

学位論文

「血管内皮成長因子による黄体機能調節機構の解明と
妊娠維持・早産予防への応用」

指導教授名 馬嶋 正隆

申請者氏名 和田 貴子

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 旨

血管内皮成長因子 (VEGF) が血管新生において重要な役割を果たしていることは広く知られている。本研究では、マウスの妊娠中期以降において、VEGF が黄体の血流維持に重要な役割を担うことを見出した。分娩直前になると、黄体細胞の VEGF 発現が減弱し、その結果生じる黄体血管内の血栓形成に起因する血流障害を引き金として、黄体で産生されたプロゲステロンの循環への移行量減少、血漿中プロゲステロン濃度低下、子宮筋収縮性亢進、分娩、という一連の反応が起こる。また、妊娠中期に低分子 VEGF 受容体阻害薬を投与することで、正常分娩直前で観察される一連の反応と同様の機序による早産が引き起こされることを明らかにした。

以上より、妊娠中期以降のマウスにおいて VEGF / VEGFR-2 システムは循環中のプロゲステロン量の調節と、分娩のタイミングを決定する重要な因子であることが示唆された。

目次

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1. 序論 | 2 |
| 2. 方法 | |
| 2-1. 使用動物、妊娠動物の作成 | 3 |
| 2-2. 実験プロトコール | 3 |
| 2-3. 組織固定(卵巣・臍臓)とレクチンによる灌流血管の描出 | 4 |
| 2-4. 免疫染色 | 4 |
| 2-5. 蛍光画像の取得 | 5 |
| 2-6. 定量的解析 | 5 |
| 2-7. 血漿および分泌液中のプロゲステロン濃度の測定 | 6 |
| 2-8. 子宮筋の自発性収縮測定実験 | 6 |
| 2-9. 統計解析 | 6 |
| 3. 結果 | |
| 3-1. 妊娠中期以降の黄体における VEGF 発現と血管構造・機能の変化 | |
| 3-1-1. 黄体における VEGF/VEGFR-2 発現分布 | 7 |
| 3-1-2. 妊娠経過に伴う黄体および腓ラ氏島における VEGF 発現変化 | 7 |
| 3-1-3. 妊娠経過に伴う黄体の VEGFR-2 発現の変化 | 9 |
| 3-1-4. 妊娠経過に伴う黄体における血管傷害 | 11 |
| 3-1-4-1. 血管内皮細胞 | 11 |
| 3-1-4-2. 基底膜 | 12 |
| 3-1-4-3. ペリサイト(周皮細胞 / 壁細胞) | 12 |
| 3-1-5. 妊娠経過に伴う血管機能変化 | 18 |
| 3-1-5-1. 卵巣黄体のマクロ所見 | 18 |
| 3-1-5-2. 黄体内灌流血管 | 18 |
| 3-1-5-3. 黄体におけるフィブリン沈着 | 20 |
| 3-1-6. 妊娠経過に伴う血漿中プロゲステロン濃度の変化 | 22 |
| 3-1-7. 妊娠経過に伴う子宮筋の自発性収縮の観察 | 22 |
| 3-2. 黄体における VEGF 発現の妊娠中期以降における意義 | |
| 3-2-1. KRN633 処置の妊娠維持率に及ぼす影響 | 23 |

| | |
|--|----|
| 3-2-2. KRN633 処置の血管に及ぼす影響 | 24 |
| 3-2-2-1. KRN633(d16.5)と vehicle(d16.5)の卵巢黄体のマクロ所見 | 24 |
| 3-2-2-2. 卵巢黄体の血管内皮細胞と灌流血管 | 25 |
| 3-2-2-3. 膝ラ氏島における血管内皮細胞と灌流血管 | 27 |
| 3-2-2-4. 黄体におけるフィブリン沈着 | 28 |
| 3-2-2-5. 黄体内ペリサイト | 30 |
| 3-2-2-6. 膝ラ氏島におけるペリサイト | 32 |
| 3-2-3. KRN633 処置の血漿中プロゲステロン濃度に及ぼす影響 | 34 |
| 3-2-4. KRN633 処置の子宮筋の収縮性に及ぼす影響 | 34 |
| 3-2-5. KRN633 処置の血漿中プロゲステロン濃度と黄体からの プロゲステロン基礎分泌量の関係 | 35 |
| 4. 考察 | |
| 4-1. VEGF/VEGFR-2 情報伝達経路の 黄体血管構造・機能に及ぼす影響について | 37 |
| 4-2. 分娩直前に生じる黄体循環障害のメカニズムについて | 37 |
| 4-3. VEGF/VEGFR-2 発現変化と分娩誘発について | 38 |
| 4-4. 血中プロゲステロン濃度低下のメカニズムについて | 38 |
| 4-5. 卵巢黄体での VEGF 発現の調節メカニズムについて | 39 |
| 4-6. 全身性の VEGF 阻害における各組織の感受性について | 39 |
| 4-7. ヒトへの分娩メカニズム解明への応用について | 40 |
| 5. 総括 | 40 |
| 6. 今後の課題 | 40 |
| 7. 謝辞 | 41 |
| 8. 引用文献 | 41 |
| 9. 業績目録 | 46 |

本

文

1. 序論

我が国の新生児救命率は世界最高水準にあるものの、早産によって出生した児の周産期の罹病率および死亡率は高い。そして、早産児はその後の神経発達障害など、長期間にわたる医療および家族のケアを必要とする。最近の医学の進歩は目覚ましいが、残念なことに早産率はほとんど減少してない。今後は、いかに早産を予防するかが、周産期医療上の課題になると考えられる。

早産は、感染や絨毛膜羊膜炎、胎盤循環不全などを刺激因子として、炎症性サイトカインなどの中間作動物質が誘導され、早期に陣痛が発来する症候群であるとされている (Bastek *et al.*, 2008; McIntire and Leveno, 2008)。その刺激因子の一つにホルモンの変化があげられる。特に、プロゲステロンは中間作動物質の誘導、それに続く分娩の発来を抑制するとされており、実際に妊娠中にプロゲステロンを補充すると早産のリスクを減らすことが報告されている (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2003)。治療においては、早産の原因の約 50%を占める感染については、原因が明らかであるため薬物療法が確立している。しかし、残りの 50%を占める原因不明の早産については、子宮収縮抑制剤やマグネシウム製剤による子宮筋の収縮を抑制するための対症療法を行っているのが現状であり、残念な結果に終わることも多い。それゆえに、早産の予防や、より効果的な治療戦略を発展させる必要がある。そこで本研究の目的は、まだ完全に解明されていない妊娠の維持および分娩のタイミングを調節するメカニズムを明らかにすることである。

血管内皮細胞成長因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) は、腫瘍などの病的血管新生のみならず、生理的な血管新生においても重要な促進因子である (Risau, 1997; Shibuya, 2006)。この VEGF の作用は、主にその受容体である VEGF receptor-2 (VEGFR-2) を介して発揮される (Quinn TP, 1993)。卵巣においては、排卵後に形成される黄体での急激な血管新生に VEGF/VEGF receptor-2 (VEGFR-2) が関与している (Ferrara *et al.*, 1998; Wulff *et al.*, 2001)。さらに VEGF/ VEGFR-2 は、血管新生を促進するだけでなく、血管の透過性・緊張などの血管機能維持にも関与していることが知られている。従って、黄体においては、十分な血流を維持し、黄体細胞にプロゲステロンの合成に必要なコレステロールを供給し、産生されたプロゲステロンを循環中に運ぶための血管機能維持に関与している可能性が示唆されている (Redmer and Reynolds, 1996)。

妊娠の初期・中期のラットにおいて、VEGF は卵巣の黄体細胞で発現し、黄体の血管新生とそれによる黄体形成およびプロゲステロンの産生に関与している (Kashida *et al.*, 2001; Pauli *et al.*, 2005)。しかし、血管新生が終了した黄体においても VEGF 発現は分娩直前まで高レベルを維持している (Li *et al.*, 2002)。この VEGF が妊娠中期から分娩直前の黄体において、黄体血管の構造・機能および黄体細胞の機能維持に対してどのような役割を担っているのかについては明らかではない。ラットやマウスなどの齧歯類においては、黄体退縮による母胎血中からのプロゲステロンの消退が、分娩の引き金になることが知られている

(Mitchell and Taggart, 2009; Ratajczak *et al.*, 2010)。よって、VEGF が黄体機能をコントロールし、分娩のタイミングを決定している可能性がある。

そこで本研究では、1) 妊娠中期から分娩直前期にかけての黄体の VEGF と VEGFR-2 の発現変化と血管構造・機能の変化について、2) VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害薬により VEGF の作用を低下させた場合の黄体の血管構造と黄体機能について明らかにすることを目的として、妊娠マウスを用いて検討を行った。

2. 方法

2-1. 使用動物、妊娠動物の作成

ICR 系雌性マウス (8-20 週齢) と雄性マウス (8-48 週齢)(Charles River Breeding Laboratories, Kanagawa, Japan) を 12 時間の明暗サイクルで、自由摂食ならびに自由飲水の下で飼育して実験に供した。

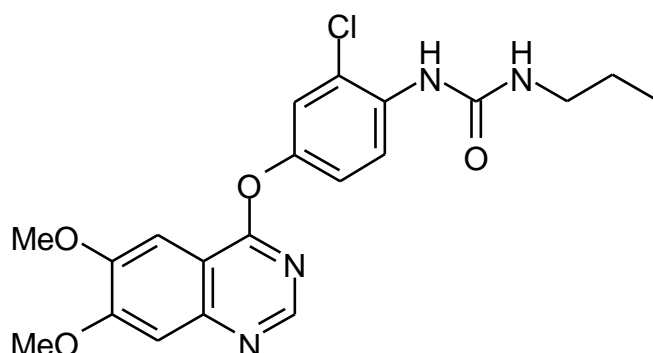
妊娠動物は雌マウス 2 匹と 1 匹の雄マウスを 17 時から翌日 10 時まで一晩同居させた。膣栓を認めた雌マウスを妊娠 0.5 日 (以下 d0.5) として d13.5 (妊娠中期)、d16.5 (妊娠後期) ならびに d18.5 (分娩直前) に以下の実験を行った。

2-2. 実験プロトコール

プロトコール 1 : 正常の妊娠 d13.5、d16.5、d18.5 各時期において、1) 卵巢黄体における VEGF と VEGFR-2 の発現変化、2) 黄体血管の構造と機能、3) 血漿中のプロゲステロン濃度の変化、および 4) 子宮筋の収縮性について調べた。

プロトコール 2 : 妊娠中期の VEGF 阻害の影響を調べるために、低分子 VEGF 受容体 (VEGFR) チロシンキナーゼ阻害薬 (KRN633)(Nakamura *et al.*, 2004) を使用し、1) d13.5 より分娩 (d18.5-d19.5) に至るまで連日 KRN633 を投与した。2) d13.5 から d15.5 の 3 日間、KRN633 を投与し、黄体血管構造と機能の変化、血漿中プロゲステロン濃度の変化、および子宮筋の収縮性を調べた。

KRN633 は、精製水で調整した methylcellulose (0.5%) 500 μ L に 300 mg/kg の用量分を懸濁させた (Wada *et al.*, 2010)。この懸濁液を 1 日 1 回経口投与し、この群を KRN633 処置群とした。対照には溶媒である methylcellulose (0.5%) を 500 μ L 経口投与し vehicle 群とした。



KRN633 の構造

(*N*-{2-chloro-4-[(6,7-dimethoxy-4-guainazolinyl)oxy]phenyl}-*N*-propylurea)

2-3. 組織固定 (卵巣と膵臓) とレクチンによる灌流血管の描出

各妊娠期のマウスを、pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.) で麻酔した。速やかに胸腔を開き、左心室を小さく切開し、そこへ 18G の金属性注射針を 1.0 cm の長さに切断し、先端部を滑らかに加工して作製したカニユーレを刺入した。注射針の先端を大動脈起始部に保持して組織固定液 (1% paraformaldehyde 含有 PBS) を全身性に 5 分間定圧 (120-130 mmHg) で灌流し、組織固定を行った (以下、灌流固定)。その際、右心房には、灌流液を排出させるために切開を加えた。また、血流のある血管 (灌流血管) を標識するためには、FITC 標識された *Lycopersicon esculentum* lectin (100 µg / 0.9% NaCl 100 µl; Vector laboratories, Burlingame, California) と Concanavalin A (500 µg / 0.9% NaCl 200 µl; Vector laboratories) を尾静注し、その 30 分後に灌流固定した (Thurston *et al.*, 1996)。灌流後、組織を摘出し、4℃ で 1 時間、1% paraformaldehyde 含有 PBS にて固定した後、各臓器を数回 PBS で洗浄し、30% sucrose 含有 PBS 中に入れ一晩浸透させた。その後 O.C.T compound (Sakura Finetek, Torrance, California) 中に埋めて凍結させ、-80℃で保存した。

2-4. 免疫染色

O.C.T compound に埋め込まれた凍結組織を、クリオスタット (HM550; Carl Zeiss, Tokyo, Japan) を用いて 20 µm の切片を作製し、Superfrost®/plus コートのスライドガラス (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 上で乾燥させた。その標本は、まず O.C.T compound を取り除くために洗浄し、ブロッキングとして、5% normal goat serum または 5% normal hamster serum を含む 0.3% Triton X 含有 PBS (PBS-T) で 30 分から 1 時間、常温にてインキュベートした。次に 5% normal serum 含有 PBS-T で標的とする 1 次抗体を希釈し、常温で 12-15 時間インキュベートした。1 次抗体として、血管内皮細胞 : rat monoclonal anti-CD31 antibody (1:500, clone MEC 13.3; BD Pharmingen, San Diego, California) または hamster monoclonal anti-CD31 antibody (1:500, clone 2H8; Chemicon, Temecula California)、基底膜 : rabbit polyclonal antitype IV

collagen antibody (1:8,000; Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan)、ペリサイト:rabbit anti-NG2 polyclonal antibody (Chemicon) と rabbit anti-platelet derived growth factor receptor β (PDGFR- β) monoclonal antibody (C82A3)(1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) または rat monoclonal anti-PDGFR- β antibody (CD140b)(1:500; eBioscience, San Diego, California)、フィブリン:rabbit polyclonal antifibrinogen/fibrin (1:500; Dako, Carpinteria, California) 以下 anti-fibrin antibody と略す。VEGF と VEGFR-2:goat polyclonal anti-VEGF164 antibody (1:500; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) と rabbit monoclonal anti-VEGFR-2 antibody (1:500, 55B11; Cell Signaling Technology) を使用した。

標本を PBS-T で数回洗浄した後、1次抗体に対して特異的な2次抗体 (1:400; Jackson ImmunoResearch) と5時間、常温でインキュベートした。その後、PBS-T で数回洗浄し、Vectashield (Vector Laboratories) で封入した。

2-5. 蛍光画像の取得

各組織切片の観察と画像の取得には、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE, Tokyo, Japan) と共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM510; Carl Zeiss, Tokyo, Japan) を用いた。

2-6. 定量的解析

取得した蛍光画像を画像解析ソフト ImageJ (version 1.41d)(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて目的に応じて解析した。

1) VEGF と VEGFR-2 発現: 卵巣黄体および腓ラ氏島における VEGF 発現の変化は、黄体領域または腓ラ氏島を選択しその選択領域において、VEGF 由来でかつある閾値以上の蛍光強度をもった pixel を VEGF pixel としてその総数を求めた。また、各 VEGF pixel の蛍光強度の総和を、VEGF pixel 総数で除して平均蛍光強度 (mean intensity) を求めた。VEGFR-2 発現分布の評価は、選択した黄体領域の総 pixel 数と VEGFR-2 由来でかつある閾値以上の蛍光強度をもった pixel (VEGFR-2 pixel) の数をそれぞれ求め、選択領域の総 pixel 数に対する VEGFR-2 pixel の割合 (area density) を VEGFR-2 発現密度とした。

2) 血管系の評価: 黄体の血管、基底膜ならびにペリサイトの変化は、選択した黄体領域内で、CD31 由来、type IV collagen 由来、NG2 または PDGFR- β 由来でかつある閾値以上の蛍光強度をもつ pixel の数をそれぞれ求め、選択領域の総 pixel 数に対するそれぞれの割合 (area density) を血管密度、基底膜密度、NG2 陽性ペリサイト密度および PDGFR- β 陽性ペリサイト密度とした。

3) 灌流血管の評価: 黄体の灌流血管とフィブリン沈着量の変化は、選択した黄体領域内で、lectin (conA) 由来またはフィブリン由来でかつある閾値以上の蛍光強度をもった pixel の数をそれぞれ求め、選択領域の総 pixel 数に対するそれぞれの割合 (area density) を算出し、灌流血管密度およびフィブリン沈着密度とした。

2-7. 血漿および分泌液中のプロゲステロン濃度の測定

血漿: 麻酔下のマウスの左心室より血液を採取した。採取した血液は、遠心分離し (10,000 回転 / 分、4℃、15 分) 血漿を分取し、-80℃ にて凍結保存した。

分泌液中: 麻酔下に摘出した両側卵巢から、実体顕微鏡下に黄体を単離した。単離した黄体は、混合ガス (95% O₂-5% CO₂) で十分に通気し 37℃ に加温した Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB: 119mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 10mM D-glucose; pH=7.4) で洗浄した。混合ガス (95% O₂-5% CO₂) で十分に通気した KRB を 200 μl 入れた各マイクロチューブに 3 から 4 個の黄体を入れた。始めに 37℃ で 30 分間、前培養し安定化させた。その後、チューブ内の溶液を完全に除去し、新鮮で十分に通気した KRB で黄体を洗浄後、新たに 200 μL の KRB を加え、再度 30 分間インキュベーションした培養液中のプロゲステロン量を測定した。使用した黄体は Lowry 法によりタンパク量を測定し、分泌量はタンパク量あたりの補正值 (pg/μg protein) で表した。

血漿および培養液中のプロゲステロン濃度は、ラジオイムノアッセイ法 (Mitsubishi Chemical Medience, Tokyo, Japan) により測定した。

2-8. 子宮筋の自発性収縮測定実験

摘出子宮筋標本の作製と等尺性張力の測定

マウスを pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.) で麻酔した後、開腹し子宮を摘出した。摘出した子宮は混合ガス (95% O₂-5% CO₂) で十分に通気し氷冷した Krebs-Ringer Bicarbonate 溶液 (KRB, NaCl 119 mM; KCl 4.8 mM; MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mM; KH₂PO₄ 1.2 mM; CaCl₂ · 2H₂O 2.5 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glucose 10 mM) (pH=7.4) に浸した。その子宮を長軸方向に切開し、胎盤附着部位を避け 4 つの均一な筋肉条片 (1 x 2 x 7 mm) を作製した。

筋肉の条片は、37℃ に加温し混合ガス (95% O₂-5% CO₂) で十分に通気した KRB を満たした 10 ml マグナス管内に懸垂した。続いて、標本に 1 g の初期張力をかけ、60 分間の等尺性張力測定を行った。実験の最後に、各標本において最大収縮を引き起こす 35 mM KCl 溶液 (NaCl 88.8 mM; KCl 35 mM; MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mM; KH₂PO₄ 1.2 mM; CaCl₂ · 2H₂O 2.5 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glucose 10 mM) を 10 分間作用させ脱分極性の収縮反応を観察した。

2-9. 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。2 群間の検定には t-検定を行い、多群間の比較には one-way ANOVA を使った。P<0.05 をもって統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 妊娠中期以降の黄体における VEGF 発現と血管構造・機能の変化

3-1-1. 黄体における VEGF と VEGFR-2 発現分布

d13.5 の黄体における VEGF、VEGFR-2 および CD31 (血管内皮細胞) の免疫活性を調べた。VEGF は黄体細胞に発現し (arrows)、VEGFR-2 は黄体細胞よりもむしろ血管内皮細胞に強く発現していた (arrowheads)。

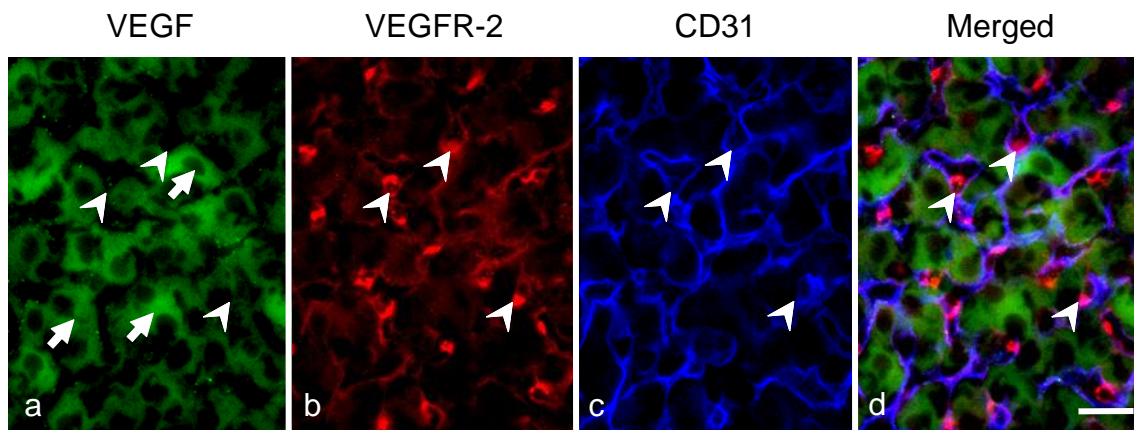


Fig. 1 卵巣黄体における VEGF、VEGFR-2 および CD31 の発現分布

d13.5 のマウス卵巣黄体を示している。VEGF の免疫活性は黄体細胞の細胞質に認められた (arrows)。VEGFR-2 の免疫活性は CD31 のそれと一致していた (arrowheads)。Scale bar: 20 μ m

3-1-2. 妊娠経過に伴う黄体および腓ラ氏島における VEGF 発現変化

妊娠経過に伴う黄体の VEGF 発現変化について免疫組織化学的に検討した。

Fig. 2 は妊娠 d13.5、d16.5 および d18.5 のマウス卵巣黄体 (Fig. 2 a-c) と腓ラ氏島 (Fig. 2 d-f) における VEGF の免疫活性を示している。d13.5 の卵巣黄体では、強い VEGF の免疫活性が黄体細胞に認められた (Fig. 2 a)。この免疫活性は妊娠の経過に伴い低下した (Fig. 2 b, c)。一方、恒常的に VEGF を発現している腓ラ氏島 β 細胞 (Christofori *et al.*, 1995) の VEGF 免疫活性は妊娠経過に伴い変化しなかった。Fig. 2 B と C には各妊娠期の卵巣黄体および腓ラ氏島における VEGF の発現変化を蛍光強度の変化として評価した結果を示している。d13.5 を 100% とすると d18.5 の黄体では $57.3 \pm 8.3\%$ ($n = 9$) と有意に低下したが (Fig. 2 B)、腓ラ氏島ではこのような変化は認められなかった ($107.2 \pm 11.0\%$, $n = 5$) (Fig. 2 C)。

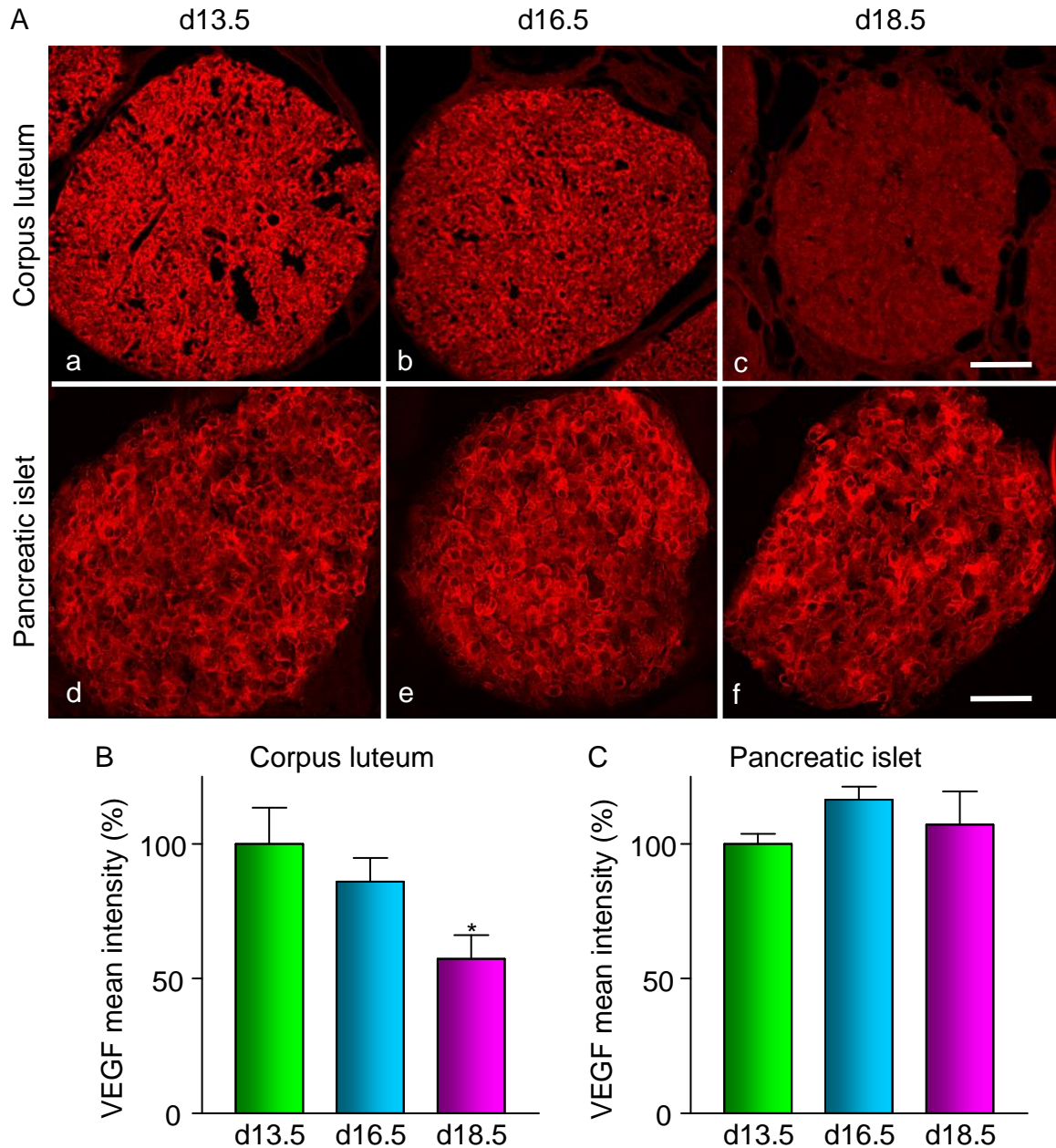


Fig. 2 妊娠経過に伴う卵巣黄体および膵ラ氏島における VEGF 発現変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の卵巣と膵臓の凍結切片を抗 VEGF 抗体で、蛍光免疫染色した結果を示している (A)。VEGF の免疫活性は卵巣黄体 (a-c) および膵ラ氏島 (d-f) に認められた。妊娠経過に伴い黄体の VEGF 免疫活性は低下した。B と C はそれぞれ黄体と膵ラ氏島の VEGF 発現を d13.5 の VEGF mean intensity を 100% として表している。黄体では d18.5 において有意に VEGF の発現が低下するものの (B)、膵ラ氏島では VEGF 発現に変化が認められなかった (C)。Scale bars: 200 μ m (a-c), 50 μ m (d-f) * P <0.05 vs. d13.5

3-1-3. 妊娠経過に伴う黄体の VEGFR-2 発現の変化

黄体内の CD31 陽性血管内皮細胞の分布は d13.5 から d18.5 までほとんど変化しなかったものの血管内皮細胞に認められる VEGFR-2 発現は妊娠経過に伴い低下した (Fig. 3 A)。また、VEGFR-2 の area density を評価すると d16.5 から減少する傾向が認められ始め、d18.5 において有意となった (Fig. 3 B)。

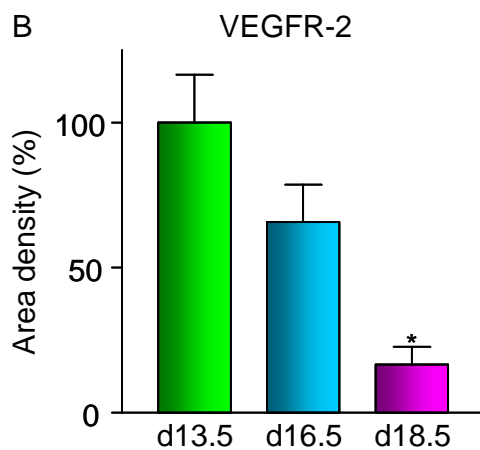
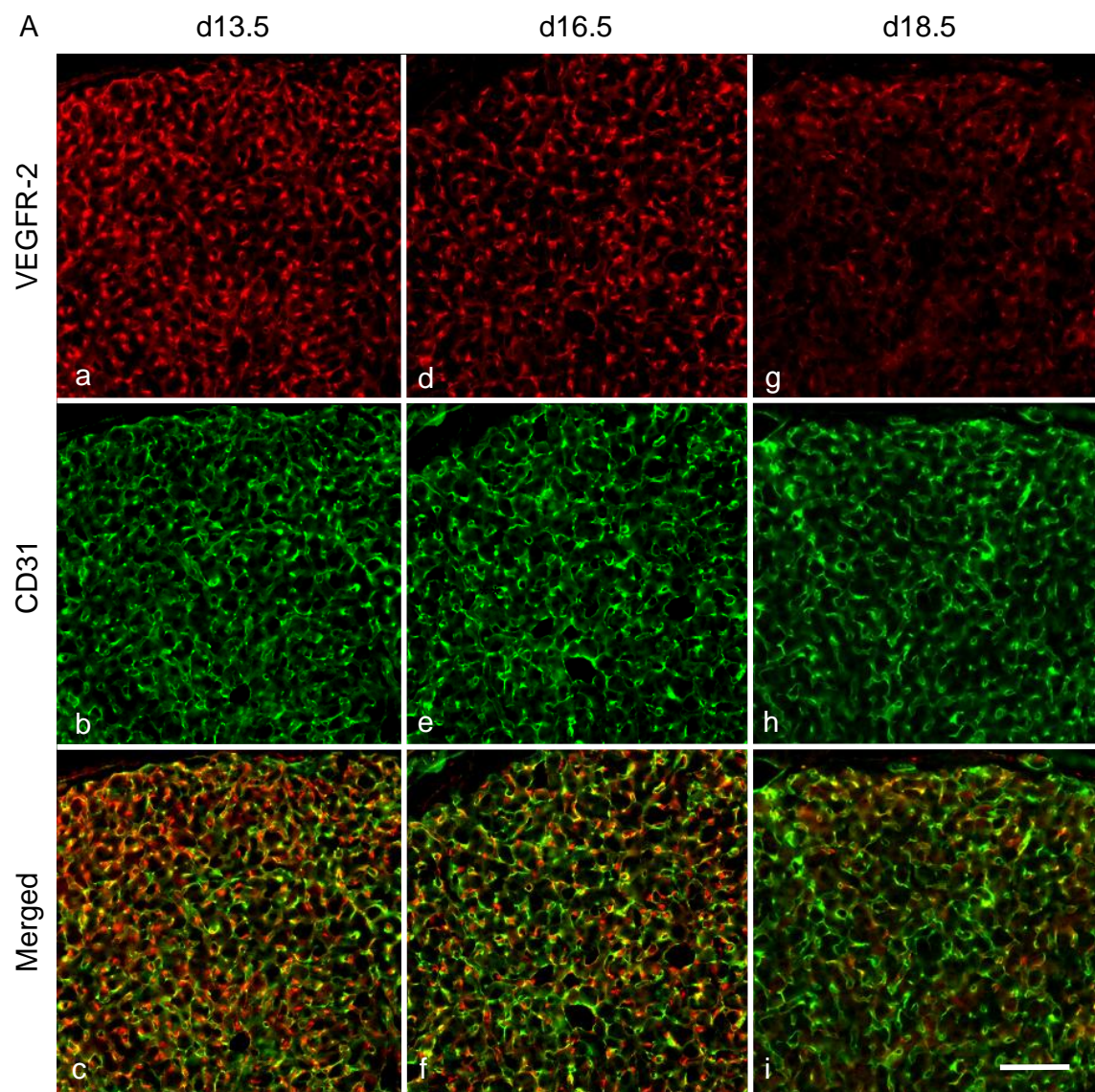


Fig. 3 妊娠経過に伴う黄体の VEGFR-2 発現の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における VEGFR-2 の免疫活性 (a, d, g) および抗 CD31 抗体 (b, e, h) で標識される内皮細胞の分布を示している (A)。妊娠経過に伴い VEGFR-2 発現量は低下した。B は d13.5 の VEGFR-2 area density の値を 100 % とし て各妊娠期における VEGFR-2 area density を表している。d18.5 において有意な低下が認められた。Scale bar: 80 μ m * P <0.01 vs. d13.5

3-1-4. 妊娠経過に伴う黄体における血管傷害

VEGF の作用低下は黄体内の血管にどのような影響を及ぼすのかについて血管を構成する血管内皮細胞、基底膜およびペリサイト (壁細胞 / 周皮細胞) に分けて詳細に検討した。

3-1-4-1. 血管内皮細胞

Fig. 4 A には、各妊娠期の卵巣黄体における血管内皮細胞を抗 CD31 抗体で免疫染色した結果を示している。このように、血管内皮細胞の分布は妊娠経過により顕著な変化を示さなかった。その area density を評価してみても、有意な変化は認められなかった (Fig. 4 B)。

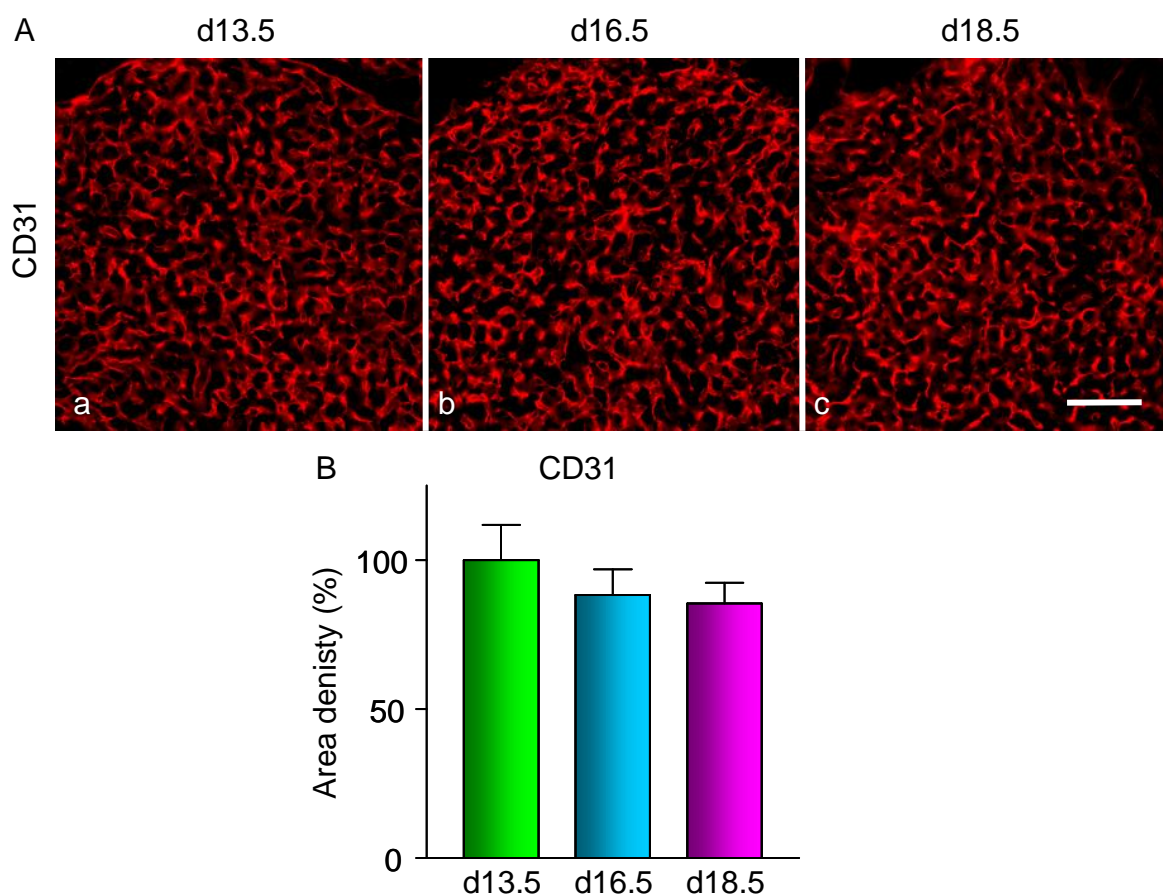


Fig. 4 妊娠経過に伴う黄体内の血管内皮細胞の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における抗 CD31 抗体を用いて免疫染色した結果を示している (A)。妊娠経過に伴い抗 CD31 抗体で標識される血管内皮細胞はほとんど変化しなかった。B は d13.5 の area density の値を 100 % として表している。血管内皮細胞の area density は妊娠経過によって有意な変化を示さなかった。Scale bar: 80 μ m

3-1-4-2. 基底膜

Fig. 5 A には、各妊娠期における卵巣黄体の基底膜を抗 type IV collagen 抗体で免疫染色した結果を示している。基底膜の分布も血管内皮細胞と同様に妊娠経過による変化を示さなかった。Fig. 5 B では、その area density について評価した結果を示しており、有意な変化は認められなかった。

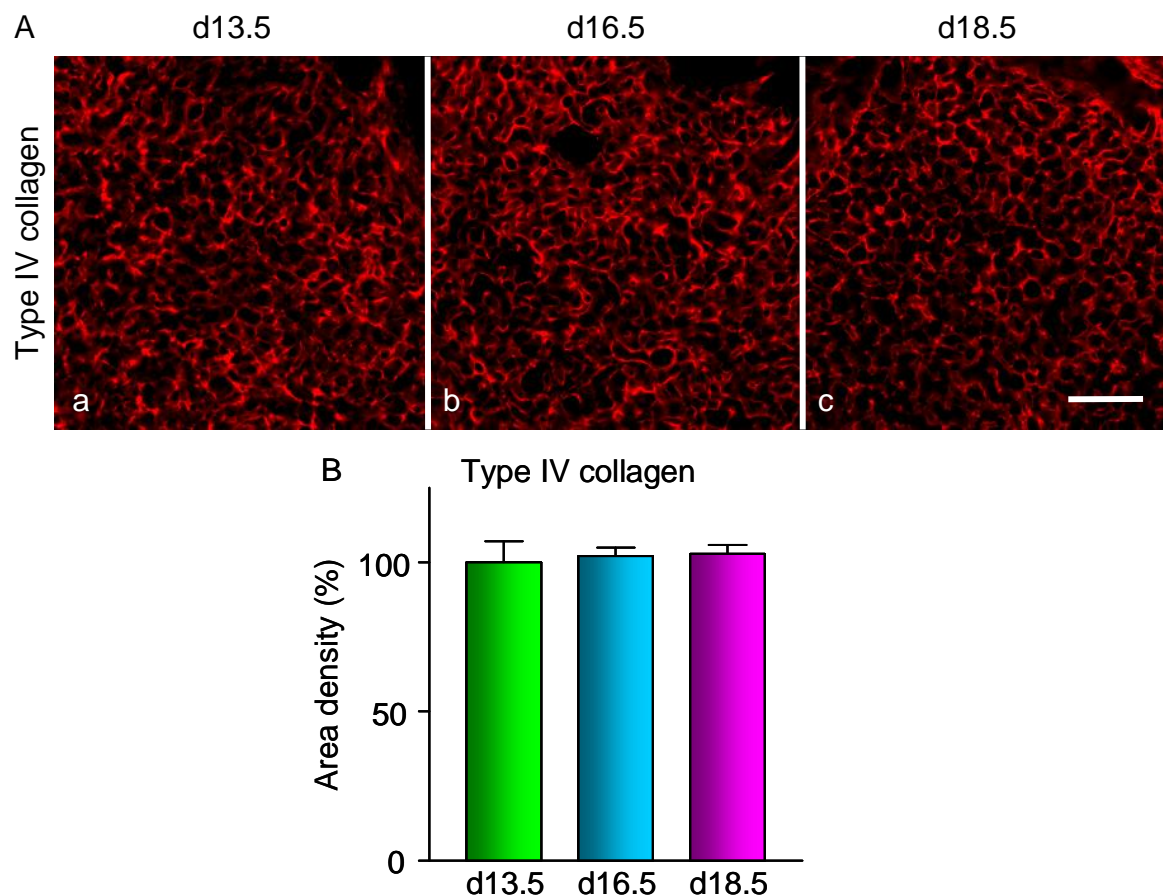


Fig. 5 妊娠経過に伴う黄体内の基底膜の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における抗 type IV collagen 抗体を用いて免疫染色した結果を示している (A)。妊娠経過に伴い抗 type IV collagen 抗体で標識される基底膜はほとんど変化しなかった。B は d13.5 の area density の値を 100 % として表している。基底膜の area density は妊娠経過によって有意な変化を示さなかった。Scale bar: 80 μ m

3-1-4-3. ペリサイト (周皮細胞 / 壁細胞)

ペリサイト (周皮細胞 / 壁細胞) は毛細血管に接着するように存在しており、血管の透過性や内皮細胞の増殖、生存、遊走、成熟に関与している (Armulik *et al.*, 2005)。また、ペリサイトの脱落は血管の不安定化を引き起こすことが知られている。VEGF の作用を阻害

すると黄体のペリサイトが減少するとの報告 (Kuhanert *et al.*, 2008) もあることから、妊娠の経過に伴い黄体内血管のペリサイトが変化する可能性が考えられた。マウスの黄体においては、 α -smooth muscle actin-positive cell は検出できない (Pauli *et al.*, 2005) ため、NG2 と PDGFR- β に対する抗体を用いてペリサイトの分布と phenotype を調べることにした。

Fig. 6 A には各妊娠期の卵巣黄体における NG2 陽性細胞と CD31 で標識された血管内皮細胞を示している。d13.5 の黄体において、NG2 陽性細胞は黄体全体に存在しており、merge 画像で明確に示されるように、血管にしっかりと接着しておりペリサイトに特徴的な形態を有していた。そして NG2 陽性細胞は、妊娠経過に伴い減少した。NG2 陽性ペリサイトを area density として評価してみると d13.5 と比較して d16.5 以降で有意に低下することが示された (Fig. 6 B)。

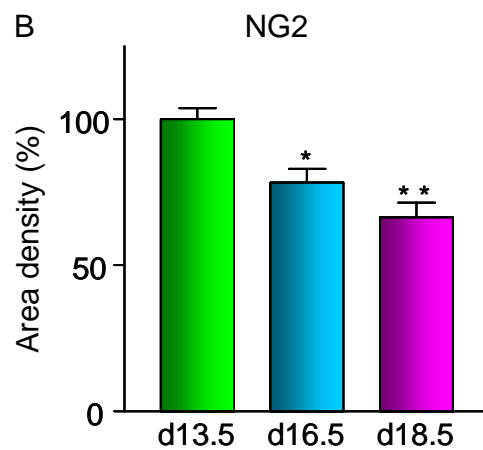
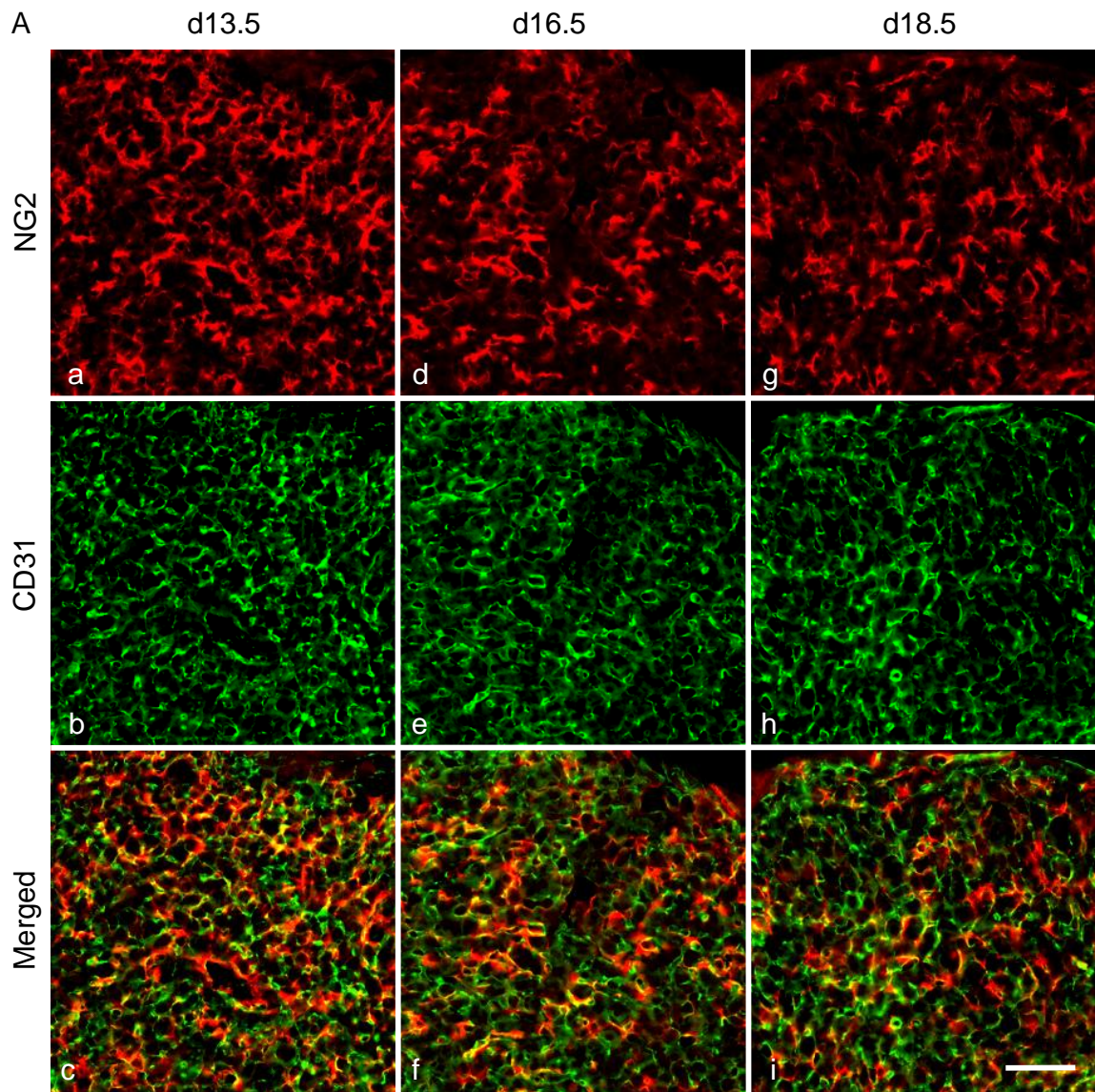


Fig. 6 妊娠経過に伴う黄体の NG2 陽性細胞の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における抗 NG2 抗体で標識された細胞 (a, d, g) および抗 CD31 抗体で標識された内皮細胞の分布 (b, e, h) を示している (A)。妊娠経過に伴い NG2 陽性細胞数が減少した。B は、d13.5 の NG2 area density の値を 100% として表している。d16.5 以降で有意な低下が認められた。Scale bar: 80 μ m * P <0.05, ** P <0.001 vs. d13.5

Fig. 7 A には各妊娠期の卵巣黄体における PDGFR- β 陽性細胞と CD31 で標識された血管内皮細胞を示している。d13.5 の黄体において、PDGFR- β 陽性細胞は NG2 陽性細胞と同様に黄体全体に存在し、ペリサイトの特徴的な形態を示した。しかし、NG2 陽性細胞とは異なり PDGFR- β 陽性細胞は妊娠経過に伴い有意な変化を示さなかった (Fig. 7 B)。

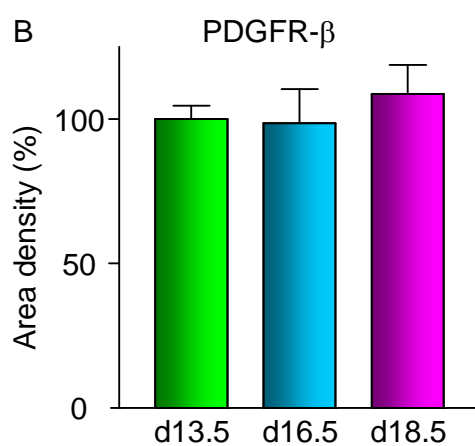
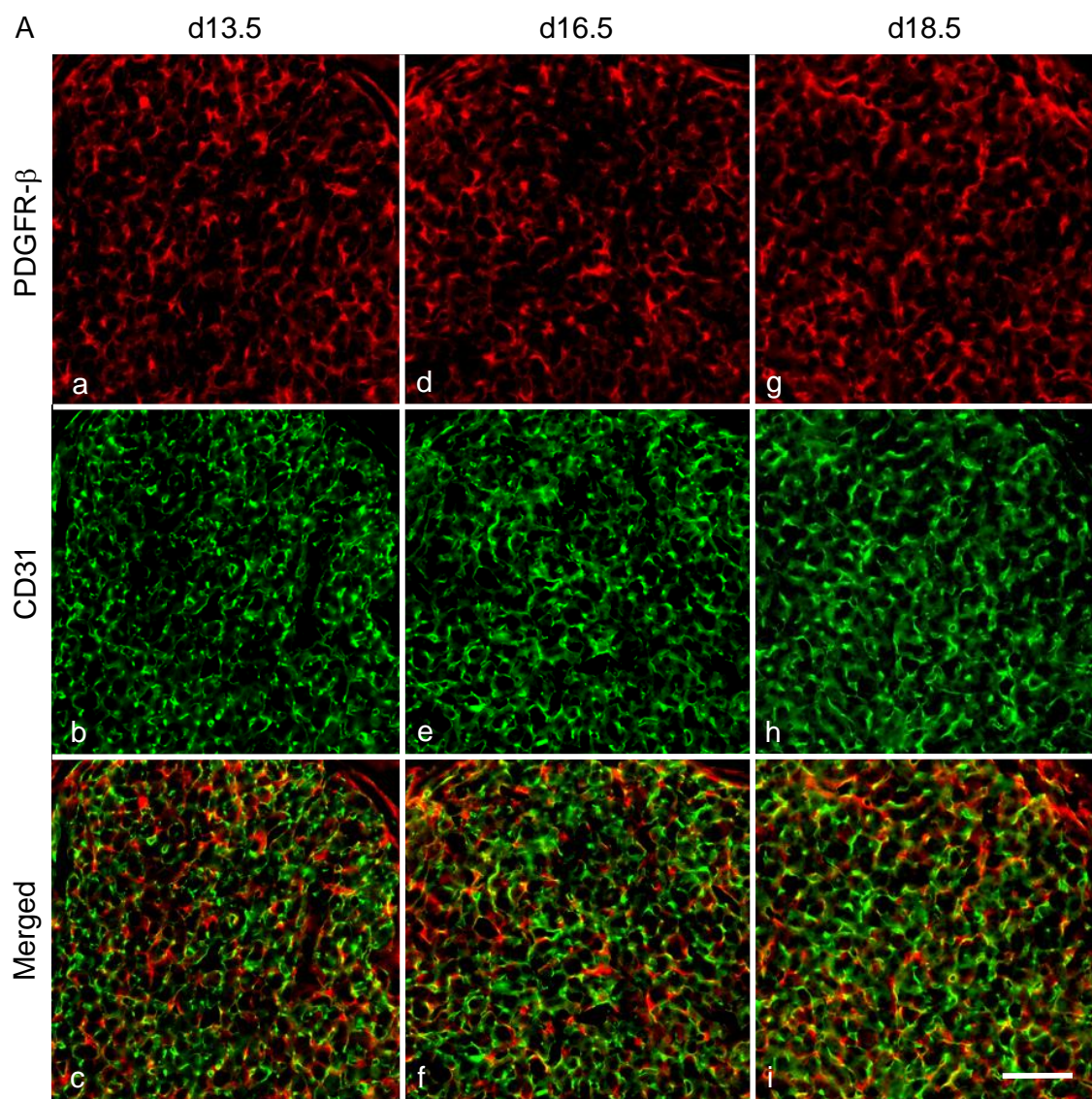


Fig. 7 妊娠経過に伴う黄体の PDGFR- β 陽性細胞の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における 抗 PDGFR- β 抗体で標識された細胞 (a, d, g) および抗 CD31 抗体で標識された内皮細胞の分布 (b, e, h) を示している (A)。妊娠経過に伴い PDGFR- β 陽性細胞の分布はほとんど影響を受けなかった。B は d13.5 に

における PDGFR- β area density の値を 100 % として表したグラフを示している。すべての妊娠期において有意な変化は認められなかった。Scale bar: 80 μ m

次に、NG2 と PDGFR- β の免疫活性の共局在性とそれに及ぼす妊娠経過の影響について検討した。Fig. 8 には各妊娠期の卵巣黄体凍結切片を、抗 NG2 抗体と抗 PDGFR- β 抗体で二重染色した後に、共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像を示している。Merge 画像が示すように、どの妊娠期においても PDGFR- β 陽性ペリサイトの一部は NG2 を発現していた (arrowheads)。結果的に NG2 陰性、PDGFR- β 陽性ペリサイトが増加していた。

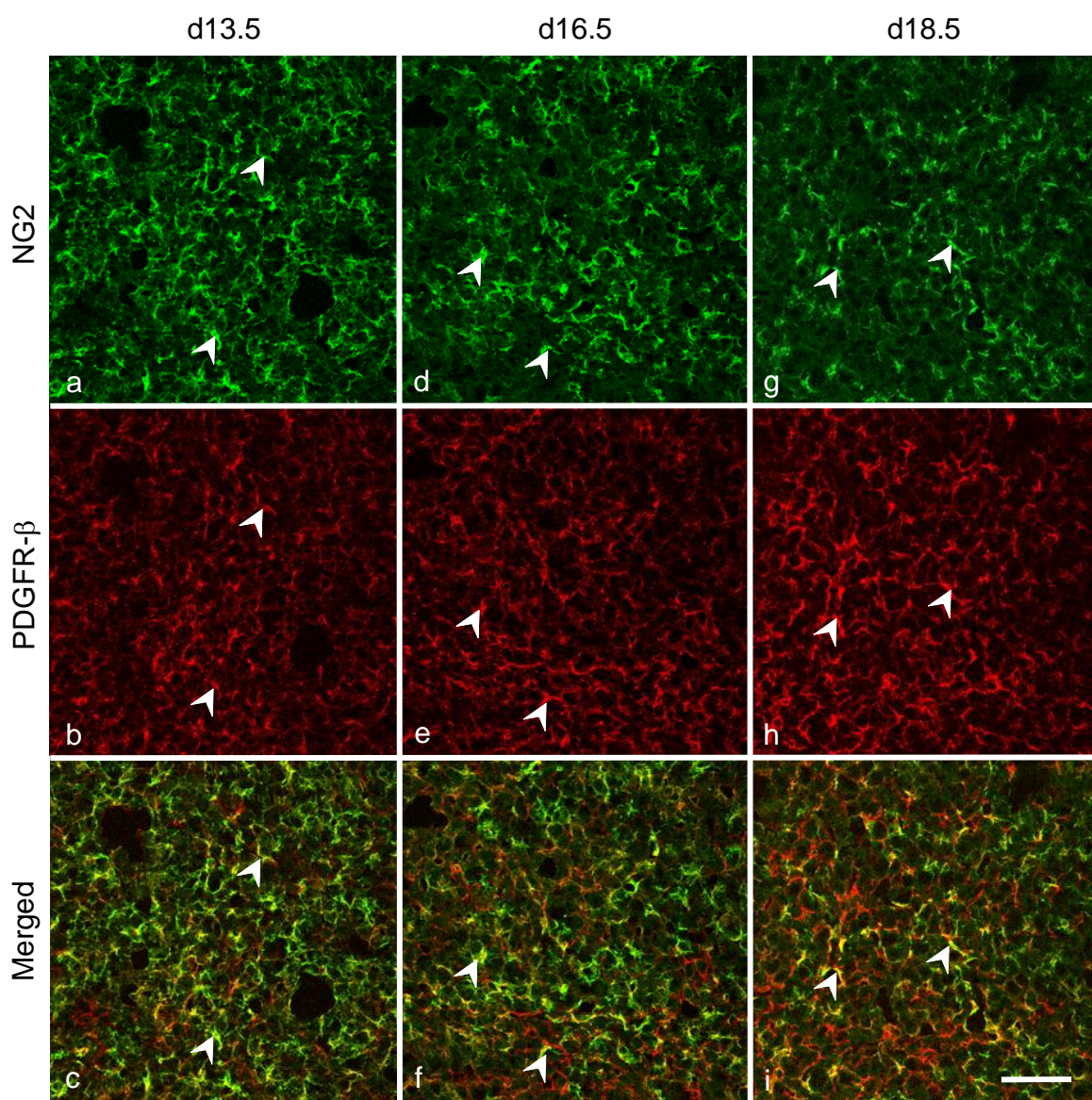


Fig. 8 妊娠経過に伴う黄体の NG2 と PDGFR- β 免疫活性の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における NG2 陽性ペリサイト (a, d, g) および PDGFR- β 陽性ペリサイト (b, e, h) の分布を示している。共焦点レーザー顕微鏡で取得

した画像を 6 μm の projection として示している。どの妊娠期においても PDGFR- β 陽性ペリサイトの一部は NG2 を発現していた (arrow heads)。Scale bar: 90 μm

3-1-5. 妊娠経過に伴う血管機能変化

3-1-5-1. 卵巣黄体のマクロ所見

妊娠中期である d13.5 と分娩直前期である d18.5 の卵巣を示す。d13.5 の黄体 (arrowheads) は赤色で血液が豊富に存在しているように見えたが、d18.5 の黄体は赤味が薄く血液があまり存在していないように見えた。PBS で d13.5 の黄体を灌流したところ黄体の赤色が薄くなった (データは示していない) ことから、この黄体内の赤色は出血ではなく、豊富な血管網内に留まっていた血液に由来するものであると考えられた。

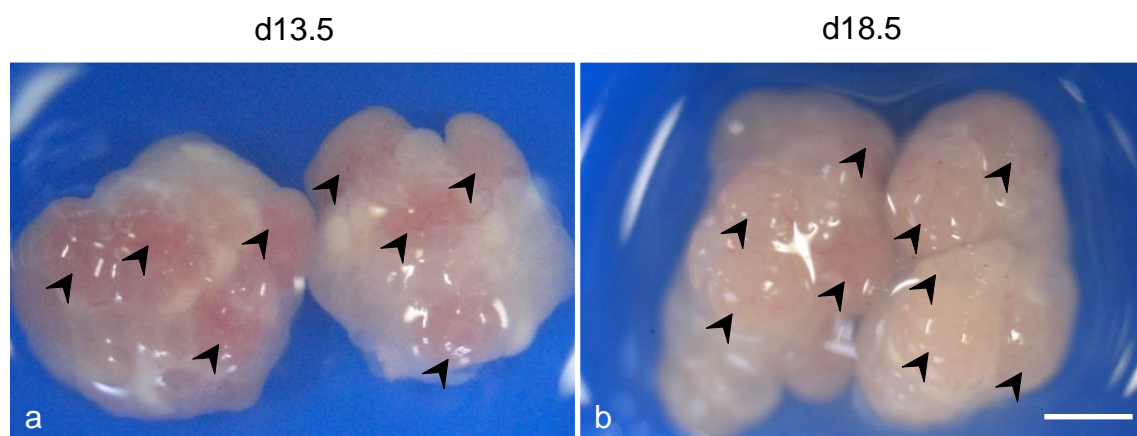


Fig.9 d13.5 と d18.5 の卵巣

d13.5 と d18.5 の卵巣を実体顕微鏡下で観察した (a, b)。黄体を arrowheads で示している。d13.5 の黄体の方が d18.5 のそれよりも赤色がかっていた。Scale bar: 1 mm

3-1-5-2. 黄体内灌流血管

血液循環障害を調べる手法として、レクチンによる灌流血管の可視化法を利用した。Concanavalin A は、レクチンの 1 種であり血管内皮に結合する性質を有する。この性質を利用すると、FITC で標識された Concanavalin A [以下 lectin (conA)] を血管内に投与し循環血液中に十分拡散させることによって、血流が存在している血管 (灌流血管) を蛍光標識することが可能となる。さらに抗 CD31 抗体を用いて免疫染色を行うと、CD31 抗原を有していれば血流の有無に関係なく標識される内皮細胞と、血流を介して lectin (conA) で標識される内皮細胞との分布を区別でき血管内の血流の有無をある程度推測できるようになる。

Fig. 10 には、lectin (conA) を投与することにより灌流血管を標識したマウスから得た卵巣組織切片を抗 CD31 抗体で免疫染色した結果を示している。d13.5 の画像を見てみると

抗 CD31 抗体で標識された内皮細胞と lectin (conA) で標識された内皮細胞のほとんどが一致している。d16.5 でも d13.5 とほとんど変わらないように見えるが d18.5 になると著しく lectin (conA) で標識された内皮細胞が減少した。よって、分娩直前では黄体血管の灌流が減少していることが示された。

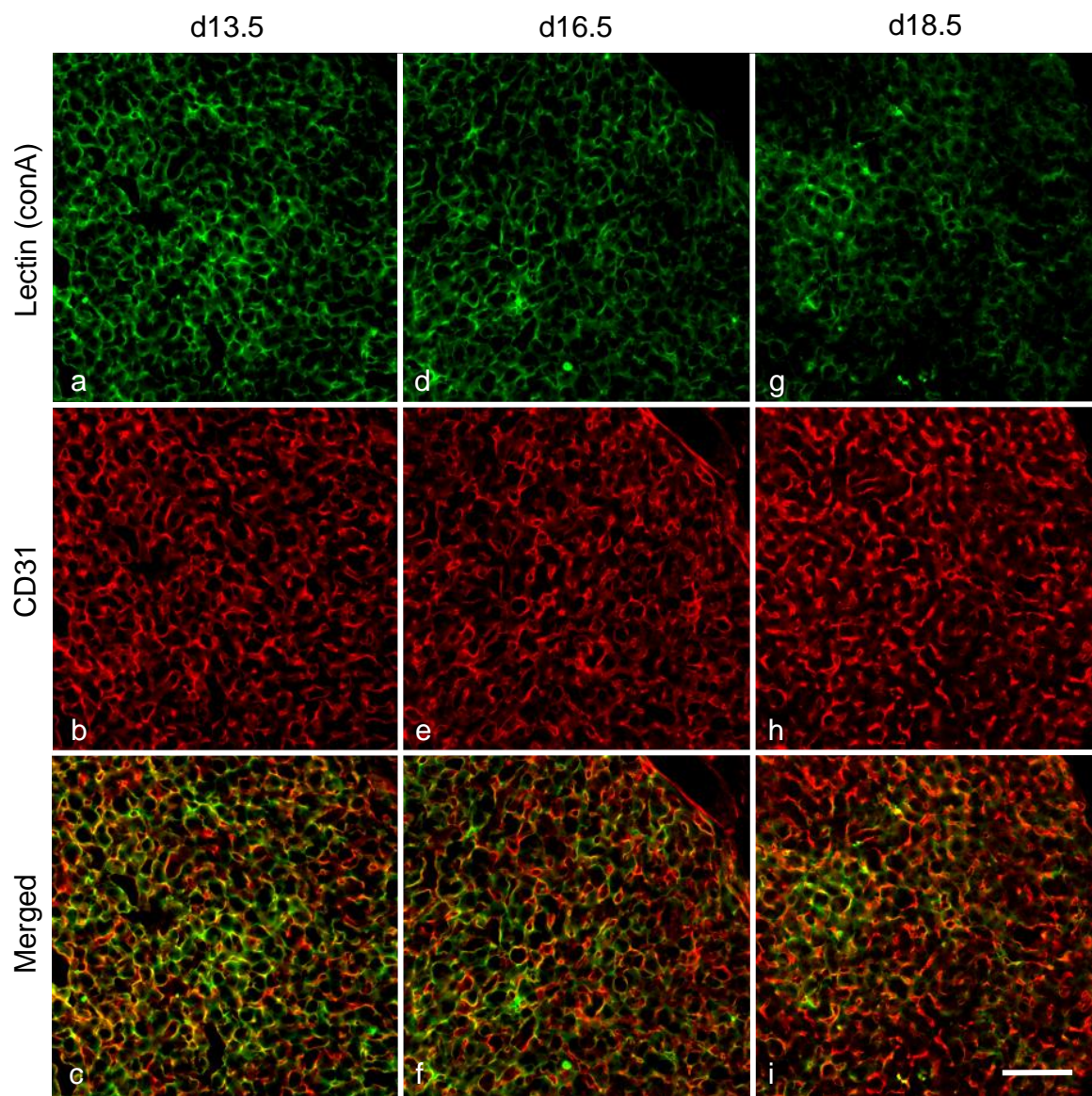


Fig. 10 妊娠経過に伴う黄体内灌流血管の減少

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における lectin (conA) で標識された灌流血管内皮細胞 (a, d, g) と抗 CD31 抗体で標識された血管内皮細胞 (b, e, h) の分布を示している。妊娠経過に伴い CD31 陽性血管内皮細胞には変化が見られなかったが、lectin (conA) 陽性灌流血管内皮細胞は減少した。Scale bar: 80 μ m

3-1-5-3. 黄体におけるフィブリン沈着

VEGF 阻害の際に生じる血流の途絶のメカニズムの 1 つにフィブリンの沈着が報告されている (Eremina *et al.*, 2008; Baffert *et al.*, 2006)。そこで、分娩直前に認める黄体の血流障害にフィブリン沈着が関与しているかどうか、またその分布を検討した。Fig. 11 A には、各妊娠期の卵巣黄体の lectin (conA) で標識された灌流血管とフィブリン沈着を示している。灌流血管が急激に減少する d18.5 においてフィブリン沈着の有意な増加が認められた (Fig. 11 B, C)。よって、分娩直前の黄体内血管には VEGF 阻害時と同様のフィブリン沈着が生じていることが示された。

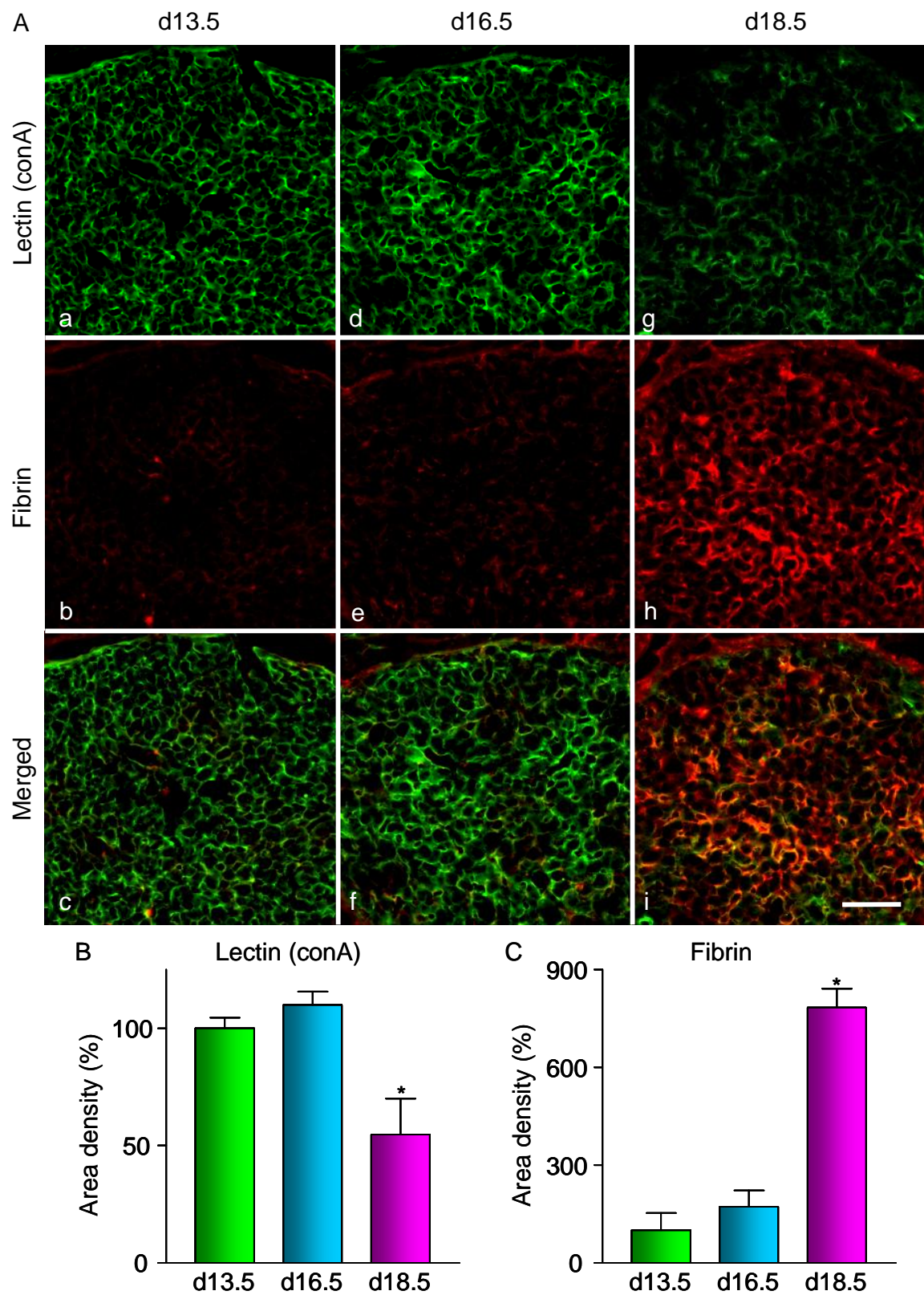


Fig. 11 妊娠経過に伴う黄体内のフィブリン沈着の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の黄体における lectin (conA) (a, d, g) および抗フィブリン抗体 (b, e, h) を用いて免疫染色した結果を示している (A)。d18.5 では灌流血管が減少し、フィブリンの沈着量が増加した。B と C は d13.5 の area density の値を 100% として表している。d18.5 で共に有意となった。Scale bar: 80 μ m * P <0.01 vs. d13.5, d16.5

3-1-6. 妊娠経過に伴う血漿中プロゲステロン濃度の変化

卵巢黄体での血流の減少は黄体機能に影響を及ぼすか否かについて調べるために、各妊娠期の血漿中プロゲステロン濃度を測定した (Fig. 12)。すると d16.5 まで高値に維持されていた血漿中プロゲステロン濃度は d18.5 で著しく低下することが示された。

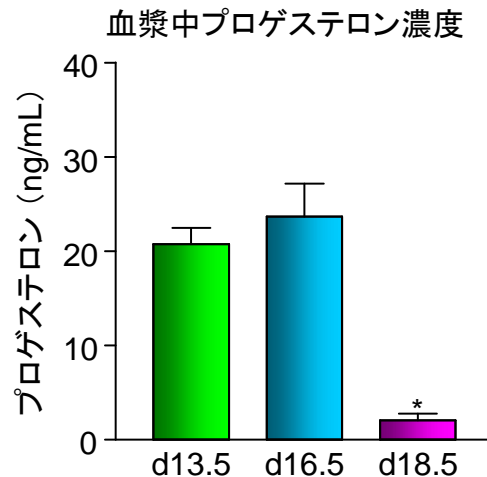


Fig. 12 妊娠経過に伴う血漿中プロゲステロン濃度の変化

d13.5、d16.5 および d18.5 の血漿中プロゲステロン濃度を示している。d18.5 では血漿中プロゲステロン濃度が有意に低下した。* $P < 0.001$ vs. d13.5, d16.5

3-1-7. 妊娠経過に伴う子宮筋の自発性収縮の観察

齧歯類においては、血中のプロゲステロン濃度が低下すると、子宮筋の収縮性が亢進することが知られている (Garfield *et al.*, 1987; Dudley *et al.*, 1996)。そこで、妊娠経過に伴う子宮筋の収縮性亢進について検討した。

Fig. 13 は、d13.5 と d18.5 の妊娠マウスから摘出した子宮から作製した筋肉条片の張力測定実験の代表的な結果を示している。d18.5 の子宮筋標本では律動性の自発性収縮が観察されたが、d13.5 の場合にはそのような収縮は観察されなかった。一方、子宮平滑筋細胞を脱分極させることにより収縮を誘発する 35 mM KCl を用いた場合、d13.5 と d18.5 でほぼ同程度の収縮が観察された。このように d18.5 の子宮筋では収縮性が亢進していることが示された。

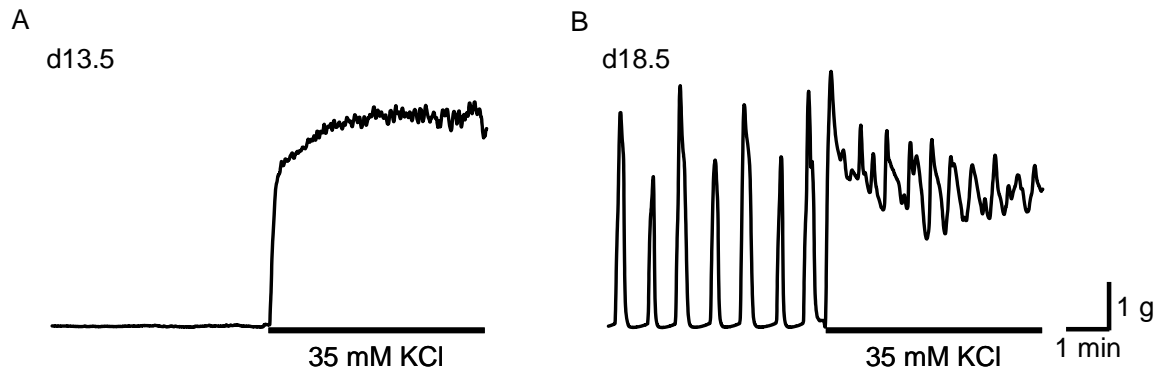


Fig. 13 妊娠経過に伴う子宮筋の自発性収縮

A と B は、d13.5 および d18.5 の妊娠マウスから摘出した子宮から作製した標本の自発性収縮を示している。d18.5 では子宮筋標本の律動性の自発性収縮が観察されたが d13.5 では観察されなかった。両標本において、35 mM KCl により同程度の脱分極性収縮が観察された。

3-2. 黄体における VEGF 発現の妊娠中期以降における意義

3-2-1. KRN633 処置の妊娠維持率に及ぼす影響

以上の結果より正常妊娠の分娩発来には、卵巣黄体における VEGF の発現の低下が引き金になることが示唆された。そこで、VEGF/VEGFR-2 経路を遮断すると、正常妊娠維持に影響を与え、早産を引き起こすのではないかと仮説を立てた。

まず、VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害薬である KRN633 (300 mg/kg) を d13.5 から分娩に至るまで 1 日 1 回連日経口投与した。その結果を妊娠維持率として Fig. 14 に示している。溶媒 (0.5% methylcellulose) 500 μ L を投与した vehicle 群では d18.5 と d19.5 ですべてのマウスが分娩に至った。一方、KRN633 処置群は処置開始 2 日後の d15.5 から分娩に至る例が観察され始め、d16.5 までに約 70% のマウスが分娩に至った。つまり、妊娠中期に VEGF の作用が抑制されると早産を引き起こす可能性が示された。

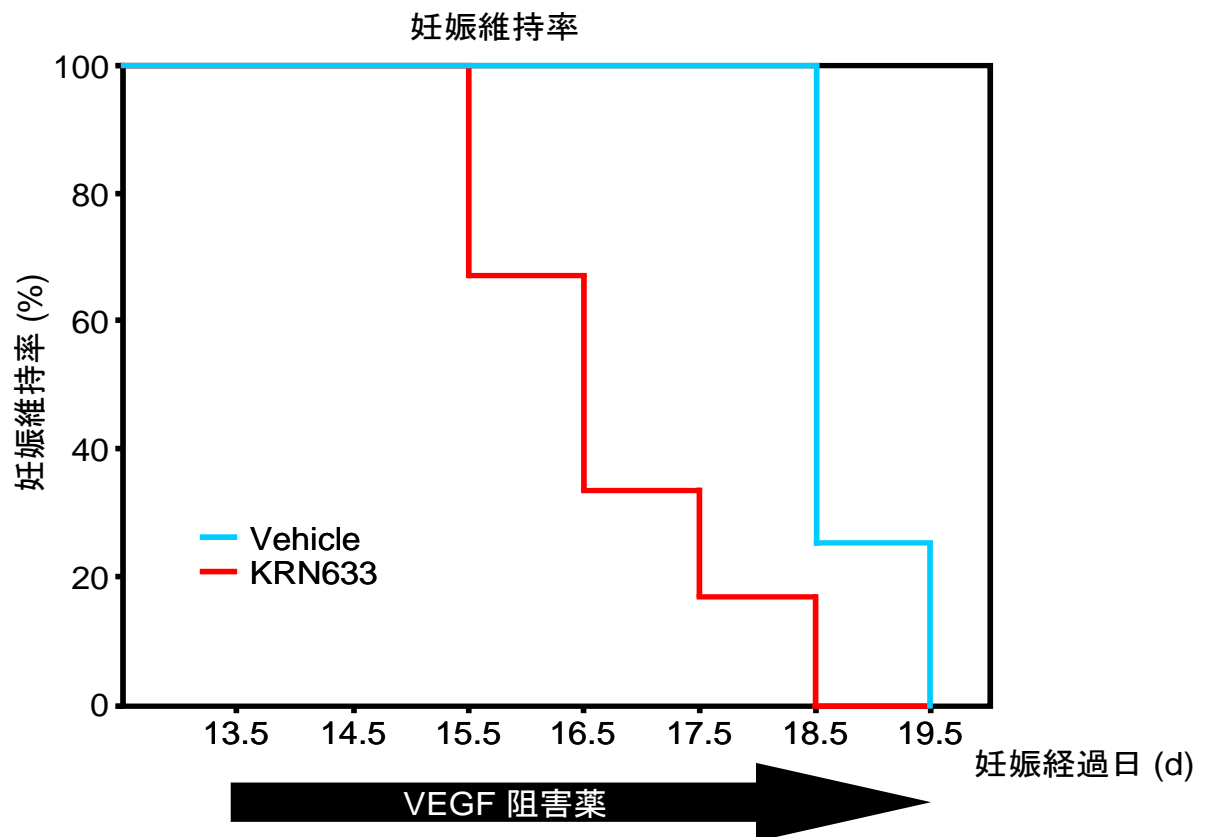


Fig. 14 KRN633 処置の妊娠維持率に及ぼす影響

表は、縦軸に妊娠維持率 (%) を、横軸に妊娠経過日 (d) を示している。Vehicle 群のマウスでは d18.5 と d19.5 に分娩に至り、KRN633 処置群では d16.5 までに約 70% のマウスが分娩に至った。

3-2-2. KRN633 処置の血管に及ぼす影響

妊娠中期に VEGF の作用が抑制されると早産を引き起こすことが示されたので、そのメカニズムを明らかにするために、以下の実験では、妊娠中期である d13.5 より 3 日間 KRN633 を処置し、早産直前である d16.5 の卵巣およびその組織を免疫組織化学的に検討した。

3-2-2-1. KRN633 (d16.5) と Vehicle (d16.5) の卵巣黄体のマクロ所見

卵巣の肉眼所見を Fig.15 に示す。Vehicle (16.5) では赤色であるが、KRN633 処置では赤味が薄くなっていた。これは d18.5 の分娩直前の卵巣所見に類似していた。また、卵巣重量は vehicle および KRN633 処置で有意な差は認めなかった (Vehicle, 19 ± 2.0 mg, $n=5$ vs. KRN633, 20 ± 1.0 mg, $n=4$)。

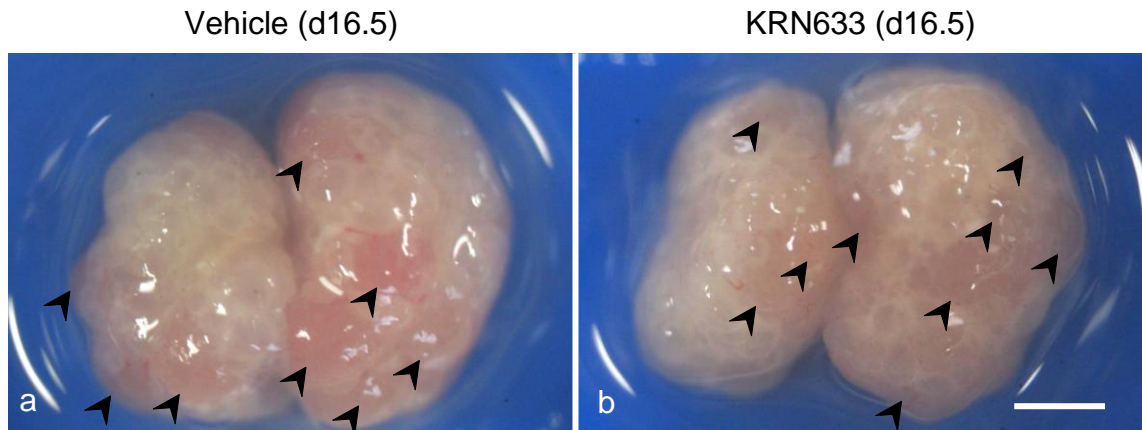


Fig. 15 Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の卵巣の観察

Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の卵巣を実体顕微鏡下で観察した (a, b)。黄体を arrowheads で示している。Vehicle (d16.5) の黄体と比べると KRN633 (d16.5) の黄体は白味がかっていた。Scale bar: 1 mm

3-2-2-2. 卵巣黄体の血管内皮細胞と灌流血管

肉眼的所見から、KRN633 処置では分娩直前の d18.5 と同様に黄体内の血流が低下していることが示唆された。そこで、3-1-5-2. 黄体内灌流血管の項と同様の手法で KRN633 処置による灌流血管の評価を行った (Fig. 16A)。

Vehicle (d16.5) では、血管内皮細胞と lectin による染色との分布が一致していた。しかし、KRN633 (d16.5) では血管内皮細胞が存在しているが、lectin で染色されない無灌流血管 (血流のない血管) が増加していた。また、vehicle と比較すると KRN633 (d16.5) では、血管内皮細胞密度および灌流血管の減少がみられた。その減少の程度は、灌流血管の減少のほうが大きかった (Fig. 16 B, C)。これは、血管の退縮よりも先に、血流の途絶が生じているためであると考えられる。

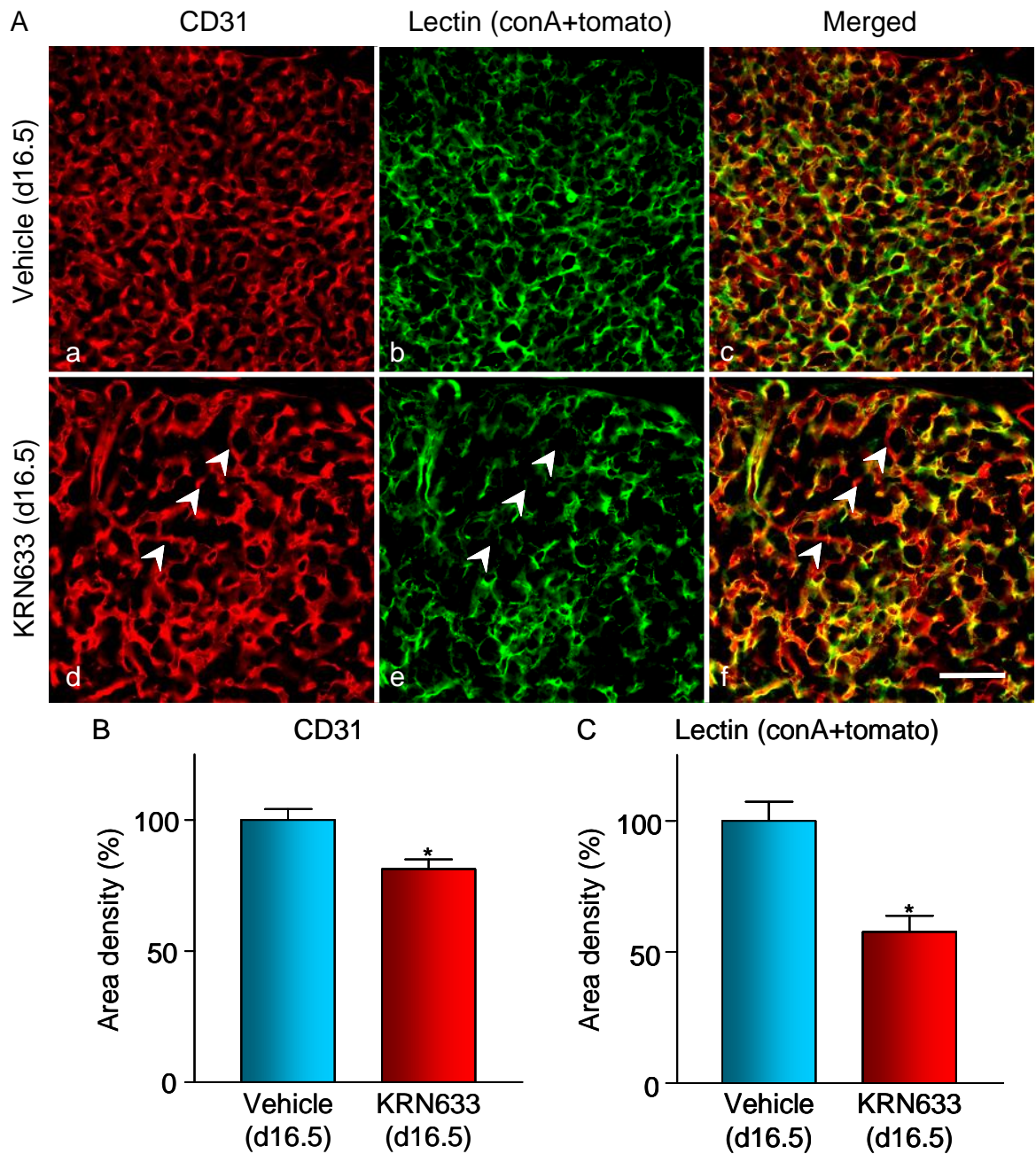


Fig. 16 KRN633 処置の黄体内血管と灌流血管に及ぼす影響

Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の黄体における抗 CD31 抗体で標識された血管内皮細胞(a, d) と lectin (conA+tomato) で標識された灌流血管内皮細胞 (b, e) の分布を示している (A)。KRN633 (d16.5) では血管内皮細胞と灌流血管の減少が見られたが、血管内皮細胞が存在しても灌流血管が存在しない部分が観察された (arrowheads)。B と C は、Vehicle (d16.5) の area density の値を 100% として表している。KRN633 (d16.5) は共に有意な低下を示したが、灌流血管の減少の程度の方が大きかった。Scale bar: 80 μ m
* $P < 0.01$ vs. Vehicle (d16.5)

3-2-2-3. 腓ラ氏島における血管内皮細胞と灌流血管

全身性に VEGF 阻害薬を 1-2 週間投与すると、腓ラ氏島の血管に退縮が起こることが報告されている (Baffert *et al.*, 2006; Kamba *et al.*, 2006)。そこで、本実験モデルでの腓ラ氏島の血管への影響を観察した。

Fig. 17 A には、Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の腓ラ氏島の抗 CD31 抗体で標識された血管と lectin (conA+tomato) で標識された灌流血管を示している。血管内皮細胞の染色と lectin の染色分布が一致している。腓ラ氏島の血管と灌流血管は、VEGF 阻害による影響をほとんど受けていなかった (Fig. 17 B, C)。

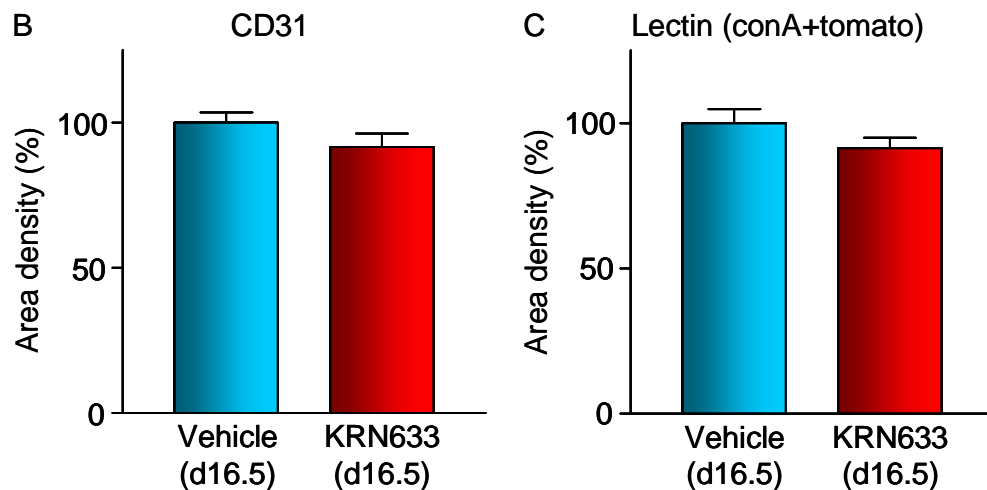
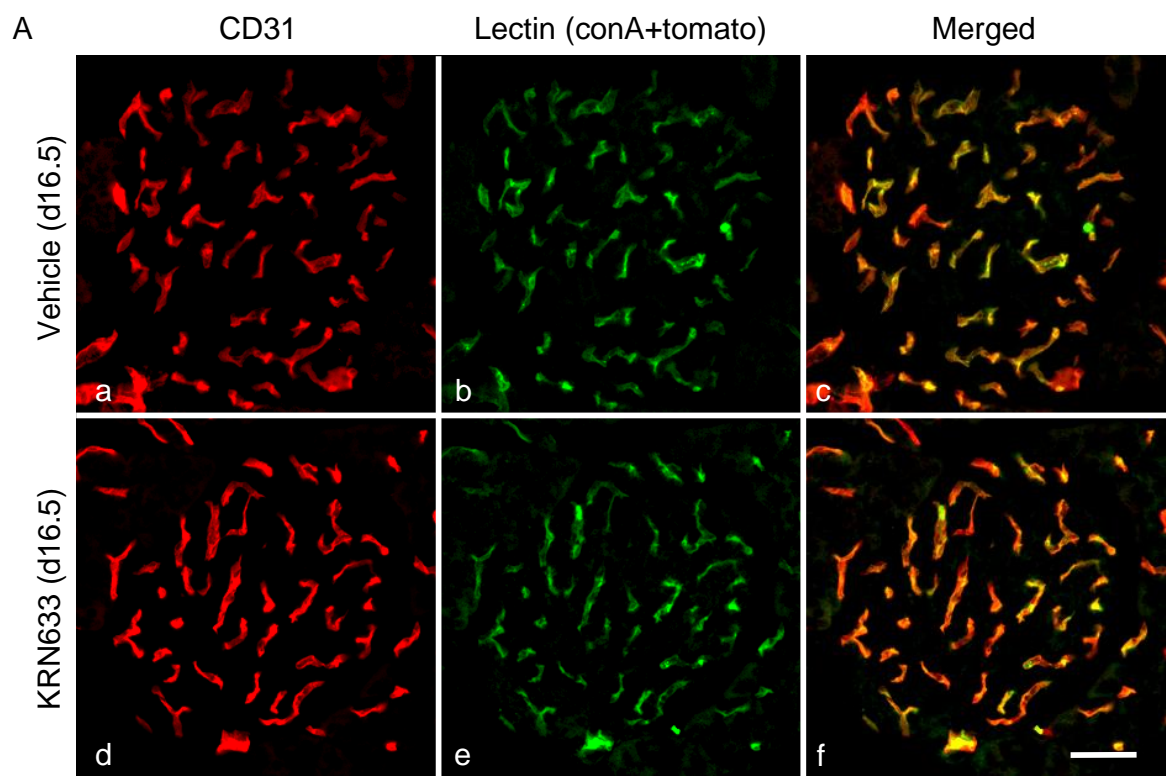


Fig. 17 KRN633 処置の腓ラ氏島の血管と灌流血管に及ぼす影響

Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の腓ラ氏島における抗 CD31 抗体で標識された血管内皮細胞 (a, d) と lectin (conA+tomato) で標識された灌流血管内皮細胞 (b, e) の分布を示している (A)。B は、Vehicle (d16.5) の area density の値を 100% として表している。KRN633 (d16.5) の血管内皮細胞および灌流血管内皮細胞の area density はほとんど影響を受けなかった。Scale bar: 50 μ m

3-2-2-4. 黄体におけるフィブリン沈着

Fig. 18 A には、Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の卵巢黄体の lectin (conA) で標識された灌流血管とフィブリン沈着を示している。灌流血管の減少に伴い KRN633 (d16.5) ではフィブリン沈着の有意な増加が認められた (Fig. 18 B, C)。KRN633 (d16.5) の所見は d18.5 のそれと類似していた。

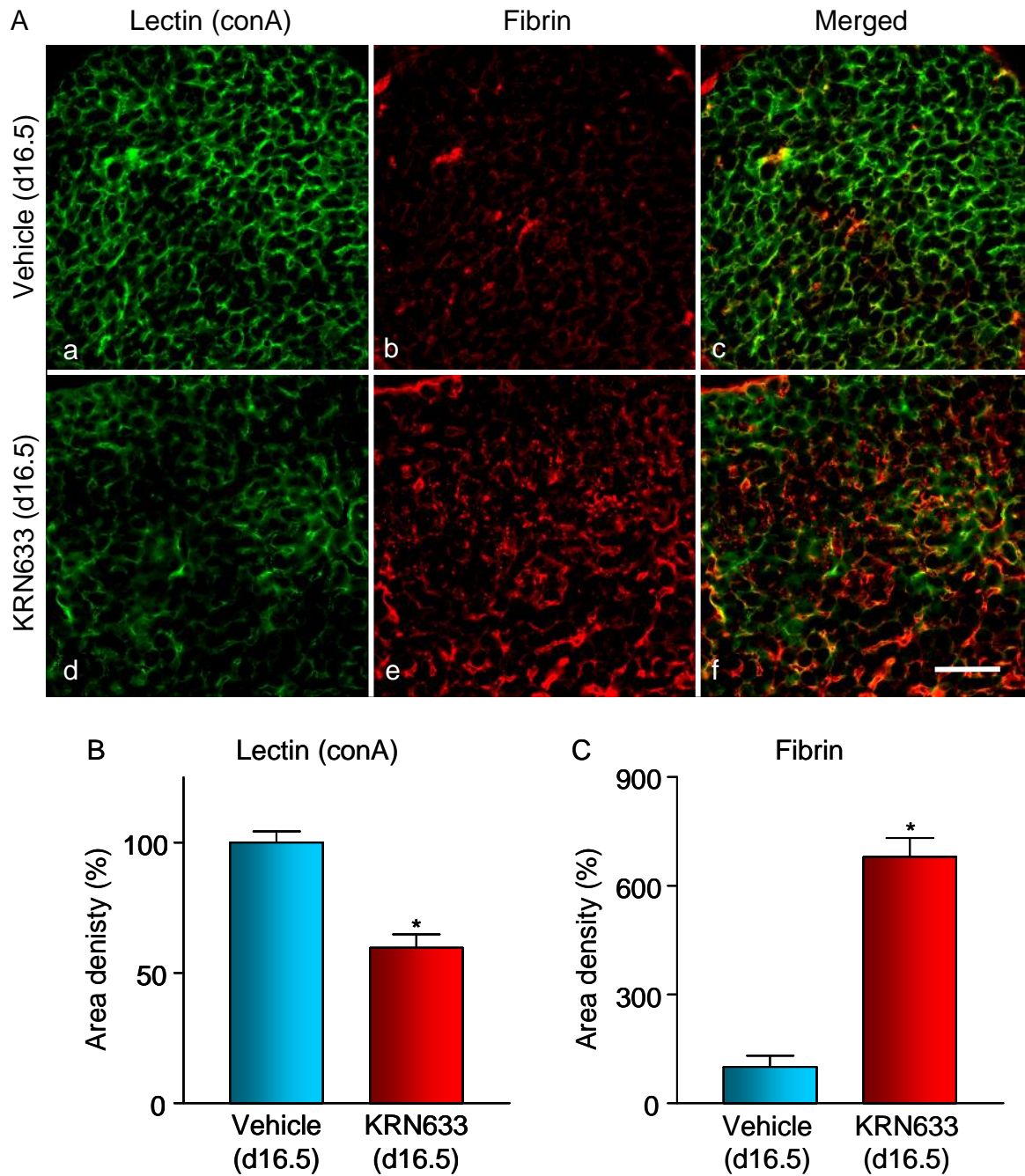


Fig. 18 KRN633 処置の黄体内のフィブリン沈着に及ぼす影響

Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の黄体における lectin (conA) (a, d) および抗フィブリン抗体 (b, e) を用いて免疫染色した結果を示している (A)。KRN633 (d16.5) では灌流血管が減少し、フィブリンの沈着量が増加した。B と C は Vehicle (d16.5) の area density の値を 100% として表している。KRN633 (d16.5) で共に有意となった。Scale bar: 80 μ m * P <0.01 vs. Vehicle (d16.5)

3-2-2-5. 黄体内ペリサイト

KRN633 (d16.5) では黄体で軽度の血管内皮細胞の脱落と顕著な灌流血管の減少が生じていることが示された。これまでの KRN633 処置群で得られた結果は、正常分娩直前期に生じた黄体における変化と類似していた。そこで、黄体内血管のペリサイトに及ぼす影響も同様であるかを明らかにするため NG2 陽性ペリサイトと PDGFR- β 陽性ペリサイトについて検討した。

Fig. 19 A には Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の卵巣黄体における NG2 陽性細胞と CD31 で標識された血管内皮細胞を示している。処置の有無に関わらず NG2 陽性ペリサイトは血管に接着しているように存在しているが、Vehicle (d16.5) と比較して KRN633 (d16.5) では有意に低下することが示された (Fig. 19 B)。

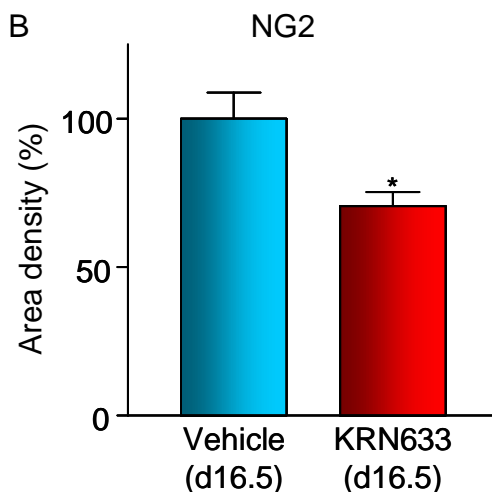
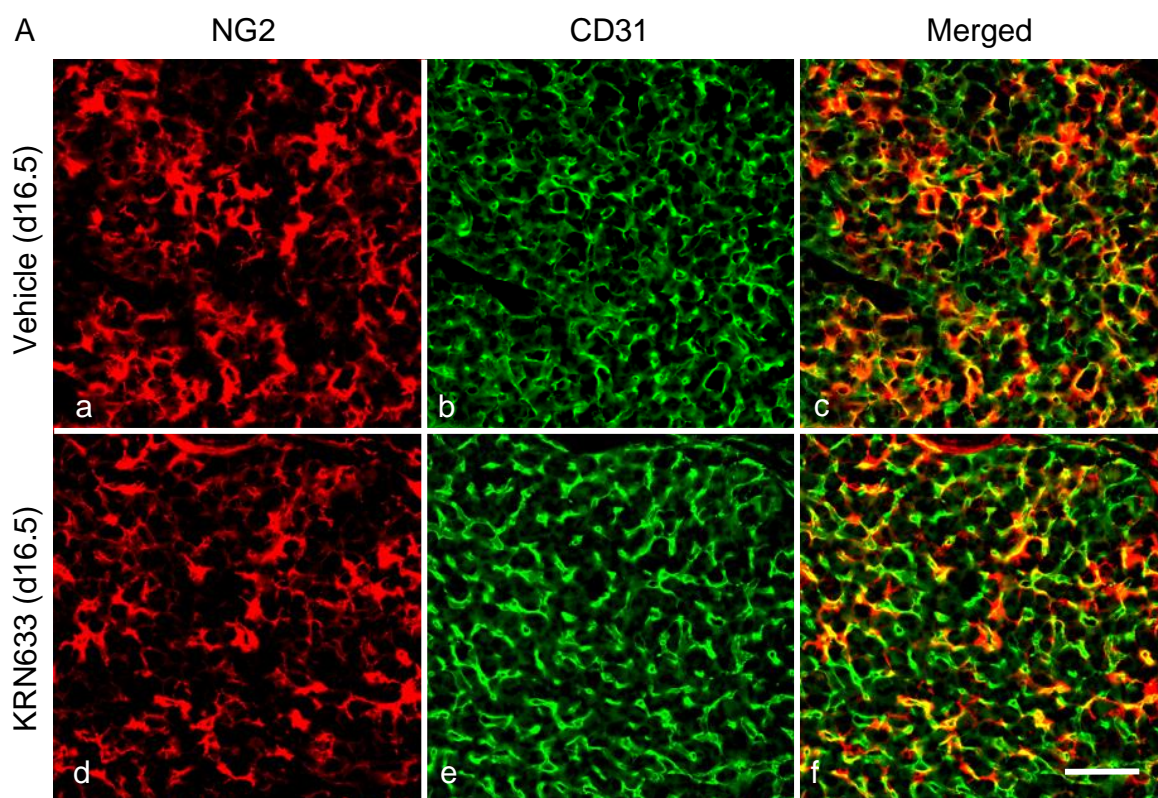


Fig. 19 KRN633 処置の黄体内の NG2 陽性細胞に及ぼす影響

Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の黄体における抗 NG2 抗体で標識された細胞 (a, d) および抗 CD31 抗体で標識された内皮細胞の分布 (b, e) を示している (A)。KRN633 (d16.5) では NG2 陽性細胞数が減少した。B は、Vehicle (d16.5) の NG2 area density の値を 100% として表している。KRN633 (d16.5) では有意な低下が認められた。Scale bar: 80 μ m * P <0.05 vs. Vehicle (d16.5)

Fig. 20 A には Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の卵巣黄体における PDGFR- β 陽性細胞と CD31 で標識された血管内皮細胞を示している。PDGFR- β 陽性細胞は NG2 陽性細胞と同様に処置の有無に関わらず血管に接着しているように存在していた。しかし、NG2 陽性細胞とは異なり PDGFR- β 陽性細胞は KRN633 (d16.5) において有意な変化を示さなかった (Fig. 20 B)。

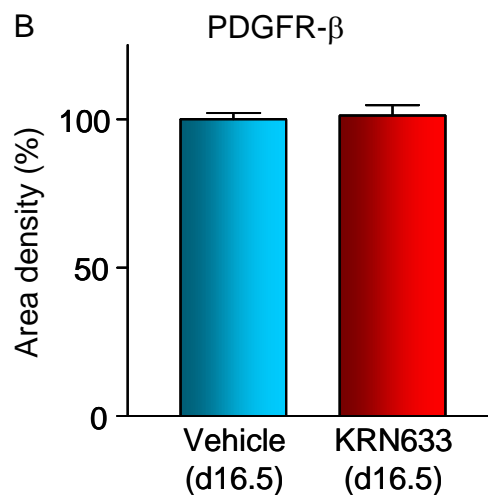
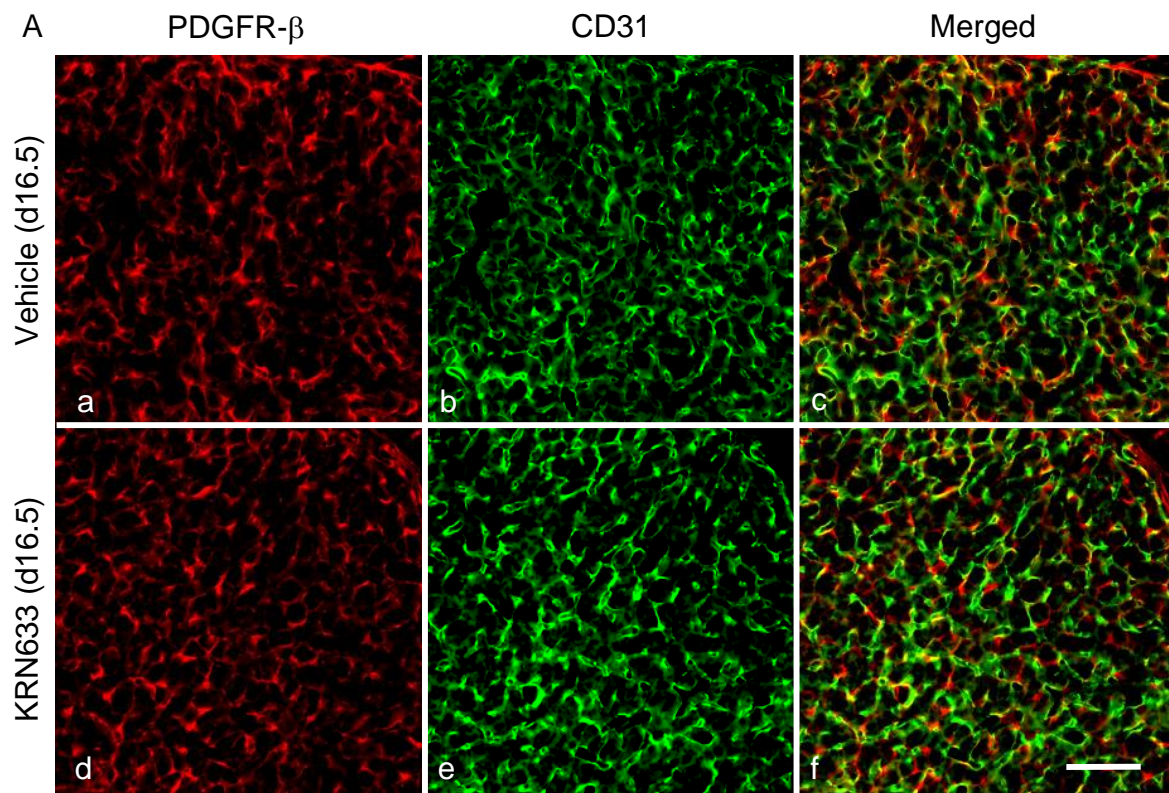


Fig. 20 KRN633 処置の黄体の PDGFR- β 陽性細胞に及ぼす影響

Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の黄体における抗 PDGFR- β 抗体で標識された細胞 (a, d) および抗 CD31 抗体で標識された内皮細胞の分布 (b, e) を示している (A)。

KRN633 (d16.5) は PDGFR- β 陽性細胞の分布に変化が見られなかった。B は Vehicle (d16.5) における PDGFR- β area density の値を 100 % として表したグラフを示している。KRN633 (d16.5) では変化は認められなかった。Scale bar: 80 μ m

3-2-2-6 腓ラ氏島におけるペリサイト

3-2-2-5. 黄体内ペリサイトの項で、KRN633 (d16.5) の黄体ではペリサイトも影響を受けていることが示された。**3-2-2-3. 腓ラ氏島における血管内皮細胞と灌流血管**の項で、腓ラ氏島の血管内皮細胞に対して KRN633 は顕著な影響を及ぼさないことを示したがペリサイトにも影響を及ぼさないか否かについて検討した。

Fig. 21 A には、Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の腓ラ氏島の NG2 陽性細胞と PDGFR- β 陽性細胞の結果を示している。腓ラ氏島の NG2 および PDGFR- β 陽性ペリサイトはほとんど一致し、どちらも VEGF 阻害による影響を受けていなかった (Fig. 21 B, C)。

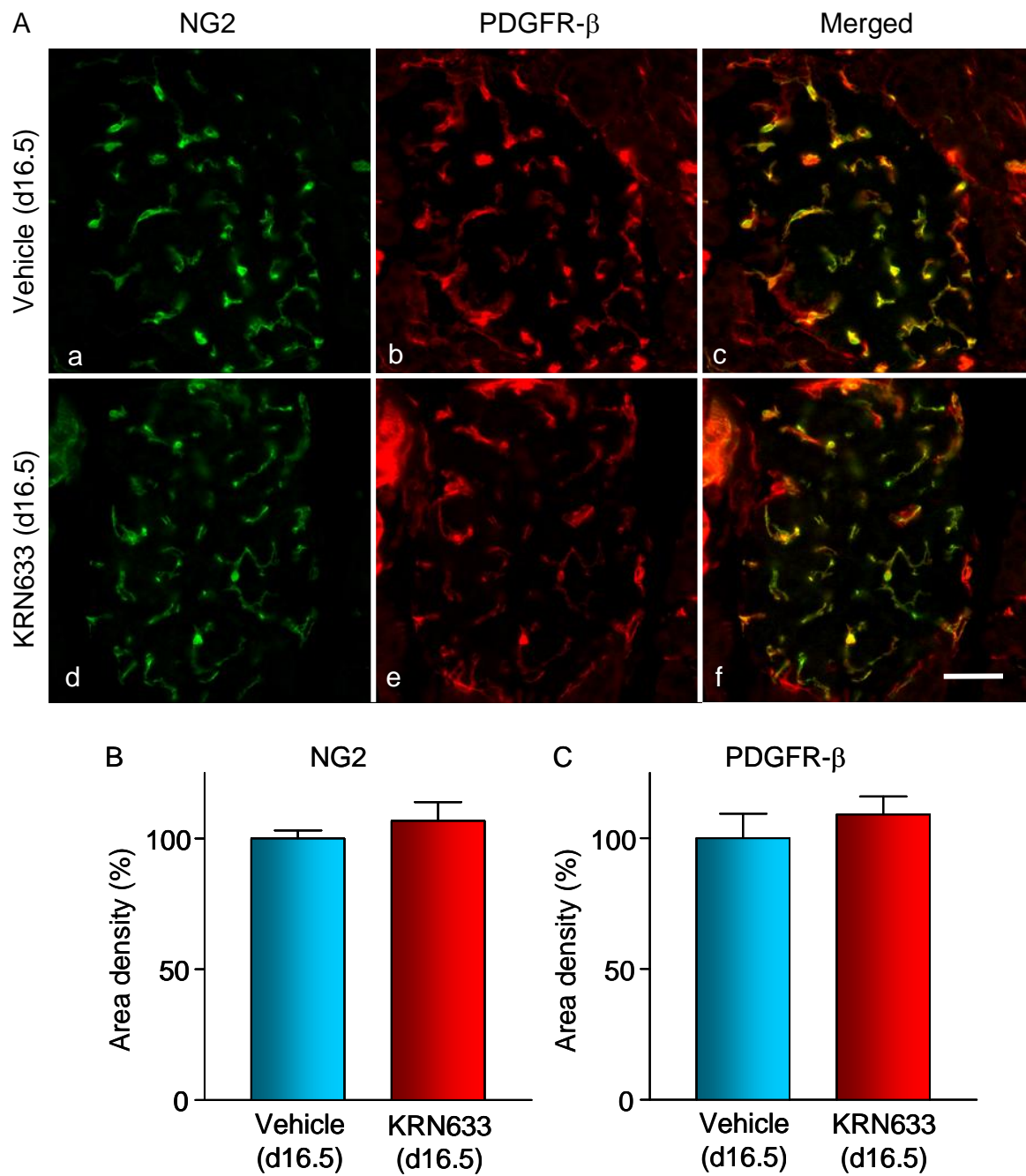


Fig. 21 KRN633 処置の腭ラ氏島の NG2 陽性細胞と PDGFR- β 陽性細胞に及ぼす影響
Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の腭ラ氏島における抗 NG2 抗体で標識された NG2 陽性細胞 (a, d) と抗 PDGFR- β 抗体で標識された PDGFR- β 陽性細胞 (b, e) の分布を示している (A)。B と C は、Vehicle (d16.5) の area density の値を 100% と表している。KRN633 (d16.5) の NG2 陽性ペリサイトと PDGFR- β 陽性ペリサイトの area density はほとんど影響を受けなかった。Scale bar: 50 μ m

3-2-3. KRN633 処置の血漿中プロゲステロン濃度に及ぼす影響

これまでの結果から KRN633 (d16.5) では黄体内血管の機能的・構造的障害が生じ、血流障害が生じていることが示された。次に、血漿中プロゲステロン濃度を測定した。その結果、KRN633 (d16.5) では血漿中プロゲステロン濃度が有意に低下することが示された (Fig. 22)。

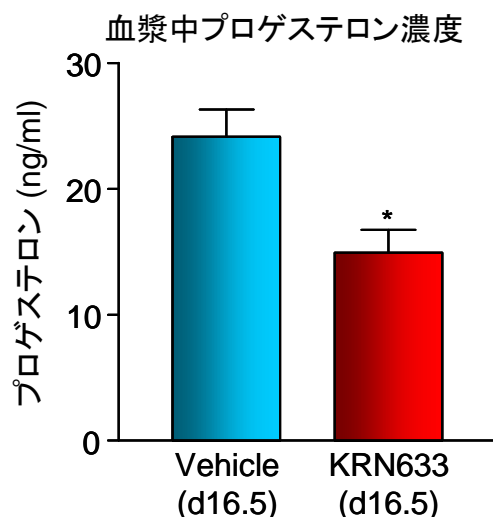


Fig. 22 KRN633 処置の血漿中プロゲステロン濃度に及ぼす影響

Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の血漿中プロゲステロン濃度を示している。KRN633 (d16.5) では血漿中プロゲステロン濃度が有意に低下した。* $P < 0.01$ vs. vehicle (d16.5)

3-2-4. KRN633 処置の子宮筋の収縮性に及ぼす影響

3-1-7. 妊娠経過に伴う子宮筋の自発性収縮の観察の項で、分娩直前期である d18.5 の子宮筋標本では律動性の自発性収縮が観察された。早産直前である KRN633 (d16.5) においても同様の変化が観察されるかを検討した。

Fig. 23 は、Vehicle (d16.5) と KNR633 (d16.5) の妊娠マウスから摘出した子宮を用いて作製した筋肉条片の張力測定実験の代表的な結果を示している。KRN633 (d16.5) の子宮筋標本では、Vehicle (d16.5) では観察されなかった律動性の自発性収縮が観察された。一方、子宮平滑筋細胞を脱分極させることにより収縮を誘発する 35 mM KCl を用いた場合、Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) でほぼ同程度の収縮が観察された。このように KRN633 (d16.5) の子宮筋でも分娩直前期である d18.5 と同様に子宮筋の収縮性が亢進していることが示された。

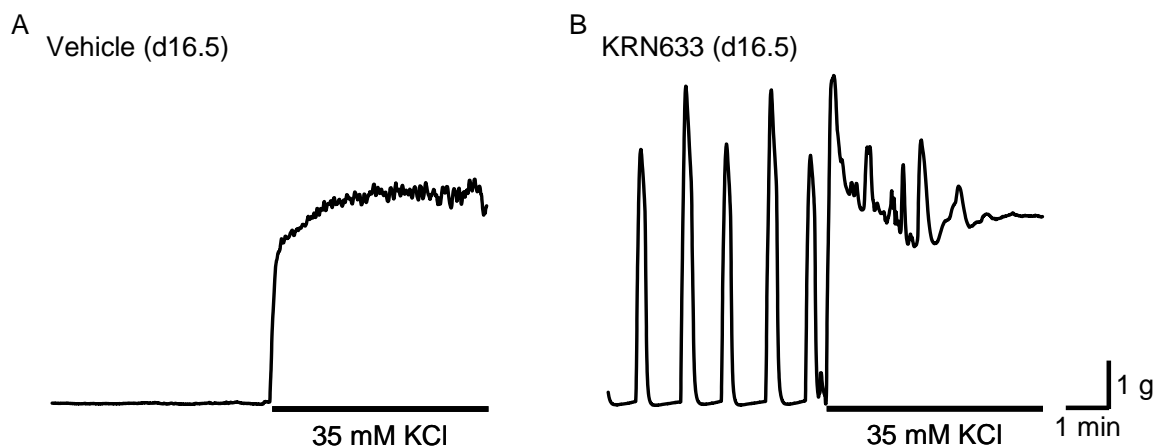


Fig. 23 KRN633 処置の子宮筋の収縮性に及ぼす影響

A と B は、Vehicle (d16.5) と KRN633 (d16.5) の妊娠マウスから摘出した子宮で作製した標本の自発性収縮を示している。KRN633 (d16.5) では子宮筋標本の律動性の自発性収縮が観察されたが Vehicle (d16.5) では観察されなかった。両標本において、35 mM KCl により同程度の脱分極性収縮が観察された。

3-2-5. KRN633 処置の血漿中プロゲステロン濃度と黄体からのプロゲステロン基礎分泌量の関係

最後に、黄体の灌流血管の減少が黄体のプロゲステロン分泌に影響を与えるか、結果的に血中のプロゲステロン濃度を低下させるか否かについて調べた。

Fig. 24 A には Vehicle (d16.5)、KRN633 (d16.5) および d18.5 の血漿中プロゲステロン濃度を示している。KRN633 (d16.5) および d18.5 では、Vehicle と比較して有意に血漿中のプロゲステロン濃度は低下していた。Fig. 25 B には Vehicle (d16.5)、KRN633 (d16.5) および d18.5 の黄体からのプロゲステロン基礎分泌量を示している。KRN633 処置はプロゲステロン基礎分泌量には影響を与えなかった。一方 d18.5 では Vehicle (d16.5) と比較して有意にプロゲステロン基礎分泌量が低下していた。

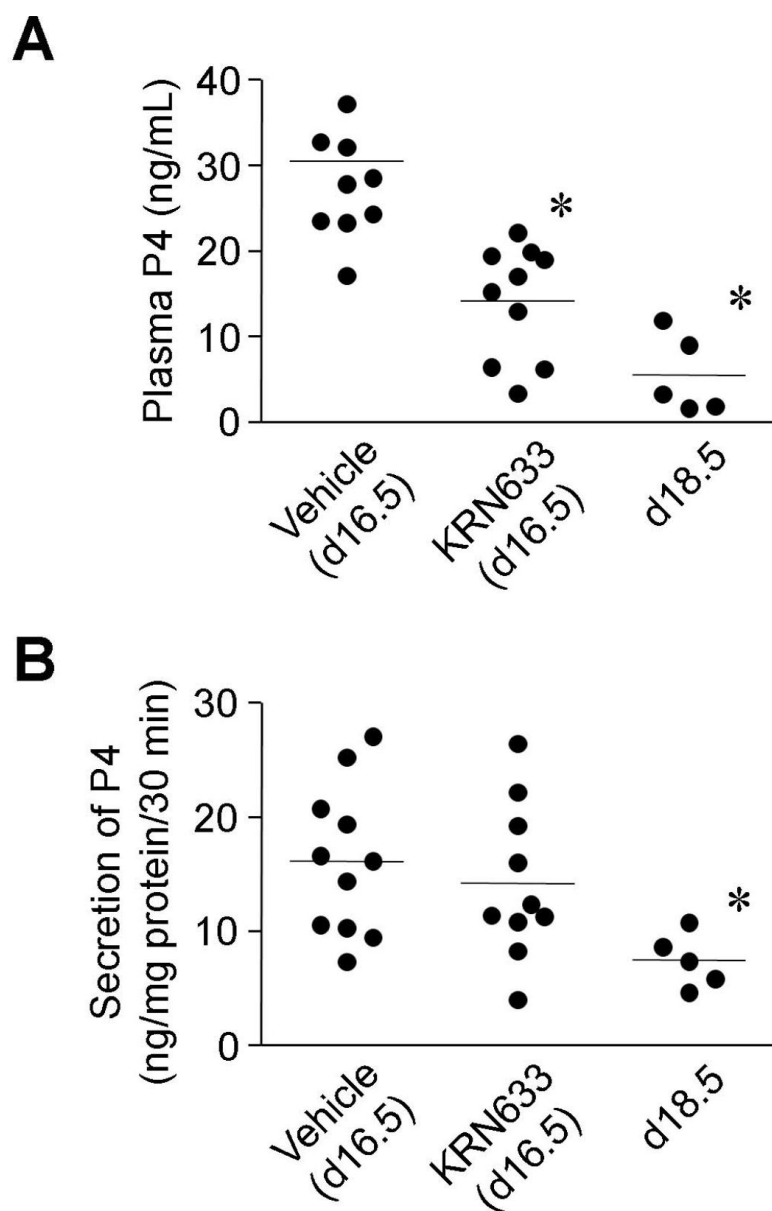


Fig. 24 血漿中プロゲステロン濃度と黄体からのプロゲステロン基礎分泌量の関係
Vehicle (d16.5), KRN633 (d16.5), および d18.5 の血漿中プロゲステロン濃度 (A) と黄体からの基礎プロゲステロン分泌量 (B) を示している。血漿中プロゲステロン濃度は Vehicle (d16.5) と比べて、KRN633 (d16.5) および d18.5 で有意に低下した。しかし、プロゲステロン基礎分泌量は、KRN633 処置による影響は受けなかったが、d18.5 では Vehicle (d16.5) と比べて有意に減弱した。* $P < 0.05$ vs. Vehicle (d16.5)

4. 考察

VEGF が血管新生において重要な役割を果たしていることはよく知られているが、本研究により、VEGF が妊娠中期以降の黄体の血流維持に重要な役割を担っていることが示唆された。分娩直前になると黄体細胞の VEGF 発現が減弱する。その結果、黄体血管内で血栓形成が促進され、それによる血流障害を引き金として、黄体で産生されたプロゲステロンの循環への移行量減少、血漿中プロゲステロン濃度低下、子宮筋収縮性亢進、分娩、という一連の反応が起こることが明らかになった。さらに、妊娠中期に低分子 VEGFR 阻害薬 KRN633 を投与すると、正常分娩の直前で観察される一連の反応を介した早産を引き起こすことも示された。

以上の結果より、マウスにおいて、VEGF / VEGFR-2 系は循環中のプロゲステロン量の調節と、分娩のタイミングを決定する重要な因子であることが示唆された。

4-1. VEGF / VEGFR-2 情報伝達経路の黄体血管構造・機能に及ぼす影響について

VEGF / VEGFR-2 情報伝達経路を低分子 VEGFR 阻害薬や抗 VEGF 抗体で阻害すると、多くの正常の成人組織において、血管内皮細胞の脱落による血管の退縮が生じることが示されている (Baffert *et al.*, 2006; Kamba *et al.*, 2006)。全身性に VEGFR 阻害薬を 1-2 週間投与すると、脾臓、気管、甲状腺、小腸において、血管の退縮が生じる (Baffert *et al.*, 2006; Kamba *et al.*, 2006)。このことは、VEGF は内分泌腺を含む多くの組織において血管の構造を維持する上で重要な役割を演じていることを示唆している。そこで、妊娠マウスの黄体において分娩直前の VEGF 発現が低下していることに着目し、黄体の血管が退縮しているのはいか、との仮説を立てて検討を行った。しかし、驚くことに分娩直前の黄体内の血管密度および基底膜は変化しておらず、血管退縮を示す所見は見出せなかった。一方で、肉眼的な黄体所見の違いは明らかで、妊娠中期の黄体は赤色調であるが、分娩直前では白色を帯びており黄体内の血流が低下していることが想像された。腫瘍や幾つかの正常組織において、VEGF により誘導される情報伝達経路を遮断すると、血管の退縮が起こるよりも早く、血流の途絶が観察されることが報告されている (Kamba *et al.*, 2006; Inai *et al.*, 2004)。そこで、灌流血管（血流が保たれている血管）の可視化法を用いて血液循環障害の可能性について検討した。その結果、分娩直前の黄体内では血管の退縮は認められないものの、血流が低下していることが明らかとなった。

4-2. 分娩直前に生じる黄体循環障害のメカニズムについて

分娩直前に生じる黄体循環障害のメカニズムは、十分に明らかにされていないが、2つの仮説を立てることができる。1つ目は、VEGF が一酸化窒素の産生を増加させることで、血管の拡張を生じさせる (He *et al.*, 1999) ことから、VEGF / VEGFR-2 系を介する作用が減

弱すると、血管の狭小化を引き起こし血流が減少するというものである。血流が障害されると、血管内にフィブリンが沈着し血流が途絶する (Eremina *et al.*, 2008; Baffert *et al.*, 2006)。実際に本研究においても、血流の減少とともにフィブリン沈着の増加が認められた。2つ目は、微小循環の調節においてはペリサイトが重要な働きをしている (Peppiatt *et al.*, 2006; Kutcher *et al.*, 2009) ことからペリサイトの機能が障害されると、異常な血流が生じる可能性があるという点である。今回、マウスの黄体内のペリサイトは NG2 と PDGFR- β を共発現していた。その発現は、分娩直前にかけて PDGFR- β 陽性ペリサイトの発現に変化は認めなかったが、NG2 陽性ペリサイトは減少し、結果的に NG2 陰性、PDGFR- β 陽性ペリサイトが増加していた。同様の観察が、VEGF 阻害薬を処置した腫瘍血管の退縮の際になされている (Inai *et al.*, 2004)。従って、NG2 の発現変化が、微小循環の調節に関与しているかもしれない (Hellstrom *et al.*, 2001)。

4-3. VEGF / VEGFR-2 発現変化と分娩発来について

分娩直前の黄体内では、灌流血管が著しく減少し、血中のプロゲステロン濃度が低下する。齧歯類においては、妊娠を維持するためには血中のプロゲステロン濃度が高い必要があり、血中のプロゲステロン濃度が低下することで分娩が誘発される (Mitchell *et al.*, 2009; Dudley *et al.*, 1996; Morishige *et al.*, 1973; McCormack *et al.*, 1974)。よって、黄体での VEGF / VEGFR-2 の作用低下が、血中プロゲステロン濃度を低下させ分娩を誘発する 1 つの因子になっている可能性が考えられる。しかし、妊娠後期のマウスにおいて、プロゲステロン減少に黄体での VEGF / VEGFR-2 の作用低下以外の機序も関与している可能性がある。この可能性を調べるために、妊娠中期に VEGF の作用を抑制することにより、正常妊娠維持が破綻し、早産を引き起こすか否かという点を調べることにした。対照のマウスは d18.5 または d19.5 で分娩に至ったが、妊娠中期 d13.5 より低分子 VEGFR 阻害薬である KRN633 (Nakamura *et al.*, 2004) を投与すると、ほとんどのマウスで d18.5 以前に分娩に至った。KRN633 処置したマウスの黄体では、正常分娩直前の黄体と同様の变化、即ち、灌流血管の減少、フィブリン沈着の増大が観察された。加えて、KRN633 を処置したマウスの血漿中のプロゲステロン濃度は、対照と比較して有意に低下し、子宮筋の収縮性も亢進していた。以上より、妊娠中期の VEGF 作用低下が正常分娩と同様の機序で分娩の発来を起こすことが示された。

4-4. 血中プロゲステロン濃度低下のメカニズムについて

本研究より、マウスの血中プロゲステロンレベルの調節に VEGF / VEGFR-2 系が重要であることが示された。循環血中のプロゲステロンレベルの低下メカニズムに関して、これまでに 2 つの有力な仮説：1) 黄体細胞死に関連したプロゲステロン合成の低下、と 2) 黄体内の血管内皮の apoptosis による血管退縮で循環血中へのプロゲステロンの供給が減少す

る、が提案されている。しかし、これらの仮説に対して、現在までの報告からみると、血管内皮および黄体の細胞死の程度は、わずかであり、劇的に循環中のプロゲステロンを減少させるほどではなかったこと、そして劇的な細胞死は分娩の後に観察されていること (Fraser *et al.*, 2006) から、いささか懐疑的であった。そこで本研究では、黄体からのプロゲステロンの基礎分泌量を測定してみることとした。驚いたことに KRN633 処置では、卵巢黄体の血流障害はあるものの、プロゲステロンの基礎分泌量は保たれていた。一方、d18.5 では、血流障害に加えプロゲステロンの基礎分泌量も低下していた。この d18.5 での基礎分泌量の低下は、先に報告されている分娩前の PGF2 α 刺激による黄体退縮 (Sugimoto *et al.*, 1997) が関与しているのかもしれない。血中のプロゲステロン濃度については、分娩直前の d18.5 では、黄体の退縮によるプロゲステロンの産生低下に加えて、血管機能の障害による血中へのプロゲステロンの供給が減少するために、KRN633 (d16.5) と比較するとより血中のプロゲステロン濃度の減少が生じている可能性が考えられた。また、KRN633 (d16.5) での血中プロゲステロン濃度は、分娩を引き起こすのに十分な低下であったと考えられる。以上より、黄体の退縮よりも、黄体内の灌流血管の減少が、妊娠中期の血中プロゲステロン低下を引き起こす primary event であるのかもしれない。

4-5. 卵巢黄体での VEGF 発現の調節メカニズムについて

分娩が近づくにつれて、黄体での VEGF 発現は減弱するが、この減弱のメカニズムはよく分かっていない。VEGF の産生は局所の酸素濃度によって調節されている。さらに、黄体においては局所的に産生された成長因子が、VEGF の発現に影響を及ぼすことが報告されている (Al-zi'abi *et al.*, 2003; Neuvians *et al.*, 2004)。妊娠末期には、これらの因子が変化する。In vivo において、PGF2 α を投与すると黄体での VEGF 発現が減少し (Sugimoto *et al.*, 1997)、in vitro において黄体細胞を PGF2 α で刺激すると VEGF の発現が低下する (Tropea *et al.*, 2006, Berisha *et al.*, 2010)。妊娠の末期には黄体内の PGF2 α 量は著しく増加している (Kurusu *et al.*, 1999) ことが報告されている。よって、本研究においても PGF2 α が、黄体内で観察された VEGF の発現の減少に関与している可能性が考えられるが、これについてはさらなる研究が必要である。

4-6. 全身性の VEGF 阻害における各組織の感受性について

全身性に VEGF を阻害すると、正常の成獣マウスの組織 (臍臓を含む) の血管数は減少する (Kamba *et al.*, 2006)。一方で、本研究では、卵巢黄体の血管は影響を受けているものの、臍島においては血管の減少を認めなかった。この違いは、実験条件の相違 (VEGF 阻害の方法、投与期間など) により生じた可能性も考えられる。通常のマウスにおいては、全身性に VEGF 阻害薬を 1-2 週間投与すると臍島の血管退縮が認められる (Kamba *et al.*, 2006)。一方、本研究では KRN633 を 3 日間のみ投与しているが、黄体の機能血管数の減少による血管傷害、胎盤の Labyrinthine zone、胎仔の組織 (皮膚、臍臓、腎臓、肺) の血管の発達障害が生

じた (Wada *et al.*, 2010)。以上より、成獣マウスの組織において、血管内皮細胞は生存のために VEGF に依存しているが、その依存度は組織により異なっており、脾臓に比べて、黄体血管でより VEGF 依存が高い可能性が考えられた。

4-7. ヒトへの分娩メカニズム解明への応用について

ヒトの妊娠維持における、プロゲステロンの役割はまだ完全に理解されていない。しかし、早産の予防としてプロゲステロンの有効性は報告されている (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2003; Meis *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2012)。

ヒトにおいては、妊娠初期にはプロゲステロンは主に卵巣黄体で産生されているが、その後は胎盤へと産生部位が移行する。さらに、齧歯類と異なり、ヒトでは分娩直前に血中のプロゲステロンの減少を認めないため、分娩にはプロゲステロンは重要な役割を果たしていないとも考えられている (Boroditsky *et al.*, 1978; Mathur *et al.*, 1980)。しかし、ヒトにおいて胎盤におけるプロゲステロン産生の低下が分娩発来を引き金になっていることも示唆されている (Smith *et al.*, 2009)。よって、今回マウスモデルで同定された分娩メカニズムが、ヒトの分娩にも適用できるかどうかは、今後取り組むべき課題である。

5. 総括

本研究では、妊娠中期以降の黄体において、VEGF が血流の維持に重要な役割を演じていることが示唆された。正常な黄体を維持するためには十分な黄体血流が必要であり、妊娠中期に VEGF の作用が低下すると、早産に至ることが明らかとなった。これは、黄体血管における VEGF の作用低下が血栓形成を促進し、その結果生じる血流障害を引き金として、黄体で産生されたプロゲステロンの循環への移行量減少、血漿中プロゲステロン濃度低下、子宮筋収縮性亢進、分娩、という一連の反応が起こったことによるものと考えられた。

6. 今後の課題

今回のマウスモデルにより明らかとなった早産の機序により、妊娠中に正常な黄体機能を維持するための血栓形成抑制および血流障害改善に向けた薬物療法を見出すことが、効果的な早産予防のアプローチへつながると考えられる。

また、VEGF の発現の調節が黄体機能の維持に重要であることが示唆されたため、その VEGF 発現を調節している因子を調べることで、VEGF の発現調節ができれば、早産、黄体機能不全などの疾患の治療に結びつくと考えられる。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、このような機会を与えて下さいました北里大学薬学部分子薬理学教室・石井邦雄教授に謹んで御礼申し上げます。

また、ご多忙の中、御指導いただきました北里大学大学院医療系研究科分子薬理学・馬嶋正隆教授に心より感謝いたします。

そして、本研究を遂行する上で終始御指導、御鞭撻を賜り、7年間にわたる研究生生活を支えて下さいました同大学薬学部分子薬理学教室・中原努准教授、坂本謙司講師、森麻美助教に心より御礼申し上げます。

本研究において、KRN633の合成にご協力くださった薬品製造化学教室・長光亭教授、大学院生であった尾崎裕美氏、阿部直道氏に深く感謝致します。

8. 引用文献

Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction* 2003; **125**: 259-270

American College of Obstetricians and Gynecologists ACOG Committee Opinion. Use of progesterone to reduce preterm birth. *Obstet Gynecol* 2003; **102**: 1115-1116

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/Pericyte interactions. *Circ Res* 2005; **97**: 512-523

Baffert F, Le T, Sennino B, Thurston G, Kuo CJ, McDonald DM *et al.* Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **290**:H547-H559

Bastek JA, Sammel MD, Paré E, Srinivas SK, Posencheg MA, Elovitz MA. Adverse neonatal outcomes: examining the risks between preterm, late preterm, and term infants. *Am J Obstet Gynecol* 2008; **199**:367.e1-e8

Berisha B, Meyer HH, Schams D. Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2010; **82**:940-947

Boroditsky RS, Reyes FI, Winter JS, Faiman C. Maternal serum estrogen and progesterone concentrations preceding normal labor. *Obstet Gynecol* 1978;**51**:686-691

Christofori G, Naik P, Hanahan D. Vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and flk-1, are expressed in normal pancreatic islets and throughout islet cell tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1995; **9**:1760-1770

Dudley DJ, Branch DW, Edwin SS, Mitchell MD. Induction of preterm birth in mice by RU486. *Biol Reprod* 1996; **55**: 992-995

Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, *et al.* VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008; **358**:1129-1136

Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, *et al.* Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998; **4**:336-340

Fraser HM, Wilson H, Wulff C, Rudge JS, Wiegand SJ. Administration of vascular endothelial growth factor Trap during the 'post-angiogenic' period of the luteal phase causes rapid functional luteolysis and selective endothelial cell death in the marmoset. *Reproduction* 2006; **132**: 589-600

Garfield RF, Gasc JM, Baulieu EE. Effects of the antiprogestosterone RU486 on preterm birth in the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1987; **157**: 1281-1285

Gupta S, Roman AS. 17- α hydroxyprogesterone caproate for the prevention of preterm birth. *Womens Health (Lond Engl)* 2012; **8**: 21-30

He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25130-25135

Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Betsholtz C *et al.* Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001; **153**:543-553

Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, McDonald DM *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 2004; **165**: 35-52

Kamba T, Tam BY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, McDonald DM *et al.* VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **290**:H560-H576

Kashida S, Sugino N, Takiguchi S, Karube A, Takayama H, Yamagata Y, *et al.* Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol Reprod* 2001; **64**: 317-323

Kuhnert F, Tam BY, Sennino B, Gray JT, Yuan J, Kuo CJ. *et al.* Soluble receptor-mediated selective inhibition of VEGFR and PDGFRbeta signaling during physiologic and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; **105**: 10185-10190

Kurusu S, Kaizo K, Ibashi M, Kawaminami M, Hashimoto I. Luteal phospholipase A2 activity increases during functional and structural luteolysis in pregnant rats. *FEBS Lett* 1999; **454**: 225-228

Kutcher ME, Herman IM. The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res* 2009; **77**: 235-246

Li Q, Wang H, Lin H, Shao L, Ni J, Duan E, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in rat ovary during pregnancy and postpartum. *Sci China C Life Sci* 2002; **45**: 379-387

Mathur RS, Landgrebe S, Williamson HO. Progesterone, 17-hydroxyprogesterone, estradiol, and estriol in late pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol* 1980; **136**:25-27

McCormack JT, and Greenwald GS. Progesterone and oestradiol-17beta concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J Endocrinol* 1974; **62**: 101-107

McIntire DD, Leveno KJ. Neonatal mortality and morbidity rates in late preterm births compared with births at term. *Obstet Gynecol* 2008; **111**: 35-41

Meis PJ, Klebanoff M, Thom E, Dombrowski MP, Sibai B, Gabbe S, *et al.*; National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate. *N Engl J Med* 2003; **348**: 2379-2385

Mitchell BF, Taggart MJ. Are animal models relevant to key aspects of human parturition? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; **297**:R525-545

Morishige WK, Pepe GJ, Rothchild I. Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 1973; **92**: 1527-1530.

Nakamura K, Yamamoto A, Kamishohara M, Takahashi K, Taguchi E, Miura T, *et al.* KRN633: A selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase that suppresses tumor angiogenesis and growth. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**: 1639-1649

Neuvians TP, Berisha B, Schams D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Mol Reprod Dev* 2004; **67**: 389-395

Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, *et al.* The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology* 2005; **146**: 1301-1311

Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 2006; **443**: 700-704

Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Aug 15; 90(16): 7533-7

Ratajczak CK, Fay JC, Muglia LJ. Preventing preterm birth: the past limitations and new potential of animal models. *Dis Model Mech* 2010; **3**: 407-414

- Redmer DA, Reynolds LP . Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod* 1996; **1**: 182-192
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; **386**: 671-674
- Rowe AJ, Morris KD, Bicknell R, Fraser HM. Angiogenesis in the corpus luteum of early pregnancy in the marmoset and the effects of vascular endothelial growth factor immunoneutralization on establishment of pregnancy. *Biol Reprod* 2002; **67**: 1180-1188
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) -Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium* 2006; **13**: 63-69
- Smith R, Smith JI, Shen X, Engel PJ, Bowman ME, Smith DW, *et al.*. Patterns of plasma corticotropin-releasing hormone, progesterone, estradiol, and estriol change and the onset of human labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 2066-2074
- Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Narumiya S, *et al.* Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 1997; **277**: 681-683
- Thurston G, Baluk P, Hirata A, McDonald DM. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol* 1996; **271**: H2547-H2562
- Tropea A, Miceli F, Minici F, Tiberi F, Orlando M, Apa R, *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis and release by human luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 2303-2309
- Wada Y, Ozaki H, Abe N, Nagamitsu T, Nakahara T, Ishii K *et al.* Effects of KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase, on vascular development of placenta and fetus of mid-pregnancy in mice. *J Pharmacol Sci* 2010; **112**: 290-298
- Wulff C, Wilson H, Rudge JS, Wiegand SJ, Lunn SF, Fraser HM. Luteal angiogenesis: prevention and intervention by treatment with vascular endothelial growth factor trap (A40) . *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 3377-3386

9. 業績目録

(I) 原 著

- 1. Abe N, Nakahara T, Morita A, Wada Y, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K: KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, induces intrauterine growth restriction in mice. Birth Defects Research Part B, 2013 (in press)
- ◎ 2. Wada Y, Ozaki H, Abe N, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Nakahara T, Ishii K: Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Maintenance of Pregnancy in Mice. Endocrinology, 154 (2) :900-910, 2013.
- 3. Wada Y, Ozaki H, Abe N, Nagamitsu T, Ohta H, Nakahara T, Ishii K: Effects of KRN633, an Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Tyrosine Kinase, on Vascular Development of Placenta and Fetus of Mid Pregnancy in Mice. J Pharmacol Sci, 112:290-298, 2010.
- 4. Mujoo K, Krumenacker JS, Wada Y, Murad F: Differential Expression of Nitric Oxide Signaling Components in Undifferentiated and Differentiated Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells And Development, 15:779-787, 2006.
- 5. 関野貴子、安達知子、高松潔、橋口和生、松田義雄、太田博明：当科における母体血小板減少症例の臨床的検討。日本産婦人科・新生児血液学会誌、11 巻 1 号 107-108, 2001.
- 6. 関野貴子、矢島正純、丹野純香、伊地知律子、樋田一英、石巻静代、高松潔、安達知子、太田博明：卵巣癌との鑑別が困難であった腹部腫瘤の 2 例。日本産科婦人科学会東京地方部会会誌 49 巻 4 号 457-460, 2000.

(II) 著 書

なし

(III) 総説・講座

なし

IV) 症例・臨床治験・その他

- 1. 和田貴子、中原努、太田博明、石井邦雄：妊娠中・後期の維持における VEGF の役割。第 118 回日本薬理学会関東部会 2008.
- 2. 宮原優子、丹野純香、関野貴子、木村敬、熊谷万紀子、村岡光恵、高木耕一郎、黒島淳子：腸腰筋膿瘍を伴った付属器膿瘍の 1 例。日本産科婦人科学

会関東連合地方部会会報、37 巻 3 号 377, 2000.

3. 関野貴子、矢島正純、石巻静代、安達知子、太田博明：術後肺塞栓を起こした卵巣原発悪性リンパ腫の 1 例. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会会報、37 巻 2 号 176, 2000.
4. 岡本弥生、関野貴子、伊地知律子、岡村恵子、斎藤理恵、橋口和生、中林正雄：先天性副腎皮質過形成 (21-OHase 欠損症) 女性での妊娠分娩の 1 例. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会会報、37 巻 2 号 221, 2000.
5. 新井理水、安達知子、関野貴子、石巻静代、矢島正純、中林正雄：婦人科術後血栓症のリスク評価と血栓症予防に関する検討. 日本産科婦人科学会雑誌、52 巻 2 号 348, 2000.
6. 関野貴子、安達知子、新井理水、石巻静代、中林正雄：予防的低分子ヘパリン使用による婦人科術後患者の血液凝固系の変動. 日本産婦人科・新生児血液学会誌、9 巻 1 号 80-81, 1999.
7. 関野貴子、斎藤理恵、中林正雄：当科における品胎妊娠の検討. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会会報 36 巻 3 号 369, 1999

(V) 学会発表

1. 和田貴子、中原努、太田博明、石井邦雄：妊娠中・後期の維持における VEGF の役割. 第 118 回日本薬理学会関東部会 2008.
2. 関野貴子、矢島正純、石巻静代、安達知子、太田博明：術後肺塞栓を起こした卵巣原発悪性リンパ腫の 1 例. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会、2000.
3. 関野貴子、安達知子、新井理水、石巻静代、中林正雄：予防的低分子ヘパリン使用による婦人科術後患者の血液凝固系の変動. 日本産婦人科・新生児血液学、1999.
4. 関野貴子、斎藤理恵、中林正雄：当科における品胎妊娠の検討. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会 1999