

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590171

研究課題名 (和文) 肋骨の胸部特異的な形成に必須の体節-表皮間相互作用における分子基盤

研究課題名 (英文) Molecular basis for the region specific morphogenesis of the rib depending on the interaction between somites and surface ectoderm.

研究代表者

青山 裕彦 (AOYAMA HIROHIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70143948

研究成果の概要 (和文)：

脊椎動物の進化の過程で肋骨形成部位が限局した結果、ほ乳類と鳥類の胴部は胸部と腹部とに分化した。肋骨は長軸に沿って3区画に分けられる。発生初期に体節と側板中胚葉の接触を阻止すると、最も遠位部にあたる肋骨胸部が形成されない。これは、肋骨部の原基である側軸部体節細胞が形成されなかったためである。体節を標識し、その発生を追跡すると腹壁筋の大部分は、最下位の肋骨を形成する体節1個に由来していた。腰部体節は肋骨のみならず筋も形成しないといえる。表皮外胚葉-体節間相互作用に関わる候補遺伝子 *Wnt6*, *Fzd7* をクローニングした。

研究成果の概要 (英文)：

In the course of evolution, the vertebrae bearing rib localized to form thorax in birds and mammals. The rib is constituted of three developmental compartments. The most distal compartment is the sternal rib, which was not formed when contact between the somites and the lateral plate mesoderm was interrupted in a two-day chick embryo. In this case, the abaxial somitic cells did not appear. Labeling each somite individually, the 27th somite was shown to form almost entire abdominal muscles as well as the most caudal rib, suggesting that the lumbar somites form neither the ribs nor the body wall muscles. To understand molecular entity of the interaction between surface ectoderm and somites in the distal rib-genesis, *Wnt6* and *Fzd7* were cloned.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：形態形成, 体節, 骨格, 脊椎動物, ボディプラン, 発生・分化, 進化, ニワトリ胚

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の体節中胚葉は頭部から尾部まで形態的によく似た分節性の構造であるが、これから発生する椎骨や肋骨は部域によって異なっている。ほ乳類や鳥類では胸部体節は

椎骨と肋骨を生じるが、その他の部位では椎骨のみを生じる。共通の発生単位が異なった形態形成を行う、ここには共通の発生機構に加えてそれを部域ごとに修飾する機構が存在するはずである。またこの修飾機構の動物

種による違いが、その多様性を産み出したのであろう。実際、硬骨魚類では脊柱の全長にわたって肋骨を備えていたものが、尾部、頸部からそれを失い、ほ乳類、鳥類にいたって、胸部と腹部（腰部）の違いが生じたのである。

われわれは肋骨が、発生的に3つの区画からなっていると提唱している（Sudo et al., 2001; Aoyama et al., 2005）。これは図に示すように二つのカテゴリーの組み合わせに基づいている。第一は、肋骨を、小さな「近位肋骨」と、肋骨の大部分を占める「遠位肋骨」に分ける。近位肋骨は、脊索及び底板に依存して発生し、それは Shh に仲介される。一方、遠位肋骨の発生には表皮外胚葉が必要なのである（研究成果(1)の図を参照。Aoyama et al, 2005）。

比較解剖学的には、肋骨は頸椎や腰椎にもその相同物が存在するとされている。ヒトで言えば、頸椎の横突起前部、腰椎では肋骨突起がそれである。肋骨（あるいはその相同構造物）が、部域によりその大きさを変え、また、椎骨と関節したりしなかったりすることにより、中軸骨格に部域特異性が生じると考えているのである。肋骨の部域特異的な形態形成の違いを考える際には、われわれが示した肋骨の3区画のどれに注目すべきかを考慮した上で、さらにその発生を制御する周囲組織との相互作用をもとにその発生機構を追求しなければならない。

肋骨の発生における第二のカテゴリーは、「肋骨椎骨部」と「肋骨胸骨部」にわけるのである。これは鳥類では両者の間に関節があるため形態的に明らかである。実験的には、体節と側板中胚葉との間を非透過性フィルムで遮蔽し、両者の拡散性物質による相互作用を阻止すると共に体節細胞の移動も止めると「肋骨胸骨部」が形成されなくなったが「肋骨椎骨部」は正常であったことに基づく（Sudo et al., 2001）。椎骨部と肋骨部の区分は、近年 Burke & Novicki (2003)によって提唱された、主軸部 primaxial と側軸部 abaxial の区画と合致している。これは従来の軸上筋 epaxial muscle と軸下筋 hypaxial muscles という区画とは別の発生的な見地、すなわち、体節細胞と側板中胚葉との相互作用という観点からの区分である。側軸部組織は発生の過程で側板中胚葉壁側板に進入していくのに対し、軸周囲部組織は進入しない。肋骨胸骨部形成に側板中胚葉が必要であることと符合している。

部域によって肋骨形成の有無があることについては肋骨原基の発生だけでなく筋の発生にも目を向ける必要がある。はじめ上皮様組織の袋状構造物であった体節は、やがてその腹内側部から上皮構造が壊れ椎板が形成され、これが椎骨や肋骨の起源とされる。残った上皮の部分が筋や真皮の原基とされ

る皮筋板である。皮筋板の移植実験から、われわれは肋骨の起源を皮筋板に求めたが（Kato & Aoyama, 1998）、Huang ら(2000)は、椎板の移植実験によりやはり肋骨は椎板由来であると主張した。その後、われわれは詳細な移植実験を行い、肋骨原基が皮筋板と椎板の境界領域にあり、予定椎骨形成領域にある椎板もそこへ移植すると肋骨を形成することを明らかにした（Kato, 2001, 大阪大学大学院博士論文）。実は、椎板細胞は表皮外胚葉下に移植すると筋にも分化できるほどの可塑性を持つ（Docter & Ordahl, 2000）ので、肋骨原基が椎板か皮筋板かについてはこのようなアプローチからは明らかにできない。表皮外胚葉と体節との間の相互作用を遮断すると遠位肋骨の形成がなくなるが、そのとき肋骨原基領域を含めて、皮筋板の外側部の形成も同時になくなる（Hirao & Aoyama, 2004; Aoyama et al, 2005）。肋骨の原基が何れにあるにしても、表皮外胚葉が直接肋骨原基に作用するのか、皮筋板を介して作用するのかは不明である。

2. 研究の目的

胸部において肋骨原基細胞がどのように側板中胚葉と関係しているのかを明らかにすることによって肋骨胸骨部の発生と椎骨部の発生との違いを読み取る。

一方、肋骨形成が胸部に特異的に起きることは逆に言えば腰部に肋骨形成を抑制する機構があるのかもしれない。本研究では四肢形成が肋骨形成を抑制するかどうかを明らかにする。

部域による形態形成の違いを見るには、それぞれ対応する部分の発生を比較する必要がある。そのため、部域間の相同性を明らかにする。

筋形成については、肋骨を形成しない腹部の筋形成を肋間筋の形成と比較することから肋骨形成について考察してみる。

これらを踏まえた上で、表皮外胚葉からの分泌因子、体節細胞のその受容体について分子機構に迫るため、前者の候補として Wnt 遺伝子群、後者の候補として Frizzled 遺伝子群についてその機能を探る。

3. 研究の方法

材料はニワトリ胚で、後藤孵卵場（岐阜）より種卵を購入し、必要とする発生段階まで孵卵して用いる。

移植実験はウズラ胚とニワトリ胚との間、もしくはニワトリ胚間で行った。ウズラ胚由来細胞はその特異抗体で同定した。ニワトリ胚由来細胞は必要に応じて蛍光色素（DiI, DiO）で標識した。

骨格標本はアルシアンブルーによる軟骨染色のみ、あるいはアリザリンレッドによる

骨染色との二重染色を全載標本に施した。また組織標本は、標識、染色に応じてパラフィン切片および凍結切片を調整した。

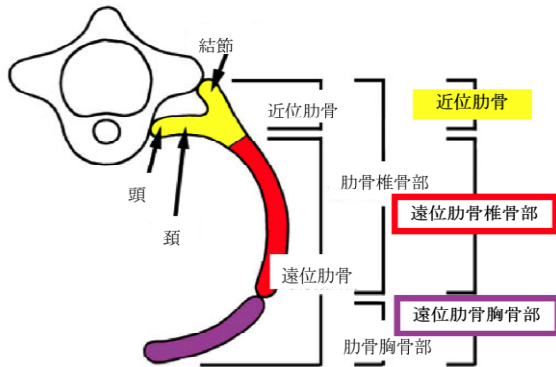
遺伝子発現パターンを見るために *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったが、すべて非 RI 手法によった。

遺伝子クローニングはニワトリ胚の cDNA から PCR 法によって行った。

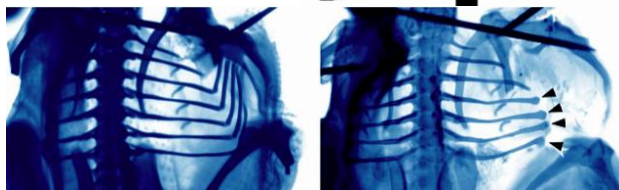
4. 研究成果

(1) 遠位肋骨胸骨部の形態形成：体節-側板中胚葉間の遮断実験

以下に述べる、肋骨の各部域は研究の背景で述べたとおりである。理解を助けるため、ここに図を載せる。



20~26 体節期のニワトリ胚の 19~25 体節レベルで、側板中胚葉側板の近位端およびそれを覆う表皮外胚葉と共に切開し非透過性のフィルムを挿入した (下図)。これによって側板中胚葉と体節の相互作用、および体節細胞の移動が阻害されるが、胚の成長に伴いこのフィルムは小さくなるため、



その効果は一時的である。我々が先に報告したように (Sudo et al., 2001), この胚を手術後 7 日で固定し観察すると遠位肋骨胸骨部の形成が見られなかった (上図右下, 矢尻)。近位肋骨及び遠位肋骨椎骨部は正常であった (図左下)。

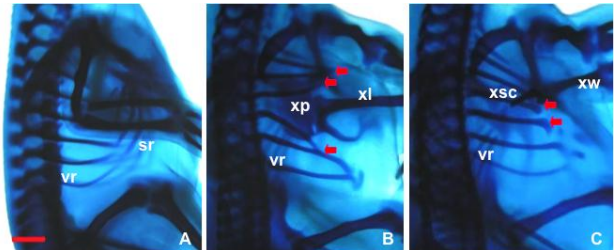
遠位肋骨胸骨部は Nowicki ら (2003) のいう側軸部である。手術後 1 日, 2 日では実験側と対照側とで体節由来細胞の挙動に差が見られなかった。3 日後, 対照側では皮筋板より遠位に側板中胚葉と混じり合う細胞が見られたが, 実験側ではそれが認められなかった。これが体節由来の側軸組織と考えられ

る (Nowicki et al. 2003)

この結果は、体節中胚葉から側軸部細胞が形成されるためにはその出現に先立つ一定の期間に体節中胚葉と側板中胚葉との相互作用が必要であることを示している。

(2) 遠位肋骨胸骨部の形態形成: 遠位肋骨胸骨部形成と四肢形成

発生 2 日ニワトリ胚の胸部表皮外胚葉と側板中胚葉の間に四肢形成部の側板中胚葉を移植することにより異所的に四肢を形成させると (図 B xl; 過剰肢, 図 C xw; 過剰翼) 遠



位肋骨胸骨部 (図 A sr; 正常側の肋骨胸骨部) の形成が抑制された (図 BC 赤矢印)。肋骨椎骨部は正常に形成されている (図 BC vr; 実験側) 正常側と比較 (図 A vr)。

体節細胞の挙動を調べてみると、本来体壁に入って側板中胚葉と混じる側軸部細胞が認められず、かわりに異所的な四肢に移動しているのが見られた。

遠位肋骨胸骨部、四肢の両者ともに側軸部領域であり、両者間で競争的に体節細胞がリクルートされた結果、体幹より四肢に体節細胞が誘引されたものと考えられる。今後、この誘引機構を *in vitro* 系で明らかにしていく予定である。

(3) 頸椎, 腰仙椎における肋骨相同部位の同定

軟骨形成, 骨化中心形成, 関節形成のパターンを解析することにより, 各部位における肋骨相同部位を同定した。

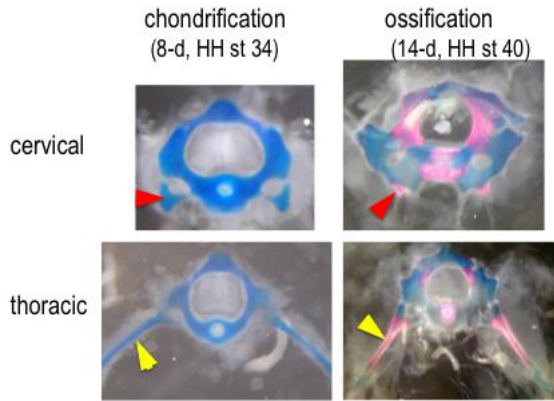
軟骨形成をアルシアンブルー染色および *Sox9* の発現で検討した。軟骨分化は胸椎と肋骨でそれぞれ開始する (次頁図左下, 黄色矢尻が肋骨)。頸椎では肋骨突起の軟骨分化が, 肋骨と同様, 椎体や椎弓から離れた位置から独立して始まった (次頁図左上, 赤矢尻が肋骨突起)。

軟骨形成に引き続く骨化において, 骨化点は胸椎では椎体にひとつと両側の椎弓にひとつずつ, また肋骨にも 1 箇所出現した (次頁図右下, 黄色矢尻が肋骨)。頸椎では胸椎同様, 椎体に 1, 椎弓に 2 に加え, 両側の肋骨突起 (次頁図右上, 赤色矢尻) にも 1 ずつ骨化点が見られた。

肋骨関節の形成は, 細胞密度の高い部分の出現に始まる。この部分に空隙が生じて関節腔となった。頸椎でも椎体と肋骨突起の間に

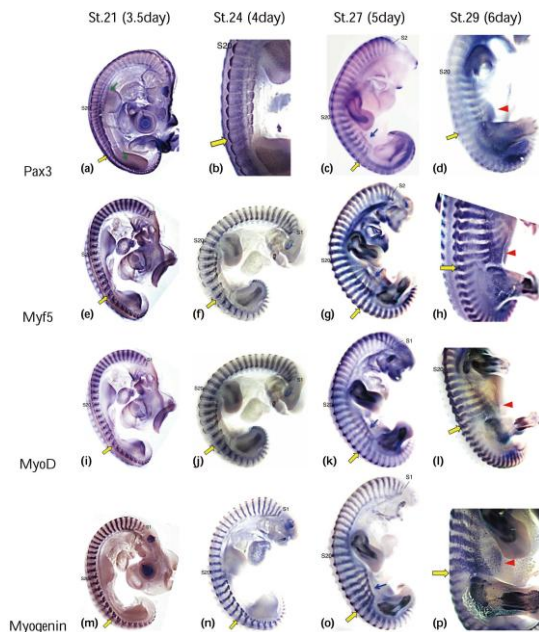
同様の高細胞密度の領域が一過性に見られた。頸部でも、椎体と肋骨突起の間に、ある段階までは関節形成が進行するものと考えられる。

以上の結果は、頸椎の肋骨突起が肋骨と相同であることを示している。



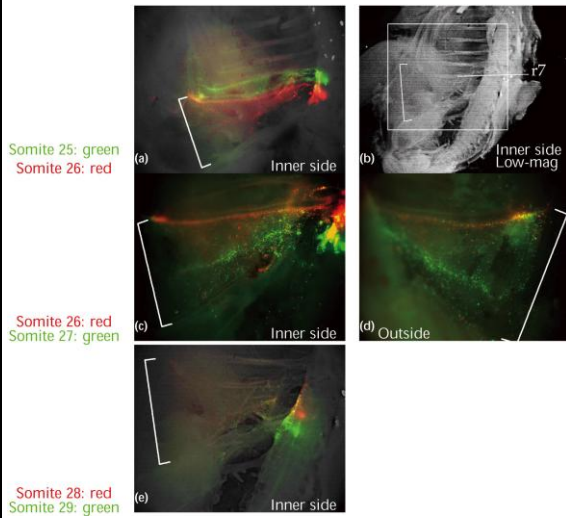
(4) 腹壁筋の発生由来

我々は先にウズラ-ニトリキメラ胚作成により腹壁筋の大部分が、胸部/腰部境界にある1体節に由来することを示した(山口)。

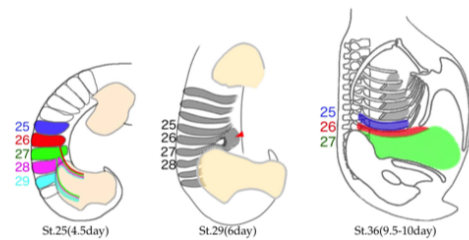


筋分化にかかわる転写因子 (*Pax3*, *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin*) の遺伝子の発現パターン(上図, 黄色矢印が第 27 番体節とその派生物を示している。赤矢印は、腹壁に移動した筋板が癒合している部分を示す。このまえの段階までは筋原基が分節上に移動しているので、その発生を追跡することができる), および体節1個1個を蛍光色素 DiI および DiO で標識し追跡した結果(下の図. 上段; 第 25 体節, 第 26 体節共に帯状に移動している。中段; 第 26 体節が帯状であるのに対して第 27 体節は腹壁全体に拡がっている。左は体壁内

面から見た図, 右は体壁外面から見たもの。それぞれ深層の腹壁筋, 浅層の腹壁筋が観察できる。下段; 第 28, 29 体節はいずれも体壁形成にはほとんど寄与せず後肢芽へと移



動している), 腹壁筋の大部分は, その発生過程を通じて第 27 体節(胸部腰部境界体節; 第 8 肋骨尾側半を形成.) に由来することが明らかになった。腰仙部体節細胞は椎骨とその周囲の筋を形成する他は後肢に移動して行くことが明らかになった。すなわち, 腰仙部体節は肋骨のみならず腹部体壁全体を形成しないのである(下図参照)。



At first, the myotome migrate to form the body wall, keeping its segmental structure, while the cells migrating into the limb bud scatter.

Around st 29, the distal ends of the myotomes in the body wall begin to fuse.

The 27th somite cells, then, expand caudally to fill the abdominal wall.

以上のことから, 胸部体節と腰仙部体節との違いは, 肋骨形成の有無と言うよりは体壁への移動能の有無であることが示唆される。

(5) 遠位肋骨形成における, 表皮外胚葉と体節中胚葉間相互作用の分子の実体
表皮外胚葉が分泌する因子として *Wnt6* を, 体節中胚葉の受容体として *Fzd7* を候補としてクローニングを行い, 胚発生に伴う両者の発現パターンを記載し始めた。

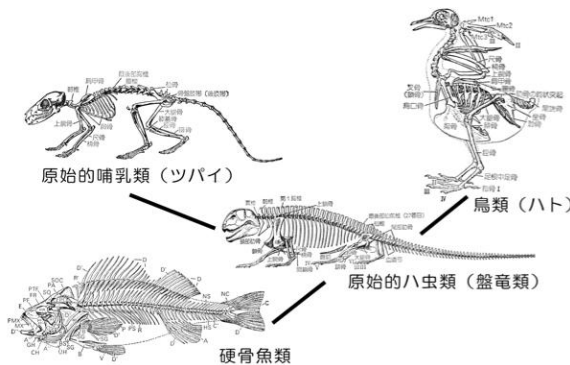
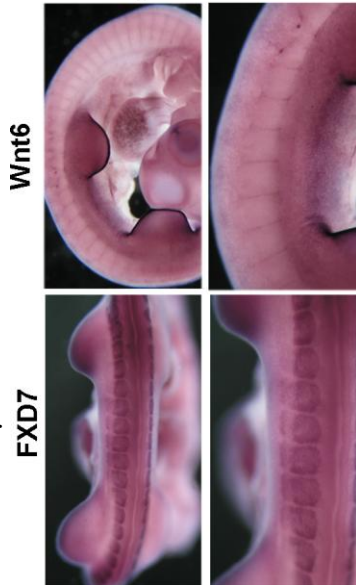
Wnt6 についてはコード領域全長を含む cDNA を得ることができたが, *Fzd7* については全長を得ることが難しかったが, *Wnt6* の機能阻害実験を行うことに必要な細胞外ドメインを

含むN末端側の一部分を得た。これは in situ ハイブリダイゼーションを行うことにも十分な長さである。

このふたつの遺伝子の発現パターンを in situ ハイブリダイゼーションにより記載した。Wnt6, Fzd7ともに体節-表皮間相互作用が起こっていると考えられる時期に一致して発現がみられた。

本研究で明らかになった胸部体節と腰仙部体節の形態形成の違いが系統発生の過程で軸骨格の多様性、すなわち胸部への肋骨局在として現れたものであろう。今後、系統発生的視点から体節から肋骨形成への発生機構を考えてみたい。

HH Stage 20-21



ローマー、パーソンズ「脊椎動物のからだ—その比較解剖学」より改変

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Liem, I. K., Aoyama, H. (2010). Body wall morphogenesis: limb-genesis interferes with body wall-genesis via its influence on the abaxial somite derivatives. Mech Dev. 査読有. 126, 198-211.
2. Sasaki, T., Watanabe, W., Muranishi, Y., Kanamoto, T., Aihara, M., Miyazaki, K., Tamura, H., Saeki, T., Oda, H., Souchelnytskyi, N.,

Souchelnytskyi, S., Aoyama, H., Honda, Z., Furukawa, T., Mishima, H. K., Kiuchi, Y., Honda, H. (2009). Elevated intraocular pressure, optic nerve atrophy, and impaired retinal development in ODAG transgenic mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 査読有. 50, 242-248.

[学会発表] (計 16 件)

1. Haiming Fan (2011). Interaction between the somite cells and the lateral plate mesoderm on the development of ribs: microsurgery on the cell migrating course. The 88th annual meeting of the physiological society of Japan and the 116th annual meeting of the Japanese Association of Anatomists. 2011.3. The Journal of Physiological Sciences, 61, suppl. 1, 2011, S138. 誌上開催
2. Tasuku Masuda, Nobuyuki Sakamoto, Hirohiko Aoyama (2011). Homology between the thoracic vertebrae with ribs and the cervical/lumbosacral vertebrae shown by chondrogenesis and ossification pattern. The 88th annual meeting of the physiological society of Japan and the 116th annual meeting of the Japanese Association of Anatomists. 2011.3. The Journal of Physiological Sciences, 61, suppl. 1, 2011, S138. 誌上開催
3. Kazutaka Maeda, Nobuyuki Sakamoto, Hirohiko Aoyama (2011). The origin and the migration route of the avian somitic abdominal wall muscles. The 88th annual meeting of the physiological society of Japan and the 116th annual meeting of the Japanese Association of Anatomists, 2011.3. The Journal of Physiological Sciences, 61, suppl. 1, 2011, S144. 誌上開催
4. 前田和孝, 坂本信之, 青山裕彦 (2010). 鳥類腹壁筋の由来体節とその移動経路. 日仏生物学会第 173 回例会 2010.12.4 京都市上京区
5. 范海明, 青山裕彦 (2010). 脊椎動物の部域特異的体壁形成における体節細胞の移動と組織間相互作用. 日本解剖学会第 65 回中国・四国支部学術集会 2010.10.9. 呉

6. 増田佑, 坂本信之, 青山裕彦 (2010). 部域ごとの椎骨の発生的軟骨・骨形成と肋骨相同部位の同定. 日本解剖学会第 65 回中国・四国支部学術集会 2010.10.9. 呉
7. 前田和孝, 坂本信之, 青山裕彦 (2010). 腹壁筋の由来体節とその移動経路. 日本解剖学会第 65 回中国・四国支部学術集会 2010.10.9. 呉
8. 増田佑, 坂本信之, 青山裕彦 (2010). 椎骨と肋骨の部域間相同性と部域特異的形態形成. 日仏生物学会第 172 回例会, 2010.5.29. 東京都渋谷区
9. 増田佑, 坂本信之, 青山裕彦 (2010). 頸椎・腰仙椎における肋骨相同部位の同定 - 軟骨形成, 骨化点と肋骨関節形成の解析による. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010.3.28. 盛岡
10. 松井浩二, 山口真未, 青山裕彦 (2010). 筋の発生由来分節と脊髄神経支配. 日仏生物学会第 170 回例会, 2009.6.13. 東京
11. 松井浩二, Isabella Kurnia Liem, 山口真未, 青山裕彦 (2009). 腹壁筋の由来体節と神経支配. 発生学懇話会シンポジウム「肉眼解剖学と発生生物学の対話」(オーガナイザー; 横山尚彦, 青山裕彦) 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2009.3.30. 岡山
12. 青山裕彦 (2009). 実験形態学と発生生物学. シンポジウム「解剖学を築いた人々」(オーガナイザー; 坂井建雄, 島田和幸) 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2009.3.30. 岡山
13. Liem, I. K., Aoyama, H. (2008). Body wall morphogenesis: The new primaxial-abaxial patterning domains and its functional relevance. 12th Indonesian Association of Anatomists Congress, 2008.6.20. Jakarta, Indonesia.
14. Liem, I. K., Yamaguchi, M., Aoyama, H. (2008). Regionalization of the vertebrate body wall: A hypothesis. 12th Indonesian Association of Anatomists Congress, 2008.6.20. Jakarta, Indonesia.
15. Liem, I. K., Yamaguchi, M., Aoyama, H. (2008). Shoulder and pelvic girdles homology. 12th Indonesian Association of Anatomists Congress, 2008.6.20. Jakarta, Indonesia.
16. Aoyama, H. (2008). From somite into the axial skeleton - Experimental morphology in an eggshell. Plenary session, 12th Indonesian Association of Anatomists Congress, 2008.6.20. Jakarta, Indonesia.
- [図書] (計 1 件)
1. 青山裕彦 (2008) 序論 (翻訳) 「臨床のための解剖学」(Keith L Moore, Arthur F. Dalley 著, 佐藤達夫, 坂井建雄 監訳) pp. 1-48 メディカル・サイエンス・インターナショナル 東京
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
青山 裕彦 (AOYAMA HIROHIKO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 70143948
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者
松井 浩二 (MATSUI KOUJI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 80183945
- 坂本 信之 (SAKAMOTO NOBUYUKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 90346487
- (4) 研究協力者
山口 真未 (YAMAGUCHI MAMI)
大阪大学・大学院理学研究科・大学院生
- Isabella Kurnia Liem
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生
- 増田 佑 (MASUDA TASUKU)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生
- 前田 和孝 (MAEDA KAZUTAKA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生
- 范 海明 (FAN HAIMING)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生