

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 秋野 なな

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おり、今後さらに晩婚化、少子化、出生年時齢の上昇は進行すると考えられ、これに伴い不妊に悩むカップルは増加している。

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、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。卵巣の加齢の大きな原因となる酸化ストレスを減じることで、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、重要な抗酸化経路である Nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) / Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-antioxidant response element (ARE)に着目した。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、発癌や糖尿病、神経疾患との関連も近年わかってきた。

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、酸化ストレスのレベルを適切にマネー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以下の方法で検討した。

1. ヒト黄体化顆粒膜細胞

体外受精の採卵時に回収した卵胞液からヒト黄体化顆粒膜細胞 (GC) を単離培養し、過酸化水素または Nrf2/Keap1 経路を活性化させる試薬 Dimethylfumarate (DMF)により刺激した。また Nrf2 特異的 siRNA を用いて内在性 Nrf2 をノックダウンした。その後、定量的 RT-PCR 法または Western blotting に供した。

2. ヒト卵巣組織免疫染色法

免疫組織化学染色用として、子宮頸癌もしくは子宮内膜癌のため摘出された、病理学的に正常なヒト卵巣組織切片を用いた。パラフィン切片を作成し、一次抗体として抗-Nrf2 抗体と抗-Keap1 抗体を用いて染色した。

3. マウス採卵、卵巣、血清採取

20 週齢の BALB/c 雌マウスを 32 週まで飼育し、DMF 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 20 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後に排卵誘発を行い、採卵、両側卵巣摘出と心臓採血を施行した。

4. マウス卵巣組織免疫染色と TUNEL 染色

3. で摘出した卵巣組織をパラフィン包埋し、組織免疫染色を行った。HE 染色連続標本を用い

て卵胞数を計測し、残りの切片を用いて一次抗体として抗-Nrf2 抗体と抗-Human 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG)抗体を用いて染色した。またアポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を TUNEL 染色により検出した。

5. RNA 抽出及び定量的 PCR

1. で得られた GC、及び 3. で摘出したマウス卵巣から RNA を抽出し、定量的 PCR を行った。ヒト Nrf2、ヒト Catalase、ヒト SOD1、ヒト 8-oxoguanine DNA-glycosylase 1 (OGG1)、マウス Nrf2、マウス Catalase、マウス SOD1、マウス NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) の発現を評価した。

6. Western blotting

1. で得られた GC、及び 3. で摘出したマウス卵巣からタンパクを抽出し、一次抗体として抗-Nrf2、抗-Keap1、抗-Catalase、抗-SOD1、抗-OGG1、抗-NQO1、と抗-telomerase reverse transcriptase (TERT) を用いて各タンパク量を検出した。

7. 細胞蛍光免疫染色法と細胞内 ROS の計測

1. で得られた GC に対して、抗-Nrf2 抗体、抗-8-OHdG 抗体で反応させ、蛍光標識二次抗体で染色し共焦点顕微鏡で観察した。また、細胞内 ROS を fluoroprobe carboxymethyl-H2-dichlorofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA; Invitrogen) 染色を用いて、共焦点顕微鏡で観察し蛍光強度を計測した。

8. ELISA 法

ELISA 法を用いて、3. で得られたマウス血清の抗ミュラー管ホルモン (anti-mullerian hormone ; AMH) と Nrf2 の濃度を測定した。

9. 統計学的解析

統計学的解析は JMP Pro 11 software 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。

上記の方法により下記の結果を得られた。

1. ヒト卵巣における Nrf2 及び Keap1 タンパクの発現

組織免疫染色法を用いて様々な発育段階の卵胞を抗-Nrf2 抗体と抗-Keap1 抗体で染色した結果、各発育段階の卵胞において GC 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 μm 、400 μm 、600 μm) をそれぞれ培養液に添加して培養刺激し、定量的 RT-PCR 法または Western blotting に供した。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 μm の過酸化水素刺激では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。

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、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結果、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 のタンパク発現量を低下させ、Keap1 タンパクは発現量が上昇した。

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

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 タンパクの発現量は低下した。

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

GC をそれぞれ DMF または過酸化水素で刺激し、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結果、DMF 刺激を与えた GC は Nrf2 の蛍光強度が上昇し、8-OHdG の蛍光強度は低下し、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ことから、DMF による Nrf2 の活性化は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結果、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。

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

マウスへの DMF 投与は、DMF 群に対して Control 群 で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結果、一次卵胞、二次卵胞、胞状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。

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、ELISA 法で血清中の Nrf2 と AMH の濃度は有意な上昇を認めた。

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

マウスへの DMF 投与により mRNA 発現量は Nrf2、Catalase、SOD1、NQO1 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それぞれ上昇がみられた。Keap1 のタンパク発現量は反対に低下した。

9. DMF 投与は卵巣組織での酸化ストレスを軽減した

卵巣組織免疫染色で Nrf2 と、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG のタンパク発現量を検討した結果、DMF 投与により Nrf2 は発現の上昇を認め、反対に 8-OHdG は発現が減少した。また TUNEL 染色では、DMF 投与により TUNEL 陽性細胞は減少した。

10. Telomere と TERT 活性は DMF 投与で上昇した

DMF 投与による Telomere と TERT の mRNA 発現量の変化を測定した結果、Telomere、TERT 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。

以上より下記のように考察された。

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。

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。現在、多発性硬化症の治療で DMF 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。