着床前後のラット子宮内膜における
progesterin, glucocorticoid 結合と glycogen 代謝 :
抗 progesterone RU-38486 の効果に関する研究

日本大学医学部産科婦人科学教室

(指導: 高木繁夫教授)

高 橋 徹, 坂 元 秀 樹, 大 谷 香
鈴 木 英 夫, 田 根 培, 高 木 繁 夫

A Study of Progesterin, Glucocorticoid Binding and
Glycogen Content in Rat Endometrium before and after Implantation:
Effect of Antiprogestosterone RU-38486

**Toru TAKAHASHI, Hideki SAKAMOTO, Kaori OHTANI,
Hideo SUZUKI, Konbair DEN and Shigeo TAKAGI**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nihon University School of Medicine

Pregnant rats were injected with 3H RU38486 into the uterine cavity on day 2, 4, 5 and 8 of pregnancy. Before implantation, the saturable RU binding increased significantly (day 2 vs. 4; 30.0 ± 2.3 vs. 640.0 ± 17.9 dpm/g, $p < 0.001$). After implantation, the binding became higher at the nidation site (implantation vs. non-implantation site; 1156.1 ± 237.1 vs. 595.0 ± 24.3 , $p < 0.001$, day 5). The dexamethasone suppressive RU binding, on the other hand, showed no significant increase during day 4, 5 and 8.

Daily administration of RU38486 during day 4 and 8 caused failure to implant or to develop normal conceptus. The endometrium in these RU treated animals was stained for tissue glycogen and studied light microscopically. The tissue glycogen content appeared to be markedly decreased in RU treated animals but only at the site of implantation. The decrease was observed in both decidua and trophoblasts but not in myometrium or decidual epithels.

The present results indicate;

- (1) In rats, endometrial progesterone binding increases prior to implantation.
- (2) After implantation, the nidation site further increases its saturable progesterone uptake compared to the non-implantation site.
- (3) When normal process of implantation is inhibited by RU38486 administration, there occurs a decrease in the glycogen synthesis at the nidation site, including decidua and trophoblasts.

緒 言

着床は胚と子宮内膜との局所的相互作用により成立するものと考えられ、したがって胚の分割、発育という胚側の因子と併せて、内膜側における血管拡張、透過性亢進、それに引き続く脱落膜反応の惹起などの着床準備状態が同調して整うことが必須と見做されている。すなわち、近年着床の成立については、その主導的役割が、胚または内膜のいずれかによって果たされるとするよりむしろこの両者の緊密な相互の連繋作用によって始めて成立し得るとする方向になりつつある。しかもこの相互の連繋作用は母体血行を介することなく、子宮腔のいわゆる luminal fluid を介する胚と内膜との相互の作用が一義的な役割を果たしているものと思われるが、この一連の機構の調節因子としてステロイドホルモン、プロスタグランディン、あるいはプロゲステロン依存性子宮内膜蛋白 (PEA-progesterone dependent endometrial protein) などの特殊蛋白等があげられている。通常このステロイドホルモンは直接子宮内膜に作用して、着床可能な状態を形成するとされるが、この状態は排卵前に上昇する血中 estrogen (E) の作用に基づく progesterone receptor (PR) の増加により内膜細胞の progesterone に対する感受性の亢進によるためのものと考えられている¹⁾。そしてこの progesterone には2つの由来があり、その一つは母体卵巣から、いま一つは卵自身により産生されるそれであろうとされている²⁾。ちなみに progesterone によって更に誘導されるものの一つに家兎子宮腔液中に認められる分子量14,000~15,000の蛋白、ウテログロビンなども報告されたが³⁾、その生理的作用については未だ明らかではない。これと同様にヒトのそれについてもプロゲステロン依存性子宮内膜蛋白が報告されたが⁴⁾、これらの蛋白の生殖生理における生物学的意義についてはなお明らかでない。しかし子宮内膜細胞自身が着床周辺期においてはステロイドホルモン依存性の特殊蛋白を分泌することは、それらがいずれも着床およびその後の妊娠維持にとって一定の役割をする可能性があることを示唆したものを受け取れる。

次にこれらのホルモン因子の他、糖類、リン脂質についても、子宮内膜自身の局所生理にとってその調節因子になるものとされており、中でも glycogen はその子宮内蓄積量が妊娠の成立とともに急増し⁵⁾、また非妊動物では、子宮内膜における glycogen 蓄積には E が重要であるとする子宮筋⁶⁾のそれとは異なって、むしろ progesterone が重要な役割を果たしているものとされている⁷⁾。しかしこれまたその生理的役割については未だ明らかではない。しかし、着床以降における trophoblast の発育、あるいは decidua の reorganization あるいはステロイド代謝、蛋白合成などにいずれも多量の生化学的エネルギーを必要とすることにより、子宮内膜に蓄積された glycogen がその供給源となる可能性も否定し難いし、また着床の成立、維持に子宮内膜の glycogen 代謝に直接係わり、重要な因子となるものとも考えられる。

今回、我々は PR の antagonist である RU38486 を用いて、着床前後におけるラット子宮内膜の progesterone 結合および glucocorticoid 結合の推移を検討し、また、RU38486 の着床胚発育阻害作用を、着床部位における glycogen 産生の変化というパラメータを介して検討したのでここに報告する。

実 験 方 法

〔1〕

まず着床部位と非着床部位とにおける progesterone および glucocorticoid の結合分布を検討するため、以下の実験を行った。すなわち、Wister 系雌ラットを proestrus の午後から夕に交尾さ

せ、腔栓の形成を確認し、これをもって妊娠第0日とした。このラットを妊娠第2日、第4日、第5日及び第8日にそれぞれ、エーテル麻酔下に開腹し、両側子宮の卵管側及び子宮頸部側を結紮した後、ツ反用注射器を用いて、一側子宮腔内に100pCiの ^3H -RU38486 (1.87TBq/mmol, Roussel UCLAFより提供)のみを注入した。一方、対側子宮腔内には ^3H -RU38486に対して100倍量のモル濃度の progesterone 又は非標識 RU38486 (Rousselより提供)、あるいは250mg dexamethasone を ^3H -RU38486と同時に注入した。dexamethasone 以外のホルモンについてはいずれも溶媒を生理食塩水/エタノール=7/3とし、用いた。注入後、子宮角への mesenterium からの血行を温存しながら15分間 incubation を行い、その後両側子宮角を摘出した。摘出した子宮はその長軸方向に切開し、生理食塩水にて十分に洗浄し、その後10%緩衝ホルマリン溶液中で24時間室温にて固定した。固定後、実体顕微鏡下で着床部位とその周辺部位とをメスを用いて切り出し、濾紙上にて余剰の水分を除去した後、その湿重量を測定後、1 ml の NCS 組織溶解液 (tissue solubilizer for liquid scintillation counting; Amersham) を加え、70°Cにて48時間加温し、組織を完全に溶解し、次いで試料に10ml の econofluor (NEN Research Products) を加え、液体シンチレーションカウンター (Mark III model 6880, Searle Analytic Inc.) を用いて ^3H 測定効率50%でその radioactivity を測定した。結果はグラム組織量当量に換算した後、 ^3H -RU38486のみを注入した子宮角の値を総結合量 A とし、 ^3H -RU38486と共にその cold のみを注入した反対側子宮角の値を B とし、 $(A-B) = C$ をもって特異的結合量とし算定した。

〔II〕

子宮内膜における progesterone の生理的作用の一つとして、glycogen の子宮内膜細胞内への蓄積が示唆されている。よって着床部位における同様の作用の有無について検討するため、以下の実験を行った。すなわちラットに交尾後4日目より RU38486 (5mg/rat/day, 溶媒:ゴマ油) を4日間皮下に投与し、妊娠第8日目に断頭した。子宮を切開し、実験〔I〕と同様に固定を行った。次いで着床の痕跡部位を含む子宮組織をパラフィン包埋し、切片を作成後ベストカルミンにて染色を施行し、試料を光顕的に観察した。

実 験 成 績

〔I〕

(a) 着床と非着床部位における progesterone 結合分布

妊娠第2日より第8日にわたる子宮組織においては ^3H -RU38486の総結合量に著明な変動は見られなかった (Table 1)。これに対して、前述した方法により算定した ^3H -RU38486の結合量は妊娠第2日では $30.0 \pm 2.3 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=3$) と低値であるが、着床直前の第4日には $640.0 \pm 17.9 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ となり著明に増加した ($n=4$, $p<0.001$)。さらに着床直後の第5日では着床部における RU 結合は $1156.0 \pm 237.1 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($n=6$) となり、第2日に比較して約40倍の高値となったが ($P<0.01$)、その周辺部における結合は着床直前の値と比較し、変化がなかった (Table 1)。しかし着床後第8日になるとこの RU 結合は着床部で $700.0 \pm 34.1 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($n=4$) となり、一方の周辺部では $260.0 \pm 14.8 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($n=4$) に減少したが、着床部と周辺部との間になお有意の差が認められた ($P<0.001$) (Table 1)。

(b) グルココルチコイドの結合分布

RU-38486はPRに対する antagonistic ligand でありまた同時に glucocorticoid receptor (GR) の ligand である。従って、 ^3H -RU38486の結合のうち、dexamethasone による抑制部分はそのレ

セプターへの結合をある程度反映しているものと見做される。よってこれを利用し着床前後の glucocorticoid 結合の推移を検討した。glucocorticoid の ligand としての結合分布は妊娠第 2 日では $80.0 \pm 12.4 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($n = 3$) と低値であるが，着床直前の第 4 日に $1170.0 \pm 141.3 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($n = 4$) となり増加した ($P < 0.001$)。しかし，着床直後の第 5 日で，着床部におけるその結合は $1330.0 \pm 162.5 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($n = 4$) となり第 4 日のそれとの間に有意の変化は無く，引き続き第 8 日においても $1350.0 \pm 6.4 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ ($n = 4$) となり明らかな変動を認めなかった。これに対して 5 日目，8 日目の周辺部においては着床部の約 1/2 となり，第 8 日にはさらに減少した (Table 1)。

Table 1

	day 2	day 4	day 5		day 8	
			implantation	non-implantation	implantation	non-implantation
Total binding	1710.0 ± 87.2 (3)	1850.0 ± 158.2 (4)	1850.6 ± 251.8 (6)	1442.3 ± 92.9 (6)	1925.0 ± 49.3 (4)	1650.0 ± 94.3 (4)
progesterone binding*	30.0 ± 2.3 (3) ¹	640.0 ± 17.9 (4) ²	1156.1 ± 237.1 (6) ³	595.0 ± 24.3 (6) ⁴	700.0 ± 34.1 (4) ⁵	260.0 ± 14.8 (4) ⁶
glucocorticoid binding**	80.0 ± 12.4 (3) ⁷	1770.0 ± 141.3 (4) ⁸	1330.3 ± 162.5 (4) ⁹	770.3 ± 61.3 (3) ¹⁰	1350.0 ± 6.4 (4) ¹¹	580.0 ± 30.3 (4) ¹²

* cold RU suppressive ³H-RU binding ** dexamethasone suppressive ³H-RU binding
 1 vs. 2 < 0.001, 2 vs. 3 < 0.01, 3 vs. 4 < 0.001, 3 vs. 5 = not significant, 4 vs. 6 < 0.001
 5 vs. 6 < 0.001, 7 vs. 8 < 0.001, 8 vs. 9 = not significant, 9 vs. 10 < 0.02,
 9 vs. 11 = not significant, 11 vs. 12 < 0.001, ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, dpm/g)

〔Ⅱ〕

周知のとおりベストカルミンによって糖質，主として glycogen は赤色に染色されるが光顕的には，decidual epithel および myometrium のいずれも対照，および RU 処理群においてほぼ同一程度の赤色の染色陽性部分を認めた。一方 decidua/trophoblast では，対照群では着床部の decidua および trophoblast に多量の染色陽性所見を明瞭に認めたが，RU 投与群，すなわち胚の流産またはその吸収が起こったラットの子宮においては，着床の痕跡部分に残存する trophoblast あるいは decidua 中にベストカルミン染色陽性物質は全く認められなかった (Fig. ①②)。

考 案

今日，妊娠特に着床の成立には progesterone の子宮内膜における作用が極めて重要であることには疑いの余地はない。またこの progesterone は主として母体卵巣由来であるが，近年胚自身においても β -OH steroid dehydrogenase が証明され²⁾胚側にも progesterone 産生能力が存在することが示唆されている。また我々の検討では母体へ投与された RU は胚の正常な発育を阻害しがたいと思われるので⁸⁾胚で産生される progesterone も亦生理的条件下においては子宮内膜に対する胚由来の着床 signal となりその役目を果たしている可能性があるものと思われる。しかしその作用機序の本態についてはなお明らかでない。よって今回我々は，この点を中心に検討したが，まず今回用いた方法は謂わば semi-in vivo とも言える方法であり，従来の子宮内膜組織を用いる in vitro でのレセプターの調整方法に比較し，特異的結合を正確に定量する点で必ずしも十分と言い難い。しかし，より生理的状态に近いという利点に加えて，luminal fluid と子宮内膜との相互関係を可及的に変えることなく実験的操作を行い得る利点があるものと思われる。しかしこの方法による標識ステロイドの子宮内膜細胞への取り込みを見る上での問題点は，子宮腔内へ注入したトレーサーが組織の

表面から組織内方に向かって単位時間内にどの程度到達し得るかにあるものと思われる。我々の基礎検討はもとより、最近の Baulieu らも15分間の incubation ではトレーサーは子宮腔側から子宮内膜深部までを十分透過することが可能であろうと思われる⁹⁾。

次に isotopic dilution による特異的結合の算定については、左右の子宮角における ^3H -RU38486 の総結合量には著しい差は無く、また cold と競合させた対側のそれでも、hot のみの投与側に比較し、投与側の結合量が抑制されたので、この方法で算出した ^3H -RU 結合は PR の saturable binding (又は up take) の少なくとも一部を反映しているものと考えられる。しかしこのことが直接 in vitro で扱う receptor binding を反映しているものとは見做し難く、in vitro 実験に比べるとむしろ着床直前の luminal fluid 中に存在する progesterone が内膜側へ取り込まれる場合の態様を直接反映しているものと受け取れる。

したがって以上の方法論上の問題点の考慮をした上、今回の成績より、 ^3H -RU38486 の saturable binding は妊娠第2日目と4日目の間に著しい増加を見たことになり、従来の報告同様にこの時期に

は子宮全体の PR の増加¹⁰⁾が内膜レベルにおいても起こっているとの推定が可能になるものと思われる。さらにこの binding は第 5 日目の着床部がその周辺部に比較し、著しく増加をしている。したがってこの時期では着床周辺部分の結合が着床前（妊娠 4 日目）のそれと大差がないことを考えると、この部分での PR 結合は、着床現象を境に著しく増加をするものと考えられる。またこの傾向は妊娠 8 日目のそれにおいても同様である。一方、dexamethasone によって抑制される ³H-RU38486 の結合は、妊娠第 4 日目のそれでは 2 日目のそれに比較して著しく増加をしたが、その後の着床部においては第 5 日目、8 日目ともに PR 結合に見られた増加がなく、むしろ周辺部分においていずれも結合低下を認めた。したがって RU の glucocorticoid receptor への結合は、ラットにおいては子宮、子宮内膜でのそれが弱いとされてもいるため¹¹⁾、今回の検討のみでその生理的意義を推測することには問題があり、またヒトにおいても子宮・胎盤における glucocorticoid 結合が着床、及びその後の生理にとって重要な役割を果たしている可能性もあるため¹²⁾、今後の検討すべき問題点の一つであろうと思われる。

次に RU38486 は現在その黄体期短縮作用¹³⁾と妊娠初期における着床阻害又は流産効果⁸⁾¹¹⁾が注目されている。しかし今回の成績より RU は妊娠成立の初期段階で殊に胞胚の着床部位に比較的選択的に取り込まれることが強く示唆をされるため、RU の対子宮作用は着床部位に最も強く出現する可能性があるものと受け取れよう。

次に我々は妊娠第 4 日目から RU の投与によって着床の阻害あるいは胞胚の正常な発育を抑制し、痕跡程度の子宮内膜肥厚を残して流産誘発を見ると報告したが⁸⁾、今回はこの部分における glycogen の組織中濃度の変化について形態学的に観察し、RU の投与 rat において着床部における glycogen 量が著しく低下をしていることを示唆する所見を得たが、これについては流産による二次的变化を示したそれとも考えられる。しかし今回の成績より RU が着床周辺期においては着床部位を中心に取り込まれていること、また内膜細胞の *in vitro* 培養系では、RU に progesterone による子宮内膜の glycogen 産生の抑制作用があるとされてもいるため⁷⁾、RU 投与群ではむしろ流産完了以前に着床部分における glycogen 産生能の低下が起こっているものと考えられる。

今回の成績では光顕レベルでは非着床部分の glycogen 量および子宮筋細胞内の glycogen 濃度が RU 投与群と対照群との間に明らかな変化を認めることができなかった。このことは子宮内膜の着床部分においては glycogen 代謝のみより強い RU の抑制をうけることを意味しているが、反面その由来が着床部と非着床部との間にみる PR の量的分布の相違にあるのか、あるいは着床部において特異な機能的 glycogen 産生があるのかなお明らかではない。しかしながら胞胚着床部における正常な glycogen 代謝が正常な妊娠の成立およびこの経過にとって重要な因子であると考えられる。

稿を終わるにあたり形態学的検討に関しての御助言、御校閲を賜った津端助教授に深謝します。又、産婦人科第五研究室助手 片岡ツル、横畠美恵各位ならびに本研究に対する Roussel 社の御協力を感謝いたします。

なお、本研究の要旨は、第38回日本産婦人科学会（昭和61年4月、東京）、第60回日本内分泌学会（昭和62年6月、京都）で発表した。

文 献

- 1) Vuhai, M.T., Logeat, F. and Milgrom, E.: Progesterone receptors in the rat uterus: Variation in cytosol and nuclei during the oestrous cycle and pregnancy. *J. Endocrinol.*, 76: 43–48, 1978.
- 2) Niimura, S. and Ishida, K.: Histochemical studies of Δ^5 - 3β , 20α - and hydroxysteroid dehydrogenases and possible progesterone production in hamster egg. *J. Reprod. Fertil.*, 48: 275, 1976.
- 3) Janne, O.A., Isomaa, V.V., Torkkeli, T.K., Isotalo, H.E. and Kopu, H.T.: Hormonal regulation of uteroglobin synthesis in the rabbit uterus. pp 33–47 in “Progesterone and progestines” Edts Bardin, C.W., Milgrom, E. and Mauvais-Jarvis, P. Rave Press, New York, 1983.
- 4) Julkunen, M., Koistinen, R., Sjoberg, J. et al.: Secretory endometrium synthesizes placental protein 14. *Endocrinol.*, 118: 1780–1782, 1986.
- 5) Chiew, C.S. and Rinard, G.A.: Glycogen levels in the rat myometrium at the end of pregnancy and immediately postpartum. *Biol. Reprod.*, 20: 1111–1114, 1979.
- 6) Smith, D.E. and Gorski, J.: The effect of estrogen on the activity glucose phosphorylating enzymes in the rat uterus. *Life Science*, 6: 1263–1268, 1967.
- 7) 石原智子, 武谷雄二, 水野正彦: 子宮内膜細胞培養系における RU38486 の glycogen 産生抑制効果, RU486 研究会抄録集: 20, 1986.
- 8) Ohtani, K., Sakamoto, H., Takahashi, T., Satoh, N., Den, K. and Takagi, S.: Effects of RU38486, an antiprogestone, on endometrium, fertilized ovum and serum sex steroid levels. *Acta Obstet. Gynecol. Jpn.* in press: 1987.
- 9) Ennis, B.W., Stumpf, W.E., Gasc, J-M. and Baulieu, E-E.: Nuclear localization of progesterone receptor before and after exposure to progestin at low and high temperatures: Autoradiographic and immunohistochemical studies of chick oviduct. *Endocrinol.*, 119: 2066, 1986.
- 10) Chikusu, P.M.A., McConnel, K.M. and Green, B.: Progesterone nuclear receptor levels in rat uterine myometrium during pregnancy. *J. Steroid Biochem.*, 16: 489–492, 1982.
- 11) Edited Baulieu, E-E and Segal, S.J.: The antiprogestin steroid RU38486 and human fertility control. Plenum Press, New York, pp.1985.
- 12) Giannoulouos, G., Jackson, K. and Tulchinsky, D.: Specific glucocorticoid binding in human uterine tissues, placenta and fetal membranes. *J. Biochem.*, 19: 1375, 1985.
- 13) Shortle, B., Dyrenfurth, I. and Ferin, M.: Effects of an antiprogestone agent RU-486, on the menstrual cycle of the rhesus monkey *Endocrinol.*, 60: 731, 1985.

(受付日: 87. 9. 18)