

氏 名	劉 (西島) 昌恵
(ふりがな)	(ゆ (にしじま) まさえ)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙 第 1204 号
学位審査年月日	令和 2 年 8 月 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題名	The protective effect of testosterone on the ovarian reserve during cyclophosphamide treatment (シクロフォスファミド誘因性卵巣毒性に対するテストステロンによる卵巣保護効果)
論文審査委員	(主) 教授 朝日 通雄 教授 高井 真司 教授 廣瀬 善信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

近年では化学療法によって悪性腫瘍患者の予後が改善してきている一方で、特に卵巣機能を有する若年女性においては、卵巣機能不全や不妊症等の重大な副作用が深刻な問題となっており、優先度の高い解決すべき課題となっている。

シクロフォスファミド (Cyclophosphamide: CPA) は、悪性腫瘍や自己免疫性疾患などの治療に用いられる一般的なアルキル化剤であるが、アメリカ臨床腫瘍学会 (ASCO) や小児がんサバイバー研究 (CCS) では、卵巣機能障害や不妊症の原因となる高リスクな薬剤と位置付けている。CPA の卵巣毒性の機序の一つとして、卵胞の顆粒膜細胞や莢膜細胞のアポトーシスによる卵胞消失が原因と報告されている。

テストステロン (Testosterone: Ts) は正常な卵胞形成に必須なホルモンであり、インスリン様成長因子-1 (Insulin like growth factor-1: IGF-1) の発現増加に伴う初期卵胞発育の誘導や、アンドロゲン受容体を介した FSH 受容体数の増加や感受性の増加などによって卵胞の成長および発育に関与している。しかし、高濃度 Ts 下では FSH 制御系を介して卵胞発育が停止し、未熟卵胞が増加することが知られている。一方で、GnRH アナログは、顆粒膜細胞の増殖や卵胞発育を抑制することで未熟卵胞の状態を維持する作用が知られており、現行では化学療法関連無月経の予防薬として使用されている。この GnRH アナログ効果と同様に、高濃度 Ts 状態も卵胞発育停止を誘導する。そこで、本研究は化学療法による卵巣機能低下の予防として Ts の可能性に注目し、CPA による卵巣機能低下に対する Ts による保護効果を検討した。

《方 法》

In vitro 実験

1. COV434 (ヒト顆粒膜細胞腫不死化細胞株) における、CPA による細胞生存率の変化の検討とそれに対する Ts や Flutamide の前添加の影響

CPA の COV434 における細胞生存率におよぼす影響を、CPA を濃度別 (0、1、10、100、1000 μM) に添加し、48 時間後に MTS assay をすることで検討した。また、Ts を濃度別 (0、10、100 nM) に前添加し、CPA の細胞生存率におよぼす影響にどのように変化するかを検討した。さらに、抗アンドロゲン作用を有する Flutamide を前添加し Ts による変化を検討した。Ts および Flutamide の前添加は CPA 添加の 6 時間前とした。

2. COV434 における、CPA によるアポトーシスの誘導の検討と、それに対する Ts や Flutamide の前添加の影響

CPA100 μM 添加による COV434 のアポトーシスの誘導が、Ts の濃度別 (0、10、100 nM) 前添加と Flutamide の有無によってどの程度変化するのかを、cleaved caspase-3 抗体による免疫染色にて蛍光顕微鏡で評価した。アポトーシス細胞である cleaved caspase-3 陽性細胞は DAPI 蛍光色素によって色素集積され、FACS 装置により検出される。以上の原理

を用いて、cleaved caspase-3 陽性細胞の割合を評価することで COV434 のアポトーシスの発現を検討した。また、Western blotting 法においても蛍光顕微鏡と同条件で行い、薬剤添加後 48 時間後に蛋白を回収し、Bim EL と cleaved caspase-3 のアポトーシス関連蛋白の発現を検討した。

In vivo 実験

3. マウスへの CPA 投与による、卵胞形成の変化の検討とそれに対する Ts 投与の影響

6 週令の BALB/c 雌マウスを用いて、コントロール群 (PBS 1ml i.p.)、CPA 単独群 (100 mg/kg i.p.)、CPA+Ts 群 (CPA 100mg/kg i.p.、Ts 4mg/kg s.c.) の 3 群を作製した (BALB/c 雌マウス、各群 5 匹ずつ合計 15 匹)。薬剤の投与をそれぞれ 1、4、7 日目とし (Ts のみ単独で 10 日目にも投与)、14 日目に安楽死させたのちに解剖を行った。摘出卵巣をホルマリン固定後に 4 μ m 厚に薄切し HE 染色を行い、各群の各ステージ (原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、黄体、閉鎖卵胞) の卵胞数をカウントし、3 群間で比較検討し、薬剤の卵巣への影響を評価した。

4. マウスへの CPA 投与による、血清における卵巣予備能の指標 anti-Müllerian hormone (AMH) 値の変化の検討と、それに対する Ts 前投与の影響

マウス解剖時に心臓より採血した血清中の AMH を ELISA 法を用いて測定し、各群の数値を比較検討した。

5. マウスへの CPA 投与による、アポトーシス誘導の検討と、それに対する Ts 投与の影響

方法 3 で得たマウスの卵巣の組織切片を抗 cleaved caspase-3 抗体を用いて免疫染色をした。Cleaved caspase-3 は細胞質内にドット状に濃染されるため、濃染された顆粒膜細胞を持つ卵胞を cleaved caspase-3 陽性卵胞とし、アポトーシスの指標とした。それぞれの条件下での cleaved caspase-3 陽性卵胞数をカウントし、全卵胞数当たりの陽性卵胞率を算出し比較検討した。

《結 果》

In vitro 実験

1. COV434 の細胞生存率は CPA 濃度依存性に減少した。Ts を前添加すると、Ts 濃度依存性に CPA による細胞生存率の減少を有意に改善した。また、Ts と同時に抗アンドロゲン製剤である Flutamide を前添加すると Ts による細胞生存率の改善効果が消失した。
2. 蛍光顕微鏡では CPA によってアポトーシスを受けた細胞は蛍光色素により染色され、Ts を前添加すると Ts 濃度依存性に CPA によるアポトーシス細胞陽性率の減少を認めた。また、Flutamide を前添加すると Ts の効果が抑制され、アポトーシス細胞陽性率が増加した。次に Western blotting 法では、Bim EL と cleaved caspase-3 のアポトーシス関連蛋白は CPA 添加により発現増加を認めたが、これらは Ts 前添加により発現が抑制された。さらに Flutamide を前添加すると Ts による発現の抑制が認められなくなった。

In vivo 実験

3. 原始卵胞は、CPA 群で PBS 群と比較して有意に減少を認めており、CPA+Ts 群では CPA 群と比較して有意に改善していた。一次卵胞と二次卵胞および黄体は、各群における卵胞数に有意差は認めなかった。閉鎖卵胞は、CPA 群で PBS 群と比較して有意に増加を認めており、CPA+Ts 群では CPA 群と比較して有意に改善していた。
4. 血清 AMH 値では、CPA 群の中央値は 11.2 [8.9-12.1] ng/ml であるが、PBS 群の中央値 12.8 [12.0-14.6] ng/ml と比較して有意に低かった。さらに、CPA+Ts 群の中央値 16.2 [9.7-22.6] ng/ml は CPA 群と比較すると有意に高かった。
5. Cleaved caspase-3 陽性卵胞率を 3 群間で比較したところ、CPA 群では PBS 群に比較し有意に高く、CPA+Ts 群では CPA 群と比較し有意に低かった。

《考 察》

in vitro 実験においては、CPA による卵巣障害は、アポトーシスシグナルの発現増加を認めることで示唆され、さらにそれは CPA 濃度依存性であるが、Ts を併用することで CPA 単独で認めていたアポトーシス作用が Ts 濃度依存性に減弱することが示唆された。また、この減弱が Flutamide を前添加することで消失することにより、アンドロゲン受容体を介した作用であることが示唆された。

in vivo 実験においては、CPA 投与により原始卵胞が減少しアポトーシスの産物である閉鎖卵胞の増加を認めるが、Ts を前投与することで CPA のアポトーシス作用が抑制されることが示唆された。また、卵巣予備能の指標として用いられる AMH 値においても Ts を前投与することで CPA による卵巣予備能の減少が抑制されることが示唆された。さらに、CPA 投与により増加した cleaved caspase-3 陽性卵胞率は、Ts 前投与により減少し、CPA によるアポトーシス変化が Ts 前投与により抑制されることが示唆された。

《結 論》

卵巣細胞において、CPA 単独投与で認めていたアポトーシス作用が、Ts 併用により減弱していることを、*in vitro* 実験および *in vivo* 実験の 両方で認めた。Ts は CPA による卵巣障害に対して新たな予防策として期待できると考えられる。

論文審査結果の要旨

近年、若年女性における化学療法誘発性卵巣機能不全が深刻な問題である一方、未だ有効な予防策がなく新たな予防治療策が望まれる。本研究は卵巣毒性の強い代表的なアルキル系抗癌剤のシクロフォスファミド (CPA) を用いてアポトーシスを惹起させた卵巣障害モデルを作製し、抗アポトーシス作用が示唆されるテストステロンを用いて、卵巣障害に対する保護作用について検討した。

申請者はまず、ヒト顆粒膜細胞腫不死化細胞株である COV434 を用いて Ts を濃度別に前添加後、CPA を濃度別に添加し MTS assay、蛍光顕微鏡、Western blotting を行いアポトーシスの誘導について検討した。また、抗アンドロゲン製剤 Flutamide を前添加することで、Ts 効果への影響を評価した。その結果、CPA によって受けたアポトーシスシグナルは Ts により有意に改善され、Flutamide を前添加すると Ts の効果は抑制されることを明らかにした。さらにマウスを用いて、コントロール群、CPA 群、CPA+Ts 群の 3 群を作製し、卵胞数カウント、血清 AMH 値測定、卵巣の抗 cleaved caspase-3 抗体による免疫染色を行い、CPA によるアポトーシス誘導作用および卵巣予備能減少作用、さらに Ts による CPA のそれぞれの作用への影響について検証した。その結果、CPA によるアポトーシス誘導作用と卵巣予備能減少作用は *in vivo* においても確認され、加えて Ts が CPA によるそれぞれの作用を抑制していることも明らかにした。

申請者は、*in vitro* 実験及び *in vivo* 実験の両面の検討で、卵巣細胞における CPA のアポトーシス作用を Ts が抑制することを明らかにした。これは、Ts が CPA による卵巣毒性からの保護効果を有し、GnRH アナログに代替しうる新たな予防法としての可能性を示唆するものである。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Onco Targets and Therapy 13: 2987-2995, 2020 Apr

doi: 10.2147/OTT.S242703