

活性酸素とその消去系が黄体機能調節に及ぼす影響について

(課題番号 09671656)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究C）研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 玉手健一  
(旭川医科大学医学部講師)

## 研究組織

研究代表者 : 玉手 健一 (旭川医科大学医学部講師)  
研究分担者 : 千石 一雄 (旭川医科大学医学部助教授)  
(研究協力者 : 千 立志)

## 研究経費

平成9年度 800 千円  
平成10年度 500 千円  
計 1,300 千円

**概要** 活性酸素種系と活性窒素種系並びにそれらの調節酵素が黄体機能調節に対してどのような関係を有しているか究明するため、ラット黄体におけるMn-SOD、eNOS、iNOS mRNAの発現動態を解析するとともにMn-SODとNOのラット培養黄体化顆粒膜細胞の progesterone (P4)産生能及びアポトーシスへの影響について検討した。hCG投与0から48時間後過排卵及び妊娠2日から20日後の妊娠黄体を実験に供した。Mn-SOD mRNA発現、Mn-SOD 蛋白及びP4を各々northern blot法、ELISA法及びRIA法で測定した。また、eNOS、iNOS mRNA 発現はcompetitive RT-PCR法にて検討した。Mn-SOD mRNA 発現はhCG投与7時間後及び妊娠14日目にピークを示した。さらに、Mn-SOD蛋白はhCG投与12時間後より増加し、24時間後にピークを示し、P4濃度と同じ推移を示した。妊娠ではMn-SOD蛋白は妊娠16日目にピークを示した。過排卵におけるeNOS、iNOS mRNAはいずれもhCG投与15時間後にピークを示す増減傾向を示した。妊娠黄体においてeNOS mRNAは妊娠全過程に次第に増強する傾向であったが、iNOS mRNAは妊娠12日目より比較的急激に増強し、妊娠末期でピークを示した。一方、PMSG投与48時間後の顆粒膜細胞をGIT培地で培養し、NO発生剤であるSNAPと SIN-1及びMn-SODを添加した結果、SNAP、SIN-1はいずれも用量依存的にP4産生を抑制したが、Mn-SODとの同時添加によっていずれのP4産生能も有意に回復した( $p < 0.01$ )。また、SNAP、SIN-1の添加によってDNA断片化が認められ、Mn-SODの同時添加によってDNA断片化が抑制された。さらに、SNAP 及び SIN-1の 添加によってMn-SOD mRNA発現は無添加群よりそれぞれ1.6倍及び1.3倍増強した。以上より、ラット黄体機能調節機構において、Mn-SODは黄体機能促進的に、NOは黄体機能抑制的に作用し、各々量的、時間的変化を示し、かつ相互にクロストークしながら、その調節に関与していることが示唆された。

**Abstract** In order to investigate the role of oxygen superoxide and nitric oxide (NO) in regulation of luteal function, we studied in vivo mRNA

expression of Mn-SOD, eNOS and iNOS in rat corpus luteum and interaction between Mn-SOD and NO in regulation of luteal function in cultured rat luteinized granulosa cells.

The expression of mRNA and protein level expression of Mn-SOD and progesterone (P4) in the corpus luteum were detected with Northern blot hybridization, ELISA and RIA, respectively, during superovulation and pregnancy. Expressions of eNOS and iNOS mRNA were detected with competitive RT-PCR.

In the in vitro study, granulosa cells collected 48 hours after PMSG stimulation, were cultured in GIT medium. After addition of NO donors, SNAP and SIN-1, and Mn-SOD, P4 concentration in the supernatant was measured with RIA. DNA fragmentation was detected as well. Further more, effect of SNAP and DIN-1 on the mRNA expression of Mn-SOD was also evaluated with Northern blot hybridization.

In superovulation, Mn-SOD mRNA was detectable during the whole process, reaching peak value at 7 hours after the hCG injection. Mn-SOD protein started to increase at 12 hours after hCG injection, reaching peak at 24 hours. P4 showed the same profile as Mn-SOD protein. The levels of eNOS and iNOS mRNA gradually increase after hCG injection for up to 15 hours and decreased afterwards. In pregnancy, mRNA of Mn-SOD was detectable during the whole process, reaching peak at the 14th day of pregnancy, while Mn-SOD proteins reached peak at the 16th day. P4 showed a similar pattern with

Mn-SOD protein up to the 12th day of pregnancy when it reached peak, but gradually decreased afterwards. While mRNA of eNOS had the tendency to increase gradually during pregnancy, mRNA of iNOS rapidly increased from the 12th day and reached peak at the late phase of pregnancy.

In cultured rat granulosa cells, production of P4 was suppressed by SNAP and SIN-1 in a dosage-dependent manner. However, addition of Mn-SOD partially reversed the suppression respectively ( $p < 0.01$ ). Similarly, fragmentation of DNA was induced by addition of SIN-1 and SNAP, but was inhibited by addition of Mn-SOD. Further more, mRNA expression of Mn-SOD in cultured granulosa cells treated with SNAP and SIN-1 were increased 1.6 fold and 1.3 fold compared with the untreated control.

We conclude that Mn-SOD is involved in stimulation, whereas NO plays a role in suppression of luteal function. In addition, Mn-SOD and NO interact with each other in regulating of luteal function.

### 緒言

黄体機能は黄体細胞から分泌されたprogesterone(P4)を中心とした性ステロイドホルモンによる増殖子宮内膜から分泌期子宮内膜への転換及び着床の成立、妊娠の維持を目的とする。この黄体機能の調節には視床下部—下垂体—卵巣系が関わっているが、近年、その調節要素として活性酸素種系や活性窒素種系等のフリーラジカルとその調節酵素が密接に関係していることが明らかになりつつある。Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)は活性酸素消去酵素SODの一種で、細胞内のミトコンドリアに局在し、活性酸素などにより誘導される。またnitric oxide (NO)はL-アルギニンからnitric oxide

synthase (NOS)によって合成され、NOSにはendothelial nitric oxide synthase (eNOS)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、brain nitric oxide synthase (bNOS)の三つのタイプが存在する。黄体におけるMn-SODとiNOS、eNOSの局在は免疫組織化学的方法によって明かされており(1、2)、さらにMn-SODは排卵抑制作用を有し(3)、P4分泌に対し促進的に働いていること(4)、またNOは排卵促進作用(5)及びP4の分泌抑制作用(6)を有していることが報告されている。しかし妊娠黄体における活性酸素種系と活性窒素種系並びにそれらの調節酵素の動態さらに両者が黄体機能調節においてどのような関係を有しているかは未だ不明である。今回われわれはラット黄体におけるMn-SOD、eNOS、iNOS mRNAの発現動態をin vivoにおいて解析するとともに、ラット黄体化顆粒膜細胞培養系を用い黄体機能調節に対するMn-SODとNOの相互作用に関して検討した。

## 研究対象と方法

### 1. 対象

#### 実験動物

人工照明時間5時から19時まで、室温23℃、湿度50～60%の空調飼育室にて、固型飼料(クレア、日本)と水道水を自由摂取させた生後26～28日齢のWistar Imamichi 系雌性未熟ラット(日本三協ラボサービス)を用いた。Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG: 帝国臓器KK) 50IU、その50時間後にhuman chorionic gonadotropin (hCG:Sigma)25IUを各々腹腔内に投与し、過排卵処置を行い、黄体を採取した。さらに同系16週齢成熟雌ラットを用い、発情前期に同系の雄ラットと交配させて得られた妊娠黄体を実験に供した。なお膣栓の確認日を妊娠0日とした。

### 2. 実験方法

#### 1) 過排卵及び妊娠ラット黄体におけるMn-SOD mRNA、Mn-SOD蛋白、eNOS、iNOS mRNA及びP4濃度の動態

過排卵ラットに関してはhCG投与直前(0時間)及び投与1、7、12、15、20、24、39、48時間後にネンブタール麻酔下にて、両側卵巢を摘出した。黄体を分離後、ただちに液

体窒素にて急速冷凍し、 $-80^{\circ}\text{C}$  deep freezerにて凍結保存した。解凍後、AGPC (Acid Guanidinium Phenol Chloroform)法を用いて、total RNAを抽出した。Mn-SOD mRNAの発現については、total RNA  $15\mu\text{g}/\text{line}$ を1%アガロースゲルに電気泳動し、UV light下で28Sと18SのリボゾームRNAバンドを確認した。Mn-SOD probe (大阪大学生化学教室より提供)を用いて、northern blot法を行った。なおコントロールとしては glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。また定量分析はBAS 2000コンピューター(富士フェルム)で行った。Mn-SOD蛋白及びP4の測定については抽出した卵巣組織を液体窒素に入れ、ホモジネート、ソニケート後、遠心分離した。上清中Mn-SOD及びP4をELISA法 (rabbit IgG anti rat Mn-SOD抗体、大阪大学生化学教室より提供)及びRIA法 (DPC P4 kit、日本DPCコーポレーション)にて測定した。さらに総蛋白量 (BCA protein assay kit、PIERCE)より換算し、Mn-SOD濃度とP4濃度とした。

eNOS、iNOS mRNAの発現は同法で抽出したtotal RNAを用いて、competitive RT-PCRにて検討した。なおcompetitorの作成について、competitive DNA construction kit (宝酒造)にて各々eNOSはsense primer 5' GGAGCCTGGGCCACCC-TGCGGTACGGTCATCATCTGACAC 3'、antisense primer 5' CAGCTTCCCCCACTGGATCCGCGTGAGTATTACGAAGGTG 3'、iNOSはsense primer 5' TGGA-AAGAG TACGGTCATCATCTGACAC 3' とantisense primer 5' ACAACCTTTCCA-TGCAG CGCCATCCTGGGAAGACTCC 3' のそれぞれ440 bpと334 bpのDNA

competitorを作成した。RTについて、oligo (dT)をprimerとしてMLV reverse transcriptase (molony strain murine leukemic virus reverse transcriptase、BRL、Inc.)にてtotal RNAサンプル $1\mu\text{g}$ を用いて、 $42^{\circ}\text{C}$  1h、 $95^{\circ}\text{C}$  5 min. にて $10\mu\text{l}$ のcDNAを作成した。PCRはeNOSではヒトのsense primer 5' GGAGCCTGGGCCACCCTGCG 3' と antisense-primer 5' CAGCTTCCCCCACTGGATCC 3' (7)、iNOSはRatの sense primer 5' GCCTCCCTCTGGAAAGA 3' とantisense primer 5' TCCATGC AGACAACCTT 3' で(8)、107 copiesのeNOS及びiNOSのDNA competitorと一緒に

eNOSでは94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 30 sec 30 cycleにてeNOSの549bp cDNAと competitorの440bp DNAを、iNOSでは94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 30 sec 30 cycleにてiNOSの500bp cDNAと competitorの334bp DNAを増幅した。target と competitor はそれぞれ単一なbandであることを確認し、negative controlとしてMLV reverse transcr-iptaseの無添加サンプルを用いた。定量分析はNIH imageソフトで行った。

妊娠ラットに関しては、妊娠2、4、6、8、10、12、14、16、18、20日目の黄体を採取し、過排卵ラット黄体と同様にMn-SOD mRNAの発現動態についてはnorthern blot法で、Mn-SOD蛋白及びP4濃度の動態についてはELISA法及びRIA法で、また、eNOS、iNOS mRNAについてcompetitive RT-PCR法で検討した。なお過排卵黄体と妊娠黄体とのMn-SODmRNAの発現を比較するためhCG投与7時間後の過排卵黄体、妊娠2日と妊娠14日の黄体を用い、同様にnorthern blot法でMn-SODmRNA発現を検討した。

2) 培養顆粒膜細胞へのSNAP、SIN-1及びMn-SODの添加によるP4産生能、アポトーシス誘導及びMn-SOD mRNA発現に対する影響

1)と同系ラットにPMSGを投与し、48時間後に卵巣摘出、26G針で卵胞を穿刺し、顆粒膜細胞を採取した。0.1%ヒアルロニダーゼ (Sigma)で30分間処理し、PBS(-)で2回洗浄後、 $2.5 \times 10^5$ /ml個細胞になるようにGIT培地(和光純薬)で調整した。それぞれ24 well組織培養皿に500  $\mu$ l、60 mm組織培養皿に4 mlを5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub>の条件下で培養し、トリバンプルー染色にて85%以上の細胞の生存を確認した。前培養24時間後、以下の添加実験を行った。

24 well培養系に各々s-nitroso-l-acetyl penicillamine (SNAP、NO発生剤、和光純薬) $10^{-5}$  M、 $10^{-4}$  M、 $10^{-3}$  MとSNAP $10^{-3}$  M + Mn-SOD (和光純薬)103 IU/mlを、3-morpholino-sydnonimine (SIN-1、NOの発生剤、和光純薬) $10^{-6}$  M、 $10^{-5}$  M、 $10^{-4}$  MとSIN-1  $10^{-4}$  M+Mn-SOD103 IU/mlを添加し、24時間培養後上清におけるP4濃度を測定した。

60 mmの培養系においてSNAP $10^{-3}$  MとSNAP $10^{-3}$  M + Mn-SOD103 IU/ml、SIN-1



10<sup>-4</sup> MとSIN-1 10<sup>-4</sup> M + Mn-SOD103 mMを添加し、ApopLadder kit (TaKaRa)にてDNAを抽出した。laneごとに20 μgを1.5 %アガロースゲルに電気泳動し、DNA断片化の有無について検討した。さらに60 mm培養系にSNAP10<sup>-3</sup> M、SIN-1 10<sup>-4</sup> M を添加し、24時間培養後、細胞よりtotal RNAを抽出し、1)と同様にnorthern blot法で検討した。

### 3) 統計方法

SNAP、SIN-1及びMn-SOD添加によるP4産生への影響についての統計検定はStudent's *t*-testを用いて、5 %未満の危険率をもって有意差ありとした。

## 結果

### 1) 過排卵及び妊娠ラット黄体におけるMn-SOD mRNA、Mn-SOD蛋白、eNOS、iNOS mRNA及びP4濃度の動態

過排卵ラット黄体におけるMn-SOD mRNAの動態に関しては、全過程で発現が認められ、hCG投与7時間後にピークを示した。Mn-SOD蛋白量はhCG投与12時間後より増加し、24時間後に26.8 ng/mg proteinと最高値となり、同組織中のP4濃度と同様に推移した(Fig1)。eNOS mRNAはhCG投与15時間後まで次第に増強し、その後減弱した。iNOS mRNA動態の発現はhCG投与後高いレベルを維持し、15時間後に0時間の7倍とピークを示した(Fig2)。

妊娠黄体に関しては全過程でMn-SOD mRNAの発現が認められ、妊娠14日目にピークを示した。Mn-SOD蛋白量は妊娠16日目に182.0 ng/mg proteinとピークを示したが、P4は12日目にはピークに達し、その後徐々に低下した(Fig3)。eNOS mRNAは全過程において次第に増強する傾向を示し、一方、iNOS mRNAは妊娠12日目より比較的急激に増強し、妊娠末期でピークを示した(Fig4)。過排卵のhCG投与7時間後と妊娠14日目のMn-SODmRNAの発現の比較では、妊娠14日目はhCG投与7時間後の黄体に比し4倍高いmRNA発現を示した(Fig5)。

### 2) 培養顆粒膜細胞へのSNAP、SIN-1及びMn-SODの添加によるP4産生能、アポトーシス誘導及びMn-SOD mRNA発現への影響

24 well培養系のP4産生に対して、SNAP、SIN-1は用量依存的に抑制を示し、SNAP  $10^{-3}$  MとSIN-1  $10^{-4}$  Mの添加により、コントロールと比較して1 %、5 %まで抑制した。一方、Mn-SOD103 IU/mlの同時添加により、各々22 %、29 %まで有意に回復した ( $p<0.01$ ) (Fig6)。

一方、60 mm培養系においてSNAP $10^{-3}$  M及びSIN-1  $10^{-4}$  Mの添加によってDNA断片化が認められ、Mn-SOD103 IU/mlの同時添加によって、いずれもDNA断片化が抑制された(Fig7)。また、同系においてSNAP $10^{-3}$  M 及び SIN-1  $10^{-4}$  M 添加によって培養顆粒膜細胞のMn-SOD mRNA発現は無添加群に比し、各々1.6倍及び1.3倍の増加を示した(Fig8)。

### 考察

活性酸素種の重要なターゲットは細胞内にあるミトコンドリアであり、そこに局在しているMn-SODは細胞活性に対して重要な保護因子として働いている(9)。我々は以前、ヒト及びラット卵巣でのCu,Zn-SOD及びMn-SODの局在性に関する検討より、黄体においてはMn-SODの強い局在を認め、さらにMn-SODは黄体形成、維持に重要な役割を有していることを報告した(1、10、11、12、13)。また、Hesla et al, (4)、Miyazaki et al, (14)は家兎において Mn-SODのレベルはP4と一致し、灌流実験においてはMn-SOD添加によりP4産生が著明に亢進すると報告しており、さらに Sugino et al, (15)はラットにおいて活性型SODはP4の産生を促進することを報告している。本研究では過排卵黄体においてMn-SOD mRNAの発現が認められ、その発現パターンより十数時間遅れて蛋白の一致した推移が認められ、また、Mn-SOD蛋白動態はP4濃度の変化と極めて一致したパターンをとることが確認された。以上よりMn-SODは排卵周辺期における黄体機能に対して促進的作用を有していると考えられた。一方、妊娠黄体においてはMn-SOD mRNAと蛋白量の変化は一致しており、妊娠初期ではMn-SODは黄体機能促進作用を有していると考えられたが、妊娠中期以降は過排卵とは異なる動態を示しており、黄体退縮機能においては妊娠黄体と非妊娠黄体では異なるメカニズムが存在することを示唆するものと推測され

た。

一方、NOについて免疫組織学的検討よりiNOS、eNOSは広く卵巣組織に局在し、黄体においても強く発現していることが明らかとされている(2)。しかし、NOSもしくはNOが黄体においてどのような生理的意義を有しているかは種々の異なる報告が認められ、未だに一定した見解は得られていない。Voorhis et al, (6)はヒト顆粒膜細胞においてNOは黄体退縮作用を有していることを示しており、また、Olson et al, (16)はラットにおいてNOの黄体退縮作用を報告している。一般にNOは黄体退縮作用を含むステロイド産生抑制作用を有していると考えられるが、一方、Anteby et al, (17)はNOの血管拡張作用によりエストラジオール産生を亢進すると報告している。今回我々は過排卵黄体においてeNOS、iNOS mRNAの発現を認め、hCG投与15時間後にiNOS mRNAはコントロールの7倍の高発現を示し、その後P4産生が低下し始めること、また妊娠黄体においてiNOS mRNAは12日目より急激に増加し、18日目にピークに達する経時的变化を示すことを明らかにした。黄体形成が進んだ状態でNOが黄体退縮作用を有するとするならば、強力なNO合成酵素であるiNOSの急激な増加は妊娠黄体においても黄体退縮作用を示すものと考えられる。さらにNOはcyclooxygenaseを活性化し、PGF2 $\alpha$ 産生を間接的に促進する(18)ことから、妊娠末期においてNOは分娩発来の誘因として間接的もしくは直接的役割を有していることが推測された。また培養ラット顆粒膜細胞においてNO供給剤であるSNAP及びSIN-1は用量依存的にP4の産生を抑制し、SIN-1はSNAPの10分の1の濃度でSNAPのP4産生抑制作用と同等の作用を示した。また、SIN-1はNOを産生すると同時にO<sub>2</sub><sup>-</sup>も産生することからSIN-1の強力な黄体機能抑制作用はONOO<sup>-</sup>の産生を介する可能性が推測された。また、Mn-SODの同時添加によりSNAP及びSIN-1によるP4産生の抑制が有意に回復することからMn-SODは黄体退縮抑制作用を有していることが示唆された。

培養ラット顆粒膜細胞における検討ではSNAP及びSIN-1の添加によってDNA断片化が誘導され、Mn-SODはこれらのアポトーシス誘導に対して抑制的に作用することが示さ

れた。Kaneto et al, (19)はSNAPは用量依存的にハムスター膵臓 $\beta$ 細胞のアポトーシスを誘導すると報告し、Brannstrom et al, (20)、Narko et al, (21)は培養ヒト及びラット顆粒膜細胞においてIL-1 $\beta$ はPGF2 $\alpha$  receptorの発現及びPGF2 $\alpha$ の産生を促進させ、一方、宮崎ら(22)はPGF2 $\alpha$ は黄体細胞にアポトーシスを誘導し、Mn-SODはPGF2 $\alpha$ によって誘導された黄体細胞のアポトーシスを抑制すると報告されている。IL-1 $\beta$ はiNOS誘導作用を有することより、NOとPGF2 $\alpha$ の両者がアポトーシス誘導に関連していると考えられる。今回の検討ではPGF2 $\alpha$ 及びFas、Bax、Bcl-2 familyなどアポトーシス関連遺伝子との関連は検討しておらず、黄体退縮メカニズムにおけるアポトーシスとNOとの明確な関係は未だ不明であるが、NOが黄体退縮時のアポトーシス誘導に促進的作用を有し、かつMn-SODはこれを抑制すると推測される。

さらにMn-SODとNOの両者がどのような相互作用によって黄体機能を調節するかは現在のところ全く不明であるが、種々の報告よりiNOS誘導剤であるLPS、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ はMn-SODの誘導剤でもあることが明らかとされており(23)、NOSとMn-SODの間に密接な相互作用の存在することが示唆される。Sugaya et al, (24)はmicroglial BV-2細胞においてSNAPやLPS投与によりMn-SOD蛋白が増加し、iNOS阻害剤であるNILの添加によって、Mn-SODが93%抑制されたと報告している。またBrady et al, (25)はL2細胞(ラットtype II肺細胞)を用いたRT-PCR法による検討からIFN $\gamma$ 及びTNF $\alpha$ はiNOS mRNA誘導作用を有しており、iNOS mRNAの誘導後SOD mRNAの発現の増強も認められること、さらにiNOS転写の活性因子であるNF- $\kappa$ B活性の特異的抑制剤であるPDTC (pyrrolidinedithiocarbamate)によって、IFN $\gamma$ 及びTNF $\alpha$ によるiNOS mRNA誘導が抑制されると同時にSOD mRNAの発現も抑制されることを報告されている。本研究において我々は培養顆粒膜細胞へのNO供給剤であるSNAP及びSIN-1の添加によりMn-SOD mRNAが誘導されることを明らかにした。また、排卵後期においてiNOS mRNA発現は著しく増強していることを考慮すると、iNOSの発現増強により産生されるNOがMn-SODを誘導し、妊娠初期における妊娠黄体の形成、維持に何らかの影響を与えるこ

とが示唆された。

## 結論

ラット黄体においてMn-SODは黄体機能促進作用を、NOはアポトーシス誘導を介した黄体機能抑制作用を有することを示した。さらにNOの黄体退縮作用に対しMn-SODは抑制的に働くことを示した。一方、NOはMn-SOD誘導作用を有することを明らかにした。以上よりラット黄体機能調節機構においてMn-SOD及びNOは量的、時間的变化を有し、相互にクロストークしながら、その調節に関与していることが示唆された。

## 参考文献

1. 玉手健一、千立志、千石一雄、石川睦男。黄体と活性酸素。Hormone Frontier in Gynecology 1997 ; 4:41-48
2. Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L and Brannstrom M. Cell-specific localization of nitric oxide synthase (NOS) in the rat ovary during follicular development , ovulation and luteal formation. Human Reproduction 1996 ; 11:2667-2673
3. 玉手健一、石川睦男、千石一雄、安部政彦、中田俊之、清水哲也、谷口直之。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 1992 ; 44:1-8
4. Hesla JS, Miyazaki T, Dasko LM, Wallach EE and Dharmarajan AM. Superoxide dismutase activity, lipid peroxide production and corpus luteum steroidogenesis during natural luteolysis and regression induced by oestradiol deprivation of the ovary in pseudopregnant rabbits . J. Reprod . Fert . 1992 ; 95 : 915-924
5. Jablonka-Sharfiff A and Olson LM. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. Endocrinology. 1998 ; 139:2944-2954

6. Voorhis BJV, Dunn MS, Snyder GD and Weiner CP. Nitric oxide: An autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 1994; 135: 1799-1806
7. Miyahara K, Kawamoto T, Sase Kyui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y, Ogoshi S, Hashimoto K, Kawai C, Sasayama S and Shizuta Y. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase gene. *Eur. J. Biochem.* 1994 ; 223:719-726
8. Lyons CR, Orloff GJ, and Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *The Journal of Biological Chemistry* 1992 ; 267 :6370-6374
9. Warner B, Papes R, Heile M, Spitz D and Wispe J. Expression of human Mn SOD in chinese hamster ovary cells confers protection from oxidant injury. *Am.J. Physiol.* 1993 ; 264 (Lung Cell. Mol. Physiol. 8) L598-L605
10. 石川睦男。生殖医学と活性酸素一消去系。日産婦会誌 1993 ; 45:842-848
11. Ishikawa M, Tamate K, Sengoku K. The role of superoxide dismutase and ovarian function. *Assist Reprod Rev.* 1996 ; 6:16-19
12. Tamate K, Sengoku K, Ishikawa M. The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J. Obstet Gynecol* 1995 ; 21:401-409
13. 石川睦男、玉手健一、干立志、千石一雄。産婦人科の世界 1998 ; 50: 印刷中
14. Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan Am, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE . Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in vitro perfused rabbit ovary. *J. Reprod Fertil* 1991 ; 91:207-212
15. Sugino N, Nakamura Y, Takeda O, Ishimatsu M and Kato H. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats . *Journal of Reproduction and Fertility* . 1993 ;

16. Olson RM, Jones-Burton CM, Jablonka-Sharff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells; possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 1996 ; 137:3531-3539
17. Anteby EY, Hurwitz A, Korach O. Human follicular nitric oxide pathway; relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. *Hum Reprod* 1996 ; 11:1947-1951
18. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Siebert K, Currie MG and Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 ; 90: 7240-7244
19. Kaneto H, Fujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Kamada T and Taniguchi N. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*. 1995 ; 44:733-738
20. Brannstrom M, Wang LJ and Norman RJ. Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. *Biology of Reproduction*. 1993 ; 48: 165-171
21. Narko K, Ritvos O and Ristimaki A. Induction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2  $\alpha$  receptor expression by interleukin-1  $\beta$  in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 1997 ; 138: 3638-3644
22. 宮崎豊彦。黄体機能調節機構における微小循環とフリーラジカルの役割。日産婦誌 1998 ; 50:511-518
23. 藤井順逸、谷口直之。NOSとSODのクロストーク。実験医学 1995 ; 13: 984-989
24. Sugaya K, Chouinard ML and Mckinney M. Induction of manganese superoxide dismutase in BV-2 microglial cells. *NeuroReport*. 1997 ; 8: 3547-3551

25. Brady TC, Chang LY, Day BJ and Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF- $\kappa$ B activation. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol. 17)* 1997; 273: L1002–L1006



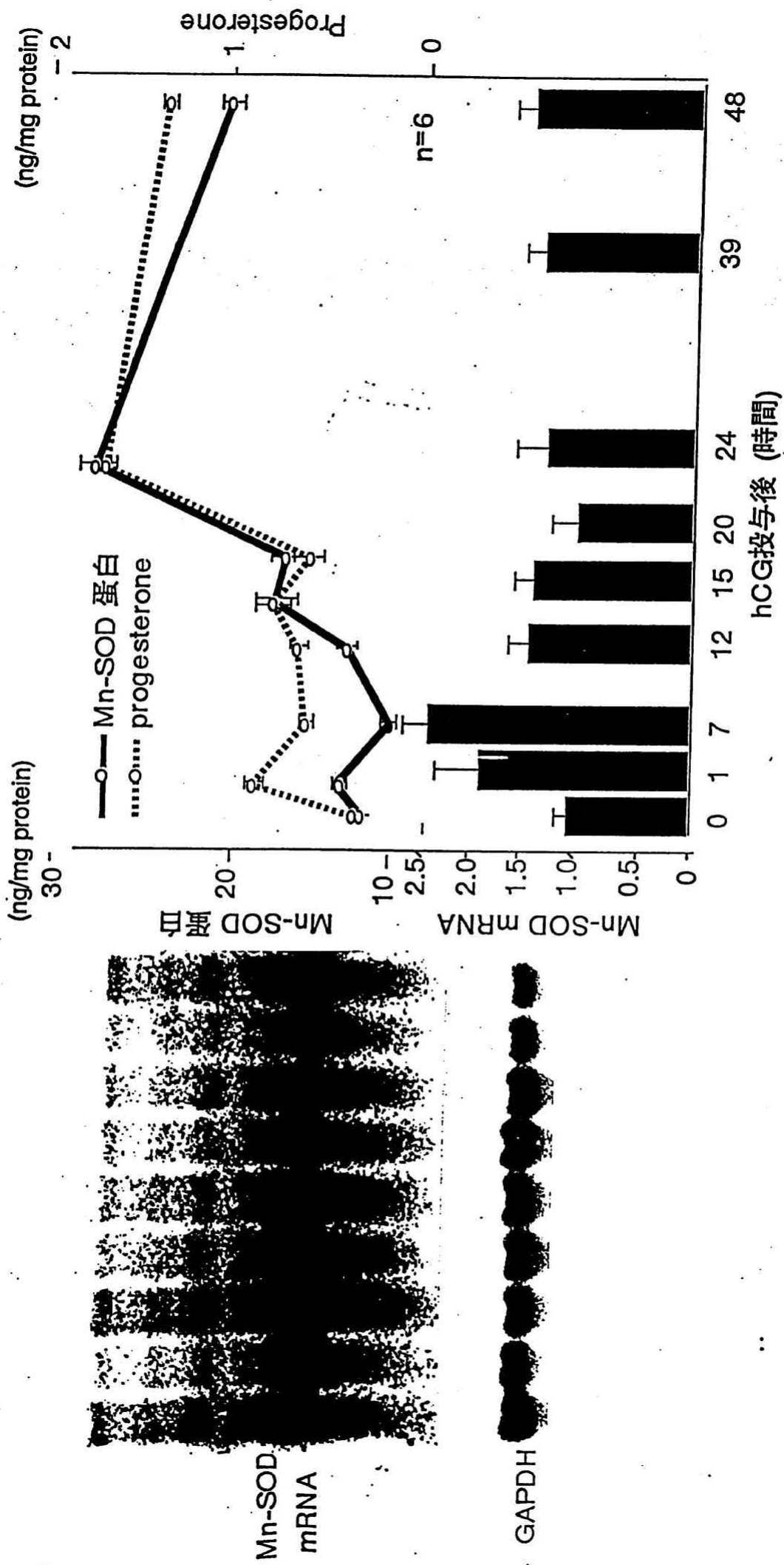
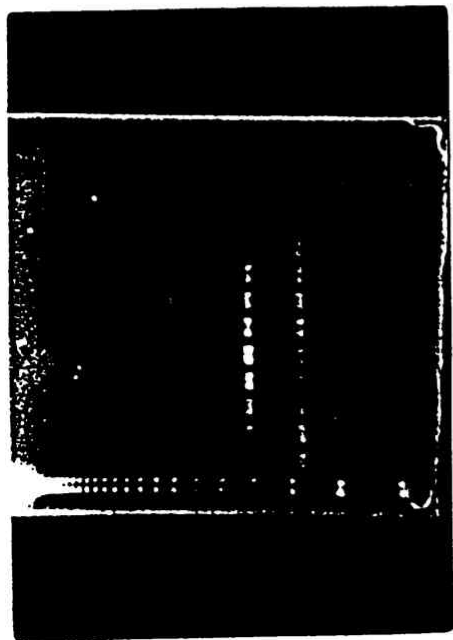


Fig.1 過排卵ラット黄体におけるMn-SODmRNA,蛋白及びprogesteroneの動態



iNOS  
CONT



eNOS  
CONT

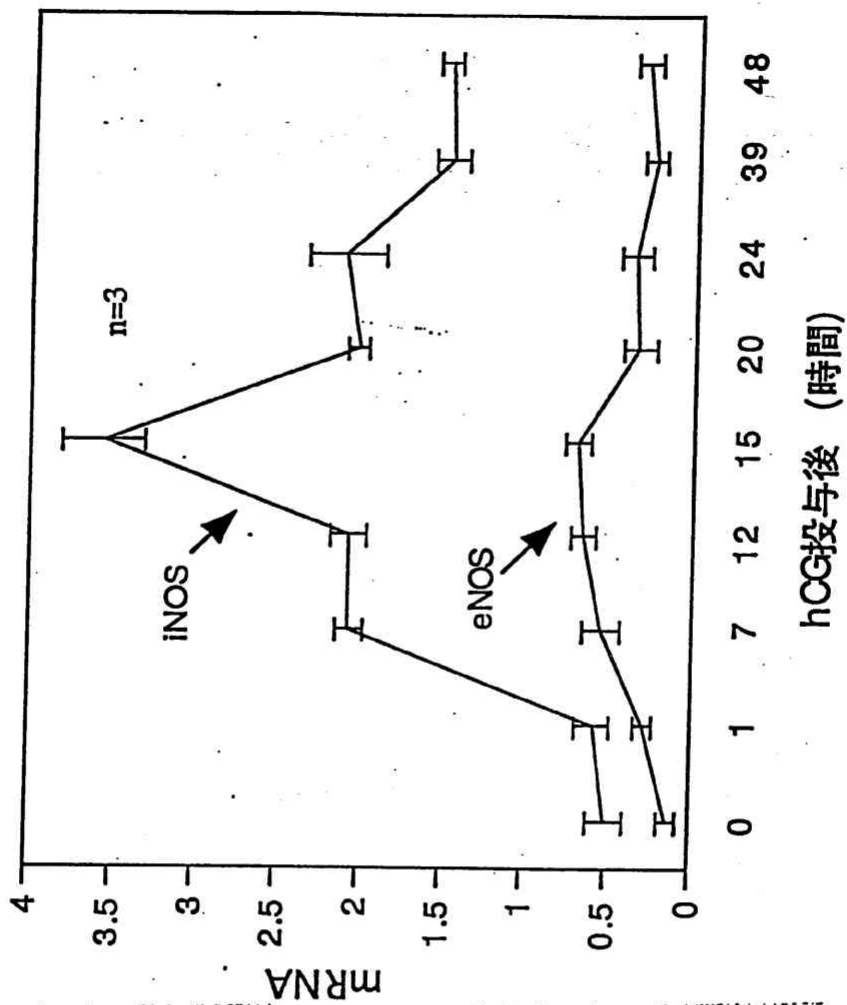


Fig.2 過排卵ラット黄体におけるeNOS、iNOS mRNAの動態

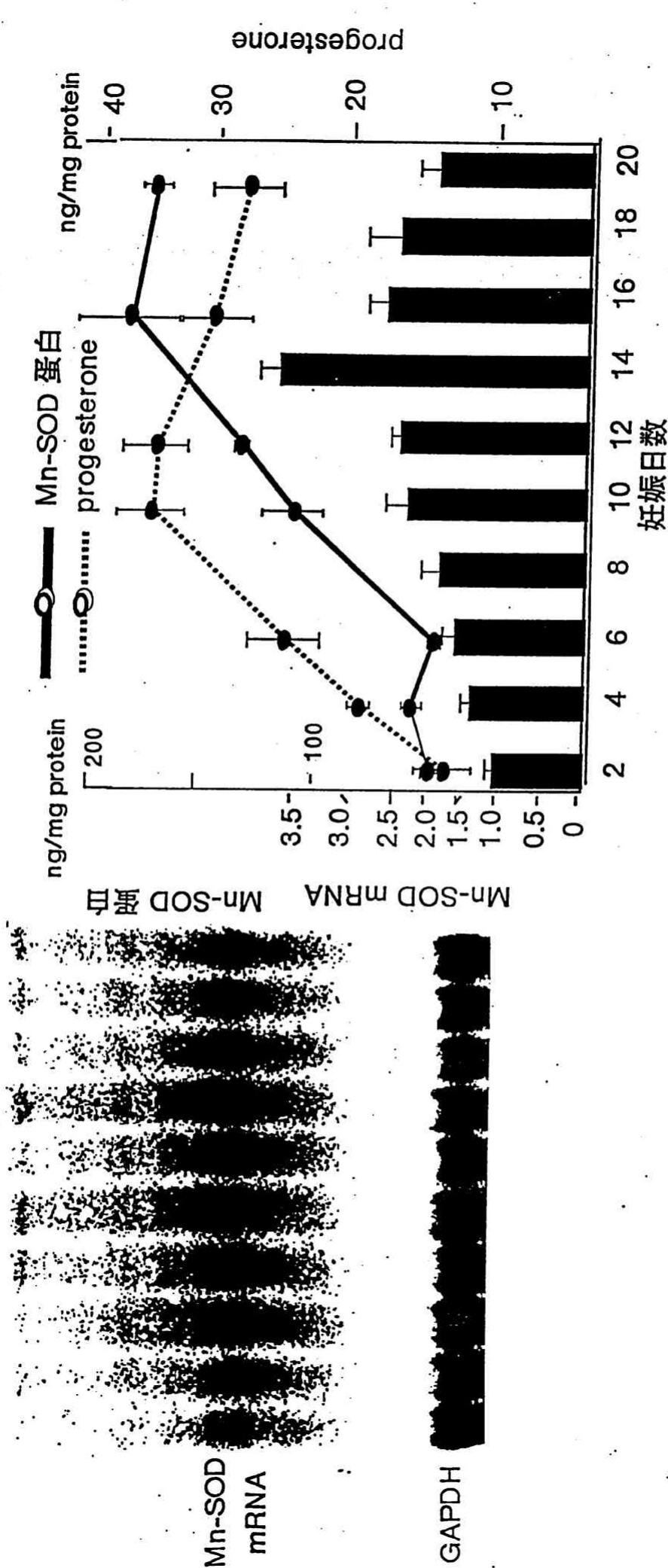


Fig. 3 妊娠ラット黄体におけるMn-SODmRNA,蛋白及びprogesteroneの動態

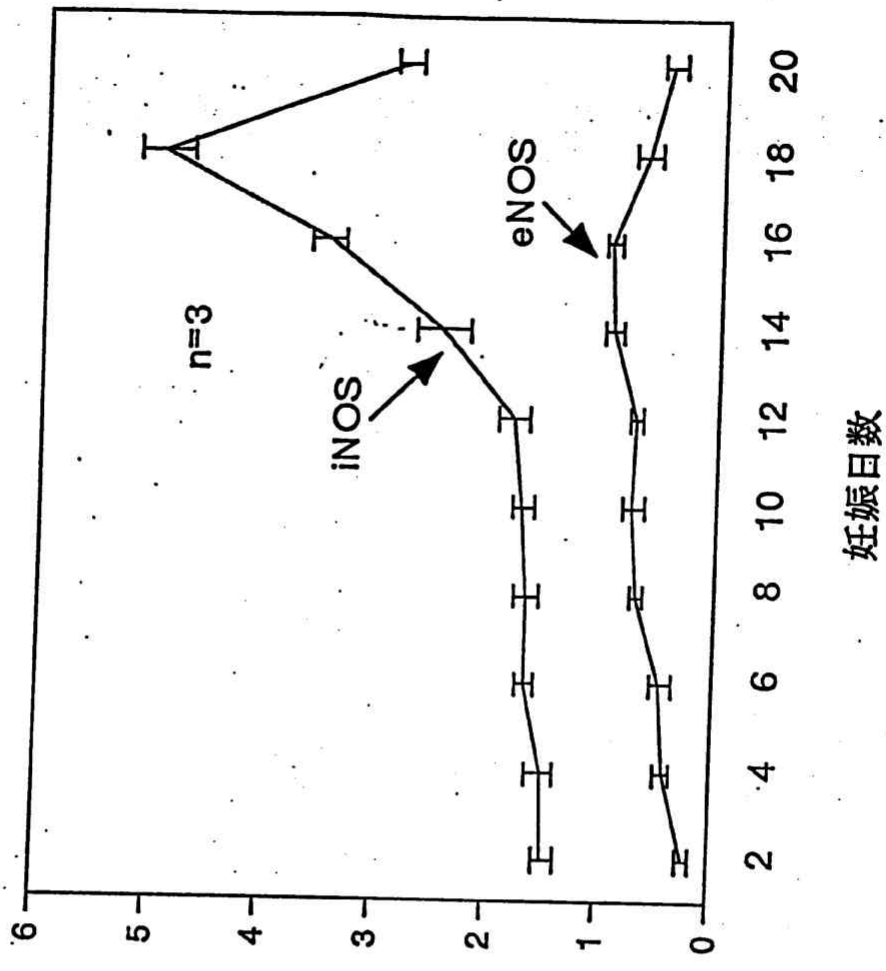
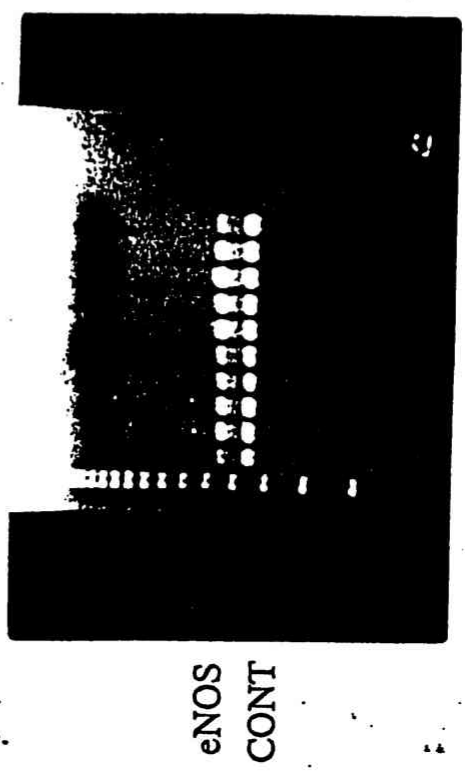
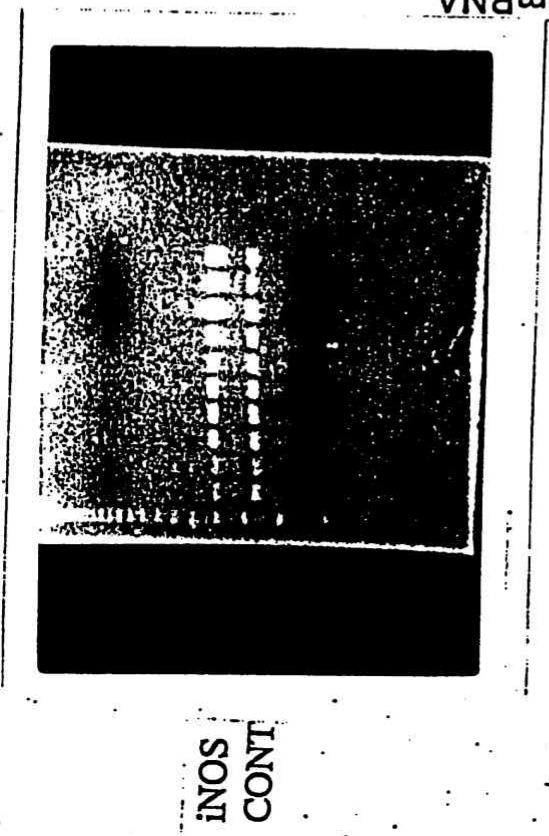


Fig.4 妊娠ラット黄体におけるeNOS、iNOS mRNAの動態

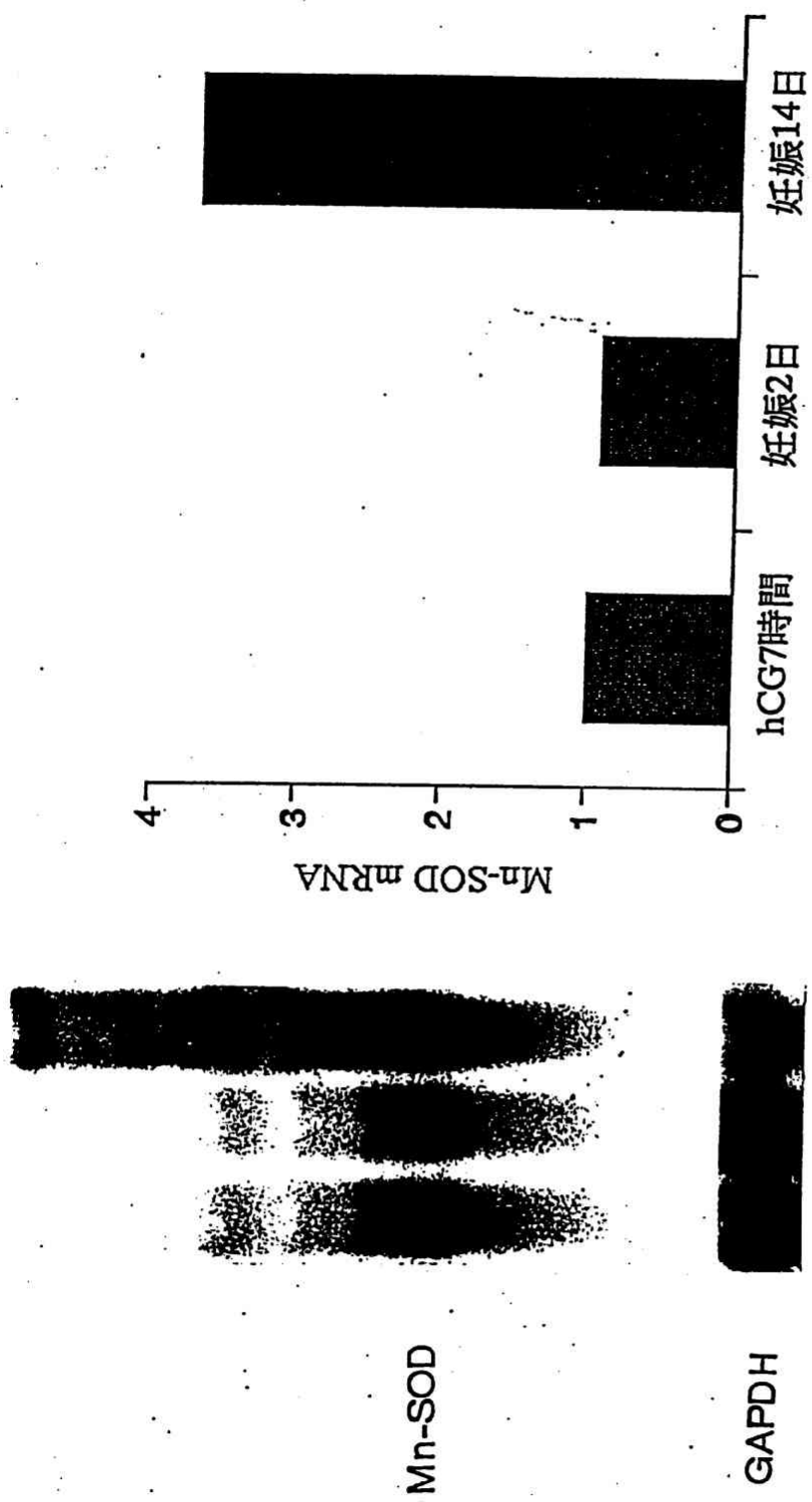


Fig.5 過排卵と妊娠とのMn-SODmRNAの比較

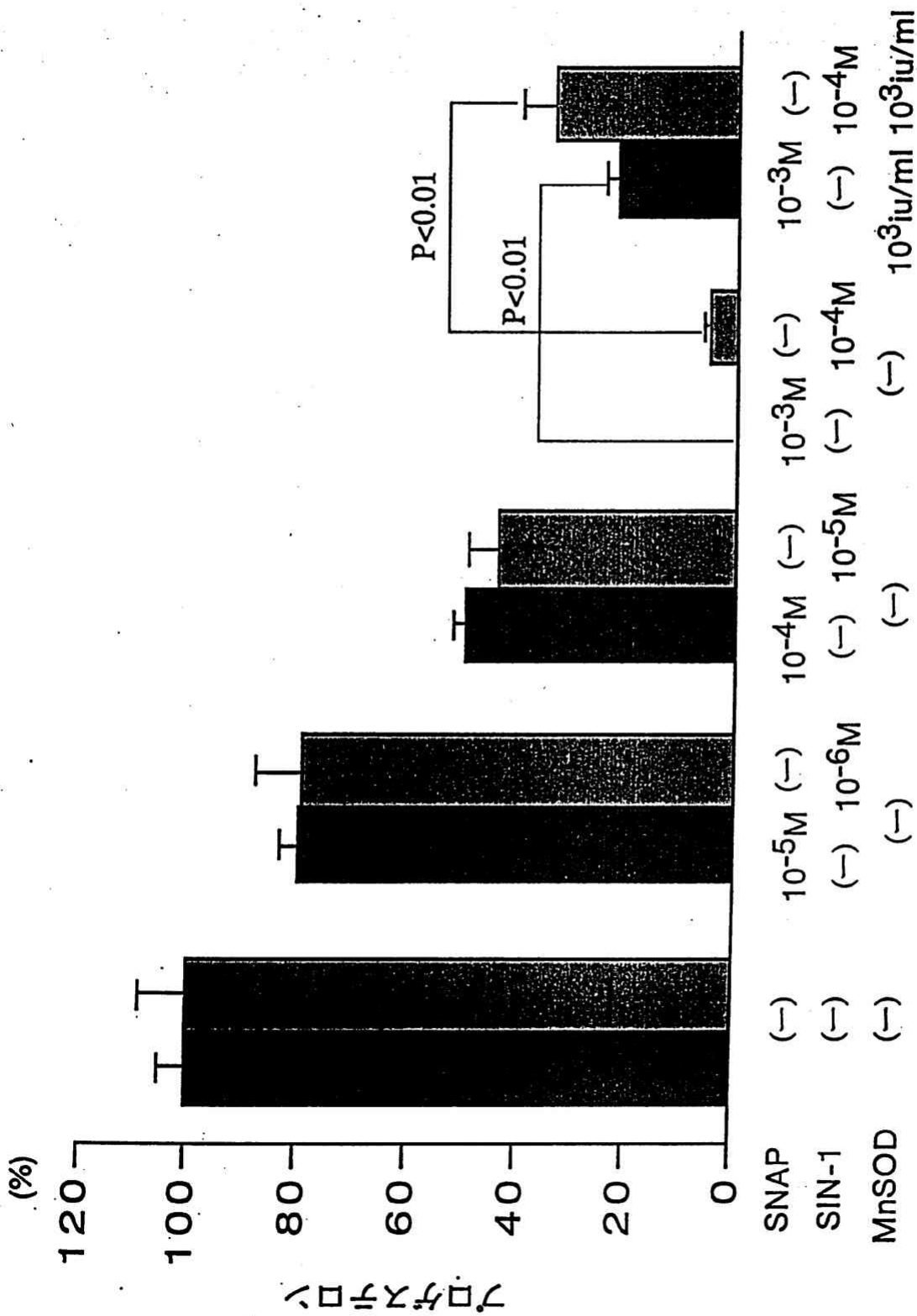
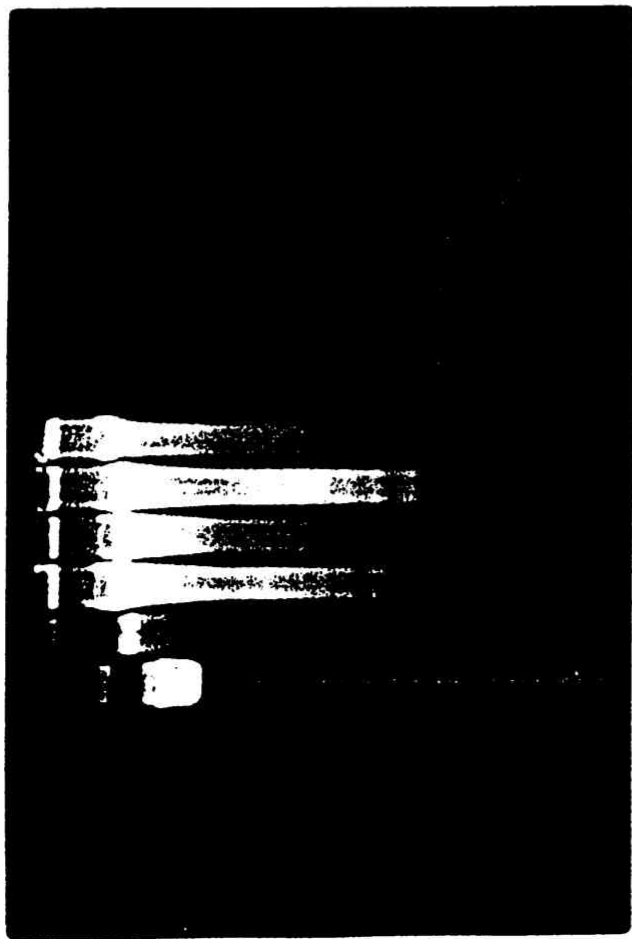


Fig.6培養顆粒膜細胞におけるSNAP、SIN-1及び Mn-SODの添加によるP4産生への影響



1 2 3 4 5 6

- 1 マーカ
- 2 コントロール
- 3 SIN-1  $10^{-4}$ M
- 4 SIN-1  $10^{-4}$ M+Mn-SOD  $10^3$ iu/ml
- 5 SNAP  $10^{-3}$ M
- 6 SNAP  $10^{-3}$ M+Mn-SOD  $10^3$ iu/ml

Fig.7 SNAP、SIN-1及びMn-SOD添加によるアポトーシスへの影響

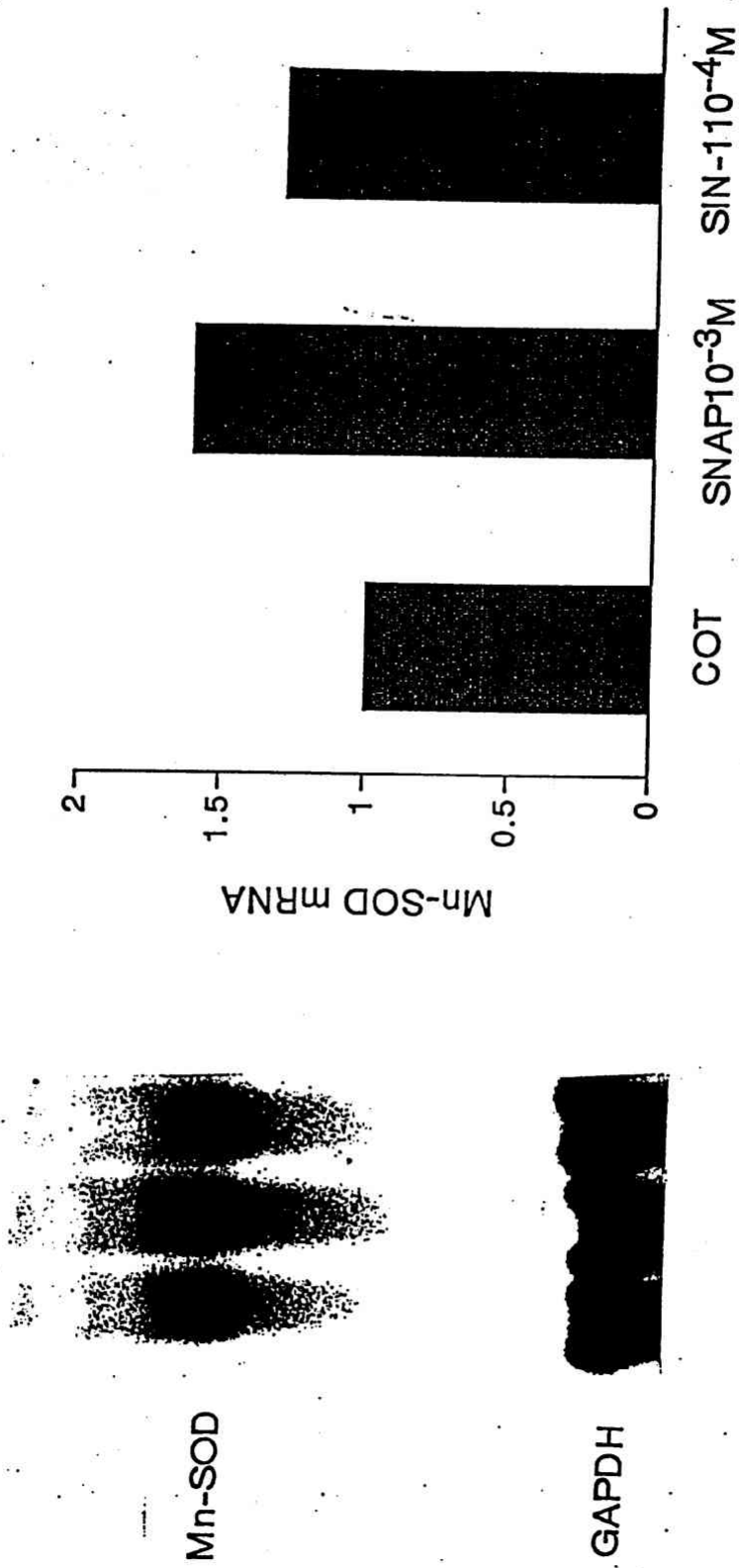


Fig 8.培養ラット顆粒膜細胞におけるSNAP及びSIN-1添加によるMn-SOD mRNAへの影響



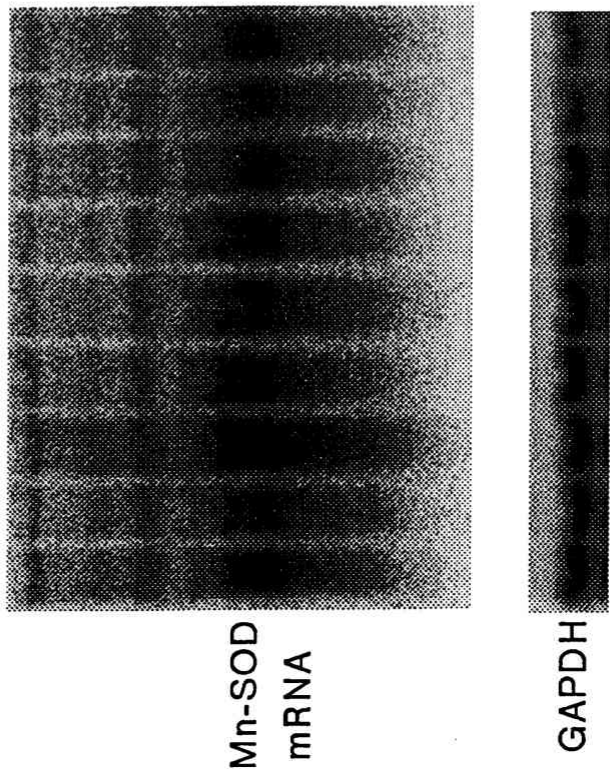
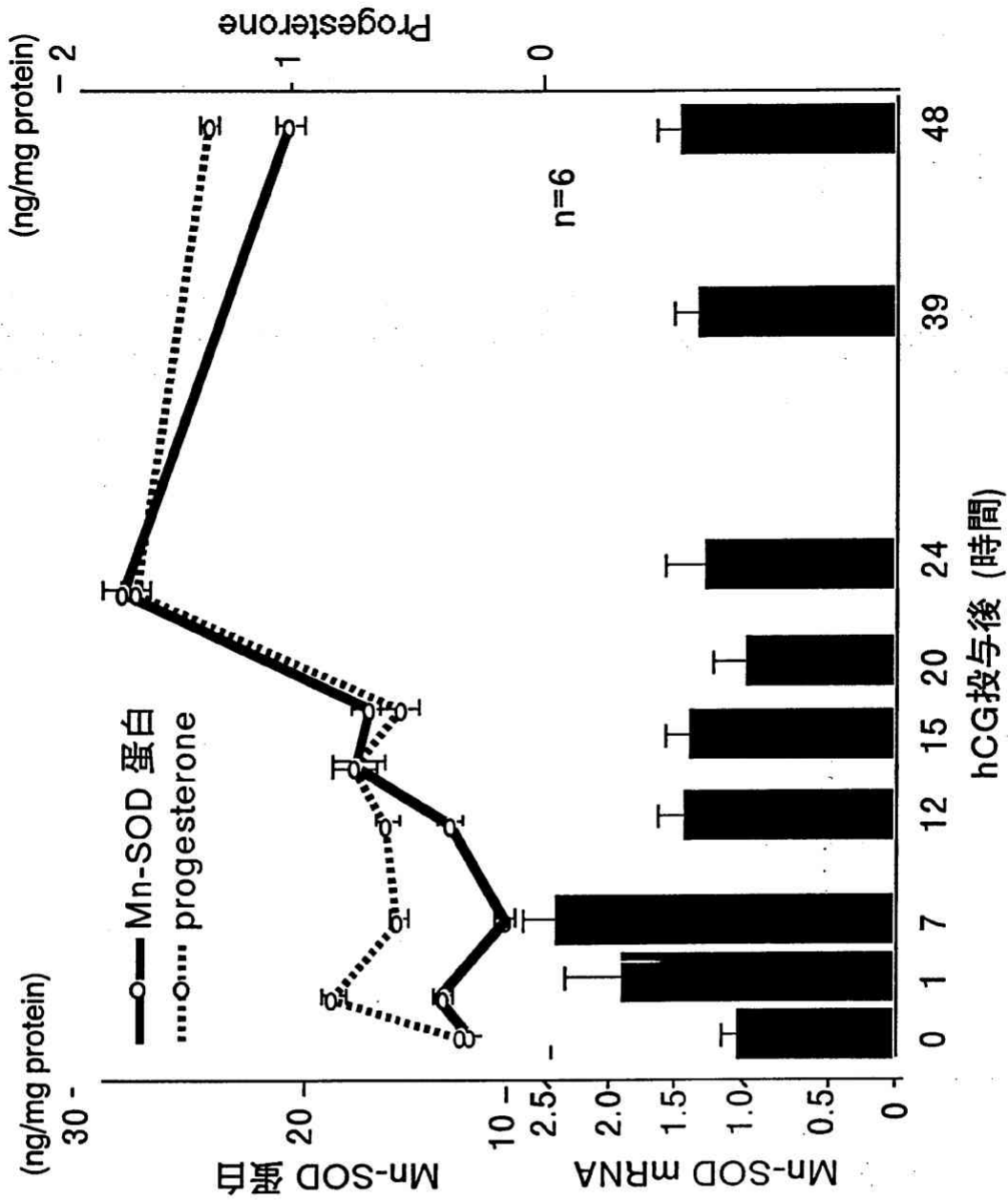
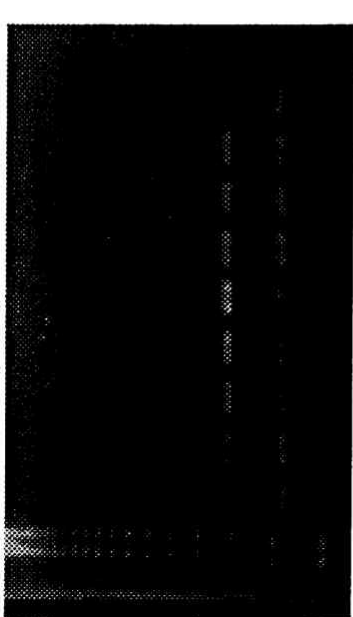
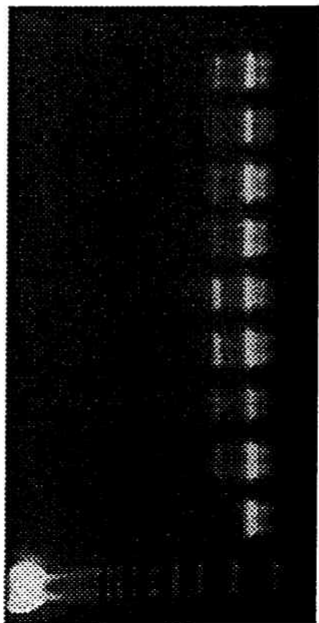


Fig.1 過排卵ラット黄体におけるMn-SODmRNA,蛋白及びprogesteroneの動態



iNOS  
CONT



eNOS  
CONT

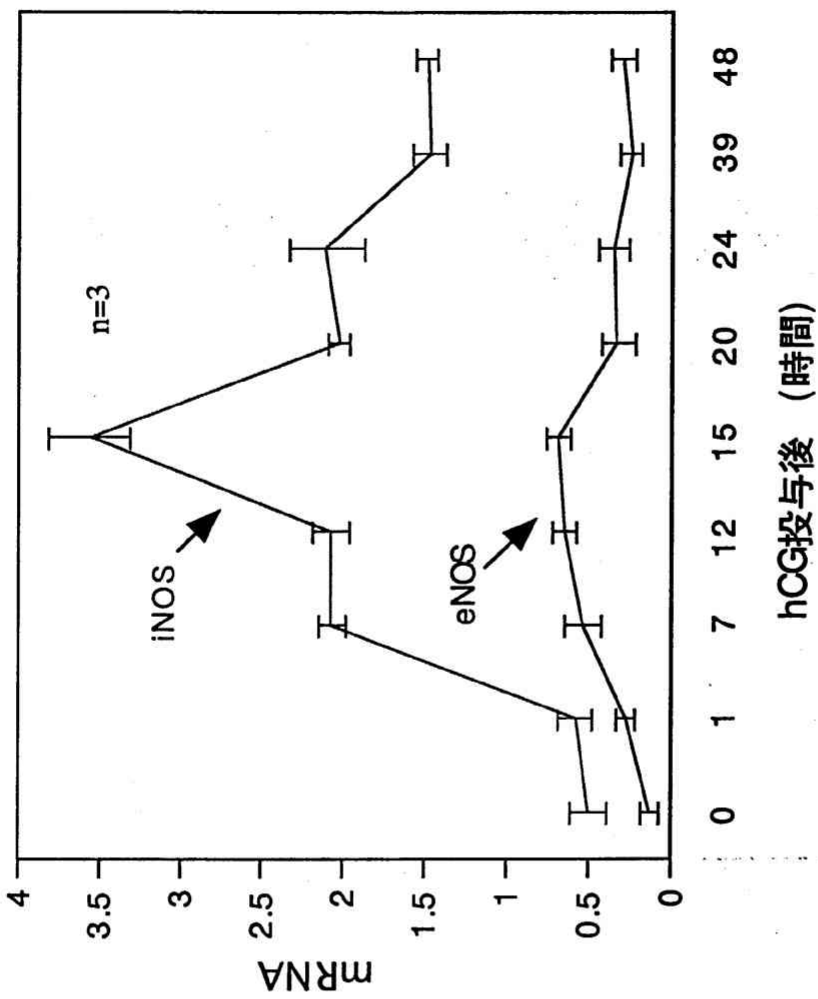


Fig.2 過排卵ラット黄体におけるeNOS、iNOS mRNAの動態

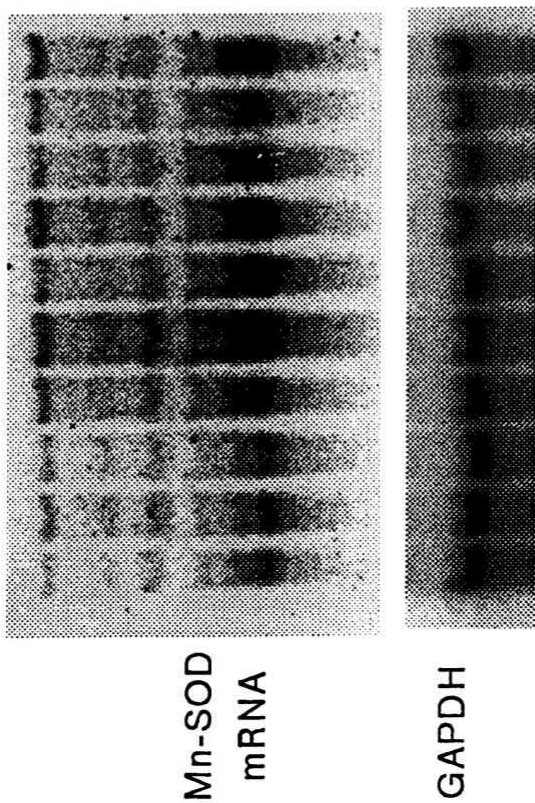
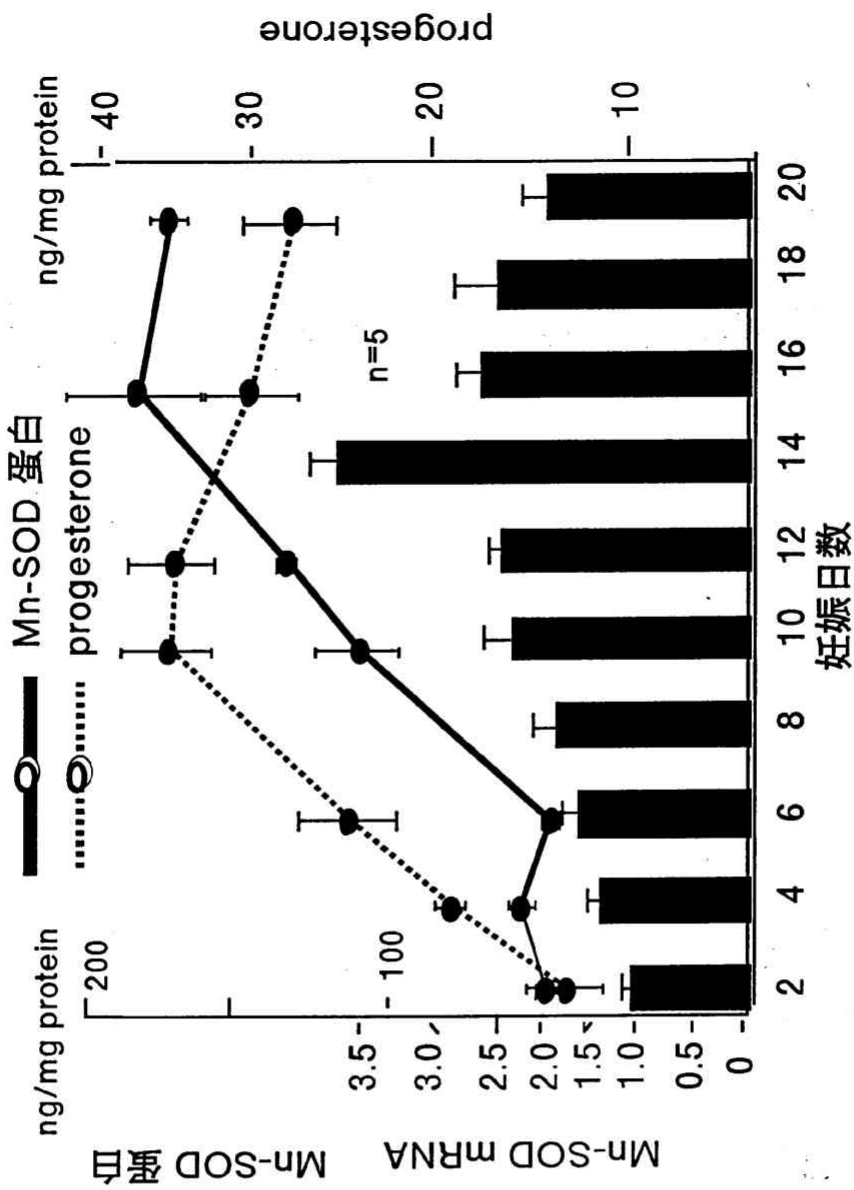
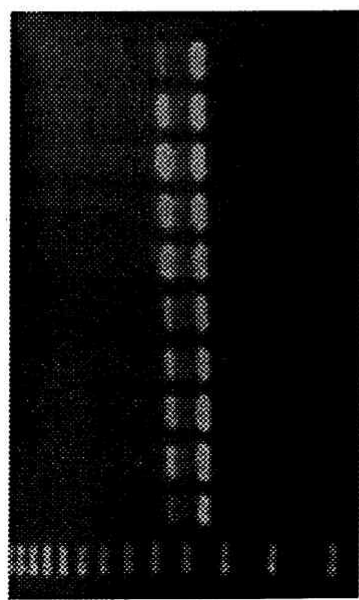
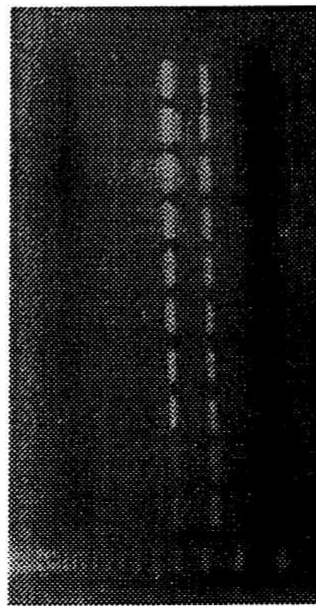


Fig. 3 妊娠ラット黄体におけるMn-SOD mRNA, 蛋白及びprogesteroneの動態



iNOS  
CONT



eNOS  
CONT

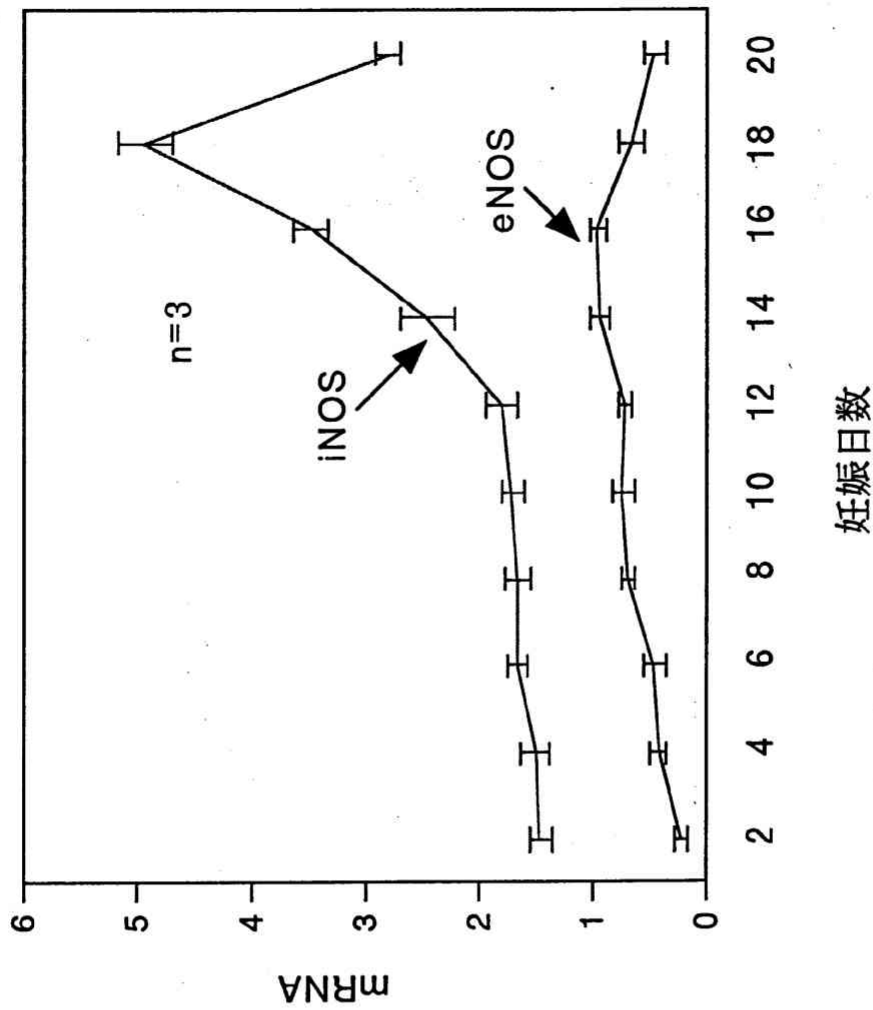


Fig.4 妊娠ラット黄体におけるeNOS、iNOS mRNAの動態

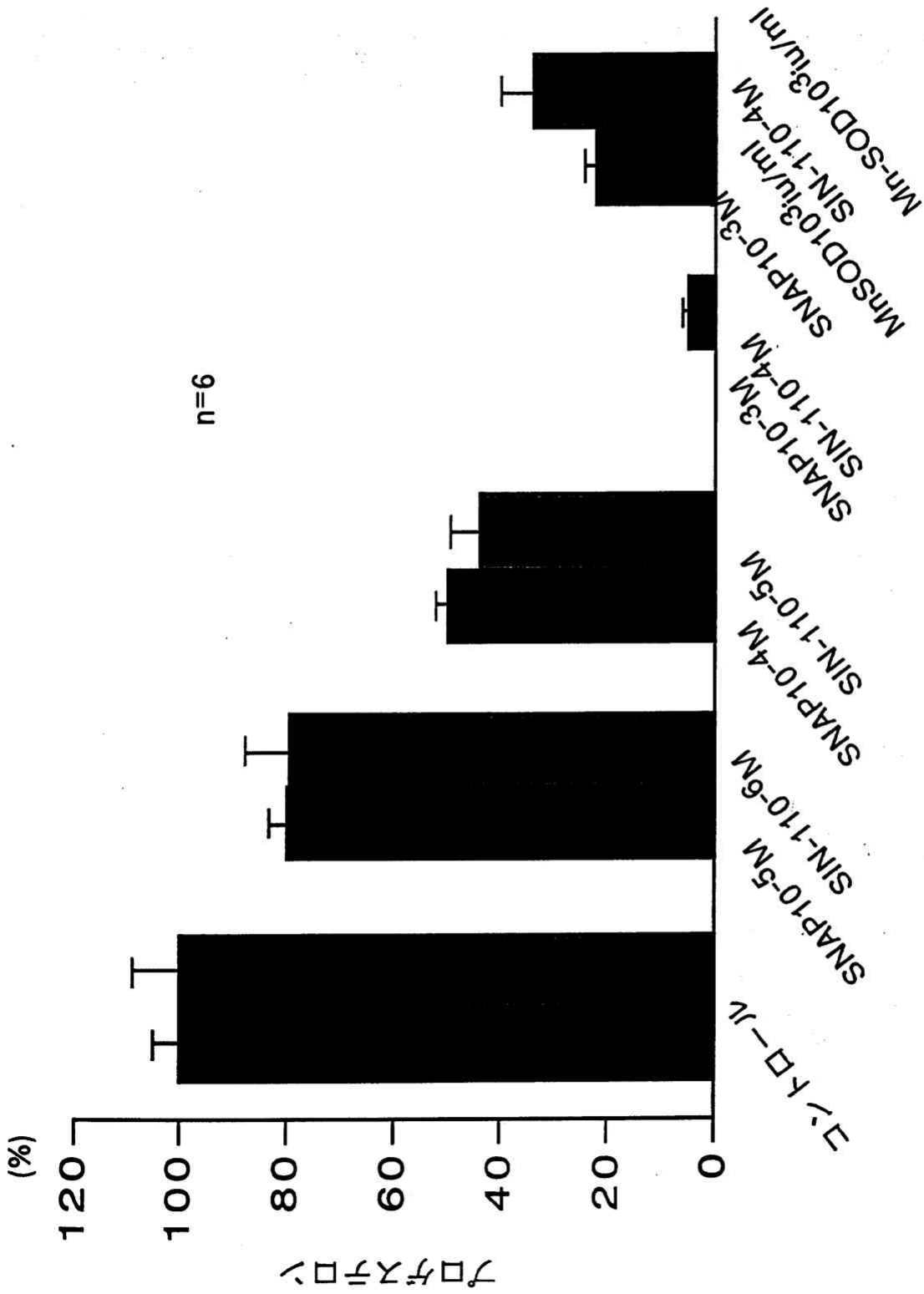
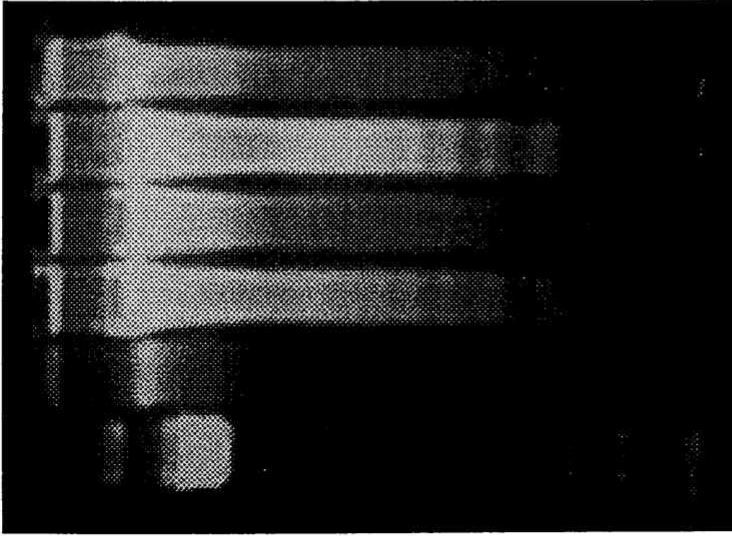


Fig.6培養顆粒膜細胞におけるSNAP、SIN-1及び  
Mn-SODの添加によるP4産生への影響



- 1 マーカ
- 2 コントロール
- 3 SIN-1  $10^{-4}M$
- 4 SIN-1  $10^{-4}M$ +Mn-SOD $10^3$ iu/ml
- 5 SNAP  $10^{-3}M$
- 6 SNAP  $10^{-3}M$ +Mn-SOD $10^3$ iu/ml

1 2 3 4 5 6

Fig.8 SNAP、SIN-1及びMn-SOD添加によるアポトーシスへの影響

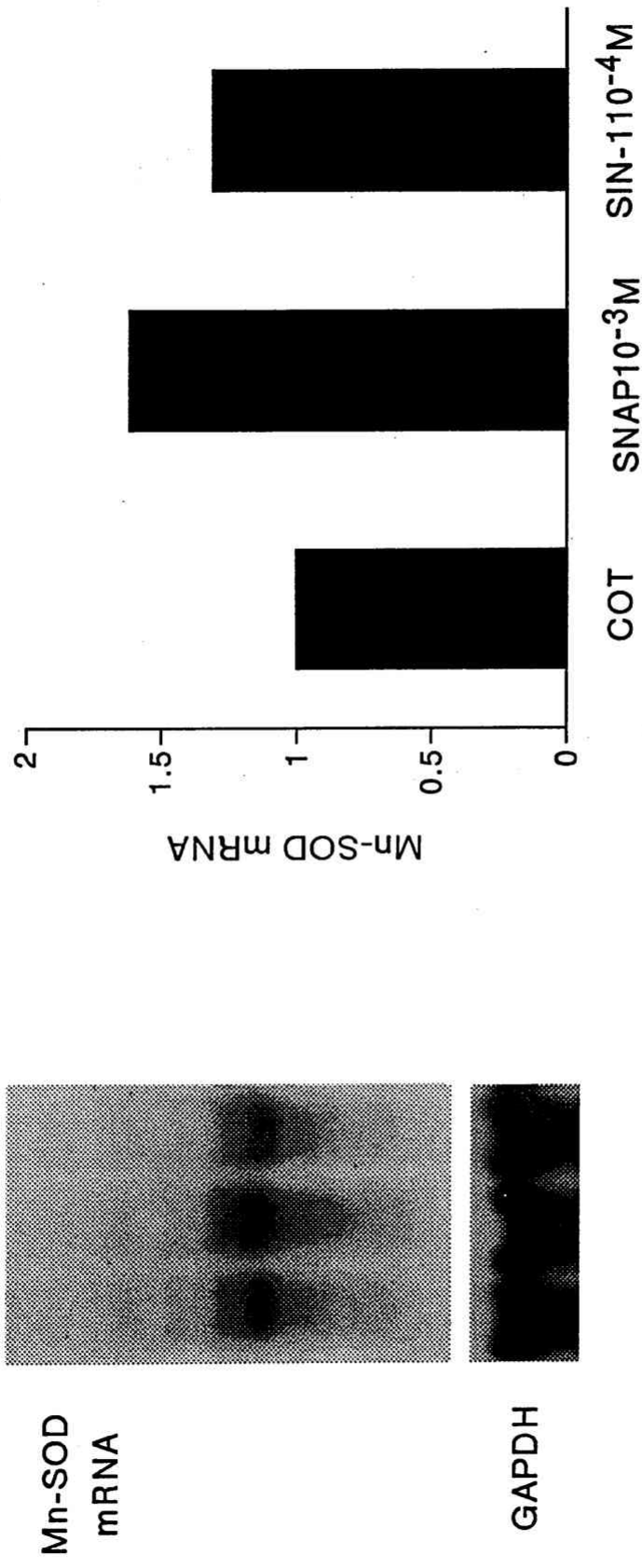


Fig 8. 培養ラット顆粒膜細胞におけるSNAP及びSIN-1添加によるMn-SOD mRNAへの影響

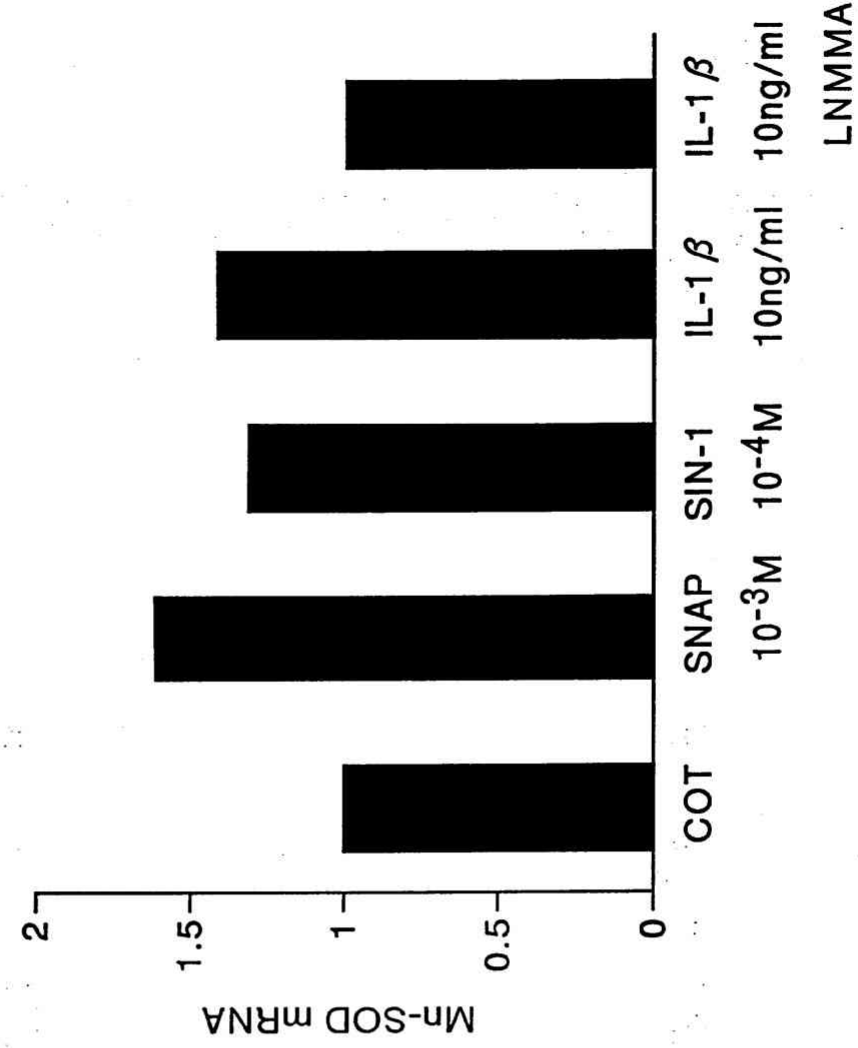
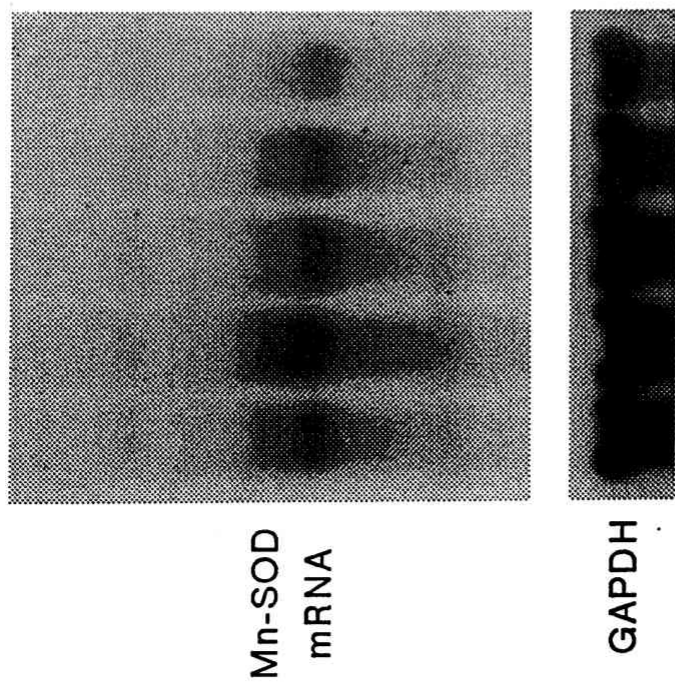


Fig. 7 培養顆粒膜細胞におけるSNAP、SIN-1、IL-1 $\beta$ 及びLNMMAの添加によるMn-SOD mRNAの変化



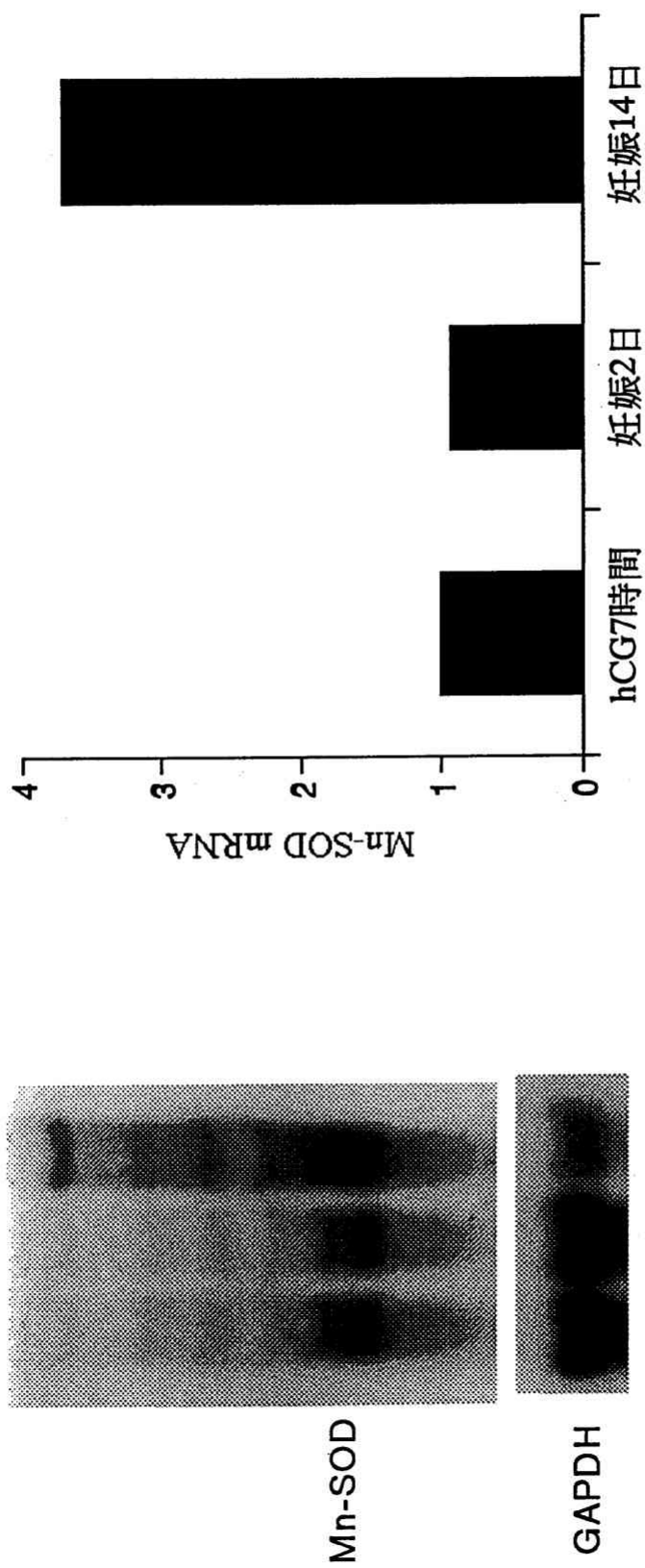


Fig.5 過排卵と妊娠とのMn-SODmRNAの比較