

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06751

研究課題名(和文)哺乳類特異的構造、横隔膜を進化させた発生機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of developmental mechanisms behind the evolution of diaphragm

研究代表者

長島 寛(Nagashima, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40435665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類で横隔膜が進化した発生的背景をさぐるため、ニワトリに横隔膜を再現する試みを行なった。横隔膜発生は四肢筋発生と似ており、ニワトリ胚頸部に過剰肢を作ると、そこに体節から筋芽細胞が侵入して筋ができるから、筋の進化は比較的容易にできたと推測される。一方、筋を動かす神経は頸部過剰肢に入らず、横隔膜進化での障害になると考えられた。過剰肢に神経が入らない原因を調べた結果、中頸部体節に軸索伸長阻害作用があることが分かった。この阻害作用は腕神経叢より頭側の神経のみに作用するものだが、その形態的意味は不明で、鳥類特異的な性質の可能性もあり、今後スッポンを用いた更なる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリの中頸部体節には他のレベルにはない軸索伸長阻害作用があるのが分かった。他の羊膜類の頸神経との比較から、この作用は鳥類特異的であり、鳥類進化の過程で獲得されたものと推測されるが、未だその形態的意味は不明である。また、この阻害作用に対しては運動ニューロンと感覚ニューロンで効果が異なっており、これらのニューロンの軸索伸長メカニズムの相違を明らかにするのに役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diaphragm is an evolutionary novelty in mammalian lineage. To unveil the developmental mechanisms underlying its evolution, we try to produce the diaphragm in chicken embryo. Development of the muscle structure is known to be very similar to that of limb muscles, and muscle evolution is assumed to be relatively easy because myoblasts from the cervical somites invade into extra limbs produced in the middle cervical portion. While the evolution of nerves innervating the diaphragm is assumed to be very hard since nerves did not invade the extra limb. We found middle cervical somites inhibited nerves extending into the extra limb. The somites only affected nerves rostral to the brachial plexus. The morphological meaning of the effect is still unknown, and it is possible that the effect is specific to avians, so investigation using other amniote species, such as turtles, would be needed.

研究分野：進化発生学

キーワード：脊髄神経 発生

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の肺は気管支の細分化を高めて表面積を増大させ、高いガス交換能を生み出し、それが哺乳類の高い代謝活性を支えている。しかしこれによって肺の柔軟性は著しく低くなり、肋骨の作用だけでは十分に肺が膨らまなくなってしまう。また体腔が胸腔と腹腔とに分かれていないと、肋骨を広げて胸部を陰圧にしても腹部内臓が胸部に引き寄せ得られて肺を圧迫してしまう。そこで胸腔と腹腔を分ける仕切りを設けて腹部内臓の移動を制限し、その仕切りの緊張によって胸腔を陰圧にして肺を膨らませるのが横隔膜である。胸腔と腹腔を分ける肺の尾部側の隔壁である後肺隔壁は、オオトカゲや主竜類(恐竜、ワニ、ニワトリ、カメ)などでも見られ、静脈血の心臓への還流や胃内容物の逆流防止などに関与しているが、この隔壁には穴が開いており分離は不完全である。完全に胸腔と腹腔とを分け、筋が入ったものが哺乳類の横隔膜であり、その出現は三疊紀初期、獣弓目(*Thrinaxodon*)に見られる。

横隔膜の筋は頸部体節に由来するが、それは直筋系 [ 鰓下筋群(舌筋群、舌骨下筋群)、鎖骨下筋 ] (Keibel and Mall, 1910; Kikuchi, 1970; Tanaka et al., 1988)、または前肢筋 [ 胸筋 (Lewis, 1902; Jinguji and Takisawa, 1983; Valasek et al., 2011) 肩甲下筋 (Hirasawa and Kuratani, 2013) ] から発生すると考えられてきた。しかしいずれにせよ、これらの筋の発生メカニズムは互いに良く似ている。というのも、体幹の骨格筋の発生には2種類ある。一つは上皮性の筋発生であり、ここでは上皮性の未分化な筋幹細胞の増殖とその分化が同時に起る。たとえば上皮性の幹細胞である皮筋節とそこから分化した筋節では、皮筋節細胞の増殖と分化によって筋板(皮筋節と筋節)が背腹に伸長する。これによって作られるのが肋間筋、固有背筋などの中軸筋である。もう一つは移動性の筋発生である。ここでは間葉性の未分化な筋幹細胞が遊走し目的地で筋分化を開始する。たとえば、四肢筋は皮筋節の幹細胞が脱上皮化し、枝芽に遊走したのち筋分化を開始する。横隔膜、鰓下筋、(鎖骨下筋)もこの様式で作られるのである。後者の筋発生では、幹細胞中で発現する Pax3 のほか、脱上皮化に誘引因子 HGF と筋幹細胞で発現する受容体 Met との相互作用が必須である。

一方、筋を支配する脊髄運動神経は発現する転写因子によって大まかに3グループに分けられている。すなわち固有背筋を支配する背枝(MMC ニューロン)は Lhx3 を、四肢筋を支配する神経(LMC ニューロン)は Foxp1 を、四肢筋以外の外側体壁筋を支配する神経(HMC ニューロン)はどちらも発現しない(Stifani, 2014 の総説)。横隔神経は Lhx3 も Foxp1 も発現しない HMC ニューロンであるから(Rousso et al., 2008; Philippidou et al., 2012)、横隔膜-前肢筋由来説は神経支配から支持されない。一方、Nagashima ら(2020)は、ニワトリの鎖骨下筋神経が腕神経叢の一枝であるにも拘わらず横隔神経と同じ HMC に属することを示した。また予備実験としてスポンで舌骨下筋群の支配神経が HMC であることも示唆された。よって横隔神経は鎖骨下筋、舌骨下筋群などの直筋系の支配神経から進化した可能性がある。

ところで横隔膜は筋幹細胞が胸腹膜ヒダに遊走し、この中で筋分化して作られるが(Kollmann, 1907, Goodrich, 1930)、胸腹膜ヒダ自体は主竜類(鳥類、ワニ、カメ)にも存在する。つまり横隔膜の新しさとは胸腹膜ヒダへの筋幹細胞の移動である。筋幹細胞の移動には誘引因子の HGF が必須で(Bladt et al., 1995)、この分子は軸索伸長にも関与しているから(Ebens et al., 1996; Yamamoto et al., 1997)、哺乳類の祖先動物の胸腹膜ヒダで新たに HGF が発現し、直筋系の筋幹細胞、軸索が胸腹膜ヒダに引き寄せられて横隔膜ができたのかもしれない。

ではニワトリの胸腹膜ヒダに HGF を発現させれば横隔膜ができるのであろうか? 実はそう簡単ではない。というのも、ニワトリ胚で枝芽(HGF を発現する)を頸部に移植した場合、異所的な枝芽に体節から筋が侵入するから(Lours and Dietrich, 2005)、強力な誘引因子さえあれば、通常は移動性の筋原基を作らない頸部体節でもそれを作ることができる(Alvares et al., 2003)。しかしこの際、異所的な枝芽に軸索は入らないから(Lours and Dietrich, 2005)、たとえニワトリの胸腹膜ヒダが HGF 発現を獲得しても横隔神経はできないだろう。つまり筋よりも神経が問題なのだ。

## 2. 研究の目的

ニワトリで頸部に作成した過剰肢に頸神経が侵入しない要因をさぐり、横隔神経が進化した発生機構を解明する一助とする。

## 3. 研究の方法

ニワトリ胚頸部に様々な条件で過剰肢を作成し、過剰肢に頸神経が入る条件を探索する。

## 4. 研究成果

ニワトリ頸部過剰肢に頸神経が侵入しない原因が頸神経自体にあるのか、その発生環境にある

のかを確かめるため、様々な条件下で頸部過剰肢を作成した。まず中頸部の壁側中胚葉とそれらを覆う外胚葉を前肢部の同等の組織に入れ替えた所、既報通り、移植片からできた頸部過剰肢に筋は侵入したが、神経は侵入しなかった。次に中頸部の神経管、脊索とそれより外側の組織全体(体節、壁側中胚葉、臓側中胚葉、それらを覆う外胚葉)を前肢部の同等の組織に入れ替えた所、できた過剰肢に移植した前肢部の神経管から神経が侵入した。よって移植部位より頭側、尾側の胚環境から軸索伸長への阻害作用はないと確かめられた。次に、中頸部の神経管、脊索より外側の組織全体(体節、壁側中胚葉、臓側中胚葉、それらを覆う外胚葉)を前肢部の同等の組織に入れ替えた所、頸部過剰肢に頸神経が侵入した。よって頸神経自体は過剰肢に侵入できる能力があり、神経を取り巻く環境(中頸部の体節または臓側中胚葉)が重要だと分かった。次に、中頸部の体節より外側の組織全体(壁側中胚葉、臓側中胚葉、それらを覆う外胚葉)を前肢部の同等の組織に入れ替えた所、頸部過剰肢に頸神経が侵入しなかった。よって体節が重要だと示唆された。そこで、中頸部の体節、壁側中胚葉、とそれらを覆う外胚葉を前肢部の同等の組織に入れ替えた所、頸部過剰肢に頸神経が侵入し、体節の重要性が確認された。ここで中頸部神経管から過剰肢に軸索が伸びる際に、その間に介在する体節には二つの作用が想定される。一つは中頸部体節が軸索の伸長を阻害し、前肢部体節にはそのような作用がない可能性。もう一つは前肢部体節から軸索伸長に必要な栄養因子が出ている一方で、中頸部体節からはそのような物質が出ていない可能性がある。そこで中頸部の体節を除去し、そこに前肢部の壁側中胚葉と外胚葉を移植した所、過剰肢に隣接する神経管から過剰肢に頸神経が侵入したから、体節は軸索伸長に不要である。以上から、中頸部体節が頸部過剰肢への軸索侵入を阻害していたことが分かった。

中頸部ではなく、上頸部に過剰肢を作成すると舌下神経が入ることが分かっていた(Lours and Dietrich, 2005)。そこで、どの体節が阻害作用を持つのかを確かめるため、中頸部の壁側中胚葉と外胚葉を前肢部の同等の組織に入れ替えて過剰肢を作成すると同時に、中頸部の体節を他の様々な位置の体節に入れ替えて、過剰肢に頸神経が侵入するかを確かめた。その結果、5-15番体節に阻害作用があり、それより頭側、尾側の体節には阻害作用がなかった。

中頸部体節の軸索伸長阻害は、どのレベルの脊髄神経にも作用するのかを確かめるため、中頸部の壁側中胚葉と外胚葉を前肢部の同等の組織に入れ替えて過剰肢を作成すると同時に、神経管を前肢部あるいは後頭部のものに入れ替えたところ、前肢部神経管から伸びる軸索は過剰肢に侵入したが、後頭部神経管からの軸索は侵入しなかった。よって、中頸部体節による軸索伸長阻害作用は腕神経叢よりも頭側の神経にのみ作用するのだ。前肢神経管を移植した際、そこからできる神経堤細胞による軸索伸長への影響があった可能性を確かめるため、前肢神経管の背側のみを交換移植した所、頸神経は過剰肢に入らなかった。一方、腹側のみを交換移植した場合は、神経が過剰肢に入り、この線維には運動神経だけではなく、感覚神経も含まれていた。したがって、神経堤細胞には軸索伸長を誘導する能力はなく、前肢神経が過剰肢に入る際には、中頸部体節の持つ阻害作用に回答しない運動神経が過剰肢に入り、それに沿って感覚神経が過剰肢に入ると考えられた。

以上のように、ニワトリでは特定の位置(中頸部)の体節が、特定の位置(前肢より頭側)の脊髄神経の伸長を阻害しているのである。そこでこの阻害作用がもつ形態的な意味を探るため、ニワトリ中頸部の体節を阻害作用のない前肢部の体節に交換したが、頸神経の形態に変化は見られず、その作用が本来的に持つ形態的な意味は不明である。ヒトやスッポンとの頸神経の形態の比較から、ニワトリの中頸部体節の軸索伸長阻害作用は鳥類特異的な性質である可能性もあり、今後はスッポンを用いた研究が必要である。

#### <引用文献>

- Alvares LE, Schubert FR, Thorpe C et al. (2003) Intrinsic, Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. *Dev. Cell*, 5, 379-390.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S et al. (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, 376, 768-771.
- Ebens A, Brose K, Leonardo ED et al. (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron*, 17, 1157-1172.
- Goodrich, E.S. (1930) *Studies on the Structure and Development of Vertebrates*. London: Macmillan.
- Hirasawa T, Kuratani S, (2013) A new scenario of the evolutionary derivation of the mammalian diaphragm from shoulder muscles. *J. Anat.* 222, 504-517.
- Keibel F. and Mall F. (1910) *Manual of Human Embryology*. Philadelphia, London: Lippincott.
- Kikuchi T (1970) A contribution to the morphology of the Ansa cervicalis and the phrenic nerve. *Acta Anat. Nippon* 45, 242-281.
- Kollmann J (1907) *Handatlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Zweiter Teil*. Jena: Gustav Fischer.

- Lewis WH (1902) The development of the arm in man. *Am. J. Anat.* 1, 145-183.
- Lours C, Dietrich S (2005) The dissociation of the Fgf feedback loop controls the limbless state of the neck. *Development* 132, 5553-5564.
- Nagashima H, Koga D, Kusumi S et al. (2020) Mukaigasa K, Yaginuma H, Ushiki T, Sato N. Novel concept for the epaxial/hypaxial boundary based on neuronal development. *J. Anat.*, 237, 427-438.
- Philippidou P, Walsh CM, Aubin J et al. (2012) Sustained *Hox5* gene activity is required for respiratory motor neuron development. *Nat. Neurosci.* 15, 1636-1644.
- Rouso DL, Gaber ZB, Wellik D et al. (2008) Coordinated actions of the forkhead protein *Foxp1* and Hox proteins in the columnar organization of spinal motor neurons. *Neuron*, 59, 226-240.
- Stifani N (2014) Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell. Neurosci.*, 8, 293.
- Tanaka S, Zukeran C, Kuratani S, et al. (1988) A case report of the anterior pericardial branch of the cervical ansa: a comparative anatomical and ontogenetical consideration. *Ann. Anat.* 165, 269-276.
- Valasek P, Theis S, DeLaurier A, et al. (2011) Cellular and molecular investigations into the development of the pectoral girdle. *Dev. Biol.* 357, 108-116.
- Yamamoto Y, Livet J, Pollock RA et al. (1997) Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development*, 124, 2903-2913.
- Jinguji Y, Takisawa A (1983) Development of the mouse diaphragm. *Okajimas Folia Anat.* 60, 17-41.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長島 寛, 佐藤 昇
2. 発表標題 頸部過剰肢の神経支配から見た頸部の特異性
3. 学会等名 第129回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長島 寛, 佐藤 昇
2. 発表標題 頸部過剰肢の神経支配からみた鳥類頸部の特異性
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長島 寛, 佐藤 昇
2. 発表標題 頸神経の発生から考える頸部の進化
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会 全国学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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