

**論文の内容の要旨**  
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

氏名 徐子焮 Xu Zixin

**【背景】**

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、がん治療後の人生における生活の質（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。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。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。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。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。

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巢予備能に依存する。シクロホスファミド（cyclophosphamide, Cy）は、最も広く使用されている性腺毒性のリスクが最も高い抗がん剤の一つである。実際に、Cy を使用した治療を受けた女性の 42% が早発卵巢機能不全（premature ovarian insufficiency, POI）に直面したとされている。POI とは、40 歳未満の女性において卵巢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。化学療法による卵巢毒性のメカニズムはまだ十分に解明されていない。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。

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。老化した細胞から生理活性物質（SASP 因子）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。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関与する。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、 $\gamma$ H2AX、及び SASP 因子 (transforming growth factor  $\beta$ -1, TGF  $\beta$ -1 や interleukin-6, IL-6 など) の発現増加、及び老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -gal) の活性化が挙げられる。

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。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患者の身体機能が改善されることが示唆された。本研究では、Cy で誘発した早発卵巣機能不全 (POI) において細胞老化現象が引き起こされるか、および senolytics である DQ が Cy による性腺毒性に対して保護的な役割を果たすかを検討した。

#### 【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 (anti- Müllerian hormone) などの抑制因子によって dormant state (停止状態) となっている。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。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 (原始卵胞のプールの枯渇) が起きるのではないか、という仮説を立てた。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。

#### 【方法】

本研究では、体外受精治療の採卵時に採取したヒト顆粒膜細胞 (human granulosa cells, hGCs) の培養系、および C57BL/6J マウスを用いて、体外と体内においてそれぞれに仮説を検証した。hGCs においては、Cy の活性型代謝産物である 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-HC) ならびに DQ 刺激により、Western Blot 法で細胞老化マーカーの発現量、細胞免疫染色法で SA- $\beta$ -gal 活性化を検証した。C57BL/6J マウスに対しては、Cy を単回投与し POI モデルを作成し、卵巣における細胞老化現象、DQ 投与の効果を検証した。組織免疫染色法を用いて卵巣顆粒膜細胞における細胞老化マーカー、SASP 因子 TGF- $\beta$ 1 の発現量を測定した。さらに血清中 TGF- $\beta$ 1 の濃度を ELISA 法を用いて測定した。更に、排卵誘発実験および交配試験を行いマウスの卵巣機能、生殖能力を検証した。

#### 【結果】

hGCs において、Cy の活性型代謝物である 4-HC 刺激により細胞老化マーカー p16、p21、p53 および  $\gamma$ H2AX の発現量と SA- $\beta$ -Gal 活性が有意に増加し、これらは DQ 投与により有意に減少した。また、POI モデルマウスの卵巣顆粒膜細胞において細胞老化マーカー p16、p21、p53 および  $\gamma$ H2AX の発現量は有意に増加しており、DQ の全身投与によりこれらは有意に減少した。更に、POI モデルマウスでは、血清 TGF- $\beta$ 1 濃度と顆粒膜細胞における TGF- $\beta$ 1 発現量が有意に増加しており、DQ の全身投与によってそれらは有意に減少した。マウスは Cy の投与により、原始卵胞と一次卵胞が減少し、二次卵胞、胞状卵胞および閉鎖卵胞が増加した。原始卵胞と一次卵胞が減少、とそれに伴う二次卵胞と胞状卵胞の増加現象は

「Burn-out」と呼ばれ、DQ の投与によりこれらの現象は部分的に回復した。さらに、コントロールマウスと比べると、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、短期的には control 群に比べより多くの卵子を排卵する可能性があり、これは DQ の投与により有意に抑制された。長期的にはより少ない卵子を排卵する可能性があり、これは DQ の投与により抑制される傾向があった。POI モデルマウスの妊孕能は加齢に伴いコントロールマ

ウスより早く低下した、すなわちおよそ 41 週齢で有意に産仔数が減少したが、DQ の全身投与によりコントロールと同程度に改善した。

#### 【結論】

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ける細胞老化が促進され、病態形成に寄与することが初めて示された。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、Senolytics である DQ 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うる。若年がん患者の妊孕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。