

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10047

研究課題名(和文) Shhシグナルによるアクトミオシン細胞内張力を介した歯の形態形成の新たな制御機構

研究課題名(英文) A new function of Shh signaling to control epithelial actomyosin contractility during tooth morphogenesis

研究代表者

山中 淳之(Yamanaka, Atsushi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：80343367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：進化(系統発生)の観点からは、哺乳類のトリボスフェニック型臼歯(多咬頭の臼歯の原型)は、爬虫類の単咬頭の円錐歯に由来するものである。発生(個体発生)の観点からは、哺乳類の臼歯は、シグナリングセンターであるエナメル結節が付加されることにより、歯胚上皮と間葉の境界が複雑な形状になり形成される。本研究では、トリボスフェニック型臼歯からの派生が小さいトガリネズミ(*Suncus murinus*)の臼歯を使って、発生過程におけるエナメル結節の形成位置と順番を詳細に追跡した。トガリネズミの臼歯の発生過程は、中生代哺乳類のトリボスフェニック型臼歯の進化過程を再現するように進行することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進化的観点からは、多咬頭の臼歯は、単咬頭の円錐歯に咬頭が付加されることで長い地質学的時間をかけて進化してきた。一方、発生的観点からは、胎生期の数日の間に、エナメル結節が次々に形成されることで、その位置に咬頭が形成され、多咬頭歯が完成する。発生過程(個体発生)が、進化過程(系統発生)を反復するのか否か、は進化生物学における大きな未解決問題である。本研究は、現生哺乳類の臼歯の発生過程が、化石哺乳類の臼歯の進化過程を反復するように進行することを明らかにしただけでなく、その並行性を生み出すメカニズムに関する示唆を与える。

研究成果の概要(英文)：Phylogenetically, the tribosphenic molars, prototypes of multi-cusped cheek teeth in mammals, are derived from the single-cusped conical teeth of reptiles through the addition of cusps. Ontogenetically, mammalian molars are formed through the interface between the dental epithelium and mesenchyme becoming geometrically complex by adding signaling centers, the enamel knots. To re-evaluate cusp homologies in Mesozoic mammals from an ontogenetic perspective, this study tracked molar development in the modern house shrew (*Suncus murinus*), whose molars are morphologically the least derived from tribosphenic prototypes. The development of house shrew molars proceeded as if it replayed the evolutionary process of tribosphenic molars in Mesozoic mammals. The parallel relationship between ontogeny and phylogeny of mammalian molars, if any, suggests that heterochronic changes during tooth development should have been causal factors for the evolutionary transformation of tooth morphology.

研究分野：歯の発生と進化

キーワード：歯 哺乳類 トガリネズミ 発生 進化 反復 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現生哺乳類の臼歯(類歯)のサイズや形態は驚くべき多様性を示すが(Ungar, 2010)、単孔類を除く現生の全ての有袋類および有胎盤類は、中生代に登場したトリボスフェニック型臼歯を持つ哺乳類(Tribosphenida)の共通祖先から進化してきたと考えられている(Luo et al., 2001, 2002; Luo, 2007)。また、単孔類もトリボスフェニック型臼歯を持つ別系統の中生代哺乳類(Australosphenida)から進化してきたと考えられている(Luo et al., 2001; 2002)。トリボスフェニック型臼歯とは、shearing (sphen) と grinding (tribein) の二つの咬合機能を有した臼歯である(Simpson, 1936)。特に、Tribosphenida 類の真のトリボスフェニック型臼歯は、哺乳類に新たな適応帯への道を開いたと考えられており(Butler, 1972)、新生代には、この臼歯を持つ哺乳類が恐竜絶滅後の空になった生態学的地位に適応放散し、繁栄を謳歌することになる。

進化的(系統発生的)観点からは、トリボスフェニック型臼歯は、元々は爬虫類型の単咬頭の円錐歯から、咬頭を付加させることにより段階的に進化してきたと考えられており(Fig. 1A, B)、その形態の変遷の過程には多くの関心が寄せられてきた(e.g., Osborn, 1888; Crompton, 1971; Butler, 1978; Davis, 2011)。その形態進化は一般に次のように考えられている。爬虫類型の祖先的な状態は、haplodonty とよばれ、単咬頭の円錐歯であった(Fig. 1A₁, B₁)。これに、2つの小咬頭が前後に加わり、近遠心方向に3つの咬頭が一直線に並んだ triconodont form となった(Fig. 1A₂, B₂)。次に、中央の主咬頭が、上顎では舌側に、下顎では頬側に移動することで、上下で逆方向を向いた三角形が配列する symmetrodont form が出現した(Fig. 1A₃, B₃)。上顎の三角形を trigon、下顎の三角形を trigonid と呼び、頂点の元々の主咬頭は、トリボスフェニック型臼歯における上顎の paracone と下顎の protoconid に相当だと考えられている。この逆三角形の臼歯形態は、餌を切り裂く機能をもつ咬合面を増大させた(Crompton, 1971)。さらに、真汎獸類などの Tribosphenida 類の前段階の臼歯では、下顎の trigonid の後方に、talonid と呼ばれる踵のような構造が付加された(Fig. 1B₄)。上顎では近遠心方向に幅が広くなり、舌側に歯帯が張り出し、下顎の talonid とかみ合うようになった(Fig. 1A₄)。そして、上顎の舌側の歯帯に protocone が形成され、下顎の talonid には、複数の咬頭で囲まれた窪み basin が形成され、トリボスフェニック型臼歯となった(Fig. 1A₅, B₅)。元々の切り裂きの機能に、protocone と talonid basin が杵と臼のように、餌をすり潰す機能が加わった。このように、トリボスフェニック型臼歯は、単純な円錐に、咬頭が付加されることで、歯の咬合機能を高めていった。

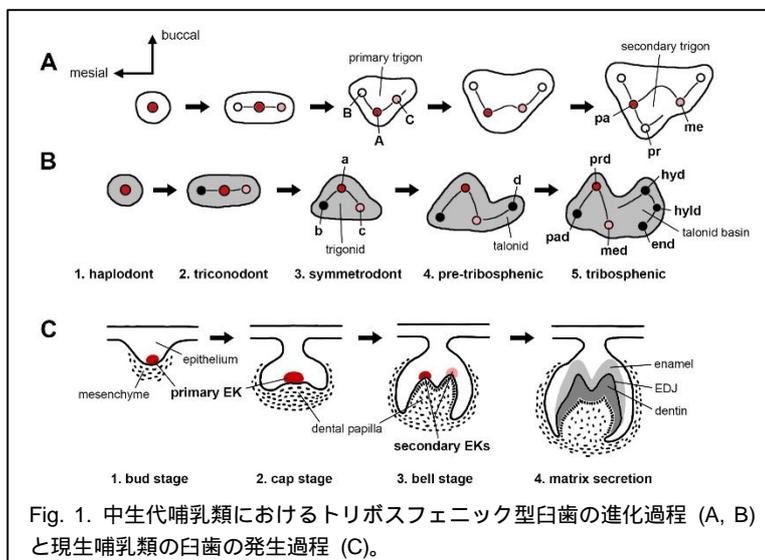


Fig. 1. 中生代哺乳類におけるトリボスフェニック型臼歯の進化過程 (A, B) と現生哺乳類の臼歯の発生過程 (C)。

一方で、発生的(個体発生的)観点からは、現生哺乳類の臼歯の複雑な歯冠形態は、歯胚の上皮と間葉の境界が複雑になることで形成される(Jernvall & Thesleff, 2000; 2012)(Fig. 1C)。歯の発生は、外胚葉由来の歯胚上皮と神経堤由来の歯胚間葉の相互作用により進行し、歯胚上皮の形状により、蕾状期、帽状期、鐘状期と呼ばれる。蕾状期には、歯胚上皮の先端に primary enamel knot (EK) という細胞集団が出現する(Fig. 1C₁)。この primary EK は、様々なシグナル分子を分泌するシグナリングセンターであり(Vahtokari et al., 1996)、周囲の上皮と間葉の細胞の増殖や分化を促進させるが、自身の細胞は増殖因子に対する受容体を持っていないので増殖しない(Jernvall et al., 1994; Kettunen et al., 1998, 2000)。その結果、primary EK を頂点に歯胚上皮が内側に窪み、帽状期となり、歯胚上皮の内側に入った間葉を歯乳頭と呼ぶ(Fig. 1C₂)。次の鐘状期になると、secondary EK と呼ばれるシグナリングセンターが複数個出現する(Fig. 1C₃)。これら secondary EKs は、primary EK と同様の働きを持つので、これらを頂点にして、上皮と歯乳頭の境界が深く陥入する(Jernvall et al., 1994)。その後、この境界の歯乳頭側に象牙質の基質が、上皮側にエナメル質の基質が形成され、歯冠が完成する(Fig. 1C₄)。歯胚上皮と歯乳頭の境界の形状が、将来のエナメル-象牙質の形状に相当し、secondary EKs の形成位置が咬頭の位置を決定する(Jernvall et al., 2000)。すなわち、発生の過程において、単純な形状の歯胚に secondary EKs が付加的に形成されることにより、複雑な多咬頭の臼歯の形態が形成される。

2. 研究の目的

では、中生代哺乳類の臼歯の進化過程と、現生哺乳類の臼歯の発生過程の間には、何かしら形態の変遷に関する関係性は存在するのだろうか? ヘッケルの生物発生原則が言うように、地質

学的な非常に長い時間をかけた臼歯の形態変化の過程を、極めて短時間で起こる臼歯の形態形成の過程が反復するような、並行性は存在するのだろうか？この問いに答えるためには、有胎盤類のトガリネズミや有袋類のオポッサムに見られるような、トリボスフェニック型臼歯からの形態的派生が小さい臼歯を使って、その形態形成過程を詳細に追跡する必要がある。本研究は、実験動物としてトガリネズミ科のジャコウネズミ (*Suncus murinus*) を導入して、上下顎第 1 大臼歯 (M^1 , M_1) の形態形成過程を追跡した。

3. 研究の方法

- (1) ジャコウネズミの胚子の収穫
- (2) ジャコウネズミの遺伝子クローニング
- (3) 連続組織切片と *in situ* hybridization
- (4) 連続組織切片からの 3 次元再構築
- (5) 免疫染色

4. 研究成果

(1) 上顎第 1 大臼歯の形態形成

E20 から E25 までの M^1 の形態形成過程では、歯胚のサイズの増大と、上皮と歯乳頭の境界形状の複雑化が見られた (Fig. 2A)。

Shh は、歯胚の形態形成の伴い、咬頭の形成位置に先行して発現し、その後咬頭全体を覆うような広い発現を示した (Fig. 2B)。帽状期の E20 では単一の近遠心方向に細長い発現を示し、これが primary EK の位置を示した。E21 では、発現領域が近遠心方向に 2 つに分かれ、近心では発現領域の拡大が見られ、遠心では尻尾のような細長い発現が見られた。近心の発現は将来の paracone の形成位置、遠心の発現は将来の metacone の形成位置に対応していた。E22 では、歯乳頭の近遠心方向への成長とともに両者の発現が拡大した。また近心の発現は、歯乳頭の舌側への成長にとともに舌側方向への拡大を見せた。E23 になると、*Shh* の近心および遠心の発現は、paracone と metacone の歯乳頭の膨らみを覆うように拡大した。また舌側方向への発現の拡大は続き、将来の protocone の位置にまで達した。その後、この舌側の発現は、拡大する歯乳頭を覆うように拡大した。

Fgf4 は、一方で、*Shh* と比較すると、発現領域が小さく、咬頭や稜の形成位置に局限した発現を示した (Fig. 2C)。帽状期の E20 では、*Shh* と同様に単一の近遠心方向に細長い発現を示し、primary EK に相当した。E21 では、*Shh* の近心の発現と同じ位置に *Fgf4* の発現は局限したが、その発現領域は *Shh* と比較すると範囲が小さくスポット状であった。*Shh* の遠心の発現位置に

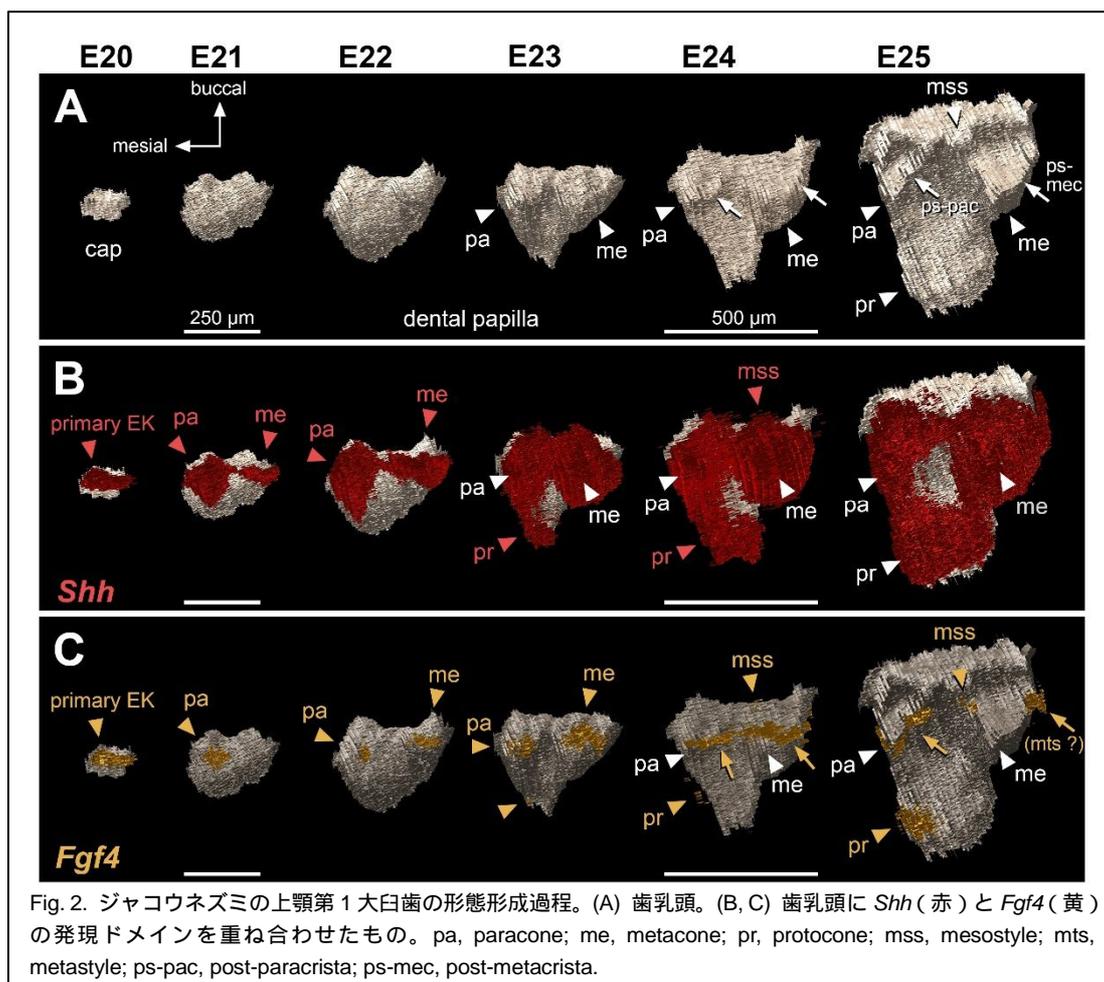


Fig. 2. ジャコウネズミの上顎第 1 大臼歯の形態形成過程。(A) 歯乳頭。(B, C) 歯乳頭に *Shh* (赤) と *Fgf4* (黄) の発現ドメインを重ね合わせたもの。pa, paracone; me, metacone; pr, protocone; mss, mesostyle; mts, metastyle; ps-pac, post-paracrista; ps-mec, post-metacrista.

は *Fgf4* の発現は確認できなかった。この近心の *Fgf4* の発現はその後も継続し、E23 にはまさにその位置に paracone の歯乳頭の膨らみが形成された。つまり、上顎大臼歯の歯胚では、帽状期の primary EK の発現が受け継がれ、鐘状期初期の最初に出現する secondary EK となり、それが将来の paracone の位置を決定した。一方で、E21 では、歯胚の遠心部には *Fgf4* の発現は見られなかったが、E22 になると、*Shh* の遠心の発現領域の中心に *Fgf4* の新たな発現が出現した。つまりこれが 2 番目の secondary EK であり、E23 では、その位置に metacone の膨らみが形成された。E23 では一部の歯胚で、舌側に伸びる歯乳頭の先端にかすかな *Fgf4* の発現が確認できた。E24 以降、その位置に *Fgf4* の発現が確認され、E25 では明確なスポット状の発現となった。この 3 番目の secondary EK は将来の protocone の位置を対応していた。

paracone と metacone の形成位置に対応する *Fgf4* の発現は、E23 まではスポット状の発現を示すが、E24 には、細長いひも状の発現を示すようになる。それらは、paracone と metacone の将来の咬頭頂から遠心頬側に伸びる稜に沿って発現していた。E25 になると、最も発達がよい metacone では *Fgf4* の発現は metacrista の遠心端にのみ見られ、咬頭頂付近では発現がなくなった。paracone では、遠心に伸びる post-paracrista および近心に伸びる paracrista に沿って細長い発現が見られた。

さらに、頬側の歯帯領域の中央部分では、E24 に *Fgf4* の新たな発現が出現したが、これは metacone の発現とは明らかに別個のものだった。E25 では、この *Fgf4* の発現位置の直下に歯乳頭の膨らみが形成され、将来の mesostyle に対応した。

(2) 下顎第 1 大臼歯の形態形成

E20 から E25 までの M_1 の形態形成過程では、 M^1 と同様に、歯胚のサイズの増大と、上皮と歯乳頭の境界形状の複雑化が見られた (Fig. 3A)。

Shh は、上顎と同様に、歯胚の形態形成の伴い、咬頭の形成位置に先行して発現し、その後咬頭全体を覆うような広い発現を示した (Fig. 3B)。帽状期の E20 では単一の近遠心方向に細長い発現を示し、これが primary EK の位置を示した。E21 では、*Shh* が歯乳頭の前部を覆うように発現が拡大した。E22 では、protoconid の歯乳頭の膨らみは完全に *Shh* の発現により覆われ、metaconid の方へ発現を広げた。E23 では、metaconid も *Shh* の発現で覆われ、将来の paraconid と、遠心の talonid の部位が *Shh* の発現がまだ見られなかった。E24 には、paraconid と hypoconid の位置にも *Shh* の発現が広がり、E25 には entoconid の位置にも発現が見られた。歯胚上皮における *Shh* の発現は、最初エナメル結節に限局して見られるが、その後、エナメル芽細胞の前駆細胞やエナメル器の内部の細胞にも発現が広がっていく。しかし、基質形成を開始したエナメル芽細胞では発現が消失する。E25 では基質形成の進んだ protoconid の咬頭頂付近で、*Shh* の発現が見られなくなった。

Fgf4 は、一方で、 M^1 で見られたのと同様に、*Shh* と比較すると、発現領域が小さく、咬頭や稜の形成位置に限局した発現を示した (Fig. 3C)。帽状期の E20 では、*Shh* と同様に単一の近遠

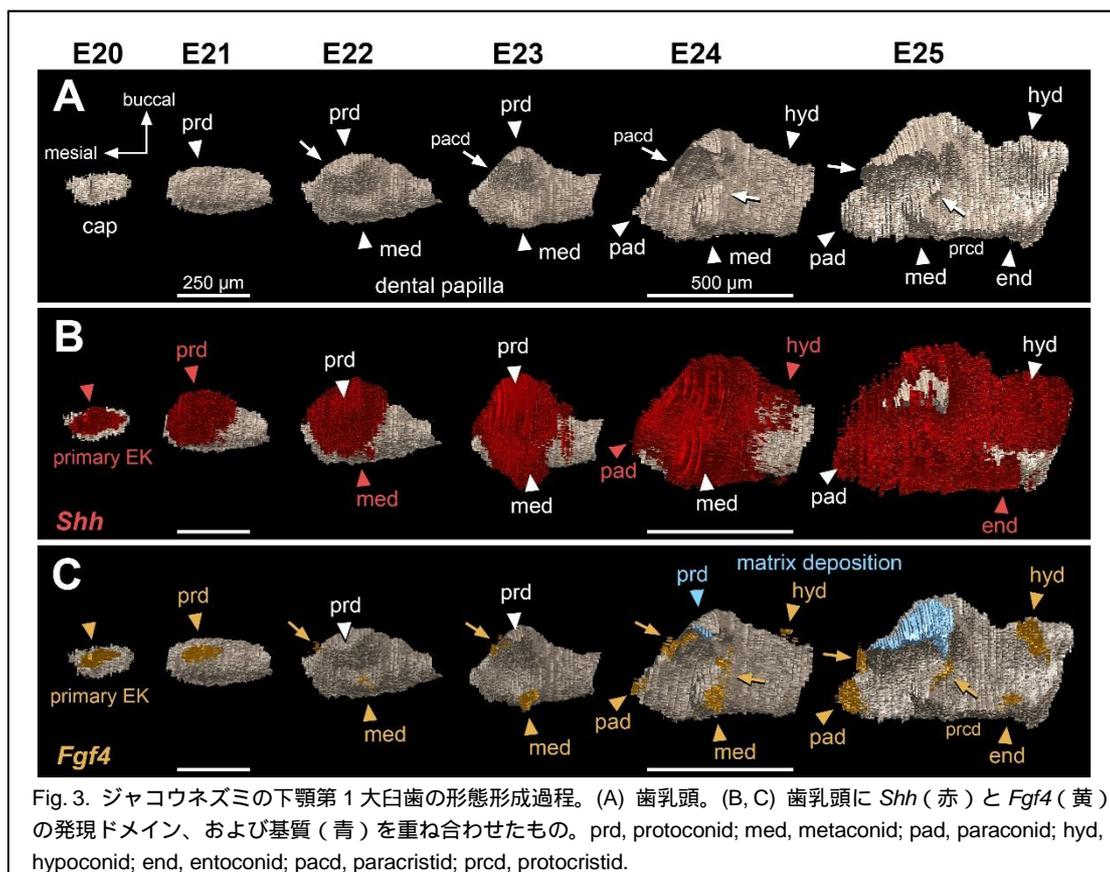


Fig. 3. ジャコウネズミの下顎第 1 大臼歯の形態形成過程。(A) 歯乳頭。(B, C) 歯乳頭に *Shh* (赤) と *Fgf4* (黄) の発現ドメイン、および基質 (青) を重ね合わせたもの。prd, protoconid; med, metaconid; pad, paraconid; hyd, hypoconid; end, entoconid; pacd, paracristid; prcd, protocrisid.

心方向に細長い発現を示し、primary EK に相当した。E21 では、歯胚前方の *Shh* の発現と重なる位置に *Fgf4* の細長い発現が見られたが、その発現領域は *Shh* と比較すると範囲が小さかった。この *Fgf4* の発現領域は将来の protoconid の位置であった。つまり、下顎大臼歯の歯胚では、帽状期の primary EK の発現が受け継がれ、鐘状期初期の最初に出現する secondary EK となり、それが将来の protoconid の位置を決定した。E22 になり、protoconid の歯乳頭の膨らみが増すと、頂上付近では *Fgf4* の発現が無くなり、近心部に発現が限局した。さらに、protoconid の遠心舌側に新たな *Fgf4* の発現が出現し、その位置に metaconid の膨らみが形成された。つまりこれが 2 番目の secondary EK であり、metaconid の位置を決定した。E23 から、protoconid の咬頭頂の近心の *Fgf4* の発現に沿って paracristid の稜線が形成された。また、同じように、E24 からは、metaconid の *Fgf4* の発現が頰側方向に細長くなり、その後その発現に沿って protocristid の稜線が形成された。E24 では、trigonid の近心舌側端に新たな *Fgf4* の発現が出現し、その後、その位置に paraconid の歯乳頭の膨らみが形成された。つまり、これが trigonid の 3 番目の secondary EK であった。

遠心の talonid の領域では、E24 に頰側の *Fgf4* の発現が出現し、これが hypoconid の位置を決定した。E25 には、talonid の舌側にさらに新たな *Fgf4* の発現が出現し、これが entoconid の位置を決定した。つまり、talonid の形成される secondary EK の順番は、hypoconid, entoconid の順番であった。hypoconid の発現はその後遠心舌側方向に細長くなるが、次第に発現が舌側に限局するようになった。

(3) 結論

現生哺乳類の臼歯の基本形であるトリボスフェニック型臼歯からの形態的派生が最小限であるトガリネズミ科ジャコウネズミの上顎および下顎大臼歯について、帽状期からの形態形成過程、および咬頭位置の決定に密接に関連するシグナリングセンター、エナメル結節の形成順序と形成位置をまとめると Fig. 4 のようになる。これは、ジャコウネズミの胎生期のわずか 5 日程度の間、将来のエナメル - 象牙境の形状がより複雑になり、将来の咬頭の数も増加していく過程を示している。この現生種の大臼歯の発生過程を、長い地質学的時間をかけて、爬虫類型の単咬頭の円錐歯から哺乳類のトリボスフェニック型臼歯が変遷してきた進化過程 (Fig. 1A, B) と比較すると、以下のような結論をえる。

最初に形成される 2 次エナメル結節は上顎の paracone と下顎の protoconid の形成位置を決定する。

稜はエナメル結節の伸長や移動により形成される。

現生トガリネズミの大臼歯の形態形成過程は、中生代哺乳類のトリボスフェニック型臼歯の進化過程を再現するように進行する。

定性的な比較ではあるが、現生ジャコウネズミの大臼歯の形態形成過程は、中生代哺乳類のトリボスフェニック型臼歯の進化過程を反復しているように見える (Fig. 1A, 1B, 4A, 4B)。もし本当に、臼歯の個体発生が系統発生を反復するのならば、それはどのように生みだされたのだろうか。S. J. Gould は、個体発生と系統発生の関係性を、発生のタイミングの変化を要因とした heterochrony の概念としてまとめ、反復はその中の一つの結果であると結論した (Gould, 1977; Alberch et al., 1979)。彼の考案した時計モデルによれば、発生と進化の反復は以下の 2 つの条件下で生みだされるという。1 つ目は、祖先種に比べて子孫種において、形態形成におけるサイズの増大に対する形の複雑さの増大の比率が大きくなった場合である。2 つ目は、祖先種と子孫種で、サイズと形の相関はあまり変化しないが、形態形成のスピードが促進されるか、形態形成の期間が延長されより大きな歯が形成された場合である。

J. Jernvall らは、歯の形態形成において形の複雑さを増大させる(すなわち、咬頭数を増やす) 因子を探索した。EDA や activin A signaling の活性化や、Shh signaling の抑制は歯の複雑さを増大させることを示した (Harjunmaa et al. 2012)。この内、activin A の活性化や Shh の抑制は、サイズに対する咬頭数を増加させる(つまり咬頭の密度が高くなる)。したがって、中生代哺乳類にこれらの signaling の変化が起こった場合、前述の 1 つ目の理由で多咬頭歯の発生と進化の反復が起こりうる。一方で、EDA の活性化は、咬頭数を増加させるが歯胚のサイズも増加させる(つまり咬頭の密度はあまり変化しない) (Harjunmaa et al. 2012)。さらに、彼らは Eda-null マウスでは歯の形態形成速度がスローダウンし咬頭数が減少するが、EDA タンパクを添加すると、濃度勾配的に形態形成スピードが促進され咬頭数が増加することを示した (Harjunmaa et al. 2014)。つまり、前述の 2 つ目の理由で反復が起こりうる。

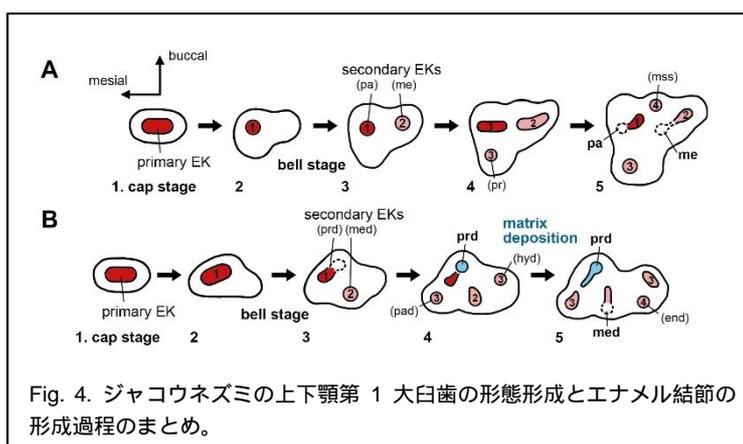


Fig. 4. ジャコウネズミの上下顎第 1 大臼歯の形態形成とエナメル結節の形成過程のまとめ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamanaka Atsushi	4. 巻 64
2. 論文標題 Evolution and development of the mammalian multicuspid teeth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 165 ~ 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2022.03.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haider Y, Morita W, Iwai H, Kuramoto E, Goto T, Nakamura N, Yamanaka A
2. 発表標題 Developmental assessment on the cusp homologies between the premolar and the molar
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中淳之, Haider Y, 森田航, 岩井治樹, 倉本恵梨子, 後藤哲哉
2. 発表標題 歯冠の発生メカニズムに基づいた「小臼歯相似説」の検証
3. 学会等名 第75回日本人類学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中淳之, Yasin Haider, 田口うらら, 倉本恵梨子, 岩井治樹, 後藤哲哉
2. 発表標題 現生トガリネズミの大臼歯における咬頭形成の発生的順番：中生代哺乳類のトリボスフェニック型臼歯の進化への発生的考察
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術大会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中淳之, 後藤哲哉
2. 発表標題 歯胚上皮の陥入および形態形成過程初期における非筋ミオシンIIの役割
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka A, Morita W, Haider Y, Goto T
2. 発表標題 Developmental assessment of cusp formation in the modern shrew's molar: an implication for the evolution of the tribosphenic molar in Mesozoic mammals
3. 学会等名 14th Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中淳之
2. 発表標題 現生トガリネズミ科の臼歯の発生過程：歯の発生と進化の並行性に関する考察
3. 学会等名 日本哺乳類学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中淳之, Haider Y
2. 発表標題 現生トガリネズミ科の臼歯の形態形成過程：哺乳類の多咬頭歯の進化発生学的考察
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中淳之, Haider Y, 森田航, 後藤哲哉
2. 発表標題 歯の発生メカニズムに基づく小白歯と大白歯の咬頭の相同性
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haider Y, Iwai H, Kuramoto E, Goto T, Nakamura N, Yamanaka A
2. 発表標題 Differences in morphogenetic process between the premolar and the molar
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022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	中富 満城 (Nakatomi Mitsushiro) (10571771)	産業医科大学・産業保健学部・准教授 (37116)	
研究 分担者	大峽 淳 (Ohazama Atsushi) (40266169)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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			
米国	University of California, San Francisco	University of California, Los Angeles		
フィンランド	University of Helsinki	Geological Survey of Finland		