

魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究：宇宙実験に基づいた骨疾患の治療薬の開発

金沢大学 鈴木信雄、JAXA 矢野幸子、ハムリー（株） 関 あずさ、神奈川歯科大学 高垣裕子、
金沢大学 関口俊男、染井正徳、北村敬一郎、富山大学 田淵圭章、岡山大学 池亀美華、東京海洋大
学 遠藤雅人、高知学園短期大学 三島弘幸、東京医科歯科大学 服部淳彦

Fish Scale Study for Space Biology: Development of the therapeutic drug of the bone disease with a space experiment

*Nobuo Suzuki*¹, *Sachiko Yano*², *Azusa Seki*³, *Yuko Mikuni-Takagaki*⁴, *Toshio Sekiguchi*¹, *Masanori Somei*¹, *Kei-ichiro Kitamura*⁵, *Yoshiaki Tabuchi*⁶, *Mika Ikegame*⁷, *Masato Endo*⁸, *Hiroyuki Mishima*⁹, *Atsuhiko Hattori*¹⁰

¹Inst. of Nat. and Environ. Technol., Kanazawa Univ.; ²Japan Aerospace Exploration Agency; ³Hamri Co. Ltd.; ⁴Kanagawa Dent. Univ. Grad. Sch. of Dentistry; ⁵Inst. of Health Sci., Kanazawa Univ.; ⁶Life Sci. Res. Ctr., Univ. of Toyama; ⁷Grad. Sch. of Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.; ⁸Fac. of Marine Sci., Tokyo Univ. of Marine Sci. and Technol.; ⁹Kochi Gakuen Coll.; ¹⁰Coll. of Liberal Arts Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.

Correspondence: Noto Marine Laboratory, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan (Nobuo Suzuki) E-Mail: nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp

Abstract: We have reported that a novel derivative (1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin: BTBM) suppressed osteoclastic activity but increased osteoblastic activity using goldfish scales that contain osteoclasts and osteoblasts. Bone matrix of fish scales consists of type I collagen and hydroxyapatite and is similar to that of mammalian membrane bone. In addition, calcemic hormones such as calcitonin, parathyroid hormone, and prostaglandin E₂ function in osteoclasts and osteoblasts of goldfish scales as they do in mammals. Also, the scale osteoclasts and osteoblasts responded sensitively to low-gravity acceleration loading. Considering these facts, we strongly believe that goldfish scales offer an excellent model for the *in vitro* study of bone metabolism. On the other hand, astronauts suffer from osteoporosis-like loss of bone mass during space flight due to microgravity. Development of a therapeutic drug for astronauts is desired earnestly. To examine the effects of BTBM on both osteoclasts and osteoblasts under microgravity, therefore, we have performed a space experiment using goldfish scales. Space shuttle STS-132 (ULF4), which carried the specimens, was launched to the International Space Station (ISS) on May 14, 2010. After its arrival at the ISS, the chambers were incubated for 86 h at 22°C under microgravity using the cell biology experiment facility and compared with a 1g control in space. To analyze mRNA expression, the scales were preserved with RNA later and then frozen. On May 26, 2010, the specimens cultured in Kibo were returned to Earth by space shuttle STS-132 and then analyzed. As a result, we found that BTBM suppressed osteoclastic marker mRNA expression but increased the mRNA expression of osteoblastic markers. To confirm the results of this space experiment, *in vivo* experiments were done using rats with metabolic bone disease. In ovariectomized rats and rats maintained on low calcium diets, oral administration of this chemical suppressed bone resorption and led to increased bone strength and bone mineral density of the femur. Thus, BTBM is a potentially effective drug for treating bone disease in space as well as on Earth.

Key words; Fish scales; Osteoclasts; Osteoblasts; Metabolic Bone disease rat models; Novel melatonin derivatives; Space Experiment

1. 背景

魚のウロコは、石灰化した骨基質の上に骨芽細胞と破骨細胞が共存した構造をしており、その基質は、I型コラーゲンからなる線維層とI型コラーゲンとハイドロキシアパタイトからなる骨質層の二層からなる^{1,2,3,4)}。また、ウロコに存在する破骨細胞は多くは単核であるが、多核で波状縁を持つものも観察され、そのような破骨細胞は哺乳類の破骨細胞と同様の微細構造をもち³⁾、カテプシン K や酒石酸抵抗性酸フォスファターゼが発現している³⁾。そこで我々は、魚類のウロコを用いて培養・評価システムを開発した^{5,6)}。このシステムを用いて遠心機による静的な過重力とバイブレーションによる動的な過重力の応答を調べた。その結果、ウロコは、静的な過重力⁷⁾及び動的な過重力^{8,9)}に感度よく応答することが判明した。次に、宇宙実験を目指すために、3次元クリノスタットによる擬似微小重力の影響を評価した。その結果、擬似微小重力環境ではウロコの破骨細胞の活性が上昇し、骨芽細胞の活性が低下することがわかった¹⁰⁾。

これらの成果が評価され、「きぼう」船内実験室第2期利用に向けた候補テーマとして採択され、2年の準備期間でスペースシャトルを用いた実験を2010年5月に実現することができた¹¹⁾。

本稿では、まず1)メラトニンの骨に対する作用について述べ、次に2)新規メラトニン誘導体 (Figure 1) の骨代謝に対する作用についてキンギョのウロコを用いて得られた成果、3)骨疾患のモデル動物 (卵巣摘出ラット及び低カルシウム食ラット) を用いた解析結果、さらに4)老齢ラットを用いた実験結果について記載する。

以上の研究実績に基づき、我々の研究グループは、骨密度低下作用が地上の10倍という宇宙環境を有効に使用して、マウスを用いた宇宙実験を計画中である。

2. メラトニンの破骨細胞に対する作用

ウロコの評価システムを用いて、メラトニンの破骨細胞に対する作用を解析した。その結果、メラトニンが、破骨細胞に対して抑制的に作用することを、脊椎動物を通して初めて明らかにした¹²⁾。なお、ウロコにメラトニン受容体が発現していることも確認しており¹³⁾、メラトニン受容体を介して、ウロコにメラトニンが作用していると考えられる。さらにメラトニンの骨吸収抑制作用は、哺乳類でも確認されている⁴⁾ので、ウロコで得られた成果は、哺乳類でも再現できたとと言える。

次に、我々はメラトニンの誘導体を合成して、誘導体の骨 (ウロコ) に対する作用を解析した。

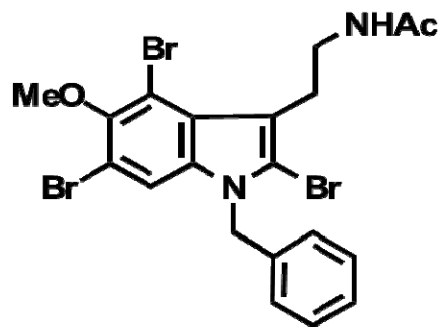


Figure 1 Chemical structure of the novel melatonin derivative (BTBM: 1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin)

3. ウロコを用いたメラトニン誘導体のスクリーニング

我々は臭素原子を導入したメラトニン誘導体に注目して、キンギョのウロコを用いたバイオアッセイによりスクリーニングを行った。

臭素原子を1個入れた誘導体である2-モノブロモメラトニンは、破骨細胞の活性を下げるのが分かった。さらに2-モノブロモメラトニンは、骨芽細胞の活性を上昇させることも判明した。次に、臭素原子を2個入れたメラトニン誘導体を合成して、ウロコのアッセイ系で解析した結果、臭素原子2個導入した誘導体には、このような作用がなかった。そこで次に、臭素原子を3個入れたメラトニン誘導体の作用を調べた。その結果、臭素原子を3個入れたトリブロモメラトニンの作用は、2-モノブロモメラトニンよりも強く、破骨細胞の活性を抑え、骨芽細胞を活性化させることが明らかになった。

次の段階として、トリブロモメラトニンの側鎖の検討を行った。即ち、メラトニン、2-ブロモメラトニン、2,4,6-トリブロモメラトニン、1-アリル-2,4,6-トリブロモメラトニン、1-プロパルギル-2,4,6-トリブロモメラトニン、1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン及び2,4,6,7-テトラブロモメラトニンを合成して、これら化合物の破骨細胞及び骨芽細胞に対する作用をキンギョのウロコのパイオアッセイにより評価した。培養時間は6時間に設定して、濃度は 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} Mで、化合物の作用を解析した。さらに最も効果があった化合物において、6時間及び18時間培養で、 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 及び 10^{-7} Mにおいて、骨に対する作用を調べた。

今回調べた化合物の中で、特に1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン (BTBM) の骨芽細胞の活性を上昇させる作用は強く、この化合物を用いてさら

に詳細に調べた。その結果、BTBM は骨芽細胞の活性を上げ、その作用は 18 時間後でも持続しており、 10^{-8} M でも効果が認められた。また BTBM の破骨細胞の活性抑制作用は、メラトニンのそれよりも強く、6 時間培養で 10^{-10} M でも効果が認められた。

4. 骨疾患モデルラットに対する新規メラトニン誘導体の作用

急速な高齢化が進む我が国では、女性を中心として骨粗鬆症の患者数が増加の一途をたどり、骨折等の運動不足による介護の人手や治療費の増大を招き、大きな社会問題となっている。加齢性の骨粗鬆症は、破骨細胞の活性化と骨芽細胞の活性低下により引き起こされるが、現時点で実用化されている治療薬の主体は、破骨細胞の活性を抑制する吸収阻害薬（ビスホスホネート）であり、骨芽細胞の活性を確認出来ている治療薬は副甲状腺ホルモンのみと言っても過言ではない。しかし、これはラットにおいて発がん性を認める等の理由から 2 年間の投与に限られ、停止後の速やかな骨代謝作用への消失が問題になっている。そこで、卵巣摘出ラットを用いて BTBM の作用を調べた。その結果、卵巣摘出ラットの大腿骨の海綿骨の骨密度が上がり、骨強度が有意に上昇することがわかった。

卵巣摘出ラットに加えて、後天性栄養疾患の骨疾患モデル（低カルシウム食ラット）を用いた動物実験も行った。その結果、BTBM は低カルシウム食により生じる骨代謝回転を抑制して、破骨細胞数は正常食群と同等な値に減少した。さらに、BTBM 投与により骨量の減少が抑制され、正常食に対して変化がないレベルにまで回復した。

これまで若いラットを用いて実験をしてきたが、次に高齢ラットを用いた実験も行った。即ち、高齢ラットに卵巣摘出手術を行い、ビスホスホネートと比較した。その結果、折り曲げ試験において、ビスホスホネートよりも骨強度が上昇することがわかった。したがって、BTBM は、ビスホスホネートとは異なり、骨形成を促進する作用がある。

5. 今後の展望

2010 年に実施した宇宙実験の結果、BTBM により骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現量が上がり、一方、破骨細胞のマーカー遺伝子 mRNA 量は低下した。さらに宇宙実験では実施できなかった形態学的な解析

を、3 次元クリノスタットによる擬似微小重力環境下において地上で実施した結果、破骨細胞の形態学的な変化を伴い、骨吸収が抑制された。したがって、BTBM は形態学的な解析からも効果があることが判明した。

今後は、マウスを用いた宇宙実験を提案して、骨密度低下作用が地上の 10 倍という宇宙環境を基盤にした骨疾患の治療薬の開発を行っていく予定である。

6. 引用文献

- 1) 鈴木信雄, 田畑 純, 和田重人, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた新しい骨モデル系の開発と歯科医療への応用. *Dental Diamond*, 31: 68-73 (2006)
- 2) 服部淳彦, 鈴木信雄, 染井正徳: メラトニン Up to Date—骨とメラトニン. *日本抗加齢医学会雑誌*, 2: 78-86 (2006)
- 3) Azuma, K., Kobayashi, M., Nakamura, M., Suzuki, N., Yashima, S., Iwamuro, S., Ikegame, M., Yamamoto, T. and Hattori, A.: Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362: 594-600 (2007)
- 4) Suzuki, N., Somei, M., Seki, A., Reiter, R.J. and Hattori, A.: Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J. Pineal Res.*, 45: 229-234 (2008)
- 5) Suzuki, N., Suzuki, T. and Kurokawa, T.: Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler (seawater teleost). *Peptides*, 21: 115-124 (2000)
- 6) 鈴木信雄: 魚類のカルシトニンの特徴. *Clinical Calcium*, 15: 459-466 (2005)
- 7) Suzuki, N., Omori, K., Nakamura, M., Tabata, M.J., Ikegame, M., Ijiri, K., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Kondo, T., Matsuda, K., Ando, H., Kasahara, H., Nagase, M., Nara, M. and Hattori, A.: Scale osteoblasts and osteoclasts sensitively respond to low-gravity loading by centrifuge. *Biol. Sci. Space*, 22: 3-7 (2008)
- 8) Suzuki, N., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Wada, S., Kondo, T., Tabata, M.J., Sodeyama, F.,

- Ijiri, K. and Hattori, A.: Effect of vibration with a frequency on osteoblastic and osteoclastic activities Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Adv. Space Res.*, 40:1711-1721 (2007)
- 9) Kakikawa, M., Yamamoto, T., Chowdhury, V.S., Satoh, Y., Kitamura, K., Sekiguchi, T., Funahashi, H., Omori, K., Endo, M., Yano, S., Yamada, S., Hayakawa, K., Chiba, A., Srivastav, A.K., Ijiri, K., Hattori, A. and Suzuki, N.: Determination of calcium sensing receptor in the scales of goldfish and induction of its mRNA expression by acceleration loading. *Biol. Sci. Space*, 26: 26-31 (2012)
- 10) 鈴木信雄, 大森克徳, 井尻憲一, 北村敬一郎, 清水宣明, 田畑 純, 池亀美華, 中村正久, 近藤隆, 松田恒平, 安東宏徳, 笠原春夫, 永瀬 睦, 久保田幸治, 奈良雅之, 服部淳彦: 擬似微小重力及び過重力下における骨代謝制御: 培養ウロコを用いた解析. *Space Utiliz. Res.*, 24: 230-233 (2008)
- 11) 鈴木信雄, 北村敬一郎, 清水宣明, 染井正徳, 笹山雄一, 大森克徳, 矢野幸子, 重藤祐子, 谷垣文章, 鈴木ひろみ, 嶋津 徹, 池亀美華, 田渕圭章, 高崎一朗, 和田重人, 近藤 隆, 遠藤雅人, 中村正久, 井尻憲一, 田畑 純, 奈良雅之, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究, *平成 22 年度 JAROS 宇宙環境利用の展望*, 第 2 章: 1-13 (2011)
- 12) Suzuki, N., Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 33: 253-258 (2002)
- 13) Ikegami, T., Azuma, K., Nakamura, M., Suzuki, N., Hattori, A., Ando, H.: Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optictectum and retina of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 152A: 219-224 (2009)