

研究成果報告書の概要

講座等名	衛生・公衆衛生学講座	事業推進者名	神田 靖士																		
所属部門	神経部門																				
分担研究課題	マウス万能細胞を用いた立体的組織の構築と骨粗鬆症に対する漢方製剤治療 メカニズムの解明																				
キーワード	組織幹細胞、SP cells、auditory pathway、骨粗鬆症、漢方製剤																				
講座内の本プロジェクト参加研究者数			5名																		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）</p> <table border="0"> <tr> <td>西山利正</td> <td>教授</td> <td>研究の統括</td> </tr> <tr> <td>神田靖士</td> <td>准教授</td> <td>大学院生などの研究指導並びに幹細胞の特徴付けと遺伝子発現の解析</td> </tr> <tr> <td>下埜敬紀</td> <td>助教</td> <td>幹細胞の特徴付け（細胞培養とシーケンス解析）と遺伝子導入</td> </tr> <tr> <td>杉本秀生</td> <td>大学院生</td> <td>骨粗鬆症における漢方製剤治療メカニズムの解明</td> </tr> <tr> <td>岡崎はるか</td> <td>研究員</td> <td>内耳の聴覚伝導路（特に下丘）における組織幹細胞の探索</td> </tr> <tr> <td>王澤蘊</td> <td>研究員</td> <td>漢方製剤の治療メカニズムの解明</td> </tr> </table>				西山利正	教授	研究の統括	神田靖士	准教授	大学院生などの研究指導並びに幹細胞の特徴付けと遺伝子発現の解析	下埜敬紀	助教	幹細胞の特徴付け（細胞培養とシーケンス解析）と遺伝子導入	杉本秀生	大学院生	骨粗鬆症における漢方製剤治療メカニズムの解明	岡崎はるか	研究員	内耳の聴覚伝導路（特に下丘）における組織幹細胞の探索	王澤蘊	研究員	漢方製剤の治療メカニズムの解明
西山利正	教授	研究の統括																			
神田靖士	准教授	大学院生などの研究指導並びに幹細胞の特徴付けと遺伝子発現の解析																			
下埜敬紀	助教	幹細胞の特徴付け（細胞培養とシーケンス解析）と遺伝子導入																			
杉本秀生	大学院生	骨粗鬆症における漢方製剤治療メカニズムの解明																			
岡崎はるか	研究員	内耳の聴覚伝導路（特に下丘）における組織幹細胞の探索																			
王澤蘊	研究員	漢方製剤の治療メカニズムの解明																			
<p>研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）</p> <p><u>更年期障害に対して処方される漢方製剤のエストロゲン活性の検討</u></p> <p>In vitro におけるラット下垂体腫瘍細胞 MtT/Se と酵母 two-hybrid system による漢方製剤のエストロゲン作用を検討した結果、温経湯、加味逍遙散、女神散においてコントロールと比較して有意に高いエストロゲン活性を有していた。また、S9 による代謝後の活性を検討したところ温経湯と女神散において代謝前と比較して有意に増強していた。さらに、最も高いエストロゲン活性が検出された温経湯の個々の構成生薬を用いて同様にエストロゲン活性を検討した結果、カンゾウ、ケイヒ、ゴシュユ、ショウキョウにおいて高いエストロゲン活性が検出された。またこれらの活性が認められた生薬を 2 種類ずつ混合した時の相加・相乗効果を検討した結果、カンゾウとゴシュユ、ゴシュユとケイヒの組合せにより β 型エストロゲン活性の相乗効果が認められた。</p> <p>また前述の β 型エストロゲン活性を有していた 3 つの漢方製剤（温経湯、女神散、加味逍遙散）および補中益気湯、加味帰脾湯を用いてマウス破骨前駆細胞(RAW264 細胞)に投与し、成熟破骨細胞への分化過程における作用を in vitro で検討することを目的とした。TRAP 染色の結果、RANKL のみ添加した RAW264 細胞は成熟破骨細胞へ分化誘導したが、これに E2 を添加した場合、その分化は顕著に抑制された。また、先行研究でエストロゲン β 活性を有していた漢方製剤、温経湯、女神散、加味逍遙散にはいずれも成熟破骨細胞への分化を有意に抑制していた。また、分化過程に於ける転写因子の遺伝子発現の変化を検討した結果、成熟破骨細胞への分化を抑制していることが分かった。</p> <p><u>聴覚伝導路における組織幹細胞の同定と特徴付け</u></p> <p>今回の研究では、中枢聴覚伝導路のなかでもすべての上行聴覚情報が経由し音情報を最初に統合する重要な核である下丘において、幹細胞のマーカーとして報告がある Prominin-1(CD133)抗原に注目し、新生仔マウス下丘における神経幹/前駆細胞を濃縮、分離し、遺伝子発現や分化能を検討する事を目的とした。Prominin-1 の発現を q-PCR を用いて検討したところ生後 1 週未満の下丘における発現が 3 週以降と比較して有意に高い事が示された。新生仔マウス下丘から取得した Prominin-1 陽性細胞の割合は成体に比し有意に高く、更に Prominin-1 陽性細胞の sphere 形成能を検討したところ、新生仔において、unsorted cells、Prominin-1 陰性細胞から形成されたものより有意に多い事が分かった。免疫染色により、新生仔マウス下丘の Prominin-1 陽性細胞に幹細胞マーカーである SOX2 が共発現しており、Prominin-1 陽性細胞から形成された sphere に SOX2、神経幹前駆細胞のマーカーである Nestin の発現を認め、分化誘導することにより神経、グリアへ分化する事を示した。</p>																					
<p>問題点</p> <p>現在、今年度の結果を受けて漢方製剤を用いた骨粗鬆症に対する予防及び治療効果を in vivo 及び in vitro で検討している。現在、骨粗鬆症モデルマウスを作成するため RANKL をリコンビナントタンパクとして発現、精製を実施している。しかしながら現在までに発現ベクターへのクローニングを終えたが、精製のステップで時間がかかっており、今後早急に進めて in vivo での実験を進めていく予定である。</p>																					

優れた成果があがった点

漢方製剤の骨粗鬆症に対する治療効果のメカニズムの解明を行う事を目的に、*in vitro* で破骨前駆細胞から成熟破骨細胞への分化過程に及ぼす影響を検討した。その結果、漢方製剤の有するエストロゲン作用により破骨細胞の分化過程において作用し、分化を抑制したものと推測された。