

胸部特異的肋骨形成における 組織間相互作用とその分子機構

課題番号 14370006

平成 14 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成 19 年 9 月
研究代表者 青山裕彦
広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

目次

はしがき	-----	05
研究組織	-----	07
交付決定額	-----	07
研究発表	-----	07
研究成果	-----	11
1. 肋骨形成における発生的 3 区画	-----	11
2. 遠位肋骨形成と体節分化	-----	14
3. 体壁筋の部域特異的形態形成～腹壁筋の発生的分節性	-----	17
(1) 体節の発生運命	-----	17
(2) 腹壁筋の神経支配	-----	20
4. 四肢形成と肋骨形成	-----	21
5. 中軸骨格原基の部域特異性の決定	-----	23
おわりに	-----	25
付録	-----	27
発表論文および発表予定論文	-----	29

はしがき

脊椎動物の名の由来にもなっている椎骨は肋骨とともに中軸骨格を形成する。この中軸骨格は、動物の体制（ボディプラン）が、個体発生上、あるいは系統発生上どのようにして形成されてきたかを研究するための恰好の材料である。それは、一個一個よく似た形のホネを単位としながらも、体の領域に応じて少しずつ異なった各領域特有の形を取ることによってその動物に特徴ある体制をもたらして折り、その結果、多様な形態の動物が存在するのである。例えば、は虫類のヘビでは体全体に肋骨があるが、哺乳類や鳥類では胸部にのみ肋骨が限局されている。本研究の目的は、進化の過程で生み出されてきた中軸骨格のこのような領域化が、個体発生においてどのようにして実現されているのか、その機構は何かを探ることにある。

個体発生における椎骨および肋骨の起源は、体節という胚発生の途上で初めて現れる分節的な組織である。これは、将来脳や脊髄を形成する神経管のすぐ両側に、球状の細胞塊の連なりとして出現する。体節は、頸部から尾部まで、体の領域を問わず一見同じ発生過程を経て中軸骨格の形成にいたるように見える。ところがそれに由来するホネの形はそれぞれ領域に応じて異なっている。この領域による違いはどうやって生み出されるのか？我々は体節から中軸骨格への発生機構を、とくに肋骨形成に注目して研究してきている。肋骨は中軸骨格の中でもきわめて大きな要素であり、それ故、実験の結果を形態的に検定することが比較的容易であるという、実験系としての有利性が高い。のみならず、系統発生の過程における肋骨の消長がすなわち形態の多様性、それに伴う運動機能の多様性を生み出してきたという、脊椎動物の進化を考える上でも非常に重要な構造のひとつであり、きわめて興味深い研究対象である。

本研究は、胸部体節のみが他の領域の体節と異なり、肋骨を形成することについて、その機構を明らかにしようとした。研究はニワトリ胚およびウズラ胚を用い、発生中の胚を卵殻内で操作する実験発生学的手法を中心として行った。

肋骨が発生上3つの区画から成っていることが明らかになったのは重要である。これは体節とその周囲組織との相互作用を調べる中で、椎骨と結合している短い部分（近位肋骨）は神経管の底板や脊索に、その遠位にある長い部分（遠位肋骨）は表皮外胚葉に依存して発生すること、遠位肋骨はさらに壁側板に進入する部分（遠位肋骨胸骨部）としない部分（遠位肋骨椎骨部）の2区画に分けられることを今回明らかにした。これは近年 Burk らにより提唱された abaxial, primaxial 区画にそれぞれ対応するものであり、肋骨のみならず、胚の区画というより一般的な問題へと通ずるものである。また、領域による肋骨の有無はおそらく遠位肋骨の大小の問題であり、従って表皮外胚葉と体節との相互作用に着目すべきであることがわかったのである。この相互作用を物理的に阻害することによる各種遺伝子発現の消長を調べ始めており、今後、肋骨形成の分子機構にせまることを目指すものである。

中軸骨格の領域化の問題は、実は体壁筋の領域化の問題でもある。体壁筋は胸部では肋骨とともに体壁を形成するが、腹部では肋骨を伴わず筋のみが体壁の要素である。胸部の筋と腹部の筋とにどのような発生的違いがあるのか、さらに体壁筋の違いが逆に骨格形成に影響することはないかを検討した。移植実験の結果は腹壁の筋はほぼ第27体節のみからできることを示した。その他の腰部体節は、肋骨

のみならず、体壁筋も形成しない。言い換えれば、胸部体節は側方への伸長・移動がみられるのに対し腰部体節のほとんどは正中付近にとどまるのである。腹壁は隣接部位から代償的に形成されており、胸部と腹部の差は肋骨の有無ではなく体壁の有無ともいえよう。さらに四肢形成領域の側板中胚葉を胸部に移植することによって胸部に四肢形成を誘導すると、近位肋骨と遠位肋骨椎骨部はほぼ正常に形成されるのに対し、遠位肋骨胸骨部とそれに付随する筋が形成されなかった。体壁の遠位部である abaxial 区画については、体壁と四肢が相補的に形成されるのである。このことは、頸部や腰部では体壁が形成されずに四肢が形成されることと関係があるのかも知れない。

ところで、腹壁筋の支配神経を成体で調べてみると、その筋が由来する体節位より上位の胸神経であった。筋の発生由来と支配神経の由来する分節が異なっており、従来、先験的にいわれるように支配神経が筋の発生由来を示すというのは必ずしも正しくないことがわかった。筋の特異的神経支配の成立過程についても、より詳細な検討が必要となった。

このような、頭尾軸に沿った部域特異性の成立がいつ決まってくるのだろうか？ これについても移植実験と組織培養実験を行って研究してきた。中軸骨格原基の部域特異性は、体節形成の最も初期、原始線条から陥入する直前に、すでに決定されているようである。部位特異的な *Hox* 遺伝子群の発現、形態形成能はそのころから実験操作を加えても変更できなくなってしまう。原始線条形成によって 3 胚葉が形成されるのであるから、原始線条期に *Hox* 遺伝子群の発現、形態形成能が決定されると言うことは中軸骨格のみならず、脊椎動物の体全体の体制がここで決定されると言うことを示唆している。

以上、我々は個体発生について胸部と腹部（腰部）体壁の部域化機構の研究に取り組んできたが、最後に系統発生上、胸部と腹部（腰部）体壁が形成されてきた機構についても仮説を提唱した。それは四肢の発達とともに体壁の構成要素が四肢の形成に使われるようになりその結果頸部からは体壁要素がなくなり腹部の体壁要素は隣接する胸部もしくは腰部の最頭側部から補充されたとするものである。

このように、中軸骨格の個体発生研究は、それをもとに系統発生、脊椎動物の多様性の成立機構にまで発展させることのできるものであり、今後、その分子的機構まで含めて研究を展開していくことが期待される。

研究組織

- 研究代表者： 青山裕彦 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授)
研究分担者： 坂本信之 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手)
研究分担者： 松井浩二 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	6,800,000	0	6,800,000
平成 15 年度	3,200,000	0	3,200,000
平成 16 年度	3,100,000	0	3,100,000
平成 17 年度	700,000	0	700,000
総 計	13,800,000	0	13,800,000

研究発表

(1) 学会誌等

[原著]

1. Hirao, A., Aoyama, H.
Somite development without influence of the surface ectoderm in the chick embryo: The compartments of a somite responsible for distal rib development.
Development Growth Differentiation, 46, 351-362, 2004.
2. Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Koseki, H.
Three developmental compartments involved in rib formation.
International Journal of Developmental Biology 49, 325-333, 2005

[総説]

1. 青山裕彦
ニフトリ-ウズラキメラ作成法
「図・写真で観る発生・再生実験マニュアル」(安田國雄 編), 遺伝子医学別冊/分子生物学実験シリーズ, pp112-123.

(2) □頭発表

[一般演題]

1. 山口真未, 青山裕彦
胸部体節からできる筋, 腰部体節からできる筋
日本発生生物学会第 35 回大会, 2002.5.21-23, 横浜
2. 坂本信之, 金谷直子, 青山裕彦

沿軸中胚葉の頭尾軸パターン形成の場としての原条
日本発生生物学会第 35 回大会, 2002.5.21-23, 横浜

3. 山口真未, 松井浩二, 青山裕彦
ニワトリ腹壁筋の由来
日本解剖学会第 57 回中国・四国支部学術集会, 2002.11.9-10, 米子
4. 山口真未, 青山裕彦
胸部体節と腰部体節による体壁筋形成
日仏生物学会第 158 回例会, 2002.12.7, 京都
5. 坂本信之, 金谷直子, 青山裕彦
体節中胚葉の頭尾軸パターンの特定化は原始線条で起こる
第 108 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2003.4.1-3, 福岡
6. 松井浩二, 山口真未, 青山裕彦
ニワトリ腹壁筋の由来と神経支配
第 108 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2003.4.1-3, 福岡
7. 平尾晶子, 青山裕彦
肋骨形成と体節の遺伝子発現パターンの表皮外胚葉依存性
日本発生生物学会第 36 回大会, 2003.6.11-13, 札幌
8. 加藤史子, 青山裕彦
遠位肋骨はどこからできてくるのか
日本発生生物学会第 36 回大会, 2003.6.11-13, 札幌
9. 平尾晶子, 青山裕彦
遠位肋骨欠損ニワトリ胚における体節分化
日本解剖学会第 58 回中国・四国地方会, 2003.11.8-9, 松山
10. Isabella Kurnia Liem, 青山裕彦
四肢形成部の側板中胚葉を胸部に移植すると過剰肢形成, 体幹筋の発生運命の変更, そして肋骨胸骨部の欠損が引き起こされる: primaxial/abaxial 構造について
第 110 回日本解剖学会・全国学術集会, 2005.3.29-31
11. 青山裕彦, Isabella Kurnia Liem, 山口真未
胸と腹の分化を筋の発生から考える
日仏生物学会第 163 回例会, 2005.5.28, 東京都渋谷区,
12. Isabella Kurnia Liem, 青山裕彦
The flank abaxial-primaxial skeletal muscle precursor cells respond

differently toward their environmental cues.
日本発生生物学会第 38 回大会, 2005.6.1-4, 札幌

13. Sakamoto, N., Aoyama, H.
The specification of rostrocaudal pattern of paraxial mesoderm in the primitive streak
16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists, 2004.8.22-27, Kyoto, Japan
14. Liem, I.K., Yamaguchi, M., Aoyama, H.
The abaxial-primaxial skeletal muscle precursor cells respond differently toward their environmental cues.
15th International Society of Developmental Biologists Congress, 2005. 9. 3-7. Sydney (Australia).

[シンポジウム等]

1. 青山裕彦
生き物のかたちづくり
公開市民講座, 「生きている解剖学」-からだの神秘にせまる (第 107 回日本解剖学会総会・全国学術集会 主催) 2002.4, 浜松
2. 青山裕彦
生物の多様性と発生学
特別講演, 紫蘭会広島支部, 2002.7, 広島
3. 青山裕彦
ハエもヒトも「節」でできている -実験を通して理解できること-
サイエンス講座, 広島県立広島国泰寺高等学校 2002.10, 広島
4. 青山裕彦
ハエもヒトも「節」でできている
出張授業, 静岡県立掛川東高等学校 2003.3, 掛川
5. 青山裕彦
肋骨形成の二元性
第 43 回日本先天異常学会学術集会, 2003.7.2-4, 大阪
6. 青山裕彦
発生生物学者の役割
広島大学第 2 回病院職員研修会, 2003.10.30, 広島
7. 青山裕彦
体節から椎骨・肋骨へ 卵の殻の中で行う実験

第 8 回広島整形外科先端医学セミナー, 2004.4.17, 広島

8. Aoyama, H.
Region specific morphogenesis of the axial skeleton
Symposium "Patterning the vertebrate axis" (organizer: Aoyama, H.,
Pourquie, O.) 16th International Congress of the International
Federation of Associations of Anatomists, 2004.8.22-27, Kyoto,
Japan
9. Aoyama, H., Pourquie, O. (Organizer)
Patterning the vertebrate axis
16th International Congress of the International Federation of
Associations of Anatomists, 2004.8.22-27, Kyoto, Japan
10. 青山裕彦, 秋田恵一 (オーガナイザー)
シンポジウム「系統発生と個体発生の解剖学」
第 110 回日本解剖学会・全国学術集会, 2005.3.29-31
11. 青山裕彦
胸と腹の分化を筋の発生から考える
シンポジウム「系統発生と個体発生の解剖学」(オーガナイザー: 青山裕
彦, 秋田恵一) 第 110 回日本解剖学会・全国学術集会, 2005.3.29-31
12. 青山裕彦
ニワトリの胚の発生
青山先生の発掘教室
第 8 回ジュニアサイエンスアカデミー「進化」, 2005.8.5-8.8, 柏崎

研究成果

1. 肋骨形成における発生的 3 区画

体節周囲組織の肋骨形成との関わりを調べ、椎骨と結合している短い部分(近位肋骨)は神経管の底板や脊索に、その遠位にある長い部分(遠位肋骨)は表皮外胚葉に依存して発生することを示した。遠位肋骨はさらに壁側板に進入する部分(遠位肋骨胸骨部)としない部分(遠位肋骨椎骨部)の2区画に分けられる。これは近年提唱された(Burke, A.C. & Nowicki, J.L. 2003), 軸周囲 abaxial 区画と軸辺縁 primaxial 区画とにそれぞれ対応する。(付録論文1および3参照)

哺乳類や鳥類では、肋骨が特定の部分に限局し胸部と腹部を明瞭に区分している。この肋骨を指標として、我々は鳥類胚における中軸骨格の部域特異的形態形成機構を明らかにしようとしている。これまでの内外の一連の研究から、肋骨は、頭、頸、結節および体の近位部の一部からなる比較的小さな近位肋骨と、肋骨体の大部分をしめる遠位肋骨とに分けられることが明らかにされてきた。

中軸骨格の分節性構成要素である椎骨と肋骨は、体節という、やはり分節性の中胚葉に由来する(図1)。われわれは、肋骨形成における体節とその周囲の組織との相互作用について、ニワトリ胚の卵殻内微小手術を主な手段として研究してきた。その結果、肋骨は、その発生にどの周囲組織が必要であるかによって以下の3つの部分に分けられることがわかった：椎骨と関節する短い部分(近位肋骨)、それ以外の部分で肋骨中央の関節(鳥類に特有のもの)より近位の部分(遠位肋骨椎骨部)、この関節以遠で胸骨と関節する部分(遠位肋骨胸骨部)である(図2)。

図1 体節から中軸骨格へ

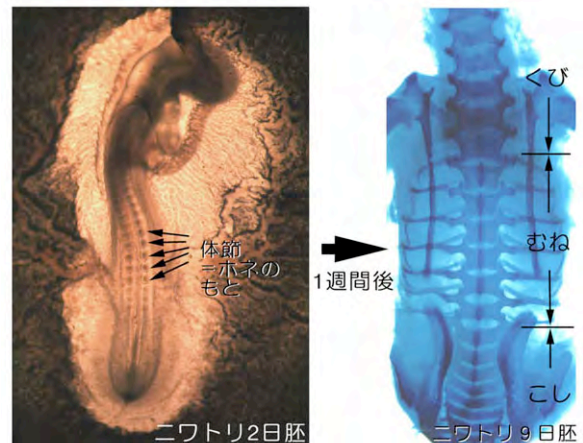
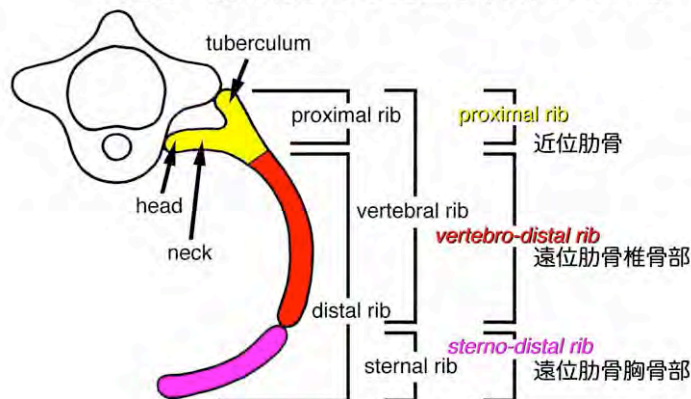
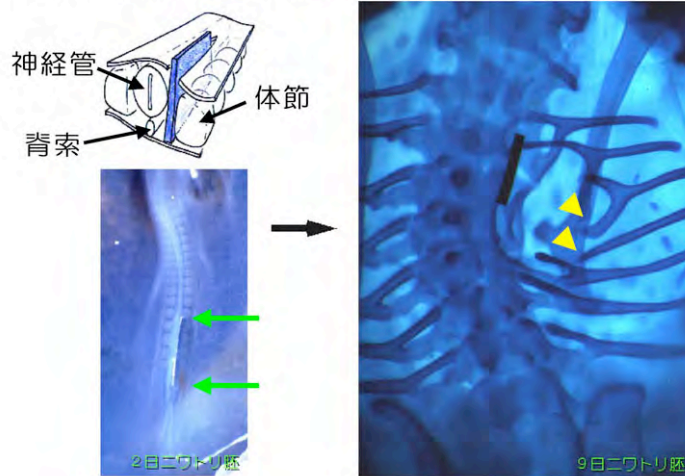


図2 肋骨は3つの区画からなっている



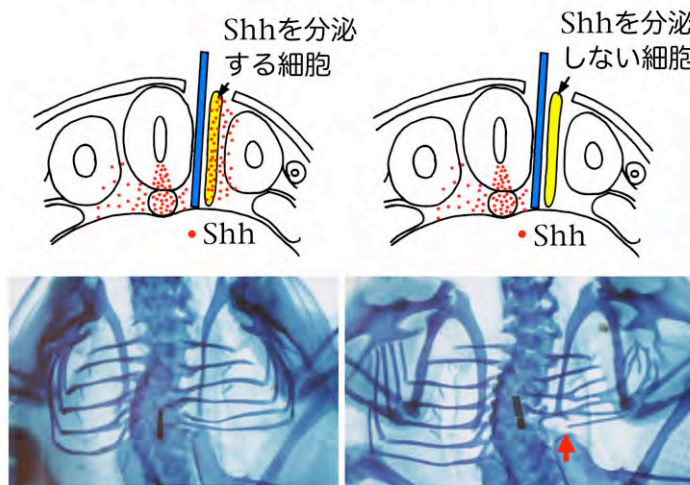
ニワトリ 2 日胚で、体節と脊索や神経管との間にアルミ箔を挿入し、さらに 1 週間孵卵を続けた後、骨格形成を観察すると近位肋骨が形成されていなかった (図 3)。アルミ箔挿入時に、アルミ箔と体節の間に、単離した脊索、あるいは神

図3 体節/中軸組織間の遮断による近位肋骨の欠損



経管の腹側部、あるいは遺伝子導入による Shh 分泌細胞を移植すると、近位肋骨の形成が見られた (図 4)。近位肋骨の形成は脊索や神経管の底板に依存し、それは Shh

図4 Shhによる肋骨近位部形成回復実験



を介していると考えられる。

一方、表皮と体節の間を遮蔽すると遠位肋骨全体が形成されない (図 5)。ただし、体節は筋の原基である皮筋板も形成し、その発生も表皮に依存しているため、遠位肋骨の形成が表皮によって直接制御されているのか、皮筋板を介しているのかはわからない。第 3 の体節周囲組織は側板中胚葉である。これを体節から切り離すと遠位肋骨胸骨部が形成されなくなる (図 6)。しかし、これは、他のふたつの組織と異なり拡散性因子の存在を必ずしも予言しない。この操作が体節細胞の移動経路を遮断しているためである。逆に言えば、肋骨の第 3 の区画は移動する体節細胞の集団ともいえる。これは最近、Ann Burke (Burke, A.C. & Nowicki, J.L. 2003) によって提唱されている、軸周囲 primaxial 区画と軸辺縁 adaxial 区画のうち軸辺縁 adaxial 区画に相当する (図 7)。

図5 体節/表皮外胚葉間の遮断による遠位肋骨の欠損

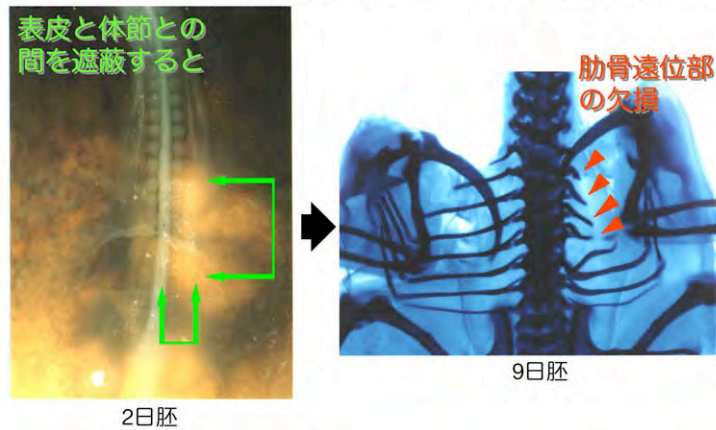


図6 体節/側板中胚葉間の遮断による遠位肋骨胸骨部の欠損

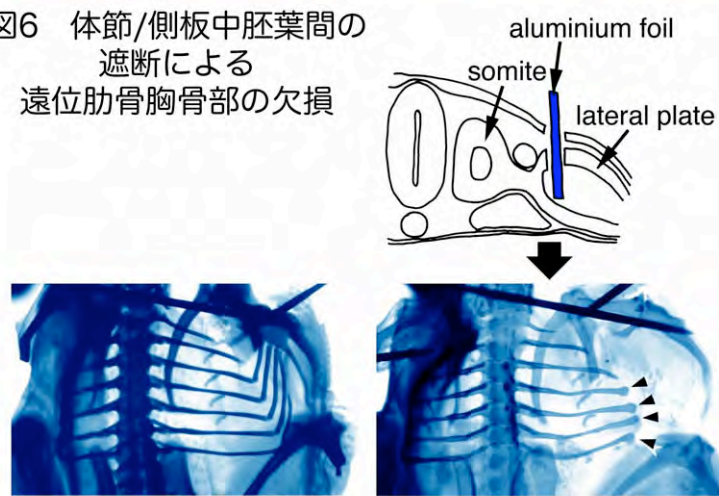
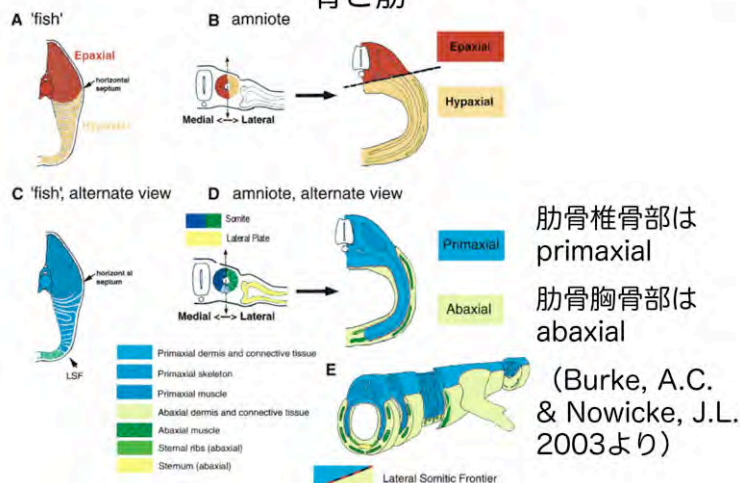


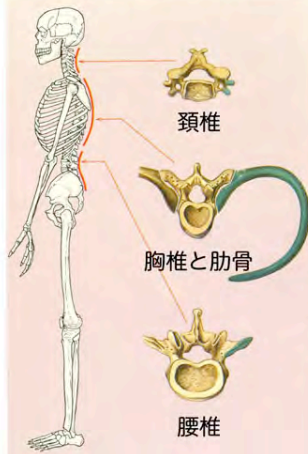
図7 軸周囲primaxial区画と軸辺縁abaxial区画の骨と筋



肋骨に見られた以上のような区画の考え方は、より一般的に骨格の再生・治癒についても敷衍できるかもしれない。肋骨の区画は胚発生上の差異に基づくものであり、成体における修復・再生の過程に必ずしも反映されるとはいえない。しかし、再生を誘導・促進するような因子を探索する上で、それが骨格のすべての部分に共通でない可能性も考慮すべきであろう。

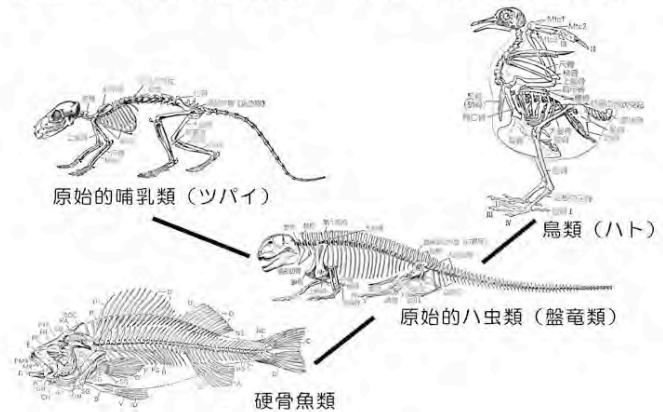
一方，比較解剖学的に見ると鳥類やほ乳類では，肋骨は胸部にのみ独立した骨として存在し，その他の部位では，小さな突起として椎骨に癒合していると考えられている（図 8）．このような部域特異性は進化の過程で生じたものであり（図 9），表皮外胚葉に依存する遠位肋骨の形成機構を明らかにすることは，個体発生のみならず，系統発生における部域特異性の成立機構の理解にもつながると期待している．

図8 中軸骨格の部域化



肋骨，および椎骨における肋骨相同部位を緑色で示す

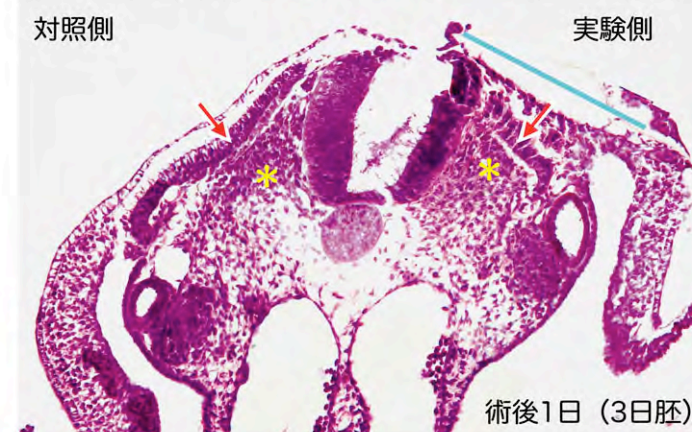
図9 脊椎動物の進化 ～肋骨形成部位の局在化



2. 遠位肋骨形成と体節分化

表皮外胚葉と体節との相互作用を物理的に阻害すると，皮筋板の外側部 (*Sim1*)，皮筋板辺縁近傍の椎板 (*Scleroaxis*) の形成不全が示された．これらの遺伝子発現領域が遠位肋骨の形成に関わるのであろう．（付録論文 1 および 2 参照）

図10 体節/表皮外胚葉間の遮断～組織学的変化



ニワトリ 2 日胚において，体節中胚葉と表皮外胚葉との間に薄いフィルムを挿入す

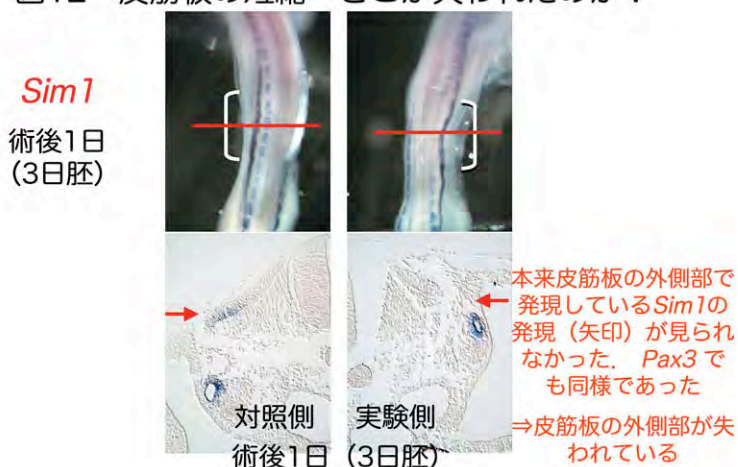
ると、遠位肋骨が形成されなくなる。体節中胚葉の分化過程において、この実験胚が正常胚とどのように異なっているのかを明らかにしようと、手術後1日(3日胚)および2日(4日胚)に組織標本を作成し、皮筋板、筋板、椎板に特異的な遺伝子の発現パターンを調べた。(1)横断切片標本をヘマトキシリン-エオシン染色すると(図10)、実験側では、皮筋板の短縮や(3日胚;図10赤矢印)、肥厚した筋板様

図11 体節/表皮外胚葉間の遮断～組織学的変化



構造の内側部へ集合している(4日胚;図11黄星印)のが見られた。椎板には実験による変化が認められなかった(図10赤矢印)。(2)正常胚の皮筋板の外側部で強い発現が見られる *Pax3* と *Sim1* の発現が手術後1日胚で共に検出できなかった(図

図12 皮筋板の短縮～どこが失われたのか?



12). (3)*Myf5* および *MyoD* を発現している筋板と考えられる領域が、3日胚の実験側では正常側より内側外側方向に短く、さらに4日胚で、正常側では側方に薄く伸展していくのに対し、実験側では神経管付近にとどまり大きな細胞集合塊を作っているのが認められた(図13)。(4)椎板は、形態的にも、また *Pax1* の発現からも実験側と正常側の違いが認められなかったが(図14)、隣接する2つの皮筋板の境界付近の細胞で発現する *rFBP* と *Scleraxis* が実験側では発現していなかった(図15)。以上のことから、実験側では、対照側に比べ、(1)皮筋板の外側部が欠損している。そのため、筋板は背側内側部にのみ存在している;(2)椎板は、一見正常であったが、皮筋板の頭側縁と尾側縁の隣接部周辺が欠損している;という結論を得

た. 肋骨遠位部の形成には皮筋板外側部, 皮筋板辺縁に接する椎板細胞のいずれか, あるいは両者がともに必要と考えられる.

図13 背内側で内側に拡大している筋板様の組織

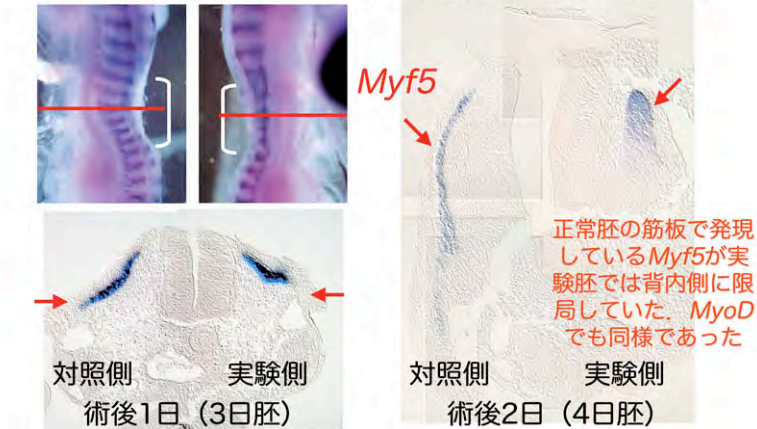


図14 椎板は正常か? ~Pax1の発現

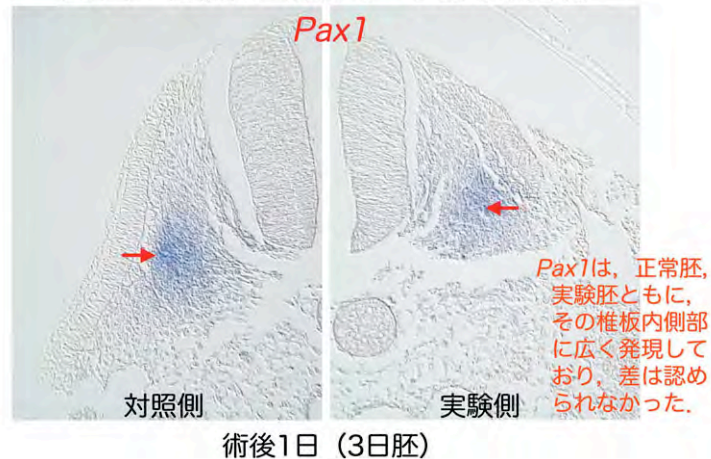
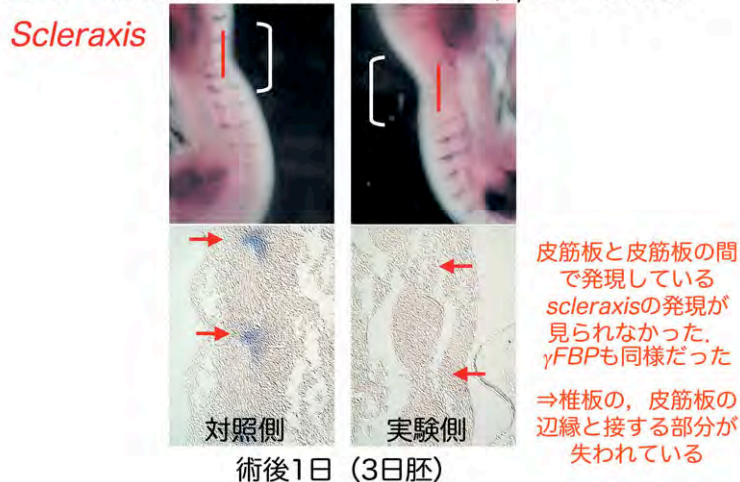


図15 椎板は正常か? ~Scleraxis, γ FBPの発現

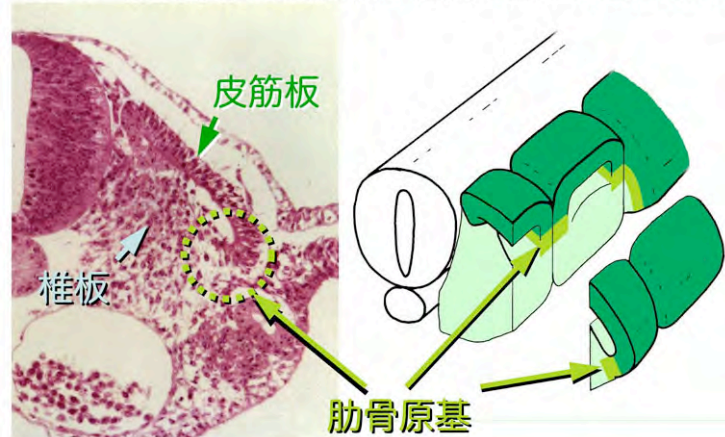


この区画は Tabin らのいうシンデトーム(Brent, A.E., Schweitzer, R. & Tabin, C.J. 2003)に相当する. しかし, 彼らによれば, シンデトームは骨の原基ではなく腱の原基であるという. 発生初期には骨と腱の共通幹細胞があるのかもしれない

ない。

一方、われわれは、本来椎骨になるはずの椎板内側領域を皮筋板近傍の肋骨原基の形成される部分（図 16）に移植すると遠位肋骨を形成するようにその発生運命を変換することが明らかにしている（加藤史子 2000, 大阪大学大学院学位論文）。すなわち、肋骨原基がどこに生じるかということは、体節中胚葉をとりまく表皮、また肋骨原基とされる椎板と隣接する皮筋板と肋骨原基との間の相互作用が大きく影響しているのである。椎板の発生運命は可塑的であり異所的移植により筋へも分化させることができるくらいである（Dockter, J. & Ordahl, C.P. 1998）。肋骨原基については細胞系譜の追究もさることながら、組織間相互作用の結果生じる肋骨形成の「場」を知り、この「場」において椎板細胞がどのように分化していくかを明らかにしていかなければならないのである。

図16 肋骨原基は皮筋板と椎板の境界付近にある



3. 体壁筋の部域特異的形態形成～腹壁筋の発生的分節性

(1) 体節の発生運命：腹壁の筋はほぼ第 27 体節のみからできることを移植実験から示した。その他の腰部体節は、肋骨のみならず、体壁筋も形成しないのである。その代わりに下肢の筋形成に寄与していた。これをもとに胸部と腹部の分化の系統発生機構を考察した。

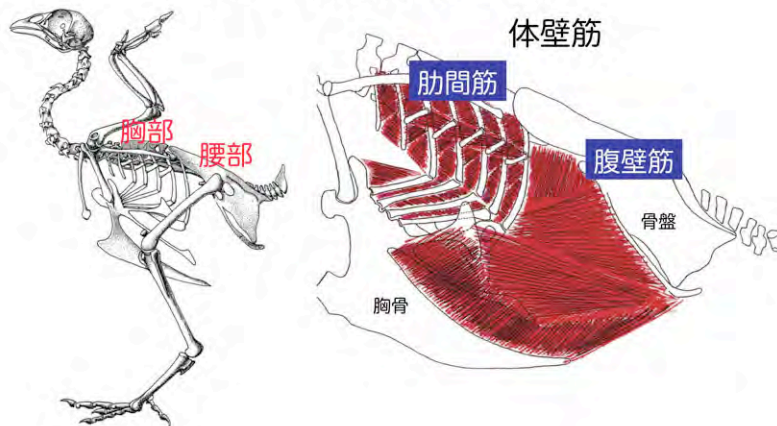
(2) 神経支配：ところが腹壁筋の支配神経は胸神経であった。筋の発生由来と支配神経の由来する分節が異なっており、支配神経からは筋の発生由来をいうことはできない。

(1) 体節の発生運命

脊椎動物の中軸骨格は体節に由来し、その部域特異性は体節自身にすでに備わっていた。しかし、体節は骨格だけでなく筋の原基でもある。もしかしたら、ホネの部域特異的な形態形成は筋によって支配されているかも知れない。ところが筋に関してはその部域特異性がほとんどわかっていない。Murakami & Nakamura (1991) は、頸部体節は体壁筋を作らないのに対し、胸部体節は肋骨に加えて体壁筋（肋間筋）を、腰部体節は肋骨は形成しないものの体壁筋は形成する能力があることを示

した。胸部と腰部には肋骨以外に違いはないのであろうか、というのがここで明らかにしようとした問題である。胸部の体壁筋は明らかな分節性をもっているのに対して、腰部体節に由来すると考えられる腹壁の筋には明瞭な分節性が認められない（図 17）。そこでわれわれは、胸壁筋と腹壁筋の発生における分節性を調べることから始めた。

図17 鳥類の胸部と腰部



ニワトリ 2 日胚の体節をひとつ、ウズラのそれと置き換えることにより単一の体節を標識し、その発生運命を追跡した（図 18）。手術後 7 日でカルノワ固定し、パラフィン切片上で抗ウズラ抗体 QCPN を用いた免疫組織化学によりウズラ細胞を同定した。また標準的な胚の標本をアザン染色をし、その切片から筋を立体再構築して同定し、これにもとづいて切片上で筋を同定した。

図18 移植により体節1個を標識する

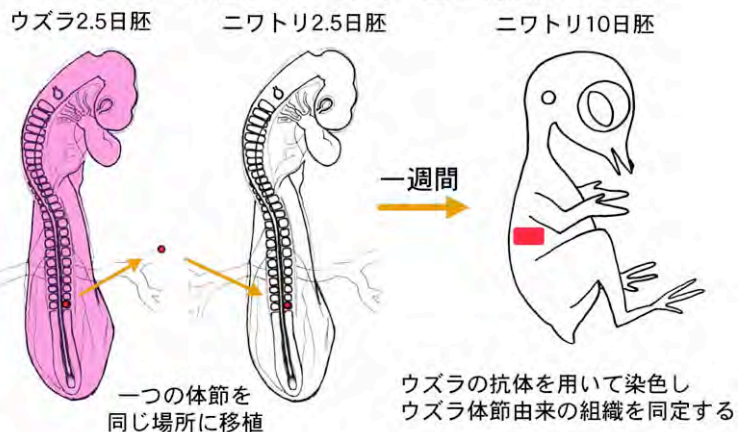
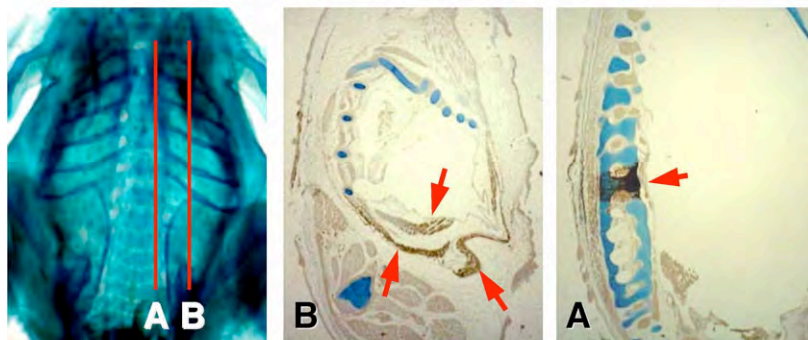
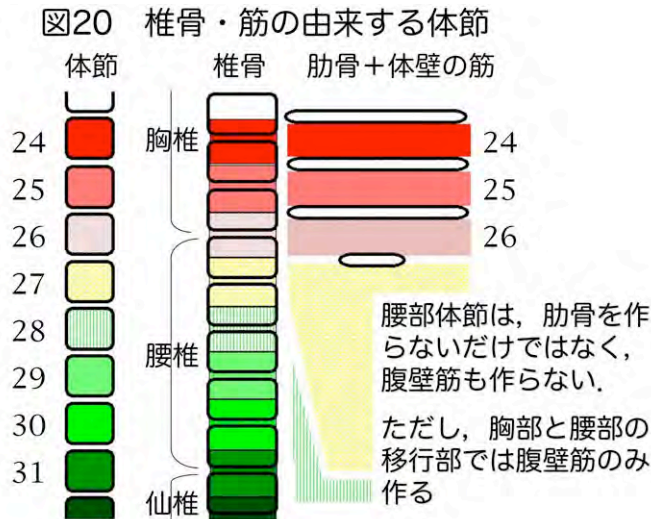


図19 移植体節（第27）由来の椎骨と腹壁筋
ウズラ細胞（茶色）が形成する



第 25 体節より頭側のものは肋間筋とそれをはさむ肋骨の半分を分節的に

形成することが報告されている (Chevallier, 1979 ; Huang et al, 1996). 腹壁筋の大部分は最も頭側の腰部体節である第 27 体節によって形成され (図 19), それに隣接する第 26 および第 28 体節はそれぞれ腹壁筋の頭側縁, 尾側縁を形成するのみであった. また, 第 29 体節より尾側の腰部体節の腹壁筋への寄与は認められなかった. すなわち, 第 29 体節より尾側の腰部体節は肋骨のみならず腹壁筋も形成しない, 体壁を構成する何れの要素も形成しないのである (図 20).

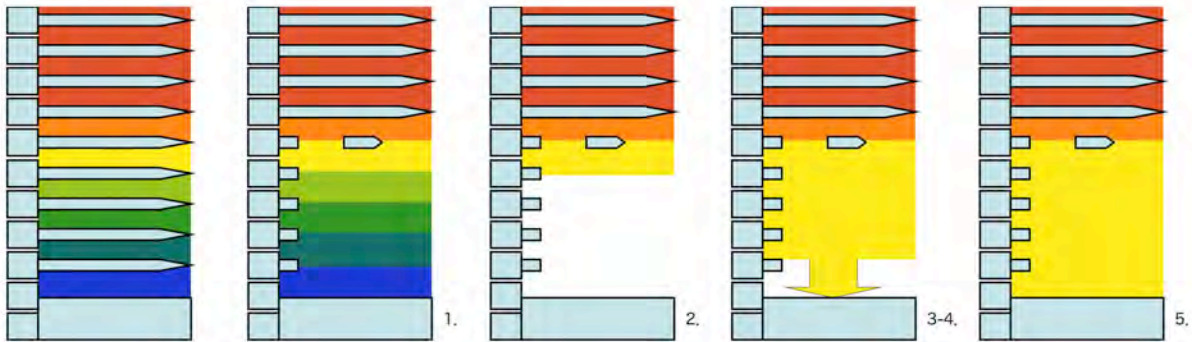


体節を異所的に移植した場合, 骨格は体節自身の発生運命に従って形成される. 腹壁筋についてはどうであろうか? ニワトリ 2 日胚の, 腹壁筋のほぼ全体を形成する第 27 体節の位置に, 異所的にウズラ体節を移植し, 1 週間後, 筋形成を調べた. 本来肋間筋を作る第 25 体節, 一部ではあるが腹壁筋の形成に寄与する第 26, 28 体節は第 27 体節位に移植すると全例で腹壁筋の全体を形成した. ところが, 本来, 体壁筋を作らない第 29, 30 体節は第 27 体節位に移植しても腹壁筋の一部しか形成しなかったり, 全く寄与しない例もあった. これらの結果から, 体節は体壁筋を作るかどうかは決定されているが, それが胸部の筋となるか腹部の筋となるかについてはまだ可塑的であるといえる.

ニワトリの肋骨は通常 7 対であるがしばしば第 8 肋骨の形成を見ることがある. これには第 27 体節が関与していると考えられ, このことはこの体節が胸部体節の性質を持っていることを示唆している. すなわち, 腹壁筋は胸部の筋が変形したものとも考えられる. 以上の結果から, 系統発生上の胸部と腰部の分化について次のような仮説を立てた (図 21).

1. (将来の) 腰部体節細胞が外側方へ移動することがなくなり, 肋骨形成
2. および, 肋間筋形成がなくなった
3. 腹壁から筋がなくなったところへ,
4. 隣接する胸部体節由来の筋が移動してくる
5. その結果, 腹壁の筋は最も尾側の胸部体節 (もしくは最も頭側の腰部体節) 由来の細胞によって形成される

図21 腹壁の系統発生

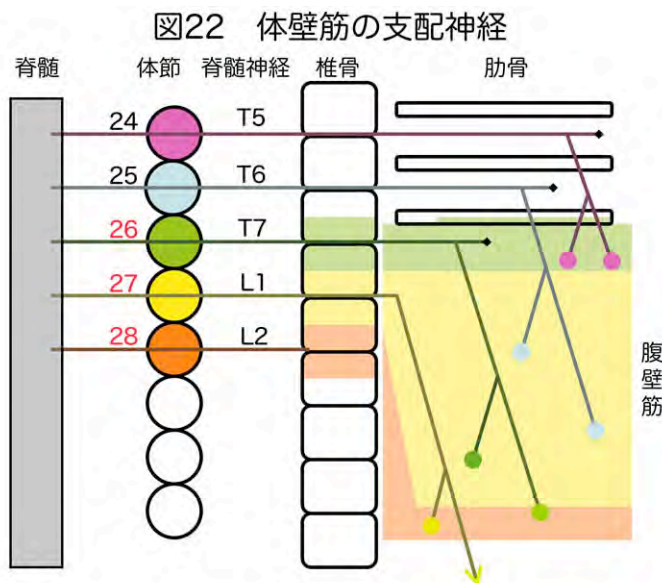


この仮説で明らかにしなければならないのは、「(予定)腰部体節細胞が外側方へ移動することがなく」なった機構である。

脊椎動物の系統発生において、中軸骨格は始め未分化であり、その全長を通してよく似た単位の繰り返しであったのが、四肢の発達とともに頸部と仙部から肋骨が失われていき、さらに胸部の後半からも肋骨が失われた結果、胸部と腰部の区別が生じた。今回のわれわれのデータでも、第 26 体節までは後肢の筋形成には寄与しなかったものが、第 27 体節でわずかに後肢の筋を作るものが現れ、第 29 体節で後肢筋形成が最大に達する。肋骨および肋間筋の形成と後肢の形成は相補的に見える。「セクション 4. 四肢形成と肋骨形成」ではこの問題を扱う

(2) 腹壁筋の神経支配

孵化後 1 か月のニワトリで腹壁筋の支配神経を肉眼的に検索した。第 1 腰仙骨神経が支配する領域は尾側縁のみであり、腹壁筋の大部分は第 7 胸神経（肋下神経に相当）およびさらに頭側の肋間神経の側副枝が肋骨を横切り下行して支配していた（図 22）。



従来、先験的にあるレベルの脊髄神経はそのレベルの体節由来の筋を支配

するとされてきており、神経支配を根拠に筋の発生由来がしばしば議論されている。しかし、今回の結果は、確立した末梢神経の神経支配が必ずしも筋の発生起源の指標とならないことを示している。

また、個体発生における、神経の特異的な筋支配の成立過程についても検討する必要がある。これまで言われてきたように、脊髄神経が直近の体節細胞と 1 対 1 対応の関係にあるのではないとすると、その対応関係がいつどのようにして決まるかが問題となる。神経-筋投射が、発生の初めから維持されるのではなく発生に従って次々に変更される可能性（例えば、脊髄神経は、最初、直近の体節を支配し、発生が進めばさらに下位の筋へと枝を伸ばしていく）も含めて検討されねばならない。

4. 四肢形成と肋骨形成

胸部に四肢を誘導すると遠位肋骨胸骨部ができなかった。 *abaxial* 区画については、体壁と四肢が相補的に形成されるのである。（付録論文 1 および 4, 5 参照）

胸壁の筋、肋間筋は明らかに分節的に構築されている。一方腹壁の筋には分節構造が不明瞭である。われわれはその発生由来を調べ、腹壁筋はその大部分が左右 1 対の体節に由来することを明らかにした。腰部体節の大部分は肋骨を形成しないばかりではなく、体壁の筋をも形成しないのである。そのかわり、これらの体節は下肢の筋の起源となっている。

ここから、系統発生上、頸部や腰部で肋骨が失われた原因は四肢の新生によるものではないのかという仮説を立てた。われわれは、個体発生においてこのようなことが再現できないかと、胸部に異所的に四肢を形成させ、肋骨形成、肋間筋形成の有無を調べた。ニワトリ 2 日胚の体側部（前肢と後肢の間）、表皮外胚葉と側板中胚葉の間に、ウズラ胚より得た前肢芽あるいは後肢芽レベルの側板中胚葉壁側板を移植した（図 23）。対照として、体側部のそれを移植した。手術後 1 週間、発生を続けた後、胚をカルノワ固定し、全載標本で軟骨をアルシアンブルー染色して、その骨格の形態を調べた。さらに前頭断切片を作製し、アザン染色を施した組織標本で軟骨および筋を同定し、また、抗ウズラ特異抗体（QCR1；ウズラ軟骨および血液系細胞特異抗体、QCPN；ウズラ細胞核特異抗体）を用いて移植片由来の細胞を検出した。

図23 側板中胚葉の移植実験

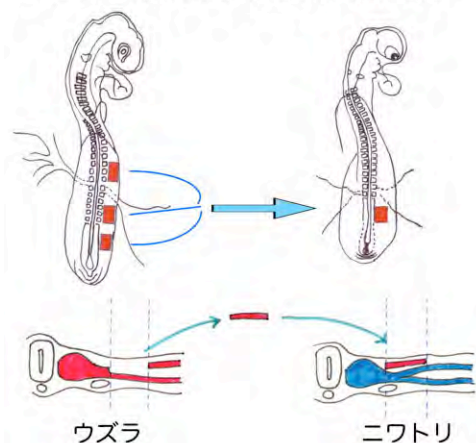
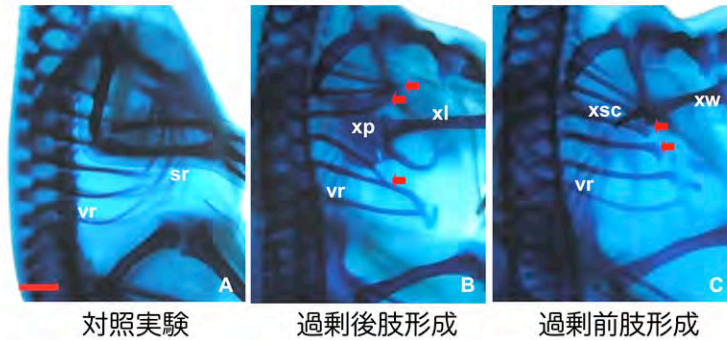


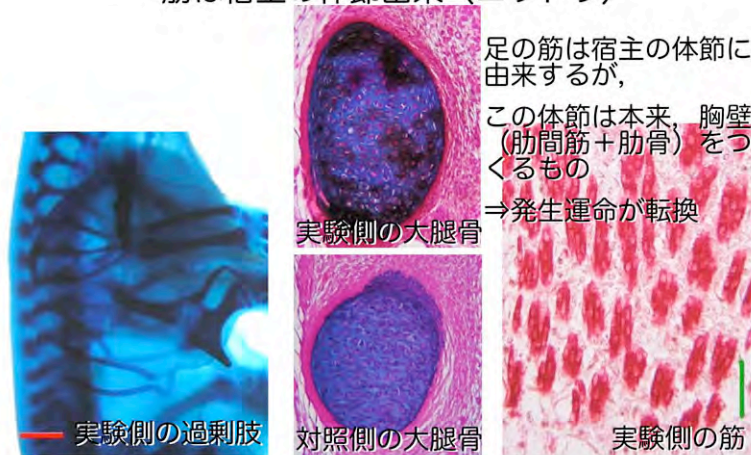
図24 側板中胚葉移植による過剰肢形成



遠位肋骨胸骨部 (sr) は失われるが, 近位肋骨, 遠位肋骨椎骨部 (vr) はほぼ正常. xp;過剰骨盤, xl;過剰後肢, xsc;過剰肩甲骨, xw;過剰前肢 (翼)

前/後肢芽側板中胚葉を移植したものでは過剰肢が形成されていたが, 体側部の側板中胚葉を移植したものでは過剰に形成されたものはなかった (図 24). 肋骨の形態を調べてみると, 胸部に過剰肢が形成された場合, 肋骨椎骨部はほぼ正常であったが, 肋骨胸骨部はその肋間筋とともに失われていた. 胸部に形成された過剰肢の筋は宿主であるニワトリ細胞からなっており (図 25), またトレーサー実験からもそれらは胸部体節に由来することが示された. 胸部体節は, 本来, 肋骨や肋間筋を含む体幹の骨格や筋の原基である. 以上の結果は, 過剰肢の誘導が, 肋骨胸骨部およびその肋間筋を形成するはずの前駆細胞を過剰肢の筋を形成するように変えたと説明できる (図 26).

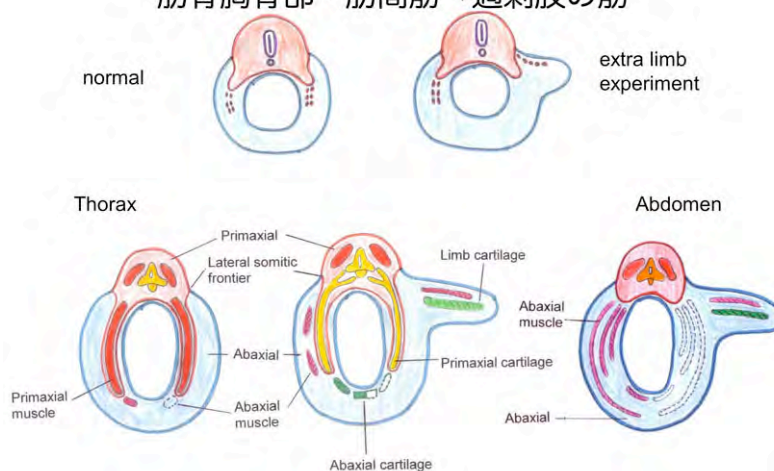
図25 肢の骨は移植した側板由来 (ウズラ)
筋は宿主の体節由来 (ニワトリ)



近年, Ann Burke は, 体節由来の筋や骨格を従来と異なり発生学的に分類することを提唱している. 彼女の言う軸周囲 primaxial 要素は従来分類である軸上筋に加えて肋骨椎骨部とその肋間筋からなり, 軸辺縁 abaxial 要素は, 腹壁筋, 肋骨胸骨部とその肋間筋, そして四肢の筋を含む (図 7). 従来分類でいえば肋骨は椎骨部も胸骨部もいずれもが軸下要素に属するが, 今回の過剰肢形成によって発生が影響されるのが四肢と同じく軸辺縁 abaxial 要素に区分される肋骨胸骨部であり, 軸周囲 primaxial 要素である肋骨椎骨部はほぼ正常であるという結果は, 肋

骨/肋間筋の椎骨部と胸骨部の発生の制御が異なっていることを示しており、このことは肋骨においては軸上 epaxial/軸下 hypaxial の区分より軸周囲 primaxial/軸辺縁 abaxial の区分の方がふさわしいことを示唆している。さらに、本来、肋骨胸骨部とそれに付随する筋を形成するはずの体節細胞が過剰肢の誘導により四肢の筋を形成するようになったことは、軸辺縁 abaxial 要素間の発生的可塑性を示しているとともに、軸周囲 primaxial/軸辺縁 abaxial の両区画を超えた発生運命の変更が起きないことをも示している。あわせて軸周囲 primaxial/軸辺縁 abaxial の区分が発生現象を考える上で有効であるといえよう。

図26 体節の発生運命の転換
肋骨胸骨部・肋間筋→過剰肢の筋

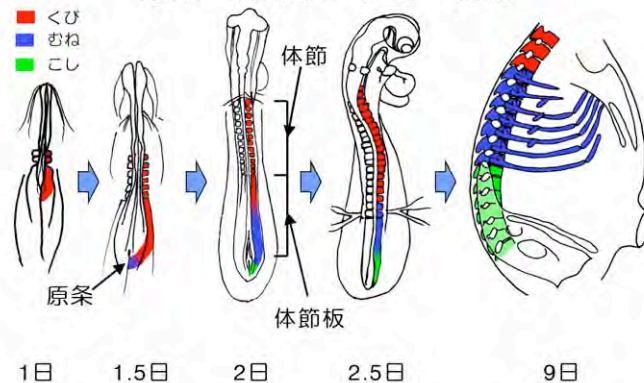


5. 中軸骨格原基の部域特異性の決定

体節形成の最も初期、原始線条から陥入する直前に、すでに決定されていることを、当該部位の移植と、その *Hox* 遺伝子群の発現、形態形成能から示した。

すでに述べたように中軸骨格を形成する椎骨と肋骨は体節に由来し、体節自身にはほとんど形態的な違いがないにもかかわらずそれから形成されるホネの形は部域によって大きく異なる。1970年代から体節や体節に分化する前の体節板はすでにどのような形のホネになるかが決定されていることを鳥類の胚を用いた異所的移植実験の結果から明らかになっている (Kieny ら, 1972; Chevallier, 1975)。この部域特異的な中軸骨格を形成する、という体節中胚葉の発生運命の決定はいつ起きるのであろうか。われわれは、体節形成直前の体節板から原腸陥入により形成された直後の体節板、さらにさかのぼって原腸陥入中の中胚葉、すなわち原条そのものについて、異所的移植によりその運命が変更されるかどうかを調べ、またそのとき *Hox* 遺伝子が発現しているかどうか、発現しているのならそれが移植後変更されるかどうかを検討した。

図27 体節の発生
原条～体節板～体節～骨格



体節形成直前の体節板（体節板の頭側半分）（図 27），あるいは形成直後の体節板（体節板の尾側半分）をウズラ 2～2.5 日胚より単離し，ニワトリ胚の相同部位と置き換えた．1 週間さらに孵卵を続けたのち骨格の形態を調べると，胸部体節板を腰部に移植した場合にはそこで肋骨を形成し（図 28），一方，頸部や腰部体節板を胸部に植えた場合は肋骨の形成を見なかった（図 29）．体節板はその形成直後から発生運命が決定されているのである．

図28 胸部体節は異所的移植後も肋骨を形成する

くび	前半	0/13	
	後半	2/9	
むね	前半	5/5	
	後半	3/3	
こし	前半	0/7	
	後半	0/2	

移植部位に肋骨をもつ胚の数 / 実験例数

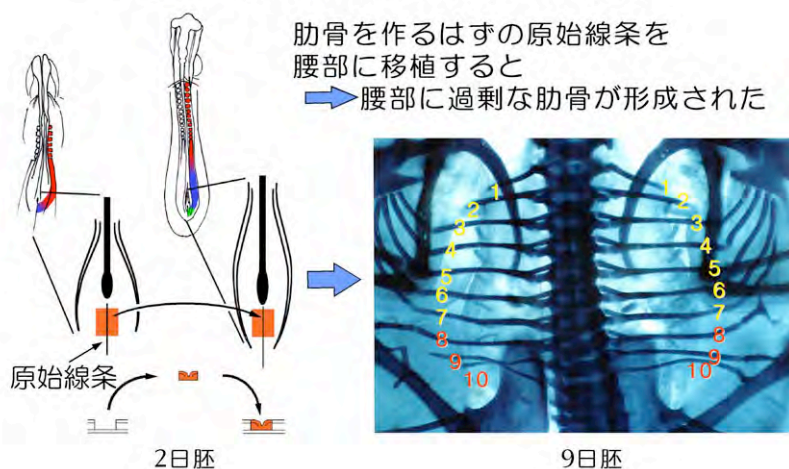
図29 頸部および腰部体節は胸部への異所的移植後も肋骨を形成しない

くび	前半	0/11	
	後半	1/11	
むね	前半	5/5	
	後半	NO DATA	
こし	前半	0/3	
	後半	0/8	

移植部位に肋骨をもつ胚の数 / 実験例数

さらに発生をさかのぼって原条について調べた．原条はその形成期にすべての頭尾軸レベルの体節原基が形成されるのではなく，発生の進行とともに頭部体節から，頸部，胸部，腰仙部と順次形成されていく（図 27）．従ってある発生段階の原条はある特定の頭尾軸レベル範囲の体節中胚葉を形成している．頸部体節原基を形成している stage 4 および stage 5 のウズラ胚原条を 11-12 体節期にあるニワトリ胚の原条へ移植しても肋骨は形成されなかった．胸部体節原基を作り始める stage 6 以降のウズラ胚原条をさきと同様のニワトリ胚へ移植すると 25-57%の頻度で肋骨形成を認められた（図 30）．体節中胚葉はそれが形成される原条ですでにその発生運命が決まっているといえる．

図30 原条の異所的（異時的）移植



頭尾軸方向の部域特異性は *Hox* 遺伝子群によって支配されていると言われている。 *Hox* 遺伝子も細胞が原条を通る直前から発現し始めるがこれも異所的移植による環境の影響を受けるかどうか調べた。上と同様の移植実験を行い、胸部体節中胚葉およびその派生物である椎骨・肋骨に特異的に発現する *HoxC8* について、in situ ハイブリダイゼーションによりその発現パターンを調べた。移植片由来の組織では *HoxC8* が宿主の *HoxC8* とは独立に発現しており、これはホネの形態に相応していた。すなわち、宿主由来、移植片由来を問わず、肋骨形成のある中軸骨格に *HoxC8* の発現が見られたのである。 *Hox* 遺伝子の発現についても形態に関する決定と時期を一にして「決定」が起きるといえる。

以上のように、中軸骨格の部域特異性は、形態形成の点においてもホックスコードについても原条ですでに決定されている。すなわち体節中胚葉が胚盤葉上層から原腸陥入によって形成されると同時に決定されているといえる。今後はさらに、胚盤葉上層で発生運命が決定されているかどうか追究したい。もし、 *Hox* 遺伝子の発現開始以前に形態形成における発生運命が決まっておればその分子機構を明らかにする必要があるが生じてくる。 *Hox* 遺伝子の発現以前によりおおきな単位の部域化が決まるという可能性も予想されるからである。

おわりに

これまで、「肋骨の形成」を指標として中軸骨格の部域化を考えてきたが、これはあくまでもひとつの指標にしすぎない。肋骨の有無は確かに大きな違いではあるが、実際に「肋骨」がひとつのホネとして存在することと、椎骨に癒合した形で存在することとの間にどのような違いがあるのか、そこで関節を形成するかどうかは何によって支配されているのか、おそらく部域特異性には遠位肋骨の形態形成の違いが大きく寄与しているであろうが、それは実際にはどのような発生過程の違いの反映であろうか。今後はこれらの、まさに細胞が集まって形を作っていく、その過程を明らかにしていきたいと考えている。

付録

発表論文および発表予定論文

1. 青山裕彦
ニワトリ-ウズラキメラ作成法
「図・写真で観る発生・再生実験マニュアル」(安田國雄 編), 遺伝子医学
別冊/分子生物学実験シリーズ, pp112-123.
----- 29
2. Hirao, A., Aoyama, H.
Somite development without influence of the surface ectoderm in the
chick embryo: The compartments of a somite responsible for distal rib
development.
Development Growth Differentiation, 46, 351-362, 2004.
----- 41
3. Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Koseki, H.
Three developmental compartments involved in rib formation.
International Journal of Developmental Biology 49, 325-333, 2005
----- 53
4. Liem, I.K., Yamaguchi, M., Aoyama, H.
Body wall morphogenesis: The abaxial-primaxial somatic cells respond
differently toward their environmental cues. (submitted)
----- 63
5. Liem, I.K., Yamaguchi, M., Aoyama, H.
Reexamination of the origin of chick pelvic bone: Insight of the shoulder
and pelvic girdles homology. (submitted)
----- 99

