

ライフサイクルに伴う概日リズム変化 ～成熟期：性周期の影響～

中村孝博[✉]

帝京平成大学薬学部薬学科

哺乳類の睡眠-覚醒リズムはライフサイクルの各ステージにおいて刻々と変化している。一般にヒトでは、生後間もない乳幼児の睡眠-覚醒リズムは未発達で、徐々に母性行動や光などの外的因子に同調し概日リズムが出現する。成人では睡眠-覚醒リズム、ホルモン分泌などの生理リズムはともに強固であるが、加齢に伴い徐々にこれらのリズムが不安定になってくる。特に女性（雌性）では、更年期や成熟期の月経周期によるホルモンバランスの急激な変化によって、睡眠-覚醒リズムの不調（変化）をきたす場合がある。哺乳類においては、時計遺伝子が次々に発見され分子時計モデルが明らかになりつつあるが、生物時計中枢である視床下部・視交叉上核から出力される行動リズムの神経回路、また末梢時計がどのように生理機能に関わっているかなど未だ不明な点が多く、その調節機構もほとんど解明されていない。社会の高齢化に伴ってQOL（Quality of life）の向上が真剣に議論されている現在、ライフサイクルが生体リズムに与える影響を個体から分子レベルまで理解することは急務である。本稿では、ライフサイクル、特に雌性の成熟期に焦点を絞り、月経周期（性周期）が概日リズムに与える影響を筆者らの最近の知見を含め、げっ歯類のデータを中心に活動リズムから時計遺伝子発現リズムについて述べ、今後の研究の方向性について展望する。

1. はじめに

「ライフサイクル」とは、大義では様々な意味を含むが、本稿では「誕生→成長期（思春期）→成熟期→更年期→老年期→死」を示す不可逆的周期として定義したい。ヒトでは、生後間もない乳幼児の睡眠-覚醒リズムは不明瞭な形で出現し、徐々に母性行動や光などの外的因子に同調したリズムが形成される [1]。そして、生後約3ヶ月でよりはっきりとした夜間睡眠のリズムが構築される [2]。成人では、睡眠-覚醒、ホルモン分泌などは顕著な概日リズムを示すが、男性と女性で分けて考えなければならない。男性（雄性）の場合、概日リズムに影響を与える男性ホルモン（テストステロン）の分泌は、老化によって徐々に減少するが、個体間に大きなばらつきがなく、生涯を通してあまり変動しない。一般に、老年期の人々は、「早寝早起き」と言われるが、げっ歯類の研究では、老化に伴い行動量が低下し、行動リズムの断片化みられ、また、恒暗条件下での自由

継続リズム周期が短縮したり延長したりすることが報告されている [3-7]。一方、女性（雌性）では概日リズムに影響を与える卵巣ステロイドホルモンのエストロゲンとプロゲステロンはライフサイクルのステージごと、さらには月経周期（性周期）に伴って分泌量が増減する。エストロゲンの分泌量は思春期に上昇し、更年期には成熟期の半分以下になる。いわゆる更年期障害（のぼせ、発汗、倦怠感など）はエストロゲンの激減のため引き起こされる。更年期、妊娠期、そして月経周期に伴って精神・身体症状の出現する月経前緊張症、月経前不快気分障害の症状の中に、不眠や過眠などの睡眠障害が報告されているが、この原因も卵巣ホルモンの分泌量の変化によるものと考えられている [8]。

哺乳類における生物時計中枢は視床下部・視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus, SCN）である事が示されてから数十年の時が流れているにもかかわらず、行動リズムを駆動するSCNからの出力経路、末

✉t.nakamura@thu.ac.jp (〒290-0193 千葉県市原市うるいど南4-3) Tel: 0436-74-6159 Fax: 0436-74-3970

梢組織における時刻依存的なホルモン分泌などの生理リズムの発現機構など、未だ解明されていないことが多くある。主時計であるSCNがどのように末梢時計を調節し、また、どのような因子によって末梢時計の針が動かされるかなど、不明な点が多く残されている。本稿では、成熟期の性周期が概日リズムに与える影響について、SCNと末梢時計が性周期に伴う卵巣ステロイドホルモンの変動によって影響を受けるか否か、時計遺伝子発現リズムを指標とした筆者らのデータを中心に紹介し、今後の研究の発展性を議論する。

2. 性周期に伴う活動リズムの変化

月経周期（性周期）は排卵と排卵の間隔であり、ヒトでは24日から32日間の周期を持つ。排卵に先行するのが卵泡期であり、エストロゲンの分泌が高まる。排卵後は黄体期と呼ばれ、プロゲステロンの分泌が高まる。一方、ラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類は4から5日を一周期とする性周期をもち、発情前期（Proestrus）、発情期（Estrus）、発情後期（Metestrus）、非発情期（Diestrus）と区別される。図1にラット性周期中の卵巣ステロイドホルモンと卵泡刺激ホルモン（LH）の血中濃度変化を示したが、マウスやハムスターも同様の変動を示す。エストロゲンの血中濃度は発情前期の明期の始め頃から急激に上昇し、その後、下垂体より排卵を誘発する卵泡刺激ホルモン（LH）の大量分泌が見られ（LHサージ状分泌）、また明期の遅い時間帯からプロゲステロンの濃度も上昇する[9]。一方、行動リズムは発情前期から発情期にかけて夜間の行動量は

亢進し活動期の位相が前進する。この現象はスカラップ運動と呼ばれ、発情前期・発情期にのみ行動量の亢進、位相の前進がみられ、他のステージでは見られない[10]。このような現象は健常女性では見られないが、月経前緊張症、月経前不快気分障害に伴う不眠や過眠、そしてその症状とは別の睡眠障害も報告されている[8, 11, 12]。行動リズムと明暗サイクルの位相角差はリズム周期に依存するので、げっ歯類で見られるスカラップ運動は、発情前期および発情期にリズム周期が短縮していることを示唆する。この現象を実験的に証明する為に卵巣を摘出

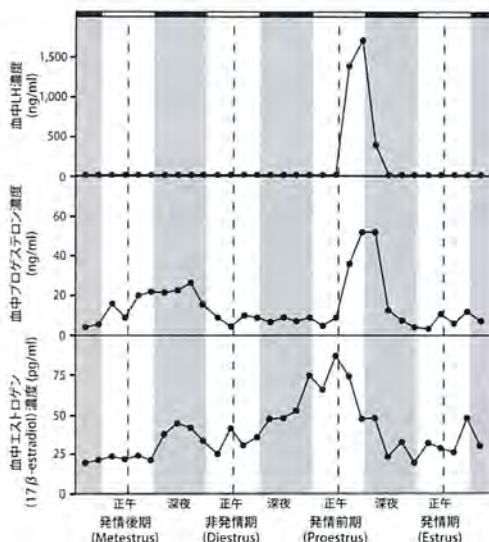


図1 ラット性周期中の卵巣ステロイドホルモンと卵泡刺激ホルモン（LH）分泌の変動
成熟雌性ラットのエストロゲン、プロゲステロン、LHの血中濃度を示した。上部の黒いバーと灰色の網掛けは暗期を示し、破線は正午を示す。（文献[9]より改変）

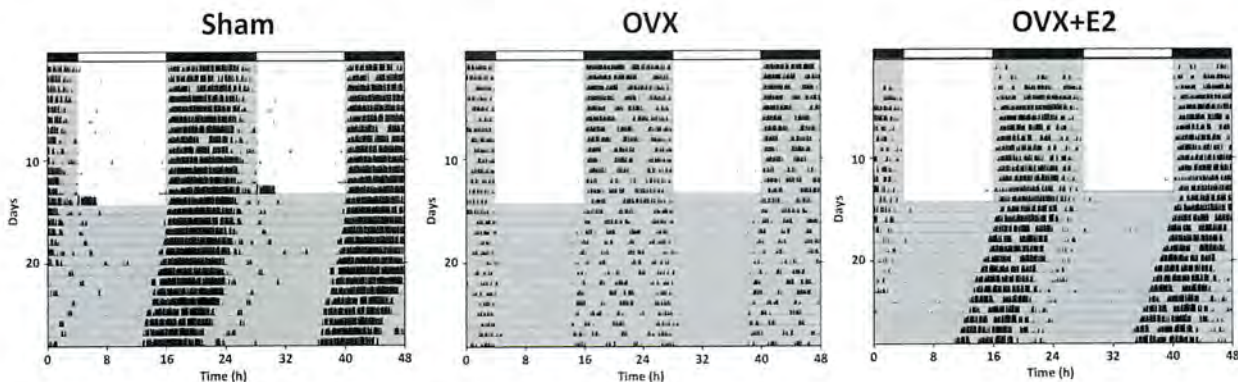


図2 エストロゲンが輪回しリズムに与える影響

雌性PER2::LUCノックインマウスの輪回し活動リズムの代表例をダブルプロットアクトグラムで示した。左から、偽手術（Sham）、卵巣摘除（OVX）、卵巣摘除及びエストロゲン投与（OVX+E2）。上部の黒いバーと灰色の網掛けは暗期を示す。2週間、明暗条件下（12:12）で飼育した後、恒暗条件下へ移した。卵巣摘除群では、偽手術群に比べ行動量が減少し、自由継続リズム周期が延長している。エストロゲンの投与は、行動量を亢進させ、自由継続リズム周期を短くする効果があることが伺える。また、この実験では顕著なスカラップ運動は観察されなかった。（筆者ら、未発表データ）

(Ovariectomy, OVX) したラットやハムスターを用い皮下にエストロゲンを埋め込み、行動リズムを測定する実験が多く試みられた。その結果、ラット、ハムスターにおいて、エストロゲンは行動量を亢進させ、自由継続リズム周期を短縮させる効果があることが示された [13-16]。また、プロゲステロンはエストロゲンの効果を軽減するという報告もされている [13]。筆者らも、同様の実験をマウス (PER2::LUCノックインマウス [17]) を用い行ったところ、OVXすなわち卵巣ホルモンがない状態では、恒暗条件下での自由継続リズム周期は延長し、エストロゲンの投与は動物の行動量を増大させ、自由継続リズム周期を短縮させた (図2)。これらの結果から、マウスにおいても、エストロゲンは活動を亢進させ、自由継続リズム周期を短縮する効果があることが示された。

3. 性周期に伴う時計遺伝子発現リズムの変化

一連の時計遺伝子群が細胞内でポジティブ・ネガティブフィードバックループとして分子時計を形成し、約24時間を作り出す分子機構は解明されつつある [18]。この分子時計はSCNだけでなく、主要な末梢組織においても存在が確認されており、卵巣や子宮などの雌性の生殖器官も例外ではなく、時計遺伝子の発現やそのリズムは確認されている [19-22]。しかしながら、分子時計がどのように時刻依存的な生殖生理機能に関わっているかなど、不明な点が多い。例えば、時計遺伝子変異マウスの *Clock*-mutant mice は不規則な性周期を示し、発情前期に起こる排卵性のLHサージ状分泌が見られなくなり、子宮における時計遺伝子のリズムも消失する [23, 24]。

また、決まって発情前期の明期の終わり頃に起こるLHサージ状分泌は、高濃度のエストロゲンとSCNにおけるバゾプレッシンニューロンの時刻情報が必要とされている [25, 26]。いずれの現象も分子時計が生殖生理機能の恒常性維持に必要不可欠であることを示しているが、分子時計がどのような情報を出し、どのような調節を受けているのか、その分子機構はほとんど解明されていない。筆者らは、最初に分子時計の調節機構に着目し、SCNまたは生殖器官の末梢時計が性周期の影響を受けるか否かを検討した。ラットを用い、時計遺伝子 (*Per1*, *Per2*, *Bmal1*) 発現リズムを *in situ* hybridization法と定量的real time PCR法で解析した結果 (図3)、SCNでは性周期の影響をほとんど受けず、末梢組織である肝臓、子宮、卵巣では、性周期の影響が顕著に現れ

た。その効果は遺伝子、組織の種類で一定ではなかったが、子宮と卵巣の *Per2* mRNA発現に着目すると、他のステージに比べ発情前期でリズムの振幅は大きく位相が前進していた。Amirらのグループも同様にSCNのPER2発現リズムは性周期の影響を受けないとの報告をしているため [27]、主時計であ

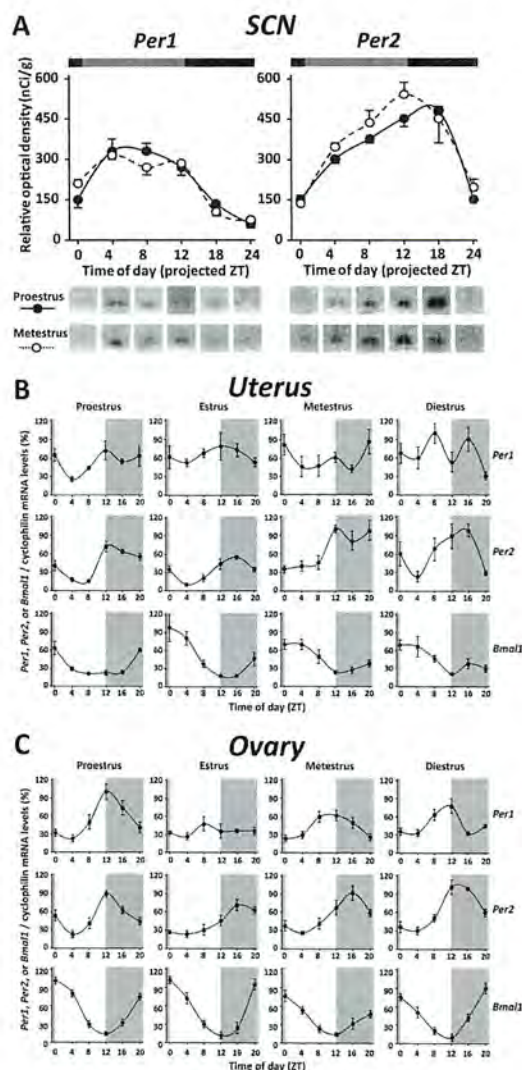


図3 性周期が時計遺伝子発現リズムに与える影響
A:ラットSCNにおける *Per1* と *Per2* mRNAの発現リズムを *in situ* hybridization法で測定した。光の影響を除くため、3日間の恒暗条件下の後、腔スメア像を参考に、発情前期 (Proestrus) と発情後期 (Metestrus) に分け、24時間、4時間おきのサンプリングを行った。SCNの *Per1* と *Per2* mRNA発現リズムは性周期の影響をほとんど受けないことが観察された。(筆者ら、未発表データ) B, C:ラット子宮 (Uterus) と卵巣 (Ovary) における *Per1*, *Per2*, *Bmal1* mRNAの発現リズムを定量的real time PCR法で測定した。腔スメア像を参考に、発情前期 (Proestrus)、発情期 (Estrus)、発情後期 (Metestrus)、非発情期 (Diestrus) に分け、明暗条件下にて、24時間、4時間おきのサンプリングを行った。子宮及び卵巣において、それぞれ遺伝子が性周期の各ステージで発現リズムの形が変化していることが観察された。(文献[28]より改変)

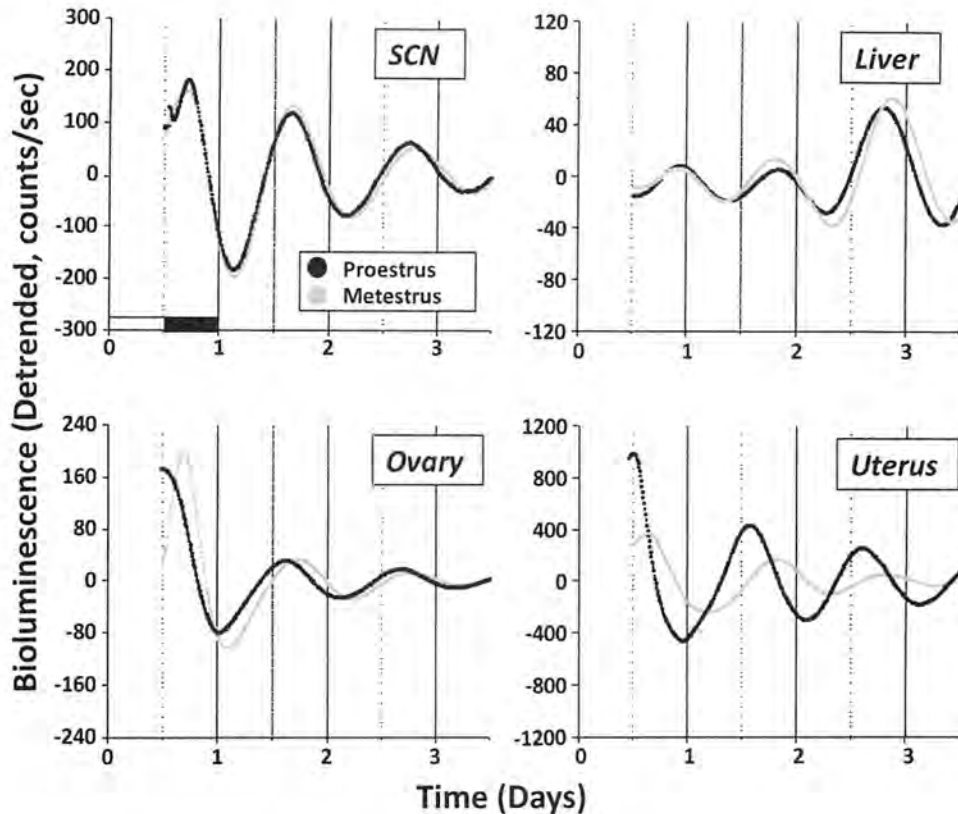


図4 性周期のステージの違いによるPER2::LUCリズムの変化

発情前期 (Proestrus) と発情後期 (Metestrus) にサンプリングを行った雌性PER2::LUCノックインマウスのSCN、肝臓 (Liver)、卵巣 (Ovary)、子宮 (Uterus) におけるPER2::LUC発光リズムの代表例を示した。膣スメア像を参考に、発情前期と発情後期に分けサンプリングを行い、SCN、肝臓、卵巣、子宮の組織培養を行った。4日間にわたって発光リズムを計測している。子宮において、発情前期のPER2::LUCリズム位相は前進し、振幅も大きかった。(文献 [28] より改変)

るSCNは性周期の影響を受けないと考えられる。また、筆者らはPer2遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を連結し、生物発光リズムが測定できるPER2::LUCノックインマウス [17] を用い、培養組織における性周期の影響を観察した。膣スメア像を参考に、発情前期と発情後期のグループに分けそれぞれSCN、肝臓、卵巣、子宮の組織培養を行い光電子増倍管によりPER2::LUCの生物発光リズムを観察した。培養系においてもSCNのリズムは性周期のステージによって違いが認められなかったが、子宮において、PER2::LUCリズムの位相は発情後期に比べ発情前期に前進し、リズムの振幅も大きかった (図4)。この結果は、図3で示した*in vivo*での結果と一致しており、子宮の時計遺伝子発現リズムは性周期の影響を受けるが、SCNでは受けないことが明らかとなった [28]。

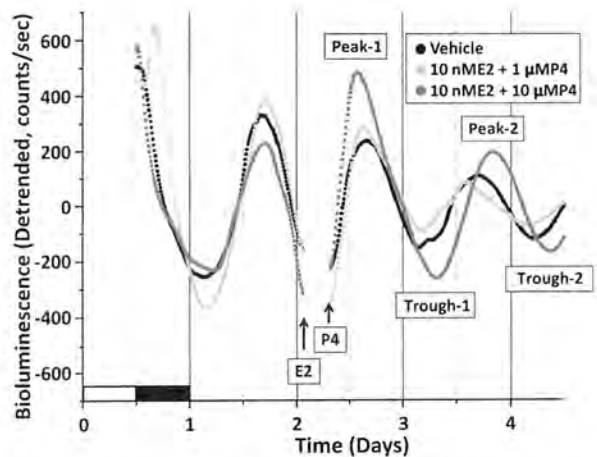


図5 卵巣ステロイドホルモンが培養子宮のPER2::LUCリズムに与える影響

発情後期にサンプリングを行った雌性PER2::LUCノックインマウスの子宮に卵巣ステロイドホルモンを投与しPER2::LUC発光リズムを計測した代表例を示した。発情後期のマウスを選びサンプリングを行い、子宮の組織培養を行った。その2日後に、エストロゲン (E2) を明期の早い時間にあたる時間帯に、プロゲステロン (P4) を明期の遅い時間にあたる時間帯に、それぞれ培養液中に添加し、擬似的な発情前期を構築した。その後、2日間にわたって発光リズムを計測している。エストロゲンと比較的高濃度のプロゲステロンの投与は、子宮におけるPER2::LUCリズムの振幅を増大させ、次の日のリズム位相を後退させた。(文献 [28] より改変)

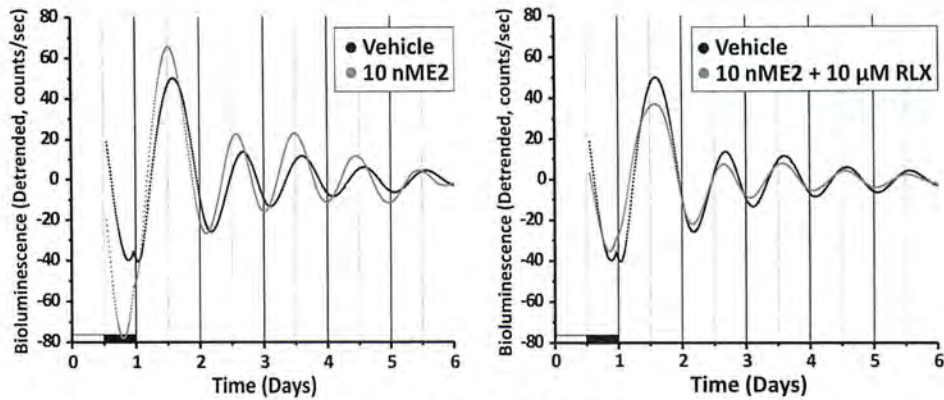


図6 エストロゲンが子宮のPER 2::LUCリズム周期に与える影響
 雌性PER 2::LUCノックインマウスの子宮におけるPER 2::LUC発光リズムに対するエストロゲン (E 2) の効果の代表例を示した。卵巣摘除したマウスの子宮をサンプリングし組織培養を行った。左のパネルでは、培養液中に10nMエストロゲンを添加した場合と溶媒 (Vehicle) を比較している。右のパネルでは、子宮においてエストロゲンに拮抗作用を示すラロキシフェン (RLX) の効果を示している。エストロゲンは子宮におけるPER 2::LUCリズム周期を短縮させる効果を示し、ラロキシフェンはその効果を減弱させた。(文献 [30] より改変)

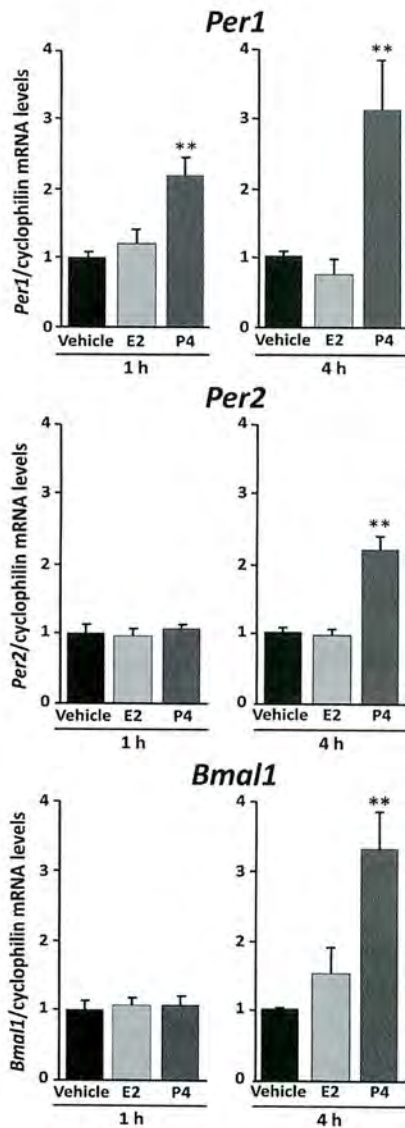


図7 エストロゲンとプロゲステロンがヒト乳癌細胞株 (MCF-7) における時計遺伝子発現レベルに与える影響
 ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) を用い、エストロゲン (E 2) とプロゲステロン (P 4) が *Per1*, *Per2*, *Bmal1* mRNA の発現レベルに与える影響を定量的real time PCR法で測定した。プロゲステロンは4時間以内に時計遺伝子の発現レベルを上昇させる効果を示した。(文献 [28] より改変)

4. 卵巣ステロイドホルモンが時計遺伝子発現リズムに及ぼす影響

性周期が子宮および末梢組織の時計遺伝子発現リズムに影響を及ぼす事は明らかになったが、その影響が性周期に伴う神経的な支配によるものか、内分泌的なホルモンの血中濃度の変化によるものかどうかは明らかになっていなかった。Hattoriらのグループや筆者らは*in vivo*においてエストロゲンとプロゲステロンが子宮の時計遺伝子発現を上昇させたり、発現リズムに影響を与えたりすることを報告しているが [22, 29]、*in vitro* 培養システムを利用して、神経支配のない状態でホルモンを投与し、時計遺伝子発現リズムの変化を検討していなかった。筆者らは*in vitro*で生体内に近い擬似的なホルモン環境を構築し、子宮におけるPER 2::LUCリズムを調べた。その結果、発情前期のエストロゲン、プロゲステロンを構築した場合、擬似的発情前期ではPER 2::LUCリズムの振幅が大きくなった (図5)。その後続く擬似的な発情期ではPER 2::LUCリズムの高い振幅は維持され、また、リズム位相が後退した。このことは、*in vivo*の子宮における*Per 2* mRNAリズム (図2) と類似しており、性周期に伴うエストロゲンとプロゲステロンの濃度変化が時計遺伝子発

現リズムを調節している可能性が示唆された [28]。さらに、それぞれのホルモンがどのような作用を与えるかを調べたところ、エストロゲンは子宮におけるPER2::LUCリズム周期を短縮させる効果があることを見いだした (図6) [30]。また、子宮において、エストロゲンの拮抗剤 (アンタゴニスト) として作用するラロキシフェンはエストロゲンの効果を減弱させた。同様の実験をSCNにおいても行ったが、エストロゲンはPER2::LUCリズムに影響を及ぼさなかった。一方、プロゲステロンは子宮におけるPER2::LUCリズム周期に影響を与えなかったが、ヒト乳癌細胞株であるMCF-7を用いた実験では、プロゲステロンは*Per1*, *Per2*, *Bmal1* mRNA発現レベルを素早く有意に上昇させた (図7) [28]。Hattoriらのグループもまた、ラット子宮間質細胞を用いた研究で、プロゲステロンが有意に*Per1* 発現を上昇させることを報告している [29]。これらのことから、エストロゲンは、分子時計の周期短縮効果を持ち、プロゲステロンは急性的に時計遺伝子の発現を促進させる効果を持つことが示唆される。

5. おわりに

本稿ではライフサイクルの一ステージである雌性の成熟期における性周期が概日リズムに与える影響について筆者らのデータを中心に概説した。他のライフサイクルのステージ、成長期や老年期では行動・生理リズムは成熟期以上に変化に富んでいることから、分子時計のダイナミックな変化が推測される。筆者らの研究結果と他のグループの結果と合わせるとこれまでに示唆されることは、1. 性周期とそれに伴う卵巣ステロイドホルモンの変動はSCNの分子時計リズムに顕著な影響を及ぼさないが、末梢組織の分子時計に影響を与える。2. エストロゲンは直接的に子宮の分子時計リズム周期を短縮させる効果を持つ。3. プロゲステロンは急性的に時計遺伝子の発現を上昇させる効果を持つ。これらの結果の中でもっとも議論すべき点は、組織ごとに卵巣ステロイドホルモンの効果が違う点である。このことは、それぞれのステロイドホルモン受容体の分布で説明できるかもしれない。例えば、エストロゲンの主要な受容体である核内受容体のER α とER β の発現分布はそれぞれの組織においてまったく異なる。SCNではER β の発現が確認されており [31]、肝臓ではER α が多く発現している [32]。子宮では両方のERが発現しているが、ER α の方が有意に多く発現している [33]。これらの分布情報と筆者らの結果から、

ER α が分子時計の制御に重要な受容体であると推測されるが、核内受容体が転写調節因子として細胞内で機能を発揮するには共役因子群の存在が不可欠であり、ERが細胞内でどのように分子時計と関わるのか、共役因子群を含めたさらなる検討が必要である。また、卵巣ステロイドホルモンが子宮の分子時計の針を動かす効果があることが示されたが、その「針のずれ」は何を意味しているのだろうか、分子時計が子宮の生殖生理機能にどのように関与しているか今後の大きな課題である。

最後に、ヒトにおける月経前緊張症、月経前不快気分障害の症状に含まれる不眠や過眠などの睡眠障害の原因は分子時計の「針のずれ」が大きく関わっているかもしれない。卵巣ステロイドホルモンは生物時計中枢のSCNの時計の針を大きく動かさないが、末梢時計の針を動かす。この内的脱同調状態が女性に起こる睡眠障害を含む精神・身体的不調を引き起こしている可能性が考えられ、今後の研究がこれらの症状を緩和する治療法や治療薬の開発につながることを期待している。

<引用文献>

- 1) Kleitman N, Engelmann TG: J Appl Physiol 6: 269-282 (1953)
- 2) Coons S, Guilleminault C: Dev Med Child Neurol 26: 169-176 (1984)
- 3) Penev PD, Zee PC, Turek FW: Am J Physiol 273: R2132-2137 (1997)
- 4) Pittendrigh CS, Daan S: Science 186: 548-550 (1974)
- 5) Scarbrough K, Losee-Olson S, Wallen EP, Turek FW: Am J Physiol 272: R1219-1225 (1997)
- 6) Turek FW, Penev P, Zhang Y, van Reeth O, Zee P: Neurosci Biobehav Rev 19: 53-58 (1995)
- 7) Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW: Am J Physiol 273: R1957-1964 (1997)
- 8) Moline ML, Broch L, Zak R, Gross V: Sleep Med Rev 7: 155-177 (2003)
- 9) Butcher RL, Collins WE, Fugo NW: Endocrinology 94: 1704-1708 (1974)
- 10) Wollnik F, Turek FW: Physiol Behav 43: 389-396 (1988)
- 11) Suzuki H, Uchiyama M, Shibui K, Kim K, Tagaya H, Shinohara K: Psychiatry Clin

- Neurosci 56: 475-478 (2002)
- 12) Shinohara K, Uchiyama M, Okawa M, Saito K, Kawaguchi M, Funabashi T, Kimura F: Neurosci Lett 281: 159-162 (2000)
 - 13) Takahashi JS, Menaker M: Am J Physiol 239: R497-504 (1980)
 - 14) Morin LP, Fitzgerald KM, Zucker I: Science 196: 305-307 (1977)
 - 15) Morin LP: Physiol Behav 24: 741-749 (1980)
 - 16) Albers HE: Am J Physiol 241: R62-66 (1981)
 - 17) Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS: Proc Natl Acad Sci U S A 101: 5339-5346.
 - 18) Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL: Nat Rev Genet 9: 764-775 (2008)
 - 19) Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gras S: Endocrinology 147: 3769-3776 (2006)
 - 20) Johnson MH, Lim A, Fernando D, Day ML: Reprod Biomed Online 4: 140-145 (2002)
 - 21) Karman BN, Tischkau SA: Circadian clock gene expression in the ovary: Biol Reprod 75: 624-632 (2006)
 - 22) Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, Shimazoe T, Watanabe S, Ebihara S, Shinohara K: J Neurosci Res 82: 622-630 (2005)
 - 23) Dolatshad H, Campbell EA, O'Hara L, Maywood ES, Hastings MH, Johnson MH: Hum Reprod 21: 68-79 (2006)
 - 24) Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS: Curr Biol 14: 1367-1373 (2004)
 - 25) Funabashi T, Shinohara K, Mitsushima D, Kimura F: J Neuroendocrinol 12: 521-528 (2000)
 - 26) Funabashi T, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K, Kimura F: Prog Brain Res 141: 165-173 (2002)
 - 27) Perrin JS, Segall LA, Harbour VL, Woodside B, Amir S: Proc Natl Acad Sci U S A 103: 5591-5596 (2006)
 - 28) Nakamura TJ, Sellix MT, Kudo T, Nakao N, Yoshimura T, Ebihara S, Colwell CS, Block GD: Steroids 75: 203-212 (2010)
 - 29) He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hattori MA: J Endocrinol 194: 511-519 (2007)
 - 30) Nakamura TJ, Sellix MT, Menaker M, Block GD: Am J Physiol Endocrinol Metab 295: E1025-1031 (2008)
 - 31) Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I: J Comp Neurol 388: 507-525 (1997)
 - 32) Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA: Endocrinology 138: 863-870 (1997)
 - 33) Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketani Y, Muramatsu M: J Mol Endocrinol 22: 37-44 (1999)