

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462853

研究課題名(和文) 骨組織におけるメラトニンと機械的刺激の相互作用の解明

研究課題名(英文) Interactive effects of melatonin and mechanical stress on bone cells

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新たな骨疾患・歯科治療法の開発を目的として、概日リズムホルモンとして知られるメラトニンの骨作用について検討した。結果、マウス骨組織におけるメラトニン受容体の発現局在については、アイソフォームのうち、MT2の発現が比較的多く、骨芽細胞のみならず、骨細胞や破骨細胞にもメラトニン受容体が発現している可能性、そして骨細胞のMT2発現は、皮質骨の骨髄側において、昼よりも夜に多い可能性が示唆された。また、メラトニンは、微小重力によって亢進した骨吸収を抑制する可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：To develop a new method for treatment of bone disease, we examined effects of melatonin on bone tissue. MT2, one of the isoforms of melatonin receptor, was the major type expressed in mouse bone tissue. It was expressed not only in osteoblasts, as has been reported previously, but also in some osteocytes and osteoclasts. The expression level of MT2 in osteocytes which located close to the endosteum tended to be higher at night compared to that at day time. It was also suggested that melatonin suppressed the up-regulated activity of osteoclasts cultured under modeled microgravity.

研究分野：骨組織細胞形態学

キーワード：メラトニン 機械的刺激 骨組織

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への応用の可能性について

メラトニンは、松果体ホルモンとして生体リズムを整えるほか、強力な抗酸化作用を持つなど、広汎な作用を有する。局所因子としても作用し、骨作用については、骨芽細胞の増殖・分化促進、破骨細胞の分化・活性抑制などが報告され¹⁾、新たな骨代謝調節因子として注目されはじめている。

一方、超高齢化社会の進行に伴い激増する骨粗鬆症は、わが国の大きな社会問題となっており、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る。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することから、骨代謝関連疾患のみならず、様々な疾患にも効果が期待できる。

しかし、骨組織におけるメラトニン受容体の局在や、その発現調節については、ほとんどわかっておらず、メラトニンの骨作用には不明な点が多く残されている。

(2) 応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

我々はいち早くメラトニンに着目しており、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、骨組織での作用を検討している²⁾。また、骨組織の機械的刺激への応答について研究を重ねて来た経験から³⁾、機械的刺激とメラトニンが相互作用する可能性を検討したいと考えた。

2. 研究の目的

メラトニンの骨作用機序の解明を進め、骨粗鬆症等の疾患に応用できる可能性を探る。

そのために、以下の2点について検討する。

(1) 骨組織におけるメラトニン受容体の局在を明らかにする。

(2) メラトニンと機械的刺激の相互作用の可能性を検討するために、メラトニン受容体の発現に対する機械的刺激の影響や、機械的刺激による骨芽細胞分化促進に対するメラトニンの影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物におけるメラトニン受容体サブタイプの骨組織・歯周組織内局在

各種マウス (ICR, C57Bl, C3H)、ラット (Wistar) の頭蓋骨、下顎骨、長管骨について、各種メラトニン受容体 (膜受容体: MT1, MT2, 核内受容体: ROR) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で検出する。

骨試料についてパラフィン切片、凍結切片を作成し、抗 MT1, 抗 MT2, 抗 ROR 抗体を用いて免疫組織化学反応を行い、それぞれのア

イソフォームの組織内局在を検討する。

(2) ヒト骨組織におけるメラトニン受容体サブタイプの発現局在

手術等で廃棄されるヒト骨組織片 (主に膝関節部、大腿骨骨頭) を海綿骨、皮質骨、軟骨、骨膜に分け、各部位についてリアルタイム PCR でメラトニン受容体の各サブタイプの発現量を検討する。

免疫組織化学によって、メラトニン受容体の各サブタイプの発現局在を検討する。

(3) 骨組織における機械的刺激とメラトニンの相互作用

マウス頭頂骨矢状縫合部に伸展刺激を加える実験系で、培養液にメラトニン (100pM, 10nM) を添加し培養する。骨芽細胞の分化マーカーとなる因子 (RUNX2, ALP) の変化を比較し、機械的刺激による骨形成促進に対するメラトニンの作用を検討する。

メラトニン受容体発現が、メラトニン投与や機械的刺激によって変化する可能性をリアルタイム PCR で検討する。

4. 研究成果

(1) 実験動物におけるメラトニン受容体サブタイプの骨組織・歯周組織内局在

ラット、複数種マウス骨組織におけるメラトニン受容体の各アイソフォームの発現について、リアルタイム PCR によって検討した。その結果、生後 2~6 日齢の実験動物では、アイソフォームのうち、MT1, MT2 の発現量は少なく、ROR はそれらよりも多く発現されていた。また、ラットやマウスの種の違い、骨の種類の違いによる明らかな発現量の差は認められなかった。

免疫組織化学による MT1 の検出は困難であったが、骨髄中の単核細胞、活発に骨形成している立方形の骨芽細胞に主に検出された。MT2 は骨細胞、骨髄中の単核細胞、骨表面の一部の間質系細胞、軟骨細胞の一部などに陽性反応が検出された。また、一部の破骨細胞にも陽性反応が検出された。

さらに、一部の臓器や脳でメラトニン受容体の発現にはリズムがあることが報告されていることから、2 週齢の動物についても検討を行い、昼と夜におけるメラトニン受容体 (MT2 について) 発現量をリアルタイム PCR で比較した。結果は一定の傾向を示さなかった。免疫組織化学により MT2 の組織内局在を検討したところ、皮質骨の内骨膜側の骨細胞において、夜間、強い反応を示すものが観察された。

以上の結果から、メラトニン受容体は、骨組織では主に骨芽細胞に発現しているが、骨細胞や破骨細胞にも発現している可能性が示された。骨細胞は骨代謝において骨形成、骨吸収の両方を調節し、機械的刺激受容応答機構にも大変重要な役割を果たしていると考えられていることから、この成果の意義は大きく、より厳密に検討してゆく必要があると考えられた。

さらに、マウス骨組織におけるメラトニン受容体の発現について、骨細胞での発現量が昼夜で変化する可能性が見られたが、これはメラトニンの骨作用に昼と夜で差異がある可能性を示すものとして大変興味深い結果である。しかしながら、遺伝子発現の変化として検出されるには至らず、さらに検討を重ねてより確実なデータにすべきと考えている。

破骨細胞にメラトニン受容体が発現している可能性については、破骨細胞への直接作用を示唆するものとして興味深いが、否定的な報告も1報出されており、より慎重に検討を続ける必要があると考えられる。

(2) ヒト骨組織におけるメラトニン受容体発現について

ヒト骨組織については、発現量の個人差が大きく、また MT2 について組織内局在を検討した結果、骨髄細胞の一部に検出され、少数であるが骨細胞の一部にも検出されることがあった。活性の高い骨芽細胞はほとんど認められず、表面は骨ライニング細胞によって覆われている。これらの骨表面にも免疫活性が認められることがあったが、吸収試験によって特異性を検討すると、その多くは非特異的反応であるが、ときどき特異性がある可能性も認められた。

ヒトの骨組織献体はほとんどが高齢者のものであり、メラトニン受容体は加齢とともに減少するという報告もあることから、メラトニン受容体の免疫組織化学による検出は困難であると考えられた。

(3) メラトニンと機械的刺激の相互作用について

マウス骨縫合部に伸展刺激を加える系において遺伝子発現変化を検討した。結果、縫合部組織では BMP, Wnt シグナル関連因子など、骨芽細胞の増殖や分化促進に影響を与えることが知られている因子のみならず、CCN ファミリー因子など細胞外基質の小分子の遺伝子発現に変化が見られた (Biomedical Res 37, 2016)。しかし、メラトニン受容体そのものの発現変化は明確ではなかった。

同様な実験系にメラトニンを添加し、骨芽細胞の増殖分化促進や、メラトニン受容体発現に及ぼす影響についてはまだ検討途中である。

(4) ニワトリ、キンギョ鱗におけるメラトニン受容体の組織内局在

当初の計画には入っていなかったが、ニワトリの骨と金魚の再生鱗についてもメラトニン受容体の局在を検出した。ニワトリについては、孵化前の若い骨組織では骨細胞、破骨細胞にも MT2 の免疫局在が見られた。またキンギョの再生鱗については、鱗の骨芽細胞に MT2 が発現している可能性が認められた。

さらに、機械的刺激とメラトニンの相互作用を検討した。鱗を擬似微小重力下で培養すると、鱗の破骨細胞の活性が増加するが、メラトニンはそれを抑制することがわかった。

従って、メラトニンは鱗において、骨芽細胞を介して、あるいは破骨細胞に直接作用することによって、機械的刺激(重力)の減少により活性化された破骨細胞に対して抑制的に働くものと考えられた。

引用文献

- 1) 1999 Roth JA, J Biol Chem 274: 22041-7 / 2002 Koyama H, J Bone Miner Res 17: 1219-29
- 2) 2002 Suzuki N & Hattori A, J Pineal Res 33:253-8 / 2008 Suzuki N, J Pineal Res 45: 229-34
- 3) 2001 Ikegame M, JBMR 16: 24-32 / 2003 Shimomura J, J Cellular Physiol 195: 488-96

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 1件)

Ikegame M*, Tabuchi Y, Furusawa Y, Kawai M, Hattori A, Kondo T, Yamamoto T. Tensile stress stimulates the expression of osteogenic cytokines / growth factors and matricellular proteins in the mouse cranial suture at the site of osteoblast differentiation. Biomedical Research. 査読あり, Vol. 37, 2016, pp.117-26. doi: 10.2220 / biomedres. 37.117.

[学会発表](計 9件)

池亀美華、内部健太、服部淳彦．マウス骨組織におけるメラトニン受容体の局在と日内変動に関する形態学的検討．第71回解剖学会中国・四国支部学術集会，2016年10月22，23日，Junko Hikutake Hall，岡山県岡山市．

Ikegame M, Hattori A, Yamamoto T, Kitamura K, Tabuchi Y, Nakano M, Yano S, Yamamoto T, Suzuki N. Melatonin suppresses the microgravity-induced activation of osteoclasts in cultured goldfish scale. The 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry. April 27-29,

2015, Tokyo Garden Palace Hotel, Tokyo.

池亀美華, 山本敏男. 骨縫合部における機械的伸展刺激による骨芽細胞形成促進機構への YAP/TAZ の関与. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2015 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター, 新潟県新潟市.

Nakano M, Ikegame M, Suzuki N, Hattori A. Mechanisms of melatonin action on osteoclasts in bone tissue. 第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会 合同大会, 2015 年 12 月 11-13 日, JMS 明日テールプラザ, 広島県広島市.

池亀美華, 服部淳彦, 河井まりこ, 山本敏男. 機械的伸展刺激により縫合部組織において変化する細胞増殖ならびに分化関連因子の検討. 第 56 回歯科基礎医学会総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場, 福岡県, 福岡市.

中野真樹, 池亀美華, 山本智章, 服部淳彦. 骨組織におけるメラトニンの作用機序の解明 ニワトリ胚をモデルとして. 第 14 回日本抗加齢医学会総会, 2014 年 6 月 6-8 日, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市.

Ikegame M, Kawai K, Tabuchi Y, Furusawa Y, Kondo T, Nakano M, Hattori A, Yamamoto I. Tensile stress-responsible novel cell proliferation / differentiation factors in mouse cranial sutures. International Symposium on Mechanobiology 2014, May 20-23, 2014, Junko Fukutake Hall, Okayama city, Okayama.

中野真樹, 池亀美華, 山本智章, 服部淳彦. ヒトおよびニワトリ骨組織におけるメラトニン受容体の発現と局在. 日本動物学会 第 84 回岡山大会, 2013 年 9 月 26-28 日, 岡山大学津島キャンパス, 岡山県岡山市.

中野真樹, 池亀美華, 山本智章, 服部淳彦. ヒト骨組織におけるメラトニン受容体遺伝子の発現と局在. 第 13 回日本抗加齢医学会総会, 2013 年 6 月 28-30 日, パシフィコ横浜会議センター, 神奈川県横浜市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池亀 美華 (IKEGAME, Mika)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 70282986

(2) 研究分担者

服部 淳彦 (HATTORI, Atsuhiko)
東京医科歯科大学・教養学部・教授
研究者番号: 70183910

河井 まりこ (KAWAI, Mariko)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 40379839

山本 智章 (YAMAMOTO, Noriaki)
新潟医療福祉大学 ロコモティブ症候群
予防研究センター・副センター長
研究者番号: 30445902

(3) 連携研究者

山本 敏男 (YAMAMOTO, Toshio)
岡山大学・名誉教授
研究者番号: 30107776