

博 士 論 文

ラットの排卵阻害メカニズムに関する研究

坪 田 健 次 郎

目次

目次.....	1
略号および用語の定義一覧.....	5
緒言.....	6
1 Indomethacin の反復投与による排卵の阻害.....	12
1.1 序論.....	13
1.2 材料と方法.....	14
1.2.1 動物.....	14
1.2.2 被験物質.....	14
1.2.3 実験デザイン.....	14
1.2.3.1 反復投与実験.....	14
1.2.3.2 雌受胎能評価実験.....	15
1.2.3.3 統計解析.....	15
1.3 結果.....	16
1.3.1 反復投与実験.....	16
1.3.2 雌受胎能に関する実験.....	16
1.4 考察.....	18
1.5 小括.....	20
2 成熟ラットの排卵時の卵胞における網羅的遺伝子発現解析.....	26
2.1 序論.....	27
2.2 材料と方法.....	28
2.2.1 動物.....	28
2.2.2 サンプル採取.....	28
2.2.3 病理組織学的検査および LMD.....	28
2.2.4 網羅的遺伝子発現解析.....	29
2.2.5 統計解析.....	29
2.3 結果.....	30
2.3.6 病理組織学的観察.....	30
2.3.7 網羅的遺伝子発現解析.....	30
2.4 考察.....	32
2.5 小括.....	35

3	Indomethacin または RU486 の単回投与による UF の誘導と卵胞における網羅的遺伝子発現解析	45
3.1	序論	46
3.2	材料と方法	48
3.2.1	動物	48
3.2.2	被験物質および投与量	48
3.2.3	実験 1 (UF の病理組織学的検査)	48
3.2.4	実験 2 (LMD および網羅的遺伝子発現解析)	48
3.3	結果	50
3.3.1	実験 1 (UF の病理組織)	50
3.3.2	実験 2 (LMD および網羅的遺伝子発現解析)	51
3.4	考察	52
3.5	小括	57
	総括	71
	謝辞	75
	引用文献	77

表

Table 1- 1	2-week and 4-week IM administration.....	21
Table 1- 2	Incidence of unruptured follicles in each stage of the estrous cycle.....	22
Table 1- 3	Female fertility experiment	23
Table 2- 1	Patterns of gene expression changes	36
Table 2- 2	Probe sets functionally related to ovulation.....	37
Table 2- 3	Top 5 up-regulated probe sets without function in the ovary.....	38
Table 2- 4	Ingenuity pathway analysis of pattern [1]	39
Table 2- 5	Ingenuity pathway analysis of pattern [2]	40
Table 2- 6	Ingenuity pathway analysis of pattern [3]	41
Table 2- 7	Ingenuity pathway analysis of pattern [4]	42
Table 3- 1	Number of animals assigned to each timepoint for necropsy	58
Table 3- 2	Histopathology of unruptured follicles	59
Table 3- 3	Ovulation- and/or luteinization-related genes.....	60
Table 3- 4	Female sex hormone- and/or prostaglandin-related genes	61
Table 3- 5	Angiogenesis- and/or blood vessel-related genes	62
Table 3- 6	Proteolysis-related genes	63
Table 3- 7	Cell adhesion- and/or extracellular matrix-related genes.....	64
Table 3- 8	Lipid and/or steroid metabolism-related genes	66
Table 3- 9	Genes possibly related to the unovulation	67



Figure 0- 1 Chemical structure of IM and RU	11
Figure 1- 1 Histopathology of UFs in the estrus	24
Figure 1- 2 Histopathology of UFs in the metestrus	25
Figure 2- 1 Differentiation of a target follicle from an atretic.....	43
Figure 2- 2 Histology of GF, PeF, and PoF	44
Figure 3- 1 UFs induced by IM and RU	68
Figure 3- 2 The uterus and vagina of rats treated with IM or RU	69
Figure 3- 3 COX2 immunohistochemistry in PeF and UF.....	70

略号および用語の定義一覧

略号および用語	定義
<i>Adamts1</i>	a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1
<i>Angpt2</i>	angiopoitin 2
<i>Cox</i>	cyclooxygenase
<i>Edn2</i>	endothelin 2
<i>Ednra</i>	endothelin receptor type A
FSH	follicular stimulating hormone
GF	Graafian follicle (グラーフ卵胞)
HCG	human chorionic gonadotropin
<i>Hmox1</i>	heme oxygenase 1s
IM	indomethacin
LH	luteinizing hormone
LMD	laser microdissection
<i>Lyve1</i>	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
NSAID	non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
PCR	polymerase chain reaction
PG	prostaglandin
PeF	pre-ovulatory follicle
<i>Plat</i>	plasminogen activator, tissue-type
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
PoF	post-ovulatory follicle
<i>Pparg</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
<i>Pr</i>	progesterone receptor
RU	RU486, または mifepristone
SPF	specific pathogen free
UF	unruptured follicle
<i>Vegfa</i>	vascular endothelial growth factor A
<i>Wnt4</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 4

遺伝子の略号は斜体で表記し、頭文字のみを大文字、蛋白として記載するときはずべて立体、大文字とした。

緒 言

ラットの卵巢は卵巢間膜により腹腔内に吊り下げられて左右に1対存在している。卵巢の表面は白膜で覆われ、実質は卵胞を豊富に含む皮質と、弾性線維に富み卵胞を全く含まない髄質からなる（加藤, 1991）。卵巢は雌性生殖器の機能的な中核として、卵細胞を容れた卵胞を貯蔵し、これらを性周期に伴い成熟・発達させ、そして排卵により卵細胞を卵巢外に放出する。これらの機能は下垂体から分泌されるホルモンの支配を受けて調節される。即ち follicular stimulating hormone (FSH) により卵胞上皮の多層化、卵胞腔の形成、卵胞液の貯留など、卵胞の成熟が促され、さらに luteinizing hormone (LH) の分泌が急激に亢進される (LH サージ) と排卵が起こる。一方、排卵前に卵胞の顆粒膜細胞から estrogen が分泌され、フィードバックにより LH の分泌を促す。また estrogen は排卵後に形成される黄体からの progesterone 分泌を促し、着床にも関与する。このように卵巢の機能は下垂体と卵巢のそれぞれから分泌されるホルモンにより、相互にフィードバックによって調節・維持されている。排卵の周期は動物により異なるが、ラットではほぼ正確に発情前期～発情期～発情後期～発情休止期の周期を4日間で繰り返し、発情期の早朝に排卵が起こる。

ラットの卵細胞の多くは1層の扁平な卵胞上皮に囲まれた原始卵胞の中に貯蔵されている。卵胞上皮は徐々に顆粒膜細胞として層の厚みを増し、卵胞は一次卵胞、前胞状卵胞と発達し、やがて卵胞腔が形成され卵胞液を蓄えた胞状卵胞、発情前期にはグラーフ卵胞 (GF) として成熟する。前胞状卵胞から GF が形成されるまでは4～5サイクルの性周期を要するが、特に胞状卵胞以降は急速に発達、4日間で GF 形成に至り、発情期に LH サージにより排卵が起こる。卵胞の発達に伴い、顆粒膜細胞層および莢膜細胞層では血管の新生が亢進して充血し、卵胞腔内には細胞外基質、卵胞液が産生される。排卵に際して、GF 卵胞は卵巢白膜下で大きく膨隆し、蛋白分解酵素により卵胞周囲組織を分解し卵胞が破裂すると考えられている。(Espey and Richards, 2006, Ko *et al.*, 2006)。排卵前後の卵胞の急激な成長および生理学的な変化に際しては、種々のホルモンレセプターやそれらに制御されるシグナル伝達経路の活性化が推察される。また血管新生、蛋白分解酵素、蛋白質含有漿液 (卵胞液) の産生、卵胞破裂、卵胞破裂後の修復は、組織傷害とそれに伴う炎症反応の経過と類似しており、実際に prostaglandin (PG) などの炎症に関与する生理活性物質の生合成も排卵の前後で亢進することが知られている (Richards *et al.*, 2002, Richards *et al.*, 2008)。排卵後の卵胞から黄体が形成され、発情後期に黄体

はさらに発達する。妊娠が起こらなければ発情休止期以降、黄体は数サイクルの性周期を経て徐々に退行していく。

上述のように排卵に際して卵胞では多様な分子が短期間に発現し相互に作用するため、毒性学的にも種々の化学物質の曝露に対する感受性が高まる時期と考えられる。したがって、内分泌かく乱、卵巣の組織傷害、シグナル伝達経路の阻害などが起こると、卵胞発達の遅延、排卵阻害など、受胎率の低下をとともなう生殖毒性が予想されることから、医薬品の開発過程においては非臨床試験による卵巣の慎重な毒性評価が必要となる。ラットでは性周期はほぼ正確に4日間で回帰し、また性周期は膣垢の観察により容易に把握できることから、非臨床試験において排卵への影響を評価するために適切な動物種と考えられる。

ラットを用いた反復投与毒性試験における卵巣の病理検査は、医薬品の開発上、生殖発生毒性の予測において重要な位置づけとされていることから、慎重かつ正確な評価が必要である。一方、ラット卵巣の組織像は各周期ごとに異なることから、正確な病理検査のためには、各期に特徴的な組織変化を理解することが欠かせない。すなわち卵巣の毒性評価は、単に組織傷害の有無だけではなく、各成長段階における卵胞、閉鎖卵胞や黄体などのコンポーネントの数、大きさなどを、子宮および膣の組織像から得られる情報と併せ、総合的に判定する必要がある。既知の化学物質により惹起される卵巣毒性を示唆する病理組織学的所見はいくつか知られているが、その中で unruptured follicle (UF) は卵胞の破裂が阻害された結果として誘導される変化であり、受胎能に影響を及ぼすと考えられることから、生殖発生毒性を予測するうえで極めて重要と考えられる。UFの誘導は種々の化学物質投与動物や遺伝子改変動物で観察されているが、そのなかでも cyclooxygenase (COX) 2, progesterone receptor (PR) の阻害 (Gaytan *et al.*, 2003), またはノックアウトマウス (Lim *et al.*, 1997, Lydon *et al.*, 1995) についての報告が多い。Richards *et al.* (1998) は *Cox2* ノックアウトマウスで *Pr* の発現が認められること、逆に *Pr* ノックアウトマウスで *Cox2* の発現が認められることから、これらの分子が別々のシグナル伝達経路で発現していることを示唆している。PRに制御される遺伝子は *Pr* ノックアウトマウスを用いて検討されており (Robker *et al.*, 2009), また *Cox2* も PG の生成および作用を介して種々の分子を

制御していると考えられ、それぞれのシグナル伝達経路を構成する分子群の中には PR または COX2 と同様に、卵胞破裂のキーになる分子が含まれていると推察される。これまでに排卵および卵胞の破裂に関与する遺伝子の探索には、ラットまたはマウスに Human chorionic gonadotropin (HCG) や pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) を投与して強制的に排卵を誘発した実験モデルが用いられてきた (Jo *et al.*, 2004, Russell and Robker, 2007, Tamba *et al.*, 2010)。Jo *et al.* (2004) は 3 週齢の Sprague Dawley ラットの卵巣から注射針で吸引して採取 (needle puncture 法) した顆粒膜細胞より抽出した RNA を GeneChip を用いて網羅的に解析し、変動した遺伝子を明らかにした。また Pr ノックアウトマウスの遺伝子発現解析により、排卵に関与する遺伝子のいくつかで down-regulation が認められている。一方、Cox2 ノックアウトマウスにおける卵巣の遺伝子発現解析について詳細な報告はない。また、これらの実験モデルは、医薬品開発の過程で行われる毒性試験とは、用いる動物の系統、週齢、排卵刺激などの条件が異なっている。そのため、毒性試験で一般的に使われる系統および週齢のラットの卵巣における遺伝子発現プロファイルの作成は、卵巣毒性の機序を考察するうえで極めて有用であると考えられる。

UF の発現機序に関与する多様な分子を検索する方法として、GeneChip®による網羅的遺伝子解析は効果的なアプローチである。しかし、卵巣全体から RNA を抽出すると様々な発達程度の卵胞、黄体、閉鎖卵胞、退行中の黄体からの情報が含まれ解析上のノイズとなると考えられるため、UF の遺伝子解析のためには排卵直前の卵胞のみを採取しなければならない。これまで排卵に関する遺伝子発現の検討には上述した needle puncture 法が用いられていたが、Jo *et al.* (2004) は、同法では卵胞周囲の間質細胞の混入を完全に防ぐことは困難であると指摘している。一方、laser microdissection (LMD) は光学顕微鏡下で病理組織切片を観察しながら、標的とする組織領域をレーザーによって切り出し、回収するツールである。Sakurada *et al.* (2006) はラット卵巣から前胞状卵胞および胞状卵胞を LMD を用いて切り出し、inhibin α および cytochrome P450 の mRNA の発現量を定量的 polymerase chain reaction (PCR) で測定し、LMD が卵胞の遺伝子発現の検討に有用であることを実証した。これらのツールを組み合わせ、LMD により組織切片上から破裂直前の卵胞または排卵直後の新規黄体を回収し、抽出した RNA を GeneChip®により解析することで、排卵の前後の遺伝子発現を網羅的に解析できると考えられる。

Indomethacin (IM) は 1959 年に Merck 社が合成したアリルアルカノイック酸誘導体 (Brogden, 1986) で、アラキドン酸カスケードにおいて PG の生成に関与する COX1 および COX2 の作用を阻害する non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) である (Figure 0- 1)。IM の副作用として消化管の糜爛および潰瘍、腎臓の乳頭部壊死が知られている (Khan *et al.*, 1998, Satoh *et al.*, 1981)。さらに IM を PG 産生が急激に亢進する排卵前にラット、ブタに単回投与すると、卵胞に直接作用し、卵胞の破裂が阻害されて UF が誘導される (Ainsworth *et al.*, 1979, Armstrong and Grinwich, 1972, Sato *et al.*, 1974, Tsafiriri *et al.*, 1972)。このような作用は PG を介したものであるが、PG の産生が阻害された場合に、ラットの卵胞で影響を受ける遺伝子、シグナル伝達経路について詳細な研究はない。

RU486 (RU) は 1982 年に Roussel-Uclaf 社が合成した人工妊娠中絶薬であり、PR およびグルココルチコイドレセプターに高い親和性を持つ (Figure 0- 1)。妊娠 49 日までの女性に 50~200 mg/day の RU を 4~7 日投与すると 50~86% の確率で、外科手術を要せず胎児が排出されるが、副作用として重度の出血がある (Mahajan and London, 1997)。さらに IM と同様に、RU を排卵前のマウスまたはラットに単回投与すると卵胞の破裂が阻害されて UF が誘導されることも知られている (Gaytan *et al.*, 2003, Loutradis *et al.*, 1991)。

本研究では IM の投与により卵胞の破裂が阻害され UF が誘導されることに着目し、排卵における遺伝子発現の変動に関する解析を行った。まず、第 1 章では正常な性周期を示すラットを用いて、IM の反復投与により UF が誘導できるかを確認した。また IM を 2 週間または 4 週間反復投与し検出感度の違いも確認した。次に、第 2 章では無処置雌ラットの発情前期から排卵後にかけての卵巣を経時的に摘出し、LMD を用いて顆粒膜細胞と莢膜細胞を採取、その mRNA を GeneChip®を用いて網羅的に探索し、正常ラットの排卵前後の卵胞の遺伝子発現プロファイルを作成した。さらに第 3 章では、卵胞破裂を阻害する化合物として IM または RU を雌ラットに単回投与し、同様の手法で卵胞の遺伝子発現プロファイルを作成した。その結果について無処置ラットのそれとの比較することで、発現が down-regulate した遺伝子を抽出し、排卵に関連のある機能ごとにカテゴリー分類した。

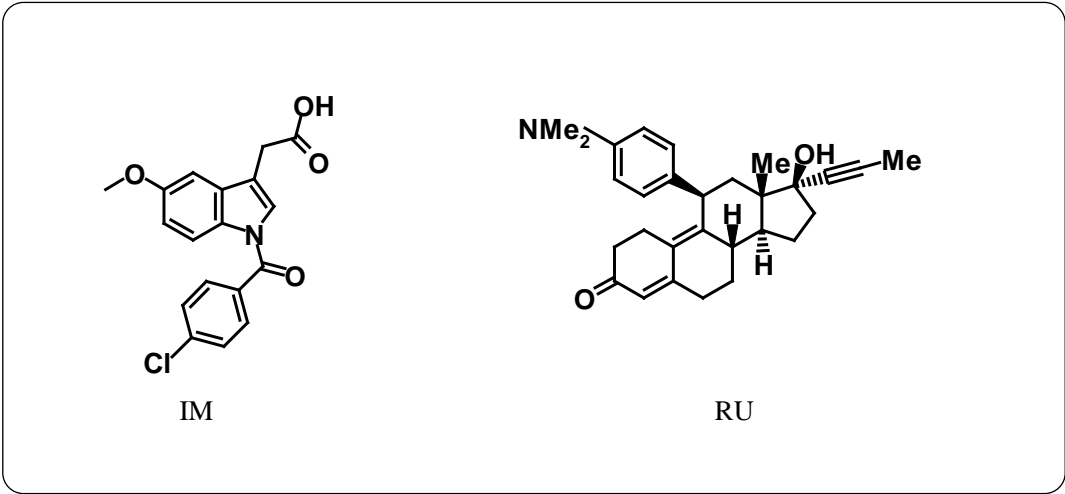


Figure 0- 1 Chemical structure of IM and RU

1 Indomethacin の反復投与による排卵の阻害

1.1 序論

COX1 および COX2 はアラキドン酸カスケードにおいて PG の生成に関与する。一方、IM はアリルアルカノイック酸誘導体 (Brogden, 1986) で COX1 および COX2 の作用を阻害する。また、IM は NSAID をラットに投与した際にしばしばみられる消化管傷害および腎乳頭部壊死を悪化させることも知られている (Khan *et al.*, 1998, Satoh *et al.*, 1981)。加えて、PG 生成が急激に亢進する排卵前に IM をラットに単回投与すると、卵胞に直接作用し、卵胞の破裂が阻害されて UF が誘導されることも知られている (Armstrong and Grinwich, 1972, Sato *et al.*, 1974, Tsafiriri *et al.*, 1972)。UF は受胎能に影響を与える病理所見であることから反復投与毒性試験で早期に検出できることが望ましい。これらの研究では、同一の性周期ステージに、ゴナドトロピンを投与して人工的な排卵刺激を与えることにより生理的条件を均一化し、単回投与の翌日に剖検を行って、UF 誘導の有無を確認している。一方、医薬品の開発における反復投与毒性試験は定型的な試験デザインで行われているが、動物の投与群構成や投与開始から剖検に至るまでの過程における性周期は考慮されない。ラットの性周期サイクルは通常 4 日間で、卵巣では GF の発達 (発情前期) ~ 排卵, 新黄体の形成 (発情期) ~ 黄体の発達 (発情後期) ~ 黄体の退行 (発情休止期) が繰り返され、組織像は各ステージで異なる。卵巣の毒性評価はこれらのステージごとの組織学的なバリエーションを考慮して実施する必要がある。毒性試験の病理検査のタイミングとして排卵が起こる発情期が最適であるが、通常の毒性試験では発情期の動物数は試験ごと、投与群ごとに様々であり、群によっては全く含まれないことも想定される。IM の単回投与により誘導される UF は病理組織学的に排卵直前の卵胞に類似し、拡張した卵胞腔内に、散乱した卵丘細胞と卵細胞が認められる。正常な排卵後に形成される新黄体は多くの場合充実性で、UF との判別は容易である。しかしながら、性周期に伴う UF の変化についてはこれまで報告がほとんどなく、発情期以外の性周期ステージにおける UF の検出感度は依然として不明である。

そこで本研究の第 1 章では IM を反復投与したラットの卵巣について病理組織学的検査を行い、UF の有無と雌性生殖器の機能に対するその他の毒性について検証し、その評価期間を最適化するために IM の 2 週間投与および 4 週間投与実験を実施した。さらに雌受胎能評価実験を実施し、IM 投与の受胎能への影響を精査した。

1.2 材料と方法

1.2.1 動物

5週齢雌の Crl:CD(SD)ラット（日本チャールス・リバー，滋賀）を，1週間の検疫および馴化の後，6週齢で反復投与実験に供した。また，9週齢の雌雄 Crl:CD(SD)ラット（日本チャールズ・リバー）を購入し，12週齢で受胎能に関する実験に供した。

動物は specific pathogen free（SPF）環境下で飼育し，ステンレス床網付きアルミニウム製ケージに，1ケージ当たり2匹を収容した。飼育室の温度は22.4～23.8℃，湿度は47～62%であった。換気回数は18.0回／時間に設定し，照明時間は7:00点灯，19:00消灯の12時間とした。ラットには121℃で30分間高圧蒸気滅菌した固型飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業，東京）を自由に摂取させた。飲水には，上水道水を濾過後，遊離残留塩素濃度が 2 ± 1 ppmになるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した水を，自由に摂取させた。実験計画はアステラス製薬の動物実験委員会の承認を受け，動物の取り扱いには社内ガイドラインに準じた。

1.2.2 被験物質

IM（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，USA）を0.5%メチルセルロース溶液（Metlose[®]，SM-400，信越化学工業株式会社，東京）に懸濁し，0.08 mg/mL，0.26 mg/mL および 0.8 mg/mL の投与液を調製した。4 mg/kg（高用量群），1.3 mg/kg（中間用量群），0.4 mg/kg（低用量群）および対照群（0 mg/kg）を設けた。

1.2.3 実験デザイン

1.2.3.1 反復投与実験

IMの0（溶媒対照），0.4，1.3 および 4 mg/kg を1群各10匹の雌ラットに胃ゾンデを用いて1日1回2週間または4週間反復経口投与し，性周期観察，剖検，器官重量測定および病理組織学的検査を実施した。投与終了前7日間（2週間投与実験）または14日間（4週間投与実験）には，膣スミアにより性周期を判定した。最終投与の翌日，ジエチルエーテルによる深麻酔下で放血死させた動物を剖検し，卵巣と子宮および下垂体を採取し，重量を測定した。これらの臓器を10%中性緩衝ホルマリンで

固定，パラフィンブロックを作製し，HE 染色を行った。これらの標本を光学顕微鏡を用いて病理組織学的に検査した。

1.2.3.2 雌受胎能評価実験

IM の 0 (溶媒対照)，0.4，1.3 および 4 mg/kg を 1 群各 10 匹の雌ラットに反復経口投与し，体重測定，性周期観察，剖検を実施した。投与は交配開始 14 日前から，交配期間を経て，妊娠 7 日まで実施した。性周期は投与開始日から交尾成立まで膣スメアで判定した。膣栓または膣垢中に精子の存在を認めた場合に交尾成立とみなし，その日を妊娠 0 日とした。エーテルによる深麻酔下で放血死させ，胸腔内および腹腔内臓器を肉眼的に観察し，黄体数，着床数，生存および死亡胎子数を記録した。さらに受胎率 (%)，着床前死亡率 (%) および着床後死亡率 (%) を算出した。

1.2.3.3 統計解析

臓器重量 (絶対値および相対値)，発情期の頻度，黄体数，着床数，死亡胎子数，生存胎子数，交尾までに要した日数については，Bartlett 法により各群の分散の均一性について検定 (有意水準 1% の両側検定) した。等分散の場合には対照群を基準とする Dunnett 多重比較 (有意水準 5% または 1% の両側検定) により対照群と投与各群の群間比較を行い，不等分散の場合には順位変換を行った後に等分散の場合と同様に比較した。同腹子の成績 (着床前死亡率，着床痕跡率，吸収胚率，胎子死亡率および着床後死亡率) については，対照群と投与各群について母体ごとの値の Wilcoxon 順位和検定 (Mann-Whitney の U 検定) を行った。

1.3 結果

1.3.1 反復投与実験

4週間投与では4 mg/kg 群の2匹が投与22日および24日にそれぞれ腹膜炎のため死亡したが、2週間投与では全動物が生残した。2週間投与実験および4週間投与実験の計画屠殺動物に性周期の異常は認められず、卵巣、子宮および下垂体の重量にも有意な変動は認められなかった。病理組織学的検査において、2週間投与の4 mg/kg 群の3匹、4週間投与の4 mg/kg 群の2匹にUFがみられた (Table 1-1)。

UFの発生頻度は、発情期には2週間投与の4 mg/kg 群で3匹中2匹、4週間投与の4 mg/kg 群で2匹中2匹、発情後期には2週間投与の4 mg/kg 群で4匹中1匹であった。4週間投与の4 mg/kg 群では2匹が発情後期であったがUFは認められなかった。一方、2週間投与の4 mg/kg 群では10匹中3匹、4週間投与の4 mg/kg 群では8匹中4匹が、発情休止期または発情前期であったが、卵巣へのIM投与に起因する変化は認められなかった (Table 1-2)。

発情期の排卵後にみられる新黄体は充実性で、大きな腔を持たず、顆粒膜細胞層と莢膜細胞層の境界は不明瞭で、黄体細胞の胞体は排卵前細胞と比較して大型化していた。一方、UFは大きく拡張した腔をもち嚢胞状を呈していたが、顆粒膜細胞層と莢膜細胞層に変性および壊死はなかった。(Figure 1-1)。発情後期にみられたUFは黄体腔内に卵細胞を認めた以外は、組織学的に異常を認めなかった (Figure 1-2)。またUF以外のIM投与に起因する組織学的変化は認められなかった。

0.4および1.3 mg/kgの2週間投与および4週間投与群では、卵巣に加えて、子宮、膣および下垂体でもIM投与に起因する変化は認められなかった。

1.3.2 雌受胎能評価実験

4 mg/kg 群において、交配前のIM投与期間中に6匹、交配期間中に2匹が死亡または切迫屠殺された。また、3匹では交配までに発情休止期の延長がみられた。生存した2匹では胎子の着床前死亡率の高値、着床数の低値および生存胎子数の低値が認められたが、動物数が不十分だったため統計解析は

実施しなかった。0.4 および 1.3 mg/kg 投与群では全動物が生存した。黄体数，着床数，着床前死亡率，胎子死亡数，着床後死亡率および生存胎子数は対照群のそれらと差がなく，IM 投与の影響は認められなかった (Table 1-3)。

1.4 考察

IM は PG 生成阻害を介して、排卵障害を惹起する (Sato *et al.*, 1974)。今回、IM を 4 mg/kg, 2 週間投与した群の 3 匹, 4 週間投与した群の 2 匹で UF が認められた。2 週間投与および 4 週間投与において、剖検前のそれぞれ 1 週間および 2 週間の発情期の回数に IM 投与の影響が認められなかったことから、2 週間投与では約 3 回, 4 週間投与では約 7 回の排卵があったと推定された。IM の反復投与中は排卵の度に UF が誘導される可能性があったと考えられるが、UF の発生頻度は 2 週間投与と 4 週間投与でほぼ同じであったことから、IM の反復投与による UF は 2 週間またはそれ未満の投与期間でも十分作出可能と考えられた。

発情期において 2 週間投与の 3 匹中 2 匹および 4 週間投与の全 2 匹で UF が認められた。ラットでは発情期において排卵直後の黄体は充実性で黄体腔を持つことが少ないため、大きく拡張した嚢胞状の UF は容易に識別できた (Figure 1-1)。発情後期では、2 週間投与の 4 匹中 1 匹のみで UF が認められたが、黄体腔内に卵細胞を認める以外に黄体嚢胞と形態学的な相違は認められなかった (Figure 1-2)。4 週間投与の 2 匹のラットでは UF は認められなかった。発情休止期および発情前期のラットでは 2 週間投与の 3 匹, 4 週間投与の 4 匹で、UF および IM 投与に起因する病変は認められなかった。従って、発情休止期及び発情前期は IM 投与に起因する UF の観察時期としては不適切と考えられた。

正常な排卵が起こった卵胞において、発情後期に progesterone などのホルモンが貯留することで黄体嚢胞が形成されることが知られているが、このような拡張した黄体腔は発情休止期には収縮し、線維性結合組織で置換される (Westwood, 2008)。今回の実験では 2 週間投与および 4 週間投与の対照群と投与群において、発情休止期および発情後期に UF は認められなかった。UF は卵胞破裂が阻害された結果生じるものであることから、排卵の度に、誘導される可能性がある。IM 投与による性周期の遅延、停滞はなかったことから、4 週間の IM 投与期間中には 2 週間投与の 2 倍の排卵の機会があったと推察されるが、UF の発生頻度はいずれもほぼ同程度であった。また発情期および発情後期にみられた UF から進展した黄体の細胞には変性・壊死像がなく、細胞数の減少または萎縮も認められなかった。以上のことから、発情期に誘導された UF は顕著な嚢胞状の病変として認められるが、性周期の推移と

ともに、徐々に黄体腔内の漿液成分が吸収されて収縮し、正常な黄体と区別がつかなくなると推察された。

NSAID の副作用は加齢とともに発生しやすくなることが指摘されている (Johnson and Day, 1991)。また、今回行った 2 週間および 4 週間投与実験、雌受胎能評価実験において、IM 投与による瀕死数、潰瘍および腹膜炎の頻度・程度は、ラットの週齢に依存して増加した。雌受胎能評価実験では 4 mg/kg 群の 10 匹中 8 匹が潰瘍および腹膜炎により死亡または切迫死されたので、統計学的な比較はできなかったが、4 mg/kg 投与群の生存した 2 匹で着床前胎子死亡率の高値、着床数の低値および生存胎子数の低値が認められた。しかし、Shirota *et al.* (1998) はラットに IM を単回静脈内投与することで UF を誘導し、消化管傷害が顕著に現れる投与量ではむしろ UF の頻度が低下することを確認している。従って、4 mg/kg 投与群の生存した 2 匹でみられた着床数および生存胎子数の低値は、UF の誘導による排卵阻害によるものではないと考えられた。

以上、IM の 2 週間および 4 週間の反復投与により UF が生じるが、発情休止期、発情前期では UF の検出は困難であった。発情前期から発情期にかけては、LH サージ、排卵、黄体形成などのイベントが短期間に続けて起こり、種々の蛋白の合成が亢進するため、化学物質に対する感受性が高い時期であると考えられた。

1.5 小括

ラットを用いた IM の 2 週間または 4 週間反復投与実験により、4 mg/kg 群において卵巢に UF が認められた。発情休止期および発情前期の卵巢には病理組織学的な異常は認められなかったことから、IM は発情前期から発情期にかけての期間においてのみ卵巢に影響を及ぼすことが明らかになった。雌受胎能について IM 投与の影響は認められなかった。発情前期から発情期は、LH サージ、排卵、黄体形成などのイベントが短期間に続けて起こり、種々の蛋白の合成が亢進するため、化学物質に対する感受性が高い時期であると考えられた。

Table 1- 1 2-week and 4-week IM administration

Duration of experiments	2-week				4-week			
IM dose (mg/kg)	0	0.4	1.3	4.0	0	0.4	1.3	4.0
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10	10	8
Estrous cycle (day)								
Mean frequency of estrous	1.7	1.5	2.0	1.8	3.5	3.2	3.5	3.3
	±0.48	±0.53	±0.00	±0.42	±0.53	±0.42	±0.53	±0.46
Organ weight (mg)*								
Ovary (R)	33	36	33	33	39	40	38	36
	±5.3	±7.8	±6.5	±9.0	±4.6	±6.1	±4.3	±6.8
Ovary (L)	33	33	38	35	36	37	41	38
	±8.6	±8.7	±6.4	±6.0	±4.5	±3.5	±5.6	±5.4
Pituitary	12	12	12	12	13	13	13	13
	±1.7	±1.5	±1.6	±0.8	±1.4	±3.2	±1.9	±1.9
Uterus	401	441	373	387	486	473	401	463
	±114.4	±190.7	±108.0	±80.6	±104.6	±128.2	±133.8	±45.2
No. of animals with unruptured follicles	0	0	0	3	0	0	0	2
Slight	0	0	0	2	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0

*, Mean±standard deviation

Table 1- 2 Incidence of unruptured follicles in each stage of the estrous cycle

Duration of experiments	2-week				4-week			
	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Estrous cycle at necropsy*	2/10	3/10	4/10	1/10	3/8	2/8	2/8	1/8
Unruptured follicle*	0/10	2/10	1/10	0/10	0/8	2/8	0/8	0/8

*, Number of animals: Detected/Examined, IM: 4 mg/kg

Table 1- 3 Female fertility experiment

IM dose (mg/kg)	0	0.4	1.3	4.0
No. of animals examined	10	10	10	10
No. of dead or sacrificed moribund	0	0	0	8
Body weight gain (g) (Days 1-15)	19	20	14	5*
Mean No. estrous phase/ (15 days)	3.7	3.8	3.7	3.8
Irregular estrous cycle ¹⁾	0	1	2	3
No. of animals mated	10	10	10	3
No. of animals copulated	10	10	10	3
No. of pregnant animals	10	10	10	2
Necropsy findings				
Ovary, dark red (bilateral)	0	0	0	2
Uterine horn, fluid (bilateral)	0	0	0	1
Mean No. of corpora lutea	14.9	15.8	14.4	12.5
Mean No. of implantations	14.0	14.6	13.4	10.0
Mean % of preimplantation loss	5.5	7.1	7.2	19.8
Mean No. of live embryos	13.1	13.9	12.4	9.5
Mean No. of dead embryos	0.9	0.7	1.0	0.5
Mean % of postimplantation loss	6.5	4.9	7.4	5.6

1) Persistent diestrous phase for 3 consecutive days or longer; *: $p < 0.01$

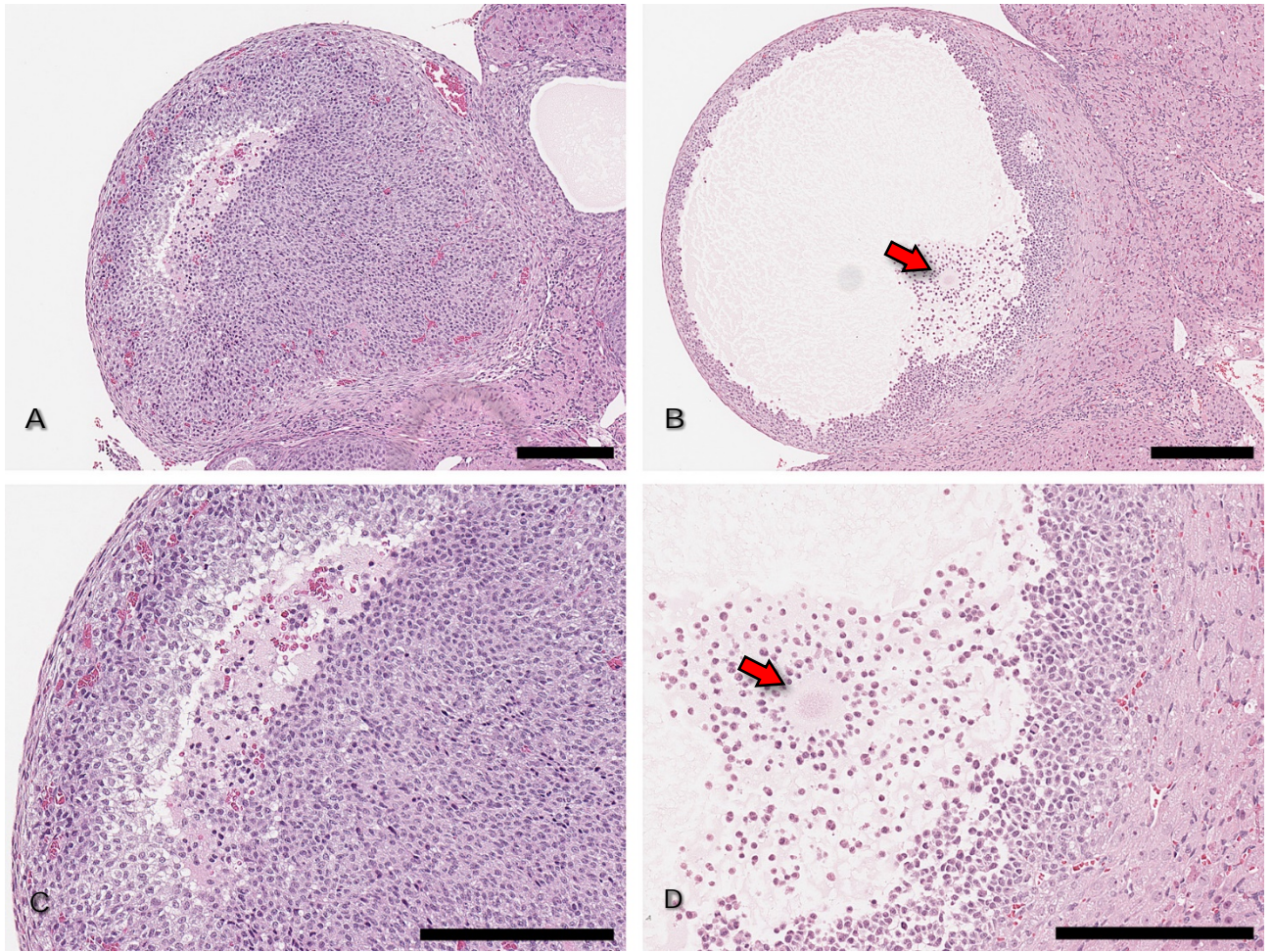


Figure 1- 1 Histopathology of UFs in the estrus

A : 排卵後にみられる新黄体は充実性で、大きな腔を持たず、顆粒膜細胞層と莢膜細胞層の境界は不明瞭である。黄体細胞の胞体は排卵前と比較して大型化していた。(4週間投与, 対照群)。B : 発情期にみられるUFは大きく拡張した腔をもち嚢胞状を呈しているが、顆粒膜細胞層と莢膜細胞層に変性および壊死はない。腔内に卵丘細胞を伴う卵細胞(矢印)を認める(4週間投与, 4 mg/kg IM 群)。C : Aの拡大像。顆粒膜細胞層と莢膜細胞層との境界は不明瞭で、小血管が認められる。D : Bの拡大像。矢印は卵細胞を示す。Bar はいずれも 200 μm 。

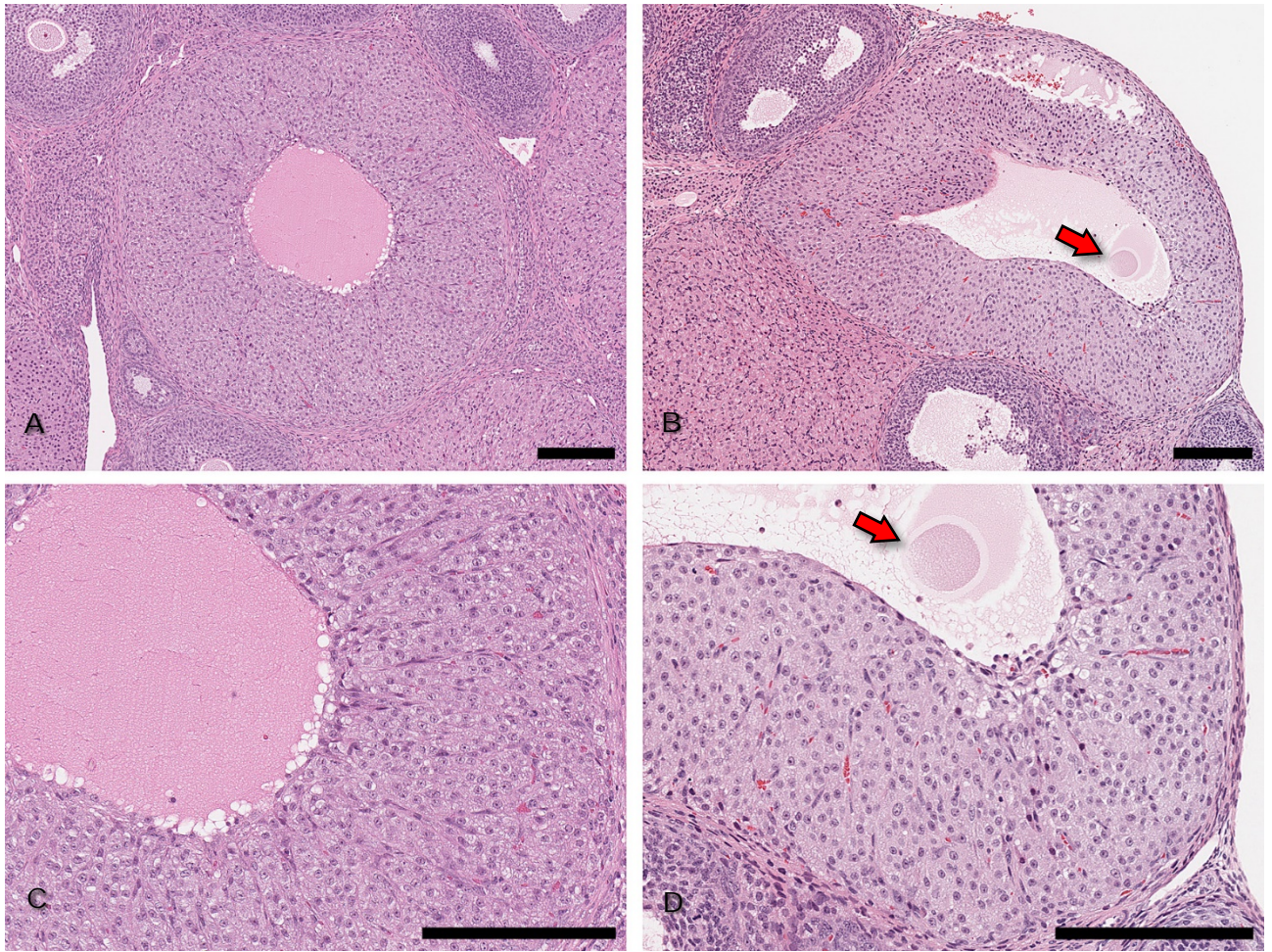


Figure 1-2 Histopathology of UFs in the metestrus

A : 発情後期, 対照群で認められた黄体嚢胞 (4 週間投与, 対照群)。B : 発情後期にみられた UF。黄体腔内に卵細胞 (矢印) を認める (2 週間投与, 4 mg/kg IM 群)。C : A の拡大像。黄体細胞は弱好塩基性を呈し, 細胞の胞体は発情期より大型化する。D : B の拡大像。透明体を伴う卵細胞 (矢印) を認める。黄体細胞に形態学的異常は認められない。Bar はいずれも 200 μ m。

2 成熟ラットの排卵時の卵胞における網羅的遺伝子発現解析

2.1 序論

COX2 は発情前期から発情期にかけて LH サージに反応して一過性に顆粒膜細胞に発現する (Espey and Richards, 2006)。また IM は COX2 の発現を阻害することで、排卵を阻止し UF を誘導する (Sirois *et al.*, 2004)。第 1 章において、IM の反復投与により、UF は発情期に顕著に認められ、発情休止期、発情前期には全く認められなかったことから、UF は COX2 が発現する発情前期から発情期にかけて誘導されると考えられた。生理学的に排卵のキーイベントである LH サージは発情前期の夕刻頃に起こることから、発情前期の夕刻から発情期の朝にかけては、形態学的な変化とともに種々の蛋白合成の亢進が起こるものと推察された。従って発情前期から発情期にかけての排卵をはさんだ期間において、これら分子の発現パターンを明らかにすることは、卵巣毒性評価において有用な情報を提供すると考えられる。

オリゴヌクレオチドを高密度に配列したマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析は新薬の毒性予測に広く用いられている。また、Jo *et al.* (2004) は 3 週齢のラットに PMSG および hCG を投与し、顆粒膜細胞から抽出した RNA をマイクロアレイで解析して、遺伝子発現の経時的な変化を網羅的に解析した。また、マウスを用いた同様の解析結果も報告されている (Tamba *et al.*, 2010)。ところが、これらの報告ではゴナドトロピン処理により強制的に排卵を誘発しており、無処置の成熟ラットにおいて経時的な遺伝子発現を網羅的に解析した報告はない。

LMD は光学顕微鏡下で病理組織標本を観察しながら、標的領域をレーザーによって切り出し、回収するツールである。Sakurada *et al.* (2006) はラット卵巣から前胞状卵胞および胞状卵胞を LMD で切出し、inhibin α および cytochrome P450 の mRNA の発現量を定量的 PCR で測定した。したがって、マイクロアレイと LMD を組み合わせることにより、他の細胞の混入のない卵胞特異的な遺伝子発現変化を検出できる。

そこで第 2 章では、無処置ラットから発情前期の 10:00、22:00 および発情期の 10:00 に卵巣を摘出し、LMD を用いて試料を作製し、排卵前から排卵後にかけての卵胞における経時的な遺伝子発現の網羅的解析を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 動物

8週齢の雌性 Crl:CD(SD)ラット（日本チャールス・リバー，滋賀）を，1週間の検疫および馴化期間の後実験に使用した。膣スミアにより全動物の性周期を5日間記録し，同一周期の動物を，ステンレス床網付きアルミニウム製ケージに，1ケージ当たり最大3匹収容した。飼育室環境は第1章に準じた。実験計画はアステラス製薬の動物実験委員会の承認を受け，動物の取り扱いは社内ガイドラインに従って行った。

2.2.2 サンプル採取

発情前期の10:00，22:00および発情期の10:00にそれぞれ3頭をエーテルで深麻酔し，放血死させた。摘出した卵巣はOCTコンパウンド（Tissue-Tek，Sakura Finetek，Torrance，CA，USA）に包埋し，ドライアイスで冷却したイソペンタン中で急速に凍結し， -70°C で保存した。

2.2.3 病理組織学的検査およびLMD

各凍結ブロックから7枚の連続切片を作製し，3枚（ $4\ \mu\text{m}$ 厚）を病理組織学的検査に，4枚（ $8\ \mu\text{m}$ 厚）をLMDに使用した。病理組織標本についてはHE染色と，閉鎖卵胞と排卵前の卵胞を鑑別するために抗Ki-67抗体（M7248，Dako Cytomation，Glostrup，Denmark）および抗COX2抗体（SC-1747，Santa Cruz Biochemistry，Santa Cruz，CA，USA）を用いた免疫染色を実施した。抗原賦活化のため，組織切片をクエン酸バッファー（S2031，Dako Cytomation）に浸漬し，電子レンジで10分間加熱した。抗Ki-67抗体および抗COX2抗体はそれぞれ1:50，1:100に希釈し，室温で1時間反応させた。二次抗体および発色キットとして mouse to mouse immunohistochemistry detection kit（CHEMICON international，Temecula，CA，USA）および horseradish peroxidase-rabbit antigoat IgG（Zymed，San Francisco，CA，USA）を使用した。発情前期10:00に摘出した卵巣で嚢胞状かつKi-67陽性/COX2陰性の卵胞をGraafian follicle（GF），発情前期22:00に摘出した卵巣で嚢胞状かつKi-67陽性/COX2強陽性の卵胞をpre-ovulatory follicle（PeF），発情期10:00に摘出した卵巣で充実性かつKi-67陽性/COX2弱陽性の卵胞（新黄体）post-ovulatory follicleを（PoF）とそれぞれ定義し，各切片上で位置を確認した。

GF, PeF と組織学的に類似する拡張閉鎖卵胞との contamination を避けるため、HE 染色, COX2 および Ki-67 染色による組織像を写真撮影し、前述の組織学的特徴に基づいて標的となる卵胞の切片上の位置をあらかじめ特定してから、GF, PeF および PoF を採取した (Figure 2- 1)。位置を確認した GF, PeF および PoF を LMD で採取するため、8 μm 厚で薄切した切片をフィルムスライド (MMI, Glatteburg, Zurich, Switzerland) 上で風乾し、histogene LCM frozen section staining kit (Arcturus Engineering, Mountain View, CA, USA) で染色した。LMD システム (CellCut Plus, MMI) を用いて、1 個体あたり、莖膜細胞層、顆粒膜細胞層および卵細胞を含む卵胞の切片を 15 枚採取し、RNA 抽出キット (RNeasy, Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、total RNA を抽出した。

2.2.4 網羅的遺伝子発現解析

31,099 の probe set (28,000 遺伝子) を配列した GeneChip[®] rat genome 230 2.0 アレイ (Affymetrix, Santa Cruz, CA, USA) を使用して抽出した RNA について網羅的解析を行った。すなわち、GeneChip 3' IVT express Kit (Affymetrix) を用いて各動物から抽出した 30 ng の total RNA からビオチン標識 cRNA を合成し、その 15 μg を Rat genome 230 2.0 アレイと 45°C, 60 rpm で 18 時間ハイブリダイズした。次に Fluidics station (Affymetrix) を用いてストレプトアビジンフィコエリスリンで発色させたアレイを、Gene array scanner (Affymetrix) でデジタルイメージ化し、Gene spring GX 7.3 ソフトウェア (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で発色強度を解析した。

2.2.5 統計解析

統計解析対象の probe set について、階層クラスター分析 (手法: ピアソンの相関係数) または発現変動遺伝子の抽出 (Welch t -test, $p < 0.05$ かつ 2 倍以上の増減) を行った。遺伝子の発現変動と既知パスウェイ、生物学的機能、疾患との相関についての解析は Ingenuity pathway analysis ソフトウェア (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) を用いて行った。これらの解析には Fisher の正確検定を用いた。

2.3 結果

2.3.6 病理組織学的観察

発情前期 22:00 の卵胞は、発情前期 10:00 のグラフ卵胞と比較してさらに大きく拡張した卵胞腔をもち、卵丘細胞は卵細胞周囲に散乱していた。発情期 10:00 にはすべての動物で卵胞破裂・排卵は完了しており、卵胞腔は消失して初期黄体が形成されていた。免疫組織化学的に、発情前期の 10:00 には GF の顆粒膜細胞および莢膜細胞が Ki-67 強陽性、COX-2 陰性、22:00 には PeF の顆粒膜細胞および莢膜細胞が Ki-67 陽性、顆粒膜細胞が COX-2 強陽性、発情期の 10:00 には PoF の黄体細胞は Ki-67 陽性、COX-2 弱陽性であった (Figure 2-2)。各サンプルとも LMD で卵胞を採取する前に、連続切片を用い HE 染色像と、免疫組織化学的染色像とを比較することで、正確に GF、PeF、および PoF を識別することができた。

2.3.7 網羅的遺伝子発現解析

各卵巣の凍結切片から LMD により 15 個前後の卵胞を摘出し約 30 ng の total RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。PeF または PoF における発現が GF における発現に対して統計学的に有意な変動を示した probe set は 17,407 種であった。階層クラスター解析により経時的遺伝子発現パターンを、[1] PeF において一過性に up-regulate または down-regulate され、PoF で GF の発現レベルに回帰するパターン、[2]GF および PeF ではほぼ同じ発現レベルだが、PoF で発現が up-regulate または down-regulate されるパターン、[3]GF-PeF-PoF と up-regulate を続けるパターン、および[4]GF から PeF にかけて up-regulate または down-regulate され、PoF でも発現レベルが維持されるパターンの 4 つに分類した (Table 2-1)。パターン[1]には up-regulation : 283 種、down-regulation : 790 種、パターン[2]には up-regulation : 624 種、down-regulation : 70 種、パターン[3]には up-regulation : 598 種、down-regulation : 0 種、パターン[4]には up-regulation : 251 種、down-regulation : 103 種の probe set がそれぞれ含まれていた。

パターン[1]では down-regulation が優位であったが、[2]から[4]では up-regulation が優位であった。これらハイブリダイゼーションの raw data およびクラスタリング解析の全結果は CIBEX data base, (Accession No. 137, <http://cibex.nig.ac.jp/data/index.html>) に掲載した。

発現変動が認められたプローブセットについて、PeF/GF比（パターン[1], [3]および[4]）またはPoF/GF比（パターン[2]）により、発現の変動幅が上位の中からその遺伝子の機能が排卵と関連しているもの（Table 2-2）、または関連が明らかでないもの（Table 2-3）を抽出した。パスウェイ解析の結果、様々なカテゴリーのパスウェイが抽出された（Table 2-4, Table 2-5, Table 2-6, Table 2-7）。グルタチオン代謝、解糖・糖新生、ピルビン酸代謝、胆汁酸生合成などのパスウェイはパターン[1]と[2]で共通してみられたが、パターン[1]では down-regulation が優位であったのに対して（Table 2-4）、パターン[2]では up-regulation が優位であった（Table 2-5）。またパターン[2]から[4]で抽出されたパスウェイは、アルギニンおよびプロリン代謝、Cdc42 シグナリング、ILK シグナリング、大食細胞および単核球 Fcγ受容体依存性食作用、好中球 fMLP シグナリング、結腸がんポリアミン制御、グルココルチコイド受容体シグナリング、PI3/AKT シグナリング、蛋白質ユビキチン化、Rac シグナリング、Rho A シグナリング、rho アクチン基盤運動能制御、アクチン細胞骨格シグナリング、軸索誘導シグナリング、クラスリン依存性エンドサイトーシスシグナリング、エフリン受容体シグナリングなどで up-regulation が優位な傾向が強かった（Table 2-5, Table 2-6, Table 2-7）。パターン[2]から[4]で重複して抽出されたこれらのパスウェイはパターン[1]では抽出されなかった。

2.4 考察

排卵に関与する遺伝子発現解析では、これまでは注射針で排卵前の卵胞から莢膜細胞、顆粒膜細胞を吸引する手法が一般的に用いられてきたが、間質細胞や大型の閉鎖卵胞の細胞などの混入が懸念されてきた (Jo *et al.*, 2004)。そこで本章の実験では COX2 免疫染色標本の観察により GF, PeF および PoF の位置を確認し、LMD 用の連続切片を作製することにより、莢膜細胞、顆粒膜細胞のみを正確に収集できた。本手法を用いれば病理組織学的な検査を実施した後で、その組織標本から目的とする細胞をそのまま回収できることから、卵巣の毒性評価にも応用できると考えられた。

PeF (発情前期 22:00) の卵胞腔は、GF (発情前期 10:00) からさらに大きく拡張していた (Figure 2-2)。その大きさと卵細胞周囲に散乱した卵丘細胞の形態は、第 1 章で観察された IM の投与で誘導された UF のそれらと類似した特徴を有していた (Figure 1-1)。従って UF は発情期に卵胞腔/黄体腔が顕著に拡張した嚢胞として認められる変化であるものの、拡張の程度は正常に発達した卵胞と同程度であることが明らかとなった。医薬品開発のための毒性試験では剖検は通常午前中か、午後の早い時間に行われるため、PeF で認められたような組織像は観察することができない。このような組織像の推移を考慮に入れることは、UF をはじめとする卵巣毒性の機序を考察する上で、重要であると考えられた。

網羅的遺伝子発現解析のため、病理組織学的検査と同じ観察ポイントで、発情前期の 10:00 から発情期の 10:00 にかけて 12 時間おきに卵巣から GF, PeF および PoF を LMD で採取し、抽出した RNA をマイクロアレイにより解析した。今回使用した Rat genome 230 2.0 array には 31,099 種の probe set (約 28,000 遺伝子) が搭載されており、それらの probe set のうち GF での発現に対する PeF または PoF の発現が有意な変動を示したものは 17,407 種であった。これらの発現変動をクラスター解析によりパターン[1]から[4]の 4 つの経時的発現変動パターンに分類した。パターン[1]は、LH サージの後に発現が上昇または低下し、排卵の後に GF とほぼ同レベルに戻るパターンであることから、LH サージ後早期に反応する遺伝子が多く含まれていると予想された。実際パターン[1]には、*Cox2* や *Pr* など排卵に必須と考えられている遺伝子が含まれていた。これに対し、パターン[2]~[4]では必ずしも排卵との関

連が明らかではない遺伝子が多かったが、これらの中でとくにパターン[2]に属した endothelin2

(*Edn2*) や a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1 (*Adamts1*) は卵胞破裂・排卵に必須な遺伝子と考えられている (Russell and Robker, 2007)。排卵後の卵胞は発情後期にかけて急速に黄体として発達するので、排卵後も高い発現レベルが維持されるパターン[2]~[4]には、卵胞破裂または黄体化・黄体維持に関与する遺伝子が含まれていると考えられる。パターン[1]の遺伝子は朝 (GF, 10:00) から夜 (PeF, 22:00) にかけて up-regulation が起こり、その後翌朝 (PoF, 10:00) に元のレベルに戻ることから、性周期とは無関係に概日リズムで変動する遺伝子も含まれていることが考えられた。

次いで PeF または PoF において GF と比較して 2 倍以上または 1/2 以下に発現が変動した遺伝子についてデータベース Ingenuity pathways analysis を用いてカテゴリー分けを行った。抽出されたパスウェイをパターン間で比較すると、パターン[1]と[2]、またはパターン[2]から[4]で重複するパスウェイがいくつか認められた。パターン[1]と[2]で共通して抽出されたパスウェイはグルタチオン代謝、解糖・糖代謝、胆汁合成に関連し、それぞれのパスウェイの遺伝子変動はパターン[1]では down-regulation、パターン[2]では up-regulation が優位の傾向であった。パターン[1]で down-regulate された probe set 数は up-regulate された probe set 数の 2.8 倍であった (Table 2- 1)。これらの中にはアミノ酸代謝、炭水化物代謝および脂質代謝に関連したパスウェイが多いことから (Table 2- 4)、パターン[1]には排卵とは無関係に発現が日内変動する遺伝子が多く含まれている可能性がある (Boden and Kennaway, 2006)。一方、パターン[2]から[4]ではアミノ酸代謝、細胞増殖、細胞免疫反応、疾患特異的パスウェイ、細胞内および二次メッセンジャーシグナリング、神経伝達物質および神経系シグナリング、生物体成長および発達に関連するパスウェイが共通して抽出された。またパターン[2]から[4]で抽出されたパスウェイで発現変動した probe set は、パターン[4]の TGFβシグナリングと C21 ステロイドホルモン代謝を除き、全て up-regulation が優位であった。

げっ歯類の卵巣における遺伝子発現解析に関する報告がいくつかある。Jo *et al.* (2004) は PMSG を投与し、さらに投与 48 時間後に hCG を投与することにより排卵を誘発した 3 週齢の SD ラットで、顆








粒膜細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、発現パターンを rat ovarian gene expression database (rOGED, <http://app.mc.uky.edu/kolab/rogedendo.aspx>) に公開している。rOGED は遺伝子のタイトルを入力すると PMSG/HCG 投与後、継時的な各遺伝子の発現がグラフで確認できるように設計されている。排卵との関連が報告されている遺伝子 (Table 2- 2) に注目すると、本章で up-regulation が認められた sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1 (パターン[1]), family with sequence similarity 110, member C (パターン[1]), stearyl-Coenzyme A desaturase 1 (パターン[3]) を除く遺伝子は、rOGED においても up-regulation を確認することができた。本章の実験と Jo *et al.* (2004) の実験では用いた動物の週齢 (10 週齢 vs. 3 週齢) および排卵誘発の刺激 (自然排卵 vs. PMSG/HCG プライミング), 採取組織と採取法 (LMD と組織切片 vs. needle puncture と新鮮顆粒膜細胞), 使用したマイクロアレイの製品 (Rat genome 230 2.0 array vs. Rat 230A, Rat 230B) などの条件が異なることを考慮すると、再現性の高い結果であると考えられた。


以上、本章では病理組織学的に発情前期から発情期までの卵胞の病理組織学的な推移を経時的に観察し、LMD により採取した卵胞 (莢膜細胞, 顆粒膜細胞および卵細胞) から抽出した RNA を GeneChip®マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、グラーフ卵胞の卵胞腔がさらに拡張し、卵胞破裂に至るまでの詳細の継時的な組織学的変化を観察することができた。さらに、網羅的遺伝子発現解析により、排卵の前後の卵胞/黄体には 4 通りの遺伝子発現変動パターンが存在することを示し、それぞれのパターンで発現変動する遺伝子および関連するパスウェイを明らかにすることができた。排卵に影響を及ぼす種々の化学物質を投与したラットの卵巣をこの実験デザインを用いて評価することにより、さらに排卵に関連のある遺伝子およびパスウェイを明らかにできると考えられた。

2.5 小括

LMD と GeneChip[®]マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により，ラット卵巢の卵胞における排卵前後の遺伝子発現変動を4通りのパターンに分類し，それぞれのパターンを示す遺伝子群および関連するパスウェイを明らかにした。

Table 2- 1 Patterns of gene expression changes

Pattern	Change in gene expression		No. of probe set*
[1]	GF<PeF>PoF		283
	GF>PeF<PoF		790
[2]	GF≈PeF<PoF		624
	GF≈PeF>PoF		70
[3]	GF<PeF<PoF		598
[4]	GF<PeF≈PoF		251
	GF>PeF≈PoF		103

 , GF, 10:00 on the proestrus day;  , PeF, 22:00 on the proestrus day;  , PoF, 10:00 on the estrus day;

≈, approximately equal; < and red allows, up-regulation; > and blue allows, down-regulation; *, untitled probe sets were included

Table 2- 2 Probe sets functionally related to ovulation

Pattern	Probe set ID	Gene title	Fold-up		Reference
			PeF/GF	PoF/GF	
	1368892_at	Adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary)	709.2*	1.7	Rat (Zhong and Kasson, 1994)
	1394908_at	Adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary)	380.2*	2.7	Rat (Zhong and Kasson, 1994)
	1387073_at	Synaptosomal-associated protein 25	331.1*	26.8	Rat and human (Grosse <i>et al.</i> , 2000)
	1377340_at	Tissue factor pathway inhibitor 2	87.0*	6.2	Human (Shimada <i>et al.</i> , 2001)
	1387459_at	Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	72.5*	5.8	Bovine (Sayasith <i>et al.</i> , 2007)
	1368733_at	Sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	54.3*	4.4	Mouse (Gershon <i>et al.</i> , 2007)
	1385251_at	Family with sequence similarity 110, member C	51.5*	4.9	Human (Hauge <i>et al.</i> , 2007)
[1]	1368527_at	<i>Cox2</i>	46.9*	1.6	Rat (Gaytan <i>et al.</i> , 2003)
	1368775_at	Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1	33.2*	8.9	Rat (Mizutani <i>et al.</i> , 2001)
	1371233_at	Versican	27.9*	4.0	Mouse (Russell <i>et al.</i> , 2003)
	1367949_at	Proenkephalin 1	22.4*	2.8	Porcine (Staszkiwicz <i>et al.</i> , 2007)
	1369105_a_at	Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	20.1*	0.6	Human (Hauge <i>et al.</i> , 2007)
	1368592_at	Interleukin 1 alpha	16.9*	4.6	Mouse (Gerard <i>et al.</i> , 2004)
	1370902_at	Aldo-keto reductase family 1, member B8	16.7*	3.1	Mouse (Brockstedt <i>et al.</i> , 2000)
	1387563_at	<i>Pr</i>	15.0*	1.2	Rat (Gaytan <i>et al.</i> , 2003)
	1369536_at	<i>Edn2</i>	2.2	57.1*	Mouse (Ko <i>et al.</i> , 2006)
[2]	1371530_at	Keratin 8	2.0	23.5*	Mouse (Gava <i>et al.</i> , 2008)
	1368258_at	<i>Apelin</i>	1.2	18.1*	Bovine (Shirasuna <i>et al.</i> , 2008)
	1370355_at	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	28.3*	145.2	Human (Feuerstein <i>et al.</i> , 2007)
[3]	1386953_at	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	15.1*	39.3	Human (Yong <i>et al.</i> , 2002)
	1368914_at	Runt related transcription factor 1	176.4*	63.6	Rat (Jo and Curry, 2006)
[4]	1368223_at	<i>Adamts1</i>	67.1*	57.1	Rat (Espey <i>et al.</i> , 2000)

Adamts1, A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 1; *Cox2*, Cyclooxygenase 2; *Edn2*, Endothelin 2; GF, Graafian follicle; PeF, Pre-ovulatory follicle; PoF, Post ovulatory follicle; *, Statistically significant ($p < 0.05$)

Table 2- 3 Top 5 up-regulated probe sets without function in the ovary

Pattern	Probe set ID	Gene title	Fold-up	
			PeF/GF	PoF/GF
[1]	1393645_at	Melanoma antigen family B, 16	147.7*	6.2
	1367733_at	Carbonic anhydrase II	110.1*	16.6
	1372510_at	Sulfiredoxin 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	76.9*	12.5
	1386922_at	Carbonic anhydrase II	38.2*	8.5
	1387314_at	Sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	36.0*	4.4
[2]	1379397_at	RAR-related orphan receptor alpha	2.9	48.6*
	1368021_at	Alcohol dehydrogenase 1 (class I)	1.0	44.2*
	1370963_at	Growth arrest specific 7	1.6	22.4*
	1368247_at	Heat shock 70 kD protein 1A/heat shock 70 kD protein 1B	1.0	20.8*
	1372246_at	Osteoclast stimulating factor 1	1.3	18.1*
[3]	1373324_at	Dual specificity phosphatase 14	26.3*	83.8
	1386921_at	Carboxypeptidase E	17.4*	63.4
	1371785_at	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	13.2*	28.9
	1377375_at	Amino adipate-semialdehyde synthase	12.7*	61.3
	1367661_at	S100 calcium binding protein A6	11.9*	50.0
[4]	1376481_at	<i>Adams9</i>	84.6*	106.2
	1370336_at	Oxidative stress induced growth inhibitor 1	53.8*	56.3
	1376265_at	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2	48.3*	25.2
	1376837_at	Hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	42.7*	42.7
	1387958_at	Aldo-keto reductase family 1, member C18	39.2*	38.6

Adams9, A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 9; GF, Graafian follicle; PeF, Pre-ovulatory follicle; PoF, Post ovulatory follicle; *, Statistically significant ($p < 0.05$)

Table 2- 4 Ingenuity pathway analysis of pattern [1]

Pathway category	Ingenuity canonical pathways	Down*	Up*
Amino Acid Metabolism	β -alanine Metabolism	9	0
	Glutathione Metabolism ¹	12	1
	Histidine Metabolism	5	1
	Lysine Degradation	14	3
	Tryptophan Metabolism	11	2
	Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	19	1
Carbohydrate Metabolism	Ascorbate and Aldarate Metabolism	5	0
	Butanoate Metabolism	13	1
	Fructose and Mannose Metabolism	6	1
	Galactose Metabolism	8	1
	Glycolysis/Gluconeogenesis ¹	12	1
	Inositol Metabolism	9	0
	Pentose Phosphate Pathway	6	0
	Propanoate Metabolism	15	1
	Pyruvate Metabolism ¹	10	2
Cardiovascular Signaling	Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	9	4
Cell Morphology	Mitochondrial Dysfunction	13	0
Energy Metabolism	Oxidative Phosphorylation	14	1
Glycan Biosynthesis and Metabolism	Keratan Sulfate Biosynthesis	3	3
	N-Glycan Degradation	6	0
Lipid Metabolism	Bile Acid Biosynthesis ¹	6	0
	Fatty Acid Biosynthesis	2	1
	Fatty Acid Elongation in Mitochondria	7	0
	Fatty Acid Metabolism	15	2
Metabolism of Cofactors and Vitamins	Metabolism of Xenobiotics by Cytochrome P450	10	0
	Ubiquinone Biosynthesis	9	0
Nuclear Receptor Signaling	Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	14	1
	LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	19	5
	PXR/RXR Activation	8	0
Xenobiotic Metabolism	Xenobiotic Metabolism Signaling	15	5

*, Number of up- or down-regulated probe sets ($p < 0.05$); 1, Found in patterns [1] and [2]

Table 2- 5 Ingenuity pathway analysis of pattern [2]

Pathway category	Ingenuity canonical pathways	Down*	Up*
Amino Acid Metabolism	Arginine and Proline Metabolism ²	2	4
	Glutathione Metabolism ¹	0	5
Carbohydrate Metabolism	Glycolysis/Gluconeogenesis ¹	1	9
	Pyruvate Metabolism ¹	1	6
Cellular Growth	Cdc42 Signaling ²	0	7
	EIF2 Signaling	0	8
	IGF-1 Signaling	2	5
	ILK Signaling ²	0	11
	Thrombopoietin Signaling	0	5
Cellular Immune Response	CCR3 Signaling in Eosinophils	0	8
	Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes ²	1	7
	fMLP Signaling in Neutrophils ²	0	9
	IL-3 Signaling	0	6
Disease-specific Pathways	Endometrial Cancer Signaling	0	
	Polyamine Regulation in Colon Cancer ²	0	6
Intracellular and Second Messenger Signaling	ERK/MAPK Signaling	0	12
	G Beta Gamma Signaling	0	7
	Glucocorticoid Receptor Signaling ²	1	14
	PI3K/AKT Signaling ³	0	8
	Protein Ubiquitination Pathway ²	0	13
	Rac Signaling ²	1	7
	RhoA Signaling ²	2	6
Lipid Metabolism	Bile Acid Biosynthesis ¹	1	3
Metabolism of Complex Lipids	Glycerolipid Metabolism	2	5
Neurotransmitters and Other Nervous System Signaling	Neuregulin Signaling	0	8
	Regulation of Actin-based Motility by Rho ²	0	8
Nuclear Receptor Signaling	Androgen Signaling	0	10
	FXR/RXR Activation	1	7
Nucleotide Metabolism	Purine Metabolism	0	18
Organismal Growth and Development	Actin Cytoskeleton Signaling ²	0	13
	Axonal Guidance Signaling ²	1	17
	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling ²	1	11
	Ephrin Receptor Signaling ²	0	12
	Prolactin Signaling	0	6
Pathogen-Influenced Signaling	Mechanisms of Viral Exit from Host Cells	0	4

*, Number of up- or down-regulated probe sets ($p < 0.05$); 1, Found in patterns [1] and [2]; 2, Found in patterns [2] and [3]; 3, Found in patterns [2]-[4]

Table 2- 6 Ingenuity pathway analysis of pattern [3]

Pathway category	Ingenuity canonical pathways	Down*	Up*
Amino Acid Metabolism	Arginine and Proline Metabolism ¹	0	6
	Lysine Biosynthesis	0	2
	Phenylalanine Metabolism	0	4
Cardiovascular signaling	Thrombin Signaling	0	10
Cellular Growth	Cdc42 Signaling ¹	0	7
	Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	0	12
	ILK Signaling ¹	0	11
	mTOR Signaling	0	8
	VEGF Signaling	0	6
Cellular Immune Response	4-1BB Signaling in T Lymphocytes	0	3
	CD28 Signaling in T Helper Cells	0	7
	Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes ¹	0	8
	fMLP Signaling in Neutrophils ¹	0	8
	HMGB1 Signaling	0	6
	IL-6 Signaling	0	7
	IL-8 Signaling	0	10
	Leukocyte Extravasation Signaling	0	10
	Lipid Antigen Presentation by CD1	0	2
	Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	0	11
	Cellular Stress and Injury	NRF2-mediated Oxidative Stress Response	0
Disease-specific Pathways	Polyamine Regulation in Colon Cancer ¹	0	5
	Prostate Cancer Signaling	0	6
Intracellular and Second Messenger Signaling	Gα12/13 Signaling	0	7
	Glucocorticoid Receptor Signaling ¹	0	13
	Integrin Signaling	0	18
	JAK/Stat Signaling	0	5
	Phospholipase C Signaling	0	14
	PI3K/AKT Signaling ²	0	8
	Protein Kinase A Signaling	0	15
	Protein Ubiquitination Pathway ¹	0	12
	Rac Signaling ¹	0	7
	Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	0	7
	RhoA Signaling ¹	0	10
Lipid Metabolism	Biosynthesis of Steroids	0	4
Neurotransmitters and Other Nervous System Signaling	Regulation of Actin-based Motility by Rho ¹	0	9
Nuclear Receptor Signaling	PPAR Signaling	0	6
Organismal Growth and Development	Actin Cytoskeleton Signaling ¹	0	12
	Axonal Guidance Signaling ¹	0	16
	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling ¹	0	13
	Ephrin Receptor Signaling ¹	0	16

*, Number of up- or down-regulated probe sets ($p < 0.05$); 1, Found in patterns [2] and [3]; 2, Found in patterns [2]-[4]

Table 2- 7 Ingenuity pathway analysis of pattern [4]

Pathway category	Ingenuity canonical pathways	Down *	Up*
Amino Acid Metabolism	Aminoacyl-tRNA Biosynthesis	0	3
Cell Cycle Regulation	Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	0	3
Cellular Growth	TGF- β Signaling	4	0
Intracellular and Second Messenger Signaling	PI3K/AKT Signaling ¹	1	5
Lipid Metabolism	C21-Steroid Hormone Metabolism	1	1
	Glycerophospholipid Metabolism	2	4
Metabolism of Complex Lipids	Phospholipid Degradation	1	4

*, Number of up- or down-regulated probe sets ($p < 0.05$); 1, Found in patterns [2]-[4]

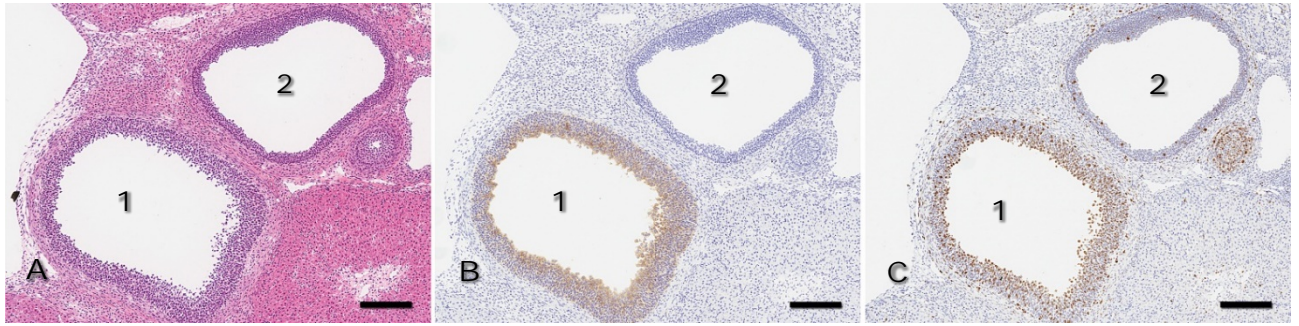


Figure 2-1 Differentiation of a target follicle from an atretic

囊胞状の PeF (1) は LMD 用の染色キットでは閉鎖卵胞 (2) との鑑別が困難である。そこで HE 染色 (A), COX2 免疫染色 (B) および Ki-67 免疫染色 (C) の結果を併せて検討した。PeF の細胞は COX2 陽性, Ki-67 陽性であったのに対し, 閉鎖卵胞の細胞は COX2 陰性で, ごくまばらに Ki-67 陽性細胞が認められた。Bar はいずれも 200 μ m。

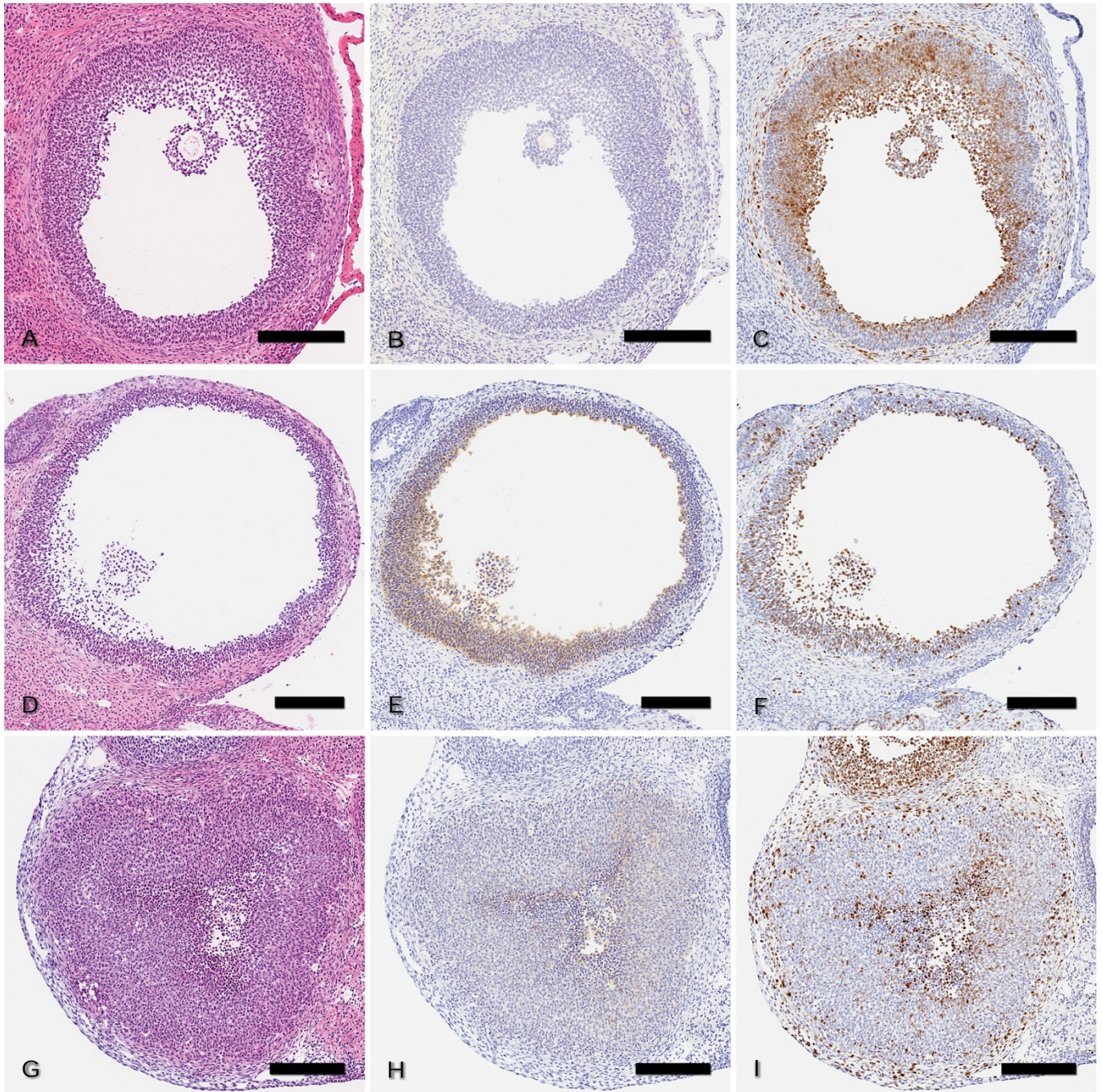


Figure 2- 2 Histology of GF, PeF, and PoF

GF (A, B, C), PeF (D, E, F), PoF (G, H, I) の HE 染色 (A, D, G), COX2免疫染色 (B, E, H) および Ki-67 免疫染色 (C, F, I)。いずれも凍結切片。卵胞腔は GF (発情前期 10:00), PeF (発情前期 22:00) と拡張を続けるが、排卵後の PoF (発情期 10:00) には充実性の新黄体となる。COX2 免疫染色の結果、GF では顆粒膜細胞、莢膜細胞とも陰性であったが、PeF では顆粒膜細胞は強陽性、PoF は弱陽性であった。Ki-67 免疫染色の結果、GF の顆粒膜細胞および莢膜細胞は強陽性、PeF および PoF では陽性細胞がまばらに観察された。Bar はいずれも 200 μm 。

3 Indomethacin または RU486 の単回投与による UF の誘導と卵胞における網羅的遺伝子発現解析

3.1 序論

化学物質の投与により卵巣に認められる種々の毒性所見の中でも、排卵の阻害により惹起される UF は、生殖機能への影響を示唆する重要な所見であると考えられる。第 1 章では、IM を 2 週間または 4 週間反復経口投与したラットで、発情期に UF が誘導されることを確認した。UF は HCG や PMSG などによる強制的な排卵刺激を用いずに、IM の反復投与のみでも惹起可能であり、2 週間投与と 4 週間投与で組織変化に違いはなかった。また、第 2 章ではラットの排卵前後の卵胞を、LMD を用いて採取し GeneChip[®]マイクロアレイにより、遺伝子発現を網羅的に解析した。遺伝子発現の変動を 4 通りのパターンに分類し、関連するパスウェイを明らかにした。これらの結果から、卵胞破裂を阻害する化合物を投与したラットの遺伝子発現プロファイルを正常ラットのそれと比較することにより、卵胞の破裂阻害に関連する遺伝子を明らかにできると考えられた。

Cox2 ノックアウトマウスで UF が誘導されること (Lim *et al.*, 1997, Lydon *et al.*, 1995)、および IM 投与によりラットおよびその他の動物種において UF が誘導されること (Karim and Hillier, 1979) から、排卵に COX2, PG を介したシグナル伝達経路が関与していることは疑いない。しかし、COX2 の阻害により発現が変化する遺伝子についてはまだ報告がない。

RU は 1982 年に Roussel-Uclaf 社が合成した人工妊娠中絶薬であり、PR およびグルココルチコイドレセプターに高い親和性を持つ (Figure 0- 1)。妊娠 49 日までの女性に RU50~200 mg/day を 4~7 日投与すると 50~86% の確率で、非外科的に胎児が排出されるが、副作用として重度の出血がおこると報告されている (Mahajan and London, 1997)。さらに、RU を排卵前のマウスまたはラットに単回投与すると卵胞の破裂が阻害されて UF が誘導されることも知られている (Gaytan *et al.*, 2003, Loutradis *et al.*, 1991)。PR を介するシグナル伝達経路が阻害された際の遺伝子発現変化は、主に *Pr* ノックアウトマウスを用いて検討されてきた (Robker *et al.*, 2009)。しかし、成熟ラットの卵胞破裂を RU で阻害した時の卵胞の遺伝子発現変化についてはこれまで報告がない。

そこで第3章では、成熟雌ラットにIMまたはRUをそれぞれ単回経口投与し、第2章と同様のLMDを用いた方法でUFからRNAを抽出、遺伝子発現プロファイルを無処置ラットと比較することで、卵胞破裂が阻害された際に変動する遺伝子を抽出し、機能ごとに分類した。

3.2 材料と方法

3.2.1 動物

8週齢雌の Crl:CD(SD)ラット（日本チャールス・リバー，滋賀）を，1週間の検疫および馴化期間の後，9週齢で実験に供した。膣スメアの観察により5日間動物の性周期を記録し，同一周期の動物ごとに，ステンレス床網付きアルミニウム製ケージに最大各3匹を収容した。飼育室環境は1.2.1項に準じた。実験計画はアステラス製薬の動物実験委員会の承認を受け，動物の取り扱いには社内ガイドラインに沿って行った。

3.2.2 被験物質および投与量

IM (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) を0.5%メチルセルロース溶液（信越化学工業，東京）に懸濁し，0.8 mg/mLとなるようにした。第1章と同様4 mg/kgを単回の投与量とした。一方，RU (Sigma-Aldrich) は20 mg/mLになるよう0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し，2週間または4週間の反復投与でUFが誘導される量として100 mg/kgを単回投与の投与量とした（Tsubota *et al.*, 2009, Tamura *et al.*, 2009）。

3.2.3 実験1（UFの病理組織学的検査）

UFの誘導に最適な投与時間を検討するために，発情前期のラットに4 mg/kgのIMを15:00および18:00に，また100 mg/kgのRUを10:00および13:00にそれぞれ単回投与した（1群各5頭）。投与の翌日10:00に，深麻酔下で放血死させた。卵巣，子宮および膣を10%中性緩衝ホルマリンで固定し，パラフィンブロックを作製，HE染色を行った。対照群として無処置雌ラット5匹を，発情期の朝10:00に剖検し，同様に卵巣，子宮および膣の病理組織標本を作製した（Table 3-1）。

3.2.4 実験2（LMDおよび網羅的遺伝子発現解析）

UFについて網羅的遺伝子発現解析を行うため，発情前期のラットに4 mg/kgのIMを16:00に，100 mg/kgのRUを10:00にそれぞれ単回投与した（1群各6匹）。発情前期22:00および翌日発情期10:00に各群3匹をそれぞれエーテルで麻酔し，放血死した（Table 3-1）。摘出した卵巣はOCTコンパウンド（Sakura Finetek）に包埋し，ドライアイスで冷却したイソペンタン中で急速に凍結，-70°Cで保

存した。対照群として6匹の発情前期の無処置ラットについて、処置群と同様に、同様に卵巣、子宮および膈を採取した。

卵巣の凍結ブロックから連続切片を作製し、4 μm 厚の切片については、HE染色と抗COX2抗体 (Santa Cruz Biochemistry) を用いた免疫染色を実施し、8 μm 厚の切片は、LMDおよび網羅的遺伝子発現解析に使用した。RNA抽出および網羅的遺伝子発現解析は第2章と同様に実施した。

遺伝子発現データを取得できた probe set について、発現量が2倍以上 (Welch-test, $p < 0.05$) に up-regulate されたものを抽出した。さらに Gene ontology database (GOD, <http://www.geneontology.org>) を用いて抽出された probe set の機能を検索し、排卵・黄体化関連、雌性ホルモン・プロスタグランジン関連、血管新生関連、蛋白分解関連、細胞間接着・細胞外基質関連、脂質・ステロイド代謝関連に分類した。

3.3 結果

3.3.1 実験 1 (UF の病理組織)

IM または RU 投与群の発情期 10:00 に摘出した卵巣において UF が認められた。UF の発現頻度 [UF 数 / (UF 数+新黄体数)] は両群とも投与した時間に依存せず, IM 投与群では約 50%, RU 投与群では 100%であった (Table 3-2)。病理組織学的に, IM および RU 投与群に認められた UF は大きく拡張した腔をもち, 腔内に卵細胞と卵丘細胞が認められた (Figure 3-1)。IM 投与群で認められた UF は第 1 章の反復投与実験で認められた UF (Figure 1-1) と同様に顆粒膜細胞層と莢膜細胞層の境界が不明瞭で, 顆粒膜細胞は RU 投与群と比較して大きな胞体を有していた。一方, RU 投与群で認められた UF では顆粒膜細胞の胞体は小さく, 上述の境界は明瞭であった。また IM 投与群では血管が顆粒膜細胞層および莢膜細胞層に認められたが, RU 投与群では莢膜細胞層のみで認められた。

IM 投与群では, 子宮内膜上皮の皺壁が顕著となり, 内膜上皮細胞及び子宮腺細胞の空胞変性やアポトーシスなど, 発情期に典型的な変化がみられた。これに対し RU 投与群の子宮では, 子宮内膜の皺壁形成は IM 投与群より軽微で, 子宮腺細胞において IM 投与群と同様に空胞変性やアポトーシスが認められたものの, 内膜上皮には認められなかった。IM または RU 投与群の膣では, 重層扁平上皮の角化亢進がみられた (Figure 3-2)。

3.3.2 実験 2 (LMD および網羅的遺伝子発現解析)

IM および RU 投与群において発情前期 22:00 および発情期 10:00 に採取した卵巣の PeF および UF の顆粒膜細胞はそれぞれ COX2 陽性であった (Figure 3-3)。各卵巣から LMD により 15 個前後の卵胞を摘出し 30 ng 程度の total RNA を抽出した。これらのサンプルについて網羅的遺伝子発現解析を行い、用いたマイクロアレイ上の全 probe set ID とそれらのシグナル強度を米国国立バイオテクノロジーセンターが運営するデータベース [the Gene Expression Omnibus database(GEO), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54584>] に掲載した。対照群に対して統計学的に発現量が 2 倍以上に up-regulate, または 1/2 以下に down-regulate された probe set 数は, IM 投与群では PeF で 87 種, UF で 120 種, RU 投与群では PeF で 348 種, UF で 584 種であった (GOD で gene title または function が定義されていないものを除く)。それらのうち, down-regulate された probe set について, 排卵・黄体化関連 (Table 3-3), 雌性ホルモン・プロスタグランジン関連 (Table 3-4), 血管新生関連 (Table 3-5), 蛋白分解関連 (Table 3-6), 細胞間接着・細胞外基質関連 (Table 3-7), 脂質・ステロイド代謝関連 (Table 3-8) に分類した。抽出された probe set のうち, 排卵阻害との関連が証明されているものは *Adamts1* (Table 3-3, Table 3-6), *Edn2* (Table 3-3, Table 3-4), epidermal growth factor receptor (*Egfr*, Table 3-3, Table 3-7, Table 3-8), heme oxygenase 1 (*Hmox1*, Table 3-4, Table 3-5), plasminogen activator, tissue-type (*Plat*, Table 3-5, Table 3-6), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Pparg*, Table 3-4, Table 3-8) および vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*, Table 3-3, Table 3-5) であった (Table 3-9)。また排卵阻害との関連が疑われるものは, *Adamts9* (Table 3-6), angiopoitin 2 (*Angpt2*, Table 3-5), endothelin receptor type A (*Ednra*, Table 3-5), lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (*Lyve1*, Table 3-7) および wingless-type MMTV integration site family, member 4 (*Wnt4*, Table 3-3, Table 3-4, Table 3-7, Table 3-8) であった。

3.4 考察

第1章でIMの反復投与により誘導されたUFは、発情休止期、発情前期には全く認められなかった (Table 1-2)。またIMまたはRUの薬理作用の標的であるCox2またはPrは、無処置雌ラットにおいて発情前期の10:00から発情期の10:00にかけて一過性にup-regulateされていることが第2章の結果から確認できた。従ってIMまたはRU投与によるUFの誘導および卵胞の遺伝子発現に対する影響を検討するには単回投与で十分であると考えられた。単回投与で高率にUFを誘導するためには、Cox2またはPrのup-regulationのタイミングで、IMまたはRUが十分な血漿中濃度を保っている必要があることから、投与タイミングとUFの頻度の相関を検討するため、実験1では異なる投与タイミングによる病理組織学的検査を実施した。

IMまたはRUの単回投与により、それぞれ約50%と100%の卵胞で破裂が阻害されていた。IMおよびRU投与群において、子宮および膣は発情期に特徴的な組織像を示していた。またLHサージに対する反応として、PeFおよびUFにおけるCOX2の発現が確認された。従って、IMまたはRUの投与によりLHサージに対する排卵反応と発情徴候の出現は起こるものの、卵胞の破裂が阻害されたと考えられた。IM投与群のUFの頻度は約50%に留まったが、用いた4 mg/kgという用量は状態悪化・死亡が認められる量であることから、ほぼ単回投与の最大耐量と考えられた。一方RU100 mg/kgの単回投与では、一般状態の変化および病理学的異常は認められなかった。またIMおよびRU投与群で投与した時間帯によるUFの発現頻度の差は認められなかった。以上のことから、網羅的遺伝子発現解析で用いる投与量および投与時間をIM投与群は4 mg/kg, 16:00, RU投与群は100 mg/kg, 10:00とした (Table 3-1)。

IMまたはRU投与の実験の結果、UFの誘導と関連が深いと考えられた遺伝子は、それぞれ *Angpt2*, *Hmox1*, *Vegfa*, *Wnt4* と *Adamts1*, *Adamts9*, *Angpt2*, *Edn2*, *Ednra*, *Egfr*, *Hmox1*, *Lyve1*, *Plat*, *Pparg*, *Vegfa* であった (Table 3-9)。

Adamts1 欠損マウスではwild typeに比べて排卵数が低下すること (Shindo *et al.*, 2000) から、RU投与群で認められた*Adamts1*のdown-regulationはUFの誘導に関連すると考えられた。一方、第2章の結

果、加えて *Adamts1* および *Adamts9* は無処置ラットにおいて発情前期 10:00 から 22:00 にかけて急激に up-regulate されること (Table 2-2, Table 2-3), また *Adamts1* および *Adamts9* はともに versican を基質とする蛋白分解酵素であること (Jungers *et al.*, 2005) から, *Adamts9* も *Adamts1* と同様に UF の誘導に関連があると考えられた。また *Lyve1* は体液の恒常性や免疫細胞の動的制御に関与し, *Adamts1* により調節されている (Brown *et al.*, 2006, Brown *et al.*, 2010)。従って *Lyve1* の down-regulation は排卵過程における卵胞液の生成などに関連していることが疑われた。

第2章で, 無処置雌ラットにおいて *Edn2* の up-regulation が発情前期 22:00 から発情期 10:00 にかけて認められた (Table 2-2)。さらに本章では, RU 投与により *Edn2* および *Ednra* の down-regulation が認められた。また *Edn* による平滑筋収縮作用は *Ednra* を介したものであることが知られている (Bridges *et al.*, 2010)。一方, ウサギでは卵胞の内圧は破裂の直前まで一定であること (Espey and Lipner, 1963), また卵巣には機能的な平滑筋組織はほとんど存在しないこと (Espey, 1978) が知られている。さらに, *Edn* 受容体拮抗剤をラットに投与すると UF が誘導されることから (Ko *et al.*, 2006), *Edn2-Ednra* によるシグナル伝達経路が卵胞破裂の過程に関与していることは疑いないが, 平滑筋の収縮により卵胞を周囲から圧迫して破裂に導くような直接的なものではなく, 血管平滑筋の収縮などを介した間接的な作用により卵胞破裂のきっかけが作られると考えられた。

Egfr のリガンドである amphiregulin (*Areg*) や epiregulin (*Ereg*) は *in vitro* で卵細胞の成熟を促し, *Cox2* の up-regulation を誘導することが知られている (Conti *et al.*, 2006)。加えてマウスでは *Egfr*, および *Areg* と *Ereg* の point mutation により排卵が阻害されていることから, *Egfr* を介したシグナル伝達経路が卵細胞の発達および排卵に必須であると考えられている (Hsieh *et al.*, 2007)。

Hmox1 はヘムを分解し, ビリベルジン, 鉄, 一酸化炭素を生成する反応を触媒する。Zenclussen *et al.* (2012) は *Hmox1* 欠損マウスで排卵数および受胎能が低下することを報告し, その原因として分解されずに増加したヘムによる細胞毒性を指摘している。しかし, 本実験で認められた UF において細胞毒性を示唆する変性所見は認められなかったことから, UF 誘導の作用機序との関連は不明である。

第2章で無処置雌ラットにおいて PPAR シグナリングパスウェイに関与する6種の probe set が発情前期から発情期にかけて up-regulate された (Table 2-6)。Pparg は Edn2 および Vegfa を介した血管新生、組織再構築、アロマターゼ活性制御、ステロイド代謝に関与すると考えられている (Komar, 2005)。さらに Pr 欠損マウスでは Pparg の発現が down-regulate されること (Kim et al., 2008)、および、Pparg コンディショナルノックアウトマウスでは排卵数の低下が認められることなどから (Kim et al., 2008)、RU 投与群で認められた Pparg の down-regulation が UF の誘導と関連していると考えられた。

無処置雌ラットにおける Plat の発現は、GF に対して PeF および PoF でそれぞれ約 17 倍、約 32 倍に up-regulate されていた (<http://cibex.nig.ac.jp/data/CBX137/Pattern4UP.txt>)。Tsafriri et al. (1989) は抗 PLAT 抗体を投与したラットで、UF の誘導と排卵数の低下を確認し、PLAT および plasminogen (PLG) が卵胞破裂前の周囲組織の軟化に関与していると考えたのに対し、Plat 欠損マウスおよび Plg 欠損マウスでは受胎能には異常が見られなかったこと (Ny et al., 1997, Ny et al., 1999) から、Plat および Plg の発現と UF の関連については更なる検討が必要と考えられた。

IM および RU 投与群において Vegfa および Angpt2 の down-regulation が認められた。これに対し、第2章では無処置雌ラットの PoF では GF に対して約 16 倍の Vegfa の up-regulation (<http://cibex.nig.ac.jp/data/CBX137/Pattern2UP.txt>) と、VEGF シグナリングパスウェイに関与する6種の probe set の up-regulation が認められた (Table 2-6)。Wulff et al. (2002) は VEGF 受容体を FC 蛋白に融合した抗体を投与することにより VEGF を阻害したマウスにおいて、莖膜細胞層が菲薄化し、卵胞の発達および排卵が阻害されたことを報告している。第2章において、Angpt2 も無処置雌ラットの PoF で GF に対して約 3 倍に up-regulate されていた (<http://cibex.nig.ac.jp/data/CBX137/Pattern3UP.txt>)。Angpt2 は排卵の前後に、Vegf の存在下で血管新生を促進すると考えられている (Wiegand et al., 2000) ことから、Vegf と Angpt2 の up-regulation による血管新生は正常な排卵に重要であると考えられた。

Wnt4 は cadherin- β catenin による細胞間接着およびステロイド代謝を介して、性分化と性成熟および卵胞の発達に関与し、*Wnt4* コンディショナルノックアウトマウスでは胞状卵胞数が減少することが知られている (Nelson and Nusse, 2004, Boyer *et al.*, 2010)。さらに、マウスおよびラットの培養顆粒膜細胞を PMSG または HCG で処理すると *Wnt4* が up-regulate されること (Hsieh *et al.*, 2002) から、*Wnt4* は LH サージに反応して up-regulate され、排卵前後の何らかのイベントに関与すると推察されている。IM 投与群の PeF における *Wnt4* の発現は、無処置ラットの約 1/10 (0.104 倍) に down-regulate されていたことから、*Wnt4* の発現と卵胞破裂との関連が疑われる。

UF が誘導された IM および RU 投与群のラットの子宮および膣では、LH サージに対するレスポンスと考えられる子宮内膜の空胞変性やアポトーシス、膣重層扁平上皮の角化亢進などの組織学的変化が認められたが、RU 投与群の卵巣顆粒膜細胞層および莖膜細胞層、子宮および膣の組織像は、IM 投与群と比較すると発情期への移行がやや遅延していた。

本章で行った網羅的遺伝子発現解析において、IM または RU 投与群に共通して認められ、排卵阻害に関連すると考えられた遺伝子発現の変化は、血管新生に関連する *Angpt2*, *Hmox1* および *Vegfa* の down-regulation であった。IM 投与群では、上記に加え *Wnt4* の down-regulation と排卵阻害との関連が疑われた。

RU 投与群では、*Adamts1*, *Adamts9*, *Egfr*, *Edn2*, *Ednra*, *Lyve1*, *Plat*, *Pparg* の down-regulation が認められ、UF の誘導と細胞外基質や卵胞周囲蛋白の分解、卵胞周囲平滑筋の収縮、卵胞液の生成および血管新生などとの関連が示唆された。これらのうち、*Adamts1*, *Edn2*, *Pparg* については、RU の薬理作用の標的である *Pr* をノックアウトしたマウスにおいて down-regulate されることが報告されていること (Robker *et al.*, 2009) から薬物投与との関連は明らかである。これらの他、第 2 章で排卵前に一過性に pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1 (*Pacap*) と synaptosomal-associated protein 25 (*Snap25*) の up-regulation が認められた (Table 2-2) が、*Pacap* は RU486 投与マウスで (Park *et al.*, 2000), *Snap25* は *Pr* ノックアウトマウス (Shimada *et al.*, 2007) で down-regulation が認められていることから、これまで *Pr* を介したシグナル伝達経路で制御されていると考えられていたが、本章では RU

投与による *Pacp* と *Snap25* の **down-regulation** は認められなかった。また、PMSG, HCG の投与により排卵刺激を与えた 4-8 時間後の *Pr* ノックアウトマウスでは *cathepsin L*, *Areg*, *Ereg* の **down-regulation** が認められ、排卵阻害との関連が示唆されている (Hsieh *et al.*, 2007) が、第 2 章の結果からこれらの遺伝子は無処置ラットで排卵前には **up-regulate** されず、また、本章の結果から RU 投与群においても **down-regulation** は明らかではなかった。これまでの報告と本研究の結果との相違は、自然排卵・強制排卵、RU 投与・*Pr* ノックアウトなど実験条件の違いによると思われる。

卵胞破裂の直接の原因は、顆粒膜細胞層、莖膜細胞層に炎症に類似した変化が惹起され、また周囲の結合組織で細胞外基質が劣化・変性することによると考えられている (Espey and Richards, 2006)。RU 投与群ではこの一連の変化に関連した遺伝子の **down-regulation** が観察されたが、IM 投与群では血管新生関連の *Vegfa* および *Angpt2* の **down-regulation** は認められたものの、蛋白分解関連遺伝子の発現はほとんど変化しなかった。今回、IM または RU の単回投与により UF が誘導されたが、その作用機序はそれぞれで異なっていると考えられた。

3.5 小括

IM または RU を単回投与したラットの PeF および UF から抽出した RNA を網羅的に定量し、UF 誘導との関連が疑われる遺伝子を検索した。その結果、過去の報告で UF 誘導との関連が示唆されている遺伝子に加え、*Adamts9* を新たに見出した。これらの遺伝子の発現変化を調べることは、新規化合物の卵巣毒性予測またはそのメカニズムの考察に有用であると考えられた。

Table 3- 1 Number of animals assigned to each timepoint

Experiment	Treatment	Dose	Dosing time	Number of animals used	
				22:00 on proestrus day	10:00 on estrus day
Experiment 1 (Histopathology)	Control	NA	NA	0	5
	IM	4 mg/kg	15:00	0	5
			18:00	0	5
	RU	100 mg/kg	10:00	0	5
13:00			0	5	
Experiment 2 (LMD & Genechip®)	Control	NA	NA	3	3
	IM	4 mg/kg	16:00	3	3
	RU	100 mg/kg	10:00	3	3

IM, Indomethacin; RU, RU486; LMD, laser microdissection; NA, not applicable

Table 3- 2 Histopathology of unruptured follicles

	Control	IM		RU	
		15:00	18:00	10:00	13:00
Number of animals examined	5	5	5	5	5
Total number of follicles ¹⁾					
0	0	0	0	0	0
1-2	0	0	0	2	1
3-4	3	2	1	1	2
≥5	2	3	4	2	2
Total number of UF					
0	5	0	1	0	0
1-2	0	3	0	2	1
3-4	0	1	3	1	2
≥5	0	1	1	2	2
Frequency of unruptured follicles ²⁾	0%	54%	52%	100%	100%

1) A sum of ruptured (new corpora lutea) and unruptured follicles found in both sides of the ovary

2) The mean ratio of no. of unruptured follicles to the total no. of follicles

IM, Indomethacin; RU, RU486; UF, unruptured follicle

Table 3- 3 Ovulation- and/or luteinization-related genes

Treatment	Follicle type	Probe set ID	Gene title	Multiple ($p < 0.05$)	Other functions
IM	PeF	1368641_at	<i>Wnt4</i>	0.104	Tables 3-4, 3-7, 3-8
	UF	1370081_a_at	<i>Vegfa</i>	0.313	Table 3-5
RU		1368223_at	<i>Adams1</i>	0.211	Table 3-6
		1370034_at	Cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)	0.238	
	PeF	1370941_at	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0.276	Tables 3-4, 3-5, 3-7
		1370830_at	<i>Egfr</i>	0.381	Tables 3-7, 3-8
		1395986_at	Slit homolog 2 (Drosophila)	0.419	Tables 3-5, 3-7
		1371223_a_at	Leptin receptor	0.180	Tables 3-4, 3-5, 3-8
RU		1369536_at	<i>Edn2</i>	0.182	Table 3-4
	UF	1370081_a_at	<i>Vegfa</i>	0.296	Table 3-5
		1368223_at	<i>Adams1</i>	0.362	Table 3-6
		1387202_at	Intercellular adhesion molecule 1	0.490	Table 3-7

Adams1, ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1; *Edn2*, endothelin 2; *Egfr*, epidermal growth factor receptor; IM, indomethacin; PeF, pre-ovulatory follicle; RU, RU486; Multiple, fold-changes to control group; UF, unruptured follicle; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; *Wnt4*, wingless-type MMTV integration site family, member 4

Table 3- 4 Female sex hormone- and/or prostaglandin-related genes

Treatment	Follicle type	Probe set ID	Gene title	Multiple ($p < 0.05$)	Other functions
IM	PeF	1368641_at	<i>Wnt4</i>	0.104	Tables 3-3, 3-7, 3-8
	UF	1387651_at	Aquaporin 1	0.165	Tables 3-5, 3-8
		1370080_at	<i>Hmox1</i>	0.363	Table 3-5
		1383860_at	Fos-like antigen 2	0.438	
RU	PeF	1369182_at	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	0.060	Table 3-5
		1370026_at	Crystallin, alpha B	0.092	
		1368492_at	Hematopoietic prostaglandin D synthase	0.116	Table 3-8
		1392382_at	Transforming growth factor, beta 2	0.172	Tables 3-5, 3-7
		1370941_at	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0.276	Tables 3-3, 3-5, 3-7
		1369179_a_at	<i>Pparg</i>	0.290	Table 3-8
		1370249_at	Translocator protein	0.455	Table 3-8
		1368259_at	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	0.466	Table 3-8
		1373803_a_at	Growth hormone receptor	0.496	
	UF	1368021_at	Alcohol dehydrogenase 1 (class I)	0.030	
		1368519_at	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	0.065	Tables 3-5, 3-6, 3-7
		1376425_at	Transforming growth factor, beta 2	0.112	Tables 3-5, 3-7
		1370026_at	Crystallin, alpha B	0.120	
		1372929_at	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	0.120	
		1371223_a_at	Leptin receptor	0.180	Tables 3-3, 3-5, 3-8
		1369536_at	<i>Edn2</i>	0.182	Table 3-3
		1387631_at	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	0.190	Table 3-8
		1368146_at	Dual specificity phosphatase 1	0.222	
		1367631_at	Connective tissue growth factor	0.226	Tables 3-5, 3-7
UF	1370805_at	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	0.249	Table 3-5	
	1369953_a_at	CD24 molecule	0.252	Tables 3-7, 3-8	
	1387925_at	Asparagine synthetase	0.265		
	1369182_at	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	0.272	Table 3-5	
	1370080_at	<i>Hmox1</i>	0.281	Table 3-5	
	1376191_at	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	0.329	Table 3-8	
	1370341_at	Enolase 2, gamma, neuronal	0.331		
	1367973_at	Chemokine (C-C motif) ligand 2	0.357	Table 3-5	
	1375043_at	FBJ osteosarcoma oncogene	0.361		
	1388178_at	Nuclear receptor coactivator 3	0.457		
1367687_a_at	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	0.497			
	1370642_s_at	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	0.498	Tables 3-5, 3-8	

Edn2, endothelin 2; *Hmox1*, heme oxygenase 1; IM, indomethacin; Multiple, fold-changes to control group; PeF, pre-ovulatory follicle; RU, RU486; *Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; UF, unruptured follicle; *Wnt4*, wingless-type MMTV integration site family, member 4

Table 3- 5 Angiogenesis- and/or blood vessel-related genes

Treatment	Follicle type	Probe set ID	Gene title	Multiple ($p < 0.05$)	Other functions
IM	PeF	1368785_a_at	Paired-like homeodomain 2	0.457	
		1384306_at	ELK3, member of ETS oncogene family	0.138	
	UF	1387651_at	Aquaporin 1	0.165	Tables 3-4, 3-8
		1370081_a_at	<i>Vegfa</i>	0.313	Table 3-3
		1370080_at	<i>Hmox1</i>	0.363	Table 3-4
		1374207_at	<i>Angpt2</i>	0.470	
		1388583_at	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	0.492	
	PeF	1369182_at	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	0.060	Table 3-4
		1370097_a_at	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0.064	
		1392382_at	Transforming growth factor, beta 2	0.172	Tables 3-4, 3-7
		1370941_at	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0.276	Tables 3-3, 3-4, 3-7
		1367974_at	Annexin A3	0.350	
		1383641_at	<i>Ednra</i>	0.359	
		1378342_at	<i>Ednra</i>	0.364	
		1387854_at	Collagen, type I, alpha 2	0.377	
1395986_at		Slit homolog 2 (Drosophila)	0.419	Tables 3-3, 3-7	
1371517_at		Growth factor receptor bound protein 10	0.422		
1370933_at		Myosin IE	0.437		
1392990_at		SRY (sex determining region Y)-box 17	0.447		
1384308_at		Meis homeobox 1	0.449		
1370864_at		Collagen, type I, alpha 1	0.457		
1370959_at		Collagen, type III, alpha 1	0.466	Table 3-7	
1388111_at	Elastin	0.470	Table 3-7		
1370155_at	Collagen, type I, alpha 2	0.482			
1387135_at	A disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)	0.483	Tables 3-6, 3-7		
1388116_at	Collagen, type I, alpha 1	0.488			
RU	1368519_at	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	0.065	Tables 3-4, 3-6, 3-7	
	1376425_at	Transforming growth factor, beta 2	0.112	Tables 3-4, 3-7	
	1367800_at	<i>Plat</i>	0.135	Table 3-6	
	1371223_a_at	Leptin receptor	0.180	Tables 3-3, 3-4, 3-8	
	1370492_a_at	Fms-related tyrosine kinase 1	0.192		
	1370097_a_at	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0.222		
	1369958_at	Ras homolog gene family, member B	0.225	Table 3-7	
	1367631_at	Connective tissue growth factor	0.226	Tables 3-4, 3-7	
	1373661_a_at	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0.242		
	1389244_x_at	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0.249		
	1370805_at	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	0.249	Table 3-4	
	1381012_at	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1	0.265		
	1369182_at	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	0.272	Table 3-4	
	1370080_at	<i>Hmox1</i>	0.281	Table 3-4	
	UF	1370081_a_at	<i>Vegfa</i>	0.296	Table 3-3
1373410_at		Myocyte enhancer factor 2C	0.306		
1398273_at		Ephrin A1	0.310		
1375570_at		Notch homolog 4 (Drosophila)	0.337		
1374207_at		<i>Angpt2</i>	0.347		
1367973_at		Chemokine (C-C motif) ligand 2	0.357	Table 3-4	
1368171_at		Lysyl oxidase	0.379		
1373829_at		Fibroblast growth factor receptor 2	0.394		
1371250_at		Platelet factor 4	0.452		
1388782_at		Transcription factor 21	0.459		
1370333_a_at		Insulin-like growth factor 1	0.469	Table 3-7	
1373000_at		Sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	0.485	Table 3-7	
1367974_at		Annexin A3	0.495		
1370642_s_at		Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	0.498	Table 3-4, 3-8	

Angpt2, angiopoietin 2; *Ednra*; endothelin receptor type A; *Hmox1*, heme oxygenase 1; IM, indomethacin; Multiple, fold-changes to control group; PeF, pre-ovulatory follicle; *Plat*, plasminogen activator, tissue-type; RU, RU486; UF, unruptured follicle; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A

Table 3- 6 Proteolysis-related genes

Treatment	Follicle type	Probe set ID	Gene title	Multiple ($p < 0.05$)	Other functions
IM	PeF	1376537_at	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	0.442	
	UF	1368545_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	0.416	
RU		1376481_at	<i>Adams9</i>	0.150	
		1368281_at	Dipeptidase 1 (renal)	0.203	
		1377018_at	Peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1	0.209	
	PeF	1368223_at	<i>Adams1</i>	0.211	Table 3-3
		1387005_at	Cathepsin S	0.362	
		1387135_at	A disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)	0.483	Tables 3-5, 3-7
		1382271_at	Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 5	0.491	
		1368519_at	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	0.065	Tables 3-4, 3-5, 3-7
		1389470_at	Complement factor B	0.068	
		1386921_at	Carboxypeptidase E	0.070	
		1367800_at	<i>Plat</i>	0.135	Table 3-5
		1391262_at	Sumo1/sentrin/SMT3 specific peptidase 5	0.138	
		UF	1368545_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	0.289
		1370457_at	Testin gene	0.321	
		1368223_at	<i>Adams1</i>	0.362	Table 3-3
		1378017_at	Pitriylsin metallopeptidase 1	0.420	
		1372440_at	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 2	0.420	
		1368280_at	Cathepsin C	0.447	
		1376481_at	<i>Adams9</i>	0.475	

Adams, a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif; IM, indomethacin; Multiple, fold-changes to control group; PeF, pre-ovulatory follicle; *Plat*, plasminogen activator, tissue-type; RU, RU486; UF, unruptured follicle

Table 3- 7 Cell adhesion- and/or extracellular matrix-related genes

Treatment	Follicle type	Probe set ID	Gene title	Multiple ($p < 0.05$)	Other functions		
IM	PeF	1368641_at	<i>Wnt4</i>	0.104	Tables 3-3, 3-4, 3-8		
		1369417_a_at	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	0.288			
		1391618_at	Kinesin-associated protein 3	0.489			
	UF	1394561_at	Hyaluronan and proteoglycan link protein 3	0.357	Table 3-8		
		1380725_at	Tetraspanin 5	0.419			
		1398380_at	Von Willebrand factor A domain containing 1	0.427			
		1367942_at	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	0.486			
		1382732_at	<i>Lyve1</i>	0.053		Tables 3-3, 3-4, 3-5	
		1382192_at	<i>Lyve1</i>	0.070			
		1368347_at	Collagen, type V, alpha 3	0.110			
1392382_at	Transforming growth factor, beta 2	0.172					
1379882_a_at	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	0.185					
1383946_at	Claudin 1	0.191					
1383708_at	Integrin, beta-like 1	0.239					
1385637_at	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	0.242					
1370941_at	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0.276	Tables 3-3, 3-4, 3-5				
1370161_at	Coiled-coil domain containing 80	0.281					
1370217_at	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	0.341					
1370927_at	Collagen, type XII, alpha 1	0.343					
1372615_at	Amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	0.374					
1370830_at	<i>Egfr</i>	0.381		Tables 3-3, 3-8			
1385115_at	Nephrocan	0.391					
1389423_at	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	0.403					
1395986_at	Slit homolog 2 (Drosophila)	0.419			Tables 3-3, 3-5		
1372905_at	Vinculin	0.453					
1393347_at	Integrin, alpha L	0.461					
1388932_at	Laminin, alpha 5	0.463					
1368474_at	Vascular cell adhesion molecule 1	0.463					
1370959_at	Collagen, type III, alpha 1	0.466	Tables 3-5				
1388111_at	Elastin	0.470					
1372294_at	Peroxidasin homolog (Drosophila)	0.471					
1387135_at	A disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)	0.483		Tables 3-5, 3-6			
1384816_at	Coxsackie virus and adenovirus receptor	0.488					
RU	PeF	1382732_at			<i>Lyve1</i>	0.033	Tables 3-4, 3-5, 3-6
		1382192_at			<i>Lyve1</i>	0.036	
		1368519_at			Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	0.065	
		1376425_at			Transforming growth factor, beta 2	0.112	
		1387470_at			Claudin 1	0.157	
		1383946_at	Claudin 1		0.192		
		1369958_at	Ras homolog gene family, member B		0.225	Table 3-5	
		1367631_at	Connective tissue growth factor		0.226		
		1369953_a_at	CD24 molecule	0.252			
		1386879_at	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3	0.286			
	1380725_at	Tetraspanin 5	0.310				
	1376711_at	Claudin 11	0.318				
	1382474_at	Collagen, type XIII, alpha 1	0.326				
	1379440_at	Follistatin-like 3 (secreted glycoprotein)	0.348				
	1373401_at	Tenascin C	0.380				
	1387137_at	Cartilage oligomeric matrix protein	0.408				
	1388539_at	Plakophilin 2	0.419	Table 3-5			
	1370927_at	Collagen, type XII, alpha 1	0.439				
	1370312_at	Spondin 1, extracellular matrix protein	0.441				
	1370333_a_at	Insulin-like growth factor 1	0.469				
	1374933_at	Melanoma cell adhesion molecule	0.473				
	1370161_at	Coiled-coil domain containing 80	0.476				
	1377089_a_at	Tetraspanin 5	0.483				
	1369895_s_at	Podocalyxin-like	0.484				
	1373000_at	Sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	0.485		Table 3-5		
	1387202_at	Intercellular adhesion molecule 1	0.490				
	1373122_at	Jub, ajuba homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	0.492	Table 3-3			

Egfr, epidermal growth factor receptor; IM, Indomethacin; *Lyve1*, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1; Multiple, fold-changes to control group; PeF, pre-ovulatory follicle; RU, RU486; UF, unruptured follicle, *Wnt4*, wingless-type MMTV integration site family, member 4

Table 3- 8 Lipid and/or steroid metabolism-related genes

Treatment	Follicle type	Probe set ID	Gene title	Multiple ($p < 0.05$)	Other functions
IM	PeF	1368641_at	<i>Wnt4</i>	0.104	Tables 3-3, 3-4, 3-7
		1368587_at	Apolipoprotein C-I	0.198	
	UF	1387651_at	Aquaporin 1	0.165	Tables 3-4, 3-5
		1387455_a_at	Very low density lipoprotein receptor	0.453	
		1367942_at	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	0.486	Table 3-7
		1370530_a_at	Phospholipase D1	0.496	
		1368492_at	Hematopoietic prostaglandin D synthase	0.116	Table 3-4
		1368587_at	Apolipoprotein C-I	0.137	
	1383355_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	0.249	Table 3-4	
	1369179_a_at	<i>Pparg</i>	0.290		
RU	PeF	1395967_at	Low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	0.374	Table 3-3, 3-7
		1370830_at	<i>Egfr</i>	0.381	
	UF	1370831_at	Monoglyceride lipase	0.437	Table 3-4
		1370249_at	Translocator protein	0.455	
		1368259_at	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	0.466	Table 3-4
		1389474_at	Myosin regulatory light chain interacting protein	0.491	
		1368700_at	Phospholipase C-like 1	0.496	Table 3-4
		1398250_at	Acyl-CoA thioesterase 1	0.150	
		1371223_a_at	Leptin receptor	0.180	Tables 3-3, 3-4, 3-5
		1387631_at	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	0.190	
RU	UF	1370708_a_at	Aldo-keto reductase family 1, member C14	0.226	Table 3-4
		1369953_a_at	CD24 molecule	0.252	
		1387455_a_at	Very low density lipoprotein receptor	0.262	Tables 3-4, 3-7
		1388644_at	Monoglyceride lipase	0.300	
		1389611_at	Very low density lipoprotein receptor	0.314	Table 3-4
		1368756_at	Oleoyl-ACP hydrolase	0.324	
		1376191_at	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	0.329	
		1386917_at	Pyruvate carboxylase	0.333	Table 3-4
		1370447_at	Phospholipase B1	0.340	
		1396933_s_at	Aldo-keto reductase family 1, member C14	0.343	Table 3-4
	1393690_at	Insulin induced gene 2	0.392		
	UF	1370563_at	Aldo-keto reductase family 1, member C14	0.392	Table 3-4
		1375247_at	Monoglyceride lipase	0.411	
		1386965_at	Lipoprotein lipase	0.414	Table 3-4
		1369098_at	Very low density lipoprotein receptor	0.417	
		1368587_at	Apolipoprotein C-I	0.431	Table 3-4
1386979_at		Serine incorporator 5	0.482		
1370642_s_at	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	0.498	Table 3-4, 3-5		

Egfr, epidermal growth factor receptor; IM, indomethacin; Multiple, fold-changes to control group; PeF, pre-ovulatory follicle; *Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; RU, RU486; UF, unruptured follicle; *Wnt4*, wingless-type MMTV integration site family, member 4

Table 3- 9 Genes possibly related to the unovulation

Gene	Animals examined	IM-treated rat	RU-treated rat
<i>Adamts1</i>	<i>Adamts1</i> -deficient mice (Shindo <i>et al.</i> , 2000)	ND	↓PeF, ↓UF
<i>Cox2</i>	<i>Cox2</i> -deficient mice (Lim <i>et al.</i> , 1997), COX1/COX2 inhibitor-treated rats (Tsubota <i>et al.</i> , 2009)	ND	ND
<i>Edn2</i>	Endothelin receptor antagonist-treated mice (Ko <i>et al.</i> , 2006)	ND	↓UF
<i>Egfr</i>	Mice with a point mutation in <i>Egfr</i> (Hsieh <i>et al.</i> , 2007)	ND	↓PeF
<i>Hmox1</i>	<i>Hmox1</i> -deficient mice (Zenclusen <i>et al.</i> , 2012)	↓UF	↓UF
<i>Plat</i>	Anti-tPA antibody-treated rats (Tsafriri <i>et al.</i> , 1989)	ND	↓UF
<i>Pparg</i>	<i>Pparg</i> -conditional knock-out mice (Kim <i>et al.</i> , 2008)	ND	↓UF
<i>Pr</i>	<i>Pr</i> -deficient mice (Lydon <i>et al.</i> , 1995), PR antagonist-treated rats (Tamura <i>et al.</i> , 2009)	ND	ND
<i>Vegf</i>	VEGF Trap treatment in marmoset monkeys (Wulff <i>et al.</i> , 2002)	↓UF	↓UF
<i>Wnt4</i>	<i>Wnt4</i> -conditional knock-out mice (Boyer <i>et al.</i> , 2010)	↓PeF	ND

Adamts1, ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1; *Cox2*, cyclooxygenase 2; *Edn2*, endothelin 2; *Egfr*, epidermal growth factor receptor; *Hmox1*, heme oxygenase 1; PeF, pre-ovulatory follicle; *Plat*, plasminogen activator, tissue-type; *Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *Pr*, progesterone receptor; UF, unruptured follicle; *Vegf*, vascular endothelial growth factor; *Wnt4*, wntless-type MMTV integration site family, member 4; ND, not detected; ↓: down-regulated

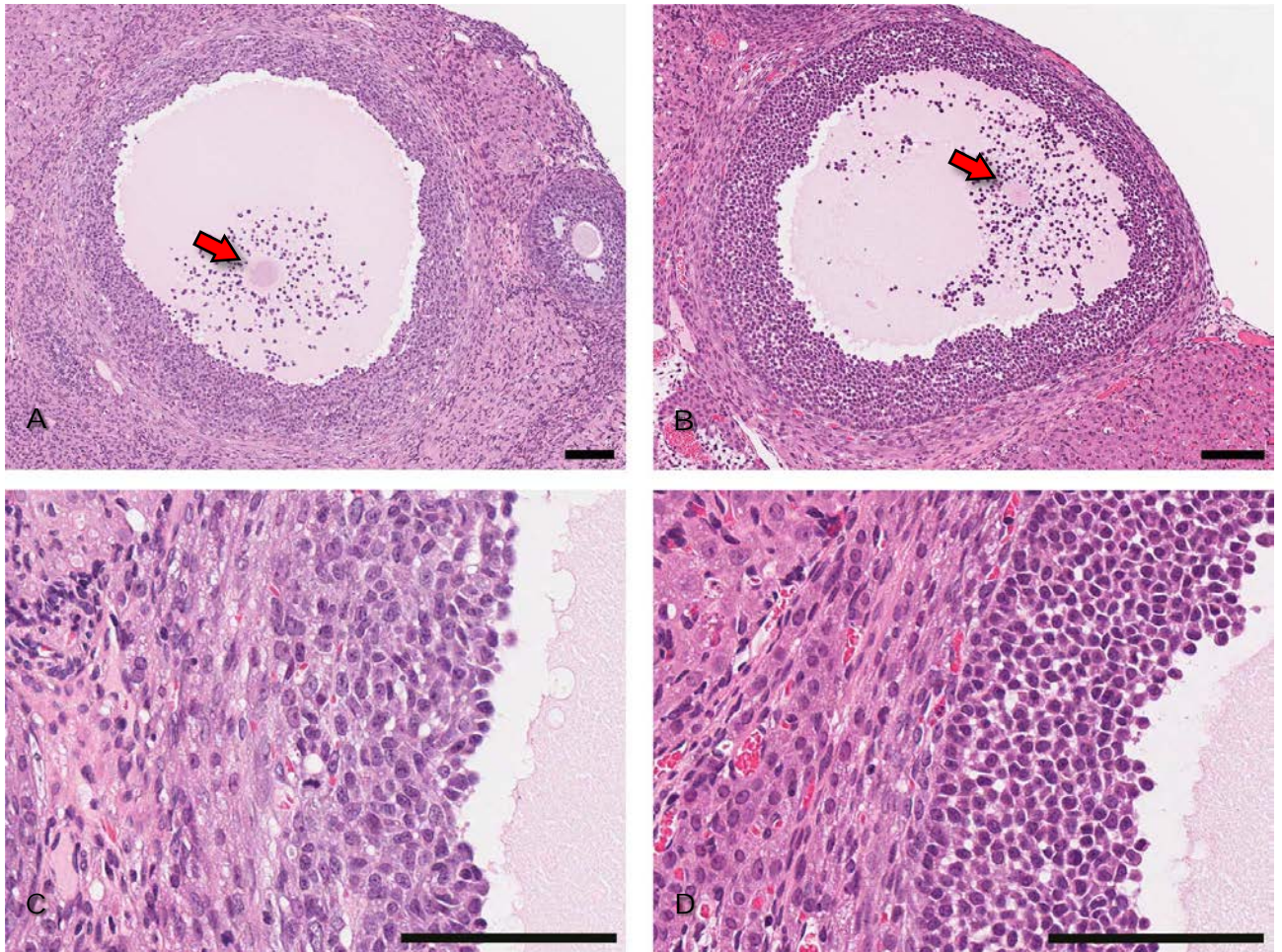


Figure 3-1 UFs induced by IM and RU

IM (A, C) または RU 投与群 (B, D) で認められた UF は大きく拡張した腔をもち、腔内に卵細胞 (矢印) と卵丘細胞が認められた (A, B)。IM 投与群で認められた UF (A) は第 1 章における反復投与実験のそれと同様に顆粒膜細胞層と莖膜細胞層の境界が不明瞭 (C) で、顆粒膜細胞は RU 投与群 (D) と比較して大きな胞体を有していた。一方、RU 投与群で認められた UF (B) では顆粒膜細胞と莖膜細胞の胞体は小さく (D)、上述した境界は明瞭であった (D)。また IM 投与群では、顆粒膜細胞層および莖膜細胞層に血管が認められたが (C)、RU 投与群では血管は莖膜細胞層のみで認められた (D)。Bar はいずれも 100 μm 。

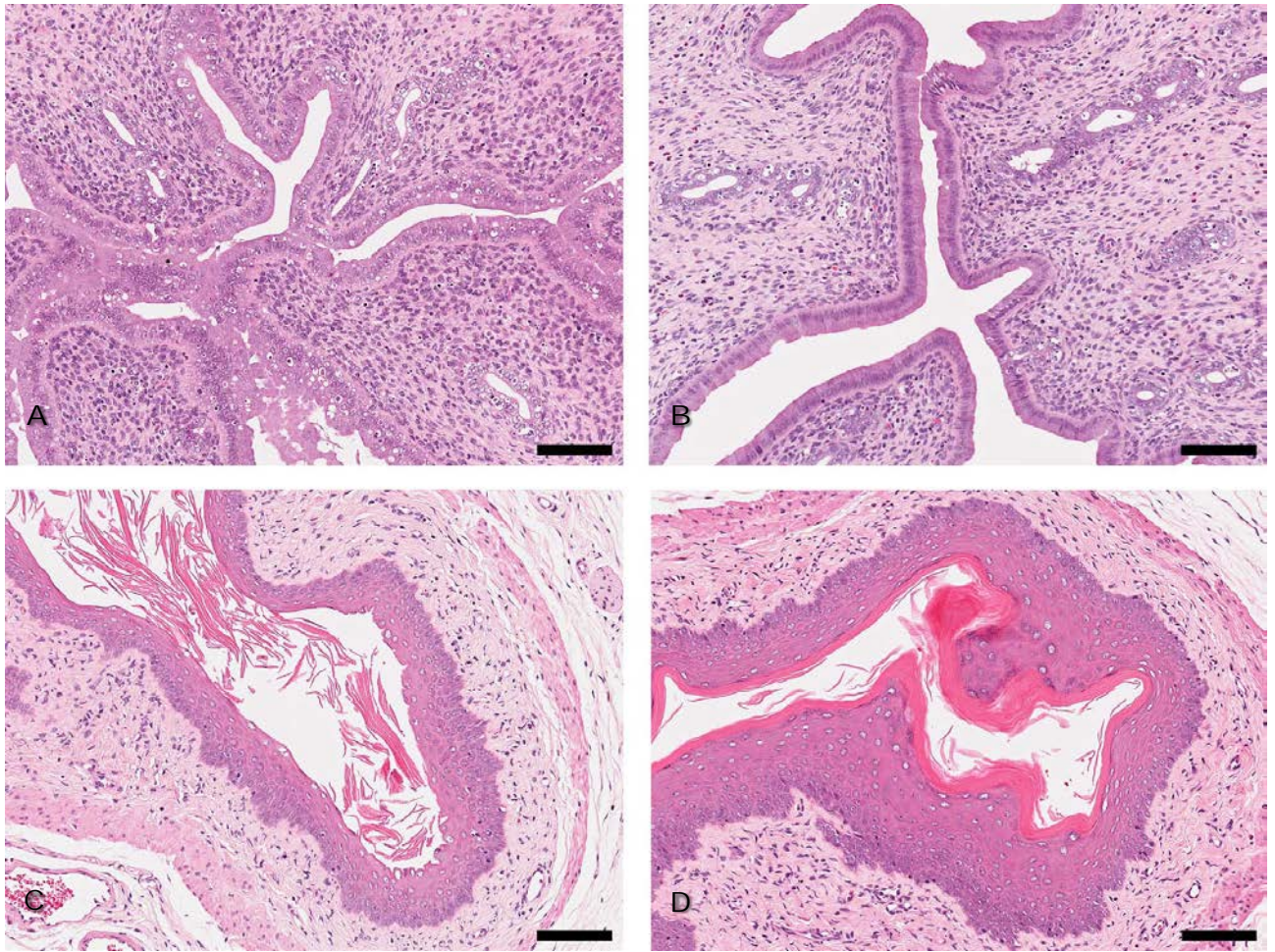


Figure 3-2 The uterus and vagina of rats treated with IM or RU

IM 投与群の子宮 (A) では内膜の皺壁が顕著で、内膜上皮の空胞変性やアポトーシスなど発情期に典型的な変化がみられた。一方、RU 投与群の子宮 (B) では子宮腺において空胞変性やアポトーシスが認められたものの、子宮内膜上皮では認められなかった。IM (C) および RU 投与群 (D) の膣では、重層扁平上皮の角化亢進がみられた。Bar はいずれも 100 μm 。

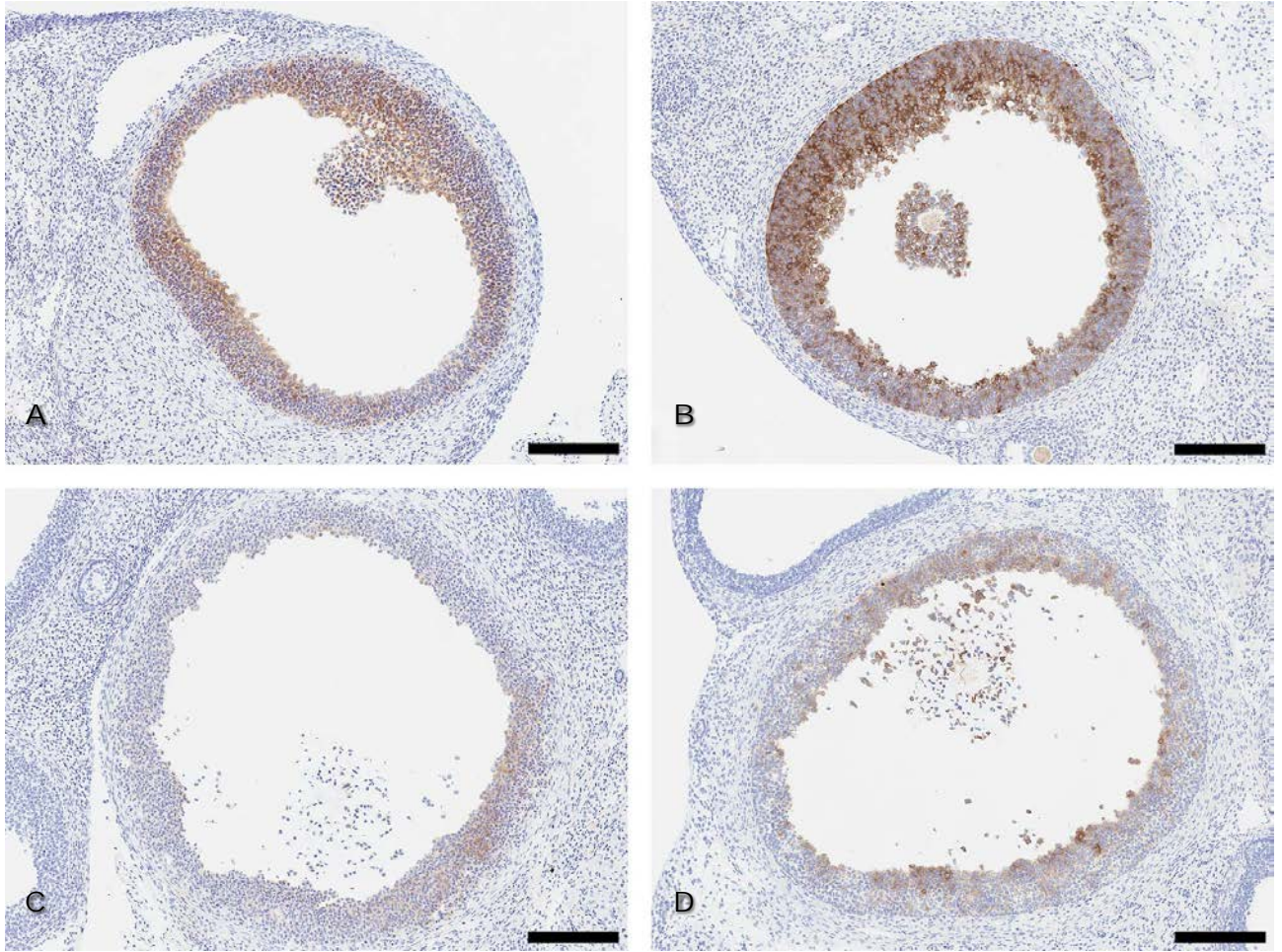


Figure 3-3 COX2 immunohistochemistry in PeF and UF

IM (A, C) および RU (B, D) 投与群において、発情前期 22:00 および発情期 10:00 に採取した卵巣の PeF (A, B) および UF (C, D) の顆粒膜細胞はそれぞれ COX2 に陽性であった。Bar はいずれも 200 μm 。

総括

医薬品開発過程において反復投与毒性試験の卵巢病理検査は、生殖発生毒性試験に先立って行われることから、生殖発生毒性の予測のため、慎重かつ正確な評価が要求される。ラットの卵巢は4日間で発情前期-発情期-発情後期-発情休止期のサイクルを繰り返す。正常な卵巢の主要なコンポーネントは卵胞と黄体であるが、排卵に至らず閉鎖する卵胞、周期を経て退縮する黄体など退行性の組織像も認められる。また、性周期の各ステージで、卵胞または黄体の発達の程度、組織像が異なっている。したがって、病理検査も各ステージにおける特徴的な組織像、ホルモンの作用、発現する蛋白などを考慮して実施することが望ましい。

本研究の第1章ではIMを2週間または4週間反復投与することにより、卵胞破裂が阻害され、UFが誘導されることを示した。IM投与の性周期への影響は認められず、4週間投与と2週間投与とで、UFの誘導頻度および程度に差は認められなかった。UFは発情期の卵巢では嚢胞状病変として認められたが、発情休止期および発情前期では認められなかった。以上のことから、IMを発情前期に投与するとUFが発情期に誘導されるが、性周期の推移とともに、UF腔内の漿液成分が吸収されて縮小し、黄体と区別がつかなくなると考えられた。また、発情休止期、発情前期にUFは認められず、UF以外にIM投与に起因する変化は認められなかったことから、発情後期から次の発情前期は、IMの毒性に対して感受性が低い時期であると考えられた。一方、発情前期から発情期にかけてはLHサージ、排卵、黄体形成などのイベントが短期間に続けて起こるため、種々の蛋白の合成が亢進すると推察される。そのため、化学物質の投与に対して感受性の高い時期であり、化学物質の卵巢に対する毒性を評価する上で重要な期間であると考えられた。

そこで第2章では、発情前期の10:00、22:00および発情期の10:00に無処置ラットから卵胞を摘出し、HE染色、抗COX2および抗Ki67抗体を用いた免疫染色により排卵前から排卵後にかけての卵胞を病理組織学的に観察するとともに、LMDを用いて採取した莢膜細胞、顆粒膜細胞および卵細胞の遺伝子発現について網羅的解析を実施した。発情前期22:00(PeF)の卵胞は発情期

10:00 の卵胞 (GF) と比較して、大きく、また卵丘細胞は卵細胞周囲に散乱して観察された。COX2 の発現は発情前期 22:00 の卵胞で最も顕著であった。網羅的遺伝子発現解析により、発現変動した遺伝子を 4 通りのパターンに分類し、関連するパスウェイを検索した結果、一過性に up-regulation または down-regulation が起こるパターン[1]には、*Cox2* や *Pr* など排卵に必須と考えられている遺伝子が含まれていた。一方、排卵に向け発現が継続的に変化するパターン[2]~[4]には *Edn2* や *Adamts1* などの卵胞破裂・排卵に必須な遺伝子が含まれていた。データベース Ingenuity pathways analysis による解析で抽出されたパスウェイは、パターン[1]では down-regulation が優位であったのに対して、パターン[2]~[4]ではほとんどのパスウェイで関連遺伝子は up-regulation が優位であった。各パターンに重複するパスウェイの変化もみられた。パターン[3]には VEGF シグナリングや PPAR シグナリングなど特に排卵との関連が示唆されるパスウェイも含まれていた。これらの結果の多くは、再現性があったことから、本章で採用したサンプリングポイント、LMD による排卵採取などの実験デザインは、化合物投与の遺伝子発現プロファイルへの影響を調べる手法として妥当であると考えられた。

第 3 章では、第 2 章で用いた実験モデルを用いて、IM または RU 投与による UF 誘導における遺伝子発現プロファイルの変化を検索した。第 1 章の結果から、IM による UF は発情前期~発情期にかけて誘導され、発情後期~次の発情前期は IM 投与の毒性に対して感受性が低いと考えられたため、IM の投与は単回とした。また、UF を単回投与で誘導することが知られている RU を投与する群も設けた。IM または RU を発情前期に単回投与することで UF が誘導された。RU 投与群の卵巣顆粒膜細胞層および莢膜細胞層、子宮および膈の上皮の組織像は、IM 投与群のそれらと比較して発情期への移行がやや遅延していた。また、IM または RU 投与群の PeF および UF の遺伝子発現プロファイルを対照群の PeF、または PoF のそれと比較した結果、排卵阻害に関連があると考えられる遺伝子発現変化として、血管新生に関連する *Angpt2*、*Hmox1* および *Vegfa* の down-regulation が認められた。IM 投与群では、上記に加え *Wnt4* の down-regulation と排

卵阻害との関連が疑われたが、詳細なメカニズムは不明であった。一方、RU 投与群では上記の変化に加えて、*Adamts1*, *Adamts9*, *Edn2*, *Ednra*, *Egfr*, *Lyve1*, *Plat*, *Pparg* の down-regulation も認められ、細胞外基質および卵胞周囲の蛋白分解、卵胞周囲の平滑筋収縮、卵胞液生成および血管新生と卵胞破裂との関連が示唆された。

以上、本研究では、IM または RU 投与により誘導された UF について遺伝子発現プロファイルを検討し、卵胞破裂との関連が疑われる遺伝子を抽出、排卵メカニズムとの関連を考察した。医薬品開発において行われる一般毒性試験の卵巣毒性病理評価は、早期の生殖毒性検出のために重要な評価項目として位置づけられており、卵胞破裂阻害の結果生じる UF は受胎能を低下させることから卵巣の毒性評価上重要な病理所見である。一般毒性試験では通常、剖検時における性周期のステージは考慮されないため、本研究で明らかにされた排卵の前後で発現が変化する遺伝子、シグナル伝達経路は、開発中の医薬品の薬理作用や卵巣毒性を予想するうえで、重要なパラメータになると考えられた。しかしながら、本研究の結果から排卵阻害と関連すると考えられた遺伝子は、排卵またはその阻害時に有意な変動を示す遺伝子のごく一部で、それら以外にも排卵との関連が報告されていない遺伝子や機能不明な遺伝子も数多く抽出されている。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、排卵のメカニズムのより詳細な理解が必要である。

謝辭

稿を終えるに当たり、本研究の遂行に際し、ご懇篤なるご指導およびご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室 中山裕之 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の機会を与えて頂きました日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部生殖毒性課題対応チーム 三分一所厚司 博士（第一三共株式会社）、国立医薬品食品衛生研究所 吉田緑博士（現食品安全委員会）、アステラス製薬株式会社安全性研究所 松本正博 博士に謹んでお礼申し上げます。

引用文献

- Ainsworth, L., Tsang, B.K., Downey, B.R., Baker, R.D., Marcus, G.J. and Armstrong, D.T. (1979). Effects of Indomethacin on Ovulation and Luteal Function in Gilts. *Biol Reprod*, **21**, 401-411.
- Armstrong, D.T. and Grinwich, D.L. (1972). Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. I. *Prostaglandins*, **1**, 21-28.
- Boden, M.J. and Kennaway, D.J. (2006). Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*, **132**, 379-392.
- Boyer, A., Lapointe, E., Zheng, X., Cowan, R.G., Li, H., Quirk, S.M., DeMayo, F.J., Richards, J.S. and Boerboom, D. (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *Faseb J*, **24**, 3010-3025.
- Bridges, P.J., Jo, M., Al Alem, L., Na, G., Su, W., Gong, M.C., Jeoung, M. and Ko, C. (2010). Production and binding of endothelin-2 (EDN2) in the rat ovary: endothelin receptor subtype A (EDNRA)-mediated contraction. *Reproduction, Fertility and Development*, **22**, 780-787.
- Brockstedt, E., Peters-Kottig, M., Badock, V., Hegele-Hartung, C. and Lessl, M. (2000). Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology*, **141**, 2574-2581.
- Brogden, R.N. (1986). Non-steroidal anti-inflammatory analgesics other than salicylates. *Drugs*, **32 Suppl 4**, 27-45.
- Brown, H.M., Dunning, K.R., Robker, R.L., Pritchard, M. and Russell, D.L. (2006). Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. *Developmental Biology*, **300**, 699-709.
- Brown, H.M., Robker, R.L. and Russell, D.L. (2010). Development and Hormonal Regulation of the Ovarian Lymphatic Vasculature. *Endocrinology*, **151**, 5446-5455.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.-Y. and Su, Y.-Q. (2006). Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. *Mol Endocrinol*, **20**, 715-723.
- Espey, L.L. (1978). Ovarian contractility and its relationship to ovulation. *Biol Reprod*, **19**, 540-551.

- Espey, L.L. and Lipner, H. (1963). Measurements of intrafollicular pressures in the rabbit ovary. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, **205**, 1067-1072.
- Espey, L.L. and Richards, J.S. (2006). Ovulation In *Physiology of Reproduction* (Neill, J.D. ed.), pp. 425-474. Elsevier.
- Espey, L.L., Yoshioka, S., Russell, D.L., Robker, R.L., Fujii, S. and Richards, J.S. (2000). Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. *Biol Reprod*, **62**, 1090-1095.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R. and Royere, D. (2007). Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod*, **22**, 3069-3077.
- Gava, N., C, L.C., Bye, C., Byth, K. and deFazio, A. (2008). Global gene expression profiles of ovarian surface epithelial cells in vivo. *Journal of Molecular Endocrinology*, **40**, 281-296.
- Gaytan, F., Bellido, C., Gaytan, M., Morales, C. and Sanchez-Criado, J.E. (2003). Differential effects of RU486 and indomethacin on follicle rupture during the ovulatory process in the rat. *Biol Reprod*, **69**, 99-105.
- Gerard, N., Caillaud, M., Martoriati, A., Goudet, G. and Lalmanach, A.C. (2004). The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol*, **180**, 203-212.
- Gershon, E., Hourvitz, A., Reikhav, S., Maman, E., Dekel, N., Gershon, E., Hourvitz, A., Reikhav, S., Maman, E. and Dekel, N. (2007). Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in SULT1E1-deficient mice. *Faseb J*, **21**, 1893-1901.
- Grosse, J., Bulling, A., Brucker, C., Berg, U., Amsterdam, A., Mayerhofer, A. and Gratzl, M. (2000). Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons in oocytes and steroid-producing cells of rat and human ovary: molecular analysis and regulation by gonadotropins. *Biol Reprod*, **63**, 643-650.
- Hauge, H., Patzke, S. and Aasheim, H.-C. (2007). Characterization of the FAM110 gene family. *Genomics*, **90**, 14-27.

Hsieh, M., Johnson, M.A., Greenberg, N.M. and Richards, J.S. (2002). Regulated Expression of Wnts and Frizzleds at Specific Stages of Follicular Development in the Rodent Ovary. *Endocrinology*, **143**, 898-908.

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D.C., Threadgill, D.W. and Conti, M. (2007). Luteinizing Hormone-Dependent Activation of the Epidermal Growth Factor Network Is Essential for Ovulation. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 1914-1924.

Jo, M. and Curry, T.E., Jr. (2006). Luteinizing hormone-induced RUNX1 regulates the expression of genes in granulosa cells of rat periovulatory follicles. *Mol Endocrinol*, **20**, 2156-2172.

Jo, M., Gieske, M.C., Payne, C.E., Wheeler-Price, S.E., Gieske, J.B., Ignatius, I.V., Curry, T.E., Jr. and Ko, C. (2004). Development and application of a rat ovarian gene expression database.[Erratum appears in *Endocrinology*. 2006 Jan;147(1):256]. *Endocrinology*, **145**, 5384-5396.

Johnson, A.G. and Day, R.O. (1991). The problems and pitfalls of NSAID therapy in the elderly (Part II). *Drugs Aging*, **1**, 212-227.

Jungers, K.A., Le Goff, C., Somerville, R.P.T. and Apte, S.S. (2005). Adamts9 is widely expressed during mouse embryo development. *Gene Expression Patterns*, **5**, 609-617.

Karim, S.M.M. and Hillier, K. (1979). Prostaglandins in the control of animal and human reproduction. *British Medical Bulletin*, **35**, 173-180.

加藤嘉太郎 (1991). 卵巢 In *家畜比較解剖図説*, Vol. 下, pp. 392-393. 養賢堂, 日本.

Khan, K.N., Alden, C.L., Gleissner, S.E., Gessford, M.K. and Maziasz, T.J. (1998). Effect of papillotoxic agents on expression of cyclooxygenase isoforms in the rat kidney. *Toxicol Pathol*, **26**, 137-142.

Kim, J., Sato, M., Li, Q., Lydon, J.P., Demayo, F.J., Bagchi, I.C. and Bagchi, M.K. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice. *Mol Cell Biol*, **28**, 1770-1782.

Ko, C., Gieske, M.C., Al-Alem, L., Hahn, Y., Su, W., Gong, M.C., Iglarz, M. and Koo, Y. (2006). Endothelin-2 in

ovarian follicle rupture. *Endocrinology*, **147**, 1770-1779.

Komar, C.M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function - implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**, 41.

Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M. and Dey, S.K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, **91**, 197-208.

Loutradis, D., Bletsas, R., Aravantinos, L., Kallianidis, K., Michalakis, S. and Psychoyos, A. (1991). Preovulatory effects of the progesterone antagonist mifepristone (RU486) in mice. *Hum Reprod*, **6**, 1238-1240.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O.M. and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, **9**, 2266-2278.

Mahajan, D.K. and London, S.N. (1997). Mifepristone (RU486): a review. *Fertility & Sterility*, **68**, 967-976.

Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Okada, T., Minegishi, T. and Miyamoto, K. (2001). Cloning and characterization of gonadotropin-inducible ovarian transcription factors (GIOT1 and -2) that are novel members of the (Cys)₂-(His)₂-type zinc finger protein family. *Mol Endocrinol*, **15**, 1693-1705.

Nelson, W.J. and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*, **303**, 1483-1487.

Ny, A., Leonardsson, G., Hägglund, A.-C., Hägglöf, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P. and Ny, T. (1999). Ovulation in Plasminogen-Deficient Mice. *Endocrinology*, **140**, 5030-5035.

Ny, A., Nordström, L., Carmeliet, P. and Ny, T. (1997). Studies of Mice Lacking Plasminogen Activator Gene Function Suggest that Plasmin Production Prior to Ovulation Exceeds the Amount Needed for Optimal Ovulation Efficiency. *European Journal of Biochemistry*, **244**, 487-493.

Park, J.-I., Kim, W.-J., Wang, L., Park, H.-J., Lee, J., Park, J.-H., Kwon, H.-B., Tsafiriri, A. and Chun, S.-Y. (2000). Involvement of progesterone in gonadotrophin-induced pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene

expression in pre-ovulatory follicles of rat ovary. *Molecular Human Reproduction*, **6**, 238-245.

Richards, J.S., Liu, Z. and Shimada, M. (2008). Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends Endocrinol Metab*, **19**, 191-196.

Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S. and Espey, L.L. (2002). OVULATION: New Dimensions and New Regulators of the Inflammatory-Like Response. *Annual Review of Physiology*, **64**, 69-92.

Richards, J.S., Russell, D.L., Robker, R.L., Dajee, M. and Alliston, T.N. (1998). Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular & Cellular Endocrinology*, **145**, 47-54.

Robker, R.L., Akison, L.K. and Russell, D.L. (2009). Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. [Review] [104 refs]. *Nuclear Receptor Signaling [Electronic Resource]: the E Journal of NURSA*, **7**.

Russell, D.L., Ochsner, S.A., Hsieh, M., Mulders, S. and Richards, J.S. (2003). Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology*, **144**, 1020-1031.

Russell, D.L. and Robker, R.L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, **13**, 289-312.

Sakurada, Y., Shiota, M., Inoue, K., Uchida, N. and Shiota, K. (2006). New approach to in situ quantification of ovarian gene expression in rat using a laser microdissection technique: relationship between follicle types and regulation of inhibin-alpha and cytochrome P450aromatase genes in the rat ovary. *Histochemistry & Cell Biology*, **126**, 735-741.

Sato, T., Taya, K., Jyujo, T. and Igarashi, M. (1974). Ovulation block by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: a study of its site of action in rats. *J Reprod Fertil*, **39**, 33-40.

Satoh, H., Inada, I., Hirata, T. and Maki, Y. (1981). Indomethacin produces gastric antral ulcers in the refed rat. *Gastroenterology*, **81**, 719-725.

Sayasith, K., Brown, K.A. and Sirois, J. (2007). Gonadotropin-dependent regulation of bovine pituitary adenylate

cyclase-activating polypeptide in ovarian follicles prior to ovulation. *Reproduction*, **133**, 441-453.

Shimada, H., Kasakura, S., Shiotani, M., Nakamura, K., Ikeuchi, M., Hoshino, T., Komatsu, T., Ihara, Y., Sohma, M., Maeda, Y., Matsuura, R., Nakamura, S., Hine, C., Ohkura, N. and Kato, H. (2001). Hypocoagulable state of human preovulatory ovarian follicular fluid: role of sulfated proteoglycan and tissue factor pathway inhibitor in the fluid. *Biol Reprod*, **64**, 1739-1745.

Shimada, M., Yanai, Y., Okazaki, T., Yamashita, Y., Sriraman, V., Wilson, M.C. and Richards, J.S. (2007). Synaptosomal-associated protein 25 gene expression is hormonally regulated during ovulation and is involved in cytokine/chemokine exocytosis from granulosa cells. *Mol Endocrinol*, **21**, 2487-2502.

Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Oh-hashii, Y., Morita, H., Ishikawa, T., Nagai, R., Yazaki, Y. and Matsushima, K. (2000). ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *The Journal of Clinical Investigation*, **105**, 1345-1352.

Shirasuna, K., Shimizu, T., Sayama, K., Asahi, T., Sasaki, M., Berisha, B., Schams, D. and Miyamoto, A. (2008). Expression and localization of apelin and its receptor APJ in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis. *Reproduction*, **135**, 519-525.

Shirota, M., Watanabe, G., Taya, K. and Sasamoto, S. (1998). Effects of indomethacin on the selective release of follicle-stimulating hormone during the period of ovulation in the rat. *Journal of Veterinary Medical Science*, **60**, 1059-1065.

Sirois, J., Sayasith, K., Brown, K.A., Stock, A.E., Bouchard, N. and Dore, M. (2004). Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human Reproduction Update*, **10**, 373-385.

Staszkievicz, J., Skowronski, M.T., Kaminski, T., Siawrys, G., Krazinski, B.E., Kusmider, M., Przala, J. and Okrasa, S. (2007). Expression of proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin genes in porcine theca and granulosa cells. *Anim Reprod Sci*, **101**, 97-112.

Tamba, S., Yodoi, R., Morimoto, K., Inazumi, T., Sueno, M., Segi-Nishida, E., Okuno, Y., Tsujimoto, G.,

- Narumiya, S. and Sugimoto, Y. (2010). Expression profiling of cumulus cells reveals functional changes during ovulation and central roles of prostaglandin EP2 receptor in cAMP signaling. *Biochimie*, **92**, 665-675.
- Tamura, T., Yokoi, R., Okuhara, Y., Harada, C., Terashima, Y., Hayashi, M., Nagasawa, T., Onozato, T., Kobayashi, K., Kuroda, J. and Kusama, H. (2009). Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *J Toxicol Sci*, **34 Suppl 1**, SP31-42.
- Tsafriiri, A., Bicsak, T.A., Cajander, S.B., Ny, T. and Hsueh, A.J.W. (1989). Suppression of Ovulation Rate by Antibodies to Tissue-Type Plasminogen Activator and α 2-Antiplasmin. *Endocrinology*, **124**, 415-421.
- Tsafriiri, A., Lindner, H.R., Zor, U. and Lamprecht, S.A. (1972). Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. *Prostaglandins*, **2**, 1-10.
- Tsubota, K., Kushima, K., Yamauchi, K., Matsuo, S., Saegusa, T., Ito, S., Fujiwara, M., Matsumoto, M., Nakatsuji, S., Seki, J. and Oishi, Y. (2009). Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 12) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of indomethacin in female rats. *J Toxicol Sci*, **34 Suppl 1**, SP129-136.
- Westwood, F.R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*, **36**, 375-384.
- Wiegand, S.J., Boland, P. and Yancopoulos, G.D. (2000). Cooperative Roles for the Angiopoietins and Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Angiogenesis In *Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts* (Adashi, E.E.Y. ed.), pp. 175-186. Springer Verlag, New York.
- Wulff, C., Wilson, H., Wiegand, S.J., Rudge, J.S. and Fraser, H.M. (2002). Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology*, **143**, 2797-2807.
- Yong, P.Y.K., Harlow, C., Thong, K.J. and Hillier, S.G. (2002). Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epithelial cells by interleukin-1.[Erratum appears in Hum Reprod. 2002 Nov;17(11):3009]. *Hum Reprod*, **17**, 2300-2306.

Zenclussen, M.L., Jensen, F., Rebelo, S., El-Mousleh, T., Casalis, P.A. and Zenclussen, A.C. (2012). Heme Oxygenase-1 Expression in the Ovary Dictates a Proper Oocyte Ovulation, Fertilization, and Corpora Lutea Maintenance. *American Journal of Reproductive Immunology*, **67**, 376-382.

Zhong, Y. and Kasson, B.G. (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, **135**, 207-213.