

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07244

研究課題名(和文) 哺乳類の脳容積拡大を可能にした頭蓋底の形態進化過程の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the morphological evolutionary process that caused brain volume expansion in mammalian cranial base

研究代表者

古寺 敏子 (Furutera, Toshiko)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90822809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、詳細な研究報告が少ない羊膜類における頭蓋底の形態進化を明らかにするため、軟骨頭蓋の主な構成要素である耳前柱、梁軟骨、極軟骨に着目し、哺乳類と爬虫類・鳥類の軟骨頭蓋形成過程の進化発生学的解析を行うことである。マウスでは耳前柱は発生が開始するものの途中で停止する可能性があること、マウスはニワトリやゼブラフィッシュと同様に梁軟骨が一对の軟骨と中央部の軟骨の双方から形成されることを明らかにした。また、マウスの下垂体軟骨の一部がニワトリの極軟骨に相当することを示唆する結果を得られたが、さらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は哺乳類進化における脳の拡大に伴う頭蓋底の形態的变化について、過去に比較形態学で提唱された仮説を土台として分子発生学的手法、発生遺伝学的、実験発生学的手法により解明を試みたものである。哺乳類胚(マウス・オポッサム)と爬虫類・鳥類胚(イモリ・ニワトリ)を用いた比較発生学的解析の結果、哺乳類頭蓋底の形態進化の背景にある発生学的イベントを推定することができた。さらなる検証が必要であるものの、これらの研究結果は、頭蓋顎顔面の形態形成メカニズムの解明や当該領域における先天性疾患の解明に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the morphological evolution of the neurocranium in amniotes, for which detailed research reports are scarce. Focusing on the major components of the anterior cartilaginous neurocranium (the pila antotica, trabecular cartilage, and polar cartilage), we conducted an evolutionary developmental analysis of cranial morphogenesis in mammals and reptiles-birds. Our findings reveal that in mice, while the development of the pila antotica initiates, but it fails to differentiate cartilage, and that like in chickens and zebrafish, the trabecular cartilage in mice is formed from both paired cartilages and a central cartilage. Additionally, our results suggest a partial homology between the hypophyseal cartilage in mice and the polar cartilage in chickens, although further validation is needed.

研究分野：進化発生学

キーワード：進化発生学 形態進化 神経堤細胞 軟骨頭蓋 Dlx1ミュータントマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類は様々な環境に適応放散した動物群の一つであるが、その一因として頭蓋顎顔面の形態進化が挙げられる。下顎構造の変化は、咀嚼効率とエネルギー代謝効率を向上させ、高温性や体毛の獲得に繋がり、中耳の形態進化は多様な音域を感受できる聴覚器官の獲得に繋がった。研究代表者と研究分担者らはこれまでに中耳と下顎の形態進化の発生学的背景を明らかにしてきたが、哺乳類の頭蓋顎顔面の進化をさらに明らかにするため、脳容積の拡大に伴う骨格の変化について明らかにしたいと考えた。脳の発生に着目し、脳容積の拡大をもたらした進化的な変化を発生学的に明らかにしようとする研究はこれまで多く行われてきた。しかし、脳容積の拡大に伴って脳を下部から支える骨格構造である「頭蓋底」の形態にも大きな変化が生じたものの、この形態進化の背景にある発生メカニズムはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

脊椎動物の頭蓋底は篩骨・蝶形骨・後頭骨などから構成される。これらの骨格要素は発生期にまず耳前柱、梁軟骨、極軟骨などの複数の軟骨要素から成る軟骨頭蓋が生じて骨化し、後に周囲に形成される膜性骨によって補完される。哺乳類と爬虫類—鳥類の軟骨頭蓋前半部の形態的差異を説明するためには、以下に示す3点の発生過程における未解決問題がある。

- (1) 爬虫類 鳥類では存在する耳前柱が、哺乳類の進化においてどのような原因で消失したのか。
- (2) 哺乳類の梁軟骨の形成過程は、中間梁軟骨と一对の軟骨原基から発生するとされるニワトリの梁軟骨の形成過程と同様であるか。
- (3) 哺乳類以外の羊膜類では梁軟骨の内側には軟骨組織は存在せず、下垂体が収まると共に内頸静脈が走行する。一方で、哺乳類の下垂体直下には軟骨(下垂体軟骨)が形成される。哺乳類における下垂体軟骨は爬虫類—鳥類における極軟骨と相同であるか、あるいは新規形成物なのか。

本研究の目的は、哺乳類胚と爬虫類 鳥類胚を用いて軟骨頭蓋の構成要素である耳前柱、梁軟骨、極軟骨の形態形成を比較することで上記の未解決問題に取り組み、哺乳類の頭蓋底の形態進化における分子発生学的メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究ではマウス、オポッサム(哺乳類)、ヤモリ、ニワトリ(爬虫類 鳥類)を実験材料とし、耳前柱、梁軟骨、極軟骨の発生過程を比較する。野生型胚を用いた遺伝子発現プロファイル解析、遺伝子組み換えマウスにおける細胞追跡実験、ニワトリ DiI 細胞標識実験及び上顎突起切除実験、骨軟骨二重染色、HE 連続切片の作製と観察を行い、各動物間で比較することで未解決の3つの問題の解決に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 哺乳類では脳褶曲近傍に存在する間葉細胞集団がアルシアンブルーで染まることが報告されている。そこで本研究では、マウス胎齢 12~14 日胚頭部において、軟骨分子マーカーである *Sox9*、*Colla2* の *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、胎齢 12 日胚の脳褶曲周囲と眼窩軟骨を形成する間葉細胞集団にこれらの遺伝子発現が認められた。一方で、胎齢 14 日胚においては、これらの遺伝子は頭蓋底形成中の軟骨では強く発現するものの他の領域ではほとんど認められなかった。これらの結果は、哺乳類胚では耳前柱の形成は一旦開始するものの、途中で停止することを示唆する。組織学切片の詳細な観察により、それらの軟骨前駆細胞が形態形成中に終脳の拡大により物理的に外側に押し出される可能性が考えられた。

(2) ニワトリやゼブラフィッシュにおいて、一对の軟骨原基は眼胞の前から移動する神経堤細胞(眼後神経堤細胞)によって形成されることが明らかにされている(、)。哺乳類との比較のためにマウス胎齢 12.5~13.5 日胚の頭蓋軟骨染色を詳細に観察したところ、ニワトリやゼブラフィッシュと同様にマウスにおいても梁軟骨が一对の軟骨と中央部が異なる軟骨細胞集団から形成される可能性を見出した。

(3) 下垂体軟骨はニワトリの極軟骨と相同か、あるいは新規形成物かを検証するため、ニワトリ孵卵 3-4 日胚の鰓弓の上顎突起の間葉細胞領域を蛍光色素 DiI で標識し、12 日目まで孵卵を継

続し、標識した細胞の移動実験を行った。さらに同様の孵卵日程で上顎突起の間葉細胞領域の焼却切除実験を行った。その結果、複数個体において極軟骨の一部が上顎突起から形成されることが示唆された。マウスでは上顎突起に存在する神経堤細胞が追跡可能な *Dlx1-creERT2:R26R* マウスを用い、軟骨形成期に当たる胎齢 15.5 日胚の複数個体の切片で X-gal 染色を行った。その結果、頭蓋底軟骨の一部が上顎突起由来の神経堤細胞である可能性を見出した。しかしながら、*Dlx1-creERT2:R26R* マウスの胎児標本において上顎突起由来細胞の分布に大きな個体差があることから、ニワトリとの比較検討が完了できなかった。

今後は、*Dlx1-creERT2:R26R* マウス胚の細胞標識に必要なタモキシフェン投与のタイミングや投与量を調節することで得られる標本のデータを改善する計画である。標本数を増やし上顎突起由来細胞の分布について追試・確認する予定である。またオポッサム、ヤモリ胎児の HE 連続切片から軟骨頭蓋前半部の形成過程について考察したが、特にオポッサムは得られた標本数が少数であったため、明確な結論が得られなかった。今後新たな標本を得てデータを追加し、原著論文としてまとめる予定である。

<参考文献>

① Wada et al., “Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull”, *Development*, 132 (17), 2005, 3977-3988

Wada et al., “Dual origins of the prechordal cranium in the chicken embryo”, *Developmental Biology*, 356 (2), 2011, 529-540

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古寺 敏子
2. 発表標題 ニワトリ胚の鰓弓における背腹軸に沿った形態パターンニングの検討
3. 学会等名 第9回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武智 正樹 (Takechi Masaki) (10455355)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------