



Recombinant H2 relaxin inhibits apoptosis and induces cell proliferation in cultured leiomyoma cells without affecting those in cultured normal myometrial cells

鈴木, 嘉穂

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5449

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005449>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Recombinant H2 relaxin inhibits apoptosis and induces cell proliferation in cultured leiomyoma cells without affecting those in cultured normal myometrial cells

ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞におけるリラキシンの増殖能およびアポトーシスに及ぼす影響の解析

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
産科婦人科学
(指導教員：山田 秀人 教授)

鈴 木 嘉 穂

(目的) リラキシンは、1926 年に Hisaw らにより豚の恥骨結合を妊娠中に弛緩させるホルモンとして発見され、近年ではマウスにおいて妊娠時の子宮頸管熟化作用や子宮収縮抑制作用などを有することが解明されている。ヒトにおいては、妊娠初期に血中濃度がピークを示す。一方で 2002 年にリラキシン受容体 (LGR7・LGR8) が発見され、LGR7 がリラキシンの主な受容体であるとされている。ヒト子宮筋や子宮筋腫でも LGR7 の発現が確認されているが、生理作用は明らかではない。子宮筋腫は 35 歳以上の生殖年齢女性の 30% が有しているとされ、妊娠中に増大することが知られている。そこで本研究では、ヒトリコンビナントリラキシン (rH2) を用いて、ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞における増殖能とアポトーシスに及ぼす影響を解析した。

(方法) 当院および関連施設において、手術前に十分なインフォームドコンセントを受け、同意をされた症例を対象としている。子宮全摘により採取された、子宮腺筋症などの他疾患を含まない、40 から 49 歳までの 9 症例 (増殖期 3 例、分泌期 6 例) について、ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞を作成し、ヒトリコンビナントリラキシン (0.1, 0.3, 1.0 ng/ml) を添加した。培養細胞におけるリラキシン受容体 (LGR7) の発現を、免疫染色を用いて確認した。細胞増殖能に及ぼす影響は、MTS 法により生細胞数を測定することや、核内増殖抗原 PCNA の発現を免疫染色することで解析した。アポトーシスに及ぼす影響は、TUNEL 法を用いてアポトーシス細胞を検出し、ウエスタンブロット法を用いて caspase-3 の発現を解析した。統計上の有意差は、one-way ANOVA および Tukey の HSD 検定にて評価した。

(結果) ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞において、リラキシン受容体 LGR7 の発現を認めた。MTS 法では、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比して 0.3, 1 ng/ml リラキシン添加群で有意に生細胞数の増加を認めた。PCNA 発現は、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比して 0.3, 1 ng/ml リラキシン添加群で有意に増加を認めた。TUNEL 法では、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比してリラキシン添加群で有意なアポトーシス細胞の減少を認めた。ウエスタンブロット法では、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比して 1 ng/ml リラキシン添加群で有意な caspase-3 発現の低下を認めた。ヒト培養子宮筋細胞では、いずれも有意差を認めなかった。

(考察) リラキシンの産生部位や生理作用は、種によって大きく異なる。ヒトにおいては、リラキシンは黄体より産生され、妊娠初期に高値となる。リラキシン受容体 LGR7 がヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞において発現していることは、リラキシンの子宮筋および子宮筋腫の増大の制御への関与を示唆している。我々はまた、子宮筋腫細胞においてのみ、リラキシン添加による生細胞数の増加を認め、その効果が 4 8 時間で最大になることが明らかとなった。よって、増殖能とアポトーシスに及ぼす影響は 4 8 時間において評価した。

我々は、ヒト培養子宮筋腫細胞において、PCNA 発現はリラキシンの容量依存性に増加することを示した。この結果は他の文献でマウス子宮における検討とは異なる結果であるが、リラキシンの種特異的な生理作用を示すものと考えられる。本研究ではまた、リラキシン添加によって、ヒト培養子宮筋腫細胞においてアポトーシスを抑制することを示した。TUNEL 法で、リラキシン添加群にアポトーシス細胞の有意な減少を認めており、さらに 1.0 ng/ml リラキシン添加群では、アポトーシスの主要な実行分子の一つである Caspase-3 発現の有意な低下を認めた。リラキシンは、PCNA 発現を増加させることで細胞増殖を促進させ、caspase-3 の発現を低下させることでアポトーシスを抑制し、ヒト培養子宮筋腫細胞を増殖促進させている。これらはヒト培養子宮筋細胞では認められない。

アポトーシスや細胞増殖は、様々な細胞内シグナル経路を用いている。リラキシンの細胞内シグナル経路はまだ判明しておらず、多数の経路を通っていることが、多くの論文で示唆されている。リラキシンは、様々な細胞において G 蛋白共役型受容体を介して cAMP を増加させることが報告されており、LGR7 を介して、リラキシンがヒト子宮筋および子宮筋腫細胞においても同様の作用がおこると考えられる。一方で、ヒト子宮筋細胞においては細胞生存、細胞増殖、分化などで主要な経路とされる PI3K/AKT 経路は介さないとの報告があり、子宮内膜細胞において AKT を活性化しないという報告もある。我々の研究でも、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン添加群に AKT のリン酸化は認められなかった。GnRH アゴニストが、子宮筋腫増大の制御に臨床応用させているように、子宮筋腫の主要な増大因子はエストロゲンとプロゲステロンである。しかしながら、同一症例の子宮でも、子宮筋と子宮筋腫においては性ホルモンの影響には差があり、他の局所成長因子の存在が示唆されている。また、他の成長因子や性ホルモンの受容体の発現量が異なるという報告がある。つまり、ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞における、リラキシンの作用の相違の原因のひとつは、局所成長因子の発現量の差によるものである。ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞において、リラキシン添加による影響の詳細な機構の解明には検討の余地がある。

我々は初めて、ヒト培養子宮筋腫細胞において選択的に、リラキシンが caspase-3 発現を低下させることでアポトーシスを抑制し、さらに PCNA 発現を増加させることで細胞増殖を促進することを示した。子宮筋腫の容量は、妊娠初期に増大し、以後はほぼ不変であるという報告がある。妊娠中のリラキシン血中濃度が妊娠初期に最高値をとり、以後は減少し推移する。本研究成果により、リラキシンは子宮筋腫細胞に細胞特異的に作用することで、妊娠初期の子宮筋腫増大に寄与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2244号	氏 名	鈴木 嘉穂
論文題目 Title of Dissertation	Recombinant H2 relaxin inhibits apoptosis and induces cell proliferation in cultured leiomyoma cells without affecting those in cultured normal myometrial cells ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞におけるリラキシンの増殖能およびアポトーシスに及ぼす影響の解析		
審査委員 Examiner	主 査 西尾久英 Chief Examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner 副 査 平井みどり Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

（目的）

リラキシンは、1926年にHisawらにより豚の恥骨結合を妊娠中に弛緩させるホルモンとして発見され、近年ではマウスにおいて妊娠時の子宮頸管熟化作用や子宮収縮抑制作用などを有することが解明されている。ヒトにおいては、妊娠初期に血中濃度がピークを示す。一方で2002年にリラキシン受容体（LGR7・LGR8）が発見され、LGR7がリラキシンの主な受容体であるとされている。ヒト子宮筋や子宮筋腫でもLGR7の発現が確認されているが、生理作用は明らかではない。子宮筋腫は35歳以上の生殖年齢女性の30%が有しているとされ、妊娠中に増大することが知られている。そこで本研究では、ヒトリコンビナントリラキシン（rh2）を用いて、ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞における増殖能とアポトーシスに及ぼす影響を解析した。

（方法）

当院および関連施設において、手術前に十分なインフォームドコンセントを受け、同意をされた症例を対象としている。子宮全摘により採取された、子宮腺筋症などの他疾患を含まない、40から49歳までの9症例（増殖期3例、分泌期6例）について、ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞を作成し、ヒトリコンビナントリラキシン（0.1, 0.3, 1.0 ng/ml）を添加した。培養細胞におけるリラキシン受容体（LGR7）の発現を、免疫染色を用いて確認した。細胞増殖能に及ぼす影響は、MTS法により生細胞数を測定することや、核内増殖抗原PCNAの発現を免疫染色することで解析した。アポトーシスに及ぼす影響は、TUNEL法を用いてアポトーシス細胞を検出し、ウェスタンブロット法を用いてcaspase-3の発現を解析した。統計上の有意差は、one-way ANOVAおよびTukeyのHSD検定にて評価した。

（結果）

ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞において、リラキシン受容体 LGR7 の発現を認めた。MTS 法では、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比して 0.3, 1 ng/ml リラキシン添加群で有意に生細胞数の増加を認めた。PCNA 発現は、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比して 0.3, 1 ng/ml リラキシン添加群で有意に増加を認めた。

TUNEL法では、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比してリラキシン添加群で有意なアポトーシス細胞の減少を認めた。ウェスタンブロット法では、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン非添加群に比して1 ng/ml リラキシン添加群で有意なcaspase-3 発現の低下を認めた。ヒト培養子宮筋細胞では、いずれも有意差を認めなかった。

(考察)

リラキシンの産生部位や生理作用は、種によって大きく異なる。ヒトにおいては、リラキシンは黄体より産生され、妊娠初期に高値となる。リラキシン受容体LGR 7がヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞において発現していることは、リラキシンの子宮筋および子宮筋腫の増大の制御への関与を示唆している。申請者はまた、子宮筋腫細胞においてのみ、リラキシン添加による生細胞数の増加を認め、その効果が48時間で最大になることが明らかとなった。よって、増殖能とアポトーシスに及ぼす影響は48時間において評価した。

申請者は、ヒト培養子宮筋腫細胞において、PCNA発現はリラキシンの容量依存性に増加することを示した。この結果は他の文献でマウス子宮における検討とは異なる結果であるが、リラキシンの種特異的な生理作用を示すものと考えられる。本研究ではまた、リラキシン添加によって、ヒト培養子宮筋腫細胞においてアポトーシスを抑制することを示した。TUNEL法で、リラキシン添加群にアポトーシス細胞の有意な減少を認めており、さらに1.0 ng/ml リラキシン添加群では、アポトーシスの主要な実行分子の一つであるCaspase-3発現の有意な低下を認めた。リラキシンは、PCNA発現を増加させることで細胞増殖を促進させ、caspase-3の発現を低下させることでアポトーシスを抑制し、ヒト培養子宮筋腫細胞を増殖促進させている。これらはヒト培養子宮筋細胞では認められない。

アポトーシスや細胞増殖は、様々な細胞内シグナル経路を用いている。リラキシンの細胞内シグナル経路はまだ判明しておらず、多数の経路を通っていることが、多くの論文で示唆されている。リラキシンは、様々な細胞においてG蛋白共役型受容体を介してcANPを増加させることが報告されており、LGR 7を介して、リラキシンがヒト子宮筋および子宮筋腫細胞においても同様の作用がおこると考えられる。一方で、ヒト子宮筋細胞においては細胞

生存、細胞増殖、分化などで主要な経路とされるPI3K/AKT 経路は介さないとの報告があり、子宮内膜細胞においてAKTを活性化しないという報告もある。申請者の研究でも、ヒト培養子宮筋腫細胞においてリラキシン添加群にAKTのリン酸化は認められなかった。GnRHアゴニストが、子宮筋腫増大の制御に臨床応用させているように、子宮筋腫の主要な増大因子はエストロゲンとプロゲステロンである。しかしながら、同一症例の子宮でも、子宮筋と子宮筋腫においては性ホルモンの影響には差があり、他の局所成長因子の存在が示唆されている。また、他の成長因子や性ホルモンの受容体の発現量が異なるという報告がある。つまり、ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞における、リラキシンの作用の相違の原因のひとつは、局所成長因子の発現量の差によるものである。ヒト培養子宮筋および子宮筋腫細胞において、リラキシン添加による影響の詳細な機構の解明には検討の余地がある。

子宮筋腫の容量は、妊娠初期に増大し、以後はほぼ不変であるという報告がある。一方、妊娠中のリラキシン血中濃度は、妊娠初期に最高値をとり、以後は減少し推移する。これらの事実と本研究の結果より、リラキシンは子宮筋腫細胞に細胞特異的に作用し、妊娠初期の子宮筋腫増大に寄与していることが示唆された。

本研究は、リラキシンが、ヒト培養子宮筋腫細胞において選択的に、caspase-3発現を低下させることでアポトーシスを抑制し、さらにPCNA発現を増加させることで細胞増殖を促進することを示したものであるが、従来報告のなかったリラキシンと子宮筋腫との関係について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。