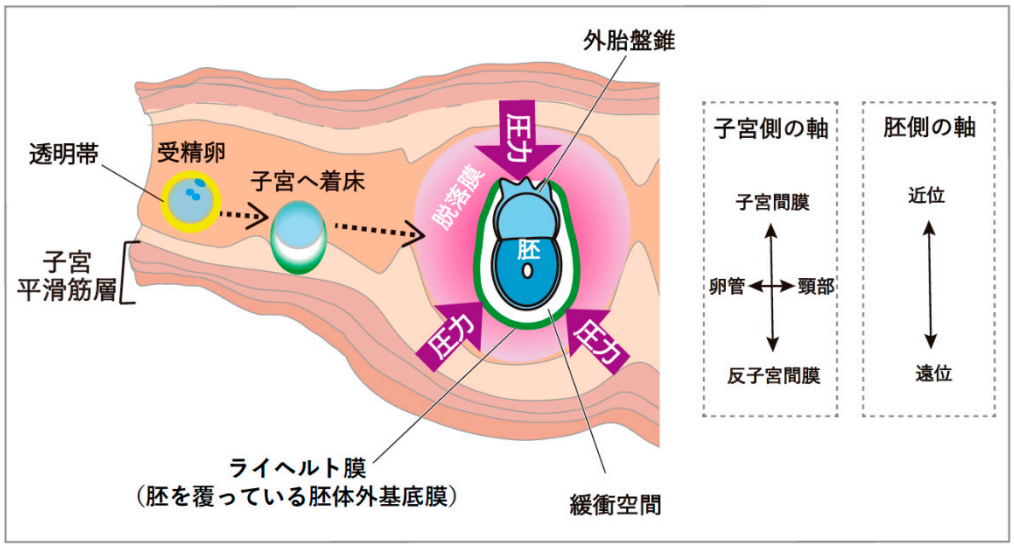
51　子宮内圧力に依存したマウス初期胚の前後軸決定機構	松尾　勲

【目的】我々は、子宮着床直後のマウス胚には、子宮筋収縮によって生じる圧力がかかっていること、また、胚全体が、基底膜（ライヘルト膜）に覆われることで、胚にかかる圧力が緩衝されて、胚は、押しつぶされずに球形から卵円筒形へと伸長し、前後軸が形成されることを明らかにしてきた（下図）。しかし、子宮内圧力が、胚の近遠方向（将来の前後軸方向）にそって胚を細長く伸長させる機構の詳細は依然として不鮮明である。本研究では、子宮筋から胚にかかる圧力や緩衝可能な部位に一定の方向性があるのかについて検討を行った。

【方法】子宮平滑筋から胚にかかる圧力に異方性があることで、マウス胚が一定の方向性をもって伸長する可能性を検討するため、子宮内圧を異なる方向から計測・定量化した。また、胚の近位側方向には、ライヘルト膜は存在しないことから、緩衝作用を持つ別な組織が、ライヘルト膜の代わりの機能を果たしているかどうかについて、免疫組織染色法を用いて細胞外マトリクス分子の発現を解析することで検討した。

【結果】子宮筋から脱落膜内の胚にかかる圧力は、子宮間膜･反子宮間膜軸方向と卵管・頸部軸方向とも有意差は観察されなかった。本結果は、子宮筋収縮によって発生する力は胚に対してほぼ均一にかかっており、圧力には異方性が認められないことが強く示唆された。また、6.5 日目胚においてラミニンα1 分子の発現は、胚の近位側となる外胎盤錐（ectoplacental cone）周辺で、強く認められた。この結果から、外胎盤錐周辺に細胞外マトリクスが広範囲に強く沈着することでライヘルト膜が存在しない近位側からの圧力も緩衝できることが示唆された。

マウス胚は、着床後に子宮平滑筋収縮による圧力を受けている



51. 子宮内圧力に依存したマウス初期胚の前後軸決定機構

松尾　勲

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

Key words：マウス，着床，前後軸，ライヘルト膜，子宮筋収縮

緒　言

多くの哺乳動物胚は、子宮平滑筋で覆われた子宮内で発生する。子宮平滑筋の収縮弛緩運動は、妊娠中は流産を防ぐため抑制され、出産前になると活発化し（ヒトの場合は陣痛）、胎児を体外へと送り出す働きをしている。また、胚が子宮に着床する前では、受精卵や精子の輸送に、卵管の運動が必要であることが示されている［1，2］。しかし、マウス胚が子宮に着床・浸潤した後の妊娠中にどのくらいの力が子宮筋から胚にかかり、胚発生にどのような機能を果たしているのか全く解析されてこなかった（図 1）。

我々は、着床直後のマウス胚は、周辺から外的な圧力を受けることで、球形から卵円筒形へと細長く伸長すること、この伸長現象によって物理的に胚の最も先端部に最大の力がかかるため胚内の基底膜が最も遠い先端部で切断され、内側に位置する外胚葉層の細胞が外側の内胚葉層に飛び出し、前後軸が形成されることを発見した［3，4］。更に、胚を圧迫する力がどの組織から由来するのか解析を進めたところ、子宮平滑筋の収縮・弛緩であることを突き止めた［5］。つまり、従来までの考えとは異なり、妊娠初期でも、子宮平滑筋は、出産期と同程度に強い収縮・弛緩が起こっていることを見いだした［5］。実際、この圧力を筋肉弛緩剤で減弱させると前後軸形成が異常になった［5］。また、子宮に着床直後の胚は、胚体外の基底膜（ライヘルト膜と呼ばれる）に覆われており、この膜は、母体と胚との間のガスや栄養の交換を行っていると考えられてきた。我々は、子宮筋収縮による圧力は、このライヘルト膜がつくりだした空間によって緩衝されることにより、胚は、押しつぶされずに球形から卵円筒形へと伸長することができることを見いだした（図 1）［5］。しかし、胚が近遠方向に細長く伸長して近遠軸（最初の前後軸）が形成される過程に子宮側からかかる圧力がどのように関与しているのかその詳細は依然としてはっきりしていない。そこで、本研究では、子宮内圧力が、胚の近遠方向にそって細長く伸長する（将来の前後軸形成）機構を明らかにするため、解析を行った。

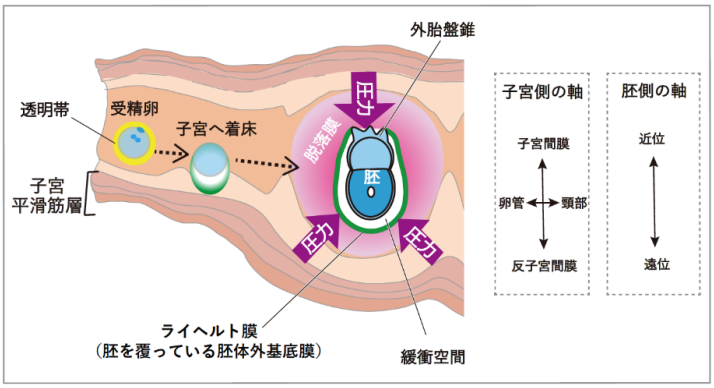


図 1. マウス胚は、着床後に子宮平滑筋収縮による圧力を受けている

マウス胚は、卵管で受精後、子宮に移動する。子宮内膜上で透明帯から脱出すると、着床し、ライヘルト膜と呼ばれる特殊な基底膜で覆われて発生・成長する。子宮平滑筋の収縮圧は、胚着床直後に最大となり、脱落膜内に存在する胚を圧縮している［5］。胚はライヘルト膜によって圧力を緩衝することで、近遠方向に成長することができる［5］。

方　法

1. 着床後胚にかかる子宮内圧力の計測

子宮平滑筋から胚にかかる圧力に異方性があることで、マウス胚が特定の方向性をもって伸長する可能性があるかどうか、子宮内圧を異なる方向から計測した。つまり子宮には、3 方向の軸（子宮間膜･反子宮間膜軸 [M-AM axis]、卵管・頸部軸 [O-C axis]、左右軸）が存在するが胚は、常に子宮間膜･反子宮間膜軸（胚にとっては近遠軸となる）に沿って細長く伸長することから、子宮間膜･反子宮間膜軸に対して平行にかかる圧力が低くなることが想定される。具体的には、妊娠したメスマウスに麻酔下で腹腔を切開し、微小トランスデューサーをもつ圧力カテーテルを着床胚の存在する脱落膜内に、子宮間膜･反子宮間膜軸と卵管・頸部軸の異なる方向性に沿って挿入した。それぞれ、圧力が安定してから 10 分間計測し、実験を終えた（図 2）[5〜7]。

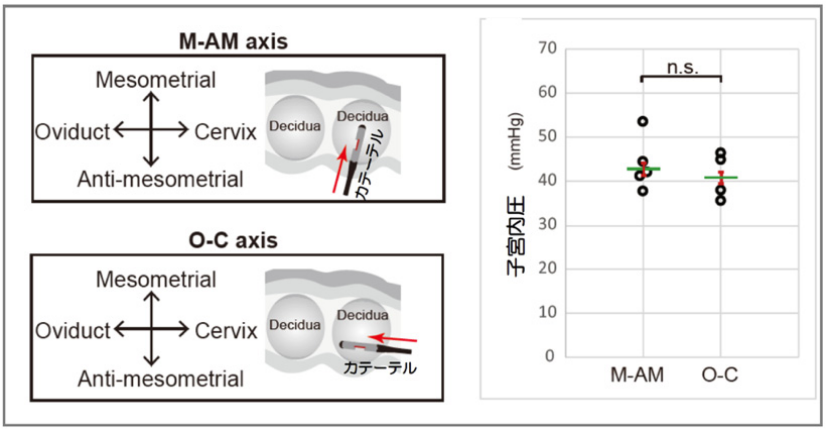


図 2.　子宮筋収縮による圧力の方向性

子宮内の脱落膜内に微小トランスデューサーをもつカテーテルを（子宮間膜–反子宮間膜軸 [M-AM axis] と卵巣–頸管軸 [O-C axis] に平行になるように）一定の方向性を保って挿入した。交尾後 6.5 日目における子宮内圧力の 10 分間における最大ピークの平均をドットで示す（M–AM（n=5）O–C（n=4））。緑線：平均値。赤線：標準誤差。M–AM＝43.8±2.68 mmHg、O–C＝41.31±2.59 mmHg。two-tailed U-test、n.s.：not significant、p=0.9。

2. 免疫組織染色法による細胞外マトリクス分子の発現

着床した胚は、子宮内において反子宮間膜側、左右方向、頸部卵巣方向については、ライヘルト膜に完全に覆われている。一方、胚の近位（子宮の子宮間膜）側の方向にはライヘルト膜は存在していない。しかし、それにも関わらず、胚は、近位方向から子宮筋からの圧力で押しつぶされることがない。その理由の 1 つとして、胚の近位側方向には、緩衝作用を持つ別な組織（外胎盤錐（ectoplacental cone）等）が、ライヘルト膜の代わりの機能を果たしていることが想定される。この可能性を検証するため、免疫組織染色法を用いてライヘルト膜の主要成分となっている細胞外マトリクス分子の発現を解析した。まず、着床後の 6.5 日目胚を脱落膜に包まれた状態で固定後、パラフィン切片を作製した。組織切片は、賦活化後コラーゲンⅣとラミニンα1 に対する一次抗体と反応させた。その後、異なる波長で励起する Alexa Fluor-conjugate された二次抗体と反応後、DAPI で細胞内の核を染色した。発現は共焦点レーザー顕微鏡で観察・解析を行った（図 3）。

3. 動物実験

動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」の基本指針にそって、環境省「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、厚生労働省「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守した。また、本実験は、大阪母

子医療センター研究所の動物実験委員会の審議の上、機関の長（当施設では総長）の承認後・その監督下で行った（承認番号 ME-2021-1）。

結果および考察

1. 着床後胚にかかる子宮内圧力の計測

子宮筋から脱落膜内にかかる圧力は、子宮間膜･反子宮間膜軸方向と卵管・頸部軸方向ともその大きさに有意差は認められなかった（図 3）。本結果は、子宮筋収縮によって発生する力は胚に対してほぼ均一にかかっており、異方性が認められないことを示唆している。つまり、胚が子宮間膜･反子宮間膜軸方向に細長く成長する際に子宮筋から胚にかかる圧力が偏っているという仮説は排除されたと言える。今後、どのような物理的な機構で胚の非対称な伸長が起こりえるのか、詳細な解析を進める必要がある。

2. 免疫組織染色法による細胞外マトリクス分子の発現

6.5 日目胚においてラミニンα1 分子の発現は、胚の近位側で外胎盤錐とその周辺で、強く認められた（図 3）。その一方、タイプⅣコラーゲンの発現は、近位側（子宮間膜側）の脱落膜で認められ、外胎盤錐やその周辺では認められなかった（図 3）。この結果は、ライヘルト膜が胚の近位側では存在していないにも関わらず、胚が子宮内圧から緩衝できている理由の一つとして、外胎盤錐周辺に存在するラミニンがライヘルト膜と同等な機能を果たしていることで説明できる可能性が示唆された。つまり、胚の近位側では、ライヘルト膜の主要成分であるラミニン分子が大量に存在することで、子宮側からの圧力に対して緩衝作用を担っている可能性を強く支持している。

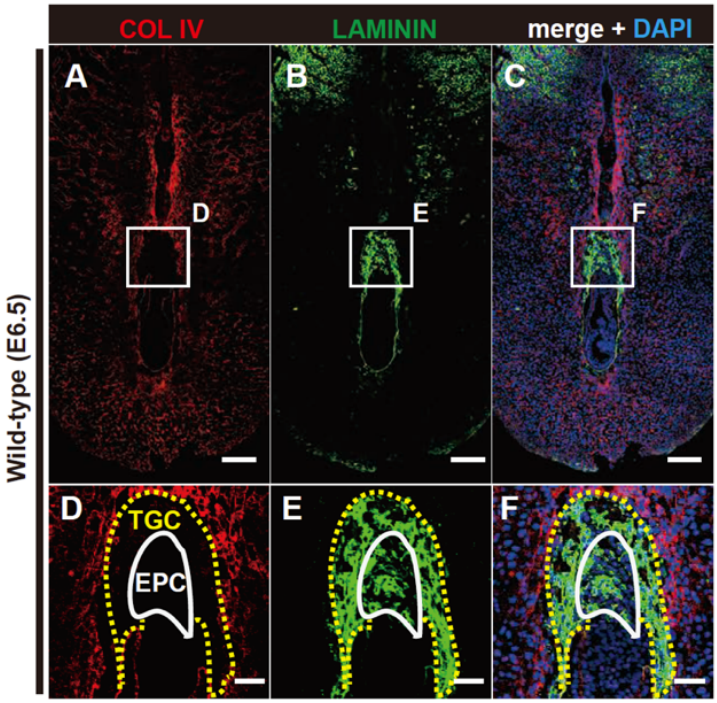


図 3. 野生型外胎盤錐における細胞外マトリクスの発現

6.5 日目野生型胚におけるタイプⅣコラーゲン（A、C、D、F：赤）、ラミニンα1（B、C、E、F：緑）、核（DAPI 染色 C、F：青）による免疫組織学的な発現。コラーゲンは脱落膜組織側で発現するが、ラミニンは外胎盤錐（EPC）を含む近位側組織（TGC）で広範囲に沈着している。スケールバー：200μm（A～C）、50μm（D～F）。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪母子医療センター研究所病因病態部門の上田陽子流動研究員及び吉田千春主任研究員である。

文　献

1) Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, DuBois RN, Dey SK. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. Nat Med. 2004 Oct;10(10):1074-80. doi: 10.1038/nm1104. Epub 2004 Sep 19. Erratum in: Nat Med. 2004 Dec;10(12):1397. PMID: 15378054.
2) Rogers PA, Murphy CR, Squires KR, MacLennan AH. Effects of relaxin on the intrauterine distribution and antimesometrial positioning and orientation of rat blastocysts before implantation. J Reprod Fertil. 1983 Jul;68(2):431-5. doi: 10.1530/jrf.0.0680431. PMID: 6864659.
3) Hiramatsu R, Matsuoka T, Kimura-Yoshida C, Han SW, Mochida K, Adachi T, Takayama S, Matsuo I. External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos. Dev Cell. 2013 Oct 28;27(2):131-144. doi: 10.1016/j.devcel.2013.09.026. PMID: 24176640.
4) Matsuo I, Hiramatsu R. Mechanical perspectives on the anterior-posterior axis polarization of mouse implanted embryos. Mech Dev. 2017 Apr;144(Pt A):62-70. doi: 10.1016/j.mod.2016.09.002. Epub 2016 Sep 30. PMID: 27697519.
5) Ueda Y, Kimura-Yoshida C, Mochida K, Tsume M, Kameo Y, Adachi T, Lefebvre O, Hiramatsu R, Matsuo I. Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis. Cell Rep. 2020 May 19;31(7):107637. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107637. PMID: 32433954.
6) Pierce SL, Kutschke W, Cabeza R, England SK. In vivo measurement of intrauterine pressure by telemetry: a new approach for studying parturition in mouse models. Physiol Genomics. 2010 Jul 7;42(2):310-6. doi: 10.1152/physiolgenomics.00058.2010. Epub 2010 May 11. PMID: 20460604; PMCID: PMC3032287.
7) Grotegut CA, Mao L, Pierce SL, Swamy GK, Heine RP, Murtha AP. Enhanced Uterine Contractility and Stillbirth in Mice Lacking G Protein-Coupled Receptor Kinase 6 (GRK6): Implications for Oxytocin Receptor Desensitization. Mol Endocrinol. 2016 Apr;30(4):455-68. doi: 10.1210/me.2015-1147. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26886170; PMCID: PMC4814475.