

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570062

研究課題名（和文） 再生鱗における隆起線形成の日周性と時計遺伝子との関連：メラトニンによる制御

研究課題名（英文） Diurnal rhythm of the ridge formation in regenerating scale and its regulation by clock genes and melatonin

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

研究成果の概要（和文）：

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）の存在が古くから知られているが、その日周輪形成の制御機構を明らかにした研究は無い。そこで本研究では、キンギョの再生鱗を用いて、それらを明らかにする実験を行った。まず、キンギョの鱗の再生過程において我々が単離した骨芽細胞関連遺伝子の発現を調べたところ、哺乳類の膜性骨の再生過程で発現する遺伝子のパターンとほぼ同じパターンを示すことが分かった。次に、再生鱗を用いて、隆起線（成長線）が1日1本ずつ外側に形成されていくこと、また、時計遺伝子の中では少なくとも *per-3* の発現に明瞭な概日リズムが認められることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In the hard tissue the presence of the incremental line formed as a unit about a day has been known than before. The formation mechanism of the diurnal incremental line has not been clarified, then, in this study, the experiment was conducted to clarify the mechanism using a regenerating scale of the goldfish. In the expression of osteoblast-specific genes during spontaneous scale regeneration, it shared similarities in gene expression with mammalian intramembranous bone regeneration. The regenerating scales showed that the ridges (incremental lines) are formed in the outer one on each day. In the expression of clock genes in regenerating scale, a clear circadian rhythm was observed in the expression of *per-3* gene. Improved understanding of the ridge formation in regenerating scale will help elucidate the mechanism of formation of the diurnal incremental line in the hard tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子内分泌学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：再生鱗、骨芽細胞、隆起線、概日リズム、時計遺伝子、メラトニン

## 1. 研究開始当初の背景

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た骨と類似した構造をしてお

り、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をした。

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)、多核の成熟破骨細胞で発現していること、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。この研究は、哺乳類における破骨細胞の単独培養系では得られなかった成果である。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、骨形成（骨芽細胞）に対する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

歯の象牙質におけるエブネル線、骨のハヴァース系の層板における形成層（約  $1\mu\text{m}$ ）や硬骨魚類の再生鱗における隆起線など、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、その日周輪とサーカディアンリズムを刻む生物時計との関連やメラトニンなど具体的な制御因子に関する研究はまったくなされていない。そこで、この日周輪（鱗の場合は隆起線）の形成メカニズムを解明することが、硬組織の形成（骨形成）をコントロールするメカニズム解明の早道の一つではないかと考え、鱗の系を用いて、以下のことを本研究では行った。(1) キンギョの再生鱗を用いて隆起線形成の日周性の確認、(2) 再生鱗形成過程における骨芽細胞

関連遺伝子の発現解析、(3) 再生鱗における日周リズムやサーカディアンリズムを示す遺伝子の検索、そして、(4) 人工的にメラトニンの日周リズムを制御できる水槽装置の作製である。

## 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、鱗の大きさが適当に大きく、取り扱い易い体長約15cmの雄キンギョを用いた。

(1) キンギョを麻酔にかけ、鱗を抜去した後、12時間照明 (12L) 12時間暗黒 (12D) の環境下、または恒明 (LL) 環境下で飼育し、再生鱗を21日間観察し、隆起線の数を計測する。

(2) 再生7,14,21日目に鱗を採取し、RNAを抽出後、既にクローニングが終了している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) の発現量を、リアルタイムPCRを用いて測定する。

(3) 再生14日目の鱗を用いて、骨芽細胞活性（アルカリホスファターゼ活性）に、日周リズムがあるかどうか、さらに骨芽細胞の分化制御遺伝子（4種）と機能遺伝子（3種）に関して、リアルタイムPCR法を用いて、日周リズムが認められるかどうかを調べる。また、時計遺伝子である *per-1, per-2, per-3* や *clock* 遺伝子をキンギョの鱗からクローニングし、それらの遺伝子の発現の日周リズムも調べる。

(4) 隆起線形成に対するメラトニンの作用機構を明らかにするために、好きな時間に、好きなように繰り返しメラトニン量を変化させることができる、人工的にメラトニンの日周リズムを作る飼育装置を作製する。

## 4. 研究成果

(1) 12L12Dの24時間周期の明暗条件下及びLL(恒明)条件下で飼育したキンギョの再生鱗にできる隆起線(成長線)は、1日に1本ずつ外側に形成されことを明らかにした。

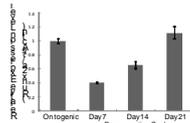
(2) キンギョの鱗からすでにクローニングが済んでいる骨芽細胞の分化制御遺伝子(4種)と機能遺伝子(3種)に関して、再生鱗形成過程においてリアルタイムPCR法を用いて調べた結果、下図のような結果が得られた。

哺乳類では、骨芽細胞の分化に最も重要だと考えられている Runx2a, Runx2b に関しては、再生過程で大きな変化は認められなかった。一方、転写調節因子である Dlx5 は再生7日目に最大値を示した後、減少するのに対し、Osterix は再生7日～21日まで高値を維持し

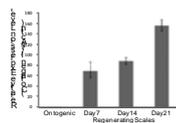
た。機能遺伝子である Type I collagen や ALP (アルカリホスファターゼ) は、徐々に発現量が増加したのに対し、Osteocalcin は、再生 14 日目から著明に増加した。

これらの結果は、鱗の再生過程が、膜性骨の再生過程や骨芽細胞の分化過程を良く再現している結果であり、再生鱗が膜性骨の再生過程の良いモデルになることを示唆した。

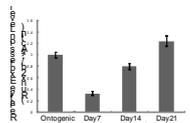
A) *Runx2a*



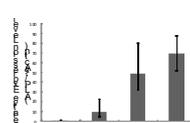
E) *Type I collagen*



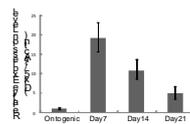
B) *Runx2b*



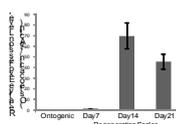
F) *ALP*



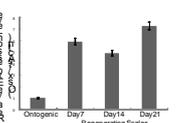
C) *Dlx5*



G) *Osteocalcin*



D) *Osterix*



(3) 時計遺伝子である *per-1, per-2, per-3* や *clock* 遺伝子をクローニングし、それらの遺伝子の発現の日周リズムを再生 14 日目の鱗で調べた結果、少なくとも *per-3* の発現に明瞭な概日リズムが観察された。

(4) 水槽内のメラトニン濃度を自由に变化させることができる装置で飼育したキンギョの血中メラトニン濃度を経時的に測定した。その結果、飼育水に加えるメラトニンの濃度を上昇させると、1, 3, 6 時間後すべてにおいて濃度依存的に血中メラトニン濃度が上昇した。また、メラトニン飼育水から通常の水に換えると、3 時間後にはかなりの低値に戻ることも分かった。

## 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 21 件)

- ① 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).
- ② Suzuki, N., Danks, J.A., Maruyama, Y., Sasayama, Y., Hattori, A., (他 15 名) : Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone* 48: 1186-1193 (2011).
- ③ Yonei, Y., Hattori, A., Tsutsui, K., Okawa, M., and Ishizuka, B. : Effects of melatonin: Basics studies and clinical applications. *Anti-Aging Medicine* 7: 85—91 (2010).
- ④ Kitamura, K., Suzuki, N., Sato, Y., Nemoto, T., Ikegame, M., Yamamoto, T., Shimizu, N., Kondo, T., Furusawa, Y., Wada, S. and Hattori, A. : Osteoblast activity in the goldfish scale responds sensitively to mechanical stress. *Comp. Biochem. Physiol., part A* 156: 357-363 (2010).
- ⑤ Chowdhury, V. S., Yamamoto, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., Hattori, A. and Tsutsui, K. : Melatonin stimulates the release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus. *Endocrinology* 151: 271-280 (2010).
- ⑥ Ikegama, T., Azuma, K., Nakamura, M., Suzuki, N., Hattori, A. and Ando, H. : Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optictectum and retina of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol., Part A* 152: 219-224 (2009).
- ⑦ Suzuki, N., Hayakawa, K., Kameda, K., Toriba, A., Tang, N., Tabata, M.J., Takada, K., Wada, S., Omori, K., Srivastav, A.K., Mishima, H. and Hattori, A. : Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit both osteoclastic and osteoblastic activities in teleost scales. *Life Sci.* 84: 482-488 (2009).
- ⑧ Ikegama, T., Motohashi, E., Doi, H., Hattori, A. and Ando, H. : Synchronized diurnal and circadian expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles. *Neurosci. Lett.* 462: 58-63 (2009).

[学会発表] (計 57 件)

- ① Maruyama, Y., Suzuki, N., **Hattori, A.**: Activation of osteoclasts in female goldfish during the reproductive stage. 7th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 3-7 March, 2012, Malaysia.
- ② **服部淳彦**: 硬組織における日周性とその制御【招待講演】 第53回日本歯科基礎医学会・サテライトシンポジウム、2011年9/30、長良川国際会議場。
- ③ **服部淳彦**: メラトニンとは(オーバービュー)【招待講演】 第3回抗加齢内分泌研究会学術集会、2011年9/4、鶴見大学会館。
- ④ **服部淳彦**: 骨とメラトニン【招待講演】 第3回抗加齢内分泌研究会学術集会、2011年9/4、鶴見大学会館。
- ⑤ 池亀美華, **服部淳彦**, 北村敬一郎, 田畑 純, 矢野幸子, 山本敏男, 鈴木信雄: キンギョのウロコに存在する破骨細胞は微小重力下で活性化する 第29回日本骨代謝学会、2011年7/28-30、大阪国際会議場。
- ⑥ 関あずさ, 鈴木信雄, 染井正徳, 矢野幸子, **服部淳彦**: 新規プロモメラトニン誘導体の骨折治癒モデルラットの骨代謝に及ぼす影響 第29回日本骨代謝学会、2011年7/28-30、大阪国際会議場。
- ⑦ 佐藤雄亮, 根本 鉄, 鈴木信雄, 矢野幸子, **服部淳彦**, 北村敬一郎: 魚類の再生ウロコの骨代謝に及ぼす機械的刺激の影響: in vivo および in vitro のアッセイによる解析 第25回日本宇宙生物科学会、2011年9/30-10/1、横浜国立大学教育文化ホール。
- ⑧ **服部淳彦**: メラトニン研究の基礎と最前線【招待講演】 第65回生命科学先端研究センター学術セミナー、2010年11月24日、富山大学。
- ⑨ **服部淳彦**: メラトニン研究の最前線【招待講演】 第6回キレーション治療セミナー、2010年11月21日、大手町サンケイプラザ。
- ⑩ 奈良雅之, **服部淳彦**, 大西晃宏, 赤塚陽子, 鈴木信雄, 松田准一: 再生ウロコの振動分光学研究 日本分光学会年次講演会、2010年11月18日、京都大学。
- ⑪ 丸山雄介, 鈴木信雄, 伊藤正則, **服部淳彦**: 繁殖期の雌キンギョにおけるカルシウム代謝に対するメラトニンの作用 第81回日本動物学会、2010年9月23日、東京大学。
- ⑫ Kitahara, M., **Hattori, A.**, Suzuki, N., Tabata, M.J., Kakei, M., Miake, Y. and Mishima, H.: The relationship between

the melatonin and the periodicity of incremental lines in the tooth dentin. 37th European Symposium on Calcified Tissues, June 26, 2010, Glasgow.

- ⑬ **服部淳彦**: メラトニンの効果と各種食材に含まれるメラトニン【招待講演】 第10回日本抗加齢医学会総会、2010年6月12日、国立京都国際会館。
- ⑭ **服部淳彦**: メラトニンとアンチエイジング【招待講演】 日本抗加齢医学会・日本再生医療学会 合同エデュケーショナルセミナー、2010年2月16日、アカデミーヒルズ カンファレンス5。
- ⑮ 三島弘幸、北原正大、**服部淳彦**、鈴木信雄、田畑純、笈光男、見明康夫: 象牙質の成長線の形成リズムとメラトニンの分泌リズムとの関連 第4回バイオミネラリゼーションワークショップ、2009年12月13日、東京大学。
- ⑯ Nara, M., **Hattori, A.**, Ohnishi A., Akatsuka Y., Kimura-Suda H., and Matsuda, J.: Micro Raman and IR imaging analyses of regenerated goldfish scales. 5th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, July 12-17, 2009, Melbourne.
- ⑰ **服部淳彦**: メラトニン総論と骨への作用【招待講演】 第1回抗加齢内分泌研究会、2009年9月6日、東京医科歯科大学。
- ⑱ **Atsuhiko Hattori**: Melatonin and Anti-aging. YIES Symposium "Biorhythms and Health", July 25, 2009, Yamanashi Institute of Environmental Sciences.

[図書] (計 2 件)

- ① **服部淳彦**: 新興医学出版、抗加齢医療—その最前線の実際、第V章 睡眠。米井嘉一編、2010年、5ページ。
- ② 鈴木信雄, 田畑 純, **服部淳彦**: 三共出版、身近な動物を使った実験1、第3章 キンギョ。鈴木範男編、2009年、46ページ (31-77)。

## 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

鈴木 徹 (Suzuki Toru)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号: 70344330

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：