

## 学位請求論文の内容の要旨

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 論文提出者氏名  | 成育科学領域 小児病態学教育研究分野 氏名 八木 弘子 |
| <p><b>Relaxin-3 regulates corticotropin-releasing factor gene expression in cultured rat hypothalamic 4B cells</b><br/> (ラット視床下部 4B 細胞における relaxin-3 による <i>Crf</i> 遺伝子発現調節の機序についての検討)</p>   |                             |
| <p><b>【背景】</b><br/> Corticotropin-releasing factor (CRF) は、視床下部室傍核 (PVN) で産生され、ストレス反応における視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系賦活化の主要な調節因子である。<br/> Relaxin-3 は、relaxin/insulin superfamily に属し、脳の縫線核に特異的に発現が認められるペプチドホルモンで、食欲のコントロール、ストレス反応[1,2]、覚醒などへの関与が報告されている。Relaxin-3 は、G 蛋白共役型受容体である relaxin 受容体 (RXFP) 3 への親和性が最も高く、RXFP1 にも結合する。RXFP1 及び 3 はストレス応答の中心であるラット PVN に強く発現している [3,4]。</p> <p><b>【目的】</b><br/> 本研究ではラット視床下部 PVN 由来とされる 4B 細胞を用いて、RXFP の発現と relaxin-3 による <i>Crf</i> 遺伝子発現調節への関与について検討した。</p> <p><b>【対象と方法】</b><br/> ラット視床下部 4B 細胞を継代培養し、以下の検討を行なった。<br/> Relaxin-3 による</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) <i>Crf</i> mRNA 発現の変化を、<math>\beta</math> 2-microglobulin をコントロールとして、real time-PCR 法により解析した。</li> <li>(2) <i>Crf</i> 遺伝子転写活性調節作用の変化を、<i>Crf</i> 5'-promoter luciferase fusion gene を導入した 4B 細胞を用いて、luciferase assay により解析した。<br/> また、各種 protein kinase (PK) 阻害剤を前添加後、relaxin-3 による <i>Crf</i> 遺伝子転写活性調節作用の変化について同様に解析した。</li> <li>(3) リン酸化 CREB (pCREB) 蛋白発現の変化を、Western blot 法により解析した。</li> <li>(4) <i>Rxfp1</i> 及び <i>Rxfp3</i> mRNA の変化を、<math>\beta</math> 2-microglobulin をコントロールとし、real time-PCR 法により解析した。</li> <li>(5) RXFP1 及び RXFP3 蛋白の変化を、Western blot 法により解析した。</li> </ol> <p>これらの実験を 3 回行い、統計学的処理は ANOVA を用い、引き続き Fisher's protected least-significant difference post-hoc test を行った。P &lt; 0.05 の危険率をもって有意とした。</p> <p><b>【結果】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) <i>Crf</i> mRNA 発現は、relaxin-3 (10nM) 投与 2-24 時間後において有意に増加した。また、relaxin-3 投与 24 時間後では、濃度依存性 (0.1-10nM) に増加した。</li> <li>(2) <i>Crf</i> 遺伝子転写活性は、relaxin-3 (10nM) 投与 2 時間後において有意に上昇した。その転写活性の上昇は、PKA 阻害剤 (H89、PKAi)、PKC 阻害剤 (Ro-32-0432、bisindolylmaleimide I) の前投与により有意に抑制された。</li> <li>(3) pCREB 蛋白の発現は、relaxin-3 (10nM) 投与 5 分後において有意に増加した。</li> <li>(4) <i>Rxfp1</i> mRNA は、relaxin-3 (10nM) 投与 2-6 時間後において有意に低下した。また、relaxin-3 投与 2 時間後では、濃度依存性 (0.1-10nM) に低下した。<i>Rxfp3</i> mRNA</li> </ol> |                             |

は、relaxin-3 (10nM) 投与 24 時間後において有意に増加した。

(5) RXFP1 蛋白は、relaxin-3 (10nM) 投与 2-24 時間後において有意に低下した。RXFP3 蛋白は、relaxin-3 (10nM) 投与 2-6 時間後に有意に増加した。

#### 【考察】

ラット脳室内への relaxin-3 投与では、視床下部 CRF を介した HPA 系の賦活化が認められる[5]。本検討では、ラット視床下部 4B 細胞において *Rxfp1* 及び *Rxfp3* の mRNA 発現と蛋白発現を確認し、relaxin-3 の添加にて pCREB 蛋白発現の増加と、*Crf* 遺伝子の転写活性及び *Crf* mRNA 発現の増加を認めた。また、その増加した転写活性は PKA または PKC 阻害剤の前投与により完全に抑制された。以上より、ラット視床下部 4B 細胞において、relaxin-3 は *Crf* 遺伝子発現を刺激し、そのシグナル伝達には PKA 及び PKC 経路が関与し、更にその 2 つの経路のクロストークが存在する可能性が示唆された。

ラット脳室内への RXFP3 選択性アゴニストの投与では、PVN 内の *c-fos* mRNA 発現及び血中コルチコステロン値の上昇を認めず、relaxin-3 による HPA 系の賦活化には RXFP1 を介する可能性が報告されている[6]。本検討では、ラット視床下部 4B 細胞への relaxin-3 添加により *Rxfp1* mRNA と蛋白は抑制され、*Rxfp3* mRNA と蛋白は増加した。これらの結果より、RXFP 蛋白の発現は、relaxin-3 によって制御されると考えられた。Relaxin-3 による *Crf* 遺伝子発現増加には RXFP1 が主に関与し、RXFP3 は同反応の抑制性の制御に関わる可能性が示唆された。

#### 【結論】

ラット視床下部 4B 細胞において、relaxin-3 は *Crf* 遺伝子発現を増加させ、RXFP1 及び 3 を介してストレス反応を制御する可能性がある。

#### 【参考文献】

- 1) Banerjee A, Shen PJ, Ma S, Bathgate RA, Gundlach AL. Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF1 activation. *Neuropharmacology* 2010;58:145-155.
- 2) Tanaka M, Iijima N, Miyamoto Y, Fukusumi S, Itoh Y, Ozawa H, et al. Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *Eur. J. Neurosci.* 2005;21:1659-1670.
- 3) Sutton SW, Bonaventure P, Kuei C, Roland B, Chen J, et al. Distribution of G-protein-coupled receptor (GPCR)135 binding sites and receptor mRNA in the rat brain suggests a role for relaxin-3 in neuroendocrine and sensory processing. *Neuroendocrinology* 2004;80:298-307.
- 4) Osheroff PL, Phillips HS. Autoradiographic localization of relaxin binding sites in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88:6413-6417.
- 5) Watanabe Y, Miyamoto Y, Matsuda T, Tanaka M. Relaxin-3/INSL7 regulates the stress-response system in the rat hypothalamus. *J. Mol. Neurosci.* 2010;43:169-174.
- 6) de Ávila C, Chometton S, Lenglos C, Calvez J, Gundlach AL, et al. Differential effects of relaxin-3 and a selective relaxin-3 receptor agonist on food and water intake and hypothalamic neuronal activity in rats. *Behav. Brain Res.* 2018;336:135-144.