

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 7 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：20K18186

研究課題名(和文) マウス子宮筋中層における新規メッシュ構造の生理学的意義

研究課題名(英文) A novel third mesh-like myometrial layer connects the longitudinal and circular muscle fibers -A potential stratum to coordinate uterine contractions-

研究代表者

鏡 京介 (Kagami, Kyosuke)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80748616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：組織透明化技術を用いたマウス子宮筋の解析から、これまで認識されてこなかった新たな子宮筋構造を同定した。光シート顕微鏡で取得した連続画像を詳細に解析すると、内輪筋に起始した筋線維束が外縦筋に連絡し、内輪と外縦を橋渡しする構造を呈していた。この領域には血管構造が豊富に観察され、さらにTUBB3陽性の神経軸索も入力されていることが明らかになった。また子宮テロサイトもメッシュ状の筋線維束に沿って走行するのが観察され、神経軸索終末がテロサイトに接している様子も観察された。以上から、長い管腔構造を呈するげっ歯類の子宮でありながら、局所の巧みな収縮を自律的に起こす起点になっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮の収縮は月経、妊娠や分娩現象に直接関わっており、その異常は子宮内膜症、月経困難症、胚の着床障害や胎児娩出異常などに関わっていると推察される。しかしながら、子宮筋収縮の制御機構についてはこれまでに明らかにされていなかった。今回申請者らがこれまで世界に先駆けて報告してきた生殖臓器の組織透明化技術を用いることで、これまで認識されていなかったマウス子宮筋のメッシュ構造が明らかになった。この構造の周囲にはペースメーカー細胞の存在が示され、収縮の起点になっている可能性が示された。本研究によって得られる知見は子宮筋の収縮異常で生じると考えられる各疾患に関して、新たな視点で病態を提案できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Although it is well-known that the mammalian myometrium is composed of longitudinal (outer) and circular (inner) layers, the precise mechanisms that coordinate both muscular contractions to produce peristaltic movements remain unclear. By treatment with CUBIC tissue-clearing method, we identified a novel muscle layer, a middle layer of the myometrium, which anatomically connects the conventional outer longitudinal and inner circular muscles. This new layer was visualized as a mesh-like structure and this structure was observed throughout the whole uterus from proximal to distal sites. In this area, CD31-positive vessels were abundantly localized around the mesh-like muscle fibers. In addition, CD34-positive uterine telocytes and tubulin-3-positive nerve fibers were closely located in this middle layer. These findings indicate the presence of a novel mesh-like stratum that connects longitudinal and circular muscle layers, and suggest its coordinating role in myometrial contractions.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮筋 組織透明化

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、内分泌因子等の制御によって周期的に構築と破壊を繰り返す、きわめてユニークな性質を持つ。子宮の収縮は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 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。一方で排卵の時期に一致する増殖期後期では“下 上”への動きがメインであり、精子を卵管に運ぼうとする動きをする。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困難症や骨盤痛の原因となる。また、胚着床時の子宮筋の収縮制御異常により、前置胎盤や異所性妊娠などの着床部異常が生じ、時として重大な母体リスクとして臨床的に問題となる。さらに妊娠時の子宮収縮の異常は胎児が十分に成熟する前に陣痛が起こる早産を誘発し、世界的にも新生児死亡の最大の原因として問題となっている。

このような背景のもと、申請者らが世界に先駆けて報告してきた生殖臓器の組織透明化技術(Kagami, et al., *Sci Rep*, 2017; *Reprod Biol Endocrinol*, 2018)を用いたマウス子宮筋の解析から、これまで認識されてこなかった新たな子宮筋構造を同定した。この構造は、内輪筋と外縦筋を橋渡しするような筋構造で、互いに入り組み合い、メッシュ状の構造を呈している。この構造はこれまで報告がなく、この構造がどのように子宮収縮に関わっているのか全く分かっていないのが現状である。一方ヒトの子宮筋にはこれに類似するメッシュ状の構造が筋層中間層に存在することが報告されており(Kuijsters, et al., *Reprod Biomed Online*, 2017)、子宮筋の異常運動に起因する病態の解明に、マウスモデルが利用可能であることを示唆している。

マウス子宮筋のような内輪筋と外縦筋で構成されている小腸の構造的類似性に注目すると、小腸では筋層間にアウエルバッハ神経叢が存在し、自律的な収縮の起点になっていることが知られている(Kumral, et al., *Dig Dis Sci*, 2018)。一方、子宮には telocyte と呼ばれるペースメーカー細胞が存在することが近年報告されているが、その局在は明らかにされていない(Janas, et al., *Adv Clin Exp Med*, 2018)。そこで申請者らは、マウス telocyte の特徴である CD34 陽性及び Vimentin 陽性細胞の局在を調べたところ、メッシュ構造近傍に telocyte が密集して分布することが分かった。このことから、今回明らかにされたメッシュ構造が子宮筋収縮の制御起点にある可能性が示唆された。

2. 研究の目的

上記背景から本研究では、「子宮筋収縮の起点はどこか」、「内輪筋と外縦筋の収縮がどのように生理的子宫筋蠕動に関わるのか」という学術的問いに対して、今回明らかにしたマウス子宮筋の新規メッシュ構造が、「子宮収縮の起点に関与する特殊構造であり」、さらに「内輪筋と外輪筋を橋渡しすることでその筋収縮を巧妙に調節する役割を果たす」という仮説をたて検証を行い、女性の妊孕性に密接にかかわり臨床的にも重要なこれらの課題を考究することを目的とした。

3. 研究の方法

子宮収縮の起点に関する解析

1) 組織透明化技術を用いた新規メッシュ構造の組織学的解析

新規メッシュ構造を取り囲む周辺の組織学的特徴を明らかにするため、まず組織ブロック標本を透明化し、取得した三次元画像を用いてその中の解析部位を同定し、続いて、その解析部位を含む断面で切片を作製し免疫染色法を用いて解析を行う。免疫染色では、メッシュ構造を構成する筋以外の血管やリンパ管(CD31, LYVE-1)やペースメーカー細胞である telocyte (CD34, Vimentin)、骨盤内から入力される自律神経(TUJ1, nNOS, CGRP)などとの関係性を明らかにし、同部位の組織構造をより詳細に解析することで、収縮起点に関連する組織学的データを得る。

2) 電気生理学的検討

上記組織学的解析データに基づき、電気生理学的にペースメーカー細胞を刺激することで、メッシュ構造を起点に子宮収縮が誘導できるか検証を行う。マウスの telocyte は CD34 陽性であることから、蛍光標識抗 CD34 抗体を用いた生細胞ラベリングにより、子宮組織に対して直接的に telocyte を電気刺激することで、収縮の起点を検証する。

内輪筋と外輪筋の筋収縮を巧妙に調節する役割を果たしているか検証

1) カルシウムイメージングを用いた解析

子宮筋の運動とメッシュ構造の役割については、カルシウムイメージングで解析を行う。検証には GCaMP-flox と SM22(カルボニン:平滑筋特異的タンパク)-Cre マウスから作出した遺伝子改変マウス(GCaMP-flox/SM-Cre)を用いて子宮筋活動を観察する。筋収縮に際し急激に変化する細胞内 Ca 濃度を検出することで収縮起点ならびに収縮の連動をイメージングすることが可能と

なる。内輪筋と外縦筋の収縮が、メッシュ構造を介してどのように連携されるのか明らかにする。また、このメッシュ構造を人為的に断裂させた横断面組織を用いて収縮がどのように変化するか解析を行い、そのメッシュ構造の役割を検証する。

次に、収縮起点に入力する細胞が上記実験から同定された後、それらの細胞から子宮筋に入力する神経筋接合部の伝達物質に拮抗する薬剤を付加し、子宮筋の収縮運動に異常が生じるか検証する。またホルモンを添加することで、ホルモン周期の違いによる子宮筋の収縮の差異についても検証を行い、実際の生理的現象が説明可能か検証を行う。

4. 研究成果

組織透明化技術を用いたマウス子宮筋の解析から、これまで認識されてこなかった新たな子宮筋構造を同定した。全身で緑色蛍光を発する CAG-EGFP マウスの子宮を透明化したところ、EGFP 蛍光シグナルの強度差から子宮筋層と内膜組織に明瞭なコントラストが生まれ、これにより子宮筋層を明瞭に描出することができ、CAG-EGFP マウスが子宮筋解析に適したモデルであることが明らかになった。このマウスモデルを用いることで、管腔構造を呈する子宮の遠位・近位を問わず、すべての領域で内輪筋と外縦筋の間にメッシュ状の中間層が存在することを明らかにした。光シート顕微鏡で取得した連続画像を詳細に解析すると、内輪筋に起始した筋線維束が外縦筋に連絡し、内輪と外縦を橋渡しする構造を呈していた。この連絡が左右交互に認められ、全体としてメッシュ状構造を形成していることが分かった。げっ歯類の子宮筋構造においては、このようなメッシュ状構造の存在を説明した報告はなく、今回透明化技術を用いることで初めて明らかにされた新たな構造であることが分かった。次にその構造的意義を検証するため、メッシュ状構造付近に存在する細胞特性について免疫組織化学による解析を行った。この領域には CD31 陽性の血管構造が豊富に観察され、メッシュを呈する筋線維束がこの血管を横切るように走行していた。さらに TUBB3 陽性の神経軸索もこの領域に入力されていることが明らかになった。興味深いことに、ペースメーカー細胞として知られる CD34 陽性の子宮テロサイトもメッシュ状の筋線維束に沿って走行するのが観察され、TUBB3 陽性の神経軸索終末がテロサイトに接している様子も観察された。電気生理学的にペースメーカー細胞を刺激することで、メッシュ構造を起点に子宮収縮が誘導できるか検証を行うため、蛍光標識抗 CD34 抗体を用いた生細胞ラベリングにより、子宮組織に対して直接的に telocyte を電気刺激する計画をしていたが、子宮筋への *Ex vivo* での直接的電気生理実験に難渋したため、子宮筋組織の単離処理から選択的に蛍光標識抗 CD34 抗体でラベリングし、同細胞を選択的にパッチクランプ法で電気生理学的検討を行う方針に変更し、現在も検討中のところである。また、当初遺伝子改変マウス (GCaMP-flox/SM-Cre) を用いて子宮筋活動を観察する計画であったが、作出に時間を要しており、並行して子宮筋組織をピプラトームで生細胞のまま薄切し、内輪筋と外輪筋とが連絡する切片に対して、筋活動を Ca イメージング下で解析できるか実験系の検証を行っている。前述の遺伝子改変マウスが作出できた段階で、当該実験系を用いた解析を予定通り行う方針である。

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 Kyosuke Kagami, Masanori Ono, Takashi Iizuka, Takeo Matsumoto, Takashi Hosono, Naomi Sekizuka-Kagami, Yohei Shinmyo, Hiroshi Kawasaki, Hiroshi Fujiwara | 4. 巻 10(1) |
| 2. 論文標題 A novel third mesh-like myometrial layer connects the longitudinal and circular muscle fibers - A potential stratum to coordinate uterine contractions | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 8274 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65299-0. | 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kyosuke Kagami |
| 2. 発表標題 A novel third mesh-like myometrial layer connects the longitudinal and circular muscle fibers -A potential stratum to coordinate uterine contractions |
| 3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会 International Session Workshop |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|