

魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究

金沢大学 鈴木信雄、JAXA 大森克徳、東京大学 井尻憲一、金沢大学 北村敬一郎、清水宣明、鹿児島大学 田畑 純、岡山大学 池亀美華、早稲田大学 中村正久、富山大学 近藤 隆、松田恒平、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、東京医科歯科大学 服部淳彦

Space Biology Utilizing Fish Scale

Nobuo Suzuki¹, Katsunori Omori², Kenichi Ijiri³, Kei-ichiro Kitamura⁴, Nobuaki Shimizu¹, Makoto J. Tabata⁵, Mika Ikegame⁶, Masahisa Nakamura⁷, Takashi Kondo⁸, Kouhei Matsuda⁹, Hironori Ando¹⁰, Haruo Kasahara¹¹, Mutsumu Nagase¹², Atsuhiko Hattori¹³

¹Inst. of Nat. and Environ. Technol, Kanazawa Univ.; ²Japan Aerospace Exploration Agency; ³RI Center, Tokyo Univ.; ⁴Grad. Sch. of Med. Sci., Kanazawa Univ.; ⁵Grad. Sch. of Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ.; ⁶Grad. Sch. of Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.; ⁷Fac. of Edu. and Integ. Arts and Sci., Waseda Univ.; ⁸Grad. Sch. of Med. and Pharmaceut. Sci., Univ. of Toyama; ⁹Grad. Sch. of Sci. and Eng., Univ. of Toyama; ¹⁰Grad. Sch. of Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.; ¹¹Japan Manned Space Systems Co.; ¹²Chiyoda Advanced Solutions Co.; ¹³Coll. 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: In osteoclast activity during space flight, inconsistent results have been reported in an *in vivo* study while osteoblastic function is consistently reduced by space flight. Bone matrix is an important function in the response to physical stress. However, there is no suitable *in vitro* co-culture system of osteoblasts and osteoclasts including bone matrix. On the other hand, fish scale is a calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix, all of which are similar to those found in human bones. Recently, we developed a new *in vitro* model system using goldfish scale. This system can be used to simultaneously detect the activities of both scale osteoclasts and osteoblasts with tartrate-resistant acid phosphatase and alkaline phosphatase as the respective markers and precisely analyze the co-relationship between osteoblasts and osteoclasts. In our co-culture system, osteoblasts and osteoclasts reacted sensitively to several degrees of acceleration, ultrasound stimulation, and micro-gravity of 3D clinostat. Therefore, we strongly believe that our *in vitro* co-culture system is suitable model for the analysis of bone metabolism under micro-gravity, such as that experienced in space flight.

Key words: Fish scale; Osteoblasts; Osteoclasts; Acceleration; Ultrasound; 3D clinostat

1. 本WGの目的

魚類のウロコは、膜性骨に似た硬組織であり^{1,2,3}、I型コラーゲンからなる線維層とヒドロキシアパタイトから構成される石灰化層の上に、骨芽細胞と破骨細胞が共存し、骨代謝を行っている (Fig.1)。さらにキンギョの場合、1 個体からほぼ均一な細胞活性をもつウロコを約 100 枚もサンプリングでき、ホルモン^{4,5,6,7}、内分泌攪乱化学物質^{8,9}、重金属¹⁰等の様々な物質に対する影響を容易に解析できる。したがってウロコを用いると、株細胞や初代培養細胞では再現できない骨芽細胞と破骨細胞の相互作用が、生体内に近い状態で再現でき、宇宙における骨量減少の機構解明やその治療にも貢献できると思われる。そこで我々は、これらの利点を最大限に生かして

重力及び微小重力における生理作用を地上実験で解析している。これらのデータを基にして、WGでは宇宙実験を計画する。本稿では、これまで得られた実験成果を示し、宇宙実験に向けての今後の課題(予定)について報告する。

2. WGの本年度の活動

平成 18 年 10 月 11 日に筑波宇宙センターで、平成 18 年 12 月 11 日に日本宇宙フォーラムでWGの会合を行った。その後、E-mail 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。なお、平成 19 年 3 月上旬にもWGの会合を計画しており、来年度の活動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

ウロコを骨のモデルとして行った実験成果を順に示す。なお、加速度の重力刺激の結果は、2006年 COSPARで発表し、Adv. Space Res.に投稿中であり、超音波刺激の結果は、ソノケミストリー討論会で発表し¹¹⁾、Life Sci.に投稿予定である。

① 加速度の重力刺激に対する骨芽及び破骨細胞の反応

WGのメンバーの北村が自作した加速度発生装置により、0.5, 1, 2, 4, 6Gで5及び10分間処理し、その後6及び24時間培養後、ウロコの骨芽及び破骨細胞の活性を測定した。なお、ウロコを1.5mlのチューブ内に固定するため、培地と共にウロコを入れ、オートクレイブで処理した綿球で固定した。

その結果、ウロコの骨芽細胞は、1Gという低強度の重力刺激にも応答し、強度が上昇すると共に骨芽細胞の活性も上昇し、6Gで最も高くなった。一方破骨細胞も0.5及び1Gという低強度の重力刺激でも反応し、24時間でその活性が低下した。2Gで最も破骨細胞の活性抑制作用が強く、6及び24時間でも反応した。4及び6Gでは徐々に破骨細胞の活性抑制作用が低下した。さらにこれらの変化は、骨芽及び破骨細胞のマーカーである estrogen receptor (ER) mRNA と tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) mRNA の変化ともほとんど一致した。

これらの反応は、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用により行われている可能性が高く、今後遺伝子発現を中心に調べていく予定である。

② 超音波のメカニカルストレスに対する骨芽及び破骨細胞の反応

骨芽細胞の活性を指標として超音波の条件を設定した。その結果、超音波の強度は $60 \text{ mW/cm}^2 (I_{\text{SATA}})$ 、超音波の刺激頻度は180パルス、コントロールは室温より3°C高い温度で18時間培養すればよいことが判明した。そこで通常のウロコを用いて骨芽及び破骨細胞の変化を調べた。その結果、骨芽細胞の活性は有意に上昇したが、破骨細胞の活性は変化しなかった。

超音波照射により骨芽細胞の活性が上昇したので、骨芽細胞の特異的マーカーであるインシュリン様成長因子 I (IGF-I) mRNA と ER mRNA の発現を RT-PCR により調べた。IGF-I の mRNA レベルは、超音波刺激後3時間培養で有意に上がり、18時間培養では有意に変化しなかった。一方 ER の mRNA レベルは培養3時間では変化しなかったが、18時間では有意に上昇した。したがって、超音波刺激により IGF-I mRNA は、ER mRNA よりも早期に発現し、骨芽細胞を活性化していることが示された。

通常のウロコでは、破骨細胞はあまり活性化して

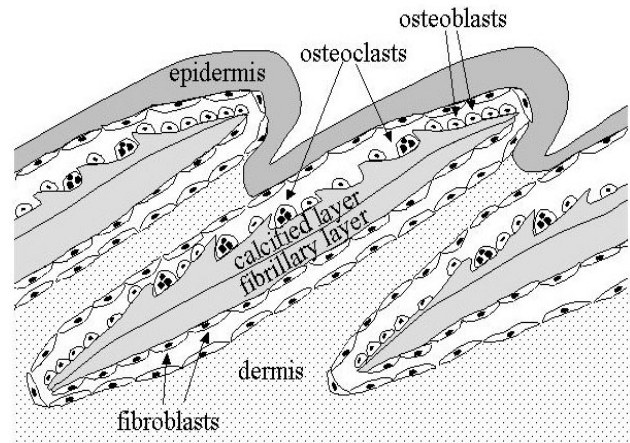


Fig.1 Schema of the scale in teleosts. Teleost scale is a calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix. The scale is similar to membrane bone of avian and mammal. The scale contains as much as 20% of the total body calcium and thought to be played a role of internal calcium reservoir during periods of increased calcium demand, such as sexual maturation and starvation.

いない可能性がある。そこで骨芽と破骨細胞の活性を共に上昇させたウロコ（骨代謝亢進ウロコ）を用いて再度解析した。魚はウロコにCaを蓄積し、必要な時にそのCaを用いる。したがって、魚の右側の全てのウロコを取ると、右側のウロコを作るため、左側のウロコの骨吸収・骨修復が進行し、骨芽及び破骨細胞の活性が上昇する。この左側のウロコ（骨代謝亢進ウロコ）を用いて、骨芽及び破骨細胞に対する超音波の影響を解析した。15°Cで18時間培養後、骨代謝亢進ウロコの骨芽細胞の活性は4個体中3個体において有意に上がり、破骨細胞の活性は4個体全てにおいて有意に低下した。

超音波刺激により骨芽細胞活性は上昇することが判明した。さらに骨代謝亢進ウロコにおいて、骨芽細胞活性は上昇し、破骨細胞活性は低下した。骨代謝亢進ウロコは、骨粗鬆症とよく似た状況を作り出しており、本研究の成果はその治療に貢献できると思われる。

③ 3D クリノスタットに対する骨芽及び破骨細胞の反応

これまでの実験では、ウロコ間の差があり、実験群と対照群との間に明確な差をみいだせないこともあった。そこでウロコを半分に切り、片方を微小重力下で処理し、もう片方を対照とすることで、その問題点を解決した。さらに1.5mlのチューブに培地と共にウロコを入れ、綿球で抑え、回転でウロコが動かないように固定した。

筑波宇宙センターの 3D クリノスタットを用いて微小重力下で 6 時間処理し、骨芽及び破骨細胞の変化を解析した。その結果、10 個体中 6 個体の骨芽細胞の活性が低下し、10 個体中 7 個体のキンギョの破骨細胞の活性が上昇した。

したがって、ウロコは 3D クリノスタットによる微小重力刺激に応答し、宇宙空間で進行する骨軟化症に近い状態になったと考えられる。今後、遺伝子発現等について詳細に調べ、加速度の重力刺激や超音波のメカニカル刺激と比較していく予定である。

④実験成果のまとめ

これまで宇宙飛行や、後肢懸垂ラット等を用いた実験では、破骨細胞に対する作用は結果の一致を欠いており、実験条件により異なった結果が報告されている。その理由の一つとして、良い *in vitro* のモデル系の欠如が上げられる。ウロコは平たい骨基質の上に骨芽細胞、破骨細胞が共存していて、ヒトの骨をスライスしたような構造をしている。さらに今回の実験では、加速度の重力刺激、超音波のメカニカルストレス、3Dクリノスタットによる刺激に感度よく反応した。このモデルを用いれば、微小重力における骨代謝に対する作用を正確に解析できる可能性が高い。

4. 今後の予定

本年度は *in vitro* の実験を行い、重力や微小重力の刺激に対する応答を解析した。次年度は、*in vivo* の実験特にウロコの再生（骨形成）に対する影響を調べる予定である。既に我々は、キンギョを用いてウロコの再生実験を行っており¹²⁾、骨芽細胞の活性の変化やホルモンに対する影響を評価済みである¹²⁾。またメダカのウロコの再生実験も開始しており、*in vivo* の宇宙実験系の確立を行う予定である。

さらに、我々はウロコをキンギョの筋肉内に自家移植して 10 日前後すると、ウロコの表面に多核の活性化した破骨細胞が誘導されることを最近明らかにした¹³⁾。このウロコは、ホルモンに対する応答性もよく、破骨細胞の微小重力における作用を容易に解析することが可能である。そこで来年度は、*in vivo* のウロコの再生実験に加えて、筋肉内自家移植ウロコの重力刺激に対する応答性についても解析する予定である。

一方 ISS 与圧部を利用した宇宙実験に備えるため、以下の実験も計画している。

骨代謝亢進ウロコ、再生ウロコ及び破骨細胞を誘導したウロコも含めて、ウロコの培養は非常に簡単であり、温度も室温程度でもよく、炭酸ガスも不要である。また通常のウロコの場合は、15°C で少なくとも 2 週間は培地交換を必要としない。したがって、ウロコと少量の培地を入れた小さなパックを作成し、

パックのまま宇宙実験を行い、終了後は冷凍して持ち帰ればよい。しかし冷凍した場合は、遺伝子や細胞の活性を測定することは可能であるが、細胞の組織学的な観察は困難になる。そこで既存の細胞培養装置（Cell Biology Experiment Facility）や NASA が既に開発済の Fluids Processing Apparatus 等の装置を用いて、ウロコの培養方法やホルマリンによる固定方法を検討する。

さらに様々な状態のウロコを長時間保管できる低温保存方法や凍結保存する技術についても検討し、宇宙実験に向けての準備をする予定である。

なお、本WGは日本宇宙フォーラムの地上公募研究の一環として行われた。

5. 引用文献

- 1) 鈴木信雄: 魚類のカルシトニンの特徴. *Clinical Calcium*, 15: 459-466 (2005)
- 2) 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)
- 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, 印刷中
- 4) 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)
- 5) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 33: 253-258 (2002)
- 6) Somei, M., Iwaki, T., Yamada, F., Tanaka, Y., Shigenobu, K., Koike, K., Suzuki, N. and Hattori, A.: The ideal synthesis method aimed at the leads for an α_2 -blocker, an inhibitor of blood platelet aggregation, and an anti-osteoporosis agent. *Heterocycles*, 68: 1565-1569 (2006)
- 7) 倉持大輔, 松下和彦, 加藤晴康, 河野照茂, 五十嵐・右高潤子, 平田和明, 鈴木信雄, 服部淳彦, 別府諸兄: 線維芽細胞成長因子-2 の骨芽細胞活性化作用に対する表皮ブドウ球菌膜タンパク質による抑制. 聖マリアンナ医科大学雑誌, 34: 395-404 (2006)
- 8) Suzuki, N. and Hattori, A.: Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sci.*, 73: 2237-2247 (2003)
- 9) Suzuki, N., Tabata, M.J., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Shimada, A., Takeda, H., Kobayashi, M., Wada, S., Katsumata, T. and Hattori, A.: Tributyltin inhibits osteoblastic activity and disrupts calcium metabolism through an increase in plasma calcium and calcitonin levels in teleosts. *Life Sci.*, 78: 2533-2544 (2006)

- 10) Suzuki, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Kambegawa, A. and Hattori, A.: Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism. *J. Bone Miner. Metab.*, 22: 439-446 (2004)
- 11) 鈴木信雄, 北村敬一郎, 根本 鉄, 清水宣明, 和田重人, 近藤 隆, 井尻憲一, 田畑 純, 新実信夫, 服部淳彦: 超音波刺激による骨形成促進作用: 魚のウロコのアッセイ系を用いた骨芽及び破骨細胞の解析. 第 15 回 ソノケミストリー 討論会講演論文集, 3-4 (2006)
- 12) Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura, K., Hosono, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M.J. and Hattori, A.: Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sci.*, 76: 2699-2709 (2005)
- 13) 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)