

主論文の要旨

***Brca2*^(p.T1942fs/+) dissipates ovarian reserve in rats
through oxidative stress in follicular granulosa cells**

Brca2^(p.T1942fs/+)ラットモデルでは卵胞顆粒膜細胞の酸化ストレスにより卵巣予備能が早期に減少する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：梶山 広明 教授)

田中 秀明

【緒言】

BRCA2 は、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の原因遺伝子としてよく知られているがん抑制遺伝子である。乳がんは世界の若年女性に最も多いがん腫であり、日本における症例対照研究では、乳がん患者の 2% 強が BRCA2 変異を有しており、オッズ比は 10.9 (7.0-17.1)、累積リスクは 58.3% (95%CI, 38.3-71.9) であった。BRCA 遺伝子変異と妊孕性については現在までに様々な報告がある。生殖能力が障害されるという報告がある一方で、生殖能力が高いという報告もあり不明瞭な点が多い。BRCA1/2 変異は不十分な DNA double strand breaks (DSB) 修復に起因する DNA 変異を通じて卵巣予備能に悪影響を与える可能性が指摘されている。疫学研究でも BRCA 保因者の閉経は早期に起こり、特に BRCA2 変異保因者の Anti-Müllerian hormone レベルは低値であることが実証されている。BRCA2 は DNA 二本鎖切断の修復に関して重要な働きを担い、DNA 損傷の蓄積は AKT/mTOR の活性化を引き起こし、顆粒膜細胞における mTOR の上昇は原始卵胞の活性化につながる。現在までに *Brc1* および *Brc2* 変異体マウスモデルはヘテロ欠損個体ではヒト類似の表現型を示さず、ホモ欠損体では胎児致死を引き起こすため、組織特異的なコンディショナルノックアウト動物の作成が必要とされている。

【方法】

SD ラットの胚細胞に対し CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行い、ヒトで最も変異が多いエクソン 11 に停止コドンを導入し BRCA2 変異 SD ラットを作成した。その中でも繁殖が可能であった *BRCA2^{p.T1942fs}* を実験動物として選択した。ホモ接合体ラットは胎生致死であったため、ヘテロ接合体雌ラットでの評価を行った。本雌性ラットの BRCA2 ヘテロ欠損個体 (MUT) と野生型 (WT) について、8-32 週齢間の繁殖時における分娩回数と産仔数、10、20、28 週齢の原始卵胞数と血清 anti-Müllerian hormone (AMH) 値と休眠卵胞に対する成長卵胞の比率を評価した。また 10 週齢卵巣を用いた RNA-シークエンスを行ない、発現変動遺伝子を特定し Gene set enrichment analysis (GESA) を行った。さらに、検出された因子について 10 週、20 週において卵巣組織の免疫染色 (IHC) による評価を行った。

【結果】

モデルラット卵巣の IHC では、顆粒膜細胞における BRCA2 タンパク質は原始卵胞・一次卵胞・二次卵胞において有意差を持って減少していた (primordial, $P < 0.01$; primary, $P < 0.05$; secondary, $P < 0.01$) (図 1)。MUT では WT と比較して分娩回数が少なく ($p=0.002$) 産仔数も少なかった ($p=0.033$)。MUT では 20 週齢における原始卵胞数が減少し ($p=0.008$)、28 週齢における AMH 値も減少していた ($p=0.008$)。休眠卵胞に対する成長卵胞の割合は 10 週齢では有意差を認めなかったが、20 週・28 週の MUT 群において成長卵胞の割合の上昇を認めた ($P < 0.01$) (図 2)。BRCA2 変異ラットと卵胞発育及び原始卵胞活性化の関係を調べるために、10 週齢ラット卵巣を用いて RNA シークエンスを行った。GESA では DNA 損傷修復のパスウェイ亢進を認めた。IHC でも 10

週齢顆粒膜細胞における γ H2AX が MUT 原始卵胞・一次卵胞・胞状卵胞において有意差を持って上昇した (primordial, $P < 0.05$; primary, $P < 0.01$; antral, $P < 0.01$) (図 3)。卵胞の活性化に関わる PTEN と mTOR に関する検討を行ったところ、PTEN は MUT 原始卵胞・胞状卵胞において有意差を持って減少しており (primordial, $P < 0.05$; antral; $P < 0.01$)、mTOR は MUT 原始卵胞・二次卵胞・前胞状卵胞において有意差を持って増加していた (primordial, $P < 0.05$; secondary; $P < 0.01$; preantral, $P < 0.05$) (図 4)。DNA 損傷の原因として酸化ストレスを考え、20 週齢ラットにおいて代表的マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)・4-hydroxy-2-noneal 修飾タンパク質 (4-HNE) の評価を行ったところ、8-OHdG は MUT 原始卵胞・二次卵胞・前胞状卵胞・胞状卵胞において有意差を持って増加しており (secondary, $P < 0.05$; primordial, preantral and antral, $P < 0.01$)、4-HNE は MUT の全ての段階の卵胞において有意差を持って増加していた (secondary, $P < 0.05$; primordial, primary, preantral and antral, $P < 0.01$) (図 5)。

【考察】

我々は HBOC 症候群を模倣した BRCA2 変異体モデルラットにおける卵巣予備能を評価し、*Brca2*^(p.T1942fs/+) が酸化ストレスを通して卵巣予備能を消失させ、早期生殖能低下につながることを初めて見出した。顆粒膜細胞は卵胞の成熟を制御し、成熟に伴って卵胞内の質量の大部分を占めるためこれに注目した。*Brca2*^(p.T1942fs/+) は顆粒膜細胞の BRCA2 タンパク質レベルを有意に減少させた。MUT は 20 週目に卵胞活性化が見られ、最終的に分娩数と総仔数の有意な減少につながった。我々はこれを卵巣予備能の早期喪失と解釈した。枯渇の原因が卵胞の活性化にあるのか、それとも DNA 変異にあるのかはまだ議論がされており、その両方の寄与が示唆されている。我々の RNA シークエンシング結果では、*Brca2*^(p.T1942fs/+) 変異体の卵巣において DNA 損傷修復のパスウェイが促進されることが明らかになり、これは DSB を示す γ H2AX 発現の増加と一致した。DNA 損傷は MAPK-AKT/mTORC 経路を活性化するが、PTEN は PIP3/AKT 経路を停止させることでこれを抑制する。PTEN の発現は顆粒膜細胞で減少したのに対し、mTOR の発現は増加した。顆粒膜細胞における mTOR の過剰発現は、PI3K-Akt-Foxo3a 経路を活性化する。今回の結果は、MUT における DSB 蓄積に伴う卵巣卵胞の早期活性化を示唆している。Foxo3a の評価については、さらなる検討が必要である。DSB の病因について我々は酸化ストレスについて考察し、MUT 顆粒膜細胞における 8-OHdG と 4-HNE の増加を確認した。この結果は、顆粒膜細胞への酸化ストレスが卵巣卵胞を早期に活性化させ、卵巣予備能を消失させる可能性を示唆している。

【結論】

我々は *Brca2*^(p.T1942fs/+) が卵胞顆粒膜細胞の DSB 蓄積を引き起こし、PTEN の減少と mTOR の増加を介し卵巣卵胞を活性化させ、早期の卵巣卵胞消耗と不妊症につながることを新しいラットモデルで発見した (図 6)。この結果は、BRCA2 遺伝子変異を持つ患者が妊孕性温存を必要とするかどうかの判断に役立つと思われる。