

令和元年6月19日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07871

研究課題名(和文) 黒色素刺激ホルモンの骨への新規作用：再生能力が高い硬組織(ウロコ)を用いた解析

研究課題名(英文) Novel action of melanocyte-stimulating hormone on bone: Analysis using fish scales with a high regeneration ability

研究代表者

鈴木 信雄 (Suzuki, Nobuo)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授

研究者番号：60242476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、魚類における黒色素刺激ホルモン(MSH)の骨代謝に対する新規作用を骨モデルであるウロコを用いて解析することである。本研究では、再生ウロコを用いて、MSHの骨代謝に対する作用をin vivo及びin vitroで解析を行い、MSHが破骨細胞及び骨芽細胞を活性化することを証明した。また、カルシウム代謝に関与しているカルシトニンの分泌をMSHが促していることもわかった。さらに、円鱗から櫛鱗への分化機構を調べるために、次世代シーケンズ解析を行った。その結果、骨代謝関連遺伝子の制御機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、MSHの骨に対する新規作用を解析することができ、MSHが破骨細胞及び骨芽細胞を活性化し、骨吸収抑制ホルモンであるカルシトニンの分泌を促すことも判明した。さらにヒラメを用いて、円鱗から櫛鱗への分化機構のメカニズムの一端も解析できた。

ヒラメは水産養殖の上で重要な魚種であり、各県の水産試験場では種苗生産を行っている。陸上の養殖時に無眼側の黒化が生じやすく、黒化が起きたヒラメは商業上の価値は低い。したがって、本研究は、無眼側の黒化機構の解明にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to analyze the novel action of melanocyte-stimulating hormone (MSH) on bone metabolism using fish scales as a bone model. In this study, we analyzed the effects of MSH on bone metabolism in vivo and in vitro using regenerating scales and demonstrated that MSH promotes osteoclastic and osteoblastic activity. In addition, we found that MSH promotes the secretion of calcitonin, which is involved in calcium metabolism. Furthermore, next-generation sequencing analyses were performed to investigate the differentiation mechanism from cycloid scales to ctenoid scales. As a result, it was possible to clarify one of the regulatory mechanisms of bone metabolism related genes in the formation of ctenoid scales.

研究分野：魚類生理学

キーワード：MSH 骨代謝 カルシトニン 円鱗 櫛鱗 ヒラメ キンギョ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、魚類における黒色素胞刺激ホルモン (Melanocyte-stimulating hormone: MSH) の新規作用 (骨代謝に対する作用) をウロコ (骨モデル) を用いて解析することである。

我々は予備的な実験により、キンギョに MSH を投与すると、再生中のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞が活性化することから、MSH の新規機能として骨代謝調節作用を見い出している。また、ヒラメの無眼側は通常は円鱗であるが、黒色素胞が形成されると櫛鱗に変化する為、黒色素胞が骨形成に影響することが考えられる。

以上のことから、本研究では、ウロコを骨モデルとして MSH の骨代謝の調節制御機構を解析すること、黒色素胞とウロコの形態形成との関係を調べることを目的とする。

### 2. 研究の目的

キンギョのウロコを用いて、MSH の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を *in vivo* 及び *in vitro* の双方から実験を行った。さらに骨代謝に関するホルモン (カルシトニン) とのクロストークを解析した。次に、ヒラメの色素沈着による円鱗から櫛鱗への形成機構について、時計遺伝子や骨代謝関連遺伝子との関係を解析した。以上のことより、MSH の骨代謝に対する作用の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### MSH の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用

まず、キンギョ (*Carassius auratus*) を用いた *in vivo* の解析を行った。キンギョの再生ウロコを用いた *in vivo* の骨形成システムにより、MSH の骨形成に対する影響を解析した。麻酔したキンギョから左側のウロコを取り、キンギョに MSH (Low dose: 0.1µg/g BW; High dose: 1 µg/g BW) を投与した。MSH の投与は、ウロコを抜いた直後、3 日、5 日、7 日、9 日後に投与した。キンギョは、水温 25 で飼育して、毎朝摂餌させた。10 日後に麻酔したキンギョから左右のウロコを採取した。10 日というタイムコースは、再生過程において骨芽細胞が活性化している時期なので、10 日目の再生ウロコを用いた<sup>1)</sup>。採取した左側のウロコ (再生ウロコ) 及び右側のウロコの骨芽細胞活性 (アルカリフォスファターゼ活性) 及び破骨細胞活性 (酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性) を測定した<sup>2)</sup>。

次に、*in vitro* の解析を行った。即ち、麻酔したキンギョからウロコを採取して、10 日間前述の方法によりキンギョを飼育した。その後、キンギョを麻酔してウロコを採取し、そのウロコを L-15 培地 (Thermo Fisher Scientific Inc., Grand Island, NY, USA) で 15 で 6 時間培養して、ウロコの骨芽細胞活性 (アルカリフォスファターゼ活性) 及び破骨細胞活性 (酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性) を測定した<sup>2)</sup>。さらに *in vitro* において、遺伝子発現解析も行った。前述のように再生 10 日のウロコを調整し、その再生ウロコを L-15 培地 (Thermo Fisher Scientific Inc.) で 15 で 3 及び 6 時間培養した。培養したウロコからキット (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、mRNA を抽出して、cDNA 合成を行った。この cDNA を用いて、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に関係する遺伝子、破骨細胞の機能遺伝子の解析をリアルタイム PCR により行った<sup>3)</sup>。

#### MSH と骨吸収抑制ホルモンとのクロストーク

キンギョにおいては、MSH とカルシトニンとの関連を調べるために、カルシトニンの分泌源である鰓後腺に MSH の受容体 (MCR) が発現しているのか否かを調べた。プライマーは、Kobayashi et al. (2011)<sup>4)</sup>に記載されているプライマー及び PCR の条件を用いた。また、MSH 投与による血液中のカルシウム濃度の変化とカルシトニンの分泌との関連についても調べて、MSH、カルシトニン及びカルシウムとの関連性を調べた。カルシトニンの測定は、Suzuki (2001)<sup>5)</sup>に従って行った。またカルシウム濃度は、Suzuki et al. (2011)<sup>6)</sup>の手法を用いた。

#### ヒラメの櫛鱗の形成機構の解析

有眼側の櫛鱗と無眼側の円鱗における時計遺伝子の発現を調べて、櫛鱗と円鱗の間で違いがあるか否かを調べた。材料にはヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) を用いて、20 で明暗 (12h:12h) サイクルで飼育した。そのヒラメの有眼側の櫛鱗と無眼側の円鱗を 6、12、18 及び 24 時にサンプリングして、そのウロコから mRNA を抽出して、時計遺伝子 (period1, period2 及び cry1) の発現をリアルタイム PCR により解析した<sup>3)</sup>。

次に、ヒラメの *in vivo* において、円鱗から櫛鱗への変化を追うことができる系を作成した。無眼側において、尾から順に色素沈着が生じる。その色素沈着のあと、棘が 1 本出て、櫛鱗へと変化することがわかった。この系を用いて、次世代シーケンズ解析により、時計遺伝子、骨代謝関連遺伝子を解析した。

### 4. 研究成果

#### MSH の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用

MSH をキンギョに投与した結果、再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞が活性化した。High dose のみならず、Low dose においても骨芽細胞及び破骨細胞を活性化していた。なお、骨芽細胞の方が破骨細胞よりも MSH の効果があり、おそらく MSH は、まず骨芽細胞に作用した後に、破骨細胞を活性化している可能性がある。

キンギョの *in vitro* の解析では、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に關与する遺伝子 (RANKL 及び OPG) の解析を行った。10 日間再生させたキンギョの再生ウロコを用いて培養実験を実施した。即ち、MSH( $10^{-6}$  M)を培地に添加して 3 時間培養した結果、RANKL (骨吸収促進) 及び OPG (骨吸収抑制) の発現が有意に上昇したが、RANKL の発現量の上昇率が大きく、RANKL/OPG が有意に上昇して骨吸収を促進することが判明した。RANKL は骨芽細胞で発現している遺伝子なので、前述のように MSH の受容体は骨芽細胞にあり、骨芽細胞を經由して破骨細胞を活性化させた可能性が高い。このような作用は、副甲状腺ホルモン<sup>6)</sup> やプロスタグランジン  $E_2$ <sup>7)</sup>で見出しており、MSH はこれらのホルモンと同じように魚類に作用している可能性が高い。

さらに培養 6 時間において破骨細胞で発現している機能遺伝子であるカテプシン K の発現が有意に上昇していた。カテプシン K の遺伝子発現が上昇していることから、骨吸収を促していることを破骨細胞の酵素活性のみならず、遺伝子レベルでも証明したことになる。

#### MSH と骨吸収抑制ホルモンとのクロストーク

キンギョの雌雄の鰓後腺から mRNA を抽出して、MSH の受容体 (MCR) の発現を解析した。その結果、雄及び雌において、個体間でそれぞれの MCR の発現レベルは変動していたが、すべてのサブタイプ (MCR1, MCR2, MCR3, MCR4 及び MCR5) が検出された。したがって、MSH は鰓後腺に作用して、カルシトニンの分泌を促している可能性が高い。

次に、MSH のカルシウム代謝に及ぼす影響を調べるため、MSH 投与による血液中のカルシウム濃度とカルシトニンレベルの変化を調べた。その結果、血液中のカルシウムに応答して鰓後腺からカルシトニンが分泌されていることを証明でき、さらに血液中のカルシウム濃度と血液中のカルシトニンとの間に有意な正の相関があることがわかった。以上のことから、MSH はカルシトニンとクロストークしており、魚類のカルシウム代謝の調節に關与している可能性が高いことが判明した。

#### ヒラメの櫛鱗の形成機構の解析

ヒラメのウロコで発現している時計遺伝子 (period1, period2 及び cry1) の発現を有眼側の櫛鱗と無眼側の円鱗と比較した。その結果、円鱗の方が櫛鱗よりも時計遺伝子の発現が高い時期や櫛鱗の方が円鱗よりも時計遺伝子の発現が高い時期があった。したがって、円鱗と櫛鱗とは、光に対する感受性が異なる可能性がある。

次に、ヒラメの *in vivo* において、円鱗から櫛鱗への変化を追うことができる系を作成した。無眼側において、尾から順に色素沈着が生じる。その色素沈着のあと、棘が 1 本出て、櫛鱗へと変化することがわかった。

そこで、ヒラメの色素沈着と円鱗から櫛鱗への分化機構を調べるため、次世代シークエンス解析を行った。尾部に沈着した色素は、頭部に向かって色素沈着が生じた。尾部から頭部に向かって 4 か所の部位で次世代シークエンス解析を行った結果、色素沈着が生じる割合が高いほど、骨形成遺伝子 (runx2, bmp2, colla1, colla2 など) と破骨細胞のマーカー (TRAP, CTSK) が低い値を示した。さらに、これらの発現パターンと同じ傾向が、時計遺伝子 (per1, per2, cry1, cry2) でも観察された。これらの結果は、時計遺伝子による骨代謝関連遺伝子の制御が行われている可能性を示している。一方、骨芽細胞で発現している calcitonin receptor-like receptor やビタミン D ホルモン受容体は、色素沈着部位で高い値を示していた。したがって、色素沈着により時計遺伝子や骨代謝関連ホルモンの相互作用による調節が行われる可能性が高い。

ヒラメは水産養殖の上で重要な魚種であり、各県の水産試験場では種苗生産を行っている。陸上の養殖時に無眼側の黒化が生じやす<sup>8)</sup>、黒化が起きたヒラメは商業上の価値は低い。したがって、本研究は、無眼側の黒化機構の解明にも貢献できる可能性が高い。

#### 引用文献

- 1) Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura, K., Hosono, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M.J. and Hattori, A.: Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sci.*, 76: 2699-2709 (2005)
- 2) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 33: 253-258 (2002)
- 3) Sato, M., Yachiguchi, K., Motohashi, K., Yaguchi, Y., Tabuchi, Y., Kitani, Y., Ikaria, T., Ogiso, S., Sekiguchi, T., Hai, T.N., Huong, D.T.T., Hoang, N.V., Urata, M., Mishima, H., Hattori, A. and Suzuki, N.: Sodium fluoride influences calcium metabolism resulting from the suppression of osteoclasts in the scales of nibbler fish *Girella punctate*. *Fisheries Sci.*, 83:543-550 (2017)
- 4) Kobayashi, Y., Chiba, H., Mizusawa, K., Suzuki, N., Cerdá-Reverter, J.M. and Takahashi, A.: Pigment-dispersing activities and cortisol-releasing activities of melanocortins and their receptors in xanthophores and head kidneys of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 173: 438-446 (2011)
- 5) Suzuki, N.: Calcitonin-like substance in the plasma of Cyclostomata and its putative role. *Comp. Biochem. Physiol.*, 129B: 319-326 (2001)

- 6) Suzuki, N., Danks, J.A., Maruyama, Y., Ikegame, M., Sasayama, Y., Hattori, A., Nakamura, M., Tabata, M.J., Yamamoto, T., Furuya, R., Saijoh, K., Mishima, H., Srivastav, A.K., Furusawa, Y., Kondo, T., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K. and Martin T.J.: Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone*, 48: 1186-1193 (2011)
- 7) 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 E<sub>2</sub> increases both osteoblastic and osteoclastic activities in the scales of goldfish and participates in the calcium metabolism in goldfish. *Zool. Sci.*, 29: 499-504 (2012)
- 8) Suzuki, T. and Tanaka, M. Chapter 7 in *Flatfishes: Biology and Exploitation*, 2nd edition. Wiley Blackwell. Pp.171-184 (2014)

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計6件)

- Ikari, T., Sekiguchi, T., Urata, M., Furusawa, Y., Ikegame, M., Kinoshita, Y., Kitamura, K., Nakabayashi, I., Horita, M., Tabuchi, Y., **Hattori, A.**, Srivastav, A.K. and **Suzuki, N.**: Sequencing and expression analysis of calcitonin receptor in the scales of goldfish (*Carassius auratus*). *Int. J. Zool. Inv.*, 4:1-10 (2018)
- Ishizu, H., Sekiguchi, T., Ikari, T., Kitamura, K., Kitani, Y., Endo, M., Urata, M., Kinoshita, Y., **Hattori, A.**, Srivastav, A.K., Mishima, H., Mizusawa, K., **Takahashi, A.** and **Suzuki, N.**:  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone promotes the bone resorption resulting from increase both osteoblastic and osteoclastic activities in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 262: 99-105 (2018)
- Sekiguchi, T., **Suzuki, T.**, Kurokawa, T., Amornsakun, T., Hai, T.N., Srivastav, A.K. and **Suzuki, N.**: Molecular characterization of putative calcitonin gene-related peptide receptors and expression of calcitonin gene-related peptide and its receptor in the early development of flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Int. J. Zool. Inv.*, 4: 106-117 (2018)
- Ikari, T., Kobayashi, Y., Kitani, Y., Sekiguchi, T., Endo, M., Kambegawa, A., Asahina, K., **Hattori, A.**, Tabuchi, Y., Amornsakun, T., Mizusawa, K., **Takahashi, A.** and **Suzuki, N.**:  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone directly increases the plasma calcitonin level and involves calcium metabolism in goldfish. *Int. Aqua. Res.*, 10: 283-292 (2018)
- Togawa, M., Endo, Y., **Suzuki, N.**, Yokoi, H. and **Suzuki, T.**: Identification of Sox10-positive cells at the dorsal fin base of juvenile flounder that are correlated with blind-side skin ectopic pigmentation. *J. Exp. Zool. Part B*, 330: 427-437 (2018)
- Kase, Y., Ikari, T., Sekiguchi, T., Sato, M., Ogiso, S., Kawada, T., Matsubara, S., Satake, H., Sasayama, Y., Endo, M., Kitamura, K., **Hattori, A.**, Watanabe, T.X., Maruyama, Y., Watanabe, Y., Funahashi, H., Kambegawa, A. and **Suzuki, N.**: Sardine procalcitonin amino-terminal cleavage peptide has a different action from calcitonin and promotes osteoblastic activity in the scales of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 211: 77-83 (2017)

### [学会発表](計10件)

- Suzuki, N.**, Ikari, T., Kobayashi, Y., Mizusawa, K., **Takahashi, A.**, Kitani, Y., Sekiguchi, T., Endo, M., Kambegawa, A., Asahina, K., Tabuchi, Y., Amornsakun, T., **Hattori, A.**: Alpha-melanocyte-stimulating hormone increases plasma calcitonin level and is involved in fish calcium metabolism. Joint Symposium between Kanazawa University and Prince of Songkla University on Recent Advances in Marine Science, Aquaculture and Food Technology, Kanazawa University, December 17, 2018, Ishikawa, Japan, Poster presentation.
- Suzuki, N.**: Teleost scale is a functional calcium reservoir and has an important physiological role in calcium metabolism. 8th International Fisheries Symposium 2018, Hansa JB Hotel, November 19-21, 2018, HatYai, Thailand, Oral presentation, 招待講演.
- 鈴木信雄**, 五十里雄大, 小林勇喜, 水澤寛太, **高橋明義**, 木谷洋一郎, 関口俊男, 遠藤雅人, 神戸川明, 朝比奈潔, 田淵圭章, Amornsakun T, **服部淳彦**:  $\alpha$ -MSH は血漿カルシトニン濃度を上昇させてカルシウム代謝に関与する. 第43回日本比較内分泌学会大会, 東北大学, 2018.11.9-11, 宮城県, ポスター.
- 鈴木信雄**, 石津偉統, 木谷洋一郎, 五十里雄大, 関口俊男, 北村敬一郎, 遠藤雅人, **服部淳彦**, 水澤寛太, **高橋明義**: 魚類の骨代謝に対する黒色素胞刺激ホルモンの影響: *in vivo* 及び *in vitro* による解析. 平成30年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 2018.3.26-30, 東京都, 口頭.
- Ishizu, H., Sekiguchi, T., Ikari, T., Kitamura, K., Kitani, Y., Endo, M., Urata, M., **Hattori, A.**, Mizusawa, K., **Takahashi, A.** and **Suzuki, N.**:  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone functions to calcium metabolism in goldfish. International Symposium "Environmental researches in northern Japan Sea and related regions: Renewed horizon of Japan-Russia scientific partnership". Shiinoki

Cultural Complex, Kanazawa, March 3-4, 2018, Ishikawa, Japan, Poster presentation.

石津偉統，関口俊男，五十里雄大，木谷洋一郎，北村敬一郎，浦田 慎，遠藤雅人，**服部淳彦**，水澤寛太，**高橋明義**，**鈴木信雄**：黒色素胞刺激ホルモンはキンギョの再生ウロコの骨芽細胞と破骨細胞を活性化する．第 42 回日本比較内分泌学会およびシンポジウム，奈良女子大学，2017.11.17-19，奈良県，ポスター．

Ishizu, H., Sekiguchi, T., Ikari, T., Kitamura, K., Kitani, Y., Endo, M., Urata, M., **Hattori, A.**, Mizusawa, K., **Takahashi, A.** and **Suzuki, N.**: Effects of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone on osteoblasts and osteoclasts in the regenerating scales of goldfish. 3rd International Symposium "International Collaboration Research Base for Reaction of Atmosphere-Marine-Ecosystem Caused by Aerosol", Hotel Noto Kinpura, October 9 -10, 2017, Ishikawa, Japan, Poster presentation.

石津偉統，五十里雄大，木谷洋一郎，小木曾正造，関口俊男，**服部淳彦**，**高橋明義**，**鈴木信雄**：黒色素胞刺激ホルモンはキンギョの骨芽細胞及び破骨細胞を活性化する．日本動物学会第 88 回富山大会，富山県民会館，2017.9.21-23，富山県，口頭．

**鈴木信雄**，木谷洋一郎，五十里雄大，石津偉統，小木曾正造，関口俊男，**服部淳彦**，**高橋明義**：魚類の骨代謝に対する黒色素胞刺激ホルモンの影響．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京海洋大学，2017.3.26-30，東京都，ポスター．

**鈴木信雄**：魚類のウロコを骨モデルとして用いた評価システムの開発と応用．関西おさかな勉強会．京都大学，2016.6.17，京都府，口頭．

〔図書〕(計 1 件)

**鈴木信雄**，関口俊男，**服部淳彦**：第 9 章血液中のカルシウムを調節するしくみ，「ホメオスタシスと適応」，裳華房，東京，pp139-157 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://rinkai.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：高橋 明義

ローマ字氏名：Takahashi Akiyoshi

所属研究機関名：北里大学

部局名：海洋生命科学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10183849

研究分担者氏名：鈴木 徹  
ローマ字氏名：Suzuki Tohru  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：農学研究科  
職名：教授  
研究者番号(8桁): 70344330

(2)研究協力者

研究分担者氏名：服部 淳彦  
ローマ字氏名：Hattori Atsuhiko  
所属研究機関名：東京医科歯科大学  
部局名：教養部  
職名：教授  
研究者番号(8桁): 70183910

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。