

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790196

研究課題名（和文）

頸は頭か胴体か？～発生、進化から頸部の解剖学的理解を求めて～

研究課題名（英文）

Anatomical characteristics of neck analyzed through development of tongue muscle

研究代表者

長島 寛 (NAGASHIMA HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40435665

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の体は頭部と体幹からなるが、その移行部にある頸部の実体を捉えるため、舌筋の発生をさまざまな動物群で比較、観察した。全ての脊椎動物で舌筋群は体節に発して咽頭弓背側にある頸部神経堤細胞の中で筋分化することが推察され、舌筋群は頭部と体幹部の素材を組み合わせられてきていることが分かった。しかしながらサメは中でも筋分化に関して特殊化が見られ、決して原始的発生プログラムを保持した動物ではないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Vertebrate body is mainly composed of head and trunk, which are combined with neck. To investigate the anatomical characteristics of neck, development of neck region, especially tongue muscles, was compared between various vertebrates. In agnathan, lamprey, anlage of hypobranchial muscle, homologous muscle to tongue muscles in gnathostome, developed behind and under pharyngeal arches. By comparing cephalic neural crest distribution and the anlage, undifferentiated muscle progenitor cells of the tongue muscles appear to develop in the cephalic neural crest just behind the arches. These phenomena were also observed in amniote embryos and confirmed by making chicken-quail chimera in which cephalic neural crest was transplanted. These results indicate that tongue muscles primordium originates from somites and migrates behind and under the arches as undifferentiated scattered cells and differentiates in the cephalic neural crest. In shark, however, the anlage was already differentiated to muscle cells and migrate behind the arches as several segmented streams of cells. This observation indicates that muscle development was secondarily changed in the lineage leading to shark in its evolution and development of fin muscle in shark also does not always shows ancestral state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：比較発生学、比較解剖学

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：脊椎動物、ボディプラン、舌筋群、頸部

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の体は頭部と体幹からできており、これらはそれぞれ異なった発生学的、解剖学的、文脈で成り立っている。すなわち頭部では腹側で複数の咽頭弓が分節リズムを刻み、頭部神経堤細胞が結合組織を作り、その中に頭部神経堤細胞由来の鰓弓骨格（顎の骨、舌骨など）があって、それを頭部中胚葉由来の筋がつないでいる。これら鰓弓筋は特殊臓性運動ニューロンによって支配されている。一方、体幹ではその背側で体節が分節リズムを刻み、結合組織は中胚葉に由来し、この中にまた中胚葉由来の骨格と筋があり、この筋は体性運動ニューロンによって支配されている。そしてこれら頭部と体幹の中間にあるのが頸部である。これまで、頸部には頭部的性質と体幹的性質があることは分かっていたが、それがどのようにできているのかは不明であった。特に様々な動物群を用いた比較解析は頸部の進化的成立を考察する上で必須であるが、これまでなされてこなかった。

2. 研究の目的

頸部は頭部と体幹の移行部分であるが、ここにあつて頭部と体幹を結ぶのが僧帽筋群と舌筋群である。僧帽筋群は近年その筋原基のほとんどが頭部に属することが示唆されたため、本研究はこれらのうち舌筋群の発生に着目した。舌筋群はその頭側端は舌として頭部に位置し、さらに尾側端は肩帯にまで伸びている。このように頭部と体幹の両方に位置しながら、その神経支配は脊髄の体性運動ニューロンによって行われている解剖学的には純粋に体幹に属する筋群である。様々な動物群でこの筋群がどのように頭部と体幹部に発生するのかを明らかにし、頸部の進化的成立の一端を解明する。

3. 研究の方法

対鰓や顎のない原始的脊椎動物であるヤツメウナギや、これらを持っている顎口類の中で最も原始的な動物であるサメ、さらに進化した羊膜類を用いて、舌筋群の発生を比較観察した。

ヤツメウナギは新潟県村上市の三面川から春に採集した成体を用いて人工授精によって受精卵を得た。受精卵は低温インキュベーターで適当な発生段階まで発生を進行させ、4%パラホルムアルデヒド (PFA) あるいは Serra の固定液で常温、一昼夜固定し、メタノール系列で脱水し、 -30°C に保存した。

発生段階はスナヤツメウナギの発生段階表 (Fujimoto and Takaoka; 1961) に従った。

サメは新潟市水族館マリニア日本海のご協力を得て、トラザメの卵を供与頂き、適当な発生ステージになるまで低温インキュベーターで孵卵し、PFA または Serra の固定液で固定し解析に供した。発生段階は、Ballard, 1993 に従った。

羊膜類ではニワトリを用いた。ニワトリ-ウズラ体節交換、頭部神経堤細胞交換キメラを作製し、頭部神経堤の分布と舌筋群の発生過程を詳細に解析した。

4. 研究成果

ヤツメウナギには対鰓および顎がまだないが、舌筋群と相同な鰓下筋群がある。この発生を観察するため、muscle precursor に発現する遺伝子である Pax3 の発現を観察したところ、背側の体節から咽頭弓の後縁を回って、咽頭底に至る細胞群が確認された。この細胞群の組織構造を確かめるため、パラフィン切片を作製し、隣接切片で Pax3 の発現とヘマトキシリン-エオジン染色による組織観察を行ったところ、これら鰓下筋原基はばらばらな細胞が頭部の間葉中を移動していることが分かった。この細胞の移動ルートは既報から頭部神経堤細胞が位置する場所であることが分かっているから、ヤツメウナギの鰓下筋は頭部神経堤細胞の中を移動して筋形成が行われることが分かった。

一方で、ニワトリの舌筋群の発生を見るため、まず PFA 固定した Hamburger-Hamilton ステージ 17 (HH ステージ 17) のニワトリ胚で Pax3 や移動性の筋原基に特異的に発現する Lbx1 の遺伝子発現をホールマウント In situ ハイブリダイゼーションを用いて観察したところ、これらのシグナルを発する細胞は、体節腹側端から咽頭弓後縁を前方にまわって、咽頭底に達していた。これらの細胞では筋分化関連遺伝子 (Myogenic regulatory factors: MRFs) が発現していなかったから、この舌筋原基はまだ筋分化を開始していない筋原基であった。

この舌筋原基の移動ルートをさらに詳細に確認するため、10 体節期のニワトリ初期胚に、同じ発生段階のウズラ初期胚の神経管背側の領域を交換移植した。孵卵一日後、Hamburger-Hamilton ステージ 17 (HH ステージ) で固定し抗ウズラ抗体でホールマウント免疫組織化学染色を行い、ウズラ細胞の分布を観察した。その結果、第一体節、第二体節の脇の背側神経管領域を交換した場合に、間葉状のウズラ細胞、すなわち頭部神経堤細胞が咽頭弓後縁を回り込むように分布しており、上述の筋原基の移動ルートと重なった分

布を示した。これらの筋原基の移動ルートの詳細に解析するため、ニワトリ-ウズラ頭部神経堤交換キメラを作成し、隣接する組織切片でウズラ細胞の分布と、移動性筋原基の分布を調べ、それらを三次元復元したところ、移動性の筋原基は神経堤細胞で満たされた咽頭弓後縁の領域を選択的に移動していることが分かった。このような舌筋群の形成様式はスッポンやマウスにも見られることから、羊膜類に共通した発生メカニズムであると考えられた。

以上から、脊椎動物の舌筋群はPax3やLbx1を発現する未分化な筋原基が咽頭弓の後縁、頭部神経堤細胞の中を、ばらばらな細胞として移動して形成されることが分かった。

ところで、サメは対鰭や顎を持つ動物系統上、現生の最も原始的な動物であり、原始的な形態、発生過程を留めた動物として扱われてきた。この動物の舌筋の発生を確かめるため胚の観察を行った。まず固定した胚をホルマウントで観察したところ、明らかに背側の体節から、帯状かつ分節状の構造が、咽頭弓の後縁を回って咽頭底へと伸びている様子が見られた。矢状切片を作製し、その組織構造を観察すると、この舌筋原基では上皮構造こそ見られないものの、筋節と思われる密に凝集した細胞群が分節状の構造を作っている様子が見られた。そこで遺伝子や分子の発現を確かめたところ、この細胞群でMRFsの発現が見られ、確かに筋分化を開始している筋節であることが確認された。

ところで、対鰭あるいは四肢の筋の進化については、これまでサメの対鰭の観察から仮説が組み立てられてきた。つまり、対鰭の進化の初期では、筋節の伸長したものから鰭の筋ができ、その後の進化段階、条鰭類と肉鰭類に分かれる前の段階で、筋節型の筋分化から、未分化でばらばらな細胞群（移動性筋原基）が鰭の原基に侵入し、そこで筋分化を行うようになったと考えられて来たのである。しかし、ヤツメウナギや羊膜類の舌筋は移動性筋原基から作られるのに対して、これらの動物の進化的中間段階に位置するサメでは移動性筋原基ではなく筋節の伸長として形成されていた。この結果は、サメの舌筋群の形成方式が、決して原始的なのではなく、サメに固有なものに変化してしまっている可能性を示している。よって、サメの鰭の筋肉の発生方式もまた原始的ではない可能性が高いのである。

以上から全ての脊椎動物で舌筋群は体節に発して頭部神経堤細胞の中で筋分化することが推察され、舌筋群は頭部と体幹部の素材を組み合わせてできていることが分かった。またサメは中でも筋分化に関して特殊化が見られ、決して原始的発生プログラムを保持した動物ではないことが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計3件: 査読有)

- (1) Nagashima, H., Kuraku, S., Uchida, K., Kawashima-Ohya, Y., Narita, Y. and Kuratani, S. (2012) Body plan of turtles: an anatomical, developmental and evolutionary perspective. *Anat. Sci. Int.* 87: 1-13.
- (2) Kawashima-Ohya, Y., Narita, Y., Nagashima, H., Usuda, R. and Kuratani, S. (2011) Hepatocyte growth factor is a crucial factor for development of the carapace in turtles. *Evol. Dev.* 13: 260-268.
- (3) Kuratani, S., Kuraku, S. and Nagashima, H. (2011) Evolutionary developmental perspective for the origin of the turtles: the folding theory for the shell based on the developmental nature of the carapacial ridge. *Evol. Dev.* 13: 1-14.

[学会発表] (計4件)

- (1) 長島 寛
「カメのユニークな形態の比較発生学的解析」
第117回日本解剖学会総会・全国学術集会
2012年3月28日
山梨大学
- (2) Nagashima, H.
“Developmental Bases for Morphological Diversity of Amniote Pectoral Girdle”
The 2011 Annual Meeting of the Society for Molecular Biology & Evolution
Symposium 14: Current problems in vertebrate evolutionary development
2011年7月30日
Kyoto University, Kyoto, Japan
- (3) 長島 寛
「カメのボディプランについての比較解剖学的、比較発生学的解析」
第116回日本解剖学会総会・全国学術集会
2011年3月29日
パシフィコ横浜 (誌上開催)

- (4) Nagashima, H., Kuraku, S. and Kuratani, S.
“Turtle evolution by folding of lateral body wall”
9th International Congress of Vertebrate Morphology
Symposium; Evolution and development in the lateral plate mesoderm
2010年7月27日
Conrad Hotel & Spa, Punta del Este, Uruguay

〔図書〕（計2件：査読有）

- (1) Kuratani, S. and Nagashima, H. (2012, in press) Developmental basis for innovative evolution of the turtle shell. In R. J. Asher and J. Müller (ed), “From Clone to Bone: the Synergy of Morphological and Molecular Tools in Paleobiology”. Cambridge University Press, Cambridge.
- (2) Nagashima, H., Kuraku, S., Uchida, K., Kawashima-Ohya, Y., Narita, Y. and Kuratani, S. (2012, in press) Origin of the turtle body plan - The folding theory to illustrate turtle-specific developmental repatterning. In D. B. Brinkman, P. A. Holroyd, and J. D. Gardner (Eds.), “Morphology and Evolution of Turtles: Origin and Early Diversification”. Springer, Dordrecht.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長島 寛 (NAGASHIMA HIROSHI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40435665

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし