

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15965

研究課題名（和文）組織透明化技術を用いたマウス着床機構の解明

研究課題名（英文）Histological analysis of mouse embryo implantation with tissue clearing method

研究代表者

杉山 真言（Sugiyama, Makoto）

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：30648225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：マウスは着床部位が予想できず、子宮の中でいつ、どのように胚が着床を迎えているか未解明である。胚着床は基礎・臨床を問わず“black box”と表現され、妊娠の諸現象が解明に向かう中、依然解明が遅れている研究分野である。これら背景から、本研究は組織透明化技術を用いることで、これまで不明であった子宮内におけるマウス胚の位置取りの形態学的な追跡を試みた。そしてマウス胚着床期の詳細なタイムスケジュールを決定した。さらに当該研究を推進する中で、副次的に腹腔臓器に適した組織透明化法を確立し、また高効率で交配適期マウスを選定する法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マウス胚着床現象の解明に向けた基礎的な情報基盤を得ることができた。その結果、本研究分野で最も重要な課題である「胚着床期に由来する習慣性流産」の克服を期待する、実験動物モデルを構築することができたと考える。また、本研究を遂行するに当たり確立した組織透明化方は、汎用性の高く他分野への応用が可能である。さらに、同時に確立した高効率の交配適期マウスの新規選定法もまた、生殖科学・実験動物学分野への広い貢献を期待できる。

研究成果の概要（英文）：The implantation site in mice is not predictable. As this result, “when” and “how” the murine embryos reach implantation in the uterus remains undefined. This question needs to be clarified to provide a complete picture of the implantation phenomenon. From this background, we applied the tissue clearing method to pregnant mice to trace mouse embryos. We then identified a detailed time schedule for the embryo implantation period in the murine pregnancy. Furthermore, in the process of our research, we established and reported two novel methods, tissue clearing, and a highly successful of producing pregnant mice.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：胚着床 マウス 妊娠 発生学

1. 研究開始当初の背景

習慣性流産の原因の約8割は着床期にあり、これはヒト・家畜に共通する。胚着床は生殖科学分野では”black box”と表現され、妊娠に関わる諸現象が解明に向かう中で、着床現象は解明が遅れている。その理由として、胚着床期に母子間では局所かつ短時間で進行していく母子間における分子の相互の応答を決定できていないことによる。胚着床現象の全貌解明のためには基礎中の基礎である、子宮内で胚が“いつ”“どのように”胚着床に至るのかを同定することが必要である。研究代表者は、組織透明化方法を適用することで、”black box”の中を目視することができると考えた。その一方で、本構想の遂行には、①正確な交配適期マウスの選出法の確立、②安価かつ早急な組織透明化法の確立、という2点の技術的な問題があった。

2. 研究の目的

本研究課題では、マウス妊娠初期の胚着床のタイムスケジュールを決定することを主目的とした。また、主目的を遂行するにあたり、上述の課題①②をクリアする実験手技の確立を副目的とした。

3. 研究の方法

本研究には JCL:ICR マウスを用いた。

(1) まず、マウス子宮・腸管を種々の条件で透明化処置を行い、組織透明化の最適条件を決定した。透過度の評価には蛍光ビーズを子宮または腸管に注入し、実態蛍光顕微鏡で標識ビーズを検出できるかを調べた。また、管腔状の組織内で追跡の対象となる物質は、人為的に動くことが考えられ、組織透明化法は、可能な限り迅速であること、かつ研究コストが安価であることを主条件とした。

(2) マウスは発情周期中、発情前期で交配を行う。つまり、正確に発情前期を選定する技術を確認することで、正確な交配適期のマウスを得ることができる。マウスは発情周期中、膈上皮上に粘液細胞が出現する。研究代表者はこの現象を再解析し、粘液細胞を特殊染色する色素を、膈スミアに適用することで交配適期マウスを得られるか調査した。

(3) 最後に上記技術を用い、C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウス胚を ICR マウスに経卵移植した、代理母 ICR マウスを着床期で採材し、透明化処置を施し蛍光実体顕微鏡で解析することで胚着床に至る胚の動態を追跡し、マウス胚着床期のタイムスケジュールの決定を試みた。

4. 研究成果

(1) 新規組織透明化法の確立

研究開始当初、組織透明化法は sca/e 法に代表されるように脳組織の神経ネットワークを解析するよう設計されていた (Hama et al *Nat. Neurosci.* 2011, 2015)。既存の組織透明化方法は解析まで約2週間かかり、その間、着床以前の子宮中に浮遊している胚が人為的に動いてしまうことが懸念された。そこで、本方法は、脳組織ではなく、管腔状構造である腹腔器官を透過度よりも解析に至る時間が短縮されるよう、種々の薬品・浸漬条件を検討し

た。

その結果、糖と界面活性剤の条件を調整することで最短で48時間で子宮や腸管など管腔状器官の標識蛍光が検出できる組織透明化条件を決定した。この方法は、薬品が安価で、また組織変性がマイルドであるため、透明化組織を組織包埋し免疫組織化学染色が可能である(図1)。

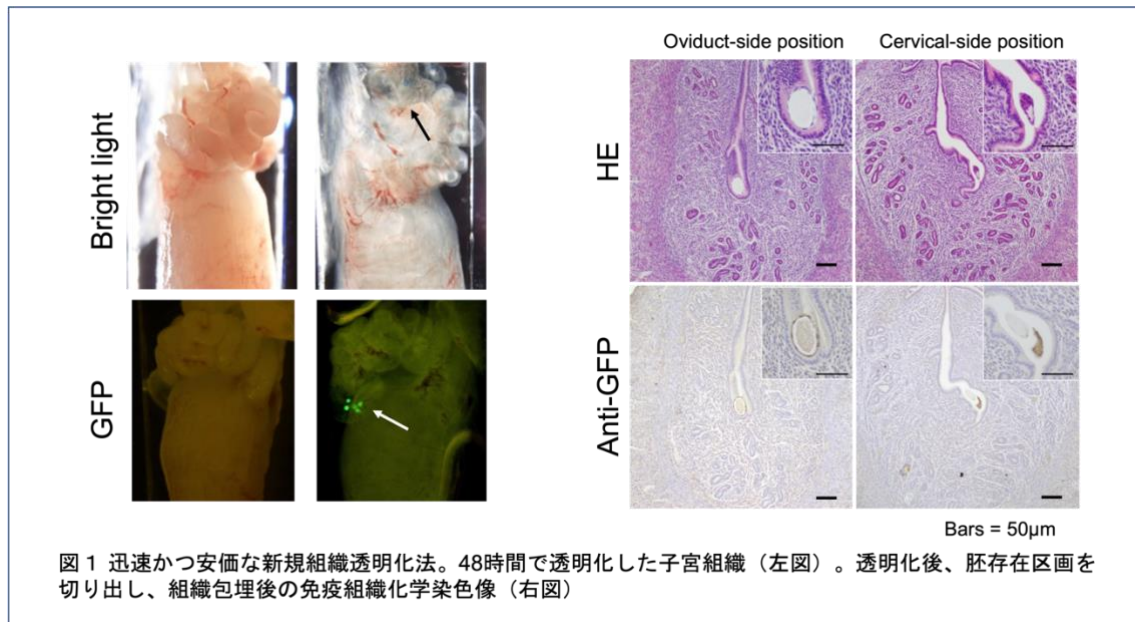


図1 迅速かつ安価な新規組織透明化法。48時間で透明化した子宮組織(左図)。透明化後、胚存在区画を切り出し、組織包埋後の免疫組織化学染色像(右図)

(2) 新規発情前期判定法の確立

マウス交配適期は発情前期であり、この時期にオスマウスと同居させることで妊娠個体を得る。胚着床研究はマウスが交配する所から開始される。一方で、マウスは発情周期が安定せず、また発情周期4期が等時間でないことから、妊娠マウスを計画したタイミングで、計画した数を安定して作出することが難しく、当該分野研究の計画的な遂行を妨げていた。マウスは発情前期に膈上皮内に膈粘液細胞が出現する。この粘液細胞は Alcian blue、PASで染色される。研究代表者は発情前期に膈組織上に出現する粘液細胞の染色特性に着目し、膈スメア性周期判定法に特殊染色技術を応用することで、高効率で妊娠マウスを得ることができると考えた。

膈スメアの判定にはギムザ染色液を用いることが一般的である。研究代表者は、ギムザ染色液に Alcian blue 液を加え簡易的に染色することで、高効率で発情前期マウスの同定を行うことができた。また、この判定により選定したマウスを交配することで交配率 78.0 % (既存法では 47.5 %) で妊娠マウスを得ることができた。

これまでは安定した実験供と動物を得るためには、交配に用いるマウスの母数を増やすことで対応してきた。それには、実験に使用しない不要なマウスが多く発生する。本研究により、計画的な妊娠実験が可能になったほか、研究に使用する実験動物の数を削減することができた。

(3) マウス胚着床時期のタイムスケジュールの決定

組織透明化処置を行った子宮の中から蛍光胚を追跡し、胚着床に至る子宮内の胚の挙動

を同定した。これまでの知見のように、マウス子宮には反芻類動物のような胚着床部位を予想させる組織構造はなく、子宮に到達する胚の数に応じ、等間隔に位置取りさせ胚着床に至っていることが想起された。着床当研究の遂行により胚がいつ、どのように動いているのかという重要な情報を得ることができた。この研究からマウス胚着床の最初期を同定することができ、これまで未解明であった胚着床の開始を導いている主因子の同定を期待することができるようになった。本研究から、同定のために研究支援を受け、着床期の遺伝子発現解析を行った（文部科学省研究推進プログラム「先進ゲノム支援」2020年 シークエンス支援、ゲノム解析支援、採択（採択番号：201035））。当該の研究は次の研究課題でさらに発展をさせることを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makoto Sugiyama, Arata Yasunaga, Ryosuke Kobayashi, Hanae Fukasawa, Osamu Hashimoto, Shiro Kurusu, Hiroshi Sasada, Kazuki Yoshioka	4. 巻 383
2. 論文標題 Improvement in identification of pro-estrous mice by using a novel method of detecting vaginal mucous cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and tissue research	6. 最初と最後の頁 1183-1190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-020-03310-w	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 Keita Nishiyama, Takashi Takaki, Makoto Sugiyama, Itsuko Fukuda, Maho Aiso, Takao Mukai, Toshitaka Odamaki, Jin-zhong Xiao, Ro Osawa, Nobuhiko Okada	4. 巻 86
2. 論文標題 Extracellular vesicles produced by Bifidobacterium longum export mucin-binding proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01464-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.01464-20	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 Nishiyama Keita, Sugiyama Makoto, Yamada Hiroki, Makino Kyoko, Ishihara Sayaka, Takaki Takashi, Mukai Takao, Okada Nobuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 A new approach for analyzing an adhesive bacterial protein in the mouse gastrointestinal tract using optical tissue clearing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41151-y	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 Makoto Sugiyama, Nao Machida, Arata Yasunaga, Nanako Terai, Hanae Fukasawa, Hisaya K Ono, Ryosuke Kobayashi, Keita Nishiyama, Osamu Hashimoto, Shiro Kurusu, Kazuki Yoshioka	4. 巻 105
2. 論文標題 Vaginal mucus in mice: Developmental and gene expression features of epithelial mucous cells during pregnancy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of reproduction	6. 最初と最後の頁 1272-1282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/iaab157	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山真言
2. 発表標題 着床直前期におけるマウス胚位置取りの解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山真言, 片井一成, 久留主志朗, 吉岡一機
2. 発表標題 マウス子宮卵管接合部は初期妊娠で胚の輸送調整を行う
3. 学会等名 日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山真言, 神人由季, 深沢英恵, 吉岡一機
2. 発表標題 新規マウス着床不全モデルの作製および不全モデルの解析
3. 学会等名 第2回 日本獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 McGeady T. A, Thomas A, 木曾 康郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 学窓社	5. 総ページ数 434（分担翻訳）
3. 書名 獣医発生学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

杉山真言（代表） 文部科学省研究推進プログラム「先進ゲノム支援」2020年 シークエンス支援、ゲノム解析支援、採択（採択番号：201035）

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