

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592403

研究課題名(和文) 生殖・産科異常におけるリラキシンと免疫異常の関連解明

研究課題名(英文) Relaxin and immune abnormality in human reproductive failure

研究代表者

山田 秀人 (Yamada, Hideto)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40220397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠初期絨毛外トロホプラスト(EVT)、子宮筋での役割を検討した。

EVTと子宮筋においてリラキシン受容体が発現していることを免疫染色で確認した。リラキシンは子宮筋細胞の増殖能には影響を及ぼさなかった。リラキシンはEVTで、caspase-3やcleaved-PARP発現を低下させ、Bcl2発現を増加させてアポトーシスを抑制した。さらにリラキシンは、MMP-2、-3、-9 mRNA発現を促進しTIMP-1 mRNA発現を抑制することによって、EVTの浸潤に関与することが示された。本研究により、リラキシンは妊娠初期の胎盤形成に役割をしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： 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 were treated with different doses of human recombinant (rh2) relaxin. 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.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：リラキシン

1. 研究開始当初の背景

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。1990 年前後にリラキシンに対する特異抗体が開発され、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る。マウスの生理作用として、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。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 (Stewart D. R., et al. J Clin Endocrinol Metab 70: 1771-3, 1990)。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。

研究分担者らは米国スタンフォード大学との共同研究で LGR7 がリラキシン受容体であることを発見した (Hsu SY, Nakabayashi K, et al., Science 2002)。一方、研究代表者らは免疫異常のヒト流産原因として、NK 細胞高活性 (Yamada H et al., Am J Reprod Immunol 2001; 2003)、NK 細胞 KIR (CD158a) 発現減少 (Yamada H et al., Am J Reprod Immunol 2004)、NK 細胞・CTL perforin 過剰発現 (Yamada H et al., Mol Hum Reprod 2005) を報告した。また、流産を高率におこす生殖不全マウスモデルを開発し (Shimada S, Yamada H, et al., Am J Reprod Immunol 2003)、M の活性化により流産を抑止できることを発見した (Takeda M, Yamada H, et al., Mol Hum Reprod 2007)。

本研究では、妊娠中のリラキシン-リラキシン受容体の役割、特に未解明な部分の多い絨毛・脱落膜組織、胎盤、妊娠子宮筋での役割を検討し、免疫学的異常ならびに流産、早産への関わりを調べる。上記のように、これまでの実績から本研究の下準備は整っている。特色のある成果が得られる可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

生殖医療技術の進歩は不妊治療に成果をもたらした。しかし受精・胚発生以降の障害、特に着床不全、化学妊娠、習慣流産、不育症の病態解明とこれらに対する治療法の確立は不十分である。本研究では、リラキシンとその受容体 (LGR7) および局所免疫細胞の、受精卵着床、初期妊娠維持、流産、早産、子宮収縮、子宮頸管熟化に関わる病態生理学的

な内分泌・免疫相互機構を解明することを目的とする。さらに、これら生殖不全疾患に対する新たな治療法の確立を目指す。

本研究課題の具体的な目的

(1) 着床から妊娠初期でのリラキシン/免疫細胞の相互機構の解析 (初期妊娠維持機構、着床不全、化学妊娠、習慣流産、不育症の病態生理解明)

同意を取得して子宮内膜や脱落膜組織を採取し、リラキシン、リラキシン受容体 (intact と spliced variant type) 発現および免疫細胞、サイトカイン発現を、不妊、自然流産、習慣流産患者と健常人、人工中絶で比較検討する。

プロゲステロンとリラキシンのクロストークを検討する。プロゲステロンの脱落膜に発現するリラキシン・リラキシン受容体発現に及ぼす影響を検討し、ヒト脱落膜に発現するリラキシンのオートクライン・パラクライン調節因子としての脱落膜促進作用を解明する。絨毛外トロホプラストは接着・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す (Maruo N, Nakabayashi K, et al., Endocrine, 2007)。胎盤形成において、胎盤内の血管拡張と血管新生は胎盤形成に重要であり、それらの破綻は子宮内胎児発育遅延につながると推察される。本研究では、ヒト胎盤での VEGF, PLGF, angiopoietin などの血管新生関連因子に及ぼすリラキシンの影響を検討し、脱落膜・胎盤に発現するリラキシンのオートクライン・パラクライン調節因子としての胎盤形成への関わりを解析する。

妊娠脱落膜では全細胞の 40% が免疫細胞であり、その多くが NK 細胞である。妊娠脱落膜の最終分化型は NK 細胞が脱落膜間質細胞と結合した decidual NK 細胞であり、IL-8、IP-10 などのケモカインを産生し絨毛外トロホプラスト浸潤を促進し、VEGF, PLGF を発現し胎盤での血管形成を促進する (Hanna J, et al. Nat Med 12: 1065-74, 2006)。本研究ではリラキシンの脱落膜間質細胞ならびに decidual NK 細胞における IL-8、IP-10 発現に与える影響を解析する。同様に、decidual NK 細胞の産生する TGF- β 、IL-4、-5、-10、-13 発現に与えるリラキシンの影響を解析する。

(2) 妊娠中期以降でのリラキシン/免疫細胞の相互機構の解析 (早産、子宮収縮、子宮頸管熟化、分娩発来の病態生理解明)

リラキシンの子宮筋におけるプロスタグランジンやサイトカイン産生への影響を検討し、子宮筋におけるリラキシン受容体発現に対するプロゲステロンの影響を検討する。また、同時に正常妊婦と切迫早産・早産症例におけるリラキシンの血中濃度ならびに脱落膜に発現するリラキシンの局所濃度、帝王切開時に採取した妊娠子宮筋におけるリラキシン受容体 (intact と spliced variant

type) 発現を検討する。リラキシンは、分娩時ヒト子宮頸部細胞で MMP 発現を誘導することが明らかにされ、妊娠子宮頸部組織のコラーゲン線維のリモデリングに役割を果たすことが示唆されている。また、近年の研究で、リラキシンがトロホプラストでの IL-6、IL-8 産生を促進することが明らかとなり、過剰発現したリラキシンがそれらサイトカインを介し、羊膜での炎症反応を惹起し破水を起こす可能性が示唆されている。

3. 研究の方法

ヒト培養子宮筋、子宮筋腫細胞およびヒト絨毛外栄養膜細胞でのリラキシン・リラキシン受容体 (LGR7) 発現を検討する。TUNEL 法でアポトーシス細胞数を調べ、ウエスタンブロット法で caspase-3、cleaved PARP、Bcl-2 発現を調べることによって、リラキシンのアポトーシスに及ぼす影響の解析を行う。血管新生関連因子、胎盤形成に及ぼす影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 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。リラキシンが選択的にヒト培養子宮筋腫細胞において caspase-3 発現を低下させることでアポトーシスを抑制し、PCNA 発現を増加させることで細胞増殖を促進することを明らかにした。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関与することが示唆された (Fertil Steril 97: 734-741, 2012)。

(2) 絨毛外栄養膜細胞のモデルとしてヒトトロホプラスト由来 HTR-8/SV neo 細胞株を用いて、リラキシンのアポトーシスに及ぼす影響を解析した。HTR-8/SV neo 細胞にリラキシンレセプターである RXFP1、RXFP2 の発現があることを RT-PCR で確認した。rH2 の添加によって、TUNEL 法でアポトーシス細胞の減少を認め、ウエスタンブロット法で caspase-3 と cleaved PARP 発現の低下を認めた。一方、Bcl-2 発現は上昇した。したがって、リラキシンは絨毛外栄養膜細胞に対してアポトーシス抑制作用があることが明らかとなった。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、以後は不変である。リラキシンには妊娠初期の胎盤形成に重要な生理学的役割があると考えられる (Gynecol Endocrinol 29: 1051-1054, 2013)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Uenaka M, Tanimura K, Tairaku S, Morioka I, Ebina Y, Yamada H. Risk factors for neonatal thyroid dysfunction in

pregnancies complicated by Graves' disease. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol in press. 査読有り。

Lodhi SZ. R, Nakabayashi K, Suzuki K, Yamada Y.A, Hazama R, Ebina Y, Yamada H. Relaxin has anti-apoptotic effects on human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells. Gynecol Endocrinol, 2013; 29: 1051-1054. 査読有り。

Suzuki K, Nakabayashi K, Yamada AY, Lodhi SZR, Hazama R, Ebina Y, Yamada H. Recombinant H2 relaxin inhibits apoptosis and induces cell proliferation in cultured leiomyoma cells without affecting those in cultured normal myometrial cells. Fertil Steril 97: 734-741, 2012. 査読有り。

Yamada H, Takeda M, Maezawa Y, Ebina Y, Hazama R, Tanimura K, Wakui Y, Shimada S. A high dose intravenous immunoglobulin therapy for women with four or more recurrent spontaneous abortions. ISRN Obstet Gynecol doi:10.5402/2012/512732, 1-5, 2012. 査読有り。

〔学会発表〕(計3件)

山田秀人. 抗リン脂質抗体と産科異常. 日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ第1回学術集会(ランチョンセミナー), 2月8日, 東京, 2014

山田秀人. 不育症の基礎知識~現状と課題. 母子保健指導者研修会.(招請講演), 12月10日, 福岡, 2013

Yamada H. Immunological etiologies in recurrent abortion and immunoglobulin therapy. 15th World Congress of Gynecological Endocrinology. (Plenary session, invited speaker) Florence. March 7-10, 2012

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 秀人 (YAMADA Hideto)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40220397

(2) 研究分担者

中林 幸士 (NAKABAYASHI Koji)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80362789

牧原 夏子 (MAKIHARA Natsuko)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30593991

(3)連携研究者
なし