

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10202

研究課題名(和文) ほ乳動物の初期胚形成に必要な子宮内圧に対する胚膜の役割

研究課題名(英文) Reichert's membranes adjust intrauterine pressure for early mouse morphogenesis

研究代表者

上田 陽子 (Ueda, Yoko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・病因病態部門・流動研究員

研究者番号：50755808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物において子宮内での受精、胚発生や胎児発生は、母体側環境や胎児と母体との相互作用の中で緻密な調整を受けている。中でも、胚の子宮への着床機構は未解明な点が多い。今回、マウスの妊娠初期における子宮内圧の計測に初めて成功し、胚にかかる圧力が着床時期に最も高いことを明らかにした。実際、この適切な子宮内圧力は、正常な胚発生に必要であった。一方、この時期の胚は、ライヘルト膜という細胞外マトリクスからなる胚膜に包まれており、胚膜の中に作られる密閉空間に胚が存在することで周辺からの圧力を適切に調整し胚を守っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年不育症の治療や不妊治療において、妊娠極初期の子宮への着床状態に関する検査方法や着床率を向上させる治療方法が求められている。今回の研究成果は、着床に必要な子宮側の要因を理解するうえで大きな一歩であり、新しい検査法・治療法の開発に繋がることを期待される。さらに、将来的に体外で胎児を正常に発育させる人工子宮に代表される未来の生殖医療技術の開発にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mammalian embryogenesis proceeds in utero with the support of nutrients and gases from maternal tissues. However, the contribution of the mechanical environment provided by the uterus to embryogenesis remains unaddressed. Notably, how intrauterine pressures are produced, accurately adjusted, and exerted on embryos are completely unknown. Here, we find that Reichert's membrane, a specialized basement membrane that wraps around the implanted mouse embryo, plays a crucial role as a shock absorber to protect embryos from intrauterine pressures. Notably, intrauterine pressures are produced by uterine smooth muscle contractions, showing the highest and most frequent periodic peaks just after implantation. Mechanistically, such pressures are adjusted within the sealed space between the embryo and uterus created by Reichert's membrane and are involved in egg-cylinder morphogenesis as an important biomechanical environment in utero.

研究分野：初期発生

キーワード：マウス 子宮内圧 ライヘルト膜 細胞外マトリクス

1. 研究開始当初の背景

ほ乳動物の胚のうち、ヒトやマウスなどげっ歯類では、子宮への着床の際、受精卵は子宮内膜上皮を破り、子宮内膜へと浸潤し、子宮内膜組織内で発生を続ける。この時期、胚と子宮内膜の間には、胚を包む胚膜（ヒト：ヒューザー膜、マウス：ライヘルト膜）が形成される。胚膜は、胎盤形成前の初期発生過程において、母体・胚間の栄養やガス交換、胚を母体免疫システムから解離する役目を担うとされている。しかし、ヒトではこの時期の解析は難しく、ヒト胚でのヒューザー膜の形成機構や機能の詳細はほとんど知られていない。

一方、ヒューザー膜と同様の構造・機能を持つと考えられるマウス組織はライヘルト膜であり、その主成分はラミニンやコラーゲン IV であることが知られている (Salamat et al., *Anat Biol.*1995)。コラーゲン IV ノックアウトマウスでは、ライヘルト膜は形成されるが脆弱であることが報告されている (Poshel et al., *Genesis.*2005)。一方、ラミニンノックアウトマウス (*Lama1 KO*) ではライヘルト膜を構成するタンパクの局在が見られず、発生初期に致死となる (Alpy et al., *Development.*2004)。また、胚本体でのみラミニンを特異的に欠失させ、ライヘルト膜は正常な状態のコンディショナル遺伝子欠損マウスでは、胎仔は出生する (Ichikawa-Tominaga et al., *Matrix Biol.*2004)。このように、ラミニンはライヘルト膜形成に必要であり、代表者はこれまで *Lama1 KO* を用いてライヘルト膜の形成機構について解析を行ってきた。発生初期の *Lama1 KO* 胚では、胚の形が変形していることがわかっていたが、その原因は特定できていなかった。また、このような初期胚の変形は、同じくライヘルト膜形成不全を呈するフクチンノックアウトマウス (*Fktn KO*) でも報告されている (Kurahashi et al., 2005)。しかし、初期胚の変形とライヘルト膜の形成不全との因果関係については、全く不明であった。

2. 研究の目的

これまでの先行研究では、発生過程において最も初期に形成される体軸である前後軸形成には、子宮からの圧力が必要である事を培養下で明らかにしている (Hiramatsu et al., *Dev Cell.*2013)。具体的には、胚を圧力がかからない状態で培養すると、前後軸は形成されないが、子宮内と同じ大きさの筒状デバイス内で培養すると前後軸が形成された。しかし、生体内で胚が子宮から受ける圧力の具体的な数値は明らかにされていない。

そこで、本研究では、ライヘルト膜形成不全と胚の変形との因果関係を明らかにし、子宮圧力が胚に加わる際のライヘルト膜の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

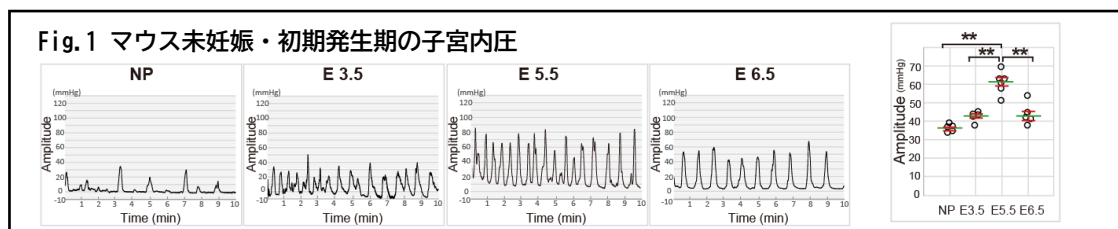
まず、(1) 生体の子宮内で初期胚にかかる圧力を数値化するため、カテーテル型トランスデューサーを用いて着床胚にかかる子宮内圧の測定を行った。

次に、(2) *Lama1 KO* 胚と *Fktn KO* 胚の病理解析として、初期胚における各種遺伝子マーカーの発現解析を行った。

さらに、野生型胚、*Lama1 KO* 胚、*Fktn KO* 胚に、培養下で胚の外側から圧力を加え、(3) 胚の変形とライヘルト膜の形成不全との因果関係を解明を試みた。

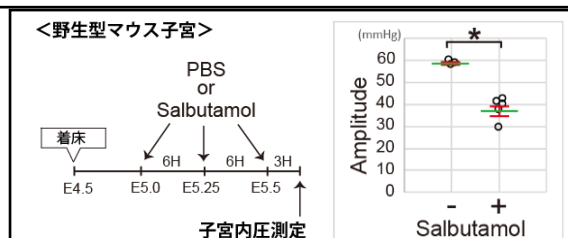
4. 研究成果

(1) 生体の子宮内で初期胚にかかる圧力を数値化
 マウス初期発生期の子宮内圧を圧力センサーつきカテーテルにより計測した。その結果、前後軸形成期である受精後 5.5 日目 (E5.5) で有意に子宮内圧が上昇することがわかった (Fig. 1)。



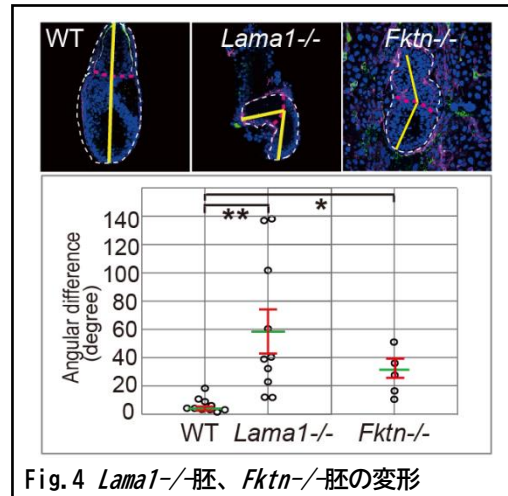
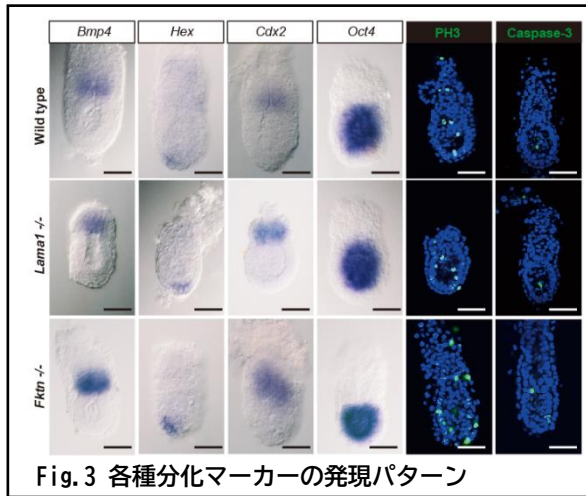
この際、筋弛緩剤であるサルブタモールを投与すると子宮内圧は優位に低下したことから、初期発生期の子宮内圧を生み出しているのは子宮筋の収縮・弛緩によるものであることが示された (Fig. 2)。

Fig. 2 筋弛緩剤投与による子宮内圧の低下 →



(2) *Lama1* KO 胚と *Fktn* KO 胚の病理解析

E5.5 日目の *Lama1* KO 胚と *Fktn* KO 胚では、胚の各種分化マーカーに異常はみられなかった (Fig. 3)。このことはマイクロアレイの結果からも明らかだった。しかし、E6.5 日目には胚が変形していることから、これらの胚の変形は、細胞自律的なものではないことが示唆された (Fig. 4)。

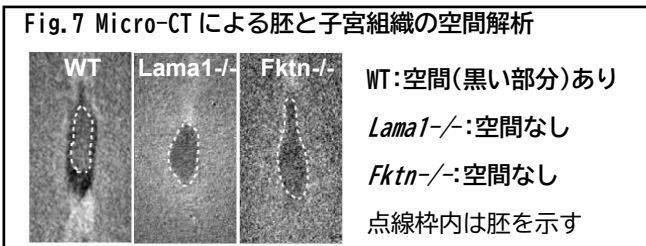
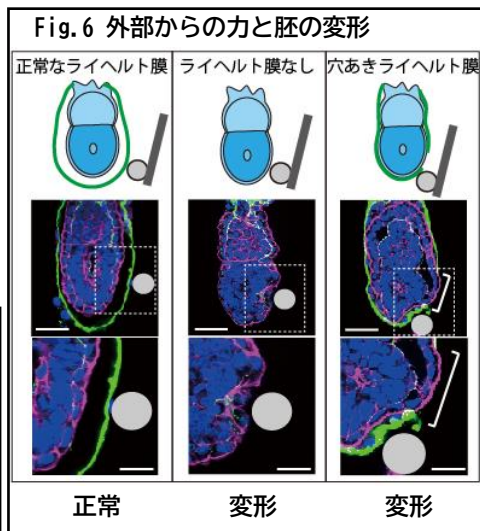
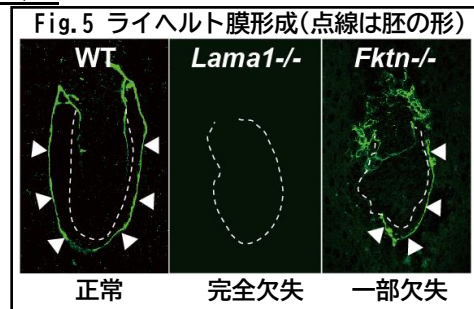


(3) 胚の変形とライヘルト膜の形成不全との因果関係を解明

野生型胚では胚周囲にライヘルト膜が存在するが、*Lama1* KO 胚ではライヘルト膜が存在しておらず、*Fktn* KO 胚ではライヘルト膜の一部が破けていた (Fig. 5)。

そこで、培養下でこれらのライヘルト膜を再現し、胚の外部から原子間力顕微鏡により、直径 30 μm のビーズで一定の力を加え、胚が変形するかどうかを確認した。その結果、正常なライヘルト膜をもつ胚では、胚は外部からの力で変形しないが、完全に欠失もしくは穴の開いたライヘルト膜では、外部からの力により胚が変形することがわかった (Fig. 6)。

さらに、Micro-CT を用いて、胚周辺を詳細に解析したところ、ライヘルト膜と胚の間には密閉空間が存在し、子宮組織と胚はこの空間に隔てられていた。一方、ライヘルト膜形成不全の *Lama1* KO 胚、*Fktn* KO 胚ではこのライヘルト膜が作り出す空間はみられず、これらの胚は子宮組織と密に接していた (fig. 7)。



以上の結果から、ライヘルト膜は胚と子宮組織の間に密閉空間を作り出すことで、子宮筋収縮による強い子宮内圧から胚を守る働きをしていることが強く示唆された。

このことは、培養下で原子間力顕微鏡により外部から力を加える実験により実証され、ライヘルト膜は密閉空間を作ることで、周囲からの圧力を適切に調整し胚を守っていることを明らかにした。

以上の成果は、国際誌 Cell Reports に投稿し掲載された (Ueda et al., 2020)。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoko Ueda, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Mami Tsume, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Olivier Lefebvre, Ryuji Hiramatsu, and Isao Matsuo	4. 巻 31
2. 論文標題 Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107637	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○Yoko Ueda, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Mami Tsume, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Olivier Lefebvre, Ryuji Hiramatsu, and Isao Matsuo
2. 発表標題 Embryo shape change from sphere to egg-cylinder mediated by intrauterine pressures is crucial for mouse primary axis formation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会 ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田陽子、木村一吉田千春
2. 発表標題 マウス胚を用いた力学測定の実践
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第72回大会 公開シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○上田陽子、木村一吉田千春、持田京子、Olivier Lefebvre、亀尾佳貴、安達泰治、爪麻美、平松竜司、松尾勲
2. 発表標題 マウス卵円筒形成に関わる子宮内力学環境の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○上田陽子、吉田一木村千春、爪麻美、持田京子、松尾勲
2. 発表標題 マウス着床後胚におけるライヘルト膜の力学的機能の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ○Yoko Ueda, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Mami Tsume, Ryuji Hiramatsu, Isao Matsuo
2. 発表標題 Mechanical role of Reichert's membrane for early mouse morphogenesis in utero.
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	松尾 勲 (Matsuo Isao) (10264285)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・病因病態部門・部長 (84408)	

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