

総 説

活性酸素を介した生殖戦略： 子宮と卵巣における活性酸素とその消去酵素の役割

杉野法広

山口大学医学部分子制御系・産科婦人科学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 活性酸素, SOD, 黄体, 子宮内膜

はじめに

繁殖という命題は、子孫を残すという意味で、我々人類を含め生物にとっては絶対的なものである。実際、過去から現在に至るまで引き続いており、さらに将来に向けて永久に存在する不滅のものであろう。同時にそれは、極めて神秘的なものでもある。子孫をいかに多く残すかということが種を超えた共通のテーマであり、数少ない妊娠をいかに有効に生かすか、そうでなければ、いかに頻回に妊娠の機会を得るかということが繁殖のための生殖戦略となる。

卵巣では、排卵した後は黄体が形成されるが、黄体から分泌されるプロゲステロンは妊娠の成立・維持には不可欠である。したがって、妊娠が成立した時は、黄体機能が速やかに延長され、プロゲステロン分泌が維持されることが妊娠の継続に重要となる。しかし、排卵しても妊娠が成立しない時は、プロゲステロンがいたずらに分泌され続けると、次の排卵がおこらない。したがって、妊娠が成立しなかった時は、速やかにプロゲステロン分泌が無くなるのが重要となる。さらに、子宮でも黄体の変化に伴い、特徴的な変化がおこる。子宮内膜では、受精卵が着床するために、黄体から分泌されるプロゲステロンにより脱落膜化という変化がおこり、子宮筋も弛緩する。しかし、排卵しても妊娠が成立しない時は、子宮内膜は必要ないため速やかに剥脱して次の周期の着床に備えた方が合理的である。このよう

に、いったん妊娠が成立した時は、妊娠を維持するために、黄体の機能を速やかに延長して、脱落膜化などの子宮の変化を誘導する。逆に、妊娠が成立しなければ、早く黄体の機能を終わらせ、子宮内膜の剥脱を誘導して次の周期の排卵や着床に備える。このような巧妙な現象、言い換えれば生殖戦略が子宮と卵巣で行われている。

活性酸素は、酸素から発生するフリーラジカルで細胞膜傷害やDNA傷害など有害な作用が知られている。しかし、最近では、この活性酸素が生理活性物質として細胞の機能調節に働くことが報告されている。一方、この活性酸素を特異的に消去する酵素としてsuperoxide dismutase (SOD)がある。SODは、活性酸素を過酸化水素に代謝し、さらに過酸化水素は catalase や glutathione peroxidase によって水と酸素に無毒化される(図1)。SODは防御的に作用する最初のステップであるほか、活性酸素量を調節することによって細胞機能調節にも関与すると言える。このSODには細胞内局在から、細胞質

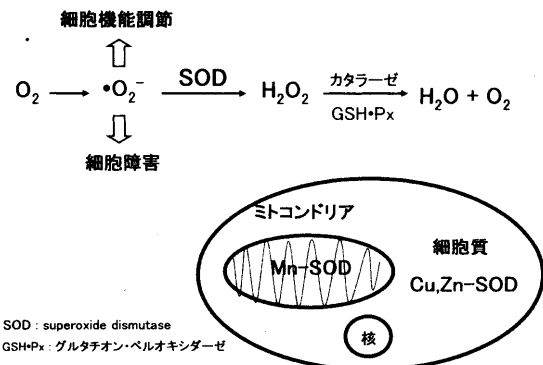


図1 活性酸素の代謝経路と SOD の細胞内局在

平成16年1月8日受理

に存在するCu,Zn-SODとミトコンドリアのMn-SODがある。両者とも活性酸素を消去する点では共通しているが、それぞれの特異的な役割については解明されていない。今回は、この活性酸素とSODが先に述べた子宮と卵巣で行われている巧妙な現象にどのように関与しているかを報告する。

I. 黄体機能の調節における活性酸素とSODの役割

1. 黄体退縮における活性酸素とSODの役割

黄体の退縮とは、黄体の機能が低下し、そして縮小していき卵巣から消失することをいうが、この黄体退縮は、機能的黄体退縮 (functional luteolysis) と構造的黄体退縮 (structural luteolysis) に分けられる。前者は、黄体の構造的変化を伴わず機能のみ低下するものである。すなわち、黄体細胞は死なないがプロゲステロン分泌が低下するものである。後者は、構造的に黄体が縮小していくもので、黄体細胞の消失や血管の退縮による。ヒトでは、黄体が形成されてからやがて白体となり卵巣から消失するのに6~8週間かかるといわれているので、機能的黄体退縮は、黄体期中期 (排卵後7日目ごろ) から月経発来までの1週間という非常に短期間でおこることになる。一方、構造的黄体退縮は、残りの5~7週間で比較的ゆっくりとおこり、本稿では詳細には述べないが、アポトーシスによっておこる^{1, 2)}。プロゲステロンが速やかに低下するという事は、次の周期の卵胞発育にとっては重要で、いたずらにプロゲステロン分泌が続いてしまうと卵胞が発育できない。したがって、いかに速やかにプロゲステロン分泌を低下させるかが、いかに早く次の妊娠の機会を得るかということにおいて重要となる。黄体は、次の卵胞の発育のため、できるだけ早くプロゲステロン分泌を低下させることに全力を尽くし (機能的黄体退縮)、その後はゆっくりとアポトーシスで死んでいくという (構造的黄体退縮)、非常に合理的な内分泌器官なのである。まず、この機能的黄体退縮における活性酸素とSODの関与について述べる。

(1) 機能的黄体退縮における活性酸素の関与

まず、ヒト黄体内のSOD発現および活性酸素量の月経周期に伴う変化を調べてみると、黄体期後期には、細胞質のCu,Zn-SODの発現が低下し、活性酸

素の増加がみられた³⁾。そこで、活性酸素の増加が黄体機能に及ぼす影響を及ぼすかを検討した。黄体細胞培養でCu,Zn-SODのantisense oligonucleotide添加によりCu,Zn-SODの発現を低下させると、活性酸素が増加しプロゲステロン分泌を低下させることがわかった^{4, 5)}。尚、生細胞数には変化がなかった。活性酸素は、プロゲステロン合成に至るステロイド代謝のなかで、ミトコンドリア内へのコレステロールの取り込みを阻害したり、プロゲステロン産生酵素であるcytochrome P450 side-chain cleavageや 3β -hydroxysteroid dehydrogenaseを阻害することが報告されている^{6, 7)}。したがって、黄体における活性酸素の増加が、機能的黄体退縮の一因と考えられるが、黄体内の活性酸素増加には、Cu,Zn-SOD発現の低下以外にも、次に述べるような色々なメカニズムが関与している。

(2) 活性酸素増加のメカニズム

1) マクロファージ

マクロファージは活性化すると活性酸素を放出することが知られている。黄体期の後期になると、黄体内には、活性化し活性酸素を産生しているマクロファージが増加してくるので^{8, 9)}、この活性酸素が黄体細胞のプロゲステロン分泌に影響することが考えられる。実際、好中球から産生された活性酸素は、黄体細胞内へ入り、プロゲステロン産生を抑制することが報告されている¹⁰⁾。興味深いことに、マクロファージの活性酸素産生能は、プロゲステロンにより抑制されるので、黄体期後期で血中のプロゲステロンレベルが低下するにつれてマクロファージも活性化されるという循環となる⁸⁾。

2) 卵巣血流量

卵巣血流量の変化は密接に黄体機能と関連している¹¹⁻¹³⁾。黄体期後期には、卵巣血流の低下がおこる¹⁴⁾。血流の低下は、虚血—再還流のメカニズムによって発生する活性酸素により、組織障害をひき起こすことが色々な臓器で知られている。ラットを用い、卵巣血流の遮断とその後の血流再開 (虚血—再還流) をおこすと、黄体ではSOD活性の低下と活性酸素の増加がおこり、プロゲステロン分泌が低下することがわかった¹⁵⁾。したがって、黄体期後期におこる卵巣血流の低下も活性酸素を介した機能的黄体退縮の促進因子になると考えられる。

3) prostaglandin F₂α (PGF₂α)

PGF₂αは黄体期後期から退縮期にかけて黄体で増加し、さらに黄体のプロゲステロン分泌を抑制することから、黄体退縮因子として知られている。PGF₂αをラットに投与すると、黄体内の活性酸素の増加とともに血中プロゲステロン濃度が低下するため、活性酸素を介した作用があることがわかっている^{16, 17)}。尚、活性酸素の産生源は黄体細胞自身や黄体内のマクロファージであると考えられている。

2. 黄体機能延長におけるSODの役割

受精卵が子宮内膜に着床した後、妊娠が成立、継続するためには、黄体の寿命が延長し、黄体機能すなわちプロゲステロン分泌が持続する必要がある。黄体のプロゲステロン分泌の持続は、絨毛から分泌されるhuman chorionic gonadotropin (hCG)が、黄体のLHレセプターに結合しプロゲステロン分泌を刺激することによる。しかし、黄体の寿命の延長に関しては、どのようなことが黄体で起こっているのかは、従来から興味を持たれているが十分わかっていない。本稿では、黄体の寿命の延長についてSODの役割を中心に述べる。

(1) hCGによるSODの増加

妊娠黄体では、非妊娠黄体に比べ細胞質のCu,Zn-SODは非常に高い値を示す^{3, 18, 19)}。これは、胎盤由来の黄体刺激物質によるもので、ヒトではhCGがCu,Zn-SODの発現を増加させる³⁾。実際、Cu,Zn-SODの活性を50%程度抑制しただけでも、活性酸素によるプロゲステロン分泌の低下がおこるため⁴⁾、Cu,Zn-SODの維持はプロゲステロン分泌にとって重要である。特に、hCGによりプロゲステロン産生が刺激されることにより、コレステロール代謝が亢進し、活性酸素の発生が増加するため^{16, 20)}、Cu,Zn-SODの維持は重要である。

(2) hCGによるアポトーシスの抑制

ヒト黄体では、妊娠が成立せずにhCGが出現しないと、まず先に述べた機序により機能的黄体退縮がおこるが、その後はアポトーシスにより黄体細胞は消失していく^{1, 21)}。このアポトーシスには、アポトーシス抑制蛋白であるBcl-2の低下とアポトーシス誘導蛋白であるBaxの増加が関与している。hCG

はこのBcl-2の増加とBaxの低下を誘導し、アポトーシスを抑制することによって黄体の寿命の延長に関与している¹⁾。

3. 黄体におけるMn-SODの役割

黄体のプロゲステロン分泌には、細胞質のCu,Zn-SODが関与していたが、それではミトコンドリアのMn-SODはどのような役割があるのか。月経周期に伴う黄体内のMn-SOD活性の変化をみると、Cu,Zn-SODとは異なり、黄体期中期の黄体や妊娠黄体に比べ黄体期後期や退縮期早期の黄体で高い値を示した^{3, 22)}。黄体期後期や退縮期早期の黄体では、マクロファージが多く出現し、サイトカイン・リッチな環境となっている。サイトカインは、活性酸素を介して細胞死を引き起こすことが知られている²³⁾。しかし、サイトカインに対し抵抗性を示す細胞では、サイトカイン刺激を受けるとMn-SODを増加させミトコンドリアにおける活性酸素による傷害を防ぐ機構をもっている^{23, 24)}。実際、黄体細胞もサイトカイン刺激でMn-SODが増加する²⁵⁾。したがって、黄体期後期や退縮期早期の黄体では、Mn-SOD発現が誘導されており、これはミトコンドリアを保護し細胞の生命維持のためと考えられる。細胞死に陥らずに、まず、黄体のプロゲステロン分泌を低下させるといふ仕事をしなければならない黄体細胞にとっては、合目的な現象であろう。

II. 子宮内膜機能の調節における活性酸素とSODの役割

ヒト子宮内膜は、卵胞から産生されるエストロゲンにより増殖し、排卵後には、黄体からのプロゲステロンにより分泌期へと変化し着床に備える。特に間質は脱落膜化という特徴的な変化を示す。着床すれば、黄体からのプロゲステロン分泌が維持され、間質の脱落膜化がさらに進み妊娠維持の方に動く。一方、妊娠が成立しなければ、血中のプロゲステロンとエストロゲンのレベルが低下することにより、血管収縮などが惹起され、子宮内膜は剥脱し月経となる。このような子宮内膜の変化に活性酸素とSODがどのように関与しているかを述べる。

1. 子宮内膜の脱落膜変化における SODの役割

ヒト子宮内膜におけるCu,Zn-SODとMn-SODの発現の変化を免疫組織学的に検討すると、腺上皮には、両者のSODが月経周期を通して一定した発現を示した²⁶⁾。一方、間質では特徴的な変化がみられ、分泌期中期以降の脱落膜変化をおこした間質細胞に両者のSODの発現が見られた²⁶⁾。また、妊娠初期の脱落膜細胞や、エストロゲンとプロゲステロンの合剤を服用した症例においても、脱落膜変化をおこした間質細胞に両者の強い発現がみられた²⁶⁾。そこで、増殖期の子宮内膜から分離した間質細胞をエストロゲンとプロゲステロン (E+P) で培養し、脱落膜化を誘導したところ、間質細胞の脱落膜化に一致して両者のSOD発現が増加することが明らかとなった²⁷⁾。尚、E+Pの効果は、主にプロゲステロンの作用によるもので、エストロゲン単独では作用がない。興味深いことに、E+PによるMn-SODの増加は、cAMPを介して調節されているが、Cu,Zn-SODの増加は、cAMPを介さない経路で調節されている²⁸⁾。このように脱落膜化に伴う両者のSODの増加は異なった機序によって調節されているので、違った役割をもつことが推察される。Mn-SODの増加の意義としては、一般に細胞機能の亢進に伴って、ミトコンドリアでは活性酸素の発生が増加するので、ミトコンドリアに存在するMn-SODは脱落膜化による細胞機能の亢進に伴ってミトコンドリアで発生してくる活性酸素を消去することにより、細胞の生命維持に貢献しているものと考えられる。Cu,Zn-SODの役割については、後述の子宮内膜剥離機構とまとめのところで触れる。

2. 子宮内膜剥離における活性酸素とSODの役割

子宮内膜の剥離には、蛋白質分解酵素やサイトカイン、PGF₂αなどの各種の生理活性物質の作用が関与している²⁹⁻³¹⁾。子宮内膜の剥離におけるPGF₂αの作用としては、血管の収縮作用が知られている。月経前の子宮内膜ではラセン動脈の収縮が認められており、これにより子宮内膜が破綻し剥離する。実際、ヒト子宮内膜組織中のPGF₂α濃度は分泌期後期である月経前に最も高値を示すが、妊娠初期の脱落膜では低値を示す³²⁾。月経前にみられるPGF₂αの増加は、血中のプロゲステロンとエストロゲンのレベルが低下すること（卵巣ステロイドホルモンの

消退）によるといわれているが、どのような細胞内の情報伝達系を介して起こるのかは不明である。本稿では、活性酸素とSODを介したPGF₂α産生調節機構について述べる。

(1) 子宮内膜間質細胞のSOD発現とPGF₂α産生に及ぼす卵巣ステロイドホルモン消退の影響

月経発来のシグナルとして知られている卵巣ステロイドホルモンの消退を培養実験で再現するため、子宮内膜間質細胞をいったんE+Pで12日間培養した後に、ステロイドホルモンを除き培養液のみでさらに11日間培養した。すると、いったんE+Pで増加したCu,Zn-SODは、卵巣ステロイドホルモンの消退により漸減していった³³⁾。この時、培養液中のPGF₂α濃度とPGF₂α合成の律速酵素であるcyclooxygenase-2 (COX-2) のmRNA発現は、Cu,Zn-SODの低下に一致して増加した³⁴⁾。そして、この卵巣ステロイドホルモン消退によるPGF₂α産生とCOX-2発現の増加は、抗酸化剤であるN-Acethyl-L-Cysteineの同時添加によって完全に阻止されたことから、活性酸素によることが明らかとなった³⁴⁾。さらに、子宮内膜間質細胞に活性酸素刺激を与えると、実際にPGF₂α産生が増加することが明らかとなっている³⁵⁾。尚、Mn-SODは卵巣ステロイドホルモンの消退により低下せず維持された。

(2) 活性酸素によるPGF₂α産生増加の細胞内情報伝達系

我々が明らかにしたヒト子宮内膜間質細胞での活性酸素とCu,Zn-SODによるPGF₂α産生調節機構を図2に示す。卵巣ステロイドホルモンが消退すると

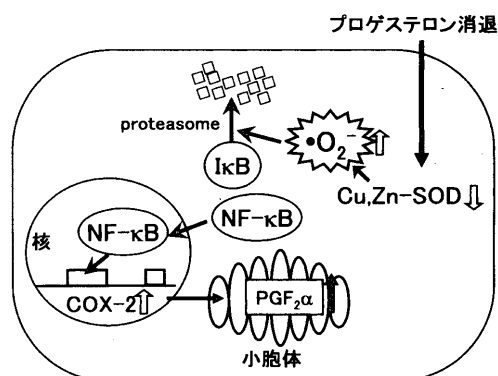


図2 ヒト子宮内膜間質細胞における活性酸素とCu,Zn-SODによるプロスタグランジンF₂α産生調節

細胞質内のCu,Zn-SODが低下する。これにより増加した活性酸素は、転写因子であるNF- κ Bを活性化させ、これが核内に移行しCOX-2のプロモーター領域のNF- κ B binding siteに結合しCOX-2発現を刺激する^{34, 36)}。これによってPGF2 α 産生が増加する。おそらく、活性酸素は、NF- κ Bを不活性化しているI κ Bの分解を促進することによると報告されている³⁷⁻³⁹⁾。近年、活性酸素が細胞機能を障害するだけでなく、このように生理活性物質として作用し、細胞機能の調節に関与していることが種々の細胞で明らかとなっている^{35, 40-42)}。

(3) ヒト子宮における活性酸素を介したPGF2 α 産生調節機構

上述したような脱落膜化間質細胞の培養実験で明らかとなったSODなどの一連の変化が、実際にヒトの子宮において、子宮収縮や子宮内膜剥脱に関係しているかに興味を持たれる。そこで、正常妊娠の脱落膜、流産症例で子宮出血や子宮収縮を伴う症例の脱落膜、流産しているけれども子宮出血や子宮収縮がない、いわゆる稽留流産の症例の脱落膜につき、組織中のCu,Zn-SOD活性、活性酸素量、COX-2 mRNA、PGF2 α 濃度を測定してみた⁴³⁾。子宮出血や子宮収縮を伴う流産症例では、正常妊娠や症状がない稽留流産症例に比し、脱落膜組織中のCu,Zn-SOD活性は有意に低く、逆に、活性酸素量、COX-2 mRNA、PGF2 α 濃度は有意に高値を示した。すなわち、ヒトの子宮において、脱落膜化間質細胞による活性酸素を介した子宮収縮や子宮内膜剥脱に対する調節機構が存在することが示唆された。

3. 子宮内膜におけるMn-SODの防御的役割

着床から妊娠成立に向けての子宮内膜では、間質細胞が脱落膜化するが、この脱落膜化により増加するMn-SODの役割はすでに述べた。また、この時期の子宮内膜では、間質細胞が自らサイトカインを分泌するようになるほか、マクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞が多く集まってきており、サイトカイン・リッチな環境になっている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。上述したように、サイトカインは、ミトコンドリアにおいて活性酸素を産生させ細胞死を引き起こすが、Mn-SODが誘導されれば、ミトコンドリア内の活性酸素は消去される。そこで、着床から妊娠に向けて子

宮内膜で増加するサイトカインであるTNF α に注目し、子宮内膜間質細胞がTNF α にさらされた場合どのように反応するかを調べた。間質細胞をTNF α で培養すると、Mn-SOD活性は増加し、この作用には、NF- κ Bが介していることがわかった^{23, 47)}。一般的にTNF α にはcaspaseを介してアポトーシスへ誘導する経路と^{48, 49)}、転写因子であるNF- κ Bを介して細胞生き残りへ誘導する経路が知られているので^{50, 51)}、TNF α によるMn-SOD増加作用は細胞生き残りに働く防御機構であると考えられる。実際、TNF α で培養した時、TNF α 単独では生細胞数に変化はないが、NF- κ Bの阻害剤を添加してMn-SODの増加をブロックしてしまうと生細胞は著しく減少した²³⁾。しかし、活性酸素消去剤を同時添加すると生細胞数の減少は阻止された²³⁾。すなわち、TNF α にさらされた時Mn-SODが増加しないとTNF α によって産生された活性酸素は消去されず、細胞は死ぬことになる。従って、子宮内膜間質細胞はTNF α などのサイトカインにさらされた場合は、Mn-SODを誘導し、ミトコンドリアにおいて活性酸素を消去することによって細胞の生命を維持するという防御機構を有していると考えられる。

III. まとめ (図3と図4)

妊娠が成立すれば、絨毛からのhCGの出現により、黄体のCu,Zn-SODの増加がおりプロゲステロン分泌の維持に働くと共にアポトーシスを抑制し、黄体の機能や寿命の速やかな延長がもたらされる。このように維持された黄体からのプロゲステロンにより、子宮内膜では脱落膜化がおこるが、同時にCu,Zn-SODやMn-SODが増加する。Cu,Zn-SODは細胞質内の活性酸素の蓄積を阻止し、PGF2 α 産生を阻止するので子宮の安静が保たれ妊娠成立にとっては好都合な子宮内膜環境となるし、Mn-SODは脱落膜化による機能亢進によりミトコンドリアで発生する活性酸素を消去し生命維持に働く。また、妊娠成立後、脱落膜化が進み、サイトカイン・リッチな環境となっても、子宮内膜間質細胞は、Mn-SODを誘導し活性酸素(サイトカインによってミトコンドリアで産生される)を消去するという防御機能を備えている。一方、妊娠が成立しない時は、hCGが出現しないため、黄体のCu,Zn-SODが低下することや卵

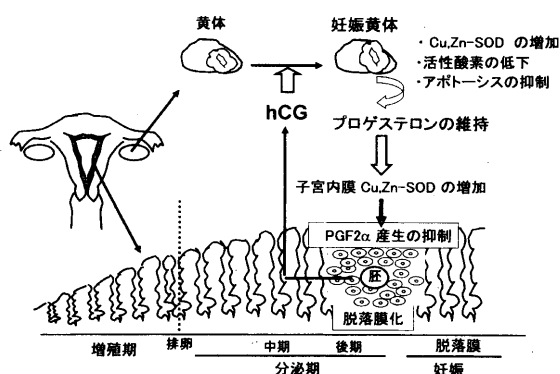


図3 妊娠周期における黄体と子宮内膜の変化

巣血流量の減少により、活性酸素が増加し黄体細胞のプロゲステロン分泌を抑制する。プロゲステロンの低下に伴いマクロファージからの活性酸素も増加する。このような機序によって産生された活性酸素が、できるだけ速やかにプロゲステロン分泌を低下させている。黄体期後期や退縮期早期の黄体では、Mn-SOD発現が維持または誘導されている。これはミトコンドリアを保護し細胞の生命維持のためと考えられる。サイトカイン・リッチな環境にあって細胞死に陥らずに、黄体のプロゲステロン分泌を低下させるという仕事をしなければならない黄体細胞にとっては、合目的な現象であろう。そして、プロゲステロンが消退すると、子宮内膜では、間質細胞において、細胞内のCu,Zn-SODが低下し、細胞質内で活性酸素が増加することにより、PGF2 α 産生が刺激される。間質細胞から分泌されたPGF2 α はそれに接したラセン動脈を収縮させ、末梢の子宮内膜の虚血と剥脱を引き起こすと同時に、子宮筋にも作用し子宮収縮を誘発する。子宮内膜間質細胞ではプロゲステロンが消退しても、Mn-SODは低下せず維持される。PGF2 α 産生という仕事をしなければならない細胞にとっては、やはり合目的な現象であろう。

活性酸素は、細胞死を引き起こすほか、生理活性物質として細胞機能を調節することもできるのであるが、どの程度の量で、また細胞内のどの場所で発生するなら毒性を示すのかという問題については、今後さらなる検討が必要などころであろう。少なくとも、サイトカインなどの刺激によってミトコンドリアで発生する活性酸素は大量であり細胞死を引き起こす。この意味でMn-SODは防御的な働きがメインである。一方、細胞質で発生する活性酸素は、生理的な範囲内のCu,Zn-SODの変化により発生してく

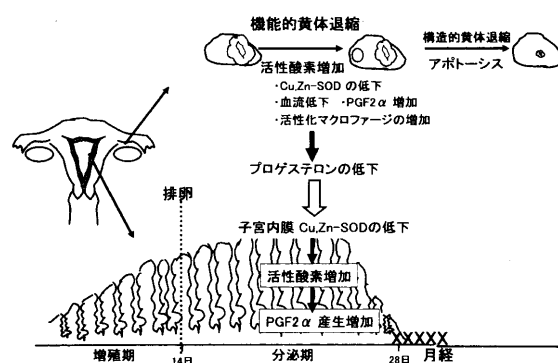


図4 月経周期における黄体と子宮内膜の変化

る様な、恐らく大量でない活性酸素であるため、細胞を死に至らしめず、細胞の機能を調節するように働くものと考えられる⁵²⁾。

いったん妊娠が成立した時は、妊娠を維持するために、黄体の機能を速やかに延長すると共に、脱落膜化などの子宮の変化を誘導する。逆に、妊娠が成立しなければ、早く黄体の機能を終わらせ、子宮内膜の剥脱を誘導して次の周期の排卵や着床に備える。このような巧妙な現象、言い換えれば生殖戦略が子宮と卵巣において、活性酸素とその消去酵素であるSODを介して行われているのである。

おわりに

今回の研究は、黄体と子宮内膜の機能調節を活性酸素という面から解明しようとしたものである。これまで有害なものとして認識されてきた活性酸素が生殖現象においてそれなりの役割を持つことがわかった。恐らくこれは、複雑な生殖現象のほんの一部であろうが、生殖現象の神秘性を垣間見るものかもしれない。

文 献

- 1) Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H. Expression of bcl-2 and bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85 : 4379-4386.
- 2) Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa

- H, Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 2004 ; **70** : 313-318.
- 3) Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y, Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000 ; **6** : 19-25.
- 4) Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Suppression of intracellular superoxide dismutase activity by antisense oligonucleotides causes inhibition of progesterone production by rat luteal cells. *Biol Reprod* 1999 ; **61** : 1133-1138.
- 5) 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.
- 6) Endo T, Aten RF, Leykin L, Behrman HR. Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 ; **76** : 337-342.
- 7) 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.
- 8) Sugino N, Shimamura K, Tamura H, Ono M, Nakamura Y, Ogino K, Kato H. Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 1996 ; **137** : 749-754.
- 9) Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Date F, Nagura H. Leukocytes in normal-cycling human ovaries : immunohistochemical distribution and characterization. *Hum Reprod* 1998 ; **13** : 2186-2191.
- 10) Pepperell J, Wolcott K, Behrman HR. Effects of neutrophils in rat luteal cells. *Endocrinology* 1992 ; **130** : 1001-1008.
- 11) Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube A, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; **85** : 3919-3924.
- 12) Kashida S, Sugino N, Takiguchi S, Karube A, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol Reprod* 2000 ; **64** : 317-323.
- 13) Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube-Harada A, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the rat corpus luteum : regulation by oestradiol during mid-pregnancy. *Reproduction* 2001 ; **122** : 875-881.
- 14) Pang CY, Behrman HR. Relationship of luteal blood flow and corpus luteal function in pseudopregnant rats. *Am J Physiol* 1979 ; **237** : E30-E34.
- 15) 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.
- 16) Sawada M, Carlson JC. Studies on the mechanism controlling generation of superoxide radical in luteinized rat ovaries during regression. *Endocrinology* 1994 ; **135** : 1645-1650.
- 17) 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.
- 18) Sugino N, Takamori-Hirosawa M, Zhong L, Telleria CM, Shiota K, Gibori G. Hormonal regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide

- dismutase mRNA in the rat corpus luteum : induction by prolactin and placental lactogens. *Biol Reprod* 1998 ; **59** : 599-605.
- 19) Takiguchi S, Sugino N, Kashida S, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Rescue of the corpus luteum and an increase in luteal superoxide dismutase expression induced by placental luteotropins in the rat: action of testosterone without conversion to estrogen. *Biol Reprod* 2000 ; **62** : 398-403.
- 20) Carlson JC, Sawada M, Boone DL, Stauffer JM. Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by antioxidants. *Steroids* 1995 ; **60** : 272-276.
- 21) Sugino N, Takiguchi S, Ono M, Tamura H, Shimamura K, Nakamura Y, Tsuruta R, Sadamitsu D, Ueda T, Maekawa T, Kato H. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum Reprod* 1996 ; **11** : 2484-2487.
- 22) Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, Sasano H. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries : immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 1999 ; **72** : 720-726.
- 23) Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H. Nuclear factor- κ B is required for tumor necrosis factor- α induced manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ; **87** : 3845-3850.
- 24) Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 1989 ; **58** : 923-931.
- 25) Sugino N, Telleria CM, Gibori G. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in the rat corpus luteum : Induction of manganese superoxide dismutase mRNA by inflammatory cytokines. *Biol Reprod* 1998 ; **59** : 208-215.
- 26) Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Tamura H, Ono M, Nakata M, Nakamura Y, Ogino K, Uda T, Kato H. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum Reprod* 1996 ; **11** : 1073-1078.
- 27) Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Nakamura Y, Kato H. Induction of superoxide dismutase by decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2000 ; **6** : 178-184.
- 28) Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H. Different mechanisms for the induction of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 2002 ; **17** : 1709-1714.
- 29) Baird DT, Cameron ST, Critchley HOD, Drudy TA, Howe A, Jones RL, Lea RG, Kelly RW. Prostaglandins and menstruation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996 ; **70** : 15-17.
- 30) Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodeling. *Mol Hum Reprod* 1996 ; **2** : 77-92.
- 31) Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; **93** : 9120-9125.
- 32) Ishihara O, Tsutsumi O, Mizuno M. Metabolism of arachidonic acid and synthesis of prostanoids in human endometrium and decidua. *Prostaglandins Leukotriens Med* 1986 ; **24** : 93-102.
- 33) Sugino N, Karube-Harada A, Kashida S,

- Takiguchi S, Kato H. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002 ; **8** : 68-74.
- 34) Sugino N, Karube-Harada A, Taketani T, Sakata A, Nakamura Y. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2 α production through nuclear factor- κ B activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells : potential relevance to menstruation. *J Reprod Dev* 2004 ; in press.
- 35) Sugino N, Karube-Harada A, Kashida S, Takiguchi S, Kato H. Reactive oxygen species stimulate prostaglandin F2 α production in human endometrial stromal cells in vitro. *Hum Reprod* 2001 ; **16** : 1797-1801.
- 36) Newton R, Kuitert LME, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 α . *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; **237** : 28-32.
- 37) Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells : AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993 ; **12** : 2005-2015.
- 38) Schieven GL, Kirihaara JM, Myers DE, Ledbetter JA, Uckun FM. Reactive oxygen intermediates activate NF- κ B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56lck and p59fyn tyrosine kinase in human lymphocytes. *Blood* 1993 ; **82** : 1212-1220.
- 39) Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991 ; **10** : 2247-2258.
- 40) Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 1999 ; **13** : 1137-1143.
- 41) Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 2000 ; **14** : 1889-1900.
- 42) Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP, Weiner CP. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000 ; **182** : 458-464.
- 43) Sugino N, Nakata M, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H. Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin F2 α in the decidua of failed pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000 ; **6** : 642-647.
- 44) Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Tabibzadeh S. Tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid and protein in human endometrium. *Biol Reprod* 1992 ; **47** : 141-147.
- 45) Wolff MV, Classen-Linke I, Heid D, Krusche CA, Beier-Hellwing K, Karl C, Beier HM. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion : an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 1999 ; **5** : 146-152.
- 46) Critchley HOD, Jones RL, Lea RG. Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 ; **84** : 240-248.
- 47) Karube-Harada A, Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor-alpha in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2001 ; **7** : 1065-1072.
- 48) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997 ; **88** : 355-365.

- 49) Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) ; a family of adapter proteins that regulates life and death. *Gene Dev* 1998 ; **12** : 2821-2830.
- 50) Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996 ; **274** : 782-784.
- 51) Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 1996 ; **274** : 787-789.
- 52) Sawada M, Carlson JC. Intracellular regulation of progesterone secretion by the superoxide radical in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 1996 ; **137** : 1580-1584.

Role of Superoxide Radical and Its Scavenger in Reproduction

Norihiro SUGINO

*Dept of Obstetrics and Gynecology. and. Reproductive,
Pediatric and Infectious Science, Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505 Japan*

SUMMARY

For successful pregnancy, progesterone production by the corpus luteum and decidualization of the endometrium are necessary. In contrast, regression of the corpus luteum and endometrial shedding should be induced promptly for the next conception when pregnancy does not occur. Superoxide radical and its scavenger, superoxide dismutase (SOD), play important roles in the regulation of cellular function. The present review focuses on the roles of superoxide radicals and SOD in the regulation of corpus luteum function and endometrial function.