

宇宙で引き起こされる疾病のインドール化合物による予防・治療効果に関する研究：小型衛星搭載魚鱗を用いた解析

鈴木 信雄 (金沢大), 平山 順 (文教大), 高橋 昭久 (群馬大), 小林 功 (金沢大), 小林 静静 (金沢大), 黒田 康平 (金沢大), 瀧野 晴美 (金沢大), 福島 夢翔 (金沢大), 廣瀬 匡 (金沢大), 保田 夏野 (群馬大), 福井 竜士 (群馬大), 木村-須田 廣美 (千歳科技大), 村尾 美羽 (千歳科技大), 池田 わたる (IDDK), 上野 宗一郎 (IDDK), 田淵 圭章 (富山大), 古澤 之裕 (富山県大), 池亀 美華 (岡山大), 本田 匡人 (金沢大), 遠藤 雅人 (海洋大), 丸山 雄介 (立教大), 松原 創 (金沢大), 中野 貴由 (大阪大), 三島 弘幸 (東京大), 染井正徳 (金沢大), 加藤 晴康 (立教大), 関 あずさ (ふくしま医療機器開発支援センター), 鷹尾 伸一 (SPACEAGENT), 茶谷昌宏 (昭医大), 永松 愛子 (JAXA), 橋本博文 (JAXA), 矢野 幸子 (JAXA), 服部 淳彦 (立教大)

Study on the preventive and therapeutic effects of indole compounds against space-related diseases: An analysis using fish scales onboard a satellite

Nobuo Suzuki^{1*}, Jun Hirayama², Akihisa Takahashi³, Isao Kobayashi¹, Jingjing Kobayashi-Sun¹, Kouhei Kuroda¹, Harumi Takino¹, Yumeto Fukushima¹, Tasuku Hirose¹, Natsuno Yasuda³, Tatsuhito Fukui³, Hiromi Kimura-Suda⁴, Miu Murao⁴, Wataru Ikeda⁵, Soichiro Ueno⁵, Yoshiaki Tabuchi⁶, Yukihiko Furusawa⁷, Mika Ikegame⁸, Masato Honda¹, Masato Endo⁹, Yusuke Maruyama¹⁰, Hajime Matsubara¹, Takayoshi Nakano¹¹, Hiroyuki Mishima¹², Masanori Somei¹, Haruyasu Kato¹⁰, Azusa Seki¹³, Shinichi Takao¹⁴, Masahiro Chatani¹⁵, Aiko Nagamatsu¹⁶, Hirofumi Hashimoto¹⁶, Sachiko Yano¹⁶, Atsuhiko Hattori¹⁰

¹Kanazawa University, ²Bunkyo University, ³Gunma University, ⁴Chitose Institute of Science and Technology, ⁵IDDK, ⁶University of Toyama, ⁷Toyama Prefectural University, ⁸Okayama University, ⁹Tokyo University of Marine Science and Technology, ¹⁰Rikkyo University, ¹¹The University of Osaka, ¹²The University of Tokyo, ¹³Fukushima medical Device Industry promotion Agency, ¹⁴SPACEAGENT Co. Ltd., ¹⁵Showa Medical University, ¹⁶Japan Aerospace Exploration Agency
E-Mail: nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp

Abstract:

The space environment is known to induce various pathophysiological changes in astronauts, including bone demineralization. Using an *in vitro* bone tissue model based on goldfish scales, our spaceflight experiment (the Fish Scales Project) aboard the International Space Station (ISS) revealed a significant reduction in melatonin levels under spaceflight conditions. This result suggests that microgravity inhibits melatonin synthesis in osteoblasts and may contribute to the osteoporosis-like bone loss observed during long-duration missions.

Moreover, gene expression analyses revealed that melatonin suppressed space radiation-induced expression of genes associated with DNA repair and oxidative stress responses, thereby enhancing cell survival. These findings indicate that melatonin has the potential to serve as a pharmacological countermeasure against spaceflight-induced pathophysiological changes and to protect astronauts from space radiation, contributing to the safety of future long-term human space exploration.

In the present study, we confirmed that melatonin acts on osteoblasts, osteoclasts, and the calcified matrix of goldfish scales even when cultured at low temperature. In addition to melatonin, we demonstrated that 5-methoxytryptophan and 1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin activate osteoblasts and suppress osteoclasts in goldfish scales. It has also been proposed that an automated cell culture system using twelve 24-well plates could be utilized for space experiments on the ISS. We will therefore investigate the additive and synergistic effects of melatonin and these compounds on the cellular and molecular components of bone tissue using goldfish scales.

To enable space experiments using small commercial satellites, we are planning to conduct experiments under low-temperature culture conditions using original equipment developed in the previous fiscal year to maintain zebrafish scales appropriately in the satellite environment.

Through these investigations, we aim to assess the risks associated with human exploration of the Moon and Mars, as well as long-term habitation in space, and to contribute to the development of preventive and therapeutic strategies targeting bone health.

Key words: Space experiment with satellite, Fish scales, Bone metabolism, Space radiation, Melatonin, Indole compounds, Low temperature culture conditions

1. はじめに

国際宇宙ステーション (ISS) において約 1 年に及ぶ長期滞在が可能となり、月や火星への有人探査、さらには民間人による宇宙旅行も現実味を帯びてきている。一方で、宇宙滞在期間の長期化に伴い、微小重力や宇宙放射線などの宇宙環境が人体に及ぼす影響は増大し、骨、筋、免疫系をはじめとする多様な組織・臓器に障害が生じることが懸念されている。そのため、これらの影響を的確に評価するとともに、有効な予防・治療薬の開発が不可欠である。

2030 年に予定されている ISS 運用終了後の月・火星探査や、将来的な宇宙居住の実現に向けては、宇宙環境が人体に及ぼすリスクの評価およびその克服を目的とした予防・治療戦略の確立が喫緊の課題となっている。

本研究では、1) メラトニンを添加した培地で培養したキンギョのウロコを用いた宇宙実験のこれまでの成果を概説するとともに、今後の宇宙実験の計画として、2) キンギョおよびゼブラフィッシュを用いた低温培養実験の研究成果、3) 低温培養時のメラトニン添加の破骨細胞および骨基質への影響評価、4) 人工衛星を利用した宇宙実験用機器の開発について報告する。さらに、5) メラトニンとの相加的・相乗的効果が期待されるインドール化合物の作用についても述べる。

2. メラトニンを用いた宇宙実験の成果

①魚類のウロコの特長

魚類のウロコは、直接化骨を行う点において、哺乳類の頭蓋骨などにみられる膜性骨と類似している。ウロコは主に、I 型コラーゲンからなる線維層と、I 型コラーゲンおよびヒドロキシアパタイトから構成される石灰化層の二層構造を有する。さらに、石灰化層の表面には骨芽細胞と破骨細胞が共存しており (Figure 1)、添加的石灰化による骨形成および破骨細胞による骨吸収が恒常的に行われている^{1,2)}。

近年、我々はウロコ中に骨細胞のマーカーであるスクレオスチン陽性細胞が存在することを見出し、電子顕微鏡観察により、これらが骨細胞様の形態を有する細胞であることを同定した³⁾。さらに、スクレオスチンが関与するシグナル経路である Wnt シグナルが、宇宙空間の微小重力環境に応答して抑制されることも明らかにしている⁴⁾。

以上のことから、魚類のウロコにはヒトの骨を構成する主要な細胞および基質成分がすべて備わっており、骨代謝研究に適したコンパクトな骨モデルであるといえる。

上述で説明したキンギョのウロコを用いて、宇宙実験 (Fish Scales) を実施した。その研究成果を国際誌³⁻⁸⁾に発表してきた。その研究成果として、メ

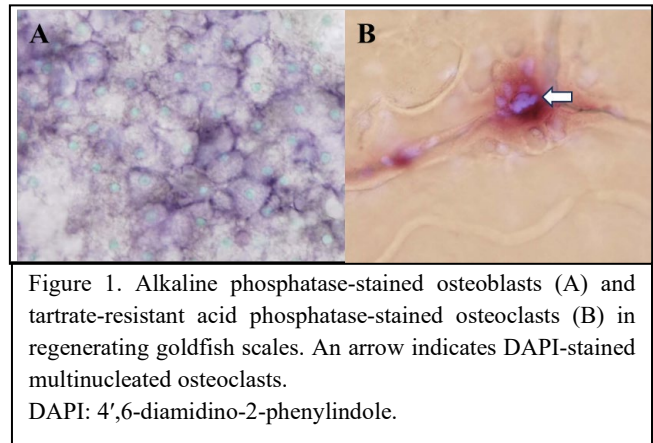


Figure 1. Alkaline phosphatase-stained osteoblasts (A) and tartrate-resistant acid phosphatase-stained osteoclasts (B) in regenerating goldfish scales. An arrow indicates DAPI-stained multinucleated osteoclasts.

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

ラトニンによる骨吸収抑制作用及び宇宙放射線の防御機構を以下に示す。

②骨芽細胞で作られるメラトニンによる新規骨吸収抑制作用

宇宙空間において活性化された破骨細胞は、メラトニンの添加により、その活性が抑制されることがわかった。破骨細胞のマーカー遺伝子であるマトリックスメタロプロテアーゼ 9 やカテプシン K は、微小重力下でその発現が上昇するが、メラトニンを添加すると Flight-1G のレベルまで発現量が低下することが判明した。

メラトニンの受容体は破骨細胞に存在するので、直接的に破骨細胞に作用する⁹⁾。我々は、メラトニンは骨芽細胞にも作用することから、骨芽細胞で作られる骨吸収抑制作用を持つホルモンであるカルシトニン¹⁰⁾に注目した。メラトニンは、破骨細胞の活性を抑制するホルモンであるカルシトニンの骨芽細胞からの分泌を促進させる新規機構もあることを証明した⁶⁾。さらにメラトニンは、破骨細胞を活性させる因子である *rankl* の発現と、骨芽細胞から分泌されるカルシトニンの発現を共に抑制することも明らかになった⁶⁾。

③メラトニンの宇宙放射線の防御作用^{5,7)}

宇宙空間及び地上で培養したキンギョのウロコの *de novo* トランスクリプトーム解析を行い、メラトニンの影響を調べた。その結果、宇宙空間で *hsp* 関連遺伝子 (*dnaja1*, *dnajb1*, *hspd1* など) が上昇することがわかった。上昇したこれらの遺伝子発現は、メラトニンにより抑制されることがわかった。さらに *bcl3* や *bcl11b* などの抗アポトーシス *bcl* ファミリー遺伝子は宇宙空間で低下したが、低下した *bcl* ファミリー遺伝子の発現は、メラトニン処理により回復することも証明することができた。

3. キンギョ及びゼブラフィッシュのウロコの低温培養の研究成果

キンギョは、冬季に氷が張った池の中でも活発に泳ぎ回る。そこで、キンギョのウロコは低温で保管

できると考えて、2010年に実施した宇宙実験では、日本でウロコをパッキングして、NASAに低温(4°C)で保管して輸送した。その後、スペースシャトルアトランティス号で打ちあげて、国際宇宙ステーション(ISS)で培養するまでの間(6日間)、4°Cで保管した。4°Cで保管後、22°Cで86時間培養して、前述の研究成果を得た実績がある⁹⁾。一方、ゼブラフィッシュのウロコは、熱帯魚であることから、4°Cでは保管できず、12°Cで保管できることが判明した。そこで、小型衛星あるいはISSを用いた宇宙実験では、キンギョのウロコは4°C、ゼブラフィッシュのウロコは12°Cで保管した実験を考えている。

4. ウロコの低温培養時におけるメラトニンの影響評価

キンギョのウロコを4°Cで1週間培養して、培養前後の細胞活性及び形態学的な解析も行い、1週間の保管により、細胞活性を保ちながら加重力応答することも明らかにした¹¹⁾。メラトニンの応答も調べた結果、4°Cという低温での培養下においても、キンギョのウロコは応答して、破骨細胞の活性を抑制することもわかった。さらに、キンギョのウロコの骨基質を解析した結果、メラトニンはウロコの石灰化を促す傾向にあることもわかった。

5. 小型衛星を用いた宇宙実験用のウロコの培養装置の開発

蛍光標識したゼブラフィッシュのウロコの骨芽細胞および破骨細胞^{12,13)}を検出する目的で、(株)IDDKは半導体ベースの顕微鏡観察技術MID(マイクロイメージングデバイス)を主幹技術とした1U以下の小型衛星に搭載可能なオートメーションバイオ実験装置を開発し、提携先の小型衛星ペイロードサービスを利用した宇宙バイオ実験プラットフォームの構築を進めている。

小型衛星を活用した宇宙実験を実施するためには、電源の無い状態でウロコを一定の温度で保温する装置の開発が不可欠である。そこで宇宙空間でウロコを培養(28°C)する前(サンプル輸送も含む)まで低温(12°C)でウロコの保管が可能な装置を開発中である。この装置を用いたウロコの培養実験を行い、小型衛星を用いた宇宙実験を実現していきたい。

6. 5MTPおよびBr-Melの骨代謝に及ぼす作用

松果体に存在するインドール化合物の破骨細胞及び骨芽細胞に対する作用を調べた結果、5-methoxytryptophan(5MTP)(Figure 2)のみが破骨細胞の活性を抑制して、骨芽細胞の活性を上昇させることが判明した。

さらに新規化合物を含む様々なインドール化合物(2-bromomelatonin, 2,4,6-tribromomelatonin,

1-allyl-2,4,6-tribromomelatonin,

1-propargyl-2,4,6-tribromomelatonin, 1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin,

2,4,6,7-tetrabromomelatonin)

の作用をキンギョのウロコのバイオアッセイ系を用いて調べた。その結果、これらのインドール化合物は破骨細胞に対する阻害作用を示した¹⁴⁾。特に、1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin

(BTBM)(Figure 3)

はメラトニンよりも強い活性を示した¹⁴⁾。BTBM(100 pM)は、6時間のインキュベーション後も破骨細胞の活性を抑制した。骨芽細胞に関しては、メラトニンは骨芽細胞の活性を阻害したが、プロモメラトニン誘導体はすべて骨芽細胞活性を促進させた。その中でもBTBMの作用は強く、1 nMの濃度でも骨芽細胞活性を上昇させた¹⁴⁾。

今後、5MTPおよびBTBMとメラトニンとの相加・相乗効果を調べていき、宇宙空間で進行する骨疾患の治療薬の開発を実施していきたい。

参考文献

- 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) Thamamongood, T.A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N. and Hattori, A.: Expression of osteoblastic and osteoclastic genes during spontaneous regeneration and autotransplantation of goldfish scale: A new tool to study intramembranous bone regeneration. *Bone*, **50**, 1240-1249 (2012).
- 3) Yamamoto, T., Ikegame, M., Hirayama, J., Kitamura, K., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Sekiguchi, T., Endo, M., Mishima, H., Seki, A., Yano, S., Matsubara H., Hattori, A. and Suzuki, N.: Expression of sclerostin in the regenerating scales of goldfish and its increase under microgravity during space flight. *Biomed. Res. (Tokyo)*, **41**,

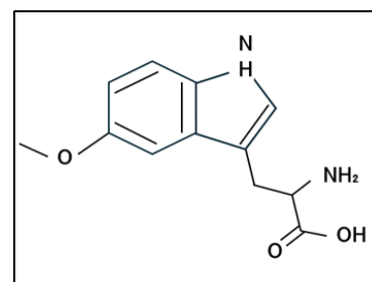


Figure 2. Chemical structure of 5-methoxytryptophan

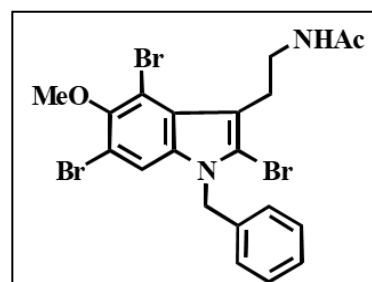


Figure 3. Chemical structure of 1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin

- 279-288 (2020).
- 4) Yamamoto, T., Ikegame, M., Furusawa, Y., Tabuchi, Y., Hatano, K., Watanabe, K., Kawago, U., Hirayama, J., Yano, S., Sekiguchi, T., Kitamura, K., Endo, M., Nagami, A., Matsubara, H., Maruyama, Y., Hattori, A., and Suzuki, N.: Osteoclastic and osteoblastic responses to hypergravity and microgravity: Analysis using goldfish scales as a bone model. *Zool. Sci.*, **39**, 388-396 (2022).
 - 5) Hirayama, J., Hattori, A., Takahashi, A., Furusawa, Y., Tabuchi, Y., Shibata, M., Nagamatsu, A., Yano, S., Maruyama, Y., Matsubara, H., Sekiguchi, T. and Suzuki, N.: Physiological consequences of space flight, including abnormal bone metabolism, space radiation injury, and circadian clock dysregulation: Implications of melatonin use and regulation as a countermeasure. *J. Pineal Res.*, **74**, e12834 (2023).
 - 6) Ikegame, M., Hattori, A., Tabata, M.J., Kitamura, K., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Maruyama, Y., Yamamoto, T., Sekiguchi, T., Matsuoka, R., Hanmoto, T., Ikari, T., Endo, M., Omori, K., Nakano, M., Yashima, S., Ejiri, S., Taya, T., Nakashima, H., Shimizu, N., Nakamura, M., Kondo, T., Hayakawa, K., Takasaki, I., Kaminishi, A., Akatsuka, R., Sasayama, Y., Nishiguchi, T., Nara, M., Iseki, H., Chowdhury, V.S., Wada, S., Ijiri, K., Takeuchi, T., Suzuki, T., Ando, H., Matsuda, K., Somei, M., Mishima, H., Mikuni-Takagaki, Y., Funahashi, H., Takahashi, A., Watanabe, Y., Maeda, M., Uchida, H., Hayashi, A., Kambegawa, A., Seki, A., Yano, S., Shimazu, T., Suzuki, H., Hirayama, J. and Suzuki, N.: Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight. *J. Pineal Res.*, **67**, e12594 (2019).
 - 7) Furusawa, Y., Yamamoto, T., Hattori, A., Suzuki, N., Hirayama, J., Sekiguchi, T. and Tabuchi, Y.: De novo transcriptome analysis and gene expression profiling of fish scales isolated from *Carassius auratus* during space flight: An impact of melatonin on the gene expression in response to space radiation. *Mol. Med. Rep.*, **22**, 2627-2636 (2020).
 - 8) Hattori, A., and Suzuki, N.: Receptor-mediated and receptor-independent actions of melatonin in vertebrates. *Zool. Sci.*, **41**, 105-116 (2024).
 - 9) Igarashi-Migitaka, J., Seki, A., Ikegame, M., Honda, M., Sekiguchi, T., Mishima, H., Shimizu, N., Matsubara, H., Srivastav, A.K., Hirayama, J., Maruyama, Y., Kamijo-Ikemori, A., Hirata, K., Hattori, A. and Suzuki, N.: Oral administration of melatonin contained in drinking water increased bone strength in naturally aged mice. *Acta Histochem.*, **122**, 151596 (2020).
 - 10) Kuroda, K., Hatano, K., Kawamura, R., Fukushima, A., Sasayama, Y., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Ikegame, M., Hattori, A., Hirayama, J., Fukuda, T., Uekura, S., Matsubara, H., Kawago, U., Sekiguchi, T., Srivastav, A.K. and Suzuki, N.: Possible involvement of Calcitonin I and II in calcium metabolism of the female reproductive physiology of goldfish (*Carassius auratus*). *Int. Aquat. Res.*, **15**, 15-26 (2023).
 - 11) Suzuki, N., Kuroda, K., Ikegame, M., Takino, H., Tsunoda, K., Izumi, R., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Yachiguchi, K., Endo, M., Matsubara, H., Yano, S., Shimazu, T., Honda, M., Maruyama, Y., Watanabe, K., Takahashi, A., Hirayama, J. and Hattori, A.: Goldfish regenerated scale culture at low temperatures improves osteoblast and osteoclast survival in scales without loss of the osteoblast and osteoclast response to changes in gravity. *Life Sci. Space Res.*, **46**, 128-136 (2025).
 - 12) Kobayashi-Sun, J., Kondo, M., Yamamori, S., Kuroda, J., Ikegame, M., Suzuki, N., Kitamura, K., Hattori, A., Yamaguchi, M. and Kobayashi, I.: Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale. *Com. Biol.*, **3**, 190 (2020).
 - 13) Kobayashi-Sun, J., Suzuki, N., Hattori, A., Yamaguchi, M. and Kobayashi, I.: Melatonin suppresses both osteoblast and osteoclast differentiation through repression of epidermal Erk signaling in the zebrafish scale. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **530**, 644-650 (2020).
 - 14) Suzuki, N., Somei, M., Kitamura, K., Reiter, R.J. and Hattori, A.: Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: Implications for the treatment of bone diseases. *J. Pineal Res.*, **44**, 326-334 (2008).