

# 学位論文の要約

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 ゲノム再生医学講座 薬理ゲノミクス分野	氏 名	門馬 康之 もんま やすゆき
-----	---	-----	-------------------

## 主論文の題名

Aging-associated microstructural deterioration of vertebra in zebrafish

(老化に関連するゼブラフィッシュ椎骨のミクロの内部構造的な劣化)

Yasuyuki Monma, Yasuhito Shimada, Hiroko Nakayama, Liqing Zang,  
Norihiro Nishimura, Toshio Tanaka

Bone Reports

Received : December 11, 2018

Accepted : July 12, 2019

## 主論文の要約

### Introduction (導入)

モデル動物としての硬骨魚は、分子経路における哺乳類との多くの類似点と、パターンニングの始まりと骨格構造の成長に関するメカニズムの研究に使用されています。解剖学および硬骨魚と哺乳類の骨格の発達の特徴は、同一の骨で形成された頭蓋骨、軸骨、体肢骨格の多くや、発達イベントと骨格形成、軟骨の形成とそれに続く骨形成を含めたメカニズムが非常によく似ています。ゼブラフィッシュは、多くの構造と骨格系を含むヒトとの表現型の類似性、および一般的な病態生理学的要因のために、多数のヒト疾患をモデル化するpathwaysとして使用されています。

### Background (背景)

発達上の病気と骨形成で骨中毒薬の発見のために使われる数種類のゼブラフィッシュモデルがあります。しかし、ほとんどのレポートが老化魚の骨の退行性の変化についての報告はありません。

### Objectives (目的)

この研究では、ゼブラフィッシュの骨老化モデルとしての使用を評価するために、成体ゼブラフィッシュの椎骨のマイクロCT分析を行い、皮質骨および骨梁の構造パラメーターを研究しました。これは、骨粗鬆症などの変性障害の骨形態学的変化の哺乳類パラメーターに対応しています。

## Methods (方法)

3～12か月齢のオスとメスのゼブラフィッシュを、受精後3、6、9、および12か月 (mpf) の4つのグループに割り当てました。3-DマイクロCTスキャンは、生体内システムR<sub>m</sub>CT 3DマイクロCTスキャナー (リガク、東京、日本) を使用し、設定は、電圧、90 kV。電流、150  $\mu$  A;倍率、20倍。スライス厚さ (スキャン幅) 10  $\mu$  m、暴露時間2分で行ないました。

スキャン後、画像データはワークステーションに転送され、TRI / 3D-BONソフトウェアを使用して、骨化の指標と程度を計算しました (Ratoc System Engineering、東京、日本)。

TRI/3DBONは、海綿骨の視覚化と形態測定分析のために3次元モデルを連続断層撮影データセットから作り上げます。マイクロCT分析のボクセル・サイズは、10の  $\mu$  mです。イメージは、i-ViewタイプRソフトウェア (モリタ東京製作所製造、日本国京都) を用いて再構築されました。

ゼブラフィッシュ椎骨の分析のために、先頭の尾椎 (FCV) を選択しました。デジタル画像はAtlas TIFF Converter (Rigaku) を使用して16ビットグレースケールTIFF形式に変換し、TRI / 3D-Bonソフトウェアにインポートして、骨密度 (BMD) および骨塩含有量 (BMC) 測定、ヒドロキシアパタイト検量線を作成しました。得られたCT値から四面体を使用して骨量体積 (BV) を計算しました。海面骨部分の体積としてのTissueVolume (TV) は、対象椎骨の海面骨領域の全量です。それらの値から海綿骨部分の骨量の密度 (BV/TV) が計算されました。骨梁骨の厚み (Tb.Th, Trabecula Thickness) と骨梁骨数 (Tb.N, Trabecula Number) 、骨梁骨表面積 (V\*tr) と組織の星型の見通し空間 (V\*m) が計算されました。

統計分析は、Student's t-test、または一元配置分散分析を使用して実行されました。

## Results (結果)

CT画像から海綿骨内骨梁骨と皮質骨のBVを定量化しました。海綿骨の中の骨梁にあたるBVは雌雄両性の9 mpfゼブラフィッシュで劇的に減少しました。しかし、そのような変化は皮質骨BVには見られませんでした。骨梁骨のBMCはゼブラフィッシュの加齢とともに減少しました。しかし、骨梁骨BMCとは対照的に、骨梁骨BMDは変化しませんでした。一方、皮質骨のBMCは年齢とともに変化しませんでした。皮質骨のBMDは増加しました。

次に、BV/TVを評価しました。組織量は年齢とともに増加する傾向 (有意性なし) を示しましたが、BV/TVは雌雄の両方で年齢とともに継続的に減少しました。

さらに、Tb.ThとTb.Nの定量化を行ないました。Tb.ThとTb.Nの両方が加齢とともに減少することが観察されました。

骨梁ネットワークの不連続による構造完全性の低下についても定量化をしました。私たちは骨

梁骨表面積 ( $V^{*tr}$ ) と海綿骨領域内の見通し空間容積 ( $V^{*m}$ ) を分析しました。 $V^{*tr}$ および $V^{*m}$ は、表面積サイズと空間サイズの絶対的で合理的に正確な推定値を提供します。私たちの解析結果は、 $V^{*tr}$ は加齢とともに減少し、骨梁の大きさがTb.Thと同様に、より小さく、より薄くなることを示しました。また、 $V^{*m}$ は、加齢とともに増加し、海綿骨領域内の空間が広がっていることを示しました。

私たちは、45 mpfゼブラフィッシュ骨梁の構造解析も実施しました。しかし、椎骨内骨化が結果の正確さを妨げました。そのことに加えて、これらの超老魚になったゼブラフィッシュは、普通の骨のまわりでも異所的な石灰化を示しました。

### Consideration (考察)

BVの減少に伴う骨梁BMDの変化は、椎骨の骨梁骨 (BV) の体積 (または数) の減少がそれらの相対ミネラル密度 (BMD) を増加させ、脊椎全体の強度を維持することを示します。

$V^{*m}$ の結果は、加齢により不明瞭な (骨梁が存在しない) 組織腔内の領域が拡大し、より大きな $V^{*m}$ 空間ができたこと、と $V^{*tr}$ の結果は、骨梁の厚さ、数、および体積を失ったため、加齢による骨梁の結合性が低くなることを示しています。

### Conclusion (結論)

ゼブラフィッシュは、発生生物学に先天性のヒトの疾患と老化の筋骨格システムのための優れた典型的な生物として証明されました。しかし、ゼブラフィッシュの椎骨が小さいサイズのために、哺乳類で練り上げられるように、ゼブラフィッシュの骨に関する微細構造を研究した論文がありません。私たちの知る限り、これはゼブラフィッシュの構造パラメーターを定量化する最初の研究であり、骨の老化、特に三次元構造上の研究におけるモデル生物としてのゼブラフィッシュの有効性を実証しています。マイクロCT解像度のさらなる改善は必要です。そして、ゼブラフィッシュは、試験化合物の経口投与プロトコルの開発により、免疫組織化学または遺伝子発現分析とともに、更年期の骨粗鬆症を含む老化に関連する骨劣化および骨変形に対する長期化学スクリーニングのモデル生物として機能する可能性があります。