

# 宇宙飛行士の様々な疾患の治療薬として有効なメラトニンに関する研究

鈴木 信雄（金沢大），平山 順（小松大），高橋 昭久（群馬大），黒田 康平（金沢大），保田 夏野（群馬大），田淵 圭章（富山大），古澤 之裕（富山県大），池亀 美華（岡山大），渡辺 数基（小松大），丸山 雄介（立教大），松原 創（金沢大），中野 貴由（大阪大），木村 廣美（千歳科技大），河島 遼太郎（小松大），三島弘幸（東京大），加藤 晴康（立教大），関 あずさ（ハムリー（株）），服部 淳彦（立教大）

## Study of melatonin as an effective therapeutic agent for various diseases in astronauts

Nobuo Suzuki<sup>1\*</sup>, Jun Hirayama<sup>2</sup>, Akihisa Takahashi<sup>3</sup>, Kouhei Kuroda<sup>1</sup>, Natsuno Yasuda<sup>3</sup>, Yoshiaki Tabuchi<sup>4</sup>, Yukihiko Furusawa<sup>5</sup>, Mika Ikegame<sup>6</sup>, Kazuki Watanabe<sup>2</sup>, Yusuke Maruyama<sup>7</sup>, Hajime Matsubara<sup>1</sup>, Takayoshi Nakano<sup>8</sup>, Hiromi Kimura-Suda<sup>9</sup>, Ryotaro Kawamura<sup>2</sup>, Hiroyuki Mishima<sup>10</sup>, Haruyasu Kato<sup>7</sup>, Azusa Seki<sup>11</sup>, Atsuhiko Hattori<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Kanazawa University, <sup>2</sup>Komatsu University, <sup>3</sup>Gunma University, <sup>4</sup>University of Toyama, <sup>5</sup>Toyama Prefectural University, <sup>6</sup>Okayama University, <sup>7</sup>Rikkyo University, <sup>8</sup>Osaka University, <sup>9</sup>Chitose Institute of Science and Technology, <sup>10</sup>The University of Tokyo, <sup>11</sup>Hamuri Co., Ltd.

E-Mail: nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp

**Abstract:** Astronauts suffer from bone disease because of the reduction of bone density induced in space. Furthermore, astronauts are at risk of cellular damage inflicted by space radiation. Therefore, therapeutic agents for the treatment of several diseases in astronauts are urgently required. Here, we conducted space experiments using goldfish scales with osteoblasts and osteoclasts to analyze the effects of melatonin on bone metabolism and space-induced radiation damage. At the International Space Station, microgravity induced osteoclastic activity and significantly upregulated gene expression involved in osteoclast differentiation and activation. Moreover, the osteoclasts were larger, and the number of nuclei in multinucleated osteoclasts was significantly greater under microgravity conditions. In turn, treatment with melatonin significantly stimulated the expression of the mRNA encoding *calcitonin* (an osteoclast-inhibiting hormone) and decreased the expression of the mRNA for *the receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand* (a promoter of osteoclastogenesis), which coincided with the suppression of the expression of genes involved in osteoclast functions. Furthermore, our space experiments using goldfish scales demonstrated that melatonin exerted a rescue effect on cells that were damaged by space radiation. Based on these results, we will analyze the response of scales to lunar gravity, to investigate the rescue action of melatonin, thus contributing to the identification of therapeutic agents for several diseases in astronauts.

**Key words:** Space experiment, International Space Station, Fish scales, Bone metabolism, Space radiation, Melatonin, Rescue effect

### 1. はじめに

人類は再び月を目指し、月に拠点を建設することにより人類の持続的な活動を目指している。この計画は NASA が提案した計画であり「アルテミス計画」と呼ばれている。日本を含めた 8 ケ国が 2020 年 10 月にこの計画にサインしている。月の重力は地球の 1/6 であり、さらに大気や磁場が無いため宇宙放射線の影響を直接受ける環境である。従って、人類が月での持続可能な活動を行うためには、低重力の影響及び宇宙放射線との複合的な影響を予防する薬の開発が必須である。本研究では、我々が低重力環境下及び宇宙放射線の存在下で用いてきた魚類のウロコの特徴を説明し、これまで得られた宇宙実験の成果を述べる。

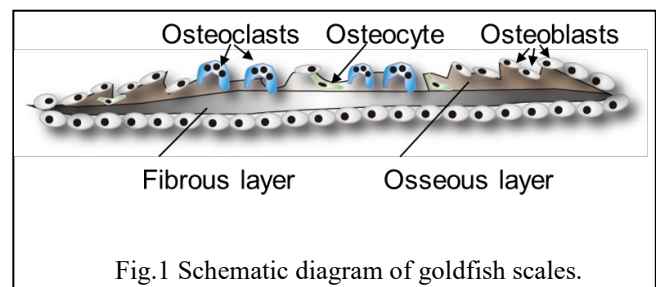


Fig.1 Schematic diagram of goldfish scales.

### 2. 魚類のウロコと哺乳類の骨との共通性

魚類のウロコは、直接化骨をする点で哺乳類の頭蓋骨等の膜性骨に似ており、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なる石灰化層の二つを主体とする。そして石灰化層の上に、骨芽細胞と破骨細胞が共存し、添加的石灰化による骨形成や破骨細胞による骨吸収を行

っている<sup>1,2)</sup>。最近、我々はウロコに骨細胞様細胞が存在することも明らかにした<sup>3)</sup>。したがって、ウロコは、コンパクトな骨モデルであると言える (Fig. 1 参照)。

### 3. 宇宙実験でウロコを用いる利点

我々が開発したキンギョのウロコの培養システムは、①材料の調整が容易でかつ状態がよい、②培養の維持が非常に簡便、しかも、培地を交換しなくても長期 (1 週間程度) 培養が可能であり、③ロケットの発射延期にも対応可能という利点がある。また、ウロコは体表にあるため採取が容易であり、一つの培養断片がひとつのウロコであるために骨組織の損傷がほとんどなく、一個体からとれるウロコの数も多い。さらに、培養の維持には、室温 (20°C 前後) で行い、炭酸ガスが不要なので特殊な機材を必要とせず宇宙ステーションでの設置や操作が簡便である。

### 4. メラトニンの骨吸収抑制作用及びラジカル除去作用

メラトニンは、必須アミノ酸の1つであるトリプトファンからセロトニンを経て合成される分子量 232 のアミン (N-アセチル-5-メトキシトリプタミン) である。メラトニンは様々な作用を持つことが知られているが、近年骨代謝への関与が明らかになっている。孵化直後のニワトリの松果体を除去すると、ニワトリの骨代謝に影響を及ぼして、脊柱側彎変形を引き起こす<sup>4)</sup>。さらにマウスの飼育水にメラトニンを添加して、16 ケ月飼育すると、マウスの骨代謝に影響を及ぼして、大腿骨の骨幹部において、メラトニン投与群はメラトニン無添加の対照群より有意に海綿骨密度が高い値を示した<sup>5)</sup>。そこで我々は、メラトニンの破骨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調べた。その結果、メラトニンは破骨細胞の活性を抑制することが判明した<sup>6)</sup>。

一方メラトニンの起源は古く、シアノバクテリアや植物にも存在しており、現時点ではシアノバクテリアや植物において受容体を介した作用ではなく、ラジカル除去に作用していると考えられている<sup>7)</sup>。メラトニンは1分子のラジカル消去作用にとどまらず、メラトニンから酵素的、酸化的に生成した (N<sup>1</sup>-アセチル-N<sup>2</sup>-ホルミル-5-メトキシキヌラミン) などが、ラジカルを除去すると考えられている<sup>8)</sup>。放射線による細胞障害は、フリーラジカルを介することが知られているので、メラトニンは宇宙放射線を防御できる可能性が高い。

以上のことから、骨吸収抑制作用とラジカル除去作用を持つメラトニンは、宇宙空間で引き起こされる骨密度低下を防ぎ、宇宙放射線の防御に作用する可能性があり<sup>9)</sup>、キンギョのウロコを用いた宇宙実験を計画した。

### 5. 宇宙実験 (Fish scales) の成果

キンギョのウロコを用いた宇宙実験 (Fish scales) を実施して、その研究成果を国際誌<sup>3,9-12)</sup>に発表してきた。その成果の一部を以下に示す。

#### ① 微小重力下での骨吸収促進作用

ウロコの表面に破骨細胞及び骨芽細胞が存在するので、ウロコは切片を作成しなくてもホールマウントでの細胞の形態学的な解析が可能である。そこで宇宙空間において、22°C で 86 時間培養したウロコの破骨細胞及び骨芽細胞の形態学的な変化を調べた。その結果、破骨細胞において顕著な変化を見出すことができた。破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性 (TRAP 活性) は主にウロコの溝条の縁に沿って観察された。溝条の幅は Flight-1G よりも Flight- $\mu$ G の方が広がって削られており、溝の幅に有意差が認められた。さらに TRAP 活性は、Flight-1G における TRAP 活性と比較して、Flight- $\mu$ G の方が Flight-1G よりも有意に高い値を示した。

Flight- $\mu$ G において、破骨細胞の多核化が進んでおり、Flight- $\mu$ G の破骨細胞の核の数が有意に増加していた。破骨細胞から分泌される酸や酵素が漏れないようにシールする働きのあるアクチンリングの保有数も Flight- $\mu$ G で増加しており、そのサイズにおいても、Flight- $\mu$ G の方が Flight-1G よりも大きくなっていった。

以上のことから、宇宙空間において、ウロコは微小重力環境に感度よく応答して、破骨細胞の活性化及び骨吸収の増加が引き起こされていたことがわかった。

#### ② 微小重力下でのメラトニンの骨吸収抑制作用

宇宙空間において活性化された破骨細胞は、メラトニンの添加により、その活性が抑制されることがわかった。破骨細胞のマーカー遺伝子であるマトリックスメタロプロテアーゼ 9 やカテプシン K は、微小重力下でその発現が上昇するが、メラトニンを添加すると Flight-1G のレベルまで発現量が低下することが判明した。またメラトニンは破骨細胞の活性を抑制するホルモンであるカルシトニンの骨芽細胞からの分泌を促進させることもわかった。さらに、破骨細胞を活性化させる因子である *rankl* の発現をメラトニンは抑制することも明らかになった。

#### ③ メラトニンの宇宙放射線の防御作用

宇宙空間及び地上で培養したキンギョのウロコの *de novo* トランスクリプトーム解析を行い、メラトニンの影響を調べた。その結果、宇宙空間



Fig.2 Photograph of Simulator of the environments on the Moon and Mars with Neutron-irradiation and Gravity-change (SwiNG).

で *hsp* 関連遺伝子、例えば、*dnaj1*、*dnajb1*、*hspd1* が上昇することがわかった。上昇したこれらの遺伝子発現は、メラトニンにより抑制されることがわかった。さらに *bcl3* や *bcl11b* などの抗アポトーシス *bcl* ファミリー遺伝子は宇宙空間で低下したが、低下した *bcl* ファミリー遺伝子の発現は、メラトニン処理により回復することも証明することができた。

## 5. 今後の展望

キンギョのウロコは、物理的な刺激に対する応答性が良く、遠心機の静的な過重力<sup>13)</sup>、バイブレーションによる動的な過重力<sup>14)</sup>及び超音波による音圧刺激<sup>15)</sup>に応答する。さらに我々は、国際宇宙ステーション「きぼう」を用いた宇宙実験により微小重力に対しても感度よく応答することを証明した<sup>10,12)</sup>。

一方、人類は再び月を目指し、月に拠点を建設して月での人類の持続的な活動を目指している。そのため月面の環境が骨に与える影響を調べる必要がある。月面の重力は1/6Gであり、その1/6Gを擬似的に作り出す機器（SwiNG: Simulator of the environments on the Moon and Mars with Neutron-irradiation and Gravity-change）（Fig. 2）<sup>16)</sup>を用いて、予備的に実験を実施した。その結果、ウロコは1/6Gに反応して、破骨細胞のマーカー遺伝子の発現が上昇して、骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現が低下することがわかった。また SwiNG は放

射線の影響も調べることができるため、骨代謝に加えて、放射線の影響を評価し、骨吸収に対するメラトニンのレスキュー作用についても詳細に調べていく予定である。

## 参考文献

- 1) 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).
- 2) Thamamongood, T.A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N. and Hattori, A.: Expression of osteoblastic and osteoclastic genes during spontaneous regeneration and autotransplantation of goldfish scale: A new tool to study intramembranous bone regeneration. *Bone*, **50**, 1240-1249 (2012).
- 3) Yamamoto, T., Ikegame, M., Hirayama, J., Kitamura, K., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Sekiguchi, T., Endo, M., Mishima, H., Seki, A., Yano, S., Matsubara H., Hattori, A. and Suzuki, N.: Expression of sclerostin in the regenerating scales of goldfish and its increase under microgravity during space flight. *Biomed. Res. (Tokyo)*, **41**, 279-288 (2020).
- 4) Katoh, H. and Hattori, A.: Experimental scoliosis produced by pinealectomy and characterization of melatonin binding sites in vertebrae of chicks. *St. Marianna Med. J.*, **23**, 853-861 (1995).
- 5) Igarashi-Migitaka, J., Seki, A., Ikegame, M., Honda, M., Sekiguchi, T., Mishima, H., Shimizu, N., Matsubara, H., Srivastav, A.K., Hirayama, J., Maruyama, Y., Kamijo-Ikemori, A., Hirata, K., Hattori, A. and Suzuki, N.: Oral administration of melatonin contained in drinking water increased bone strength in naturally aged mice. *Acta Histochem.*, **122**, 151596 (2020).
- 6) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, **33**, 253-258 (2002).
- 7) Hattori, A. and Suzuki, N.: Receptor-mediated and receptor-independent actions of melatonin in vertebrates. *Zool. Sci.*, in press (2024).
- 8) Tan, D.X., Manchester, L.C., Burkhardt, S., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Shohami, E., Huo, Y.S., Hardeland, R. and Reiter, R.J.: N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J*, **15**, 2294-2296 (2001).
- 9) Hirayama, J., Hattori, A., Takahashi, A., Furusawa, Y., Tabuchi, Y., Shibata, M., Nagamatsu, A., Yano,

- S., Maruyama, Y., Matsubara, H., Sekiguchi, T. and Suzuki, N.: Physiological consequences of space flight, including abnormal bone metabolism, space radiation injury, and circadian clock dysregulation: Implications of melatonin use and regulation as a countermeasure. *J. Pineal Res.*, **74**, e12834 (2023).
- 10) Ikegame, M., Hattori, A., Tabata, M.J., Kitamura, K., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Maruyama, Y., Yamamoto, T., Sekiguchi, T., Matsuoka, R., Hanmoto, T., Ikari, T., Endo, M., Omori, K., Nakano, M., Yashima, S., Ejiri, S., Taya, T., Nakashima, H., Shimizu, N., Nakamura, M., Kondo, T., Hayakawa, K., Takasaki, I., Kaminishi, A., Akatsuka, R., Sasayama, Y., Nishiguchi, T., Nara, M., Iseki, H., Chowdhury, V.S., Wada, S., Ijiri, K., Takeuchi, T., Suzuki, T., Ando, H., Matsuda, K., Somei, M., Mishima, H., Mikuni-Takagaki, Y., Funahashi, H., Takahashi, A., Watanabe, Y., Maeda, M., Uchida, H., Hayashi, A., Kambegawa, A., Seki, A., Yano, S., Shimazu, T., Suzuki, H., Hirayama, J. and Suzuki, N.: Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight. *J. Pineal Res.*, **67**, e12594 (2019).
  - 11) Furusawa, Y., Yamamoto, T., Hattori, A., Suzuki, N., Hirayama, J., Sekiguchi, T. and Tabuchi, Y.: De novo transcriptome analysis and gene expression profiling of fish scales isolated from *Carassius auratus* during space flight: A impact of melatonin on the gene expression in response to space radiation. *Mol. Med. Rep.*, **22**, 2627-2636 (2020).
  - 12) Yamamoto, T., Ikegame, M., Furusawa, Y., Tabuchi, Y., Hatano, K., Watanabe, K., Kawago, U., Hirayama, J., Yano, S., Sekiguchi, T., Kitamura, K., Endo, M., Nagami, A., Matsubara, H., Maruyama, Y., Hattori, A. and Suzuki, N.: Osteoclastic and osteoblastic responses to hypergravity and microgravity: Analysis using goldfish scales as a bone model. *Zool. Sci.*, **39**, 388-396 (2022).
  - 13) 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).
  - 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., Hanmoto, T., Yano, S., Furusawa, Y., Ikegame, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kitamura, K., Endo, M., Yamamoto, T., Sekiguchi, T., Urata, M., Mikuni-Takagaki, Y. and Hattori, A.: Low-intensity pulsed ultrasound induces apoptosis in osteoclasts: Fish scales are a suitable model for analysis of bone metabolism by ultrasound. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, **195**, 26-31 (2016).
  - 16) Takahashi, A., Yamanouchi, S., Takeuchi, K., Takahashi, S., Tashiro, M., Hidema, J., Higashitani, A., Adachi, T., Zhang, S., Guirguis, F.N.L., Yoshida, Y., Nagamatsu, A., Hada, M., Takeuchi, K., Takahashi, T. and Sekitomi, Y.: Combined environment simulator for low-dose-rate radiation and partial gravity of Moon and Mars. *Life*, **10**, 274 (2020).