

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06822

研究課題名(和文) 比較・実験発生学からさぐる頸部の筋、神経系の進化

研究課題名(英文) Evolution of cervical muscular and nervous systems from the aspect of comparative and experimental developmental biology

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の胴体の筋は形態的に背側の軸上筋と腹側の軸下筋に大別され、軸下筋は更に発生的に四肢筋とそれ以外の軸下筋に分けられる。この筋分類に一致して、これらの筋群を支配する運動ニューロンの種類も異なっている。今回、肩の領域を中心に筋とそれを支配する運動ニューロンの発生を調べた結果、軸上、軸下領域の間にそれらの移行帯が存在することを確かめ、これに属する筋群をmidaxial musclesと命名した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脊椎動物の胴体の筋はそれを支配する神経の形態から背側部分と腹側部分の二つに分けられてきた。今回、神経で働く分子を調べ、この二つの間に移行帯が存在することを明らかにした。頭尾軸においても頭部の筋と体幹の筋の間には移行帯が存在することが近年明らかにされており、脊椎動物の体が背側か腹側か、頭部か体幹かといった二項対立的なものではなく、ある程度の勾配を持って変化している構造であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Trunk muscles in vertebrates have morphologically been divided into dorsal epaxial and ventral hypaxial muscles. The latter contains limb muscles and the other hypaxial muscles, which is based on their development. These three types of muscles are innervated by three types of motor neurons, respectively. We analyzed the development of shoulder muscles and their motor neurons, and found transitional muscles between the epaxial and hypaxial muscles, for which we coined the term “midaxial muscles”.

研究分野：実験発生学

キーワード：軸上 軸下 筋 神経 発生 解剖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の胴体の筋は形態に基づいて背側の軸上筋と腹側の軸下筋に分けられている。魚では胴体の頭尾軸に沿って結合組織の板(水平筋中隔)が走り、これが軸上筋と軸下筋を分ける境界となっている。水平筋中隔は筋の付着部であり、魚のように胴体をうねらせて前進するのに必要な構造である。しかし陸生の四足動物が進化し、前進運動の方法が胴体のうねりから四肢を用いたものに変化するにつれて、水平筋中隔は消失した。そこで水平筋中隔の代わりに筋を支配する脊髄神経の種類によって筋を分類する方法が用いられている。脊柱管を出た脊髄神経は背側へと向かう背枝と腹側へと向かう腹枝に分かれ、前者に支配される筋を軸上筋、後者に支配される筋を軸下筋と定義したのである。ところで筋の分類には筋の発生に基づいたものもある。四肢筋と中軸の筋では筋の発生様式が異なり、前者はその形成に発生期の四肢である肢芽が必要であるが、後者は不要である。なお四肢筋は腹枝で支配されるから、これらは軸下筋に分類される。これらの筋の分類に一致して、これらの筋を支配する神経細胞の種類が異なることが知られてきた。すなわち、軸上筋を支配する背枝はLhx3を発現するMMCニューロン、四肢筋を支配する神経はFoxp1を発現するLMCニューロン、四肢筋以外の軸下筋を支配する神経は両分子を発現せず特徴のないデフォルト状態の神経細胞であるHMCニューロンで構成される。以上のように筋の解剖学的、発生的分類と神経細胞の分類は一致しているとされてきたのである。

ところが菱形筋がこの例外とされてきた。この筋は肩甲骨と椎骨を結ぶ前肢の筋であり、腕神経叢によって支配される。従ってそのニューロンはFoxp1を発現するLMCニューロンであると期待されるのであるが、実際はLhx3を発現するMMCニューロンであった(Tsuchida et al., 1994)。この結果は、菱形筋が四肢筋ではなく、しかも軸上筋であることを示唆しており、従来の解剖、発生学的整合性を破壊するものである。本研究ではこの矛盾点を解明するため、肩領域を中心に、その筋、神経発生を調べた。

2. 研究の目的

- (1) 肩領域の筋は四肢筋なのか?(発生に肢芽が必要なのか?)
- (2) 肩領域の筋を支配する神経細胞はLMCニューロンなのか?
- (3) 前肢と後肢の間の筋はどのような神経細胞によって支配されているのか?

3. 研究の方法

目的(1)のため、ニワトリ胚の肢芽の形成を阻害した後、肩領域の筋の形成を観察した。
目的(2)、(3)のため、肩および前後肢の間の筋を支配する神経が発現する分子を調べた。

4. 研究成果

まずニワトリの肩の筋の構成を調べた。肩の筋は3層構造であり、表層に広背筋、胸筋、中層に後肩甲上腕筋-肩甲下筋、烏口上筋、深層に菱形筋、前鋸筋、胸骨烏口骨筋があった。表層、中層の筋は上腕骨を中軸骨格(脊柱、胸骨)または肩帯(肩甲骨、烏口骨)に繋いでいた。深層の筋は中軸骨格(脊柱、胸骨、肋骨)と肩帯を繋いでいた。

目的(1)のため、肢芽ができる前のニワトリ胚の前肢芽予定域の外胚葉を除去し肢芽の形成を阻害したところ、四肢筋の筋原基を示すLbx1の発現が見られずその形成が阻害されていた。発生を進めた胚では前肢がなく、肩の表層、中層の筋も形成されなかったが深層の筋は形成されていた。したがって筋発生からは表層、中層の筋は四肢筋、深層の筋は中軸筋であると考えられた。

続いて筋を支配する神経細胞の種類を明らかにするため、まず腕神経叢の形態を調べた。ニワトリ胚(品種:モミジ)の腕神経叢は第13, 14, 15頸神経および第1,2胸神経からできていた。これら分節的な脊髄神経は頭尾軸に癒合した後、屈筋、伸筋を支配するため背腹に二分した。この背腹二分点から中層の筋を支配する神経枝が分岐し、背腹二分点より遠位から表層筋の支配神経が分岐した。深層筋のうち菱形筋と前鋸筋の支配神経は二分点より近位から、胸骨烏口骨筋の支配神経は胸筋神経(表層筋)と烏口上神経(中層筋)の間から分岐していた。

神経の発現分子(Lhx3, Foxp1)を調べた所、表層筋、中層筋の支配神経はFoxp1を強発現しLhx3を発現しなかったため、これらの神経はLMCニューロン(四肢筋の支配神経)である。一方、深層筋の支配神経はFoxp1を発現しなかったため、これらは中軸筋の支配神経である。この神経発生の結果は上記の筋発生の結果と一致し、表層、中層の筋は四肢筋、深層の筋は中軸筋である。さらに菱形筋、前鋸筋、胸骨烏口骨筋を支配する運動ニューロンでのLhx3発現割合は $46.9 \pm 7.2\%$ (n=4), $54.3 \pm 4.4\%$ (n=3), $0 \pm 0\%$ (n=3)であり、菱形筋、前鋸筋の支配神経はMMCおよびHMCニューロン、胸骨烏口骨筋の支配神経はHMCニューロンであった。なお形態学的には菱形筋、前鋸筋は胸骨烏口骨筋と別グループとされており(Bolk, 1898; Eisler, 1912; Romer,

1922; Howell, 1936; Kato and Sato, 1984)、本研究の結果はこれら形態学的知見と一致した。また今回の結果から、腕神経叢の基部から分枝する神経枝(菱形筋、前鋸筋枝)は MMC, HMC ニューロン、遠位から分枝する神経枝(胸骨烏口骨筋枝)は HMC ニューロン、それらの中間から分枝する神経枝は LMC ニューロンであることが分かった。

Lhx3 は軸索を背側へと伸ばす転写因子であるが(Sharma et al., 2000)、腹枝である腕神経叢の枝(菱形筋枝および前鋸筋枝)でその発現が見られることは特異なものに見える。脊髄神経の基本形は分節性であり、腕神経叢は神経枝が吻合を作るという点で特殊である。そこで分節性を保持した神経として前肢と後肢に挟まれた胸神経での Lhx3 の発現を調べた。

第五胸神経は背枝と腹枝に二分した後で、腹枝はまず肋骨挙筋枝を分枝した。その後、腹枝は3分岐した。1本目は外肋間筋枝、二本目は外側枝で外肋間筋、外腹斜筋を支配、3本目は腹側枝で内肋間筋、costoplumonaris 筋を支配した。

これらの筋枝での Lhx3 の発現を調べた結果、腹側枝以外では Lhx3 を発現するニューロンが観察された。他の胸神経でも同様な結果となり、特に腹側枝(costosternalis, 腹直筋, 腹横筋を支配)は Lhx3 を発現していなかった。従って腹側枝は純粋な HMC ニューロンからなっているが、それより背側で分岐する腹枝の枝には HMC ニューロンの他に MMC ニューロンが含まれていることが分かった。

以上から菱形筋、前鋸筋、肋骨挙筋、外肋間筋、外腹斜筋を支配する神経は HMC ニューロンと MMC ニューロンの二重支配である。ところで比較解剖学的研究によればこれらの筋はかつて水平筋中隔があったと思われる領域に存在し(Nishi, 1938; 佐藤, 1968)、背枝と腹枝の二重支配を受ける(deWet et al., 1967; Sato, 1974; Fetcho, 1986; 佐藤 1968, 1971; 相澤と熊木, 1996)。さらにサメや幾つかの真骨魚類では背枝、腹枝の間に第三の枝があり、これは水平筋中隔に沿って伸びて中隔を覆う筋を支配する(Fetcho, 1987 の総説)。ゆえに軸上筋、軸下筋の境界は固有背筋と外側体壁筋の間にあるのではなく、それらの中間には MMC ニューロンと HMC ニューロンの二重支配を受ける移行帯があるのである。この移行帯を表現するため「midaxial muscles」という用語を提案した。この筋群には更に MMC ニューロンの支配を受けることが知られている頸長筋(Luxenhofer et al., 2014)や、形態的な観点から斜角筋(Koizumi, 2019; see also review by Nishi, 1938; Ihle et al., 1971)が入ると思われる。

最後に本研究により横隔膜の進化についての手がかりが得られた。横隔膜は哺乳類に特異的な構造でその進化的由来は謎であるが、大まかに二つの説がある。古典的な説では横隔膜が中軸筋から進化したと考えている(Eisler, 1912; Nishi, 1938; Ihle et al., 1971)。二つ目の仮説では横隔膜が前肢筋、特に肩甲下筋に由来したとする(Hirasawa and Kuratani, 2013)。

二つ目の説は哺乳類の進化過程で腕神経叢が尾側にシフトしたという仮定に基づくものであるが、これには二つの問題がある。第一に横隔膜の支配神経である横隔神経が肩甲下筋神経から進化したとする結論である。発生学的データによれば横隔神経は HMC ニューロンであるが(Rouso et al., 2008; Philippidou et al., 2012)、肩甲下筋神経は LMC ニューロンであり(本研究)、支配神経の性質が異なっている。第二にこの仮定は哺乳類に特異的な腕神経叢の神経枝である正中神経が橈骨神経から進化したとも結論している。しかし橈骨神経は前肢の伸筋を支配し、正中神経は前肢の(特に前腕の)屈筋を支配する神経であり、屈側の神経が伸側の神経から進化したとの結論は無理がある。

一方、古典的仮説の論拠の一つは横隔神経と鎖骨下筋神経との吻合(副横隔神経)の存在である。近年報告されたブタ胎児では横隔膜と横隔神経がなく、鎖骨下筋とその支配神経も同時に失なわれていた(Sekiya et al., 2020)。哺乳類の鎖骨下筋は他の羊膜類の胸骨烏口骨筋と相同であると考えられているが(Fürbringer, 1900; Miller, 1934; Nishi, 1938; Ribbing, 1938; Ihle et al., 1971; Diogo and Abdala, 2010)、本研究で示したように胸骨烏口骨筋神経は横隔神経と同様に HMC ニューロンで支配されており、これらの筋が発生学的に近い関係にあることを示唆している。よって横隔膜は四肢筋ではなく中軸筋から進化したと考えられる。

<引用文献>

- 相澤幸夫, 熊木克治 (1996) 胸神経後枝皮枝の起始と走行について, *解剖学雑誌*, 71, 195-210.
- Bolk, L. (1898) Die Segmentaldifferenzierung des menschlichen Rumpfes und seiner Extremitäten. Beiträge zur Anatomie und Morphogenese des menschlichen Körpers. II. *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch*, 26, 91-211.
- deWet, P.D., Fedde, M.R. and Kitchell, R.L. (1967) Innervation of the respiratory muscles of Gallus domesticus. *Journal of Morphology*, 123, 17-34.
- Diogo, R. and Abdala, V. (2010) Muscles of Vertebrates: *Comparative Anatomy, Evolution, Homologies and Development*. Boca Raton: CRC Press.
- Eisler, P. (1912) Die Muskeln des Stammes. In: Bardeleben, K. (Ed.) *Handbuch der Anatomie des Menschen, Band 2*. Jena: Gustav Fischer, pp. 1-662.
- Fetcho, J.R. (1986) The organization of the motoneurons innervating the axial musculature of vertebrates. II. Florida water snakes (*Nerodia fasciata pictiventris*). *Journal of Comparative Neurology*, 249, 551-563.

- Fetcho, J.R. (1987) A review of the organization and evolution of motoneurons innervating the axial musculature of vertebrates. *Brain Research*, 434, 243-280.
- Fürbringer, M. (1900) Zur vergleichenden Anatomie des Brustschulterapparates und der Schultermuskeln. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft*, 34, 215-718.
- Hirasawa, T. and Kuratani, S. (2013) A new scenario of the evolutionary derivation of the mammalian diaphragm from shoulder muscles. *Journal of Anatomy*, 222, 504-517.
- Howell, A.B. (1936) The phylogenetic arrangement of the muscular system. *Anatomical Record*, 66, 295-316.
- Ihle, J.E.W., vanKampen, P.N., Nierstrasz, H.F. and Versluys, J. (1971) *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere*. Berlin: Springer-Verlag.
- Kato, K. and Sato, T. (1984) Innervation of the levator scapulae, the serratus anterior, and the rhomboideus in crab-eating macaques and its morphological significance. *Anatomischer Anzeiger*, 157, 43-55.
- Koizumi, M. (2019) Two mammalian species in which the intercostal nerves innervate the serratus anterior or scalenus muscles together with the cervical nerves: an important clue to clarify the homology of cervico-thoracic trunk muscles in mammals. *Anatomical Science International*, 94, 295-306.
- Luxenhofer, G., Helmbrecht, M.S., Langhoff, J., Giusti, S.A., Refojo, D. and Huber, A.B. (2014) MicroRNA-9 promotes the switch from early-born to late-born motor neuron populations by regulating *Onecut* transcription factor expression. *Developmental Biology*, 386, 358-370.
- Miller, R.A. (1934) Comparative studies upon the morphology and distribution of the brachial plexus. *American Journal of Anatomy*, 54, 143-175.
- Nishi, S. (1938) Muskeln des Rumpfes. In: Bolk, L., Göppert, E., Kallius, E. and Lubosch, W. (Eds.), *Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere*. Bd 5. Berlin: Urban and Schwarzenberg, pp. 351-446.
- Philippidou, P., Walsh, C.M., Aubin, J., Jeannotte, L. and Dasen, J.S. (2012) Sustained Hox5 gene activity is required for respiratory motor neuron development. *Nature Neuroscience*, 15, 1636-1644.
- Ribbing, L. (1938) Die Muskeln und Nerven der Extremitäten. In: Bolk, L., Göppert, E., Kallius, E. and Lubosch, W. (Eds.) *Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere*. Bd 5. Berlin: Urban and Schwarzenberg, pp. 543-656.
- Romer, A.S. (1922) The locomotor apparatus of certain primitive and mammal-like reptiles. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 46, 517-606.
- Rousoo, D.L., Gaber, Z.B., Wellik, D., Morrisey, E.E. and Novitch, B.G. (2008) Coordinated actions of the forkhead protein *Foxp1* and Hox proteins in the columnar organization of spinal motor neurons. *Neuron*, 59, 226-240.
- 佐藤達夫 (1968) 肋骨拳筋と横突間筋の形態学的研究, 解剖学雑誌, 43, 305-325.
- 佐藤達夫 (1971), ヒトの肋骨拳筋の神経支配-脊柱傍筋の形態学補遺, 解剖学雑誌, 46, 172-192.
- Sato, T. (1974) On the rami intermedii of the spinal nerves and their equivalent offshoots. A contribution to classification of the trunk muscles. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 143, 143-157.
- Sekiya, S., Oota, H., Maruyama, Y., Sakaiharu, M. and Takashima, Y. (2020) Congenital diaphragmatic eventration with absent left phrenic nerve in the fetal pig. *Anatomical Science International*, 95, 143-152.
- Sharma, K., Leonard, A.E., Lettieri, K. and Pfaff, S.L. (2000) Genetic and epigenetic mechanisms contribute to motor neuron pathfinding. *Nature*, 406, 515-519.
- Tsuchida, T., Ensinii, M., Morton, S.B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T.M et al. (1994) Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*, 79, 957-970.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagashima H, Koga D, Kusumi S, Mukaigasa K, Yaginuma H, Ushiki T, Sato N	4. 巻 237
2. 論文標題 Novel concept for the epaxial/hypaxial boundary based on neuronal development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 427-438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/joa.13219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長島 寛, 佐藤 昇
2. 発表標題 前肢帯における、解剖学的および発生学的背腹境界について
3. 学会等名 日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Nagashima, Noboru Sato
2. 発表標題 Epaxial and Hypaxial Distinction from the Aspect of Neuronal Development
3. 学会等名 International Congress of Vertebrate Morphology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長島 寛, 佐藤 昇
2. 発表標題 神経発生から見えた、新たな軸上-軸下境界
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム16、背部の構成を再考する（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagashima H, Sato N
2. 発表標題 On the species-specific traits of cervical motor neurons in chicken
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究の成果をまとめた論文でJournal of Anatomy Best Paper Prize 2020を受賞した。

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