

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 4 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500404

研究課題名（和文）

磁場と骨代謝調節ホルモンとの相乗効果を利用した新規骨疾患治療システムの開発

研究課題名（英文）

Development of a novel healing system for bone disease using a synergetic effect of magnetic fields and bone-regulating hormone

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・准教授

研究者番号：60242476

研究成果の概要（和文）：極低周波磁場を用いた新規治療システムを構築するため、魚類のウロコを用いた *in vitro* のアッセイ系を用いて骨芽細胞及び破骨細胞に対する応答を解析した。その結果、低強度では破骨細胞の活性が低下して、強度が上がると骨芽細胞が活性化してそれに伴い、破骨細胞が活性化することがわかった。次にその作用をマウスの頭蓋骨で確認することができた。さらに、ウロコの *in vitro* のアッセイ系により、メラトニンとの相乗効果が認められ、新規治療システムを構築することができた。

研究成果の概要（英文）：To develop a novel healing system for bone disease using magnetic fields, we examined the effects of extremely low-frequency (ELF) magnetic fields (60Hz) on osteoblasts and osteoclasts of goldfish scales using *in vitro* assay systems. The osteoblasts and osteoclasts in goldfish scales responded sensitively to the ELF magnetic fields in an *in vitro* experiment. The results agreed with those of rat calvarial osteoblasts and osteoclasts. In addition, the synergetic effect of magnetic fields and a bone-regulating hormone, melatonin, was confirmed. Thus, we succeeded in creating a novel healing system for bone disease by magnetic fields.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：人間医工学 ・ 医用生体工学・生体材料学

キーワード：骨芽細胞，破骨細胞，極低周波磁場，ホルモンとの相互作用，ウロコ，ラットの頭蓋骨，メラトニン

1. 研究開始当初の背景

ヒトの骨には骨芽細胞（骨を作る細胞）と破骨細胞（骨を壊す細胞）があり、それ

らが骨形成を調節している。骨芽細胞は細胞株があるため培養は容易であるが、破骨細胞は多核の活性型に誘導する必要があ

るため、培養は難しい。さらに骨組織には、コラーゲンやオステオカルシン等の骨基質タンパク質が存在し、特に磁場や重力等の物理的な刺激には、骨基質が重要な役割を果たしている。したがって、人体の骨組織を再現させるためには、これら全て共存させて培養する必要がある。しかしながら、現時点ではこのような共存培養が難しい。骨粗鬆症等の骨疾患に対する治療薬を開発するためには、卵巣を除去し、骨が折れやすくしたラットを用いて、時間と多額の費用を投資して開発しているのが現状である。そこで磁場が骨形成を促すことから、磁場のような物理的な刺激により、骨疾患の治療を行うことができれば、高価な薬を購入する必要もなく、さらに副作用もなく、高齢者にはとても適した治療になる。磁場の刺激に対する骨形成機構の研究はモデルシステムの欠如によって遅れ、そのメカニズムに関する基礎的なデータは少なく、

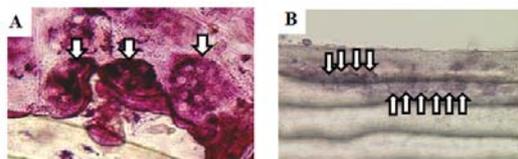


図1 キンギョのウロコに存在する破骨細胞(A)と骨芽細胞(B)
A: 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼの活性染色
B: アルカリフォスファターゼの活性染色
図中の矢印は、破骨細胞及び骨芽細胞を示す。

骨形成に最適な磁場の条件も決定されていない。

2. 研究の目的

魚のウロコには骨芽細胞及び破骨細胞(図1参照)、さらに骨基質タンパク質が共存し、カルシウムもハイドロキシアパタイトの状態で存在することに着目し、ヒトの骨に代わる *in vitro* のウロコの培養システムを開発した(Suzuki et al., 2000; Suzuki and Hattori, 2002)。このシステムを用いて、1) 60Hzの極低周波磁場に対する作用を調べ、遺伝子発現を解析した。次に2) ラットの骨においても同様に解析し、魚のウロコで得られたデータが哺乳類でも再現できるかを調べた。さらに3) 破骨細胞の活性を抑制するホルモンであるメラトニンとの相乗効果を調べ、新規骨形成モデルシステムを開発する。

3. 研究の方法

実験1: 極低周波磁場による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響(ウロコ用いた解析)

キンギョ(*Carassius auratus*) (メス40匹、体重40g前後)を麻酔(MS222, Aldrich Chemical Company Inc.)し、ウロコを取り、2ml用のエッペンドルフチューブ(BM機器)に入れた。次にそのチューブにHEPES(20mM)(pH7.0)及び抗生物質(1%)を含む培地(MEM、

ICN Biomedicals Inc.)を500・1加えた。そのチューブを3、5、10及び30mTの極低周波磁場(60Hz)に15°C、24時間曝露し、破骨及び骨芽細胞の活性に及ぼす影響を調べた。磁場発生装置の詳細は、Miyakawa et al. (2001)に示してある。本研究では、破骨細胞の活性の指標として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)を用い、骨芽細胞の活性の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)を使用し、磁場の骨組織に対する作用を調べた。詳細な方法は、Suzuki and Hattori (2002)に示してある。また培地中に放出された酵素活性も同様に測定した。

実験2: 極低周波磁場によるウロコの破骨及び骨芽細胞で発現している遺伝子の発現解析

麻酔したキンギョ(メス5匹、体重40g前後)のウロコを取り、実験1と同様に30mTの磁場に曝露(15°C、24時間)した。そのウロコからアイソゲン(ニッポンジーン)によりmRNAを抽出し、タカラのキットを用いてcDNAを合成した。破骨細胞のマーカであるcalcitonin receptor(CTR)及び骨芽細胞のマーカであるinsulin-like growth factor-I(IGF-I)とestrogen receptor(ER)の発現をRT-PCRにより解析した。詳細な方法は、Suzuki et al (1997)に示してある。さらに、リアルタイムPCR法により、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に関与する遺伝子Receptor Activator of NF- κ B Ligand(RANKL)とReceptor Activator of NF- κ B(RANK)の発現を解析した。

実験3: ラットの頭蓋骨を用いた極低周波磁場による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響

ラット(生後4日)をエーテル麻酔で安楽死させ、頭蓋骨を切り出した。それを半分に切り、片方をコントロールとし、片方を磁場曝露に用い、2ml用のエッペンドルフチューブにそれぞれ入れた。次にそのチューブにHEPES(20mM)(pH7.0)及び抗生物質(1%)を含む培地(MEM、ICN Biomedicals Inc.)を1.5ml加えた。そのチューブを30mTの磁場に37°C、24時間曝露し、破骨及び骨芽細胞の活性に及ぼす影響を調べた。なお、コントロールは磁場に曝露せず、37°Cで培養した。曝露後、頭蓋骨は冷凍保存(-80°C)した。分析直前に解凍し、500・1の蒸留水を入れ、超音波破壊機で破碎した。遠心により残渣を除き、その上清中のTRAP及びALP活性をキンギョと同様な方法で測定した。

実験4: 骨代謝に関与するホルモンと磁場との相互作用

キンギョ(10匹、体重40g前後)を麻酔し、実験1と同様な方法で左側のウロコを取り除

いた。30 mT の磁場に 15°C、24 時間曝露し、メラトニン (10⁻⁶ M) 添加による影響を調べた。バイオマーカーとして、TRAP 及び ALP 活性を用いた。

4. 研究成果

実験 1：極低周波磁場による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響

3 mT の磁場により、ウロコの破骨細胞の活性が有意に低下した。また、細胞の活性と同様に培地中の TRAP 活性もコントロールに比べて有意に低下していた。一方、ウロコの骨芽細胞の活性は変化しなかったが、培養液中の ALP 活性が、コントロールと比較して上昇していた。したがって、3 mT の磁場刺激でも骨形成が進行中であると推測される。また 5 mT でも 3 mT と同様な変化がみられた。

10 及び 30 mT では、骨芽細胞の活性が上昇し、それに伴い破骨細胞の活性も上昇していた。これら 2 種類の細胞は、密接に連絡しており、骨芽細胞で発現しているリガンドである RANKL と破骨細胞にあるレセプターである RANK が結合することにより、破骨細胞が活性化し、多核の活性型の破骨細胞に分化する (Teitelbaum, 2000)。したがって、10 及び 30 mT で 24 時間曝露することにより、骨芽細胞が活性化し、RANK-RANKL を通して破骨細胞も活性化された可能性が高い。そこで、実験 2 において、RANK, RANKL を含めた遺伝子の発現を調べた。

実験 2：極低周波磁場の遺伝子発現に及ぼす影響

極低周波磁場は、細胞膜に影響を及ぼし、細胞活性に影響を与えられている (Luben, 1991)。本研究においても、膜レセプターである CTR mRNA の発現は上昇したが、核レセプターである ER mRNA の発現は変化しなかった。CTR は破骨細胞に特異的に発現している遺伝子なので、実験 1 で得られた結果と一致している。さらに IGF-I は骨芽細胞で特異的に発現している遺伝子であり、ALP 活性の上昇と共にその mRNA レベルも上がっていた。したがって、CTR に加えて IGF-I の発現に関しても実験 1 の結果を支持していた。さらに 30 mT の磁場を照射することにより、RANKL 及び RANK の発現が上昇していることがわかった。

実験 3：ラットの頭蓋骨を用いた極低周波磁場による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響

ラットの頭蓋骨を用いて、30 mT で処理すると、ウロコと同様に骨芽細胞及び破骨細胞の両方の活性が上昇した。したがって、ウロコで得られた結果が再現され、磁場は骨代謝を亢進させて、骨形成を促進している可能性が高い。副甲状腺ホルモンは、骨芽および破

骨細胞の両方の細胞活性を上昇させて、骨形成を促していることが最近わかってきた (Martin and Seeman, 2007)。したがって、磁場による骨形成も副甲状腺ホルモンのようなメカニズムで進行している可能性が高い。

実験 4：骨代謝に関与するホルモンと磁場との相互作用

我々は、ウロコの培養システムを用いて、脳の松果体で作られ概日リズムを調節するホルモンであるメラトニンが骨芽及び破骨細胞の活性を抑制することを哺乳類に先駆けて報告した (Suzuki and Hattori, 2002)。また、メラトニンの破骨細胞の活性を抑制する作用の方が、骨芽細胞に対する作用より強く、破骨細胞が活性型に誘導されることを抑制している。そこで、磁場照射により活性化した破骨細胞の活性をメラトニンが抑制するかを調べた。その結果、磁場照射したウロコにメラトニンを添加すると、骨芽細胞の活性は変化しなかったが、破骨細胞の活性は有意に低下した。

【要約】

- 1) ウロコを用いたアッセイ系は、磁場の骨芽・破骨細胞に対する作用を調べるのに有効である。
- 2) 破骨細胞及び骨芽細胞で特異的に発現している遺伝子を解析した結果、細胞の活性の変化と同様な変化が得られ、核レセプターよりも膜レセプターが磁場刺激に反応していた。さらに 30 mT の磁場を照射することにより、RANKL 及び RANK の発現が上昇していることがわかった。
- 3) 磁場刺激に対する反応性は破骨細胞の方が高く、まず破骨細胞の活性が低下する。次に、磁場強度が上がると、骨芽細胞が活性化され、破骨細胞も活性化させると考えられる。この結果は、ラットの頭蓋骨でも再現された。
- 4) 磁場照射したウロコにメラトニンを添加すると、骨芽細胞の活性は変化しなかったが、破骨細胞の活性は有意に低下した。

以上より、ウロコのシステムは磁場の骨形成を解析するシステムとして有効であり、ホルモンとの相乗効果により、治療効率を上げることができる可能性が示された。

引用文献

- Luben, R.A.: Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. *Health Phys.* 61: 15-28 (1991)
- Martin, T.J. and Seeman, E.: New

mechanisms and targets in the treatment of bone fragility. Clin. Sci. (Lond) 112: 77-91 (2007)

Miyakawa, T. et al.: Exposure of *Caenorhabditis elegans* to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses. Bioelectromagnetics 22: 333-339 (2001)

Suzuki, N. et al.: Nucleotide sequences of reptile calcitonins: their high homology to chicken calcitonin. Zool. Sci. 14:833-836 (1997)

Suzuki, N. et al.: Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler (seawater teleost). Peptides 21: 115-124 (2000)

Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. J. Pineal Res. 33: 253-258 (2002)

Teitelbaum, S.L.: Bone resorption by osteoclasts. Science 289: 1504-1508 (2000)

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 15 件)

- ① Thamamongood, T.A, Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N. and Hattori, A.: Expression of osteoblast-specific genes during spontaneous goldfish scale regeneration and role of cell-to-cell contact in controlling the onset of resorption/regeneration process found in intra-scalepocket autotransplantation of modified scales. Bone, 1240-1249 (2012) 査読有
- ② 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., (他 8 名): Cloning of two members of the calcitonin receptor family from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. Gene, 499: 90-95 (2012) 査読有
- ③ Suzuki, N., (他 19 名) : Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. Bone, 48: 1186-1193 (2011) 査読有

- 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) 査読有

- ⑤ Ikegami, 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) 査読有

- ⑥ 北村敬一郎, 中野 淳, 川部季美, 早川和一, 根本 鉄, 大嶋雄治, 島崎洋平, 服部淳彦, 鈴木信雄: 自動面積測定法によるキンギョのウロコを骨のモデルとしたアッセイ法の改良. 日本海域研究, 42, 27-34 (2011) 査読有

[学会発表] (計 22 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, Sunway Resort Hotel (Malaysia)
- ② 佐藤雄亮, 根本 鉄, 鈴木信雄, 矢野幸子, 服部淳彦, 北村敬一郎: キンギョの再生ウロコの *in vivo* および *in vitro* 系による機械的刺激の骨代謝への影響. 平成 23 年度生体医工学会北陸支部大会, 2011 年 12 月 10 日, 金沢大学サテライトプラザ (石川県)
- ③ 奈良雅之, 服部淳彦, 大西晃宏, 赤塚陽子, 鈴木信雄, 松田准一: 赤外・ラマン分光によるキンギョのウロコの状態分析. 医用分光学会, 2011 年 11 月 13 日, 島根大学 (島根県) (招待講演)
- ④ 鈴木信雄: 魚類のウロコにおけるホルモン及び物理的刺激 (磁場刺激) の応答. 日本歯科基礎医学会サテライトシンポジウム, 2011 年 9 月 30 日, 朝日大学 (岐阜県) (招待講演)
- ⑤ 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 23-25 日, 東京大学 (東京都)
- ⑥ 服部淳彦, 池亀美華, 矢野幸子, 鈴木信雄: 骨とメラトニン. 第 3 回抗加齢内分泌研究会学術集会, 2011 年 9 月 4 日, 鶴見大学会館, (神奈川県) (招待講演)
- ⑦ 鈴木信雄, 柿川真紀子, 山田外史, 田淵

圭章, 高崎一朗, 古澤之裕, 近藤 隆, 和田重人, 廣田憲之, 北村敬一郎, 岩坂正和, 服部淳彦, 上野照剛: 交流磁場の骨形成促進作用: 再生ウロコを用いた *in vivo* の解析. 平成 22 年度宇宙生物科学会, 2010 年 9 月 17-18 日, 東北大学 (宮城県)

- ⑧ 鈴木信雄: 磁場による骨形成作用: ウロコを用いた解析. バイオサイエンスシンポジウム, 2010 年 2 月 24 日, 金沢大学 (石川県) (招待講演)
- ⑨ 鈴木信雄: 魚のウロコをモデル系とした磁場の骨代謝に対する作用. 日本磁気科学会年会サテライトシンポジウム, 2009 年 11 月 12 日信州大学 (長野県) (招待講演)
- ⑩ 鈴木信雄, 柿川真紀子, 山田外史, 田淵圭章, 高崎一朗, 古澤之裕, 近藤 隆, 和田重人, 廣田憲之, 北村敬一郎, 岩坂正和, 服部淳彦, 上野照剛: 交流磁場の骨代謝に対する作用: 魚鱗を用いたモデル系による解析. 第 34 回日本比較内分泌学会大会, 2009 年 10 月 23 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- ⑪ Suzuki, N.: Development and application of a fish scale *in vitro* assay system: Fish scale is a suitable model for analysis of bone metabolism. 2009 Korea-Japan Joint Research Project Symposium. "Aging, Radiation and Environment", October 16, 2009, Pusan National University (Busan, Korea), (招待講演)
- ⑫ 鈴木信雄: 魚類のカルシウム代謝におけるウロコの生理学的役割: 副甲状腺ホルモンに対する作用. 宇宙生物科学会第 23 回大会, 2009 年 10 月 2 日, 筑波宇宙センター (茨城県)

[図書] (計 2 件)

- ① Suzuki, N. and Sakamoto, T.: Comparative and general aspects of calcium homeostasis and its hormonal regulations. In "Evolution of calcium homeostasis and its hormonal regulation in vertebrates". Suzuki, N. and Sakamoto, T., eds. Virtual special issues in Zoological Science, in press
- ② 服部淳彦, 田畑 純, 鈴木信雄: 第 3 章 親子判別. 『身近な動物を使った実験 4』, 鈴木範男編, 三共出版, 東京, 印刷中

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号: 60242476

(2) 研究分担者

山田 外史 (YAMADA SOTOSHI)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授

研究者番号: 80019786

田淵 圭章 (TABUCHI YOSHIAKI)

富山大学・生命科学先端研究センター・准教授

研究者番号: 20322109

和田 重人 (WADA SHIGEHITO)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号: 50303219