

## Prostaglandin $F_{2\alpha}$ によるマクロファージの活性酸素産生 刺激作用の黄体退縮における意義

山口大学医学部産科婦人科学教室

杉野 法広 嶋村 勝典 田村 博史  
小野美央子 中村 康彦 加藤 紘

### Involvement of Stimulatory Effect of Prostaglandin $F_{2\alpha}$ on Superoxide Radical Production by Macrophages in Corpus Luteum Regression

Norihiro SUGINO, Katsunori SHIMAMURA, Hiroshi TAMURA, Mioko ONO,  
Yasuhiko NAKAMURA and Hiroshi KATO  
*Department of Obstetrics and Gynecology,  
Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi*

**概要** 黄体退縮における活性酸素と prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) の関与が注目されている。本研究では、マクロファージの活性酸素産生に及ぼす  $PGF_{2\alpha}$  の影響を検討した。偽妊娠ラットの7日目(黄体期中期)と13日目(黄体退縮期)に腹腔マクロファージを採取し、 $5 \times 10^5$  cells/ml に調整した細胞浮遊液に  $PGF_{2\alpha}$  を添加し90分間培養後、産生された活性酸素をチトクロームC法にて測定した。 $PGF_{2\alpha}$  は偽妊娠13日目の腹腔マクロファージの活性酸素産生を用量依存的に増加させ、 $10^{-6}$ M と  $10^{-5}$ M の濃度において有意の差が認められたが、偽妊娠7日目では有意の変化はみられなかった。この  $PGF_{2\alpha}$  の活性酸素産生促進作用は、protein kinase C (PKC) の阻害剤である H7, 細胞内  $Ca^{2+}$  キレート剤の BAPTA,  $Ca^{2+}$  channel blocker の Verapamil, 細胞外  $Ca^{2+}$  キレート剤の EGTA, GTP 結合蛋白阻害剤の百日咳毒素による1時間の前培養により有意に抑制された。

以上の成績より、 $PGF_{2\alpha}$  は、偽妊娠ラットの退縮期の腹腔マクロファージの活性酸素産生を促進させることが明らかとなった。そしてこの作用には、受容体から GTP 結合蛋白を介し、さらに  $Ca^{2+}$  channel を介した細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度の増加とそれによる PKC の活性化に至る細胞内情報伝達機構の関与が考えられた。

**Synopsis** The effect of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) on superoxide radical production by macrophages was studied in pseudopregnant rats. Peritoneal macrophages prepared on day 7 or 13 of pseudopregnancy (psp) were incubated with various doses of  $PGF_{2\alpha}$  for 90 min, and the production of superoxide radical was measured by the cytochrome C reduction method.  $PGF_{2\alpha}$  significantly stimulated superoxide radical production by macrophages on day 13 of psp, but not on day 7 of psp. The pretreatment of macrophages with an inhibitor of protein kinase C (H7),  $Ca^{2+}$  channel blocker (Verapamil),  $Ca^{2+}$  chelators (EGTA, BAPTA), and an inhibitor of GTP-binding protein (pertussis toxin) prevented the stimulatory effects of  $PGF_{2\alpha}$  on superoxide radical production. In conclusion,  $PGF_{2\alpha}$  stimulated superoxide radical production by macrophages through the intracellular signal transduction pathway including activation of protein kinase C through the GTP-binding protein and  $Ca^{2+}$  influx, which would play important roles in the luteolytic process in psp rats.

**Key words:** Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  • Macrophages • Superoxide radical • Luteolysis

#### 緒言

退縮期の黄体では活性酸素、過酸化水素などの活性酸素種や過酸化脂質の増加がみられ<sup>1)~5)</sup>, さ

らにこれらが黄体の progesterone 分泌を抑制することが報告されている<sup>6)~10)</sup>. 我々は、退縮期の黄体内にマクロファージが増加することから、退縮

期における黄体内の活性酸素種の増加の一因としてマクロファージからの活性酸素が関与していることを報告した<sup>11)</sup>。すなわち、退縮期の黄体ではマクロファージを活性化し、活性酸素を産生させる因子が存在することが考えられる。prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) は、黄体退縮因子として退縮期の黄体内および血中で増加しているが<sup>12)</sup>、我々は、このPGF<sub>2α</sub>が黄体内の過酸化脂質の増加を引き起こすことを報告した<sup>5)</sup>。そこで今回は、PGF<sub>2α</sub>がマクロファージの活性酸素産生を促進させるかどうかを検討し、さらにその作用過程における細胞内情報伝達機構を調べた。

### 実験材料および実験方法

Sprague-Dawley系成熟雌ラット(体重220~270g)を室温24.1±1°C、湿度60±5%、定時照明(5:00~19:00)の環境下で飼育し、少なくとも2周期の正常性周期を示したものを実験に用いた。偽妊娠は、proestrusの18:00とestrusの9:00にガラス棒による頸管刺激を1分間与えることによって誘導し、腔スミアでestrusを示した最後の日を偽妊娠の1日目とした。

#### 1. 腹腔マクロファージの単離

偽妊娠の7日目(黄体期中期)又は13日目(黄体退縮期)にエーテル麻酔下にラットを断頭屠殺した。4IU/ml heparinおよび20mM HEPES (Sigma)含有、phenol red非含有の冷Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; 日本製薬株式会社) 20mlを腹腔内に投与した。1分間腹部をマッサージし、採取した腹腔液を4°C、220×gで10分間遠心し、上清を除去した後、冷HBSSにてピペティングする洗浄操作を3回行い細胞を洗浄した。この洗浄細胞をHBSSに浮遊させ、プラスチックシャーレに分注し、37°C、5%CO<sub>2</sub>:95%airの条件下に1時間培養した。その後、温HBSSにて繰り返しシャーレを洗浄して非付着細胞を除去し、引き続き2.5mM EDTAを含む冷HBSSをシャーレに加え20分間水冷して付着細胞を剥離した。得られた細胞は、220×g、4°C、10分間遠心した後、マクロファージとして実験に用いた<sup>13)14)</sup>。なお、付着細胞は、約90%が大型の単核球であることを確認した。

#### 2. マクロファージの培養

マクロファージの活性酸素産生に及ぼすPGF<sub>2α</sub>の影響を検討した。マクロファージを培養液(0.25mM EDTA含有HBSS, 無血清)で5×10<sup>5</sup>cells/mlの濃度に調整し、各種濃度のPGF<sub>2α</sub>(10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M; 小野薬品工業株式会社から提供)と50μMのチトクロームC (Sigma)を添加し、96穴のculture plate (200μl/well)にて37°C、5%CO<sub>2</sub>:95%airの条件下で90分間培養した。PGF<sub>2α</sub>は、エタノールで溶解し、培養液で希釈した。培養に用いられたエタノールの終濃度は0.01%以下であり、測定系に影響を与えなかった。培養終了後、culture plateを900×gで10分間遠心し、上清の吸光度(550nm)を測定した。活性酸素量は、チトクロームCのmolar extinction coefficientを21.0×10<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>として計算した<sup>11)15)</sup>。なお、吸光度の増加が活性酸素によるものであることを確認するために、活性酸素の消去剤であるsuperoxide dismutase (ウシ赤血球, Sigma) 300U/mlを同時に添加し、また、これをblankとして用いた。なお、培養は、triplicateで行い、結果は3回又は4回の実験のmean±SEMで表した。

次に、PGF<sub>2α</sub>によるマクロファージの活性酸素産生促進作用における細胞内情報伝達機構を検討した。偽妊娠13日目の腹腔マクロファージを5×10<sup>5</sup>cells/mlの濃度に調整した細胞浮遊液(50μMチトクロームC含有)にprotein kinase C (PKC)の阻害剤である1-(5-isoquinoline sulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H7; 生化学工業株式会社)(10μM, 25μM, 100μM)、細胞内Ca<sup>2+</sup>キレート剤である1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA; Sigma)(25μM, 50μM, 100μM)、Ca<sup>2+</sup> channel blockerのVerapamil (Sigma)(0.01mM, 0.05mM, 0.1mM)、細胞外Ca<sup>2+</sup>キレート剤であるethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA; Sigma)(1mM, 2mM, 5mM)、そしてGTP結合蛋白阻害剤である百日咳毒素(生化学工業株式会社)(0.25μg/ml, 0.5μg/ml, 1μg/ml)をそれぞれ添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>:95%airの条件下に1時間の前培養を行っ

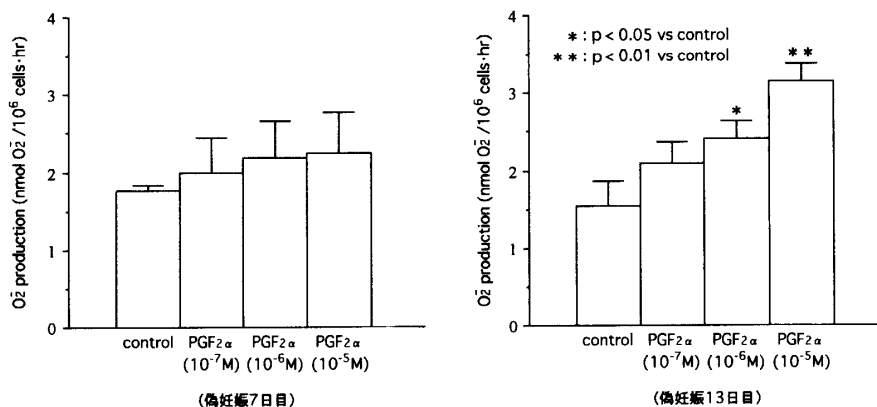


図1 偽妊娠ラットの腹腔マクロファージの活性酸素産生に及ぼす PGF<sub>2α</sub> の影響

た。その後、PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-5</sup>M) を添加しさらに同様の条件下に90分間培養し、前述の方法で活性酸素を測定した。なお、H7, Verapamil, EGTA, 百日咳毒素は培養液にて希釈し、BAPTA は、DMSO で溶解した後培養液で希釈した。培養に用いられた DMSO の最終希釈濃度は、0.1% 以下で測定系には影響しなかった。

実験データの有意差検定は、ANOVA および Duncan's new multiple range test を用い、 $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

#### 実験成績

PGF<sub>2α</sub> は、偽妊娠13日目の腹腔マクロファージの活性酸素産生を濃度依存的に増加させ、10<sup>-6</sup>M と10<sup>-5</sup>M の濃度で有意の増加を示した(図1)。しかし、偽妊娠7日目のマクロファージにおいては PGF<sub>2α</sub> の有意な作用はみられなかった(図1)。H7, BAPTA, Verapamil, EGTA, そして百日咳毒素による前培養は、PGF<sub>2α</sub> による偽妊娠13日目の腹腔マクロファージの活性酸素産生促進作用を有意に抑制した(図2 a~e)。なお、これらの阻害剤単独によるマクロファージの活性酸素産生量と培養終了後の cell viability は、それぞれ control 群; 1.3nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>cells · hr, 83.3±2.0%, H7群(100μM); 1.5nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>cells · hr, 83.2±1.4%, BAPTA 群 (100μM); 1.1nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>cells · hr, 84.1±1.2%, Verapamil(0.1mM)群; 1.1nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>cells · hr, 81.7±2.7%, EGTA(5mM)群; 1.1nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>cells · hr, 81.0±1.9%, PT (1μg/ml) 群; 1.7nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>cells · hr,

80.9±2.5%と同じレベルであった。

#### 考察

退縮期の黄体内では、活性酸素種が増加し<sup>1)~5)</sup>、さらにこの活性酸素種が黄体の progesterone 分泌を抑制することから、黄体退縮に活性酸素種の増加が関与することが明らかにされている<sup>6)~10)</sup>。我々は、退縮黄体ではマクロファージの活性酸素産生能が亢進していることから、マクロファージからの活性酸素が黄体退縮期における活性酸素種の増加の一因となることを報告した<sup>11)</sup>。PGF<sub>2α</sub> は、黄体退縮期において黄体組織内や血中に増加し<sup>12)</sup>、さらに今回 PGF<sub>2α</sub> が退縮期の腹腔マクロファージの活性酸素産生を促進させることが明らかとなった。黄体に存在するマクロファージが腹腔マクロファージと同じように PGF<sub>2α</sub> に反応するか否かは不明である。しかし、Kirsch et al.<sup>16)</sup> は、腹腔マクロファージも黄体内のマクロファージも黄体の progesterone 分泌に及ぼす影響は同じであったと報告しており、さらに、卵巣以外の組織、例えば脾臓や腹腔からのマクロファージが卵巣に浸潤し、黄体機能に影響を及ぼすことも明らかにされている<sup>17)18)</sup>。すなわち、黄体退縮期に腹腔マクロファージが黄体に移行し、その活性酸素産生能が PGF<sub>2α</sub> によって促進され黄体退縮に関与する可能性は高い。黄体内のマクロファージは、退縮が進むにつれてその数が増加する<sup>11)19)20)</sup>が、我々は、偽妊娠ラットにおいて PGF<sub>2α</sub> を投与すると黄体内の活性酸素種が増加し、しかもこの作用は、黄体の退縮が進むにつれて促進されることを報告

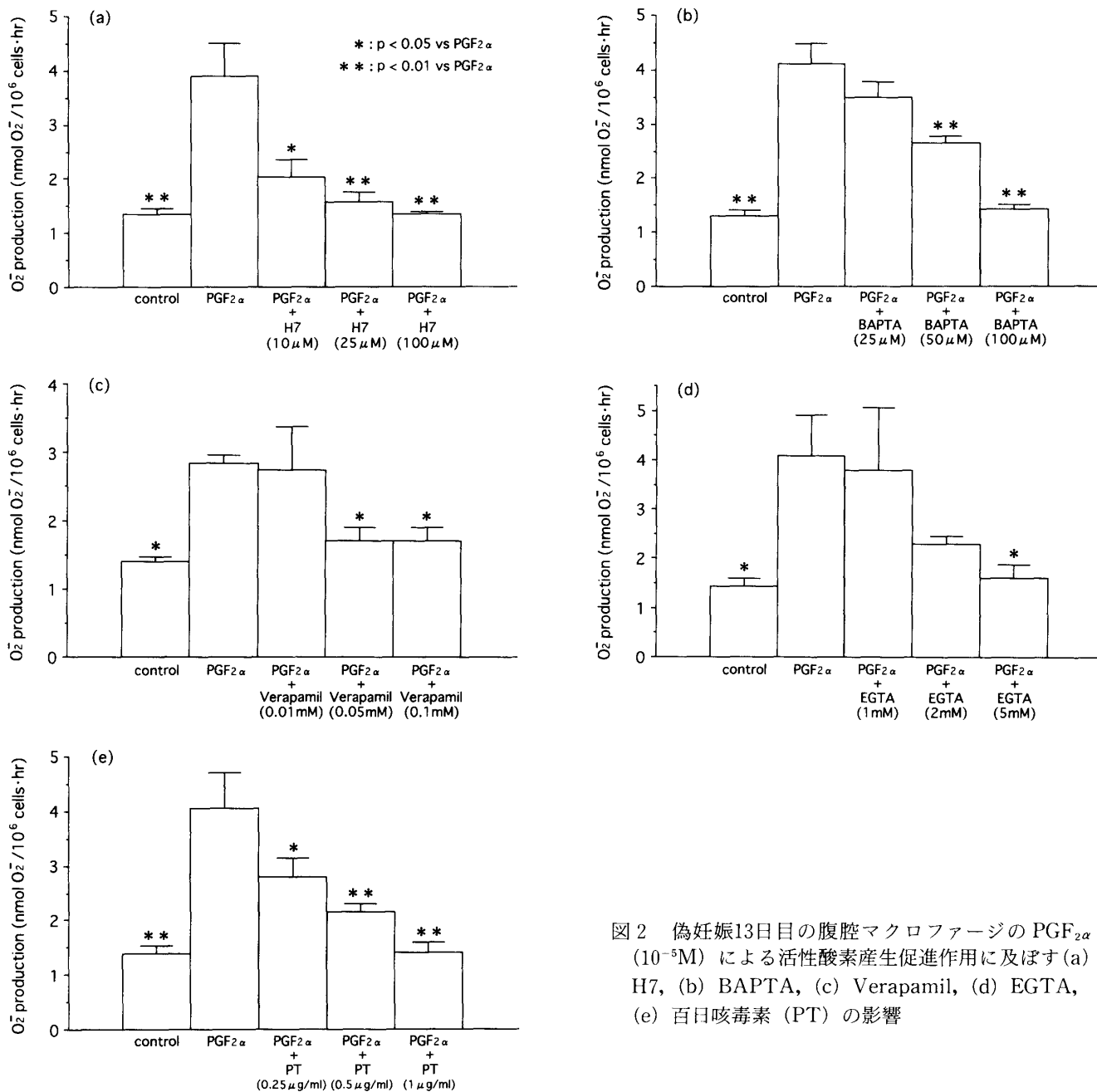


図2 偽妊娠13日目の腹腔マクロファージのPGF<sub>2α</sub> (10<sup>-5</sup>M)による活性酸素産生促進作用に及ぼす(a) H7, (b) BAPTA, (c) Verapamil, (d) EGTA, (e) 百日咳毒素 (PT)の影響

している<sup>5)</sup>。

近年、黄体退縮現象におけるアポトーシスの関与が注目され<sup>21)22)</sup>, また、アポトーシスを引き起こす因子のひとつとして活性酸素が考えられている<sup>23)~25)</sup>。PGF<sub>2α</sub>によりマクロファージから産生された活性酸素が黄体のアポトーシスを引き起こし黄体退縮に関与する可能性は興味もたれるところである。

PGF<sub>2α</sub>によるマクロファージの活性酸素産生の機序については、図3に示したごとく受容体か

らGTP結合蛋白を介し、phosphatidil inositol系による小胞体からのCa<sup>2+</sup>やCa<sup>2+</sup> channelを介したCa<sup>2+</sup>の流入による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加とそれによるPKCそしてNADPH oxidaseの活性化に至る細胞内情報伝達機構の関与が考えられた。PGF<sub>2α</sub>は、種々の細胞において、phosphatidil inositol系の亢進と細胞内のCa<sup>2+</sup>の増加、あるいは、PKCの活性化を誘導することが報告されており<sup>26)~29)</sup>, 偽妊娠ラットの黄体退縮期の腹腔マクロファージにおいても同様な機構が存在しているこ

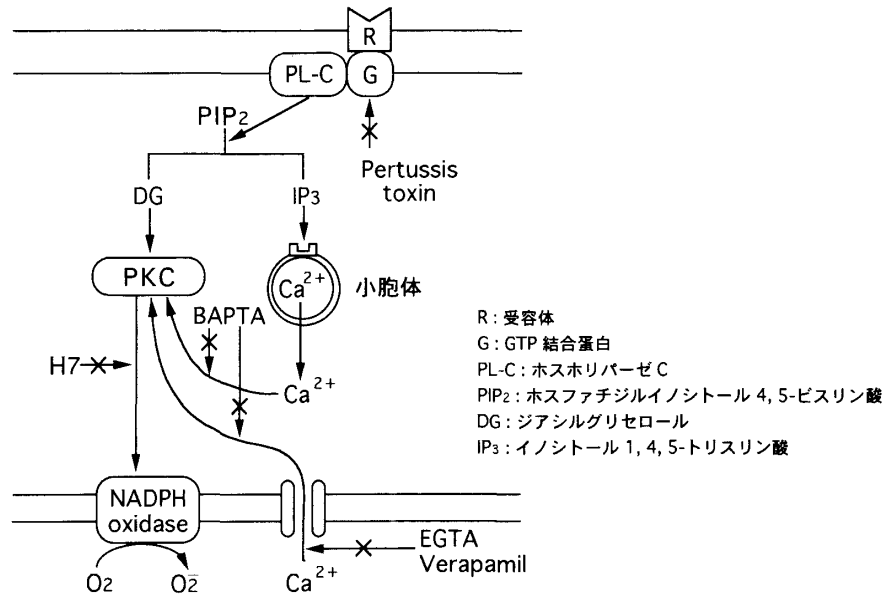


図3 PGF<sub>2α</sub>による腹腔マクロファージの活性酸素産生作用における細胞内情報伝達機構

とが窺われた。

PGF<sub>2α</sub>による活性酸素産生促進作用が黄体退縮期のマクロファージにのみ認められ、黄体期中期のマクロファージではみられないことは、興味深い。詳細なメカニズムは、不明であるが黄体期中期レベルのprogesteroneがPKCの活性化を介したphorbol 12-myristate 13-acetateによるマクロファージの活性酸素産生を抑制することから<sup>11)</sup>、黄体期中期のマクロファージではPGF<sub>2α</sub>の作用がprogesteroneにより減弱させられているのかもしれない。今後さらなる検討が必要である。

PGF<sub>2α</sub>は、黄体退縮因子として知られているがその正確な作用機序についてはいまだ不明な点も多い。今回の結果からPGF<sub>2α</sub>が黄体内のマクロファージの活性酸素産生を促進させている可能性が考えられ、PGF<sub>2α</sub>によるマクロファージからの活性酸素産生を介した黄体退縮への関与が示唆された。Rothchild<sup>30)</sup>は、黄体の退縮の引き金には黄体細胞内におけるPGF<sub>2α</sub>とprogesteroneのバランスが重要な役割を果たしていると述べており、黄体機能調節におけるPGF<sub>2α</sub>の役割は、なお検討を要する。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(07771381)により行われた。

## 文 献

1. Sawada M, Carlson JC. Association of lipid peroxidation during luteal regression in the rat and natural aging in the rotifer. *Exp Gerontol* 1985; 20: 179-186
2. Sawada M, Carlson JC. Superoxide radical production in plasma membrane samples from regressing rat corpora lutea. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; 67: 465-471
3. Riley JCM, Behrman HR. In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinology* 1991; 128: 1749-1753
4. Sugino N, Nakamura Y, Takeda O, Ishimatsu M, Kato H. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 347-351
5. Shimamura K, Sugino N, Yoshida Y, Nakamura Y, Ogino K, Kato H. Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 253-257
6. Behrman HR, Aten RF. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormonesensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. *Endocrinology* 1991; 128: 2958-2966
7. Gatzuli E, Aten RF, Behrman HR. Inhibition of gonadotropin action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells.

- Endocrinology 1991 ; 128 : 2253—2258
8. *Sugino N, Nakamura Y, Okuno N, Ishimatsu M, Teyama T, Kato H.* Effects of ovarian ischemia-reperfusion on luteal function in pregnant rats. *Biol Reprod* 1993 ; 49 : 354—358
  9. *Sugino N, Kato H.* The role of ischemia-reperfusion injuries in generating reactive oxygen species during luteolysis. *Adv Contracep Deliv Syst* 1994 ; 10 : 95—106
  10. *Musicki B, Aten RF, Behrman HR.* Inhibition of protein synthesis and hormone sensitive steroidogenesis in response to hydrogen peroxide in rat luteal cells. *Endocrinology* 1994 ; 134 : 588—595
  11. *Sugino N, Shimamura K, Tamura H, Ono M, Nakamura Y, Ogino K, Kato H.* Progesterone inhibits superoxide radical production by the mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 749—754
  12. *Olofsson J, Norjavaara E, Selstman G.* In vivo levels of prostaglandin F<sub>2α</sub> E<sub>2</sub> and prostacyclin in the corpus luteum of pregnant and pseudopregnant rats. *Biol Reprod* 1990 ; 42 : 792—800
  13. *Hu SK, Mitcho YL, Rath NC.* Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1988 ; 10 : 247—252
  14. *Chao TC, VanAllen PJ, Greager JA, Walter RJ.* Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cell Immunol* 1995 ; 160 : 43—49
  15. *McCord JM, Fridovich I.* The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968 ; 243 : 5753—5760
  16. *Kirsch TM, Friedman AC, Vogel RL, Flickinger GL.* Macrophages in corpora lutea of mice: Characterization and effects on steroid secretion. *Biol Reprod* 1981 ; 25 : 629—638
  17. *Adashi EY.* The potential relevance of cytokine to ovarian physiology: The emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr Rev* 1990 ; 11 : 454—464
  18. *Matsuyama S, Shiota K, Tachi C, Nishihara M, Takahashi M.* Splenic macrophages enhance prolactin and luteinizing hormone action in rat luteal cell cultures. *Endocrinol Japon* 1992 ; 39 : 51—57
  19. *Bulmer D.* The histochemistry of ovarian macrophages in the rat. *J Anat Lond* 1964 ; 98 : 313—319
  20. *Brannstrom M, Giesecke L, Moore IC, Heuvel CJ, Robertson SA.* Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod* 1994 ; 50 : 1161—1167
  21. *Juengel JL, Garverick HL, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF.* Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 1993 ; 132 : 249—254
  22. *Rueda BR, Wegner JA, Marion SL, Wahlen DD, Hoyer PB.* Internucleosomal DNA fragmentation in ovine luteal tissue associated with luteolysis: In vivo and in vitro analyses. *Biol Reprod* 1995 ; 52 : 305—312
  23. *Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Millman CL, Korsmeyer SJ.* Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993 ; 75 : 241—251
  24. *Kane DJ, Sarafian TA, Auton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE.* Bcl-2 inhibition of neural death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993 ; 262 : 1274—1277
  25. *Tilly JL, Tilly KI.* Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995 ; 136 : 242—252
  26. *Macphee CH, Drummomd AH, Otto AM, Asua LJ.* Prostaglandin F<sub>2α</sub> stimulates phosphatidylinositol turnover and increases the cellular content of 1,2-diacylglycerol in confluent resting Swiss 3T3 cells. *J Cell Physiol* 1984 ; 119 : 35—40
  27. *Davis JS, Weakland LL, Weiland DA, Farese RV, West LA.* Prostaglandin F<sub>2α</sub> stimulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in bovine luteal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 3728—3732
  28. *Wiltbank MC, Knickerbocker JJ, Niswender GD.* Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. I: Phosphorylation activity and steroidogenic action in large and small ovine luteal cells. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 1194—1200
  29. *McGuire WJ, Juengel JL, Niswender GD.* Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> in the ovine corpus luteum in vivo. *Biol Reprod* 1994 ; 51 : 800—806
  30. *Rothchild I.* The regulation of mammalian corpus luteum. *Recent Prog Horm Res* 1981 ; 37 : 183—218