

## 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究：キングョのウロコ及び骨疾患モデルラットの骨代謝に対するブロモメラトニンの新規作用

金沢大学 鈴木信雄、JAXA 矢野幸子、亜細亜大学 大森克徳、金沢大学 北村敬一郎、清水宣明、西内 巧、染井正徳、関口俊男、渡辺良成、岡山大学 池亀美華、富山大学 近藤 隆、田淵圭章、東北大学 鈴木 徹、東京海洋大学 遠藤雅人、竹内俊郎、朝日大学 江尻貞一、高知学園短期大学 三島弘幸、JAXA 嶋津 徹、ハムリー（株） 関 あずさ、昭和大学 舟橋久幸、神奈川歯科大学 高垣裕子、有人宇宙システム（株）笠原春夫、千代田化工建設（株）永瀬 睦、アジレントテクノロジ（株）田谷敏貴、（財）東京都神経科学総合研究所 長野慎太郎、宮下知之、東京医科歯科大学 服部淳彦

### Fish Scale Study for Space Biology: Novel Effect of Bromomelatonin on Bone Metabolism in Goldfish Scales and Metabolic Bone Disease Rat Models

Nobuo Suzuki<sup>1</sup>, Sachiko Yano<sup>2</sup>, Katsunori Omori<sup>3</sup>, Kei-ichiro Kitamura<sup>4</sup>, Nobuaki Shimizu<sup>1</sup>, Takumi Nishiuchi<sup>5</sup>, Masanori Somei<sup>1</sup>, Toshio Sekiguchi<sup>1</sup>, Yoshinari Watanabe<sup>6</sup>, Mika Ikegame<sup>7</sup>, Takashi Kondo<sup>8</sup>, Yoshiaki Tabuchi<sup>9</sup>, Tohru Suzuki<sup>10</sup>, Masato Endo<sup>11</sup>, Toshio Takeuchi<sup>11</sup>, Sadakazu Ejiri<sup>12</sup>, Hiroyuki Mishima<sup>13</sup>, Toru Shimazu<sup>2</sup>, Azusa Seki<sup>14</sup>, Hisayuki Funahashi<sup>15</sup>, Yuko Mikuni-Takagaki<sup>16</sup>, Haruo Kasahara<sup>17</sup>, Mutsumu Nagase<sup>18</sup>, Toshiki Taya<sup>19</sup>, Shintaro Naganos<sup>20</sup>, Tomoyuki Miyashita<sup>20</sup>, Atsuhiko Hattori<sup>21</sup>

<sup>1</sup>Inst. of Nat. and Environ. Technol., Kanazawa Univ.; <sup>2</sup>Japan Aerospace Exploration Agency; <sup>3</sup>Fac. of Economics, Asia Univ.; <sup>4</sup>Inst. of Health Sci., Kanazawa Univ.; <sup>5</sup>Adv. Sci. Res. Center, Kanazawa Univ.; <sup>6</sup>Organization of Frontier Sci. Innov., Kanazawa Univ.; <sup>7</sup>Grad. Sch. of Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.; <sup>8</sup>Grad. Sch. of Med. and Pharmaceut. Sci., Univ. of Toyama; <sup>9</sup>Life Sci. Res. Ctr., Univ. of Toyama; <sup>10</sup>Grad. Sch. of Agr. Sci., Tohoku Univ.; <sup>11</sup>Fac. of Marine Sci., Tokyo Univ. of Marine Sci. and Technol.; <sup>12</sup>Sch. of Dent., Asahi Univ.; <sup>13</sup>Kochi Gakuen Coll.; <sup>14</sup>Hamri Co. Ltd.; <sup>15</sup>Showa Univ. Sch. of Med.; <sup>16</sup>Kanagawa Dent. Univ. Grad. Sch. of Dentistry; <sup>17</sup>Japan Manned Space Systems Co.; <sup>18</sup>Chiyoda Co.; <sup>19</sup>Agilent Technologies Japan, Ltd.; <sup>20</sup>Tokyo Metropolitan Inst. of Med. Sci.; <sup>21</sup>Coll. 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:** Fish scales have been reported to be a better internal calcium reservoir for fish than body skeletons, jaws, and otoliths, as examined in a <sup>45</sup>Ca-labeling study of the calcified tissues of goldfish and killifish. In the scales, as in mammalian bone, type I collagen, bone  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein, osteonectin, and hydroxyapatite are present. The scales are formed by osteoblasts and are resorbed by osteoclasts, as in mammalian bone. In addition, scale osteoblasts express alkaline phosphatase, and scale osteoclasts, both mononucleated and multinucleated, express tartrate-resistant acid phosphatase. Using goldfish scales, we have recently developed a new *in vitro* assay system and have reported that a novel derivative (1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin) suppressed osteoclastic activity but increased osteoblastic activity. To confirm the results *in vitro*, we examined the effect of this chemical on osteoclasts and osteoblasts of the scales of goldfish *in vivo*. An *in vivo* experiment provided a result similar to that of an *in vitro* experiment. Furthermore, in ovariectomized rats and rats maintained with low calcium diets, oral administration of this chemical suppressed bone resorption and led to an increase in both bone strength and the bone mineral density of the femur. Thus, 1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin 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

### 1. 本研究チームの目的

魚類のウロコは、膜性骨に似た硬組織であり、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構成される骨質層の上に、骨芽細胞と破骨細胞が共存し、骨代謝を行っている<sup>1,2,3,4)</sup>。そこで我々は優れた特徴を持つウロコに注目して、キンギョのウロコを用いて培養・評価システムを開発した<sup>5,6)</sup>。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<sup>7)</sup>及び動的な過重力<sup>8)</sup>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を初めて証明できた<sup>9)</sup>。

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<sup>10)</sup>。

本年度は、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、キンギョを用いて *in vivo* で調べた。また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) を用いて解析した。さらに回収衛星を用いた宇宙実験も計画中であり、新規化合物に対するウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析する予定である。

### 2. 研究チームの本年度の活動

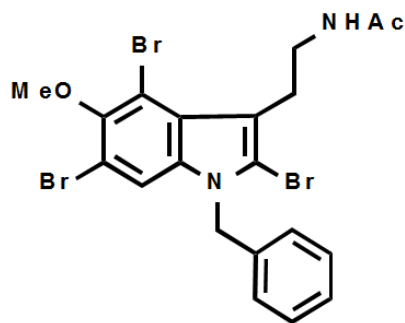
2014年10月1日～2日に金沢大学 臨海実験施設、10月22日にハムリー株式会社、10月30日及び11月21日に富山大学遺伝子実験施設、12月19日～20日に金沢大学 角間キャンパスで会合を行った。

その後、E-mail や電話等で連絡を取りながら、実験結果等について論議している。特に、1月に開催された宇宙科学シンポジウム及び宇宙環境利用シンポジウムでは、来年度の活動内容及び実験計画について論議した。

### 3. これまで得られた実験成果

本年度の研究チームの研究成果を順に示す。これらの成果は国際誌に投稿予定である。

なお、研究成果の一部は、日本動物学会中部支部



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

公開講演会、日本動物学会仙台大会、日本宇宙生物科学会大阪大会、日本動物学会中部支部能登大会、宇宙科学シンポジウム及び宇宙環境利用シンポジウムで発表した。また、2014年9月に大阪府立大学で開催された日本宇宙生物科学会大阪大会で発表した金沢大学院生 (山本樹氏) は、優秀発表賞を受賞した。

#### ① 新規メラトニン誘導体のキンギョ (*in vivo*) の骨代謝に対する作用

新規メラトニン誘導体のキンギョの骨代謝に対する作用を解析するため、*in vivo* の実験を行った。キンギョの腹腔内に1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン (BTBM) を  $0.5 \mu\text{g/g body weight}$  の割合で未成熟なキンギョに投与し、1、2、及び3日目にそれぞれのキンギョの鰓を切断して、ヘパリン処理したキャピラリーを用いて採血し、さらにウロコを採取して細胞活性と遺伝子発現を調べた (それぞれの日数において、 $n=10$ )。なお、BTBMは、1% DMSOに溶解して、キンギョの腹腔内に投与した。一方、対照群も実験群と同様に1% DMSOを腹腔内に投与して、1、2、及び3日目に採血及びウロコを採取した。

BTBM投与後1日目に、血漿中のカルシウム濃度が有意に低下した。そこで、1日目に採取したウロコの細胞活性を測定した。その結果、骨芽細胞の活性は上昇傾向にあるが有意差はなく、破骨細胞の活性が有意に低下していることが明らかになった。

さらに破骨細胞のマーカーを解析した結果、破骨細胞のマーカーであるカテプシンK及び酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ mRNA の発現量が低下していることが判明した。

## ②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

これまで骨粗鬆症の治療薬は骨吸収を抑制する薬剤（ビスフォスフォネート）が主流であり、骨吸収を抑制してかつ骨形成を顕著に促進する薬剤は未だ開発されていない。そこで、卵巣摘出ラットを用いて新規メラトニン誘導体の実験を行った。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した。

また、カルシウムの摂取量が少ない現代人の食生活から引き起こされる骨疾患モデル（低カルシウム食ラット）でも、大腿骨の海綿骨の骨密度が有意に上昇した。さらに低カルシウム食ラットの脛骨の形態計測により、骨吸収抑制作用を確認することができた。

一方、ラットにメラトニンを投与すると、骨吸収を抑制すると報告されている<sup>11, 12)</sup>。しかし、新規メラトニン誘導体は、骨吸収抑制に加えて骨形成も促進している可能性がある<sup>13)</sup>。老齢ラットに卵巣摘出手術を行い、ビスフォスフォネートと比較した結果、ビスフォスフォネートよりも骨強度が上昇した。したがって、新規メラトニン誘導体は、ビスフォスフォネートとは異なり、骨形成を促進する作用があり、現在、その作用機構を解析している。

## 4. 今後の予定

国際宇宙ステーション「きぼう」船内実験室第2期利用に向けた候補テーマに採択され、2010年5月に宇宙実験を実施することができた。宇宙実験は、全て予定通りに進行して無事終了した<sup>10)</sup>。冷凍したウロコ、組織用RNA安定化溶液(RNAlater<sup>TM</sup>)を入れて冷凍したウロコ、4%パラホルムアルデヒドで固定したウロコを用いて、ウロコの骨吸収が引き起こされていることを実証できた。現在、その詳細な機構を地上での追試も含めて解析中である。

さらにインドの回収衛星を用いた宇宙実験の準備も、技術的には可能であり、バックに入れた状態でもバイブレーションの過重力にウロコは応答することも実証済である。今後、「きぼう」の国際宇宙ステーションで実施された宇宙実験のサンプルの解析をできるだけ早く行い、次の宇宙実験を計画していく予定である。

## 5. 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) 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)

- 10) 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, 田淵圭章, 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)
- 11) Ladizesky, M.G., Boggio V., Albornoz, L.E., Castrillón, P.O., Mautalen, C., Cardinali, D.P.: Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. *J Pineal Res*, 34: 143-151 (2003)
- 12) 鈴木信雄, 関 あずさ, 服部淳彦：メラトニンの骨代謝に対する作用と骨疾患の治療への応用. *抗加齢医学会誌*, 10: 697-702 (2014)
- 13) 鈴木信雄, 関 あずさ, 染井正徳, 中村正久, 矢野幸子, 大森克徳, 池亀美華, 三島弘幸, 早川和一, 服部淳彦：メラトニンの新規作用：骨に対する作用とその誘導体を用いた骨疾患治療薬の開発. *比較内分泌学*, 37: 194-203 (2011)