

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24021

研究課題名（和文）がん患者の妊孕性温存に向けた化学療法の卵巣傷害機序の解明と新規卵巣保護法の開発

研究課題名（英文）The mechanism of chemotherapy-induced ovarian toxicity and the development of its preventive treatment

研究代表者

高橋 望 (Takahashi, Nozomi)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：20847280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん治療に伴う卵巣毒性によって、妊孕性の損失だけでなく、早発閉経に伴う晩期障害により長期的な影響を受ける。現時点ではがん治療に対する卵巣毒性を軽減する方法はない。本研究では、卵巣局所環境の変化に着目し、抗がん剤投与による早発卵巣機能不全を起こす機序を解明することを目的とした。抗がん剤投与早発卵巣機能不全モデルマウスを作成し、細胞老化関連遺伝子のタンパク発現が卵巣で上昇していることを明らかとした。細胞老化が病態に関与していること示唆された。今後の研究により、老化細胞を除去するセノリティクス薬を投与することにより、抗がん剤投与に伴う早発卵巣機能不全を予防する新たな治療戦略となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌治療の発展及び生殖医療の進歩に伴い、小児、思春期・若年成人のがんサバイバーに対する生活の質に対して注目が集まっている。がん治療に伴う卵巣毒性によって、妊孕性の損失だけでなく、早発閉経に伴う晩期障害により長期的な影響を受ける。現時点ではがん治療に対する卵巣毒性を軽減する方法はなく、卵巣毒性に対する分子生物学的メカニズムが完全には解明されていない。本研究によって、抗がん剤投与による卵巣毒性に細胞老化が関連していることが示唆され、老化細胞を除去するセノリティクス薬を投与することにより、抗がん剤投与に伴う早発卵巣機能不全を予防する新たな治療戦略となることが期待される。

研究成果の概要（英文）： Cancer treatment including chemotherapy induces ovarian toxicity such as infertility and the early menopause. At this stage, there is no treatment or prevention against ovarian toxicity. In this study, we focus on the microenvironment in the ovary, and explored the mechanism of chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency (POI). We established the chemotherapy induced premature ovarian insufficiency mouse models. We showed that the protein expression of cellular senescence markers were increased in the ovary of POI model. It suggested that the treatment of senolytic drug can be a good candidate for the treatment or prevention of chemotherapy-induced ovarian toxicity.

研究分野：生殖医療

キーワード：妊孕性温存 早発卵巣機能不全 癌生殖 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

近年、癌治療の発展及び生殖医療の進歩に伴い、小児、思春期・若年成人のがんサバイバーに対する生活の質(QOL)に対して注目が集まっている。なかでもがん治療に伴う卵巣毒性によって、妊孕性の損失だけでなく、早発閉経に伴う晩期障害により長期的な影響を受ける。高度生殖医療の発展により、妊孕性温存の方法として、精子・卵子凍結、受精卵凍結、卵巣凍結など多数の選択肢が提供されつつあるが、倫理的配慮、パートナーの有無、治療に伴うコストや身体的負担、情報提供から意思決定までの期間の短さなどが問題点としてあげられ、がん治療開始前に十分な情報提供の元、対策が必要な課題である。また、女性の場合、がん治療に伴う卵巣毒性による妊孕性の喪失だけではなく、早発閉経に伴う晩期障害に対しても考慮しなければならない。若年がんサバイバーが早発閉経に至ると長期的なホルモン補充療法を要し、定期的なフォローアップが必要となる。したがって、妊孕性温存だけでなく、長期的な女性のヘルスケアのためには、がん治療における卵巣毒性を軽減させ、早発卵巣機能不全を防ぐ方法が開発される必要がある。しかし、がん生殖医療の研究分野では、卵子凍結・卵巣凍結及び、卵胞培養など、妊孕性温存に特化した治療法が開発が進んでいる一方で、卵巣毒性のメカニズムの解明および卵巣毒性を軽減させる治療法の開発は十分に進んでいない。

抗がん剤投与による卵巣毒性のメカニズムとして、発育卵胞への直接的な影響と原始卵胞の活性化による卵子の枯渇が原因と考えられている。抗がん剤の投与により、発育卵胞の顆粒膜細胞におけるアポトーシスが誘導され、PI3K/PTEN/Akt 経路を介して原始卵胞の活性化を惹起し、原始卵胞の枯渇を引き起こす。また、卵巣皮質の線維化や卵巣血流の低下などの卵巣局所環境も影響を与えていると考えられる。卵胞発育・成熟過程において、卵巣では時間的・空間的に精緻な制御を受け周期的変化が起こっている。その制御機構の全容は未だ明らかではないが、至適な局所環境形成における卵巣局所因子の重要性が注目されている。申請者らはこれまで、卵巣局所環境を制御する卵巣局所因子として小胞体ストレスに着目してきた。小胞体ストレスとは異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に蓄積した状態を指し、タンパク質合成負荷の増大あるいは小胞体の処理能力低下を来す様々な生理的・病理的要因(例:細胞増殖、炎症、酸化ストレスなど)により惹起される。これまでの研究成果により、小胞体ストレスが卵巣における各種病態(多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過剰刺激症候群、黄体ホルモン分泌不全)に関与していることを明らかとした(Takahashi et al. Mol Cell Endocrinol 2016, Takahashi et al. Endocrinology 2017, Takahashi et al. Sci Rep 2017)。しかし、抗がん剤投与による卵巣局所環境の調節機構に与える影響については明らかとなっていない。

本研究では卵巣の局所因子として小胞体ストレス及び細胞老化に着目した。細胞老化(cellular senescence)とは、DNA 損傷、テロメアの短縮、癌遺伝子の活性化など様々な内的及び外的要因により、細胞周期が停止し、細胞が増殖できなくなった状態を示す。細胞老化は組織再生、加齢性疾患などに関与している。抗がん剤投与において、卵巣の線維化や血流障害、顆粒膜細胞のアポトーシスがおきることから、抗がん剤投与における卵巣機能障害において小胞体ストレスや細胞老化が重要な役割を担っているのではないかと着想した。また、小胞体ストレスや細胞老化の抑制剤はヒトに投与可能であ

ることから、新規卵巣保護剤として期待でき、臨床応用が現実的であるため、本研究計画の強い動機づけとなった。本研究によって、抗がん剤投与による卵巣局所環境・局所因子への影響が明らかとなれば、抗がん剤投与に伴う早発卵巣機能不全を予防する新たな治療戦略となることが期待される。

2．研究の目的

本研究では卵巣局所環境として小胞体ストレス及び細胞老化に着目し、抗がん剤投与による早発卵巣機能不全を起こすメカニズムを解明することを目的とする。ヒト顆粒膜細胞及び早発卵巣機能不全モデルマウスにおいて、抗がん剤投与が小胞体ストレス応答、細胞老化にどのような影響を与えるかを検証する。

3．研究の方法

(1) 7週齢の C57/BL6 マウスにシクロフォスファミド(75mg/kg)及び PBS を腹腔内投与し、7日後に卵巣を摘出する。摘出卵巣検体を用いて、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色を行い、各発育段階の卵胞数を計測する。また、発育卵胞における小胞体ストレス応答の活性化(sXBP1, ATF4, HSPA5, CHOP)と細胞老化関連因子(p21, p53, p16)を免疫染色法または定量的 PCR にて評価する。

(2) 体外受精患者の採卵時から採取されたヒト顆粒膜細胞を分離培養し、4-hydroperoxycyclophosphamide(4-HC) 10 μ Mを投与し、細胞老化関連因子の発現変化を定量的 PCR またはウエスタンブロット法にて評価する。

4．研究成果

(1) 研究結果

(a) 早発卵巣機能不全モデルマウスにおける小胞体ストレス及び細胞老化への影響

各発育段階の卵胞数を計測した。シクロフォスファミドを投与した群(POI 群)では、コントロール群と比較して、原始卵胞及び一次卵胞数が減少し、二次卵胞及び胞状卵胞数が増加しており、既報の早発卵巣機能不全モデルと同様の傾向を示した。

定量的 PCR で卵巣全体における小胞体ストレス応答因子及び細胞老化関連因子の mRNA 発現を比較すると、POI 群で p21, p53, p16 の発現が増加していた(図 1)。一方で、小胞体ストレス応答因子の mRNA 発現は両者で変化を認めなかった。

定量的 PCR で差を認めた細胞老化関連因子の発現について免疫染色法で比較したところ、発育卵胞の顆粒膜細胞において、POI 群では p21, p53, p16 の発現が増加していた(図 2)。また、また DNA 損傷を示す γ -H2AX の発現も顆粒膜細胞で増加していた。

(b) ヒト顆粒膜細胞におけるシクロフォスファミド投与の影響

ヒト顆粒膜細胞に 4-HC を投与し、24 時間後の p16, p21, p53, γ -H2AX のタンパク発現をウエスタンブロット法で評価すると、4-HC 投与群で発現が増加していた(図 3)。

In vivo, in vitro の結果により、抗がん剤投与により、発育卵胞の顆粒膜細胞に置いて DNA 損傷及び細胞老化が誘導されていることが示された。

図 1. コントロール(C)及び POI モデルの卵巣における p21, p53, p16, H2AX のタンパク発現

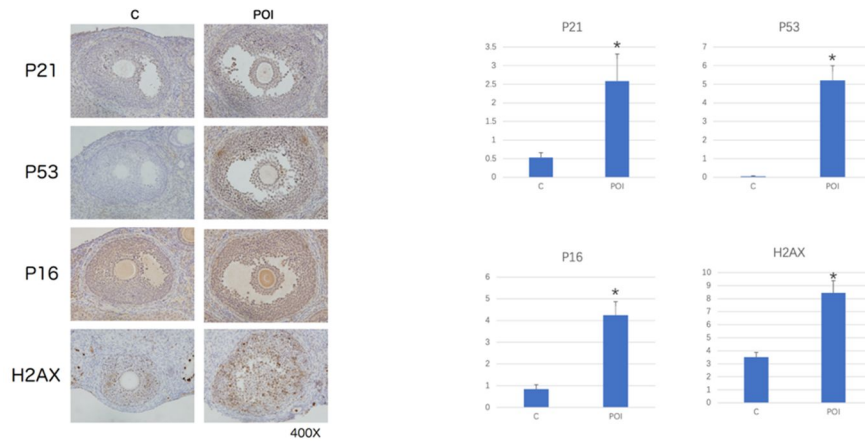


図 2. コントロール(C)及び POI(P)モデルの卵巣における p21, p53, p16 mRNA の発現

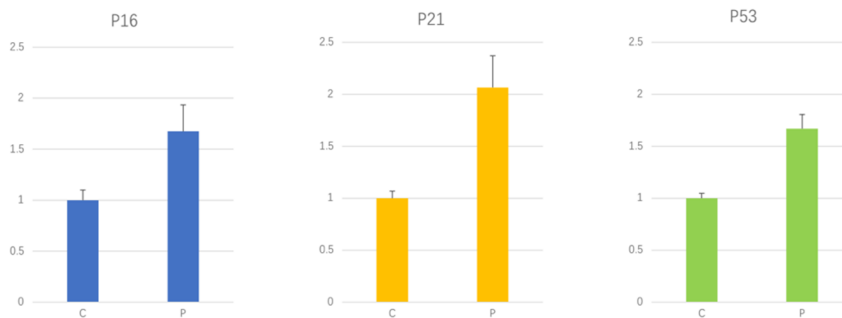
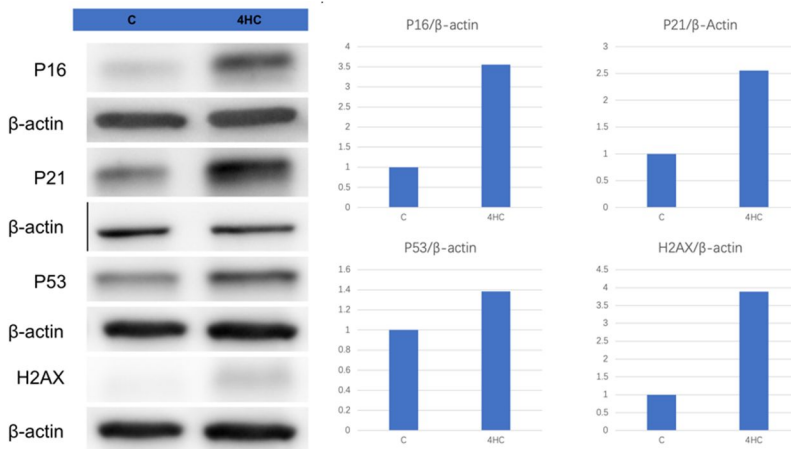


図 3. ヒト顆粒膜細胞における 4-hydroperoxycyclophosphamide(4-HC)による p16, p21, p53, H2AX の発現変化



(2)今後の展望

抗がん剤による早発卵巣不全を引き起こす詳細なメカニズムはまだ解明されていない。シクロフォスファミドやシスプラチンなどの抗がん剤投与を用いた早発卵巣不全モデルマウスを用いた研究により、発育卵胞の顆粒膜細胞や卵母細胞のアポトーシスが誘導さ PTEN/Akt/FOXO3 の誘導による原始卵胞の活性化を認めることが明らかとなっている。卵巣毒性を軽減する治療薬として、AS101 やラパマイシンなど PI3K/Akt/FOXO3 を抑制し、卵巣毒性を軽減するといった研究が報告されているが、実用性・汎用性には乏しい。本研究において、抗がん剤投与によって、発育卵胞の卵巣の顆粒膜細胞において、細胞老化を認めることが明らかとなった。一方で小胞体ストレス応答因子の発現は卵巣全体では明らかな増加を認めなかった。今後の研究により、免疫染色法で顆粒膜細胞または卵子に小胞体ストレス応答の活性化が認めるかどうかを検討していく予定である。また、今回差が認められた細胞老化に関しては、早発卵巣機能不全モデルマウスに、セノリティクス薬を投与し、病態の改善を認めるかどうかを検討していく。セノリティクス薬のダサチニブやケルセチンはすでに臨床応用されており、新規卵巣保護剤として期待できる。今後の更なる研究によって、抗がん剤投与の卵巣毒性を軽減することができれば、がん生殖医療の発展に多いに寄与しうるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原田 美由紀 (Harada Miyuki)		
研究協力者	徐 子欣 (Ju Zixin)		
研究協力者	國富 千智 (Kunitomi Chisato)		
研究協力者	草本 朱里 (Kusamoto Akari)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------