

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570068

研究課題名(和文) 魚鱗の再生と両生類変態期の後肢形成を骨形成モデルとしたメラトニンの制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism and melatonin regulation for the ridge formation in regenerating fish scale and bone formation of hind limb during amphibian metamorphosis

研究代表者

服部 淳彦 (Hattori, Atsuhiko)

東京医科歯科大学・教養部・教授

研究者番号：70183910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの硬組織には、約1日を単位として形成される日周輪(成長線)の存在が知られているが、その日周輪形成の制御機構を明らかにした研究は無い。そこで、キンギョの再生鱗に1日1本ずつできる隆起線(成長線)の形成と時計遺伝子や破骨細胞・骨芽細胞関連遺伝子の発現がどのように関連しているのかを明らかにするための実験を行った。その結果、時計遺伝子であるper3, bmal1, clock, cry1a遺伝子の発現に明瞭な日周リズムを観察するとともに、骨芽細胞遺伝子のdlx5とtype collagen遺伝子や破骨細胞遺伝子のCath K, mmp9の発現も時計遺伝子と関連した日周リズムを示していた。

研究成果の概要(英文)：In many hard tissues, the incremental line is formed as a unit about a day. The mechanism for the formation of diel incremental line has not been clarified. In this study, the experiment was conducted to clarify the mechanism of the ridge (one of the incremental line) formation in the regenerating goldfish scale. The expression of clock genes such as per3, bmal1, clock and cry1a during spontaneous scale regeneration showed a clear diel rhythm. Osteoblast-related genes, dlx5 and type collagen, and osteoclast-related genes, Cath K and mmp9 showed diel rhythmicity like clock genes. These results suggest that clock genes mediate circadian rhythm of gene expression of osteoblast- and osteoclast-related genes during the formation of incremental line in regenerating goldfish scale.

研究分野：生物学

キーワード：時計遺伝子 骨芽細胞 破骨細胞 再生鱗 隆起線 成長線 日周リズム

## 1. 研究開始当初の背景

骨と類似した構造をもつ硬骨魚類の鱗は、I型コラーゲンを基質としてハイドロキシアパタイトの形でカルシウムが沈着し、血中カルシウムの供給源として破壊(吸収)と形成を繰り返す硬組織である。これまで、魚鱗を骨のモデルとしてとらえ、キンギョの鱗を用いて、鱗には骨芽細胞 (*Life Sci*, 2005) と破骨細胞 (*Biochem Biophys Res Commun*, 2007) が存在すること、また、破骨細胞の分化に関わる遺伝子 (NFATc-1) や機能遺伝子 (TRAP, Cathepsin K, MMP-9) をキンギョの鱗からクローニングし、それらの遺伝子が鱗の破骨細胞で発現していることを報告した (*Biochem Biophys Res Commun*, 2007)。また、骨芽細胞の分化に関わる遺伝子 (Runx2a, Runx2b, Dlx5, Osterix) や機能遺伝子 (Collagen-I, ALP, Osteocalcin) も、キンギョの鱗からクローニングし、再生鱗の形成過程での発現パターンが、哺乳類の膜性骨形成時の各遺伝子の発現パターンに類似していることを示した (*Bone*, 2012)。

一方、メラトニンは、脊椎動物において夜間に松果体から血中へと分泌され、概日リズムを同調させる作用を有するホルモンである。我々は、骨の代わりにキンギョの鱗の培養系を用いて、夜間の血中メラトニン濃度に相当する生理学的な濃度のメラトニンが、破骨細胞の活性を有意に抑制することを世界で初めて報告した (*J Pineal Res*, 2002)。その後、メラトニンの膜レセプター (Mel-1a, 1b, 1c) をクローニングし (*Comp Biochem Phys*, 2009)、また、メラトニンが破骨細胞の機能遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。さらに、2010年5月には国際宇宙ステーションの「きぼう」の実験棟において、キンギョの鱗を用いて微小重力空間における骨吸収増加機構の解析を行い、メラトニンの破骨細胞抑制効果を宇宙空間においても確認した。この研究は、哺乳類の破骨細胞の単独培養系では成しえなかった成果である。このように、メラトニンが骨吸収(破骨細胞)の制御に関わることは明らかにしてきたが、再生鱗形成過程におけるメラトニンの制御機構の解明に関しては、まだ手付かずの状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、骨形成の2大様式である「膜性骨化」と「軟骨性骨化」に対するメラトニンと時計遺伝子による制御機構を解明するものである。これまで、膜性骨のモデルとして魚鱗を用いて、再生鱗にできる隆起線(成長線)は、12時間照明(12L)12時間暗黒(12D)の24時間周期の明暗サイクルや恒明(LL)において、1日に1本ずつ外側に形成されことを明らかにした。一方、歯の象牙質におけるエブネル線や骨のハヴァース系の層板における形成層(約1 $\mu$ m)のように硬組織の中には約1日を単位として形成される日周輪(成長線)の存在が古くから知られている。しかしながら、それらの日周輪形成とサーカディアンリズムを刻む時計遺伝子との関連やメラトニンなどの液性制御因子との関連に関する研究はま

ったくなされていない。一方、両生類の変態期では、後肢が軟骨から骨に置き換わること、また、その時期にメラトニンレセプターが発現していることを見出している。そこで、魚鱗の再生を「膜性骨化」のモデルとして、両生類の変態時に生じる後肢を「軟骨性骨化」のモデルとして、メラトニンと時計遺伝子による骨形成の制御機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

実験動物としては、入手や飼育が容易であり、鱗の大きさが大きく、取り扱い易い体長約15cmの雄キンギョと同じく飼育及び入手が容易であるウシガエルとアフリカツメガエルの幼生(オタマジャクシ)を用いた。

(1) キンギョを麻酔にかけ、鱗を抜去した後、12L12DやLLの環境下で飼育し、再生鱗を21日間観察し、隆起線の数を計測した。

(2) 既にクローニングが終了している *per* 遺伝子以外に、時計遺伝子として、*bmal1*, *clock*, *cry*, *Npas2* の各遺伝子をクローニングし、再生14日目から15日目にかけて経時的にそれらの時計遺伝子発現の日周リズムを調べた。

(3) 再生14日目から15日目の鱗を用いて、骨芽細胞の分化に関わる遺伝子 (*Runx2a*, *Runx2b*, *Dlx5*, *Osterix*) や機能遺伝子 (*Collagen-I*, *ALP*, *Osteocalcin*) の mRNA 発現量の日周変化を、リアルタイムPCR法を用いて調べた。また、上記の各時計遺伝子の発現との関連性についても検討した。

(4) 破骨細胞に関しては、同じく再生14日目から15日目において、機能遺伝子として *Cath K* と *mmp9* の発現リズムを、分化誘導遺伝子として *NFATc1* の発現リズムをリアルタイムPCR法で調べた。また、同時に上記の各時計遺伝子との関連性についても検討した。さらに、*Cath K* の活性染色を行い、再生鱗のどの部位の細胞で強く発現しているかを調べた。

(5) ウシガエルおよびアフリカツメガル幼生の後肢形成に伴う骨形成過程を、透明標本と組織切片を作製して観察した。次いで、変態のステージを追って、ウシガエル幼生後肢(骨)におけるメラトニン受容体 (Mel1b) の mRNA 発現量ならびに骨芽細胞のマーカーである *Osteocalcin* の mRNA 発現量をリアルタイムPCR法を用いて比較検討した。

## 4. 研究成果

(1) 再生鱗における概日リズムに関与する時計遺伝子として、*per1* ~ *3* と骨芽細胞関連遺伝子 (*dlx5*, *type collagen*, *osteocalcin*, *ALP*) の発現リズムをリアルタイムPCRで調べた結果、再生14日目~15日目においては、時計遺伝子の *per3* と *dlx5*, *type collagen* の発現が明瞭な日周リズムを示した。

(2) 同様に再生14日目から15日目の鱗では、時計遺伝子であり、かつ転写調節因子でもある *bmal1*, *clock* と破骨細胞遺伝子の *Cath K*,

mmp9 の発現に明瞭な関連性と日周リズムが認められた。

(3) Cath K の活性染色では、再生鱗の最外層の内側2~3層の細胞層にのみ陽性像が認められたのに対し、活発な骨芽細胞の多くは最外層に存在していた。

このことから、再生鱗では最外層で骨芽細胞がI型コラーゲンを産生し、その内側の破骨細胞がそれらを周期的に吸収することにより、隆起線(成長線)が形成される可能性が示唆された。

(4) 透明標本と組織切片を観察した結果、両生類幼生の後肢は、前変態期ではほぼ全てが軟骨よりなり、変態始動期の初期から骨化が進んでいくことが明らかとなった。ウシガエル幼生後肢(骨)におけるメラトニン受容体(Mel1b)mRNAの発現は、前変態期では高く、変態始動期の初期に低くなり始め、その後のステージでは発現は低いままであった。一方、骨芽細胞のマーカーであるOsteocalcinのmRNA発現は、前変態期から変態始動期の前半までは低く、変態始動期の後半から変態最盛期にかけて高くなっていった。

<今後の展望>

本研究のような骨や歯における成長線の形成機構の解明は、これまで一般に理解されている硬組織の形成機構に対して、新しい視点を与える点で非常に重要な研究である。本研究によって、再生鱗の隆起線が形成される過程に、いくつかの時計遺伝子が関与している可能性が示されたが、今後は、それらの遺伝子をノックダウンすることにより、隆起線形成に異常が生じるか否かを明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 32 件)

Ayaki, M., Hattori, A., Maruyama, Y., Nakano, M., Yoshimura, M., Kitazawa, M., Negishi, K., and Tsubota, K.: Protective effect of blue-light shield eyewear for adults against light pollution from self-luminous devices used at night. *Chronobiol. Int.*, 査読有 33: 134-139 (2016) doi: 10.3109/07420528.2015.1119158

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*, 査読有 195: 26-31 (2016) doi:10.1016/j.cbpa.2016.01.022  
Hamazaki, K., Suzuki, N., Kitamura, K.,

Hattori, A., Nagasawa, T., Itomura, M., and Hamazaki, T.: Is vaccenic acid (18:1n-7) associated with an increased incidence of hip fracture? An explanation for the calcium paradox. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 査読有 109: 8-12 (2016) doi:10.1016/j.plefa.2016.04.001

Suzuki, N., Somei, M., Seki, A., Sekiguchi, T., Tabuchi, Y., Mishima, H., Kase, Y., Kaminishi, A., Yachiguchi, K., Kitamura, K., Oshima, Y., Hayakawa, K., Yano, S., and Hattori, A.: Novel tryptophan derivatives as potentially effective therapeutic drugs to treat bone diseases. *Am. J. Life Sci.*, 査読有 3: 31-38 (2015) doi: 10.11648/j.ajls.2015.030302.16

Ikegami, T., Maruyama, Y., Doi, H., Hattori, A., and Ando, H.: Ultradian oscillation in expression of four melatonin receptor subtype genes in the pineal gland of the grass puffer, a semilunar-synchronized spawner, under constant darkness. *Frontiers in Neurosci.* 査読有 9: 1-10 (2015) doi: 10.3389/fnins.2015.00009

Obana-Koshino, A., Ono, H., Miura, J., Sakai, M., Uchida, H., Nakamura, W., Nohara, K., Maruyama, Y., Hattori, A., and Sakai, T.: Melatonin inhibits embryonic salivary gland branching morphogenesis by regulating both epithelial cell adhesion and morphology. *PLOS ONE*, 査読有 10: e0119960 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0119960

Suzuki, N., Ogiso, S., Yachiguchi, K., Kawabe, K., Makino, F., Toriba, A., Kiyomoto, M., Sekiguchi, T., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kitamura, K., Hong, C.-S., Srivastav, A.K., Oshima, Y., Hattori, A., and Hayakawa, K.: Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons influence spicule formation in the early development of sea urchins (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 査読有 171: 55-60 (2015) doi: 10.1016/j.cbpc.2015.02.004

Ando, H., Ogawa, S., Shahjahan, Md., Ikegami, T., Hattori, A., and Parhar, I.: Diurnal and circadian oscillations in expression of kisspeptin, kisspeptin receptor

and gonadotrophin-releasing hormone 2 genes in the grass puffer, A semilunar-synchronised spawner. *J. Neuroendoc.*, 査読有 26: 459-467 (2014) doi: 10.1111/jne.12165

Yachiguchi, K., Sekiguchi, T., Nakano, M., **Hattori, A.**, Yamamoto, M., Kitamura, K., Maeda, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kamauchi, H., Nakabayashi, H., Srivastav, A.K., Hayakawa, K., Sakamoto, T., and Suzuki, N.: Effect of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone. *Zool. Sci.*, 査読有 31: 330-337 (2014) doi:10.2108/zs130265

Suzuki, N., Maruyama, Y., Nakano, M., **Hattori, A.**, Honda, M., Shimazaki, Y., Sekiguchi, T., Kamauchi, H., Mishima, H., Wada, S., Srivastav, A.K., Hayakawa, K., and Oshima, Y.: Increased PGE2 has a positive correlation with plasma calcium during goldfish reproduction. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 査読有 59:97-101 (2014) URL: [http:// www.agr.kyushu-u.ac.jp /english/journal/](http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/english/journal/)

Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., **Hattori, A.**, and Suzuki, N.: Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Env. Sci. Poll. Res.*, 査読有 21: 6365-6372 (2014) doi:10.1007/s11356-012-1347-5

Yano, S., Kitamura, K., Satoh, Y., Nakano, M., **Hattori, A.**, Sekiguchi, T., Ikegame, M., Nakashima, H., Omori, K., Hayakawa, K., Chiba, A., Sasayama, Y., Ejiri, S., Mikuni-Takagaki, Y., Mishima, H., Funahashi, H., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales. *Zool. Sci.*, 査読有 30: 217-223 (2013) doi: 10.2108/zsj.30.217

Ando, H., Shahjahan, Md. and **Hattori, A.**: Molecular neuroendocrine basis of lunar-related spawning in grass puffer. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有 181: 211-214

(2013) doi: 10.1016/j.ygen.2012.07.027

Kitamura, K., Takahira, K., Inari, M., Satoh, Y., Hayakawa, K., Tabuchi, Y., Ohgai, K., Nishiuchi, T., Kondo, T., Mikuni-Takagaki, Y., Chen, W., **Hattori, A.**, and Suzuki, N.: Zebrafish scales respond differently to in vitro dynamic and static acceleration: analysis of interaction between osteoblasts and osteoclasts. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 査読有 166: 74-80 (2013) doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.023

Suzuki, N., Sekiguchi, T., Satake, H., Kato, K., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Danks, J.A., Martin, T.J., **Hattori, A.**, Nakano, M., Kakikawa, M., Yamada, S., Ogoshi, M., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K., Funahashi, H., Sakamoto, T., and Sasayama, Y.: Cloning of two members of the calcitonin receptor family from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. *Gene*, 査読有 499: 90-95 (2012) doi: 10.1016/j.gene.2012.03.042

Omori, K., Wada, S., Maruyama, Y., **Hattori, A.**, Kitamura, K., Sato, Y., Nara, M., Funahashi, H., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Endo, M., Kusakari, R., Yano, S., Srivastav, A.K., Kusui, T., Ejiri, S., Chen, W., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Kondo, T., Sasayama, Y., Nishiuchi, T., Nakano, M., Sakamoto, T., and Suzuki, N.: Prostaglandin E2 increases both osteoblastic and osteoclastic activities in the scales of goldfish and participates in the calcium metabolism in goldfish. *Zool. Sci.*, 査読有 29: 499-504 (2012) doi: 10.2108/zsj.29.499

Thamamonggood, 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*, 査読有 50: 1240-1249 (2012) doi: 10.1016/j.bone.2012.03.021

〔学会発表〕(計 90 件)

**服部淳彦**: メラトニンによる健康長寿の基礎づくり. 国際抗老化再生医療学会例会, 東京大学伊藤国際学術センター, 東京都

文京区 (2016, 1/24) **(招待講演)**

**服部淳彦**: メラトニン. 第 15 回日本抗加齢医学学会総会, 福岡国際会議場, 福岡県福岡市(2015, 5/29-31) **(招待講演)**

**服部淳彦**:メラトニンの Antiaging の意義. 第 11 回日本抗加齢医学学会北海道研究会, 札幌医科大学記念講堂, 北海道札幌市 (2015, 9/23) **(招待講演)**

**服部淳彦**: メラトニン最新情報. 第 11 回キレーション治療セミナー, TKP 品川カンファレンス, 東京都港区 (2015,11/28-29) **(招待講演)**

松本久幸, 松本千尋, 水波誠, 丸山雄介, **服部淳彦**: メラトニンには加齢に伴う長期記憶形成障害を予防・回復させる効果がある - コオロギをモデル動物として. 第 15 回日本抗加齢医学学会総会, 福岡国際会議場, 福岡県福岡市 (2015, 5/29-5-31) **\*最優秀演題賞**

**服部淳彦**: 宇宙医学とアンチエイジング医学の接点. 第 14 回日本抗加齢医学学会総会, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市(2014, 6/6-8) **(招待講演)**

**服部淳彦**: メラトニンとアゴニスト - 今後の展望. 第 14 回日本抗加齢医学学会総会, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市(2014, 6/6-8) **(招待講演)**

松本幸久, 松本 - 佐藤千尋, 水波誠, 中野真樹, **服部淳彦**: 加齢性記憶障害に対する一酸化窒素による回復とメラトニンの長期投与の効果 - コオロギをモデル動物として. 第 14 回日本抗加齢医学学会総会, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市(2014, 6/6-8) **\*優秀ポスター賞**

**服部淳彦**:メラトニンと骨粗鬆症. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 仙台国際センター 宮城県仙台市 (2013, 4/25-27) **(招待講演)**

**服部淳彦**:「宇宙メラトニン研究」の目的と今後の展開. 第 3 回宇宙メラトニン研究会. 金

沢大学 臨海実験施設, 石川県能登町 (2013,8/19) **(招待講演)**

**服部淳彦**:メラトニン - 基礎研究より - . 第 5 回抗加齢内分泌研究会. 立教大学, 東京都豊島区 (2013, 9/1) **(招待講演)**

**服部淳彦**: 宇宙メラトニン研究会. 平成 24 年度きぼう利用フォーラム総会, JAXA 東京事務所 プレスルーム, 東京都千代田区 (2013, 3/16) **(招待講演)** - Ustream **およびニコニコ生放送(インターネットライブ配信)**

**服部淳彦**:「宇宙メラトニン研究会」に関して. 第 2 回宇宙メラトニン研究会, NHK プロモーション, 東京都渋谷区 (2013, 3/5) **(招待講演)**

**服部淳彦**:「宇宙メラトニン研究会」について. 第 56 回宇宙科学技術連合講演会, 別府国際コンベンションセンター, 大分県別府市 (2012,11/20~22) **(招待講演)**

**服部淳彦**, 池亀美華, 矢野幸子, 鈴木信雄: 宇宙(微小重力)における破骨細胞の亢進とメラトニンによる抑制効果 - 「きぼう」実験棟における研究成果. 第 12 回日本抗加齢医学学会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市 (2012, 6/23) **(招待講演)**

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 淳彦 (Hattori Atsuhiko)  
東京医科歯科大学・教養部・教授  
研究者番号: 70183910

### (2) 研究分担者

田淵 圭章 (Tabuchi Yoshiaki)  
富山大学・生命科学先端研究センター・教授  
研究者番号: 20322109