

ゼブラフィッシュとメダカの摂食・呼吸に関わる頭部骨格の立体構造
 : 歯の発生過程における X 線屈折コントラストマイクロ CT 解析
**Phase contrast X-ray micro CT analysis of the 3D structure of the developing
 teeth and head skeletal elements that are involved in
 feeding and respiration in the zebrafish and medaka fish**

山本 珠実^a、吉田 圭祐^b、橋本 琢人^b、籠島 靖^b、上杉 健太郎^c、
 竹内 晃久^c、鈴木 芳生^c、伊藤 真理子^a、磯田 恵里佳^a、八田 公平^a
**Tamami Yamamoto^a, Keisuke Yoshida^b, Takuto Hashimoto^b, Yasushi Kagoshima^b, Kentaro Uesugi^c,
 Akihisa Takeuchi^c, Yoshio Suzuki^c, Mariko Itoh^a, Erika Isoda^a, Kohei Hatta^a**

^a兵庫県立大学(University of Hyogo)大学院生命理学研究科生体情報学 I 分野

^b兵庫県立大学(University of Hyogo)大学院物質理学研究科 X 線光学分野

^c高輝度光科学研究センター(JASRI)

アブストラクト

X 線屈折コントラストマイクロ CT 法を用い、ゼブラフィッシュとメダカ胚、頭部骨格系、とくに歯の 3 次元観察を行った。4%パラフォルムアルデヒドで固定した受精後 9~10 日目の胚を、パラフィン固定してガラスチューブに封入し、ピクセルサイズ 1 μ m の設定で CT 撮影を行い、立体構築を行った。その結果、歯の形態、大きさ、立体配置、方向等の詳細が明らかとなり、これらが二種間において著しく異なることが示された。

Abstract

We analyzed and compared three-dimensional structures of the head skeletal elements, especially teeth, of larval zebrafish and medaka fish by X-ray phase-contrast micro computer tomography (CT) using the SPring-8 synchrotron. Fixed larva at 9-10 days after fertilization were inserted in a glass tube to perform CT at the pixel size 1 micron, and then, their 3D images were constructed. We elucidated detailed differences in number, size, morphology and distribution between the teeth in two species. Our results will serve as a basis for the further studies on the development and function of the teeth in these model vertebrates.

背景と研究目的：

脊椎動物の頭部骨格系は、発生初期における脳の最も背側にある細胞群、神経堤細胞が、腹側に移動することによって形成される。その一部である歯は、神経堤細胞が間充織となり、その移動先の上皮組織とが相互作用することによって形成される。歯の形態と位置は動物種において様々であり、また人の奥歯と前歯に代表されるように、ひとつの個体の中でも場所によって異なる複雑な形態の違いを持っている。しかしながら、そのような形態の違いが、どのような分子機構や、細胞相互作用によって生じるかは未だに明らかにされていない。

ゼブラフィッシュやメダカはもっとも単純な脊椎動物の実験材料として様々な遺伝子、細胞レベルでの研究に適しているが、歯の形成についても重要なモデルとなっている。たとえば、私達は、転写調節因子 *Engarailed* が歯の初期発生において上皮と間充織の両方で発現することを、はじめて報告した (文献 1)。また、新しく開発した蛍光イメージング法 (文献 2) を用いて、初期の神経堤の細胞移動パターンを明らかにした。

一方、歯は、その後、体の中でも比較的奥のほうで発生が進むため、その立体構造の形成過程を解析することは難しかった。マイクロ X 線 CT を用いれば、その難点を克服できる可能性があるが、そのような試みはなされていない。そこで、私達は、今回、固定サンプルを用いた CT 観察を行い、実験条件の検討を行った。

実験：

兵庫県立大学・播磨科学公園都市キャンパスの生体材料センターで飼育している野生型のゼブラフィッシュとメダカを各々掛け合わせて卵を回収し、28.5 $^{\circ}$ C で育て、受精後 9 日目から 10 日目に、4%パラフォルムアルデヒド液で固定した。アルコール脱水、アセトン処理のあと、パラフィンに包埋し、厚み 0.01mm、外径 0.5~1.0mm のガラスチューブに入れた状態で体軸の周りに回転させながら、ピクセルサイズ 1 μ m の設定で X 線屈折コントラストマイクロ CT を行った。得られたデータから、3 次元画像を構築し、二種類の魚類の胚の歯の立体構造を比較した。

結果、および、考察：

X線屈折コントラストマイクロCTの後、画像処理した横断面では、神経組織などの組織内の細胞核をほぼ単細胞レベルで識別することができた。また、軟骨組織も横断切片では比較的是っきりと観察することができた。しかし、3D構築すると、他の軟組織に埋もれてしまい、画像化は難しいことがわかった。一方、耳石、脊索・顎・鰓弓のうち骨化が起こっている部分では、コントラストが高く、これらについては、その詳細な立体構造を画像化することができた (Fig. 1, Fig. 2)。

ゼブラフィッシュ胚では、咽頭の第5鰓弓の腹側でのみ、左右に各々数本の巨大な歯が、体の中央後方に向けて伸びていることが観察された。一方、メダカ胚では、咽頭のうち、より広い領域で、多数の小型の歯が上下から伸びている様子が観察された。このように、発生途上にある2種のモデル生物における、歯の形態、数、分布の立体構造と、その両者における違いが、詳細に明らかになった。

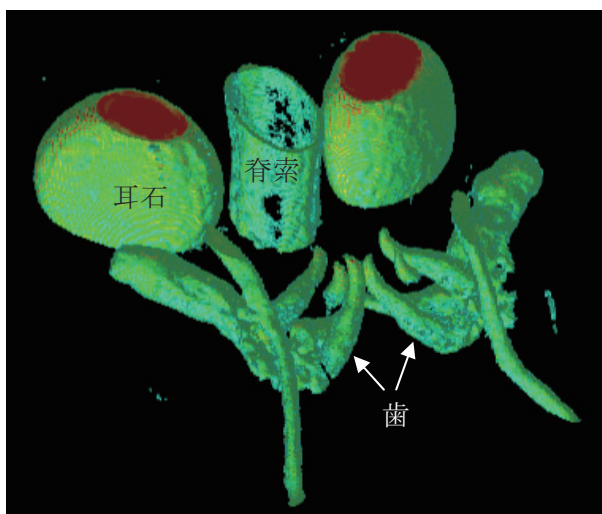


Fig. 1. ゼブラフィッシュ10日目胚における歯の立体構造 (前方：上、腹側から見た図)

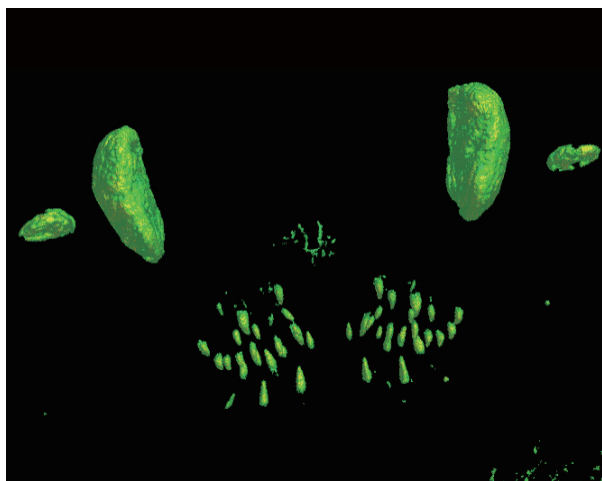


Fig. 2. メダカ9日目胚の歯の立体構造

今後の課題：

この研究によって、ゼブラフィッシュとメダカ胚の歯に著しい形態的な違いがあることが、はっきり示された。このことは、異なる形態、サイズ、数、分布をもった歯が個体発生において生じてくる仕組み、特に、神経堤細胞と咽頭の上皮細胞との間の相互作用、転写因子・シグナル分子の果たす役割について調べる際に、これらの種が、よいモデルになることを示唆している。両種の利点を生かし、細胞や遺伝子レベルでのマニピュレーションを行い、その結果を、CTによって解析することにより、複雑な形態形成の基盤となる分子および細胞機構を明らかにしたい。

一方、軟骨を他の軟組織と区別してイメージングすることが今回の条件では難しいことが判明したので、より、骨化の進んだ時期（成体など）を使い、異なる形態をもった歯が摂食や呼吸の際にどのように生かされるのか、その運動機序と形態および機能との関連を、生体でのX線屈折コンストラストイメージングによって明らかにしていきたい。

参考文献：

- 1) [Hatta, K., BreMiller, R. A., Westerfield, M., Kimmel, C. B.](#) Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development* **112**, 821-832 (1991)
- 2) [Hatta, K., Tsujii, H., Omura, T.](#) Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. *Nature Protocols* **1**: 960 - 967 (2006)

論文発表状況・特許状況：

論文発表準備中

キーワード：

神経堤、歯、ゼブラフィッシュ、メダカ、屈折コントラスト X 線マイクロ CT、脊椎動物、鰓弓、咽頭

を比較するという当初の目的が、実行可能であることがわかった。現在3次元画像の再構築を、撮影したすべてのサンプルについて行っている。これらの比較群において、骨微小構造に統計的に有意な違いがあるかどうかを検討するには、特徴的構造を定量化する必要があり、具体的な方法は今後の課題である。

参考文献：

- 1) Tatsumi *et al*, Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 5, 464-475 (2007)
- 2) Kanzaki *et al*, Resorption of auditory ossicles and hearing loss in mice lacking osteoprotegerin. *Bone* 39, 414-419 (2006)
- 3) Jochum *et al*, Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.* 6, 980-984 (2000)
- 4) Wang *et al*, Bone and haematopoietic defects in mice lacking *c-fos*. *Nature* 360, 741-745 (1992)
- 5) Naito *et al*, Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signaling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4, 353-362 (1999)
- 6) Momose *et al*, Phase tomography by X-ray Talbot interferometry for biological imaging. *Jpn J Appl Phys.* 45, 5254-5262 (2006)

論文発表状況・特許状況：
(論文作成中)

キーワード：

骨リモデリング：局所でおこる破骨細胞による骨吸収と、それに引き続く骨芽細胞による骨形成。このバランスが骨吸収に偏ると骨量が減少し、骨粗鬆症などをおこす。

骨細胞：骨芽細胞は骨形成後、骨基質の中に埋もれて骨細胞となる。近年、骨細胞が骨リモデリングの制御に関与することが明らかになったが、その詳しいメカニズムは明らかになっていない。

骨細管：骨基質に埋もれる骨細胞間、もしくは骨細胞と骨表面などをつなぐ直径 300nm 程の管。この骨細管中に骨細胞は樹状突起を伸ばし、自身を維持する栄養を得たり、骨基質に生じた微小骨折や骨へのメカニカルストレスを感知したりして、骨リモデリングを誘導するとされている。

位相差 X 線顕微鏡