

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790172  
 研究課題名（和文）  
 カメの比較発生解剖学から分かること ～肩帯、胸部形態を中心に～  
 研究課題名（英文）  
 Comparative embryological study of pectoral girdle and thorax in amniotes  
 研究代表者  
 長島 寛 (Nagashima Hiroshi)  
 独立行政法人理化学研究所・形態進化研究グループ・研究員  
 研究者番号：40435665

## 研究成果の概要（和文）：

カメ胚の甲稜の背側の真皮は背皮枝によって、腹側の真皮は外側皮枝によって支配されており、脊髄神経の支配領域はおおむねその支配する間葉の細胞系譜に従うものの、必ずしも厳密に一致するものではなかった。またスッポン、ニワトリ、ハツカネズミの肩帯の発生を比較した結果、カメの肩帯の前腹側突起が *Pax1* の制御下で肩甲骨のふくらみとして形成された肩峰であり、ほ乳類の棘上窩が、羊膜類の進化上、新しい形態であることが分かった。

## 研究成果の概要（英文）：

Dorsal and ventral dermis of carapacial ridge (CR) of turtle embryo were innervated by dorsal and lateral cutaneous nerve respectively, showing that there is less strict constraint between innervation pattern and cell lineage, because boundary between somite derived dermis and lateral plate derived dermis corresponds to ventral edge of the CR. In chicken, mouse and turtle, scapula anlage had rostral and caudal processes. The caudal process made a scapula blade in these animals. The rostral process gave rise to acromial process in chick and mouse and rostro-ventral process in turtle, suggesting that the process of turtle pectoral girdle is homologous to the acromion. This result was supported by expression pattern of transcriptional factor, three dimensional topological relationships with nerve and muscle anlage and morphology of the recently discovered oldest turtle. The scapula anlage of mouse had extra process in rostro-dorsal part from which suprascapular fossa developed, showing that the fossa is novel structure among amniotes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,000,000	300,000	1,300,000

研究分野：医歯薬学

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：比較発生解剖学, カメ, ニワトリ, 外側皮枝, 腹皮枝, 脊髄神経, 肩甲骨, 相同性

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、ヒトを含む羊膜類（は虫類、鳥類、ほ乳類の総称）の形態形成を研究するにあたっては、ハツカネズミやニワトリがモデル動物として用いられてきたが、これらは羊膜類としての基本的な形態のほかに、動物種に特異的な形態を持っている。よって、これらの動物の発生過程あるいは形態の間に違いが見つかった場合、どちらが種特異的なものであるのか不明である。時には両者がともに種特異的なものである場合もあるだろう。そこでこれらに新たな動物を加えて比較することで、羊膜類共通の発生機構と種特異的な発生過程の違いをより明確にすることができる上、これまでこれらの動物の持つ限界から見えてこなかった現象も浮かび上がらせることができるかと期待される。本研究では、胚が入手しやすいスッポン（*Pelodiscus sinensis*）を用いて、この課題に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

### (1) 皮神経支配の発生的背景

発生過程において結合組織は、その中でどのような構造がどのような形で作られるのかを決定することが近年分かってきており、その組成と他の組織との関係性を明らかにすることは重要な課題である。

動物の体幹部の結合組織は、発生学的に二種類の異なる由来を持っている。すなわち、体節と壁側中胚葉である。カメ、ニワトリ、ハツカネズミ、いずれの動物でも発生初期には、その体壁には凹みが見られ、それを基準として内-背側側の中軸部と外-腹側の外側体壁部分を形態的に明瞭に区別することができる。しかし発生が進むにつれて、ハツカネズミやニワトリではこの凹みがなくなり、形態的には中軸部と外側体壁部の境界を見分けることができない。しかし、発生初期には中軸部分の結合組織は体節から、外側体壁部分の結合組織は壁側中胚葉から作られており、さらに発生後期の真皮にも体節からできる内-背側部分と壁側中胚葉からできる外-腹側部分を見分けることができる。したがって、体節由来あるいは壁側中胚葉に由来する部分を逆に、それぞれ中軸部、外側体壁部と定義することができそうである。

カメの初期胚においては体壁の凹みのすぐ背側に膨らみができてくる。これは将来の甲羅の縁となる構造で甲稜と呼ばれている。そして発生が進んでも、この凹みは甲稜の下側の縁として羊膜類の胚の中では例外的に残り続ける。したがって、カメ胚では発生後期にあっても形態的に中軸部分と外側体壁

部分を見分けることができる。つまり、甲稜自体は体節細胞から作られ、甲稜の下側のラインから腹側は壁側中胚葉によって作られているのである。

ところで、発生中期のカメの脊髄皮神経の分布を観察すると、背側の真皮は背枝によって、腹側の真皮は腹枝によって行われているが、その境界が甲稜にあるように見える。すなわち、甲稜の脊髄皮神経支配は一見すると、背枝によってもっぱら行われ、腹枝は甲稜より腹側の真皮に分布しているように見えるのである。これは皮神経分布の背景に細胞系譜がある、つまり背枝は体節に由来する中軸の真皮を支配し、腹枝は壁側中胚葉に由来する外側体壁の真皮を支配していることを示唆している。

これはカメに限った話ではなく、人体解剖学においても皮膚分節（デルマトーム）が知られており、胸部背側に胸神経背側枝支配領域（背枝）と肋間神経外側皮枝支配領域（腹枝）の境界が見られる。これがカメにおける CR、すなわち二種の間葉の境界に相当するのではないか。本研究では脊髄皮神経の分布とそれが支配する間葉の細胞系譜が一致するのかどうかを確かめる。

### (2) 肩帯の形態形成の比較

羊膜類の形態の中でも、肩帯は動物種によってその変化が著しいものの一つである。特にカメの肩帯は三放射型をしており、他の動物の肩帯との相同性決定が未だ解決に至っていない。また真獣亜綱（有袋類と有胎盤類）の肩甲骨の前側の棚、棘上窩も進化的に新しい形質であるとの伝統的見解がある一方で、これを否定する見方もある。

本研究では様々な動物で肩帯部の発生過程を分子、形態、古生物学的に比較検討することによって、羊膜類に共通する形態と種特異的な形態を区別し、種特異的な形態の獲得、進化がどのようにして行われたのかを考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) 皮神経の発生基盤の解析

抗ニューロフィラメント抗体を用いて様々な発生段階にあるスッポン、ニワトリ胚の脊髄皮神経の形態を比較観察した。合わせて蛍光色素 DiI を用いて体節、壁側中胚葉細胞の分布を調べ、皮神経と細胞系譜の関係を考察した。

### (2) 肩帯の形態形成の比較

スッポン、ニワトリ、ハツカネズミの胚をさまざまな発生段階で固定し、ヘマトキシリン-エオジン-アルシアンブルー三重染色組織切片を作製した。続いて、各胚の肩帯領域の組織切片を顕微鏡観察して筋、神経、軟骨原基の同定を行い、そこから三次元再構成ソフトを用いて立体モデルを作製した。成体の解剖データを参考にしながら神経、筋、骨格原基の解剖学的同定を行ったのち、発生に伴うそれらの形態変化および各要素間の位置関

係の変化を種間比較した。その後、発生初期の胚を用いて各原基の位置と転写調節因子の発現部位の比較を三次元的に行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 皮神経支配の発生的背景

ニワトリ、スッポン、それぞれの種特異的形態が明らかとなる発生段階において、ホルマウント免疫組織化学染色によって胚の脊髄神経の形態を、頸部、胸腹部、尾部で比較した。その結果、頸部、尾部において両者は同様な形態を示していたが、胸腹部では、ニワトリでは、中軸と外側体壁の境界と推定される場所の近傍で筋板を貫く枝と筋板に沿って体壁中を腹側に伸びる枝があるものの、スッポンでは甲稜の近傍、すなわち中軸と外側体壁の境界の近傍で筋板を貫く枝しかなく、筋板に沿って腹側に伸びる枝が明らかに形成されなかった。筋板を貫く枝は外側皮枝、筋板に沿って伸びる枝は腹皮枝と思われるから、カメでは腹皮枝が形成されないと考えられる。その原因については調査中であるが、カメの肋骨が体壁に侵入しないことを考えると体壁において肋骨原基の移動および軸索誘導に関わる何らかのシグナル分子の発現が失われているのではないかと考えられる。特に、カメの壁側中胚葉では他の動物では胸部に発現が見られる転写因子 *Hoxc6* の発現が見られないという報告があり、これとの関連が今後の課題である。また発生後期の甲稜では、その背側の真皮が背皮枝によって、腹側の真皮が外側皮枝によって支配されていた。これは脊髄神経の支配領域がおおむねその支配する間葉の発生学的由来に従うものの、必ずしも厳密に一致するものではない事を示唆している。また人体解剖学では、ヒトの腹皮枝は腹直筋を貫き、その終枝は正中部の感覚神経となるが、ニワトリでは腹直筋を貫かず終枝は感覚神経とはならなかった。このことはヒト正中部の腹皮枝支配領域が哺乳類の系統で新たに作り出された領域であるか、トリの系統でこの領域が二次的に失われていることを示唆していると考えられた。これを明らかにするため、今後は、ワニ、ヤモリなど他の動物との比較が必要である。

##### (2) 肩帯の形態形成の比較

ハツカネズミ、ニワトリ、スッポンの初期胚で、軟骨形成に関わる転写調節因子 *Sox9* の発現を用いて肩帯の発生初期の形態を調べたところ、肩甲骨そのものの発生は動物間で大変良く保存されており、いずれの動物でも前方突起、後方突起から成っていたが、ハツカネズミでだけこれらに加えて、前方背側

にさらに突起の形成が見られた。後方突起からはどの動物でも肩甲骨本体が形成された。前方突起からは、ハツカネズミ、ニワトリでは、比較解剖学的に肩峰と名付けられた肩甲骨の突起が形成された。カメでも前方突起から肩帯の突起が作られたが、この構造が他の動物における肩峰と相同であるのかどうかを確かめるため、変異マウスで肩峰の欠失が報告されている転写調節因子 *Pax1* の発現を調べた。隣接切片において、*Pax1* の発現を調べたところ、三者の動物で前方突起とその周囲の間葉にその発現が見られた。またスッポンにおいては、前方突起と烏口骨の間を烏口上神経が肩帯の内側から外側に向けて通過し、肩帯外側にある烏口上筋を支配していた。これらの骨格、神経、筋の相対的位置関係は他の動物においても同様であった。以上から比較発生学的に、カメの肩帯の前腹側突起は他の動物の肩峰と相同であると考えられる。

化石カメ *Proganochelys* の肩帯は現生のカメのものとはほぼ同じ形をしているが、前腹側突起と烏口骨との間に烏口上神経の通過する coracoid foramen がある。2008年に中国から発見された最古の化石カメ *Odontochelys* の烏口骨の前縁にも coracoid foramen があったが、この動物の肩帯には前腹側突起がなかった。

よって *Odontochelys1* から *Proganochelys* の系統に至る過程で、*Pax1* をその形成過程に組み込むようにして前腹側突起が肩甲骨の膨らみ、すなわち肩峰として形成されたと考えられる。

またハツカネズミに特異的な前方背側突起からは、棘上窩が形成された。棘上窩は他の羊膜類には見られない構造であり、化石証拠からは、真獣亜綱の進化とともに肩甲骨が徐々に拡大してできた進化的に新しい構造であると考えられてきた一方で、有袋類の発生研究からはそれを否定する見解も出されてきた。本研究の結果は棘上窩が真獣亜綱に特異的な、進化的に新しい構造であることを支持していた。

#### 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1件)  
長島寛、武智正樹、菅原文昭、倉谷滋  
肩甲骨の形態進化についての発生学的考察  
Evolutionary developmental study on scapula morphology  
日本解剖学会第115回全国学術集会(口演)  
平成22年3月28日  
岩手県盛岡市岩手県民会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長島 寛 (Nagashima Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・形態進化研究グループ・研究員

研究者番号：40435665

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

武智正樹 (Takechi Masaki)

独立行政法人理化学研究所・形態進化研究グループ・研究員

研究者番号：10455355

菅原文昭 (Sugahara Fumiaki)

独立行政法人理化学研究所・形態進化研究グループ・ジュニア・リサーチ・アソシエイト  
神戸大学大学院、理学研究科、博士後期課程

倉谷滋 (Kuratani Shigeru)

独立行政法人理化学研究所・形態進化研究グループ・グループディレクター

研究者番号：00178089