

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460254

研究課題名(和文)細胞運動/増殖の制御による軸骨格の部域特異的形態形成：胚操作および培養実験系

研究課題名(英文)Region specific morphogenesis of the axial skeleton controlled by cell migration and/or cell proliferation: in vivo and in vitro experimental system

研究代表者

青山 裕彦 (Aoyama, Hirohiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：70143948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の進化の過程で、初めは全体に存在した肋骨が、哺乳類と鳥類では胸部に限局するようになった。その結果、運動の自由度が増し、また柔軟な腹壁の獲得が、より活発な肺呼吸を可能にした。

個体発生で、肋骨は体節に由来し、肋骨形成は胸部体節細胞が隣接する胸部側板への進入に始まる。ところが、ニワトリ胚の移植実験では、同じ胸部体節細胞が、腰仙部側板には進入できず、十分な大きさの肋骨を形成しなかった。培養系では、胸部体節細胞は胸部側板細胞と接触後、そのまま前進を続けようとしたが、腰部側板細胞と接触すると移動の向きを変え、離れていった。これは生体内で見られた現象の反映といえ、今後、分子機構の研究に活用できる。

研究成果の概要(英文)：In the course of the phylogenesis of vertebrates, the ribs has been localized in the thoracic region in their axial skeleton, which allow mammals and birds to acquire flexibility in their body and more active lung breathing.

In a developing embryo, the ribs are derived from the somites. The rib-genesis begins with migration of somite cells into the lateral plate that is adjacent to the somites. When we transplanted the thoracic somite into the lumbo-sacral region, the somite cells did not migrate into the lumbo-sacral lateral plate. In vitro, when the thoracic somite cells contact thoracic lateral plate cells, the somite cells tended to migrate forwardly as before. On the contrary when the thoracic somite cells contact lumbo-sacral lateral plate, the somite cells start to migrate in the opposite direction. These findings suggest that the behavior of somite cells in vitro represents the phenomenon seen in vivo. This in vitro system would be available for further molecular study.

研究分野：解剖学発生生物学

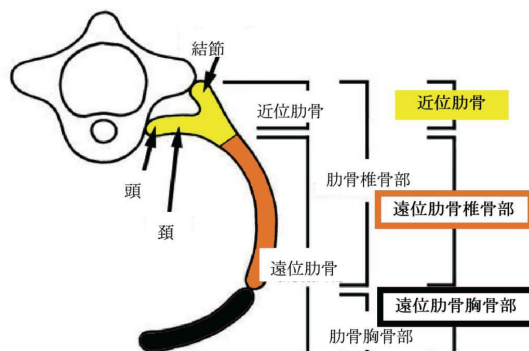
キーワード：体節 側板中胚葉 細胞間相互作用 in vitroモデル 接触阻害 軸骨格 部域化 肋骨

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物体幹の軸骨格は進化の過程で頭尾軸に沿って分化してきた。初めは胴体全体に存在した肋骨が哺乳類と鳥類では胸部に局限するようになったのである。その結果、頸部や腰部の運動の自由度が増し、また腹壁が柔軟になることにより、より活発な肺呼吸が可能になった。

軸骨格を構成する椎骨と肋骨は、いずれも、個体発生中に一時的に出現する分節組織である体節に由来する。各領域の体節はそれぞれ将来どのような形態の骨を形成するか、すでに決定されている。例えば胸部体節を頸部に移植すると、その移植された体節は頸部で肋骨を形成する(Kieny et al., 1972)。

一方、この領域特異的な形態形成は、その周囲組織にも依存している。我々は、ニワトリ胚を用いて、体節中胚葉とその周囲組織との相互作用を、両者の間に遮蔽物を挿入することで阻害しその影響を調べた。中軸組織と体節中胚葉との間を遮断すると近位肋骨(下図)が欠損した。これは脊索や底板、また Shh 分泌細胞の移植により回復することから近位肋骨形成には脊索や底板が必要であり、それは Shh を介していることが分かった。同様に表皮外胚葉と体節中胚葉との間を遮断すると遠位肋骨が欠損する。この分子機構については現在検討中である。側板中胚葉壁側板の内側縁を切開し、そこへ遮蔽物を一時的に挿入すると遠位肋骨胸部部が欠損した(Sudo et al., 2001)。以上の結果から、肋骨は周囲組織との関係により3つの部分に分けることが出来た(下図)(Aoyama et al., 2005)。なお、このうち近位肋骨と遠位肋骨椎骨部は軸周部 primaxial 遠位肋骨胸部部は軸外部 abaxial であり(Shearman & Burk, 2010, 総説)、正に側板中胚葉と体節中胚葉との関係の違いを示唆している。



我々は、この3つの部分の消長が領域化の機構ではないかと考えて研究を進めてきた。表皮外胚葉に依存して形成される遠位肋骨の欠損したものが頸部や腰仙部の軸骨格と考えられるのである。例えば、ニワトリ胚で、胸部に過剰指を形成させると遠位肋骨胸部部が形成されない(Liem & Aoyama, 2008)。また、腰仙部に胸部体節を移植すると、肋骨は形成されるが、正常のものと比較して短い。このキメラ胚の継時的観察から、我々は、体

節細胞の移動が側板中胚葉によって抑制されているらしいことを見いだした(松森, 修士論文, 2011)。胸部体節細胞は本来の位置にあれば、胸部側板中に侵入して肋骨を形成する。ところが、腰部に移植した胸部体節の細胞は、移動を開始して、腰部の側板中胚葉に出会ってもその中に侵入しない。

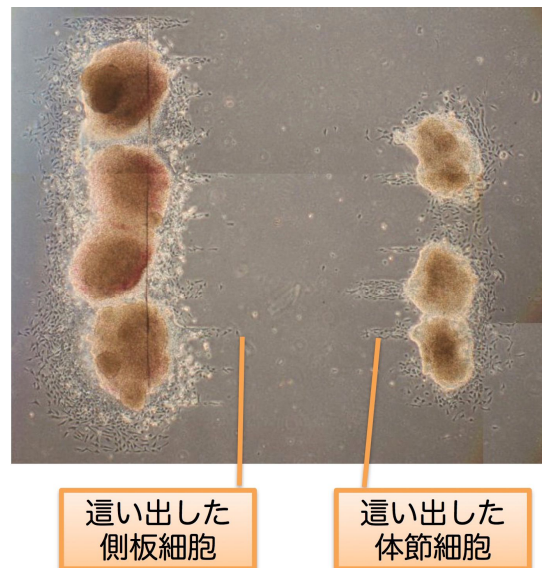
軸骨格の領域特異的的形成は、このように、その原基自身の持つ能力と、それを助長する、あるいは抑制する周囲組織との影響が相まって成立するものと言える。胸部体節細胞が腰部に侵入して腰部に肋骨を形成しようとしても、腰部の側板細胞がそれを阻止するように働くために、胸部と腰部との境界が形成されるのであろう。

2. 研究の目的

- (1) 肋骨形成の in vitro 実験系の確立: 胸部体節中胚葉と側板中胚葉との相互作用を in vitro で再現したい。すなわち、胸部体節中胚葉細胞が腰部側板中胚葉細胞に出会ったとき、運動の接触阻害が起きる、また進行方向が変化することを期待する。胸部側板中胚葉細胞と出会ったときにはそのような進行の停止が見られないはずである。
- (2) 体節細胞とその周囲組織との相互作用を担う分子機構の探究: 上の実験系が確立すれば、それを用いて、体節細胞と側板細胞との相互作用をになう分子機構を探索したい。

3. 研究の方法

- (1) 体節細胞と側板中胚葉細胞の in vitro 共培養



【一次元培養の顕微鏡写真: 左側に側板中胚葉, 右側に体節を置いた。幅 10 μ m の「道」の上を細胞が移動する。両側から移動してきた細胞が画面中央で衝突するように設置し、間歇撮影を行った。】

一次元培養（前ページの図を参照）：ニワトリ 2.5-3 日胚の胸部と腰部から、それぞれ体節と側板中胚葉壁側板を単離し、同じ部位のもの同士、異なった部位のもの同士を組み合わせて培養した。培養はサイトグラフ（大日本印刷）をもちいて、限られた基質の上で一次的に、また体節細胞と側板中胚葉細胞が向かい合って遊走するようにした。遊走している細胞が衝突し、さらにその後の挙動を定量的に解析するため間歇撮影を行った。

二次元培養：通常の培養用ペトリディッシュに体節と側板の小塊を置きそこから遊走してくる細胞集団がつくる形態を調べる。

- (2) 体節細胞とその周囲組織との相互作用を担う分子機構 1: 細胞間相互作用を担うとされている分子の発現パターンを、ニワトリ胚の各発生段階について、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより検索する。

それらの分子の発現が、実際に相互作用しているはずの組織で認められること、相互作用に関わる発生段階に特異的に発現すること、相互作用に関わる領域に特異的に発現することが候補となり得る条件である。

Eph-ephrin 系：ephrin とその受容体である Eph は、ニューロンの軸索ガイダンスや体節形成、血管形成において反発性の因子として働いている。これが、体節細胞と側板中胚葉壁側板の細胞に部域特異的、発生段階特異的に発現していれば、胸部体節と腰部体節の反発に関わっている可能性が出てくる。

Wnt シグナル伝達系：遠位肋骨の形成には表皮外胚葉が必要である。表皮外胚葉が Wnt6 を分泌していることが知られているが、これが表皮外胚葉-体節間相互作用を仲介するのであれば、体節細胞にはその受容体である *frizzled* が発現しているはずである。さらに、体節のどの派生物で発言しているか分かれば、表皮外胚葉の (Wnt の) 直接の標的が、椎板なのか、皮筋板なのか明らかになる。表皮外胚葉が直接骨格原基である椎板に働くのか、あるいは、筋の原基である皮筋板を介して働くのか、といった問題にも迫れる。体節細胞とその周囲組織との相互作用を担う分子機構 2: *frzb* は Wnt と結合して、Wnt が *frizzled* と結合するのを阻害する。*frzb* 遺伝子を導入した QT6 細胞を、ニワトリ 2 日胚の体節の近傍に移植し Wnt を阻

害した場合、表皮外胚葉と体節間を遮断した場合と同様に、遠位肋骨の欠損が見られるかどうかを検証する。もし遠位肋骨の欠損が見られた場合、表皮外胚葉からの Wnt が遠位肋骨形成に必要なことが分かる。

4. 研究成果

- (1) 体節細胞と側板中胚葉細胞の *in vitro* 共培養

体節細胞と側板中胚葉細胞との *in vitro* 衝突実験：一次元培養した体節細胞と側板中胚葉が衝突した前後に、それぞれの挙動がどう変化したかを調べた。胸部体節細胞は、腰部側板中胚葉細胞に接触すると、進行方向を変え、それまでとは逆の方向に進んだ。これは胚内で見られた、腰部に移植した胸部体節由来の細胞が腰部側板内に進入できなかったことを反映しているものと考えられる。一方、胸部体節細胞が胸部側板細胞と出会うと、胸部体節細胞は糸状突起を基質の隙間へ伸ばすが、側板細胞を押しよけることができず移動を停止した。しかし、時には側板細胞の横をすり抜けて前進を続けるものもいた。この組み合わせの培養は、正常胚の胸部で見られる、胸部体節細胞が側板細胞間に進入することを反映しているのである。

以上の細胞の挙動については定量的なデータをとっている。現在の値を元に数理モデルを構築しようとしている。今回は一次元モデルであったが、それをさらに発展させて二次元モデルを構築したい。二次元培養で見られるパターン：体節と側板中胚葉の小塊からはいだした細胞がコンフルエントになったとき、体節細胞集団と側板細胞集団との境界に特徴が見られた。胸部体節細胞集団と腰部側板細胞集団の境界では、境界線に沿って細胞が平行に配列した。一方、胸部体節と胸部側板の共培養ではそのような現象は見られなかった。この実験系と、その数理モデルを現在確立しようとしている。これが出来れば、細胞間相互作用をになう分子機構の検索が容易になる。すなわち、個々の細胞を追跡しなくても、集団としての挙動を観察するだけで、例えば阻害効果等が検定できるからである。

(2) 体節細胞とその周囲組織との相互作用を担う分子機構

Eph-ephrin 系の発現パターン：胸部体節細胞が側板中胚葉に進入し始める直前から肋骨の形態形成がほぼ完成するまでの期間にある，ニワトリ 2-7 日胚について，EPH-A1, A3, A4, A5, A6, A7, B1, B2, B3, B6, ephrin-A2, A5, A6, B1, B2 の発現パターンを調べた。しかし，体節細胞と側板中胚葉壁側板細胞に関しては，いずれも地域特異的，発生段階特異的な発現は見られなかった。体節-側板中胚葉間相互作用に Eph-ephrin 系は関わっていないようである。(Eph, ephrin 各遺伝子のプロンプは，東京女子医科大学生物学教室，石井泰雄博士の供与による。ここに謝意を表します。) Wnt シグナル伝達系：表皮外胚葉と体節中胚葉およびその派生物について，*Wnt6*, *frizzled7* の遺伝子を単離し，プロンプを作成した。ニワトリ 2 日胚についてそれらの遺伝子発現を調べた予備的な結果ではまだ期待する結果が得られていない。今後その他の Wnt および *frizzled* の遺伝子を単離しそれらの発現パターンを調べる予定である。Wnt シグナル伝達系の *in vivo* 阻害実験：*frzb* 発現 QT6 細胞を，ニワトリ 2 日胚の表皮外胚葉と体節中胚葉との間に移植したところ，7 日後，遠位肋骨の欠損を見た。しかし，遺伝子導入をしていない QT6 細胞を移植した対照群でも同様に遠位肋骨が欠損していた。細胞そのものが物理的に表皮外胚葉と体節中胚葉の相互作用を阻害していたのである。今後，表皮外胚葉，または体節中胚葉といった，胚の組織そのものに *frzb* を遺伝子導入してその効果を検討する予定である。肺内組織への遺伝子導入はエレクトロポレーションで行う。この技術については，我々の研究室で日常化しているので実現可能である。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kawamata, S., Aoyama, H., Kurose, T. (2015). Importance of a single observation of dissected cadavers for nursing students. *Structure and Function*, 14, 12-21. (査読有り)
2. Tani C¹, Funama Y, Fujioka C, Nakamura Y, Komoto D, Aoyama H, Awai K. (2014).

Radiation dose reduction at MDCT with iterative reconstruction for prenatal diagnosis of skeletal dysplasia: preliminary study using normal fetal specimens. *AJR Am J Roentgenol.* 203, 1249-1256. (査読有り)

[学会発表](計 11 件)

1. 加賀谷美幸, 青山裕彦, 現生・化石類人猿の下位肋骨形態パターンと椎式, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.3.29, 長崎市
2. 范海明, 坂本信之, 青山裕彦, 原条に由来する体節中胚葉の発生運命, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.3.29, 長崎市
3. 坂本信之, 青山裕彦, 胸部側板中胚葉壁側板の発生運命, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.3.29, 長崎市
4. 表原拓也, 南貴一, 万谷洋平, 朝克吉楽, 梅村ゆりあ, 西田美穂, 平野哲史, 青山裕彦, 吉岡秀文, 北川浩, 横山俊史, 星信彦, ニワトリの発生過程に特徴的な生殖腺の左右差, シンポジウム「生殖器の組織生物学」, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.3.29, 長崎市
5. 范海明, 坂本信之, 青山裕彦, 体節中胚葉の発生由来: 原条の標識実験, 日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学術集会, 2016.10.23, 岡山市
6. 朝克吉楽, 青山裕彦, 側板中胚葉に由来する腸管壁の発生, 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016.3.30, 郡山市
7. 松谷薫, 松森大輔, 青山裕彦, 腰部壁側板細胞は腰部体節細胞の移動を止めるのか?: ニワトリ中軸骨格の地域特異的形態形成に関する培養系モデル, 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016.3.29, 郡山市
8. 朝克吉楽, 青山裕彦, 側板中胚葉に由来する腸管壁の発生, 日本解剖学会第 70 回中国・四国支部学術集会, 2015.10.25, 松山市
9. 松谷薫, 青山裕彦, 胸部体節細胞の遊走は, 腰部側板中胚葉によって停止する: 培養系モデルで観るニワトリ中軸骨格形成における地域特異的形態形成, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会第 92 回日本生理学会大会合同大会, 2015.3.22, 神戸市
10. 朝克吉楽, 范海明, 青山裕彦, ニワトリ側板中胚葉の発生運命予定図~壁側板と臓側板, 日仏生物学会第 181 回例会, 2014.12.6, 京都市

11. 増田 佑, 志村 菜穂子, 坂本 信之, 青山 裕彦, ニワトリ胚とマウス胚の部域特異的中軸骨格形成の比較, 日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 2014.10.25, 広島市

〔図書〕(計 4 件)

1. 青山裕彦(2015)人体解剖学実習「人体の構造と機能 解剖生理学実習」(森田規之, 河田光博, 松田賢一, 編)栄養化学シリーズ NEXT, pp.52-55, 講談社, 東京
2. 青山裕彦(2015)旧項目改稿, 新項目執筆「南山堂医学大事典 第 20 版」南山堂, 東京
3. 青山裕彦(2015)器官系の構造と発生の概観 1. 体腔の器官系と発生, 2. 循環器系, 3. 呼吸器系, 4. 消化器系, 5. 泌尿器系, 6. 生殖器系(翻訳)「プロメテウス解剖学アトラス 胸部/腹部・骨盤部 第 2 版」(Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher, Markus Voll, Karl Wesker 著, 坂井建雄, 大谷修 監訳) pp.1-55 医学書院 東京
4. 青山裕彦(2015)第 22 章 女性生殖器系(翻訳)「ジュンケイラ 組織学 第 4 版」(Anthony L. Mescher 著, 坂井建雄, 川上速人 監訳) pp. 469-499 丸善株式会社 東京

〔その他〕

ホームページ等

https://www.hiroshima-u.ac.jp/system/files/18985/04_Anatomy%20and%20Developmental%20Biology_2016.pdf

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

加賀谷 美幸 (KAGAYA MIYUKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：50623790

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

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

(4)研究協力者

松谷 薫 (MATSUTANI KAORU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

松森 大輔 (MATSUMORI DAISUKE)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

桂-郷 由香理 (KATSURA-GOU YUKARI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

朝克吉楽 (CHAOKEJILE)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

范 海明 (FAN HAIMING)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

増田 佑 (MASUDA TASUKU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

内藤 美智子 (NAITOU MICHIKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

山合 諒 (YAMAAI MAKOTO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生