

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：中村 健太郎

専攻分野：産婦人科学

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Exposure Reduces Ovarian Reserve Followed by Dysfunction in Granulosa Cells

(PARP 阻害薬は顆粒膜細胞障害により卵巣予備能を低下させる)

共著者：

Seido Takae, Eriko Shiraishi, Kiemi Shinya, Arby Jane Iguualada, Nao Suzuki

緒言

Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害薬は遺伝子発現や転写因子の制御による抗腫瘍効果のほか、抗血管新生、抗炎症効果なども有するため、様々ながんや自己免疫疾患など長期生存可能な症例への治療適応拡大が期待されている。Rajesh らの報告によると、PARP 阻害薬は VEGF の作用を阻害する可能性が示唆されている。また VEGF は血管新生のみならず、原始卵胞の生存や一次卵胞および二次卵胞の発育に関与し、顆粒膜細胞の細胞分裂を促進することも報告されており、VEGF 阻害を介して PARP 阻害薬が妊孕性へ影響を与える可能性が推測された。以上より、我々は PARP 阻害薬(オラパリブ)の妊孕性への影響を検証した。

## 方法・対象

10-11 日齢 ICR マウス卵巣をオラパリブ添加培養液 (0, 10, 100  $\mu$ g/ml) にて 6-8 日間、12 週齢 ICR マウス顆粒膜細胞を 6 時間体外培養し、real-time PCR で各遺伝子 (CYP19a、follicle stimulating hormone receptor:FSHR、growth differentiation factor 9:GDF9、VEGF、vascular endothelial growth factor receptor:VEGFR、CD31、Ki67) における mRNA 発現量を調べ、培養液中のエストラジオール ( $E_2$ ) 値を測定し、組織学的評価 (HE 染色、免疫染色、卵胞数カウント) を行った。また、21 日齢 ICR マウスにオラパリブ 300mg/kg を 2 週間経口投与し、同様の評価ならびに体外受精 (*in vitro* fertilization:IVF) 成績を検証した。なお、本研究は聖マリアンナ医科大学動物実験委員会 (承認 1908015 号) の承認を得たものである。

統計は、Steel-Dwass 検定または Mann-Whitney U 検定を用い、有意水準を  $P < 0.05$  とした。

## 結果

卵巣培養による real-time PCR では、オラパリブ群において VEGF および CD31 遺伝子発現の変化は認められなかったが、VEGFR 遺伝子発現が低下し ( $P < 0.01$ )、CYP19a、FSHR、GDF9、Ki67 遺伝子発現の低下を認めた ( $P < 0.05$ )。また、培養液中  $E_2$  濃度はコントロール群では経時的に上昇したが、オラパリブ群では上昇を認めなかった ( $P < 0.01$ )。

顆粒膜細胞培養では、オラパリブ群で CYP19a および FSHR 遺伝子の発現が低下した ( $P < 0.01$ )。 *in vivo* においては、オラパリブ群で CYP19a、GDF9、VEGFR、CD31 遺伝子発現の低下を認めた ( $P < 0.05$ )。

次に組織学的評価を行った結果、HE 染色ではオラパリブ群で顆粒膜細胞の立方性が保たれておらず、Ki67 免疫染色では顆粒膜細胞が染色されなかった。さらに、VEGFR 免疫染色ではコントロール群においては卵巣全体に血管様構造を認め、かつ卵子が軽度染色されたのに対し、オ

ラパリブ群では染色されなかった。卵胞数カウントでは、各発育段階の卵胞数減少と閉鎖卵胞数増加が認められた。また IVF では、オラパリブ投与群において採卵数減少および受精率低下を認め ( $P<0.05$ )、さらにオラパリブ投与後 3 週間のインターバルにおいて IVF を実施した結果、採卵数は減少傾向にあったが、受精率はコントロールと同程度まで改善した。

## 考察

VEGF や VEGFR は卵胞の生存や発育、ホルモン産生に関与していることが報告されている。本研究結果では、免疫染色においてオラパリブ群で VEGFR の発現が明らかに低下し、VEGFR、CYP19a および GDF9 遺伝子の発現低下を認め、卵胞数カウントで卵胞数が減少したことから、オラパリブが顆粒膜細胞障害作用を有し、卵巢予備能を直接的に低下させることが示唆された。さらに、オラパリブ群では VEGFR 免疫染色で血管様構造が観察されず、*in vivo* で CD31 遺伝子発現低下が認められたことから、間接的な作用として、オラパリブは血管新生を抑制し、卵胞の生存・発育に影響を与える可能性が考えられた。また、 $E_2$  産生の低下や IVF での採卵数の減少は、卵巢内の卵胞数の減少が一因と考えられたが、顆粒膜細胞培養で CYP19a および FSHR の遺伝子発現が低下していることから、顆粒膜細胞の機能的な障害による影響の可能性も示唆された。さらに、オラパリブ投与後 3 週間の休薬期間後に IVF を施行したところ、採卵数などで回復を示したことから、オラパリブの影響は発育途中の卵胞には影響があるものの、残存した原始卵胞の発育には影響がないと考えられた。

## 結論

PARP 阻害薬は、卵胞の生存・発育障害作用および顆粒膜細胞障害作用を有し、卵巢予備能を低下させることが示唆された。

