

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590219

研究課題名(和文) 体節に由来する軸骨格の部域特異的形成と四肢形成の関連：その個体発生と系統発生

研究課題名(英文) Regionalization of the axial skeleton derived from the somites: its ontogenesis and phylogenesis

研究代表者

青山 裕彦 (AOYAMA, Hirohiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70143948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類と鳥類において、肋骨が胸部に局在するのは、表皮外胚葉に依存して発生する遠位肋骨の有無に帰するとの仮定の下、特に遠位肋骨の発生に注目して肋骨原基である体節とその周囲の組織との相互作用を調べている。胸部体節を腰仙部に移植すると本来のものより短い肋骨が形成される。これは腰仙部側板細胞が体節細胞の移動を阻止するためであることがニワトリ胚を用いた異所的移植キメラの解析から分かった。

一方、ニワトリ胚とマウス胚で軸骨格形成を比較したところ、骨化の順序が両者で異なっていた。ほ乳類と鳥類の軸骨格の部域化が独立に生じたことと矛盾しないが、部域化の必然性を知るためには両者の発生的共通点を探らねばならない。

研究成果の概要(英文)：In the axial skeleton of mammals and birds, the ribs are exclusively in the thoracic region. The most part of the rib is consisted of the distal rib, which develops depending on the surface ectoderm. Regionalization of the axial skeleton is, thus, considered to be differential development of the distal rib according to its location. An ectopic transplantation of the thoracic somite into the lumbosacral region in a 2-day chick embryo caused ectopic rib, which was shorter than the normal rib. In the course of development of this chimera, we found that the thoracic somite cells stopped their migration when they met the lumbosacral lateral plate mesoderm.

On the other hand, we compared the axial skeleton development between chick embryos and mouse embryos and found that order of the ossification was different, which coincide with an idea that the regionalization of the axial skeleton independently occurs in the course of phylogenesis of mammals and birds.

研究分野：基礎医学

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 軸骨格 体節 側板 肋骨 接触阻止 ニワトリ 進化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類も鳥類も肋骨が胸に局在しているが、これは収斂進化の結果である：哺乳類と鳥類において、その軸骨格は胸部では肋骨と椎骨からなるが、その他の部域では椎骨のみから成るという共通点がある。両者の共通祖先である爬虫類では、はじめ胴体は胸部と腹部とに分化せず胴体全体を通じて肋骨があった。哺乳類はキノドン類から派生したが、肋骨が胸部に限局するようになったのはキノドン類の中でもトリナクソドン以降である。一方鳥類の祖先は恐竜であり、恐竜が進化していく中で胸部と腹部が分かれてきた (Carroll, 1988)。すなわち系統発生において、哺乳類と鳥類は爬虫類より進化したが、軸骨格の分化は独立に起きているのである。両者は相似だろうか、相同だろうか？ その個体発生に相同性はあるのだろうか？

胸部と腹部の骨格系では何が違うのか？
～ニワトリ胚において、肋骨は個体発生の機構から3つの区画に分けられる：われわれは肋骨が、発生的に、3つの部分からなっていることを明らかにした (Aoyama ら, 2005)。これは二つのカテゴリーの組み合わせに基づいている (図1)。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である (Aoyama ら, 2005)。表皮外胚葉に特徴的なシグナル伝達物質に Wnt 分子群がある。現在 Wnt 遺伝子群とその受容体である Frizzled 遺伝子群を単離しその発現パターンを解析しているところである。

鳥類の肋骨は遠位肋骨の中間点に関節をもつ。第二はこの関節より近位部 (椎骨部) とより遠位部 (胸骨部) に分けるものである。体節と側板中胚葉との間を一時的に遮蔽すると遠位肋骨胸骨部が形成されない。遮蔽がなくなったあと、体節細胞は体壁に入るのであるが、その細胞は遠位肋骨椎骨部しか作らないのである (Sudo ら, 2001)。近年 Burke と Novicki (2003) によって、主軸部 primaxial と側軸部 abaxial という発生区画が提唱された。これは従来の軸上 epaxial と軸下 hypaxial という区画とは別の発生学的な見地による。すなわち、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、主軸部組織は体壁内へ伸びていくものの側板中胚葉との相互作用を示さないという点で異なっている。Novicki ら (2003) によれば、遠位肋骨胸骨部は側軸部にあたり、その発生における側板中胚葉の関与は我々の結果と符合している。

従来、頸椎や腰椎にも胸部の肋骨に相当する部分が存在すると言われていたがそれはここで言うところの近位肋骨のことと考えられ、従って遠位肋骨の大小、もしくは有無

が胸部とその他の部位を分ける差異と考えられる。すなわち表皮と反応する部分が期間で異なっているはずなのである。また、種間の相違も系統発生上、体節-表皮間の相互作用の関係に変化が起きたためではないかと予想される。

胸部と腹部の分化は筋系にも現れているか？～ニワトリ胚の腹壁筋の由来はほぼ1体節に限られている：骨格系の形態から一見明らかに見える胸部と腹部の差異であるが、こと筋についてみればそれほど明瞭ではない。胸部の分節性 (肋間筋はそれぞれ1個の体節に由来する) に対して腹部の分節性はどうか？ 1体節をウズラ胚からニワトリ胚へ移植し、ウズラ細胞がどの筋を構成したかを解析した結果、第1番目の腰部体節である第27体節由来の細胞が腹壁筋の大部分を構成していた (Yamaguchi と Aoyama, 準備中)。腰仙部体節はひとつを除き肋骨も体壁筋も形成しないのである。頸部には肋骨も体壁筋もないので、結局、骨も筋も含めて体壁を作るのは胸部体節のみと言えるのである。

四肢の形成と肋骨の形成は相補的ではないか？

1. 腰仙部体節は最も頭側のものが腹壁筋となる以外は後肢の筋を形成する：我々は、胸部に四肢の領域の側板中胚葉を移植することによって異所的に前肢や後肢を形成させると、肋骨胸骨部のみが欠損することを見た。この異所的に形成された四肢の筋は胸部体節に由来していた。本来肋骨胸骨部やその肋間筋を形成するはずの体節が、その発生運命を肋骨椎骨部及び肋間筋から四肢筋の形成へ転換したと考えられる (Liem & Aoyama, 2009)。

2. ニワトリ胚において、遠位肋骨胸骨部は四肢とおなじ側軸部 abaxial に属する：前述した Burke & Novicki (2003) の発生区分によれば、肋骨の椎骨部は主軸部に、胸骨部は四肢とともに側軸部に分類され、従って、同じ側軸部領域のもの同士の間で発生運命が転換したものと言える。

この2点から、系統発生の過程で嗣子が発達してきたことが、体節の発生運命を体壁型性から四肢形成へと転換したのではないかと想像される。

2. 研究の目的

軸骨格の部域特異的形態形成機構を、その個体発生と系統発生の両面から考えたい。軸骨格の個体発生では、胸部体節から肋骨と椎骨が、その他の部分の体節からは椎骨のみが形成されるという部域特異性が見られる。我々は、ニワトリ胚の肋骨がその長軸に沿った3つの区画からなることを示したが、肋骨

の部域特異性は、そのうち、最も遠位にある遠位肋骨胸骨部の有無によるものと考えられる。この部分は体節とそれに隣接する表皮外胚葉との相互作用に依存するものであり、本研究では、この相互作用を阻害した場合に起きる現象を組織学的に明らかにした上で、その分子機構に迫りたいと考えている。

一方、体節と側板中胚葉の相互作用については、胸部における組織間相互作用阻害による細胞動態の記述と共に、この相互作用の部域特異性を明らかにする。従来より、胸部体節を頸部や腰部に移植すると、肋骨が形成されるものの、本来の長さより短いことが知られている。この現象は移植された体節周囲の環境によるものであり、その候補として側板中胚葉を取り上げる。我々は先に、腰仙部体節移植により、肋骨胸骨部が形成されなくなることを示している (Liem & Aoyama, 2009)。肋骨原基である体節の分化能と、その発現に関わる体節周囲組織の部域特異的助長/抑制能を明らかにしたい。肋骨胸骨部は、発生上、四肢と同じカテゴリーに属する。胸部と腹部の分化、すなわち腹部で肋骨が失われたのは後肢の発達によるものではないかという仮説をたてている。

哺乳類と鳥類の系統発生において、胴体が胸部と腹部へと分化したのは、独立に生じた収斂進化の結果と考えられる。哺乳類と鳥類の個体発生における軸骨格形成の部域投句為政について、両者の間の相違点と共通点を追究することによって、収斂進化の必然性にせまりたい。

3. 研究の方法

全体の戦略は、ニワトリ胚の体節細胞を標識した細胞移動の追跡 (GFP 遺伝子を染色体に組み込んだ長期にわたる標識)、ニワトリ胚に実験操作を加えた組織間相互作用の変更の結果引き起こされた形態形成の変化の観察、その分子実体の追究、in situ ハイブリダイゼーションによる特異的遺伝子発現パターンの記載、マウス胚とニワトリ胚との間での比較解剖学的検討である。具体的方法については「研究成果」の項で述べる。

4. 研究成果

(1) 遠位肋骨形成における表皮外胚葉の役割とその分子機構

表皮外胚葉-体節間相互作用を抑制したとき遠位肋骨形成の他に形成不全となる構造はないか？

体節と表皮の間にプラスチックフィルムを挟むと肋骨遠位部が形成されない (Aoyama ら, 2005)。今回は、体節から肋骨形成に至るまでの細胞動態を一般染色に

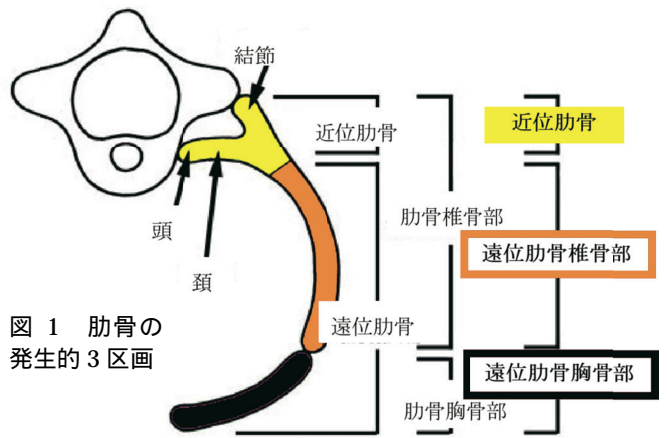


図 1 肋骨の発生的 3 区画

より明らかにした。これまで、表皮-体節間相互作用の阻害により遠位肋骨の欠損を認めているが、その他の体壁組織についてはまだ観察していなかった。とりわけ肋骨と同じく体節を起源とする筋について検討したところ、肋骨の欠損部では肋間筋、外腹斜筋が欠損していることが認められた。一方、側板に由来する結合組織や胸膜には異常が見られなかった。

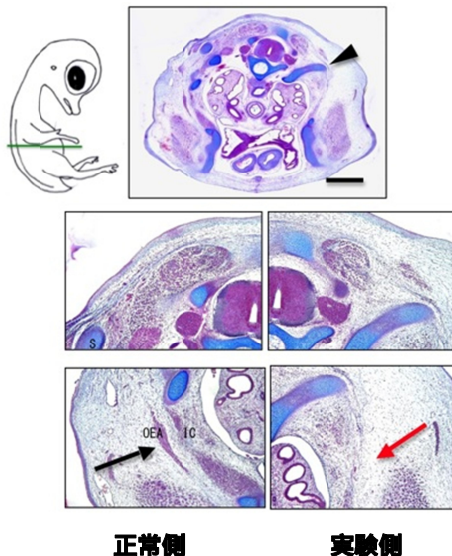


図 2. 孵卵 2 日で表皮外胚葉-体節間にフィルムを挿入し、さらに 7 日間孵卵を続けたニワトリ胚。胚の模式図 (左上) に緑線で切片の位置を示す。正常側では肋骨、肋間筋 (IC)、外腹斜筋 (OEA) が形成されているが、実験側では肋骨の形成が不全であり (やじり)、肋間筋、外腹斜筋も見られない。しかし、皮膚、皮下組織は形成されている。アザン染色。バー = 1mm。

以上により、表皮外胚葉-体節間相互作用の阻害は、遠位肋骨とその間の肋間筋、すなわち体節に由来する構造の形成不全のみを引き起こすことが分かった。

さらに、組織構築を、頸部と胸部とで比較したところ、肋骨形成能を持たない頸部体節も、胸部のものと同様に皮筋板の外側部が欠損していた。一方、肋骨に相同と考えられる頸椎横突起の形態には変化が認め

られなかった。頸部体節は遠位肋骨の形成能を持たないため、肋骨基部のみ形成され、それが頸椎横突起となったと考えられる。

表皮外胚葉-体節間相互作用をになう分子は何か？

表皮外胚葉が体節に働きかける候補分子として Wnt6 を、その受容体として Frizzled7 (Frz7) を取り上げた。Frz7 の変異遺伝子をクローニングし QT6 細胞に導入したものを表皮と体節の間に移植したが、期待された阻害効果が見られなかった。引き続き阻害実験を試行する。

In situ ハイブリダイゼーションにより、Wnt6 と Frz7 の発現パターンが、全載標本では重なって見えた。今後、Wnt6 が表皮に、Frz7 が体節に発現することを確認する必要があるが、表皮から体節へのシグナルが Wnt6 であることを示唆するデータである。

(2) 遠位肋骨形成における側板中胚葉の役割～その部域特異的相互作用

側軸部 abaxial 細胞の動態

ニワトリ 2 日胚 (20 体節期前後) の側板中胚葉の内側端を切開し、そこに非透過性のフィルムを挿入することで側板中胚葉-体節間相互作用を阻害すると、遠位肋骨胸部部が形成されなくなる。フィルムの挿入部位は体節細胞の移動の経路ではあるが、体節細胞がその位置まで来る頃 (挿入後 1 日) には、たいていの場合、フィルムはそこから外れている。従って、この操作により、側板-体節間相互作用が遮断されるのは、最大 24 時間程度である。体節細胞の移動を一般染色および体節細胞を蛍光蛋白質 GFP で安定に標識したもので追跡した結果、正常発生では体壁内へ進入した体節 (外側唇) は集団で進入する主軸部 primaxial 体節細胞とそれから分離して側板中胚葉と混じり合う側軸部 abaxial 体節細胞の両者が見られるのに対して、実験側では側軸部細胞が見られなかった。側軸部細胞の分化決定は体節細胞の移動以前のどこかの時期に側板中胚葉から一過性のシグナルを受けて側軸部細胞となるよう運命づけられると言える。

側板中胚葉-体節間相互作用の部域特異性～腰仙部側板中胚葉は胸部体節細胞の移動を阻止する

胸部体節を腰仙部に移植すると肋骨が形成されるものの、本来の長さより短い。移植体節を GFP 遺伝子導入により、宿主側板中胚葉を DiI により標識し追跡した。正常胚において、胸部では体節細胞が側板中胚葉で構成される体壁内に進入していく。一方、腰仙部に胸部体節を移植すると、体節細胞が移動してきて側板中胚葉に達したところでその移動が止まってしまうことが

見つかった。すなわち、胸部体節を腰仙部に移植したとき形成された肋骨が短くなるのは、腸骨などの骨の存在による物理的障壁と言うよりは、発生初期の未分化ではあるが、それぞれの原基となる細胞同士の相互作用によるものであることが分かった。

in vitro でこの現象を再現する実験系の確立を試みた。ニワトリ 2 日胚 (20 体節期前後) より胸部体節細胞および胸部もしくは腰仙部側板中胚葉を単離し、共培養し、間歇撮影した。胸部体節細胞が腰仙部側板中胚葉細胞に接触すると、それまでとは違う方向・向きへ、側板細胞から逃げるように移動した (図 3)。胸部側板中胚葉と共培養した場合、胸部体節細胞の移動にこのような現象は見られなかった。

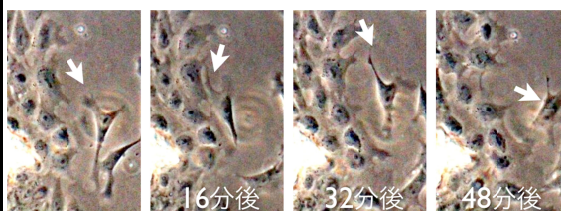


図 3 体節細胞と側板中胚葉細胞の共培養。胸部体節細胞 (白矢印) が側板中胚葉細胞 (画面右側) と接触するとその側板中胚葉細胞から逃げるように移動の方向・向きを変える。

この系の活用により、生体内で見られた現象を細胞レベルの動態から説明出来るようになり、さらにそれをを用いて、体節-側板間に働く分子機構が明らかになることが期待される。

(3) ニワトリ胚とマウス胚における軸骨格形成の比較発生学

頸椎・胸椎 + 肋骨・腰仙椎の相同性～ニワトリ胚

従来から頸椎や腰椎、仙椎に肋骨との相同部位の存在がいわれている。これまでに、ニワトリ胚の椎骨について、軟骨形成、骨化中心のパターン解析によりそれを同定した。さらに、一般染色、および関節部に特異的に発現する遺伝子、GDF5 および Erg の発現パターンから、肋骨関節の形成過程、およびその相同部位における変化を比較した。

両者ともに、肋骨関節に相当する部位に細胞の密度が高い部分が生じる。その後、胸部ではそこに腔所が現れ関節が形成される。一方、頸部や腰部では、再び周囲の組織と同様の均一な組織となる。このとき、肋骨関節及びその相同部位で、GDF5 および Erg の発現がみられた。以上のことから、胸部以外の椎骨でも肋骨関節形成の初期過程は共通であり、その後の過程の違いが独立した肋骨を産み出すかそうでないかを決めることになる。

鳥類（ニワトリ）とほ乳類（マウス）における、椎骨および肋骨形成の比較発生学。ニワトリ胚とマウス胚を、アルシアンブルーとアリザリンレッドの二重染色し、その軸骨格の軟骨形成と骨化パターンを比較・検討した。軟骨形成については、ニワトリ胚とマウス胚に違いは見られなかった（図4）、頸椎の肋骨相同部位が、マウス胚でもニワトリ胚と同様に認められた。

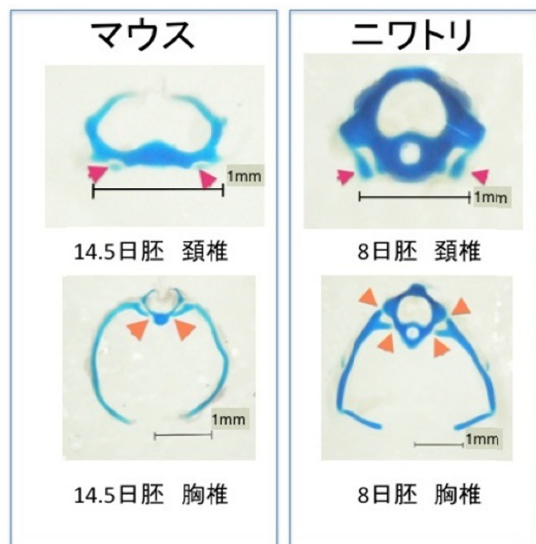


図4 マウス胚、ニワトリ胚の頸部及び胸部骨格。アルシアンブルー-アリザリンレッド二重染色。まだ骨化が始まっていない。やじり（赤）は頸椎の肋骨相同部位。胸部の肋骨関節（やじり（橙））と比較。

一方、骨化パターンには両者の間に違いが認められた。ニワトリ胚では椎体は上位頸椎から下位頸椎に向かって骨化する波と、下位胸椎から頭尾両側へ向かって骨化する波があるのに対して、マウス胚では下位胸椎に始まり頭尾両側へ向かう骨化の波のみが認められた。このことは、マウスとニワトリとでは、系統発生における、その中軸骨格部域化の機構が異なっていることを示唆する。

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）

〔学会発表〕（計13件）

1. 松谷 薫, 松森 大輔, 青山 裕彦, ニワトリの部域特異的中軸骨格の形成における体節細胞と側板中胚葉の相互作用: 腰部側板中胚葉が肋骨原基体節細胞の移動能に与える影響. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014.3.28, 下野市
2. 朝克吉楽, 青山 裕彦, 側板中胚葉の発生運命. 第119回日本解剖学会総会・全

国学術集会, 2014.3.28, 下野市

3. 加賀谷 美幸, 青山 裕彦, 肋骨形態にみるヒト上科霊長類の胸郭. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014.3.28, 下野市
4. 朝克 吉楽, 青山 裕彦, 側板中胚葉の発生運命. 日本解剖学会第68回中国・四国支部学術集会, 2013.10.19, 米子市
5. 范 海明, 坂本 信之, 青山 裕彦, 肋骨形成における体節細胞と側板中胚葉の相互作用: 微小手術による体節-側板間遮断実験. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013.3.30, 高松市
6. 桂 由香理, 坂本 信之, 青山 裕彦, 体節-表皮外胚葉間相互作用遮断による体節細胞の挙動~頸部と胸部との比較~. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013.3.30, 高松市
7. 加賀谷 美幸, 濱田 穰, 青山 裕彦, 麻酔下マカクザルにおける前肢帯骨格の可動域計測の試み. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013.3.28, 高松市
8. 桂 由香理, 青山 裕彦, 頸部体節と表皮外胚葉間の相互作用遮断による体節細胞の挙動. 日本解剖学会第67回中国・四国支部学術集会, 2012.10.21, 宇部市
9. 桂 由香理, 青山 裕彦, 体節と表皮外胚葉の相互作用遮断による遠位肋骨欠損胚における体節細胞の挙動. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012.3.26, 甲府市
10. 松森 大輔, 青山 裕彦, 鳥類の胸部と腰仙部の部域特異的肋骨形成: 体節細胞の移動と枝芽形成側板中胚葉. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012.3.26, 甲府市
11. 松森 大輔, 青山 裕彦, 中軸骨格と部域特異的形態形成と四肢形成: 体節細胞の移動に対する枝芽の影響をキメラ胚に見る. 日本解剖学会第66回中国・四国支部学術集会, 2011.11.12, 徳島市
12. 桂 由香理, 青山 裕彦, 遠位肋骨形成における体節細胞の移動と表皮外胚葉との相互作用. 日本解剖学会第66回中国・四国支部学術集会, 2011.11.12, 徳島市
13. 増田 佑, 坂本 信之, 青山 裕彦, ニワトリ軸骨格の部域特異的形態形成: 肋骨

関節形成の相同性 . 日仏生物学会第 174
回例会, 2011.5.28, 東京都渋谷区

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科

志村 菜穂子 (SHIMURA NAHOKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科

〔図書〕(計 3 件)

1. 青山 裕彦 (翻訳), 西村書店, 「ラーゼン人体発生学 第 4 版」(Schoenwolf, Bleyl, Brauer, Francis-West 編著, 仲村春和, 大谷浩 監訳) 第 11 章 呼吸器系と体腔の発生, 2013, p.267-282.
2. 青山 裕彦 (旧項目改稿, 新項目執筆; 分担), 岩波書店, 「岩波生物学辞典 第 5 版」(巖佐庸, 倉谷滋, 斎藤成也, 塚谷裕一 編), 2013.
3. 青山 裕彦 (翻訳), 丸善株式会社, 「ジューンケイラ 組織学 第 3 版」(Anthony L. Mescher 著, 坂井建雄, 川上速人 監訳) 第 22 章 女性生殖器系, 2011, pp. 412-436.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 裕彦 (AOYAMA HIROHIKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 70143948

(3) 連携研究者

松井 浩二 (MATSUI KOUJI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 80183945

坂本 信之 (SAKAMOTO NOBUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 90346487

(4) 研究協力者

范 海明 (FAN HAIMING)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科

松森 大輔 (MATSUMORI DAISUKE)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科

増田 佑 (MASUDA TASUKU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科

桂 由香理 (KATSURA YUKARI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科

朝克吉楽 (CHAOKEJILE)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科

松谷 薫 (MATSUTANI KAORU)