EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS ON OSTEOCLASTS AND OSTEOBLASTS OF TELEOST SCALES

メタデータ	言語: eng 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/2297/38993

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS ON OSTEOCLASTS AND OSTEOBLASTS OF TELEOST SCALES

（邦文）真骨魚類のウロコの破骨細胞及び骨芽細胞に対する環境汚染物質の影響

（氏名）谷内口　孝治

Abstract

Environmental pollution due to chemicals has become a major problem. For example, heavy metals and persistent organic pollutants have been accumulating in animals and higher up the food chain, causing toxicity. In the present study, therefore, both mercury and polychlorinated biphenyls (PCBs) as environmental chemical pollutants were noted, and their influence on osteoclasts and osteoblasts of the teleost scales was examined.

In goldfish (fresh water teleosts), mercury directly influenced osteoclasts and osteoblasts of the scales. TRAP activity as an osteoclastic marker in the scales significantly decreased with treatment of mercury in a shorter time than did ALP activity as an osteoblastic marker. In nibbler fish (marine teleosts) as well as goldfish, similar results were obtained. With a short time of incubation, osteoblasts may be resistant to mercury as a result of the production of metallothionein (MT), which plays a protective role in mercury-induced toxicity. Therefore, MT mRNA expression in the scales was examined by real-time PCR methods. As a result, MT mRNA expression in the scales of goldfish and nibbler fish was significantly increased with mercury treatment. Judging from these results, the activation of MT in osteoblasts may be involved in resistance to mercury.

In goldfish, on the other hand, the influence of PCB (118) on bone metabolism was examined both *in vivo* and *in vitro*. It was found that PCB (118) induced hypercalcemia, resulting from increasing osteoclastic activity in the scales *in vivo*. In an *in vitro* experiment, the data were reproduced, and osteoclastic marker mRNA expression and enzyme activity increased. In addition, mRNA expression of the receptor activator of the NF-κB ligand, which is an activation factor of osteoclasts, was promoted by PCB (118) treatment. Therefore, the present study demonstrates that PCB (118) promotes osteoclastogenesis in the scales and then induces hypercalcemia in goldfish.

Considering these results, thus, I conclude that the scale assay system is useful for analyzing the effects of environmental contaminants on bone metabolism, and I believe that the above findings regarding bone in fish are tied to an overall health issue for mammals in general.

１．　研究の背景と目的

近年、ダイオキシンやポリ塩化ビフェニル（PCB）、有機塩素系農薬など残留性有機汚染物質（POPs）が大きな問題になっている。これらの環境汚染物質は、長期間にわたり生物体内に蓄積されると、強く毒性を発する慢性毒性を有するだけでなく、内分泌攪乱作用を引き起こすものもある。さらに食物連鎖の上位に位置する動物に移行すると、生

物濃縮により高濃度の汚染となり、生物多様性や生態系に悪影響を及ぼすことになる。環境汚染物質の中では、カドミウムや水銀などの重金属も残留性が高く、生物濃縮を起こすことにより、深刻な汚染が引き起こされていることから、POPs 同様、次世代への影響も懸念されている。

難分解性の汚染物質による陸地への汚染がひとたび拡大すると、やがて大気や河川を経由して、海洋汚染へと拡散する。海洋汚染の 80%は陸地に由来すると考えられている。このように水圏への汚染拡大に伴い、大きな影響を受ける動物は魚類である。魚類は、脊椎動物の中で最大の動物群であり、最初に脊椎を持った動物でもある。硬骨魚には、石灰化した脊椎骨や肋骨のような内部骨格と、鰭条、ウロコのような外骨格がみられるが、放射性同位元素を用いた研究から、骨よりもウロコの方がより活発なカルシウムの貯蔵器官であることが認められている。つまり、硬骨魚類のウロコは、ヒトの骨と同じようなカルシウム調節を行っている。

重油の汚染海水により魚の奇形（脊柱湾曲）が引き起こされるが、骨の細胞に対する直接的な影響は不明である。また、ダイオキシンや PCB によって、マウスの頸骨の石灰化に低下がみられるが、仕組みはよく分かっていない。そこで、破骨細胞や骨芽細胞が共存するシシンプルな骨のモデルとされているウロコを用いることで、環境汚染物質の骨に対する影響を詳細に解明できる可能性が高いと考えられる。

本研究では、対象とする環境汚染物質して、POPs の一種である PCB と、重金属の水銀を選定した。いずれも毒性が高く、難分解性で生体内に蓄積性があり、生物濃縮を起こしている。世界的にも深刻な汚染実態のあるこの２種類の汚染物質が、魚類の骨代謝に関係する破骨細胞と骨芽細胞にどのような影響を与えるのか究明することを本研究の目的とする。

２．研究内容

２－１）　淡水硬骨魚（キンギョ）の破骨細胞と骨芽細胞に対する無機水銀の影響

淡水硬骨魚を実験材料に、破骨細胞及び骨芽細胞の特異的マーカー酵素及び遺伝子を用いて無機水銀の影響を解析した。

【実験方法】

MS-222 で麻酔した淡水硬骨魚のキンギョ（*Carassius auratus*）からウロコを採取し、$HgCl_2$（InHg）（10^{-8}～10^{-3}M）を添加した L-15 培地（pH 7.0）で 6 時間培養（曝露）を行った。その後、破骨細胞のマーカー酵素として、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP）活性、骨芽細胞のマーカー酵素として、アルカリ性フォスファターゼ（ALP）活性を測定した。続いて、InHg（10^{-7}～10^{-4}M）を加えて、18、36、64 時間培養を行い、同様にマーカー酵素の活性を測定した。次に、InHg（10^{-4} M）を添加した培地で 18 時間

培養後、total RNA isolation kit を用いて Total RNA を抽出し、RT-PCR により TRAP とカテプシン K、IGF-1、メタロチオネイン（MT）などの mRNA 発現の変化を調べた。

【実験結果及び考察】

6 時間の培養実験では、破骨細胞に対する InHg の抑制作用は、10^{-5}～10^{-3}M 濃度でみられた（Fig. 1）。さらにマーカー遺伝子の変化を調べた結果、TRAP の酵素活性の低下と同様、TRAP とカテプシン K の両方の mRNA 発現が減少したことを確認できた。したがって、InHg が破骨細胞の活性を抑制していることを、タンパク質レベルと遺伝子レベルで証明したことになる。

一方、6 時間の培養では、ALP 活性には影響が認められなかった。次に、18、36、64 時間培養を行い、ALP の変化を調べた結果、36、64 時間培養で活性の低下が認められた。なお、MT の mRNA の発現が増加していたので、短期間の培養では、骨芽細胞は MT を産生することにより、InHg に対する耐性を持っている可能性がある。しかし、骨芽細胞のマーカーである IGF-1 mRNA 発現は低下し、長時間の培養では骨芽細胞の活性が低下したと考えられる（Fig.2）。

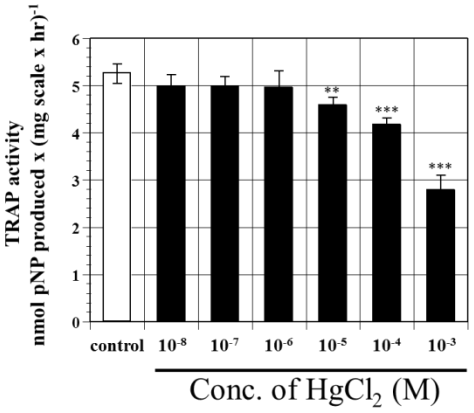

Fig. 1 Effect of $HgCl_2$ (10^{-8} to 10^{-3} M) on TRAP activity in the cultured scales incubated for 6 hrs. **, *** indicate statistically significant differences at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, from the value in the control scales.

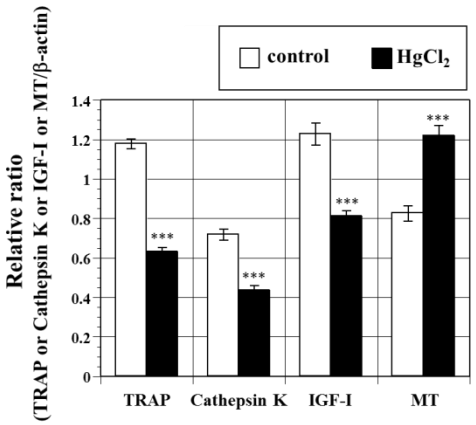

Fig.2 Changes in the mRNA expression of TRAP, cathepsin K, IGF-1, and MT in $HgCl_2$ (10^{-4} M)-treated scales of goldfish incubated for 18 hrs of culture. *** indicates statistically significant difference at $p < 0.001$ from the values in the control scales.

２－２）海水硬骨魚（メジナ）の破骨細胞と骨芽細胞に対する無機水銀と有機水銀の影響

海水硬骨魚のウロコを使って、新たな *in vitro* 評価システムの開発を行った。このシステムを用いて、無機水銀（$HgCl_2$：InHg）と有機水銀（CH_3HgCl：MeHg）の破骨細胞や骨芽細胞に対する影響を調べた。

【実験方法】

海水硬骨魚のメジナ（*Girella punctata*）を実験材料として用い、2-フェノキシエタノール（0.004%）で麻酔してウロコを採取した。この時、およそ同じ大きさのウロコを採取

し、ウロコの面積あたりのTRAPやALP活性が同じ活性を持つウロコを探索した。同時に、破骨細胞と骨芽細胞の共存状態の形態学的な観察も行った。次に、ほぼ同じTRAPとALP活性を持つウロコを用いて、InHgとMeHgをそれぞれ添加した培地で、6, 18及び36時間培養を行い、InHgとMeHgとの作用を比較した。

遺伝子発現の実験に際し、まず、RNA抽出キット（NucleoSpin RNA Ⅱ、タカラバイオ社）を使って全RNAを調製し、cDNAはPrimeScriptTM RT試薬キット（タカラバイオ社）を用いて合成した。その後、既に報告されている動物群の配列に基づきプライマーを設計して、TRAP、タイプ1コラーゲンα1（COL1A1）及びMTをクローニングした。続いて、これらの配列に基づき特異的なプライマーを用いて、リアルタイムPCR法でmRNAの変化を調べた。

【実験結果及び考察】

メジナのウロコを採取し、ウロコの面積あたりのTRAPやALP活性がほぼ同じになるようなウロコの位置を探した結果、１行のウロコの中では、隣同士は活性が非常に近いことが判明した。そこで、ウロコを交互に分けて、2 群（対照群と実験群）を設定した（Fig. 3）。さらに、形態学的な観察により、ウロコの溝条の部位において、破骨細胞と骨芽細胞の共存が観察された。

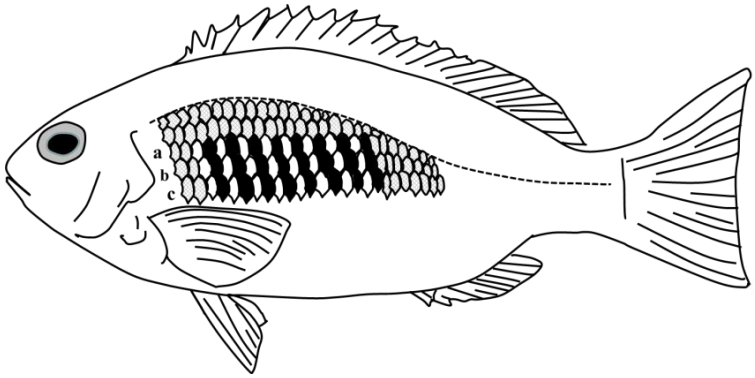

Fig. 3 Location of the scales used in the present study. In nibbler fish, we chose the line of scales of approximately the same size. In each line, the removed scales were separated in two groups, a control group and an experimental group. The scales of group 1 are shown in white; the other scales (group 2) are indicated in black.

InHgとMeHgのメジナの培養ウロコに対する作用を比較すると、TRAP活性は、6時間培養でInHg（10^{-5}～10^{-4} M）処理によって有意に減少した。また、MeHgにおいても6時間培養でTRAP活性が有意に低下した（10^{-6}～10^{-4} M）（Fig.4）。一方、InHgとMeHgのALP活性に対する作用を調べた結果、6時間の培養では変化がなかった。しかし、18時間や36時間の培養では、InHg及びMeHgともにALPの活性が低下した。InHg及びMeHgに対する酵素活性の応答性は、いずれも海水硬骨魚のメジナの方が淡水硬骨魚のキンギョの結果と比較して低い傾向にあった。この結果は、淡水魚の方が海水魚より低いカルシウム環境に生息しているため、淡水硬骨魚のウロコの方が、カルシウム代謝に重要な働きをしている

ことと一致する。

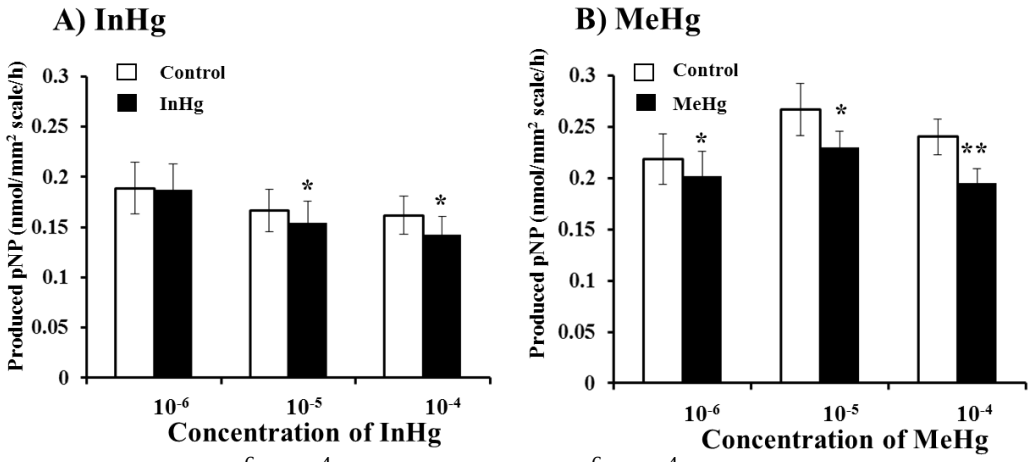

Fig. 4 Effect of InHg (10^{-6} to 10^{-4} M) (A) and MeHg (10^{-6} to 10^{-4} M) (B) on TRAP activity in the cultured scales at 6 hrs. * and ** indicate statistically significant difference at $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively, from the values of the control scales (n = 6 samples; one sample from one fish).

マーカー遺伝子の mRNA 発現解析から、6 時間の培養では骨芽細胞のマーカーである COL1A1 の mRNA 発現が変わらなかったが、InHg と MeHg で処理したウロコにおける TRAP mRNA の発現は有意に低下し、MT mRNA の発現は上昇していた。この結果は、淡水硬骨魚類のキンギョにおける結果と一致する。6 時間の培養で、骨芽細胞は MT を作ることにより、水銀に対する耐性を得ている可能性がある。

このように破骨細胞と骨芽細胞の関連性がみられる実験結果より、両細胞を同時に行う培養実験は、水銀の骨代謝に対する作用を評価する上で必要である。しかし、破骨細胞と骨芽細胞の共存培養は、特に破骨細胞の取扱いが困難なため容易ではない。そこで本研究では、海水硬骨魚を用いたウロコの *in vitro* 分析システムの開発を行った。このシステムにより、破骨細胞と骨芽細胞の活性を同時に調べることができ、さらに、メジナのウロコから TRAP と COL1A1、MT のクローニングも行うことができ、遺伝子発現解析も可能になった。したがって、本研究で開発された *in vitro* の分析システムは、重金属の骨に対する作用を調べるのに有用であると思われる。

２－３）　キンギョ（淡水硬骨魚）の骨代謝に対する PCB の影響

キンギョを用いて、PCB の骨代謝に対する作用を *in vivo* 及び *in vitro* の両面から調べた。

【実験方法】

淡水硬骨魚のキンギョ（*Carassius auratus*）を実験材料として用いた。*in vivo* の実験では、PCB（118）の腹腔内投与を行い、血液中の Ca 濃度、ウロコの破骨細胞及び骨芽細胞の活性を測定した。すなわち、キンギョを MS-222 で麻酔して、イニシャルの採血をした。その後、麻酔したキンギョの腹腔に PCB 溶液（10 ppm ジメチルスルホキシド（DMSO）溶液）を 10 µl / body weight (g) の割合で投与し、1 および 2 日後にウロコを採取した。2 日後にはファイナルの採血も行い、血漿中の Ca 濃度やウロコの TRAP および ALP 活性を測定した。

in vitro の実験では、PCB-118 を 0.025, 0.25 及び 2.5 ppm の PCB（118）を添加した培地（L-15 培地、ギブコ）でウロコの培養を 6 及び 18 時間行った後、TRAP および ALP 活性を測定した。18 時間培養後にマーカー遺伝子として、破骨細胞に特異的なカテプシン K と TRAP を、骨芽細胞の特異的な遺伝子として、Receptor Activator of NF-κB Ligand（RANKL）を解析した。それぞれの遺伝子における mRNA レベルは、リアルタイム PCR により調べ、β-アクチンにより標準化された。

【実験結果及び考察】

in vivo の実験により、PCB(118)は破骨細胞の活性を上昇させ、血液中の Ca 濃度を上げることがわかった（Fig.5）。さらに TRAP 活性が上昇することも判明した。

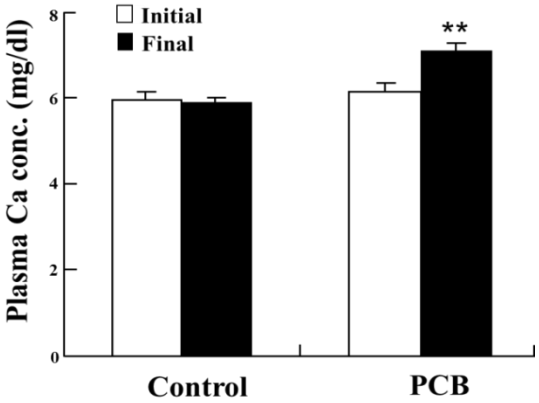

Fig. 5 Effects of PCB (118) injection on plasma calcium level (mg/100 ml) in goldfish. Each column and the vertical line represent the mean±SEM (n = 10 samples; one sample from one fish). ** indicates statistically significant difference at $p < 0.01$ from the values in the control.

in vitro 実験における 6 時間培養の結果を Fig 6 に示す。TRAP 活性は 6 時間培養で 0.25 ppm、また、18 時間培養では、全ての濃度で有意差が認められた。ALP 活性は 6 及び 18 時間培養において

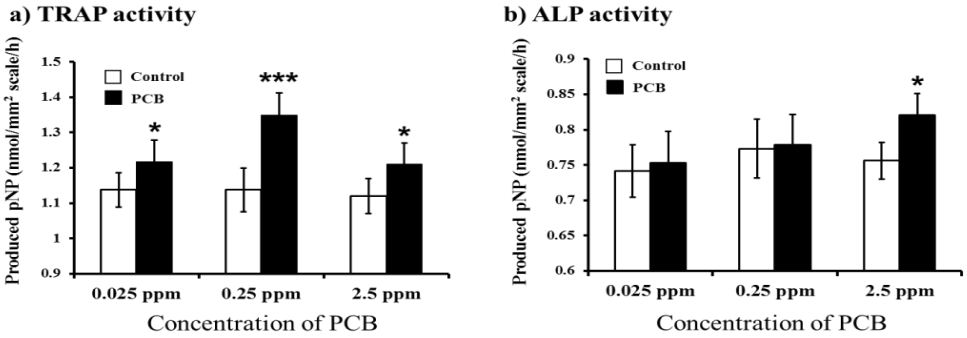

Fig. 6 Effects of PCB (118) administration on TRAP (a) and ALP (b) activities in the scales of goldfish at the 18 h of incubation. Each column and the vertical line represent the mean ± SEM (n = 10 samples; one sample from one fish). * and *** indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively, from the values in the control.

て、最も高い濃度である 2.5 ppm のみで有意に上昇した。これらの結果から、*in vivo* 及び *in vitro* 実験において、PCB(118)は破骨細胞の活性を上昇させることが明らかになり、破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP とカテプシン K の mRNA 発現も有意に上昇することもわかった。さらに、

RANKL の mRNA 発現が PCB（118）で処理することにより上昇しており、RANK-RANKL 経路で破骨細胞形成を促進させる可能性も示すことができた。

以上のことから、本研究で初めて、PCB(118)が魚の破骨細胞を活性化させ、その結果として、血液中の Ca 濃度を上昇させ、魚の骨代謝を撹乱していることを明らかにした。今後、海産硬骨魚類のメジナに対する PCB(118)の作用を調べていく予定である。

３． まとめ

１． ウロコを用いた *in vitro* 分析システムにより、破骨細胞と骨芽細胞が共存する状態で、淡水硬骨魚（キンギョ）の破骨細胞と骨芽細胞に対する無機水銀の直接的な影響を証明することができた。さらに、骨芽細胞はメタロチオネインを産生することにより、水銀の解毒をしている可能性も示すことができた。

２． 海水硬骨魚（メジナ）のウロコを用いた *in vitro* 分析システムを開発できた。このシステムを用いて、海水硬骨魚の破骨細胞及び骨芽細胞に対する無機水銀と有機水銀の影響を比較した結果、破骨細胞の方が水銀に対する応答性がよく、骨芽細胞よりも短時間の培養で活性が低下することが明らかになった。このシステムは今後とも重金属の骨代謝に対する効果を調べる上で有効な手段となると思われる。

３． PCB（118）の破骨細胞と骨芽細胞に対する作用を淡水硬骨魚（キンギョ）を用いて解析した。*in vivo* と *in vitro* の実験から、PCB（118）は破骨細胞の活性を高め、その結果として血中 Ca 濃度が上昇することが分かった。さらに、RANK-RANKL 系が関与して、破骨細胞が活性化している可能性も示すことができた。

学位論文審査報告書（甲）

1．学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS ON OSTEOCLASTS AND OSTEOBLASTS OF TELEOST SCALES

真骨魚類のウロコの破骨細胞及び骨芽細胞に対する環境汚染物質の影響

2．論文提出者　(1) 所　　属　生命科学　専攻　生物多様性動態学　講座

(2) 氏　　名　谷内口　孝治（やちくち　こうじ）

3．審査結果の要旨（600～650 字）

谷内口氏は、環境汚染物質の中でも難分解性で蓄積性のある水銀と PCB に注目して、魚類の骨代謝に対する作用を解析した。これまで、魚の骨代謝の影響を調べるには、*in vivo* の実験が多く、骨芽細胞と破骨細胞に対する直接的な作用を解析する手段がなかった。そこで谷内口氏は、魚類のウロコに注目して実験を行った。ウロコには骨芽細胞と破骨細胞が共存しており、骨のモデルとして使用可能である。まず最初に、淡水魚のキンギョのウロコを用いて、水銀の作用を解析した。その結果、水銀は破骨細胞に対して応答性がよく、短時間で活性が抑制されるが、骨芽細胞は比較的長時間培養しないと、影響が出ないことがわかった。この骨芽細胞に対する水銀の作用を調べるために、谷内口氏は水銀の解毒に関与しているタンパク質（メタロチオネイン）を解析して、メタロチオネイン mRNA の発現が水銀で処理すると上昇することを明らかにした。さらに水銀は、海産魚のメジナのウロコにおいても、キンギョと同様に作用することも証明できた。一方、PCB の骨代謝に対する作用をキンギョ（*in vivo*）で解析した。その結果、PCB はキンギョの破骨細胞の活性を上昇させることにより、血液中のカルシウム濃度が上昇することが判明した。さらに、*in vivo* の結果の再現性を調べるため、ウロコの系（*in vitro*）で解析した結果、破骨細胞の活性化を証明できた。以上の内容を、2 報の査読付き、英文誌に First author として投稿して、既に受理されており、学位に値すると判断された。

4．審査結果　(1) 判　　定（いずれかに○印）　合　格　・　不合格

(2) 授与学位　博　士（理学）