

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580431

研究課題名(和文) 化学物質の卵巣毒性評価に向けたレーザーマイクロダイセクションの応用に関する研究

研究課題名(英文) Studies on application of laser microdissection technique for an assessment of ovarian toxicity of xenobiotics

研究代表者

代田 真理子 (Shirota, Mariko)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：40426424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Multiple drug resistance (mdr)1のラット卵巣での組織特異的発現を知るために性腺刺激ホルモン投与により3日後に自然排卵するよう卵巣発育を促した幼若雌ラットから経日的に卵巣を採取し解析した。Mdr1アイソフォームに交叉する抗体による免疫組織化学でmdr1は発育卵巣の顆粒層細胞及び黄体細胞に局在し、これらのmRNA(ABCB1a及びABCB1b)の定量及びin situ hybridizationからは両遺伝子の黄体での発現に差異が示唆されたのでレーザーマイクロダイセクションで黄体組織を採取し解析した結果、ABCB1aのみ黄体の発達に伴い増加することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to determine tissue specific expression of multiple drug resistance (mdr)1 in the rat ovary, ovaries were collected daily from immature female rats treated with gonadotropin to ovulate spontaneously three days after the treatment. Immunohistochemical analysis of the ovaries using a primary antibody, which reacts with two types of isoforms of the mdr1, revealed localization of the mdr1 in the granulosa cells of growing follicles and luteal cells. Since quantitative analyses of mRNAs encoding the isoforms, ABCB1a and ABCB1b, and in situ hybridization suggested divergent expression of the both forms in the corpus luteum, luteal tissues were dissected from the ovaries by a laser microdissection technique. Quantitative analyses of the mRNAs in the dissected luteal tissues indicated that ABCB1a, but not ABCB1b, increased with development of the corpus luteum.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：mdr1 ABCB1a ABCB1b ovary laser microdissection in situ hybridization real-time PCR rat

## 1. 研究開始当初の背景

外来性化学物質が卵巣に直接影響を及ぼしてその機能を障害することは様々な化学物質で報告されている。例えば、芳香族炭化水素の中には、ベンゾピレン(BP)のように、実験動物に卵巣がんを発生させるものがある。また、我々は、環境汚染物質であるコプラナーPCB類の経胎盤経乳汁曝露が、ラット新生児の卵胞発育を抑制することを報告している。このような卵巣毒性物質は、しばしば、卵巣を構成する特定の組織だけを障害し、それによる内分泌学的変化や生殖細胞の枯渇による副次的影響によって、卵巣毒性が明らかになることがある。その代表例として、4-vinylcyclohexene の活性代謝産物である4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD)は原始卵胞などの小型の卵胞を特異的に障害し、その結果、原始卵胞が枯渇すると、発育卵胞も減少し、内分泌学的な変化が認められるようになる。VCD の選択毒性には、卵胞の発育段階による第Ⅰ相および第Ⅱ相の薬物代謝酵素の発現の違いが関与していることが示され、卵巣を構成する各組織の機能的変化が毒性発現に深く関与する可能性が示唆される。これらのことから、卵巣毒性評価には同一の内分泌環境下にある卵巣組織の機能の詳細な比較が求められている。

## 2. 研究の目的

レーザーマイクロダイセクション(LMD)は、光学顕微鏡下で形態を確認しながら目的とする組織をレーザー光で切り出す試料採取方法である。これまで、我々はLMDを利用した遺伝子定量解析を行って来た。卵巣については、予め隣接切片で健全性や発育程度を確認しておいた卵胞から顆粒層細胞層のみを採取することが可能で、卵巣毒性評価への応用が期待される。そこで本研究では、LMDの卵巣毒性評価への応用を目的として、卵巣に発現する毒性関連因子の中でも排出型薬物トランスポーターのひとつであるmultiple drug resistance 1 (mdr1)に着目し、げっ歯類ではこれに相当する二つのタンパク質をコードする *ABC1a* および *ABC1b* の卵巣における発現を、性腺刺激ホルモン投与により卵胞発育が促され投与3日後に自然排卵する幼若ラットの卵巣を用いて検討し、さらにLMDを用いて相同性の高い *ABC1a* および *ABC1b* の卵巣組織特異的発現を明らかにすることにより、卵巣毒性評価におけるLMDの応用への知見を蓄積することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 使用動物および飼育方法

日本チャールス・リバーから購入したSprague-Dawley [Cri:SD(SD)IGS]系を、室温16-25℃、相対湿度45-65%に設定された麻布大学附置生物科学総合研究所の飼育施設

にて、8時点灯20時消灯の12時間の明暗周期下で、木製チップ(床敷きソフト、三峽ラボサービス)を敷いたケージ(クリーン200-PC、日本クレア)に収容し、飲用水(水道水、相模原市水道局供給)および固形飼料(CE-2、日本クレア)を自由摂取させて飼育した。動物は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て、以下の実験に供した。

### 2) 卵巣に発現する薬物トランスポーターの確認

成熟雌ラットから卵巣および肝臓を採取した。また、同系統の雄と交配して得られた妊娠20日のラットから胎盤を採取し、Trisol試薬にてRNAを抽出した。アガロース電気泳動により18Sおよび28S RNAの存在を確認し、これを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した。性腺に発現する可能性のある薬物トランスポーターを文献情報から検索し、プライマーの塩基配列はプライマー設計ソフトウェア(Primer Express、Life Technologies Corporation)を用いて設計した。PCR装置(ラボラトリーズ MyCycler サーマルサイクラー、バイオ・ラッド)を用いて40サイクルの増幅反応を行い、電気泳動によりPCR増幅産物の有無を調べた。

### 3) 卵胞発育、排卵および黄体形成に伴うmdr1の局在

21日齢で購入した雌ラットを23日齢で使用した。ラットは23日齢に体重を測定し、ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG、Sigma-Aldrich)5IUを皮下投与して、5匹/群から成る4群に分けた。各群の動物は、eCG投与後24、48、72および96時間にペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル、共立製薬)を腹腔内投与し、深麻酔下にて放血屠殺した。動物から卵巣および子宮を採取し、重量を測定した。その後、片側卵巣は4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、左側は10%リン酸緩衝ホルマリン(マスクドホルム、日本ターナー)で固定した。PMSG投与後72時間および96時間の剖検では卵管も採取し、排卵検査を行った。固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、2μmの厚さに薄切して免疫組織化学に供した。

免疫組織化学では、薄切した標本を脱パラフィンし、脱水の後、加熱処理による抗原の賦活化を行い、内在性ペルオキシダーゼを阻害してブロッキングを行った後、一次抗体として抗mdr抗体(Mdr(C-19)、Santa Cruz Biotechnology)と反応させた。使用した一次抗体は、げっ歯類で認められる二つのmdr1 (mdr1a および mdr1b)の間で高い相同性を有するC末端を抗原としている。二次抗体(抗ヤギIgG(ヒストファインシンプルステインラット MAX-PO(G)、ニチレイバイオサイエンス)と反応後、0.2% 3,3-diaminobensidine/50 mM Tris を発色基質として抗原を可視化した。

標本を観察し、切片上に観察された卵胞の中で卵母細胞が観察されたものについて卵胞を分類し、卵母細胞、顆粒層細胞、莢膜細胞、莢膜の毛細血管上皮のそれぞれについて染色強度を4段階に分類した。黄体は全てを観察対象とした。

4) 卵胞発育、排卵および黄体形成に伴うMDR1 遺伝子 (*ABCB1a* および *ABCB1b*) の発現変化

3)と同様に23日齢の雌ラットにeCGを5IU皮下投与し、投与0(投与前)24、48、72および96時間にソムノペンチルを腹腔内投与し、深麻酔下に於て放血屠殺した。動物から卵巣および子宮を採取し、重量を測定した。また、対照として同じ動物から肝臓を採取して急速凍結した。投与72時間後および96時間後の剖検では卵管も採取し、排卵の有無を確認して排卵が確認された卵巣だけを解析に用いた。採取した卵巣の片側は遺伝子定量解析のために直ちに液体窒素による急速凍結を行った。対側の卵巣の約半数はLMDに供する凍結切片を作製するためにO.C.T.コンパウンド(Sakura)に包埋して液体窒素で急速凍結した。残りの卵巣は*in situ* hybridizationにより、遺伝子の発現部位を観察するために4%PFAで固定し、常法に従ってパラフィン包埋した。

急速凍結した卵巣は、個体毎にTRIzol試薬および細胞破碎装置用ビーズ(ステンレスφ3.2、トミー精工)とともに細胞破碎装置用チューブ(トミー精工)に入れ、冷却型ビーズ式細胞破碎装置MS-100R(トミー精工)を用いてホモジナイズし、TRIzol試薬の処方に従い総RNAを抽出した。抽出した総RNAはdeoxyribonuclease  $\square$  (Amplification Grade, Life Technologies Corporation)処理によりゲノムDNAを除去してランダムプライマーを用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型としてStepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies Corporation)を用い、TaqManプローブ法によるreal-time PCRを行った。Real-time PCRでは、プライマー設計ソフトウェア(Primer Express)を用いて設計したTaqManプローブおよびプライマーを用い、*mdr1a* および *mdr1b* のmRNAを定量した。また、内在性コントロールとしてglyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase(*GAPDH*) mRNAを定量し、*GAPDH* mRNA発現量で補正した相対発現量を各遺伝子の発現量とした。

4 %PFA 固定しパラフィン包埋した卵巣は4  $\square$ m 厚の切片を作製し乾燥させた後、10 %に調整したホルムアルデヒドに浸漬し室温で60分間インキュベートした。切片を一晚40  $\square$ でインキュベートし乾燥させ脱パラフィン処理した後、キットの処方に従いQuantiGene ViewRNA (Affymetrix/Panomics) による *in situ*

hybridizationを行った。*Mdr1a* mRNA および *mdr1b* mRNA の *in situ* hybridization に用いるプローブは、遺伝子配列情報(Accession Nos. NM\_133401 および NM\_012623)に基づきQuantiGene ViewRNA用に設計されたものを使用した。また、陽性対照として*GAPDH* mRNA (Accession No. NM\_017008)についても*in situ* hybridizationを行った。切片は*in situ* hybridizationを行った後、ヘマトキシリン(Gill's Hematoxylin  $\square$ , HE染色用、武藤化学)で対比染色し、光学顕微鏡下で鏡検した。

5)LMDを応用した発現解析

4)で採取し、O.C.T.コンパウンドに包埋して凍結した卵巣のうち、黄体を有するeCG投与後72および96時間の卵巣を用い、黄体組織特異的な遺伝子定量解析を行った。クリオスタットを用いて卵巣断面の中心部付近から10  $\mu$ mの厚さで6枚の連続切片を作製し、両端はヘマトキシリンエオジン染色を行った。中間の4枚はPEN foil付きスライドガラス(2.5- $\mu$ m thick, Leica Microsystems)に拾い、0.05%トルイジンブルーで染色した。アルコールで脱水し、キシレンに浸漬した後風乾してLMDに供した。

LMD装置に付属した顕微鏡で標本を観察し、黄体組織を選択して切り出した。切り出した黄体組織は、RNeasy Plus Micro (Qiagen)を用いて総RNAを抽出した。得られたRNAはSuper-Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCRを用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。逆転写ではランダムヘキサマーを用いた。得られたcDNAを鋳型として、3)で述べた方法により*ABCB1a*, *ABCB1b* および *GAPDH* のmRNAを定量した。また、黄体組織のプロジェステロン分泌能を知るために、*3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD)* をコードするmRNAも定量した。

#### 4. 研究成果

1) 卵巣に発現する薬物トランスポーターの探索

PCRを行った結果、卵巣組織では*ABCB1a* および *ABCB1b* 発現が明らかであったことから、これらを解析対象に選定した。

2) 卵胞発育、排卵および黄体形成に伴う*mdr1*の局在

排卵検査の結果、eCG投与後72時間ではすべての動物の卵管膨大部に新鮮な卵が確認され、96時間では全例の卵管に卵が観察され、eCG投与によって卵胞発育が促され、投与3日後に自然排卵が起こることが確認された。また、卵巣はeCG投与後の時間経過に伴い重量を増し、さらに排卵後に形成された黄体は72時間と比べて96時間ではサイズを増していた。

免疫組織化学では、いずれの時期の卵巣においても*mdr1*陽性反応は、発育卵胞の顆粒

層細胞の細胞膜に認められ、投与後 72 時間以降には黄体細胞の細胞膜にも認められた。原始卵胞および一次卵胞については、陽性反応は殆ど認められなかった。顆粒層細胞の染色強度を卵胞間で比較すると、胞状卵胞が最も強く、特に排卵前日の投与後 48 時間での染色が強く認められた。各発育段階の卵胞の莢膜および卵母細胞には陽性反応は殆ど認められなかった。胞状卵胞においては、その周囲の毛細血管に陽性反応が認められた。黄体組織は、投与 72 時間後と比べて投与 96 時間後のサイズは大きくなり、内部も充実していた。このことから、*mdr1* は主として発育卵胞の顆粒層細胞および黄体細胞に発現していることが示されたが、免疫組織化学で用いた第一抗体は、ふたつのアイソフォームのいずれとも交叉すると考えられることから、それぞれのタンパク質の組織特異的な局在は免疫組織化学からは明らかにならなかった。

### 3) 卵胞発育、排卵および黄体形成に伴う *MDR1* 遺伝子 (*ABCB1a* および *ABCB1b*) の発現変化

eCG 投与後の時間経過に伴う *mdr1* 遺伝子の発現量は、*ABCB1a* および *ABCB1b* との間で異なるパターンを示した。すなわち、*ABCB1a* は投与 24 時間までは投与前と同レベルであったが、排卵前日の投与 48 時間に高値を示した後、排卵日である投与 72 時間に一旦低下し、投与 72 時間に再び増加に転じた。一方、*ABCB1b* は排卵前日まで顕著な変動は認められなかったが、排卵日に低下し翌日まで低値で推移した。同じ動物の肝臓では発現に変動は認められなかったことから、これらの変化は卵巣に固有の変化であると考えられる。

*In situ* hybridization を行って両遺伝子の局在を観察したが、*ABCB1a* のシグナルはいずれの時期の卵巣にも認められなかった。一方、*ABCB1b* のシグナルは、いずれの時期も発育卵胞の顆粒層細胞に認められたが、黄体にシグナルは認められなかった。マウスの卵巣では *ABCB1a* の発現は *ABCB1b* と比べて低いことが報告されていることから、標的遺伝子を増幅により定量する real-time PCR で検出されても、*in situ* hybridization では可視化に至らなかった可能性が考えられる。また、*ABCB1a* と *ABCB1b* とではやや異なるシステムの可視化を行ったことから、可視化方法の違いによる検出感度の差も関与していることが考えられる。

遺伝子定量では特に排卵後に *ABCB1a* と *ABCB1b* との間で発現に差が認められ、*ABCB1a* は増加に転じたのに対し、*ABCB1b* は低値で推移した。また、*in situ* hybridization この時間の卵巣の卵胞に *ABCB1b* シグナルが認められたにもかかわらず、黄体にはシグナルが認められなかったことから、黄体組織特異的な発現変化が示唆

された。そこで投与 72 および 96 時間の卵巣凍結切片から黄体組織を LMD で採取し、*ABCB1a* と *ABCB1b* の発現量を定量して、時間経過に伴う変動を調べた。その結果、*ABCB1b* は形成後の経過時間が進行しても黄体組織における発現量は低値で推移したが、*ABCB1a* は形成後の時間経過に伴い、発現量が増加した。プレグネロンを基質としてプロジェステロンを合成する *3 $\beta$ -HSD* mRNA の発現量は時間経過に伴って増加したことから、黄体組織の機能的な発達に伴い、*ABCB1a* 発現量が増加するが、*ABCB1b* は発現も少なく、変動も乏しいことが示唆された。これらのことから、eCG 投与後の卵胞発育、排卵および黄体の発達過程で *ABCB1a* と *ABCB1b* は異なる動態を示し、特に黄体での発現には顕著な差のあることが LMD を用いた解析から示唆された。

以上のように LMD を用いて特定の組織を切り出し、遺伝子定量解析を行うことは、組織特異的な解析をもたらす、*ABCB1a* と *ABCB1b* の発現のように直接の解析が困難な分子の動態を検索する上で有用であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 菊地 朝香、鈴木 真歩、山本 萌、小川 祐布子、川嶋 潤、代田 欣二、代田 眞理子： 幼若ラットの卵巣における Multidrug resistant protein (MDR) 1/ATP-binding cassette subfamily B (ABCB) 1 の発現、第 157 回日本獣医学会学術集会
- 2) 代田 眞理子： 生殖生物学から理解する卵巣毒性、第 30 回関西生殖発生毒性セミナー

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

代田 眞理子 (麻布大学獣医学部)

研究者番号：40426424

### (2) 研究分担者

代田 欣二 (麻布大学獣医学部)

研究者番号：70147974