

周産期心筋症(産褥心筋症)

国立循環器病研究センター周産期・婦人科 *部長

神谷千津子 (かみやちづこ) *池田 智明 (いけだともあき)

【要旨】

周産期心筋症とは、心疾患既往のない女性が妊娠・産褥期に心機能低下を来し、急性心不全を発症する特異な心筋症である。日本では年来、産褥心筋症と呼ばれてきたが、妊娠期に発症する例もあり、peripartum cardiomyopathyを直訳して周産期心筋症とも呼ばれるようになってきた。日常診療の場で遭遇する頻度は高くないが、治療が遅れると致死的でもあるため、妊産婦の呼吸困難や急激な体重増加、浮腫などの訴えに対して、鑑別診断の一つとして挙げなくてはならない疾患である。

1. 診断基準

診断基準としては、1971年にDemakisら¹⁾が提唱した、「①分娩前1カ月から分娩後5カ月以内に新たに心不全の症状が出現、②心疾患の既往がない、③ほかに心不全の原因となるものがない」

を基に、心エコー上の左室収縮能低下の所見を加えて、「④左室駆出率(LVEF)45～55%未満、左室内径短縮率30%未満」などが広く用いられている。

もともと、分娩前1カ月よりも以前に心不全を発症した症例では、自覚症状のなかった拡張型心筋症

患者に妊娠による循環負荷、またはホルモン負荷により心不全症状が現れてきたということ否定しえないため、①項が設定されていた。

しかし、2005年にElkayamら²⁾は、妊娠・産褥期に心筋症を発症した123症例のうち約5分の1(23症例)が診断基準に含まれていない分娩前1カ月よりも前の発症であり、その患者背景、発症時の臨床所見、予後などは、従来の診断基準に合致する周産期心筋症症例とほぼ同等であったと報告した。この結果を基に、分娩前1カ月以前の発症の患者も含むよ

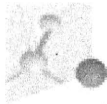
◆キーワード

周産期心筋症
産褥心筋症
心不全
妊娠

2. 発症頻度

う、①項を「妊娠中から分娩後5カ月以内」と変更する動きもある。

1990～2002年の米国全土の人口ベース発症率調査においては、3189出産に1例の確率で周産期心筋症の発症を認めた³⁾。興味深いことに、1990～93年が4350出産に1例の確率であったのが、2000～02年では、2229出産に1例と、年々発症率が増加してきている。その要因について筆者らは、妊婦の高齢化と多胎妊娠の増加傾向に加えて、医療従事者における疾患認識が向



学 術

上し、診断数も増加したためと推測している。

従来、ハイチや南アフリカなど、中南米・アフリカの一部の国においては周産期心筋症を高頻度に認め、黒人に多い傾向があると報告されてきた。実際に、南カリフォルニアでの周産期心筋症発症率を人種別にまとめた報告⁴⁾によると、黒人、アジア人、白人、ヒスパニックの順であり、それぞれ1421例、4075例、2675例、9861例に1例の発症率であった。日本においては2009年に全国調査を行い、出産約2万例に1例の発症率であることが判明した(後述)。欧米の発症率に比し、かなり低値である。その原因として、人種や生活習慣(妊娠年齢期の女性の肥満・高血圧が少ないなど)の差異だけでなく、疾患概念が普及しておらず、未診断症例がある可能性も考慮される。

3. 病因

周産期心筋症の病因については様々な説があり、未だ原因不明で

ある。

診断基準の項で述べたように、病態が拡張型心筋症によく類似していることから、もともと拡張型心筋症が潜在しており、それが妊娠・出産の心負荷により顕在化したという説や、心筋炎であるという説もある。しかしながら、周産期心筋症は拡張型心筋症や心筋炎の発症率よりもかなり高率で妊娠婦に発症する。このため、米国立衛生研究所のワークショップグループにおいても、妊娠自体が発症に関与している別な病態と結論づけられている⁵⁾。

以下、病因についてのいくつかの説を取り上げて解説する。

(1) ウイルス感染説

妊娠中は免疫反応が低下しており、未感染のウイルスに感染した際に心筋炎を起こしやすい、もしくは既感染のウイルスによる炎症再燃が起こりやすい状態と考えられる。実際に、周産期心筋症患者の心筋生検標本の病理診断から心筋炎が疑われる確率は、8〜78%と報告されている。報告ごとに確率が大きく異なっているのは、心

不全発症から心筋生検施行までの期間の長さの違いや、病理診断でボーダーライン心筋炎と診断された症例も含めるかどうかの違いによるとされる。

2005年、Bullmannら⁶⁾は、心筋生検で得られた組織にてウイルスのゲノム解析を施行し、周産期心筋症患者の約30%に間質の炎症所見(CD3陽性Tリンパ球やCD68陽性マクロファージの間質浸潤)とPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法にてウイルス遺伝子を認めた。一方、対照群として拡張型心筋症など、その他の心筋症患者においても同様の検査を実施し、同じく約30%にPCR法にてウイルス遺伝子を認めたが、間質の炎症所見は認めなかった。また、周産期心筋症患者におけるウイルス陽性例と陰性例との間に、心機能も含めた母体予後の差はなかったと報告した。

(2) 異常免疫反応説

これまでに、妊娠中、胎児由来の造血細胞のキメラが母体血液中に出現することが知られている。このような胎児由来の細胞が心筋

内に生着し、免疫反応が低下している妊娠中には炎症を起こさなかったものが、出産後免疫反応が回復するとともに抗原と認識され、局所的な炎症を引き起こす可能性が考えられている⁷⁾。

特発性拡張型心筋症患者と周産期心筋症患者において、血清中心筋蛋白に対する自己抗体量を測定したところ、後者で有意に抗体量が多かったとの報告⁵⁾がある。

(3) 妊娠に伴う循環負荷への

反応説

妊娠中、循環血液量や心拍出量は増大し、血管抵抗は減少する。このような循環生理の変化に伴い、正常心においても妊娠後期から産褥にかけて一過性に心収縮力が低下することが報告⁸⁾されている。このような変化が過剰に発現した結果、周産期心筋症を発症するという仮説もあるが、これを証拠づける報告は未だない。

(4) 内分泌異常説

2007年にHilker-Kleinerら⁹⁾は、異型プロラクチンが心筋を障害し、心筋症を発症させているという研究結果を報告した。彼

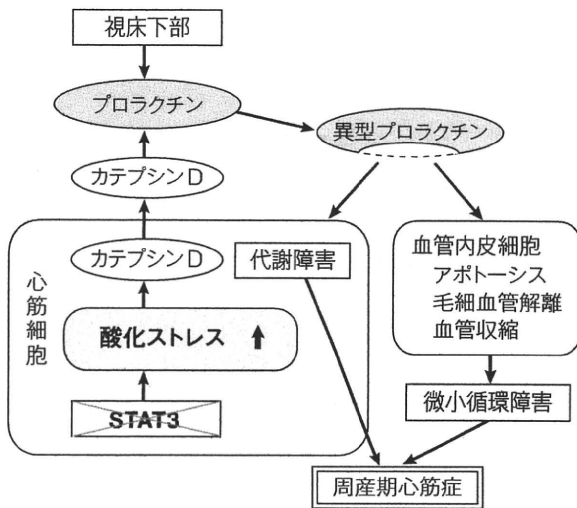


図1 異型プロラクチンによる周産期心筋症発症のメカニズム

STAT3 (心筋で酸化ストレスを抑制し、血管新生に関与している蛋白)を抑制することにより、心筋内で酸化ストレスが増加し、カテプシンDという酵素が増産される。このカテプシンDにより、血中のプロラクチンが異型プロラクチンに変化し、血管内皮細胞のアポトーシスや毛細血管解離、心筋内の代謝障害を引き起こし、心筋症が発症する。

(文献⁹⁾より改変引用)

らは周産期心筋症モデルマウス (心筋のSTAT3蛋白ノックアウトマウス)において、心筋内酸化ストレスが上昇し、カテプシンDという酵素が産生され、これが血中のプロラクチンを異型プロラクチンに切断し、この異型プロラクチンが心筋細胞の代謝障害や血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こしていることを同定した(図1)。

また、このマウスに抗プロラクチン薬であるプロモクリプチン(心筋症を発生しない)を投与すると心筋症を発生しないことが、実際の周産期心筋症患者の血清中にも異型プロラクチンが出現していることも併せて報告した。その後、プロモクリプチン(抗プロラクチン)療法が有効であると報告が複数あり^{10) 12)}、症例数を増やした検討が待たれている。

以上、病因については諸説紛々であり、今後のさらなる研究が望まれるところである。

4. 危険因子

前述のように、疾病原因は未だ特定されていないが、数々の危険因子については報告されてきている。

まず、診断基準を提唱したDipertらの¹⁾は、多産、高齢、多胎、妊娠高血圧症候群、黒人を危険因子として挙げている。ほかに、子宮収縮抑制薬の使用や慢性高血圧合併、喫煙、肥満なども、患者群で有意に多いことが指摘されている¹³⁾。

日本においては、2009年の全国調査で、高齢、慢性高血圧や妊娠高血圧症候群の合併、子宮収縮抑制薬の使用や多胎が危険因子であることが判明した。

5. 予後

当初Demakisら¹⁴⁾は、半数は心機能が正常に回復し、半数は心機能低下が残存すると報告した。後者の一部が重症化し、死亡もしくは心移植を受けることとなる。その後、様々な国や施設で検討されたが、左室機能が改善する率が7

50%、死亡率が4~80%と、報告ごとに大きく異なっており、人種や医療水準の違いが影響していると考えられる。

最近の欧米からの報告では、死亡率が3~6%である。依然、重症例は致死的であると考え、慎重に治療に当たることが必要であろう。

また、2006年のAHOsらの報告¹³⁾によると、発症後平均約4年間の追跡期間で、約6割が心機能改善し、残りの4割が心機能低下、最重症の1割が心機能増悪して心移植が必要であった。心移植により、死亡例は1例も認めなかったという。彼らは、左心補助装置や心移植により死亡例がなかったこと、適切な内科治療(対象患者の9割がACE阻害薬、6割がβ遮断薬を内服)により心機能改善例がこれまでの報告よりも多かったことを挙げて、周産期心筋症の予後が改善してきていると結論づけている。

これまでに、予後予測因子として、初診時もしくは発症2カ月後のLVEF、左室拡張末期径(LVEDD)、左室内血栓の有無、人



表1 周産期心筋症患者の再妊娠・出産時における母体合併症の発生率

	心不全症状の出現	周産期における20%以上のLVEF低下	再妊娠前と比較し、最終経過観察時のLVEF低下	死亡
Group 1 (23人)	6人 (26%)	4人 (17%)	2人 (9%)	0人
Group 2 (12人)	6人 (50%)	4人 (33%)	5人 (42%)	3人 (25%)

LVEF：左室駆出率

Group 1 = 心筋症発症後の心機能改善群：LVEF ≥ 50%

Group 2 = 心筋症発症後の心機能低下群：LVEF < 50%

(文献¹⁶⁾より改変引用)

種などが挙げられている¹³⁾。

6. 治療法

周産期心筋症の治療については、一般的な心不全に対する治療が広く行われている。

重症例では、急性期にカテコラミンに加え、大動脈内バルーンポンピング (IABP) や経皮的心肺補助装置 (PCPS) を使用する。慢性期には、ACE阻害薬やβ遮断薬、利尿薬などの内服治療を行うが、治療抵抗性の症例では、心臓移植や死に至ることもある。また心不全に対する対症療法以外にも、心筋炎を疑う症例での免疫抑制薬の使用や、前述の抗プロラクチン療法などの報告もある。

慢性期の心機能回復例における内服治療の中止については、明確な基準はない。ACE阻害薬とβ遮断薬を併用し、心機能が回復した周産期心筋症患者において、どちらか一方を中止した6人と両薬を中止した5人の全員が、平均2・5年の経過観察中、心機能は保たれたままであったとの報告¹⁴⁾がある一方、心機能回復例でも心室細動などが原因で突然死するこ

7. 再妊娠による再発率

妊娠・分娩が周産期心筋症の発

症・進行に関与していると考えられるため、周産期心筋症既往者の再妊娠については、高いリスクが伴う。

次子を分娩した周産期心筋症既往患者35人を、心筋症発症後の心機能改善群 (Group 1: LVEF 50%以上) 23人と心機能低下群 (Group 2: LVEF 50%未満) 12人に分けて解析した結果、心不全発症例がGroup 1で6人 (26%)、Group 2で6人 (50%)であった。Group 1で死亡例はなかった一方、Group 2では3人 (25%) が死亡した (2人が突然死、1人が心不全死 (表1))。

一方、児の予後については、Group 1で3人 (13%)、Group 2で6人 (50%) が早産に至ったが、新生児死亡例はなかった¹⁶⁾。

これらの結果を踏まえ、周産期心筋症発症後、慢性期にも心機能低下が持続している症例においては、再妊娠は回避すべきであると考えられる。しかしながら、心機能改善症例においてどう対応するかは、まだ一定した見解のないところである。

8. 日本における周産期心筋症の実態

筆者らは、厚生労働省科学研究の一環として、2009年に全国2486の産科、循環器科、救急専門医認定施設を対象に、2007年からの2年間に周産期心筋症と診断され、治療を受けた患者を対象としたアンケート調査を実施した。

前述のように日本における発症率は約2万出産に1例であった。ただし、母体年齢とともに発症率は増加し、20〜24歳では5万出産に1例であったが、35〜39歳では1万出産に1例であった。

また、子宮収縮抑制薬の使用 (14%)、多胎妊娠 (15%)、慢性高血圧や妊娠高血圧症候群の合併 (42%) などが危険因子として挙げられた。従来、多産婦に多いとされてきたが、少子高齢化の反映か、日本においては初産婦が過半数を占めていた。

発症時期としては、分娩直後から産褥1週間以内が最も多く、妊娠中発症が約3割、分娩後産褥発

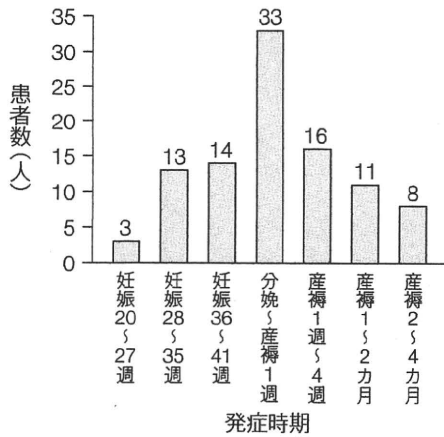


図2 日本における周産期心筋症の発症時期

表2 周産期心筋症の臨床像についての国際比較

	日本 2009年 n=102	米国 2005年 n=100	南アフリカ 2005年 n=100	ハイチ 2005年 n=98
平均年齢 (歳)	32.7	30.7	31.6	31.8
平均妊娠回数 (回)	1.7	2.6	3	4.3
初産婦 (%)	55	37	20	24
アフリカ系人種 (%)	0	19	100	98
高血圧・妊娠高血圧 症候群の合併 (%)	42	43	2	4
子宮収縮抑制薬の 使用 (%)	14	19	9	0
多胎妊娠 (%)	15	13	6	6
死亡率 (%)	4	9	15	15

(文献¹⁷⁾より改変引用)

症が約7割であり(図2)、初診時の三大症状は、息切れ、咳、浮腫であった。

75%の患者において、産婦人科医もしくは一般内科医が初診医であった。初診時の血清BNP(脳性ナトリウム利尿ペプチド)値は96%の患者で100pg/mlを超えており、簡便な診断検査として有用であると判明した。

予後については、母体死亡例が4%、左心補助人工心臓を装着し、移植待機となった重症心不全例が2%であった。退院症例においては、平均約10カ月の観察期間の後、

心機能が回復した患者が約6割、回復しなかった患者が約4割であった。

これらの臨床像についての国際比較を表2に挙げる。日本の臨床像は米国と相似しており、先進国における周産期心筋症像が一致することが初めて示された¹⁷⁾。

アンケート調査結果の詳細につ

いては、国立循環器病研究センターホームページに掲載している¹⁸⁾。今後の診療のご参考にしていただければ幸いです。

□□□文 献 □□□

1) Demakis JG, et al : Circulation 44 : 964, 1971. 2) Elkayam U, et al : Circulation 111 : 2050, 2005. 3) Mialniczuk LM, et al : Am J Cardiol 97 :

1765, 2006. 4) Brar SS, et al : Am J Cardiol 100 : 302, 2007. 5) Pearson GD, et al : JAMA 283 : 1183, 2000. 6) Bultmann BD, et al : Am J Obstet Gynecol 193 : 363, 2005. 7) Ansari AA, et al : Clin Immunol Immunopathol 68 : 208, 1993. 8) Geva T, et al : Am Heart J 133 : 53, 1997. 9) Hilfiker-Kleiner D, et al : Cell 128 : 589, 2007. 10) Hilfiker-Kleiner D, et al : J Am Coll Cardiol 50 : 2354, 2007. 11) Meyer GP, et al : J Med Case Reports 4 : 80, 2010. 12) Siwa K, et al : Circulation 121 : 1465, 2010. 13) Amos AM, et al : Am Heart J 152 : 509, 2006. 14) Demakis JG, et al : Circulation 44 : 1053, 1971. 15) Siwa K, et al : Int J Cardiol In press, 2010. 16) Elkayam U, et al : N Engl J Med 344 : 1567, 2001. 17) Siwa K, et al : Lancet 368 : 687, 2006. 18) 国立循環器病研究センターホームページ「循環器病情報サービス」医療従事者向け < http://www.ncvc.go.jp/cvinfo/pro/peripartum_cardiomyopathy.html > 一般向け < http://www.ncvc.go.jp/cvinfo/disease/peripartum_cardiomyopathy.html >

周産期心筋症(産褥期心筋症)

Peripartum cardiomyopathy

神谷千津子
KAMIYA Chizuko

瀧原 圭子*
TAKIHARA Keiko

心筋症・心筋炎—基礎と臨床の最前線2010

Key words 周産期心筋症 産褥期(性)心筋症 心不全 プロラクチン

診断基準

1971年に Demakis らが提唱した、「①分娩前1ヵ月から分娩後5ヵ月以内に新たに心不全の症状が出現, ②心疾患の既往がない, ③他に心不全の原因となるものがない¹⁾」をもとに, 心エコー上の左室収縮能低下や拡大所見を加えて, 「④左室駆出率(LVEF) <45~55%, 左室短縮率<30%, 左室拡張末期径/体表面積 $\geq 2.7\text{cm}^2/\text{m}^2$ 」などが, 診断基準として広く用いられている。

もともと, 分娩前1ヵ月よりも以前に心不全を発症した症例では, その原疾患が妊娠による循環負荷やホルモン負荷により心不全症状が出てきた潜在性特発性拡張型心筋症であるということを否定し得ないため, ①項が設定されていた。しかしながら, 2005年に Elkayam らが, 妊娠・産褥期に心筋症を発症した123症例のうち23症例が, 診断基準に含まれていない妊娠16~36週の発症であり, その患者背景, 発症時の臨床所見, 予後などは, 従来の診断基準に合致する周産期心筋症症例とほぼ同等であったと報告した²⁾。この結果をもとに, 分娩1ヵ月前以前の発症の患者も含むよう, ①項を妊娠中もしくは妊娠6ヵ月以降から分娩後

5ヵ月以内と変更する動きもある。

このように診断基準もまだ未確立ではあるが, 周産期心筋症に特化した検査所見はなく, あくまで除外診断であることを念頭に置き, 他の二次性心筋症や心筋梗塞, 心筋炎など, 鑑別疾患をきちんと除外して診断にあたることが重要である。

発症頻度

1990~2002年のアメリカ全土の人口ベース発症率調査においては, 周産期心筋症の発症は3,189出産に1例の確率であった³⁾。興味深いことに, 1990~1993年が4,350出産に1例の確率であったのが, 2000~2002年では, 2,229出産に1例と, 年々発症率は増加してきている。その要因について, 妊婦の高齢化と生殖医療の進歩による多胎妊娠の増加傾向に加えて, 医療従事者における疾患認識が向上し診断数も増加したため, と報告者らは考察している。

従来, ハイチや南アフリカなど, 中南米・アフリカの一部の国においては, 周産期心筋症を高頻度に認め, 黒人に多いと報告されてきた。実際に, 南カリフォルニアでの周産期心筋症発症率を人種別にまとめた報告によると, 黒人>アジア人>白人>ヒスパニックの順であり, それぞれ1/1,421出産, 1/2,675出産, 1/4,075出産, 1/9,861出産

国立循環器病研究センター周産期・婦人科 *大阪大学保健センター・大阪大学大学院医学研究科循環器内科学 教授

の発症率であった⁴⁾。このような人種による発症率の違いの原因は分かっておらず、その発症機序に遺伝的素因があるとも推測されている。

わが国においては、2009年に厚生労働省科学研究の一環として全国調査が行われ、約2万出産に1例の発症率であることが判明した。欧米の発症率に比し、かなり低値であるが、その原因として、人種や生活習慣(妊娠年齢期の女性の肥満・高血圧が少ないなど)の差異だけでなく、疾患概念が普及しておらず、未診断症例がある可能性も考慮される。

病 因

周産期心筋症の病因についてはさまざまな説があるが、まだ原因は不明である。病態が拡張型心筋症に類似していることから、診断基準の項で述べたように、もともと特発性拡張型心筋症が潜在しており、それが妊娠・出産に伴う心負荷により顕在化したという説や、心筋炎であるという説もある。しかしながら、同年代女性における特発性拡張型心筋症や心筋炎の発症率よりもかなり高率に妊産褥婦に発症することから、アメリカ NIH のワークショップ・グループにおいても、妊娠自体が発症に関与している別な病態と結論付けられている⁵⁾。

以下、病因についてのいくつかの説を取り上げて解説する。

1. ウイルス感染説

妊娠中は免疫反応が低下しており、未感染のウイルスに感染した際に心筋炎を起こしやすい、もしくは既感染のウイルスによる炎症再燃が起こりやすい状態と考えられる。実際に、周産期心筋症患者の心筋生検標本の病理診断から心筋炎が疑われる確率は、8~78%と報告されている。報告ごとに数値が大きく異なっているのは、心不全発症から心筋生検施行までの期間の長さの違いや、病理診断でボーダーライン心筋炎と診断された症例

も含めるかどうかの違いによるとされる。2005年 Bultmann らは、心筋生検で得られた組織にてウイルスのゲノム解析を施行し、周産期心筋症患者の約30%に間質の炎症所見(CD3+Tリンパ球やCD68+マクロファージの間質浸潤)とPCR法にてウイルス遺伝子を認めた。一方、対照群として拡張型心筋症などそのほかの心筋症患者においても同様の検査を実施し、同じく約30%にPCR法にてウイルス遺伝子を認めたが、間質の炎症所見は認めなかった。周産期心筋症患者におけるウイルス陽性例と陰性例との間に心機能も含めた母体予後の差はなかったと報告した⁶⁾。

2. 異常免疫反応説

これまでに、胎児由来の造血細胞のキメラが妊娠中の母体血液中に出現することが知られている。このような胎児由来の細胞が心筋内に生着し、免疫反応が低下している妊娠中には炎症を起こさなかったものが、出産後免疫反応が回復するとともに抗原と認識され、局所的な炎症を引き起こす可能性が考えられている⁷⁾。また、血清中の心筋蛋白に対する自己抗体量が特発性心筋症患者よりも周産期心筋症患者において高値であり、自己免疫異常が発症に関与しているという説や、周産期心筋症患者の血中TNF- α やCRPが有意に増加し、その値が初診時心機能と相関しているため、異常な炎症メカニズムが発症に関与しているのでは、との説もある。

3. 妊娠に伴う循環負荷への反応説

一般に、妊娠中には循環血液量や心拍出量は増大し血管抵抗は減少する。このような循環生理の変化に伴い、正常心においても妊娠後期から産褥にかけて一過性に心収縮力が低下することが報告されている⁸⁾。このような変化が過剰に発現した結果、周産期心筋症を発症するという仮説もあるが、これを証拠付ける報告はまだない。

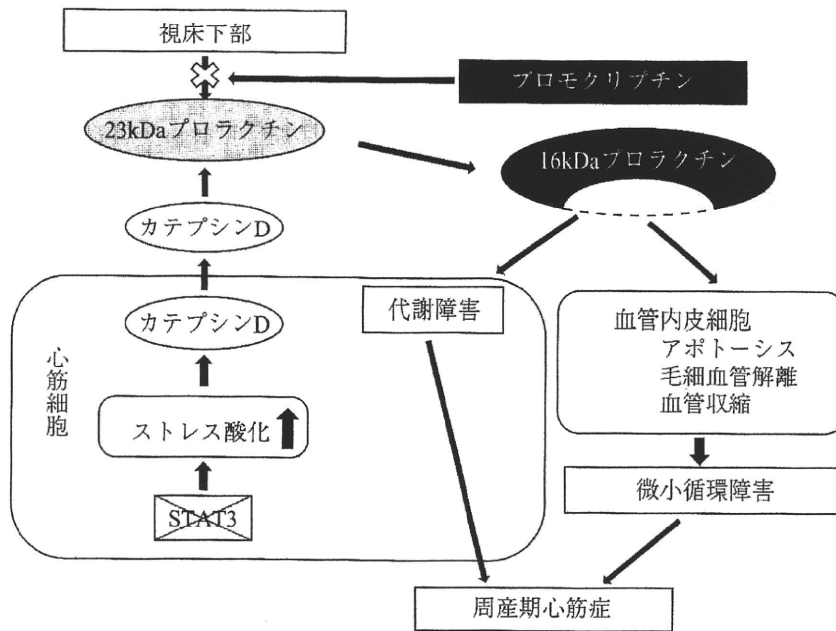


図1 異型プロラクチンによる周産期心筋症発症のメカニズム

STAT3(転写因子：酸化ストレスを抑制し血管新生に関与)が減少することにより、心筋細胞内で酸化ストレスが増加し、カテプシンDという酵素の産生が増強される。このカテプシンDにより、16kDaの異型プロラクチンが血中で増加し、内皮細胞のアポトーシスや血管収縮、心筋細胞の代謝異常を引き起こし、心筋症が発症すると考えられる。(文献9より引用改変)

4. 内分泌異常説

2007年に Hilfiker-Kleiner らは、心筋特異的にSTAT3蛋白をノックアウトした雌マウスにおいて、妊娠出産を契機として高率に心筋症・心不全を発症することに注目し、周産期心筋症の発症メカニズムについての研究結果を報告した⁹⁾。心筋でのカテプシンDという蛋白分解酵素の発現亢進により、血中で23kDaのプロラクチンが切断され16kDaのプロラクチンが増加していることが明らかにされた。この16kDaのプロラクチンは血管新生に対して抑制的に作用することが知られており、この異型プロラクチンが内皮細胞や心筋細胞を傷害することにより心筋症を発症すると考えられた(図1)。また、このマウスに抗プロラクチン薬であるプロモクリプチンを投与したうえで妊娠分娩させると心筋症を発症しないこと、実際の周産期心筋症患者の血清中にも異型プロラクチンが存在しており、周産期心筋症既往患者の次回妊娠時にプロモクリプチンを投与すると、心筋症の発症を予防できることもあわせて報告した⁹⁾。

その後、プロモクリプチン(抗プロラクチン)療

法(後述)が有効であるとの報告がいくつかなされている^{10)~12)}。

危険因子

前述のように、疾病原因ははまだ特定されていないが、数々の危険因子については報告されてきている。まず、診断基準を提唱したDemakisらは、多産、高齢、多胎、妊娠高血圧症候群、黒人を危険因子としてあげている。ほかに、子宮収縮抑制剤の使用や慢性高血圧合併、喫煙、肥満なども患者群で有意に多いことが指摘されている¹³⁾。

わが国においては、2009年の全国調査で、高齢、慢性高血圧や妊娠高血圧症候群の合併、子宮収縮抑制剤の使用や多胎が危険因子であることが判明した。これらの危険因子も含めたわが国における周産期心筋症の臨床像は、アメリカと相似していることが判明した(表1)。しかしながら、少子化の影響か、わが国における周産期心筋症患者の半数以上が初産婦であった。また、35歳以上に限った発症率は1万出産に1例であり、高齢でかつ高

表1 周産期心筋症の臨床像についての国際比較

	日本 2009年 n=102	アメリカ 2005年 n=100	南アフリカ 2005年 n=100	ハイチ 2005年 n=98
平均年齢(歳)	32.7	30.7	31.6	31.8
平均妊娠回数(回)	1.7	2.6	3	4.3
初産婦(%)	55	37	20	24
アフリカ系人種(%)	0	19	100	98
高血圧・妊娠高血圧症候群の合併(%)	42	43	2	4
子宮収縮抑制剤の使用(%)	14	19	9	0
多胎妊娠(%)	15	13	6	6
死亡率(%)	4	9	15	15

(Sliwa K, et al : Lancet 368 : 687-693, 2006より引用改変)

血圧などの危険因子を併せ持つ症例においては、注意が必要と考えられた。

予 後

当初 Demakis らは、半数は心機能が正常に回復し、半数は心機能低下が残存すると報告した¹⁴⁾。後者の一部が重症化し、死亡もしくは心移植を受けることとなる。その後、さまざまな国や施設で検討されたが、左室機能が改善する率が7~50%、死亡率が4~80%と、報告ごとに大きく異なっており、人種や医療水準の違いが影響していると考えられる。最近の欧米からの報告では、死亡率が3~6%であり、依然、重症例は致死的であると考えられ慎重に治療にあたる必要がある。

また、2006年の Amos らの報告によると、発症後平均約4年間の追跡期間で、約6割が心機能改善し、残りの4割が心機能低下、最重症の1割が心機能増悪して心移植が必要であった。心移植により、死亡例は1例も認めなかった。左心補助装置や心移植により死亡例がなかったこと、適切な内科治療(対象患者の9割がACE阻害薬、6割がβ遮断薬を内服)により、心機能改善例がこれまでの報告よりも多かったことをあげて、周産期心筋症の予後が改善してきていると結論付けている¹³⁾。

これまでに、予後予測因子として、初診時もしくは発症2ヵ月後のLVEF、左室拡張末期径

(LVDd)、左室内血栓の有無、人種などがあげられている。

治 療 法

周産期心筋症の治療については、一般的な心不全に対する治療が広く行われている。重症例では、急性期にカテコラミン治療に加え、IABP(大動脈内バルーンパンピング)やPCPS(経皮的心肺補助装置)を使用する。慢性期には、ACE阻害薬やβ遮断薬、利尿剤などの内服治療が行われるが、治療抵抗性の症例では、心臓移植や死に至ることもある。

また心不全に対する対症療法以外にも、自己免疫性心筋炎を疑う症例でのステロイド・免疫抑制剤の使用や、大量γグロブリン療法などが試みられてきた。前述の抗プロラクチン療法においては、2010年に Sliwa らが南アフリカにおける周産期心筋症患者20人を、標準治療にプロモクリプチンを投与した群(PPCM-Br 群:10人)と標準治療のみの群(PPCM-Std 群:10人)の2群に分け、半年間予後を追跡したところ、患者背景に有意差がなかったにもかかわらず、死亡率はPPCM-Br 群10%に対しPPCM-Std 群で40%、生存者の半年後のLVEFはPPCM-Br 群58%に対しPPCM-Std 群で36%と、予後に大きな差を認めた¹²⁾。しかし、対照であるPPCM-Std 群の予後が一般に比べて悪すぎるとの指摘もあり、今後のさらなる検討が

表2 周産期心筋症患者の次回妊娠・出産時における母体合併症の発生率

	心不全症状の出現	周産期における20%以上のLVEF低下	再妊娠前と比較し、最終経過観察時のLVEF低下	死亡
Group 1(23人)	6人(26%)	4人(17%)	2人(9%)	0人
Group 2(12人)	6人(50%)	4人(33%)	5人(42%)	3人(25%)

LVEF：左室駆出率

Group 1：心筋症発症後の心機能改善群：LVEF \geq 50%

Group 2：心筋症発症後の心機能低下群：LVEF < 50%

(文献16より引用改変)

待たれるところである。

慢性期、心機能回復例における内服治療の中止については、明確な基準はない。ACE阻害薬と β 遮断薬を併用し、心機能が回復した周産期心筋症患者において、どちらか一方を中止した6人と両剤を中止した5人の全員が、平均2.5年の経過観察中、心機能は保たれたままであったとの報告¹⁴⁾がある一方、心機能回復例でも心室細動などが原因で突然死することがあり、長期に経過観察が必要との報告¹⁵⁾もある。

Group 2では3人(25%)が死亡した(2人が突然死、1人が心不全死)(表2)。一方、児の予後については、Group 1で3人(13%)、Group 2で6人(50%)が早産に至ったが、新生児死亡例はなかった¹⁶⁾。

この結果を踏まえ、発病後、慢性期にも心機能低下が持続している症例においては、再妊娠は回避すべきであると考えられる。しかしながら、心機能回復症例においてどう対応するかは、まだ一定した見解のないところである。

再妊娠による再発率

妊娠・分娩が本疾患の発症・進行に関与していると考えられるため、周産期心筋症既往者の再妊娠については、高いリスクが伴う。

次子を分娩した周産期心筋症既往患者35人を、心筋症発症後の心機能改善群(Group 1：LVEF \geq 50%)23人と心機能低下群(Group 2：LVEF < 50%)12人に分けて解析した結果、心不全発症例がGroup 1で6人(26%)、Group 2で6人(50%)であった。Group 1で死亡例はなかった一方、

おわりに

息切れや体重増加、浮腫などの心不全症状は、多くの正常妊婦も訴える症状であり、その軽重を見極めることは難しい。しかしながら、診断時の心機能が予後に影響することが分かっており、早期診断、早期治療が及ぼす効果は大きい。心不全症状を訴える妊産褥婦の診察においては、周産期心筋症も鑑別疾患にあげ、診療にあたることが非常に重要である。

文 献

- 1) Demakis JG, Rahimtoola SH : Peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 44 : 964-968, 1971.
- 2) Elkayam U, Akhter MW, Singh H, et al : Pregnancy-associated cardiomyopathy : clinical characteristics and a comparison between early and late presentation. *Circulation* 111 : 2050-2055, 2005.
- 3) Mielniczuk LM, Williams K, Davis DR, et al : Frequency of peripartum cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 97 : 1765-1768, 2006.
- 4) Brar SS, Khan SS, Sandhu GK, et al : Incidence, mortality, and racial differences in peripartum cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 100 : 302-304, 2007.
- 5) Pearson GD, Veille JC, Rahimtoola S, et al : Peripartum cardiomyopathy : National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases (National Institutes of Health) workshop recommendations and review. *JAMA* 283 : 1183-1188, 2000.

- 6) Bultmann BD, Klingel K, Nabauer M, et al : High prevalence of viral genomes and inflammation in peripartum cardiomyopathy. *Am J Obstet Gynecol* 193 : 363-365, 2005.
- 7) Ansari AA, Neckelmann N, Wang YC, et al : Immunologic dialogue between cardiac myocytes, endothelial cells, and mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* 68 : 208-214, 1993.
- 8) Geva T, Mauer MB, Striker L, et al : Effects of physiologic load of pregnancy on left ventricular contractility and remodeling. *Am Heart J* 133 : 53-59, 1997.
- 9) Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, et al : A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128 : 589-600, 2007.
- 10) Hilfiker-Kleiner D, Meyer GP, Schieffer E, et al : Recovery from postpartum cardiomyopathy in 2 patients by blocking prolactin release with bromocriptine. *J Am Coll Cardiol* 50 : 2354-2355, 2007.
- 11) Meyer GP, Labidi S, Podewski E, et al : Bromocriptine treatment associated with recovery from peripartum cardiomyopathy in siblings : two case reports. *J Med Case Reports* 4 : 80, 2010.
- 12) Sliwa K, Blauwet L, Tibazarwa K, et al : Evaluation of bromocriptine in treatment of acute severe peripartum cardiomyopathy. A proof-of-concept pilot study. *Circulation* 121 : 1465-1473, 2010.
- 13) Amos AM, Jaber WA, Russell SD : Improved outcomes in peripartum cardiomyopathy with contemporary. *Am Heart J* 152 : 509-513, 2006.
- 14) Demakis JG, Rahimtoola SH, Sutton GC, et al : Natural course of peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 44 : 1053-1061, 1971.
- 15) Sliwa K, Forster O, Tibazarwa K, et al : Long-term outcome of peripartum cardiomyopathy in a population with high seropositivity for human immunodeficiency virus. *Int J Cardiol* (in press).
- 16) Elkayam U, Tummala PP, Rao K, et al : Maternal and fetal outcomes of subsequent pregnancies in women with peripartum cardiomyopathy. *N Engl J Med* 344 : 1567-1571, 2001.

—Original Article—

Analysis of Prolactin Gene Expression and Cleaved Prolactin Variants in the Mouse Testis and Spermatozoa

Michiyo ISHIDA¹⁾, Makoto YOSHIDA¹⁾, Shinya FUKUTA¹⁾, Kenji UEMURA¹⁾, Mieko IJIMA¹⁾, Kotaro HORIGUCHI¹⁾ and Toshio HARIGAYA¹⁾

¹⁾Laboratory of Functional Anatomy, Department of Life Sciences, Faculty of Agriculture, Meiji University, Kanagawa 214-8571, Japan

Abstract. Prolactin (PRL) has long been known to be a hormone responsible for mammary gland development and lactation in females, whereas its role in males is still unclear. Thus, we investigated male mouse (m) PRL protein and mRNA expression in spermatozoa at various differentiation stages in the testes. Quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization detected the expression of PRL not only in Leydig cells but also in germ cells, in particular in spermatogonia. The nucleotide sequence of testis PRL mRNA was the same as that in the pituitary. The mPRL was detected in Leydig cells and in round and elongated spermatids of the testes by immunohistochemistry. Immunoblotting detected 2 forms of mPRL in the testes, one form was 23-kDa PRL, and the other form was smaller than full-length PRL. Based on these results, we focused on N-terminal cleaved PRL to determine its involvement in spermatogenesis. Immunohistochemistry using two sets of antibodies, one that recognized full-length PRL and N-terminal cleaved PRL and another that recognized full-length PRL and C-terminal cleaved PRL, suggested that intact PRL was localized in the nucleus of round spermatids, while N-terminal cleaved PRL variants were localized in the Golgi apparatus of the spermatid nuclei of round spermatids, cytoplasm of elongated spermatids and in the spermatozoa tails. These findings suggest that PRL is ectopically expressed in the spermiogenesis and spermatogenesis and that cleaved PRL variants were localized in the Golgi apparatus of spermatids and in spermatozoa tails.

Key words: Ectopic expression, Mouse, Prolactin, Testis

(J. Reprod. Dev. 56: 567–574, 2010)

The various functions of prolactin (PRL) in vertebrates include the growth and differentiation of the mammary epithelium, lactation in mammals, osmoregulation and parental behavior in teleosts, amphibian development, broodiness in hens, crop sac production in pigeons and immunoregulation [1].

Moreover, many studies generally suggest that PRL positively modulates testicular functions in several ways, as follows: PRL is involved in the upregulation of LH receptor on Leydig cells [2, 3], in the increase in FSH receptors in Sertoli cells [4], and in the meiosis of germ cells [5]. In contrast, none of the parameters or functions of the male reproductive organs are affected in PRL knockout (KO) or PRL receptor (PRLR) KO mice [6, 7]. Thus, the exact role of PRL in the regulation of testicular function is still unclear. It is unknown why the lack of PRL signaling in PRLR KO and PRL KO mice affects the reproductive function of the male mouse in such a way that the expected results are marginal compared with those obtained in hypophysectomized or PRL deficient hereditary dwarf mice or even absent. Perhaps normal or near-normal reproductive function in PRLR KO and PRL KO animals is due to compensatory mechanisms and/or alternate signaling pathways (e.g., growth hormone) that are absent in both hypophysectomized animals and hereditary dwarf mice [8].

Additively, these apparent discrepancies may be due to the exist-

ence of structural variants of PRL in the testes. Recent studies have shown that PRL exists in several molecular forms, some arising from genetically determined factors and others from posttranslational modifications. The genetic variants include variant genes and splice variants of PRL [9]. On the other hand, the posttranslationally modified variants include cleaved, glycosylated and phosphorylated PRL [9]. Targeted disruption of either PRL or PRLR may be ineffective for these PRL variants. For instance, mutation of PRL by a targeted insertion that truncated the protein at residue 117 resulted in an intact N-terminal PRL fragment of 11 kDa [10]. In addition, these PRL fragments do not appear to signal through PRLR but rather through a distinct, endothelial cell surface receptor [11] whose activity would be unaltered by targeted deletion of the PRLR.

Furthermore, functional analysis of PRL is complicated by the existence of extrapituitary PRL. Extrapituitary PRL mRNA expression is not an uncommon phenomenon, and the various tissues that produce PRL include the placenta, nipple, spleen, lachrymal gland, skin and brain [12–15]. Roux M *et al.* [16] showed that PRL immunohistochemistry was detected in the interstitial tissue, Sertoli cells and germ cells in adult and prepubertal animals. That study, however, did not clarify whether the PRL was produced or only stored by the testis and nor did it clarify its function. The function of extrapituitary PRL was very interesting, but the difference of those functions was not clear in a PRL^{-/-} mouse, which possessed neither pituitary gland nor extrapituitary PRL [10]. In general, it is thought that extrapituitary PRL compensates for deficiency in pituitary PRL and when a large quantity of PRL is

Received: September 16, 2009

Accepted: June 15, 2010

Published online in J-STAGE: July 20, 2010

©2010 by the Society for Reproduction and Development

Correspondence: M Ishida (e-mail: michi@isc.meiji.ac.jp)

needed [17, 18]. However, the relative contribution of the pituitary and extrapituitary PRL is unknown.

Based on these data, the present study focuses on ectopic PRL expression and PRL variants in the mouse testis and spermatozoa.

Materials and Methods

Animals

The experimental design of this study complied with the guidelines for animal experiments of our institution. We housed ICR mice under controlled temperature conditions (22 ± 2 C) in an artificially illuminated room (12-h light/12-h dark cycle). Food and tap water were freely available. At 70–90 days of age, females were mated with males, and the day a vaginal plug was present was designated as day 0 of pregnancy. The day of birth was designated as infant day 0. Mice were sacrificed by ether anesthesia at 10, 20, 30, 40 and 120 days after birth. The pituitary glands and testes were removed and stored at -80 C until use.

Antibodies

We used three types of PRL antibody. One antibody was rabbit antiserum against recombinant mouse PRL (mPRL), which recognizes all types of PRL (PRL Ab). The second antibody was against oligopeptide corresponding to the 104–116 aa of mPRL (N-PRL Ab). The third antibody was against oligopeptide corresponding to the 174–186 aa of mPRL (C-PRL Ab). Figure 1A provides a schematic diagram of the antibodies. The crude peptide was purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography with a 0–60% linear gradient of CH₃CN in 0.1% trifluoroacetic acid. Purification of the peptide was confirmed by measuring its molecular mass by mass spectrometry. The antibodies were raised in a chicken immunized with the N-PRL and C-PRL peptide (Japan-lamb, Hiroshima, Japan). Immunoblot analysis using each antibody against the recombinant mPRL, which was truncated by Cathepsin D, revealed the specificity of each Ab to cleaved PRL as follows. PRL Ab recognized approximately 23-kDa, 16-kDa and 6-kDa bands of PRL. However, N-PRL Ab recognized approximately 23-kDa and 16-kDa bands but not 6-kDa PRL. On the other hand, C-PRL Ab recognized approximately 23-kDa and 6-kDa bands but not 16-kDa PRL. Therefore, comparison of each reaction among the three antibodies showed differences of PRL and PRL variants (Fig. 1B). In addition, the specificity of the immunoreactivity was checked using of an absorption test by preincubating each antibody with the recombinant mPRL ($1 \mu\text{g/ml}$).

The anti-Golgi 58K protein monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan), which specifically recognizes the Golgi apparatus, was used for the Golgi marker. Secondary antibodies of biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG and rabbit anti-chicken IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A) were used for immunohistochemistry and immunoblotting. Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 568 goat anti-chicken IgG and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) were used for indirect immunofluorescence histochemistry.

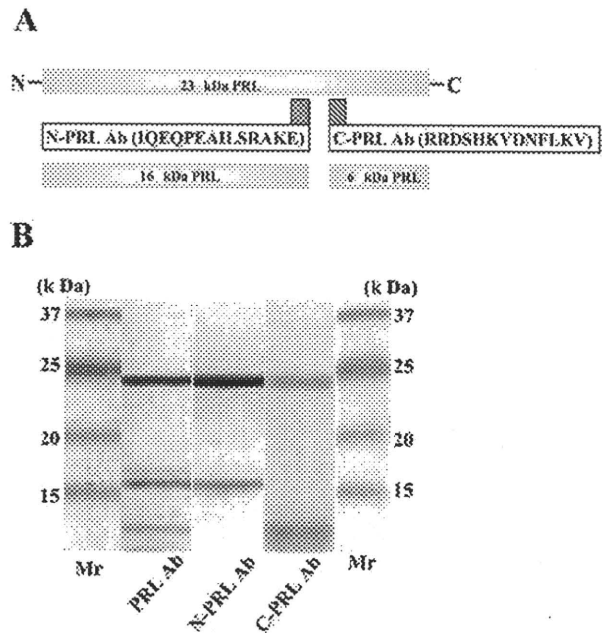


Fig. 1. A: Schematic diagram of the antibodies. N-PRL Ab recognizes PRL_{103–116} peptide, which includes full-length PRL and N-terminal cleaved PRL. C-PRL Ab recognizes PRL_{174–186} peptide, which includes full-length PRL and C-terminal cleaved PRL. B: Specificity of the antibodies. Immunoblotting against the recombinant mPRL, which was truncated by Cathepsin D. PRL Ab recognized approximately 23-kDa, 16-kDa and 6-kDa bands. The N-PRL Ab did not react to an approximately 6-kDa band, and the C-PRL Ab did not react to an approximately 16-kDa band.

Tissue preparation

For *in situ* hybridization and immunohistochemistry, mouse testes were fixed in Bouin's fluid for 6 h and embedded in paraffin. Sections $6 \mu\text{m}$ thick were cut on a microtome and mounted on 3-aminopropyltriethoxysilane-coated slides. Serial sections were prepared to compare the immunoreactions of different PRL antibodies.

Sperm collection

Spermatozoa were collected from the cauda epididymis of mature male mice. The distal portion of each epididymis was cut using a blade, and a dense sperm mass was squeezed out of the epididymis. Sperm were suspended in TYH medium under oil in a dish. These spermatozoa were incubated for 60 min at 37 C under 5% CO₂ in air for capacitation. The spermatozoa were then diluted and counted using a hemocytometer. The final concentration of spermatozoa was adjusted to 2×10^6 spermatozoa/ml in TYH medium.

Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed using Taq Man Universal PCR Master Mix and an ABI Prism 7500 Sequence Detector (Life

Technologies Japan) according to the protocol of the manufacturer. The TaqMan Gene Expression Assay IDs were Mm00599949_m1 (PRL) and Mm9999915_g1 (GAPDH), respectively.

Nucleotide sequencing

We estimated the concentration of total RNA isolated from 100 mg of testis using an RNA extraction Kit (ISOGEN, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). First strand cDNA synthesis from 1 μ g of total RNA was performed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN Japan, Tokyo, Japan) according to the protocol of the manufacturer. The cDNAs were then subjected to PCR amplification by 35 cycles of 94 C for 30 sec, 55 C for 30 sec, and 74 C for 1 min using KOD DNA Polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) and a GeneAmp PCR system 9600 (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan). The PRL primers corresponded to the PRL cDNA (accession No. P06879). For PRL, the primers were as follows: sense, 5'-CTGCCAATCTGTTCCGCTG-3'; antisense, 5'-AGAGATGGACTGAAT GTGGGT-3'.

We purified a testis ectopic PRL product in Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel, Duren, Germany), and cDNA was subcloned into the *Bam*H I-*Sal* I site of Bluescript pSK (-) plasmid. The nucleotide sequence was reacted with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence kit (Life Technologies Japan), and the product was purified in BigDye X Terminator (Life Technologies Japan). An ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and the Sequence Scanner software ver1.0 (Life Technologies Japan) were used for analysis, and the results were compared with an already known pituitary PRL sequence.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed as described previously with minor modifications [14]. In brief, the sections were pretreated with proteinase K (10 ng/ml) solution, 0.2 N-HCl and 0.1 M triethanolamine before hybridization. Hybridization proceeded with the biotin-labeled PRL cDNA probe (5'-CTTCCGGAGGGAC TTTCAGGGCTTG-3') for 16 h at 42 C. The specificity of this cDNA probe was demonstrated in our previous study [14]. Negative control sections were incubated with only hybridization buffer. After hybridization, sections were washed twice in 2 \times SSC and 0.2 \times SSC. Hybridized biotin-conjugated cDNA probes were detected with the horseradish peroxidase-conjugated anti-biotin antibody for 1 h and then incubated with an ABC Standard kit (Vector Laboratories) for 30 min. Immunohistochemical reactions were visualized using a Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Immunoblotting

Pituitaries and testes were disrupted ultrasonically in tissue protein extraction reagent and a Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Fisher Scientific) and separated by centrifugation at 15,000 g for 10 min. Equivalent amounts of sample buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 20% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol (2-ME) and 0.01% (w/v) bromophenol blue) were added to the supernatants, and the samples were then heated 95 C for 5 min. The samples were resolved by 15% SDS-PAGE. Sepa-

rated proteins were electrophoretically transferred to Immobilon-P membranes (Nihon Millipore, Tokyo, Japan) and incubated with the primary antibodies PRL Ab, N-PRL Ab and C-PRL Ab (1:10000). After washing with TBS, membranes were incubated with secondary antibodies, biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG, and visualization were performed as for *in situ* hybridization.

Immunohistochemistry

The sections were autoclaved in 10 mM sodium citrate (pH 6) at 115 C for 5 min to do retrieve the antigen. After treatment with 0.1% Triton X-100 for 10 min, endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 min. Furthermore, non-specific binding of antibody was blocked with Block Ace (Summit Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) for 1 h at room temperature. The sections were then incubated with primary antibody at 4 C overnight. Control sections were incubated with Block Ace instead of each primary antibody (1:10000), respectively. After washing with PBS, sections were incubated with the secondary antibody, rabbit anti-chicken IgG (1:500, Vector Laboratories), for 1 h. Detection and visualization were performed as for *in situ* hybridization. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin or periodic acid Schiff (PAS).

Immunofluorescence histochemistry

Sections, or sperm on slides, were pretreated by autoclaving (sections only) and incubation in 0.1% Triton X-100 and Block Ace and then incubated with the primary antibody N-PRL Ab (1:10000) and the anti-Golgi 58k protein monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Japan), which specifically recognizes the Golgi apparatus, in the same manner as for immunohistochemistry. After rinsing with PBS, the samples were incubated for 1 h with secondary antibodies, Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, Alexa 568 goat anti-chicken IgG and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:500, Life Technologies Japan).

The sections were mounted and counterstained with VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories). Slides were examined under an LSM510 Confocal Laser Scan Microscope (Carl Zeiss Japan, Tokyo, Japan).

Results

Testis PRL expression and nucleotide sequence analysis

We performed real-time PCR for PRL from the testes of 7- to 120-day-old mice. PRL was ectopically expressed in testes days of age; at the day 7, the level of expression was especially high level.

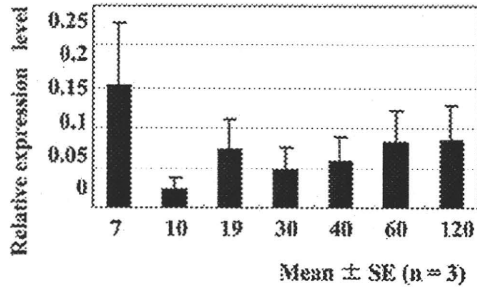
The quantity of each testis PRL PCR product compared with a pituitary PRL PCR product was very small. The proportion of amplified RT-PCR PRL products in the male adult testis vs. those in the pituitary was 1:9.4 (data not shown).

Then, we determined the testis PRL nucleotide sequence and confirmed that the sequence was the same as that of a pituitary PRL (data not shown).

Localization of PRL in the mouse testis

In situ hybridization for PRL mRNA was performed using a biotin-labeled PRL cDNA probe to determine the site of PRL

A



B

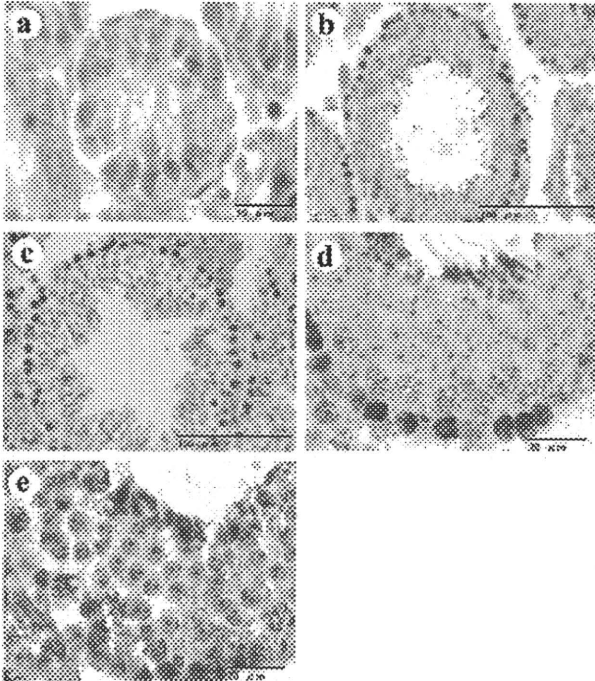


Fig. 2. A: PRL expression in the mouse testis. Real-time PCR analysis of PRL in the testis. The longitudinal axis shows the level of PRL expression relative to GAPDH expression. Data is presented as the mean \pm SE (n=3) and expressed in terms of arbitrary units per ng total RNA in the reverse transcription reaction. The horizontal axis shows the ages of the testes in days, 7, 10, 20, 30, 40, 60 and 120. B: *In situ* hybridization for PRL mRNA in the testis. Panels a-e show the testis on days 10, 40 and 120, respectively. Panel d shows day 120 and higher magnification images. Intense immunoreactivity to PRL mRNAs was observed in the spermatogonia, pachytene stage spermatocytes and preleptotene stage spermatocytes. Weak signals from PRL mRNAs were observed in the spermatids from 40 (b)- and 120 (c, d)-day-old mice. Panels a, d, e, bar=20 μ m; panels b, c, bar=100 μ m. No positive signals were detected in the negative control (incubated with only hybridization buffer) (e).

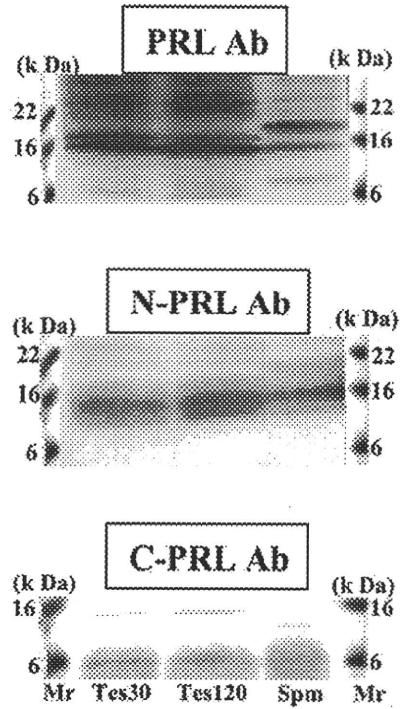


Fig. 3. Immunoblotting of testis and spermatozoa mPRL. Testes and spermatozoa samples resolved by 15% SDS-PAGE were immunoblotted and reacted with N-PRL Ab, C-PRL Ab and PRL Ab. The molecular size of the protein band showed that reactants against N-PRL Ab in the testes were approximately 16-kDa and 17-kDa. In sperm, immunoreactive protein against PRL Ab was approximately 16-kDa and 18-kDa. Full-length PRL is absent in sperm. The size of the protein band indicating binding to C-PRL Ab was less than 6-kDa in both the testis and spermatozoa.

expression. We detected PRL mRNA not only in Leydig cells but also in germ cells, particularly in spermatogonia (Fig. 2B-a), pachytene stage spermatocytes (Fig. 2B-b) and preleptotene stage spermatocytes (Fig. 2B-d) from 10- to 120-day-old mice (Fig. 2B). No signal was detected in the negative control sections that were incubated with only hybridization buffer. Fig. 2-e shows 120 days as a representative sample of the negative control.

Immunoblotting

Immunoblotting also detected mPRL in mature male testes and spermatozoa. The molecular size of the protein band reacted to N-PRL Ab in the testes and spermatozoa was approximately 16 kDa. The size of the protein band reacted to C-PRL Ab was less than 6 kDa in both the testis and spermatozoa. Another faint immunoreactive band was detected by N-PRL Ab and C-PRL Ab immunoblotting, but it could be ignored as the quantity was small. PRL Ab recognized 23-kDa and 16-kDa PRL (Fig. 3). Besides the 16-kDa band, both the PRL Ab and the N-PRL antibodies detected a 17-kDa immunoreactive protein in the testis and an 18-kDa protein in sperm. However, full-length PRL was absent in sperm (Fig.

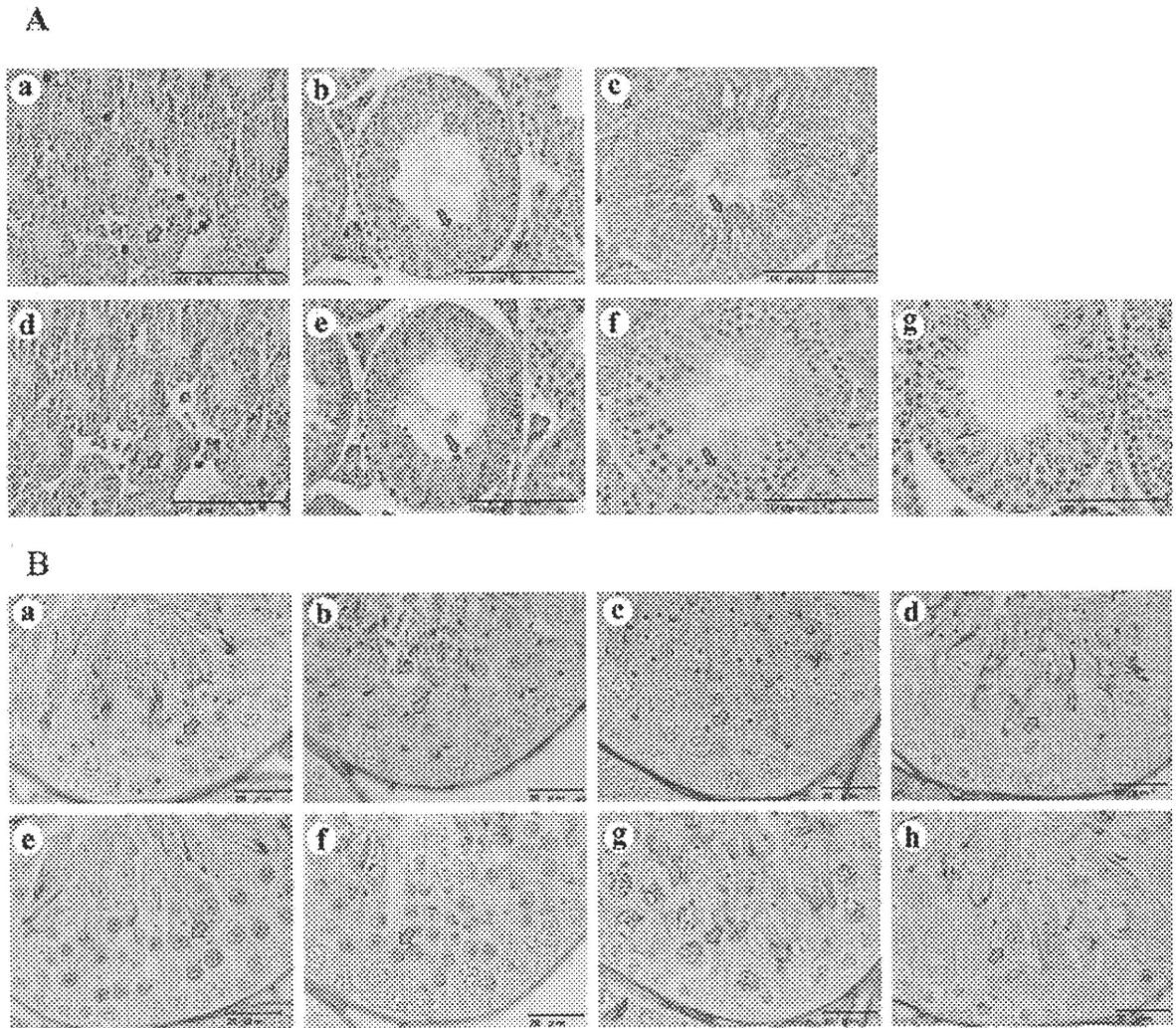


Fig. 4. A: Immunohistochemistry of PRL in testes. The upper panels (a–c) show N-PRL Ab immunoreactivity. The lower panels (d–f) show C-PRL Ab immunoreactivity. N-PRL Ab and C-PRL Ab immunoreactive sections of testes from days 10 (a, d), 30 (b, e) and 120 (c, f) were the serial sections. Localization of N-PRL Ab staining was clearly different from that of C-PRL Ab. Bar=100 μ m. No positive signals were detected in the negative control (incubated with PBS) (g). B: Stage-specific localization of N-terminal cleaved PRL and C-terminal cleaved PRL. The upper panels (a–d) show N-PRL Ab immunoreactivity. The lower panels (e–h) show C-PRL Ab immunoreactivity followed by a PAS reaction for the day 120 testis. N-PRL Ab and C-PRL Ab immunoreactive sections were the serial sections at stages IV (a, e), VI (b, f), IX (c, g) and XII (d, h). Different immunoreactivity was detected in the early round to elongated spermatids. Bar=20 μ m.

3). In the day10 testis, faint bands were detected by immunoblotting of each antibody (data not shown). The N-PRL Ab positive band was abolished by absorption with the recombinant mPRL (data not shown).

Localization of PRL in the mouse testis and spermatozoa

For the immunohistochemical studies, the absorption test in which each antibody was preincubated with the recombinant mPRL (1 μ g/ml) demonstrates the specificity of the antibodies because no

signal was detected.

PRL was detected in the Leydig cells of testes from 10- to 120-day-old mice and in early round and elongated spermatids from testes after day 30 by immunohistochemistry (Fig. 4A). These specific signals were located in different areas compared with PRL mRNA localization. Furthermore, the N-PRL Ab (Fig. 4A-b, c) and C-PRL Ab (Figs. 4A-e, f) immunoreacted signals were not localized in the same area.

Stage-specific localization of PRL in testicular germ cells was

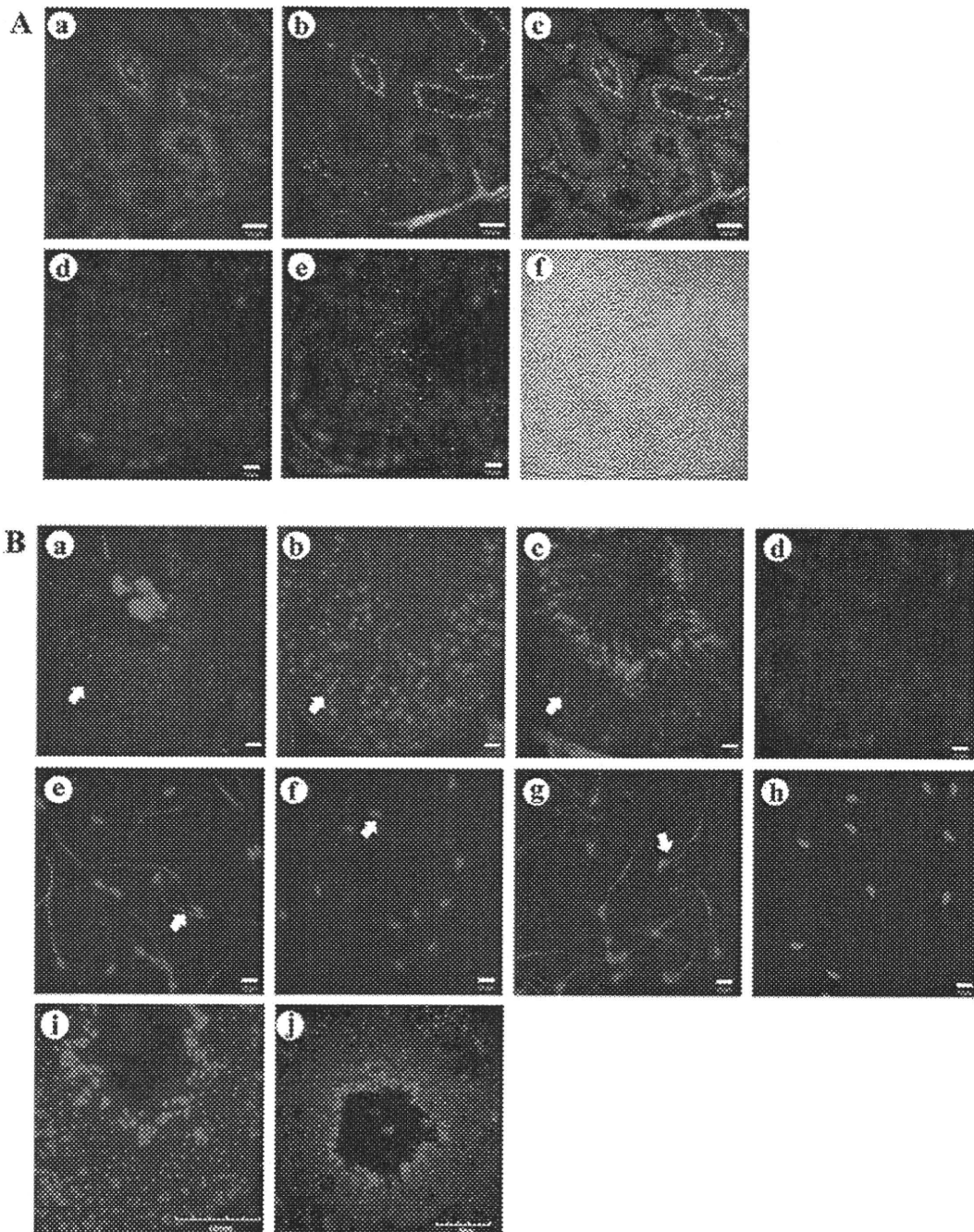


Fig. 5. A: Immunofluorescence double staining for mPRL (red) and Golgi 58K protein (green). Yellow indicates that N-PRL Ab immunoreactivity completely colocalized with Golgi 58K protein (c). Panels d and e show high magnification images of N-PRL Ab (a) and Golgi 58K protein (b). Panel f shows a bright field image of the negative control (incubated with PBS). The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Panels a–c, bar=100 μm ; panels d–f, bar=10 μm . B: Immunohistochemical staining for mPRL. The PRL signal is shown in red. Panels a–c show immunoreactivity for the testis from day 120. Panel e–g shows immunoreactivity for mature male mouse spermatozoa from the cauda epididymis. Panels a and e show immunoreactivity for N-PRL Ab. Panels b and f show immunoreactivity for C-PRL Ab. Panels c and g show immunoreactivity for PRL Ab. N-PRL Ab staining was localized in elongated spermatid tails from testes and in spermatid tails of spermatozoa. C-PRL Ab staining was localized in the testis, elongated spermatid head pieces and spermatozoa head pieces. PRL Ab staining was localized in both regions. No positive signals were detected in the negative control (incubated with PBS) (d, h). No signal was detected in the absorption test for N-PRL Ab (i) and C-PRL Ab (j). The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar=10 μm .

detected by immunostaining with N-PRL Ab and C-PRL Ab followed by PAS staining (Fig. 4B). N-PRL Ab reacted with protein in the Golgi-like regions of spermatids, nuclei of round spermatids, cytoplasm of elongated spermatids and in the spermatozoa tails. On the other hand, C-PRL Ab reacted with protein in the nuclei of round spermatids and in the spermatozoa heads. Spermatogonia through mid-pachytene spermatocytes showed no immunoreactivity. PRL was first detected in late pachytene spermatocytes at stage IX. Different immunoreactivity for N-PRL Ab and C-PRL Ab was detected in the early round to elongated spermatids (Fig. 4B).

Because concentrated N-PRL Ab immunoreactivity was observed in a discrete perinuclear region, we then analyzed whether this was in the Golgi apparatus. Double-staining immunohistochemistry was performed with N-PRL Ab and anti-Golgi 58K as the Golgi marker. N-PRL Ab immunoreactivity was partially colocalized with Golgi 58K protein (Fig. 5A).

Counterstaining was performed with DAPI following immunofluorescence staining with N-PRL Ab, C-PRL Ab and PRL Ab in adult testis. The data clearly indicated that immunoreactivity of N-PRL Ab was present in the elongated spermatid tails, while C-PRL Ab immunoreactivity was observed in elongated spermatid head pieces (Figs. 5B a, b). As expected, PRL Ab, which recognizes all PRL forms, reacted with elongated spermatid tails and head pieces that seemed to be in the acrosome region (Fig. 5B c). Interestingly, cleaved PRL variants and intact PRL localized differently. Therefore, we performed immunofluorescence staining with N-PRL Ab, C-PRL Ab and PRL Ab of spermatozoa collected from the cauda epididymides of mature male mice. The immunoreactivity of the male mouse spermatozoa was the same as that of the adult testis; that is, N-PRL Ab reacted with protein in spermatid tails, C-PRL Ab reacted with spermatid head pieces and PRL Ab reacted with both spermatid tails and head pieces (Figs. 5B e-g).

Discussion

The results presented here demonstrate that PRL is ectopically expressed in the testes. Furthermore, PRL in the testes and spermatozoa is cleaved, and cleaved PRL variants are localized in the Golgi apparatus of spermatids and in spermatozoa tails.

Our data also indicate that PRL mRNA is localized not only in Leydig cells but also in germ cells, particularly in the spermatogonia of the testes. The real-time RT-PCR analysis showed that the level of ectopic PRL expression was particularly high in the day 7 testis. In the day 7 testis, there were only spermatogonia to the germ cells, and this was consistent with the *in situ* hybridization signal.

The real-time RT-PCR analysis was performed with primers that span the intron. Furthermore, the testis PRL sequence was the same as a pituitary PRL. Emanuele NV *et al.* [19] previously described a mutant with exon 4 deleted that also encodes a 16-kDa protein in the brain. This mutant was not found in the testis. Although the ectopic PRL function remains unclear, these extrapituitary PRLs are thought to play a role in controlling local functions of the specific tissue, since the amount of PRL produced in extrapituitary tissues is much less than that in the pituitary gland. For instance, it is speculated that decidual PRL regulates uterine water

balance or fetal functions that PRL in the immune system stimulates proliferation of lymphocytes and that PRL in the brain modulates a number of behavioral and neuroendocrine controls [17]. On the other hand, male reproductive function is not affected in PRL KO and PRLR KO mice; however, testis PRL may play a role in controlling spermiogenesis and spermatogenesis.

Immunoblotting also detected mPRL in the testes and spermatozoa, but the molecular size of the immunoreactive substance was smaller than that of full-length PRL. Western blot analysis suggests that 16-kDa and 17-kDa immunoreactive proteins exist in the testis. On the other hand, 16-kDa and 18-kDa immunoreactive proteins exist in sperm. Full-length PRL is also absent in sperm. It is suggested that other antiangiogenic PRL fragments were truncated by the testis and sperm. Absence of full-length PRL in sperm suggests that PRL was cleaved at the testes or 23-kDa PRL in the testes.

Based on this finding, we focused on N-terminal cleaved PRL to determine its involvement in spermatogenesis. The N-terminal cleaved PRL variants can be derived from an enzymatically cleaved form of intact PRL, and they have unique functions that are not shared with the parent PRL. The cleaved PRL variants were first reported in rat pituitary extracts by Mitra [20, 21]. Interestingly, the specific function of cleaved PRL variants includes the inhibition of angiogenesis, tumor vascularization and growth and induction of apoptosis as a means of blood vessel regression [22]. Moreover, cleaved PRL variants were recently shown to mediate postpartum cardiomyopathy, a life-threatening disease in late-term and lactating mothers [23, 24].

Based on these reports, we speculate that the functions of cleaved PRL variants are different from those of intact PRL in the male reproductive system.

In situ hybridization revealed that mouse PRL mRNA was expressed in spermatogenic cells. Although strong signals were detected in spermatogonia by *in situ* hybridization, immunohistochemistry showed unexpectedly no reaction in spermatogonia for all antibodies. Whether PRL protein was not translated in spermatogonia or PRL disappeared from these cells remains in question.

Immunohistochemical analysis suggested that full-length PRL is localized in the nuclei of round spermatids, while cleaved PRL variants appear to be localized in the Golgi apparatus of the spermatid nuclei of round spermatids, cytoplasm of elongated spermatids and in the spermatozoa tails.

In contrast to hormones that are endocytosed and then rapidly degraded in lysosome, plasma-borne PRL is transported by transcytosis across the lactating mammary epithelial cell through the endocytotic and secretory pathways and released in milk in an intact molecular form of intact and cleaved molecular forms [9]. PRL is transported via a vesicular pathway that includes not only endosomes, late endosomes and multivesicular bodies, but also vesicles located in the Golgi region and secretory vesicles containing casein micelles [25]. There may be a similar mechanism at work in the testes and spermatozoa that is similar to that in the mammary glands. However, PRL does not appear to be released extracellularly in the testes and spermatozoa or to accumulate in spermatozoa tails and heads. Whether cleaved PRL variants exert

their effects through a classical transmembrane receptor remains to be determined. Cleaved PRL variants derived from PRL bind to a single class of sites on endothelial cell membranes with a Kd of 1 - 10 nM, and cross-linking experiments have identified proteins of 52-kDa and 32-kDa as the major cleaved PRL variant binding species [11]. It is still unclear whether these proteins are receptors for cleaved PRL variants or regulatory binding proteins important for cleaved PRL function.

The present study suggests that PRL originating the testes and cleaved PRL variants may play a role in spermiogenesis, and spermatogenesis and that the signal transduction and secretory mechanisms at work may differ from those of intact PRL.

Acknowledgments

This research was supported by funding for the "High-Tech Research Center" Project for Private Universities and a matching fund subsidy from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (2006–2008).

References

- Banerjee MR, Menon RS. Synergistic actions of glucocorticoid and prolactin on milk protein gene expression. In: Rillema JA (ed.), *Actions of Prolactin on Molecular Process*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1987: 121–136.
- Dombrowicz D, Sante B, Closset J, Hennen G. Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. *Endocrinology* 1992; 130: 695–700.
- Furvis K, Clausen OP, Olsen A, Haug E, Hansson V. Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. *Arch Androl* 1979; 3: 219–230.
- Guillaumot P, Tabone E, Benahmed M. Sertoli cells as potential targets of prolactin action in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 122: 199–206.
- Nag S, Sanyal S, Ghosh KK, Biswas NM. Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. A quantitative study. *Horm Res* 1981; 15: 72–77.
- Steger RW, Chandrashekar V, Zhao W, Bartke A, Horseman ND. Neuroendocrine and reproductive functions in male mice with targeted disruption of the prolactin gene. *Endocrinology* 1998; 139: 3691–3695.
- Binart N, Melaine N, Pineau C, Kercret H, Touzalin AM, Imbert-Bollere P, Kelly PA, Jegou B. Male reproductive function is not affected in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 2003; 144: 3779–3782.
- Bartke A. Prolactin in the male: 25 years later. *J Androl* 2004; 25: 661–666.
- Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16: 354–369.
- Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K. Defective mammapoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J* 1997; 16: 6926–6935.
- Clapp C, Weiner RI. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 1992; 130: 1380–1386.
- Harigaya T, Komori M, Kawakami T, Watanabe H, Abe M. Expression of prolactin gene in mouse placenta during late pregnancy: detection of mRNA and its translation product. *Endocr J* 1997; 44: 155–161.
- Koizumi M, Horiguchi K, Tomita Y, Kato Y, Harigaya T. Prolactin gene expression in the mouse nipple. *J Reprod Dev* 2003; 49: 465–472.
- Horiguchi K, Yagi S, Ono K, Nishiura Y, Tanaka M, Ishida M, Harigaya T. Prolactin gene expression in mouse spleen helper T cells. *J Endocrinol* 2004; 183: 639–646.
- Imaoka T, Matsuda M, Mori T. Expression of prolactin messenger ribonucleic acid in the mouse gonads during sexual maturation. *Life Sci* 1998; 63: 2251–2258.
- Roux M, Martinat N, Richoux JP, Grignon G. Histoimmunological identification of a prolactin-like substance in rodent testis. *Cell Tissue Res* 1985; 240: 663–667.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 1996; 17: 639–669.
- Gerlo S, Davis JR, Mager DL, Kooijman R. Prolactin in man: a tale of two promoters. *Bioessays* 2006; 28: 1051–1055.
- Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 35–42.
- Mitra I. A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1750–1759.
- Mitra I. A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. *In vivo* mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1760–1767.
- Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jezierski MC, Martinez de la Escalera G. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 301–307.
- Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, et al. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 2007; 128: 589–600.
- Clapp C, Thebault S, Martinez de la Escalera G. Hormones and postpartum cardiomyopathy. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18: 329–330.
- Ollivier-Bousquet M. Transferrin and prolactin transcytosis in the lactating mammary epithelial cell. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3: 303–313.

