

黄体における血管新生調節機構

田村 博史, 木塚 文恵

山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学

はじめに

卵巣では排卵を契機に、形態学的に卵胞とは全く異なる実質器官である黄体が短期間の間に形成される。黄体では活発なプロゲステロン合成のため、基質であるコレステロールや黄体刺激物質を黄体細胞に供給するため、また合成されたプロゲステロンを血中に運搬するために、高度に発達した血管網の構築および機能的に成熟した血管形成が必要である。一方、黄体は妊娠が成立しなければプロゲステロン合成の低下とともに血管網も退行し、短期間でその寿命は終わり、卵巣から消失する。しかし、妊娠が成立すれば胎盤からの黄体刺激物質により黄体発育が維持促進され、その寿命および機能が延長される。このような黄体の形成と発育には血管新生が不可欠である。本稿では、排卵後の黄体形成に伴う血管新生および妊娠成立後の黄体機能延長に伴う黄体発育における血管新生に注目し、黄体の血管新生メカニズムについて概説する。

排卵後の黄体血管新生のメカニズム

成体における血管新生は、既存の血管の血管内皮細胞から血管ができる血管新生 (angiogenesis) が主に考えられている。黄体形成においても、卵胞の内荊膜細胞層の血管内皮細胞が、luteinizing hormone (LH) サージ後に基底膜の破壊に伴って、無血管領域である顆粒膜細胞層へ侵入・増殖し非常に短期間で血管新生が完成する。しかしながら、正常な血管網の構築には血管新生に加えて血管の質的な変化、すなわち血管の成熟や安定化が重要となる。特に、黄体では、基質であるコレステロールの供給と合成されたプロゲステロンの血中への運搬の必要性があるので、黄体内の血管は癌組織にみられるような漏出性の高い脆弱な血管ではなく、安定した血管いわ

ば機能的血管である必要がある。

血管新生は、血管内皮細胞の増殖に関わる血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) と血管安定性に関与する angiopoiein との相互作用によって調節されている。VEGF は血管新生に関与するタンパクであり、血管内皮細胞表面にある VEGF 受容体 (VEGFR) にリガンドとして結合し、細胞分裂や遊走・分化を刺激したり、微小血管の血管透過性を亢進させたりする機能をもつ。血管の安定化は、angiopoiein-1 (Ang-1) が tyrosine kinase 型の受容体である Tie-2 に結合することにより、血管内皮細胞と血管支持細胞 (壁細胞) との接着や血管内皮細胞同士の接着を増強することによる。一方、Ang-1 の拮抗物質として Ang-2 が存在し、これは Tie-2 に結合するが tyrosine kinase のリン酸化を起こさないためシグナルが伝達されず、結果として Ang-1 の作用に拮抗する。すなわち、血管の安定化には Ang-1 が Ang-2 に比べ優位になり、脱安定化には Ang-2 が優位になる必要がある。血管新生には、Ang-2 優位による血管支持細胞の脱安定化とともに VEGF による血管内皮細胞の増殖が必要であり、血管成熟には Ang-1 優位による血管内皮細胞と血管支持細胞の相互作用による血管の安定化が必要とされている [1]。また、血管の退縮には、Ang-2 優位による血管支持細胞の脱安定化とともに VEGF 作用の欠如による血管内皮細胞の細胞死が関与する。

1. 黄体における血管の変化

a) 血管数の変化

黄体における血管網の構築を検討するため、まず、ヒト黄体における血管数の月経周期に伴う変化をみた。血管内皮細胞に対する抗体である CD34 を用いた免疫組織染色を行い、黄体内の血管数の月経周期に伴う変化を調べた。血管数は、黄体期の初期の前半から初期の後半にかけて増加し、初期の後半ではすでに中期の黄体と同程度であった。そして、妊娠黄体では、中期の黄体と比べ有意に増加していた。しかし、黄体期後期から退縮期では中期に比し著明に減少した。すなわち、黄体の血管新生は初期に活発に起こり中期までに完成する [2, 3]、

連絡先：田村博史，山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学

〒755-8505 山口県宇部市南小串1-1-1

TEL : 0836-22-2288

FAX : 0836-22-2287

E-mail : hitamura@yamaguchi-u.ac.jp

そして妊娠が成立しなければ血管は減少していく。一方、妊娠が成立すれば血管新生が再開され血管数が増加する [2, 3]。

b) 血管支持細胞（壁細胞）数の変化

正常な血管網の構築には、血管新生の他に血管の質的な変化、すなわち血管の成熟や安定性も重要である。血管の成熟・安定性は、血管内皮細胞とその周りを覆う壁細胞や平滑筋細胞との相互作用による。そこで、壁細胞数の月経周期に伴う変化を調べた。壁細胞に対する抗体である α -smooth muscle actin (α -SMA) を用いた免疫組織染色を行ったところ [3]、黄体内の壁細胞は黄体期の初期の前半から後半、そして中期にかけて漸増したが、後期になると減少した。妊娠黄体では、中期と同程度の数であった。すなわち、血管安定性は初期から中期にかけて増加し中期に最も高くなる。妊娠が成立せず退縮に向かえば、血管は脆弱となるが、妊娠が成立すれば安定性が維持される。

2. 黄体における血管新生の調節因子

前述したように、血管新生は、主に VEGF と angiopoietins の共同作用によって調整されているため、VEGF と angiopoietins の発現とその調節を述べる。

a) VEGF

黄体では、VEGF は黄体細胞に発現している。黄体内 VEGF 発現の月経周期に伴う変化を調べた [4]。免疫組織化学染色、Western blot によるタンパク発現、RT-PCR による mRNA 発現の結果を総合して判断すると、黄体期初期から後期までは一定した発現を示したが、退縮期にある黄体では有意に発現が低下していた。そして、妊娠黄体では中期の黄体の VEGF 発現より有意に高い発現を示した。さらに、黄体期中期の黄体を HCG で培養したところ、HCG は有意に VEGF 発現を増加させたことから、妊娠黄体でみられた高い VEGF 発現は HCG によることが考えられる [4]。また、VEGF のレセプターには fms-like tyrosine kinase (flt-1: VEGFR-1) と kinase insert domain-containing region (KDR: VEGFR-2) があるが、両者とも黄体の血管内皮細胞に発現しており、退縮期の黄体では発現が著明に低下する [4, 5]。

b) Angiopoietins

Ang-1 発現は黄体期初期では発現がみられなかったが、徐々に発現が増加し、中期になると最も強い発現を示した [3]。妊娠黄体では中等度の発現で、中期の黄体よりは低い発現であり、後期や退縮期では弱い発現であった。Ang-2 発現は黄体期初期の前半から弱いながらも発現を示しており、初期の後半には最も強い発現を示

した。中期と妊娠黄体で中等度の発現を示した他、後期の黄体でも中等度の発現を維持していた。血管の安定化・脱安定化には Ang-1 と Ang-2 の相対的な発現が重要である。免疫組織化学染色と RT-PCR による mRNA 発現の結果を総合して判断すると、黄体期の中期と妊娠では、Ang-1 が Ang-2 に比べ優位であり血管の安定化に働いている。一方、黄体期の初期、後期、退縮期では Ang-2 が Ang-1 に比べ優位であり、血管の脱安定化や脆弱化に働いていると考えられる [3]。

3. 黄体における血管網の構築機構

月経周期と妊娠に伴う黄体における血管網の構築過程を説明する [4]。黄体期の初期には、Ang-2 が優位な環境となっており VEGF の作用で血管新生が急激に起きているが、壁細胞が少なくおそらく血管は未熟と考えられる。そして、初期の間に血管新生が完成した後、中期には壁細胞が増加し、Ang-1 が優位となり、血管の成熟・安定化が起こる。妊娠が成立せず退縮に向かう黄体では Ang-2 が優位な環境となり、VEGF 発現が低下し壁細胞も減少するため血管は脆弱となり、さらには血管の退縮が進み血管が消失していく。すなわち、構造的黄体退縮に血管数の減少が伴っていることが確認された [6]。一方、妊娠黄体では Ang-1 が優位となっているが、中期黄体に比し VEGF 発現が増加するため、再度血管新生が起こるものと考えられる。そして、壁細胞は増加しないが、Ang-1 の作用により血管の安定化も同時に起こっていると考えられる。

4. 骨髄由来血管内皮前駆細胞の黄体血管新生への関与

血管内皮前駆細胞が新たに血管をつくる血管形成 (vasculogenesis) は、これまで Folksman らの説によって胎生期にしか認められない現象とされていた。しかし成人の末梢血中にも血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) が発見され、循環血液中の血管内皮前駆細胞が血管形成に関与するという概念が出てきた。そこで、われわれは、黄体の血管形成に骨髄由来細胞が関与しているかどうかを検討した。

排卵後の黄体形成においては、卵胞の内葉膜細胞層の血管内皮細胞が、LH サージ後に顆粒膜細胞層へ侵入・増殖し、非常に短期間で血管新生は完成する。この血管新生は前述のように VEGF による血管内皮細胞の増殖が主体であると考えられるが、この黄体形成に伴う血管新生に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が関与しているかどうかについて調べた。4 週齢マウスに致死線量 (9Gy) 放射線を照射後に、6 週齢 GFP transgenic マウスから

採取した骨髄由来単核球を静脈投与した。骨髄が定着する4週間後にGnRH agonistにて内因性ゴナドトロピンを抑制後、PMSGにて過排卵を誘発し、hCG投与0, 6, 12, 24時間後の卵巣を摘出した。12時間前後で排卵、24時間では黄体が形成されている。摘出卵巣において、血管内皮に対する抗CD31または抗CD34抗体、壁細胞に対する抗platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β) 抗体、マクロファージに対する抗f4/80抗体を用いて免疫組織染色を行った。hCG投与後の黄体形成過程では、抗CD34抗体、抗GFP抗体による2重染色において、共に陽性の細胞が散見された。さらに抗CD31抗体、および抗GFP抗体による蛍光免疫染色でも同様に検討したところ、黄体形成に伴いmergeした陽性細胞数の増加を認め、骨髄由来細胞が血管内皮細胞として黄体の血管形成に関与していると思われる。さらに、壁細胞に対する抗PDGFR- β 抗体およびマクロファージに対する抗f4/80抗体を用いた検討においても、それぞれGFP陽性細胞とmergeするものを新生血管周囲に確認した。以上の結果より、骨髄由来単核球の一部は、血管内皮細胞に分化し、黄体内の血管形成の一部に関与していることが明らかとなった。さらに骨髄由来単核球の一部は壁細胞やマクロファージにも分化し、血管形成に関与していると考えられる。

妊娠に伴う黄体発育における血管新生

妊娠が成立すると胎盤性luteotropin（ヒトではhCG）が出現し、黄体のプロゲステロン産生を刺激・促進し、黄体機能を延長させながら妊娠黄体へと変化させる。ラットの妊娠黄体では、妊娠中期に機能的にも形態的にも大きな変化を認める。黄体重量は妊娠中期（12日目から15日目）の短期間に約2倍に著しく増加し、プロゲステロン産生も著しく増加する（図1）。この時期は、黄体機能維持機構が下垂体のプロラクチンから胎盤性luteotropinに切り替わった時期であり、ヒトでは妊娠が成立し黄体維持機構が下垂体のLHから胎盤のhCGに切り替わる時期に相当する。妊娠ラットでは胎盤性luteotropinであるテストステロンが黄体内で変化して生成されるエストロゲンにより黄体のプロゲステロン産生が刺激される。ラットを用いて、妊娠黄体の発育に伴う血管新生および血管安定性について検討した内容を概説する。

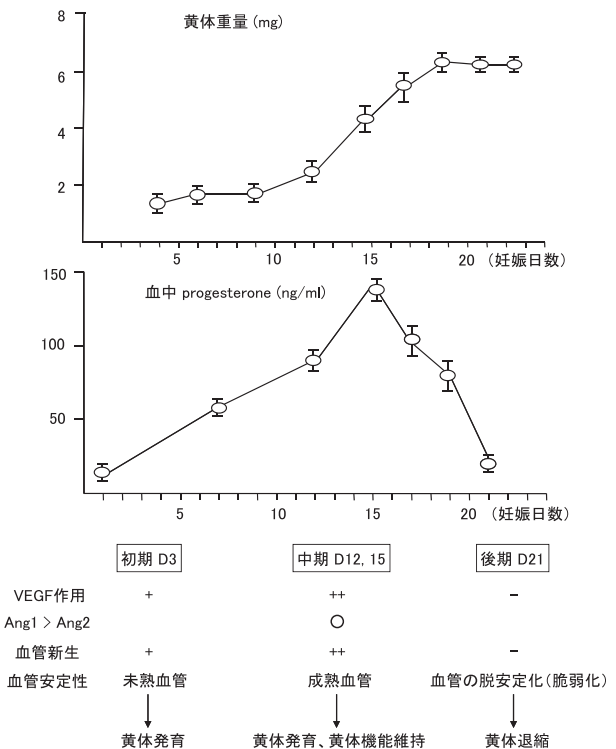


図1 妊娠ラットの黄体発育に伴う血管新生・血管安定性の変化

1. 妊娠黄体における血管数および血管新生調節因子の変化

妊娠ラットにおける黄体内の血管内皮細胞のうち、bromodeoxyuridine: BrdU陽性細胞を、labeling indexで表し内皮細胞の増殖能を検討したところ、妊娠12日から15日の間に急激に増加していた。また黄体内の血管数を血管内皮マーカー（CD34）による免疫染色にて検討すると12日以降に増加しており、胎盤性luteotropinの出現に伴う黄体発育に一致して血管数も増加していた。黄体内のVEGF発現（タンパク発現, mRNA発現とも）は、妊娠中期（12日目から15日目）において高い発現を認めた[7]。血管の安定化に必要なAng-1発現は、タンパク発現, mRNA発現ともに12日から15日の中期中で高値を示し、後期には低下した。一方、Ang-2発現は変化を認めず、したがって、妊娠中期の黄体では、Ang-1優位な環境となっていることが分かった[8]。すなわち、胎盤性luteotropinが出現し黄体発育が著明に増加する妊娠中期には、VEGFの増加に伴い血管新生が促進されるとともに、Ang-1有意な環境のため血管の安定性も増す。つまり妊娠中期の黄体は血管新生と血管安定が同時に起こり、急激な重量の増加やプロゲステロン産生の増加といった機能を維持している。妊娠後期ではVEGFレセプターの著明な発現低下によるVEGF作用の消失とともに、Ang-2有意な環境となるため血管の脱

安定化が起こり黄体退縮へとつながる (図1)。

2. 妊娠黄体の血管安定性の変化

前述のように妊娠中期では、Ang-1の発現が増加しAng-2は変化しないため相対的にAng-1優位の環境となっている。したがって、このようなVEGFとAng-1の両者の発現が高い環境で血管新生が充進している状況では、血管の安定性がどうなっているかは興味深い。そこで実際にわれわれは、Evans Blue色素を用い、黄体の血管の漏出性を定量化することによって血管の安定性を評価した。Evans Blueは血管内ではアルブミンと結合しているが、血管が未熟で脆弱な場合は、アルブミンのような大きな分子量(約67,000)の物質が血管外に漏出する。したがって、血管外に漏出したEvans Blue色素を測定することによって血管の漏出性を定量化した。血管外に漏出したEvans Blue色素がオレンジ色に見えるが、初期の黄体では黄体の中心部に色素が濃く見られるが、中期の黄体では非常に薄かった。すなわち、黄体期初期の黄体では血管が未熟・脆弱であり、中期の黄体は安定化していることが推察される。実験では、この黄体からEvans Blue色素を抽出し、さらに抽出後の黄体の組織切片を作成し黄体内の血管数を数え、抽出されたEvans Blue色素量を血管数で除したものを血管あたりの漏出性として定量化した[8]。血管の漏出性は初期(妊娠3日目)から中期(妊娠12~15日目)に向かい低下し、後期には再度増加する。すなわち、黄体の血管は初期には脆弱であるが、中期に向かい安定化し、そして後期には脱安定化することが分かった。したがって、胎盤からの黄体刺激物質により維持される妊娠中期の黄体では、高いVEGF発現による血管新生の亢進とともに、高いAng-1発現による血管安定化の両者が同時に起こっていることが実際に明らかとなった。すなわち、妊娠黄体では黄体機能維持のため、安定した血管による発達した血管網が構築されていることが示されたわけである[3, 9, 10]。

3. 妊娠黄体における血管網構築の調節機構

このようなラット妊娠中期の黄体発育、血管数の増加、VEGF発現増加に対して、妊娠維持に不可欠な黄体刺激物質であるエストロゲンが実際に関与しているのかという疑問が残る。そこで、下垂体・子宮摘出モデルを用いて検討した。これは妊娠ラットのエストラジオールによる黄体維持機能をみるモデルであり、下垂体・子宮を妊娠12日目に摘出してエストロゲンの影響を排除すると、黄体は退縮し、黄体重量および血中プロゲステロン値は低下する。しかし12日目から15日目までエストラジオールを補充すると黄体重量、プロゲステロン値ともに回復を認めることから[11]、妊娠中期の黄体発育やプロゲステロン産生にはエストロゲンが必要であることが分かる。このモデルを用いて、黄体内のVEGF発現、labeling index、血管数を検討したところ、すべてにおいて下垂体・子宮摘出で低下し、エストラジオール投与で回復を認めた[7]。したがって、VEGF発現および血管新生もエストロゲンにより調節されていることが明らかとなった。さらに、下垂体、子宮摘出モデルにエストラジオールとともにVEGF抗体を投与して、VEGFの作用をブロックすると黄体内の血管数、黄体重量、血中プロゲステロン値ともに低下した[7]。エストラジオールの作用がブロックされたことから、エストラジオールの血管新生促進作用は、VEGFを介していることが明らかとなった。

さらに下垂体、子宮摘出モデルにおいてangiotensin発現と血管漏出性を検討した。下垂体子宮摘出によりAng-2発現は変化を認めないが、Ang-1発現は有意に低下し、血管漏出性も有意に増加した。そしてエストラジオール補充でAng-1発現と血管漏出性は回復を認めたことから、エストラジオールはAng-1優位な環境をつくることで血管を安定させていることが明らかとなった。

ラット妊娠中期においては、胎盤由来のテストステロンが黄体でエストラジオールに変換される。このエストラジオールの作用により黄体内でVEGF産生が増加し血管新生が亢進すると同時に、Ang-1を増加させること

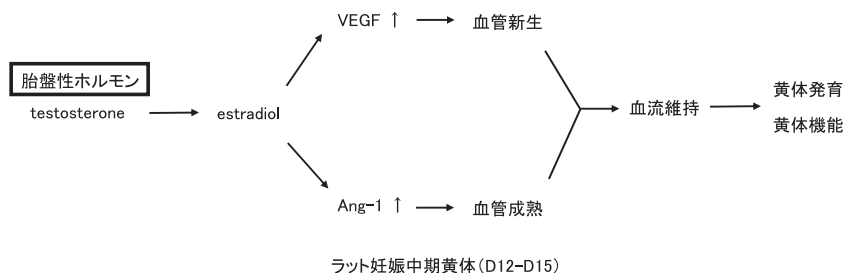


図2 胎盤性ホルモンによる血管新生と血管成熟を介した黄体維持機構

で血管が成熟，安定化する（図2）。すなわち，妊娠中期黄体では，Ang-1優位な環境であっても，血管成熟とともに血管新生も同時に起こっているものと考えられる。これは妊娠による黄体機能の延長に伴う血流維持を考えると合目的な現象といえる。

おわりに

本稿では，黄体形成から黄体退縮に至る変化や妊娠による寿命延長といった変化のなかで起こっている黄体内の血管新生，血管成熟，血管退行という血管系変化の制御機構を，われわれの研究結果を中心に説明した。本稿では触れていないが，これらの黄体の血管系変化は黄体機能と密接な関係があることも，われわれは明らかにしている [12-14]。黄体は排卵後速やかに形成され，妊娠が成立しなければ短期間でその寿命は終わる。しかし，次の周期には再び排卵が起こり黄体が形成される。言い換えれば，黄体は生体内でみられる臓器再生としてとらえることができる。そうした意味から考えると，黄体形成過程に骨髄由来細胞が関与しているという新たな知見は非常に興味深い。また，妊娠の成立により胎盤由来の luteotropin により黄体の寿命，機能が延長されるが，luteotropin は血管新生と血管成熟を同時に促進するという巧妙な調節機構をもつことも明らかとした。これらの知見は，単に黄体機能の解明のみならず，臓器再生や血管再生医学の分野にも有用な情報を提供するものと考ええる。

引用文献

1. Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277, 48-50.
2. Christenson LK, Stouffer RL (1996) Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Endocrinology* 137, 367-374.
3. Sugino N, Suzuki T, Sakata A, Miwa I, Asada H, Taketani T, Yamagata Y, Tamura H (2005) Angiogenesis in the human corpus luteum: changes in expression of angiopoietins in the corpus luteum throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6141-6148.
4. Sugino N, Matsuoka A, Taniguchi K, Tamura H (2008) Angiogenesis in the human corpus luteum. *Reprod Med Biol* 7, 91-103.
5. Endo T, Kitajima Y, Nishikawa A, Manase K, Shibuya M, Kudo R (2001) Cyclic changes in expression of mRNA of vascular endothelial growth factor, its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1, and Ets-1 in human corpora lutea. *Fertil Steril* 76, 762-768.
6. Modlich U, Kaup FJ, Augustin HG (1996) Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab Invest* 74, 771-780.
7. Kashida S, Sugino N, Takiguchi S, Karube A, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H (2001) Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol Reprod* 64, 317-323.
8. Matsuoka-Sakata A, Tamura H, Asada H, Miwa I, Taketani T, Yamagata Y, Sugino N (2006) Changes in vascular leakage and expression of angiopoietins in the corpus luteum during pregnancy in rats. *Reproduction* 131, 351-360.
9. Rowe AJ, Morris KD, Bicknell R, Fraser HM (2002) Angiogenesis in the corpus luteum of early pregnancy in the marmoset and the effects of vascular endothelial growth factor immunoneutralization on establishment of pregnancy. *Biol Reprod* 67, 1180-1188.
10. Wulff C, Dickson SE, Duncan WC, Fraser HM (2001) Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. *Hum Reprod* 16, 2515-2524.
11. Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube-Harada A, Kato H (2001) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in rat corpus luteum: regulation by oestradiol during mid-pregnancy. *Reproduction* 122, 875-881.
12. Takasaki A, Tamura H, Taniguchi K, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Sugino N (2009) Luteal blood flow and luteal function. *J Ovarian Res* 2, 1.
13. Tamura H, Takasaki A, Taniguchi K, Matsuoka A, Shimamura K, Sugino N (2008) Changes in blood-flow impedance of the human corpus luteum throughout the luteal phase and during early pregnancy. *Fertil Steril* 90, 2334-2339.
14. Takasaki A, Tamura I, Kizuka F, Lee L, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura H, Shimamura K, Morioka H, et al (2011) Luteal blood flow in patients undergoing GnRH agonist long protocol. *J Ovarian Res* 4, 2.