

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11442

研究課題名(和文)メラトニンと骨代謝調節ホルモン・サイトカインとの新規相互作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel interactions between melatonin and bone metabolism regulating hormones / cytokines

研究代表者

池亀 美華 (Ikegame, Mika)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70282986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計を調節するホルモンとして知られるメラトニン(Mel)は、骨作用も有する。我々は、Melの骨作用機序について検討するとともに、骨粗鬆症治療薬とMelを併用することで、治療薬の投与量を減らし副作用を減弱させる可能性について検討した。その結果、Melは骨におけるカルシトニン(骨吸収抑制因子)の産生を刺激することが初めて示された。また、骨粗鬆症モデルラット(Ovx群)に、骨粗鬆症薬の一つである副甲状腺ホルモン剤(PTH)とMelを同時に作用させると、骨の部位によって効果が異なること、さらに脂質代謝については、Ovx群にみられる体重増加を抑制する作用が強化される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会の進行に伴い激増する骨粗鬆症は、大きな社会問題であり、より安全でかつ骨形成促進効果のある治療法が切望されてきた。本研究結果により、骨の部位により、PTHとMelの相互作用に違いを生じることが示唆された点は、薬剤併用効果は単純ではなく、骨組織内で反応性が異なることを意味しており、学術的に意義深い。また、PTHとMelを併用することで、卵巣機能低下に伴う脂肪蓄積をより強力に抑制できたことは、今後、閉経後の脂質代謝異常を効果的に調節する方法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Melatonin (Mel), a hormone known as a regulator of the circadian clock, has also been found to act on bone. We investigated the effects of Mel on bone tissue and the possibility that the combined use of an osteoporosis treatment drug and Mel would reduce the dose of the treatment drug and reduce side effects. As a result, it was shown for the first time that Mel stimulates the production of calcitonin (a bone resorption inhibitor) in bone. When the parathyroid hormone (PTH), which is one of the osteoporosis drugs, and Mel were simultaneously applied to the osteoporosis model rat (Ovx rat), the combined effect was different depending on the bone site. Moreover, regarding lipid metabolism, the combined use of PTH and Mel enhanced the suppressing effect on the weight gain observed in the Ovx rat.

研究分野：硬組織形態学

キーワード：メラトニン 副甲状腺ホルモン 骨粗鬆症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) メラトニンの骨作用と骨粗鬆症治療薬との併用効果の可能性について

メラトニンは、松果体ホルモンとして体内リズムを整えるのみならず、強力な抗酸化作用、脂質代謝調節など、広汎な作用を有することが知られている。骨作用については、骨芽細胞の増殖・分化促進が知られ、*in vitro*の実験系でメラトニンの骨芽細胞分化促進作用は BMP や Wnt シグナルと関連することが報告されている 1)。さらに、RANKL の発現抑制等により破骨細胞の分化・活性を抑制することも報告された 2)。最近では老齢ラットでメラトニン食によって骨喪失が阻止されることも示され 3)、骨吸収を抑制し、骨形成を促進する、新たな骨代謝調節因子として注目が高まっている。しかしながらその作用機序についてはまだ不明なことが多く残されている。また、メラトニンは経皮・経口投与によっても効果が得られ、抗炎症作用、抗腫瘍作用なども有し、抗がん剤と併用することでその副作用をやわらげ、効果を促進することが報告され、他剤と併用することでアジュバント効果を示す可能性にも期待が集まっている 4)。

一方、超高齢化社会の進行に伴い激増する骨粗鬆症は、大きな社会問題であり、より安全でかつ骨形成促進効果のある治療法が切望されてきた。現在、骨形成促進作用が期待できる骨粗鬆症薬として、副甲状腺ホルモン (PTH) 薬が注目されている。しかし、腫瘍形成のリスクのため、長期にわたる投与はできない。また、間歇的に皮下注射をする必要があり、その頻度は用量が高いほど少ななくて済むが、高用量は血圧低下などの副作用を強めてしまうという問題を抱えている。

そこで、骨粗鬆症治療薬とメラトニンを併用することで、治療薬の投与量を減らしつつも、メラトニンの骨作用によって治療効果を維持し、副作用を減弱させられる可能性が考えられるのではないかとこの着想に至った。

#### (2) 応募者の研究背景

我々は長らく骨代謝研究に携わっており、いち早くメラトニンに着目してきた。これまでに骨組織におけるメラトニン受容体の発現局在や、機械的刺激とメラトニンの作用について、骨粗鬆症モデルラットや骨組織様硬組織をもつ魚類のウロコを用いて検討してきた 5)。その中で骨粗鬆症治療あるいは予防にメラトニンを応用できる可能性を検討したいと考えてきた。

これまでの成果から、微小重力による骨量減少に対して、メラトニンは抑制的効果を期待できるという結果を得ている 6)。今回は、メラトニンの骨作用メカニズムを、他の骨代謝関連ホルモンやサイトカインとの相互作用について明らかにするとともに、骨粗鬆症治療薬との併用効果について検討したいと考えた。

### 引用文献

- 1) 1999 Roth JA, J Biol Chem 274: 22041-7. / 2011 Park KH, J Pineal Res 49: 187.
- 2) 2002 Koyama H, J Bone Miner Res 17: 1219-29.
- 3) 2014 Tresguerres IF, Rejuvenation Res 17: 341-6.
- 4) 2006 Witt-Enderby PA, J Pineal Res 41: 297.
- 5) 2002 Suzuki N & Hattori A, J Pineal Res 33:253-8. / 2008 Suzuki N, J Pineal Res 45: 229-34. / 2016 Ikegame M, Biomedical Research 37: 117-126.
- 6) 2019 Ikegame M, J Pineal Res 67:e12594.

### 2. 研究の目的

骨疾患においてメラトニンをアジュバントとして使用し、より効率的で副作用が少ない骨疾患治療法を開発することを目的とする。そのため、骨疾患治療薬に用いられるサイトカイン・ホルモンとメラトニンの、骨形成ならびに骨吸収作用に関する相互作用について検討し明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 骨代謝に影響するサイトカインとメラトニンの相互作用

骨で発現される骨代謝関連サイトカインへのメラトニンの作用

頭蓋骨の期間培養系にメラトニンを投与し、骨芽細胞、破骨細胞の活性ならびに、それらを調節する各種サイトカインの遺伝子発現を検討する。

伸展刺激によって骨形成を促進させるサイトカイン群へのメラトニンの影響について

我々は、マウス骨縫合部に伸展刺激を負荷することにより、さまざまなサイトカインの発現が促進され、未分化間葉系細胞が骨芽細胞へと分化促進されることを明らかにしてきた。

そこで、同様の実験系において骨形成を促進させる過程へのメラトニンの作用について、骨芽細胞分化マーカーとなるアルカリ性ホスファターゼ活性の組織内局在変化や遺伝子発現変化、な

らびに、伸展刺激で発現を刺激される骨芽細胞分化促進作用をもつサイトカイン(BMP, Wnt, CCN など)の発現変化について検討する。

## 2) 骨粗鬆症モデル動物における骨代謝ホルモンとメラトニンの相互作用について

骨粗鬆症モデル動物として、卵巣摘出ラットを作製し、骨粗鬆症治療にもちいられる副甲状腺ホルモン(PTH)投与とメラトニンの併用効果について検討した。

PTH投与方法については、先行論文を参考にして、骨量が完全に維持される量よりも少ない用量を用い、間歇的(3回/週)に皮下投与した。メラトニンはエタノールに溶解したストック液を飲料水に溶かし(低用量群:0.1 mg/mL, 高用量群:1 mg/mL)自由摂取させた。対照群として、PTHの溶媒を皮下注射し、エタノールのみを加えた飲料水を与えた。

1カ月毎に尾静脈から血液を採取し、3カ月後、麻酔下でト殺して骨試料、尿を採取した。一部の動物については、脂質代謝について検討するため内臓脂肪を採取した。

解析方法を以下に述べる。

### 骨への作用

下肢骨(大腿骨、脛骨)を用いて、骨の形態学的変化、石灰化度の変化をマイクロCTにより、骨強度の変化を3点曲げ試験、圧縮試験により検討した。

血清、尿を用いて、骨代謝マーカーの変化について検討した。

### 脂質代謝への作用

メラトニンは脂質代謝へも影響することから、内臓脂肪の重量ならびに血清中の脂質代謝マーカーの変化について検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 骨代謝に影響するサイトカインとメラトニンの相互作用

骨で発現される骨代謝関連サイトカインへのメラトニンの作用

ニワトリ頭蓋骨にメラトニンを作用させると、破骨細胞活性に関連する遺伝子発現が抑制され、さらに、破骨細胞を抑制するホルモンとして知られるカルシトニンの遺伝子発現が増加することがわかった(Nakano et al, J Endocrinol 242, 2019)。また、ラットの頭蓋骨にメラトニンを作用させると、培養上清中にカルシトニンが検出された(Ikegame et al, J Pineal Res 67, 2019)。

これらの結果は、メラトニンの新しい骨作用機序を示唆するものとして興味深いが、その意義を明らかにするためには、哺乳類の骨でカルシトニンを産生する細胞は何か、メラトニンの刺激で産生されるカルシトニンに破骨細胞活性の抑制効果があるのかどうかなど、検討すべきことが多く残されている。

伸展刺激によって骨形成を促進させるサイトカイン群へのメラトニンの影響について

伸展刺激後6時間で、骨縫合部中には、アルカリ性ホスファターゼ陽性の骨芽細胞系細胞が増加してきた。

しかし、その変化に対して、メラトニン投与による明らかな効果は認められなかった。

メラトニンの投与量、作用時間などの条件について今後検討する必要があると考えられる。

### 2) 骨粗鬆症モデル動物における骨代謝ホルモンとメラトニンの相互作用について

#### 骨への作用

#### ・骨の微細構造

偽手術群のラット(Sham群)に比較して、卵巣摘出手術を施したラット(Ovx群)では、脛骨近位端の海綿骨が明らかに減少しており、さらに子宮の委縮も確認されたことから、卵巣摘出による骨粗鬆化を生じていることを確認することができた。

卵巣摘出直後からPTHを単独投与したラット(PTH群)では、Ovx群に比べて有意な海綿骨の増加を認め、PTH反復投与による骨量減少の抑制効果を確認することができた。特に骨梁幅を増加させる効果がみられた。

メラトニン単独投与群(Mel群)については、低用量群、高用量群とも、卵巣摘出による海綿骨の骨量減少を抑制する効果は認められなかった。

PTHとメラトニンを併用したラット(PTH+Mel群)では、低用量群、高用量群ともにPTH単独群に比較して骨量について有意な差は認められなかったが、海綿骨の骨密度、骨梁幅について、PTH単独より少ない傾向を示した。

#### ・骨強度

海綿骨の強度を反映すると考えられる骨幹端の圧縮試験では、破断力、Stiffnessについて、Ovx群、PTH群に比べて、それぞれメラトニンを併用した群では、有意差はないが減少する傾向を示した。

その一方、皮質骨の強度を反映すると考えられる3点曲げ試験では、破断エネルギー、破断力

について、PTH 群に比べて PTH+Mel 群では、有意差はないが増加する傾向を示し、Stiffness については有意差をもって増加した。

#### ・血清・尿の生化学的検査

血清の解析は予算の関係で現在解析途中となっている。尿については、クレアチニンで補正した骨吸収マーカーである CTX-1(骨吸収によって分解されたコラーゲン断片)の測定を行ったが、ばらつきが大きく一定の傾向を得られなかった。

#### 脂質代謝への作用

卵巣機能低下により体重が増加することが知られている。PTH 群、Mel 群は、いずれも卵巣摘出による体重増加には抑制的に作用し、その作用は PTH + Mel 群で増強される傾向がみられた。

内臓脂肪の重量は、体重の結果を反映する結果となった。

今回の投与条件(飲料水へのメラトニン添加)では、PTH の卵巣摘出後の骨量維持作用に関して、メラトニンを併用することによる改善効果は認められず、むしろ海綿骨については、やや抑制的な作用を持つことが示唆された。しかし興味深いことに、骨強度については、海綿骨と皮質骨では異なる反応がみられ、皮質骨の強度は、メラトニンと PTH を併用することで増加する可能性が示された。PTH は皮質骨に影響することが知られることから、皮質骨領域について骨形態計測を行い、さらにファントムを用いた骨密度の測定も行ったが、今回の PTH 投与量では、Ovx 群との間に有意な差を生じることはなかった。PTH 群と比較して PTH + Mel 群では、脛骨骨幹部の厚みが増加している傾向がみられた。この骨の部位による相互作用の違いについては、さらに解析が必要と考えられたが、このような結果は、骨の部位により、PTH とメラトニンの相互作用の現れ方が異なることを示唆するものとして興味深い。

また、脂質代謝についても PTH とメラトニンの相互作用を検討したところ、体重増加抑制作用は、PTH 群、Mel 群、それぞれで認められたが、PTH と Mel を併用することでその作用は増強する可能性が示された。今後、それぞれの体重増加抑制の作用機序について掘り下げていく必要があると考えられる。

以上から、閉経からあまり間がない時期では、メラトニンは経口投与では骨粗鬆症薬としては、単独でも PTH と併用でも、少なくとも海綿骨での効果は期待できないが、卵巣機能低下に伴う脂肪蓄積については、PTH と併用することで、より効果的に抑制できる可能性があると考えられた。

#### (1) 論文発表

Nakano M, Ikegame M, Igarashi-Migitaka J, et al.

Suppressive effect of melatonin on osteoclast function via osteocyte calcitonin.

J Endocrinol 242(2): 13-23, 2019. doi: 10.1530/JOE-18-0707

Ikegame M, Hattori A, Tabata MJ, Kitamura KI, 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, Nishiuchi T, Nara M, Iseki H, Chowdhury VS, 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, Suzuki N.

Melatonin Is a Potential Drug for the Prevention of Bone Loss During Space Flight.

J Pineal Res (3):e12594, 2019. doi: 10.1111/jpi.12594

#### (2) 学会発表

池亀美華、田中みか子、江尻貞一、服部淳彦、高尾亮子、内部健太、岡村裕彦  
骨粗鬆症モデルラットにおける副甲状腺ホルモンとメラトニンの併用効果  
第 60 回歯科基礎医学会学術大会 2018 年

池亀美華、田中みか子、江尻貞一、服部淳彦、高尾亮子、内部健太、岡村裕彦  
卵巣摘出ラットの骨粗鬆化における副甲状腺ホルモンとメラトニンの併用効果  
第 124 回日本解剖学会総会全国学術集会 2019 年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano Masaki, Ikegame Mika, Igarashi-Migitaka Junko, Maruyama Yusuke, Suzuki Nobuo, Hattori Atsuhiko	4. 巻 242
2. 論文標題 Suppressive effect of melatonin on osteoclast function via osteocyte calcitonin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 13~23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1530/JOE-18-0707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikegame Mika, Hattori Atsuhiko, et al.	4. 巻 67
2. 論文標題 Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pineal Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/jpi.12594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池亀美華、田中みか子、江尻貞一、服部淳彦、高尾亮子、内部健太、岡村裕彦
2. 発表標題 骨粗鬆症モデルラットにおける副甲状腺ホルモンとメラトニンの併用効果
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池亀美華、田中みか子、江尻貞一、服部淳彦、高尾亮子、内部健太、岡村裕彦
2. 発表標題 卵巣摘出ラットの骨粗鬆化における副甲状腺ホルモンとメラトニンの併用効果
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田中 みか子  (Tanaka Mikako)  (20361909)	明倫短期大学・歯科技工学科・教授   (43109)	
研究 分担者	服部 淳彦  (Hattori Atsuhiko)  (70183910)	東京医科歯科大学・教養部・教授   (12602)	
研究 分担者	江尻 貞一  (Ejiri Sadakazu)  (40160361)	朝日大学・歯学部・教授   (33703)	
研究 分担者	内田 健太  (Uchibe Kenta)  (20584618)	広島大学・医歯薬学総合研究科・助教   (15401)	2019年11月、岡山大学から広島大学へ異動。異動に伴い研究分担者から外れた。
連携 研究者	岡村 裕彦  (Okamura Hirohiko)  (20380024)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	