

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21651

研究課題名（和文）がん自然発症マウスを用いた末梢概日リズム異常によるがん発生・進展誘導機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanisms of induction of cancer initiation/progression by abnormal peripheral circadian rhythm using cancer mouse models

研究代表者

大黒 多希子 (Daikoku, Takiko)

金沢大学・疾患モデル総合研究センター・教授

研究者番号：30767249

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、子宮内膜増殖症あるいは子宮体癌を自然発症するマウスモデルで Bmal1 遺伝子を欠損させることによって、末梢の概日リズムの乱れが、血管新生を制御して、子宮体癌の発症と進展に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの知見からは、子宮体癌発生が段階的な遺伝子変異の蓄積だけでは説明が困難であるが、末梢時計の乱れが、子宮体癌発症・進展に関与する可能性をマウスモデルを用いて示唆した点が学術的に意義がある。また、新しい機序の解明により臨床の新しい診断法や治療法の開発に繋がる点で社会的に意義がある。

研究成果の概要（英文）： In the present study, we found that disruption of peripheral circadian rhythms may be involved the initiation and progression of endometrial cancer by regulating angiogenesis through the deletion of the Bmal1 gene in mouse models that spontaneously develops endometrial hyperplasia or endometrial cancer.

研究分野：生殖生理学、婦人科がん

キーワード：マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常組織の機能維持には上皮-間質間の相互応答をはじめとする空間的な連動性が必須であるが、近年それを統一的に制御する因子として神経や内分泌システムの他に、細胞自身が内在性に有する概日リズムの存在が注目されている。概日リズムは時計遺伝子と呼ばれる一群の分子の周期的な発現によって形成されるが、正常臓器におけるその臓器特有の機能や組織環境の保持には臓器全体にわたる概日リズム周期の同期性が重要と推察されている。近年様々な臓器での概日リズムの乱れが糖尿病や心臓血管系疾患などの生活習慣病の発症に関わっている可能性が指摘され (Ando et al. *Endocrinology* 2016)、さらにがん細胞においても概日リズム異常の関与を示唆する報告がなされている (Altman et al. *Cell Metab* 2015)。しかしながら、がんの自然発症モデルを用いてこの関係を直接証明した報告はない。申請者はヒト子宮体癌患者の約80%には罹患組織における*Pten*遺伝子の体細胞変異が認められるということに注目して、子宮特異的および子宮上皮特異的に*Pten*遺伝子を欠損する*Pten*-PRcreマウスと*Pten*-LTFcreマウスを作製したところ、子宮間質も含めて*Pten*遺伝子が欠損した*Pten*-PRcreでは100%子宮体癌を自然発症し (Daikoku et al. *Cancer Res*2008) さらに筋層浸潤、リンパ節転移するのに対して、上皮細胞のみ欠損する*Pten*-LTFcreでは過形成までの病変をこれも100%自然発症するがリンパ節転移はしない (Liang, Daikoku et al. *PLoS Genet* 2018) ことを明らかとした。さらに、*Pten*-PRcreマウスの卵巣を除去しプロゲステロン(P4)を連続投与すると、子宮上皮癌(子宮体癌)の進行は抑えるが、子宮間質が100%肉腫化するが筋層浸潤しないことを見出した(unpublished data)。これらの表現型はいわゆる段階的な遺伝子変異の蓄積だけでは説明がつかず、別視点からの探索が必要である。

また、申請者らは最近時計遺伝子と生殖・周産期疾患との関係を調べる目的で子宮特異的に時計遺伝子*Bmal1*を欠損させたマウス (*Bmal1*-PRcre) の作出に成功し、妊娠維持できず産仔が全く得られないことを見出した(unpublished data)。この表現型は、子宮組織内の概日リズムが確かにこの組織の正常機能を維持する上で重要な役割をしていることを示している。

2. 研究の目的

本研究では「子宮体癌・肉腫の発生と進展に末梢時計遺伝子の異常が関与する」との仮説を掲げ、*Pten*欠損子宮体癌マウス、*Pten*欠損+P4子宮肉腫マウスを基調にして新たに子宮上皮単独または間質を含めて特異的に*Bmal1*を追加欠損させたマウスを作出し、子宮体癌の発生と子宮体癌・肉腫の筋層浸潤やリンパ節転移などに対する時計遺伝子の関与について検討することを目的とした。

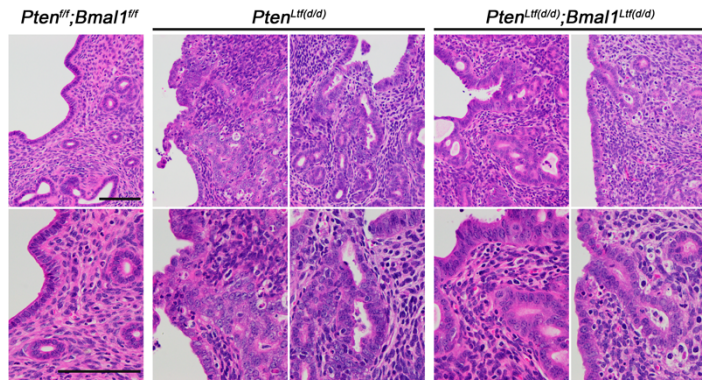
3. 研究の方法

これまでがん抑制遺伝子*p53*を単独で子宮特異的に欠損させた*p53*-PRcreマウスでは過形成や癌・肉腫は発症しなかったが、*p53*-*Pten*-PRcreマウスでは子宮体癌・肉腫の早期発生および子宮体癌の浸潤・転移能の増強が観察されている。そこで子宮上皮過形成から子宮体癌への進展過程を*Pten*-LTFcreマウスで、また子宮体癌および子宮肉腫の筋層浸潤およびリンパ節転移への進展過程を*Pten*-PRcreマウスと*p53*-*Pten*-PRcreを基調にして、これらのマウスに時計遺伝子*Bmal1*を

様々な条件下で欠損させて、がんの発生、子宮筋層浸潤、リンパ節転移の、またP4投与し肉腫の子宮筋層浸潤、リンパ節転移の有無と時期及びその頻度の変化について解析する。

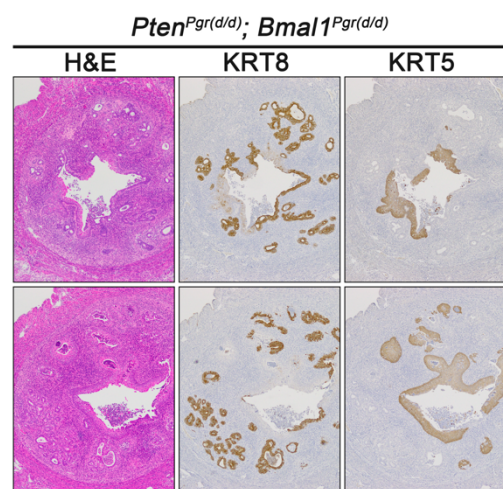
4. 研究成果

まず、子宮上皮特異的に *Bmal1* と *Pten* を欠損させた *Bmal1-Pten-LTFcre* マウスを作製し *Pten-LTFcre* マウスと比較した。*Pten-LTFcre* マウス子宮では、子宮内膜増殖症が自然発症する。6ヶ月令で子宮を採取した場合、*Pten-LTFcre* のものと比べて、*Bmal1-Pten-LTFcre* の子宮の上皮は、



正常上皮の形体に近く、*Bmal1* 欠損により悪性度が低く保たれている可能性が示唆された（右図）。

次に、子宮内膜特異的に *Bmal1* と *Pten* を欠損させた *Bmal1-Pten-PRcre* マウスを作製し *Pten-PRcre* マウスと比較した。*Pten-PRcre* マウス子宮では、子宮体癌が自然発症する。3ヶ月令で子宮を採取した場合、*Pten-PRcre* のものと比べて、*Bmal1-Pten-PRcre* の子宮の上皮の悪性度もまた低く保たれている可能性が示唆された（右図）。一方で、P4投与した場合の肉腫の発生頻度には、変化がなかった。上記マウスのリンパ節および



および *Bmal1-p53-LTFcre*、*Bmal1-p53-PRcre* および *Bmal1-p53-Pten-PRcre* マウスについては、引き続き組織学的解析を行っている。また、*Bmal1-Pten-PRcre* と *Pten-PRcre* の子宮の上皮組織と間質組織に分けて単離して mRNA を抽出し、*Bmal1* 遺伝子の欠損により発現変化した遺伝子群を microarray 法で解析中である。今後、子宮体癌の組織を採取して遺伝子群の発現を臨床データと照らし合わせて解析し、これらの分子に関する知見が新しい診断法や治療法の開発に繋がる可能性について検討する。

上記で示した子宮内膜増殖症および子宮体癌マウスモデルに加えて、*Bmal1* 遺伝子の単独欠損が子宮機能に何らかの影響を与えるかについて、子宮内膜特異的に欠損した *Bmal1-PRcre* マウスを用いて解析した。*Bmal1-PRcre* の妊娠子宮では、着床部位の吸収や胚の成長遅延などの病的な状態を呈し、全例が流死産に至り生存を得られなかった。組織学的に解析すると、妊娠8日目に脱落膜化部位の縮小、血管新生の阻害および胚の吸収が観察され、妊娠12日目には母体の血管新生が阻害され、胎盤の形成不全が確認された。さらに、*Bmal1-PRcre* の一部個体では血清P4レベルの低下を認めたためP4を補充する実験を行ったが、胎盤形成不全の表現型は回復しなかった。以上のことから *Bmal1* 欠損が血管新生の阻害をおこなっている可能性ことが示唆された。したがって、子宮体癌の発症・進展においても *Bmal1* 欠損が血管新生の阻害を行い、癌の進展を抑制する可能性があるかと推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fujiwara Tomoko, Ono Masanori, Mieda Michihiro, Yoshikawa Hiroaki, Nakata Rieko, Daikoku Takiko, Sekizuka-Kagami Naomi, Maida Yoshiko, Ando Hitoshi, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Adolescent Dietary Habit-induced Obstetric and Gynecologic Disease (ADHOGD) as a New Hypothesis? Possible Involvement of Clock System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12051294	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 -

1. 著者名 Nakayama Midori, Ono Masanori, Iizuka Takashi, Kagami Kyosuke, Fujiwara Tomoko, Sekizuka Kagami Naomi, Maida Yoshiko, Obata Takeshi, Yamazaki Rena, Daikoku Takiko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Hypertensive disorders of pregnancy are associated with dysmenorrhea in early adulthood: A cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2292 ~ 2297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14431	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 -

1. 著者名 Kayahashi Kayo, Mizumoto Yasunari, Matsuoka Ayumi, Obata Takeshi, Iwadare Junpei, Nakamura Mitsuhiro, Daikoku Takiko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Mucinous, endometrioid, and serous ovarian cancers with peritoneal dissemination are potent candidates for P-cadherin targeted therapy: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07737-w	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 -

1. 著者名 Hasan Nazmul, Nagata Naoto, Morishige Jun-ichi, Islam Md Tarikul, Jing Zheng, Harada Ken-ichi, Mieda Michihiro, Ono Masanori, Fujiwara Hiroshi, Daikoku Takiko, Fujiwara Tomoko, Maida Yoshiko, Ota Tsuguhito, Shimba Shigeki, Kaneko Shuichi, Fujimura Akio, Ando Hitoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Brown adipocyte-specific knockout of Bmal1 causes mild but significant thermogenesis impairment in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101202 ~ 101202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101202	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 -

1. 著者名 Nakata Hiroki, Terakawa Jumpei, Horike Shin-ichi, Daikoku Takiko, Iseki Shoichi	4. 巻 381
2. 論文標題 The lack of terminal tubule cells in the submandibular gland of mice deficient in submandibular gland protein C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 229 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03205-w	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0件

〔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
研究分担者	水本 泰成 (Mizumoto Yasunari) (00420331)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	
研究分担者	藤原 浩 (Fujiwara Hiroshi) (30252456)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	安藤 仁 (Ando Hitoshi) (50382875)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

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