

審査の結果の要旨

氏名 坪田 健次郎

本研究では卵胞の破裂が阻害された結果生じる unruptured follicle (UF) に注目し, indomethacin (IM, COX1/COX2 dual inhibitor) の反復投与実験と卵胞の経時的な遺伝子発現の網羅的探索を行い, さらに IM および RU486 (RU, progesterone receptor antagonist) 投与した際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, 雌 Sprague Dawley (SD) ラットを用いて, IM の反復投与実験と受胎能の評価を実施した。その結果, IM の2週および4週間投与で, 発情期および発情後期に UF が認められた。受胎能評価では, 死亡又は切迫屠殺が多く, 受胎能に対する影響を評価できなかった。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週または4週投与実験のいずれによっても検出可能であった。

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時, 22時および発情期の10時に摘出した雌SDラットの卵胞から抽出したRNAをGeneChip®を用いて解析し, 同じ時間に採取した対照群の卵胞と比較した。その結果, COX-2 および progesterone receptor (*Pr*), Endothelin 2 (*Edn2*), hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1, ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1 (*Adamts1*) など排卵と関連の深い遺伝子の継時的発現パターン, および vascular endothelial growth factor (*Vegf*) シグナリング, peroxisome proliferator-activated receptor (*Ppar*) シグナリングなど排卵と関連の深い伝達経路を解析することができた。

第3章では, IM および RU の単回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, 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。IM と RU を発情前期のSDラットに投与し, 発情前期の22時および発情期の10時に剖検を行い, 卵胞から抽出したRNAをGeneChip®で解析し, 対照群と比較した。その結果, 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 の発現低下が認められ, IM 投与の細胞間接着, 細胞外マトリクスまた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, *Ppar* γ , plasminogen activator, tissue の発現低下が認められ, 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発現低下が認められ

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、本研究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、排卵メカニズムに関するより詳細な理解とさらなる検討が必要であると考えられた。

これらの一連の研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。