

魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究：新規メラトニン誘導体のウロコ及び骨疾患ラットの骨代謝に対する作用

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、新潟大学 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、吉駒重徳、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、佐藤和彦、渡邊竜太、森部絢嗣、高知学園短期大学 三島弘幸、アジレントテクノロジー（株）前田齊嘉、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、ハムリー（株） 関 あずさ、昭和大学 舟橋久幸、東京医科歯科大学 奈良雅之、服部淳彦

Fish Scale Study for Space Biology: Effects of Novel Melatonin Derivatives on the Bone Metabolism in Both Fish Scales and Ovariectomized Rats

Nobuo Suzuki¹, Katsunori Omori², Kenichi Ijiri³, Kei-ichiro Kitamura⁴, Tetsu Nemoto⁴, Nobuaki Shimizu¹, Yuichi Sasayama¹, Takumi Nishiuchi⁵, Masanori Somei¹, Mika Ikegame⁶, Makoto J. Tabata⁷, Masahisa Nakamura⁸, Takashi Kondo⁹, Yukihiko Furusawa⁹, Kouhei Matsuda¹⁰, Yoshiaki Tabuchi¹¹, Ichiro Takasaki¹¹, Shigehito Wada¹², Hironori Ando¹³, Haruo Kasahara¹⁴, Mutsumu Nagase¹⁵, Koji Kubota¹⁵, Yoshikazu Tsuchiya¹⁵, Naoki Tanigawa¹⁵, Shigenori Yoshinari¹⁵, Kazunari Oshima¹⁵, Tohru Suzuki¹⁶, Masato Endo¹⁷, Toshio Takeuchi¹⁷, Sadakazu Ejiri¹⁸, Yasutoku Kogaya¹⁸, Kazuhiko Satoh¹⁸, Ryuta Watanabe¹⁸, Junji Moribe¹⁸, Hiroyuki Mishima¹⁹, Masahiro Maeda²⁰, Hideaki Uchida²⁰, Toshiki Taya²⁰, Akio Hayashi²⁰, Sadao Nakamura²⁰, Kuniyo Sugitate²⁰, Takeshi Serino²¹, Toru Shimazu²², Sachiko Yano², Azusa Seki²³, Hisayuki Funahashi²⁴, Masayuki Nara²⁵, Atsuhiko Hattori²⁵

¹Inst. of Nat. and Environ. Technol., Kanazawa Univ.; ²Japan Aerospace Exploration Agency; ³RI Center, Univ. of Tokyo; ⁴Grad. Sch. of Med. Sci., Kanazawa Univ.; ⁵Adv. Sci. Res. Center, Kanazawa Univ.; ⁶Grad. Sch. of Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.; ⁷Grad. Sch. of Tokyo Med. Dent. Univ.; ⁸Fac. of Edu. and Integ. Arts and Sci., Waseda Univ.; ⁹Grad. Sch. of Med. and Pharmaceut. Sci., Univ. of Toyama; ¹⁰Grad. Sch. of Sci. and Eng., Univ. of Toyama; ¹¹Life Sci. Res. Center, Univ. of Toyama; ¹²Fac. of Med., Univ. of Toyama; ¹³Sado Marine Biological Station, Niigata University; ¹⁴Japan Manned Space Systems Co.; ¹⁵Chiyoda Advanced Solutions Co.; ¹⁶Grad. Sch. of Agr. Sci., Tohoku Univ.; ¹⁷Fac. of Marine Sci., Tokyo Univ. of Marine Sci. and Technol.; ¹⁸Sch. of Dent., Asahi Univ.; ¹⁹Kochi Gakuen Coll.; ²⁰Agilent Technologies Japan, Ltd.; ²¹Agilent Technologies International Japan, Ltd.; ²²Japan Space Forum; ²³Hamri Co. Ltd.; ²⁴Showa Univ. Sch. of Med.; ²⁵Coll. of Liberal Arts Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.

Correspondence: Noto Marine Laboratory, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan (Nobuo Suzuki) E-Mail: nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp

Abstract: The teleost scale is calcified tissue that contains osteoblasts and osteoclasts and the bone matrix, including type I collagen, bone γ -carboxyglutamic acid protein, osteonectin, and hydroxyapatite, similarly to mammalian bone. Using goldfish scale, we recently developed a new *in vitro* assay system and reported that melatonin suppressed both osteoclastic and osteoblastic activities. We then examined the effects of novel melatonin derivatives on osteoblasts and osteoclasts in fish scales. In this way, we demonstrated that 1-benzyl-2,4,6-tribromo-melatonin inhibited osteoclastic activity in the scale but increased the scale osteoblastic activity. In a rat bone disease model using ovariectomized rats, oral administration of bromomelatonin led to an increase in the total bone mineral density of the femoral metaphysis. Thus, novel bromomelatonin derivatives are potentially effective drugs to treat bone disease in space as well as on Earth.

Key words: Fish scale; Bone diseases rats; Osteoblasts; Osteoclasts; Novel melatonin derivatives

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^{1,2,3,4)}。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^{5,6)}。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⁷⁾。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⁸⁾。

昨年度は、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して、ゼブラフィッシュの応答をマウスの頭蓋骨の応答と比較した。その結果、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応答して、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、骨と同様に応答している可能性が高く、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、ウロコを用いて開発された新規メラトニン誘導体の作用を骨疾患のモデル動物を用いて解析した。さらに回収衛星を用いた宇宙実験も計画中であり、新規化合物に対するウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析する予定である。

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23年5月20日～22日及び8月25日～26日に朝日大学歯学部、10月15日にアジレントテクノロジー、11月7日に富山大学遺伝子実験施設、11月28日～29日に金沢大学、12月7日に東京医科歯科大学教養部、12月15日～16日に富山大学遺伝子実験施設、1月22日に東京医科歯科大学教養部で会合を行った。

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。平成24年2～3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、2011年度骨形態計測学会及び骨代謝学会で発表した。

①メラトニンの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用

ウロコの評価システムを用いて、メラトニンの破骨細胞と骨芽細胞に対する作用を解析した。その結果、メラトニンが、破骨細胞や骨芽細胞に対して抑制的に作用することを、脊椎動物を通して初めて明らかにした。これらのメラトニンの作用は、骨芽細胞で発現しているインスリン様成長因子-I mRNAやエストロゲン受容体mRNAの発現を低下させることによって引き起こされていた。なお、ウロコにメラトニン受容体が発現していることも確認している。

哺乳類の骨芽細胞株を用いて、メラトニンの作用を調べた報告（骨芽細胞の単独培養）^{9,10)}では、薬理的な量のメラトニンは骨芽細胞の増殖促進に作用するが、ラットを用いた*in vitro*の実験では、メラトニンを投与すると、血液中のALP活性が低下することが報告されており¹¹⁾、ウロコの評価系の方が*in vivo*の状態を再現していることを示している。

②新規メラトニン誘導体のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する応答

メラトニンの骨に対する作用が明確になったので、新規メラトニン誘導体を合成して骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用をメラトニンと比較した。即ち、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を合成して、これら化合物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。培養方法等の詳細は、Suzuki et al. (2000)⁵⁾の方法に従った。

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^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 及び 10^{-6} Mにおいて、骨に対する作用をメラトニンと比較した。

さらに、骨芽細胞で発現しているエストロゲン受容体 mRNA の発現（6 時間培養）に対する影響も解析した。

その結果、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。一方、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、メラトニンと同程度であった。しかし Br 原子を 1 及び 4 個入れた誘導体では、メラトニンの方が破骨細胞の活性抑制作用は強かった。今回調べた化合物の中で、特に 1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン（Figure 1）の骨芽細胞の活性を上昇させる作用は強く、この化合物を用いてさらに詳細に調べた。

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 時間後でも持続しており、 10^{-8} M でも効果が認められた。また 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 でも効果が認められた。さらに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。

③骨疾患モデルラットに対する新規メラトニン誘導体の作用

これまで骨粗鬆症の治療薬は骨吸収を抑制する薬剤（ビスフォスフォネイト）が主流であり、骨吸収を抑制してかつ骨形成を顕著に促進する薬剤は未だ開発されていない。そこで、卵巣摘出ラットを用いて新規メラトニン誘導体の実験を行った。その結果、卵巣摘出ラットの大腿骨の海綿骨の骨密度が上がり、骨強度が有意に上昇した。

さらにカルシウムの摂取量が少ない現代人の食生活から引き起こされる骨疾患モデル（低カルシウム食ラット）でも、大腿骨の海綿骨の骨密度が有意に上昇した。ラットにメラトニンを投与すると、骨吸収を抑制すると報告されている¹¹⁾。しかし、新規メラトニン誘導体は、骨吸収抑制に加えて骨形成も促進している可能性がある。現在、大腿骨を外科的に切断したラット（骨折モデル動物）を用いて実験中であり、骨形成を促進する治療薬になる可能性を秘めている。

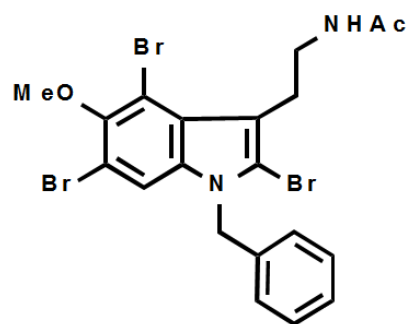


Figure 1 Chemical structure of the novel melatonin derivative (1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin).

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⁸⁾。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、ウロコの骨吸収が引き起こされていることを実証できた。現在、その詳細な機構を解析中である。

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応答することも実証済である。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) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
 - 6) 鈴木信雄：魚類のカルシトニンの特徴. *Clinical Calcium*, 15: 459-466 (2005)
 - 7) 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)
 - 8) 鈴木信雄, 北村敬一郎, 清水宣明, 染井正徳, 笹山雄一, 大森克徳, 矢野幸子, 重藤祐子, 谷垣文章, 鈴木ひろみ, 嶋津 徹, 池亀美華, 田渕圭章, 高崎一朗, 和田重人, 近藤 隆, 遠藤雅人, 中村正久, 井尻憲一, 田畑 純, 奈良雅之, 服部淳彦：魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究, 平成 22 年度 JAROS 宇宙環境利用の展望, 第 2 章: 1-13 (2011)
 - 9) Roth, J.A., Kim, B.-G., Lin, W.-L., Cho, M.-I.: Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem*, 274: 22041-22047 (1999)
 - 10) Nakade, O., Koyama, H., Aiji, H., Yajima, A., Kaku, T.; Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. *J Pineal Res*, 27: 106-110 (1999)
 - 11) Ladizesky, M.G., Boggio V., Albornoz, L.E., Castrillón, P.O., Mautalen, C., Cardinali, D.P.: Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. *J Pineal Res*, 34: 143-151 (2003)