Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Relaxin has anti-apoptotic effects on human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells

LODHI ROMANA SHER ZAMAN

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2013-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第5982号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005982

※ 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。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Relaxin has anti-apoptotic effects on human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells

リラキシンはヒトトロホブラスト由来 HTR8/SV neo 細胞のアポトーシス抑制効果を有する

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

Lodhi Romana Sher Zaman

Relaxin has anti-apoptotic effects on human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells

The study was conducted to evaluate the effects of human relaxin on apoptosis in the human trophoblast derived HTR-8/SV neo cell line, which is a possible model of human extravillous trophoblasts (EVTs). HTR-8/SV neo cells, cultured in phenol red free RPMI1640 medium, were treated with different doses of human recombinant (rH2) relaxin in serum-deprived conditions. RT-PCR was used for evaluating relaxin receptor: RXFP1 and RXFP2 expression in HTR-8/SV neo cells. The cell death was examined by TUNEL assay. Furthermore, we investigated caspase-3, cleaved PARP, and Bcl-2 expressions by Western blot analysis to recognize the translational effects of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins. RXFP1 and RXFP2 mRNA expression was observed in HTR-8/SV neo cells. Compared with untreated control cultures, treatment with rH2 relaxin, decreased TUNEL-positive rate in HTR-8/SV neo cells was observed. Western blot analysis revealed that treatment with rH2 relaxin decreased the expression of caspase-3 and cleaved PARP, but in contrast increased Bcl-2 expression in those cells. These results suggest that rH2 relaxin has anti-apoptotic effects on HTR8/SV neo cells by decreasing pro-apoptotic caspase-3 and cleaved PARP expression and up-regulating anti-apoptotic Bcl-2 expression.

目的

リラキシンは、1926年Hisaw FLらによって妊娠中の豚より発見され、妊娠中の恥骨結合を緩める作用があると報告された分子量約6,000のペプチドホルモンである。マウスの代表的な生理作用は妊娠末期の子宮頸部の開大、分娩前の恥骨結合を緩め軟産道を軟らかくする作用、子宮・乳頭の発達、心血管系の制御などが報告されており、妊娠維持・分娩に重要なホルモンであると考えられている。マウスでは、リラキシンは全妊娠期間中、黄体で産生され妊娠経過とともに血中濃度は増加する。一方、ヒトリラキシンは黄体より血中に分泌され、LH surge後9～10日目より上昇を認め、hCGと同様に妊娠10週で最大の血中濃度を示した後は、妊娠経過とともに妊娠24週に向けて緩やかに低下、妊娠36週に向けて再上昇する。妊娠中のヒト血中リラキシン濃度がマウス、ラット、ブタの血中濃度よりも約100倍低いことが明らかとなり、リラキシンの作用が種によって異なっていると推察されている。ヒトリラキシンは、主な産生臓器である黄体以外に、胎盤、脱落膜細胞で発現し、排卵から妊娠、分娩の生殖過程全般に関与することが推察されてきたが、ヒトでのリラキシンの生理作用は不明な点が多い。さらに、2002年、RXFP1とRXFP2がリラキシン受容体であることを発見されるまでの長い間、リラキシンはorphan ligandであったため、リラキシン作用機序の詳細な解明が困難であった。本研究では、RXFP1とRXFP2発現を認めるヒト胎盤に着目し、特にリラキシンの絨毛外トロホブラストに与える影響を検討する。

トロホブラストには、絨毛性トロホブラストのcytotrophoblast、syncytiotrophoblastと母体脱落膜へ侵入する絨毛外トロホブラスト(extravillous trophoblast: EVT)がある。EVTは接着・浸潤と血管新生を介して妊娠初期の胎盤形成に重要な役割を果たし、一部のEVTは母体脱落膜血管に侵入しtrophoblastic cleftを形成し、母体血を絨毛間腔へ取り込む。本研究ではEVTのアポトーシス調節の分子機構にリラキシンとその受容体がいかに関わるかを解析することにより、placentationにおけるリラキシンとその受容体（RXFP1とRXFP2)の役割を明らかにすることが目的である。

方法

オタワ大学のTsang教授より、ヒトEVTモデルとなるヒトトロホブラスト由来のHTR-8/SV neo cell lineの提供を受け培養実験を行った。RT-PCR法にて、HTR-8/SV neo cell lineにRXFP1とRXFP2 mRNA発現を検討した。HTR-8/SV neo cell lineの無血清培養系に種々の濃度の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。アポトーシスに関しては、TUNEL法により、培養細胞でのアポトーシス陽性率を添加用量別に解析する。また同時に、アポトーシス誘導因子（caspase-3）およびアポトーシス抑制因子(Bcl-2)の蛋白発現に及ぼす影響をウェスタンブロット法にて解析した。さらに、cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)蛋白発現に及ぼす影響をウェスタンブロット法にて、ヒトリコンビナントリラキシン添加用量別に、経時的に検討した。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

HTR-8/SV neo cell lineにRXFP1とRXFP2 mRNA発現を認めた。TUNEL法では、リラキシン非添加群に比較してリラキシン添加群では、HTR-8/SV neo cell lineでのアポトーシス陽性細胞に有意な減少を認めた。ウェスタンブロット法では、リラキシン非添加群に比較してリラキシン添加群では、HTR-8/SV neo cell lineでの有意なcaspase-3発現とcleaved PARPの低下を認めた。一方、Bcl-2発現では有意な増加を認めた。

考察

我々は初めて、リラキシンはヒトトロホブラスト由来HTR8/SV neo細胞のアポトーシス抑制効果を有することを明らかにした。リラキシンは妊娠初期の胎盤形成に役割を有し、妊娠維持に働くことが強く示唆された。

体外受精・凍結胚移植などの生殖補助医療の進歩とともに、ヒトでの妊娠初期の胎盤形成にはプロゲステロンが極めて重要であることが判明してきている。生理的な環境下では、排卵後の黄体からプロゲステロン産生がおこり、それにより着床妊娠維持に働く。本研究などにより、リラキシンも同様に黄体より産生され、妊娠維持に働いていると考えられる。しかし、凍結胚移植のプロセスでは、黄体がない状態で、外因性のプロゲステロンの投与で凍結胚による妊娠の維持が可能である。内分泌因子としてのリラキシンは黄体での産生が必要であるが、パラクライン・オートクライン因子として、胎盤脱落膜間で局所発現している可能性がある。プロゲステロンにより脱落膜に発現するリラキシン産生が誘導される可能性があるが、プロゲステロンとリラキシンの相互関係については、今後の検討が必要と考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第２３７２号	氏　名	LODHI ROMANA SHER ZAMAN
論文題目 Title of Dissertation	Relaxin has anti-apoptotic effects on human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells リラキシンはヒトトロホブラスト由来 HTR-8/SV neo 細胞のアポトーシス抑制効果を有する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 西尾久英 副　査 Vice-examiner 伊藤宗雄 副　査 Vice-examiner 平井みどり		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【目的】

リラキシンは、1926 年 Hisaw FL らによって妊娠中の豚より発見され、妊娠中の恥骨結合を緩める作用があると報告された分子量約 6,000 のペプチドホルモンである。マウスの代表的な生理作用は妊娠末期の子宮頸部の開大、分娩前の恥骨結合を緩め軟産道を軟らかくする作用、子宮・乳頭の発達、心血管系の制御などが報告されており、妊娠維持・分娩に重要なホルモンであると考えられている。マウスでは、リラキシンは全妊娠期間中、黄体で産生され妊娠経過とともに血中濃度は増加する。一方、ヒトリラキシンは黄体より血中に分泌され、LH surge 後 9～10 日目より上昇を認め、hCG と同様に妊娠 10 週で最大の血中濃度を示した後は、妊娠経過とともに妊娠 24 週に向けて緩やかに低下、妊娠 36 週に向けて再上昇する。妊娠中のヒト血中リラキシン濃度がマウス、ラット、ブタの血中濃度よりも約 100 倍低いことが明らかとなり、リラキシンの作用が種によって異なっていると推察されている。ヒトリラキシンは、主な産生臓器である黄体以外に、胎盤、脱落膜細胞で発現し、排卵から妊娠、分娩の生殖過程全般に関与することが推察されてきたが、ヒトでのリラキシンの生理作用は不明な点が多い。さらに、2002 年、RXFP1 と RXFP2 がリラキシン受容体であることを発見されるまでの長い間、リラキシンは orphan ligand であったため、リラキシン作用機序の詳細な解明が困難であった。本研究では、RXFP1 と RXFP2 発現を認めるヒト胎盤に着目し、特にリラキシンの絨毛外トロホブラストに与える影響を検討する。

トロホブラストには、絨毛性トロホブラストの cytotrophoblast、syncytiotrophoblast と母体脱落膜へ侵入する絨毛外トロホブラスト(extravillous trophoblast: EVT)がある。EVT は接着・浸潤と血管新生を介して妊娠初期の胎盤形成に重要な役割を果たし、一部の EVT は母体脱落膜血管に侵入し trophoblastic cleft を形成し、母体血を絨毛間腔へ取り込む。本研究では EVT のアポトーシス調節の分子機構にリラキシンとその受容体がいかに関わるかを解析することにより、placentation におけるリラキシンとその受容体（RXFP1 と RXFP2)の役割を明らかにすることが目的である。

【方法】

オタワ大学の Tsang 教授より、ヒト EVT モデルとなるヒトトロホブラスト由来の HTR-8/SV neo cell line の提供を受け培養実験を行った。RT-PCR 法にて、HTR-8/SV neo cell line に RXFP1 と RXFP2 mRNA 発現を検討した。HTR-8/SV neo cell line の無血清培養系に種々の濃度の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。アポトーシスに関しては、TUNEL 法により、培養細胞でのアポトーシス陽性率を添加用量別に解析する。また同時に、アポトーシス誘導因子（caspase-3）およびアポトーシス抑

制因子(Bcl-2)の蛋白発現に及ぼす影響をウェスタンブロット法にて解析した。さらに、cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 蛋白発現に及ぼす影響をウェスタンブロット法にて、ヒトリコンビナントリラキシン添加用量別に、経時的に検討した。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】

HTR-8/SV neo cell line に RXFP1 と RXFP2 mRNA 発現を認めた。TUNEL 法では、リラキシン非添加群に比較してリラキシン添加群では、HTR-8/SV neo cell line でのアポトーシス陽性細胞に有意な減少を認めた。ウェスタンブロット法では、リラキシン非添加群に比較してリラキシン添加群では、HTR-8/SV neo cell line での有意な caspase-3 発現と cleaved PARP の低下を認めた。一方、Bcl-2 発現では有意な増加を認めた。

【考察】

我々は初めて、リラキシンはヒトトロホブラスト由来 HTR8/SV neo 細胞のアポトーシス抑制効果を有することを明らかにした。リラキシンは妊娠初期の胎盤形成に役割を有し、妊娠維持に働くことが強く示唆された。

体外受精・凍結胚移植などの生殖補助医療の進歩とともに、ヒトでの妊娠初期の胎盤形成にはプロゲステロンが極めて重要であることが判明してきている。生理的な環境下では、排卵後の黄体からプロゲステロン産生がおこり、それにより着床妊娠維持に働く。本研究などにより、リラキシンも同様に黄体より産生され、妊娠維持に働いていると考えられる。しかし、凍結胚移植のプロセスでは、黄体がない状態で、外因性のプロゲステロンの投与で凍結胚による妊娠の維持が可能である。内分泌因子としてのリラキシンは黄体での産生が必要であるが、パラクライン・オートクライン因子として、胎盤脱落膜間で局所発現している可能性がある。プロゲステロンにより脱落膜に発現するリラキシン産生が誘導される可能性があるが、プロゲステロンとリラキシンの相互関係については、今後の検討が必要と考えられる。

本研究は、妊娠初期の胎盤形成・妊娠維持に関与するホルモンについて、特にプロゲステロン以外のホルモンについて研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかったリラキシンのアポトーシス抑制作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。