

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00343

研究課題名(和文)概日リズムによる性周期制御の数理モデルとその不妊治療への応用

研究課題名(英文) Mathematical model for circadian control of estrus cycles and its implication to infertility treatment

研究代表者

徳田 功 (Tokuda, Isao)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：00261389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計による性周期の制御メカニズムを理解することを目指して、野生型メスマウスの行動リズム計測、ヒトの体内時刻推定、概日時計による性周期制御の数理モデル試作を行なった。行動リズム解析から、位相応答特性には、性周期段階への依存性は見られないこと、また、シフト勤務を模擬した生活パターンによって、性周期に大きな乱れが生じることが分かった。次に、体毛を利用した概日時計測定により、被験者の負担を最小限にとどめ、コストを最小にした上で、1時間以内の精度でヒトの体内時刻を推定できることが分かった。最後に、数理モデルでは、SCNの時間シグナルの強度が、性周期の概日コントロールに重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

行動リズムの位相応答特性には、性周期依存が見られないことから、メスの概日行動を決めているのは中枢時計の視交叉上核であり、性周期の中枢への影響は弱いことが分かった。これは、中枢時計を整えることが、性周期の周期性を保つには重要という考えを支持している。また、昼夜勤のローテーションは時差ぼけを生じ、性周期を乱すため、妊娠を望む女性には避けるべき勤務形態であることが改めて浮き彫りとなった。排卵を促進し妊娠に至るには、規則性のある性周期を保つことが重要であり、本研究で明らかとなった概日時計による性周期制御の知見は、晩婚化が進み少子化問題を抱える先進国で深刻化する不妊治療の糸口を与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：In mammals, estrous cycles are not only regulated by the hypothalamus-pituitary-gonadal axis but they also require an appropriately timed signal from the suprachiasmatic nucleus, which forms the central circadian pacemaker. Towards understanding the circadian control of estrus cycles, we studied behavioral rhythms of wild-type female mice. We found that phase response properties of the circadian system were independent of the estrous stages, implying that intrinsic photic entrainment system is not influenced by the estrous cycle. We also confirmed that shift-work disrupts circadian rhythmicity and consequently induces irregular estrous cycles. We finally constructed a prototype mathematical model for circadian system that regulates estrous cycles. Decrease in the timing signal gave rise to very long or irregular estrous cycles. The present study may provide insights into an improved life style as a possible treatment for infertility.

研究分野：非線形動力学

キーワード：性周期 概日リズム 視交叉上核

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

概日時計の制御を受ける生理機能は代謝から免疫まで多様であるが、そのなかでも性周期は概日時計の単位で起こり、生命活動の根幹をなす重要機能の一つである。排卵を促進し妊娠に至るには、規則性のある性周期を保つことが重要となるが、度重なる長距離飛行による時間帯の移動やシフトワークなどの不規則な生活リズムで、性周期は乱れることが知られている。研究代表者および研究協力者の最近の研究では、週日と週末の生活リズムの僅かな差によって生じる社会的時差ボケも、性周期の乱れに大きく影響することが分かってきた[Takasu et al., 2015]。このような周期性の乱れは年齢とともに顕在化し、不規則な性周期リズムは不妊の大きな要因となることが知られている。また、時計関連遺伝子変異マウスでは、加齢の影響が早まり、若年齢で不妊の問題が出る。驚くべきことに、このような変異マウスで、環境の明暗サイクルを 24 時間ではなく、マウス個体の固有周期に合わせたところ、性周期のリズムが大幅に改善し、妊娠率が飛躍的に向上することが分かった[Takasu et al., 2015]。これは、個体にあわせて適切な環境サイクルを設定することによって、概日リズムが強化され、結果として性周期の規則性を回復することが可能であることを示唆する。このような方法論は、医療現場で深刻化する不妊問題を自然な形で解決に導く可能性を持っており、国際的な関心を集めるものである。ただし、視交叉上核(SCN)における概日時計が性周期リズムに時刻情報を付与し、排卵の制御に関与していることは知られているが、その正確な機構についてはいまだに特定されていない。

2. 研究の目的

本研究では、マウスによる実験から得られた知見を拡張し、概日時計による性周期の制御メカニズムを包括的に理解することによって、晩婚化が進み少子化問題を抱える先進国で深刻化する不妊治療の糸口を模索することを目的とする。実験計測データの分析に基づいて数理モデルを構築し、概日リズムの性周期制御の機能を理解し、概日リズムを安定化し、性周期の規則性を高めるための環境を追究する。基礎体温以外の計測量から体内リズムを推定し、性周期の規則性を定量化する枠組みを開発する。以下の研究項目に取り組む。

- (1) 行動データ分析による性周期判定法の改良を行い、野生型のメスマウスに応用する。手術によって SCN を周囲の組織から孤立させたメス個体解の析から、SCN の性周期制御を検証する。
- (2) 光に対するメスマウスの位相応答が、性周期に依存するかを調べる。
- (3) シフト勤務プロトコルをマウスに導入し、夜勤作業の性周期に及ぼす影響を調査する。
- (4) ヒトの性周期モニターを目指し、体毛を利用したヒト概日時計測定法を数名の被実者に応用する。
- (5) SCN による性周期の制御の基本モデルを作成する。

3. 研究の方法

- (1) 行動データ分析による性周期判定法の開発： 実験動物には野生型マウスを用い、メスの行動リズムを計測し、性周期サイクルの規則性を自動検出するアルゴリズムを開発する。ピリオドグラムをベースに統計的に優位な周期性を検出する方法を作成し、行動データ解析に応用する。特に、マイクロナイフで SCN を周囲の組織から孤立させたメス個体について解析を行い、SCN が性周期の制御に関わっているかを検証する。
- (2) メスマウス位相応答の性周期依存性検証： 野生型メスマウスを用い、輪回し実験による行動データ実験から、光入力刺激に対する位相応答を計測する。特に、発情前期、発情期、発情後期、発情間期の性周期段階毎で位相応答曲線に変化が見られるかを検証する。
- (3) シフト勤務の影響： 夜勤作業の性周期に及ぼす影響を調査する。特に、日勤と夜勤の入れ替わり間隔の影響に注目し、マウスに対して、3 日、6 日、12 日のローテーションでシフトワークを行った影響を、行動計測（アクトグラム）およびスミア検査に基づいて調査する。
- (4) 体毛を利用した概日時計測定： 性周期の乱れを検出する基礎データとして、ヒトの体内時刻をストレスなしに、正確に計測する技術は必要不可欠である。体内時刻を非侵襲に計測する方法として、体毛を利用した概日時計測定法を、ヒトの被験者に応用する。3 つの時計遺伝子 (PER3, NR1D1, NR1D2) の発現量を計測し、サンプリング間隔は、3 時間間隔、6 時間間隔、8 時間間隔を試す。体内時刻を精度よく推定するために、必要なサンプリング間隔および計測する時計遺伝子 (PER3, NR1D1) の数を見積もり、患者の負荷を軽減し、かつコストを下げる方法を探る。
- (5) 概日系による性周期の制御モデル： SCN による性周期の制御系についてもモデルを拡張する。現在、最も有力な仮説として、GnRH (gonadotropin releasing hormone) が 1 日のある時間帯に概日リズムから信号を受けることが、性周期には重要であると考えられている。このような仮説の下、SCN が GnRH に信号を送る数理モデルを構築する。

4. 研究成果

- (1) 行動データ分析による性周期判定法の開発： ピリオドグラムをベースにランダムサロゲ

- ート法によって統計的に優位な周期性を検出する方法を作成し、野生型メスマウスの行動リズム解析に応用した。マイクロナイフで視交差上核(SCN)を周囲の組織から孤立させたメス個体と比較したところ、手術をしたマウスについては、コントロールと比較して性周期が不明瞭となり、SCNが性周期の制御に関わっている可能性を確認することができた。
- (2) メスマウス位相応答の性周期依存性検証：野生型メスマウスの光入力刺激に対する位相応答を計測した。特に、発情前期、発情期、発情後期、発情間期の性周期段階毎の位相応答曲線を計測したところ、段階毎に応答特性の有意差は見られないことが分かった。これは、メスの行動を決めているのはあくまでの中枢時計の視床下部視交叉上核(SCN)であり、性周期は中枢への影響はあったとしても弱いということを示唆している。従って、性周期の制御においては、中枢時計を整えることが重要となる。
 - (3) シフト勤務の影響：夜勤作業の性周期へ及ぼす影響を調査した。特に、日勤と夜勤の入れ替わり間隔の影響に注目し、マウスに対して、3日、6日、12日のローテーションでシフトワークを行った影響を、行動計測(アクトグラム)およびスメア検査に基づいて調査した。ローテーションの間隔が短くなるにつれ、性周期に乱れが生じ、ローテーション終了後も3週間後にもわたって悪影響が継続することが分かった。このことは、現代では避けられない夜勤作業において、ローテーション間隔を十分にあげることが重要であることを示す。夜間に働くことよりも、昼夜の入れ替わりによって時差ぼけが生じることが問題であることが明確になった。昼夜勤のローテーションは妊婦には避けるべき作業であることが改めて浮き彫りとなった。
 - (4) 体毛を利用した概日時計測定法：体内時刻を非侵襲に計測する方法として、体毛を利用した概日時計測定法を発展させ、5名の被実者に応用した。これによって、1日3点のデータ計測で、二つの時計遺伝子(PER3, NR1D1)の発現量を計測できれば、最小二乗法で、1時間以内の精度で体内時刻を推定できることが分かった。ヒトの性周期リズム計測において、基盤技術となりうる。
 - (5) 再生数理モデル：性周期の概日コントロールに関する数理モデルを試作した。卵巣におけるエストロゲンの蓄積とSCNからの時間シグナル入力および、GnRH生成ニューロンからの黄体形成ホルモン(LH)分泌と卵巣におけるLH感受性の概日制御をモデル化した。老化によってSCNの時間シグナルが減弱すると仮定したところ、排卵周期が不規則になることが確認できた。予備実験結果は、高齢マウスにおいて、中枢時計の信号が弱くなることが要因で、性周期の不規則性が起こり、不妊につながることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① I. T. Tokuda, D. Ono, S. Honma, K. Honma, H. Herzl, “Coherency of circadian rhythms in the SCN is governed by the interplay of two coupling factors,” *PLOS Computational Biology*, 14(12): e1006607, 2018, 査読有.
doi: 10.1371/journal.pcbi.1006607
- ② P. D. Gould, M. Domijan, M. Greenwood, I. T. Tokuda, H. Rees, L. Kozma-Bognar, A. J. Hall, J. C. Locke, “Coordination of robust single cell rhythms in the Arabidopsis circadian clock via spatial waves of gene expression,” *eLife*, e31700, 2018, 査読有.
doi: 10.7554/eLife.31700
- ③ S. Mizuta, M. Sugiyama, I. T. Tokuda, W. Nakamura, T. J. Nakamura, “Photoc phase-response curves for cycling female mice,” *Hormones and Behavior*, Vol. 105, 41-46, 2018, 査読有.
doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.07.008
- ④ A. Yamaguchi, M. Tatsumoto, R. Matsumura, T. Endo, K. Hirata, I. T. Tokuda, M. Akashi, “Normal peripheral circadian phase in the old-old with abnormal circadian behavior,” *Genes Cells.*, Vol. 23, Issue 10, pp. 849-859, 2018, 査読有.
doi: 10.1111/gtc.12633
- ⑤ H. Kada, J. Teramae, I. T. Tokuda, “Highly heterogeneous excitatory connections require less amount of noise to sustain firing activities in cortical networks,” *Frontiers in Computational Neuroscience*, 12:104, 2018, 査読有.
doi: 10.3389/fncom.2018.00104
- ⑥ I. T. Tokuda, O. E. Akman, J. C. W. Locke, “Reducing the complexity of mathematical models for the plant circadian clock by distributed delays,” *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 463, pp. 155-166, 2018, 査読有.
doi: 10.1016/j.jtbi.2018.12.014
- ⑦ K. Masuda, R. Kitaoka, K. Ukai, I. T. Tokuda, H. Fukuda, “Multicellularity enriches the entrainment of Arabidopsis circadian clock,” *Science Advances*, Vol. 3, No. 10, e1700808, 2017, 査読有.

doi: 10.1126/sciadv.1700808

- ⑧ S. Koinuma, H. Kori, I.T. Tokuda, K. Yagita, Y. Shigeyoshi, “Transition of phase response properties and singularity in the circadian limit cycle of cultured cells,” PLoS ONE, Vol. 12, No. 7, e0181223, 2017, 査読有.
doi: 10.1371/journal.pone.0181223
- ⑨ K. Yoshinaka, A. Yamaguchi, R. Matsumura, K. Node, I.T. Tokuda, M. Akashi, “Effect of different light-dark schedules on estrous cycle in mice, and implications for mitigating the adverse impact of night work,” Genes Cells, Vol. 22 (10), pp 876–884, 2017, 査読有.
doi: 10.1111/gtc.12522
- ⑩ I.T. Tokuda, A. Okamoto, R. Matsumura, T. Takumi, M. Akashi, “Potential contribution of tandem circadian enhancers to nonlinear oscillations in clock gene expression,” Mol. Biol. Cell. 28(17): 2333–2342, 2017, 査読有.
doi: 10.1091/mbc.e17-02-0129
- ⑪ I.T. Tokuda, H. Hoang, M. Kawato, “New insights into olivo-cerebellar circuits for learning from a small training sample,” Current Opinion in Neurobiology, Vol. 46: 58–67, 2017, 査読有.
doi: 10.1016/j.conb.2017.07.010
- ⑫ N. Hayasaka, A. Hirano, Y. Miyoshi, I.T. Tokuda, H. Yoshitane, J. Matsuda, Y. Fukada, “Salt-inducible kinase 3 regulates the mammalian circadian clock by destabilizing PER2 protein,” eLife, Vol. 6, e24779, 2017, 査読有.
doi: 10.7554/eLife.24779
- ⑬ H. Kada, J. Teramae, I.T. Tokuda, “Effective suppression of pathological synchronization in cortical networks by highly heterogeneous distribution of inhibitory connections,” Frontiers in Computational Neuroscience, Vol. 10, 109, 2016, 査読有.
doi: 10.3389/fncom.2016.00109

[学会発表] (計 4 件)

- ① C. Schmal, I.T. Tokuda, D. Ono, S. Honma, K.-I. Honma, H. Herzl, “A mathematical model for transient dissociation of *Per1* and *Bmal1* rhythms in the suprachiasmatic nucleus,” 第 25 回日本時間生物学会学術大会, 2018 年.
- ② I.T. Tokuda, D. Ono, S. Honma, K.-I. Honma, H. Herzl, “Mathematical modeling of dual coupling mechanisms in the suprachiasmatic nucleus,” 第 95 回日本生理学会大会, 2018 年.
- ③ I.T. Tokuda, D. Ono, S. Honma, K.-I. Honma, H. Herzl, “Mathematical modeling of cellular circadian network with dual coupling mechanisms in the SCN,” Gordon research conference on Chronobiology, 2017 年.
- ④ 徳田功, 小野大輔, 本間さと, 本間研一, Herzl Hanspeter, “Mathematical model for cellular circadian network having dual coupling mechanisms in the SCN,” 第 20 回日本時間生物学会学術大会, 2017 年.

[図書] (計 1 件)

宮野尚哉, 徳田功著, 「機械力学の基礎: 力学への入門」(175 ページ), 数理工学社 (2017 年)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 石村 憲意

ローマ字氏名: (Ishimura, Kazuyoshi)

所属研究機関名: 立命館大学

部局名: 理工学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 50779072

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 中村 渉

ローマ字氏名：(Nakamura, Wataru)

研究協力者氏名：中村 孝博

ローマ字氏名：(Nakamura, Takahiro)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。