

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460256

研究課題名(和文) 哺乳類下顎の形態進化の背景にある発生モジュールの解明

研究課題名(英文) Developmental modularities behind evolution of the jaw and middle ear in mammals

研究代表者

武智 正樹 (TAKECHI, Masaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・テニュアトラック助教

研究者番号：10455355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は哺乳類に特徴的な形態である聴覚器官の進化的成立に着目した。中耳は胎児期に生じる咽頭弓において形成され、耳小骨と鼓膜で構成される。従来、鼓膜は外耳道と第1咽頭嚢が第1、2咽頭弓の境界に沿って会合することにより形成される膜成分であると考えられてきた。本研究では、マウスとニワトリにおける鼓膜の形成過程をさらに詳細に比較し、両者における中耳形成の相違点を明らかにしようと考えた。マウスやニワトリの咽頭弓における遺伝子発現解析や実験発生学的手法により、マウス・ニワトリの鼓膜形成過程が共に従来の理解とは異なることを明らかにした。以上の研究結果を原著論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：We have focused on morphological evolution of the mammalian middle ear and have reported that the tympanic membrane (TM), consisting of the external auditory meatus (EAM) and first pharyngeal pouch, evolved independently in mammalian and diapsid (modern reptiles and birds) lineages. In this study, we compare TM formation along the anterior-posterior axis of pharyngeal arches in mouse and chick embryos. In mouse, TM is formed in the first pharyngeal arch (PA1) and this arch plays a crucial role in TM formation. By contrast, the EAM begins to invaginate at the surface ectoderm of the second pharyngeal arch (PA2) in chick, and the entire TM is formed in PA2. These results indicate that the classical idea of TM formation is not correct in either animal and further strengthen the idea of independent origin of the TM during amniote evolution.

研究分野：発生生物学

キーワード：中耳 鼓膜 外耳道 咽頭弓 進化発生 マウス ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

顎を有する脊椎動物(顎口類)の下顎は一般に複数の骨要素の結合により形成されるが、哺乳類の下顎は歯骨という一つの骨要素のみからなる。このような哺乳類独自の顎形態が進化した背景にある発生学的な変化を解明したいと考えた。マウスの発生遺伝学より、第1咽頭弓の下顎形成領域に「近位部」と「遠位部」という2つの発生モジュールが存在することが示唆されており、そのモジュール性は下顎の形態進化とよく符合する。「近位部」モジュールは、爬虫類・鳥類では顎関節、哺乳類では鼓膜を伴う中耳に相当する。我々のこれまでの研究において、両系統における「近位部」モジュールの形態学的差異が鼓膜の進化に深く関与していることを見出した(Kitazawa and Takechi et al., 2015)。また、両系統において形態学的には極めて類似している鼓膜が、独自の発生メカニズムによって独立に進化したことを強く示唆する結果を得た。これらのことを踏まえ、哺乳類と爬虫類・鳥類の鼓膜の形成過程を再検討し、両者における鼓膜形成メカニズムにおける共通点や相違点を明らかにすることが新たな課題となった。

2. 研究の目的

哺乳類下顎の「近位部」モジュールの形態の成立に深く関わる鼓膜の形成過程について、哺乳類のモデルであるマウスと爬虫類・鳥類のモデルであるニワトリを用いて解析しようと考えた。従来、鼓膜は「第1咽頭溝と第1咽頭嚢が第1咽頭弓と第2咽頭弓の境界に沿って会合することで形成される」と考えられてきたが(Grevellac and Tucker, 2010)、その根拠は乏しい。本研究では、鼓膜が形成される位置や鼓膜形成における第1、2咽頭弓の役割について詳細な比較発生学的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

マウス胚とニワトリ胚において、咽頭弓の前後軸に沿った形態パターンに着目して鼓膜形成過程の解析を行った。マウス胚、ニワトリ胚の様々な胚発生時期における連続組織切片の三次元再構築による鼓膜形成過程の詳細解析、*In situ* hybridization法や遺伝子組み換えマウス胚(*Hoxa2*^{EGFP/+}および*R4::Cre;Roza-CAG-LSL-tdTomato*)を用いた*Hoxa2*遺伝子の発現パターン解析による第1、2咽頭弓境界の可視化、第2咽頭弓が消失して代わりに第1咽頭弓が重複したマウス胚(*Hoxa2*ノックアウトマウス)とニワトリ胚(ウズラ神経堤のロンボメア3-5領域を、ニワトリ胚の同領域と交換移植したキメラ胚)の表現型を詳細に解析した。

4. 研究成果

第2咽頭弓要素が消失し、代わりに第1咽頭弓要素が重複する表現型を示す*Hoxa2*ノック

アウトマウス胚では、鼓膜が重複していた。*Hoxa2*が発現する第2咽頭弓以降の神経堤細胞が蛍光タンパク質で標識されている遺伝子組み換えマウス胚(*Hoxa2*^{EGFP/+}および*R4::Cre;Roza-CAG-LSL-tdTomato*)を用いて、第1、2咽頭弓領域の境界と鼓膜の位置関係を調べたところ、マウスの外耳道の陥入開始と鼓膜形成が第1咽頭弓内で生じていることがわかった。これらの結果から、マウスでは鼓膜形成に第1咽頭弓が中心的な役割を果たすことが示唆された。

一方、ニワトリで*Hoxa2*の発現パターンを調べたところ、外耳道の陥入開始と鼓膜形成が第2咽頭弓内で生じていた。ニワトリとウズラを用いて神経堤の交換移植により第1咽頭弓が重複したキメラ胚を作成したところ、外耳道が縮小して鼓膜が消失し、また異所性の外耳道様陥凹が形成された。このことから、ニワトリの鼓膜形成では第2咽頭弓が中心的な役割を果たし、第1咽頭弓は外耳道形成の一部にのみ関与すると考えられた。

以上の結果より、マウス・ニワトリ双方において、「鼓膜は第1咽頭溝と第1咽頭嚢が第1咽頭弓と第2咽頭弓の境界に沿って会合することで形成される」という従来の理解とは異なることを明らかにした(下図)。また、マウスとニワトリにおいて鼓膜形成に中心的な役割を果たす咽頭弓が異なることから、鼓膜は哺乳類系統と爬虫類・鳥類系統で独立に進化したというこれまでの仮説を支持する新たな発生学的証拠を得ることができた。

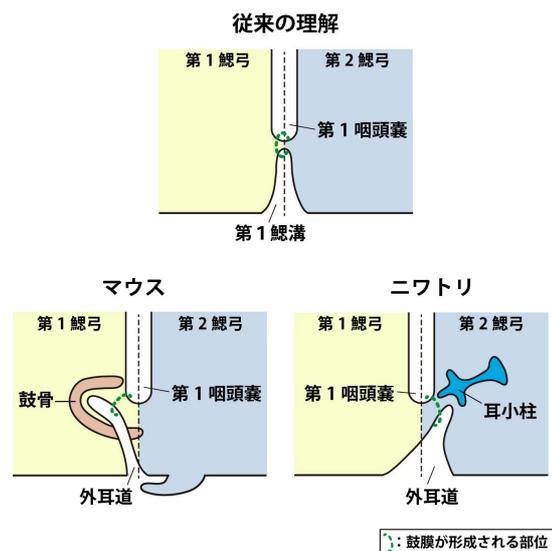


図. 第1、2咽頭弓の境界と鼓膜の形成位置を示した模式図。マウス(左下)とニワトリ(右下)における鼓膜形成過程は、従来の理解(上)と異なっていることを明らかにした。発表論文の図を改変して引用。

<引用文献>

Kitazawa, M.[†], Takechi, M.[†] (†equally contributed), Hirasawa, T., Adachi, N., Narboux-Neme, N., Kume, H., Maeda, K., Hirai, T., Miyagawa-Tomita, S., Kurihara,

Y., Hitomi, J., Levi, G., Kuratani, S., Kurihara, H. (2015) Developmental genetic bases behind the independent origin of the tympanic membrane in mammals and diapsids *Nature Communications*, 6: 6853

Grevell, A. and Tucker, A. S. (2010). The pharyngeal pouches and clefts: development, evolution, structure and derivatives. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 325-332.

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 2 件)

Furutera T.[†], Takechi M.[†] (†equally contributed), Kitazawa, T., Takei, J., Yamada, T., Hoang, V. H., Rijli, F. M., Kurihara, H., Kuratani, S., and Iseki, S. (2017) Differing contributions of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick. *Development*, 144 (18): 3315-3324. doi: 10.1242/dev.149765. 査読有

Takechi M., Kitazawa, T., Hirasawa, T., Hirai, T., Iseki, S., Kurihara, H., Kuratani, S. (2016) Developmental mechanisms of the tympanic membrane in mammals and non-mammalian amniotes *Congenital Anomalies*, 56 (1):12-17. doi: 10.1111/cga.12132. 査読有

[学会発表](計 12 件)

武智正樹 鼓膜は本当に第1咽頭弓と第2咽頭弓の境界に形成されるのか? 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会(シンポジウム招待講演) 2018年

Takechi M., Furutera, T., Kitazawa, T., Rijli, F., Kurihara, H., Kuratani, S., Iseki, S. Differing contributions of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick. Gordon Research Conference, Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration, Il Ciocco, Italy, 2018.

Takechi M., Furutera, T., Kitazawa, T., Takei, J., Yamada, T., Rijli, F. M., Kurihara, H., Kuratani, S., Iseki, S. Differing contributions of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick 50th Annual meeting for Japanese Society of Developmental Biologists, Tower Hall Funabori, 2017

武智正樹 哺乳類中耳の形態進化にお

ける分子発生的背景について. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会(シンポジウム招待講演)長崎大学 2017年

古寺敏子、武智正樹、北沢太郎、栗原裕基、倉谷滋、井関祥子 哺乳類と爬虫類鳥類の鼓膜形成メカニズムはどのように異なるのか? 第39回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2016年

武智正樹 神経堤細胞から形成される顎と中耳の進化発生学. 第39回日本分子生物学会(シンポジウム招待講演)パシフィコ横浜 2016年

武智正樹 中耳の形態進化を発生学的に理解する. 日本進化学会第18回大会東京工業大学(シンポジウム招待講演) 2016年

武智正樹、古寺敏子、顧潔、横山紀典、井関祥子 鼓膜形成の比較発生学的解析. 第6回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting、東京慈恵医科大学、2016年

武智正樹、顧潔、横山紀典、古寺敏子、井関祥子 鼓膜の発生メカニズムとその進化的考察. 第56回日本先天異常学会学術集会 姫路商工会議所 2016年(優秀ポスター受賞)

武智正樹、北沢太郎、平井珠美、横山紀典、栗原由紀子、栗原裕基、倉谷滋、井関祥子、顎と中耳の発生における背腹軸・前後軸に沿ったパターンニング機構の解析. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 郡山ビッグパレット 2016年

武智正樹、北沢太郎、栗原由紀子、井関祥子、栗原裕基、倉谷滋、哺乳類と双弓類は異なる発生機構によって独立に鼓膜を獲得した. 日本進化学会第17回大会 中央大学 2015年

武智正樹、北沢太郎、井関祥子、栗原由紀子、栗原裕基、倉谷滋、なぜ哺乳類のみが3つの耳小骨をもつのか? 第55回日本先天異常学会学術集会 パシフィコ横浜 2015年(優秀ポスター受賞)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

鼓膜の発生過程が従来の理解と異なることを発見

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20170919_2.pdf

6．研究組織

(1) 研究代表者

武智 正樹 (TAKECHI, Masaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・テニユアトラック助教

研究者番号：10455355

(2) 研究協力者

古寺 敏子 (FURUTERA, Toshiko)