

The effects of cadmium on osteoclasts and osteoblasts in the scales of goldfish

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/1104

ウロコの破骨細胞及び骨芽細胞に対するカドミウムの作用

鈴木信雄

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測研究応用センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: The effects of cadmium on osteoclasts and osteoblasts in the scales of goldfish

魚のウロコには、破骨細胞と骨芽細胞とが共存し、I型コラーゲンも存在している。その中のカルシウムは、ハイドロキシアパタイトの形状をしている。したがってウロコは、ヒトの脊椎骨を薄く輪切りにしたような構造である。私は、このような構造を持つウロコを用いて培養系を開発した（前研究報告参照）。

カドミウムはイタイタイ病（骨軟化症）を引き起こす。その作用機構は、腎障害を経る経路が有力だが、骨に対する直接的な影響に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、この培養系を用いて、カドミウムの骨細胞に対する直接的な作用を調べ、ウロコで発現している遺伝子も解析した。

キンギョのメス（体重30g前後）をMS222（Aldrich）で麻酔し、ウロコを採取した。そのウロコを1%の抗生物質を含むイーグルスの最少培地（大日本製薬）で2度洗浄し、その後カドミウム（ 10^{-15} ~ 10^{-5} M）を含む培地で培養（15℃, 6時間）した。培養後10%ホルマリンを含む0.05Mカコジル酸緩衝液（pH7.4）で固定し、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRACP）及びアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を測定した。

同様にキンギョのメス（体重30g前後）からウロコを採取し、カドミウム（ 10^{-7} M）を含む培地で培養した。培養後、ウロコを液体窒素で凍結し、アイソゲン（ニッポンジーン）によりトータルRNAを抽出した。その後、キット（宝酒造）によりcDNAを合成した。また本研究では、骨芽細胞の増殖及び分化に関係するエストロゲンの受容体（ER）とインシュリン様成長因子1（IGF-1）及び重金属の解毒に関与するタンパク質であるメタロチオネイン（MT）の発現をRT-PCRにより調べた。一方、残りのウロコを用いてTRACP及びALP活性を測定した。

さらに本研究では、骨芽細胞に対するカドミウムの長時間培養（96時間）による影響を調べるため、ウロコを前述の方法で調整し、ALP活性を測定した。

TRACP活性は、培養6時間で非常に高感度（ 10^{-13} ~ 10^{-5} M）でカドミウムに反応し、その活性を有意に低下させた（Fig 1）。一方、骨芽細胞の活性の指標であるALP活性は6時間の培養では変化がなかった。また、ウロコの骨細胞で発現している遺伝子を解析すると、カドミウムの解毒に関係するタンパク質であるMTmRNAの発現が上昇していた。したがって、短時間の培養では、本タンパク質がカドミウムの解毒に寄与することが推測される（Fig 2）。しかしながら、骨芽細胞の増殖や分化に関係するER及びIGF-1の発現が減少していたので（Fig 2）、長期間の培養では、その活性が低下する可能性がある。実際にALP活性は、64及び96時間で低下した（Fig 3）。

本研究において、ウロコの培養系を用いると、 10^{-13} Mのカドミウムを検出できることが判明した。原子吸光分光光度計を用いても、 10^{-10} Mまでしか測定できず、この系は非常に高感度である。さらに、64及び96時間の培養により、カドミウムは、骨芽細胞の活性を抑えていることが判明した。したがって、カドミウムはこれら両方の骨細胞に作用し、その活性を抑制し、骨代謝に悪影響を及ぼしていることがわかった。

以上のことから、ウロコはカドミウムの骨への直接的な作用を調べるにはよいモデルであり、今後、この系を用いて、さらに詳細なメカニズムを解明していきたい。

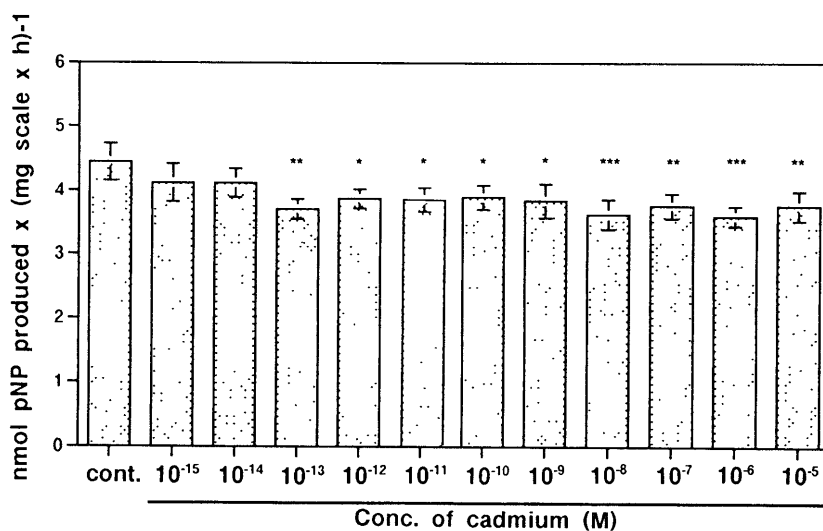


Fig 1 Effect of cadmium on TRACP activity in the cultured scales at 6 h. *, **, *** indicate statistically significant differences at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively, compared with the values in the control scales.

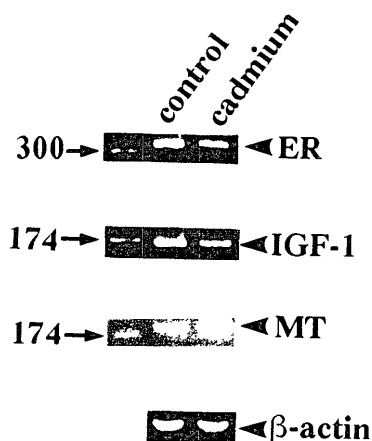


Fig 2 Expression of *ER*, *IGF-1*, *MT* and β -*actin* mRNAs in the control and cadmium-treated scales of goldfish. Expression of *ER* and *IGF-1* mRNAs in the cadmium-treated scales were lower than those in the control scales while *MT* mRNA expression increased by cadmium-treatment. The PCR products of β -*actin* mRNA were equally amplified in both scales. Arrowheads indicate the PCR products of *ER* cDNA (327 bp), *IGF-1* cDNA (160 bp), *MT* cDNA (200 bp) and β -*actin* cDNA (200 bp). Arrow indicates respective size marker.

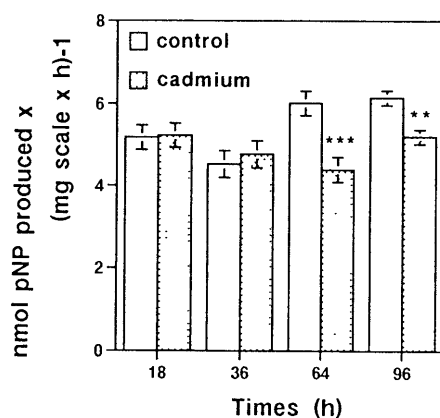


Fig 3 Effect of cadmium on ALP activity in the cultured scales. **, *** indicate statistically significant differences at $P<0.01$ and $P<0.001$, compared with the values in the control scales.

謝辞

本研究は科学研究費，若手研究B（14740455）の援助により行われた。