

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10737

研究課題名(和文) 抗癌剤誘発性の卵巣機能不全に対するテストステロンを用いた予防法確立に向けた検討

研究課題名(英文) Testosterone for the Prevention of Cyclophosphamide -Induced Ovarian Toxicity

研究代表者

田辺 晃子 (Tanabe, Akiko)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70454543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト顆粒膜細胞種株(COV434)を用い、シクロフォスファミド(CTX)による細胞障害とテストステロン(Ts)による保護効果を検討するために、細胞増殖、アポトーシスへの影響を比較した。Balb/c雌マウスにCTXを静脈注射し卵巣機能不全モデルマウスを作成し、Ts皮下注射を行なったのち1週間後に安楽死させ卵巣の卵胞数を計測した。CTXによるCOV434のアポトーシスはTs存在下で抑制され、アポトーシスの抑制と生存シグナルの増強を確認した。CTX投与マウスでは原始卵胞と成長卵胞が著明に減少していたが、Tsにより改善していた。CTXによる卵巣毒性はTsにより軽減される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For in vitro analysis, immortalized granulosa cells derived from a primary human granulosa cell tumor, COV434 cells were treated with CPA in presence or absence of testosterone. Cell viability, apoptosis and expression of pro-apoptotic protein in COV434 were examined. For in vivo analysis, Balb/c female mice were treated subcutaneously with testosterone or saline, and cyclophosphamide (CPA) was administered. Number of primordial follicles, atresia, apoptosis of granulosa cells, serum AMH levels in mice. Ovaries in mice treated with testosterone had significantly less atresia and reduced apoptosis compared to those exposed to CPA alone. The serum AMH levels was significantly higher. Current study demonstrated the protective effect of testosterone for the prevention of ovarian reserve during treatment with cyclophosphamide.

研究分野：女性内分泌

キーワード：卵巣毒性 アルキル化剤 顆粒膜細胞 テストステロン AMH 卵巣保護

1. 研究開始当初の背景

性腺組織は抗癌剤の影響を受けやすく、その障害が永続的となりうる。抗癌剤治療の結果生じた無月経や無排卵症などの早発卵巣機能不全 (premature ovarian insufficiency: POI) は、抗癌剤治療を受けた年齢、抗癌剤の種類、および投与量に依存するが、なかでもシクロフォスファミドに代表されるアルキル化剤がもっとも影響が大きいとされる。近年における小児癌患者の5年生存率は約79%とされ、治療寛解後の女性若年者は卵巣機能不全、妊孕性消失、さらには早発閉経などの女性としての生活の質(QOL)の低下に直面することとなる。

2013年 ASCO の報告によると、標準的な妊孕性温存法は受精卵胚凍結、卵子凍結が、放射線の遮断を目的とした方法、および子宮温存法である。しかし、受精卵胚凍結は担癌状態での卵巣刺激が必要であり、また若年の悪性腫瘍患者を対象とした卵巣凍結は癌患者から外科的に採取するという侵襲の問題と、摘出組織内への癌細胞の混入を否定できない点で適応は限定的である。また、成長卵胞は原始卵胞に比べて抗癌剤への感受性が高く有意に障害をうけることより GnRH アナログによる卵胞の成長停止を目的とした試みもなされているが、否定的な結果も多く未だ有効性は確立されたものではない。

卵細胞の成長には顆粒膜細胞からの Kit Ligand などの成長因子が必須であり、逆に卵細胞から growth differentiation factor-9 (GDF-9) などの因子が顆粒膜細胞の増殖分化を促進し、顆粒膜 卵細胞ループを形成している。Androgen receptor knock out mice (AR KO) の研究から、androgen 作用の減少は顆粒膜細胞のアポトーシスを引き起こし POI となることから、androgen による顆粒膜細胞保護とそれに引き続く卵細胞保護に対する検討が始まっている。

現行の妊孕性温存治療とは異なり、テストステロン治療は侵襲なく投与可能なレジユメであり、性腺ホルモン依存性悪性腫瘍以外の患者が対象となりえる。実際、テストステロンの経皮型製剤は、異なる適応症が対象ではあるが保険調剤としてすでに市販されており、若年 POI 患者に対する卵巣刺激の際に使用され始めていることから、POI 予防を目的とした臨床応用へすぐにステップアップ可能な薬剤である。癌治療のみを対象とした腫瘍学; Oncology から、癌克服後の妊孕性温存までを治療対象とする癌・生殖医学; Oncofertility への理解と浸透が加速するきっかけとなると考える。

2. 研究の目的

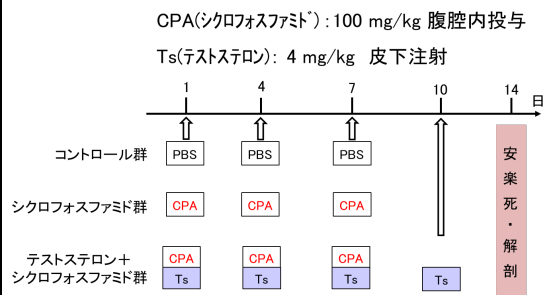
抗癌剤の中でもアルキル化剤は悪性リンパ腫などに使用され、POI の高リスク薬剤として有名である。若年性悪性腫瘍治療に際し、現状の妊孕性温存法には侵襲的なものが多く適応も限定的である。ところで海外では若

年の特異性 POI に対する排卵誘発時にテストステロン (testosterone: Ts) が併用されており、その顆粒膜保護作用が注目されている。よって、Ts がアルキル化剤系抗癌剤による卵巣毒性を軽減させる可能性とそのメカニズムを明らかにし、臨床応用に向けた基礎的検討を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

シクロフォスファミド (CPA) が及ぼす卵巣毒性の作用機序、およびテストステロンによる短期的卵巣保護作用の *in vivo* 検討

6週令 Balb/c メスマウスを各グループ5匹ずつ図のごとく3群の治療群を準備する。



摘出卵巣は体積を概算したのち、ホルマリン固定し薄切切片を作成する。卵巣門を通る切片における原始卵胞、成長卵胞、成熟卵胞、閉鎖卵胞の数は HE 染色をおこない測定する。顆粒膜細胞のアポトーシスは TUNEL 法を用い、TUNEL 陽性卵胞率を算出し比較する。心臓から採血し、遠心分離のち血清を用い、FSH, Estradiol, Testosterone, AMH の測定を行う。

CPA の卵巣毒性およびテストステロンによる保護作用機序の *in vitro* 検討。

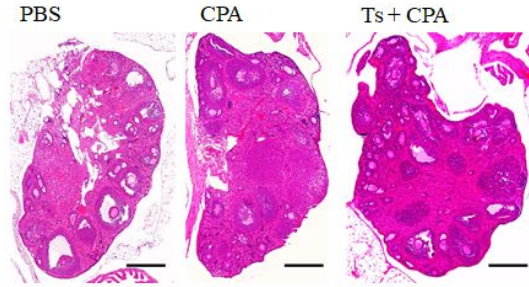
CPA に対する半数阻害濃度: IC50 (Half maximal inhibitory concentration) は MTS assay をおこない算出する。さらに、テストステロン 10 nM, 100 nM 存在下における IC50 と比較し、テストステロンによる顆粒膜細胞保護作用を検討する。

COV434 のアポトーシスは、活性化カスパーゼを検知する CspACE TM FITC In Situ Marker を用い、FITC で蛍光を発しているアポトーシス細胞を FACS で細胞ソーティングし定量し、テストステロン 10nM, 100nM 存在下におけるアポトーシス抑制作用を検討する。

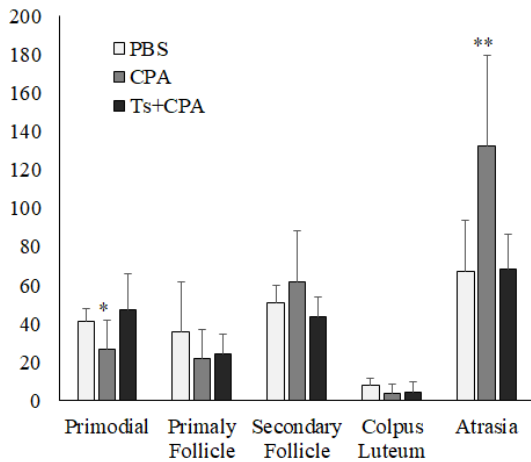
顆粒膜細胞の Pro-apoptotic Bcl-2 蛋白の一つ、BimEL (Bim extra-long) の発現を RT-PCR 法および Western blotting 法で検討する。また、アポトーシスの際出現する cleaved caspase-3 を Western blotting 法で検討する。

4. 研究成果

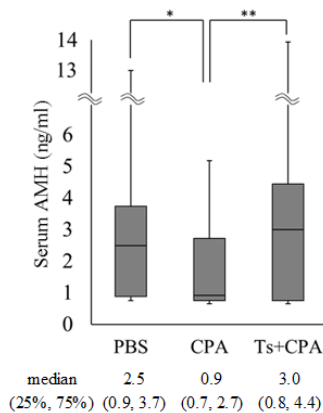
1) CPA による卵巣毒性とテストステロンによる予防効果



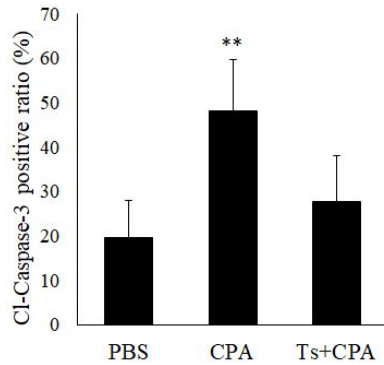
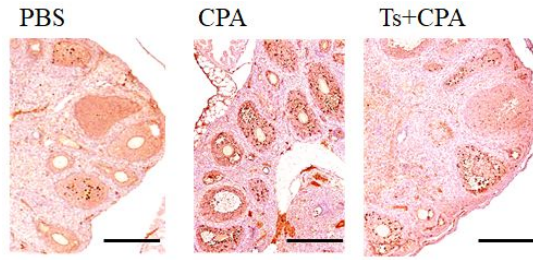
生理的食塩水を投与した PBS 群、CPA 群、テストステロンを同時投与した Ts+CPA 群のマウスから摘出した卵巣の HE 染色標本である。最大直径の切片から前後 3 切片ずつ合計 6 切片に含まれる卵胞を数え、それぞれの成長段階で評価し、下グラフに示した。



原始卵胞(Primordial)数において、CPA 群が有意に減少していたが Ts 併用群では改善していた(* $p < 0.05$)。閉鎖卵胞(Atrasia)においては CPA 群が有意に増加していたが、Ts 併用群で抑制されていた(** $p < 0.01$)。

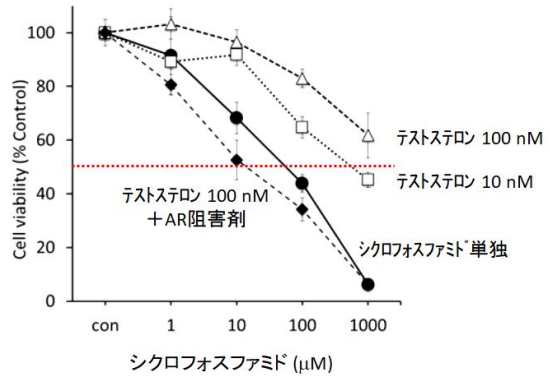


安楽死後、心臓からの採血で AMH を測定したところ、CAP 群で有意に減少していたが、Ts 併用群で改善していた。

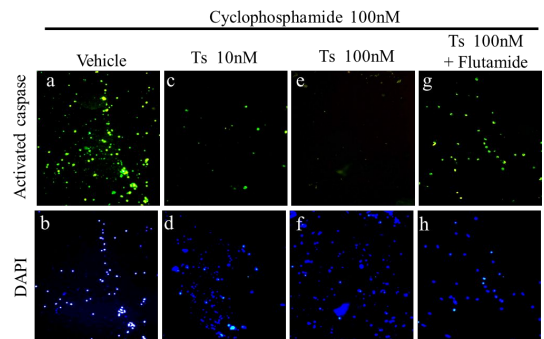


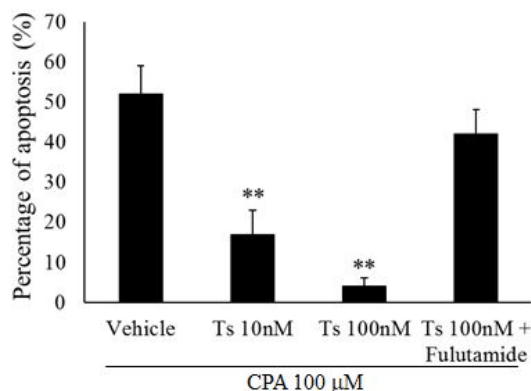
Cleaved-caspase-3 に対する免疫染色を行ったところ、上段の図に示したように、PBS 群では黄体化した部分でのみ染色されているが、成長卵胞では染色されていない。CPA 群は成長卵胞にも高頻度に染色されていた。一方 Ts 併用群ではその染色比率は抑制されていた(** $p < 0.01$)。

2) 顆粒膜細胞株 COV434 に対する CPA の細胞毒性とテストステロンの抑制作用。

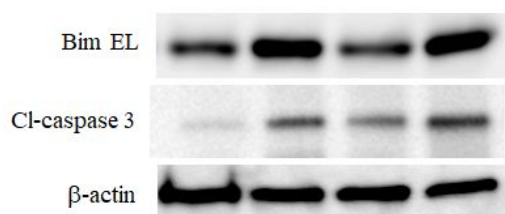


CPA 濃度依存性に cell viability は減少し、IC50 は約 70 μM であった。そこへ Ts 10nM または 100nM を添加したところ viability は上昇した。この Ts による改善効果は Androgen receptor (AR) 阻害剤で抑制された。





COV434 細胞を activated caspase 蛍光染色を行ない、アポトーシスの比率を定量した。CPA 100uM 存在下では COV434 は約 50%強がアポトーシスを起こすが、Ts 添加群では濃度依存性にアポトーシスが抑制されていた (** $p < 0.01$)。AR 阻害剤である Fulutamide を添加することでこの抑制効果は消失した。



Ts 100 nM	-	-	+	+
Flutamide	-	-	-	+
CPA 100 μM	-	+	+	+

アポトーシス関連因子の変化については Western blotting 法で検討した。CPA で蛋白発現増加した Bim EL は Ts 添加により抑制された。同じく Cleaved-caspase 3 も CPA で蛋白発現増加したが Ts で抑制された。Ts によるアポトーシス関連蛋白の抑制は Flutamide で相殺された。

結論

シクロフォスファミド誘因性の卵巣機能不全は、テストステロン投与により軽減される可能性が *in vivo* で示唆され、*in vitro* 検討により、顆粒膜細胞のアポトーシス抑制作用がメカニズムの一つであると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 晃子(Tanabe Akiko)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70454543

(2) 研究分担者

林 正美(Hayashi Masami)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：00551748

大道 正英(Ohmichi Masahide)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283764

田中 良道(Tanaka Yoshimichi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：10625502

金村 昌徳(Kanemura Masanori)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：40298782

恒遠 啓示(Tsunetoh Satoshi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：70388255

佐々木 浩(Sasaki Hiroshi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：80432491

俞 史夏(Yu Saha)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：80625674

寺井 義人(Terai Yoshito)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90278531

藤原 聡枝(Fujiwara Satoe)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90707960