

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03689

研究課題名(和文) マウス胚の前後軸形成における子宮・胚体外組織との相互作用

研究課題名(英文) Interaction between embryo and maternal tissues during the anterior-posterior axis formation of the mouse embryo

研究代表者

藤森 俊彦 (Fujimori, Toshihiko)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授

研究者番号：80301274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚盤胞の着床は子宮の対子宮間膜側でおこり、胎盤は子宮間膜側に形成される。受精後5.5日目には、臓側内胚葉(VE)の一部の細胞集団がシリンダー状の胚の遠位側から一つの方向に向かって移動することで前側が決まる。培養下でマウス胚の体軸形成を再現した報告は古くからあり、これらの実験から胚が自律的に体軸を形成し得ることを示されているが、子宮の環境との相互作用が胚の体軸形成にどのように影響を及ぼすかについては解決に至っていない。そこで、妊娠子宮内で子宮の軸と胚の前後軸との関係を定量的に計測する。更にこの関係が生じる要因を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類胚発生の大きな特徴は、母胎内で発生が進むことにある。マウス胚が培養下で自律的に体軸形成できることが示されている。一方で、子宮内において胚軸と子宮軸が関連することが示唆されていた。そこで、母体との相互作用は栄養供給に限らず、胚軸形成についても重要な意義を持つことを検証するという点で本研究は学術的な意義が大きい。

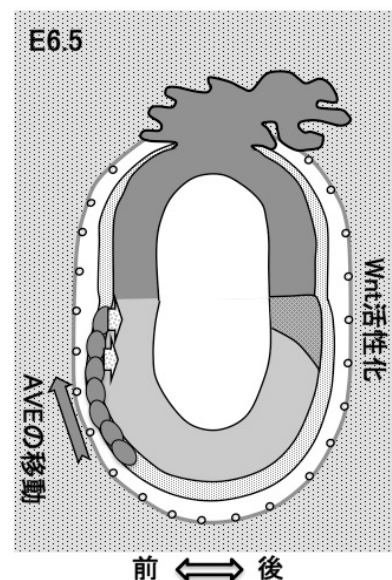
研究成果の概要(英文)：The mouse blastocyst implants on the mesometrium side of the uterus, and future placenta is formed on the mesometrium side. During the mouse development, the future anterior side is formed after the migration of the visceral endoderm (VE) from the distal side of the cylinder-shaped embryo at 5.5 day after the fertilization. Formation of the body axis in cultured embryos has been reported, and these results indicate that embryos can autonomously form body axes. However, the significance of the interaction with the uterine environment on the embryonic axis formation is unclear. The relationship between the axis of the uterus and the anterior-posterior axis of the embryo is quantitatively measured in the pregnant mouse uterus, and the factors that are regulating this relationship are searched.

研究分野：発生生物学

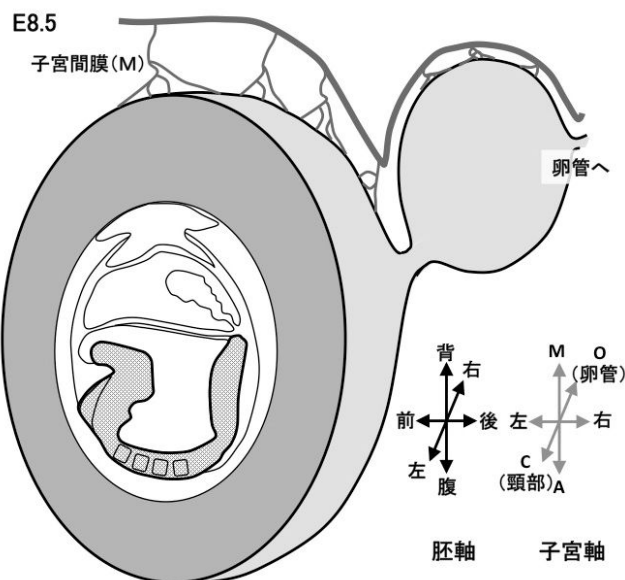
キーワード：マウス 胚軸 胚体外組織 子宮

1. 研究開始当初の背景

マウス胚においては、受精後 6.5 日目 (E6.5) には Wnt シグナルが活性化された領域でエピプラストから細胞集団が陥入し中内胚葉が形成され、体の後ろ側が形態的に明確になり前後軸が確立される。その形態的な変化に先立ち E5.5 には、シグナル抑制因子である Dkk、Cer1、Lefty1 などを発現する臓側内胚葉 (VE) の一部の細胞集団 (前側臓側内胚葉 (AVE)) がカップ状の胚の遠位側から一つの方向に向かって移動することで前側が決まる (右図)。それ以前の着床の段階で、AVE で発現する遺伝子群の一過的な発現が見られるが、一過的な発現と将来の前後軸との関係は明確ではない。着床前の胚盤胞の形態は、完全な球ではなく 3 次元的にはややつぶれた形態をしている。胚盤胞の中で円盤状の形態をしている内部細胞塊 (ICM) の領域も、円でなく楕円型をしており、その形態と将来の体軸に関しての関係は未知である。



子宮では、卵管 (oviduct; O) から子宮頸部 (cervix; C) へ向かう軸 (OC 軸) に加えて、血管がつながっている子宮間膜 (mesometrium; M) とその反対側である対子宮間膜



(anti-mesometrium; A) を結ぶ軸 (MA 軸) が見られる。着床は子宮の対子宮間膜側でおこり、胎盤は子宮間膜側に形成される。ラットにおいて胚の前後軸は OC 軸に垂直に形成されると報告されており (Brown et al. 1992) 教科書にも同様の記載がある (左図)。しかし、それ以前の段階でマウスにおいても子宮の軸と胚の前後軸を関連づけられるかは少ない例で検討されているが十分には確定されていない。また、胚軸と子宮軸の間の角度について定量的な計測は

されていない。

培養下でマウス胚の体軸形成を再現したという報告は古くからあり、これらの実験から胚が自律的に体軸を形成し得ることを示されているが、子宮の環境との相互作用が胚の体軸形成にどのように影響を及ぼすかについては解決に至っていない。

そこで、子宮の OC 軸、MA 軸に垂直に胚の前後軸が形成されることを再度確認し、子宮軸と胚軸の関係を定量的に計測する。更にこの関係が生じる要因を考察する。現在考えられる可能性は二つあり、1. 胚自身が子宮からの情報とは独立に胚軸を形成することが可能で、子宮の軸に沿うように着床する (permissive 仮説)、2. 着床などによって子宮からの軸情報を得て、それに従って胚軸を形成する (instructive 仮説) である。いずれの仮説においても、胚と子宮との相互作用を介するのは胚体外組織である。そこで、

本研究では、子宮と胚体外組織が、胚軸の形成に能動的な役割を果たすという可能性を検証する。

2. 研究の目的

子宮環境の中で胚の軸が決まる際に、子宮から胚体外組織を介して与えられる情報と胚の側で軸を決める情報がどのように一致するのかを明らかにすることを旨とし、以下の3項目を検討する。

子宮軸と胚軸の関係の定量解析

過去に報告されているラットでの観察は、頭部も形成され形態的に胚の前後軸が明確になった発生の進んだ段階（マウスでの E8.5 相当）で行われている。マウスでの早い時期について一部の報告はあるが、未確定である。そこで、より早い時期である E5.5、E6.5 のマウス胚の前後軸と子宮の OC 軸との関係を確定する。形態観察を行う為の多面的な方法を開発し 3 次元での観察を行う。また、E5.5 では AVE のマーカー、E6.5 日目では原腸陥入部のマーカーを用いる。子宮の 3 軸は、左右の子宮を識別した上で卵巣、卵管、子宮間膜、血管を指標に形態的に判別する。この際に、子宮軸との関係だけでなく、子宮や胚体外組織の形態に体軸と関係する特徴が見られるか検討する。

胚盤胞での偏りは将来の胚軸に反映されるか？

胚盤胞の中で円盤状に存在する ICM は楕円形をしている。楕円の ICM の長軸、短軸と将来の胚の前後軸との関係がみられるかを解析する。着床のタイミングでの子宮の軸と胚盤胞の形状との関係を組織学的に明らかにする。また、光誘導的 Cre-LoxP システムを用いた細胞系譜解析方を開発し、これにより胚盤胞の楕円の長軸が将来の胚軸と対応するか調べる。ICM の短軸あるいは長軸方向が前後軸に反映された場合には、胚盤胞の段階に存在する胚内での自律的情報によって胚軸が決まることになり、一致しない場合には子宮の情報に強く関与することが明らかになる。

胚体外組織および子宮で胚軸に関与する発現する分子はあるか？

着床から前後軸形成の時期において、胚体外組織と子宮で発現し胚軸と関連して局在する分子を検索する。発現、局在のパターンから相互作用に関与する可能性のある候補が見つかった場合には、その機能解析へと進める。

3. 研究の方法

子宮軸と胚軸の関係の確認

形態およびマーカー遺伝子の発現を指標に胚の前後軸を判定し、子宮の軸に対しての関係を定量的に解析する為に3つのアプローチを取った。

(1) パラフィン切片を用いた 3 次元再構築

妊娠マウスの子宮をパラフィンに包埋し、ミクロトームを用いて連続切片を作成した。切片を HE 染色した後プレパラートを作成し、スライドスキャナで取り込んだ。この際に各スライドのサンプル番号、スライド番号などはバーコードラベルで管理し、自動で取得した画像ファイル名とした。独自に開発したソフトウェアを用いて、子宮内で胚の存在する領域を子宮の画像から半自動で切り出し、場所合わせを行った。これらの連続画像を用いて立体再構築を行った。これにより、子宮の向きと胚の前後軸の関係を明確に計測することが可能となった。

(2) マイクロ CT を用いた観察

切片からの子宮の3次元構築と並行し、マイクロCTを用いて子宮内の胚を観察する方法を検討した。異なる固定法および染色法を試し、染色後の子宮を樹脂包埋することで撮影中に動くことを抑制した。2機種のマイクロCTを用いて撮影を行った。

(3) マーカー遺伝子による胚の前後軸の判定

切片からの3次元再構築を行った後に、形態的に判定した原腸陥入部を胚の後ろ側と定義したが、形態的に不明瞭な場合も見られたため、前後軸を判定するためのマーカー遺伝子を用いた。後部の中内胚葉で発現する *T*, *Cdx2* および前側臓側内胚葉で発現する *Cer1* のそれぞれをマーカー遺伝子として用いた。共通に抗GFP抗体を用いて免疫染色により遺伝子発現を調べる為、それぞれの遺伝子のプロモーター下でGFPを発現するトランスジェニックマウスを導入した。また、有機溶媒を用いた透明化により子宮の中の胚を観察する際にマーカーを容易に観察するために、後部で発現する *Mesp1* 遺伝子の制御下 *Gal* を発現するトランスジェニックマウスを導入して用いた。

胚盤胞での偏りは将来の胚軸に反映されるか？

胚盤胞の中で楕円型に存在するICMの極性が将来の体軸に反映されるかを検証するために組織学的な観察と、細胞標識の開発を進めた。

(1) 組織学的な観察

上記の組織切片から3次元再構築する手法を着床時の胚の形態の観察にも適用し、着床時の胚盤胞の極性が子宮の軸に対してどのように存在するかを観察した。

(2) 胚盤胞からの細胞標識法の開発

胚盤胞の一部の領域に存在する細胞を特異的に標識する方法として、光誘導型Creを発現するトランスジェニックマウスを作成した。既に報告のある光依存的に組換え誘導可能なCreを恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、*loxP* 配列によって挟まれたストップ配列が除去されると、EGFPを発現するマウスと掛け合わせ、胚盤胞期に光を照射した後にEGFPの発現を観察した。

胚体外組織および子宮で胚軸に関与する発現する分子はあるか？

これまでに我々の研究室では、マウス胚盤胞を免疫して得られたモノクローナル抗体のライブラリーを得ている(未発表)。これらのモノクローナル抗体を用いて受精後5.5日目、6.5日目の子宮の免疫染色を行った。

4. 研究成果

子宮軸と胚軸の関係の確認

組織切片からの3次元再構築技術を用いて形態的に胚の前後軸が判定可能な時期である受精後8.5, 7.5, 6.5日目の子宮を解析した。子宮を固定、パラフィン包埋した際に、卵巣-子宮頸部に対して一直線になるように子宮軸を配置することが難しい為、胚の周辺の脱落膜見られる空間(子宮内腔に由来する)を子宮軸として捉えた。7.5日目には子宮の軸と胚の前後軸は直交に近い傾向が見られたが、角度が小さいものでは、25度以下であった。6.5日目においても同様の傾向が見られた。

マイクロCTを用いた観察において、用いた2機種のうち1機種については、7.5日目においても形態観察を行うには分解能が不十分であった。一方で分解能の

高い機種を用いた際には 7.5 日目においては胚の前後軸と子宮の軸をそれぞれ判定することができ、軸間の関係を計測することが可能であった。その結果多くの胚では、胚と子宮の軸は直交に近かったが、一部の胚においてその間の角度は小さかった。

マーカー遺伝子を用いた解析においては、7.5 日目の子宮の切片を免疫染色すると、それぞれの遺伝子の下流での GFP の発現が確認された。一方で 6.5 日目では十分な染色像が得られず、前後軸判定が難しいことが判明した。更に Mesp1 の制御領域下で gal を発現するトランスジェニックマウスを導入し、X-gal 染色した後に子宮ごと透明化し、胚軸と子宮軸の関係を検討する方法についても開始した。

上記の 3 つの方法により、6.5 日目以降において胚軸と子宮軸の関係を検討し、これらの 2 軸の間の角度の定量化を進めた。詳細な結果については論文で発表する予定である。

胚盤胞での偏りは将来の胚軸に反映されるか？

組織学的な解析によって着床直後の子宮内での胚の形態の観察を行った。詳細な結果については、論文発表する予定である。光照射による胚盤胞の標識により、誘導効率は 10% に満たないが、光照射した胚で特異的に EGFP の発現が誘導されることが確認された。着床前胚を回収し、光誘導後に胚を移植し、7.5 日目相当で GFP の発現が見られることも確認した。従って、光照射によって細胞を標識された胚が正常に発生することが確認され、胚盤胞と着床後の胚軸との関係を調査している。

胚体外組織および子宮で胚軸に関与する発現する分子はあるか？

胚を含む領域を凍結切片にした後に、過去に子宮で発現が見られた候補となるモノクローナル抗体を用いた。6.5 日目、7.5 日目の何れにおいても、子宮の長軸、子宮間膜 対子宮間膜に明確に偏って発現する分子を見いだすことは出来なかった。

以上の結果から、着床後の胚の前後軸は子宮の長軸に垂直な方向に配置されることが示唆された。一方で、胚の前側が子宮の右側、あるいは左側のどちらかに揃う傾向はみられなかった。また子宮内で右側あるいは左側に偏って存在する分子は見いだすことが出来なかった。上記の結果から、胚の前後軸は子宮内の何らかのシグナルによって子宮の長軸に垂直になると考えられるが、そのシグナルの実体の解明については今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Usami Fumiko Matsukawa, Arata Masaki, Shi Dongbo, Oka Sanae, Higuchi Yoko, Tissir Fadel, Takeichi Masatoshi, Fujimori Toshihiko	4. 巻 134
2. 論文標題 Intercellular and intracellular cilia orientation is coordinated by CELSR1 and CAMSAP3 in oviduct multi-ciliated cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs257006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.257006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koyama Hiroshi, Fujimori Toshihiko	4. 巻 496
2. 論文標題 Isotropic expansion of external environment induces tissue elongation and collective cell alignment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Theoretical Biology	6. 最初と最後の頁 110248 ~ 110248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtbi.2020.110248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Honda Hisao, Abe Takaya, Fujimori Toshihiko	4. 巻 118
2. 論文標題 The Chiral Looping of the Embryonic Heart Is Formed by the Combination of Three Axial Asymmetries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 742 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.11.3397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamemizu Chizuru, Fujimori Toshihiko	4. 巻 100
2. 論文標題 Distinct dormancy progression depending on embryonic regions during mouse embryonic diapause †	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1204 ~ 1214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyonari Hiroshi, Kaneko Mari, Abe Takaya, Shioi Go, Aizawa Shinichi, Furuta Yasuhide, Fujimori Toshihiko	4. 巻 57
2. 論文標題 Dynamic organelle localization and cytoskeletal reorganization during preimplantation mouse embryo development revealed by live imaging of genetically encoded fluorescent fusion proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 e23277 ~ e23277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Hiroshi, Shi Dongbo, Fujimori Toshihiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Biophysics in oviduct: Planar cell polarity, cilia, epithelial fold and tube morphogenesis, egg dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 89 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.16.0_89	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Hiroshi, Fujimori Toshihiko	4. 巻 51
2. 論文標題 Biomechanics of epithelial fold pattern formation in the mouse female reproductive tract	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 59 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2018.06.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe, T., Kutsuna, N., Kiyonari, H., Furuta, Y., Fujimori, T.	4. 巻 145
2. 論文標題 ROSA26 reporter mouse lines and image analyses reveal the distinct region-specific cell behaviors in the visceral endoderm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development.	6. 最初と最後の頁 dev.165852.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.165852.	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11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Fumiko M. Usami, Masaki Arata, Dongbo Shi, Sanae Oka, Yoko Higuchi, Fadel Tissir, Masatoshi Takeichi, Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Celsr1 and CAMSAP3 differently regulate intercellular and intracellular cilia orientation in oviduct multiciliated cells
3. 学会等名 JSDB online trial meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Dormancy progression in mouse embryonic diapause
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Embryonic Diapause (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤森 俊彦
2. 発表標題 マウス胚の発生休止における休眠の進行
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Establishment of morphological and functional polarity in the mouse oviduct
3. 学会等名 Memorial Conference for Dr.Goro Eguchi in Kumamoto
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Regulation of cell differentiation during early mammalian embryogenesis
3. 学会等名 KEY Forum 2018 Stem Cell Traits and Developmental Systems (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Distinct region-specific cell behaviors in the visceral endoderm after anterior-posterior axis specification
3. 学会等名 EMBO Workshop Imaging Mouse Development (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤森 俊彦
2. 発表標題 マウス初期胚における細胞分化
3. 学会等名 第12回認識と形成研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Specification and plasticity of cells during early mouse development
3. 学会等名 IRCMS mini-symposium "Cell Fate in Development" (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 How do cells differentiate during preimplantation mouse development?
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoaki Ito, Yasufumi Sato and Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Identification of molecules expressed in the trophectoderm of the mouse peri-implantation embryo
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会ConBio2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoaki Ito, Yasufumi Sato, Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Searching for molecules expressed in the trophectoderm of the mouse peri-implantation embryo.
3. 学会等名 The 50th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

基礎生物学研究所・初期発生研究部門
<http://www.nibb.ac.jp/embryo/>
 基礎生物学研究所・初期発生研究部門
<http://www.nibb.ac.jp/embryo/>

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