

# 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究：ウロコ及びマウスの頭蓋骨に対する重力応答

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、根本 鉄、清水宣明、笹山雄一、西内 巧、染井正徳、岡山大学 池亀美華、東京医科歯科大学 田畑 純、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、高崎一朗、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・ソリューションズ（株）永瀬 睦、久保田幸治、土屋美和、谷川直樹、吉馴重徳、大嶋一成、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）前田斉嘉、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、JSF 嶋津 徹、JAXA 矢野幸子、東京医科歯科大学 奈良雅之、服部淳彦

## Fish Scale Study for Space Biology: Gravity Responses in the Fish Scales and Mouse Calvarial Bone

Nobuo Suzuki<sup>1</sup>, Katsunori Omori<sup>2</sup>, Kenichi Ijiri<sup>3</sup>, Kei-ichiro Kitamura<sup>4</sup>, Tetsu Nemoto<sup>4</sup>, Nobuaki Shimizu<sup>1</sup>, Yuichi Sasayama<sup>1</sup>, Takumi Nishiuchi<sup>5</sup>, Masanori Somei<sup>6</sup>, Mika Ikegame<sup>7</sup>, Makoto J. Tabata<sup>8</sup>, Masahisa Nakamura<sup>9</sup>, Takashi Kondo<sup>10</sup>, Yukihiko Furusawa<sup>10</sup>, Kouhei Matsuda<sup>11</sup>, Yoshiaki Tabuchi<sup>12</sup>, Ichiro Takasaki<sup>12</sup>, Shigehito Wada<sup>13</sup>, Hironori Ando<sup>14</sup>, Haruo Kasahara<sup>15</sup>, Mutsumu Nagase<sup>16</sup>, Koji Kubota<sup>16</sup>, Yoshikazu Tsuchiya<sup>16</sup>, Naoki Tanigawa<sup>16</sup>, Shigenori Yoshinari<sup>16</sup>, Kazunari Oshima<sup>16</sup>, Tohru Suzuki<sup>17</sup>, Masato Endo<sup>18</sup>, Toshio Takeuchi<sup>18</sup>, Sadakazu Ejiri<sup>19</sup>, Yasutoku Kogaya<sup>19</sup>, Masahiro Maeda<sup>20</sup>, Hideaki Uchida<sup>20</sup>, Toshiki Taya<sup>20</sup>, Akio Hayashi<sup>20</sup>, Sadao Nakamura<sup>20</sup>, Kuniyo Sugitate<sup>20</sup>, Takeshi Serino<sup>21</sup>, Toru Shimazu<sup>22</sup>, Sachiko Yano<sup>2</sup>, Masayuki Nara<sup>23</sup>, Atsuhiko Hattori<sup>23</sup>

<sup>1</sup>Inst. of Nat. and Environ. Technol., Kanazawa Univ.; <sup>2</sup>Japan Aerospace Exploration Agency; <sup>3</sup>RI Center, Univ. of Tokyo; <sup>4</sup>Grad. Sch. of Med. Sci., Kanazawa Univ.; <sup>5</sup>Adv. Sci. Res. Center, Kanazawa Univ.; <sup>6</sup>Grad. Sch. of Nat. Sci and Technol., Kanazawa Univ.; <sup>7</sup>Grad. Sch. of Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.; <sup>8</sup>Grad. Sch. of Tokyo Med. Dent. Univ.; <sup>9</sup>Fac. of Edu. and Integ. Arts and Sci., Waseda Univ.; <sup>10</sup>Grad. Sch. of Med. and Pharmaceut. Sci., Univ. of Toyama; <sup>11</sup>Grad. Sch. of Sci. and Eng., Univ. of Toyama; <sup>12</sup>Life Sci. Res. Center, Univ. of Toyama; <sup>13</sup>Fac. of Med., Univ. of Toyama; <sup>14</sup>Grad. Sch. of Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.; <sup>15</sup>Japan Manned Space Systems Co.; <sup>16</sup>Chiyoda Advanced Solutions Co.; <sup>17</sup>Grad. Sch. of Agr. Sci., Tohoku Univ.; <sup>18</sup>Fac. of Marine Sci., Tokyo Univ. of Marine Sci. and Technol.; <sup>19</sup>Sch. of Dent., Asahi Univ.; <sup>20</sup>Agilent Technologies Japan, Ltd.; <sup>21</sup>Agilent Technologies International Japan, Ltd.; <sup>22</sup>Japan Space Forum; <sup>23</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: nobuo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

**Abstract:** Fish scale is calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and the bone matrix, all of which are similar to those found in mammalian membrane bone. Recently, we developed a new *in vitro* assay system using fish scale, which can be used to detect the activities of scale osteoblasts and osteoclasts simultaneously using the alkaline phosphatase (ALP) and the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) assay, respectively. Using the assay system, we examined hyper-gravity (3G) responses by centrifuge and vibration in the fish scales and compared these responses with those in the mouse calvarial bone. In addition, we developed an apparatus for space experiments using a recovery satellite and examined hyper-gravity (3G) by vibration responses to the fish scales. We found that the ALP activity in the goldfish scales significantly increased under 3G loading by centrifuge and vibration, while the TRAP activity in both loaded scales of goldfish significantly decreased. Similar results were obtained in the mouse calvarial bone. The goldfish scales that were put into the bag that would be used in the recovery satellite responded to hyper-gravity responses by vibration, as explained above. Thus, our assay system may help explain the mechanism of bone loss, such as that occurring during space flight.

**Key words:** Fish scale; Calvarial bone; Osteoblasts; Osteoclasts; Hyper-gravity response

## 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>1,2,3,4,5)</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>6,7,8)</sup>。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<sup>9)</sup>。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、僅か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月に実現した。

昨年度は、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、カルシトニンや副甲状腺ホルモン等のホルモンが哺乳類の骨と同様に作用することを確認した。さらに骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に関係する遺伝子である Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)と Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) のクローニングに成功し、フグ PTHにより RANK 及び RANKL mRNA の発現が共に上昇することがわかった。RANK の発現は18時間で顕著に上昇し、6時間培養の方が RANKL の発現は上昇率が大きく、細胞活性の変化と一致していた。したがって、ウロコは破骨細胞と骨芽細胞の相互作用を解析する良い骨のモデルであることを示している。

本年度は、遠心機の静的な重力とバイブレーションの動的な重力との応答をゼブラフィッシュのウロコを用いて解析する。その結果をマウスの頭蓋骨の結果と比較する。さらに回収衛星で用いるバックを用いて、バックに入れた状態のウロコがバイブレーションに応答するかを解析した。

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22年8月19日～20日に金沢大学能登臨海実験施設、10月27日に東京医科歯科大学教養部、11月5日に朝日大学、11月12日に金沢大学保健学科、11月22日に富山大学薬学部、12月14日～15日に東京医科歯科大学歯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23年3月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、本研究チームの研究成果の一部は、2010年宇宙生物科学会(仙台大会)で発表した。

### ①遠心機の過重力に対するウロコとマウスの頭蓋骨の応答

水棲生物用の麻酔薬 (MS-222) で麻酔したゼブラフィッシュからウロコを取り、左側全てのウロコと右側全てのウロコを別々のエッペンドルフチューブに入れ、L-15培地 (Gibco) を700 $\mu$ l 加えて、滅菌した綿球を用いてエッペンの中に入れたウロコが過重力により動かないように抑えた。その後、遠心機 (LIX-130、トミーデジタルバイオロジー (株)) にエッペンを取り付けて20分間3Gで遠心した<sup>10)</sup>。遠心後、3, 6, 12, 18及び24時間、培養 (15 $^{\circ}$ C) して、ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性を測定した。

破骨細胞の活性は、3Gという低強度の重力負荷でも応答し、3時間でも低下傾向が見られ、培養12時間と24時間で有意に低下した。一方、骨芽細胞の応答は破骨細胞よりも遅く、培養12時間までは変化がなく、18時間及び24時間で有意に上昇した。

マウス (C57BL系) の頭蓋骨においてもウロコと同様に遠心機の過重力に応答した。マウスとウロコの応答は非常によく似ており、破骨細胞は6時間の培養から低下傾向にあり、18及び24時間の培養で有意に低下した。一方、骨芽細胞の応答はウロコよりも遅く24時の培養で有意に上昇した。

### ②バイブレーションの加速度重力に対するウロコとマウスの頭蓋骨の応答

①の遠心機と同様にゼブラフィッシュのウロコを採取して、WGのメンバーの北村が自作した加速度発生装置<sup>11)</sup> (Figure 1参照) により、3Gで20分間処理し、その後3, 6, 12, 18及び24時間、15 $^{\circ}$ Cで培養して、ウロコの骨芽及び破骨細胞の活性を測定した。なお、①の遠心機と同様にして、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、ウロコの破骨細胞はバイブレーションの過重力に反応して、6、12 及び 24 時間の培養で有意に低下した。骨芽細胞の反応も遠心機と同様に、破骨細胞よりも反応が遅く、18 及び 24 時間の培養で有意に上昇した。

一方、マウスの頭蓋骨は 6 時間の培養で骨芽細胞の活性が著しく上昇し、その結果、破骨細胞が上昇傾向にあった。それ以外は、遠心機の過重力と同様に、破骨細胞の活性は 12、18 及び 24 時間の培養で有意に低下した。マウスの頭蓋骨の骨芽細胞の活性は、遠心機と比較して反応性がよく、6 時間の培養で顕著に上昇した。その後 18 時間の培養で有意に上昇した。

今回の実験で、ゼブラフィッシュのウロコもマウスの頭蓋骨も静的な遠心機の重力、バイブレーションの加速度重力に反応して、骨芽細胞の活性が上昇して、破骨細胞の活性が低下した。したがって、ウロコは、骨と同様に反応している可能性が高い。今後遺伝子発現を中心に調べていく予定である。

### ③回収衛星用バックに入れたウロコの過重力に対する反応

千代田アドバンス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<sup>12)</sup>で使用するバックに再生ウロコ（ウロコを抜いて 25℃で 2 週間飼育したキンギョより採取した再生ウロコ）を入れて、バイブレーションの過重力の反応を解析した（Figure 1）。

キンギョ 3 個体を用いて、バイブレーションの過

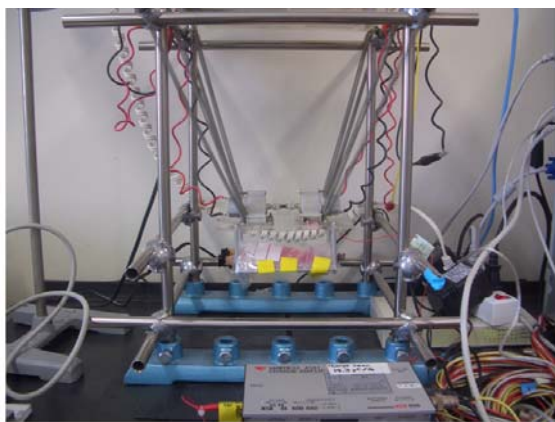


Figure 1 Gravity-providing system  
Scales were put into a bag that would be used in the recovery satellite and loaded to 3G acceleration in the Z-axis.

重力G（3G）をかけて、15℃で 6 時間培養し、再生ウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性の変化を解析した。その結果、破骨細胞は 3 個体全て、非常によく反応して、破骨細胞の活性が有意に低下した。一方、骨芽細胞の活性もすべての個体において骨芽細胞の活性が上昇して、3 個体中 2 個体が有意に上昇した。

したがって、バックに入れても、これまでのエッペンで培養した時<sup>13)</sup>とほとんど同じように重力に反応することがわかった。

### 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、昨年 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。冷凍したウロコ、RNA later 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、現在解析中である。

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反応することが判明した。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、次回の宇宙実験の方針を立てていく予定である。

### 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) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) Suzuki, N., Kitamura, K., Omori, K., Nemoto, T., Satoh, Y., Tabata, M.J., Ikegame, M., Yamamoto, T., Ijiri, K., Furusawa, Y., Kondo, T., Takasaki, I., Tabuchi, Y., Wada, S., Shimizu, N., Sasayama, Y., Endo, M., Takeuchi, T., Nara, M., Somei, M., Maruyama, Y., Hayakawa, K., Shimazu, T., Shigeto, Y., Yano, S. and Hattori, A.: Response of osteoblasts and osteoclasts in regenerating scales to gravity loading. *Biol. Sci. Space*, 23: 211-217 (2009)