

平成 20 年 3 月 26 日

平成 19 年度「魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究」活動報告書

代表者所属 氏名 金沢大学 環日本海域環境研究センター 鈴木信雄

1. 構成メンバー

氏名	所属
鈴木信雄	金沢大学環日本海域環境研究センター
大森克徳	宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究本部 ISS 科学プロジェクト室
服部淳彦	東京医科歯科大学 教養部
井尻憲一	東京大学 アイソトープ 総合センター
北村敬一郎	金沢大学大学院 医学系 研究科
清水宣明	金沢大学 自然計測応用 研究センター
田畑 純	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科
池亀美華	岡山大学大学院 医歯薬 学総合研究科
中村正久	早稲田大学 教育総合科 学学術院
近藤 隆	富山大学大学院 医学薬 学研究部
安東宏徳	九州大学大学院 農学研 究院
松田恒平	富山大学大学院 理工学 研究部
奈良雅之	東京医科歯科大学 教養 部
笠原春夫	有人宇宙システム (株)
永瀬 睦	千代田アドバンスト・ソ リューションズ (株)

2. 本年度 WG 会合開催実績

- (1) 第 1 回：平成 19 年 11 月 20 日-21 日
- (2) 第 2 回：平成 19 年 12 月 7 日
- (3) 第 3 回：平成 20 年 3 月 5 日-6 日

3. 活動目的

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 型コラーゲンとヒ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。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。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。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。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対する応答を地上実験で解析し、宇宙実験を目指している。

4. 活動内容

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 3 月 5 日-6 日にも WG の会合を開催し、来年度の活動について論議した。

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、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新規ブロモメラトニンの骨芽細胞及び破骨細胞に対する反応

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-アリル-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個導入した誘導体では、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個入れた誘導体は、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誘導体は、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。

5. 成果

「きぼう」船内実験室第2期利用候補テーマに選定、代表：鈴木信雄

原著論文

- 1) Suzuki, N. et al.: 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)
- 2) Azuma, K. et al.: Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362: 594-600 (2007)
- 3) Suzuki, N. et al.: Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: Implications for the treatment of bone diseases. *J. Pineal Res.*, 44:326-334 (2008)
- 4) Suzuki, N. et al.: Scale osteoblasts and

osteoclasts sensitively respond to low-gravity loading by centrifuge. *Biol. Sci. Space*, in press

総説

- 1) 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, pp.55-57, 2007.

学会発表

- 1) 北村敬一郎他: 魚のウロコを用いた新規モデルシステムの開発. 第46回日本生体医工学会, 仙台 (2007, 4), 生体医工学, 45 Suppl.: 110 (2007)
- 2) Suzuki, N.: Effect of physical stress on the osteoblasts and osteoclasts: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. The 6th International Satellite Symposium on the Comparative Endocrinology of Calcium Regulation (17th Scientific Meeting Second Joint Meeting of International Bone and Mineral Society), Montreal, Canada (2007,6)
- 3) 鈴木信雄他: 超音波の機械的刺激及び加速度の重力刺激に対する骨芽・破骨細胞の応答. 第78回日本動物学会, 弘前 (2007, 9)
- 4) Kitamura, K. et al.: Effects of low-intensity ultrasound on bone metabolism in goldfish scale. International Symposium of Sonochemistry and Sonoprocessing 2007, Kyoto, Japan (2007, 12)
- 5) 鈴木信雄他: 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. 第24回宇宙利用シンポジウム, 東京 (2008,1)
- 6) 鈴木信雄他: 物理的刺激に対する骨芽・破骨細胞の応答: 魚類のウロコを骨のモデルとした骨代謝の解析. 第35回日本生体電気・物理的刺激研究会, 新潟 (2008, 3)