

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20890228

研究課題名（和文） 哺乳類の横隔膜獲得プロセスに関する進化発生学的研究

研究課題名（英文） Evolutionary developmental biology studies on acquisition process of mammalian diaphragm.

研究代表者

辰巳 徳史（TATSUMI NORIFUMI）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60514528

研究成果の概要（和文）：本研究では横隔膜の獲得機構の解明をめざし、横隔膜を持つマウスと横隔膜を持たないニワトリを用いて比較を行った。その結果、マウス胚とニワトリ胚の体節細胞は共に横中隔に移動していた。しかしながら、マウス胚ではこの細胞は筋芽細胞に分化するのに対しニワトリ胚では分化していないことが明らかとなった。この結果より、哺乳類が進化の過程で体節細胞を筋細胞へと分化できる機構を独自に獲得した可能性があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to understand acquisition mechanism of the diaphragm by comparing mouse and chicken. First, I observed the migration pathway of somite derived cells in mouse and chicken embryo and found similar migration pathway in both species. However, differentiation to myoblast was observed only by the mouse embryo. As a result suggest the possibility that the mammalian originally acquired the differentiation mechanism of the myoblast from somite cell in the process of evolution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：横隔膜、体節、筋芽細胞、進化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類特異的組織である横隔膜は、原始横隔膜の形成とそこに体節由来の筋芽細胞

胞が移動することにより完成するとされているがその詳しい解析はほとんど行われていない。

(2) 鳥類も横隔膜と同様に胸腔と腹腔を隔てる2つの膜(肺横隔膜と斜隔膜)が存在している。これが哺乳類の横隔膜と相同組織であると考えられているが、膜を形成する細胞や筋細胞の有無などは明らかになっていない。

(3) 横隔膜研究は他の実験動物を使った解析が困難とされ、また発生期間が長く観察などが難しいと考えられている。

## 2. 研究の目的

ニワトリの解剖を行い観察した結果胸腔と腹腔を隔てる斜隔膜には筋細胞がないような像が観察された。このことから、膜を形成する細胞は哺乳類、鳥類であり変わらないが、哺乳類と鳥類の大きな違いは横隔膜に移動してくる体節由来の筋芽細胞である可能性が考えられた。そこで哺乳類と鳥類でどのようにこの体節細胞の移動が異なっているのかを明らかにすることで、哺乳類がどのように横隔膜を獲得するに至ったかを理解し、さらに相同な組織を見つけることで鳥類を使って横隔膜の研究をおこなうことができる可能性を探ることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 鳥類の胸腔と腹腔を隔てる2つの膜(斜隔膜と肺横隔膜)がどのように発生してくるかの詳細な組織観察を行うために、発生段階ごとの切片を作製しマウス胚との比較を行う。

(2) 体節の細胞がGFP蛍光タンパク質で標識された遺伝子組み換えマウスを作製し、各発生段階における体節細胞の観察を行う。当初の研究計画では*Hoxa5*遺伝子のプロモーターを用いて解析を行う予定であったが、予備実験の結果から目的の成果が得られない可能性が示されたため*Pax3*遺伝子発現部位が標識されたマウスを用いて解析を行った。

(3) ニワトリ胚の体節を細胞標識色素DiIで標識し、その後どこに移動するかの観察を行う。

(4) 上記の実験の発生段階における筋分化の状態をマーカー遺伝子や免疫組織化学により観察を行う。

(5) 哺乳類と鳥類の胸腔と腹腔を隔てる膜組織が相同なものであるのかを横隔膜の形成に関連することが報告されている遺伝子を用いて比較解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) ニワトリ胚、マウス胚の各発生段階の切片を作製し比較した結果、初期の発生段階では非常に類似した膜の形成を行うことが明らかとなった。成長するにつれ少しずつ両種に特異的な膜の形成を行うことが明らかとなった。

(2) *Pax3-Cre* マウスと *CAG-CAT-GFP* マウスとを掛け合わせて得られた胚子は E8.5 から体節が GFP により標識されていることが明らかとなった。更に E9.5、E10.5、E12.5、E14.5、E16.5 について胚子を得て観察を行った。その結果、体節由来の筋芽細胞は E10.5 胚から原始横隔膜の背側基部側に認められ、E14.5 胚では原始横隔膜全体で GFP の発現が認められた(図1)。

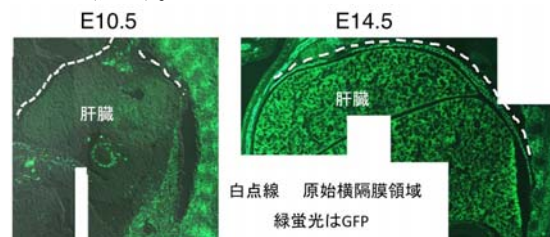


図1 横隔膜領域における Pax3-GFP の発現

更にこの結果から今まで考えられていた3-5体節から移動してくる筋芽細胞以外に8-12体節からの筋芽細胞が横隔膜形成に重要である可能性を示唆させる像が観察され、新たな知見が得られた。

(3) ニワトリ2日胚の体節にDiIで標識して、体節細胞の移動の追跡実験を行った。まず、哺乳類と鳥類は頸椎骨の数が異なるため(哺乳類は7個、ニワトリの場合は13個)3-7体節にそれぞれ標識を行った。その結果、6、7体節に標識した体節の細胞はマウス胚で観察されたようにニワトリの横隔膜相同組織とされている斜隔膜の領域に移動する様子が観察された(図2)。

この結果より、哺乳類と同等の横隔膜が無いとされるニワトリ胚にも保存されている発生機構があることが示唆された。

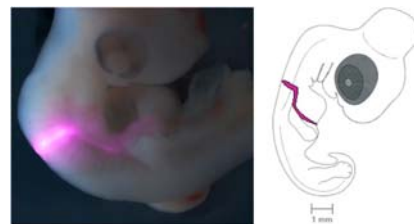


図2 DiI標識したニワトリ胚

(4) ニワトリ胚で体節細胞が斜隔膜に移動していた。そこでニワトリ胚ではこの細胞が筋細胞の前駆細胞である筋芽細胞に分化しているのかを *MyoD* 遺伝子の発現観察を行った。その結果マウス胚では横隔膜領域で *MyoD* 遺伝子の発現 (図3 中矢印部の青色部分) が見られるのに対して、ニワトリ胚では *MyoD* 遺伝子の発現を観察することができなかった

(図3)。

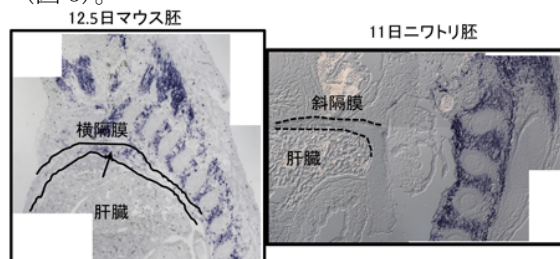


図3 マウス胚とニワトリ胚の *MyoD* の発現

この結果から、体節の移動パターンはマウス胚、ニワトリ胚共に類似していたが、体節細胞が筋芽細胞へと分化する機構が両種間で異なっている可能性が示唆された

(5) 体節細胞の分化能に違いがあることが明らかになったが、胸腔と腹腔を隔てる膜組織が相同であるかは明らかになっていない。そこで、横隔膜の形成に関連する遺伝子群 (*Wt1*, *Raldh2*, *Gata4*, *Slit3*) を用いて、マウス胚とニワトリ胚で比較を行った。

その結果、発生初期では両種間で相同とされる細胞群でそれら遺伝子の発現が確認されたことから、膜の形成に関与する細胞や遺伝子には哺乳類と鳥類とで共通性があることが明らかとなった。

(6) 今回の実験の総括  
今回の実験結果より、

①哺乳類に特異的である横隔膜は体節細胞が進化の過程で筋細胞へと分化できる能力を手に入れたことで獲得された可能性が考えられた。この変化はゲノムの変化に現れていると考えられるため、哺乳類特異的なゲノム進化を知る上でも非常に重要な知見となった。

②膜組織を形成する細胞群が共通していたことから、膜組織に関連した横隔膜の研究はニワトリ胚を用いても行える可能性が考えられた。これにより、先天性疾患である横隔膜ヘルニアの原因遺伝子を探すのが容易になる可能性が考えられた。

③学会等の発表では非常にユニークで有用な研究であることが評価され、海外のいくつ

かの研究室から問い合わせがあった。このことから、本研究は世界的にも非常にインパクトのある研究であると言える。

## 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4件)

① Norifumi Tatsumi, Masataka Okabe, An approach for analysis of acquisition mechanism of diaphragm、第32回日本分子生物学会年会横浜、2009年12月9-12日、パシフィコ横浜

② Norifumi Tatsumi, Masataka Okabe, Comparison of diaphragm development between mouse and chicken embryo、16th International Society of Developmental Biologists Congress, 2009、2009年9月6-11日、Edinburgh international conference center Scotland, UK

③ 辰巳徳史、岡部正隆、横隔膜発生に関連した組織群を特定するためのマーカー遺伝子解析、Gene marker analysis to identify tissues related to diaphragm development、第27回日本ヒト細胞学会、2009年8月22-23日、東京慈恵会医科大学 大学1館

④ Norifumi Tatsumi, Masataka Okabe, Comparative developmental anatomy of the diaphragm in mouse and chick embryo、マウス胚とニワトリ胚を用いた横隔膜発生の比較解析、第42回日本発生生物学会、2009年5月28-31日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辰巳 徳史 (TATSUMI NORIFUMI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60514528