the effect of phosphatidic acid (PA), the primary product of PLD, on the amnion cells was examined. PA stimulated the PGE₂ secretion from cultured amnion cells. These results suggest that PLD plays an important role in the signal transduction in amnion cells and maintenance of human pregnancy.

In conclusion, various bioactive substances in the amniotic fluid of fetal origin act on amniotic membrane, modulate the production of ET, BNP, PA or PGE₂, and finally regulate the intrauterine milieu to adapt the fetal survival.