

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討

所属 埼玉医科大学第四内科
研究者 和田 誠基

要旨

末梢血単核球をRANKLとM-CSFを用いて破骨細胞へ分化させカルシトニンCTの効果を検討した。CTはCT受容体数、mRNA発現を低下させ、グルココルチコイドGCは受容体発現を増大させた。GCとCTの併用がある種の病態で有益と考えられた。

1. 研究目的

近年急激に進む高齢化によりquality of lifeを障害する骨粗鬆症が社会問題化し、治療法と予防法の確立が社会的要請の極めて高い医学的課題となっている。ごく最近血液幹細胞から破骨細胞への分化誘導には破骨細胞分化誘導因子（RANKL）とマクロファージ・コロニー刺激因子（M-CSF）が必須であることが示され、これら因子を利用して健常者末梢血単核球からヒト破骨細胞をin vitroで樹立でき種々の薬剤の効果をヒトの標的細胞で直接検討できるようになった。種々の薬剤が骨作用を期待され臨床応用されている。中でもカルシトニン(CT)製剤は高Ca血症、骨粗鬆症に用いられるが、連続使用では不応性が出現し効果が持続しない。本研究では、この機構にCT受容体のde novo合成の調節機構が関与していることを考え検討した。

2. 研究方法

1) ヒト破骨細胞形成系

昭和大学松崎らの方法に則り、健常ヒト末梢血からHISTOPAQUEを用いたDensity gradient法によってヒト単核球を調整し、破骨細胞分化誘導因子（RANKL: 50ng/ml）、M-CSF（200ng/ml）の存在下に培養し成熟破骨細胞様細胞が主体となった培養第7日目の細胞を用いた。

2) カルシトニン受容体遺伝子発現機構の検討

CT特異的結合能は $[^{125}\text{I}]$ サケCTを用いbinding assayとautoradiographyを用いて解析し、CTRのmRNAの発現はRT-PCR法により特異的プライマーを用いて増幅し発現量を比較した。同一RNAでのinternal controlとしてはGAPDHを用いた。

4) 破骨細胞機能の検討

象牙切片上における骨吸収活性およびアクチンリング形成を評価した。

3. 研究成果

ヒト健常者末梢血単核球をRANKLとM-CSF存在下に培養して得た破骨細胞を、CTで1時間刺激すると用量依存的にCT受容体数、mRNA発現レベルが低下しde novoの合成阻害によることが示された。一方デキサメサゾンによる処置はCT受容体数、mRNA発現レベル、CT反応性cAMP産生を増加させた。この効果は性ホルモンやミネラルコルチコイドでは再現されず、RU486で阻害されたことからグルココルチコイドに特異的な作用と考えられた。Autoradiographyでは多核の破骨細胞における銀粒子の数が個々の破骨細胞で増加していた。興味深いことにグルココルチコイドの効果はCTと共存させると一定時間の後に抑制されることが判明し、CTによるCT受容体数の抑制効果とグルココルチコイドによるCT受容体数の増加効果は作用点が異なる

のではないかと推察された。グルココルチコイドとCTの併用がある種の病態でヒト破骨細胞を標的とし有益であることが考えられた。その分子メカニズムに関しては今後解明すべき課題と思われた。

4. 考察

種々の薬物の骨系細胞に対する影響を検討することは、副作用・安全性を早期に知ることができるとともに、薬物の細胞への作用機構の詳細なども観察可能とし、副作用を評価するのに年余を要する骨という組織に対して、至適な投与量・投与方法等を含めてより合理的な薬物療法を提案できるものと考えられた。

5. 結論

ヒト健常者末梢血単核球から破骨細胞への分化誘導をRANKLとM-CSFを利用してin vitroで行い薬剤の効果をヒトの標的細胞で直接検討した。本実験系は薬物の細胞への作用機構の詳細も観察可能とし、至適な投与量・投与方法等を含めてより適切な薬物療法を提案できるものと考えられた。

6. 研究発表

Samura A, Wada S, Suda S, Iitaka M, Katayama S. Calcitonin receptor regulation in human osteoclast-like cells prepared in vitro by osteoclast-differentiating factor and macrophage-colony stimulating factor. **Endocrinology** 141: 3774-3782, 2000

Wada S, Yasuda S, Nagai T, Maeda T, Kitahama S, Suda S, Findlay DM, Iitaka M, Katayama S. Regulation of calcitonin receptor by glucocorticoid in human osteoclast-like cells prepared in vitro by osteoclast-differentiating factor and macrophage-colony stimulating factor. **Endocrinology** 142:1471-1478, 2001

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社