

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

産婦人科の実際 (1996.10) 45巻10号:1261～1266.

黄体機能を考える—臨床へのフィードバック
黄体機能と活性酸素

石川睦男、玉手健一、千石一雄

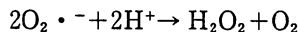
黄体機能と活性酸素

石川睦男* 玉手健一* 千石一雄*

黄体機能にスーパーオキシド (O_2^-) や過酸化水素などの活性酸素が関与していることが少しずつ解明されてきている。活性酸素の半減期がきわめて短いため、 O_2^- を消去する SOD に着目して研究を進めた結果、ヒトとラットにおいて、黄体形成とともに Mn-SOD が上昇し、かつ progesterone の産生と相関していた。しかし、ヒトとラットでは Mn-SOD と Cu, Zn-SOD の挙動が異なり、種特異性が存在していた。

活性酸素とは

活性酸素とは、われわれが呼吸する大気中の酸素よりも活性化された酸素およびその関連分子の総称で、生体内では、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2) およびヒドロキシラジカル ($HO\cdot$) の 3 種類が問題となり、主に図 1 のような抗酸化酵素のはたらきで代謝される¹⁾。 O_2^- の細胞内での寿命は短く、拡散距離も短く、さらに O_2^- は生体内を通過できないため、 O_2^- を生成する部位に SOD が存在してはならない。これを反映して進化の過程で、内因性の反応で O_2^- を生成する細胞小器官や部位に SOD の含有量が高くなっているわけである。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は O_2^- を消去する酵素で、下記の反応を触媒する。



ヒトには表 1 に示した 3 種類の SOD が存在している。Cu, Zn-SOD は Cu と Zn をもった単

量体 2 個からなり細胞質に大量存在する。また、とくに肝臓や赤血球中に多く、血中レベルは溶血の影響を強く受ける²⁾。Mn-SOD はミトコンドリアに局在し、Cu, Zn-SOD と異なり KCN で失活されないで区別できる。本酵素は TNF や IL-1 などのサイトカインで誘導され、TGF によって発現が抑制される。EC-SOD は

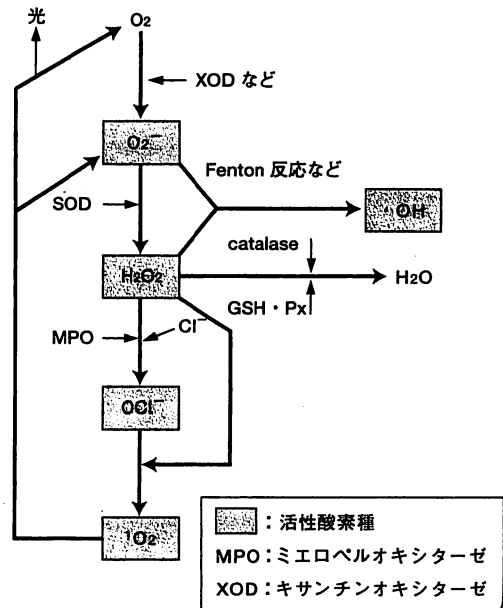


図 1 生体における活性酸素の代謝

*Mutsuo ISHIKAWA, Kenichi TAMATE, Kazuo SENGOKU

旭川医科大学産婦人科学教室

〒078 旭川市西神楽 4 線 5 号 3-11

表 1 ヒトに存在する 3 種類の SOD

	Cu, Zn-SOD	Mn-SOD	EC-SOD
分 布	細胞質	ミトコンドリア	分泌性 (細胞外)
分 子 量	32,000	88,000	135,000
サブユニット	二量体	四量体	四量体
金 属 (モノマーあたり)	1 Cu, 1 Zn	1 Mn	1 Cu, 1 Zn
染 色 体	21q22	6q21	4pter-q21
特 徴	家族性筋萎縮性側索硬化症で遺伝子に変異糖化を受け失活・断片化	サイトカイン, ホルモン誘導される	ヘパリン結合ドメインを持つ
活性阻害			
CN	+	-	++
H ₂ O ₂	+	-	++
ジエチルジチオカルバメート	+	-	++
2% SDS	-	+	++

血液中に存在し、肺、脾臓、乳汁中などにもみられる。Cu と Zn を 1 分子ずつ含有し、ヘパリン結合ドメインを持つ糖蛋白質である。本酵素はインターフェロン- γ で増加し、TGF- β で抑制される³⁾。

黄体退縮においては、各種の卵巣において白血球やマクロファージの浸潤が黄体に認められている。これらの細胞は過酸化水素に産生する能力を有し、細胞障害をもたらすことは可能である。Behrman らは一連の研究では、黄体に増加した H₂O₂ が、LH 受容体複合物の急激なデセンタイゼーションにより ATP の減少をもたらす黄体退縮作用を発現していることを見出した。また、xanthine oxidase は黄体の過酸化水素の発生源としての意義を見い出している⁴⁾⁻⁶⁾。また、Sugino らはラット黄体に SOD 活性と過酸化脂質の変動を報告している⁷⁾。

活性酸素はきわめて短い半減期のため、生物学的作用の役割を明確にすることはできない。そのため、われわれは O₂⁻ を消去する SOD に着目して黄体機能における活性酸素の役割を検討してきた成績を解説する⁸⁾。

黄体の退縮は細胞機能の変性の代表的なもの 1 つで、生殖機能においては正常かつ必須の

過程である。おそらく、卵巣機能に酸化過程が関与していることを最初に示唆した事実は、LH が黄体のアスコルビン酸を減少させたという観察と考えられる。黄体退縮作用の有する Prostaglandin F₂ α もまたアスコルビン酸を減少させ、自然の退縮と同様の効果を示す。また、卵巣における LH のアスコルビン酸減少は、SOD や peroxidase 活性を増加させる。最近、黄体退縮に活性酸素が関与している報告がみられてきている。すなわち、過酸化水素は卵巣の ATP の減少や、gonadotropin 依存の cAMP や Progesterone の産生の減少をもたらす。

アスコルビン酸は O₂⁻ との反応性は SOD に比べて 7,000 分の 1 であるが、ヒドロキシラジカル (HO \cdot) との反応性は高いため、生体内ラジカル消去機構に必須なはたらきをしている。

さらに、アスコルビン酸のラジカル補足の生体反応として重要なものにビタミン E の再生作用、すなわちアスコルビン酸が生体膜表面においてラジカルとなったビタミン E のラジカルを受け取り、ビタミン E を再生する作用がある。

表 2 ラット黄体における SOD の局在

染色法	SOD 活性 mNBT	Cu, Zn-SOD ABC	Mn-SOD ABC
黄体			
黄体細胞 (月経)	+	-	+
黄体細胞 (妊娠)	++	-~+	++

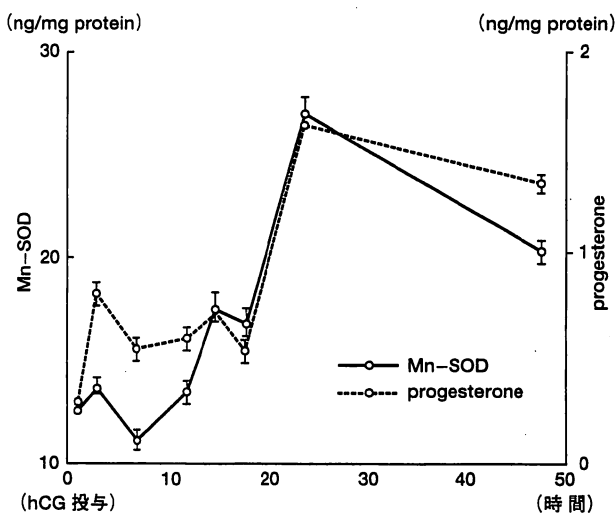


図 2 過排卵ラット卵巣中 Mn-SOD および progesterone 濃度

I. ラット黄体期における活性酸素

1. Cu, Zn-SOD および Mn-SOD のラット卵巣における分布, 局在

過排卵処置ラットの卵巣を用いて各 SOD の局在性を検討した。組織化学的に Beauchamp らの nitroblue tetrazolium 法 (NBT 法) を用いて SOD 活性の局在をみた。その結果, 黄体において強い SOD 活性を認めた。また, 免疫組織学的局在については Avidin-Biotin peroxidase complex (ABC) 法にて検討した。Cu, Zn-SOD は黄体には, ほとんど染色されなかったが, Mn-SOD は黄体細胞に強い染色性を示した。さらに, HCG 投与後のラット黄体の Mn-SOD の染色性をみると, HCG 投与時間が経過するにつれて Mn-SOD 染色性が増加していった。また, 妊娠黄体においては, 強い Cu, Zn-SOD の

染色性は認められたが, Mn-SOD の強い染色性が認められた^{9)~11)}。

2. ラット卵巣における Mn-SOD mRNA および蛋白の動態

免疫染色における結果を考察し, hCG 投与後のラット卵巣中 Mn-SOD mRNA および蛋白質の経時的变化を Northern blot および ELISA 法にて検討した。また同一検体の progesterone 濃度を RIA 法にて測定した。過排卵ラット卵巣における Mn-SOD mRNA は全時期をつうじて発現しており, 発現のピークは hCG 投与後 7~12 時間であった。また, Mn-SOD 蛋白質は hCG 投与 12 時間後より増加しはじめ 24 時間後に 26.8 ng/mg/protein と最高値となり, 48 時間後では漸減し, 同組織の progesterone 濃度と全く同じ推移であった (図 2)。この成績よりラット黄体機能に Mn-

表 3 ヒト卵巣における Cu, Zn-SOD と Mn-SOD の局在

染色法	SOD 活性 mNBT	Cu, Zn-SOD ABC	Mn-SOD ABC
黄体			
黄体細胞 (月経)	+	-~+	+
黄体細胞 (妊娠)	++	+	+~++
吸引顆粒細胞		+	++

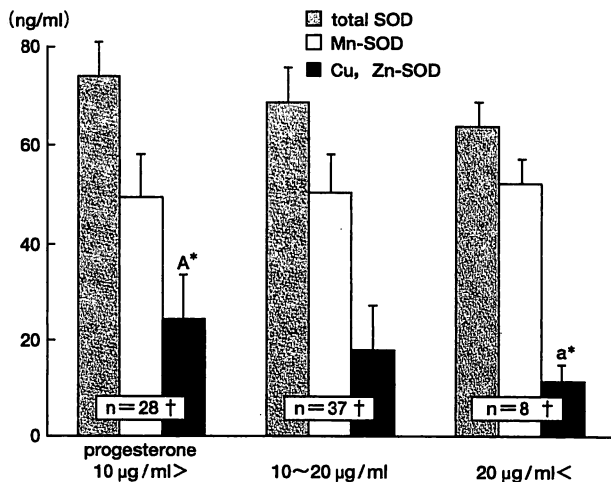


図 3 Progesterone 濃度別における卵胞液中各 SOD 濃度の比較

* : A-a : $p < 0.05$, † : サンプル数

SODmRNA の発現から蛋白合成が密接に関連し合っていることが示された。Mn-SODmRNA および蛋白はその調節遺伝子由来の活性型サブレッサーが superoxide anion によって不活性型となり、Mn-SOD 構造蛋白質遺伝子が発現することにより誘導・合成されることが報告されている¹³⁾。したがって、排卵過程のきわめて早期に superoxide anion を中心とした活性酸素が発生・増加し、Mn-SOD mRNA および蛋白を誘発すると推測される。これは以前報告した SOD 投与による排卵抑制実験の結果と時間的に一致しており、hCG 投与直後から 7 時間後には活性酸素が発生し、黄体機能に対して促進的にはたらくものと考えられる^{10)~13)}。

II. ヒト黄体期における活性酸素

1. Cu, Zn-SOD および Mn-SOD のヒト卵巣における分布・局在

正常性周期を有する婦人で、子宮筋腫および子宮頸癌患者で手術時採取した黄体期の卵巣ならびに子宮外妊娠時の黄体、および体外受精-胚移植患者より得た顆粒膜細胞を用いた。以上、すべての検体使用に際しては、患者本人の同意を得た。一次抗体をおのおの、ヒト肝臓の Mn-SOD およびヒト赤血球の Cu, Zn-SOD に対するモノクローン抗体を用い、ラット同様の ABC 法による免疫染色を行った。ABC 法による免疫組織学的検討では Mn-SOD は吸引顆粒膜細胞においても Mn-SOD が強く局在していた。さらに子宮外妊娠における妊娠黄体および非妊娠

時黄体のいずれの黄体細胞においても Mn-SOD は比較的強く認められた。一方, Cu, Zn-SOD は血管上皮細胞を中心とした成熟卵胞莢膜細胞層, 妊娠黄体の辺縁に認められるのみであった。以上, SOD の分布を表 3 に示す。ヒトおよびラット卵巣および SOD の局在検討より, 黄体の SOD の分布は Mn-SOD が中心であり広く分布するのに対し, Cu, Zn-SOD は比較的限局した部位にのみ存在し, またヒトとラットとはその分布が異なり, SOD 分布に動物種で差のあることが判明した。

2. ヒト卵胞液中 Mn-SOD および Cu, Zn-SOD 濃度

体外受精-胚移植患者より採取した卵胞液中各 SOD 濃度を, ELISA 法により測定した。なお Mn-SOD の測定感度は 2~200 ng/ml で同時再現性 CV 値 3% であり, Cu, Zn-SOD の測定感度は 3.13~200 ng/ml で CV 値は 3.6~4.7% であった。また同一検体の progesterone 濃度を RIA 法にて測定した。ヒト卵胞液 70 検体を progesterone 濃度より 3 群に分け, おのこの各 SOD 濃度を比較した(図 3)。各群の Mn-SOD ならびに total SOD 濃度には差を認めなかった。しかし, Cu, Zn-SOD 濃度は progesterone 高値群ほど減少し, progesterone 高値群の Cu, Zn-SOD は低値群より有意に低い値であった ($p < 0.05$)。この卵胞液中 Cu, Zn-SOD の由来は免疫組織学的検討より莢膜細胞層, ことに血管上皮と考えられ, 排卵の進み黄体化した高 progesterone 群の Cu, Zn-SOD が低いことは卵胞成熟過程のなかで莢膜層より卵胞液中に分泌・蓄積された Cu, Zn-SOD がその LH surge とともに発生した O_2^- により急激に消費されていく結果と考えられた(図 3)^{11)~13)}。

おわりに

成熟卵胞および黄体細胞では, ことに Mn-SOD が増加し, ステロイド産生能に関与していると推測され, この Mn-SOD の増加は LH surge 直後から増加する superoxide anion に

よって惹起されると考えられた。すなわち黄体機能, ことに progesterone 産生能に対し Mn-SOD が促進的に関与していることが推測された。

最近, Sugino らはラットの黄体の活性酸素が Progesterone で抑制されることを報告した¹⁴⁾。また, Sohal らは酸化物質の生成と抗酸化能は遺伝子の微妙な制御を受けており, この酸化還元のパランスが個体発生から老化にいたる一連の過程において, 逆に遺伝子発現を調節する重要な因子としてはたらくと報告している。また, エネルギー代謝の効率化にともなう抗酸化酵素の進化が微生物から哺乳類まで系統的に研究されてきている。しかし, 排卵・受精・分割および着床の過程において, 卵細胞および初期胚は急激かつ正確に細胞内でのエネルギー代謝の効率化を行っていることが明らかであるにもかかわらず, 十分な研究がなされていないのが現状である。今後, この領域においても活性酸素-消去系の研究が発展することを期待したい。

文 献

- 1) 石川睦男: 生殖医学と活性酸素-消去系. 日産婦誌, 45(8): 842~848, 1993.
- 2) 石川睦男, 玉手健一: スーパーオキシドと産婦人科疾患. 日産婦誌, 46(8): 855~864, 1994.
- 3) 谷口直之監修, 藤井順逸・鈴木敬一郎編: 活性酸素 Q & A. 医薬ジャーナル社, 大阪, 1996.
- 4) Behrman HR, Preston SL: Luteolytic actions of peroxide in rat ovarian cells. *Endocrinology*, 124(6): 2895~2900, 1989.
- 5) Riley JCM, Behrman HR: *In vivo* generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinology*, 128(4): 1749~1753, 1991.
- 6) Gatzuli E, Aten RF, Behrman HR: Inhibition of gonadotropin action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells. *Endocrinology*, 128(5): 2253~2258,

- 1991.
- 7) Sugino N, Nakamura Y, Takeda O, et al: Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil*, **97**: 347~351, 1993.
 - 8) Ishikawa M, Yaginuma Y, Hayashi H, et al: Reactivity of a monoclonal to manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, **50**: 2538~2542, 1990.
 - 9) Ishikawa M, Tamate K, Nakata T, et al: Superoxide dismutase/corpus luteum: Immunohistochemical localization of Cu, Zn—and Mn—superoxide anion in ovulation/luteal function. *ARTA*, **4**: 251~259, 1993.
 - 10) 玉手健一, 石川睦男, 千石一雄, 他: ラット排卵周辺期における活性酸素及び Superoxide Dismutase の意義. *日産婦誌*, **44**: 1~8, 1992.
 - 11) Tamate K, Sengoku K, Ishikawa M: The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynecol*, **21**(4): 401~409, 1995.
 - 12) 石川睦男, 玉手健一, 千石一雄, 他: 排卵と活性酸素・特集 “排卵—卵胞破裂のメカニズムを探る—”. *Hormone frontier in gynecology*, **1**(4): 343~349, 1994.
 - 13) Ishikawa M, Tamate K, Sengoku K, et al: The role of superoxide dismutase and ovarian function. *Assisted Reproduction Reviews*, **6**(1): 16~19, 1996.
 - 14) Sugino N, Shimamura H, Tamura M, et al: Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology*, **137**(2): 749~754, 1996.

* * * *

* * *