

魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究：魚類のウロコにおけるホルモン応答

金沢大学 鈴木信雄、東京医科歯科大学 田畑 純、JAXA 大森克徳、東京大学 井尻憲一、金沢大学 北村敬一郎、根本 鉄、清水宣明、笹山雄一、染井正徳、岡山大学 池亀美華、早稲田大学 中村正久、富山大学 近藤 隆、古澤之裕、松田恒平、田淵圭章、高崎一郎、和田重人、九州大学 安東宏徳、有人宇宙システム（株）笠原春夫、千代田アドバンスト・ソリューションズ（株）永瀬 睦、久保田幸治、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、小萱康徳、アジレントテクノロジー（株）前田齊嘉、内田秀明、田谷敏貴、林明生、中村貞夫、杉立久仁代、アジレント・テクノロジー・インターナショナル（株）芹野 武、東京医科歯科大学 奈良雅之、服部淳彦

Fish Scale Study for Space Biology: Hormonal Responses in the Fish Scale

Nobuo Suzuki¹, Makoto J. Tabata², Katsunori Omori³, Kenichi Ijiri⁴, Kei-ichiro Kitamura⁵, Tetsu Nemoto⁵, Nobuaki Shimizu¹, Yuichi Sasayama¹, Masanori Somei⁶, Mika Ikegame⁷, Masahisa Nakamura⁸, Takashi Kondo⁹, Yukihiko Furusawa⁹, Kouhei Matsuda¹⁰, Yoshiaki Tabuchi¹¹, Ichiro Takasaki¹¹, Shigehito Wada¹², Hironori Ando¹³, Haruo Kasahara¹⁴, Mutsumu Nagase¹⁵, Koji Kubota¹⁵, Tohru Suzuki¹⁶, Masato Endo¹⁷, Toshio Takeuchi¹⁷, Sadaichi Ejiri¹⁸, Yasunori Kogara¹⁸, Masahiro Maeda¹⁹, Hideaki Uchida¹⁹, Toshiki Taya¹⁹, Akio Hayashi¹⁹, Sadao Nakamura¹⁹, Kuniyo Sugitate¹⁹, Takeshi Serino²⁰, Masayuki Nara²¹, Atsuhiko Hattori²¹

¹Inst. of Nat. and Environ. Technol., Kanazawa Univ.; ²Grad. Sch. of Tokyo Med. Dent. Univ.; ³Japan Aerospace Exploration Agency; ⁴Ri Center, Univ. of Tokyo; ⁵Grad. Sch. of Med. Sci., Kanazawa Univ.; ⁶Grad. Sch. of Nat. Sci and Technol., Kanazawa Univ.; ⁷Grad. Sch. of Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.; ⁸Fac. of Edu. and Integ. Arts and Sci., Waseda Univ.; ⁹Grad. Sch. of Med. and Pharmaceut. Sci., Univ. of Toyama; ¹⁰Grad. Sch. of Sci. and Eng., Univ. of Toyama; ¹¹Life Sci. Res. Center, Univ. of Toyama; ¹²Fac. of Med., Univ. of Toyama; ¹³Grad. Sch. of Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.; ¹⁴Japan Manned Space Systems Co.; ¹⁵Chiyoda Advanced Solutions Co.; ¹⁶Grad. Sch. of Agr. Sci., Tohoku Univ.; ¹⁷Fac. of Marine Sci., Tokyo Univ. of Marine Sci. and Technol.; ¹⁸Sch. of Dent., Asahi Univ.; ¹⁹Agilent Technologies Japan, Ltd.; ²⁰Agilent Technologies International Japan, Ltd. ²¹Coll. of Liberal Arts Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.

Correspondence: Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan (Nobuo Suzuki)

E-Mail: nobuo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

Abstract: Fish scale is a calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and the bone matrix of two layers (a bony layer: a thin, well-calcified external layer; and a fibrillary layer: a thick, partially calcified layer), all of which are similar to those found in mammalian membrane bone. Recently, we developed a new *in vitro* model system using goldfish scales. This system can be used to detect the activities of osteoblasts and osteoclasts with alkaline phosphatase (ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) as respective markers. Therefore, it can be used to analyze the co-relationship between osteoblasts and osteoclasts. To obtain basic data for a space experiment, effects of calcemic hormones, such as parathyroid hormone (PTH), calcitonin, vitamin D₃, and insulin-like growth factor-I on osteoblasts and osteoclasts in the scale, were examined using this assay in the present study. PTH activated osteoblastic activity and then increased osteoclastic activity. Furthermore, we found that other calcemic hormones function in both osteoclasts and osteoblasts in the fish scale as they do in mammals. Thus, scale is a functional calcium reservoir and has a physiological significance role in the bone metabolism of teleosts. Our assay system may help explain the mechanism of bone loss, such as that occurring during space flight.

Key words: Fish scale; Osteoblasts; Osteoclasts; Calcemic hormones

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^{1,2,3,4,5)}。そこで我々はウロコの特徴に注目し、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^{6,7,8)}。このシステムを用いて、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⁹⁾。さらに、「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、スペースシャトルを用いた実験を計画中である。

昨年度は、ウロコの滅菌方法を含む長期間の培養法の検討を行った。その結果、ウロコの滅菌方法を確立し、26℃で少なくとも1週間は細胞の活性は保持していることがわかった。さらにこの滅菌方法でウロコを低温(4℃)保管すると、1週間は細菌・真菌のコンタミがなく、保管することができた。また、この低温保管したウロコの重力応答(バイブレーションによる加速度重力に対する応答)を解析した結果、保管前と同様にウロコの骨芽細胞および破骨細胞が応答することが判明した。したがって、ウロコは技術面においても宇宙実験に適した材料であることが判明した。

本年度は様々なカルセミックホルモンに対するウロコの応答を解析し、過重力及び微小重力に対するウロコの骨芽細胞と破骨細胞のホルモン応答を調べるための基礎データにする。さらに実験装置の開発を行い、回収衛星を用いた実験を目指す。

以下に活動内容及び研究成果を報告する。

2. 研究チームの本年度の活動

平成21年7月8日～7月10日に東京医科歯科大学歯学部、8月31日に東京医科歯科大学教養部、10月26日～10月27日及び11月2日～11月4日に金沢大学保健学科、11月13日に筑波宇宙センター、12月16日～12月17日に富山大学薬学部で会合を行った。

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。さらに、平成22年2月2日～2月3日に研究チームの会合を計画してお

り、来年度の活動内容及び実験計画について論議する予定である。

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する予定である。なお、ウロコのホルモン応答に関する研究成果の一部は、動物学会中部支部例会(名古屋大会)、2009年宇宙生物学会(筑波大会)で発表した。

①副甲状腺ホルモン(PTH)のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用

フグPTH及びヒトPTH(1 pg/ml～10 ng/ml)を培地(血清なしのMEM)に添加してウロコを6時間及び18時間培養した後、ウロコのALP及びTRAP活性を測定した。

フグPTH及びヒトPTHは6時間の培養において、ウロコのALP活性を上昇させた。フグPTHは100 pg/mlでもALP活性を上昇させ、キンギョのウロコではヒトPTHよりも応答性が良かった。18時間培養でも同様にウロコのALP活性を上昇させたが、上昇率は6時間培養よりも低かった。

フグPTH及びヒトPTHは6時間の培養において、ウロコのTRAP活性を変化させず、18時間培養においてTRAP活性を上昇させた。18時間培養では、ALPと同様にして、フグPTHは100 pg/mlでもウロコのTRAP活性を上昇させ、キンギョのウロコではヒトPTHよりも応答性が良かった。

ALP及びTRAP活性はそれぞれ骨芽細胞と破骨細胞の活性の指標として使用されているので^{10,11)}、ウロコにおいても、まずPTHは骨芽細胞に作用して、その後破骨細胞の活性を上昇している可能性が高い。

さらに未成熟なキンギョの腹腔内にフグPTH(1 µg/g Body weight)を投与して、ウロコのTRAPとALP活性及び血漿中のCa濃度を測定した。その結果、*in vitro*と同様にウロコのALP及びTRAP活性が上昇した。ウロコのTRAP活性が上昇した結果、血漿中のCa濃度も上昇することがわかった。

以上のことから、PTHは魚においても破骨細胞の活性を上げ、その結果として血液中のCa濃度を上昇させ、魚のCa代謝に大きく関与していることが判明した。

②様々なカルセミックホルモンのウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用

ウロコの *in vitro* のアッセイ系で様々なカルセミックホルモンに対する作用を解析した。その結果、カルシトニン、活性型ビタミン D₃、ビタミン K、インスリン様成長因子I及びインターロイキンIは哺乳類の骨芽細胞と破骨細胞に対する作用と同じようにウロコの ALP 及び TRAP 活性を変化させた。その中で、サケのカルシトニンは、18 時間の培養において 10⁻¹¹ M でもウロコの破骨細胞の活性を抑制することがわかった¹²⁾。

③回収衛星を用いた宇宙実験

NASA が開発済みの Fluids Processing Apparatus (FPA) はピストンを押すだけで培地と化学薬品 (RNA 抽出用の RNA later や形態学的観察用のホルマリン等) を混合できる装置であり、回収衛星の実験には適している。しかし、FPA は遠隔操作が可能なシステムではない。無人の衛星にも搭載可能にするため、遠隔操作も可能なシステムを設計する必要がある。

そこで本年度は、千代田アドバンストソリューションズが開発したインド回収型衛星 SRE-II 搭載微生物培養装置¹³⁾ を用いて、ウロコを培養できるかについて検討した。その結果、少し改良すれば、ウロコを培養できることがわかった。今後、この装置を用いて、ウロコの培養実験を行い、培養条件の検討を行う予定である。

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、本研究チームは宇宙実験に向けて準備中である。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ることがわかってきた。ウロコはバイブレーションによる加速度重力¹⁴⁾ に加えて、遠心機の過重力にも感度良く応答する¹⁵⁾。そこで遠心機の過重力応答の詳細な機構を調べていくため、アレイ解析を行っている最中であり、骨の重力・微小重力応答の機構解明を目指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) 田畑 純, 鈴木信雄, 服部淳彦: 魚鱗—硬組織研究と再生研究のフロンティア. *細胞*, 39: 55-57 (2007)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 33: 253-258 (2002)
- 8) 鈴木信雄: 魚類のカルシトニンの特徴. *Clinical Calcium*, 15: 459-466 (2005)
- 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) Kurata, K., Uemura, T., Nemoto, A., Tateishi, T., Murakami, T., Higaki, H., Miura, H. and Iwamoto, Y.: Mechanical strain effect on bone-resorbing activity and messenger RNA expressions of marker enzymes in isolated osteoclast culture. *J. Bone Miner. Res.*, 16: 722-730 (2001)
- 11) Tanaka, S.M., Li, J., Duncan, R.L., Yokota, H., Burr, D.B. and Turner, C.H.: Effects of broad frequency

- vibration on cultured osteoblasts. J. Biomech., 36: 73-80 (2003)
- 12) Sekiguchi, T., Suzuki, N., Fujiwara, N., Aoyama, M., Kawada, T., Sugase, K., Murata, Y., Sasayama, Y., Ogasawara, M. and Satake, H.: Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis*: the prototype of the vertebrate Calcitonin/Calcitonin gene related peptide superfamily. FEBS J., 276: 4437-4447 (2009)
 - 13) 東端 晃、福井啓二、高橋秀幸、東谷篤志、馬嶋秀行、曾我部正博、高橋昭久、二川 健、永瀬 睦、嶋津 徹、村瀬浩史、行徳淳一郎、Oleg Gusev、山崎 丘、石岡憲昭：平成 20 年度生物科学系スモールペイロード宇宙実験研究班WG活動報告。Space Utiliz. Res., 25: 149-150 (2009)
 - 14) 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)
 - 15) 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)