

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25610152

研究課題名(和文) 哺乳類横隔膜の進化的起源解明の突破口：遺伝子、細胞、ペルム紀～三畳紀化石の統合

研究課題名(英文) The evolutionary origin of the mammalian diaphragm: an integrative approach studying genes, cells and Permo-Triassic fossils

研究代表者

平沢 達矢 (Hirasawa, Tatsuya)

独立行政法人理化学研究所・倉谷形態進化研究室・研究員

研究者番号：60585793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：横隔膜は、哺乳類系統で独自に獲得された進化的新規形態であるが、その起源や初期進化については未解明のままであった。本研究では、基盤的単弓類をはじめとした化石骨格の調査とHox遺伝子発現パターンの観察を通じて、横隔膜は祖先動物の肩の筋から進化したという新しいシナリオの証拠を得た。また、胚発生における外側体壁の変形を解析し、羊膜類では心臓の位置が胸郭内部に移動する際に頸部レベルの外側体壁も同調して胸郭内部に引き込まれるが、哺乳類の横隔膜はこれを基盤として胸腔と腹腔を分ける構造として成立したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The diaphragm is a mammalian-specific evolutionary novelty, whose origin and early evolution has remained unclear. In this study, through investigations on the fossil record, in particular skeletons of basal synapsids, and on Hox gene expression patterns, I obtained evidence that the diaphragm evolved from a shoulder muscle of the ancestors. In addition, analyses on transformations of lateral body walls during embryonic development demonstrated that the lateral body wall at cervical levels later extends into the thorax along with the caudal transposition of the heart, and suggest that this infolding of the lateral body wall in the embryonic body provided the basis for the diaphragm separating the thoracic cavity from the abdominal cavity.

研究分野：古生物学

キーワード：進化 発生 化石 横隔膜 哺乳類 前肢筋 肩帯 羊膜類

1. 研究開始当初の背景

横隔膜は、胸腔と腹腔を分けるシート状の骨格筋であり、哺乳類系統のみで独自に進化した構造である。哺乳類では、ガス交換効率を高めたトレードオフとして肺のコンプライアンスが小さくなっているが、胸郭の変形運動に加えて横隔膜を動かすことで換気を可能としている。このように、横隔膜の獲得は高い代謝の維持を可能にする呼吸器系の進化にとって非常に重要なステップであったにもかかわらず、その進化的起源は未解明のままであった。横隔膜は進化的新規形態の代表的な例の1つであり、その進化的起源およびその初期進化を解明することは、生物進化の中でどのような過程で進化的新規形態が成立するのかについて重要な事例研究となる。

また、横隔膜は医学でも注目されてきた。ヒト新生児では3,000人に1人の割合で横隔膜が欠損する先天異常(先天性横隔膜ヘルニア)が現れる。この先天異常は生後の呼吸機能に重篤な影響を及ぼすため、おそらく多様に存在する原因について解明が待たれてきた。これまでの先天性横隔膜ヘルニアの研究はマウス等哺乳類を用いて進められてきたが、新たに進化的視点を導入し、祖先動物では横隔膜の発生は他のどの構造と連関して形成されてきたかを理解していくことは、先天性横隔膜ヘルニアの原因となる発生メカニズムや遺伝子の変異の解明を推進させることができると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 横隔膜がどこから進化したのか、(2) その際に変化した発生メカニズムは何なのかを解明していくことを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、古生物学的アプローチと発生的アプローチを並行して展開した。

古生物学的アプローチ

祖先動物から哺乳類へ至る系統で、横隔膜まわりの構造がどのような変化を経てきたのか、その形態進化を復元するため、アメリカ国立自然史博物館(ワシントンDC)に所蔵されるペルム紀単弓類オフィアコドン *Ophiacodon* 等の化石骨格について、骨の形態や筋の付着痕に注目して観察した。

また、得られたデータを系統図上で比較し、進化過程を復元した。

発生的アプローチ

現生哺乳類において、横隔膜の筋前駆細胞は頸部の体節から遊離したのち、胚発生の中で胸郭内部に移動し筋に分化することが知られている。ここでは、羊膜類の胚発生にお

ける体壁の変形に注目し、ニワトリ胚で頸部レベルの体壁が発生とともにどのように分布するようになるかを、ニワトリ-ウズラ間で側板中胚葉を交換移植したキメラを作製することで観察した。

また、横隔膜の筋前駆細胞が胚環境の中でどの位置情報をもとに遊離、移動するのか、そしてそれは他の羊膜類ではどの領域の位置情報に相当するのかを解明するため、主にマウスとニワトリにおいて *Hox* 遺伝子等をクローニング、*in situ* ハイブリダイゼーションで遺伝子発現パターンを観察し、種間比較を行った。

4. 研究成果

(I) 横隔膜は肩甲下筋の paramorph である

羊膜類において、腕神経叢の位置は肋骨の形態が頸椎型から胸椎型に変わる位置と関連している。この関係性を化石種に適用し、それをもとに祖先動物から哺乳類へ至る進化の中で腕神経叢の位置がどのように変化してきたかを復元したところ、現生哺乳類の横隔神経は祖先動物で肩甲下神経があった位置にあることが分かった。肩甲下神経は、肩帯骨格の内側に位置する肩甲下筋を支配する神経である。これらより、哺乳類に至る進化で、腕神経叢および前肢の位置が尾方へ移動した中、祖先動物の肩甲下筋は重複して横隔膜と(本来の)肩甲下筋に進化したのではないかと推測された。

ペルム紀から三畳紀に生息していた基盤的単弓類においても、肩甲下筋は肩帯骨格の内側に付着していたことが確認され、また、現生哺乳類と異なり基盤的単弓類では肩甲下筋が胸郭上口のレベルに位置していたと復元されることから、肩甲下筋が内側に張り出した移行段階の横隔膜を経て哺乳類に見られる横隔膜が成立したという初期進化が示唆された。

この横隔膜の進化的起源に関するシナリオは、化石記録を調べることで、現生種の比較だけでは認識できなかった肩帯の筋との相同性を見いだしたものであり、多角的な視点を重視する本研究の特色が活かされた成果と言える。

(II) 胚発生における横隔膜の移動

ニワトリ-ウズラ側板中胚葉交換移植キメラの実験により、鳥類においても、筋が発生する以前に頸部レベルに位置していた外側体壁は、発生とともに胸郭内部、心臓と肝臓の境界レベルにまで分布することが明らかとなった。ニワトリ胚 Hamburger & Hamilton (HH) ステージ 11~12 において、第 7~14 体節それぞれの遠位側にある側板中胚葉をウズラの同組織と交換移植し、HH ステージ 30 まで培養、固定して免疫染色を用いてウズラ細胞の分布を可視化したところ、深層にあるウズラ細胞は胸郭内部にまで移動していることが確かめられた(図1)。頸部レベルにあ

った外側体壁の細胞は、浅層では真皮に分化し、深層ではHHステージ30の時点で皮下結合組織を構成する。この深層部分の細胞の移動は、胚発生における心臓の尾方への移動と連動しているようであり、頸部頭側にあった心臓が胸郭内部へ移動する発生過程の中で、周囲の外側体壁細胞も胸郭内部に引き込まれる現象であると考えられる。

同様の細胞系譜解析はマウスでは技術的に困難だが、本研究では、横隔膜を含む腕神経叢の形態の変化を観察することで、頸部外側体壁が心臓の移動にともなって胸郭内部に位置することを推定することができた。同じように、スッポン胚において腕神経叢の形態を指標に外側体壁の変形を推定すると、心臓の移動に連動して肩帯の頭側部が胸郭レベルに位置するようになることが示唆された。

以上の実験、観察により、心臓が胸郭内部に位置する羊膜類では、胚発生における心臓の相対的位置変化により頸部外側体壁の一部は胸郭内部にまで分布するようになり、これが哺乳類系統で横隔膜を成立させる基盤となったと考えられた(図2)。

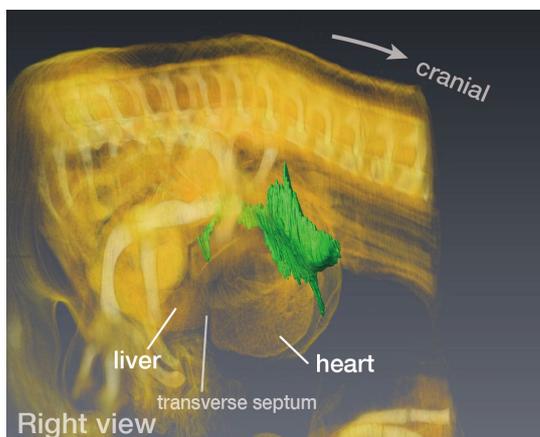


図1 ニワトリ-ウズラ側板中胚葉交換移植キメラの結果。第11体節レベルの側板中胚葉を交換移植し、組織切片免疫染色でウズラ細胞を可視化、コンピューター上で立体再構築した。移植した側板中胚葉に由来する細胞は緑色で示してある。この細胞集団の深層部は心臓と肝臓の境界レベルにまで達していることがわかる。

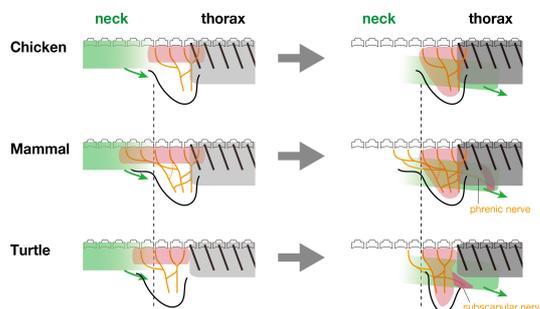


図2 胚発生における心臓の相対的位置変化と同調した頸部外側体壁(緑色)の変形。一部は胸郭(灰色)内部にまで分布する。

(III) 遺伝子発現パターンの種間比較

先行研究のデータをもとにすると、前後軸に沿った骨格筋の分布に対しては、体節よりも側板中胚葉の位置情報が重要な役割を果たしていると予想された。そこで、本研究では、マウス胚(E9.5-10.5)とニワトリ胚(HH19-24)の側板中胚葉におけるHox4-6の発現パターンを解析した。

結果、マウスではHoxa5とHoxc5が、横隔膜筋前駆細胞と前肢筋前駆細胞の頭側集団が移動する位置にわたって発現していることが分かり、これは、横隔膜が祖先動物の肩甲下筋から進化してきた中で共通の位置情報を残した結果ではないかと考えられた。種間比較をすると、ニワトリではHoxc5は前肢筋前駆細胞が移動する位置のみで強く発現していることから、哺乳類に至る系統で前肢筋が重複して横隔膜が進化した際にHoxc5の発現領域も重複した可能性がある。Hoxa4に関しては、ニワトリ胚では頸部～腰部レベルまで全域の側板中胚葉で発現しており、哺乳類系統における前肢筋の部分重複の痕跡は見られなかった。

本研究では、これまでもっぱら哺乳類で研究されてきたHox遺伝子発現パターンは、独自の進化として成立した部分もあることを明らかにし、特にHoxc5の発現領域は横隔膜の起源と関連して成立したものである可能性を見いだした。今後、さらに外群となる動物種との比較を行うことで、頸部～肩部レベルにおけるHox遺伝子による位置情報が哺乳類に至る系統でどのように変化したかをより詳細に解明できるはずである。

(まとめ)

本研究により、(1)横隔膜は祖先動物の肩甲下筋から進化したものであり、(2)前肢筋系である横隔膜筋前駆細胞が胸郭内部で心臓と肝臓を分ける位置に分布するのは、胚発生で心臓が胸郭内部に移動する過程と連動していることが明らかとなった。Hoxコードに起きた変化がこの進化の背景にあると予想され、今後、ゲノム編集技術を駆使して進化を部分的に巻き戻すことによりさらなる検証が可能だと期待される。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)
Hirasawa T, Kuratani S. Evolution of the vertebrate skeleton: morphology, embryology, and development. *Zoological Letters*, 査読有, 1 (2), 2015.
<http://dx.doi.org/10.1186/s40851-014-0007-7>

Nagashima H, Hirasawa T, Sugahara F, Takechi M, Usuda R, Sato N, Kuratani S.

Origin of the unique morphology of the shoulder girdle in turtles. *Journal of Anatomy*, 査読有, 223 (6), 2013, pp. 547-556.
<http://dx.doi.org/10.1111/joa.12116>

Hirasawa T, Nagashima H, Kuratani S. The endoskeletal origin of the turtle carapace. *Nature Communications*, 査読有, 4 (2107), 2013.
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3107>

Hirasawa T, Kuratani S. A new scenario of the evolutionary derivation of the mammalian diaphragm from shoulder muscles. *Journal of Anatomy*, 査読有, 222 (5), 2013, pp. 504-517.
<http://dx.doi.org/10.1111/joa.12037>

〔学会発表〕(計 8 件)

Hirasawa T, Fujimoto S, Kuratani S. Timing of skeletal muscle development during primary body wall transformation in amniotes. *CDB Symposium 2015*. 2015 年 3 月 25 日(神戸).

Böhmer C, Hirasawa T, Kuratani S, Fröbisch N. Development of the vertebral column in amphibians reveals mechanisms for evolutionary transition from water to land. *74th Annual Meeting, Society of Vertebrate Paleontology*. 2014 年 11 月 5 日 (Berlin, Germany).

Hirasawa T. Evolutionary origin of the diaphragm: a novelty acquired by homeotic duplication of shoulder muscles. *Symposium at the 16th Annual Meeting of the Society of Evolutionary Studies, Japan: Evolutionary Developmental Changes Behind Novel Adaptations*. 2014 年 8 月 22 日(大阪)

Hirasawa T. Position of hearts and their surrounding muscles: problems of evolutionary origins of the neck and the diaphragm. *1st International Meeting of Evolutionary Developmental Biology of Heart and Head Muscles*. 2014 年 5 月 12 日. Washington DC, USA.

平沢達矢, 倉谷滋. 横隔膜の進化的起源研究における新展開. 日本古生物学会第 163 回例会. 2014 年 1 月 25 日. (兵庫県三田市).

平沢達矢, 倉谷滋. 横隔膜の進化的起源. 日本進化学会第 15 回大会. 2013 年 8 月 30 日. 筑波大学(茨城県つくば市).

Nagashima H, Hirasawa T, Sugahara F,

Takechi M, Sato N, Kuratani S. Developmental plan of the amniote shoulder girdle and its evolutionary diversity. 10th International Congress of Vertebrate Morphology. 2013 年 7 月 9 日. Barcelona, Spain.

Hirasawa T, Kuratani S. The evolutionary derivation of the diaphragm from a shoulder muscle: a new hypothesis. 10th International Congress of Vertebrate Morphology. 2013 年 7 月 8 日. Barcelona, Spain.

〔その他〕
ホームページ等
<http://researchmap.jp/hirasawa>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平沢 達矢 (HIRASAWA, Tatsuya)
理化学研究所・倉谷形態進化研究室・研究員
研究者番号 : 60585793