

論文の内容の要旨

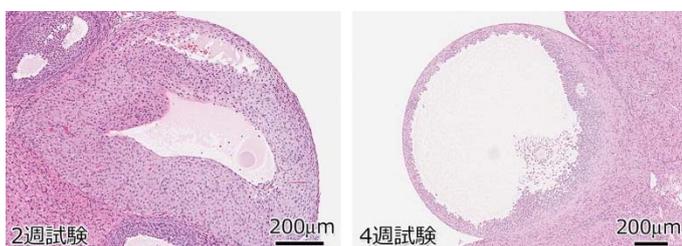
論文題目 ラットの排卵阻害メカニズムに関する研究

氏名 坪田健次郎

反復投与毒性試験における卵巣の病理検査は、ICH-M3 ガイドライン（医薬品の臨床試験および製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス）において、受胎能試験の実施に先立って行われ、妊娠可能な女性を臨床試験に繰り入れる要件であることから、慎重かつ正確な評価が必要である。一方、ラットの卵巣は4日間の性周期を繰り返すことから、病理検査もこれらの周期に特徴的な組織像を考慮して実施することが望ましい。本研究では indomethacin (IM, COX1/COX2 dual inhibitor) の投与により、卵胞の破裂が阻害され病理組織学的に unruptured follicle (UF) が誘導されることに着目し、発情前期から排卵後にかけて卵胞（顆粒膜細胞および莢膜細胞）の経時的な遺伝子発現を網羅的に探索し、さらに卵胞破裂を阻害する化合物、IM および RU486 (RU, progesterone receptor antagonist) 投与の卵胞の遺伝子発現プロファイルに対する影響を検討した。

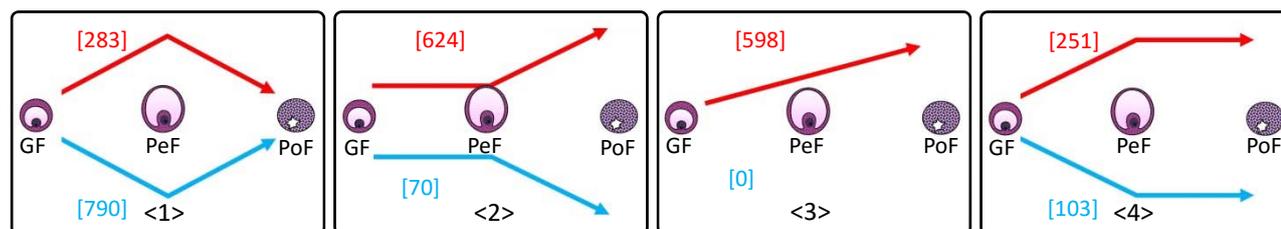
第1章では8週齢雌 Crl:CD(SD)ラットを用いて、IM の卵巣に及ぼす毒性を反復投与実験と受胎能評価実験で調べた。反復投与実験として、卵巣毒性を検出するための実験期間を最適化するために、2週および4週を実施した。各試験における投与量は0.4、1.3 および 4 mg/kg とした（1群10匹）。その結果、2週試験および4週試験の4 mg/kg 投与群においてUFが認められた（図1）。IM の反復経口投与による性周期への影響は認められず、UF の出現頻度・程度は投与期間に依存しなかった。また、UF は発情後期には鑑別がやや困難になり、発情休止期および発情前期にはその痕跡は認められなかったことから、UF は性周期の推移とともに消退していくと考えられた。一方、受胎能評価実験の4 mg/kg 投与群では10匹中8匹が死亡又は切迫屠殺されたため、受胎能に対する影響が評価できなかった。いずれの試験においても0.4 および 1.3 mg/kg 投与群では測定した検査項目に異常は認められなかった。以上、IM 投与により誘発されるUFは、性周期により検出感度が異なるものの、2週又は4週投与実験のいずれによっても検出可能であった。

図1 IMの反復投与により誘導されたUF



第2章では無処置ラットの排卵時における経時的遺伝子発現プロファイリングを実施した。発情前期の10:00、22:00および発情期の10:00にそれぞれ3匹の8週齢の雌CrI:CD(SD)ラットから卵巣を摘出した。レーザーマイクロダイセクション(LMD)で卵巣の凍結切片から、Graafian follicle (GF, 発情前期10:00)、Pre-ovulatory follicle (PeF, 発情前期22:00)およびPost-ovulatory follicle (PoF, 発情期10:00)を採取し、抽出したRNAをGeneChip®で解析した。GFと比較してPeFまたはPoFにおいて統計学的に有意な変動(Welch *t*-test, $p < 0.05$)がみられたprobe setを抽出して、変動パターンを<1>~<4>に分類した(図2)。さらに、それぞれの遺伝子群についてIngenuity Pathway Analysis (IPA)による解析を行った。その結果、COX-2およびprogesterone receptor (*Pr*)を含め排卵と関連が深い遺伝子のup-regulationは<1>において最も多く認められた。また、<2>においてEndothelin 2 (*Edn2*)、<3>においてhydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1、<4>においてADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1 (*Adams1*)などのup-regulationが認められた。IPA解析の結果、排卵と関連の深いpathwayとしてvascular endothelial growth factor (*Vegf*)シグナリング、peroxisome proliferator-activated receptor (*Ppar*)シグナリングに関連する遺伝子のup-regulationが認められた。<1>で抽出されたpathwayに関連する遺伝子はdown-regulationが優勢であったが、<2>~<4>ではup-regulationが優位で、また重複したpathwayが多く抽出された。<2>~<4>は排卵後も発現亢進が維持される遺伝子であることから黄体化に関連する遺伝子が多く含まれていると推察された。以上、LMDとGeneChip®の組み合わせにより、ラットの排卵前後の卵胞で発現する遺伝子を検出し、プロファイル化することができた。また本実験系は化合物投与による卵巣への毒性評価に応用できると考えられた。

図2 排卵前後の遺伝子発現変動パターン



[] , up-regulate された遺伝子数, [] , down-regulate された遺伝子数

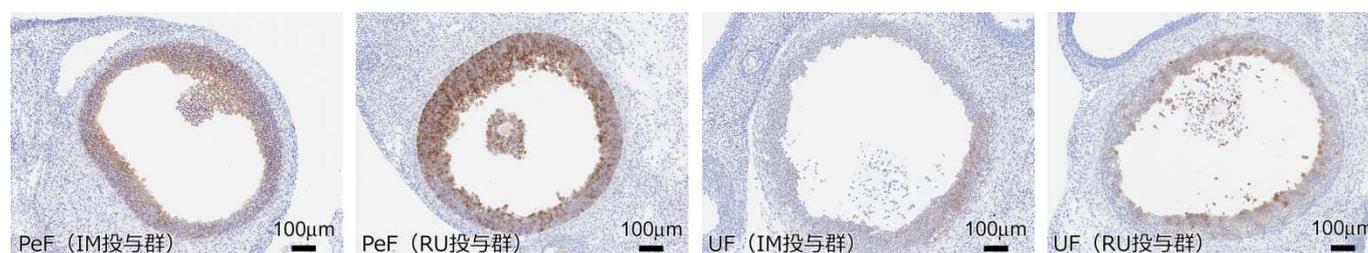
第3章ではIMおよびRUの単回投与によりラットにUFを誘導し、卵胞の遺伝子発現プロファイルへの影響を探索した。

[実験1] 単回投与によるIMおよびRUの投与時間を最適化するため、IM 4 mg/kgを15:00および18:00に、RU 100 mg/kgを10:00および13:00に、それぞれ発情前期の8週齢雌CrI:CD(SD)ラット(1群各5匹)に単回経口投与し、翌発情期10:00に卵巣、子宮および膈を摘出して病理組織学的に検査した。対照群として発情期の無処置ラット5匹からも卵巣、子宮および膈を摘出して同様に検査した。その結果、IM投与群およびRU投与群でUFが認められ、その発現頻度は設定した投与時間に依存しなかった。また、子宮および膈は発情期の組織像を示した。以上のことから、選択した投与時間はいずれも妥当と考えられた。

[実験2] IMおよびRU投与により誘導されたUFにおける遺伝子発現への影響を検討するために、IMの4 mg/kgを16:00に、RUの100 mg/kgを10:00に各6匹の発情前期の8週齢雌CrI:CD(SD)ラットに投与し、発情前期の22:00および発情期の10:00に各3匹から卵巣、子宮および膈を摘出した。対照群として発情前期の6匹の無処置雌ラットから、発情前期の22:00、および発情期の10:00に各3匹から卵巣、子宮および膈を摘出した。卵巣の凍結ブロックから6枚の連続切片を作製し、2枚はHE染色および抗COX-2抗体を用いた免疫染色を実施し、残りの4枚は第2章と同様にLMDによるサンプル採取に供した。IMおよびRU投与群の発情前期22:00、発情期10:00に摘出した卵巣からそれぞれPeF、UFをLMDにより採取し、抽出したRNAをGeneChip®で解析した。対照群のPeFと投与群のPeF、対照群のPoFと投与群のUFを比較し、mRNAの発現量が1/2以下に変動した遺伝子(Welch *t*-test, $p < 0.05$)について、排卵前後の卵胞の機能的または組織学的な変化に関連したキーワードと、排卵が阻害されるトランスジェニックマウスや化学物質などの情報に着目して、排卵阻害と関連が深いと考えられる遺伝子群を分類

した。

図3 IMまたはRU単回投与により誘導されたUF



その結果、IM および RU 投与群において PeF および UF は COX-2 に陽性で、LH サージに対する反応が示唆された (図 3)。GeneChip®マイクロアレイおよび統計解析の結果、IM または RU 投与群の PeF または UF において 1/2 以下に down-regulate された probe set 数は、IM 投与群では PeF: 34 および UF: 60、RU 投与群では PeF: 194 および UF: 295 であった。排卵阻害と関連の深いものとして IM 投与群では *wingless-type MMTV integration site family, member 4* の down-regulation が認められ、細胞間接着、細胞外マトリクス又はステロイド産生への影響が疑われた。RU 投与群では *Adamts1*, *Adamts9*, *Edn2*, endothelin receptor type A, epidermal growth factor receptor, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1, *Pparγ*, plasminogen activator, tissue が抽出され、細胞外マトリクスの生成・分解、卵胞周囲の平滑筋収縮、血管新生などに対する影響が疑われた。また IM および RU 投与群に共通して *Vegfa*, angiopoietin 2, heme oxygenase 1 などの血管新生関連遺伝子の down-regulation が認められた。

以上、第 1 章では IM の反復投与による卵巣毒性として UF を見出し、第 2 および 3 章ではそれぞれ正常な卵胞および UF の遺伝子発現プロファイルを継時的に検討することにより、排卵阻害との関連が疑われる遺伝子を抽出し、卵胞が破裂するために重要な生理学的機能の特徴づけることができた。しかしながら、本検討により排卵阻害と関連付けられた遺伝子は、統計学的に有意な変動を示した遺伝子の一部である。今回得られた遺伝子発現プロファイルを新規化合物の毒性予測に活用していくためには、排卵メカニズムのより詳細な理解と更なる検討を要する。