

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

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、東京医科歯科大学 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、久保田幸治、東京医科歯科大学 奈良雅之、服部淳彦

Regulation of Bone Metabolism under Simulated Micro-Gravity and Hyper-Gravity Loading: Analysis by the Cultured Scales of Goldfish

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, Koji Kubota¹², Masayuki Nara¹³, Atsuhiko Hattori¹³

¹Inst. of Nat. and Environ. Technol., Kanazawa Univ.; ²Japan Aerospace Exploration Agency; ³RI Center, Univ. of Tokyo; ⁴Grad. Sch. of Med. Sci., Kanazawa Univ.; ⁵Grad. Sch. of Tokyo Med. Dent. 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: Fish scale is a calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix, all of which are similar to those found in mammalian bone. Recently, we developed a new *in vitro* model system using goldfish scale. This system can detect the activities of osteoblasts and osteoclasts with alkaline phosphatase (ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) as the respective markers and analyze the co-relationship between osteoblasts and osteoclasts. Using this system, we indicated that osteoblastic and osteoclastic activities in the scale responded to the simulated microgravity with a three-dimensional clinostat. As these activities in the scale did not change by the stimulation with a two-dimensional clinostat, we believe that the response to simulated microgravity in the scale osteoblasts and osteoclasts is a specific phenomenon. In addition, we analyzed the bone metabolism under 2-, 4-, and 7-gravity (G) loading with a centrifuge and compared them with the control (1-G). The osteoblastic activity significantly increased under 2- and 4-G loading. This activity increased remarkably under 7-G loading. On the other hand, we found that the osteoclastic activity significantly decreased under 2-G loading. Under 4-G loading, there was no significant difference between G-loaded scales and control scales. The osteoclastic activity tended to increase under 7-G loading. These results were similar to our previous study of acceleration by vibration. With the goal of developing a drug for bone diseases, the effect of novel bromomelatonin derivatives on osteoblasts and osteoclasts was examined. All bromomelatonin derivatives had an inhibitory action on osteoclasts. In particular, 1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin (benzyl-tribromomelatonin) possessed a stronger activity than melatonin. In reference to osteoblasts, all bromomelatonin derivatives had a stimulatory action. In addition, estrogen receptor mRNA expression (an osteoblastic marker) was increased in benzyl-tribromomelatonin (10^{-7} M)-treated scales. Therefore, this chemical will be useful to treat bone diseases, such as those experienced in space flight.

Key words; Fish scale; Osteoblasts; Osteoclasts; Three-dimensional clinostat; Centrifuge; Bromomelatonin derivative

1. 本WGの目的

宇宙実験では骨芽細胞の培養株を用いた実験はあるが、破骨細胞は多核の活性型に誘導する必要があるが、

培養した破骨細胞を用いた宇宙実験は実現していない。また宇宙飛行士及びラットによる宇宙実験 (*in vivo*) や、後肢懸垂ラット等を用いた地上実験 (*in*

vivo) では、骨芽細胞の活性低下はいつも起こるが、破骨細胞については結果に一致を欠いており、変化しなかったという報告とその活性が上昇したという報告がある¹⁾。

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^{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システムを開発した^{6,7,8)}。このシステムを用いて、昨年度はバイブレーションによる加速度の重力刺激及び超音波の音圧により生じる機械的刺激に対する骨芽細胞及び破骨細胞の相互作用を解析した⁹⁾。さらに3次元クリノスタットによる擬似微小重力下でウロコを培養した結果、骨芽細胞の活性が低下し、破骨細胞の活性が上昇した⁹⁾。したがって、ウロコは3次元クリノスタットによる擬似微小重力に応答し、宇宙空間で進行する骨密度低下に近い状態になったと考えられる。

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19年11月20日及び21日に筑波宇宙センター、平成19年12月7日に東京医科歯科大学教養部で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。さらに、平成20年2月下旬から3月上旬に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。なお遠心機の過重力刺激の結果は、2007年宇宙生物科学会で発表し、*Biol. Sci. Space*¹⁰⁾に、新規プロモメラトニンの成果は、*J. Pineal Res.*¹¹⁾に掲載予定である。

①3次元クリノスタットによる擬似微小重力刺激に対する骨芽細胞及び破骨細胞の反応

今年度は、昨年度の再現性を確認するため、まず細胞活性の変化を中心に解析し、さらに1軸(2次元)でクリノスタットを回転させ、3次元のデータと比較した。

キンギョ(*Carassius auratus*) 8個体を使用して、昨年度と同じ条件⁹⁾で擬似微小重力に対する影響を解

析した。昨年度は6時間しか実験を行わなかったが、今年度は、6及び24時間の2回にわたりサンプリングし、長時間処理に対する影響も調べた。その結果、骨芽細胞の活性は6時間の処理により8個体中6個体において、骨芽細胞の活性が低下し、24時間の処理により8個体中7個体において、骨芽細胞の活性が有意に下がった。一方、破骨細胞の活性は、6時間の処理により8個体中5個体において上昇し、24時間の処理により8個体中6個体において、破骨細胞の活性が有意に上がった。

培養細胞に対する影響を3次元クリノスタットで調べる場合は、培地の流動が細胞活性に影響を及ぼす可能性がある。そこで本研究では、昨年度と同様、エッペンドルフチューブ内に綿球を詰めてウロコを固定し、ウロコの動きを抑え、かつ培地の流動をできるだけ低減する工夫を施した。結果として、ウロコは非常に感度よく3次元クリノスタットに応答した。

次に1軸(2次元)でクリノスタットを6時間回転させ、骨芽細胞及び破骨細胞の応答を解析した。その結果、骨芽細胞の活性は3次元では低下するのに、2次元では変化しなかった。また破骨細胞の活性は3次元ではその活性が上昇したが、2次元では変化しなかった。したがって、3次元クリノスタットに対するウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に現れた現象は、微小重力に特異的な反応である可能性が高い。

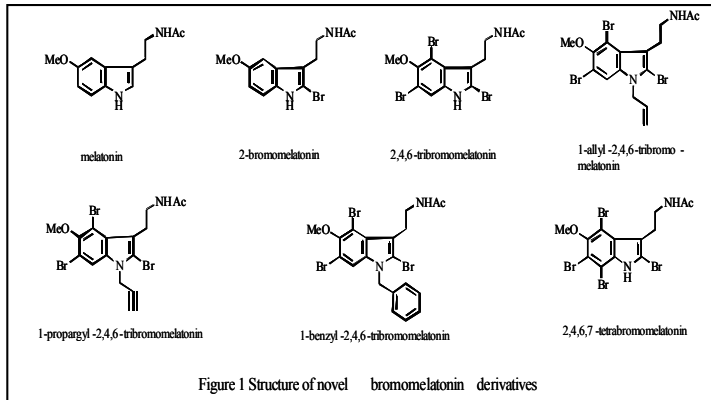
②遠心機の過重力刺激に対する骨芽及び破骨細胞の反応

水棲生物用の麻酔薬(MS-222)で麻酔したキンギョからウロコを取り、そのウロコを半分に切り、片方を実験群とし、他方をコントロール群(1G)とした。2,4及び7Gで遠心機(LIX-130、トミーデジタルバイオロジー(株))を用いて5及び10分間遠心した後、6及び24時間培養し、ウロコの骨芽・破骨細胞の活性を測定した。なおそれぞれの実験は3回行い、ウロコは各群とも12枚使用した。ウロコの培養方法及び細胞の活性測定は、Suzuki and Hattori (2002)の方法⁷⁾を用いた。

骨芽細胞の活性は、2Gという低強度の重力負荷でも応答し、5及び10分間処理により、その活性が上昇した。4Gでは2Gとあまり変わらないが、7Gでは顕著に骨芽細胞の活性が上昇した。さらに破骨細胞の活性も2Gで5分間処理しても応答し、その活性が低下した。破骨細胞活性の低下率は、強度が上がるにつれて下がり、7Gでは破骨細胞の活性が上昇する傾向にあった。これらの結果は、バイブレーションによる加速度重力の結果と似ており¹²⁾、ウロコは重力刺激に感度よく応答したことを示している。

③新規プロモメラトニンの骨芽細胞及び破骨細胞に

に対する反応



宇宙空間で引き起こされる骨疾患の治療薬の開発を行うため、新規インドール化合物を合成し、骨芽及び破骨細胞に対する作用を解析した。

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-アニル-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 (Figure 1) 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を用いた培養系で評価した。培養時間は6時間で、濃度は 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} M でその作用を解析した。

次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} 、 10^{-7} M において、骨に対する作用をメラトニンと比較し、詳細に調べた。さらに、骨芽細胞で発現しているエストロゲン受容体の発現 (6時間培養) に対する影響も解析した。

その結果、Br 原子を3個導入したアナログでは、破骨細胞の活性抑制作用は強く、メラトニンと同等であった。しかし Br 原子を1及び4個入れたアナログは、メラトニンの方が破骨細胞の活性抑制作用は強かった。一方、メラトニンは骨芽細胞の活性を低下させたが、Br 原子を導入した全てのアナログは、骨芽細胞の活性を上昇させることが判明した。特に、1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンの作用は強く、この化合物を用いて、詳細に調べた。

1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン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 でも効果がみられた。また 1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンはメラトニンとは異なり、骨芽細胞の活性を上げ、その作用は18時間でも持続しており、 10^{-8} M でも効果がみられた。

骨芽細胞のマーカーであるエストロゲン受容体 mRNA の発現は、1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン処理で有意に上昇することも判明した。したがって、この新規インドール化合物は、宇宙空間で引き起こされる骨疾患の治療薬として有望である。

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おり、骨のモデルとして使用可能である。前回の加速度の重力刺激、超音波のメカニカルストレス、3次元クリノスタットによる擬似微小重力刺激に加えて、今年度は遠心機の過重力刺激にも感度よく反応した。このモデルを用いれば、宇宙空間における微小重力の骨代謝に対する影響を正確に解析できる可能性が高い。

さらに新規ブロモメラトニンは、骨芽細胞の活性を上昇させ、破骨細胞の活性を低下させることが判明した。したがって、この化合物は宇宙空間で進行する骨密度低下の治療薬として有望であり、現在骨疾患のモデルとして用いられている卵巣除去ラットや低カルシウム食を与えたラットを用いた動物実験により、新規インドール化合物の作用を確認中である。

4. 今後の予定

国際宇宙ステーション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。

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。またウロコは、 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、少量の培地を入れたチューブ (エッペンドルフチューブ) にウロコを入れ、チューブ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関しても検討し、宇宙実験に向けての準備を進めていく予定である。

本WGの活動の一部は、(財)日本宇宙フォーラムの宇宙環境利用に関する公募地上研究 (研究代表: 鈴木信雄) の一環として行われた。

5. 引用文献

- 1) Carmeliet, G., Vico, L. and Bouillon, R.: Space flight: A challenge for normal bone homeostasis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 11: 131-144 (2001)
- 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) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 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, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究. *Space Utiliz. Res.*, 23: 318-321 (2007)
- 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*, in press
- 11) Suzuki, N., Somei, M., Kitamura, K., Reiter, R.J. and Hattori, A.: Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: Implications for the treatment of bone diseases. *J. Pineal Res.*, in press
- 12) 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 on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Adv. Space Res.*, 40: 1711-1721 (2007)