

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 田中 秀明

論 文 題 目

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)

論文審査担当者 名古屋大学教授

主 査 委員 榎本 篤
名古屋大学教授

委員 加留部 謙之輔
名古屋大学教授

委員 内田 広夫
名古屋大学教授

指導教授 梶山 広明

論文審査の結果の要旨

BRCA2 遺伝子変異が卵胞発育と妊孕性に及ぼす影響とその機序を明らかにするために、欠損ラットを作成し検討した。SD ラットの胚細胞に対し CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行い、*BRCA2*^{p.T1942Kfs} 変異 SD ラットを作成した。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、分娩回数と産仔数、原始卵胞数と血清 anti-Müllerian hormone (AMH) 値を評価した。また RNA-Seq を行ない、検出された因子について免疫染色 (IHC) による評価を行った。MUT は分娩回数が少なく ($p=0.002$) 産仔数も少なかった ($p=0.033$)。また、原始卵胞数は減少し ($p=0.008$)、AMH 値も減少した ($p=0.008$)。更に MUT は成長卵胞割合の上昇を認め、卵胞の活性化亢進を認めた ($p<0.01$)。Gene set enrichment analysis で MUT は DNA 損傷修復パスウェイ亢進を認め、IHC では卵胞顆粒膜細胞における γ H2AX 増加 ($p=0.003$)、PTEN 減少 ($p=0.003$)、mTOR 増加 ($p=0.040$) を認めた。これらは、*Brca2* 病的変異が DNA 二本鎖切断の蓄積による卵胞活性化を惹起し、卵巣予備能を早期に低下させる可能性を示唆した。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp> as of June 21st, 2022) を用い、off target 効果を生じる可能性のある部位が 2 箇所抽出された。このため、ストレインの繁殖に用いた全ての個体について、これらの部位を PCR で増幅しサンガーシーケンスを行うことで off target 効果が生じていないことを確認した。
2. 過去の報告では *Brca2* 変異ラットは ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) を使用した SD-*BRCA2*^{m10vm} の 1 系統のみ存在し、これは 13 番染色体 exon11 の 2 番目の BRC リピート後ろに変異を生じたものである。この雄性ラットから繁殖した F1 世代では、多指や尻尾の奇形、目の奇形、髭の奇形など異なる表現型が確認されている。またヘテロ・ホモ接合体雌性ラットにおいては性腺の萎縮を認め、ホモ接合体ラットで顕著であった。本研究モデルにおいては F1 世代での表現型異常は確認せず、ホモ接合体ラットは胎生致死であった。既存モデルと異なる特徴を示した原因として、変異部位の違いが予想された。本モデルは CRISPR-Cas9 により臨床で問題となる頻度の多い病的変異部位である 5 番目の BRC リピート後ろに変異が生じており、臨床像をより再現していることが予想される。
3. 原始卵胞活性化に関しては MUT で 28 週齢まで継続しているが、原始卵胞数は 20 週齢から減少し、28 週齢においてもその傾向を認める。32 週齢までの分娩回数と産仔数は MUT で減少している。これらは原始卵胞の早期消耗により卵胞活性化が 32 週齢までに低下する可能性を示唆している。

本研究は、*BRCA2* 病的変異が妊孕能に与える影響に関して重要な知見を提供した。以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	田中 秀明
試験担当者	主査 榎本 篤		副査: 加留部 謙之輔	
	副査: 内田 広夫		指導教授 梶山 広明	
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none">1. CRISPR-Cas9によるゲノム編集の際のオフターゲット評価方法に関して2. 既存モデルとの比較とその相違点に関して3. 卵胞活性化時期に関して <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、産婦人科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				