

博士論文

Nrf2/Keap1 経路の活性化による酸化ストレスの減少が
卵巣の抗加齢に及ぼす影響の検討

秋野 なな

Nrf2/Keap1 経路の活性化による酸化ストレスの減少が
卵巣の抗加齢に及ぼす影響の検討

生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員 大須賀 穰 教授

秋野 なな

目次

要旨.....	5
1) 序文.....	6
2) 方法.....	10
1. ヒト黄体化顆粒膜細胞.....	10
2. GC の薬剤刺激.....	10
3. ヒト卵巣組織.....	11
4. マウスと薬剤投与.....	11
5. マウスの排卵誘発・採卵、卵巣、血清採取.....	12
6. マウス排卵数のカウント.....	12
7. 卵巣組織免疫染色.....	13
8. マウス卵胞数の計測.....	14
9. TUNEL 染色.....	14
10. RNA 抽出、RT 及び定量的 PCR.....	15
11. short-interference RNA (siRNA) による内在性 Nrf2 のノックダウン.....	18
12. Western blotting.....	19
13. 細胞蛍光免疫染色法.....	20
14. ELISA 法.....	21
15. ヒト GC 細胞内 ROS の計測.....	21
16. 統計学的解析.....	22
3) 結果.....	23
<ヒト>	
1. ヒト卵巣における Nrf2 及び Keap1 タンパクの発現.....	23
2. 酸化ストレス刺激はヒト顆粒膜細胞において Nrf2 及び抗酸化物質の発現	

を上昇させる	23
3. 内因性 Nrf2 のノックダウンはヒト顆粒膜細胞での抗酸化物質の発現を低下させる	24
4. Nrf2 活性化剤 DMF によるヒト顆粒膜細胞刺激は抗酸化物質の発現を上昇させる	24
5. ヒト顆粒膜細胞における Nrf2 の活性化は 8-OHdG 産生と ROS 産生を低下させる	25
<マウス>	
6. マウスへの DMF 投与は排卵数と貯蔵原始卵胞数を増加させた	26
7. DMF 投与で血清中 Nrf2 と AMH 濃度は上昇した	27
8. DMF 投与により Nrf2 は活性化し、抗酸化物質の産生は上昇した.....	28
9. DMF 投与は卵巣組織での酸化ストレスを軽減した.....	28
10. Telomere と TERT 活性は DMF 投与で上昇した	28
4) 考察.....	29
5) 結論.....	33
6) おわりに.....	34
謝辞.....	35
略語.....	36
文献.....	38
図.....	45

要旨

昨今の晩婚化傾向に伴い、加齢による妊孕性低下を理由に不妊治療を受けるカップルは増加の一途を辿っている。特に加齢による卵巣機能低下は深刻な不妊原因であることから、抗酸化経路である Nrf2/Keap1 経路の活性化を通じて酸化ストレスの影響を減少させることで、ヒト及びマウス卵巣の加齢現象を遅らせることができるという仮説のもと、Nrf2/Keap1 経路の卵巣における意義を検討すると同時に、この経路を活性化させる試薬 Dimethylfumarate (DMF) を培養ヒト顆粒膜細胞およびマウスに用いた。Nrf2/Keap1 経路は卵巣において抗酸化遺伝子群を制御する作用があることが明らかになり、DMF は Nrf2 を活性化して抗酸化物質の発現が上昇することで酸化ストレスを減少させ、マウスに経口投与すると排卵数や貯蔵原始卵胞の増加につながり卵巣の加齢を遅らせる可能性が示唆され、今後の臨床応用への基盤が作られた。

序文

近年本邦において、女性の社会進出に伴い晩婚化が進行している。厚生労働省の人口動態統計調査によると平均初婚年齢は上昇を続けており、2015年で夫が31.1歳、妻が29.4歳となっており、30年前（1985年）と比較すると夫は2.9歳、妻は3.9歳上昇している。また、第1子出生時の母親の平均年齢は2015年においては30.7歳と、30年前（1985年）と比較すると4.0歳上昇している（図1-1）。その影響もあり、女性が一生の間に生む子供の数にあたる合計特殊出生率は2015年で1.46と、30年前に比べ0.3低下しており¹（図1-2）、今後もさらに晩婚化、少子化、出生年時齢の上昇は進行すると考えられる。これに伴い不妊に悩むカップルは増加している。

不妊とは、「生殖年齢の男女が妊娠を希望し、ある一定期間、避妊することなく通常の性交を継続的に行っているにもかかわらず妊娠の成立をみない場合」と定義され、本邦においては2015年にその期間が従来の2年から、1年に短縮され、その理由として妊娠を希望する女性の年齢が上昇するなかで早期に適切な治療を受けることにつながることへの期待が挙げられる²。本邦では、不妊を心配したことがあるカップルは3組に1組、実際に不妊の検査や治療を受けたことがある、または現在受けているカップルは、5.5組に1組³といわれており、その深刻な状況が伺える。

不妊の原因は女性因子、男性因子、原因不明に大別される⁴(図2)。女性は35歳を境に妊孕性が急激に低下することが知られているが⁵⁻⁷(図3)、その大きな要因として酸化ストレスなどの蓄積による卵巣の加齢が挙げられる⁸⁻¹¹。自然妊娠が難しいと医療機関を受診し、一般不妊治療と呼ばれるタイミング法や人工授精を経て、高度不妊治療と呼ばれる体外受精・胚移植へと治療(図4)は段階を踏んで行われることが一般的である(図5-1)。体外受精での出生は右肩上がりに増加しており、本邦では出生児の約20人に1人(5.1%)に当たる5万1001人が体外受精で出生している(2015年)(図6)。しかし体外受精をしても出産に成功した女性の割合は、30歳で21.5%、35歳で18.4%、40歳で9.1%、42歳では4.5%と年々顕著に低下し¹²、卵巣の加齢による影響は高度不妊治療をもつてしても克服しがたい。また、不妊治療は肉体的、精神的、経済的に負担が大きく¹³(図5-2)、最近では不妊治療と仕事の両立の困難さから離職をせざるを得ないなど^{14,15}、社会的にも大きな問題となっている。

加齢に伴い、卵巣には排卵数の減少やステロイドホルモンのバランスの変化などが生じる。卵巣の加齢変化の大きな原因となる酸化ストレスを減じること、卵巣の加齢を遅らせることが妊孕性の温存に有用であると考え、重要な抗酸化経路¹⁶である Nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) / Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-antioxidant response element (ARE)^{17,18}

に着目した。定常状態において、転写因子 Nrf2 は Keap1 により細胞質に留められ、核移行が阻害されることで遺伝子発現が抑制されている¹⁹。細胞が酸化ストレスにさらされると、Keap1 は酸化修飾され Nrf2 との結合が減弱し、Nrf2 は核内へ移行する。核内へ移行した Nrf2 は遺伝子上流にある抗酸化応答配列 ARE に結合し、下流遺伝子の発現を誘導する¹⁸ (図 7)。下流遺伝子には抗酸化酵素である Catalase や superoxide dismutase 1 (SOD1)、DNA 修復酵素である 8-oxoguanine DNA-glycosylase 1 (OGG1)、NAD(P)H キノン還元酵素(NQO1)など異物代謝酵素群が含まれる²⁰。Nrf2/Keap1 経路が適切に機能することで生体は酸化ストレスから防御されており¹⁶⁻²⁰、発癌²¹や糖尿病²²、神経疾患²³との関連も近年わかってきた。Nrf2 活性化剤として経口薬である Dimethylfumarate (DMF、フマル酸ジメチル)が知られており (図 8)、1959 年から乾癬の治療薬として長期に渡り使用されていたが^{24,25}、再発寛解型多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) の第一選択薬として 2013 年に米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) から承認されて以降、世界 55 か国 (2017 年時点) で承認され、数年で 30 万人以上の患者に投与されており米国とヨーロッパでは第一選択薬として使用されている^{18,26,27}。本邦においては 2016 年に承認、2017 年に発売され、使用が広まっている²⁸。

過剰な酸化ストレスは卵巣を加齢させることで不妊に繋がる一方で、適切な

量の酸化ストレスは卵胞の発育や排卵に不可欠であると考えられており²⁹、酸化ストレスのレベルを適切にマネジメントすることは有用であると考えられる。そこでNrf2/Keap1 経路の活性化が酸化ストレスを減弱させ、加齢による不妊を遅らせることにつながるかを、ヒト卵巣顆粒膜細胞とマウス卵巣において検討した。

方法

1. ヒト黄体化顆粒膜細胞

患者からの文書による同意と、東京大学研究倫理委員会の承認（3594－(2)）のもと、東京大学医学部附属病院と木場公園クリニックで体外受精患者 171 人（26～46 歳）の採卵時に卵胞液を回収し、以前に当研究室で報告した方法を用いて^{30,31} ヒト黄体化顆粒膜細胞 (granulosa cell; GC) を単離培養した。卵胞液を 1500 m/s で 10 分間遠心分離した後、0.2 % hyaluronidase を含んだ Phosphate buffered saline (PBS) で懸濁し、37 °C で 30 分間インキュベートした。懸濁液を Ficoll-Paque 液 (GE Healthcare) に加え、700 G で 30 分間遠心分離し、中間層を回収した。PBS で洗浄し、10%チャコール処理仔ウシ血清 (FBS; Biowest) と抗生剤 (ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 0.1 mg/ml、アンフォテリシン 250 ng/ml、Sigma Aldrich) を含んだ DMEM/F-12 (Invitrogen) に懸濁し、 2×10^5 cells/ml の濃度で 5% CO₂、37°C の条件で培養した。すべての GC は 2-3 日間の培養ののちに薬剤刺激を行った。

2. GC の薬剤刺激

GC において酸化ストレスの主な原因物質である活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) (図 9) や DMF が Nrf2 発現に及ぼす影響を検討するために、異な

る濃度の過酸化水素 (200 μ M、400 μ M、600 μ M) または DMF (50 μ M、100 μ M) をそれぞれ培養液に添加して 48 時間刺激した。培養細胞は定量的 RT-PCR 法または Western blotting に供された。

3. ヒト卵巣組織

東京大学研究倫理委員会の承認 (324) のもと、文書にて同意を得た患者の卵巣組織切片を用いた。患者は 32~42 歳で正常な月経周期をもち、ホルモン剤や GnRh アナログの投与はされておらず、子宮頸癌もしくは子宮内膜癌のために東京大学医学部附属病院において手術が行われた際に摘出された、病理学的に正常な卵巣組織を使用した。

4. マウスと薬剤投与

動物実験は全て東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認 (医 P-17-009) のもと行った。飼育環境条件は $23 \pm 2^{\circ}$ C、湿度 50-60%、餌・水へはフリーアクセスの環境で、12 時間ごとの明暗条件とした。20 週齢の BALB/c 雌マウス (日本チャールズリバー) を 32 週まで飼育し、DMF (Sigma Aldrich) の卵巣への効果を調べるために DMF 群と Control 群 (各 15 匹) の 2 群に分け、DMF 群には 0.1% メチルセルロースに懸濁混和した 50 mg/kg の DMF を 0.1ml、Control 群には 0.1%

メチルセルロースを 0.1ml、それぞれ 32 週から 48 週まで 16 週間連日経口投与した (図 10)。先行実験³⁶から、32 週齢はヒトで 35 歳前後、48 週齢は 43 歳前後を想定して実験を行った。その後、以下に示すように排卵誘発を行った。

5. マウスの排卵誘発・採卵、卵巣、血清採取

DMF または Control 薬剤最終投与の翌日に解剖し、採卵、両側卵巣摘出と心臓採血を施行し実験に供した。妊馬血清由来性腺刺激ホルモン (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG; あすか製薬) 及びヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, hCG ;あすか製薬) を腹腔内に投与にして排卵誘発を行った。PMSG 注射後 47-49 時間後に hCG を投与し、その 13-18 時間後に麻酔下で解剖し、両側卵管と卵巣を切除して採取した。ミネラルオイルで覆われた 60 μ l のドロップをヒト卵管液 (human tubal fluid , HTF; Merck Millipore) で作成し、卵管膨大部を確認して実体顕微鏡下で卵子卵丘細胞複合体 (Cumulus-oocyte-complexes ,COCs) を 25 ゲージ注射針で採取した。右卵巣は採取後直ちに中性緩衝ホルマリン液で固定、左卵巣は液体窒素を使用して-80 度保存した。

6. マウス排卵数のカウント

卵丘細胞を除去した卵子数のカウントと体外発生の観察を目的として、前述

のCOCを採取した際と同様のHTFを用い、体外受精を行った。頸椎脱臼した3-6ヶ月齢の同系統のオスマウスの精巣上体から25ゲージ注射針を用いて200 μ lドロップの中に用手的に精液を採取し、1時間インキュベーター内で静置し、COCを採取したドロップ内に2 μ l程度注入し体外受精を行った。インキュベーター内で1時間培養し、正常卵子の合計数をカウントした。

7. 卵巣組織免疫染色

ヒト及びマウスの卵巣を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、エタノールで脱水し、パラフィン包埋し、ヒトでは4 μ m、マウスでは20 μ mの切片を作成した。卵巣切片を脱パラフィン後、Target retrieval solutionを用いて抗原賦活化し、Envision + Dual Link System/HRP (DAB) kit (Dako)を用いて免疫染色を行った。各卵巣の切片の半分をHematoxylin-Eosin (HE)染色に用い、半分は下記の抗体で染色した。1次抗体として、ヒト抗-Nrf2抗体(16396-1-AP, Proteintech Group)、ヒト抗-Keap1抗体(ab66620, Abcam)、マウスanti-Nrf2抗体(1:200, 16396-1-AP, Proteintech Group)とマウス抗-Human 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG)抗体(1:100, N45.1, JaICA)を用い、4°Cで一晩インキュベートした。Negative controlとしてIsotype-specific IgGを使用した。スライドはMayer-Hematoxylin液(Wako Chemical)にて核対比染

色した後に包埋した。

8. マウス卵胞数の計測

上述したマウス卵巣組織の HE 染色連続標本を用い、光学顕微鏡を用いて各卵巣あたりの卵胞数を計測した。卵胞は、原始卵胞（扁平で一層の顆粒膜細胞層をもつ）、一次卵胞（単一な立方状の顆粒膜細胞層をもつ）、二次卵胞（二層以上の顆粒膜細胞数をもつ）、成熟卵胞（卵胞腔をもつ）の 4 種類に分類し³²、Mishra らのプロトコール^{33,34}を若干改変した。原始卵胞と一次卵胞では全ての、二次卵胞では 3 枚おき、成熟卵胞では 5 枚おきに切片を観察し、重複のないように注意をしながら卵胞数を計測した。

9. TUNEL 染色

マウス卵巣組織に対して、アポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を in situ cell death detection peroxidase (POD) Kit (Cat. No. 11684817910, Roche) を用いて TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色法により検出した。卵巣切片を脱パラフィン後、20 μ g/ml の proteinase K solution (Roche) を用い 8 分間室温でインキュベートし、PBS 洗浄後に内因性のペルオキシダーゼ活性を抑制するために 15 分間、3 %過酸化水素に浸透した。PBS 洗浄後に TUNEL

solution (450 μ L label solution, 50 μ L of enzyme solution) (Cat. No. 11684817910, Roche) を用いて 60 分間室温で標識反応を行い、PBS 洗浄後に converter-POD solution に 30 分間室温で浸透した。再度 PBS 洗浄後に 3,3-diaminobenzidine (DAB) にて検出反応を行い、Mayer-Hematoxylin 液 (Wako Chemical) にて核対比染色した後に包埋した。

10. RNA 抽出、RT 及び定量的 PCR

ヒト GC は SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO) を用いて、cDNA を得た。マウス卵巣からは ISOGEN (Nippon Gene) を用いて total RNA を抽出した。1 μ g の total RNA を Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix with genomic DNA remover (TOYOBO) を用いて RT し、cDNA を得た。得られた cDNA を用いて、定量的 PCR を LightCycler (Roche) により行った。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を internal standard として標準化し、ヒト Nrf2、ヒト Catalase、ヒト SOD1、ヒト OGG1、マウス Nrf2、マウス Catalase、マウス SOD1、マウス NQO1 の発現を評価した。プライマー配列を以下に示す。

ヒト Nrf2

Forward : 5' - ACGGTCCACAGCTCATCATG -3'

Reverse : 5' - ACTCTTTCCGTCGCTGACTG -3'

ヒト Catalase

Forward : 5' - TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC -3'

Reverse : 5' - TCCGGGATCTTTTTAACGCCATTG -3'

ヒト SOD1

Forward : 5' - CTGAAGGCCTGCATGGATTC -3'

Reverse : 5' - CCAAGTCTCCAACATGCCTCTC -3'

ヒト OGG1

Forward : 5' - CTGCCTTCTGGACAATCTTT -3'

Reverse : 5' - TAGCCCGCCCTGTTCTTC -3'

ヒト GAPDH

Forward : 5' - TGGACCTGACCTGCCGTCTA -3'

Reverse : 5' - CTGCTTCACCACCTTCTTGA -3'

マウス Nrf2

Forward : 5' - GGTTGCCACATTCCCAAAC -3'

Reverse : 5' - TCCTGCCAAACTTGCTCCAT -3'

マウス Catalase

Forward : 5' - TTGACAGAGAGCGGATTCCT -3'

Reverse : 5' - AGCTGAGCCTGACTCTCCAG -3'

マウス SOD1

Forward : 5' - CGGATGAAGAGAGGCATGTT -3'

Reverse : 5' - CACCTTTGCCCAAGTCATCT -3'

マウス NQ01

Forward : 5' - GCAGGATTTGCCTACACAATATGC -3'

Reverse : 5' - AGTGGTGATAGAAAGCAAGGTCTTC -3'

マウス TERT

Forward : 5' - GGATTGCCACTGGCTCCG -3'

Reverse : 5' - TGCCTGACCTCCTCTTGTGAC -3'

マウス Telomere

Forward : 5' - CGGTTTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT -3'

Reverse : 5' - GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT -3'

マウス GAPDH

Forward : 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

Reverse : 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'

PCR の条件は、denaturing 98°C, 10 秒、annealing 60°C, 10 秒、extension 68°C, 30 秒とし、40 サイクルとした。全ての PCR は melting curve を確認した。

11. short-interference RNA (siRNA) による内在性 Nrf2 のノックダウン

GC の内在性 Nrf2 を Nrf2 特異的 siRNA (Genbank BC 011558.1, Invitrogen) を用いてノックダウンした。

Sense 側配列は各々以下の通りである。

Nrf2 siRNA #1

5' - CCAACCAGUUGACAGUGAACUCAUU -3'

5' - AAUGAGUUCACUGUCAACUGGUUGG -3'

Nrf2 siRNA #2

5' - CAAACUGACAGAAGUUGACAAUUU -3'

5' - AUAUUUGUCAACUUCUGUCAGUUUG -3'

Nrf2 siRNA #3

5' - CAAUGAAGCUCACUUGCAUUAAUU -3'

5' - AAUUAUUGCAAGUUGAGCUUCAUUG -3'

コントロール siRNA には Stealth RNAi negative control (Invitrogen) を用いた。GC へのトランスフェクションは Lipofectamine RNAimax (Lifetechnologies) を用いてマニュアルに記載された方法で行った。siRNA の最終濃度はすべて 40 nM となるように調整した。トランスフェクション後、48 時間培養を継続した後、

回収した。内在性 Nrf2 のノックダウンは3種類の siRNA を用いて行い、同様の実験を3回反復した。Nrf2 がノックダウンされていることは定量的 RT-PCR 法および Western blotting にて確認した。

12. Western blotting

ヒト GC とマウス卵巣組織を phosphatase inhibitor (Nacalai Tesque) と protease inhibitor (Roche) を含んだ lysis buffer (Cell Signaling) で溶解し、バイオラプター (コスモ・バイオ株式会社) を用いて 10 秒破碎、20 秒冷却を 10 回反復して細胞溶解液を調整し遠心処理を行った。細胞溶解液の上清を 10% SDS-PAGE で泳動し、トランスブロット® Turbo™ 転写システムを用いてブロッキングし、ブロッキング後メンブレンを、10% スキムミルク入り TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で 1 時間ブロッキングした。一次抗体 (抗-Nrf2 (1:100; 16396-1-AP, Proteintech Group)、抗-Keap1 (1:1000; ab66620, Abcam Ltd.)、抗-Catalase (1:200; ab16731, Abcam Ltd.)、抗-SOD1 (1:1000; ab13499, Abcam Ltd.)、抗-OGG1 (1:1000; ab135940, Abcam Ltd.)、抗-NQO1 (1:1000; SC-32793, Santa Cruz, Texas, USA)、と抗-telomerase reverse transcriptase (TERT) (1:100; LS-B9932, LSBio)) 入り TBS-T に 4°C でオーバーナイト、二次抗体 (anti-rabbit IgG, 7074S, 1:3000;

anti-mouse IgG, 7076S; 1:3000, Cell Signaling) 入り TBS-T に室温で 1 時間浸透した。メンブレンは各段階で 3 回ずつ TBS-T で洗浄した。二次抗体に結合している horseradish peroxidase は ECL advance (GE healthcare) のマニュアルに従い化学発光され、ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare) で検出した。各タンパクの発現量は β -actin (1:2000; A2228, Sigma Aldrich) を loading control とし、Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて計算した。3 回実験を行い代表的なプロットを提示し、定量の結果を示した。

13. 細胞蛍光免疫染色法

GC は 4-well ガラス Millicell EZ slides (Merck Millipore) の上で、DMEM (10% FBS) で培養した。100 μ M の DMF、400 μ M の過酸化水素、または培養液のみで刺激をした後に PBS + 4% Paraformaldehyde で固定し、PBS + 0.2% Triton X-100 で浸透化し、PBS + 6% bovine serum albumin を用いて blocking をおこなった後、抗-Nrf2 抗体 (1:100; 16396-1-AP, Proteintech Group)、抗-8-OHdG 抗体 (1:100; 1b48508, Abcam) で反応させた。一次抗体を洗浄後、蛍光標識二次抗体として Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (1:100; A-21206, Invitrogen) と Alexa fluor 558 goat anti-mouse IgG (1:100; A-

11004, Invitrogen)、核染色として 300 nM の 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI; D1306, Thermofisher)を用いた。DAPI を洗浄後、共焦点顕微鏡 (Carl-Zeiss) を用いて細胞を観察した。

14. ELISA 法

マウスは解剖時に心臓採血を施行し、1000G で 15 分間遠心分離して上清を回収した。得られた血清は蒸留水で 10 倍希釈し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて抗ミュラー管ホルモン (anti-mullerian hormone ; AMH) と Nrf2 の濃度を測定した。AMH 測定には Mouse AMH ELISA kit (CSB-E13156m, CUSABIO Life science) 、Nrf2 測定には Mouse Nrf2 ELISA kit (CSB-E16188m, CUSABIO Life Science)を用い、Epoch Multi-Volume Spectrophotometer (Bio Tek)を用いて、450 nm 吸光度を測定した。

15. ヒト GC 細胞内 ROS の計測

ヒト GC の細胞内 ROS を fluoroprobe carboxymethyl-H2-dichlorofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA; Invitrogen)染色を用いて計測した。GC は 100 μ M の DMF、400 μ M の過酸化水素、100 μ M の DMF + 400 μ M の過酸化水素、または培養液のみで刺激をした後に、10 μ M の CM-H2DCFDA を含んだ PBS に 37 °C で 20 分間

インキュベートし、10 μM の Hoechst 33342 (Thermofisher) で 5 分間対比染色を行い、ただちに共焦点顕微鏡 (Carl-Zeiss) で観察した。蛍光強度は LSM700 ZEN を用いて計測した。

16. 統計学的解析

統計学的解析は JMP Pro 11 software (SAS Institute Inc.) を用いて行った。データは最低限 3 回の実験結果の平均値及び標準誤差値で記載し、2 群比較は Student t test で、多重比較は Tukey-Kramer HSD test にて解析を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

結果

<ヒト>

1. ヒト卵巣における Nrf2 及び Keap1 タンパクの発現

免疫組織化学染色法を用いてヒト卵巣における Nrf2 及び Keap1 タンパクの発現を検討した。様々な発育段階の卵胞を抗-Nrf2 抗体と抗-Keap1 抗体で染色した (図 11-1, 2)。その結果、各発育段階の卵胞において顆粒膜細胞の細胞質を中心に Nrf2 と Keap1 タンパクの発現が確認された。

2. 酸化ストレス刺激はヒト顆粒膜細胞において Nrf2 及び抗酸化物質の発現を上昇させる

GC において酸化ストレスが Nrf2 及び抗酸化物質の発現に及ぼす影響を検討するために、培養 GC 細胞に酸化ストレス刺激を与えた。過酸化水素 (200 μ M、400 μ M、600 μ M) をそれぞれ培養液に添加して 48 時間刺激した。どの条件下でも培養細胞に細胞死は観察されなかった。培養細胞は定量的 RT-PCR 法または Western blotting に供された。その結果、定量的 RT-PCR 法において過酸化水素刺激は濃度依存性に Nrf2、Catalase、SOD1、OGG1 の mRNA 発現を上昇させ、600 μ M の過酸化水素刺激では有意な上昇がみられた。SOD1 と OGG1 では 400 μ M の過酸化水素刺激でも有意な上昇がみられた。Western blotting による解析でも濃

度依存性に Nrf2, Catalase、SOD1、OGG1 のタンパク発現量を上昇させ、Keap1 はタンパク発現量の低下が観察された (図 12)。

3. 内因性 Nrf2 のノックダウンはヒト顆粒膜細胞での抗酸化物質の発現を低下させる

siRNA を用いてヒト GC の内因性 Nrf2 をノックダウンした。その後、定量的 RT-PCR 法または Western blotting により Nrf2、及び抗酸化物質の発現量を検討した。内因性 Nrf2 のノックダウンにより、Catalase、SOD1、OGG1 の mRNA 発現量は有意に減少することが観察された。また、Western blotting による解析でも内因性 Nrf2 のノックダウンは Catalase、SOD1、OGG1 のタンパク発現を低下させ、Keap1 タンパクは発現が上昇した (図 13)。

4. Nrf2 活性化剤 DMF によるヒト顆粒膜細胞刺激は抗酸化物質の発現を上昇させる

Nrf2 活性化剤である DMF がヒト GC において抗酸化物質の発現に与える影響を検討するために、培養 GC に DMF (50 μ M、100 μ M) を添加し、定量的 RT-PCR 法または Western blotting により Nrf2、及び抗酸化物質の発現量を検討した。その結果、100 μ M の DMF 刺激は Nrf2、Catalase、SOD1、OGG1 の mRNA 発現量を

有意に上昇させ、Nrf2、Catalase、SOD1、OGG1 のタンパク発現量も増加した。

DMF 刺激により Keap1 タンパクの発現は低下した (図 14)。

5. ヒト顆粒膜細胞における Nrf2 の活性化は 8-OHdG 産生と ROS 産生を低下させる

8-OHdG は DNA を構成する塩基の一つ deoxyguanosine (dG) の 8 位が ヒドロキシル化された構造を持つ、DNA 酸化損傷マーカーである。dG は 4 種類の DNA 塩基のうち最も活性酸素による酸化を受けやすいため、dG の主要酸化生成物である 8-OHdG は活性酸素による生体への影響を鋭敏に反映し、現在最も広く用いられている酸化ストレスマーカーの一つである³⁵。ヒト顆粒膜細胞をそれぞれ 100 μ M の DMF (図 15 E~H) または 400 μ M の過酸化水素 (図 15 I~L) で刺激し、抗-Nrf2 抗体または抗-8-OHdG 抗体で反応させ、蛍光免疫染色法で検討を行った。その結果、DMF 刺激を与えた GC は Nrf2 の蛍光強度が上昇し (図 15 F)、8-OHdG の蛍光強度は低下し (図 15 E)、過酸化水素刺激を与えた GC は 8-OHdG の蛍光強度が上昇した (図 15 I)。このことから、DMF は Nrf2 を活性化し、酸化ストレスの軽減に寄与することが示唆された。また GC 内 ROS を CM-H2DCFDA 染色を用いて計測した。無蛍光の CM-H2DCFDA プローブは ROS により素早く酸化されることで、強く蛍光発色し、2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) に変化する

るため (図 16)、その蛍光強度を定量することにより細胞内の ROS 産生量を計測できる。GC は 100 μM の DMF (E~H)、400 μM の過酸化水素 (G~I)、100 μM の DMF + 400 μM の過酸化水素 (J~L)、または培養液のみ (A~C) で刺激をし、CM-H2DCFDA を含んだ PBS で蛍光染色し細胞内の ROS 産生を定量した (図 17-1, 2)。DMF による刺激は Control に比べ ROS 産生を 1/3 程度に有意に減少させ、反対に過酸化水素刺激は ROS 産生を増加させた。また、過酸化水素刺激により ROS 産生の増加は DMF を同時に添加することで、その産生量は減少することが示された。

<マウス>

6. マウスへの DMF 投与は排卵数と貯蔵原始卵胞数を増加させた

マウス DMF 群または Control 群への試薬の投与で死亡、体重減少、脱毛といった副作用は観察されず、48 週齢での体重にも有意差は見られなかった (DMF 群: $28.9 \pm 0.43\text{g}$ vs Control 群: $29.1 \pm 0.43\text{g}$, $p = 0.76$)。controlled ovarian stimulation (COS) により得られる排卵数は経時的に減少することが知られており、12 か月齢での排卵数は 2-3 か月齢でのわずか 20% 程度であった³⁶。マウスへの DMF 投与は図 18 に示すように、DMF 群 (5.1 ± 0.3 oocytes per mouse) に対して Control 群 (0.8 ± 0.3 oocyte per mouse) と有意な排卵数の

増加が見られた。

また、卵巣組織の HE 染色で DMF 群と Control 群の原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の数をそれぞれ計測した (図 19)。一次卵胞 (DMF 群: 108.2 ± 38.7 vs Control 群: 75.2 ± 14.3 , $p = 0.12$)、二次卵胞 (DMF 群: 23.5 ± 10.0 vs Control 群: 21.6 ± 5.9 , $p = 0.72$)、胞状卵胞 (DMF 群: 7.5 ± 3.7 vs Control 群: 8.0 ± 1.5 , $p = 0.81$) では有意差は見られなかったが、原始卵胞では約 60 % 多くの卵胞が DMF 群で観察された (DMF 群: 395.0 ± 15.8 vs Control 群: 251.2 ± 17.3 , $p = 0.0002$)。

7. DMF 投与で血清中 Nrf2 と AMH 濃度は上昇した

マウスへの DMF 投与により血清中の Nrf2 と AMH の濃度は上昇を認めた。血中 AMH は卵巣に存在する前胞状卵胞と小胞状卵胞の数を反映するといわれており、妊孕性を示す卵巣予備能の評価として有用である³⁷と考えられているため不妊治療のスクリーニング検査としても行われることが一般的になっている。図 20 に示したように、DMF 投与により Nrf2 (コントロール群: 6.79 ± 0.12 ng/ml vs DMF 群: 8.21 ± 0.11 ng/ml, $p < 0.0001$)、AMH (コントロール群: 13.93 ± 0.44 ng/ml vs DMF 群: 18.63 ± 0.38 ng/ml, $p < 0.0001$) と有意な上昇がみられた。

8. DMF 投与により Nrf2 は活性化し、抗酸化物質の産生は上昇した

マウス卵巣における DMF 投与の影響を検討するため、Nrf2 およびその標的遺伝子である NQO1、抗酸化物質である Catalase と SOD1 の mRNA とタンパク発現量を測定した。mRNA 発現量は Nrf2 (DMF 群で 1.50 倍)、Catalase (DMF 群で 1.91 倍)、SOD1 (DMF 群で 1.42 倍)、NQO1 (DMF 群で 1.84 倍) とそれぞれ有意に上昇し、Western blotting によるタンパクの発現量も Nrf2、Catalase、SOD1、NQO1 とともに上昇がみられた。Keap1 のタンパク発現は反対に低下した (図 21)。

9. DMF 投与は卵巣組織での酸化ストレスを軽減した

DMF 投与が卵巣組織に及ぼす影響を検討するために、免疫染色で DNA 酸化損傷マーカーである 8-OHdG 量を検討した。DMF 投与により 8-OHdG は発現が減少した (図 22-1)。またアポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を測定する TUNEL 染色では、DMF 投与により TUNEL 陽性細胞は減少した (図 22-2)。

10. Telomere と TERT 活性は DMF 投与で上昇した

DMF 投与の影響を検討するため、Telomere と TERT の mRNA 発現量を測定した。Telomere (DMF 群で 2.15 倍)、TERT (DMF 群で 1.90 倍) とともに mRNA は有意に発現が上昇し、TERT のタンパク発現量も上昇を認めた (図 23)。

考察

女性不妊の原因として酸化ストレスの影響は大きいと広く考えられており、代表的な抗酸化経路である Nrf2/Keap1 経路の活性化がヒト及びマウス卵巣において酸化ストレスを軽減するかを検討した。Nrf2 を活性化することで知られる DMF は、50 年以上乾癬の治療薬として長期投与され安全性が高いことが知られており、今回の検討でも重要な副作用は観察されなかった。

DMF の投与量に関しては以下のように検討して決定した。DMF の動物実験に関しては既報^{27, 38-40} 及び、多発性硬化症に対する経口 DMF 薬である Tecfidera® の投与量を参考にした。Tecfidera® の最大投与量は 480 mg/日、およそ 10mg/kg/日であり、発売前動物臨床実験⁴¹ において、マウスへの 50、100 mg/kg/日の経口投与は副作用がみられなかったのに対して 250 mg/kg/日の投与では胃粘膜障害に起因する体重減少の副作用がみられたため、50 mg/kg/日を経口投与し、体重減少を含む副作用は観察されなかった。ヒト GC への DMF 刺激も同等量を用い、明らかな細胞死は観察されなかった。

Nrf2/Keap1 経路はその同定以降、生体を酸化ストレスから防御する「よい面」が注目されてきた⁴²。しかし、Nrf2 の活性化は卵巣癌を含む癌の抗がん剤への抵抗性を増す可能性が示唆され⁴³、その「わるい面」にも注目が集まった⁴⁴⁻⁴⁷。癌細胞における Nrf2 活性化の正確なメカニズムはまだ不明であるが¹⁶、Keap1

の変異による Nrf2 蓄積が活性化の原因と考えられる^{44,48}。そのため、正常な細胞に対して Nrf2 活性化剤である DMF を投与しても、Keap1 への阻害作用は一時的であるため^{44,48} 癌化などのリスクは少なく、DMF による Nrf2/Keap1 経路の活性化は細胞保護的に働く可能性が高いと現在は考えられている⁴⁹。乾癬の患者で癌の発生が増加するというデータはなく²⁵、今後は多発性硬化症患者を長期に観察することでさらなる知見が得られると考える。ただし、多発性硬化症に対して DMF の正確な作用機序は明らかではなく、その解明も待たれる。

卵巣において妊孕性を規定するのは原始卵胞の数と考えられている⁵⁰。ヒトを含め大多数の哺乳類において卵巣生殖細胞は胎生期のみを増殖する。ヒトの場合、胎生期には約 600~700 万個存在する原始卵胞は出生時には約 30 万個に減少し、それ以降も減少していくが増加することはない⁵¹⁻⁵³。それゆえ加齢に伴い減少する原始卵胞の数を温存することは、卵巣の加齢を遅らせることにつながる⁵⁴。マウスへの DMF の経口投与はコントロール群に比して 60% も多くの原始卵胞数の貯蔵を示した (図 19)。また COS による排卵数 (DMF 群 (5.1 ± 0.3 oocytes per mouse)、Control 群 (0.8 ± 0.3 oocyte per mouse)) も有意に多く (図 18)、今後さらなる検討は必要だが、DMF が加齢マウスの妊孕性を温存する可能性が示唆された。哺乳類でも種により、卵胞の貯蔵パターンは異なるが、マウスとヒトではそのパターンの近似性が示されている⁵⁵。血中 AMH 値は原始卵

胞から発育する前胞状卵胞数を反映すると考えられており、その値は卵巣内に貯蔵される卵、つまり卵巣予備能を反映する^{56,57}。ヒトにおいて正確な原始卵胞数をモニターすることは困難であるため、卵巣予備能として AMH 値を測定することが一般的である。今回マウスにおいて DMF 投与は原始卵胞の貯蔵とともに、AMH 値の有意な上昇を示していた (図 20)。最近、患者からの文書による同意と、東京大学研究倫理委員会の承認 (3594- (4)) のもと、多発性硬化症の治療で Tecfidera® を経口投与されている東京大学医学部附属病院の生殖年齢にある女性患者の卵巣機能を追跡しており、今後は卵巣予備能の指標として血中の AMH や Nrf2 の値を測定する予定である。

Telomere とは真核生物の染色体の末端部分にみられる TTAGGG の塩基配列の反復構造である。Telomere は細胞分裂や酸化ストレスにより生じる ROS の影響で少しずつ短縮し、体細胞は 50 回程度の細胞分裂で細胞死に至る^{58,59}。生殖細胞ではテロメラーゼという酵素の活性が高く、Telomere が伸長することが知られている⁶⁰。Telomere 長は加齢とともに短縮し、ヒトやマウスの生殖能力との関連性は複数の報告がある⁶¹⁻⁶³。生殖細胞の Telomere は特に ROS の影響を受けやすく⁶⁴、その短縮は生殖細胞の質の低下をもたらす不妊につながる⁶⁵。テロメラーゼはテロメア配列の鋳型となる RNA である TERC (Telomerase RNA Component) と逆転写酵素 TERT、その他の制御サブユニットからなる複合体であ

り、その活性は TERT 活性に依存する⁶⁶。Telomere 長や TERT 活性と、Nrf2 の関連は未だ不明な点が多いが、Telomere 欠損マウスでは Nrf2 の発現抑制と老化がみられた⁶⁷。今回、マウスへの DMF 投与で TERT の mRNA およびタンパク発現は増加しており、DMF による Nrf2 活性化との関連が示唆される。しかし Telomere 長の測定は技術的な問題から未実施のため、今後の検討が必要である。

結論

ヒト顆粒膜細胞において、Nrf2 活性化剤 DMF による刺激は Nrf2 及び抗酸化物質の発現を上昇させ、8-OHdG と ROS 産生を低下させた。またマウスへの DMF 経口投与は排卵数と貯蔵原始卵胞数を有意に増加させ、卵巣組織での酸化ストレスの軽減がみられた。以上より、DMF による Nrf2/Keap1 経路の活性化は抗酸化物質の発現が上昇することにより酸化ストレスを減少させ、卵巣の加齢を遅らせる可能性が示された。

おわりに

今後も女性のライフスタイルの変化に伴い先進国での晩婚化は進み、将来的に体外受精などの高度不妊治療を受けるカップルは増加すると考えられる。

Nrf2/Keap1 経路の活性化を通じて卵巣の加齢を遅らせることができれば、高齢を理由に不妊治療を受けるカップルは減少する可能性があり、これは当事者だけではなく社会経済的にも大きい利点がある。今後は、DMF を投与されている女性患者の卵巣機能の追跡を通じた、さらなる検討を予定している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な助言を頂きご指導いただきました、東京大学医学部産科婦人科学教室 平池修准教授、同 藤井知行教授、同 大須賀穰教授に心よりお礼を申し上げます。

また研究協力ならびに助言をいただきました、日本大学医学部産婦人科学教室 川名敬教授、東京大学医学部産科婦人科学教室 織田克利准教授、同 甲賀かをり准教授、同 廣田泰講師、同 平田哲也講師、同 原田美由紀講師、同 谷川道洋先生、同 宮本雄一郎先生、同 平野茉来先生、同 Fu Houju 先生、同 磯野涉先生、同 本城晴紀先生、同 寺尾宏美先生に感謝します。

略語

DMF, Dimethylfumarate

Nrf2, Nuclear factor-E2-related factor 2

Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1

ARE, antioxidant response element

SOD1, superoxide dismutase 1

MS, multiple sclerosis

FDA, Food and Drug Administration

GC, granulosa cell

PBS, Phosphate buffered saline

ROS, reactive oxygen species

PMSG, Pregnant Mare Serum Gonadotropin

hCG, human chorionic gonadotropin

HTF, human tubal fluid

COCs, cumulus-oocyte complexes

HE, hematoxylin and eosin

8-OHdG, Human 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine

POD, peroxidase

TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End

Labeling

DAB, 3,3-diaminobenzidine

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

OGG1, 8-oxoguanine DNA-glycosylase 1

NQO1, NAD(P)H quinone dehydrogenase 1

siRNA, short-interference RNA

TERT, telomerase reverse transcriptase

DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

AMH, anti-mullerian hormone

dG, deoxyguanosine

COS, controlled ovarian stimulation

TERC, Telomerase RNA Component

文献

1. 内閣府. 平成 29 年版 少子化社会対策白書. in *少子化対策の現状*, Vol. 2018 (2017).
2. 日本産科婦人科学会. 不妊症の定義の変更について. Vol. 2018 (2015).
3. 国立社会保障・人口問題研究所. 2015 年社会保障・人口問題基本調査 <結婚と出産に関する全国調査> 第 15 回出生動向基本調査結果の概要. in *不妊の心配経験や治療経験は増加傾向*, Vol. 2018 (2015).
4. 日本産婦人科医会. 2. 不妊症の定義・分類・治療法. Vol. 2018 (2016).
5. Dew, J.E., Don, R.A., Hughes, G.J., Johnson, T.C. & Steigrad, S.J. The influence of advanced age on the outcome of assisted reproduction. *Journal of assisted reproduction and genetics* **15**, 210-214 (1998).
6. ACOG Committee Opinion. Age-related fertility decline. *Obstetrics and gynecology* **112**, 409-411 (2008).
7. Henry, L. Some data on natural fertility. *Eugenics quarterly* **8**, 81-91 (1961).
8. Mihalas, B.P., Redgrove, K.A., McLaughlin, E.A. & Nixon, B. Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2017**, 4015874 (2017).
9. Karuputhula, N.B., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B. & Chaudhury, K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Systems biology in reproductive medicine* **59**, 91-98 (2013).
10. Pasqualotto, E.B., Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and sterility* **81**, 973-976 (2004).
11. Martin-Romero, Ortíz-de-Galisteo JR, Lara-Laranjeira J, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Alvarez IS. Store-operated calcium entry in human oocytes and sensitivity to oxidative stress. *Biology of reproduction* **78**, 307-315 (2008).
12. 日本産科婦人科学会. 平成 28 年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告 (2015 年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および 2017 年 7 月における登録施設名) . Vol. 2018 (2017).

13. Brandes, M., van der Steen JO, Bokdam SB, Hamilton CJ, de Bruin JP, Nelen WL, Kremer JA. When and why do subfertile couples discontinue their fertility care? A longitudinal cohort study in a secondary care subfertility population. *Human reproduction (Oxford, England)* **24**, 3127–3135 (2009).
14. 厚生労働省 「女性の活躍推進企業データベース」. 不妊治療と仕事の両立に係る諸問題についての総合的調査研究事業調査結果報告書 Vol. 2018 (2017).
15. NPO 法人 Fine. 「仕事と不妊治療の両立に関するアンケート Part 2」. Vol. 2018 (2017).
16. Lu, M.C., Ji, J.A., Jiang, Z.Y. & You, Q.D. The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Medicinal research reviews* **36**, 924–963 (2016).
17. Kaspar, J.W., Niture, S.K. & Jaiswal, A.K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **47**, 1304–1309 (2009).
18. Chen, B., Lu, Y., Chen, Y. & Cheng, J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *The Journal of endocrinology* **225**, R83–99 (2015).
19. McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J.D. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *The Journal of biological chemistry* **278**, 21592–21600 (2003).
20. Singh, B., Chatterjee, A., Ronghe, A.M., Bhat, N.K. & Bhat, H.K. Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC cancer* **13**, 253 (2013).
21. Fahey, J.W., Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7610–7615 (2002).
22. Uruno, A., Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, Sugawara A, Kensler TW, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2

- system prevents onset of diabetes mellitus. *Molecular and cellular biology* **33**, 2996–3010 (2013).
23. Chen, P.C., Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2933–2938 (2009).
 24. W., S. Heilung von Psoriasis. *Med. Monatsschr* **13**, 103–104 (1959).
 25. Atwan, A., Ingram JR, Abbott R, Kelson MJ, Pickles T, Bauer A, Piguet V. Oral fumaric acid esters for psoriasis. *The Cochrane database of systematic reviews*, Cd010497 (2015).
 26. <Age-associated telomere shortening in mouse oocytes.pdf>.
 27. Lee, D.H., Gold, R. & Linker, R.A. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and neurodegenerative diseases: therapeutic modulation via fumaric acid esters. *International journal of molecular sciences* **13**, 11783–11803 (2012).
 28. Tanaka, M. & Shimizu, Y. [Dimethyl Fumarate in Multiple Sclerosis]. *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo* **69**, 1041–1046 (2017).
 29. Shkolnik, K., Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 1462–1467 (2011).
 30. Yoshino, O., Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Yano T, Tsutsumi O, Fujimoto A, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Taketani Y. Upregulation of interleukin-8 by hypoxia in human ovaries. *American journal of reproductive immunology (New York, N. Y. : 1989)* **50**, 286–290 (2003).
 31. Takahashi, N., Harada M, Hirota Y, Zhao L, Azhary JM, Yoshino O, Izumi G, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A potential role for endoplasmic reticulum stress in progesterone deficiency in obese women. *Endocrinology*, en20161511 (2016).
 32. Saatcioglu, H.D., Cuevas, I. & Castrillon, D.H. Control of Oocyte Reawakening by Kit. *PLoS genetics* **12**, e1006215 (2016).
 33. Lim, J., Lawson GW, Nakamura BN, Ortiz L, Hur JA, Kavanagh TJ, Luderer U. Glutathione-deficient mice have increased sensitivity to transplacental benzo[a]pyrene-induced premature ovarian failure and ovarian tumorigenesis. *Cancer research* **73**, 908–917 (2013).

34. Mishra, B., Ortiz, L. & Luderer, U. Charged iron particles, components of space radiation, destroy ovarian follicles. *Human reproduction (Oxford, England)* **31**, 1816–1826 (2016).
35. Kasai, H., Hayami, H., Yamaizumi, Z., Saito H & Nishimura, S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic acids research* **12**, 2127–2136 (1984).
36. Isono, W., Wada-Hiraike O, Kawamura Y, Fujii T, Osuga Y, Kurihara H. Administration of Oral Contraceptives Could Alleviate Age-Related Fertility Decline Possibly by Preventing Ovarian Damage in a Mouse Model. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 1933719117746758 (2017).
37. Seifer, D.B., MacLaughlin, D.T., Christian, B.P., Feng, B. & Shelden, R.M. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertility and sterility* **77**, 468–471 (2002).
38. Ha, C.M., Park S, Choi YK, Jeong JY, Oh CJ, Bae KH, Lee SJ, Kim JH, Park KG, Jun do Y, Lee IK. Activation of Nrf2 by dimethyl fumarate improves vascular calcification. *Vascular pharmacology* **63**, 29–36 (2014).
39. Liu, Y., Qiu J, Wang Z, You W, Wu L, Ji C, Chen G. Dimethylfumarate alleviates early brain injury and secondary cognitive deficits after experimental subarachnoid hemorrhage via activation of Keap1-Nrf2-ARE system. *Journal of neurosurgery* **123**, 915–923 (2015).
40. Lastres-Becker, I., García-Yagüe AJ, Scannevin RH, Casarejos MJ, Kügler S, Rábano A, Cuadrado A. Repurposing the NRF2 Activator Dimethyl Fumarate as Therapy Against Synucleinopathy in Parkinson's Disease. *Antioxidants & redox signaling* **25**, 61–77 (2016).
41. バイオジェンジャパン. 多発性硬化症治療薬テクフィデラ医薬品インタビューフォーム. Vol. 2018 (2017).
42. Itoh, K., Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* **13**, 76–86 (1999).

43. van der Wijst, M.G., Brown, R. & Rots, M.G. Nrf2, the master redox switch: the Achilles' heel of ovarian cancer? *Biochimica et biophysica acta* **1846**, 494-509 (2014).
44. Wang, X.J., Hayes, J.D. & Wolf, C.R. Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer research* **66**, 10983-10994 (2006).
45. Cho, J.M., Manandhar, S., Lee, H.R., Park, H.M. & Kwak, M.K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. *Cancer letters* **260**, 96-108 (2008).
46. Grossman, R. & Ram, Z. The dark side of Nrf2. *World neurosurgery* **80**, 284-286 (2013).
47. Marchan, R. & Bolt, H.M. The cytoprotective and the dark side of Nrf2. *Archives of toxicology* **87**, 2047-2050 (2013).
48. Wang, X.J., Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, Chen W, Yi X, Zheng W, Wondrak GT, Wong PK, Zhang DD. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**, 1235-1243 (2008).
49. Habib, S.L., Yadav, A., Kidane, D., Weiss, R.H. & Liang, S. Novel protective mechanism of reducing renal cell damage in diabetes: Activation AMPK by AICAR increased NRF2/OGG1 proteins and reduced oxidative DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **15**, 3048-3059 (2016).
50. Liu, M., Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL, Liu L. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Human reproduction (Oxford, England)* **28**, 707-717 (2013).
51. Baerwald, A.R., Adams, G.P. & Pierson, R.A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human reproduction update* **18**, 73-91 (2012).
52. Oktem, O. & Urman, B. Understanding follicle growth in vivo. *Human reproduction (Oxford, England)* **25**, 2944-2954 (2010).
53. Guzel, Y. & Oktem, O. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? *Molecular reproduction and development* **84**, 544-559 (2017).

54. Depmann, M., Faddy MJ, van der Schouw YT, Peeters PH, Broer SL, Kelsey TW, Nelson SM, Broekmans FJ. The Relationship Between Variation in Size of the Primordial Follicle Pool and Age at Natural Menopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **100**, E845–851 (2015).
55. Findlay, J.K., Hutt, K.J., Hickey, M. & Anderson, R.A. How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established? *Biology of reproduction* **93**, 111 (2015).
56. Cate, R.L., Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* **45**, 685–698 (1986).
57. de Vet, A., Laven, J.S., de Jong, F.H., Themmen, A.P. & Fauser, B.C. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertility and sterility* **77**, 357–362 (2002).
58. Hayflick, L. & Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* **25**, 585–621 (1961).
59. Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569–573 (1991).
60. Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology* **41**, 181–190 (1973).
61. Liu, L., Blasco, M., Trimarchi, J. & Keefe, D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Developmental biology* **249**, 74–84 (2002).
62. Schaetzlein, S., Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, Niemann H, Rudolph KL. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8034–8038 (2004).
63. Kalmbach, K.H., Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL. Telomeres and human reproduction. *Fertility and sterility* **99**, 23–29 (2013).
64. Huang, J., Okuka, M., McLean, M., Keefe, D.L. & Liu, L. Telomere susceptibility to cigarette smoke-induced oxidative damage and

- chromosomal instability of mouse embryos in vitro. *Free radical biology & medicine* **48**, 1663–1676 (2010).
65. Keefe, D.L. & Liu, L. Telomeres and reproductive aging. *Reproduction, fertility, and development* **21**, 10–14 (2009).
66. Ling, X., Yang W, Zou P, Zhang G, Wang Z, Zhang X, Chen H, Peng K, Han F, Liu J, Cao J, Ao L. TERT regulates telomere-related senescence and apoptosis through DNA damage response in male germ cells exposed to BPDE in vitro and to B[a]P in vivo. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **235**, 836–849 (2018).
67. Sahin, E., Colla S, Liesa M, Moslehi J, Müller FL, Guo M, Cooper M, Kotton D, Fabian AJ, Walkey C, Maser RS, Tonon G, Foerster F, Xiong R, Wang YA, Shukla SA, Jaskelioff M, Martin ES, Heffernan TP, Protopopov A, Ivanova E, Mahoney JE, Kost-Alimova M, Perry SR, Bronson R, Liao R, Mulligan R, Shirihai OS, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* **470**, 359–365 (2011).

図

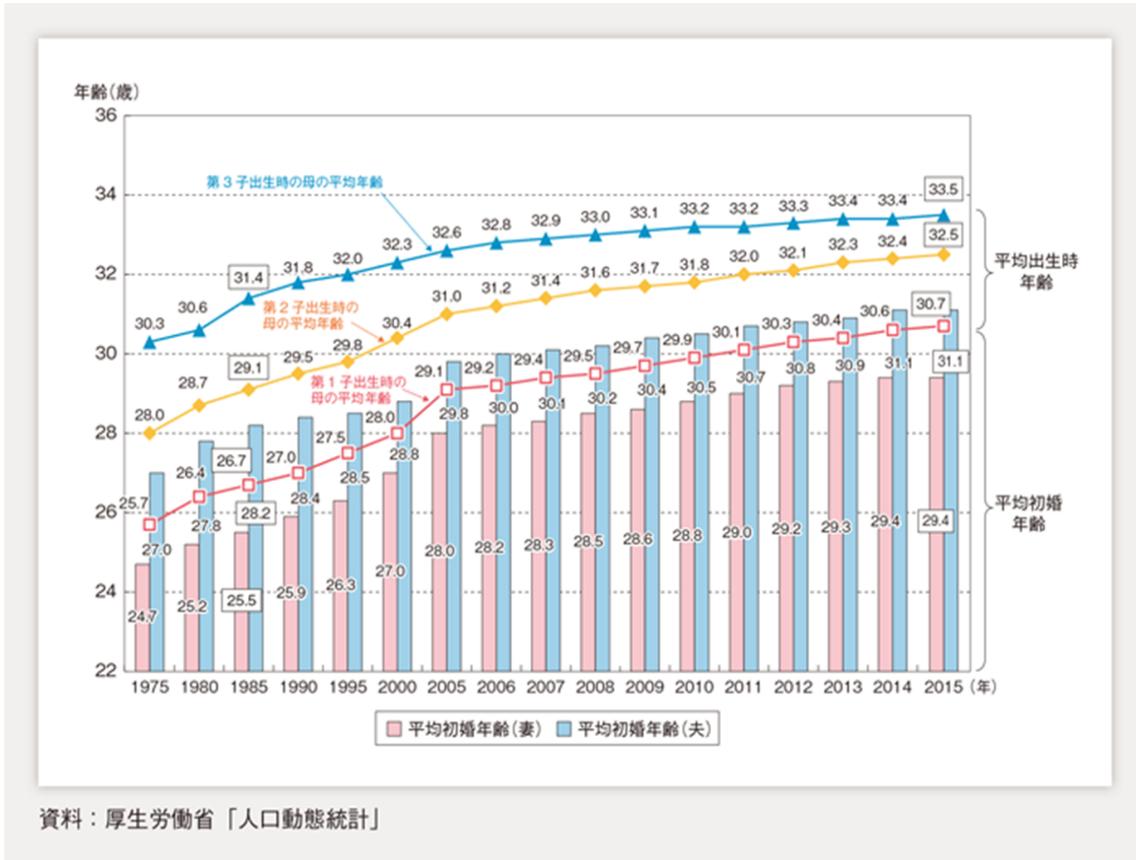


図 1-1 本邦における平均初婚年齢と平均出生時年齢の推移

日本の出生数と合計特殊出生率の推移

○ 平成23年は、出生数105万806人、合計特殊出生率1.39。平成17年に1.26と過去最低を記録してから微増傾向にあるが、なお楽観できない状況。

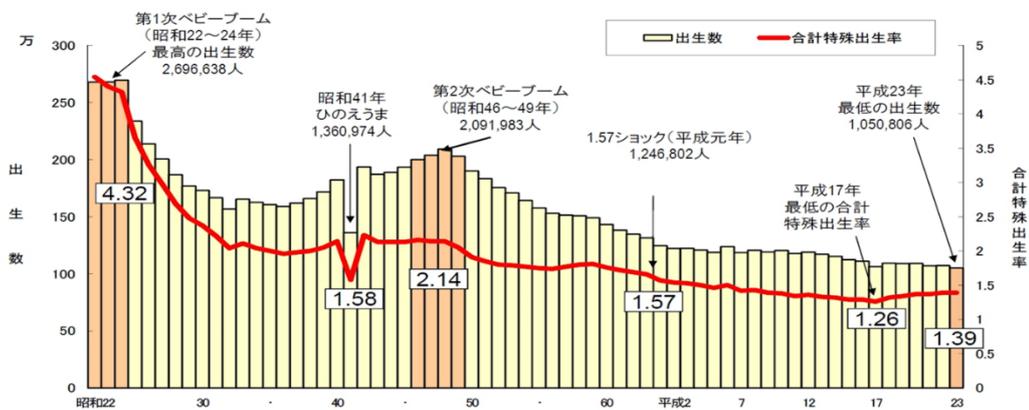


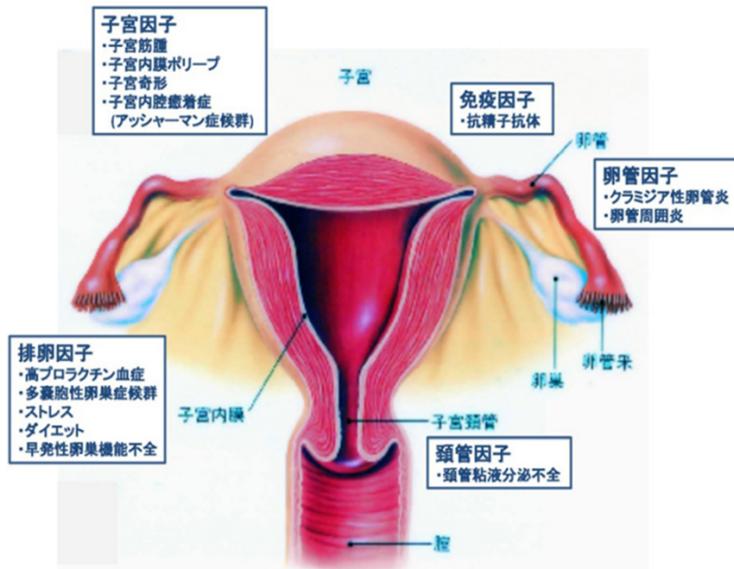
図 1-2 本邦における出生数と合計特殊出生率の推移

厚生労働省「人口動態統計」2017年度版より

http://www8.cao.go.jp/shoushi/shoushika/whitepaper/measures/w-2017/29webhonpen/html/b1_s1-1-2.html

女性の初回進出に伴い、初婚年齢並びに出生時年齢は年々上昇している。それに伴い合計特殊出生率は低下を示している。

女性因子



男性因子

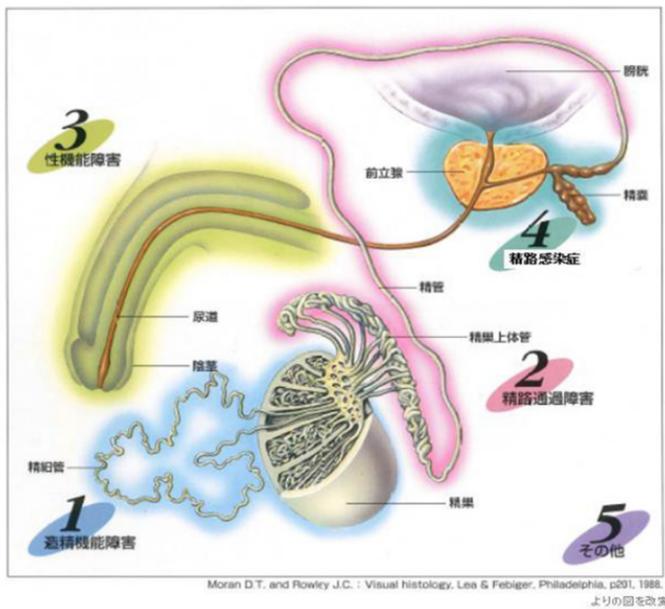


図 2 不妊の原因（日本産科婦人科学会ホームページより引用）
女性因子、男性因子、原因不明に大別される。

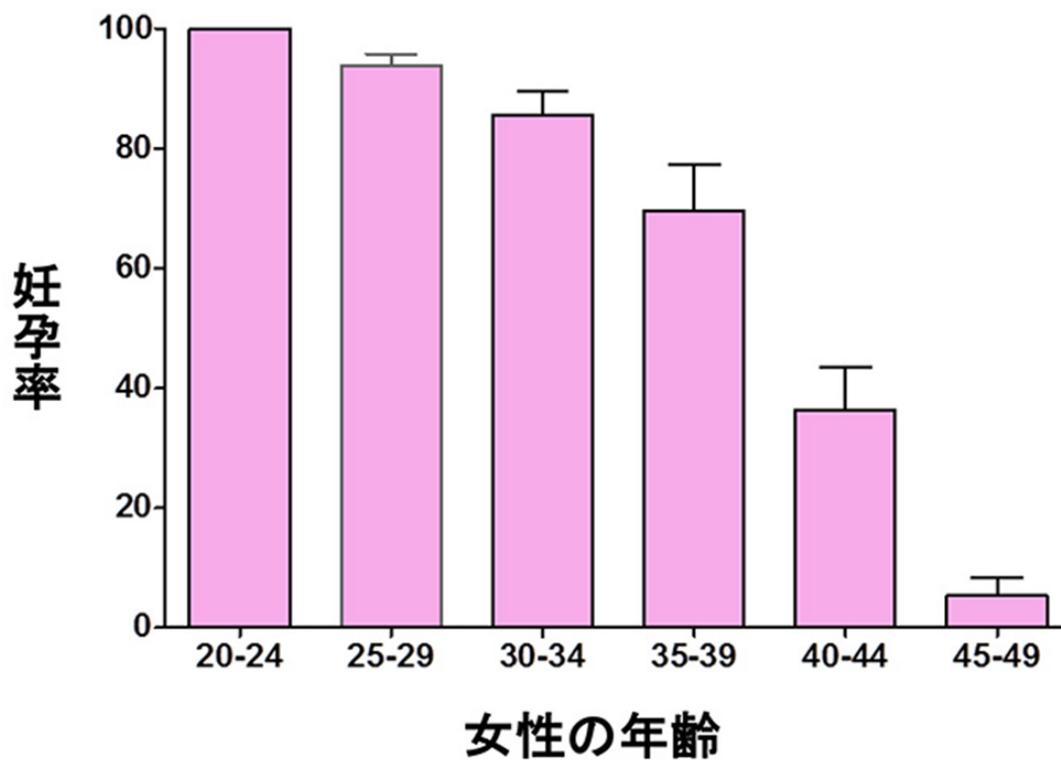
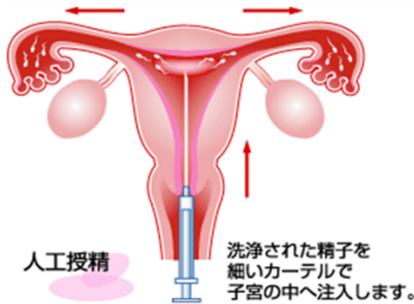


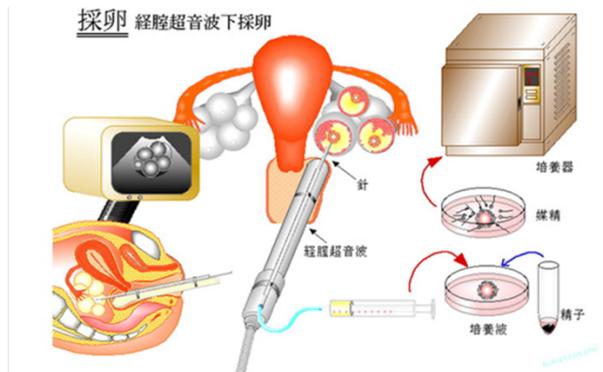
図 3 女性の年齢による妊孕力の変化（自然妊娠）

妊孕率は、女性 1,000 人あたりの出生数（17～20 世紀のアメリカ、ヨーロッパ、イランなど 10 ヶ所のデータ：Henry, L. (1961). Some data on natural fertility. *Eugenics Quarterly*, 8(2), 81-91.）を元に、20～24 歳を 100%として計算した。年齢の増加に伴い（特に 35 歳以降）妊孕率の低下が認められる。データは平均±標準偏差で示した。

<人工授精>



<体外受精（採卵&胚移植）>



胚移植 ET (Embryo Transfer)

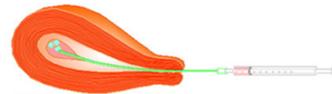


図 4 人工授精と体外受精の概要 (<http://www.ivf.co.jp/>より引用)

人工授精は洗浄精子をカテーテルで直接子宮内に注入する。体外受精は卵巣に育った卵胞を穿刺針で体外から穿刺回収し、採取した精子と受精させて培養した胚を子宮内に胚移植する。いずれの手順も卵胞を育てるために服薬や注射による排卵誘発を行うことが多い。

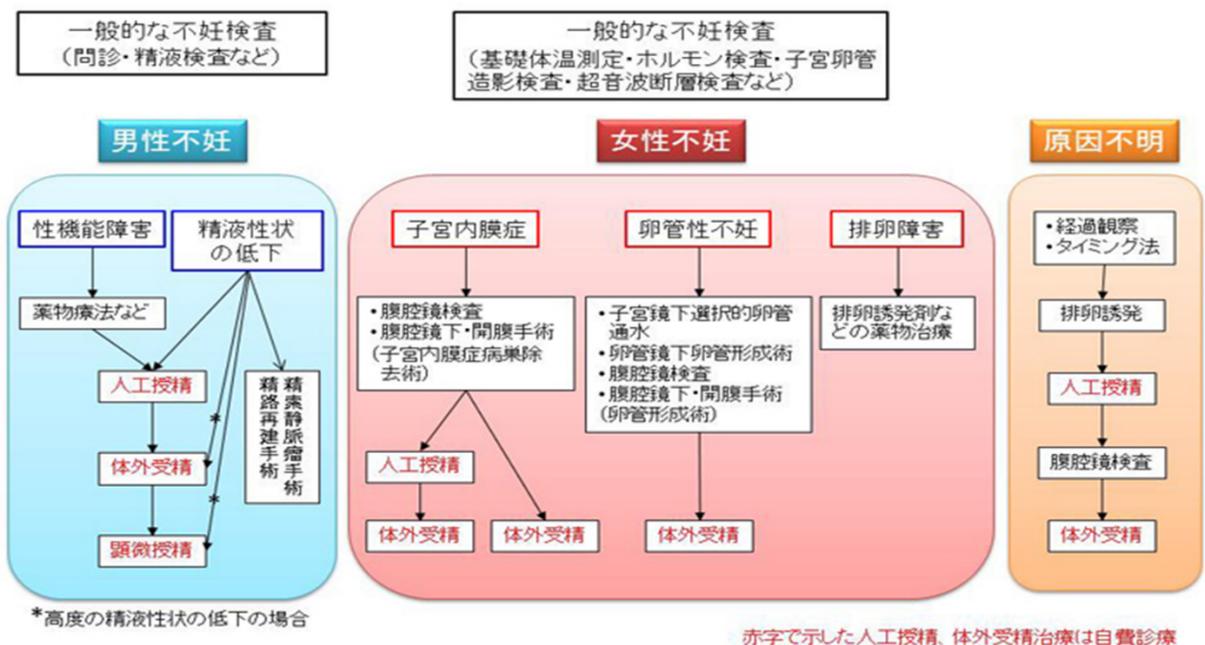


図 5-1 不妊治療の流れ (日本産科婦人科学会ホームページより引用)

治療	月経周期ごとの通院日数の目安	
	女性	男性
一般不妊治療	診察時間 1回 30分程度の通院: 4日~7日 人工授精を行う場合、上記に加え、 診察時間が1回2時間程度の通院: 1日~	0~半日 ※手術を伴う場合には1日必要
生殖補助医療	診察時間 1回1~2時間程度の通院: 4~10日 + 診察時間 1回あたり半日~1日程度の通院: 2日	0~1日 ※手術を伴う場合には1日必要

図 5-2 不妊治療における月経周期ごとの通院日数の目安 (厚生労働省ホームページより引用)

不妊検査の結果で原因を大別し治療を進める。一般不妊治療と呼ばれるタイミング法、人工授精を経て、高度不妊治療と呼ばれる体外受精と段階を踏んでステップアップしていくことが一般的である。これに伴い、服薬や注射の増加、通院日数の増加、侵襲の高い治療となっていくため、患者にとって負担が大きくなっていく。

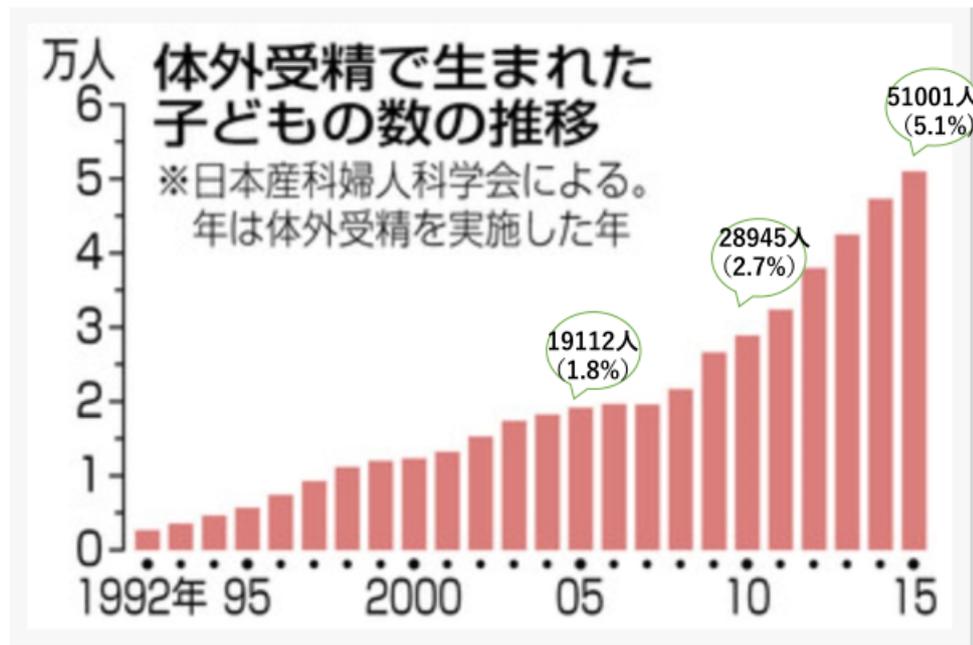


図 6 体外受精での出生児数と全出生児に占める割合（日本産科婦人科学会ホームページを改変）

体外受精での出生は年々増加しており、2015年には約20人に1人にあたる5.1%が体外受精で出生している。

Nrf2/Keap1 Theory

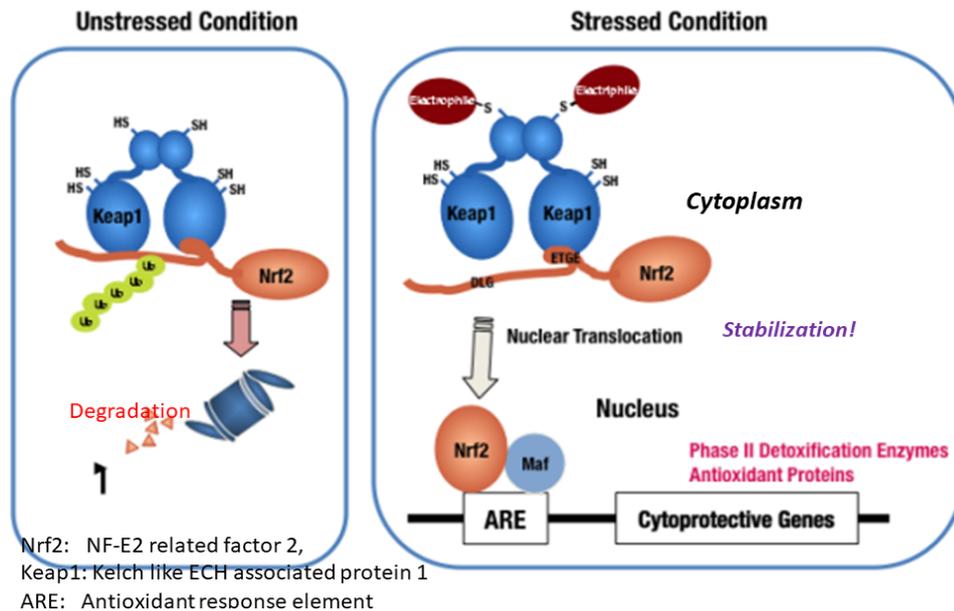


図 7 Nrf2/Keap1 経路の概要

定常状態において、転写因子 Nrf2 は Keap1 により細胞質に留められ、核移行が阻害されることで遺伝子発現が抑制されている。細胞が酸化ストレスにさらされると、Keap1 は酸化修飾され Nrf2 との結合が減弱し、Nrf2 は核内へ移行する。核内へ移行した Nrf2 は遺伝子上流にある抗酸化応答配列 ARE に結合し、下流遺伝子の発現を誘導する。下流遺伝子には抗酸化酵素である Catalase や superoxide dismutase 1 (SOD1)、解毒代謝酵素などが含まれる。

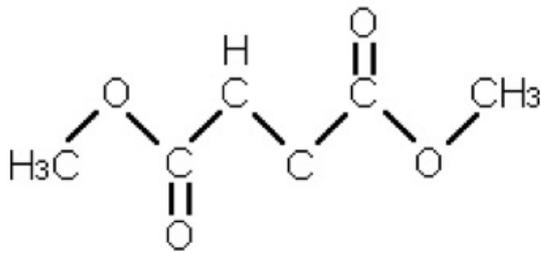


図 8 Nrf2 活性化剤 Dimethylfumarate (DMF) の分子構造と、多発性硬化症に対する経口 DMF 薬である Tecfidera®カプセル(Biogen 社ホームページより引用)
DMF は乾癬の治療薬として 50 年以上使用されていた。多発性硬化症 (MS) 治療薬として 2013 年～米国などで臨床応用開始。本邦では 2017 年 2 月より販売開始 (Tecfidera®)。
DMF が Keap1 と結合することにより Nrf2 の核内移行が亢進し、OS が減弱する。

ROS, Antioxidants and OS

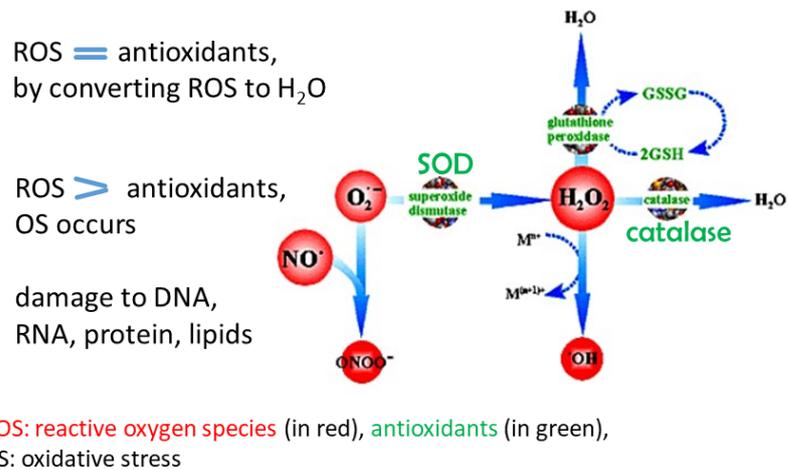


図 9 酸化ストレスは ROS と抗酸化物質の均衡が崩れると発生する (Squier TC, Bigelow DJ. Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis. Front Biosci. 2000 May 1;5:D504-26. より引用)

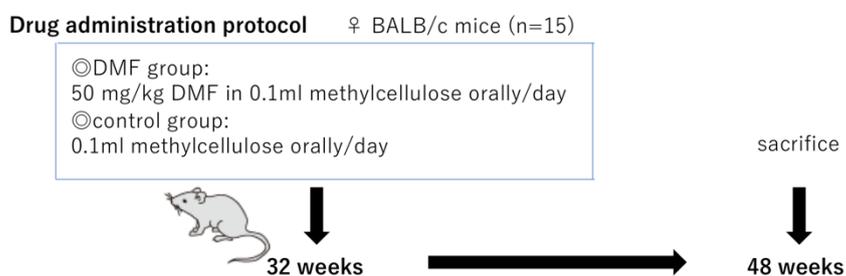


図 10 マウスと薬剤投与

20 週齢の BALB/c 雌マウスを 32 週まで飼育し、DMF 群と Control 群（各 15 匹）の 2 群に分け、DMF 群には 0.1%メチルセルロースに懸濁混和した 50 mg/kg の DMF を 0.1ml、Control 群には 0.1%メチルセルロースを 0.1ml、それぞれ 32 週から 48 週まで 16 週間連日経口投与した。

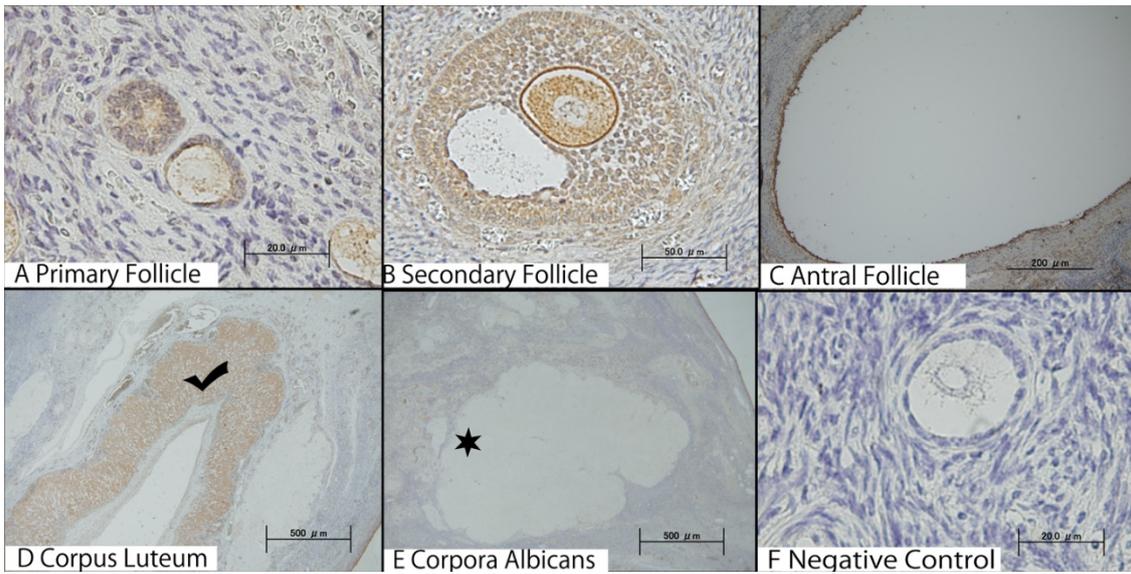


図 11-1 ヒト卵巣における Nrf2 タンパクの発現

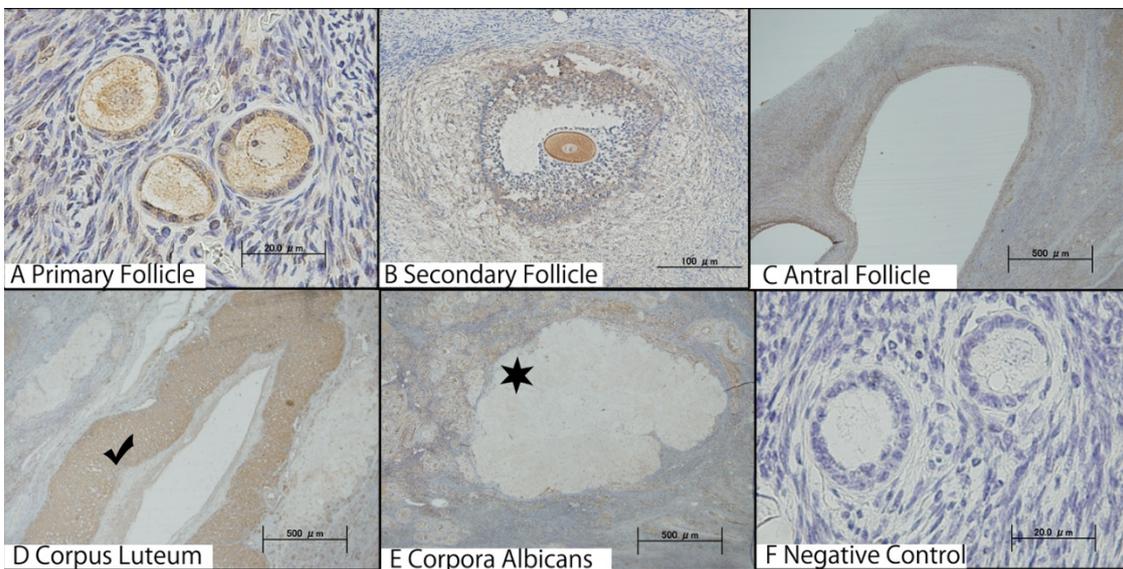
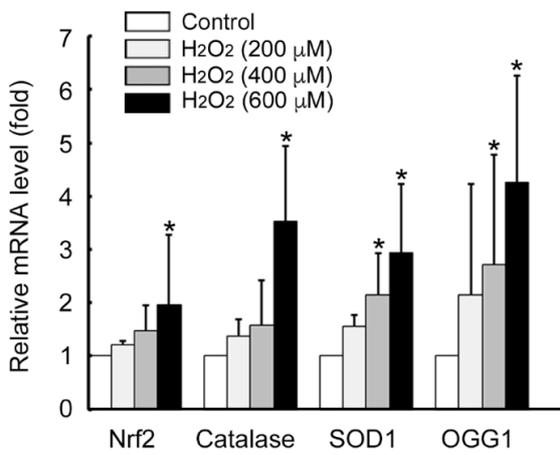


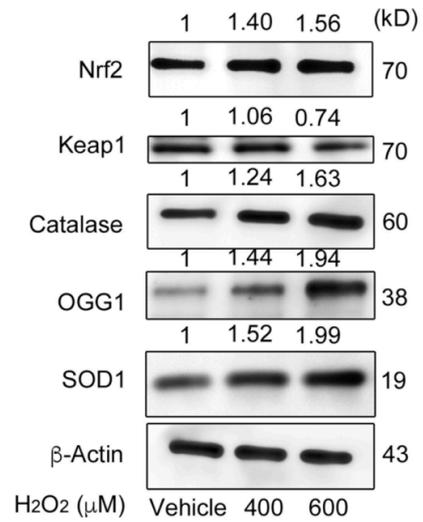
図 11-2 ヒト卵巣における Keap1 タンパクの発現

組織免疫染色法を用いてヒト卵巣における Nrf2 及び Keap1 タンパクの発現を検討した。様々な発育段階の卵胞を抗-Nrf2 抗体と抗-Keap1 抗体で染色した。

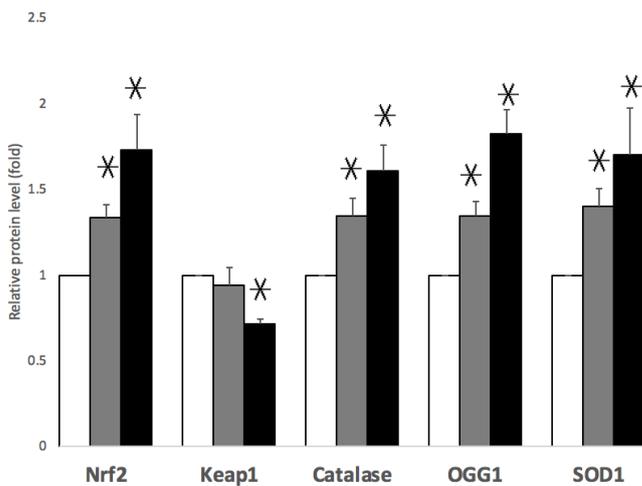
✓は黄体、★は白体を図示



定量的 RT-PCR 法



Western blotting



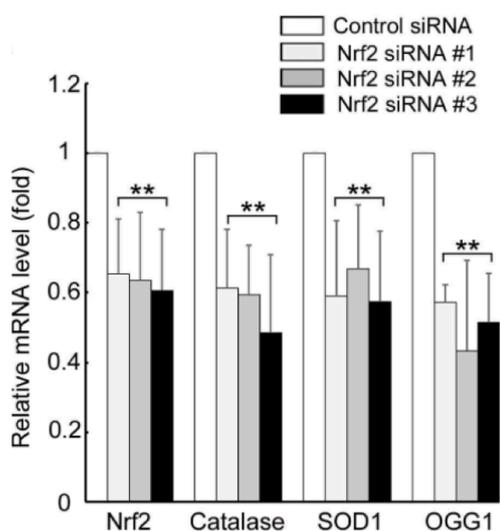
Western blotting 定量

図 12 酸化ストレス刺激はヒト顆粒膜細胞において Nrf2 及び抗酸化物質の発現を上昇させる

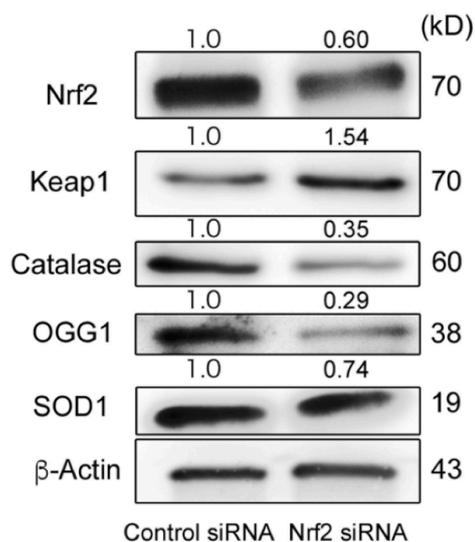
培養 GC 細胞に過酸化水素を添加して酸化ストレス刺激を与え、定量的 RT-PCR 法または Western blotting に供した。

定量的 RT-PCR 法、Western blotting とともに n=3、* p < 0.05 vs control

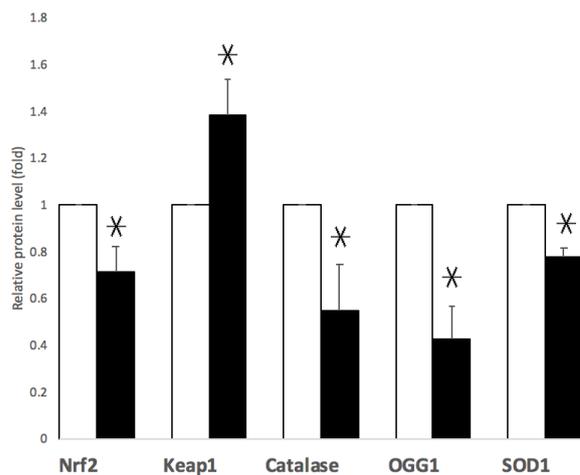
Western Blotting の各タンパクの発現量は β-actin を loading control として補正した。



定量的 RT-PCR 法



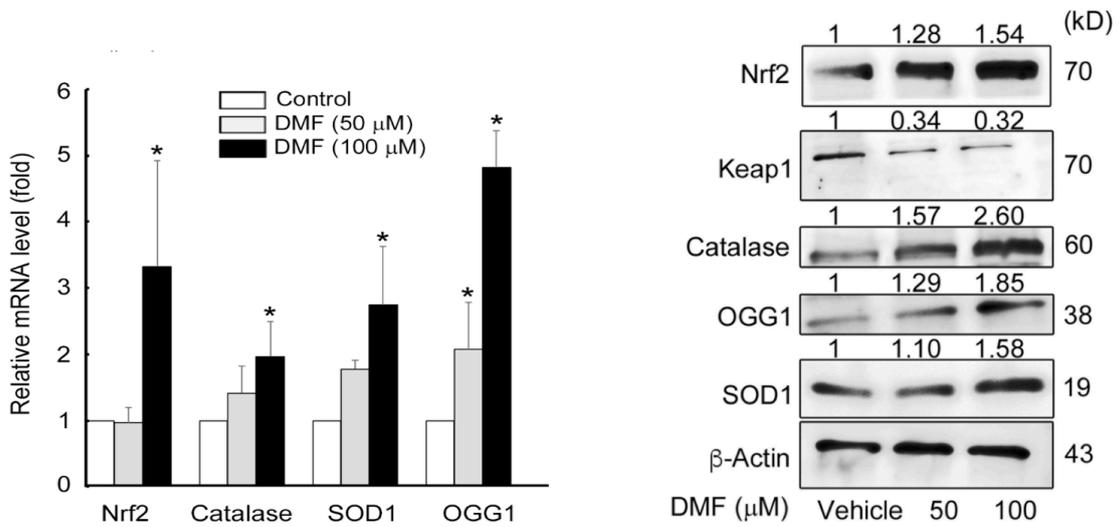
Western blotting



Western blotting 定量

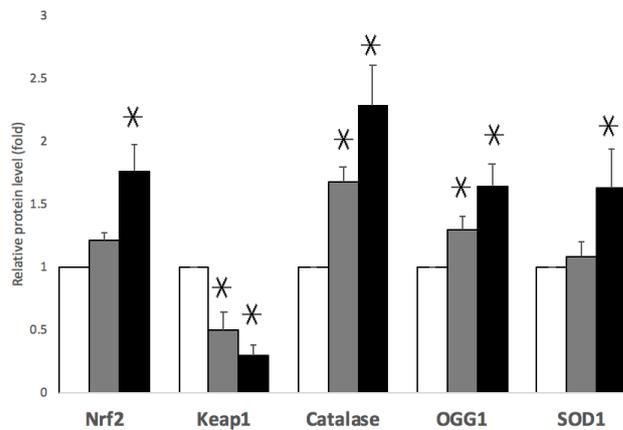
図 13 内因性 Nrf2 のノックダウンはヒト顆粒膜細胞での抗酸化物質の発現を低下させる

SiRNA を用いてヒト培養 GC の内因性 Nrf2 をノックダウンし、定量的 RT-PCR 法または Western blotting により Nrf2、及び抗酸化物質の発現量を検討した。定量的 RT-PCR 法、Western blotting とともに n=3、* p < 0.05 vs control Western Blotting の各タンパクの発現量は β-actin を loading control として補正した。



定量的 RT-PCR 法

Western blotting



Western blotting 定量

図 14 Nrf2 活性化剤 DMF によるヒト顆粒膜細胞刺激は抗酸化物質の発現を上昇させる

ヒト培養 GC に DMF (50 μ M、100 μ M) を添加し、定量的 RT-PCR 法または Western blotting により Nrf2、及び抗酸化物質の発現量を検討した。

定量的 RT-PCR 法、Western blotting とともに n=3、* p < 0.05 vs control
Western Blotting の各タンパクの発現量は β -actin を loading control として補正した。

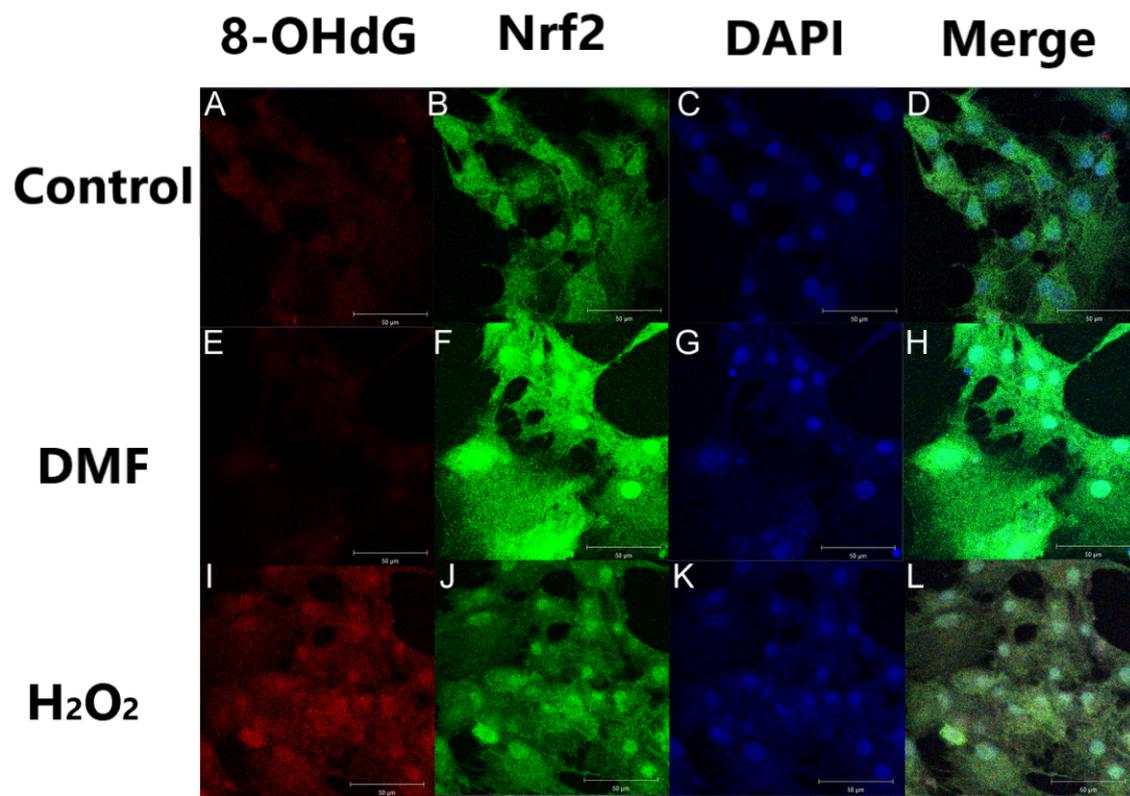


図 15 ヒト顆粒膜細胞における Nrf2 の活性化は 8-OHdG 産生を低下させる
 ヒト培養 GC をそれぞれ 100 μM の DMF (図 E~H) または 400 μM の過酸化水素
 (図 I~L) で刺激し、抗-Nrf2 抗体または抗-8-OHdG 抗体で反応させ、蛍光免疫
 染色法で検討を行った。

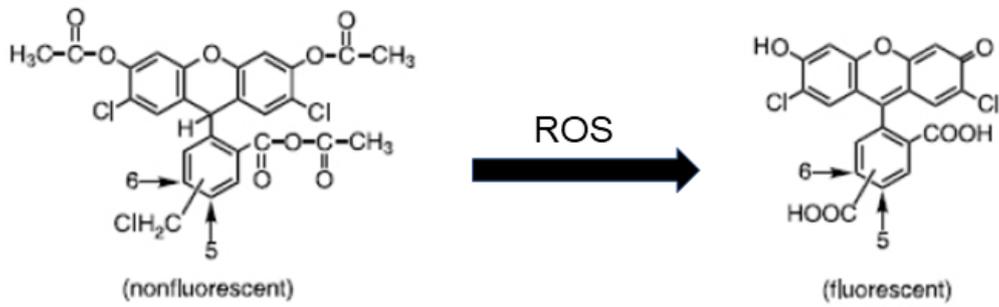


図 16 細胞内 ROS の測定

無蛍光の CM-H2DCFDA プローブ は ROS により素早く酸化されることで、強く蛍光発色し、2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) に変化するため、その蛍光強度を定量することにより細胞内の ROS 産生量を計測できる。

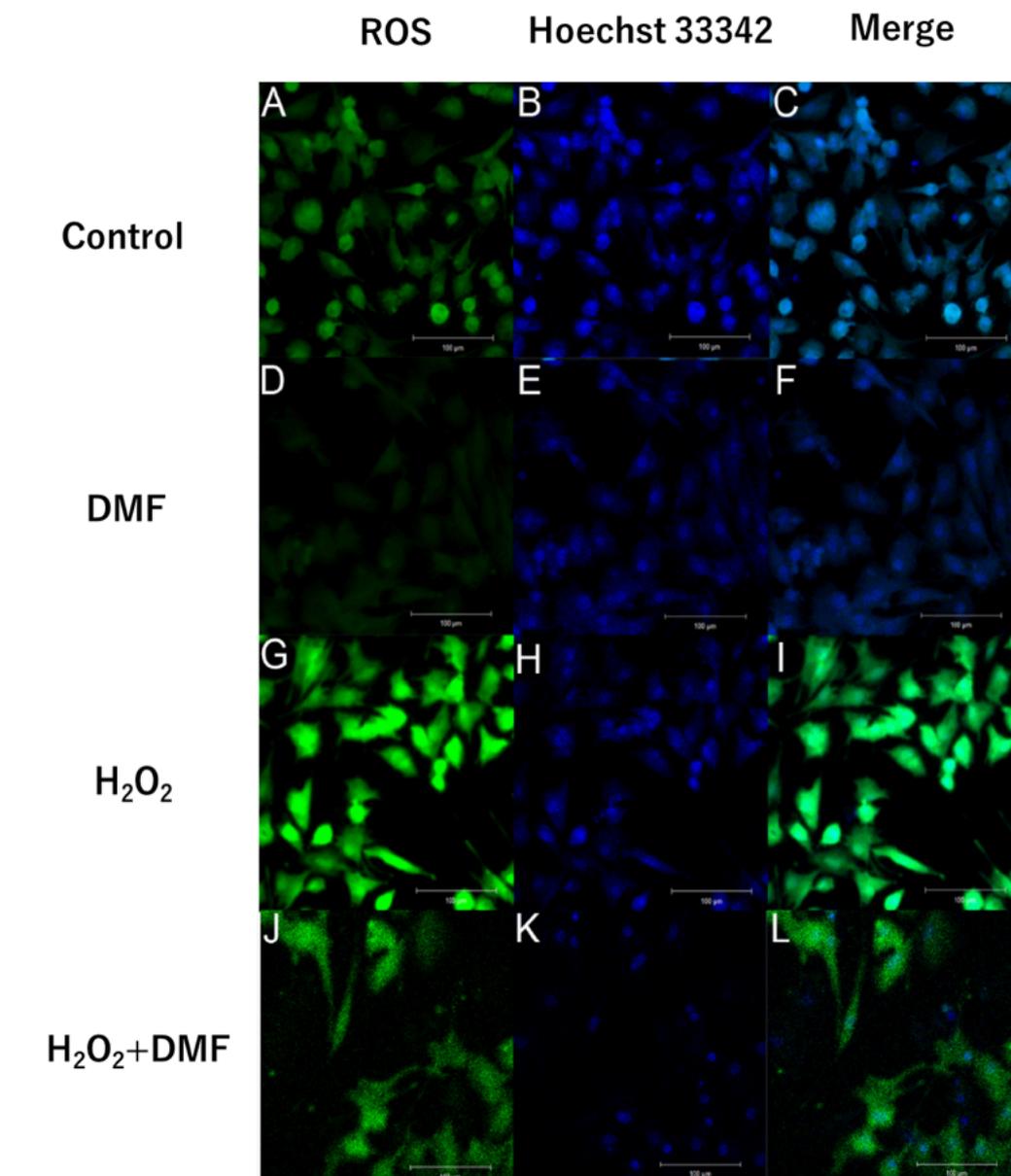


図 17-1 ヒト顆粒膜細胞における Nrf2 の活性化は ROS 産生を低下させる
GC 内 ROS を CM-H2DCFDA 染色を用いて計測した。GC は 100 μ M の DMF (E~H)、
400 μ M の過酸化水素 (G~I)、100 μ M の DMF + 400 μ M の過酸化水素 (J~L)、
または培養液のみ (A~C) で刺激をし、CM-H2DCFDA を含んだ PBS で蛍光染色し
た。

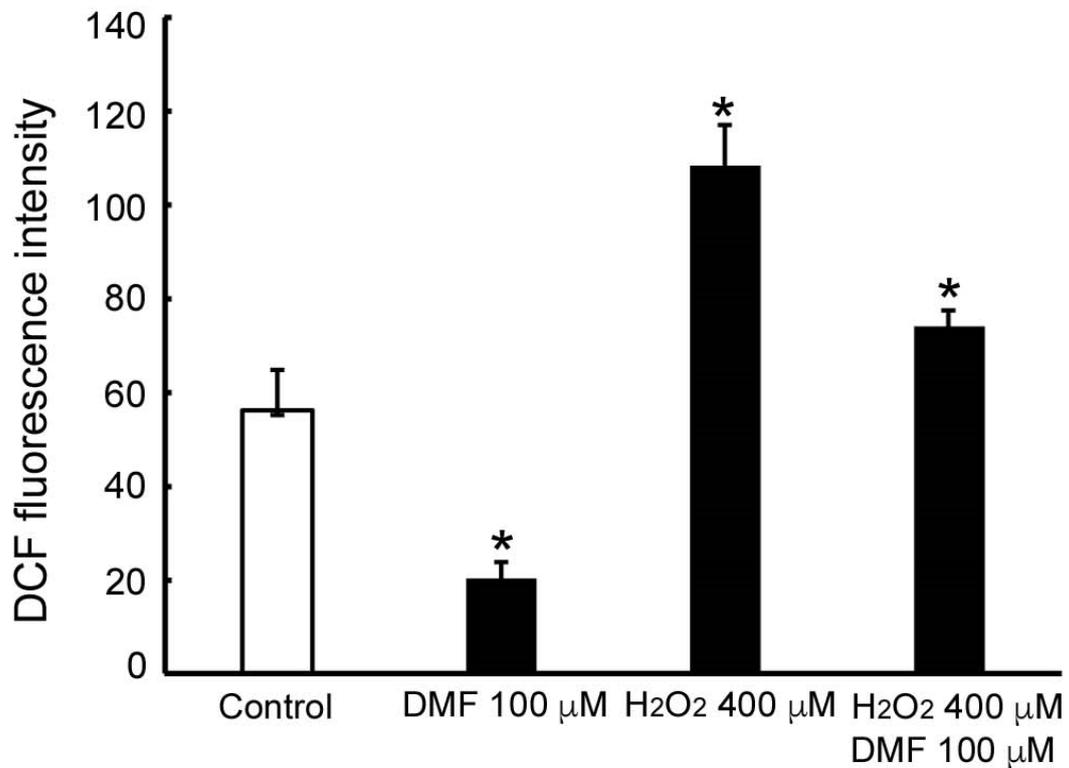


図 17-2 ヒト顆粒膜細胞における Nrf2 の活性化は ROS 産生を低下させる
 ヒト GC の細胞内 ROS を CM-H2DCFDA 染色を用いて計測した。GC は刺激をした後に、10 μ M の CM-H2DCFDA を含んだ PBS に 37 °C で 20 分間インキュベートし、Hoechst 33342 対比染色を行い、ただちに共焦点顕微鏡で観察し、蛍光強度は LSM700 ZEN を用いて計測した。

各群 n=150、* p < 0.05 vs control

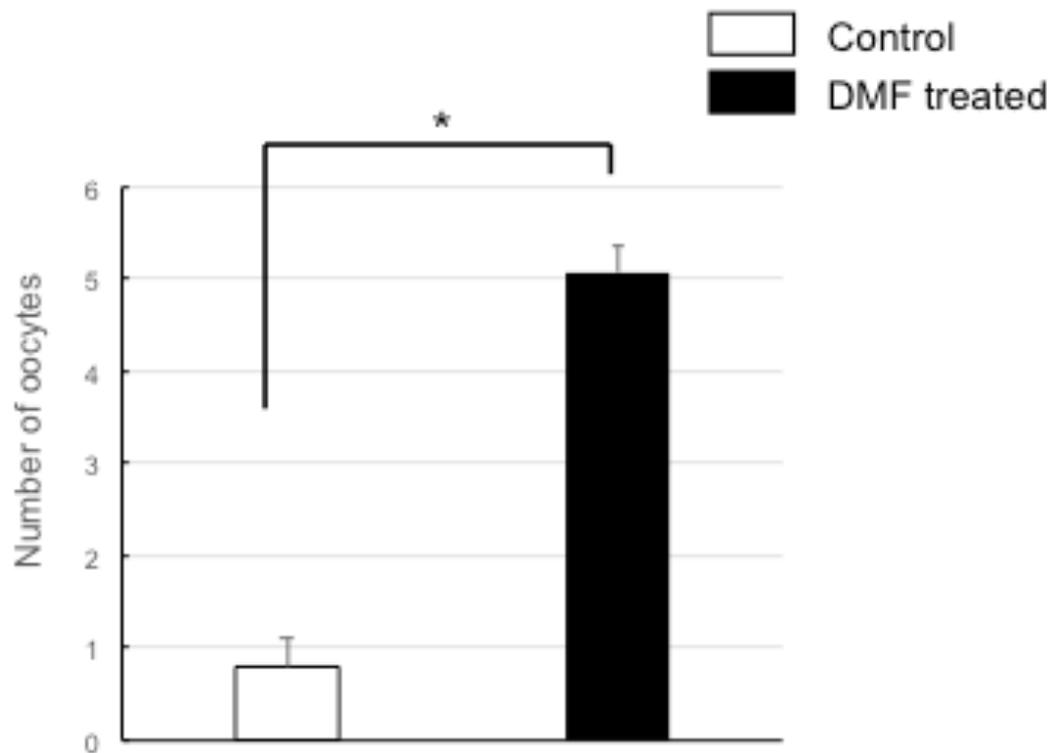


図 18 マウスへの DMF 投与は排卵数を増加させた

マウスの腹腔内に PMSG 及び hCG を投与して排卵誘発を行い、両側卵管と卵巣を切除して採取し、卵管膨大部を確認して実体顕微鏡下で卵子卵丘細胞複合体を採取して排卵数を確認した。

各群 n=15、* $p < 0.05$ vs control

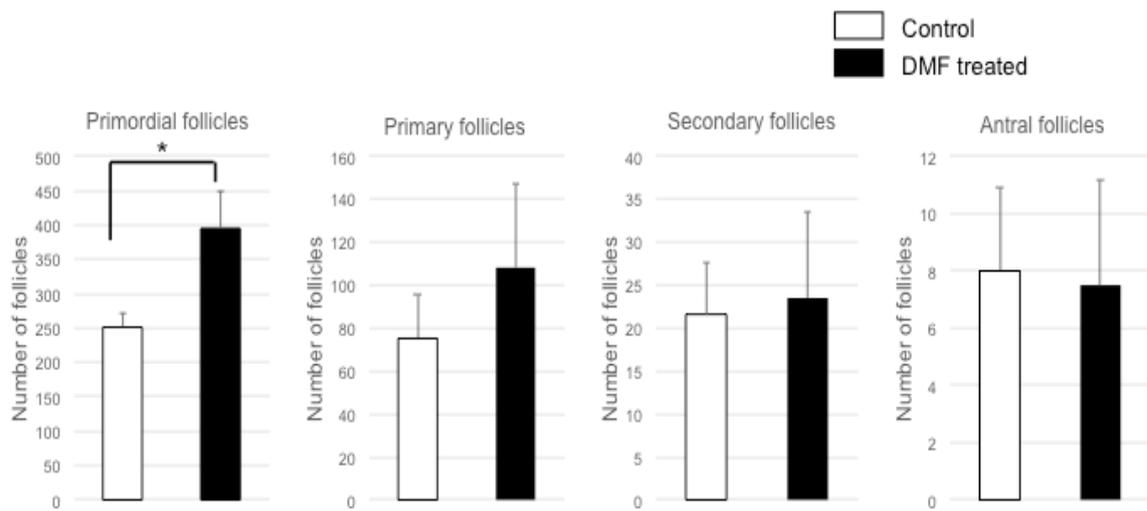


図 19 マウスへの DMF 投与は貯蔵原始卵胞数を増加させた
 マウス卵巣組織の HE 染色で DMF 群と Control 群の原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の数を光学顕微鏡下でそれぞれ計測した。
 各群 n=15、* p < 0.05 vs control

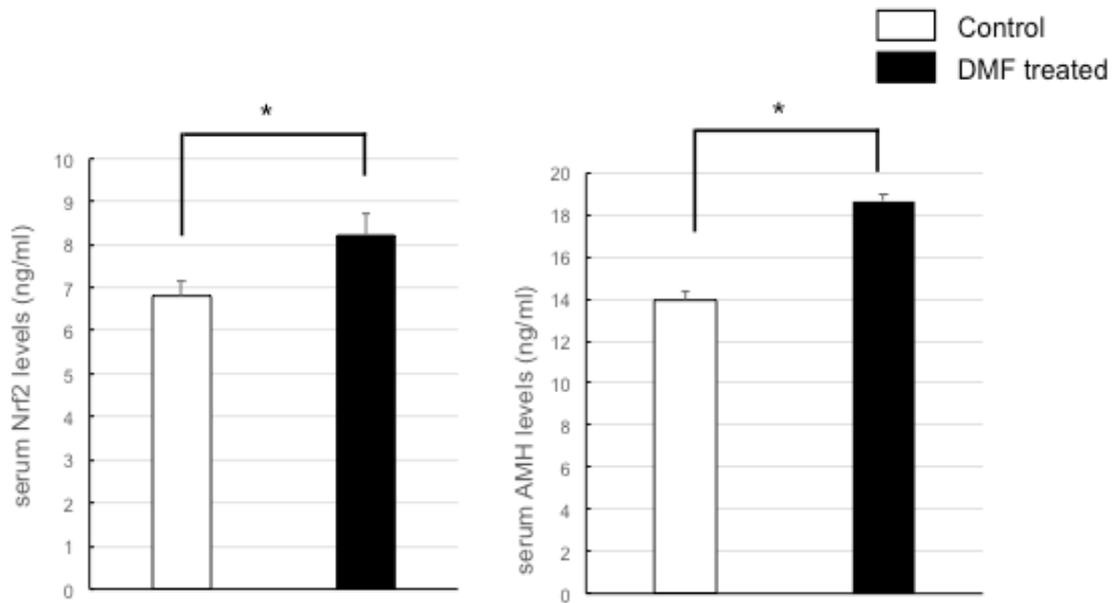
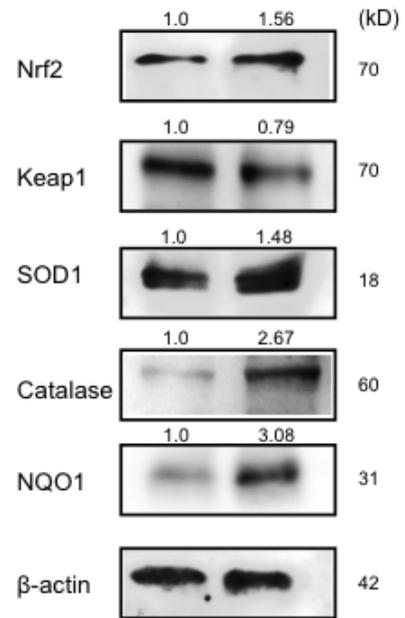
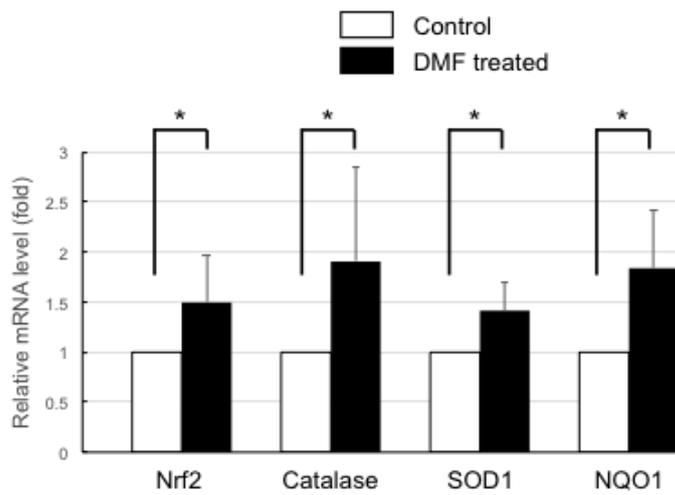
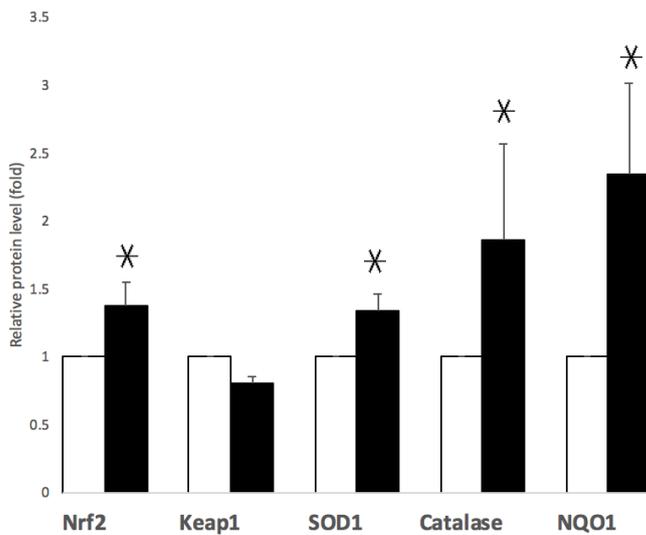


図 20 DMF 投与で血清中 Nrf2 と AMH 濃度は上昇した
 マウスの解剖時に心臓採血を施行し、ELISA 法にて AMH と Nrf2 の濃度を測定した。
 各群 n=15、* p < 0.05 vs control



定量的 RT-PCR 法

Western blotting



Western blotting 定量

図 21 DMF 投与により Nrf2 は活性化し、抗酸化物質の産生は上昇した
 DMF 投与の影響を検討するため、Nrf2 およびその標的遺伝子である NQO1、抗酸化物質である Catalase と SOD1 の mRNA とタンパク発現量を測定した。
 RT-PCR 法 n=15、Western blotting n=3、* p < 0.05 vs control
 Western Blotting の各タンパクの発現量は β-actin を loading control として補正した。

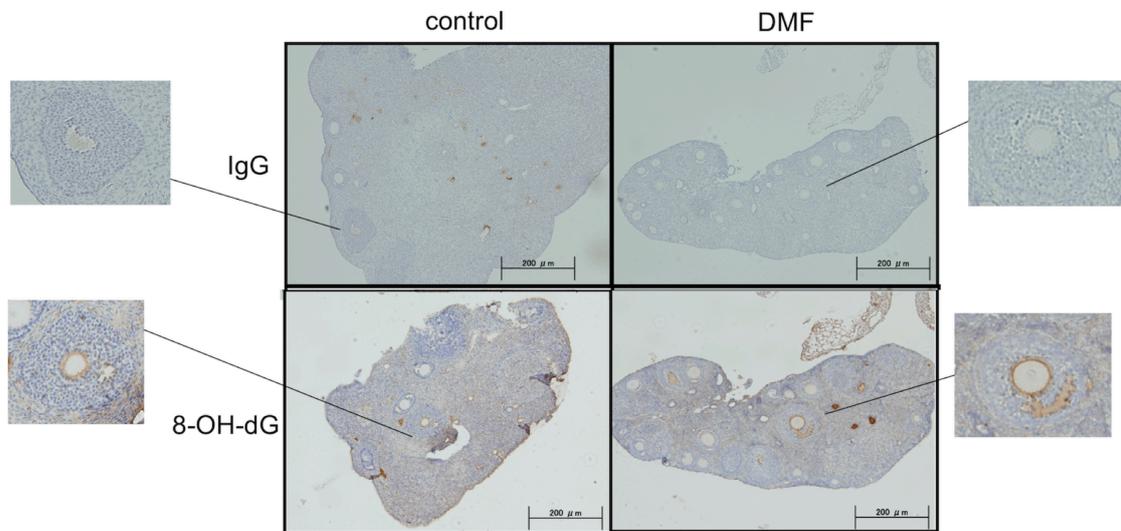


図 22-1 DMF 投与は卵巣組織での酸化ストレスを軽減した
 DMF 投与がマウス卵巣組織に及ぼす影響を検討するために、免疫染色で 8-OHdG のタンパク発現量を検討した。

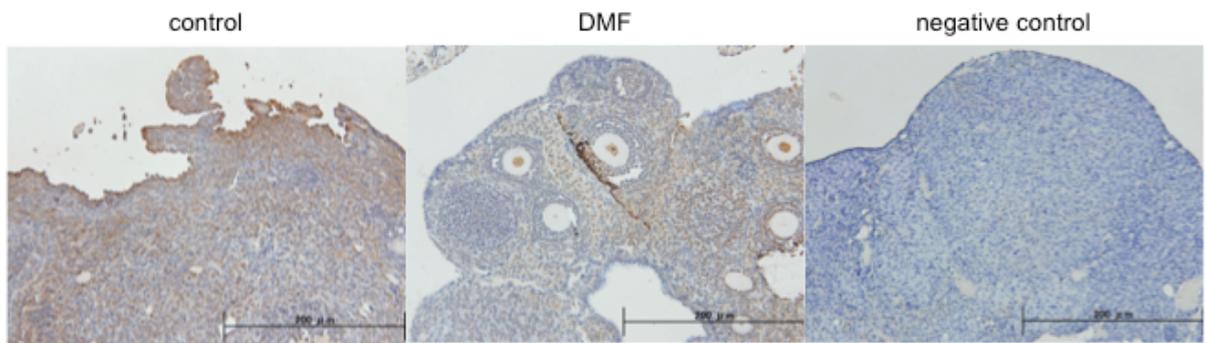
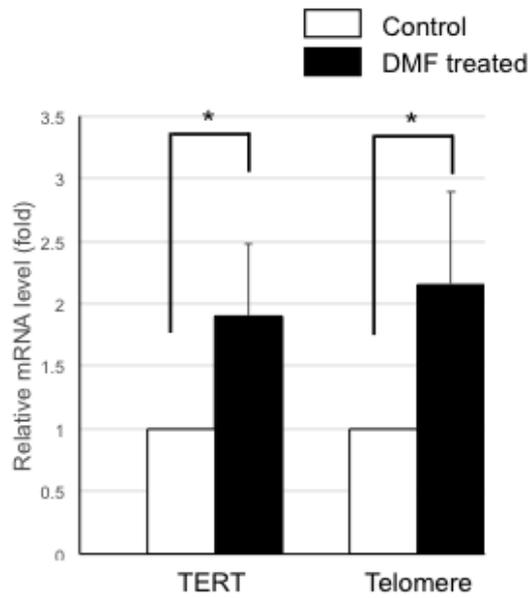
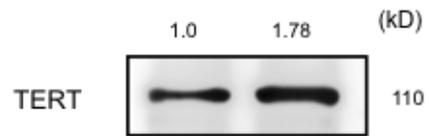


図 22-2 DMF 投与は卵巣組織での TUNEL 陽性細胞を軽減した (TUNEL 染色)
マウス卵巣組織に対して、アポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を TUNEL 染色法により検出した。



定量的 RT-PCR 法



Western blotting

図 23 Telomere と TERT 発現量は DMF 投与で上昇した
 マウス卵巣において、Telomere と TERT の mRNA 発現量、および TERT のタンパク
 発現量を測定した。
 各群 n=15、* $p < 0.05$ vs control