

博士論文

抗がん剤による早発卵巢機能不全における
細胞老化の役割

徐 子焮

Xu Zixin

目次

1. 目次
2. 要旨
3. 序文
4. 方法
5. 結果
6. 考察
7. 結論
8. 謝辞
9. 引用文献
10. 略語

要旨

本研究では、シクロホスファミド (cyclophosphamide, Cy) による早発卵巣機能不全 (Premature Ovarian Insufficiency, POI) において細胞老化現象が起きているか、さらに老化細胞除去薬である DQ (Dasatinib and Quercetin) で POI を改善できるかを検討した。Cy で刺激したヒト顆粒膜細胞 (human granulosa-lutein cells, hGCs) と Cy 誘発性 POI マウスから採取した卵巣では細胞老化が誘導されており、DQ の先行投与により、Cy により上昇した細胞老化マーカーの発現が減少した。Cy 投与した POI マウスでは妊孕能の低下を認め、DQ の投与により改善した。本研究では、Cy 投与による卵巣毒性では、卵巣顆粒膜細胞において細胞老化が惹起され、病態形成に寄与することが初めて示された。DQ は、Cy による卵巣毒性に対する有望な治療法となりうる。

序文

不妊とは、1年間性生活をしているにも関わらず、妊娠を望む健康な男女が避妊をせず、妊娠しないものをいう。女性側の不妊原因は排卵因子、卵管因子、頸管因子、免疫因子、及び子宮因子である。中でも、排卵因子は不妊症で重要な割合を占めている。

卵子は、無限に分裂・分化されうる精子と異なり、出生後に新たに作られることはなく、持って生まれた原始卵胞の貯蓄プールから消費をされ閉経まで供給される。ヒトの場合では、胎生5週ごろに未分化性腺を形成し、胎生20週ごろには700万の卵原細胞が形成され[1]、胎生8ヶ月でほぼ全ての生殖細胞が一次卵母細胞となり休止状態に入る。これらの原始卵胞はいったん停止状態となるが、思春期以降、卵巢局所因子やゴナドトロピンの制御のもと、活性化されて卵胞発育過程へとリクルートされるが、多くの卵胞はその初期過程で閉鎖卵胞となる。出生時には貯蓄された卵子は300万個まで減少し、性成熟期までには更に20万個まで減少する。卵子の発育には、卵胞を構成する体細胞が必須である。特に顆粒膜細胞は、卵子と直接的間接的に相互作用することより、卵子の発育、成熟を制御することが知られており、良好な卵子の獲得のために顆粒膜細胞の役割は極めて重要である。図1にヒトの卵胞の発育過程を示す。最も未熟な卵子は扁平な上皮様細胞（前顆粒膜細胞）に囲まれ原始卵胞として存在している。様々な卵巢局所因子の作用により原始卵胞の発育が開始し、扁平だった前顆粒膜細胞は立方体的な顆粒膜細胞へと変化して、さらに基底膜が発達して一次卵胞が形成される。この原始卵胞からのリクルートメントにおいては、全ての原始卵胞が一気にリクルートをされるわけではなく、時間的、空間的に非常に巧妙に

制御されている。先に発育過程に入った前胞状卵胞から原始卵胞の発育を抑制する AMH (anti-Müllerian hormone) が分泌され、多くの卵胞は原始卵胞のステージに止まっている。顆粒膜細胞は重層化し、基底膜の外側に莢膜細胞が形成され二次卵胞となる。その後、顆粒膜細胞はさらに重層化していき、前胞状卵胞、さらに卵胞腔が形成され胞状卵胞へと進展する。そして、卵巢局所因子、ゴナドトロピンの作用により成熟卵胞が形成され、排卵される。卵胞発育中、各ステージの卵胞が閉鎖していき、人間の場合は、一周期でただ一つの卵子を排卵する。

卵巢予備能とは、「ある時点で卵巢に残っている卵母細胞の数、または卵母細胞の質」と定義される[2]。卵巢予備能、特に卵母細胞の数は出生してから閉経まで一貫して低下していく (図 2)。1 個の排卵のために、リクルートされる原始卵胞の数は年齢により異なると考えられている[3]。年齢の増加とともに原始卵胞数が減少し、卵巢予備能が低下していく。年齢以外に遺伝子と環境因子は卵巢予備能の低下速度に影響する因子として考えられる。例えば、ターナー症候群の患者は出生時にすでに卵巢予備能が低下していることが示されている。一方で、喫煙、栄養状態、卵巢病変また薬剤は卵巢予備能低下に至る原因となる[4-6]。

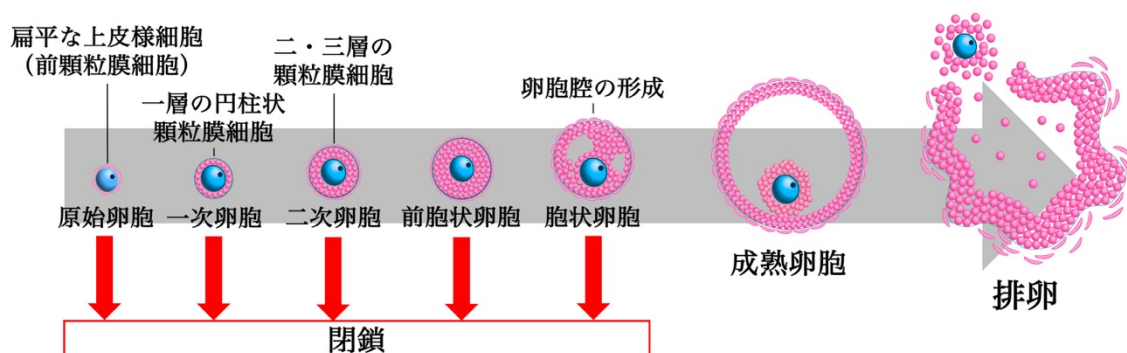


図 1. ヒトの卵胞の発育過程

原始卵胞は休止状態にあり、一次卵母細胞の周りを扁平な上皮細胞つまり前顆

粒膜細胞が取り囲んでいる。やがて扁平だった前顆粒膜細胞は円柱状な形態へ変化し、更に周辺では基底膜が発達して一次卵胞へと成長する。顆粒膜細胞は重層化し、二次卵胞が形成される。その後、ゴナドトロピン依存性に卵胞発育が進行する。卵胞内に卵胞腔が形成され、胞状卵胞となる。AMH は前胞状卵胞と初期胞状卵胞の顆粒膜細胞から産生されると考えられている。卵胞発育中、各ステージの卵胞が閉鎖していきつつ、最後に選択された成熟卵胞、すなわち主席卵胞だけが排卵される。

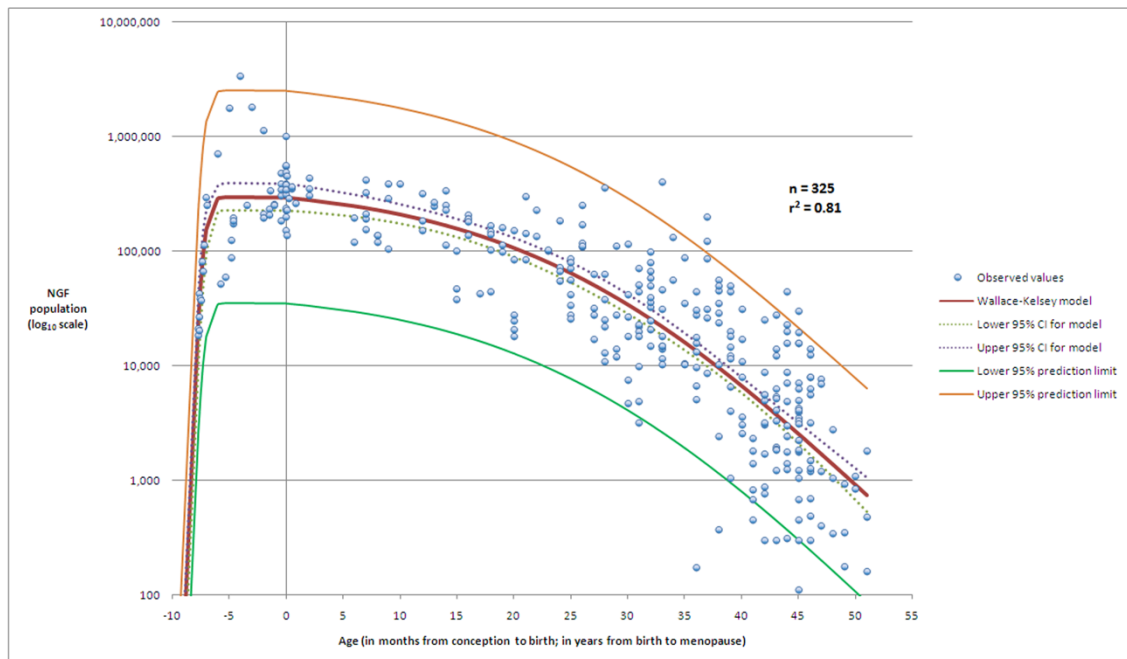


図 2. 組織学的卵巣解析一年齢と原始卵胞数の関連性

(W. H. Wallace and T. W. Kelsey, Human ovarian reserve from conception to the menopause. PLoS One, 5(1): e8772.2010. より)

抗がん剤による卵巣毒性

近年のがん診断技術、治療成績の向上に伴い、小児、思春期、若年成人がん患者の治療成績の向上は著しく、したがって、がん治癒後の人生における生活の質 (Quality of life, QOL) が重視されるようになり、中でも将来妊娠する能力＝妊孕性は非常に重要な部分を占めている。がん治療に使用される化学療法による性腺毒性は、化学療法プロトコルに含まれる抗がん剤の種類、総投与量、用法、ならびに治療時の患者の年齢や卵巣予備能に依存する[7] (図 3)。Cy は、リンパ

腫、白血病、神経芽腫、網膜芽腫、乳がんなど、幅広いがんや自己免疫疾患の治療において広く使用されている抗がん剤の一つである。Cy を含むアルキル化剤は、性腺毒性のリスクが最も高い。実際に、アルキル化剤を使用した治療を受けた女性の 42% が POI に直面したとされている[8]。POI とは、40 歳未満の女性において卵巣の原始卵胞プールが枯渇し、生殖器官及び内分泌器官として正常な機能を喪失する状態である[9]。化学療法による卵巣毒性のメカニズムはまだ十分に解明されていないが、原始卵胞への直接的障害と Burn-out の 2 つの機序があると考えられている (図 4)。「Burn-out」とは原始卵胞のプールの枯渇を指す。抗がん剤により胞状卵胞や前胞状卵胞が傷害されることにより、これらの卵胞からの AMH 等の原始卵胞のリクルートメントを抑制する因子の分泌が低下し、その結果、原始卵胞における PI3K / PTEN / Akt 等の卵胞活性化経路がアップレギュレートされて、多くの原始卵胞がリクルートメントされることによって、結果的に原始卵胞数の減少を招くことを Burn-out と称する[10] (図 4)。マウスに Cy を投与することにより原始卵胞ではなく、胞状卵胞や前胞状卵胞などの大きい卵胞の顆粒膜細胞のみが障害されることによりこれらの卵胞のアポトーシスが引き起こされ、同時に AMH の分泌も有意に下がっていることが報告されている[10]。このことは Cy の卵巣毒性のメカニズムのひとつとして、Burn-out が寄与していることを示している。また AMH に加えて、VEGF (vascular endothelial growth factor)、LIF (leukemia inhibitor factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor)、KGF (keratinocyte growth factor)、PDGF (platelet-derived growth factor) などの成長因子も原始卵胞のリクルートメントや維持に影響することが報告されている[11]。がん治療のために行う化学療法による性腺機能低下を防ぐ有効な手段はいまだ

確立されていない。一方、最近の体外受精治療技術の進歩とあいまって出てきたのが妊孕性温存治療、すなわち性腺機能低下前に胚（受精卵）、卵子などを採取し凍結保存しておき、がん治療後にそれらを用いて妊娠を試みる、という手法である。しかし、これは妊娠の可能性を残すものの、卵巢の内分泌機能、つまり女性ホルモン分泌機能の喪失には効果がない。化学療法による性腺機能低下を防ぐ方法の開発が喫緊の課題と言える。

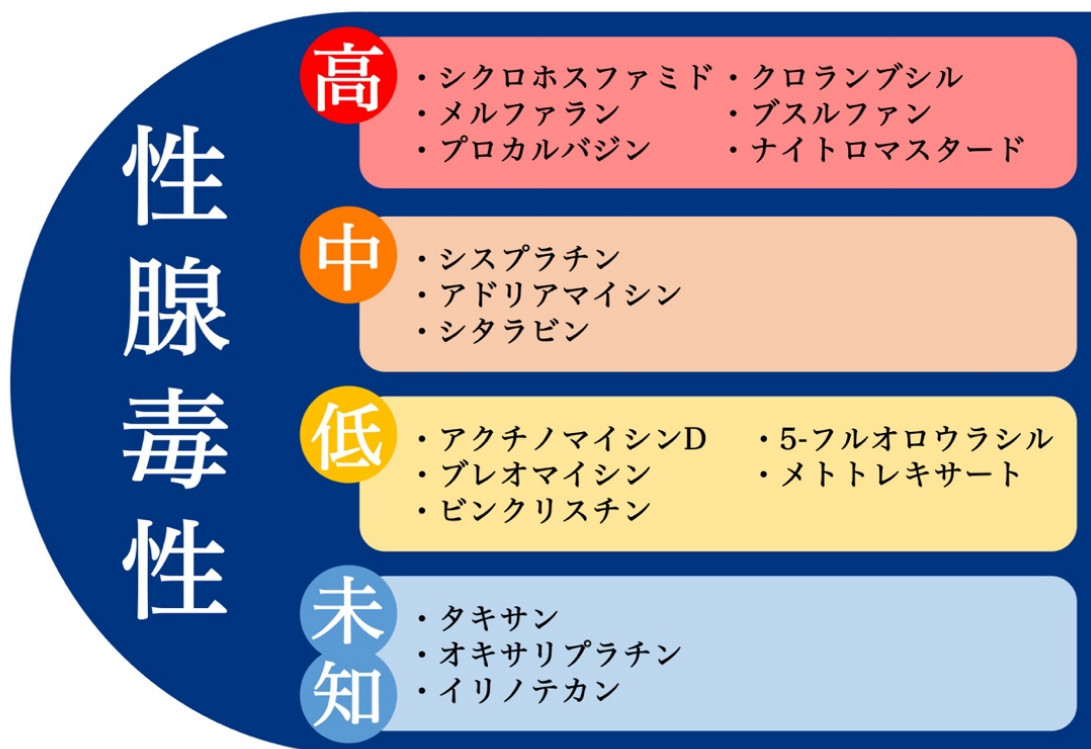
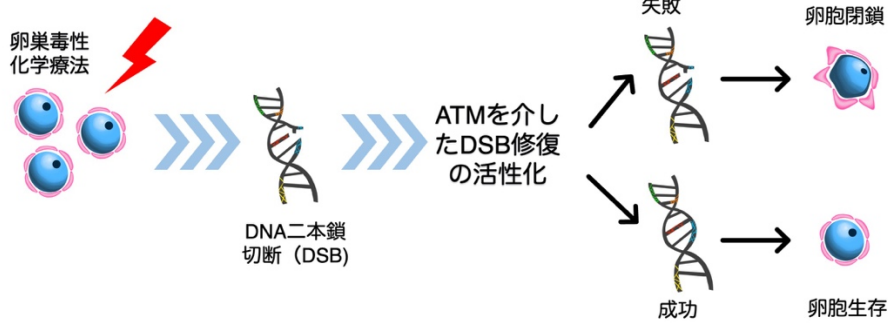


図 3. 抗がん剤による POI のリスク

(A. Richard and S. Norah, Cancer treatment and the ovary: Clinical and laboratory analysis of ovarian toxicity.48, 2015.より)

A) 原始卵胞への直接的障害



B) 「Burn-Out」

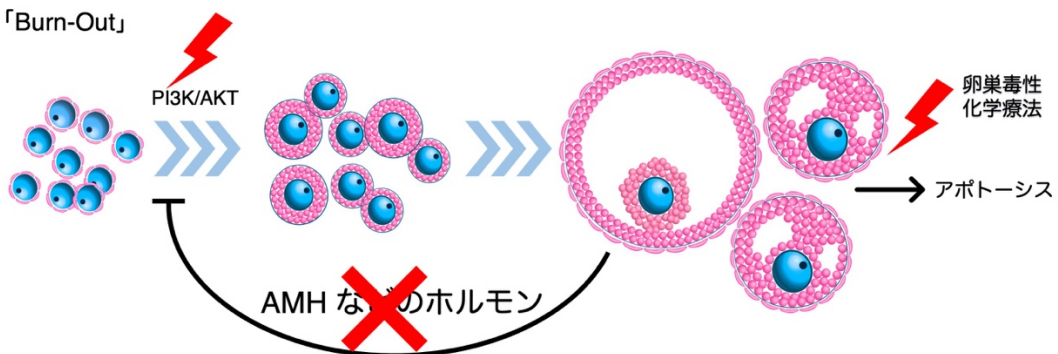


図 4. 想定されている抗がん剤による卵巣毒性のメカニズム

A) 原始卵胞への直接的障害。化学療法は dormant state（停止状態）中の原始卵胞の DNA 二本鎖切断によって、卵胞のアポトーシスを引き起こす。B) Burn-out。卵胞発育過程にある卵胞が障害されることにより、これらの卵胞からの AMH 等の原始卵胞のリクルートメントを抑制する因子の分泌が低下し、その結果、原始卵胞における PI3K / PTEN / Akt 等の卵胞活性化経路がアップレギュレートされて、多くの原始卵胞がリクルートメントされることによって、結果的に原始卵胞数の減少を招く。

細胞老化

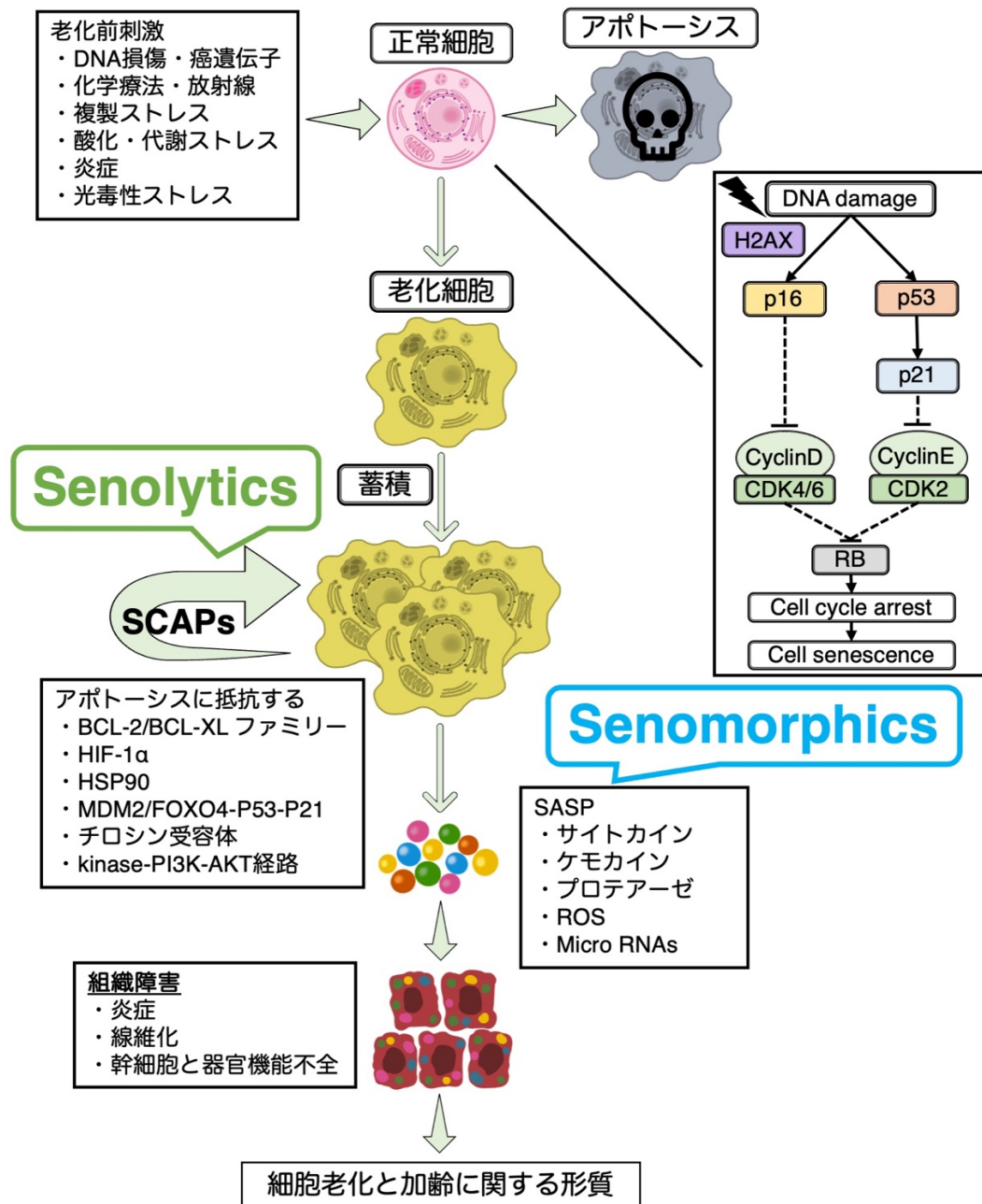
細胞老化とは、細胞分裂を一定回数繰り返した後、不可逆的に細胞分裂を停止する現象である[12]。細胞老化の特徴には、形態的な変化、不可逆的な複製停止、腫瘍抑制因子の活性化、クロマチンの再構成、及び抗アポトーシスなどが挙げられる。更に、タンパク質合成の増加とも関連している[13]。老化した細胞から生理活性物質が分泌され引き起こされる現象を細胞老化関連分泌形質（senescence-associated secretory phenotype, SASP）という。SASP 因子は分泌されたサイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ、Micro RNAs などの様々な

因子から構成され、その成分は細胞や組織によって異なる。SASP は SASP 因子によって誘導される炎症や免疫活性、線維化、アポトーシス等を指し、局所環境を悪化させる要因となる[13, 14]。老化細胞は、老化相関抗アポトーシス経路（senescent cell anti-apoptotic pathways, SCAPs）を通じて、自分が分泌した SASP 因子により自身が細胞死に至ることを防ぐ。このような自身の獲得した抗アポトーシスの形質により老化細胞は排除されることなく蓄積していき、局所環境の増悪、組織障害を通じて、様々な病理的状态に關与する[14, 15]。老化細胞の体外及び体内マーカーとしては、細胞体積の膨大、p16、p21、p53、 γ H2AX、及び SASP 因子（transforming growth factor β -1, TGF- β -1 や interleukin-6, IL-6 など）の発現増加、及び老化関連 β -ガラクトシダーゼ（senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal）の活性化が挙げられる[16, 17]（図 5, 表 1）。

細胞老化に対する治療戦略としては、Senomorphics と Senolytics の二種類がある。Senomorphics は、SASP 因子の分泌を低下させる標的薬の総称である。SASP 因子の分泌は経時的また空間的にも変化しているため、一種類の Senomorphics は全ての SASP に効かないという限界がある。Senolytics は、SCAPs を阻害することで、選択的に体内から老化細胞を除去する薬である[18, 19]。Senolytics を用いた最初の臨床試験において、Dasatinib と Quercetin

（DQ）の投与によって特発性肺線維症（Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF）患者の身体機能が改善されることが示唆された[20]。Dasatinib は Ephrin-B レセプターを含む複数のチロシンキナーゼを阻害する。Quercetin は PI3K を含む多数のキナーゼや serpins を阻害する[21]。これまで報告されている主な Senolytics と

その作用機序を図 6 にまとめた。最近、慢性腎障害、変形性関節症などの疾患で Senolytics に関する臨床試験が進行しており、有効性が確認されている[22, 23]。卵巣における細胞老化や Senolytics の効果の報告としては、肥満状態の卵巣やシスプラチンによる卵巣傷害において老化細胞が蓄積しており Senolytics によりこれが除去されたというものがある[24, 25]。一方で Cy と細胞老化については、線維芽細胞において Cy により細胞老化が誘導されることが報告されているが[26]、Cy が卵巣において細胞老化を誘導するのか、さらに Senolytics により Cy 誘発性 POI が緩和されるか、についての検討はされていない。



SASP: senescence-associated secretory phenotype
SCAPs: senescent cells anti-apoptotic pathways
 Khosla S, et. al. Nat Rev Endocrinol. (2020)より引用改変

図 5. 細胞老化

通常、細胞は様々なストレスにさらされ、最終的にアポトーシスに至る。しかし、一部の細胞では細胞老化が誘導される。老化細胞では、p21/p53 経路及び p16 経路が活性化し、細胞周期が止まった状態となっている。これらの老化細胞は SASP 因子を分泌し、局所環境を悪化させる。さらに老化細胞は、SCAPs の活性化によりアポトーシス抵抗性を獲得するため、排除されず蓄積するため悪循環に陥り、組織機能不全や疾患に至る。細胞老化に対する治療戦略として、SASP 因子の分泌を低下させる薬である Senomorphics と老化細胞を選択的に除去する薬である Senolytics の二種類がある。

マーカー	作用
p53-p21	持続的な DNA 損傷により p53-p21 経路が活性化され、CDK (Cyclin-dependent kinase)が阻害されることによって細胞周期が停止する[27]。
p16-RB	正常細胞では発現レベルが極めて低く殆ど機能していないが、老化細胞では発現レベルが著しく高くなるため、老化細胞を特定するためのマーカーとしても有用である[28]。
γ -H2A.X	DNA 二本鎖断裂などの DNA 損傷は、細胞老化で見られる特徴の一つである。H2A.X は DNA の二本鎖断裂が起こった場合に、チェックポイントを介して細胞周期を停止させ、DNA 修復を行うために必要なバリエーションヒストンである[29]。
SA- β -gal	弱酸性条件下 (pH6) で X-gal を基質としてベータガラクトシダーゼを染色すると、老化した細胞が青く染まる[30]。
SASP 因子	TGF- β 1、TNF α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) など、老化細胞から分泌した様々な物質。周囲の細胞に細胞老化を誘導するなどの作用を持つ[31]。

表 1. 細胞老化の指標となるマーカー

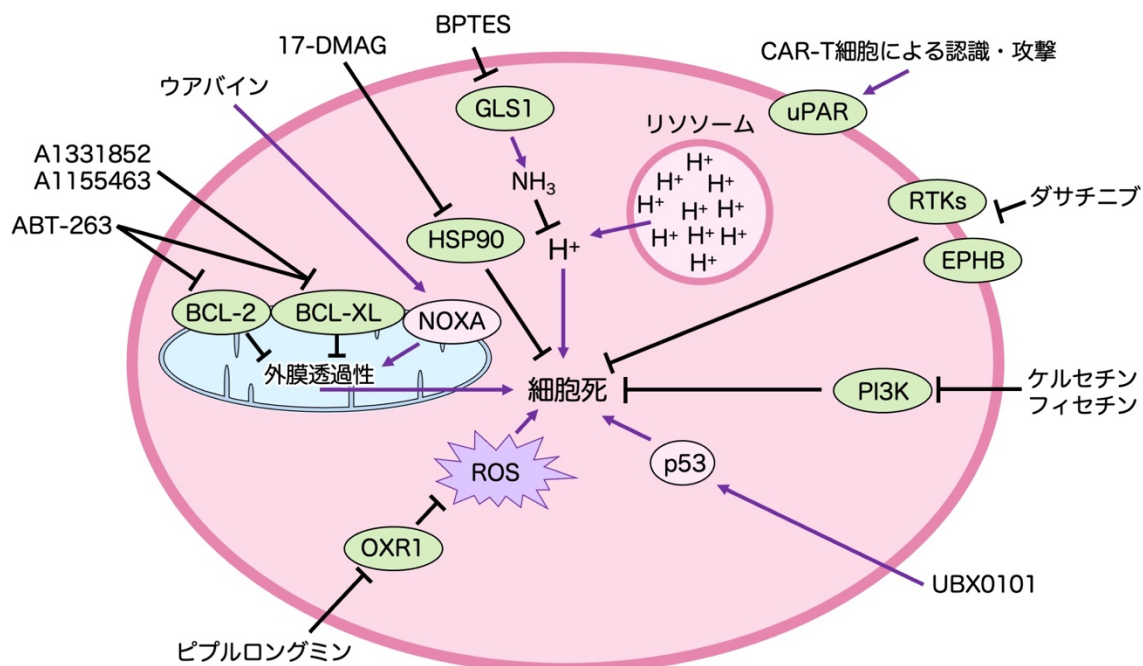


図 6. 主な Senolytics とその作用機序

(高杉征樹, 大谷直子: senolytic drug 開発の動向と展望. 実験医学, 40: 407-412, 2022 より引用改変)

ダサチニブ (Dasatinib) は Ephrin-B レセプターを含む複数のチロシンキナーゼを阻害する。ケルセチン (Quercetin) とフィセチン (Fisetin) は PI3K を含む多数のキナーゼや serpins を阻害する。ABT-263 は BCL-2、BCL-XL を阻害する。

A1331852 と A1155463 は BCL-XL を阻害する。ウアバインは NOXA を活性化

させる。17-DMAG は HSP90 を阻害する。ピプルロングミンは OXR1 を阻害して活性酸素 (ROS) を増加させる。UBX0101 は p53 と MDM2 の相互作用を阻害し p53 を活性化させる。BPTES はアンモニアの生成を減少させることで細胞内の H^+ 濃度を増加させる。

仮説

正常な卵胞発育においては、原始卵胞の休眠状態と成長過程へのリクルートメントのバランス状態が保たれている。すなわち、原始卵胞は前胞状卵胞と初期胞状卵胞の顆粒膜細胞から産生された AMH などの抑制因子によって dormant state (停止状態) となっている[32]。そしてごくわずかな数の原始卵胞がリクルートメント (選択・活性化) されて成長へと進行する (図 6A)。私は、Cy によって胞状卵胞の顆粒膜細胞において細胞老化が誘導され胞状卵胞の機能不全、卵胞局所環境の悪化が引き起こされることにより、原始卵胞を休眠状態に抑制することができず Burn-out を起きるのではないかと、という仮説を立てた (図 6B)。そして Senolytics である DQ の投与により蓄積した老化顆粒膜細胞を除去することにより、原始卵胞に対する抑制的な影響が回復され、正常な卵胞発育のバランスを保つことに寄与する、すなわち DQ が Cy による性腺毒性に対して保護的な役割を果たすのではないかと考えた (図 6C)。本研究では、Cy による POI において細胞老化現象が起きているか、さらに老化細胞除去薬である DQ で POI を改善できるかを検討した。

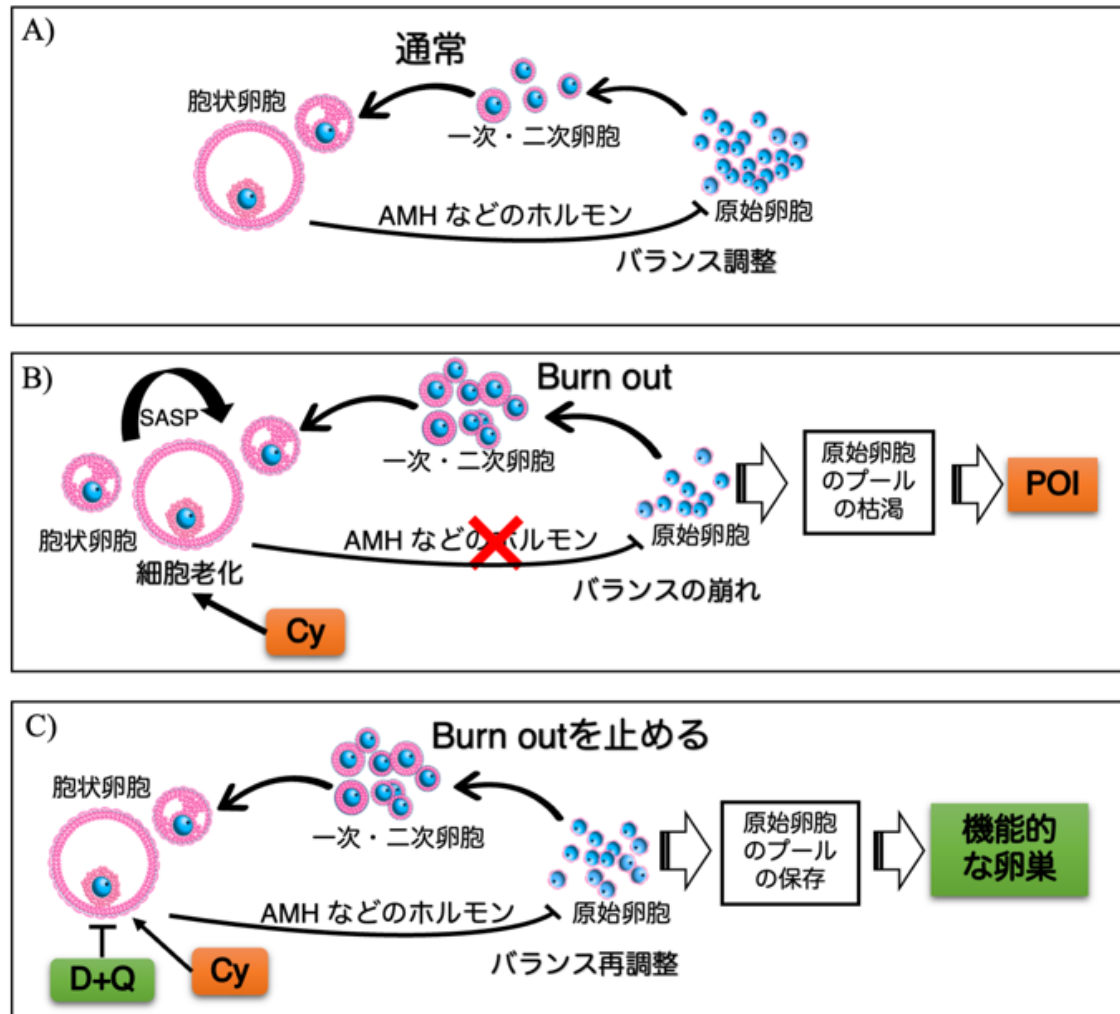


図 7. 仮説

A) 通常状態で、原始卵胞は dormant state (停止状態) となっている。ごくわずかの原始卵胞がこのプールからリクルートメントされ成長過程へ進行する。B) Cy は胞状卵胞の顆粒膜細胞の細胞老化を誘導し、胞状卵胞の機能不全、卵胞局所環境の悪化が引き起こされることにより、原始卵胞を休眠状態に抑制することができなくなる。結果的に Burn-out を引き起こし、原始卵胞のプールを枯渇させ卵巣機能不全に至る。C) DQ は老化細胞を除去し局所環境を改善することにより、胞状卵胞の機能を回復、すなわち原始卵胞に対する抑制因子の分泌を回復し、卵胞発育のバランスを取り戻す。Cy, シクロホスファミド、DQ, Dasatinib and Quercetin

方法

倫理承認

全ての実験手順は、関連する機関審査委員会の承認を得た（承認参照番号: 3594-11、医-H19-222）。全ての患者が署名入りのインフォームド・コンセントを提供し、本研究はヘルシンキ宣言の原則に則って実施された。マウスを使用した実験は、東京大学動物の使用および管理に関する委員会によって承認され（承認参照番号: P21-005）、関連するガイドラインおよび規制に従って実施された。

患者検体

患者からの文書による同意の下、東京大学医学部附属病院、松本レディースクリニック及びフェニックス ART クリニックで体外受精のために卵子を採取した患者から、卵胞液を回収し、hGCs を使用した。

hGCs の分離培養

hGCsの分離と培養はこれまでの論文を参考にした[33-36]。hGCsを含んだ卵胞液を採卵時に回収し、1500rpmで10分間遠心分離し、中間層からhGCsを回収し、PBSで洗浄した。洗浄したhGCsを0.2% w/vヒアルロニターゼ（Sigma-Aldrich）を含んだPBSに加え、再懸濁し、ウォーターバスで37°Cで30分間インキュベートした。この懸濁液をFicoll-Paque（GE Healthcare）に重層し、400gで30分間遠心した。上清を捨て、中間層からhGCsを回収し、PBSで2回洗浄し、チャコール処理10% v/v仔ウシ血清及び抗生物質（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) を含んだDMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) に懸濁し、 5×10^5 cells/mlの濃度で12穴培養プレートにまいた後、5%CO₂、37°Cの条件で培養した。全てのhGCsは、不妊治療時のホルモン剤投与によってホルモン受容体の感受性が変化している。したがって実験に使用する前に3-5日培養した[37]。

hGCs の刺激方法

Cy は生体内においては、肝臓で代謝をされてその薬理作用を発揮するため、培養細胞に直接添加しても細胞毒性効果をもたない。一方、Cy の代謝産物である4-hydroperoxy cyclophosphamide (4-HC) は細胞膜を通過し更に細胞内で分解されて細胞毒性を表す[38]。Cy が hGCs において細胞老化を誘導するか評価をするために、hGCs を 4-HC (Toronto Research Chemicals) [38, 39]にて刺激した。4-HC の濃度を決定するために 100、50、25、10、5、1、0.1、0.01 または 0.001 μ M で 24 時間培養した。これらの条件はヒトまたは動物の顆粒膜細胞を用いた先行研究[40-42]を基にして選択した。予備実験において、細胞形態の変化の起こらず、かつ最も効果のあった濃度は、10 μ M であったため、以後この濃度で実験を行った。Senolytics である DQ の効果を評価するため、4-HC 刺激前に、DQ を投与し細胞を 24 時間刺激した。DQ の最適濃度を判定するため、先行研究[25, 43]を基にして Quercetin は 1、10、20 μ M を、Dasatinib は 1、10、100、1000nM を選択して予備実験を実施した。ウェスタンブロット法で細胞老化マーカーp21 の発現を評価することにより、DQ の効果を評価した。予備実験の結果に基づき Quercetin 10 μ M と Dasatinib 1nM の組み合わせを本研究にお

いて使用した。

POI モデルマウス

先行研究に基づいて Cy 誘発性 POI モデルマウスの作成プロトコルを決定した [44, 45]。7 週齢の雌の C57BL/6J マウス (Japan SLC) を使用した。マウスは特定病原体フリーの環境で、温度 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm10\%$ 、午前 8 時に点灯し午後 8 時に消灯する連続的な明暗サイクルで、食物と水は自由摂取の状態で飼育された。POI モデルマウスの卵巣で細胞老化が起きるかどうかを調べるため、control 群と POI 群の 2 群に分けた。Cy (Tokyo Chemical Industry) は PBS に溶解し全量 0.1 ml を腹腔内投与した。Control 群 ($n=3$) では、0 日目に PBS を腹腔内投与し、POI 群 ($n=3$) では、0 日目に Cy (75mg/kg) を腹腔内投与した。7 日目に血清・卵巣を採取した。DQ の Cy 誘導性 POI マウスに対する卵巣保護効果を調べるため、control 群、POI 群、DQ 群、および POI+DQ 群の 4 群に分けた。Dasatinib (Sigma-Aldrich)、Quercetin (Sigma-Aldrich) とともに 10% Polyethylene Glycol 400 (PEG400, Fujifilm) に溶解し全量 0.1 ml を経口投与した。POI 群と POI+DQ 群では 1 日目に Cy (75mg/kg) を腹腔内投与した。Control 群と DQ 群では 0 日目に同量の PBS を腹腔内投与した。DQ 群と POI+DQ 群には 3 日間連続 DQ (Dasatinib 5mg/kg、Quercetin 50mg/kg) を経口投与した。Control 群と POI 群には 3 日間連続 10% PEG400 を経口投与した。DQ の投与経路と用量は、先行研究を参考にした [44-47]。7 日目に血清・卵巣を採取した (図 8A)。

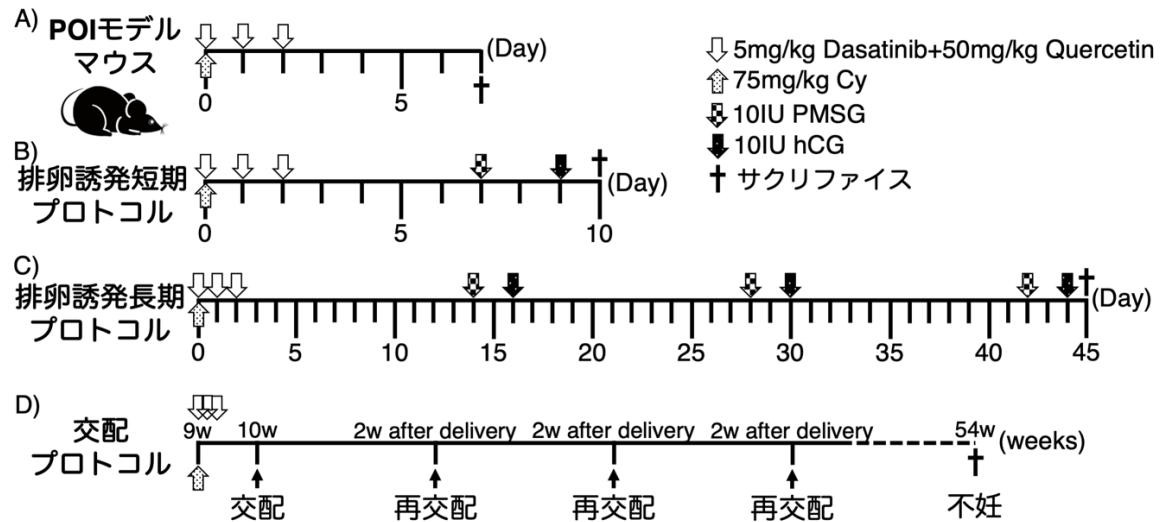


図 8. 動物実験のプロトコル

POI モデルマウスを用いた各実験のプロトコルを示す。A)POI モデルマウスと DQ 投与。A) 8 週齢の雌 C57BL/6J マウスを 4 群 (Control 群、POI 群、DQ 群、及び POI+DQ 群) 分けて、0 日目に 0.1ml の PBS (Control 群と DQ 群) または 1500µg Cy を含む 0.1ml の PBS (POI 群と POI+DQ 群) を腹腔内投与した。マウスに、0 日目から連続 3 日間、午前 8 時に 0.1ml の 10%PEG400 (Control 群と POI 群) または 1000µg Quercetin と 100µg Dasatinib を含む 0.1ml の 10%PEG400 (DQ 群と POI+DQ 群) を経口投与した。7 日目にサクリファイスして、評価した。B) 排卵誘発短期プロトコル。7 日目に 10 IU PMSG を腹腔内注射し、続いて 9 日目に 10 IU hCG を腹腔内注射した。hCG 投与後 12~14 時間後、10 日目に卵管全体及び卵巣を採取した。C) 排卵誘発長期プロトコル。マウスには 14、28、及び 42 日目に 10 IU PMSG を腹内注射し、続いて 16、30、及び 44 日目に 10 IU hCG を腹腔内注射した。その後、45 日目にサイクリファイスして、卵管全体及び卵巣を採取した。D) 交配プロトコル。Cy 投与から 1 週間後に雌マウスと交配させ始めた。産後 2 週間経過後再交配し、雌マウスが不妊になる (1 ヶ月以上交配を続けても妊娠できない、もしくは腹部肥満や膣口閉鎖、脱毛や皮膚潰瘍などの閉経後及び老化症状が現れる) または 51 週齢になるまで、繰り返し交配させた。各グループの妊娠能を評価するため、交配サイクル毎の出産仔数を記録した。

卵巣の形態的評価と卵胞数の計測

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、パラフィンに包埋した。マウス卵巣を最大断面から両側に毎 5µm ごとに連続的に切片し、毎 5 枚ごとに Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。各卵巣毎に計 26

枚 HE 染色したマウス卵巢連続切片を作成した。卵胞に対する化学療法の影響および DQ の保護効果を評価するため、卵胞を分類しそれぞれを計数した [48]。なお、卵母細胞の核がはっきりと見える卵胞のみカウントした。卵母細胞の周りに一層の扁平な前顆粒膜細胞が取り囲んだ卵胞は原始卵胞として分類した。一層の円柱状顆粒膜細胞が取り囲んだ卵母細胞は一次卵胞と定義された。卵胞が原始卵胞と一次卵胞の間の中間状態にある場合、すなわち扁平な前顆粒膜細胞と円柱状顆粒膜細胞両方が存在する場合には、前者が優勢である場合は原始卵胞、後者が優勢である場合は一次卵胞として分類した。顆粒膜細胞が重層化し 2 層～3 層になって、かつ卵胞腔が存在しない卵胞は二次卵胞として分類した。胞状卵胞は、3 層以上の顆粒膜細胞と単一の大きな卵胞腔を備えた卵胞として分類された。顆粒膜細胞層の菲薄化、収縮した顆粒膜細胞、変性卵母細胞核が観察された卵胞は閉鎖卵胞として分類された [49] (図 9)。

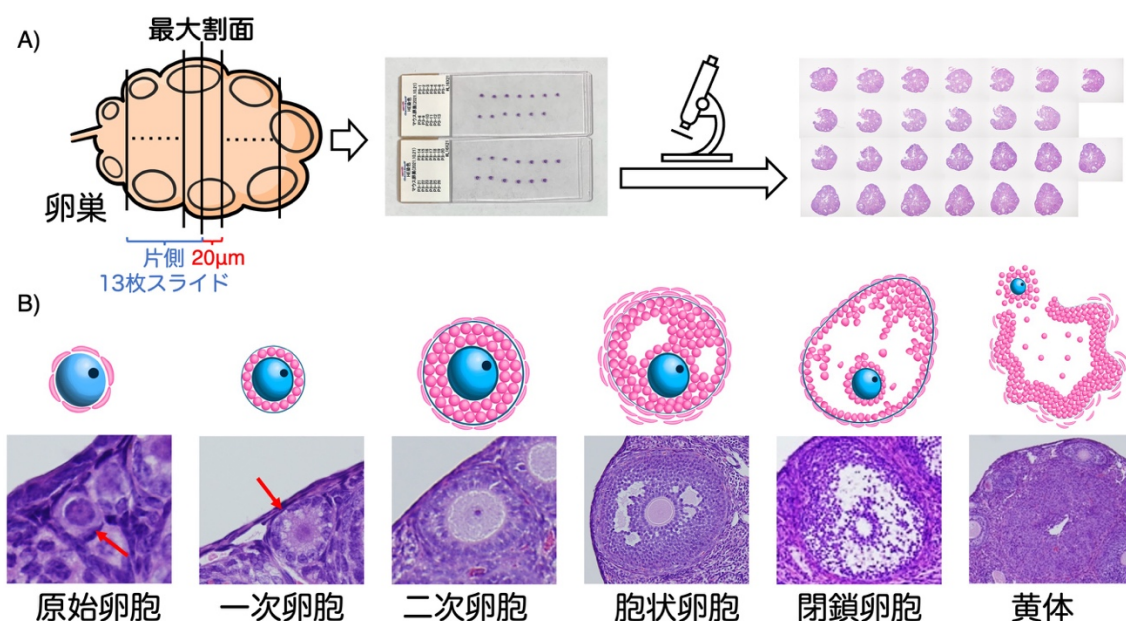


図 9. 卵胞数の計測

A) 連続切片の作成。卵巢のバラフィンブロックを最大断面から両側に毎 20μm

ごとに一枚の切片に対して HE 染色を行った。卵巢全体で合計 26 枚連続切片を作成した。B) 代表的な各ステージの卵胞及び黄体。原始卵胞：卵母細胞の周りに一層の扁平な前顆粒膜細胞が取り囲んだ卵胞。一次卵胞：一層の円柱状顆粒膜細胞が取り囲んだ卵胞。二次卵胞：2 層～3 層の顆粒膜細胞を認め卵胞腔が存在しない卵胞。胞状卵胞：3 層以上の顆粒膜細胞と単一の大きな卵胞腔を備えた卵胞。閉鎖卵胞：菲薄化した顆粒膜細胞層、収縮した顆粒膜細胞、変性卵母細胞核が観察された卵胞。

免疫組織化学染色

3 μ m の卵巢切片を脱パラフィン後、抗原賦活化液 Target retrieval solution

(Dako) を用いた後、Envision + Dual Link System/HRP (DAB) kit (Dako) を用いて免疫組織化学染色した。1 次抗体として、anti-p16 抗体 (1:500, RRID: AB_628067, Abcam)、anti-p21 抗体 (1:1000, RRID: AB_2077682, Proteintech)、anti-p53 抗体 (1:5000, RRID: AB_2881401, Proteintech)、anti-Phospho-Histone H2A.X 抗体 (1:400, AB_2118009, Cell Signaling Technology) を用いた。定量分析は ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を使用した[50]。具体的には、p16、p21、p53 及び TGF- β 1 は、画像を白黒 (8-bit) にして、画像の Threshold を 0~120-170 の間に設定した。同じマーカーの全ての画像の解析において同じ Threshold を設定した。ImageJ の自動分析で %Area の数値を % of XX-positive GCs とし、統計解析を行った (図 10)。ヘマトキシリン染色が統計結果へ影響しないように、染色する時にヘマトキシリンを薄く染める工夫をした。なお各マウスの卵巢から 3~5 個の胞状卵胞を評価した。 γ H2AX については immunoreactivity score (IS) で評価した。一番濃く染まっている黒色及び茶色の GCs を 3 点、黄褐色の GCs を 2 点、薄黄色の GCs を 1 点、染色されていない GCs を 0 点でとして記録し数えた。IS = (3 点の GCs 数 \times 3 + 2 点の GCs 数 \times 2 + 1 点の GCs 数 \times 1) / GCs の総数で評価した (図 11) [51]。

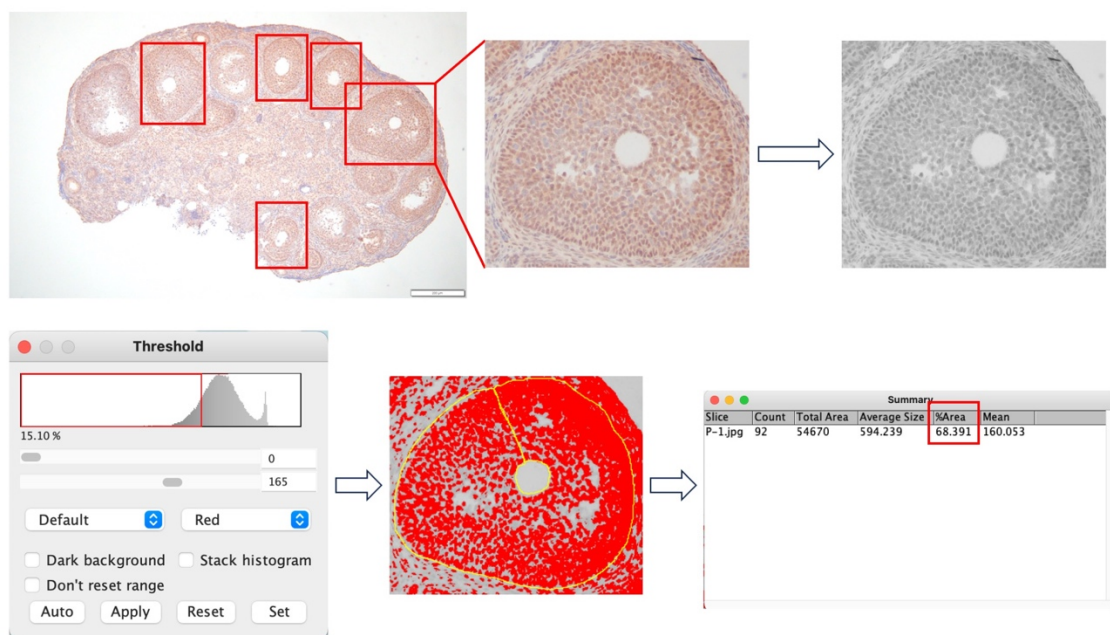
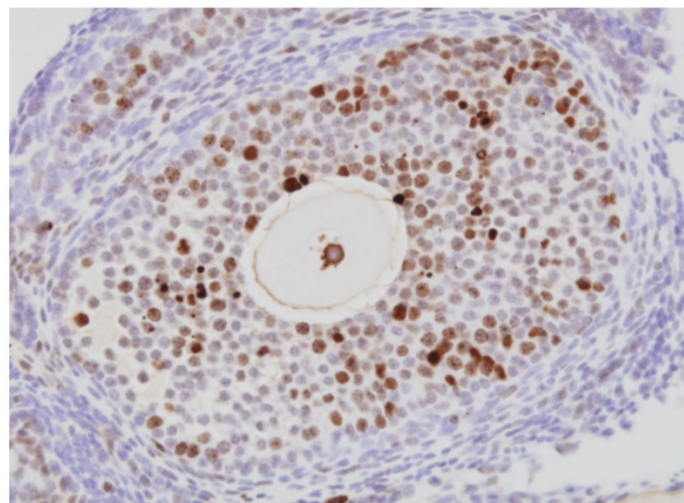


図 10. p16、p21、p53 及び TGF-β1 の ImageJ 評価
各マウスの卵巣から 3～5 個の胞状卵胞を選んで（赤枠）、Image J で 8-bit にし、画像の Threshold を図のように設定し、自動的な分析により %Area の結果を得た。同じマーカーの全ての画像の Threshold 設定は統一している。



IS ; immunoreactivity score

- ① Black + Brown = 3
- ② Yellow Brown = 2
- ③ Light yellow = 1
- ④ Negative = 0

$$\text{Total} = \text{①} + \text{②} + \text{③} + \text{④}$$

$$\text{IS} = (\text{①} \times 3 + \text{②} \times 2 + \text{③} \times 1) / \text{total}$$

図 11. γ H2AX の定量分析

γ H2AX は immunoreactivity score (IS) で評価した。①黒色及び茶色の GCs を 3 点、②黄褐色の GCs を 2 点、③薄黄色の GCs を 1 点、④陰性の GCs を 0 点として記録し数えた。IS = $(\text{①} \times 3 + \text{②} \times 2 + \text{③} \times 1) / (\text{①} + \text{②} + \text{③} + \text{④})$ で評価した

TGF-β1 濃度測定

マウス血清の TGF-β1 濃度測定するため、各マウスグループ (n=10) をイソフ

ルラン麻酔下で心臓採血を行った。採取した血液を遠心分離し、分離した血清を-80°Cで保存した。TGF- β 1 ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。TGF- β 1 を活性化させるため、血清を 1 N HCl で酸性化し、10 分間室温でインキュベートした後、1.2 N NaOH/0.5 M HEPES で中性化した。Epoch Multi-Volume Spectrophotometer (Bio Tek) を用いて、450nm 吸光度を測定した。

排卵誘発実験

マウスの卵巢機能を評価するため、卵巢刺激を行い排卵した卵子数を計測した。卵巢刺激の方法として、排卵誘発短期プロトコルと長期プロトコルを実施した (図 8)。短期プロトコルとし、Cy を注射した 1 週間後に、4 群のマウスに 10 IU 人馬血清性性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, 朝香製薬) を腹腔内投与し、続いて 48 時間後に 10 IU ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, hCG, 持田製薬) を腹腔内投与し、更に 12~14 時間後に、マウスの卵管及び卵巢を採取した。長期プロトコルでは、14、28、及び 42 日目に 10 IU PMSG を腹腔内注射し、続いて 16、30、及び 44 日目に 10 IU hCG を腹内注射した。その後、45 日目に卵管全体及び卵巢を採取した。排卵誘発実験において実施した、排卵した卵子数の計測法を図 10 に示した。光学顕微鏡 (Olympus) 下で 27 ゲージ針を用いて卵管から卵子卵丘複合体 (COCs) を単離し、10 分間 37°C でヒアルロニダーゼ処理して卵子を単離し、数を記録した[33]。

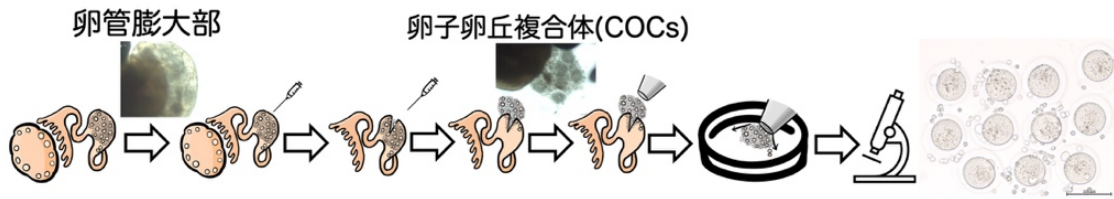


図 12. 排卵誘発実験における排卵数の計測法

PMSG・hCG を注射後 12～14 時間後、マウスの卵巣及び卵管を採取し、卵管膨大部を切開し、COCs を分離。これにヒアルロニダーゼ処理を加え、卵子を単離した。

交配実験

マウスの生殖能力を検証するため、22 匹の雌マウスを、Control 群 (n=5)、POI 群 (n=6)、DQ 群 (n=5)、及び POI+DQ (n=6) 群の 4 群に分けて、Cy 投与 1 週間後に交配を行った。1 匹または 2 匹の雌マウスを 1 匹の 11 週齢の雄マウスとランダムに交配させた。妊娠したマウスは出産まで個別に飼育し、出産した仔の数を記録した。産後 2 週間経過した後に再交配をし、雌マウスが不妊になる（1 ヶ月以上交配を続けても妊娠できない、もしくは腹部肥満や膣口閉鎖、脱毛や皮膚潰瘍などの閉経後及び老化症状が現れる）または 51 週齢になるまで、繰り返し行なった。交配実験の期間は合計 308 日だった（図 8D）。

Western Blot 法

4-HC と DQ で刺激した hGCs を lysis buffer (Merck) で溶解し、4°C、16000g で 10 分間遠心して、不溶性物質を除去した。上清を回収し、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) で蛋白濃度を測定した。10 μ g 相当量の蛋白質を SDS-PAGE ゲルに泳動後、PVDF 膜へ転写を行った。5%スキムミルク (Fujifilm) で 1 時間室温にブロッキングし、一次抗体として anti-p16 抗体 (1:500, RRID: AB_628067,

Abcam)、anti-p21 抗体 (1:1000, RRID: AB_2077682, Proteintech)、anti-p53 抗体 (1:5000, RRID: AB_2881401, Proteintech)、anti-Phospho-Histone H2A.X 抗体 (1:400, AB_2118009, Cell Signaling Technology) をのせ一晩 4 °C もしくは 1 時間室温で抗体反応を行った。その後二次抗体 (1:2000, anti-rabbit, RRID: AB_2099233 or anti-mouse, RRID: AB_330924, Cell Signaling) をのせ 1 時間室温でインキュベートし、ECL system (GE Healthcare) で発光反応を行い検出した。 β -actin (1:10000, RRID: AB_476697, Proteintech) を loading control として用いた。定量には ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を使用した[43]。

SA- β -gal の細胞免疫染色

4-HC と DQ で刺激したヒト hGCs を PBS で洗浄し、0.5%グルタルアルデヒド (FUJIFILM) 溶液 8ml と 2%ホルムアルデヒド (FUJIFILM) 0.2ml を 1.8ml の PBS (pH=7.4) で溶解し、hGCs を固定した。固定後、染色液で染色した。染色液は X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド, FUJIFILM)、MgCl₂、フェリシアン化カリウム (FUJIFILM)、及びフェロシアン化カリウム (FUJIFILM) を PBS (pH=6.0) に溶解し作成した。

統計学解析

全ての統計学解析は Prism 9 software を用いて行った。全てのデータは平均値 \pm SEM で表示した。二群間の比較には Student's t-test で解析を行った。p<0.05 の値を統計的に有意とした。全ての実験は少なくとも 3 回繰り返し行った。

結果

Cy 誘発性 POI モデルマウスの卵巣顆粒膜細胞では細胞老化が促進された

Cy 誘発性 POI モデルマウスの卵巣顆粒膜細胞で細胞老化が促進されるかどうかを調べるため、Cy 誘発性 POI モデルマウス (n=3) と Control マウス (n=3) の卵巣を用いて細胞老化マーカー p16、p21、p53、 γ H2AX の免疫組織染色を行った。POI モデルマウスでは Control マウスに比べて、すべての細胞老化マーカーについて陽性顆粒膜細胞の割合が有意に上昇していた (図 11, p16 : $0.72 \pm 0.18\%$ vs. $3.63 \pm 0.57\%$, $p < 0.001$; p21 : $0.42 \pm 0.12\%$ vs. $2.59 \pm 0.72\%$, $p < 0.001$; p53 $0.29 \pm 0.14\%$ vs. $5.20 \pm 0.79\%$, $p < 0.001$; γ H2AX 0.39 ± 0.04 vs. 0.69 ± 0.056 , $p < 0.001$)。

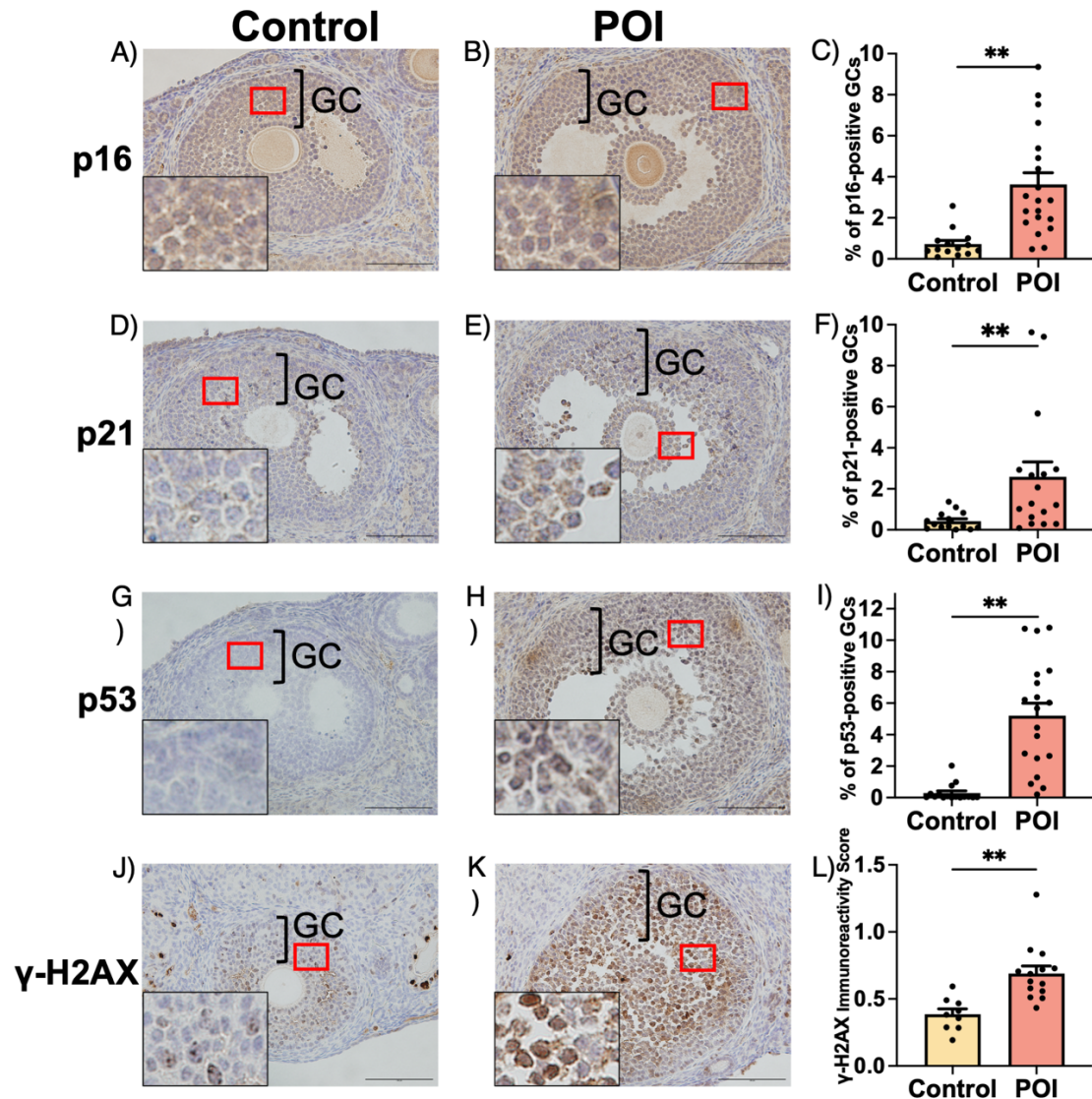


図 13. Cy 誘発性 POI モデルマウス卵巣における細胞老化マーカーの免疫組織学的染色結果

Control 群マウス (n=3) と POI 群マウス (n=3) の卵巣組織切片の細胞老化マーカーの免疫組織化学染色の結果を示す。(A, B) p16、(D, E) p21、(G, H) p53、(J, K) γH2AX。代表的な断面を示す。(C, F, I, L) は免疫組織化学染色の定量的分析を示す。各マウスから 3~5 個の卵胞を評価した。スケールバーは 100μm である。値は平均値±SEM で示した。**p<0.01。GC：顆粒膜細胞層。

hGCs において DQ の最適濃度を定めるための予備実験を行い、この結果に基づき Quercetin 10μM と Dasatinib 1nM の組み合わせを本研究において使用した。

DQ の最適濃度を判定するため、Quercetin は 1、10、20μM を、Dasatinib は 1、

10、100、1000nM を選択して、ウェスタンブロット法で細胞老化マーカーp21 の発現を評価することにより、DQ の効果を評価した。図 14 に結果を示す。

Quercetin 10 μ M 及び 20 μ M によって、4-HC により誘導された細胞老化マーカー p21 タンパクの発現上昇が有意に抑制された。次に Quercetin を 10 μ M に固定し Dasatinib の濃度を 1、10、100、1000nM と変化させたところ、いずれも p21 タンパクの発現上昇は有意に抑制された。顕微鏡で細胞形態を観察すると、Dasatinib 1000nM で半分以上の細胞は死滅しており、Dasatinib 100nM では細胞の正常形態を維持できていなかった。従って、細胞毒性の最も少ない Dasatinib 1nM に決定した。更に上記の結果をふまえて、Dasatinib 1nM を固定し、Quercetin の濃度を 1、2、5、10 μ M と変化させて刺激したところ、4-HC 群と比べ、Dasatinib 1nM+Quercetin 10 μ M の組み合わせにおいて、p21 タンパクの発見上昇を抑制する傾向があった。これらの結果を基に、Quercetin 10 μ M と Dasatinib 1nM の組み合わせを本研究において使用した。

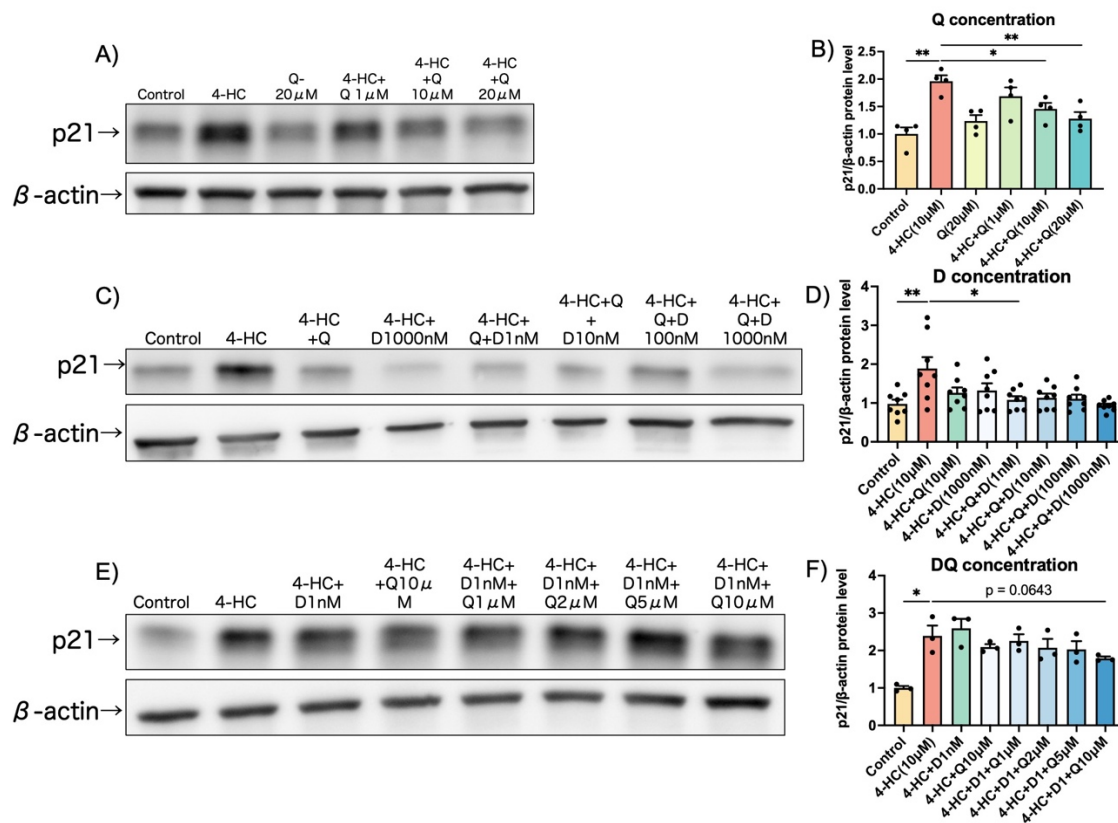


図 14. 本研究の *in vitro* の実験における DQ 濃度を定めるための予備実験の結果

4-HC を投与した hGCs で、DQ 投与実験のための予備実験を実施した。ウェスタンブロット法を用いて細胞老化マーカー p21 の発現によって、DQ の効果を評価した。A) Q (Quercetin) または negative control で 24 時間培養後、4-HC または vehicle で刺激した。Q の濃度として、先行研究を基に 1、10、20 μ M を選んだ。C) D+Q または negative control で 24 時間培養後、4-HC または vehicle で刺激した。Q の濃度を A) の結果を基に 10 μ M で固定し、D (Dasatinib) の濃度として、先行研究を基に 1、10、100、1000nM を選んだ。E) D+Q または negative control で 24 時間培養後、4-HC または vehicle で刺激した。D の濃度を 1nM で固定し、Q の濃度を A) の結果を基に 1、2、5、10 μ M で実施した。(B, D, F) それぞれ (A, C, E) のウェスタンブロットの定量分析を示す。 β -actin を loading control として使用した。値は平均値 \pm SEM で示した。4-HC 群の発現量と比較し、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。Q : Quercetin、D : Dasatinib。

hGCs において、4-HC 刺激により細胞老化マーカー p16、p21、p53 及び γ -H2AX の発現と SA- β -Gal 活性が増加し、これらは DQ 投与により減少した

hGCs において、Cy により細胞老化が誘導されるかどうか、また Senolytics である DQ の投与によって Cy により誘導される細胞老化が軽減されるかを検証する

ために、培養 hGCs を 4-HC と DQ で刺激し、細胞老化マーカーである p16、p21、p53、及び γ H2AX の蛋白質発現、ならびに SA- β -Gal 活性を測定した。4-HC 刺激群では control 群に比し、p16、p21、p53、 γ H2AX の蛋白質発現はいずれも有意に増加しており（図 12）、SA- β -Gal 活性も増加していた（図 13）。一方で、DQ の先行投与によって、全ての細胞老化マーカーの発現は 4-HC 単独群に比し有意に減少し、SA- β -Gal 活性も低下した。

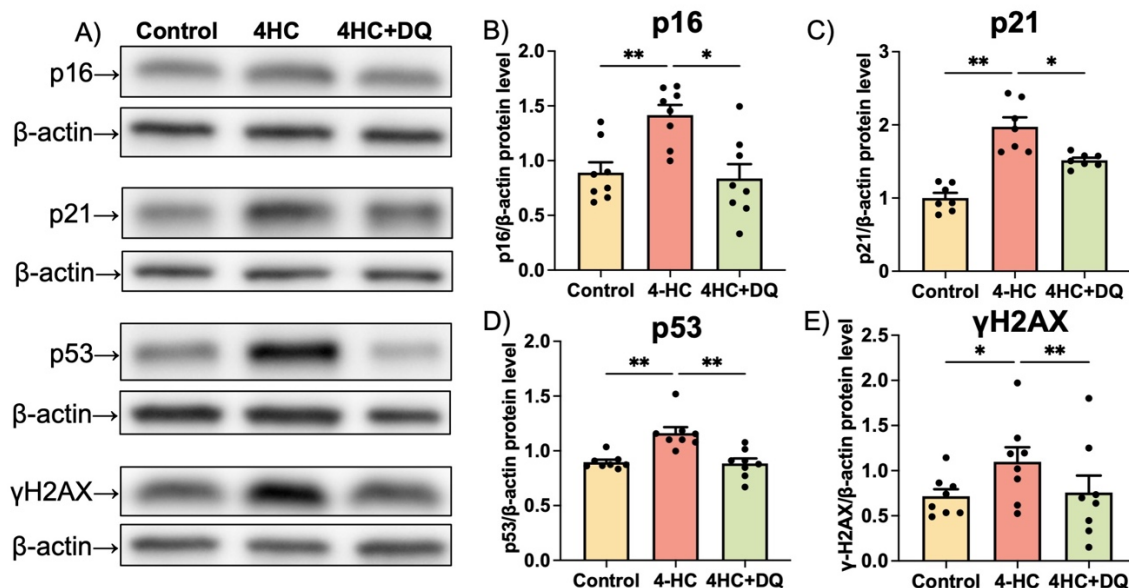


図 15. 4-HC, DQ 刺激した培養 hGCs における細胞老化マーカーのウェスタンブロッティング法による解析結果

培養 hGCs (n=8) に DQ または negative control を添加し 24 時間培養し、その後 4-HC または vehicle で刺激した。A) hGCs における細胞老化マーカー p16、p21、p53、 γ H2AX の蛋白質発見レベルをウェスタンブロット法にて解析した。(B, C, D, E) ウェスタンブロットの定量分析。 β -actin を loading control として使用した。値は平均値 \pm SEM で示した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。

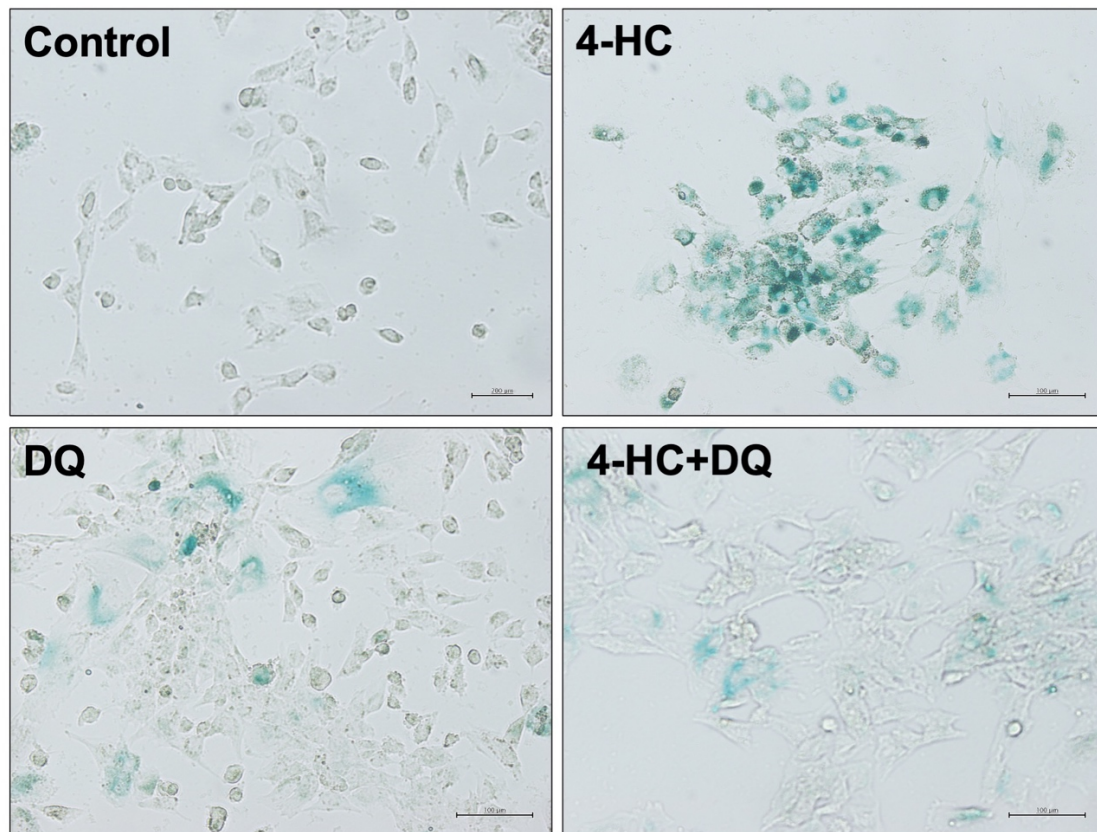


図 16. 4-HC, DQ 刺激した培養 hGCs における SA-β-gal 活性

培養 hGCs (n=8) DQ または negative control を添加し 24 時間培養し、その後に 4-HC または vehicle で刺激した。老化細胞に特異的に存在する SA-β-gal で細胞免疫染色を行った。代表的な光学顕微鏡画像を示す。スケールバーは 200μm である。

POI モデルマウスの卵巣顆粒膜細胞において増加した細胞老化マーカー p16、

p21、p53 及び γ-H2AX の発現は DQ の全身投与により減少した

次に DQ の全身投与により、POI マウスの顆粒膜細胞で誘導された細胞老化を軽減できるかどうかを明らかにするため、Control (n=5) マウス、POI (n=4) マウス、DQ (n=5) マウスと POI+DQ (n=4) マウスの卵巣切片を用いて、免疫組織化学染色分析を行った (図 14)。Control 群と比較し、POI 群では細胞老化マーカーの陽性細胞の割合が有意に増加した (p16: $22.43 \pm 2.86\%$ vs. $44.09 \pm 2.50\%$, $p < 0.001$ 、p21: $17.50 \pm 2.34\%$ vs. $34.27 \pm 2.82\%$, $p < 0.001$ 、p53: $4.81 \pm 0.98\%$ vs.

36.39±2.12%, $p < 0.001$ 、 γ H2AX: 0.42±0.026 vs. 0.70±0.11, $p=0.0275$) が、DQ 投与により POI 群における陽性細胞の割合は、すべての細胞老化マーカーにおいて DQ 投与なし群に比べて有意に減少した (p16: 44.09±2.50% vs. 18.86±2.93%, $p < 0.001$ 、p21: 34.27±2.82% vs. 10.74±2.36, $p=0.01$ 、p53: 36.39±2.12% vs. 13.91±2.54%, $p < 0.001$ 、 γ H2AX: 0.70±0.11 vs. 0.27±0.027, $p=0.002$)。

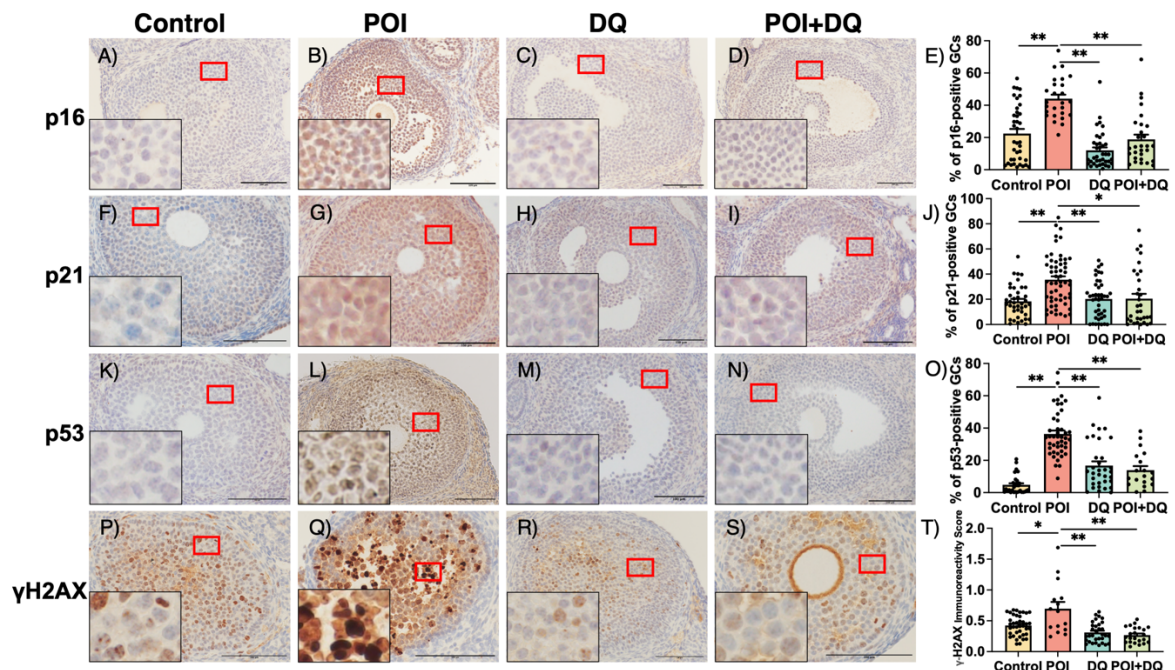


図 17. DQ の全身投与が Cy 誘発性 POI モデルマウス卵巣における細胞老化マーカー発見に与える影響の検証

Control (n=5) マウス、POI (n=4) マウス、DQ (n=5) マウスと POI+DQ (n=4) マウスの卵巣検体を用いて、抗 p16 抗体、抗 p21 抗体、抗 p53 抗体及び抗 γ -H2AX 抗体を用いて免疫組織化学染色を行なった。代表的な結果を示す。

(A-D, F-I, K-N, P-S) はそれぞれ p16, p21, p53, γ -H2AX の染色結果に対応している。(E, J, O, T) は各抗体の染色の定量的分析を示す。各マウスから 3~5 個の卵巣を評価した。定量分析の結果は平均値±SEM で示した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。スケールバーは 100 μ m を示す。GCs: 顆粒膜細胞。

POI モデルマウスでは、血清 TGF- β 1 濃度と顆粒膜細胞における TGF- β 1ga 発現が増加しており、DQ の全身投与によってそれらは減少した

POI モデルマウスの全身と卵巣局所において、SASP 因子である TGF- β 1 の変化を調べた。全身については、血清濃度を ELISA にて測定し、卵巣局所の発現については、卵巣顆粒膜細胞の免疫組織学的染色を行った。Control 群と比較し、POI 群において血清 TGF- β 1 濃度は有意に上昇しており（図 15A, $40606.52 \pm 2314.83 \text{ pg/mL}$ vs. $46417.54 \pm 1652.11 \text{ pg/mL}$, $p=0.0280$ ）。同時に TGF- β 1 陽性卵巣顆粒膜細胞の割合も有意に増加していた（図 15B-F, Control vs. POI: $0.527 \pm 0.17\%$ vs. $8.90 \pm 0.99\%$, $p<0.001$ ）。DQ の全身投与によって、血清中の TGF- β 1 濃度は有意に減少し（図 15A, $46417.54 \pm 1652.11 \text{ pg/mL}$ vs. $41397.14 \pm 2147.51 \text{ pg/mL}$, $p=0.0402$ ）、TGF- β 1 陽性卵巣顆粒膜細胞の割合も有意に減少した（図 15B-F, POI vs. POI+DQ: $8.90 \pm 0.99\%$ vs. $1.74 \pm 0.80\%$, $p<0.001$ ）。

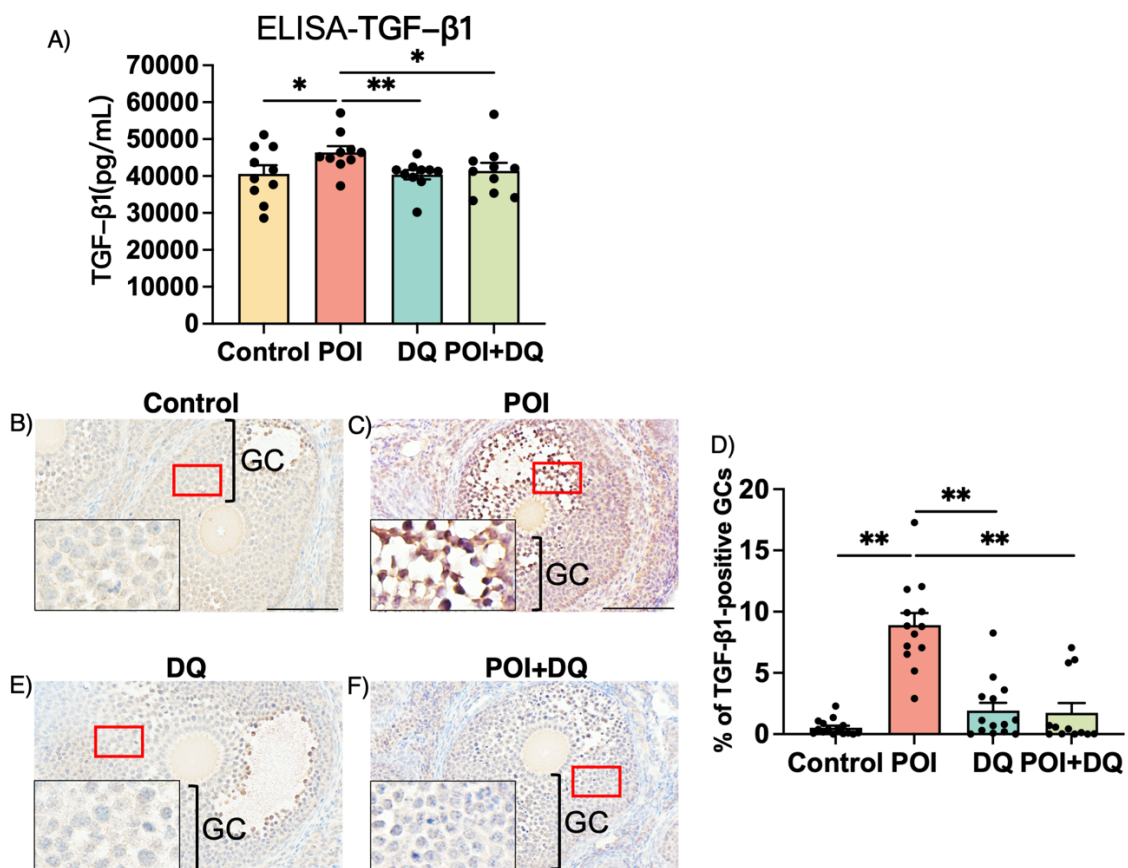


図 18. POI マウスにおける SASP 因子 TGF- β 1 の変化

(A) Control, POI, DQ, POI+DQ (各 n=10) の血清中 TGF- β 1 濃度。(B, C, E, F) マウスの卵巣検体を抗 TGF- β 1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行なった。代表的な断面を示す。(D) 免疫組織化学染色の定量的分析を示す。各マウスから 3~5 個の卵胞を評価した。結果を平均値 \pm SEM で示した。*は $p<0.05$, **は $p<0.01$ を示す。スケールバーは 100 μ m を示す。GCs: 顆粒膜細胞。

POI モデルマウスの卵巣では Burn-out が起きており、DQ 投与により部分的に改善した

Control 群、POI 群、DQ 群、及び POI+DQ 群 4 群において、Cy 投与 1 週間後に卵巣を採取して、連続 HE 染色切片を作って、顕微鏡で各ステージの卵胞の数を数えた。図 16 に示すように、Control 群と比較して、POI 群では、原始卵胞数 (167.40 ± 26.42 vs. 57.60 ± 9.99 , $p=0.04$)、一次卵胞数 (77.40 ± 9.15 vs. 37.2 ± 4.75 , $p=0.0023$)、及び黄体数 (2.80 ± 0.80 vs. 0.00 ± 0.00 , $p=0.004$) は有意に減少した。同時に、閉鎖卵胞数 (11.60 ± 1.22 vs. 16.60 ± 2.18 , $p=0.038$) および閉鎖卵胞の割合 ($3.92\pm0.49\%$ vs. $10.91\pm1.05\%$, $p<0.001$) は有意に増加した。POI マウスに DQ を投与することにより、原始卵胞数 (57.60 ± 9.99 vs. 102.00 ± 5.79 , $p=0.0079$)、一次卵胞数 (37.2 ± 4.75 vs. 71.50 ± 8.87 , $p=0.0042$)、および黄体数 (0.00 ± 0.00 vs. 2.50 ± 1.19 , $p=0.0476$) が有意に増加した。同時に、閉鎖卵胞数 (16.60 ± 2.18 vs. 10.25 ± 1.49 , $p=0.0288$) および閉鎖卵胞の割合 ($10.91\pm1.05\%$ vs. $4.52\pm0.76\%$, $p<0.001$) は有意に減少した。また原始卵胞からのリクルートメントを評価するために、卵胞を休眠卵胞 (原始卵胞) と成長卵胞 (一次卵胞+二次卵胞+胞状卵胞) に分類し、その比率を算出した (図 16G)。Control 群と比べ、POI 群の成長卵胞の休眠卵胞に対する比率 (0.800 ± 0.060 vs. 1.493 ± 0.149 , $p=0.0013$) は有意に増加しており、原始卵胞からのリクルートメントが亢進し

ていることが示された。一方、POI 群に対する DQ の投与により、この比率は有意に減少しており、POI 群におけるリクルートメントの亢進が抑えられていることが示された (1.493 ± 0.149 vs. 1.122 ± 0.095 , $p=0.0444$)。以上の結果から、DQ の投与により、POI モデルマウスの Burn-out が部分的に回復したことが明らかになった。

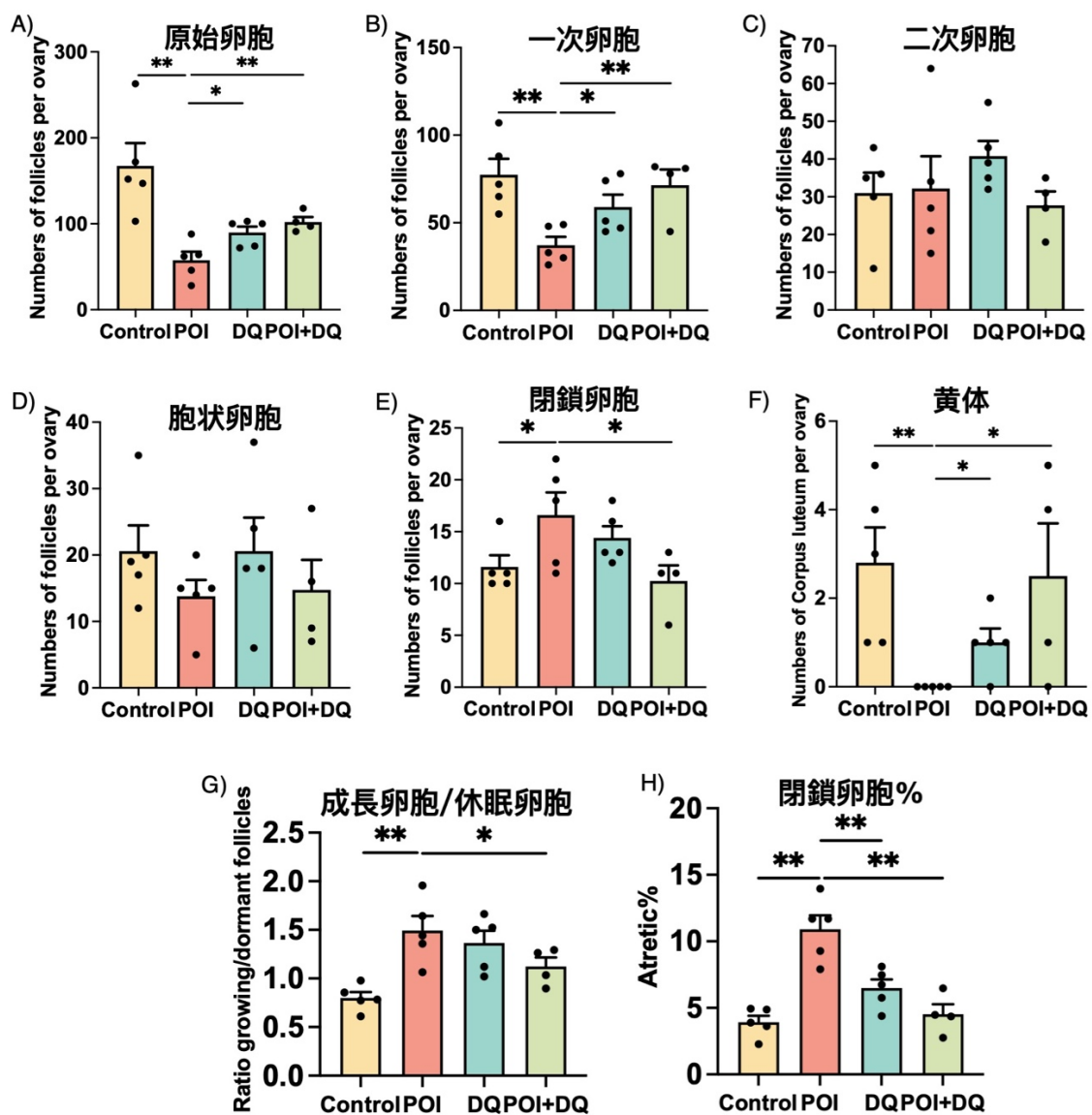


図 19. POI モデルマウスにおける各ステージの卵胞数と DQ 投与の効果
Control, POI, DQ, POI+DQ (n=5,5,5,4) の各群において、Cy あるいは溶媒投与

後 7 日目に卵巢を採取し、(A-F) 各群の各ステージの卵胞数を計測した。G) 成長卵胞 Growing follicle の休眠卵胞 dormant follicles に対する比率。休眠卵胞は原始卵胞、成長卵胞は一次卵胞+二次卵胞+胞状卵胞と定義している。H) 閉鎖卵胞の全卵胞に対する比率。結果を平均値±SEM で示した。*は $p<0.05$, **は $p<0.01$ を示す。

POI モデルマウスでは Burn-out により過排卵刺激時の排卵数は Control と比べ短期的には増加する可能性があり、これは DQ の投与により有意に抑制された。長期的には減少する可能性があり、これは DQ の投与により抑制される傾向を認めた。

Control 群、POI 群、DQ 群、及び POI+DQ 群 4 群のマウスの卵巢機能を評価するため、PMSG・hCG を投与して過排卵させ、卵子数を数えた。図 17A に示すように、短期的には POI 群は control 群に比べより多くの卵子を排卵する可能性がみられたが、これは DQ の投与により抑制された (Control vs. POI vs. POI+DQ, 28.83 ± 4.23 vs. 36.56 ± 5.48 vs. 22.55 ± 4.31 ; Control vs. POI, $p=0.1352$; POI vs. POI+DQ, $p=0.0282$)。一方で、図 17B に示すように、長期的には、POI 群では control 群に比し排卵数が少ない可能性がみられ、DQ の投与によって、回復する傾向にあった (Control vs. POI vs. POI+DQ, 18.44 ± 2.89 vs. 14.22 ± 3.76 vs. 25.00 ± 6.29 ; Control vs. POI, $p=0.1933$; POI vs. POI+DQ, $p=0.0804$)。今回の排卵誘発実験では、各個体のばらつきが大きく、いずれも統計学的な有意差には至らなかったが、今回の結果は、Cy 投与により原始卵胞プールからのリクルートメントが亢進し、短期的には、より多くの卵胞が発育・排卵するが、その結果 POI 群では原始卵胞のプールは他の群より早めに枯渇するため、長期的には排卵数が減少する、すなわち Burn-out が起きていることが示唆された。そして DQ の全身投与によりこの Burn-out は一部改善することが同時に示唆された。

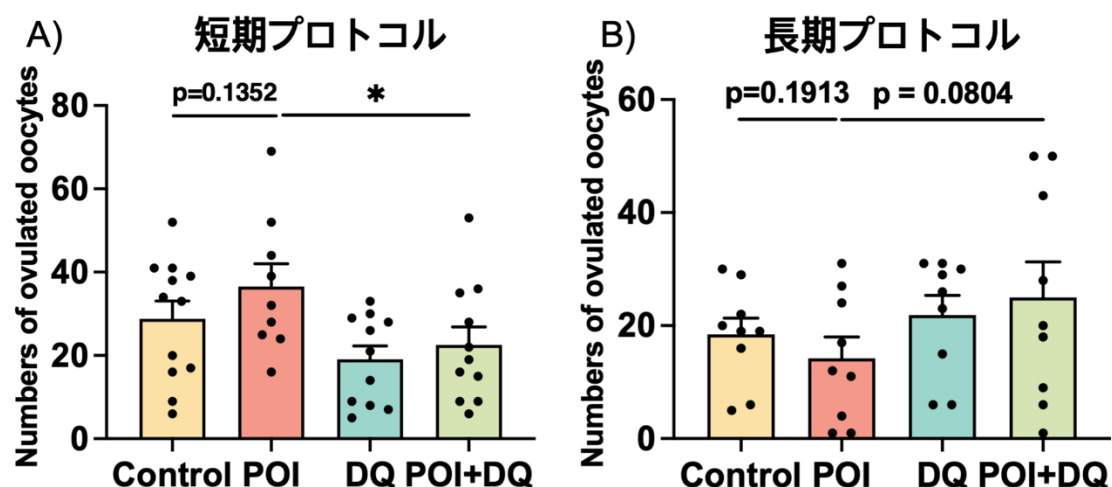


図 20. 排卵誘発実験における排卵数の結果。

A) 短期プロトコルでは、Cy あるいは溶媒投与後の 7 日目に 4 群のマウス (Control, n=12; POI, n=9; DQ, n=11; POI+DQ, n=11) に PMSG 10IU を投与し、更に 48 時間後に hCG 10IU を投与した。hCG を投与した 12~14 時間後にマウスの卵管膨大部から卵子を採取した。B) 長期プロトコルでは、Cy 投与後の 14 日目、28 日目、及び 42 日目に 4 群のマウス (Control, n=9; POI, n=9; DQ, n=9; POI+DQ, n=9) に PMSG・hCG を投与した。最後の hCG 投与後 12~14 時間後にマウスの卵管膨大部から卵子を採取した。平均値±SEM で示した。有意差 $p<0.05$ とし、*で示す。

POI モデルマウスの妊孕能は加齢に伴い Control より早く低下し、DQ の全身投与により改善した

最後に、DQ 投与の POI モデルマウスの生殖機能に与える影響を検証するために、交配実験を行った。Control, POI, POI+DQ 群において、Cy あるいは溶媒投与後 7 日目に交配を開始し、36 日 (交配 1 日+妊娠 21 日+産休 14 日) を 1 交配周期として交配を繰り返し、各周期の産仔数を計測した。図 18 に示すように、5 周期目 (およそ 36 週齢) まではいずれの群でも産仔数は保たれており、一方で、7 周期目 (およそ 46 週齢) 以降は、いずれの群でも産仔数は加齢により減少していた。POI 群の産仔数は、5 周期目では他の群と比較し差がなかった

が、6 周期（およそ 41 週齢）に、POI 群の産仔数は Control 群に比べ有意に減少した（POI vs. Control, 5.75 ± 0.63 vs. 8.67 ± 0.88 , $p=0.0194$ ）。一方で、DQ を投与した POI 群の産仔数は、POI 群と比較して有意に増加していた（DQ vs. POI, 8.00 ± 0.41 vs. 5.75 ± 0.63 , $p=0.0120$ ）。以上より、DQ の全身投与は、POI 群において control 群より早く進行する妊孕能の低下に対し、予防的な効果を持つことが示唆された。

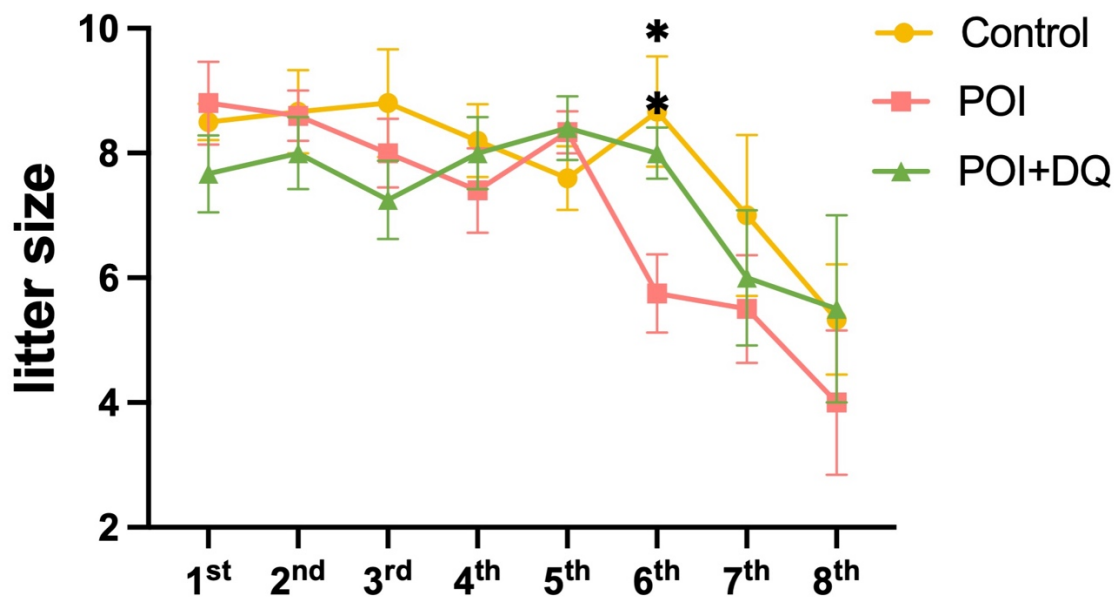


図 21. Control マウス、POI マウス、及び DQ 投与した POI マウスの産仔数
Cy あるいは溶媒投与後 7 日目に、マウス（Control, $n=5$; POI, $n=6$; POI+DQ, $n=6$ ）を雄マウスと交配させ、36 日（交配 1 日 + 妊娠 21 日 + 産休 14 日）を 1 交配周期とし、以降交配を繰り返した。各周期における産仔数を示す。結果を平均値 \pm SEM で示した。*は $p < 0.05$ （POI と比較した際）を示す。

考察

本研究の結果より、Cy 誘発性 POI モデルマウスの卵巣の顆粒膜細胞及び 4-HC で刺激した培養 hGCs では細胞老化マーカーである p16、p21、p53、および γ H2AX の発見が上昇しており、細胞老化が促進されることが明らかとなった。そしてこの POI モデルマウスおよび培養 hGCs で促進された細胞老化は、マウスに対する DQ の全身投与、培養 hGCs への DQ 投与により抑制されることが確認された。さらに POI モデルマウスにおいて SASP 因子である TGF- β 1 の血清濃度および顆粒膜細胞におけるそのタンパク質発現レベルはコントロール群に比し有意に増加しており、DQ の全身投与によりその血清濃度と顆粒膜細胞における発現は減少した。POI モデルマウスの卵巣では Burn-out が起きており、DQ 投与により部分的に改善した。また排卵誘発モデルを用いた検証においては、過排卵刺激時の排卵数は、POI モデルマウスでは Burn-Out のために Control と比べ短期的には増加し長期的には減少する可能性にあったが DQ 投与によりそれらの可能性は抑制された。さらに、POI モデルマウスの妊孕能は加齢に伴い Control より早く低下したが、DQ の全身投与により改善することが示された。

本研究ではまず Cy により卵巣顆粒膜細胞で細胞老化が惹起されるかどうかを調べた。炎症、放射線、及び酸化ストレスなど、様々なシグナルにより細胞老化は誘導される[14]。老化細胞は、細胞周期停止、アポトシス抵抗性、SASP 因子の産生増加などを特徴とする。p16、p21、p53、 γ -H2AX、IL-6、IL-8、IL-1 α 、SA- β -Gal および TGF- β 1 などが細胞老化マーカーとして認識されている[52]。本研究においては、Cy の活性代謝物である 4-HC が培養 hGCs にお

ける p16、p21、p53、 γ -H2AX のタンパク質発現量および SA- β -Gal 活性を上昇させることを示した。これらの知見は、Cy により培養マウス卵巣顆粒膜細胞において p16、p53、 γ -H2AX のタンパク質発現量および SA- β -Gal 活性が上昇することを報告した先行研究の結果と矛盾しない[53]。さらに我々の仮説を証明するため、Cy 誘発性の POI マウスモデルの卵巣における細胞老化について調べた。POI モデルマウスでは、胞状卵胞の顆粒膜細胞において p16、p21、p53、および γ -H2AX のタンパク質発現が増加していた。老化細胞の蓄積とそこから分泌される SASP 因子により組織構造や機能に障害が生じたり、またパラクライン及び全身的な影響を生じ、線維化、慢性炎症等をもたらすと考えられる[54]。本研究では、POI モデルマウスにおいて TGF- β 1 の血清中濃度及び顆粒膜細胞でのタンパク質発現量が増加していることを示した。この結果は老化した顆粒膜細胞がこの SASP 因子を分泌していることを示唆しているが、Cy 刺激により他の細胞から分泌される TGF- β 1 により血清中濃度が上昇している可能性については否定できない。これまで細胞老化は、シスプラチンやドキソルビシンなどの他の抗がん剤による卵巣機能障害において、誘導されていることが報告されている[25, 55]。本研究の結果とこれらの研究結果より、細胞老化は抗がん剤による卵巣機能障害において重要な役割を果たしていることが強く示唆される。

Senolytics は、老化細胞内の抗アポトーシス経路（SCAPs）を無効にすることにより、老化細胞を除去する作用を有する[19, 54, 56]。Senolytics は、老化関連疾患のみならず、変形性関節症や新型コロナウイルス感染症などの様々な炎症関連疾患に対し有望な治療法となり得ることが報告されている[21, 57]。現在

DQ は、糖尿病性腎障害[58]および特発性肺線維化[20]の臨床第 II 相試験で使用されている。本研究では、培養 hGCs を用いた実験においては 4-HC 刺激の 24 時間前に DQ を投与し、マウスを用いた実験においては Cy を投与する日から連続 3 日間 DQ を投与した。DQ 投与により、顆粒膜細胞における細胞老化マーカーの p16、p21、p53、および γ -H2AX の発見量が in vivo および in vitro 両方で減少した。さらに、TGF- β 1 の血清中濃度及び顆粒膜細胞でのタンパク質発見量は、POI 群よりも POI+DQ 群で有意に低下していた。これらの結果は、Cy により誘導された老化顆粒膜細胞は DQ 投与により除去され、卵巣における老化細胞の負荷が軽減したことを示唆している。

化学療法による POI の機序には二つあると考えられている。一つは原始卵胞の卵母細胞 DNA の直接的な損傷であり、もう一つは休眠状態にある原始卵胞を活性化させ原始卵胞のプールを枯渇させる、いわゆる「Burn-out」である[10]。本研究では POI モデルマウスで「Burn-out」現象が観察された。これらのマウスでは、成長卵胞（一次卵胞+二次卵胞+胞状卵胞）の休眠卵胞（原始卵胞）に対する比率が control に比し有意に増加し、さらに閉鎖卵胞も有意に増加した。排卵誘発の短期プロトコルでは、Cy により休止状態の卵胞が大量に活性化されたため、POI 群の排卵数は Control 群よりも多い傾向にあり、一方、繰り返し排卵誘発を行った長期プロトコルでは POI 群では原始卵胞のプールが枯渇したため Control 群よりも排卵数が少ない傾向にあったと考えられた。またマウスの加齢に伴う生殖能力の変化を調べたところ、第 6 回目の交配周期には、POI 群では control 群より有意に産仔数が減少した。この結果は、POI 群では生殖能力が早く低下し、若年期の Cy 投与により卵胞の早期喪失が起きるこ

とが示唆された。一方で、DQ 投与により、成長卵胞の休眠卵胞に対する比率、閉鎖卵胞の割合は有意に改善し、また排卵誘発周期における Burn-out が改善する傾向を認め、さらに高年齢期における生殖能力の有意な改善を認めた。これまでの他の抗がん剤を投与した POI モデルを用いた研究において、DQ の投与は、シスプラチン誘発 POI の卵巣機能改善には効果がある一方、ドキソルビシン誘発 POI の卵巣予備能や生殖能力を改善しなかった[25, 55]。抗がん剤が性腺毒をきたす機序は、抗がん剤の種類によって異なる。シスプラチンと Cy は Burn-out を誘導し、ドキソルビシンは原始卵胞の DNA 損傷を引き起こすことが報告されている[59]。これらの機序の違いが、Senolytics である DQ の有効性の違いと関連する可能性がある。また、Cy を投与したマウスに AMH を投与する実験において原始卵胞の喪失と生殖能力の低下が抑制される、すなわち Burn-out が改善することにより卵巣予備能や生殖能力が改善することが実際に示されている[60]。

本研究の限界としては以下の点が挙げられる。まず、本研究においては卵胞発育の後期段階にある卵胞の顆粒膜細胞に注目した。理由の一つは、in vitro の実験において利用できる hGCs は体外受精治療患者の採卵時に採取するため、後期段階の卵胞由来のもののみである。また本研究において、幾つの細胞老化のマーカーの発現変化によって細胞老化が促進しているかどうかを評価した。しかし卵巣顆粒膜細胞は初代細胞でそもそも増殖能力を持ってないため、これらの細胞において、細胞老化により増殖停止したかどうかは検証できない。さらに、原始卵胞では休止状態を維持するために p16 と p21 の発現量は高くなっていることが報告されているため[61]、原始卵胞において細胞老化マーカー高

発現をする場合に、それが細胞老化によるものであるかどうかを判断することは困難であることが予想される。今後は卵胞培養の手法を用いることで、休眠状態にある原始卵胞や一次卵胞などのより未成熟な卵胞における細胞老化現象を明らかにする必要があると考える。また本研究では、senolytics である DQ が Cy によって蓄積した老化顆粒膜細胞の除去に有効であることと、POI モデルの卵巣機能、生殖機能を改善することを示したが、蓄積した老化顆粒膜細胞が卵巣機能障害をひきおこす機序の詳細を調べてはいない。我々はその機序として、本研究は、蓄積した老化顆粒膜細胞が TGF- β 1 などの SASP 因子を分泌することによって局所環境を悪化させ、生理的に緻密な制御下にある卵胞の発育および成熟過程を傷害し、Burn-out に至ると想定している。また本研究において DQ の投与により細胞老化マーカーの発現量が減少したが、この原因が DQ によって蓄積した老化顆粒膜細胞が除去されたためなのか、あるいは Senomorphics 作用の様な他の機序によるためなのかは明らかになっていない。今後の研究では、最も性腺毒性の高い抗がん剤である Cy による卵巣機能障害を予防する対策を確立するために、Cy により蓄積した老化顆粒膜細胞が卵巣機能障害をひきおこす機序及び DQ の老化顆粒膜細胞への作用機序が解明される必要がある。

現在、Senolytics に関する臨床試験が様々な疾患において行われている。特発性肺線維化症における Senolytics である DQ 療法の安全性は phase 1 臨床試験で証明された (NCT02874989) [62]。また DQ 投与によりアルツハイマー病進行を調節する複数の phase 2 臨床試験が進行中である (NCT04785300、NCT04063124、NCT04685590)。さらに Senolytics である Fisetin は SARS-CoV-2

感染症の予防及び進行に対する効果を検証する臨床試験（NCT04476953）も行われている。このように、Senolytics は様々な疾患において安全性、有効性が示されつつあり、さらに新規の Senolytics の開発も進んでいる。本研究において、Cy 誘発性の卵巣毒性に対して Senolytics による卵巣保護効果が示唆された。今後さらなる研究を重ねることにより、senolytics や senomorphics などの細胞老化現象をターゲットとした治療法が抗がん剤治療を受ける若年女性の卵巣保護戦略となることが期待される。

結論

結論として、本研究では Cy 誘発性 POI の卵巣顆粒膜細胞において細胞老化が促進されることを明らかにした。卵巣内に蓄積した老化細胞は不妊症の一因となると考えられ、老化細胞を除去する senolytics の投与により卵巣機能が部分的に回復することが示唆された。老化細胞を標的とした DQ などの senolytics は、Cy による卵巣機能障害に対する有望な治療戦略となり、若年がん患者の妊娠能を含めた長期的な健康維持に資することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました原田美由紀准教授、平池修准教授、大須賀穰教授に心よりお礼を申し上げます。同時に、研究生生活にご支援くださった岩城留学生奨学会および渥美国際交流財団に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. R. Lew, Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 55: 2-13. 2019.
2. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*, 114(6): 1151-1157. 2020.
3. K. Michio, Oncofertility Recent Advances in Fertility Preservation. N. Suzuki. 24, 2020.
4. M. Dolleman, et al., Reproductive and lifestyle determinants of anti-Mullerian hormone in a large population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(5): 2106-15. 2013.
5. R. L. Mulder, et al., Fertility preservation for female patients with childhood, adolescent, and young adult cancer: recommendations from the PanCareLIFE Consortium and the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Lancet Oncol*, 22(2): e45-e56. 2021.
6. A. Seyhan, B. Ata and G. Uncu, The Impact of Endometriosis and Its Treatment on Ovarian Reserve. *Semin Reprod Med*, 33(6): 422-8. 2015.
7. W. H. Wallace and T. W. Kelsey, Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*, 5(1): e8772. 2010.
8. D. Meirou, Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169(1-2): 123-131. 2000.
9. S. J. Chon, Z. Umair and M. S. Yoon, Premature Ovarian Insufficiency: Past, Present, and Future. *Front Cell Dev Biol*, 9: 672890. 2021.
10. L. Kalich-Philosoph, et al., Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med*, 5(185): 185ra62. 2013.
11. A. J. Hsueh, et al., Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev*, 36(1): 1-24. 2015.
12. S. Morgan, et al., How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update*, 18(5): 525-35. 2012.
13. T. Tchkonja, et al., Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, 123(3): 966-72. 2013.
14. S. Khosla, et al., The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nat Rev Endocrinol*, 16(5): 263-275. 2020.
15. Y. He, et al., Cellular senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis. *Transl Res*, 209: 14-21. 2019.
16. F. Debacq-Chainiaux, et al., Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4(12): 1798-806. 2009.
17. A. R. Davalos, et al., p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol*, 201(4): 613-29. 2013.
18. T. Tchkonja and J. L. Kirkland, Aging, Cell Senescence, and Chronic Disease: Emerging Therapeutic Strategies. *Jama*, 320(13): 1319-1320. 2018.

19. J. L. Kirkland and T. Tchkonian, Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*, 21: 21-28. 2017.
20. J. N. Justice, et al., Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, 40: 554-563. 2019.
21. Y. Zhu, et al., The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4): 644-58. 2015.
22. S. Chaib, T. Tchkonian and J. L. Kirkland, Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med*, 28(8): 1556-1568. 2022.
23. E. O. Wissler Gerdes, et al., Strategies for late phase preclinical and early clinical trials of senolytics. *Mech Ageing Dev*, 200: 111591. 2021.
24. J. D. Hense, et al., Senolytic treatment reverses obesity-mediated senescent cell accumulation in the ovary. *Geroscience*, 44(3): 1747-1759. 2022.
25. D. Du, et al., Senotherapy Protects against Cisplatin-Induced Ovarian Injury by Removing Senescent Cells and Alleviating DNA Damage. *Oxid Med Cell Longev*, 2022: 9144644. 2022.
26. A. Palaniyappan, Cyclophosphamide induces premature senescence in normal human fibroblasts by activating MAP kinases. *Biogerontology*, 10(6): 677-82. 2009.
27. V. Gorgoulis, et al., Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4): 813-827. 2019.
28. E. Hara, et al., Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, 16(3): 859-67. 1996.
29. C. Wang, et al., DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*, 8(3): 311-23. 2009.
30. G. P. Dimri, et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20): 9363-7. 1995.
31. J. C. Acosta, et al., Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6): 1006-18. 2008.
32. J. A. Visser and A. P. Themmen, Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 234(1-2): 81-6. 2005.
33. H. Koike, et al., Notch Signaling Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Cumulus-Oocyte Complex Expansion in Polycystic Ovary Syndrome. *Biomolecules*, 12(8). 2022.
34. C. Kunitomi, et al., Induction of aryl hydrocarbon receptor in granulosa cells by endoplasmic reticulum stress contributes to pathology of polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod*, 27(3). 2021.
35. C. Kunitomi, et al., Activation of endoplasmic reticulum stress mediates oxidative stress-induced apoptosis of granulosa cells in ovaries affected by endometrioma. *Mol Hum Reprod*, 26(1): 40-52. 2020.
36. N. Takahashi, et al., Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep*, 7(1): 10824. 2017.
37. L. Ophir, et al., Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. *Mol Cell Endocrinol*, 384(1-2): 165-74.

- 2014.
38. M. E. de Jonge, et al., Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet*, 44(11): 1135-64. 2005.
39. S. Lau, et al., Effects of acrolein in comparison to its prodrug cyclophosphamide on human primary endothelial cells in vitro. *Toxicol In Vitro*, 62: 104685. 2020.
40. J. Dynes, et al., Low-dose metronomic delivery of cyclophosphamide is less detrimental to granulosa cell viability, ovarian function, and fertility than maximum tolerated dose delivery in the mouse. *Biol Reprod*, 97(3): 449-465. 2017.
41. Y. Luan, et al., Inhibitors of apoptosis protect the ovarian reserve from cyclophosphamide. *J Endocrinol*, 240(2): 243-256. 2019.
42. Z. Nie, et al., The protective effects of pretreatment with resveratrol in cyclophosphamide-induced rat ovarian granulosa cell injury: In vitro study. *Reprod Toxicol*, 95: 66-74. 2020.
43. K. Kovacovicova, et al., Senolytic Cocktail Dasatinib+Quercetin (D+Q) Does Not Enhance the Efficacy of Senescence-Inducing Chemotherapy in Liver Cancer. *Front Oncol*, 8: 459. 2018.
44. M. Han, et al., Abnormal aggregation of myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of cyclophosphamide-induced premature ovarian failure. *Gynecol Endocrinol*, 35(11): 985-990. 2019.
45. N. Pascuali, et al., Ceramide-1-phosphate has protective properties against cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure. *Hum Reprod*, 33(5): 844-859. 2018.
46. J. Iske, et al., Senolytics prevent mt-DNA-induced inflammation and promote the survival of aged organs following transplantation. *Nat Commun*, 11(1): 4289. 2020.
47. M. Xu, et al., Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*, 24(8): 1246-1256. 2018.
48. M. Myers, et al., Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127(5): 569-80. 2004.
49. P. Osman, Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J Reprod Fertil*, 73(1): 261-70. 1985.
50. C. A. Schneider, W. S. Rasband and K. W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7): 671-5. 2012.
51. L. Mei, et al., Phospho-histone H2AX is a diagnostic and prognostic marker for epithelial ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5): 5597-602. 2015.
52. B. G. Childs, et al., Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*, 16(10): 718-735. 2017.
53. Y. Xiong, et al., Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway. *Gene*, 596: 1-8. 2017.
54. J. L. Kirkland, et al., The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc*, 65(10): 2297-2301. 2017.

55. Y. Gao, et al., Increased cellular senescence in doxorubicin-induced murine ovarian injury: effect of senolytics. *Geroscience*. 2023.
56. J. Chang, et al., Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*, 22(1): 78-83. 2016.
57. C. D. Camell, et al., Senolytics reduce coronavirus-related mortality in old mice. *Science*, 373(6552). 2021.
58. L. J. Hickson, et al., Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*, 47: 446-456. 2019.
59. K. J. Szymanska, X. Tan and K. Oktay, Unraveling the mechanisms of chemotherapy-induced damage to human primordial follicle reserve: road to developing therapeutics for fertility preservation and reversing ovarian aging. *Mol Hum Reprod*, 26(8): 553-566. 2020.
60. C. Sonigo, et al., AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. *FASEB J*, 33(1): 1278-1287. 2019.
61. A. Bayrak and K. Oktay, The expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p15, p16, p21, and p27 during ovarian follicle growth initiation in the mouse. *Reprod Biol Endocrinol*, 1: 41. 2003.
62. A. Nambiar, et al., Senolytics dasatinib and quercetin in idiopathic pulmonary fibrosis: results of a phase I, single-blind, single-center, randomized, placebo-controlled pilot trial on feasibility and tolerability. *EBioMedicine*, 90: 104481. 2023.

略語

AMH: anti- Müllerian hormone

POI: Premature Ovarian Insufficiency

4-HC: 4-Hydroperoxy Cyclophosphamide

Cy: cyclophosphamide

DQ: Dasatinib/Quercetin

hCG: human chorionic gonadotropin

hGCs: human granulosa-lutein cells

IL: interleukin

IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis

CDK: cyclin-dependent kinase

PMSG: pregnant mare serum gonadotropin

PVDF: polyvinylidene difluoride

QOL: Quality of life

SASP: senescence-associated secretory phenotype

SA- β -gal: senescence-associated β -galactosidase

SCAPs: senescent cells anti-apoptotic pathways

TGF- β 1: transforming growth factor-beta1

γ H2AX: Phospho-Histone 2AX