

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18161

研究課題名(和文) マウス子宮蠕動運動と概日リズムに着目した産科婦人科疾患予防法の探索

研究課題名(英文) A novel method to prevent obstetric and gynecological diseases based on mouse uterine peristalsis and circadian rhythms.

研究代表者

細野 隆 (Hosono, Takashi)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：50867893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムは一日単位のリズムであり、視床下部の中核時計と各臓器内の末梢時計が同期して形成され、基本的な生体活動を維持している。一方で女性は月経周期という月単位のリズムを有しており、子宮や卵管の収縮リズムはこれに連動して変化する。子宮収縮は月経や分娩に必須の運動であり、その異常は月経困難症、子宮内膜症、着床障害さらに早産などに関与すると推察される。マウス子宮の概日リズムと子宮収縮運動の関連性に関して研究を進めていく中で、子宮の概日リズムが摂餌行動に制御されていることが明らかとなった。これは現代人の乱れた食生活が、中核時計と末梢時計の脱同調のために様々な婦人科疾患の原因となる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではマウス子宮の末梢時計リズムが摂餌行動に制御されていることが分かった。不規則な食事による中核時計と末梢時計の脱同調は、結果として子宮の異常収縮を引き起こし、様々な婦人科疾患の原因となる可能性が示唆された。この脱同調は食事時間などの生活習慣により改善されるため、本研究の成果は予防医学の分野においても重要であり、引き続き研究解析を継続していく。

研究成果の概要(英文)：The circadian rhythm is a daily rhythm, in which the central clock in the hypothalamus and the peripheral clocks in each organ synchronize to maintain basic biological activities. On the other hand, women have a monthly reproductive rhythm called the menstrual cycle, and the uterine contraction rhythm changes in conjunction with it. Uterine contractions are essential for menstruation and delivery, and abnormalities in uterine contractions are thought to be involved in dysmenorrhea, endometriosis, implantation disorders, and premature delivery. In the course of research on the relationship between the circadian rhythm of the mouse uterus and uterine contractions, it became clear that the circadian rhythm of the uterus is regulated by feeding behavior. This suggests that the disordered diet of modern humans may be a cause of various gynecological diseases due to desynchronization of the central and peripheral clocks.

研究分野：生殖・周産期医療

キーワード：時計遺伝子 概日リズム 子宮

### 1. 研究開始当初の背景

子宮を構成する子宮内膜および子宮筋はともに内分泌因子等の制御によって周期的な変化を繰り返す性質を持つ。子宮内膜組織は卵巣より分泌されるエストロゲンとプロゲステロンの刺激により肥厚と剥脱を繰り返し、他方で子宮筋組織は妊娠・分娩時に著明な肥大と細胞数の増加を示して産後期には急激に apoptosis を起こす。子宮の収縮も月経周期でダイナミックに変化し、増殖期ではエストロゲンの作用により収縮が増強し、分泌期ではプロゲステロンの作用により収縮が減弱する。月経期では“上から下”への動きがメインであり、子宮内容(月経血、子宮内膜)を外に排出しようとする動きがある。一方で増殖期後期から分泌期では“下から上”への動きがメインであり、精子の卵管への移動や受精卵の子宮内維持に適した動きをする。

上記の生理学的な作用に対して非妊娠時の子宮収縮の異常は月経痛や骨盤痛の原因となる。機能的な月経痛は月経時の子宮の過剰収縮が病態の主因であるが、そのような訴えを持つ患者では背景に子宮内膜症が存在することがある。子宮内膜症の発症機序の一つに月経時の子宮内膜の逆流説があるが、子宮内膜症患者は何らかの原因で月経時に子宮収縮が増強または蠕動運動の方向に異常を認め、子宮内膜が逆流しやすい状態になっている可能性が推察される。さらに排卵期の蠕動運動異常は精子の受け入れの障害となり、着床期の蠕動運動異常は受精卵の子宮内維持の障害となると考えられる。

一方で消化管の蠕動運動は自律神経の支配のもとカハールの介在細胞などの働きで同期的な収縮リズムを形成している。食事刺激は自律神経のみならず中枢時計や消化管臓器の末梢時計を介してこの蠕動運動を制御することが知られている。さらに重要な点として月経周期に伴う血中エストロゲンとプロゲステロン値の増減に呼応して腸管の蠕動運動が影響を受ける点が挙げられる。組織解剖学的な類似性に加え、骨盤内の自律神経系を共有していることにより子宮と消化器の運動機能制御機構の類似性と共有性が推察されるが、これまで時計遺伝子による子宮収縮運動の制御についての報告はなかった。そこで申請者らの研究グループは「子宮の蠕動運動が概日リズム下に末梢時計遺伝子の制御を受けている」可能性を想定し、「その異常が産婦人科疾患の発症を誘発する」という新しい仮説を掲げた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は末梢時計遺伝子が子宮蠕動運動を制御する可能性を検証することである。本研究で用いる子宮器官培養系を用いた子宮収縮評価実験は、本申請者が新たに開発したシステムであり、これまで不可能であった継続的かつ形態的な子宮収縮様式が肉眼的および客観的に解析できる。この実験系と既に作出している子宮特異的な時計遺伝子改変マウスを用いて、子宮末梢時計遺伝子発現と子宮収縮運動との関連性を解析する。

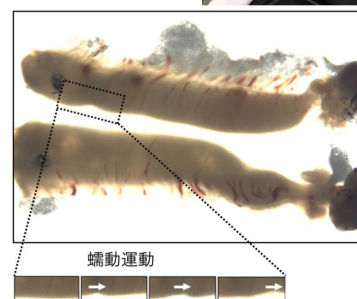
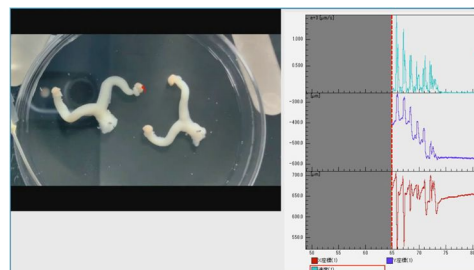
### 3. 研究の方法

#### (1) 子宮収縮と時計遺伝子の関連性の解析

##### 1) 野生型および遺伝子改変マウスを用いた解析

申請者はこれまでに野生型マウス摘出子宮を用いた長時間組織培養収縮観察実験系(右写真)を開発した。24時間を超え最大36時間程度まで培養下での子宮収縮を観察することができ、ソフトウェアを用いる事で各種パラメータの定量化が可能である。これまでの実験において野生型マウスでは約1時間周期の新しい“収縮期”と“静止期”のリズムが観察されている。この実験系では子宮の“振り子運動”というべき粗大な運動が解析可能である。ここに *Bmal1*-flox と PGR(プロゲステロン受容体)-cre マウスから作出した子宮特異的に *Bmal1* 遺伝子をノックアウトした遺伝子改変マウス(*Bmal1*-flox/PGR-cre)から子宮を供し、子宮収縮観察を行い野生型のそれと比較検討する。本実験は24時間以上に渡り運動が観察可能であるため、概日リズムとの関連を観察するに適している。また子宮の“収縮の強さ”に関しては同様に野生型と遺伝子改変マウス子宮をそれぞれマグナス管(右図)の解析によって比較する。また子宮組織の mRNA および蛋白質を抽出して子宮内膜症で高発現する炎症性サイトカイン(TNF、COX2、IL-6、IL-8、CCL2、IL-1)等の発現を解析し、野生型のそれと比較検討する。

次に蠕動運動を観察する目的で申請者が開発した顕微鏡下培養収縮観察系(右図)に野生型及び遺伝子改変マウスを供して、蠕動運動と概日リズムの関連を検討する。本実験系は培養条件下で顕微鏡拡大のもと子宮蠕動運動を観察することができる。



## 2) ヒト子宮筋細胞を用いた解析

まず、ヒト子宮筋組織を培養下で3時間おきにサンプリングし、mRNA および蛋白質を抽出して培養条件下においてヒト子宮筋組織が概日リズムを持つことを明らかにする。次にヒト子宮検体から分散子宮筋細胞を調整し、分散子宮筋細胞を培養した後にレンチウイルス sh-Bmal1 を感染させて Bmal1 時計遺伝子発現をノックダウンさせる。この際の子宮筋の収縮および周囲の子宮筋細胞との同調性の変化について生細胞タイムラプスを用いて解析する。さらに子宮筋の収縮力について3次元コラーゲンゲルを用いた培養モデルにより子宮筋の収縮ゲルの収縮様式を評価して、概日リズムが子宮収縮を制御する可能性について検証する。

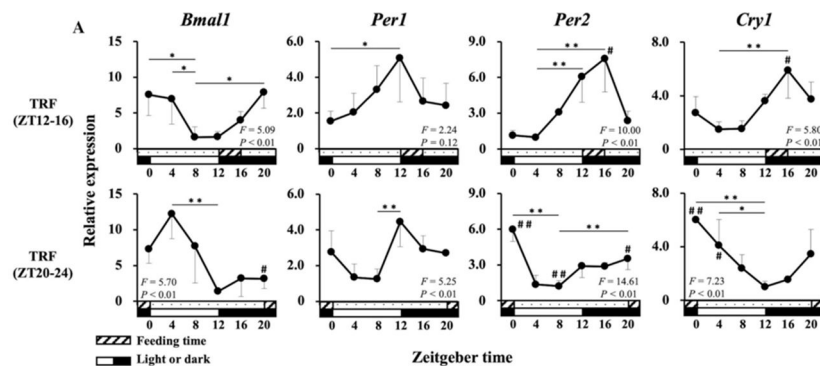
## (2) 摂餌行動がマウス子宮時計遺伝子発現に及ぼす影響の解析

8週齢 C57BL/6J 雌マウスを、食事時刻条件が異なった3群(Group 1[自由摂餌]、Group 2[活動期始めの4時間のみ摂餌]、Group 3[活動期終わりの4時間のみ摂餌])に振り分け2週間飼育した後、4時間おき6ポイントで子宮を摘出し、その時計遺伝子(Bmal1, Per1, Per2, Cry1)の mRNA 発現を定量PCRで、タンパク発現をウェスタンブロット法で解析した。

## 4. 研究成果

Ex-vivo での子宮収縮運動解析では、野生型マウスと遺伝子改変マウスの間に明らかな差を認めなかった。ホルモン補充等を行い、条件を変えて現在研究を続けている。

マウス子宮の概日リズムと子宮収縮運動の関連性に関して研究を進めていく中で、子宮の概日リズムが摂餌行動に制御されていることが明らかとなった(Hosono et al., Current Developments in Nutrition, 2021)。これは現代人の乱れた食生活が、中枢時計と末梢時計の脱同調のために様々な婦人科疾患の原因となる可能性を示唆する。



不規則な食事による中枢時計と末梢時計の脱同調は、結果として子宮の異常収縮を引き起こし、様々な婦人科疾患の原因となる可能性が示唆された。この脱同調は食事時間などの生活習慣により改善されるため、本研究の成果は予防医学の分野においても重要であり、引き続き研究解析を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Hosono, Masanori Ono, Takiko Daikoku, Michihiro Mieda, Satoshi Nomura, Kyosuke Kagami, Takashi Iizuka, Rieko Nakata, Tomoko Fujiwara, Hiroshi Fujiwara, Hitoshi Ando	4. 巻 5
2. 論文標題 Time-Restricted Feeding Regulates Circadian Rhythm of Murine Uterine Clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Developments in Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cdn/nzab064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細野 隆
2. 発表標題 時刻制限給餌はマウス子宮における概日リズムを調整する
3. 学会等名 第68回北日本産科婦人科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細野 隆
2. 発表標題 摂餌行動はマウス子宮における概日リズムを調整する
3. 学会等名 第26回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------