

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

平成 22 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 金子 修 
所属機関名： 長崎大学 熱帯医学研究所
所属部署名： 原虫学分野 職名： 教授
所在地： 長崎県長崎市坂本 1 丁目 12-4
電 話： 095-819-7838 内線： 7838

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

ヒト感染性マラリア原虫中国流行地株の分子疫学

3. 成果の概要

三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられ、ヒト免疫と思われる選択圧がかかっている多型抗原 PvSTP1 について、①4 年間でアミノ酸アレルが変化するか、②アレル頻度分布は 4 年間で一定か、③特定の型が病原性と関連するかについて解析した。2004 年の 21 配列、2008 年の 13 配列を用いて解析を行ったところ、4 年間で有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルが 21 あった。また、アレル頻度分布は、4 年間でシステインに富む CRD と呼ばれる領域は多型の VAR 領域と比較して有意に変化が少なかった。①CRD が平衡淘汰にさらされている可能性、②宿主免疫を逃れるために VAR の多型性による抗原変異を起こしている可能性、の二点の可能性が考えられた。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 金子 修	職名：教授
所属機関名：長崎大学 熱帯医学研究所	部署名：原虫学分野
中国側研究者氏名： 曹 雅明	職名：教授
所属機関名：中国医科大学 基礎医学院	部署名：抗感染免疫研究室

ヒト感染性マラリア原虫中国流行地株の分子疫学

研究者氏名	金子修
日本研究機関	長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野
中国共同研究者	曹雅明、王各各、朱晓彤
中国研究機関	中国医科大学基礎医学院抗感染免疫研究室

要旨：

中国南部では依然として三日熱マラリアが流行し問題となっている。三日熱マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、ロゼット形成や細胞接着現象を起こし、病原性との関連が予想されるが詳細はあきらかでない。そこで、三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられ、ヒト免疫と思われる選択圧がかかっている多型抗原 PvSTP1 について、2004 年と 2008 年に収集した原虫を用いて、①2004 年に見られたアミノ酸アレルが 2008 年にも存在するか、②アレルの頻度分布は 4 年間で一定か、③特定の型の PvSTP1 が三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかについて解析した。2004 年の 21 配列、2008 年の 13 配列を用いて解析を行ったところ、2004 年に見られ 2008 年では有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルが 21 ある一方、2004 年に見られず 2008 年にみられるようになったアミノ酸アレルが 4 つあった。さらに、2004 年と 2008 年の間に GRD ではアレル頻度が VAR と比較して変化が少ないことが分かったため、①GRD が平衡淘汰にさらされている可能性、②宿主免疫を逃れるために VAR の多型性を用いて抗原変異を起こしている可能性、の二点の可能性を考えた。これを明らかにするために中立遺伝子のアレル頻度の変化の解析を行うことが必要と考えられる。また、特定の PvSTP1 アレルと病原性との関連は見られなかったが、さらに多くの塩基配列を加えて解析を行う必要がある。

Key Words 三日熱マラリア、抗原、多型性、

緒言：

中国の南部では依然として三日熱マラリアが流行し、他の感染症との合併による間接的な死亡や体力低下に伴った生産性の低下による経済的損失が問題となっている。三日熱マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、感染赤血球が非感染赤血球に接着するロゼット形成と呼ばれる現象を起こし、病原性との関連が予想されているが、詳細はあきらかでない。我々は最近、熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面に発現する SURFIN という分子を同定したが、その三日熱マラリア原虫の相同体である PvSTP1 は三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられる[1]。このような分子は、マラリア病原性の解析のカギとなるのみならず、ヒト免疫にも直接さらされるワクチン候補と考えられるため、PvSTP1 の解析は重要な課題である。

現在までに、我々の教室では抗 PvSTP マウス抗体をすでに作成し、分子レベルでの基礎的解析を行っているが、同時に、曹博士が 2004 年に収集し、保管していた中国の雲南省、浙江省、湖北省の 3 つの異なる地区の三日熱マラリア原虫 DNA (各地区 20 標本ずつ) について PvSTP の塩基配列を決定した。その結果、PvSTP は非常に多型で、多くのアレルが存在することがわかった。また、集団遺伝学的統計解析により、ヒト免疫によると思われる淘汰圧を検出することができた。

そこで、本研究では PvSTP1 のアレル頻度が経年的に変化するのかどうかを、2004 年と 2008 年に収集した原虫を用いて、①2004 年度に見られたアレルがまだ存在するかどうか、②アレルの頻度分布は安定して存在しているのか(抗原変異を起こすか)、③特定の型の PvSTP1 が三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかを解析することで、将来、この分子を標的とするコントロール戦略を立てる基礎情報を得ることを目的として行った。

対象と方法：

A. 三日熱マラリア患者からのマラリア原虫の採取

三日熱マラリア原虫標本は、2008年、中国国内の雲南省のマラリア流行地において患者の同意を得た後にマラリア感染血液を濾紙に採取することで曹雅明により集められた。

B. DNA抽出とPCR増幅、塩基配列決定（図1）

濾紙からのマラリア原虫DNAの抽出を市販のDNA抽出試薬（EZ1 DNA Tissue Kit; Qiagen）を用いて行った。抽出したDNAを鋳型として、KOD-Plus- DNA polymeraseを用いてPvSTP1の細胞外領域をコードするDNA断片のPCR増幅をおこなった。PvSTP1にはSalI型とIVD10型があるため、5'側プライマーはSalI型特異的プライマー（TTTCATTTCAAAAATATGTATTACTCTTG）とIVD10型特異的プライマー（TTTCATTTCAAAAATATGTATTACTCTTG）、3'側プライマーは共通プライマー（AAGAAGGAAAA TAAATGTGATAAAGCC）を用いてInitial PCRを行い、このPCR産物を鋳型として、SalI型Nested用プライマー（GAAAACAAACTTATAATATAATGCA）もしくは、IVD10型Nested用プライマー（ACATAGTACTAT GTGTCTTGAAATATG）とInitial PCRに用いた3'側プライマーを用いてSeminested PCRを行った。塩基配列決定はPCR産物を鋳型とする直接シーケンス法により行った。反応は2回に分けて行い、一つは5' primerにより、もう一つは3' primerによりシーケンス反応を行うことにより、PCR増幅反応中のエラーが入らないように注意した。

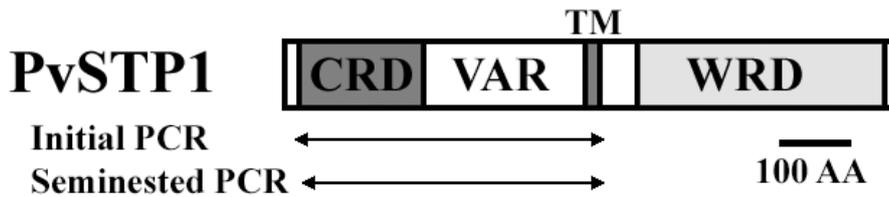


図1. PvSTP1の模式図。細胞外領域にあるCystein-rich domain (CRD)とVariable domain (VAR)、細胞内領域にあるTryptophan-rich domain (WRD)、および膜貫通領域(TM)を示す。図の下に、Initial PCRとSeminested PCRにより増幅される部位を示す。スケールバー=100アミノ酸。

C. 統計学的解析

得られた塩基配列より、予想アミノ酸配列を決定し、2004年度に雲南省の三日熱マラリア原虫から得られたPvSTP1のアレルと比較した。多型を示す全てのアミノ酸部位について、アミノ酸の頻度分布が2004年と2008年の群で有意に異なるかどうかをFisher's exact testにより検討した。また、PvSTP1の二つの領域、①種々のマラリア原虫の相同体間において保存されているシステインが豊富なCystein-Rich Domain(CRD)と②種々のマラリア原虫の相同体間において非常に多型性に富むVariable Domain (VAR)の間で、頻度分布が変化しているアミノ酸部位の数が有意にことなるかどうかをカイニ乗検定で検討した。P<0.05を有意に異なるとした。

結果：

顕微鏡検査にて三日熱マラリア原虫と診断された52標本について、IVD10型プライマーを用いてPCR増幅をおこなったところ、27標本についてPvSTP1遺伝子断片をPCR増幅することが出来た。残りの25標本についてSalI型プライマーを持ちいてPCR増幅をおこなったところ、25標本すべてについて、PvSTP1遺伝子断片の増幅ができた。これらのPCR産物の直接塩基配列決定を行ったところ、IVD10型プライマーにより増幅された27のPCR産物のうち、18が重複感染で9つが単一アレル優位であった。SalI型プライマーにより増幅された25のPCR産物のうち、21が重複感染で4つが単一アレル優位であった。そこで単一アレル優位の合計13の塩基配列を用いて2004年度に15標本から得られた21の塩基配列と比較解析することとした。

①2004 年度に見られ 2008 年度では有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルがある。

2004 年標本にみられたが、その頻度が有意に減少して 2008 年標本では検出されなかったアミノ酸は SalI 株のアミノ酸配列を基準として、N²⁸、I³⁵、N¹³⁸、A¹³⁹、P¹⁴¹、K¹⁴³、S²⁸³、N²⁹⁸、E³¹⁸、T³²²、P³²⁵、D³³⁰、P³³⁷、A³³⁸、A³⁴⁰、D³⁴¹、I³⁵⁰、L³⁵¹、H³⁸¹、A³⁹⁵、H³⁹⁶ の 21 アミノ酸あった。逆に、2004 年標本には見られなかったが、その頻度が有意に増加して 2008 年標本で検出されたアミノ酸は同様に、T¹⁴³、E²³⁵、Q²⁶³、K²⁶⁶ の 4 アミノ酸であった。

②VAR と比べて CRD ではアレル頻度分布は比較的安定していた。

2004 年と 2008 年の間で頻度分布が変化していた個所は、CRD (アミノ酸部位 23-199) で見つかった 75 の多型部位中 15 個所であった、また、VAR (アミノ酸部位 200-416) で見つかった 91 の多型部位中 35 個所であった。CRD と VAR において比較したところ、有意に CRD の方が、頻度分布が安定して存在していることがわかった (P < 0.01)。

		100 AA	
PvSTP1 細胞外領域		CRD	VAR
頻度分布が 変化した部位	15	35	
多型部位	75	91 (P < 0.01)	

図 2. PvSTP1 細胞外領域 Cystein-rich domain (CRD) と Variable domain (VAR) における頻度分布の変化した部位の程度。スケールバー = 100 アミノ酸。

③特定の PvSTP1 アレルと発熱の有無や原虫感染率との関連は見られなかった。

2004 年と 2008 年の全てのサンプルをまとめた 34 塩基配列と患者発熱の有無および感染率との相関を検討したが有意な関連を見出すことはできなかった。

考 察：

本研究では PvSTP1 のアレル頻度が経年的に変化するのかどうかを中心に解析を行ったところ、2004 年と 2008 年の間に、CRD ではアレル頻度が VAR と比較して変化が少ないことが分かった。CRD はシステインに富んだ領域で種々のマラリア原虫間で保存性が高く、三日熱マラリア原虫では 300 ものメンバーを持つ VIR と呼ばれる多重遺伝子族にドメイン・シャッフリングにより使用されるようになっており、未同定ではあるが重要な機能を有すると考えられている。4 年間の年月にもかかわらず、この領域の多くの多型部位のアミノ酸アレル頻度が一定であること、VAR ではアレル頻度が多い多型部位で変化していることは、CRD が平衡淘汰にさらされているか、あるいは逆に VAR が多型性により抗原変異を起こしているかの可能性があると考えられる。マラリア原虫抗原に対する平衡淘汰については、熱帯熱マラリア原虫の主要抗原である MSP1 について解析が行われ、第二領域と呼ばれる多型部位が異なる地域間でもアレル頻度が一定であることが報告されている [2]。熱帯熱マラリア原虫の MSP1 については、さらにアレル頻度は経年的には変化しないことが報告されており、熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫と言う差はあるものの、VAR のアレル頻度の経年変化はさらなる検討を要する。そのためには、中立遺伝子に関するアレル頻度の変化の解析と、さらに後年の標本を用いてこの点を確認することが必要である。また、2008 年に解析した配列数が少ないため、各種の関連解析の検出感度が低くなっている。そのため、

重複感染がみられた標本について大腸菌を用いたクローニングを行って、さらに多くの塩基配列を加えて解析を行う必要がある。

参考文献：

1. Winter G, Kawai S, Haeggstrom M, Kaneko O, von Euler A, Kawazu S, Palm D, Fernandez V, Wahlgren M. "SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes." *J Exp Med* 201(11):1853-63 (2005).
2. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AM, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS. "A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses." *Nat Med* 6(6):689-92 (2000).

作成日：2010年3月14日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2010 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 吉田 弘 
所属機関名：国立感染症研究所
所属部署名：ウイルス第二部 職名：主任研究官
所在地：東京都武蔵村山市学園 4-7-1
電 話：042-561-0771 内線：3358

1. 助成金額：1, 000, 000 円

2. 研究テーマ

広東省における環境水調査によるポリオウイルス検出法の研究

3. 成果の概要

広東省広州市をパイロットエリアとして、ポリオウイルスを検出すべく環境ウイルスサーベイランスを行った結果、①AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランスと比べ、ウイルス分離頻度が高いこと、②ポリオウイルスは 1-3 型ともコンスタントに分離されており、VP1 領域における塩基置換は生ワクチン株と比較して 1%未満であることから、OPV 定期接種のアセスメントツールとして有用であることを示した。このことは広東省のような流動人口を多く抱える省において、従来の AFP サーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

※発表論文等：なし

4. 研究組織

日本側研究者氏名：吉田 弘
所属機関名：国立感染症研究所
中国側研究者氏名：郑焕英
所属機関名：広東省 CDC

職名：主任研究官
部署名：ウイルス第二部
職名：副主任技師
部署名：ポリオ実験室

広東省における環境水調査によるポリオウイルス検出法の研究

研究者氏名 吉田 弘
日本研究機関 国立感染症研究所
ウイルス二部主任研究官
共同研究者氏名 郑 煥英
中国所属機関 広東省CDCポリオ実験室
副主任技師

研究要旨

広東省広州市をパイロットエリアとして、ポリオウイルスを検出すべく環境ウイルスサーベイランスを行った。2008年4月から2009年11月までの流入下水調査の結果、①AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランスと比べ、ウイルス分離頻度が高いこと、②ポリオウイルスは1-3型ともコンスタントに分離されており、VP1領域における塩基置換は生ワクチン株と比較して1%未満であることから、OPV定期接種のアセスメントツールとして有用であること、を示した。このことは広東省のような流動人口を多く抱える省において、従来のAFPサーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

Key words : ポリオ根絶計画、環境サーベイランス

緒言

ポリオ根絶計画では、生ポリオワクチン(OPV)投与によりヒト集団中の野生株ポリオ(PV)ウイルスの消失を、AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランス下の実験室診断で確認をしている。中国は10年以上野生株フリーの状況であるが、近隣のパキスタン、インド等で流行しているため野生株の輸入のリスクは依然として存在する。これはPV感染の多くが不顕性であり健常者がリザーバーになるためである。

OPV接種後、ワクチン株はヒトの腸管で増殖し免疫を誘導するが、同時にウイルスゲノム上ではわずかに変異が起こり、糞便中に排泄される。集団免疫が高ければ排泄されたウイルスがヒト集団に広まることはないが、OPV接種率が低下すると、ヒト-ヒト感染を繰り返しゲノム上に変異が蓄積した強毒型ワクチン由来株(VDPV)が出現する。中国ではVDPVによる流行が貴州省(2004年)他で問題となった。

環境ウイルスサーベイランスは、ヒトから環境水に排泄されたPVを調べることで、顕性、不顕性感染に関わらず地域に流行するウイルスを高感度に検出できる可能性がある(1)。実際2007年にスイスジュネーブ市では、患者感染例はなかったがチャド由来野生株が下水中より検出されたことにより、輸入リスク評価のツールとして有用性が認められている。WHOは“2010-12年行動計画”(2)の中で環境ウイルスサーベイランスを導入する計画である。本課題では、2008年以来、広東省CDCと共同研究を行っている環境ウイルスサーベイランスにより、ポリオウイルス野生株輸入・VDPVリスク対策方法として導入可能か検討する。

材料と方法

環境水採取エリア：広東省広州市内（人口約 1000 万人、流動人口約 300 万人）を流れる珠江（1 箇所）及び天河地区猎德下水処理場の流入下水（2 箇所）にて、2008 年 4 月から月 2 回の頻度で 2010 年 3 月まで 2 年間継続した。なお既に河川、下水処理場からのサンプリングについては広州市監督官庁から承認済み。

ウイルス分離同定：流入下水（500ml）を出発材料に、疎遠心（3000 rpm、30 分）後、上清に塩化マグネシウムを添加（最終濃度 0.05M）し、pH3.5 に調整。加圧ろ過装置（KST142、アドバンテック）に装着した陰電荷膜（A045A142、アドバンテック）にてウイルス吸着。3% beef extract（10ml）存在下、2mmプローブを用いて 1 分間超音波処理（VP-5S、タイテック）を行いウイルス誘出を 2 回行った。膜より誘出した濃縮液を 0.45um フィルターにてろ過後、RD, HEp-2、Vero、L20B 細胞へ 0.2ml ずつ接種、2 代継代を行った。なお RD, HEp-2、Vero で CPE 陽性の場合は L20B に再接種しポリオウイルスの有無を確認した。分離ウイルスは、ポリオ抗血清を用いて中和法にて型別同定を行った。

ポリオウイルス遺伝子解析

ポリオウイルスはRNA抽出後、ウイルスゲノム VP1 領域をターゲットとした UG1, UC11 プライマーセットを用いて RT-PCR にて増幅。得られた PCR 産物をダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、1-3 型ワクチン株と比較した。

結果

環境水採取：2008 年 4 月から 2009 年 11 月まで、下水処理場流入口 1 号、3 号から月 2 回、合計 20 回採水。80 試料を得た。

ウイルス分離、同定：80 試料を RD、HEp-2、Vero、L20B に接種したところ、各々 80、61、15、29 株分離された。これらのウイルスについてはポリオ以外のエンテロウイルスも混ざっているため検査続行中である。

L20B に接種/再接種して分離されたポリオウイルスに関しては 2008 年 3 月から 2009 年 11 月までに 1 型 14 株、2 型 32 株、3 型 14 株、計 60 株が分離された。また 2008 年 6 月を除き毎月ポリオウイルスが分離されている（表 1）。これは広東省における AFP サーベイランスより高い分離頻度である（3）

1-3 型分離株について、VP1 領域の塩基配列を調べたところ、ワクチン株と 1% 以下の違いであり、すべて Sabin-like 株と判定された（図 1）。

考察

本研究では従来の AFP サーベイランスとポリオウイルス分離頻度の比較検討を行い野生株輸入・VDPV 検出法としての妥当性、ヒト集団中のエンテロウイルス流行を包括的に把握するツールとしての適用性を研究目的とした。先行研究を含め 2 年間の調査を通じ、①AFP サーベイランスによるポリオ分離率に比べ高頻度にポリオウイルスが分離できること、②VP1 領域の遺伝子解析により分離株は Sabin-like 株であったことから、OPV 定期接種状況を把握するモニタリングツールとしても適用できる可能性、③未同定ではあるもの多量のエンテロウイルスの地域流行の可能性、を示唆している。

野生株ポリオフリー地域では、集団免疫低下に伴う VDPV のアウトブレイクの危険性が存在する。本研究で行った遺伝子解析の結果、分離ウイルス株の変異が 1% 以内であることから、広東省広州市では、OPV 接種状況が良好であることが示唆される。このこ

とは広東省のような流動人口を多く抱え、疾患サーベイランスが困難な省において、従来のAFPサーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

他方、新疆ウイグル自治区のように広大な面積を有し、流行国であるパキスタンに隣接するような省では、国境地域に環境ウイルスサーベイランスを導入することで輸入リスク対応として期待できる。

（研究協力者）

中国広東省 CDC Dr. Ke Changwen

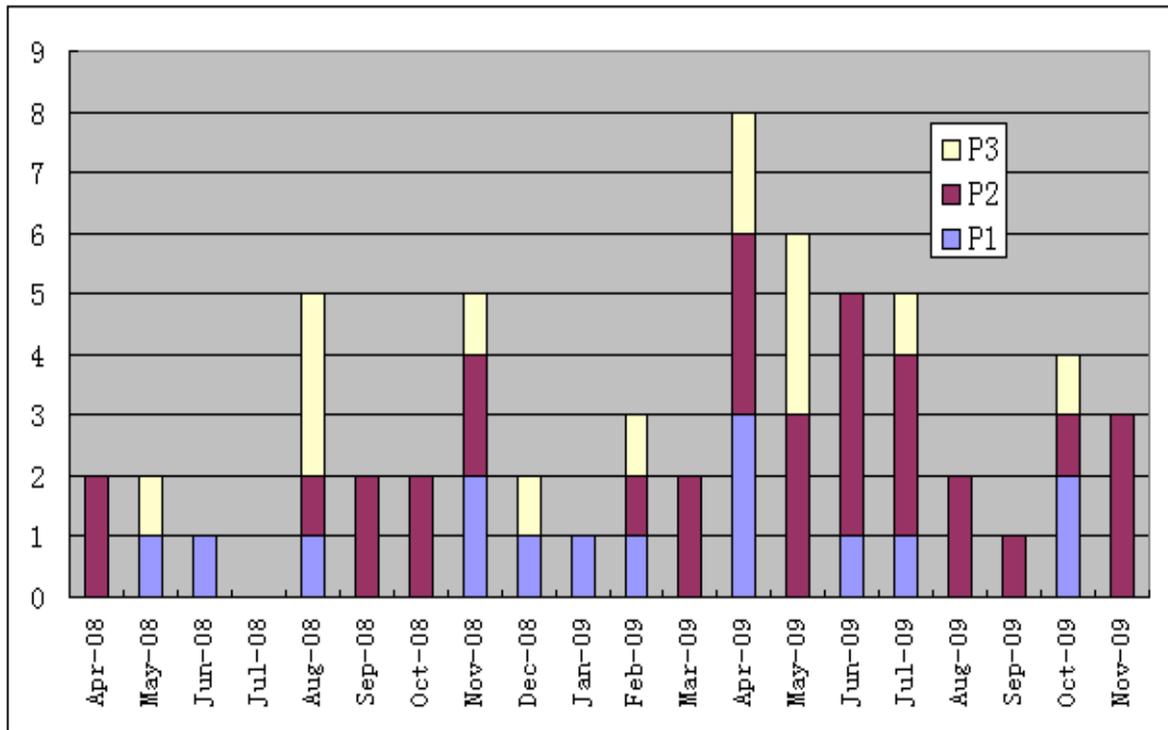
中国 CDC ポリオ実験室 Dr. XuWenbo, Dr. ZhangYong.

参考文献

- 1) 岩井雅恵 中村一哉 小原真弓 堀元栄詞 長谷川澄代 倉田 毅 滝澤剛則 吉田 弘 環境水サーベイランスによるポリオウイルス伝播の監視－富山県 IASR Vol. 30 p. 180-181: 2009年7月号
- 2) <http://www.wpro.who.int/sites/epi/documents/PolioWeeklyBulletin.htm>
- 3) http://www.polioeradication.org/content/publications/GPEI_ProgrammeofWorkStructureNovember2009.pdf

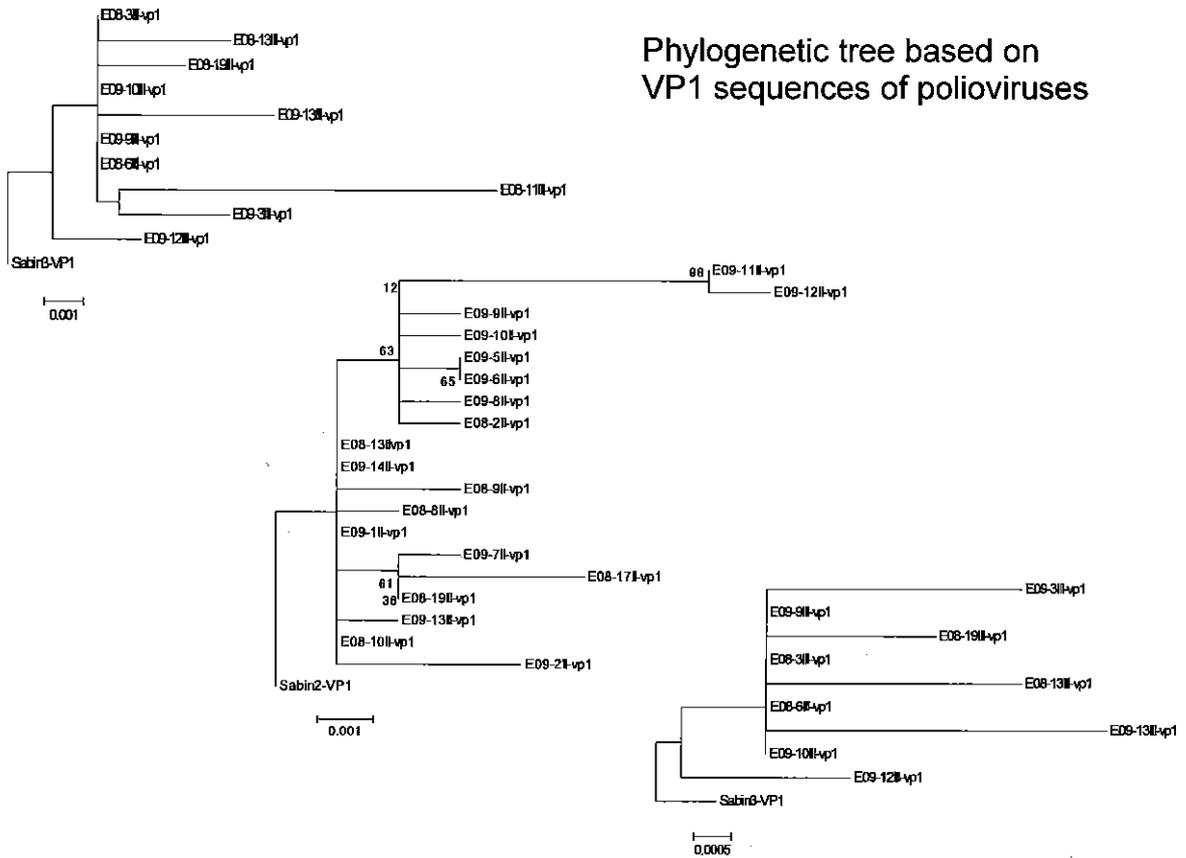
作成日：2010年3月11日

図1 天河地区猎德下水処理場の流入下水（2箇所）におけるポリオウイルス分離
 (2008.4-2009.11)



横軸は採取月、縦軸は分離数を示す。P1, 2, 3 はそれぞれポリオ1型、2型、3型。

図 2



広東省広州市内の下水由来ポリオウイルス 1-3 型とのワクチン株と VP1 領域にて 1%以下の塩基置換であることを示す。

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 大坂 巖 
所属機関名：静岡県立静岡がんセンター
所属部署名：緩和医療科 職名：医長
所在地：静岡県駿東郡長泉町下長窪 1007
電 話：055-989-5222 内線：6105

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

終末期がん患者の苦痛症状に対する鍼治療の有用性の検証

3. 成果の概要

終末期がん患者に対して MD アンダーソン症状評価表日本語版 (MDASI-J) を用いて鍼治療前後での種々の苦痛症状の変化と、EORTC-QLQ-C30 による QOL の変化を測定した。共同研究者である佐々木弘鍼灸師が中医学に基づいた診察を行い、虚証に対する治療 (本治) を行った上で、主訴に対する治療 (標治) を行った。15 例に対して計 68 回の治療を行った。経穴の選定に関しては、王健教授のアドバイスをお願いした。治療前後において、疼痛、倦怠感、しびれが有意な低下を示した。MDASI-J にて 3 ポイント以上の低下は 6 例において認められ、不眠、食思不振、眠気、口渴、倦怠感、呼吸苦、しびれが多かった。QOL は有意な改善は認められなかった。MDASI-J によって潜在的な苦痛症状が明らかとなり、本治により改善した可能性がある。症例数の蓄積により、治療効果が期待できる症状およびその時期などがより明確にされうる。

4. 研究組織

日本側研究者氏名：大坂 巖	職名：医長
所属機関名：静岡県立静岡がんセンター	部署名：緩和医療科
中国側研究者氏名：王 健	職名：教授
所属機関名：遼寧中医薬大学付属病院	部署名：鍼灸科

終末期がん患者の苦痛症状に対する鍼治療の有用性の検証

研究者氏名	大坂 巖
所属機関	静岡県立静岡がんセンター緩和医療科
共同研究者	王 健
中国所属機関	遼寧中医薬大学附属病院鍼灸科
共同研究者	佐々木 弘

要 旨

終末期がん患者の苦痛に対して、補完代替医療（CAM）が患者のQOLを向上させられる可能性がある。鍼灸治療は中医学の根幹をなす確立された標準的治療であり、CAMの中でも最もevidenceが豊富な治療である。がん患者の症状緩和に関する研究は存在するが、これらの多くは抗がん治療が可能な状態の患者を対象としていることが多く、予後が限られている患者を対象とした研究は皆無に等しい。今回、終末期がん患者に対して包括的症状評価ツールであるMDアンダーソン症状評価表日本語版（MDASI-J）を用い、鍼治療前後での種々の苦痛症状の変化を検討した。あわせてEORTC-QLQ-C30によるQOLの変化も測定した。鍼治療は1名の鍼灸師が中医学に基づいた診察を行い、虚証に対する治療（本治）を行った上で、主訴に対する治療（標治）を行った。15例に対して計68回の治療を行ったが、46回の治療において評価が可能であった。治療前後において、疼痛（ $P < 0.001$ ）、倦怠感（ $P = 0.032$ ）、しびれ（ $P = 0.004$ ）が有意な低下を示した。MDASI-Jにて3ポイント以上の低下は、6例において認められた。改善した症状としては不眠、食思不振、眠気、口渇、倦怠感、呼吸苦、しびれが多かった。QOLは有意な改善は認められなかった。治療開始から死亡日までは中央値21.5日であった。MDASI-Jにより明らかになった潜在的な苦痛症状が本治により改善した可能性がある。症例数の蓄積により、治療効果が期待できる症状およびその時期などがより明確となることが期待される。

Key Words 鍼治療, 終末期, がん, 苦痛症状, MDASI-J

緒 言 :

終末期がん患者の苦痛に対して、標準的な医療やケアのみでは対応不十分なことが多い。補完代替医療（CAM）が患者のQOLを向上させられる可能性があることは以前より指摘されている。鍼灸治療は中医学の根幹をなす確立された標準的治療であり、CAMの中でも最もevidenceが豊富な治療である。がん患者の疼痛、嘔気、倦怠感、呼吸困難感、口腔乾燥などの症状緩和に有効であることが報告されている。しかし、これらの研究の多くは抗がん治療が可能な状態の患者を対象としていることが多く、終末期がん患者を対象とした研究報告は皆無に等しい。終末期がん

患者の症状緩和に関しても鍼灸治療が有効であることが明らかにされれば、患者の QOL 向上に大きく貢献できる可能性がある。特に polypharmacy に陥りがちな緩和医療においては、薬物療法以外の治療方法の選択肢が増えることの意義は非常に大きい。苦痛症状を有する終末期がん患者に対して鍼灸治療を実施し、症状の改善度を検討することとした。

対象と方法：

2009 年 9 月～2010 年 2 月までに当院緩和ケア病棟に入院中の患者のうち、以下の適格基準を満たし、鍼治療の希望がある患者に対して鍼治療を実施した。

【適格基準】

- ・ 緩和ケア病棟入院中の患者
- ・ 何らかの苦痛を有する患者
- ・ 自記式質問票に回答可能な患者

【除外基準】

- ・ 血小板減少症 (PLT < 50,000/ μ L) がある患者
- ・ 臨床的に予後が 1 週間以内と予測される患者

【方法】

1 名の鍼灸師 (三島広小路治療院 佐々木弘鍼灸師) が中医学に基づいた診察を行い、虚証に対する治療 (本治) を行った上で、各種症状緩和に対する治療 (標治) を行った。本治に対する治療として、肺虚には太淵 (LU9) や太白 (SP3)、脾虚には太都 (SP2) や太白 (SP3)、肝虚には曲泉 (LR8) や復溜 (KI7)、腎虚には復溜 (KI7)、陰谷 (KI10)、尺沢 (LU5)、太淵 (LU9) など、心虚には神門 (HT7) などを主に取穴した。経穴の選定に関しては、あらかじめ王健教授のアドバイスを受けた。施術は 1 回 30 分以内とし、原則的に週 2 回行った。治療当日の治療前と 1 日後に、症状評価として MD アンダーソン症状評価票日本語版 (MDASI-J) を、QOL 評価として EORTC-QLQ-C15PAL (The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C15PAL) の item15 (1:とても悪いから 7:とてもよいの 7 件法) を各々測定した。

主要エンドポイントは MDASI-J により測定される鍼治療前後の 11 症状 (疼痛、倦怠感、嘔気、不眠、呼吸苦、食思不振、便秘、眠気、口渇、抑うつ気分、しびれ) のスコアの変化であり、副次的エンドポイントは EORTC-QLQ-C15PAL により測定される鍼治療前後の QOL の変化とした。治療前後での評価項目を t-検定にて各々の統計学的検討を行った。研究開始に際しては、当院倫理審査委員会にて承認を受け、患者本人に同意を得た上で行った。

結 果：

計 15 例に対して計 68 回の鍼治療を実施したが、症状評価が実施できたのは計 46 回であった。年齢は 42～83 歳であり、平均 65.2 歳 (中央値 64 歳)、性別は男性 7 例、女性 8 例であった。PS は 1 が 1 例、2 が 2 例、3 が 9 例、4 が 3 例であった。各症例の原疾患、転移部位、主訴、治療回数および中医学にもとづく虚証は表 1 に示す。

表1 症例一覧

No.	原疾患	転移	主訴	治療回数	虚証				
					肺	脾	肝	腎	心
1	肝細胞癌	骨	腰痛、下肢しびれ、上肢脱力	13	1	1		4	
2	胃癌	腹膜	腰痛	1			1		
3	胆管癌	腹膜、肝、骨	腰痛、下肢しびれ、便秘	3	1	1	1	1	
4	大腸癌	脳	半身痛	3	1	1			
5	肺癌	脳、骨	肩痛	4	1	2	2		1
6	子宮頸癌	肺	下肢痛	6			3	3	1
7	卵巣癌	腹膜	便秘、腹部膨満感	3		3	3		
8	前立腺癌	骨	倦怠感、肩痛	4	4	1		3	
9	膀胱癌	肺、胸膜	肩凝り	2	1			1	
10	膵癌		腰痛	1		1		1	
11	肺癌		四肢のしびれ	18	17			2	
12	胃癌	肝、腹膜	倦怠感	4	3	2		1	
13	胃癌	肝	下肢のだるさ	3				1	
14	肺癌		背部痛	2	2				
15	乳癌		上肢のしびれ	1	1			1	

治療前後において MDASI-J による改善を認めた症状は、疼痛、倦怠感、しびれであった。また、症状毎に 3 ポイント以上の改善を認めたものは、疼痛 2 回、倦怠感 3 回、嘔気 2 回、不眠 5 回、呼吸苦 3 回、食思不振 5 回、便秘 3 回、眠気 5 回、口渇 4 回、抑うつ気分 3 回、しびれ 4 回であったが、増悪をみとめたものは嘔気 1 回、不眠 5 回、呼吸苦 2 回、食思不振 1 回、便秘 1 回、眠気 5 回、口渇 1 回、抑うつ気分 1 回であった。

さらに、1 回でも 3 ポイント以上の改善を認めた症例数は 6 例であり、内訳は不眠、食思不振、眠気、口渇が 4 例、倦怠感、呼吸苦、しびれが 3 例、疼痛、便秘、抑うつが 2 例、嘔気が 1 例であった。

QOL は治療前と治療後は各々 4.2 ± 1.0 、 4.4 ± 1.2 であり、有意な改善は認められなかったが、6 回において 2 ポイント以上の改善を認めたが、2 回において増悪を認めた。

治療開始から死亡日までの日数は 30.5 ± 22.3 (平均 \pm 標準偏差) 日、中央値 21.5 日、最終治療日から死亡日までの日数は平均 12.8 ± 6.9 日、中央値 12.0 日であった。

表 2 鍼治療前後での MDASI-J の変化

症状	治療前*	治療後*	P 値
疼痛	4.1 ± 2.3	3.4 ± 2.3	<0.001
倦怠感	4.4 ± 1.5	3.8 ± 1.6	0.032
嘔気	1.4 ± 2.3	1.1 ± 2.4	0.230
不眠	2.4 ± 2.3	2.5 ± 2.4	0.882
呼吸苦	3.5 ± 2.3	3.2 ± 2.0	0.302
食思不振	2.9 ± 3.1	2.5 ± 2.7	0.136
便秘	1.1 ± 2.1	0.9 ± 1.8	0.393
眠気	3.1 ± 2.6	3.1 ± 2.2	0.894
口渇	5.1 ± 2.4	4.6 ± 2.3	0.103
抑うつ気分	2.7 ± 3.2	2.3 ± 3.1	0.133
しびれ	4.1 ± 2.2	3.4 ± 2.3	0.004

*平均値 \pm 標準偏差

考 察：

本研究においては、患者の包括的評価として MDASI-J を用いることにより、潜在的な苦痛症状を明らかにし、本治法も加えることによる治療効果の変化を検討した。MDASI-J の変化に着目すると全体の平均としての変化は疼痛、倦怠感、しびれと限られた症状の改善にとどまったが、個々の治療の前後で比較すると大きな変化が認められていた。このことから、鍼治療の効果を検討する際には全体の変化のみにとらわれることだけではなく、症例蓄積を重ねていくことの意義も考慮しなければならないと考えられる。

鍼治療に関する多くの研究は標治が主体であり、中医学に基づく診断から本治も行った研究はほとんどない。患者の状態は流動的であり、実際に本研究においても治療毎に証が変化することが明かになった。このことは鍼治療に関する研究を行う上で熟慮されるべき点であるが、施術者の経験や力量によるバイアスや再現性の点で limitation のひとつとなると考えられる。

今後は症例数の蓄積により、治療効果が期待できる症状、時期などがより明確にされうる。鍼治療を通常の緩和医療に取り入れることにより、薬物療法以外の strategy が豊富になり、しいては終末期がん患者の QOL 向上の一助となりうる可能性がある。

参考文献：

1. Kwok OL, et al. Symptom distress as rated by advanced cancer patients, caregivers and physicians in the last week of life. *Palliat Med* 2005; 19: 228-233.
2. Bullinger M. Quality of life assessment in palliative care. *J Palliat Care* 1992; 8: 34-39.
3. Deng GE, et al. Integrative Oncology Practice Guidelines. *J Soc Integr Oncol* 2007; 5: 65-84.
4. NIH Consensus Conference, Acupuncture. *JAMA*. 1998; 280: 1518-24.
5. Takahashi H. Effects of acupuncture on terminal cancer patients in the home care settings. 20th Annual AAMA Symposium 2008.
6. Helms JM. Acupuncture energetics: a clinical approach for physicians. Berkeley, California: Medical Acupuncture Publishers, 1995
7. Filshie J. Safety aspects of acupuncture in palliative care. *Acupuncture in Med* 2001; 19: 117-122.
8. Groenvold M. The development of the EORTC QLQ-C15-PAL: A shortened questionnaire for cancer patients in palliative care. *Eu J Cancer* 2006; 42: 55-64.

注：本研究は、第 15 回日本緩和医療学会学術大会および第 18 回日本ホスピス・在宅ケア研究会にてポスター発表予定。

作成日：2010 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 5 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 村 松 正 明 
所属機関名： 東京医科歯科大学難治疾患研究所
所属部署名： 分子疫学分野 職名： 教授
所 在 地： 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10
電 話： 03-5280-8060 内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

中国漢民族における CIDEA 遺伝子多型と肥満との相関に関する研究

3. 成果の概要

CIDEA (Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor Alpha-like Effector A) 遺伝子はミトコンドリアにおける基礎代謝を介して体重調節に重要な役割を果たすことが知られている。私達は日本における先行研究において CIDEA 遺伝子 V115F 変異 (dpSNP:rs45619832) が肥満に影響していることを日本人集団において報告した。そこで本研究においては、CIDEA 遺伝子 V115F 多型が中国間民族集団においてと肥満との相関関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

中国漢民族サンプルは北京首都医科大学において、新規に高血圧と診断された患者 (n=351, 男:163、女:188) を用いた。解析の結果、CIDEA 遺伝子 V115F は腹部肥満、メタボリック症候群発症リスクと関連しており、CIDEA 遺伝子 T allele がそれぞれの表現型のリスク因子であることが明らかになった。即ち体重、BMI、ウエスト囲、ヒップ囲、WHR、中性脂肪(TG)において、CIDEA 遺伝子の TT +TG 遺伝子群は GG 遺伝子群に比較して有意に高かった (P<0.05)。脂質代謝異常、腹部肥満とメタボリックシンドロームとの発症率も TT +TG 遺伝子群は GG 遺伝子群に比較して有意に高かった (P<0.05)。ロジスティック解析によると、T アレル優性モデルにおいてガリスク比は過体重 (OR=1.83, 95% CI: 1.13-2.97)、肥満 (同 1.91, 1.08-3.36)、腹部肥満 (同 2.38, 1.45-3.92)、脂質代謝異常 (2.09, 1.28-3.43) とメタボリック症候群 (同 2.36, 1.42-3.92) であった。本研究において中国人においても、日本人と同様な遺伝子-形質の関連を CIDEA 遺伝子に

認めることができた。このようなゲノム情報を取り入れた疫学は、中国においては未だに新しい段階の研究であり、今後より発展して行く事が期待される。

※ 発表論文等

1. Zhang L et al. Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor Alpha-like Effector A (CIDEA) Gene V115F (G/T) Polymorphism Is Associated with Phenotypes of Metabolic Syndrome in Chinese Population. *submitted*
2. Zhang L et al. Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (CIDEA) gene V115F (G/T) polymorphism is associated with obesity and metabolic syndrome in Chinese. Abstracts in International Journal of Cardiology. Vol.137, Suppl.1, pS115. World Hypertension Congress Inconjunction with the 11th International Symposium on Hypertension and Related Diseases. Oct,29-Nov,1,2009, Beijing,China.

4. 研究組織

日本側研究者氏名:村松 正明
所属機関名:東京医科歯科大学
中国側研究者氏名:張 玲
所属機関名:首都医科大学

職名:教授
部署名:難治疾患研究所分子疫学分野
職名:講師
部署名:公衆衛生と家庭医学学院

中国漢民族におけるCIDEA遺伝子V115F多型と肥満との関連に関する研究

研究者氏名	教授 村松 正明
日本所属機関	東京医科歯科大学難治疾患研究所分子疫学分野
中国研究機関	首都医科大学公衆衛生と家庭医学学院
指導責任者	教授 村松 正明
共同研究者	張 玲、戴 穎、辺 麗麗、王 崑、華 琦

要旨

CIDEA遺伝子の非同義一塩基多型V115F (G/T) は、肥満とメタボリック症候群 (MetS) に関連する新しい候補遺伝子であると考えられる。しかし中国漢民族においては、CIDEAの影響は明らかにされていない。そこで本研究では、CIDEAのSNPと、肥満およびMetSの関連を中国において検討した。対象は新規に本態性高血圧と診断された中国漢民族患者351人 (平均年齢51y、男：46%、女：54%) であり、横断研究を行った。理学的所見、生化学検査等およびCIDEA V115F SNPを測定した。その結果、体重、腹囲、血清トリグリセリド値、高脂血症、腹部肥満など複数のMetS形質とCIDEA遺伝子V115Fの関連を認めた。多変量解析の結果、GG遺伝子型グループにおいてはTT+TG遺伝子型グループより高値であり、オッズ比はそれぞれ体重 (OR=1.83, 95%CI:1.13-2.97)、肥満 (1.91:1.08-3.36)、腹部肥満 (2.38:1.45-3.92)、高脂血症 (2.09:1.28-3.43)、およびMetS発症 (2.36:1.42-3.92) であった。以上のようにCIDEA遺伝子は中国漢民族においてMetSとその関連した表現型の危険因子であると結論した。

キーワード: CIDEA、一塩基多型、メタボリック症候群、肥満、交互作用

緒言

メタボリック症候群 (MetS) は過食、運動不足といったライフスタイル因子に依るところ大きいものの、遺伝子もその発症に大きく関与しており、この両因子が絡み合って発症すると考えられる。MetSの病態にはインスリン抵抗性、持続的炎症反応が知られており、これによって慢性的な代謝異常が引き起こされる。近年、肥満やMetSに関連する多くの遺伝子が発見されたが、これらの結果は異なった民族でも再現されるかどうか十分に検証される必要がある。

CIDEA遺伝子はモデルマウスの実験より、エネルギー代謝に重要な機能を担っている事が明らかにされた。またCIDEAは脂肪酸代謝にも関連している事が知られている。血中に遊離脂肪酸を過剰に負荷すると、インスリン抵抗性および高脂血症となるが、この理由として最も支持されている仮説は、炎症性サイトカインTNF- α の活性を抑制することを介して、CIDEAが脂肪質の分解を低下させる、あるいはCIDEAが中性脂肪をエステル化することによって、脂肪細胞に脂質滴を保存させることであると考えられている。このようにCIDEAの機能障害によって、MetSに繋がる種々の代謝異常が誘発される可能性が示唆されている。

一方、家系解析等より肥満、中性脂肪濃度、空腹時血糖、糖尿病と関連する連鎖領域として染色体18p11が知られていた。CIDEAはこの領域の中にある候補遺伝子としても見出された。CIDEAは、4つのイントロンと5つのエクソンを持ち長さが23.22キロ塩基対ある。CIDEAには唯一の非同義SNP、V115Fが存在する。スウェーデン人において、Gアレル (Vをコード) が肥満のリスクであることが報告された。一方、日本人における追試実験では、CIDEA Tアレル (Fをコード) が日本人のリスクであることを私達は報告した。これらのCIDEA遺伝子多型と肥満・MetSの形質の関係は相反する結果であり、更なる検討が必要である。そこで本研究では、MetSとその関連した表現型の上で中国人集団内でV115F多型の影響を検討した。私達の知る限りでは、これは中国において実施されたはじめてのCIDEAの疾患関連研究である。

対象と方法

参加者は、2007年に首都医科大学付属玄武病院において新しく本態性高血圧と診断された中から任意に選択された患者である。参加者合計351人、163人の男性と188人の女性であり、年齢は50.86の±6.14年、年齢分布は18歳から86歳である。悪性腫瘍、重度の心血管疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、痴呆、結核、後天性免疫不全症候群、感染症等の重篤な余病を持つ患者は除外した。各々の参加者は面談し、標準化されたアンケート取った。身体検査とインタビューは、訓練された看護婦と医者によって行われた。総コレステロール（TC）、高密度リポタンパク質-コレステロール（HDL-C）、トリグリセリド（TG）と空腹時血糖（FPG）は、ルーチン方法で測定した。すべての参加者より書面によるインフォームドコンセントを得ており、本プロトコルは、首都医科大学の倫理委員会で承認を受けた。

肥満、MetSの定義は中国において推奨されている2005年IDF最新版の基準に従った。即ち、中心肥満（腹囲：男性の90cm、女性の80cmを持ち、且つ1）高血圧：140/90mmHg以上、または高血圧治療の既往；2）高トリグリセリド血症：空腹時トリグリセリド1.7mmol/L、以上；3）低HDL：空腹時のHDLコレステロール男性：1.0mmol/L以下、女性：1.3mmol/L以下、；4）高血糖：空腹時血糖5.6mmol/L以上、のいずれか二項目がある事である。DNAは、-80℃で凍結保存された全血サンプルより標準的な方法により抽出した。PCR反応は50 μL溶液：5μL 10×PCR Buffer（50mM, KCl, 20mM, Tris-HCl）、1μL：Fプライマー（20pmol/L）、1μL：Rプライマー（20pmol/L）、4μL dNTP混合物（2.5mM）、0.25のU Taqポリメラーゼ、2μL DNA、で行った（30秒間の94° C変性、30秒間の52° Cアニーリング、1分間の72° C伸張反応を40回繰り返した。遺伝子タイピングはPSQTM 96 MA機械（ジーン社、HK）で行った。最後に94° Cで変性し、pyrosequencing法にてタイピングをした。統計解析にはソフトウェアSPSS 13.0（SPSS Inc, Chicago, IL, USA）を使用し、カイ二乗検定、フィッシャー正確検定、一方向性分散分析、ロジスティック回帰分析を行った。すべての確率値は両側検定で $p < 0.05$ の時に統計学的に有意である判定した。

結果

CIDEA遺伝子多型V115F(G/T)を測定したところ、GG、GT、TT遺伝子型頻度は、29.91%、50.71%、19.48%であった。遺伝子型分布は、Hardy-Weinbergの平衡に従っていた。体重、腹囲、腰囲、腹腰比率、BMI、および中性脂肪において、TT+TGグループがGGグループより高値だった（ $p < 0.05$ ）。年齢、SBP、DBP、TC、HDL-CとFPGに関しては3つの遺伝子型グループによる有意差はなかった。

MetSの各形質の有病率は、MetS：46.64%、肥満：28.21%、腹部肥満：65.81%、高脂血症：41.10%、高血圧：69.80%、空腹時高血糖：35.04%だった。腹部の肥満と同様にMetSの流行、異脂肪血症はTT+TGグループでGGグループ（ $P < 0.05$ ）のそれより高かった。全体的な肥満において、女性より男性で高かった（32.5%対22.9%）。

TTグループとTGグループはMetSに関連した大部分の変数でGGグループより同じ程度に高いレベルを示したので、以下の分析はTT+TGグループを1つにまとめてTキャリアーとし、GGグループと比較した。GGグループと比較してTキャリアーでは代謝性障害と相関しているパラメータが高値だった。体重（74.08の±17.50対66.76の±12.39）、腹囲（90.26の±12.08対84.64の±12.08）、腰囲（103.07の±9.61対99.55の±11.83）、WHR（0.88.11±0.11対0.85の±0.07）、HDL-C（50.64の±46.18対53.58の±27.72）BMI（26.59の±5.40対24.54の±3.78）、FPG（104.95の±34.12対98.06の±22.01）、TG（176.66の±126.52対138.81の±96.96）で有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。

単純回帰分析の結果、TキャリアーグループがGGグループに比べて持つ危険度は、過体重（OR=1.82, 95%CI: 1.14-2.90）肥満 1.92（1.10-3.36）、腹部肥満 2.16（1.35-3.46）、高脂血症 2.10（1.29-3.42）とMetS 2.17（1.35-3.39）であった。年齢、性、BMIで調節される多重ロジスティック回帰分析では、関連は減弱したが、統計的有意性は維持された。以上よりCIDEA遺伝子V115F(G/T)遺伝子型はMetSの代謝性障害の形質との間に有意な関係があると結論した。

考察

中国において肥満や MetS の人口は急速に拡大しており、その対応が急がれる。本研究において、CIDEA 遺伝子が始めて中国漢民族における MetS 代謝性障害と関連している事を始めて見出した。CIDEA は肥満のための新しい候補遺伝子としてこれまで注目されてきた。始めはスウェーデン人における研究において、CIDEA V115F (G/T) が肥満と関係がある事が報告された。続いて日本人においても CIDEA V115F (G/T) が MetS の形質と関連していることが示された。しかしスウェーデン人においては、リスクアレルはGアレルであり、日本人においては、リスクアレルはTアレルであり、正反対の結果となっていた。今回、中国人を対象とした研究の結果、CIDEA V115F (G/T) が肥満などの代謝障害形質と関連し、Tアレルがリスクアレルであることが明らかとなった。これは日本人を対象とした研究結果と基本的に同じであり、少なくともアジア人においてはTアレルキャリアーが高リスクであることを支持する。中国人、日本人とスウェーデン人の間でこのような違いが生まれた原因は、当該の遺伝子多型を含む haplotype ブロックの異質性あるいは北ヨーロッパとアジアの環境違いによって説明されるかもしれない。本横断研究は高血圧外来受診の患者で行われたが、高血圧の有無で、CIDEA 遺伝子多型の効果を比較すると、明らかに高血圧群の方が肥満・MetS 形質との関連が強く見られた。このことは高血圧が CIDEA 遺伝子多型と交互作用を起こしている事を示唆しており、この点は更なる研究が必要である。

以上、本研究は CIDEA 遺伝子 T アレルが中国人の MetS を起こす代謝性障害の表現形質の危険因子であることを明らかにした。

注：本論文 “Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor Alpha-like Effector A (CIDEA) Gene V115F (G/T) Polymorphism Is Associated with Phenotypes of Metabolic Syndrome in Chinese Population.” Zhang L. et al は現在投稿中。

作成日：2010年3月5日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：渡邊 泰男
所属機関名：昭和薬科大学
所属部署名：薬理学研究室 職名：教授
所在地：東京都町田市東玉川学園 3-3165
電話：042-721-1511 内線：2120



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

神経因性疼痛における一酸化窒素の分子病態：カルシウム受容キナーゼの調節機構

3. 成果の概要

ラット神経因性疼痛モデルにおいて、後根画分の一酸化窒素修飾タンパクの検出を行ったところ、損傷側に有意にニトロソ化タンパクの上昇が検出された。一方、分子・細胞レベルでの解析の結果、カルシウム受容キナーゼのカルモデュリン（CaM）キナーゼ I が、部位特異的なグルタチオン化修飾を受けることによって酵素活性が可逆的に阻害されることを見出した。このことは慢性疼痛における新しい作用機構解明に役立つと思われる。

※発表論文等

平成 21 年 10 月 21 日-24 日 第 82 回日本生化学会大会（神戸）にて口演発表、現在 FEBS Lett で改訂中。平成 22 年 3 月 16 日-18 日第 83 回日本薬理学会年会（大阪）にてシンポジウム発表予定。

4. 研究組織

日本側研究者氏名：渡邊 泰男	職名：教授
所属機関名：昭和薬科大学	部署名：薬理学
中国側研究者氏名：宋 涛	職名：准教授
所属機関名：中国医科大学付属第一病院	部署名：麻酔科

神経因性疼痛における一酸化窒素の分子病態：カルシウム受容キナーゼの調節機構

日本側研究者氏名 渡邊 泰男

所 属 機 関 昭和薬科大学薬理学研究室 教授

中国側研究者氏名 宋 涛

所 属 機 関 中国医科大学附属第一病院麻酔科 准教授

要旨

細胞は様々なレドックス反応「レダクション(還元)とオキシデイション(酸化)」を基本として維持されている。近年、このレドックス代謝に異常を起こすことが、脳梗塞、脊髄損傷、脳神経変性疾患等の種々の疾患に密接に関与している可能性が強く指摘されている。また、これらの中樞神経障害に一酸化窒素(NO)が関与することが報告されている。そして、このNOによる中樞神経細胞死はNO由来の反応性窒素酸化物による生体機能分子のレドックス制御機構の乱れによる可逆的修飾であるグルタチオン化やニトロソ化を介して発現することも示唆されている。一方、脳神経系において、神経成長、成熟に関わる細胞内情報伝達はカルシウム/カルモデュリン(Ca^{2+}/CaM)によって活性化されるカルシウム受容リン酸化酵素、CaMキナーゼ群が絡んでいる可能性が示唆されている。近年、このCaMキナーゼ群ならびにNOが、神経因性疼痛等の種々の慢性疼痛に密接に関与している可能性が強く指摘されている。しかし、これまでに、神経因性疼痛のメカニズムをCaMキナーゼ群のNO応答性ならびにレドックス反応性に着目して行われた研究はない。そこで、本研究課題では、神経因性疼痛の分子病態をNOとカルシウム受容キナーゼの相互作用で理解し、予防法・治療法の基盤を築くことを目的とした。その結果、ラット脊髄神経損傷モデルにおいて、後根画分のNO修飾タンパクの検出を行ったところ、損傷側に有意にニトロソ化タンパクの上昇が検出された。一方、分子・細胞レベルでの解析の結果、CaMキナーゼIが、部位特異的なグルタチオン化修飾を受けることによって酵素活性が可逆的に阻害されることを見出した。これらレドックス応答分子としてのキナーゼ群ならびにタンパクの制御機構解明は、脳神経傷害における新たなレドックス制御薬の理論的基礎研究として位置付けられる。

Key Words 神経因性疼痛、CaM キナーゼ、一酸化窒素、ニトロソ化、グルタチオン化

緒言

近年、脳梗塞、変性疾患による中枢神経障害に一酸化窒素(NO)を始め様々なタンパク質リン酸化酵素が関与することが

報告されている。中でも、カルシウム/カルモデュ

リン (Ca^{2+}/CaM) によって活性化されるリン酸化

酵素 CaM キナーゼは、神経シナプス形成、記憶・

学習に関わる機能分子でもあることが広く研究さ

れてきている。これまでに、私共は神経における

NO 産生の律速酵素である神経型 NO 合成酵素

(NOS) の CaM キナーゼによる部位特異的リン

酸化が NO シグナルを負に制御していることにより脳梗塞や神経伝達物質ドパミン信号系において重要な役割を果たして

いることを示唆してきた (図) [1-4]。

ところで、NO によるシグナル伝達には可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化による cGMP を介する経路と、cGMP

に依存しないものがある。前者は、血管内皮依存性 NOS による血管平滑筋弛緩反応に代表される情報伝達メカニズムで

脳循環や血圧調節に関与する。後者の場合、NO そのものというより、NO 由来の反応性窒素酸化物による生体分子のシ

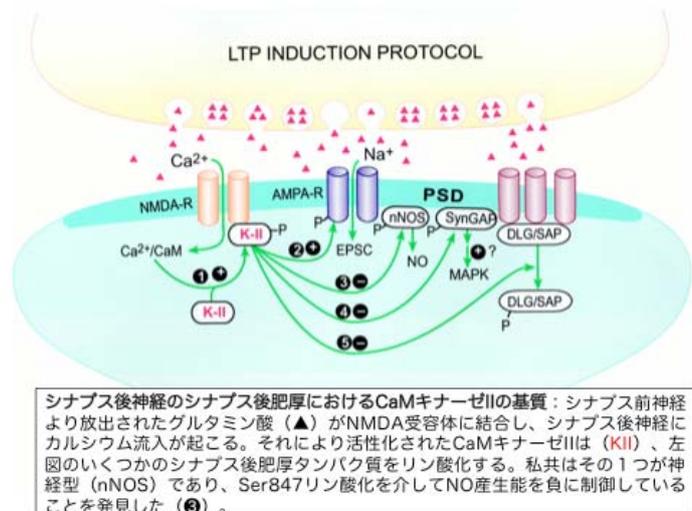
ステインチオールグルタチオン化 (RSSG) やニトロソ化 (RSNO) 反応を介するものである。近年、この後者の反応

性窒素酸化物などによる生体分子修飾が、脳神経変性疾患等の種々の疾患に密接に関与している可能性が強く指摘されて

いる。私共はこれまでに、CaM キナーゼ II の部位特異的システインチオールのニトロソ化によってキナーゼ活性が可逆的

に阻害され、脳虚血時の CaM キナーゼ II 活性の低下がこの部位特異的 NO 修飾によることを示唆した [5]。本研究課題では、

近年、いくつかの神経機能がそれにより調節されているとされる CaM キナーゼ I のレドックス応答性の分子基盤ならびに、



その脳神経細胞機能を明らかにすることを目的とした。そして、ペインクリニックでも重要懸案である神経因性疼痛のメカニズムを機能分子のレドックス応答性解析の為、ラット神経因性疼痛モデルにおける髄後根画分でのレドックス応答タンパク質の検索を行った。

方法

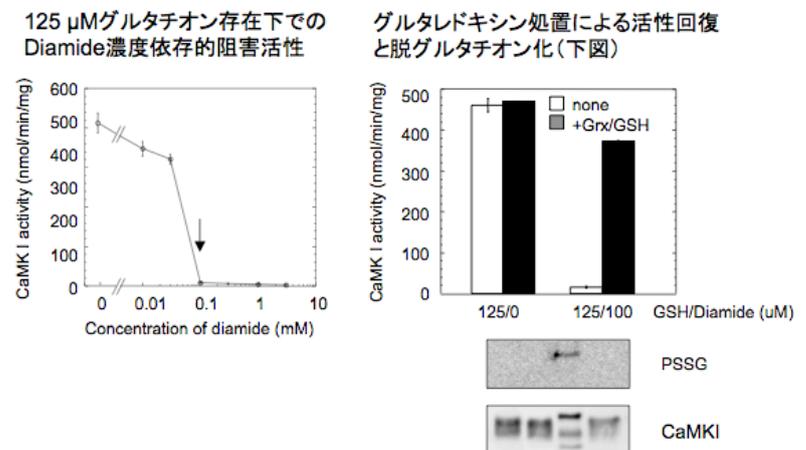
神経因性疼痛モデルラットは、手技的な変動が少ない脊髄神経結紮モデルを用いた。腰髄後根画分での不特定多数の修飾タンパクの検出は、抗ニトロソ化タンパク抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。CaM キナーゼ I のレドックス応答性の解析には、酸化ストレス刺激として SH 基選択性酸化剤(diamide)ならびに還元型グルタチオンを使用した。リコンビナント CaM キナーゼ I は大腸菌発現系にて精製し、キナーゼ活性測定には $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ から合成ペプチド基質 (シグナイド 2) への ^{32}P 転位の検出によって行った。酸化修飾部位および種類解析は、CaM キナーゼ I の分子内のシステイン残基の点変異体および ESI-四重極型 MS による質量分析法にて行った。グルタチオン化タンパクの検出には抗グルタチオン化抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。

結果

1) CaM キナーゼ I のグルタチオン化による活性阻害

リコンビナント CaM キナーゼ I を Diamide (0-3 mM) および還元型グルタチオン(125 μM) 処置し、酵素活性を測定すると 100 μM Diamide でほぼ完全に阻害された。この処置により CaM キナーゼ I がグルタチオン化されていることが、抗グルタチオン抗体を用い

図 1 Diamide/グルタチオン処置によるCaMキナーゼI活性阻害



確認できた。さらに、阻害された酵素活性は、脱グルタチオン化酵素であるグルタレドキシシンによって回復され、同時に

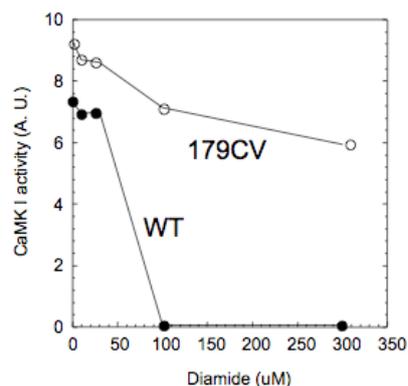
脱グルタチオン化も観察された (図 1)。

2) Cys179 修飾による CaM キナーゼ I 活性阻害

CaM キナーゼ I の活性中心近傍の Cys179 の変異体(179CV)ミュータントのリコンビナント酵素を作成した。そして、Diamide/グルタチオン処置による CaM キナーゼ I 活性阻害を野生型と比較した。179CV は 125 μ M グルタチオン、0-300 μ M Diamide 存在下で、酵素活性に大きな変化は見られなかつ

た (図 2)。CaM キナーゼ I は Cys179 以外に 9 つの Cys 残基を有するがどの点変異体も Diamide/グルタチオン処置による活性低下には抵抗性を示さなかつた (データ表示せず)。

図2 Cys179を介したグルタチオン化によるCaMキナーゼIの活性阻害



3) CaM キナーゼ I の Cys179 残基のグルタチオン化修飾の検出

Diamide/グルタチオン処置によって

Cys179 にグルタチオン化修飾が見られるのかを、処置酵素のプロテアーゼ分解後、

ESI四重極型 MS による質量分析法によ

って解析を行った。73% のペプチド回

収率で 10 個の Cys 残基のうち 3 つの

Cys 残基を含むペプチド (Cys179, Cys267, Cys349) が回収された。そのどの Cys 残基にもグルタチオン化修飾が検出された

(表)。

プロテアーゼ処置後のCys残基を含むペプチドのグルタチオン化検出

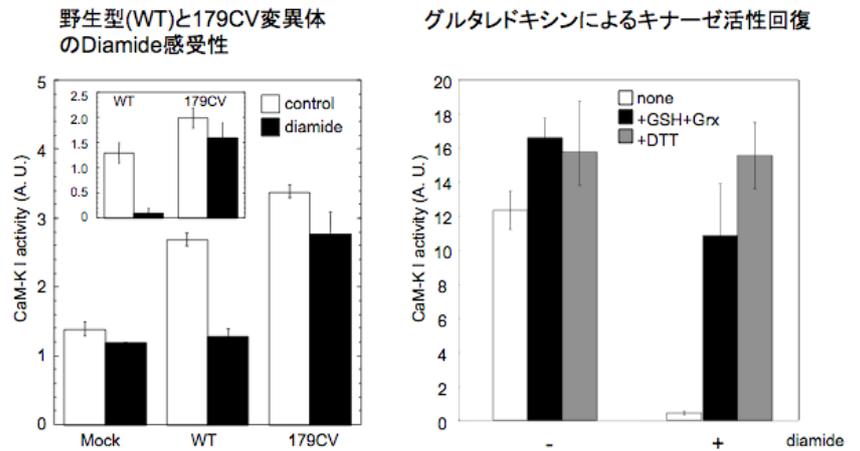
Amino acid sequence	Modification	ESI (m/z)
170-188	DPGSVLSTACGTPGYVAPE	1063.47
176-190	STACGTPGYVAPEVL	885.39
176-195	STACGTPGYVAPEVLAQKPY	786.38
265-275	FTCEQALQHPW	832.87
336-349	ELLTPTAGGPAAGC	781.86

4) 細胞内 CaM キナーゼ I のグルタチオン

化による活性制御

Hela 細胞に野生型と 179CV 変異体の CaM キナーゼ I を遺伝子導入し、Diamide(1 mM) 処置後、CaM キナーゼ活性を測定した。野生型では Diamide 処置により酵素活性は殆ど消失したが、179CV 変異体は抵抗性を示した。

図3 Hela細胞におけるCaMキナーゼIの酸化ストレスによる活性阻害



さらに、野生型の酵素活性消失は、その後のグルタレドキシン処置によって回復が見られた (図 3)。

5) ラット神経因性疼痛モデルにおける髄後根画分でのレドックス応答タンパク質の検索

脊髄神経結紮モデルを用い、腰髄後根画分での不特定多数の修飾タンパクの検出を、抗ニトロソ化タンパク抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。障害側でのニトロソ化タンパクは健側側に比べて有意に増加していることが分かった (図 4)。なお、障害側でのバンドは還元剤処置によって消失することを確認した (データ表示せず)。

図4 損傷側 健側



Anti-SNO抗体

考察

以上のように、今回の助成では、NO 信号系制御の新しい作用機序の解明を通して、NO 信号系制御薬創製の分子基盤を築くことが出来た。つまり、CaM キナーゼ群が直接 NO の修飾を受けその活性が可逆的に制御されているという概念を確立できた。これまでに、レドックス制御の乱れが、脳神経細胞障害を引き起こすとされている。実際に、いわゆるレド

ックス制御薬が、急性期脳梗塞の治療に使われている。しかしながら、各レドックス疾患において主因となる酸化ストレス系は単一でないことから、フリーラジカル消去薬だけで全てのレドックス疾患を効率的に治療するには限界があり、今後は各疾患の信号系に特化したレドックス疾患治療に貢献する新しいレドックス制御薬の登場が待たれる。私共はこれまで、キナーゼシグナルによる活性窒素シグナルの制御機構を報告してきた。その中で、私共が見出したレドックス応答分子としてのCaMキナーゼ群の制御機構は、神経傷害において防御的分子であるCaMキナーゼ群と攻撃的分子である酸化ストレスのクロストーク理解において新展開であり、新たなレドックス制御薬の理論的基礎研究として位置付けられる。神経因性疼痛モデルでは脊髄でのNO産生が亢進していることが判明しているため、今回得られた障害側の腰髄後根画分でのニトロソ化タンパクの検出は今後その標的分子の同定を通して、慢性疼痛における新しい作用機構を明らかにすることができると思われる。現在、CaMキナーゼ群のニトロソ化ならびにグルタチオン化の検出をしているところである。今後は脳虚血、神経損傷、クモ膜下出血などの中枢神経疾患の分子病態を広く生体機能分子のレドックス制御破綻として捉え、レドックス制御薬開発の基盤研究を展開させたい。

参考文献

- [1] T. Song, N. Hatano, K. Kume, K. Sugimoto, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by phosphorylation at Threonine1296 in NG108-15 neuronal cells. *FEBS Lett.* 579 (2005) 5658-5662.
- [2] Y. Hayashi, M. Nishio, Y. Naito, H. Yokokura, Y. Nimura, H. Hidaka, and Y. Watanabe, Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20597-20602.
- [3] K. Komeima, Y. Hayashi, Y. Naito, and Y. Watanabe, Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28139-28143.
- [4] T. Song, N. Hatano, M. Horii, H. Tokumitsu, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS Lett.* 570 (2004) 133-137.
- [5] T. Song, N. Hatano, T. Kambe, Y. Miyamoto, H. Ihara, H. Yamamoto, K. Sugimoto, K. Kume, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 412 (2008) 223-231.

注：本研究は、平成21年10月21日-24日 第82回日本生化学会大会（神戸）にて口演発表、現在FEBS Lettで改訂中。

平成22年3月16日—18日第83回日本薬理学会年会（大阪）にてシンポジウム発表予定。

作成日：2010年3月10日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2010 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：塚本徹哉
所属機関名：藤田保健衛生大学医学部
所属部署名： 第一病理学 職名：准教授
所在地：愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98
電 話：0562-93-2440 内線：



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

スナネズミモデルにおけるグリチルリチン酸の *H. pylori* 感染胃発癌への予防効果

3. 成果の概要

甘草の主成分であるグリチルリチン酸の加水分解産物グリチルレチン酸は、*H. pylori* 感染スナネズミ胃底腺および幽門腺胃粘膜において、好中球、単核球浸潤を抑制し、粘膜上皮の過形成や潰瘍形成も軽減したことから、有力な抗炎症効果を有する事が確認された。

※発表論文等

第68回日本癌学会学術集会（2009年10月1日、横浜、示説発表）

「スナネズミにおけるグリチルリチン酸の *H. pylori* 感染胃炎への抑制効果」

4. 研究組織

日本側研究者氏名：塚本 徹哉

職名：准教授

所属機関名：藤田保健衛生大学医学部

部署名：第一病理学

中国側研究者氏名：曹 雪源

職名：副教授

所属機関名：吉林大學第一病院

部署名：胃腸外科

スナネズミモデルにおけるグリチルリチン酸の *H. pylori* 感染胃発癌への予防効果

日本側研究者氏名	准教授 塚本徹哉
所属機関名	藤田保健衛生大学医学部病理学 I
中国側研究者氏名	副教授 曹 雪源
所属機関名	吉林大学第一病院

要 旨:

ヘリコバクター・ピロリ菌(*H. pylori*)感染は、慢性胃炎、胃発癌に非常に重要な役割を果たしており、その除菌あるいは炎症の制御によるヒト胃癌の予防が急務である。しかし、抗生物質耐性菌の出現や除菌に伴うコストの問題も発生しており、それに代わる新しい安価かつ安全な天然資源の探索が注目されている。今回、スナネズミモデルを用いて、甘草に含まれる天然物質グリチルリチン酸の *H. pylori* 感染による慢性胃炎の抑制作用を検討した。スナネズミに *H. pylori* を強制胃内投与し、2 週間からグリチルリチン酸の加水分解産物であるグリチルレチン酸 (GA) を 0.1% の濃度で混餌投与し、20 週後に屠殺した。*H. pylori* 感染スナネズミの胃底腺粘膜における好中球および単核球浸潤の程度 (スコア: 0-3) は、対照群が 1.6 ± 0.1 、 1.3 ± 0.1 に対して、GA 投与群では、 0.9 ± 0.2 ($P < 0.05$)、 0.8 ± 0.2 ($P < 0.05$) と有意に減少した。また、幽門腺粘膜においても、対照群が 2.9 ± 0.3 、 3.0 ± 0.2 に対して、GA 投与群では、 2.2 ± 0.4 ($P < 0.05$)、 2.0 ± 0.2 ($P < 0.05$) と有意な改善が見られた。本研究により、グリチルリチン酸の投与により、*H. pylori* 感染に伴う胃炎が抑制され、胃癌発生にも効果的である可能性が示唆された。

Key Words Mongolian gerbils, stomach cancer, *Helicobacter pylori*, Glycyrrhizic acid

緒 言:

動物モデルは胃癌発生にかかわる遺伝子と環境要因の解析や化学予防候補物質の有効性を評価するに有用と考えられる。ヘリコバクターピロリ菌(*H. pylori*)除菌によるヒト胃癌発生の予防効果が臨床において期待されている。



図1. 甘草 (カンゾウ) とグリチルレチン酸

胃癌は、東アジアを中心に依然高い罹患率、死亡率を示している。*H. pylori* 感染は、慢性胃炎、胃発癌に非常に重要な役割を果たしており、その除菌あるいは炎症の制御によるヒト胃癌の予防が急務である。しかし、抗生物質耐性菌の出現やコストの問題も発生しており、それに代わる新しい安価かつ安全な天然資源の探索が注目されている。申請者らが開発したスナネズミ

胃発癌モデルは胃癌発生にかかわる遺伝子と環境要因の解析や化学予防候補物質の有効性を評価するに有用である。我々はこれまでに、梅エキス、リグナン類、さらに菜種原油中に含まれる抗ラジカル活性物質 Canolol の酸化抑制作用と胃発癌予防効果を明らかにしてきており、天然物質の胃発癌への影響についての研究基盤を確立している。

グリチルリチン酸は、植物カンゾウ（甘草）の根から抽出される抗炎症・抗アレルギー成分である。胃・十二指腸の粘膜を保護し、潰瘍の予防・炎症の改善効果があり、*H. pylori* の抑制作用も観察されている。本研究においては、*H. pylori* 感染スナネズミモデルを用いて、天然物質グリチルリチン酸の加水分解産物であるグリチルレチン酸の抗炎症効果を検討し、新しい胃癌抑制戦略を構築する事を目的とする。(図1)

対象と方法：

動物実験：グリチルリチン酸による *H. pylori* 感染慢性胃炎の抑制実験

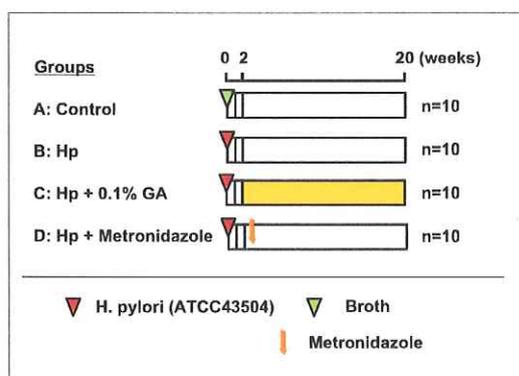
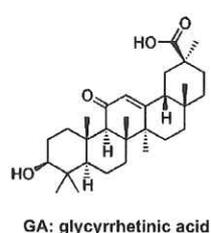


図2. 実験デザイン

5 週齢 Specific pathogen-free 雄性スナネズミ (*Meriones unguiculatus*; MGS/Sea) に、*H. pylori* 標準株 (ATCC43504, American Tissue Culture Collection) を経口胃内投与し感染させた。*H. pylori* 感染後、無処置群を B 群とした。2 週後から 0.1% グリチルリチン酸を添加した飼料を投与し C 群とした。また、メトロニダゾールを投与した群を設け、除菌効果の陽性対象とした (D 群)。非感染群を陰性対照群とした (液体培地 *Brucella* broth のみ投与、A 群)。

実験第 20 週で屠殺し、胃底腺および幽門腺粘膜における好中球 (Neutrophils)、リンパ球や形質細胞などの単核球 (Mononuclear cells)、粘膜の過形成の程度、潰瘍の程度について、病理組織学的にスコアリング (0 : ほぼ正常、1 : 軽度、2 : 中等度、3 : 高度) し、Mann-Whitney U 検定を用いて統計検算を行った。 $P < 0.05$ を有意と判断した。

結果：

動物の感染率は 90% 以上であった。*H. pylori* 感染により、強い好中球、リンパ球、形質細胞浸潤が観察された。胃粘膜の潰瘍が発生し、胃粘膜の肥厚や過形成性病変が認められた。

グリチルレチン酸投与群 (C 群)、メトロニダゾール投与群 (D 群) では、対照群 (B 群) と比較して、好中球浸潤、リンパ球浸潤の程度が有意に軽減した。また、過形成性の変化も軽減した。陰性対照群 (A 群) では、明らかな炎症所見は確認されなかった。

考察：

H. pylori 除菌によるヒト胃癌の予防効果が臨床において期待されており、抗生物質に代わる新しい天然資源の探索が注目されている。グリチルリチン酸 (Glycyrrhizic acid, GA) は、植物カンゾウ (甘草) の根から抽出される抗炎症・抗アレルギー成分である。胃・十二指腸の粘膜を保護し、潰瘍の予防・炎症の改善効果もよく知られている。本実験では、*H. pylori* による炎症の抑制作用が観察された。他の実験の類推から、抗炎症効果を

持つ化学物質は、胃粘膜における過酸化物質の過剰産生を調節し、炎症反応の軽減に寄与しているものと想定される。現在、グリチルレチン酸による胃癌抑制実験が進行中であり、胃癌の抑制に対しても期待される。

動物モデルは胃癌発生にかかわる遺伝子発現やその異常、環境要因の解析、化学予防候補物質の有効性を評価するに有用であり、胃癌動物モデルの研究を実施していくことにより、天然物質から新しいがん抑制物質の探索を可能にすると考えられる。

本研究は、胃癌を抑制する薬物を探索して、胃炎や胃潰瘍の軽減と胃癌の新しい化学予防のための戦略を確立するにも寄与するものと考えている。

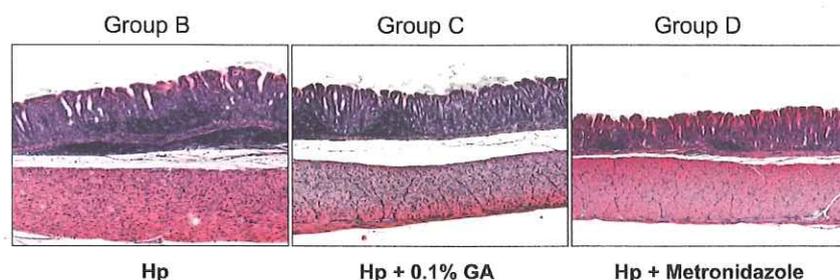


図3. 実験第12週におけるスナネズミ胃粘膜の病理組織学所見。HE染色 (対物X50)。

表 1. 胃底腺における炎症所見

Groups	No.	Treatments	Corpus			
			Infiltration of neutrophils	Infiltration of mononuclear cells	Hyperplasia	Peptic ulcer
A	10	Broth	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
B	10	Hp	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.3
C	10	Hp → GA	0.9 ± 0.2*	0.8 ± 0.2*	0.7 ± 0.2*	0.9 ± 0.2*
D	10	Hp → Metronidazol	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.2

Hp, *Helicobacter pylori*; GA, glycyrrhetic acid.

* $P < 0.05$, compared with group B. Values for results are expressed as means ± SD.

表 2. 幽門腺における炎症所見

Groups	No.	Treatments	Antrum			
			Infiltration of neutrophils	Infiltration of mononuclear cells	Hyperplasia	Peptic ulcer
A	10	Broth	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
B	10	Hp	2.9 ± 0.3	3.0 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.3
C	10	Hp → GA	2.2 ± 0.4*	2.0 ± 0.2*	1.5 ± 0.1*	1.2 ± 0.3*
D	10	Hp → Metronidazol	2.0 ± 0.4*	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.0 ± 0.0

Hp, *Helicobacter pylori*; GA, glycyrrhetic acid.

* $P < 0.05$, compared with group B. Values for results are expressed as means ± SD.

参考文献：

1. Krausse R, Bielenberg J, Blaschek W, Ullmann U. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Extractum liquiritiae, glycyrrhizin and its metabolites. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul;54(1):243-6. Epub 2004 Jun 9.
2. Kamiya S, Taguchi H. Prospect of the development of new bactericidal drugs against Helicobacter pylori for eradication therapy. *Nippon Rinsho.* 2002 Feb;60 Suppl 2:751-5.
3. Kawashima K, Fujimura Y, Makino T, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicine (XXXII): protective effects of hangeshashinto and the combinations of its major constituents on gastric lesions in rats. *Biol Pharm Bull.* 2006 Sep;29(9):1973-5.
4. Tian M, Yan H, Row KH. Extraction of glycyrrhizic Acid and glabridin from licorice. *Int J Mol Sci.* 2008 Apr;9(4):571-7.
5. Ikeda T, Abe K, Kuroda N, Kida Y, Inoue H, Wake K, Morito M, Sato T. The inhibition of apoptosis by glycyrrhizin in hepatic injury induced by injection of lipopolysaccharide / D-galactosamine in mice. *Arch Histol Cytol.* 2008 Nov;71(3):163-78.
6. Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Muranaka T. Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 16;105(37):14204-9.
7. Shiota G, Harada K, Ishida M, Tomie Y, Okubo M, Katayama S, Ito H, Kawasaki H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice. *Carcinogenesis.* 1999 Jan;20(1):59-63.
8. Arase Y, Ikeda K, Murashima N, Chayama K, Tsubota A, Koida I, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Kumada H. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer.* 1997 Apr 15;79(8):1494-500.
9. Cao X, Tsukamoto T, Seki T, Tanaka Hi, Morimura S, Cao Liyu, Mizoshita T, Ban H, Toyoda T, Maeda H, and Tatematsu M. 4-Vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (Canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *Int J Cancer.* 2008 Apr 1;122(7):1445-54.
10. Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Tanaka H, Cao L, Toyoda T, Takasu S, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Severity of gastritis determines glandular stomach carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 2007 Apr; 98(4):478-83.
11. Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Shimizu N, Mizoshita T, Kumagai T, Kaminishi M, Tatematsu M. Eradication of Helicobacter pylori induces apoptosis and inhibits proliferation of heterotopic proliferative glands in infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 2004 Nov; 95(11):872-7.
12. Takasu S, Tsukamoto T, Cao X, Toyoda T, Hirata A, Ban H, Yamamoto M, Sakai H, Yanai T, Masegi T, Oshima M, Tatematsu M. Roles of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and beta-catenin activation in gastric carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea-treated K19-C2mE transgenic mice. *Cancer Sci.* 2008 Dec;99(12):2356-64.
13. Toyoda T, Tsukamoto T, Takasu S, Shi L, Hirano N, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Cancer.* 2009 Oct 15;125(8):1786-95.

注：本研究は、2009年10月1日『第68回日本癌学会学術総会（横浜）』（68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association -PROCEEDINGS-, 2009, Yokohama, p. 129）にて示説発表した。

作成日：2010年3月6日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2010 年 3 月 5 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：井内 康輝
所属機関名：広島大学大学院医歯薬学総合研究科
所属部署名：病理学研究室 職名：教授
所在地：〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3
電話：082-257-5150 内線：



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

アスベスト（石綿）曝露による健康被害に関する日中共同研究

3. 成果の概要

アスベスト（石綿）の吸入による健康被害、ことに呼吸器障害について、

中国及び日本の研究者が集まり、第2回中日アスベストシンポジウムを開催した。
※発表論文等

Proceedings of The 2nd China-Japan Joint Asbestos Symposium

4. 研究組織

日本側研究者氏名：井内 康輝	職名：教授
所属機関名：広島大学大学院医歯薬学総合研究科	部署名：病理学研究室
中国側研究者氏名：張 幸	職名：院長兼所長
所属機関名：浙江省医学科学院	部署名：衛生学研究所

アスベスト（石綿）曝露による健康被害に関する日中共同研究

研究者氏名：井内 康輝

所 属：広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学

要旨

アスベスト（石綿）の吸入による呼吸器障害について、中国及び日本の医療関係者が共同して討議するために、第2回中日アスベストシンポジウムを開催した。その成果をまとめた報告書を、いまだアスベストの全面的な使用禁止に至っていない中国におけるアスベスト対策に役立ててもらおうことを目的にして、中国の関係者に広く配布した。

Key Words

アスベスト（石綿）、呼吸器障害、被害者補償・救済制度

緒言

アスベスト（石綿）は、繊維状の鉱物の総称であるが、耐熱性、耐火性などに優れた有用な物質として広く工業的に用いられてきた。しかし、これらを体内に吸引すると、呼吸器において石綿肺や胸膜肥厚などの非腫瘍性病変に加えて、中皮腫や肺がんなどの腫瘍性病変を発生させることが明らかとなった。1972年WHOがこれを発がん物質として指定して以降、欧米ではその使用が禁止されてきたが、日本での規制は欧米に比べ遅れ、2006年になり全面的な禁止に至った。現在日本では、この石綿への職業性曝露によって生じた呼吸器病変である石綿肺、びまん性胸膜肥厚、良性石綿胸水及び中皮腫、肺がんは労災補償制度の適応を受けることができ、一般生活環境下での曝露でも中皮腫と肺がんについては救済制度の対象となっている。

しかし、中国を含むアジア諸国ではいまだ、アスベスト（石綿）の使用規制が十分になされておらず、アスベスト（石綿）曝露による呼吸器障害発生は衆知されていない可能性がある。こうした観点から、日本におけるアスベスト（石綿）による曝露や障害に関する診断や治療法の進歩あるいはこれらの最新の研究を紹介することは、中国にとって有用な情報となるとと思われる。

そこで今回、中国・杭州において、中国と日本の研究者が一同に会し、シンポジウムを開催し、研究発表と討論によってお互いの研究の進展をはかることとした。

結果

中国からの発表の要約を以下に示す。

1. Li Tao (中国疾病予防センター)

[アスベストの生産]

- 中国で生産されるアスベストの99.9%はクリソタイルで、クロシドライトは0.1%以下である。
- 1996年の統計データでは、中国国内に120の石綿鉱山があり、うち30はかなり大規模である。これら鉱山で従事する労働者は24,300人である。
- アスベスト製品の生産工場は数千あり、それらで働く従業員は46,300人に達する。
- アスベスト製品には約200のカテゴリーがある。50%はアスベストセメント製品、20%は摩擦防止製品、10%は天井などの断熱材である。
- 1996年の鉱山の生産量は441,700トンで、世界の中で生産量第2位であり、世界の総生産量の約10%を占める。(図1)
- アスベスト製品の生産量は140,000トンで、世界の中で生産量は第3位であり、総生産量の約10%を占める。この生産量は増加を続けており、摩擦防止製品は2002年に比べ2003年は32.6%増加している。
- 長いアスベスト (amphibole) は消費量からみて不足しており、輸入が必要であり、輸入量は2003年に比べ、2004年は22.4%増加している。一方、短いアスベスト (serpentine) には国内生産分に余剰があり、輸出している。(図2)

[アスベストによる健康被害]

- 中国には80,000人のアスベスト曝露者がいて、1950年から法制度にもとづいて検診を受けている。2003年までに石綿肺と診断された例は7907例であり、塵肺症の約1%である。石綿肺が診断された時期のピークは1979～1985年であり、1985年は467例である。近年でも毎年220例が診断されている。2003年末までの死亡例は923例で、死亡率は11.67%である。死因は、混合性呼吸器疾患、循環器疾患、がんの順である。
- 疫学的研究では、アスベスト曝露者の総死亡率、がんでの死亡率、肺がんでの死亡率はそれぞれ100万人対522.9人、195.7人、72.2人である。
- 胸膜プラークは、石綿肺の51%、アスベスト曝露労働者の15%にみられる。

[職業病予防の方針]

- 2002年までに様々な職業病の予防法が作られた。
- アスベスト代替製品の開発が行われ、その使用が奨められている。
- クロシドライトは、2007年7月までに排除されるべき品目一覧にあがった。
- アスベストの代替品の研究は1980年代から始まっている。
- 多くのアスベスト企業とそれらを認める国では、アスベストのうちでクリソタイルは安全で信頼できるとしている。一方、International Labor Decision No.162では、アスベストを安全に使用することを厳密に守らなければならないことを強調している。
- 中国において、研究者の間ではアスベストの使用について議論があるが、クリソタイルはクロシドライトに比べ、その有害性はかなり低いと認識している。

[結論]

- 中国は世界の中でアスベストの生産と使用の主要国のひとつであるが、経済発展のレベルに従って、アスベストの使用の制限と禁止を行うという方針をとっている。
- アスベストを扱う地方の手工業は禁止し、小さなアスベスト鉱山も徐々に閉鎖している。
- クロシドライトを含む製品は2002年10月以降禁止し、2003年10月以降、自動車のブレーキの摩擦防止の目的での使用を禁止した。
- アスベストの代替製品について広く研究を続けている。

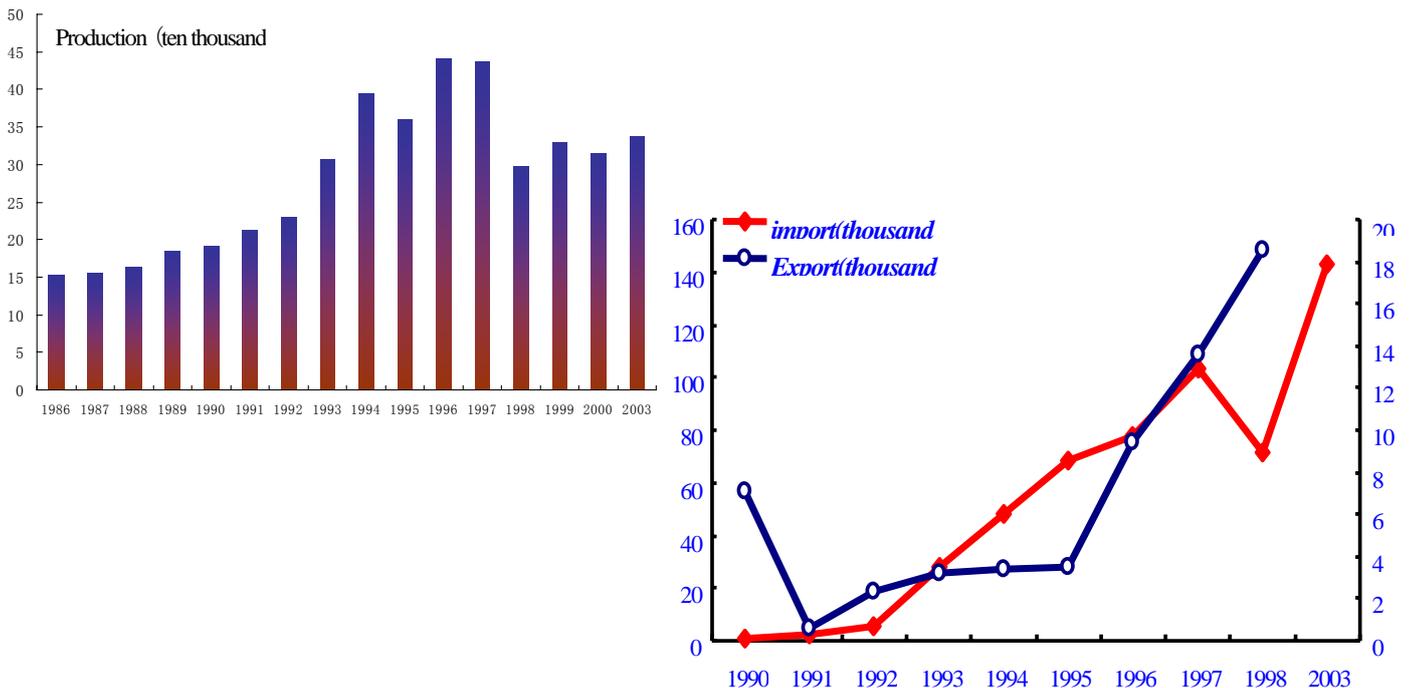


図1. 中国におけるアスベストの生産

図 2. 中国におけるアスベストの輸出入

2. Wang Mianzhen 他 (四川大学)

アスベスト製品を生産する工場の男性従業員の石綿肺と死亡のコーホート研究の結果、アスベスト濃度や曝露期間に関連して石綿肺と死亡率の上昇を認めた。

3. Lan Yajia 他 (四川大学)

石綿肺の重症度と喫煙量の相関を、石綿プラントの従業員 1814 人について検討した結果、喫煙が石綿肺の増悪因子であることが判った。

4. Jun-Qiang Chen 他 (浙江省医学科学院)

クリソタイル曝露者の死因を解明するために 2854 死亡例の死因調査を行った結果、手工業のクリソタイル紡績業に従事した女性の呼吸器疾患と肺癌による過剰死を認めた。

5. Deng Qian 他 (四川大学)

石綿を扱う労働者における石綿肺の発生の量-反応関係を知るために、石綿工場で 1 年以上勤務した 338 人の男性について調査した結果、40 年間勤務する人の石綿肺を 1%以下にする石綿の濃度は $3.9\text{mg}/\text{m}^3$ と計算された。

6. Lijin Zhu (浙江省医学科学院)

人造繊維の発がん性を、培養された気管支上皮細胞を用いて検討した結果、耐火性セラミック繊維は石綿と同様に、細胞の悪性転化を誘導した。

7. Jixian Zhang 他 (余姚市人民医院)

中国における 27 例 (男女比=8 : 19) の悪性胸膜中皮腫を臨床的に解析した。17 例が職業性に、4 例が非職業性に石綿への曝露歴があった。病理学的には上皮型 9 例、肉腫型 5 例、二相型 8 例であった。

日本からの発表の要約を以下に示す。

1. 井内康輝他 (広島大学)

石綿への曝露によって、さまざまな非腫瘍性疾患すなわち、石綿肺、良性石綿胸水、びまん性胸膜肥厚や、腫瘍性疾患すなわち、中皮腫、肺癌が生じるが、これらについて日本では、患者に対する補償あるいは救済が行われている。従って、それらを正しく診断することが、患者の治療とともに補償制度や救済制度の運用にも重要である。しかしながら、血清や胸水中の診断マーカーの検査や CT などの画像診断にも不確実性があり、最終的な診断に至らない。そこで、正しい診断に至るための病理診断が期待されるが、そこにもさまざまな困難さがあり、その克服に努力している。

2. 岡部和倫他 (山口宇部医療センター)

悪性中皮腫に対する胸膜肺全摘出術 (extrapleural pneumonectomy, EPP) には実施者によって質の差がある。演者は Dr.Sugarbaker から手法を学んでおり、その手法を紹介した。

3. 廣島健三他 (千葉大学)

胸膜肺全摘出術を受けた後、長期生存している 7 例の中皮腫例について、中皮腫の組織像を把握するとともに、腫瘍細胞における p16^{INK4A} のメチル化の有無を調べた結果、メチル化のある例では予後が悪いことが判明した。

4. 森永謙二他 (環境再生保全機構)

現在、世界のなかで石綿関連疾患について補償や救済が行われているフランス、ベルギー、オランダ、イギリス、日本の状況を紹介した。

5. 田川雅敏他 (千葉がんセンター)

Replication-competent recombinant adenovirus (Ad)を用いた中皮腫の遺伝子治療の開発のなかで、promotor-mediated

replication-competent Ad with the type 35 fiber-knob を作成し、これが中皮腫細胞に対して type 5 Ad よりつよい抗腫瘍効果をもつことを明らかにした。

6. 篠原也寸志他（労働安全衛生センター）

肺組織の中から石綿小体の定量を正しく行うために、2年間にわたる共同研究を行った。初年度に石綿小体の形や大きさに関して規準を作成した結果、翌年度には定量結果により合意がえられた。

7. 西村泰光他（川崎医科大学）

抗腫瘍免疫を司る natural killer (NK)細胞の細胞障害性は NKG2D、2β4、NKp46 などのレセプターによってコントロールされている。実験的にクリソタイルに曝露されたヒト NK 細胞の特性を調べ、NKp46 が免疫活性をはかるよい指標となる可能性が示唆された。

8. 金龍男 他（広島大学）

上皮型中皮腫の腫瘍細胞におけるアポトーシスを検討し、アポトーシス関連蛋白である survivin の高発現が caspase3 の活性化を阻害しアポトーシスを抑制していることを見出した。

考察

中国におけるアスベスト（石綿）の生産状況や輸入状況を見ると、アスベストによる健康障害の発生が日本よりほぼ20年遅れて継続する可能性が考えられる。アスベスト（石綿）の中でクリソタイルは安全であるという考え方は、アスベスト（石綿）鉱山があり、これを輸入している国あるいはそれを担う企業において述べられているが、クリソタイルが安全であるという科学的な根拠は希薄である¹⁾。事実今回の中国側からの発表でも、クリソタイル紡績業に従事する女性に大きな健康障害が認められている。

アスベスト（石綿）の使用について、厳重な管理のもとで可能という議論もある。しかし、クリソタイルは短い繊維であり、空中に飛散する可能性も高いことから、アスベスト製品を生産する工場内での管理は可能であったとしても、その製品を利用する一般の生活環境では、製品の劣化によるクリソタイル飛散と体内への吸引という危険性が常に残されると考えられる。中国においてもクリソタイルを含むアスベスト（石綿）の全面的な使用禁止が望まれる。

アスベスト（石綿）曝露によるさまざまな疾患については診断が難しい²⁾。日本においては近年、労災補償制度に加えて救済制度が発足して以降、それらの疾患の診断の精度の問題が浮上してきている。非腫瘍性疾患では、様々な原因でおこる肺の線維化の中からアスベスト（石綿）への曝露による石綿肺であることを証明していくことは難しい。また、胸水貯留あるいは胸膜肥厚という非特異的な所見も、他の原因による所見との鑑別が難しい。腫瘍性疾患では、中皮腫は病理学的診断が重視されるが、日本ではこれまでの診断を再検討すると10数%は誤診であるという結果をえている³⁾。また、肺癌についてみると、その80～90%は喫煙が主たる要因と考えられることから、それらの中からアスベスト（石綿）が原因とする根拠をいかに求めるかが問題となる。欧米では、アスベスト（石綿）への曝露歴があれば全ての患者を補償・救済するとの考えもあるが、日本ではこれらの疾患の鑑別を厳密に行うことで対処している。日本においてもこれらの制度の運用方法が変わる可能性もなくはないが、中国が補償・救済制度をどのような形で作るかについても日本を参考にすることが多いと思われる。

日本においては、アスベスト（石綿）への曝露による健康被害に関する基礎的な研究が多方面からすすめられている。これらの研究の進展は、疾患の予防や診断あるいは治療法の開発に繋がると思われ、中国においても、こうした基礎的な研究が今後展開されることが期待される。

参考文献

- 1) 神山宣彦、石綿の基礎知識、石綿ばく露と石綿関連疾患（森永謙二編）、pp17-54、三信と所、2007
- 2) 井内康輝：病理学的にみたアスベスト関連疾患の診断。肺癌 49: 83-87, 2009
- 3) Takeshima Y., Inai K. et al: Accuracy of pathological diagnosis of mesothelioma cases in Japan: Clinicopathological analysis of 382 cases, Lung Cancer 66: 191-197, 2009

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 川上 和義
所属機関名： 東北大学
所属部署名：医学系研究科 職名：教授
所在地：仙台市青葉区星陵町 2-1
電 話：022-717-7946 内線：



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答性の日中間における比較に関する研究

3. 成果の概要

宮城県南地域の病院と中国広州市中山大学医学部附属第三医院の呼吸器外来に通院中の患者に肺炎球菌ワクチンを接種し、その前後の肺炎球菌莢膜抗原に対する血清抗体濃度を測定しその推移を日中間で比較検討するとともに、中国側への抗体濃度測定法の技術移転を行うことができた。

※発表論文等

特記なし

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 川上 和義	職名：教授
所属機関名： 東北大学	部署名：医学系研究科
中国側研究者氏名： 張 天托	職名：教授
所属機関名： 中山大学	部署名：医学部

肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答性の日中間における比較に関する研究

研究者氏名 教授 川上和義
研究機関 東北大学大学院医学系研究科
共同研究者氏名 張 天托 (中山大学医学部 教授)
宮坂智充 (東北大学大学院医学系研究科
大学院生)

要旨

肺炎球菌は成人肺炎の最も頻度の高い起炎菌であり、65歳以上の高齢者や慢性心肺疾患を有する患者では肺炎球菌ワクチンの接種が推奨されている。現在使用可能な肺炎球菌ワクチン（ニューモバックス®）は胸腺非依存性抗原であるためメモリー反応が期待できず、感染予防に必要な血清抗体価がどの程度維持できるのか不明な点も多い。本研究では、中国広州市中山大学医学部附属第三医院呼吸器内科との共同研究により、肺炎球菌ワクチン接種前後で経時的に血清抗体濃度を測定することによって、ワクチンに対する免疫応答性及び抗体価の持続期間について検討するとともに、現在申請者が宮城県南地域において得ているデータと比較することで日中間の相違点について解析を実施した。宮城県南地域では、肺炎球菌莢膜血清型 6B、14、19F、23F に対する血清 IgG 抗体濃度については 14 で 3 カ月後、その他の血清型では 4 週後をピークに増加がみられた。その後、6B では接種 1 年後までピーク値に近い濃度が維持されたが、その他の血清型では接種 1 年後にはピーク値の半分近くにまで低下を示した。一方、中国での解析では、各種血清型に対する血清 IgG 抗体濃度は 19F を除き 1 カ月後にピークとなり、まだワクチン接種 6 カ月後の段階ではあるが、23F ではピーク値の約 1/3 にまで低下していた。このように、これまでの欧米からの報告と異なり、日本と中国では血清抗体濃度が比較的早期に低下する可能性が示唆され、今後のさらなる追跡調査が重要と考えられた。

Key Words : 肺炎球菌ワクチン、免疫応答性、血清抗体濃度、低応答者、日中間比較

緒言 :

肺炎は高齢者の主要な死亡原因であり、その予防は重要な対策のひとつとなる。肺炎球菌は成人肺炎の最も頻度の高い起炎菌であり、65歳以上の高齢者や慢性心肺疾患を有する患者では肺炎球菌ワクチンの接種が推奨されている。現在使用可能な肺炎球菌ワクチン（ニューモバックス®）は胸腺非依存性抗原であるためメモリー反応が期待できず、感染予防に必要な血清抗体価がどの程度維持できるのか不明な点も多い。欧米ではワクチン接種後の血清抗体価は 5 年程度持続するとされているが(1, 2)、わが国での解析は限定されたものであり、中国ではほとんど解析されていないのが現状である。最近 Chen らは、わが国の主要な 4 種の血清型についてワクチン接種前後での血清抗体価を解析し、上昇した抗体価が 2 年後には初期値付近まで低下することを報告している(3)。我々も宮城県南地域においてワクチン接種による血清抗体価の推移を検討しており、同様に 1 年以内の早期に低下する症例が少なくないことを観察している。このことは、血清抗体価の持続期間における人種の影響について問題を提起しているものと考えられる。すなわち、欧米と日本、中国のような東アジアとでワクチンに対する応答性や予防抗体の持続性に明らかな相違がみられるのであれば、今後の肺炎予防対策を考える際に欧米とは異なる独自のエビデンスの構築が求められることになる。そこで本研究では、中国広州

市中山大学医学部附属第三医院呼吸器内科との共同研究により、肺炎球菌ワクチン接種前後で経時的に血清抗体価を測定することによって、ワクチンに対する免疫応答性及び抗体濃度の持続期間について検討するとともに、現在我々が宮城県南地域において得ているデータや欧米からの報告と比較することで、日中間、そしてさらに欧米との相違点について解析を実施した。

対象と方法：

本研究では、宮城県白石市の公立刈田総合病院及び中国広州市中山大学医学部附属第三医院との共同研究を実施した。公立刈田総合病院呼吸器内科外来に通院中の慢性呼吸器疾患患者 55 症例、中山大学医学部附属第三医院呼吸器内科外来に通院中の 30 症例から得られた血清検体を用いて以下の研究を実施した。

ワクチン接種前後の血清抗体濃度の推移を調べるために、日本では接種前、接種 2 週、4 週、3 ヶ月、6 ヶ月後、そして 1 年後に、中国では接種前、接種 4 週、6 ヶ月後に血清を採取した。血清 IgG 抗体濃度は、WHO によって推奨されている第三世代 ELISA を用いて、莢膜血清型 6B、14、19F、23F について測定した。但し、中国の検体においては、本報告書作成の段階では 19F、23F については測定を開始できていなかった。

（倫理面への配慮）

本研究については、東北大学及び公立刈田総合病院の倫理委員会の承認を受けており、十分なインフォームドコンセントの上で被験者の同意を得ることとした。中国での研究を開始する前に、中山大学医学部第三附属医院の倫理委員会の承認を得た上で、被験者からは十分なインフォームドコンセントによる研究協力への同意を得た。

結 果：

1) 日本における血清抗体濃度の推移

公立刈田総合病院の 55 症例における肺炎球菌莢膜血清型 6B、14、19F、23F に対する血清 IgG 抗体濃度については 14 で 3 カ月後、その他の血清型では 4 週後をピークに増加がみられた。その後、6B では接種 1 年後までピーク値に近い濃度が維持されたが、その他の血清型では接種 1 年後にはピーク値の半分近くにまで低下を示した（図 1）。また、ワクチン接種前の IgG 抗体濃度が 2 μ g/ml 以下の患者では、6B、14、19F、23F においてそれぞれ 21%、15%、13%、22%でピーク時の濃度が前値の 2 倍に到達しなかった（低応答者）。

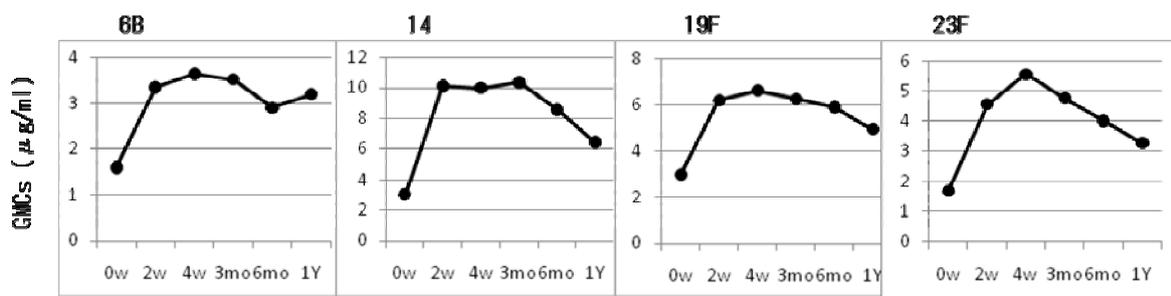


図 1. 日本における肺炎球菌ワクチン接種後の IgG 抗体血清濃度の推移

2) 中国における血清抗体濃度の推移

中山大学医学部附属第三医院での解析では、肺炎球菌莢膜血清型 6B、14、23F に対する血清 IgG 抗

体濃度は公立刈田総合病院と同様に1カ月後にピークとなり、19Fだけは1カ月後よりも6カ月後の方が高値を示した。まだワクチン接種6カ月の段階ではあるが、6B及び14ではピーク値の約3/2を維持しており、23Fではピーク値の約1/3にまで低下していた(図2)。また、低応答者は6B、14、19F、23Fにおいて、それぞれ、14.3%、16.7%、33.3%、9.1%であった。

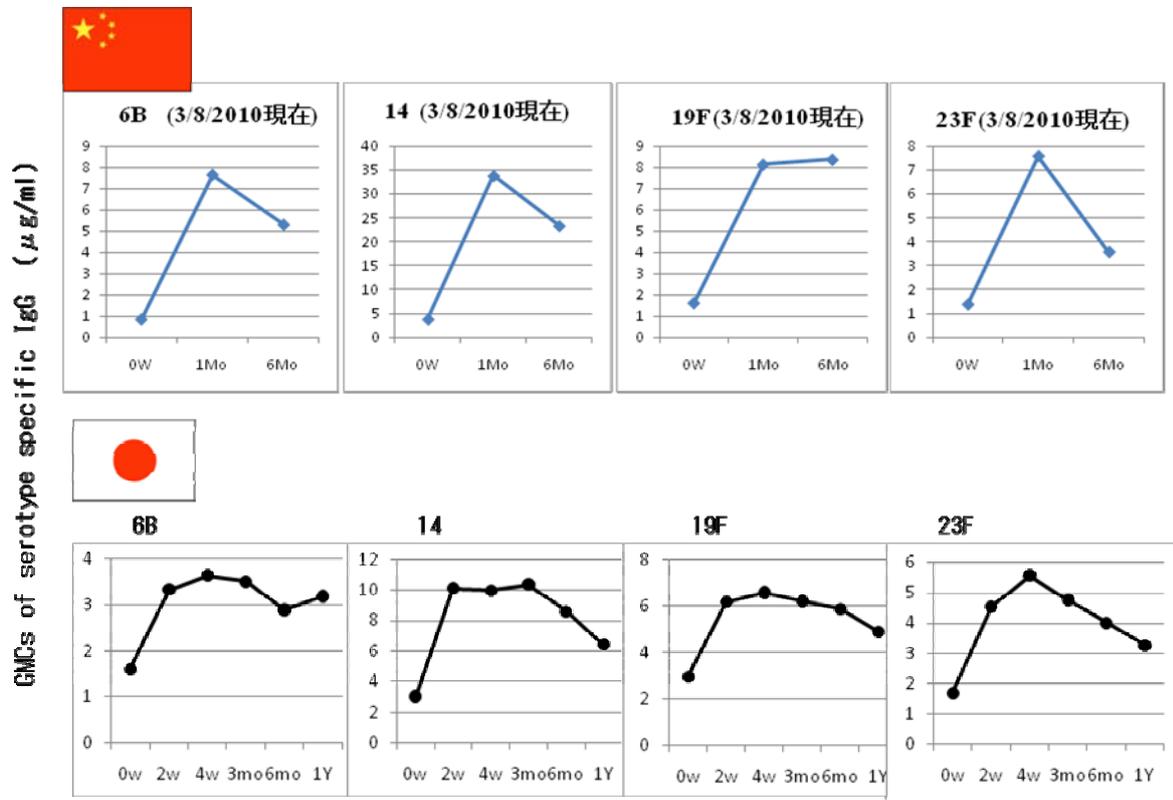


図2. 中国における肺炎球菌ワクチン接種後のIgG抗体血清濃度の推移

考 察:

本研究で我々は、肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答性及びワクチン接種前後における血清中の荚膜血清型特異抗体濃度の推移について解析し、日中間での比較検討を行った。中国における肺炎、髄膜炎、菌血症患者から分離される肺炎球菌の荚膜血清型は未だ不明であるため、今回の抗体濃度測定は、我が国での主要な血清型である6B、14、19F、23Fについて実施した。ワクチン接種前の抗体濃度については両国間で類似した値を示しており、これらの血清型の頻度に関してはそれほど大きな相違はない可能性が予想される。一方、ワクチン接種後のピーク値については、19F、23Fでは大きな相違はないものの、6B、14では中国でより高い応答性が認められた。症例数が十分でないために明確なことは言えないものの、両国間でワクチンに対する免疫応答性に相違がみられる可能性が示唆された。便宜的にワクチン接種前の抗体濃度が2µg/ml未満で、前値に対するピーク値の比が2未満の場合を低応答者と定義すると、日本では6B、14、19F、23Fについてそれぞれ21%、15%、13%、22%、中国では14.3%、16.7%、33.3%、9.1%と多少の相違はあるものの、統計学的に有意な差は認められなかった。

肺炎球菌ワクチン接種後の血清抗体濃度の持続期間については、宮城県南での検討では6Bで接種1年後までピーク値に近い濃度が維持され、その他の血清型では接種1年後にはピーク値の半分近く

にまで低下を示したのに対して、中国での検討ではワクチン接種 6 カ月の段階ではあるが、6B 及び 14 ではピーク値の約 3/2 を維持しており、23F ではピーク値の約 1/3 にまで低下していた。今回の検討では、一部の血清型では血清抗体濃度が比較的短い期間で低下する可能性が予想された。米国における初期の検討から血清抗体価は 5~10 年程度持続すると考えられてきた (1, 2)。これまでわが国では、肺炎球菌ワクチンの再接種は認められておらず生涯 1 度のみであったが、最近になって前回の接種から 5 年程度経過していれば再接種が認められるように変更された (4-6)。しかし、本研究ではワクチン接種後 1 年という比較的短い期間での血清抗体濃度の低下が認められたことから、今後さらなる継続的な調査研究が必要になる。さらには、ワクチン接種後の血清抗体濃度の推移が日中間で類似していたことから、欧米との比較を目的とした研究も今後は望まれ、このような解析を通してより効果的な肺炎予防対策が可能になるものと考えられる。

参考文献：

- 1) Mufson MA, Krause HE, Schiffman G: Long-term persistence of antibody following immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 173: 270-275, 1983.
- 2) Mufson MA, Krause HE, Schiffman G, Hughey DF. Pneumococcal antibody levels one decade after immunization of healthy adults. *Am J Med Sci.* 293: 279-284, 1987.
- 3) Chen M, Hisatomi Y, Furumoto A, Kawakami K, Masaki H, Nagatake T, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Oishi K. Comparative immune responses of patients with chronic pulmonary diseases during the 2-year period after pneumococcal vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* 14: 139-145, 2007.
- 4) 川上和義: 肺炎球菌ワクチンによる肺炎予防効果とその持続期間、そして再接種問題について. *感染制御*, 5: 539-542, 2009.
- 5) 川上和義: ワクチンによる肺炎予防とその免疫学的機序, *内科学会雑誌*, 98: 291-297, 2009.
- 6) 大石和徳, 川上和義, 永井英明, 砂川慶介, 渡辺 彰: 肺炎球菌ワクチン再接種承認の必要性に関するアンケート調査研究. *日本呼吸器学会雑誌*, 48: 5-9, 2010.

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 馬 峰 
所属機関名：東京大学
所属部署名：医科学研究所 職名：特任研究員
所 在 地：東京都港区白金台 4-6-1
電 話：03-5449-5397 内線：

1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

iPS 細胞を利用した先天性骨髄不全症候群の病態解析と治療法の開発

3. 成果の概要

今回の研究により、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、血液細胞への分化が可能であった。現在、先天性骨髄不全症候群患者から iPS 細胞を樹立中であり、今後は患者由来 iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞の血液細胞への分化を比較検討する予定である。

※発表論文等

Ma F, Ebihara Y, Nakauchi H, Tsuji K: Derivation of mature blood cells from human induced pluripotent stem cells. 38th Annual Scientific Meeting, International Society of Experimental Hematology. Athens. Sept 9 ~ 12, 2009.

4. 研究組織

日本側研究者氏名：馬峰

所属機関名：東京大学

中国側研究者氏名：竺晓凡

所属機関名：中国医学科学院中国协和医科大学

職名：特任研究員

部署名：医科学研究所

職名：教授

部署名：血液学研究所

血液病医院

児童血液病診療センター

iPS 細胞を利用した先天性骨髄不全症候群の病態解析と治療法の開発

研究者氏名	馬峰
日本研究機関	東京大学 特任研究員
中国研究機関	中国科学院血液学研究所
共同研究者名	竺晓凡

要 旨

Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、Diamond-Blackfan 症候群、Pearson 症候群、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化異常症等の様々な遺伝的背景を有する先天性骨髄不全症候群 (CBMFS: congenital bone marrow failure syndrome) の研究を目的として、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から血液細胞への分化誘導法を、健常人由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) と CBMFS 患者由来 iPS 細胞に応用し、その血液細胞への分化過程を解析することを計画した。健常人由来 iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、胎生 15~16 日のマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、培養 2 週間頃より多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞が分化誘導され、これらの造血前駆細胞から、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの様々な血液細胞の産生が可能であった。今後は、健常人由来 iPS 細胞から血液細胞への分化過程を、現在樹立中の CBMFS 患者由来 iPS 細胞のそれと比較検討することにより、CBMFS の病因・病態が解明され、新たな治療法が開発されることが期待される。

Key Words iPS 細胞, 先天性骨髄不全症候群, 造血前駆細胞, ストローマ細胞

緒 言:

Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、Diamond-Blackfan 症候群、Pearson 症候群、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化異常症等の様々な遺伝的背景を有する骨髄不全症が存在し、これらは先天性骨髄不全症候群 (CBMFS: congenital bone marrow failure syndrome) と呼ばれる。CBMFS の原因遺伝子については、その一部は特定されているが、同定されていないものも多数存在し、特定された遺伝子についても、骨髄不全を惹起するメカニズム、さらには白血病、悪性腫瘍へ進展するメカニズムについてはほとんど解っていない。

一方、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚繊維芽細胞などの体細胞から樹立される、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同質の性状を有する多能性幹細胞である。特に、ヒト iPS 細胞の樹立法が開発されたことにより、その臨床応用が期待されている。我々は、これまでに、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、ヒト ES 細胞が多能性造血細胞へ分化誘導されることを示してきた (参考文献 1, 2)。

それらの成果から我々は、我々が確立したヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導系をヒト iPS 細胞の分化誘導に応用することにより、さまざまな CBMF 疾患患者から樹立された iPS 細胞の血液細胞への分化過程を、健常人由来 iPS 細胞のそれと細胞生物学的及び分子生物学的に比較検討することにより、CBMFS の病因・病態の解明や治療法の開発が可能になるのではないかと考え、本研究を実施した。

方 法:

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の樹立

我々がすでに報告した方法で（参考文献3）、胎生 15～16 日のマウス胎仔肝から分離された細胞を付着培養し、ストローマ細胞を樹立した。

2. ヒト iPS 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養

ヒト iPS 細胞を、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養し、産生されてくる細胞を、形態学的観察、フローサイトメトリー、RT-PCR 法、血液細胞コロニー形成法などにより、継時的に解析した。

3. ヒト iPS 細胞由来赤血球におけるヘモグロビンの解析

マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により分化誘導されたヒト iPS 細胞を血液細胞コロニー培養し、形成された赤血球コロニーや混合コロニーに含まれる赤血球系細胞のヘモグロビンを、免疫染色により解析した。

結 果:

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の樹立

胎生 15～16 日のマウス胎仔肝から分離された細胞を付着培養することにより、ストローマ細胞を樹立することができた（図1）。

2. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養によるヒト iPS 細胞から血液細胞への分化

(1) 形態学的観察

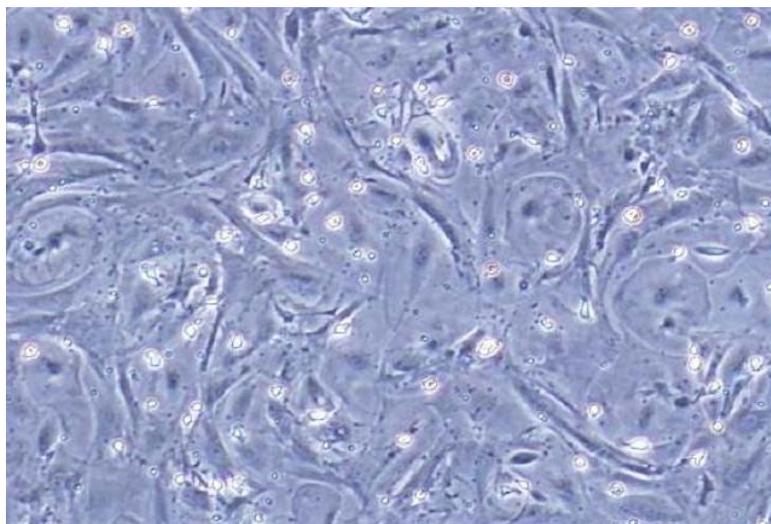
ヒト iPS 細胞は、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、ヒト ES 細胞との共培養と同様に、培養 5 日目ごろより分化を開始し、培養 10 日目ごろには、未分化な小型円形細胞が出現した（図2）。その後、培養 15 日目ごろまで、これらの細胞は増殖し続けた。

(2) RT-PCR による検討

ヒト ES 細胞との共培養と同様に、培養 13 日目には、未分化な iPS 細胞のマーカーである Oct4、未熟な中胚葉系細胞のマーカーである Brachury の発現は認められなくなった。

図1.

樹立されたマウス胎仔肝由来
ストローマ細胞



(3) フローサイトメトリーによる検討

ヒト ES 細胞との共培養と同様に、CD34+細胞は、培養 5 日目ころから共培養中に出現し、培養 16~17 日目ころまで増加し続けた。培養 14 日目の CD34+細胞の一部は、CD45 や c-Kit を発現していた。

(4) 血液コロニー形成法による検討

interleukin (IL)-3、エリスロポエチン、トロンボポエチン、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)、SCF (stem cell factor)存在下での血液コロニー培養による検討でも、ヒト ES 細胞との共培養と同様に、血液細胞コロニー形成細胞は、培養 10 日目ごろに初めて出現した。その数は次第に増加し、培養 14~16 日目には最大となった。観察されたコロニー形成細胞は多様で、赤血球コロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、種々の血液細胞を含む混合コロニーが認められた。これらのコロニー中には、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの種々の血液細胞がされていた。産生された赤血球の中には、脱核した成熟赤血球も認められた。

以上の結果は、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、さらには、複数の血液細胞に分化可能な多能性造血前駆細胞に分化誘導され、これらの造血前駆細胞から種々の血液細胞が産生されたことを示している。

3. ヒト iPS 細胞由来赤血球における成人型ヘモグロビンの合成

上記の方法により形成された赤血球コロニー、あるいは混合コロニーに含まれるヒト iPS 細胞由来赤血球のほとんどが、胎児型ヘモグロビン(HbF)を保持していたが、同時に、成人型ヘモグロビン(HbA)も保持していることが確認された。

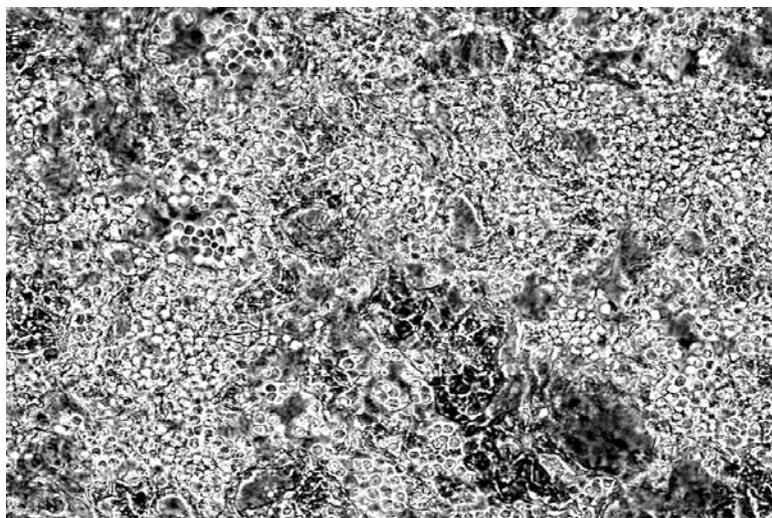
考 察：

今回の検討により、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、血液細胞への分化が可能であった。

現在、CBMFS 患者から iPS 細胞を樹立中であり、今後は CBMFS 患者由来 iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞の血液細胞への分化を比較検討することにより、これまでほとんど解明されていない CBMFS の病因・病態を解明し、治療法の開発に繋げていきたいと考えている。

図 2.

ヒト iPS 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養中に出現した小型円形細胞 (培養 10 日目)



参考文献：

1. Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, Zaike Y, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuji K: Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13087-13092, 2008.
2. Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Kawasaki H, Zaike Y, Heike T, Nakahata T, Tsuji K: Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. *Int J Hematol* 85:371-379, 2007.
3. Ma F, Wada M, Ebihara Y, Ishii F, Manabe A, Tanaka R, Maekawa T, Ito M, Mugishima H, Asano S, Nakahata T, Tsuji K: Development of human lymphohematopoietic stem/progenitor cells defined by CD34 and CD81 expressions. *Blood* 97: 3755-3762, 2001.

注：本研究成果の一部は、2009年9月9-12日第38回国際実験血液学会にて口頭発表。

作成日：2010年2月28日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：江頭 健輔 
所属機関名：九州大学大学院医学研究院
所属部署名：循環器内科学 職名：准教授
所在地：812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1
電 話：092-642-5356 内線：5356

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

単球選択的ナノ DDS 技術を基盤とする急性心筋梗塞症の治療法の開発
(不安定化プラークの破綻と分子イメージング)

3. 成果の概要

動脈硬化プラークの進展と不安定化、破綻には単球/マクロファージの関与が大きいことから、単球選択性を持つナノ粒子を用いて、単球走化因子である MCP-1/CCR-2 シグナリングを阻害する治療戦略を検討した。MCP-1 のドミナントネガティブ変異体である 7ND の cDNA プラスミドを封入した PLGA ナノ粒子の静脈内投与により、ApoE 欠損マウスを用いたモデルにおけるプラーク破綻が予防できる事を明らかにした。

※発表論文等

本研究は 2009 年 11 月、米国心臓病学会 (AHA) にて口演発表した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名：江頭 健輔	職名：准教授
所属機関名：九州大学大学院医学研究院	部署名：循環器内科学
中国側研究者氏名：趙 鋼	職名：助手 (主治医)
所属機関名：上海交通大学附属第六人民医院	部署名：心内科

単球選択的ナノ DDS 技術を基盤とする急性心筋梗塞症の治療法の開発 (不安定化プラークの破綻と分子イメージング)

研究者氏名 江頭健輔

日本所属機関 九州大学大学院医学研究院循環器内科学・准教授
共同研究者

趙 鋼

中国所属機関 上海交通大学附属第六人民医院・助手（主治医）

要旨

心血管病の生命予後と生活の質を改善するため、急性冠症候群の主因である動脈硬化プラーク不安定化・破綻を効果的に予防する新規治療法の研究開発が求められている。動脈硬化プラークの進展と不安定化、破綻には単球/マクロファージの関与が大きいことから、単球選択性を持つナノ粒子を用いて、単球走化因子である MCP-1/CCR-2 シグナリングを阻害する治療戦略を検討した。MCP-1 のドミナントネガティブ変異体である 7ND の cDNA プラスミドを封入した PLGA ナノ粒子の静脈内投与により、ApoE 欠損マウスを用いたモデルにおけるプラーク破綻が予防できる事を明らかにした。今後、プラーク破綻予防のための分子イメージングによる診断と治療の融合としてより患者の負担を軽減する新規医療が期待される。本研究をさらに発展させ経時的に動脈硬化病変の分子イメージングによる診断と治療の融合を行う予定である。

Key words 単球、ナノテクノロジー、不安定化動脈硬化プラーク、低侵襲治療、遺伝子治療

緒言

我が国は超高齢化社会を迎え、動脈硬化性疾患（心筋梗塞、脳卒中、末梢動脈疾患など）が増加し、その中でも急性心筋梗塞症とその結果生じる心不全が死因の大半を占めている（平成 18 年、厚生労働省人口動態調査）。薬剤溶出ステントを用いた経皮的冠動脈インターベンションは再狭窄を抑制するが、急性心筋梗塞を含む急性冠症候群の予防効果はなく、また安定狭心症患者の予後改善には無力である¹。故に急性冠症候群の主因である動脈硬化プラーク不安定化・破綻を効果的に予防する新規治療法の研究開発は、心血管病の生命予後と生活の質を改善するための重要な研究課題である。動脈硬化プラークの進展と破綻のメカニズムに関して、ヒト病理および種々の動物モデルにおいて検討が行われ、血管壁を場とした慢性炎症がその主体である事が徐々に明らかにされてきた。中でも動脈硬化巣に対する単球/マクロファージの遊走、浸潤が血管壁の炎症および動脈硬化巣の進展において中心的な役割を果たすことが明らかになってきている。我々も主要な単球走化因子である Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)/CCR-2 およびその受容体である CCR-2 の役割に着目し、高脂血症マウスモデルを用いて検討を行ってきた²。MCP-1 の N 末端側 2~8 番目のアミノ酸を欠失した変異型 MCP-1(7ND)は CCR-2 受容体に対する阻害剤として作用する。リポソーム化した 7ND プラスミドの筋肉注射により遺伝子導入を行うと 7ND は血漿中に遊離し、単球/マクロファージの遊走を *in vivo* で抑制する²。その結果、ApoE 欠損マウスにおいて、高脂肉食負荷に伴う大動脈壁へのマクロファージの浸潤を抑制し、脂肪染色で評価した動脈硬化病変自体も抑制する事を明らかにしてきた³。また、ApoE および CCR-2 両遺伝子の欠損マウスをドナーとした骨髄移植モデルにおける検討により、骨髄細胞に発現する CCR-2 を介した MCP-1/CCR-2 シグナリングが動脈硬化病変の進展に重要な役割を果たしている事を示した。我々は、上述の研究成果を基礎として、単球/マクロファージにおける MCP-1/CCR-2 シグナリングが治療標的になり得ると考え、単球選択性を持つナノ粒子を用いた、新規のプラーク破綻予防療法を研究開発している。そこで、本研究では我々が独自に開発した単球・マクロファージに選択性を持つ生体吸収性ナノ粒子を用いて新規動脈硬化病変プラーク破綻に対する新規治療法の開発を目標とした。

研究対象と方法

水中エマルション溶媒拡散法によるマクロファージ走化因子(MCP-1)の変異体 7ND の cDNA プラスミド封入 PLGA ナノ粒子の作製

水中エマルション溶媒拡散法により PLGA ナノ粒子の作製を行った⁴。PLGA 2g をアセトン 150mL で溶解した後、精製水に溶解した蛍光マーカである FITC あるいは 7ND の cDNA プラスミド 10 mg 水溶液 25mL を添加してポリマー溶液とした。これを 40 °C で攪拌中の 0.5wt%PVA 水溶液 200mL と 0.015 wt%キトサン水溶液 200mL の混液中に滴下した後、アセトンを留去した。得られた PLGA ナノ粒子懸濁液に 10 %マンニトール(東和化成工業製)水溶液 20 mL を添加し、攪拌混合した後、凍結乾燥して粉末化した。ナノ粒子の平均粒子径の測定は、動的光散乱式粒度分布測定装置(マイクロトラック UPA150、日機装)を用いて行った。

PLGA ナノ粒子の単球/マクロファージへの選択的取り込み評価

PLGA ナノ粒子に治療因子を導入し、単球/マクロファージ選択的な DDS としてプラーク破綻に対する新規治療に応用が可能か検討を行った。蛍光色素 FITC を封入した PLGA ナノ粒子を先述の水中エマルション溶媒拡散法により作製し、ApoE 欠損マウスに単回静脈注射を行い、定法により 24 時間後に採血を行い、フローサイトメリーにより CD11b および Gr-1 陽性細胞の定量を行った。

マウスプラークラプチャーモデルの作製と 7ND 封入 PLGA ナノ粒子の有効性評価

従来のプラーク破綻に対する治療法開発研究では、プラーク破綻率が低く研究期間が長期にわたることなど、適切な動物モデルがないことが問題であった。我々は、高脂肪食を負荷した ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II 持続投与を行うことにより、腕頭動脈に高率にプラーク破綻を発症するモデルを開発した。本モデルでは急性プラーク破綻およびプラークに埋没した線維性皮膜をカウントすることにより、プラーク破綻を定量的に評価することが可能である。7ND プラスミド封入ナノ粒子を本モデルマウスに週 1 回静脈内投与し、4 週間後のプラーク破綻予防効果を検討した。

統計解析

データはすべて平均±標準誤差で示した。各データは Prism software program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて解析を行った。P 値が 0.05 以下を統計学上の有意差とした。

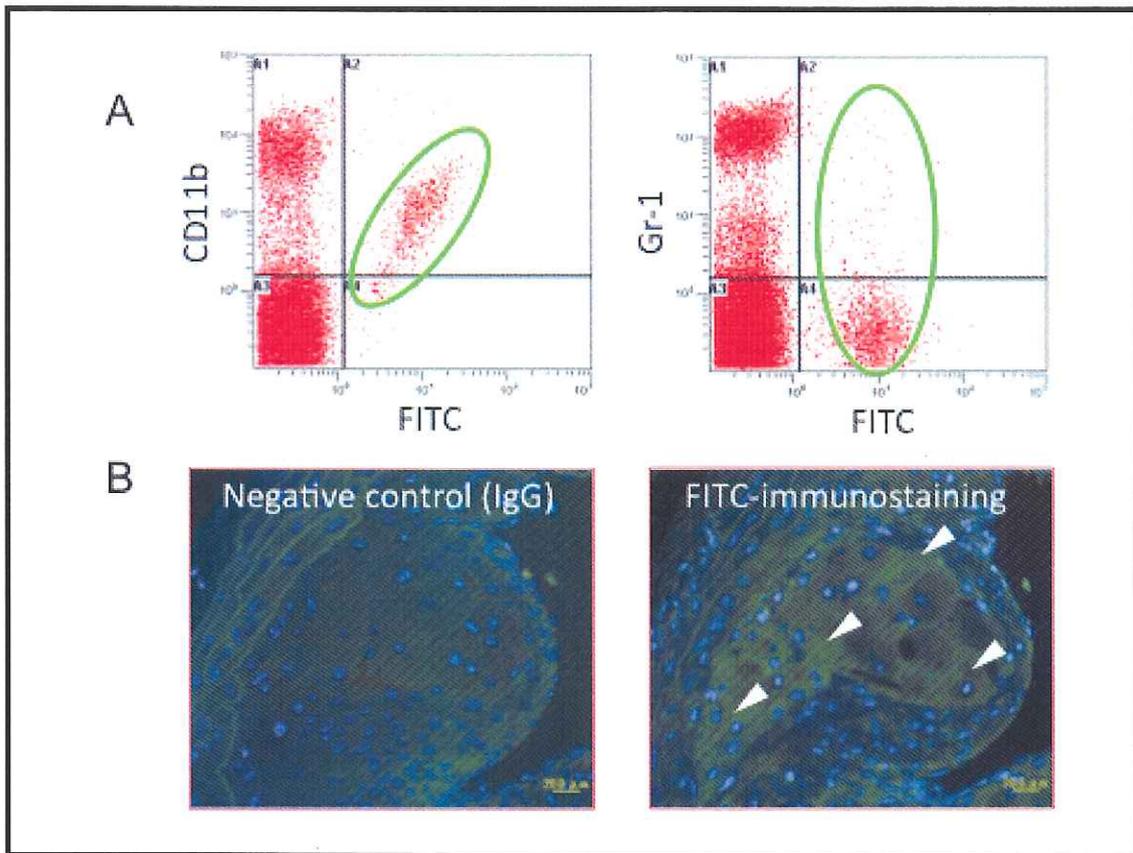
結果

生体吸収性 PLGA ナノ粒子の物性

水中エマルション溶媒拡散法により FITC 封入 PLGA ナノ粒子および 7ND プラスミド封入ナノ粒子を作製した。平均粒子径はそれぞれ 299.8nm、380.4nm、表面ゼータ電位はそれぞれ+6.7、+9.5mV であった。

PLGA ナノ粒子の単球/マクロファージへの選択的送達

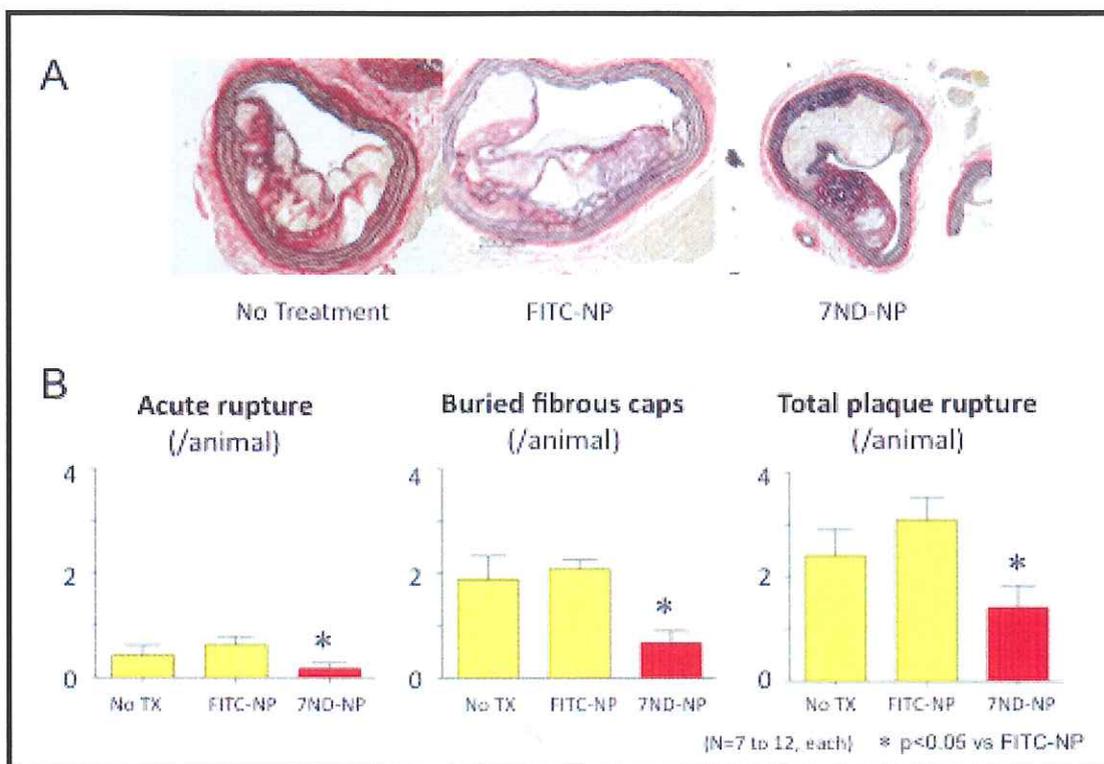
蛍光色素 FITC を封入した PLGA ナノ粒子を作成し、ApoE 欠損マウスに単回静脈注射を行ったところ、末梢血において白血球への取り込みを認めた。これらの末梢血白血球をフローサイトメリーで検討したところ、FITC 取り込みは主に CD11b 陽性、Gr-1 陰性の単球に認められた(図 1A)。さらに、高脂肪食負荷後の ApoE 欠損マウスにおいて FITC 封入ナノ粒子の分布を検討したところ、静脈注射 7 日後に腕頭動脈の動脈硬化病変内のマクロファージに FITC 免疫染色を認めた(図 1B)。従って、PLGA ナノ粒子の静脈内投与により、末梢血から動脈硬化病変へ遊走する単球に選択的に治療因子の送達が可能であり、プラーク破綻の治療に応用可能である事が示唆された。図 1. FITC 封入 PLGA ナノ粒子の単球/マクロファージへの送達



- A. ApoE 欠損マウスに FITC 封入ナノ粒子を静注し、1 時間後に末梢血白血球のフローサイトメトリーを検討した。FITC は CD11b 陽性、Gr-1 陰性の白血球に分布した。
- B. 高脂肪食を負荷した ApoE 欠損マウスに FITC 封入ナノ粒子を静注し、7 日後に腕頭動脈組織を検討し、プラーク内に FITC 免疫染色を認めた(矢頭)。

単球選択的ナノ粒子によるプラーク破綻治療

未治療のモデルマウスでは、腕頭動脈にプラーク破綻(急性プラーク破綻および埋没した線維性被膜)を認め、FITC 封入ナノ粒子では治療効果を認めなかったが、7ND プラスミド封入ナノ粒子はプラーク破綻数を有意に抑制した(図2)。プラーク破綻が抑制された病変では Mac-3 陽性マクロファージ数の減少およびプラーク線維性被膜の増厚を認め、7ND による単球/マクロファージ遊走の抑制がプラーク破綻予防の機序の一つである事が示唆された。図2. 7ND 封入ナノ粒子によるプラーク破綻予防



A. ApoE 欠損マウスに高脂肪食(8週間)およびアンジオテンシン II 持続注入(4週間)を负荷したモデルマウスにおいて、無治療では腕頭動脈にプラーク破綻を認めた。FITC 封入ナノ粒子 (FITC-NP) では効果がなかったが、7ND プラスミド封入ナノ粒子 (7ND-NP、週 1 回静脈内投与) プラーク破綻を抑制した。

B. 7ND-NP は急性動脈硬化プラーク破綻、埋没した線維性被膜を含めた動脈硬化プラーク破綻を有意に抑制した。

考察

ナノ粒子を用いたプラーク破綻治療は、今回検討した 7ND プラスミド遺伝子導入以外の治療因子に関しても応用が可能である。PLGA ナノ粒子には核酸以外にも各種薬剤の封入が可能であり、全身投与では有効性が明らかでない薬剤でも標的細胞への選択的投与により有効性を発揮する可能性がある。現在の医療では、不安定プラークが実際に急性冠症候群として症候性となった時点で治療介入が始まる場合が多い。現在、SPECT/CT など最先端の医療機器を用いた不安定プラークの分子イメージングの実現の開発に取り組んでおり、今後、不安定プラークが潜在する「不安定患者」を診断し、同時に、ナノ粒子を応用した「ナノ DDS 治療」により、診断と治療が一体となった、より低侵襲、高率な動脈硬化プラーク破綻を未然に防ぐ医療が実現できる可能性は極めて高いだろう。

参考文献

- 1 A. Kastrati, J. Mehilli, J. Pache et al., *The New England journal of medicine* **356** (10), 1030 (2007).
- 2 W. Ni, K. Egashira, S. Kitamoto et al., *Circulation* **103** (16), 2096 (2001).
- 3 M. Ishibashi, K. Egashira, Q. Zhao et al., *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24** (11), e174 (2004).
- 4 Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi et al., *Eur J Pharm Biopharm* **45** (1), 41 (1998).

注:本研究は 2009 年 11 月、米国心臓病学会 (AHA) にて口演発表した。

作成日:2010 年 2 月 6 日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2009 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 川野 仁 
所属機関名： 東京都神経科学総合研究所
所属部署名：発生形態研究部門 職名：副参事研究員
所在地： 府中市武蔵台 2-6
電 話： 042-325-3881 内線：4507

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

脊髄損傷の治療のための損傷後の中枢神経系における神経再生に関する研究

3. 成果の概要

昨年5月に李助教授を招へいし、また9月には中国医科大学を訪れ、共同研究を進めるとともに、中国医科大学の若手研究者を指導した。協同研究の成果は欧文原著論文として投稿し、Neural Regeneration Research に受理された。

※発表論文等

Teng X, Yoshioka N, Kimura-Kuroda Junko, Kawamura Koki, Kawano H, Li HP: Neur. Regener. Res. 2010 印刷中

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 川野 仁	職名：副参事研究員
所属機関名：東京都神経科学総合研究所	部署名：発生形態 研究部門
中国側研究者氏名： 李 洪鵬	職名： 助教授
所属機関名： 中国医科大学	部署名：解剖学教室

脊髄損傷の治療のための損傷後の中枢神経系における神経再生に関する研究

研究者氏名	川野 仁
日本所属機関	東京都神経科学総合研究所
共同研究者名	李 洪鵬
中国所属機関	中国医科大学解剖学

要 旨

脊髄損傷患者は日本に約10万人おり、毎年新たに5000人の受傷者が生じている。しかし、その治療法が確立されていないために、多くの患者が寝たきりや車いすの生活を強いられている。中国でも日本の10倍に及ぶ脊髄損傷患者がいるが、脊髄損傷に関する研究は欧米や日本に比べて遅れている。本事業では、①日本と中国の研究者による脊髄損傷に関する共同研究を推進することと、②中国の医育研究機関において技術の習得や研究者の育成を進めること、の二つに焦点を当てた。その成果は以下の通りである。

- ① 日中共同研究の推進：脊髄損傷の治療法として有望視されている嗅神経被覆細胞（OEC）の移植の再生促進の機序を中国医科大学と協同して研究し、細胞移植が損傷部に形成される再生阻害因子である線維性瘢痕の形成を抑制することで神経再生と運動機能回復を促進することを見いだした（Neural Regeneration Research, 2010, 印刷中）。
- ② 中国の研究者の育成と技術の指導：李助教授は昨年5月に3週間神経研に滞在し、細胞移植や標本作成などの技術を習得し、帰国後、中国医科大学の教員や大学院生にその技術を教えている。さらに、昨年9月には川野研究員が中国医科大学を訪れ、神経再生に関する講習を行い、脊髄損傷の治療法の研究について指導した。

以上のように、当事業は所期の目的通りの成果を上げたと言える。

Key Words 脊髄損傷, 神経再生, 線維性瘢痕, グリア瘢痕, ラット

緒 言：

スポーツ事故や転落事故などにより脊髄が損傷を受けると、損傷部より下位の運動・知覚機能に重篤な障害が生じる。現在のところ脊髄損傷の有効な治療法は確立されておらず、多くの患者が車椅子や寝たきりの生活を余儀なくされている。脊髄損傷の治療が困難な理由は、損傷を受けた神経線維がほとんど再生せず、失われた機能を回復できないからである。神経再生が起こりにくい理由として、神経細胞自身の再生能の欠如に加えて、グリア瘢痕やコンドロイチン硫酸プロテオグリカンなど、再生軸索の伸長を阻害する種々の環境因子の存在が挙げられてきた。しかし脳や脊髄の損傷部でそれら阻害因子の働きを抑制し、神経再生を実現させようという試みが繰り返し行われてきたが、多くの場合予想外に小さな効果しか得られていない。

われわれは再生阻害因子として、線維性瘢痕に注目してきた。線維性瘢痕は損傷後、線維芽細胞が損傷部に侵入し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分泌して形成する、いわば「カサブタ」のようなものである。これまでに、①マウス新生仔(Kawano et al., 2005)、②IV型コラーゲンの合成阻害(Kawano et al., 2005)、③視床下部弓状核(Homma et al., 2006)、④コンドロイチン硫酸の酵素的分解(Li et al., 2007)などの損傷脳モデルを解析したところ、いずれのモデルにおいても、線維性瘢痕が形成されない状況で、神経再生が起こっていた。この一連の研究成果は、線維性瘢痕が強力な再生阻害因子であることを示している。

動物の脊髄損傷モデルにおいては、様々な細胞を損傷部に移植することで神経再生と機能回復を促進する試みが多数報告されている。とくに嗅神経被覆細胞（OEC）は患者自身から採取し、培養した後に移植することが可能なため、すでにいくつかの国では患者を対象にした移植手術も行われている。しかし、細胞移植による神経再生促進のメカニズムはいまだに不明であり、患者への移植手術も動物で見られたほどの運動機能の改善は起こっていない。われわれは最近、脳損傷モデルマウスの損傷部へOECを移植すると、線維性瘢痕の形成が抑制され神経再生が促進することを見出している（Teng et al., 2008）。

本研究は、ラットの脊髄損傷部へOECを移植し、その神経再生促進のメカニズムを明らかにすることを目的として計画された。もし、OEC移植群で損傷部における線維性瘢痕の形成が抑制され、神経再生が促進されていけば、線維性瘢痕が主要な再生阻害因子であるという、われわれの仮説が脊髄損傷においても証明されることになる。

対象と方法：

1. 嗅球グリア細胞の調整

生後4週齢のSD系雄ラットの嗅神経と嗅球の糸球体層をイソフルラン吸入麻酔下で取り出し、小片にして10%胎仔牛血清を含むEagle/F12培養液中で4-6日間培養した。組織片から細胞が十分に遊走したら、遊走した細胞だけを集め、さらに約2週間培養した。細胞を蛍光色素であるHoechst33342で標識した後、トリプシン処理によりディッシュから剥がし、培養液で約 $5-8 \times 10^7$ /mlの濃度に調整した。それぞれの細胞マーカーで確かめたところ、培養細胞に含まれるOECと線維芽細胞の割合はそれぞれ、40%と60%であった。

2. 嗅球グリア細胞の移植

生後8週齢のSD系雄ラットをペントバルビタールNa（50mg/kg体重）で麻酔し、背部の皮膚と筋を切開した後、下部胸椎の椎弓と棘突起を切除し、幅2mmのナイフで脊髄を完全に切断した。マイクロシリンジを用いて $2 \mu\text{l}$ （約 1×10^5 個）のOECと線維芽細胞の懸濁液を脊髄損傷部に注入した。術後、術部を縫合し、抗生物質を注射した。Shamコントロールは脊髄を露出するだけで、ナイフは挿入しなかった。

3. 標本作製と免疫組織化学

術後1週あるいは2週に、ラットはイソフルラン麻酔下で、心臓より4%パラフォルムアルデヒド液を用いて灌流を行い、脊髄を固定した。脊髄を取り出し、さらに一晩固定した後、ドライアイス中で凍結し、 $40 \mu\text{m}$ 厚の連続矢状断切片を作成した。

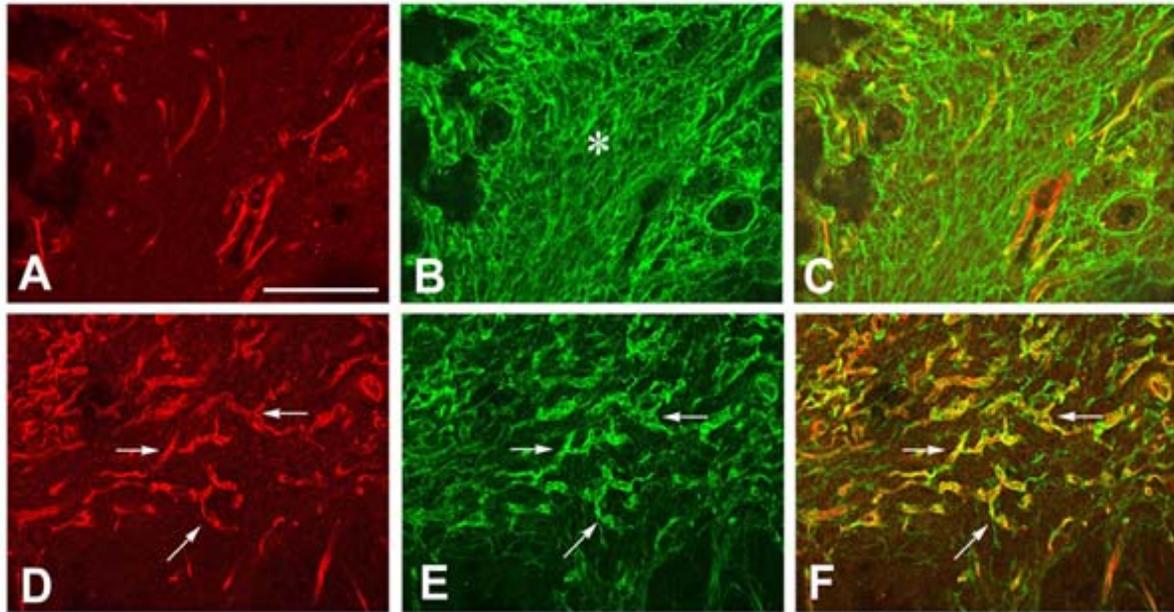
免疫組織化学的染色には、GFAP、IV型コラーゲン、RECA-1、セロトニン、CGRPに対する各抗体を用いた。単染色はABC法を行い、DABで褐色に発色した。また2重免疫染色は異なる蛍光色素で標識した抗体を用いた。セロトニン線維については、KS400（Ziess社、ドイツ）を用いて画像解析を行い、再生線維の数を計測した。

結果：

使用したラットは、損傷のみが9匹（1週間5匹、2週間4匹）、OEC移植が11匹（1週間5匹、2週間6匹）、sham手術群（脊髄を切断しないコントロール）が3匹であった。下位胸髄を微小ナイフにより切断すると、下肢の運動は麻痺し、2週間までほとんど回復しなかった。組織学的に観察すると、損傷部にはIV型コラーゲン陽性の線維性瘢痕が形成されており、その周囲にはGFAP強陽性を示す反応性アストロサイトが集積してグリア瘢痕を形成していた。上行性（知覚性）のカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）を含む線維と、下行性（運動性）のセロトニン線維はいずれも損傷部を越えて再生することはなかった。

一方、OECを移植したラットは術直後では下肢の麻痺が見られたが、徐々に回復する傾向を示した。OEC移植群の損傷部を組織学的に解析すると、グリア瘢痕も線維性瘢痕も損傷のみの場合と変わりなく存在しているように見えた。それにもかかわらず、多数のセロトニン線維とCGRP線維が移植組織内を伸長し、損傷部を越

えて再生する線維も有意に増加していた。線維性癒痕の有無についてさらに詳しく調べてみた。IV型コラーゲンは線維性癒痕の他に血管にも発現しているため、血管に特異的な RECA-1 と蛍光二重免疫染色を行い両者の局在を比較した。損傷のみの群では、血管以外にも線維状の IV 型コラーゲンの沈着が豊富に見られ、線維性癒痕が明らかに認められた (図 1A-C)。それに対し、OEC 移植群では、損傷のみに比べ血管が明らかに増加していたが、血管以外の IV 型コラーゲンの沈着は少なく、線維性癒痕の形成が抑制されていることが分か



った (図 1D-F)。

図 1. 損傷のみ (上段) と OEC 移植 (下段) の損傷部における RECA-1 陽性の血管 (A, D、赤色) と Col IV (B, E、緑色) の局在。損傷のみでは血管以外に Col IV の沈着 (C、緑色) が豊富に存在し、線維性癒痕が形成されているが、OEC 移植では線維性癒痕の形成はほとんどない (F)

考 察

現在、OEC の損傷部への移植は、脊髄損傷の治療法としてもっとも有望視されているが、その再生促進のメカニズムは明らかでなかった。脊髄損傷部には種々の再生阻害因子が存在する。それらの中で、OEC 移植により、線維性癒痕の形成が抑制されていることを見出した (図 1)。私たちは最近、OEC をラット中脳ドーパミン線維の切断部に移植し、OEC 移植 2 週後で有意に神経再生が促進されることを見出している (Teng et al., 2008)。

本研究では、ラット脊髄損傷部への OEC の移植により、下行性のセロトニン線維と上行性の CGRP 線維が損傷部を越えて再生し、同時に運動機能回復も促進した。このような効果は、再生を阻害する線維性癒痕の形成が OEC 移植により抑制されたことによると結論された (図 2)。本研究の成果は、現在、欧文原著論文として印刷中である (Teng et al., 2010)

損傷後の脊髄には様々な軸索伸長阻害因子が存在し、これが神経再生が起こりにくい理由であると考えられてきた。これまで多くの研究者は反応性アストロサイトが形成するグリア癒痕が主要な阻害因子であると考えられてきたが、OEC 移植により、グリア癒痕の形成が抑制されるという結果は得られていない。今回の結果でもグリア癒痕に変化は見られなかった。

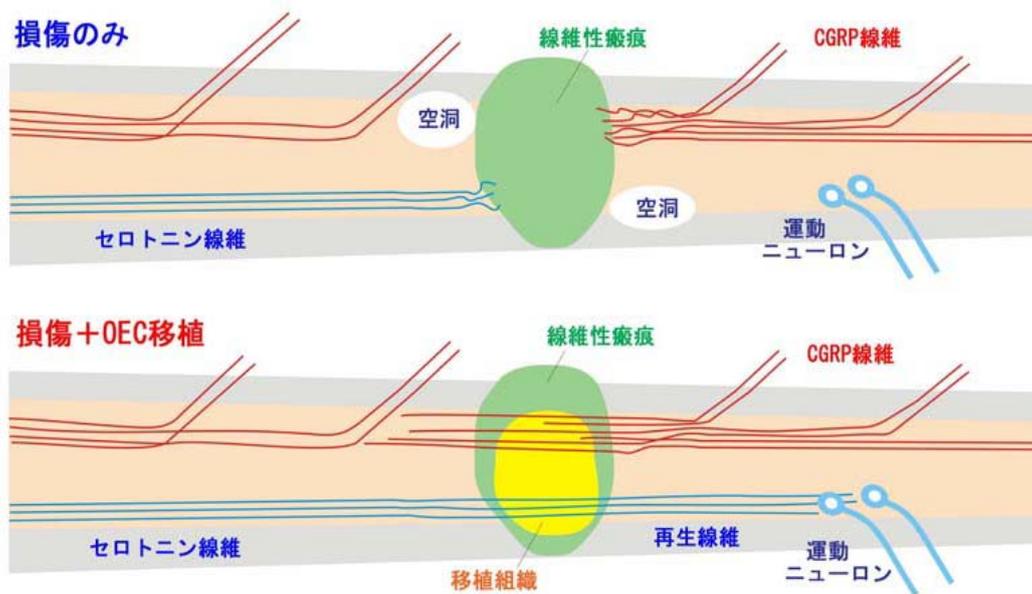


図2. 本研究のまとめ。損傷のみの場合（上）は脊髄の損傷部には線維性瘢痕が形成され、切断された下行性のセロトニン線維と上行性の CGRP 線維は再生しない。OEC 移植群（下）では移植により線維性瘢痕の形成が抑制され、再生線維が損傷部を越えて伸長する。

以上の研究のうち、損傷と OEC 移植の手術は共同研究員である李洪鵬（中国医科大学・解剖学教室・助教授）と昨年 7 月まで神経研の流動研究員であった膝錫川（現遼東医学院大学・病理学教室・助教授）が、OEC の培養は東京都神経研の黒田純子技術員がそれぞれ担当し、川野が研究の統括を行った。

今後、脊髄損傷の治療法の確立を目指してさらに研究を進めていく予定である。具体的には、OEC 移植に加え、線維性瘢痕の形成を阻害する処置（IV 型コラーゲンの合成阻害やコンドロイチン硫酸の分解）の併用や、軸索伸長を促進する神経栄養因子の投与なども考えている。

参考文献（下線は代表研究者と共同研究者）：

Kawano H, Li HP, Sango K, Kawamura K, Raisman G: Inhibition of collagen synthesis overrides the age-related failure of regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. J. Neurosci. Res., 80 (2): 191-202, 2005.

Homma A, Li HP, Hayashi K, Kawano Y, Kawano H: Differential response of arcuate proopiomelanocortin- and neuropeptide Y-containing neurons to the lesion produced by gold thioglucose administration. J Comp Neurol., 499: 120-131, 2006.

Li HP, Homma A, Sango K, Kawamura H, Raisman G, Kawano H: Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site. J. Neurosci. Res., 85: 536-547, 2007.

Teng X, Nagata I, Li HP, Kimura-Kuroda J, Sango K, Kawamura K, Raisman G, Kawano H: Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons after transplantation of olfactory ensheathing cells and fibroblasts prevents fibrotic scar formation in the lesion site. J. Neurosci. Res. 86(14):3140-3150, 2008.

注：本研究は以下に掲載された。Teng X, Yoshioka N, Kimura-Kuroda Junko, Kawamura Koki, Kawano H, Li HP: Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in a rat model of spinal cord injury. Neur. Regener. Res. 2010 印刷中。 作成日：2010年3月12日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 福永 浩司
所属機関名： 東北大学大学院薬学研究科
所属部署名： 薬理学分野 職名： 教授
所在地： 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3
電 話： 022-795-6836 内線： 6836



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

神経変性疾患治療薬のトランスレーショナルリサーチの基盤形成

3. 成果の概要

本研究では生薬を含む天然化合物の中から、神経細胞において神経生存シグナルであるプロテインキナーゼ B の活性化反応を指標にして、新規バナジウム有機錯体化合物を創製した。さらに、日本と中国における神経変性疾患の創薬研究拠点を作るために共同して、シーズ化合物の創薬研究を行なった。

※発表論文等

Transcriptional Upregulation of Calcineurin A β by Endothelin-1 is Partially Mediated by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ 3 in Rat Cardiomyocytes. Ying-Mei Lu, Norifumi Shioda, Yui Yamamoto, Feng Han, Kohji Fukunaga BBA - Gene Regulatory Mechanisms 2010 in press.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 福永 浩司	職名： 教授
所属機関名： 東北大学大学院薬学研究科	部署名： 薬理学分野
中国側研究者氏名： 韓 峰 (Feng Han)	職名： 准教授
所属機関名： 浙江大学薬学部・薬理毒性研究所	部署名： 薬理学分野

神経変性疾患治療薬のトランスレーショナルリサーチの基盤形成

日本側研究者氏名	福永 浩司
所属機関	東北大学大学院薬学研究科
中国側研究者氏名	韓 峰
所属機関	浙江大学薬学部

要 旨

本研究の目的は日本と中国における神経変性疾患治療薬のトランスレーショナル・リサーチの基盤を形成することである。東北大学(日本)、蘇州大学(中国)、浙江大学(中国)チームで神経変性疾患治療薬の開発研究を行った。Fas-ligand (FasL) は TNF ファミリーに属するアポトーシス誘導因子のひとつであり、分子量約 40kDa の II 型膜貫通蛋白質である受容体である Fas と結合することによって Fas を発現する細胞でアポトーシスを誘導する。主に細胞膜に発現する膜型 FasL (mFasL)の細胞外領域にあたる C 末端側 26kDa が metalloprotease のひとつである ADAM10 に限定分解され、soluble Fas-ligand (sFasL) が産生される。しかしながら、脳虚血において sFasL がいつ、どの細胞で産生され神経細胞死を誘導するのか明らかではない。本研究では 2 種類の脳虚血モデルを用いて ADAM10 の活性化機構と脳虚血後の FasL の発現細胞を初めて明らかにした。さらに、FasL の誘導を抑制する神経変性疾患治療薬のシーズを見出した。

Key Words 神経変性疾患, Fas-ligand, ADAM10, アポトーシス, Akt

緒 言 :

私達はアルツハイマー病のモデルマウスである嗅球摘出マウスを用いて bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium (IV) [VO(OPT)] が protein tyrosine phosphatase1B を抑制して、PI3 キナーゼを活性化する結果、細胞の生存シグナルである protein kinase B (Akt) を活性化することを報告した(図1) (1)。新しいシーズである VO(OPT) は嗅球摘出マウスにおいて傷害された海馬歯状回における神経新生を回復させ、同時に認知機能障害を改善した (2)。脳虚血において Akt 活性が低下して、その結果 FasL が誘導されること、FasL の誘導は神経細胞に置いて Caspase 8、Caspase 3 を活性化してアポトーシスを誘導することを明らかにした (3, 4)。しかし、脳虚血障害時に FasL が脳のどの細胞で産生され、脳損傷を起こすのか不明であった。本研究では 2 種類の脳虚血モデルを用いて FasL の活性化機構を明らかにした。さらに、FasL の活性化を抑制する神経変性疾患治療薬のシーズを見出した。

実験方法 :

マウス中大脳動脈一過性閉塞虚血モデルは既報の方法により作製した (3)。12 週齢の C57BL6J マウスを実験に用いた。シリコンコーティングしたナイロン栓糸を内頸動脈から挿入して、中大脳動脈を 90 分間閉塞した後再開通した。再開通直後(0)、2、6、24 時間後に脳組織を摘出して免疫ブロット解析を、灌流固定して免疫組

織化学的解析を行った。多発性脳塞栓モデルであるマイクロスフェア脳塞栓モデルは 10-12 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いて既報の方法で作製した (5)。マイクロスフェア注入直後(0)、0.5、2、3、7 日目に大脳皮質を摘出して FasL の発現を免疫プロット法で解析し、灌流固定して免疫組織化学でも解析した。ミノサイクリンは 45 mg/kg/day でマイクロスフェア注入の翌日から 6 日間、腹腔内投与した。

実験結果：

福永らはマウス中大脳一過性閉塞虚血モデルを用いて、90 分間虚血の再開通直後 (0)、2、6、24 時間後に虚血部位である大脳皮質を摘出して、組織抽出液を調製して、免疫プロット解析を行い、ADAM10 の活性化の時間経過を調べた。ADAM10 の活性化体は再開通直後から有意に上昇し、少なくとも 24 時間、その活性体の発現は上昇した。免疫組織化学手法を用いて ADAM10 の発現細胞を調べると、特に、虚血の梗塞周辺領域(ペナンプラ)において強い発現が見られ、その免疫反応性を示す陽性細胞のほとんど MAP2 陽性細胞であった。このことはペナンプラ領域の神経細胞において活性型 ADAM10 が脳虚血直後から持続的に発現することが示唆された。次に、同じ脳組織抽出液を用いて、mFasL と sFasL の発現を免疫プロット法にて解析した。活性型 ADAM10 の発現上昇の時間経過に一致して、sFasL の量は 2 時間をピークとして急激に上昇し、24 時間まで有意な上昇が持続した。逆に、mFasL の発現量は 0 及び 2 時間で一過性に低下した。面白いことに虚血再開通後 24 時間後には mFasL も発現量が有意に上昇した。私達は以前に、FasL 遺伝子発現が虚血後 1-2 日目に上昇することを見いだしており、この結果と一致している。

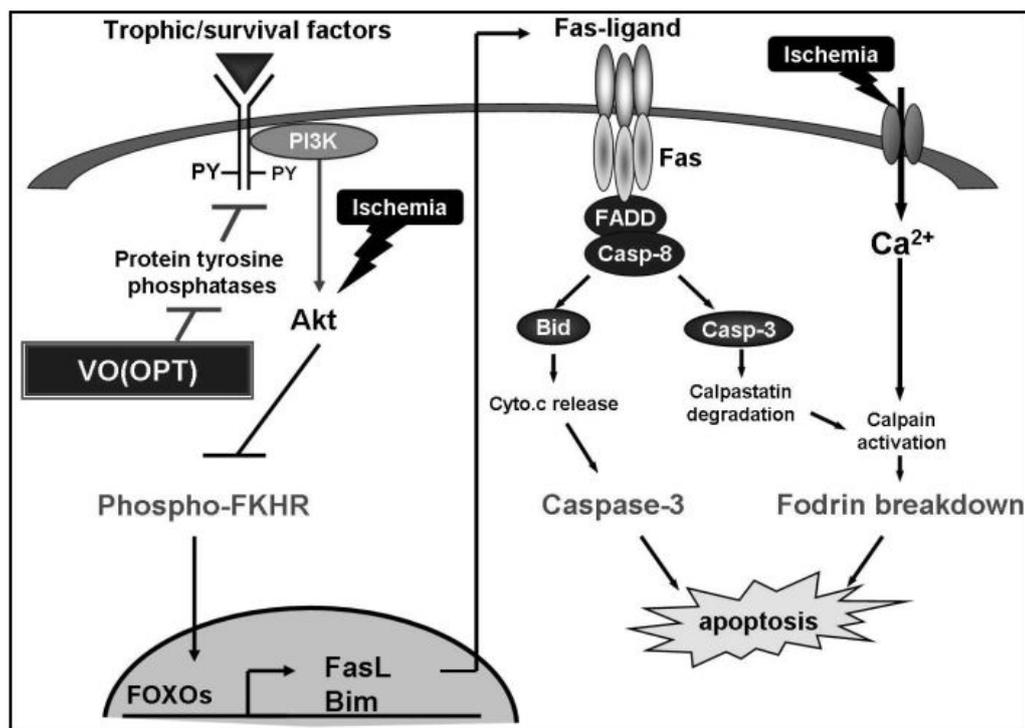


図 1. 脳虚血における Fas-ligand の発現とアポトーシスの誘導機構

次に、免疫組織化学的解析により、sFasL の発現部位について検討した。偽手術群のマウス大脳皮質においては sFasL の免疫染色はほとんど見られない。それに対して、虚血再開通マウス大脳皮質のペナンプラ領域では著しい免疫陽性細胞の上昇が見られた。神経細胞のマーカーである NeuN とミクログリア細胞のマーカーである

ED1 で二重染色を行うと、ほとんどの sFasL 陽性細胞は NeuN で染色され、僅かな sFasL 陽性細胞が ED1 陽性であった。このことは虚血直後から発現する活性型 sFasL は主にペナンプラ領域の神経細胞に発現することを示している。虚血直後の sFasL の発現上昇は私達のオリジナルな発見である (Fukunaga et al, 論文準備中)。

共同研究者である韓博士は、彼らが開発した多発性脳塞栓モデルであるマイクロスフェア脳塞栓ラットを用いて、虚血後亜急性期での FasL の誘導を調べた (5)。マイクロスフェア注入後 2-7 日目にかけて、持続的な FasL の上昇が認められた。免疫組織化学的解析により、FasL の発現細胞を同定した。マイクロスフェア注入後 24 時間以降に発現が上昇するほとんどの細胞は ED1 陽性細胞であり、ミクログリアにおいて FasL が上昇することが示された。一方、少数の神経細胞とアストログリア細胞においても FasL の発現は上昇していた。次に、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンをマイクロスフェア注入後 1 日目から 6 日間投与して、FasL の発現を検討した。マイクロスフェア注入後 7 日目に見られる FasL の顕著な誘導はミノサイクリン投与により完全に抑制された。同時に、神経細胞死も有意に抑制された (Han et al, 論文投稿中)。このことは活性化ミクログリアにおける FasL の誘導は神経細胞のアポトーシスの引き金になることを示している。

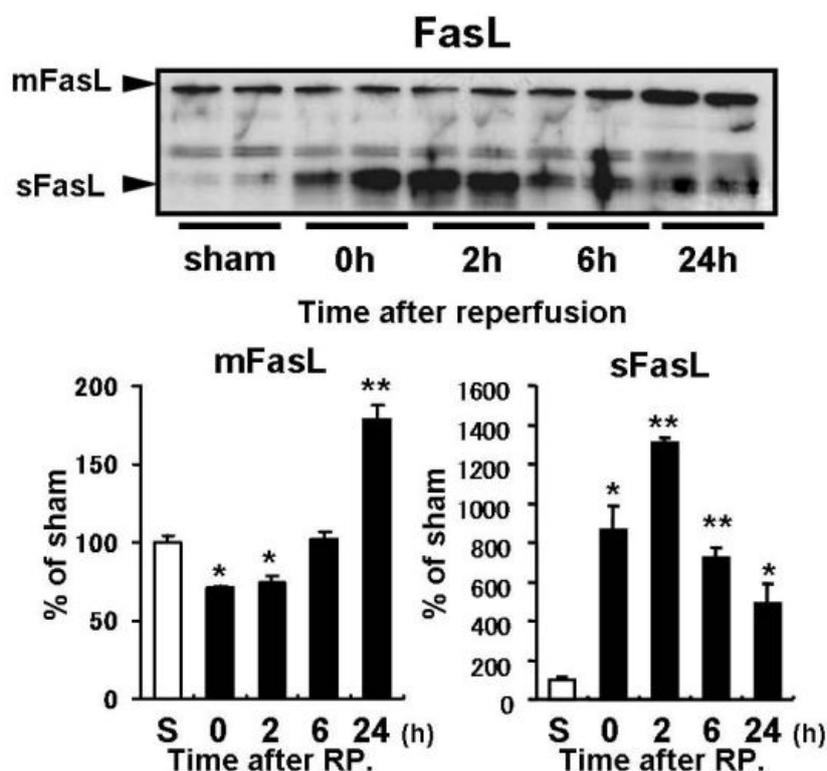


図 2. マウス中大脳動脈閉塞虚血後の大脳皮質における FasL の誘導の時間経過

考察 :

本研究で私達 (東北大学) と韓博士 (浙江大学) は異なる中大脳閉塞マウスとマイクロスフェア脳塞栓ラット脳虚血モデルで検討した。急速に脳損傷が進展する中大脳動脈閉塞では再開通直後から FasL は ADAM10 により、mFasL から sFasL が神経細胞において産生され、活性型 sFasL が神経細胞死を誘導すること、また、24 時間後では mFasL が誘導されることが明らかとなった。一方、マイクロスフェア脳塞栓では 12 時間後から 7 日にか

けて mFasL の誘導が起こり、アポトーシスを誘導された。マイクロスフェア脳塞栓における mFasL の誘導細胞はミクログリアであり、ミクログリア抑制薬であるミノサイクリンがほぼ完全に mFasL 誘導を抑制することが解った。一方、Qin 博士らは、脳虚血においてアポトーシスとは異なるオートファジーによる細胞障害が細胞死を誘導することを見いだした (6)。今後はオートファジーによる細胞死に対する V0(OPT) とミノサイクリンの抑制効果について共同で解析する。

結語：

本研究では脳梗塞に伴う FasL の誘導を抑制する 2 つのシーズを開発した。V0(OPT) は Akt の活性化反応を介して FasL や Bim などのアポトーシス誘導因子の発現を抑制した(図 1)。テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンはミクログリアの活性化反応を抑制することで、FasL の発現を抑制する。これらの研究成果は私達のグループのオリジナルな発見であり、今後の脳梗塞急性期と亜急性期治療において新しい創薬開発に繋がる。今後はこれらのシーズ化合物の毒性と臨床応用について日本と中国で共同研究を進めて臨床開発の基盤を作る。

参考文献

1. F. Han, N. Shioda, S. Moriguchi, ZH. Qin and K. Fukunaga: The vanadium (IV) compound rescues septo-hippocampal cholinergic neurons from neurodegeneration in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 151: 671-679 (2008)
2. N. Shioda, F. Han, M. Morioka and K. Fukunaga: Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 155: 876-887 (2008)
3. N. Shioda, F. Han, S. Moriguchi, K. Fukunaga: Constitutively active calcineurin mediates delayed neuronal death through Fas-ligand expression via activation of NFAT and FKHR transcriptional activities in mouse brain ischemia. *J. Neurochem.* 102: 1506-1517 (2007)
4. N. Shioda, T. Ishigami, F. Han, S. Moriguchi, M. Shibuya, Y. Iwabuchi and K. Fukunaga: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway by a vanadyl compound mediates its neuroprotective effect in mouse brain ischemia. *Neuroscience* 148: 221-229 (2007)
5. F. Han, A. Ali Raie, N. Shioda, ZH. Qin and K. Fukunaga: Accumulation of beta-amyloid in the brain microvessels accompanies increased hyperphosphorylated tau proteins following microsphere embolism in aged rats. *Neuroscience* 153: 414-427 (2008)
6. HL. Zhang, ZL. Gu, SI. Savitz, F. Han, K. Fukunaga and ZH. Qin: Neuroprotective effects of prostaglandin A(1) in rat models of permanent focal cerebral ischemia are associated with nuclear factor-kappaB inhibition and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma up-regulation. *J. Neurosci. Res.* 86: 1132-1141 (2008)

作成日：2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会

2009年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 許 煥麗
所属機関名： 東京大学大学院医学系研究科
所属部署名： 肝胆膵外科 職名： 客員研究員
所在地： 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1
東京大学医学部附属病院
電 話： 03-5800-8654 内線： 33321



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

先進的スクリーニング技術を導入したウイルス性肝炎に対する新規治療薬の開発

3. 成果の概要

本研究はウイルス性肝炎の発症及び関連疾患への進行を抑制する化学療法剤を開発することを目的とし、新規に合成された化合物も含めて、基礎生命科学的手法を用いた in vitro 研究及び in vivo 研究を行うことにより、有効性の高い化合物をライブラリから抽出し、有効性が評価された化合物による疾患制御のメカニズムを基礎医学的な視点から解析することを展開した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 許 煥麗	職名： 客員研究員
所属機関名： 東京大学大学院医学系研究科	部署名： 肝胆膵外科
中国側研究者氏名： 杜 冠華	職名： 副所長・教授
所属機関名： 中国医学科学院・協和医科大学	部署名： 薬物研究所

肝癌・ウイルス性肝炎に対する新規治療薬の開発と評価

Evaluation of new chemotherapeutic agents for hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus infection

研究代表者名：許 煥麗

日本研究機関名：東京大学医学部附属病院・肝胆膵外科学

中国側共同研究代表者名：杜 冠華

中国所属機関名：中国医学科学院・協和医科大学・薬物研究所

中国側共同研究者名：趙 新（解放軍第302医院・医），崔 曉燕（川大・医），徐 文方（山大・薬）

日本側共同研究者名：稲垣 善則（東大・医），唐 偉（東大・医）

Abstract

To find effective chemotherapeutic agents for hepatocellular carcinoma (HCC) with hepatitis B virus (HBV) infection, we evaluated the effects of newly-synthesized compounds 24F and LY52 on the metastasis of a HBV infected HCC cell line and the anti-HBV activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in this cell line. The effects of these drugs on the cell proliferations were detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide assays. The effect of 24F on aminopeptidase (APN) activity was measured by a spectrophotometric method using L-leucine-*p*-nitroanilide as a substrate of APN. The effects of LY52 on the MMPs expressions were measured by gelatin zymography. The effects of 24F and LY52 on cell invasion were performed by 24-well invasion chambers. Effects of Cinobufacini, Bufalin, and cinobufagin on HBV antigens and DNA were quantified with a HBV DNA quantitative kit. The APN activity was inhibited in the presence of 24F in dose-dependent manner. The effects of LY52 on MMP-9 expressions in HepG2.2.15 cells were not obvious. The inhibition rates of LY52 on pro-MMP-2 levels of HepG2.2.15 cells were in a dose-dependent manner. 24F could inhibit the invasion of HepG2.2.15 cells, which displayed 56% of inhibition rate in the concentration of 100 μ g/mL. LY52 could also effectively inhibit the invasion of HepG2.2.15 cells, although a dose dependent manner was not found. The effect of cinobufacini on secretion of HBsAg, HBeAg, and HBcrAg was promoted in a time-dependent manner. It was more effective than its components bufalin and cinobufagin in inhibiting the secretion of HBV antigens. These result showed that 24F and LY52 might be effective anti-metastasis reagents for HCCs, even when the HCC cells were infected by HBV. Cinobufacini may serve as an anti-viral therapeutic agent for the management of HBV infection, which warrants further investigation.

Key words: Hepatitis B virus, hepatocellular carcinoma, Aminopeptidase N inhibitor, matrix metalloproteinases inhibitor, Cinobufacini

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is recognized as the leading cause of chronic hepatitis and the cause of 60-80% of hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. A number of researches have shown that chronic infection by hepatitis virus, especially HBV, leads to the progression of chronic hepatitis to liver cirrhosis and contribute to HCC. It was also showed that HBV infection increased the invasion potential of HCC, though the role of HBV in the invasion and metastasis of HCC was not elucidated clearly. Thus, the discovery and development of novel antiviral drugs for HCC is urgently needed. Aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F and matrix metalloproteinases (MMPs) inhibitor LY52 were newly-synthesized compounds by our research group. Our previous studies showed that 24F could inhibit the activity of the targeted enzyme APN and suppress the invasive capacity of HCC cells, and LY52 could inhibit the

invasion and metastasis of HCCs via blocking the proteolytic activities of MMPs. In this study, we evaluated the effects of 24F and LY52 on the invasion ability of a HBV infected HCC cell line, HepG2.2.15.

Cinobufacini (Huachansu), a Chinese medicine prepared from this toad skin, has been extensively used in clinics to treat a number of diseases, such as malignant tumors, chronic hepatitis B. In this study, we also evaluated the anti-hepatitis B virus activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in HepG2.2.15 cells.

Materials and Methods

Reagents. The hydroxamic acid derivatives 24F was synthesized as one of series of cyclic-imide peptidomimetics with free amino group by using 3D-QSAR model¹. Caffeoyl pyrrolidine derivative LY52, was designed and synthesized as described previously². LY52 was dissolved in dimethylsulfoxide and 24F was dissolved in phosphate-buffered saline for *in vitro* studies. Cinobufacini was obtained from Anhui Jinchuan Biochemical Co., Ltd., China. Bufalin and cinobufagin were purchased from Sigma.

Cell culture and treatment. The human HBV-transfected cell line HepG2.2.15 was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 200 µg/mL G418 at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. The effects of these drugs on the cell proliferations were detected by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. The effect of 24F on APN activity was measured by a spectrophotometric method using L-leucine-*p*-nitroanilide as a substrate of APN. The effects of LY52 on the MMP-2 and -9 expressions were measured by gelatin zymography. The effects of 24F and LY52 on cell invasion was performed by 24-well BD BioCoat Matrigel invasion chambers. Effects of Cinobufacini, Bufalin, and cinobufagin on HBV antigens and DNA were quantified with a HBV DNA quantitative kit.

Results

Effects on proliferations of HepG2.2.15 cells

The HepG2.2.15 cell growth could be inhibited by 24F, but there was no significant difference in the inhibition rate among 1-200 µg/mL of 24F. No acute cytotoxic effect was observed by trypan blue staining. The inhibitory effects of LY52 on HepG2.2.15 cells proliferations increased as the concentrations and incubation periods increased. No obvious inhibitory effects of LY52 were found in lower concentrations (<200 µg/mL) and in shorter incubation period (24 h), which was also verified by trypan blue staining. Cinobufacini at the concentrations below 20 µg/mL, bufalin at the concentrations below 10⁻² µM, and cinobufagin at the concentrations below 10⁻¹ µM were non-toxic to HepG2.2.15 cells. Cinobufacini, bufalin, and cinobufagin could significantly inhibit the growth of HepG2.2.15 cells at the concentrations above 20 µg/mL, 10⁻² µM, and 10⁻¹ µM, respectively.

Effects of 24F on aminopeptidase activity

The aminopeptidase activity was inhibited in the presence of 24F in dose-dependent manner and the inhibition rate of ΔA/min under 0.27 mM (100 µg/mL) of 24F was around 25% compared with the negative control. In this analysis, IC₅₀ of 24F (the volume of 24F that displayed 50% inhibition of enzyme activity) was calculated 1.88 mM.

Effects of LY52 on MMPs activities

The effects of LY52 on MMP-9 expressions in HepG2.2.15 cells were not obvious. The inhibition rates of 0.1, 1, 10, 100, and 200 µg/ml of LY52 on pro-MMP-2 levels of HepG2.2.15 cells were 4.0%, 9.4%, 11.5%, 15.8%, and 34.4%, respectively, compared with the control group (100%).

Effects of 24F and LY52 on the invasion of HepG2.2.15 cells

The number of invading cells was significantly decreased in the presence of 100 µg/mL of 24F compared with that in non-treated cells. This result suggested that 24F has an ability to inhibit the invasion of HepG2.2.15 cells, which displayed 56% of inhibition rate in the sample incubated with 100 µg/mL of 24F. LY52 could also effectively inhibit

the invasion of HepG2.2.15 cells, although a dose dependent manner was not found. The inhibition rates of 0.1, 1, 10, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LY52 on invasion abilities of the HepG2.2.15 cells were 21.8%, 26.4%, 43.3%, 50.2%, and 19.7%, respectively.

Effects of cinobufacini, bufalin, and cinobufagin on the HBV antigens and DNA

The data clearly showed that the inhibitory effect of cinobufacini on secretion of three HBV antigens (HBsAg, HBeAg, and HBcrAg) was promoted in a time-dependent manner. On day 6 cinobufacini at the concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly reduced the secretion of HBsAg, HBeAg, and HBcrAg, which was more potent than the positive control 3TC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in inhibiting HBV antigen secretion. On day 6, bufalin at the concentration of 10^{-4} μM significantly inhibited secretion of HBeAg and HBcrAg at the rates of 11.36 and 19.58%, respectively. In this concentration of bufalin was more potent than the positive control 3TC in inhibiting HBcrAg secretion. The data for bufalin at 10^{-4} μM on day 3 and 6 showed that the inhibitory effects of bufalin on secretion of two HBV antigens (HBeAg and HBcrAg) were time-dependent. After incubation with cinobufagin for 3 days or 6 days, secretion of HBeAg and HBcrAg in the culture medium was slightly less than that with the control. Moreover, cinobufagin at a concentration of 10^{-3} μM on day 3 exhibited the same potent activity as the positive control 3TC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in terms of the inhibition of HBeAg secretion.

Discussion

Although recent progress in the diagnosis and treatment modalities has improved the prognosis of patients with HCC, the long-term prognosis remains disappointing because of the frequent recurrence and the development of intrahepatic metastasis in 16%-65% of HCCs patients. Since APN functions to degrade extracellular matrix and thereby promote the cancer cell invasion and metastasis, inhibition of APN function would have a significant role in the development of cancer chemotherapeutic agents. This study showed that our newly-developed APN/CD13 inhibitor 24F can inhibit the activity of the targeted enzyme APN and suppress the invasive capacity of HCC cell. It was suggested that HBV infection may facilitate tumor cell invasion by upregulation of MMPs and subsequent destruction of the extracellular matrix. In this study, we assessed the effects of MMPs inhibitor LY52 on MMPs expressions in HepG2.2.15 cells, which is originated from the same clone of HCC. It was suggested that LY52 could effectively inhibit invasion of HCC cells by suppressing MMP-2 expressions. These result showed that 24F and LY 52 might be effective anti-metastasis regents for HCCs, even when the HCC cells were infected by HBV.

We also evaluated the anti-hepatitis B virus activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in HepG2.2.15 cells. It was demonstrated that the effects of cinobufacini on secretion of HBsAg, HBeAg, and HBcrAg was promoted in a time-dependent manner. It was more effective than its components bufalin and cinobufagin in inhibiting the secretion of HBV antigens. The present findings suggested cinobufacini may serve as an anti-viral therapeutic agent for the management of HBV infection, which warrants further investigation.

参考文献

- 1 Cui SX, Qu XJ, Gao ZH, et al. Targeting aminopeptidase N (APN/CD13) with cyclic-imide peptidomimetics derivative CIP-13F inhibits the growth of human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009.
- 2 Qu X, Yuan Y, Tian Z, et al. Using caffeoyl pyrrolidine derivative LY52, a potential inhibitor of matrix metalloproteinase-2, to suppress tumor invasion and metastasis. *Int J Mol Med*. 2006; 18 (4), 609-614

注：本研究は、2009年10月24日第82回日本生化学会大会にてポスター発表。なお、英文学術論文は投稿中であります。

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名 酒 井 郁 子
所属機関名：千葉大学
所属部署名：看護学研究科 職名：教授
所 在 地：千葉市中央区亥鼻 1-8-1
電 話：043-226-2768（直通）



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

四川大地震後被災者のリハビリテーション看護に関するニーズに応じた看護現
任教育プログラムの開発

3. 成果の概要

四川大地震災害拠点病院に勤務する医師、看護師、理学療法士、作業療法士お
よび被災後リハビリテーションを必要とした患者へのインタビューを実施し、リ
ハビリテーション看護ニーズに関する調査票を作成した。その後専門家会議を実
施して調査票を洗練し、リハビリテーション看護に関する現任教育ニーズを調査
した。この調査結果を用いて看護師を対象とした現任教育プログラムの素案を作
成した。

※発表論文等

なし。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 酒井郁子	職名：教授
所属機関名：千葉大学	部署名：看護学研究科
中国側研究者氏名： 胡秀英	職名：副教授/副科長
所属機関名：四川大学	部署名：華西看護学部/華西病院

四川大地震被災住民のリハ看護に関するニーズに応じた 看護師現任教育プログラムの開発

研究者氏名 酒井郁子
日本所属機関 千葉大学大学院看護学研究科
共同研究代表者 胡秀英
中国所属機関 四川大学華西看護学部/華西病院

<要旨>

四川大地震被災者のリハ(以下リハ)看護ニーズおよび看護師のリハ看護に関する学習ニーズを明らかにし、これをもとに看護師教育プログラムを立案、実施し、患者、看護師、病院管理からの多面的な効果を検討することを目的として研究を実施した。四川大地震災害拠点病院に勤務する医師、看護師、理学療法士、作業療法士および被災後リハを必要とした患者へのインタビューを実施し、リハ看護学習ニーズに関する調査票を作成した。その後専門家会議を実施して調査票を洗練し、看護師の災害リハ看護に関する学習ニーズ(以下学習ニーズ)を調査した。4か所の災害拠点病院の看護師220人に配布し、170人から回答を得た。結果、学習ニーズは、災害発生から1カ月までの早期のリハ看護について必要と答えたものが80%以上の項目は、合併症管理とくに慢性病のコントロールと睡眠障害の予防、PTSDへの対応、疼痛管理であった。1カ月から6ヶ月後の中期の学習ニーズでは、80%以上の対象者が必要と答えた項目は、日常生活能力の再獲得支援、移動能力の向上支援、家族への介護指導方法であった。災害6か月以降の後期リハにおける学習ニーズでは社会資源の利用であった。また災害リハを提供するための看護管理では、患者の状態に応じた療養場所の選択と搬送に関するマネジメント、リハ資源の公平分配と継続看護のためのマネジメントについての学習ニーズが高かった。以上を看護師現任教育プログラムの学習項目に組み入れた学習プログラムを検討し作成した。

<Key Words> 四川大地震、被災者、リハビリテーション看護、看護師、学習ニーズ、現任教育

I はじめに

日本では、阪神大震災をきっかけとして、その後、新潟中越沖地震、能登半島地震、JR 福知山線事故など大規模災害を経験したことによって災害看護学が構築されつつあり、現場救護、救命救急に関する知見は蓄積しつつあるが、災害により障害を負った人々への長期的リハ看護に関してはほとんど報告がない。

2008年5月12日に発生した四川大地震に関しても同様に、発生直後からの医療支援活動、心のケアに関する報告はあるが、被災者のリハに関する報告はほとんどないのが現状である。しかし現地では巨大地震のあとの復興はいまだ進んでいない。現在、中国は高齢化を突き進んでおり、今回の被災者のなかにも災害弱者である高齢者が多く含まれている。リハは本来、予防の概念を含む実践活動である。つまり地震により障害を負った人に加え、障害をもともと有している人に対する災害時の情報提供、救助、健康問題への対応、長期的回復支援を一貫して実施することが災害リハ看護の重要課題と考える。一方、四川大地震被災者のリハ看護ニーズの実態調査、医療者の困難感やリハにかかわる医療ケア提供システムの評価は不十分である。

このような背景から、四川大地震被災住民に対して中国四川省の災害拠点病院などの看護師が、リハ看護の基本的な知識と技術を得て、被災住民の長期的な回復とQOLの向上に資する看護援助を実施できるように、教育プログラムを考案することは、中国だけでなく日本においても有用だと考えた。

【研究目的】

四川大地震被災者のリハ看護ニーズおよび看護師のリハ看護に関する学習ニーズを明らかにする。これをもとに看護師教育プログラムを立案、実施し、多面的に実現可能性と効果を検討する。

II 研究方法

1. 研究枠組み



図1 研究枠組み

研究枠組みを図1に示した。本研究では、段階的に、看護師の災害リハ看護の学習ニーズを明らかにする。第1段階では、被災者と災害医療従事者へのフォーカスグループインタビュー（以下 FGI）を実施し、災害リハ看護のニーズと看護師の学習ニーズを抽出した。これをもとに看護師の災害リハ看護学習ニーズ調査用紙 ver1 を作成し、これを用いてリハ看護および看護管理者による専門家会議を実施し項目の内容妥当性の検討と洗練を行い、調査用紙 ver2 とした。そして看護学研究者による調査項目および調査方法の洗練を行い、調査用紙 ver3 を作成した。調査用紙 ver3 を用いて看護師の災害リハ看護に関する学習ニーズ調査を実施し、これらの結果を統合して、四川省災害拠点病院等における看護師への災害リハ看護教育項目を抽出した。

2. 医療従事者への FGI

1) 調査期間及び調査場所、調査対象

調査期間は2009年6月であった。調査場所は、四川大学華西病院地震リハ治療センターおよび、都江堰市整形外科病院（災害拠点病院）の2か所であった。調査対象は四川大学華西病院リハ治療センター医師2名、理学療法士1名、作業療法士1名、看護管理者2名、看護師2名、都江堰市整形外科病院医師3名、看護管理者3名であった。

四川大学華西病院地震リハ治療センターは大地震後に震源地周辺から搬送されてきた被災者への本格的なリハ拠点として現在も活動している。また災害拠点病院である都江堰市整形外科病院は、もともと地域の医療拠点であったが地震のため倒壊し、地震から1年以上経過した2009年6月においても仮設プレハブ平屋建てで診療を継続していた。

2) データ収集方法およびデータ分析方法

前もって研究同意の得られたリハ関連の医療従事者に集まってもらい、2時間半から3時間のグループインタビューを実施した。インタビューの全ての経過を調査対象者の許可を得て録音し逐語録を作成し、これをデータとした。なおデータは日本語に訳し中国側研究者と日本の研究者が共有した。

インタビュー内容は、地震発生後から現在までのリハ活動の実際、医療従事者が認識している被災者のリハニーズ、リハ提供上の困難と課題、リハ看護に関する看護師の学習ニーズであった。分析は、これらのインタビュー項目ごとに発言内容を分類し、最終的に全体を統合して災害リハ看護の学習ニーズを抽出した。

3. 被災者の FGI

調査期間は2009年6月であった。都江堰市整形外科病院に通院中の被災者6名に対して FGI を実施した。インタビュー内容は、現在の健康状態、災害による身体、心理、社会面への影響、日常生活上の困難、リハへの自己の取り組み状況、将来展望であった。分析は、これらのインタビュー項目ごとに内容分析を用いて、発言内容を分類し、現在のリハ医療提供上の課題を抽出した。

4. 災害リハ看護に関する学習ニーズの実態把握のための調査票の開発と調査

1) 調査用紙開発過程

医療従事者の FGI 及び被災者の FGI をもとに、調査用紙 ver1 を作成した。作成の際の基本的考え方は、災害リハの特徴を表現できること、地震災害の被災によるリハ提供上の特徴を表現できること、長期的な回復過程を網羅できることであった。これを用いて専門家会議を実施した。専門家会議構成員は、リハ看護

護、看護教育、看護管理の領域から 10 年以上の経験を有し、リハ看護学に関する知識が豊富であり、本研究への協力の同意を得られたを一人ずつ 3 名選択した。また同様の基準で理学療法士 1 名、作業療法士 1 名を選択し、合計 5 名による専門家会議を開催した。この結果を基に調査用紙 ver2 を作成した。また次に看護学研究者 5 名による専門家会議を実施し、項目を確定し調査方法を決定した。

2) 開発した調査用紙 ver3 の構造

FGI および専門家会議の検討から、災害リハ看護に必要な項目を、①対象者の特徴、②リハ過程、③リハを効果的に提供するための看護管理、④発展的災害リハ看護の 4 つの枠組みで検討した。そして①対象者の特徴を被災者、災害弱者（高齢者、小児、もともとの障害を有していた人）、健康住民に分類した。②リハ過程を初期（災害発生から 1 カ月）、中期（1 カ月から 6 カ月）、後期（6 か月以降）と分類した。このリハ過程に沿って FGI で得られたデータをもとに項目を作成し、研究方法で示した調査用紙を作成した。

調査用紙は、①回答者の属性 8 項目、②リハ看護学習経験 6 項目、③災害リハ看護学習への動機と準備性 3 項目、④災害リハ看護現任教育のニーズに関する自己評価 46 項目、の 4 セクションから構成され、合計 63 項目であった。①、②、③は 2 択および複数回答を指示し、④は非常に必要、必要、わからない、あまり必要でない、全く不要の 5 段階リッカートを指示した。

3) 災害リハ看護に関する看護師の学習ニーズ調査

調査期間は 2009 年 12 月、調査場所は、四川華西病院老年科およびリハ病棟、都江堰市中心鎮骨傷医院、都江堰市第二病院、都江堰市公立衛生医院の 4 か所であった。合計で 220 部配布し、170 部改修した。回収率は 77.3%であった。

5. 看護師現任教育プログラム案の作成

以上の結果をもとに、看護師現任教育プログラムに含まれる必要のある学習項目を抽出しプログラム案を検討した。

Ⅲ結果

1. 大地震後のリハの実態

大地震後のリハは、初期（地震発生から 1 カ月後）、中期（1 ヶ月後から 6 ヶ月未満）、後期（6 か月以降）のⅢ期に分け実施された。四川大学華西病院では、初期、中期のリハを受け持ち、被災者がそれぞれの自宅に復帰した後の後期のリハを災害拠点病院が担当した。四川大学華西病院の職員は、早期リハの効果を認識していた。しかしこれらの被災者が自分のコミュニティに帰って以降の後期リハは、人員や社会資源、物資の不足から不十分だと認識していた。その要因の一つとして地震発生地域が非常に広範であり、ゆえに、被災者の居住地区も分散しており公共交通機関が分断し、医療施設へのアクセシビリティが低いことが挙げられた。都江堰市整形外科病院職員は、災害発生まで全くリハを行ったことがなく、職員に基本的知識や技術がなかったこと、初期は救命救急に当たり、その後は 3 カ月にわたり、被災した各村を、チームを組んで訪問し、公衆衛生教育を実施した。これによって感染症の蔓延を防ぐことはできたが、それと並行して 2008 年 8 月以降の中期からリハを行わざるを得ず、さまざまな研修に職員を派遣しながら実施してきたことを語った。またリハに必要な機材の欠乏は深刻であり、現在もそれは継続した課題であると認識していた。

2. 今後のリハ提供上の課題

FGI で語られた、リハ提供上の課題は、①職業リハの資源が不足している。②医療従事者の知識と技術の標準化がなされていないため、体系的・理論的なリハが実施できない。③住民のリハに関する知識不足があり理解が得られにくく、啓発活動が必要である。④慢性疾患管理、健康教育、リハ、子育て支援を一貫してサービス提供できるようなコミュニティ拠点が必要である。の 4 点であった。そのほかに都江堰市整形外科病院では医療者も被災者であるため、医療者のストレスマネジメントの必要性が語られた。

3. リハを必要とする被災者の特徴

FGI 参加者の発言から、通常のリハを必要とする患者と比較して、被災者の特徴として以下のことが抽出された。①医療従事者への依存、愛着が非常に強く、「自分の健康や命をまるごと医療者に任せた」ようになることが多かった。②家族、家屋、財産、職業など人生にとって重要な事柄をいっぺんに喪失した体験をもちながら、リハに取り組んでいるため、当事者は気がつかないが、大きな精神的問題を抱えていることが多い。③とくに都市部に居住する中高年の被災者は大きな喪失であるにもかかわらず、政府保証が農村部ほど大きくない

ため将来への不安を抱えていることが多い、④地震発生1年以上経過した現在、中年以降の女性に首、肩、腰、足の疼痛の問題が多く生じているが、これは地震の影響が大きい。⑤PTSD、うつ、不眠などの精神症状を有する被災者は都市部に多い

3) 災害リハ看護に関する学習ニーズ

看護師、医師、理学療法士、作業療法士は災害リハ看護の学習ニーズに関して、以下のようにあげていた。①被災者の「喪失」からの回復をどのように援助したらよいか心理的援助スキルを学びたい。②長期的持続的な援助提供をどのようにしていったらよいか、③被災者は通常のリハ患者と比較して、リハ過程の合併症が発生しやすいため、合併症管理の知識を得たい。④被災者は家族からの支援を得られないケースが多いため、家族への教育の方法を知りたい、⑤農村部では「なにかあったら医師に診てもらおう」という伝統的な治療への価値観が強く、主体的にリハに取り組むことに関して住民の理解を得にくいため、啓発活動の方法、健康教育の方法を知りたい。⑥継続的なリハ医療の提供のために看護として何ができるか知りたい、⑦系統的なリハおよびリハ看護に関する教育を受けたい。断片的な知識は得ているが応用が難しく、さまざまなリハスキルをどのように被災者に適用してよいかわからない。⑧人員配置や資源の公平分配などに関するリハ看護管理を学びたい、であった。この結果をもとにして災害リハ学習ニーズ調査項目を作成した。

4. 災害リハ看護に関する看護師の学習ニーズ調査と教育プログラム検討

看護師への学習ニーズ調査（220人に配布、170人回収）の結果、非常に必要、必要と答えた看護師が80%以上であった項目を初期、中期、後期を分けて説明する。

災害発生から1カ月までの早期のリハ看護について必要と答えたものが80%以上の項目は、合併症管理とくに慢性病のコントロールと睡眠障害の予防、PTSDへの対応、疼痛管理であった。1カ月から6ヶ月後の中期の学習ニーズでは、80%以上の対象者が必要と答えた項目は、日常生活能力の再獲得支援、移動能力の向上支援、家族への介護指導方法であった。災害6か月以降の後期リハにおける学習ニーズでは社会資源の利用であった。また災害リハを提供するための看護管理では、患者の状態に応じた療養場所の選択と搬送に関するマネジメント、リハ資源の公平分配と継続看護のためのマネジメントの項目について、必要だと回答した人が80%以上であった。

以上の結果から、学習項目として、災害リハ看護の展開に必要な理論と知識、災害リハ看護の目的と目標の設定、災害リハの対象の理解、災害リハの過程の理解、看護の方法（廃用と合併症の予防、活動の促進、参加の促進、コミュニティベーストリハビリテーション、地域医療連携とネットワーク形成を含む看護師教育プログラム案を作成した。

IV 考察

震災前からリハ看護の理念の共有がなされず、リハビリテーションネットワークの仕組みが発展していたとはいえない状態で大地震が発生し、長期的にリハを必要とする被災者が多く存在している。住民も医療者もリハ看護に関する知識不足があり、提供システムの構築が間に合っていないことからリハ資源の公平分配に大きな課題があることが示唆された。リハ看護はチームアプローチが基本であり、そのためにはリハに関する知識と技術の標準化と目標の共有が必須である。そのため、災害リハ看護の学習項目は必要最小限の項目を洗練し、知識と技術の標準化を目的に検討した。また教育プログラムの実施方法に関しては、出前講義を行うか、あるいはITを活用した学習方法を構築し、災害拠点病院の負担を軽減する方向で検討することが望ましいと考えられた。また災害拠点病院にはコミュニティベーストリハビリテーション（CBR）の知識やスキルが必要とされており、大学病院ではリハビリテーションのシステム化の知識、連携協働のスキル、ネットワーク形成のスキルが必要とされていると考えられたためこれらを教育プログラムに盛り込む必要があった。

リハビリテーションを必要とする四川大地震被災者は震災後のパニック、無力感などによって身も心もまるごと医療者にあずけ、依存せざるを得ない状況に置かれること、喪失体験が非常に強大であることから通常のリハと心理的回復のプロセスが全く違うことが示唆された。また医療従事者も被災者であることからお互いが自律性を取り戻していくプロセスと体験を理解し共有することも今後重要な研究課題である。

今後開発した教育プログラムを実際に行うためには、教材の制作および、ファシリテーターの育成が必要となる。そのためのプロジェクト研究なども必要となる。四川大地震からの復興を契機に、四川省におけるリハビリテーション看護学がさらに充実していくことが期待される。

財団法人 日中医学協会

2009年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

2010年2月12日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：中 尾 稔

所属機関名：旭川医科大学

所属部署名：寄生虫学講座

所在地：北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号

電 話：0166-68-2423

職名：准教授

内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

中国四川省における囊虫症流行に関する免疫、分子疫学研究

3. 成果の概要

2009年11月に実施した現地調査で入手したサンプル（糞便、寄生虫、血清）

について、免疫、遺伝子検査を行った。 その結果、3村落におけるテニア症流行

の基礎成績が得られた。

4. 被招聘者

被招聘者氏名：李 調 英

所属機関名：中国CDC・寄生虫病研究所

職名：主任研究員

部署名：人獣共通条虫症対策部

5. 滞在日程概要（日付・主な活動・工程など）

2月18日、19日：研究打合せ、技術指導を行った。

2月22日～26日：サンプルの解析を実施した。

3月1日、2日：解析成績の報告会、論文作成の指導、打合せを実施した。

中国四川省における囊虫症流行に関する免疫、分子疫学研究

研究者氏名	李 調英
中国所属機関	中国CDC・寄生虫病研究所 主任研究員
日本研究機関	旭川医科大学
指導責任者	准教授 中尾 稔
共同研究者	伊藤 亮, 迫 康仁, 柳田 哲矢 中谷 和宏, 岡本 宗裕

要 旨

中国四川省では人獣共通条虫症（脳囊虫症、エキノコックス症）が流行している。本研究ではこれまでに①人体寄生テニア属条虫3種(*Taenia solium*、*Taenia saginata*、*Taenia asiatica*)が同所的に分布していること(Li TY et al. 2006)、②*T. saginata* と *T. asiatica* 間での交雑個体が確認されたこと(Nkouawa A et al. 2009) から、③交雑個体の追加確認、④交雑個体の遺伝子解析、⑤*T. solium* が確認される村落における囊虫症患者の検出とその検出法の評価、⑥今後の流行抑制に向けた対策指針策定を目的とする現地での共同調査を 2009 年 11 月に実施した。11 月に採集した寄生虫、住民の糞便、血清を用い、2010 年 2 月に四川省寄生虫行研究所から Li TY 博士を招へいし、3 村落住民におけるテニア症および囊虫症流行の現状解析を行った。その結果、①今回調査した 3 村落で駆虫されたテニア条虫は *T. saginata* と *T. solium* であった。②2 集落からは *T. saginata* だけが検出されたが、残りの 1 集落からは *T. solium* と *T. saginata* が検出された。③1 集落で高率に囊虫症患者ならびに *T. solium* 保虫者が確認された。④通常 *T. solium* 保虫者は 1 隻の条虫を宿すことがほとんど全例と言われているにもかかわらず、今回確認された 2 症例では 5 隻および 20 隻が駆出された。テニア症患者と囊虫症患者の居住地と地理情報についての解析ならびに *T. solium* テニア症患者の家族、近隣住民における囊虫症の集積性の有無確認が今後の研究テーマである。

Key Words

中国四川省、チベット族、テニア症、囊虫症、遺伝子解析、血清検査、糞便内遺伝子解析

緒 言

人体寄生テニア条虫として *T. saginata*（無鉤条虫、ウシサナダムシ）と *T. solium*（有鉤条虫、ブタサナダムシ）の 2 種が古くから知られている。近年、アジア各地で第 3 のテニア条虫 *T. asiatica*（アジア条虫）の分布が報告され、*T. saginata* と *T. asiatica* の近縁関係が議論されてきている(Ito et al. 2003; Ito A et al. 2010)。本研究グループの研究を通して上記の 3 種類のテニア条虫が同所的に分布している地域が最近特定され始

め (Li TY et al. 2006; Aantaphruti et al. 2007)、さらに *T. asiatica* と *T. saginata* の交雑個体が存在することが遺伝子解析から判明し始めている(Nkouawa A et al. 2009; Okamoto M et al. 2010)。

本研究では、①人体寄生テニア属条虫 3 種が同所的に分布し、②*T. saginata* と *T. asiatica* 間での交雑個体が確認されている (Nkouawa A et al. in prep; Okamoto et al. in prep) 四川省 Yajiang (雅江) 県で、③3 種テニア条虫の追加確認、④交雑個体の追加確認、⑤交雑個体における遺伝子解析、⑥*T. solium* が確認される村落における囊虫症患者の検出と⑦その検出法の評価、⑧今後の流行抑制に向けた対策指針策定を目的とする現地での共同調査を 2009 年 11 月に実施した。11 月に採集した寄生虫、住民の糞便、血清を用い、2010 年 2 月に四川省寄生虫行研究所から Li TY 博士を招へいし、3 村落住民におけるテニア症、囊虫症に関する流行の現状解析を行った。

対象と方法

対象：四川省 Yajiang (雅江県) のチベット族の生活地域住民、地域の保健所の予備調査からテニア症患者の検出が可能と期待される村落

方法：村長を通して村民に住民健診の目的を前もって連絡し、2009 年 11 月中旬に希望者について問診、血清、糞便を採取、テニア条虫を排泄した記憶がある村民にプラジカンテルならびに中国の伝統的駆虫剤であるカボチャの種を処方し、排泄される虫体の形状の比較解析を行った。血清抗体検査、糞便内遺伝子検査、寄生虫の遺伝子検査は 2010 年 2 月に旭川医科大学ですでに確立されている検査法により実施された。さらに、地理情報生態学の研究で国際的リーダーシップを発揮しているフランスの Giraudoux P 教授による指導の下、地理情報システムから得られたデータと各患者の居住地との相関解析を試みた。

結果

- ①今回調査した 3 村落のうち 1 村落から *T. solium* と *T. saginata* が検出された。*T. solium* を排泄した 2 女性は 5 隻、20 隻を宿しており、通常 1 隻寄生である *T. solium* 感染の背景に特殊な事情があると予測された。
- ②ミトコンドリア遺伝子の解析結果から *T. saginata* と *T. solium* が確認された。
- ③皮下腫瘍を有していた村民は囊虫症であることが強く示唆された。
- ④*T. solium* が確認された村落は山の尾根筋に位置する村落であった。

考察

今回調査した 3 村落におけるテニア症流行の基礎成績が得られた。①特に血清検査から囊虫症患者の存在が 3 村落で予測され、今後の確認検査が必要である。また、②今回確認されなかった 2 村落における *T. solium* 保虫者の確認が今後必要である。③稜線沿いの 1 村落でテニア症、囊虫症の患者が確認されたが、この村落内での家族集積性、近隣家族集積性、ならびに山麓の村落での患者発生の可能性についても今後調査が必要である。④地理情報システムを用い、患者の居住区域、特に *T. solium* 保虫者と囊虫症患者の位置関係の解析は今後の重要な研究課題である。また、現時点ではミトコンドリア遺伝子だけを解析したが、今後、核遺伝子の解析を実施し、今回検出された *T. saginata* 条虫の中に *T. asiatica* との交雑個体が含まれているのかについての更なる解析が必要である。

参考文献

- Anantaphruti TM et al. Sympatric occurrence of *Taenia solium*, *T. saginata*, and *T. asiatica*, Thailand. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13: 1413-1416.
- Ito A et al. Human taeniasis and cysticercosis in Asia. *Lancet* 2003; 362: 1918-1920.
- Ito A et al. Chapter 62. *Taenia*. *Molecular Detection of Food-Borne Pathogens* (ed by Liu D), pp.839-850, CRC Press, Boca Raton, 2009.
- Ito A et al. Taeniasis and cysticercosis: serological detection of patients and animals, and molecular identification of parasites. *Future Microbiology* in press, 2010.
- Li T et al. Taeniasis/cysticercosis in a Tibetan population in Sichuan province, China. *Acta Tropica* 2006; 100: 223-231.
- Nakao M et al. State-of-Art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; in press.
- Nkouawa A et al. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 168-174.
- Okamoto M et al. Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. *Parasitology International* 2010; in press.

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

2009 年 12 月 25 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：菱田明



所属機関名：浜松医科大学

所属部署名：医学部内科学第一 職名：教授

所在地：静岡県浜松市東区半田山 1-20-1

電話：053-435-2261 内線：2259, 2261

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

シスプラチン誘発急性腎不全抵抗性獲得における NF κ B 活性化の役割の検討

3. 成果の概要

シスプラチン誘発急性腎不全抵抗性獲得に腎内 NF κ B 活性化が寄与し、NF κ

B 活性の抑制は PCNA と HSP72 の発現低下を伴い、シスプラチン抵抗性を減弱させることを示した。

4. 被招聘者

被招聘者氏名：羅 景慧

職名：薬剤師

所属機関名：南方医科大学附属南方医院

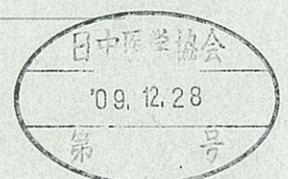
部署名：薬剤部

5. 滞在日程概要(日付・主な活動・工程など)

2009. 6. 23 来日

2009. 11. 28

帰国



シスプラチン誘発急性腎不全の抵抗性獲得モデルにおける NF κ B の役割の検討

研究者氏名	羅景慧
中国所属機関	南方医科大学附属南方病院薬剤部
日本研究機関	浜松医科大学 第一内科
指導責任者	教授 菱田 明
共同研究者名	安田日出夫

要旨

シスプラチン(CDDP)投与後に腎内 NF κ B 活性化が生じ、腎尿細管障害に寄与することが知られているが、CDDP 誘発急性腎不全抵抗性獲得モデルでの NF κ B の役割は明らかでない。NF κ B 活性化阻害薬(pyrrolidine dithiocarbamate : PDTC)で NF κ B 活性化の役割を検討した。

方法 : CDDP 5mg/kg を静注後 day14 に同用量の CDDP を投与する群(CDDP+CDDP 群)、CDDP 5mg/kg を静注後 day12 より PDTC 80mg/kg 連日、day14 に CDDP を投与する群(CDDP+PDTC+CDDP)、CDDP 5mg/kg を静注後 day12 より PDTC 80mg/kg 連日 P と day14 に Vehicle を投与する群(CDDP+PDTC) で NF κ B 活性化、腎機能、PCNA、熱ショック蛋白(HSP)72 を評価した。

結果 : 腎内 NF κ B の活性化は、CDDP+CDDP 群で day14 以降も継続し、CDDP+PDTC+CDDP 群で減弱。CDDP+PDTC+CDDP 群は CDDP+CDDP 群と比較して、血清 Cr 値が day17 で有意に増加し(0.746 \pm 0.191 mg/dl vs 1.35 \pm 0.505 mg/dl, P < 0.05)、PCNA と HSP72 が day14 で有意に減弱した。また、PDTC 自体の腎毒性は認めなかった。

考察 : CDDP 誘発急性腎不全の抵抗性獲得に腎内 NF κ B 活性化が寄与し、NF κ B 活性の抑制は PCNA と HSP72 の発現低下を伴い、CDDP 抵抗性を減弱させた。

Key Words 急性腎不全 抵抗性獲得 NF κ B シスプラチン

緒言：

シスプラチン誘発急性腎不全を来したラットでは同用量のシスプラチンを初回のシスプラチン投与2週後(day14)に投与しても急性腎不全を来さないという急性腎不全の抵抗性獲得モデルが知られているが、そのメカニズムの詳細は明らかでない。抵抗獲得におけるメカニズムが解明できれば、急性腎不全の新たな病態解明や予防・治療薬の開発につながる。シスプラチン投与後腎内 NF κ B が活性化することは知られており病態に関わっていることが示唆されているが、抵抗性獲得での動態や病態的意義に関しては明らかでない。

今回、NF κ B 活性化阻害薬(pyrrolidine dithiocarbamate：PDTC)でシスプラチン誘発急性腎不全抵抗性獲得モデルでのNF κ B 活性化の役割を検討した。

対象と方法：

対象：雄SDラット(体重200-250g)。

方法：以下の3グループを作成

CDDP+CDDP群：CDDP 5mg/kgを静注後day14に同用量のCDDPを静注投与

CDDP+PDTC+CDDP群：CDDP 5mg/kgを静注後day12よりPDTC 80mg/kg連日、day14に同用量のCDDPを静注投与

CDDP+PDTC群：CDDP 5mg/kgを静注後day12よりPDTC80mg/kg連日腹腔内投与、Vehicleをday14静注投与

CDDP+CDDP群でday0, 1, 3, 5, 7, 11に屠殺し、3つのグループではday14, 15, 16, 17, 19に屠殺し、血清、腎臓組織を回収。

血清では、クレアチニン値を測定。腎臓組織核タンパクでp65のウェスタンブロットでNF κ B活性化を評価し、腎臓組織タンパクで、PCNA、HSP72のウェスタンブロットを評価した。

結果：

1) 腎機能 (A)

抵抗性獲得モデルにおける血清クレアチニン値は、CDDP+CDDP群ではday17でピークとなったが、有意な上昇は認めなかった。CDDP+PDTC+CDDP群では、day17でピークとなりday14と比べて有意な上昇を認めた。day17ではCDDP+PDTC+CDDP群で、CDDP+CDDP群と比べて血清クレアチニン値の有意な上昇を認めた。CDDP+PDTC群では血清クレアチニン値の有意な上昇を認めなかった。

2) NF κ B 活性化 (B,C)

腎細胞核内 p65 の発現は day1 より day7 をピークに増加し、それ以降 day19 まで高発現が維持された。CDDP+PDTC+CDDP 群では day14 以降 CDDP+CDDP 群と比較して p65 核内発現は低下した。

3) PCNA と HSP72 の発現 (B,C)

PCNA は CDDP+CDDP 群で day11-16 をピークに徐々に上昇し、day17、19 と低下した。CDDP+PDTC+CDDP 群で day14-19 で PCNA は CDDP+CDDP 群と比較して低下した。HSP72 の発現は、CDDP+CDDP 群で day3-5 と day15-17 をピークに増加した。CDDP+PDTC+CDDP 群では CDDP+CDDP 群と比較して day14 以降 HSP72 の発現は低下した。

考察：

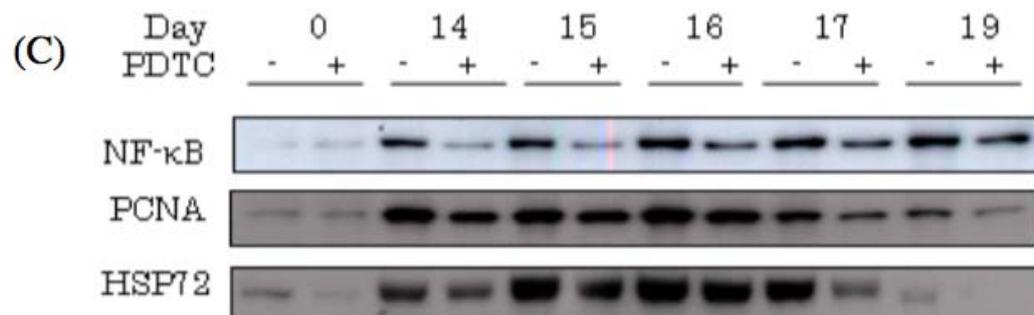
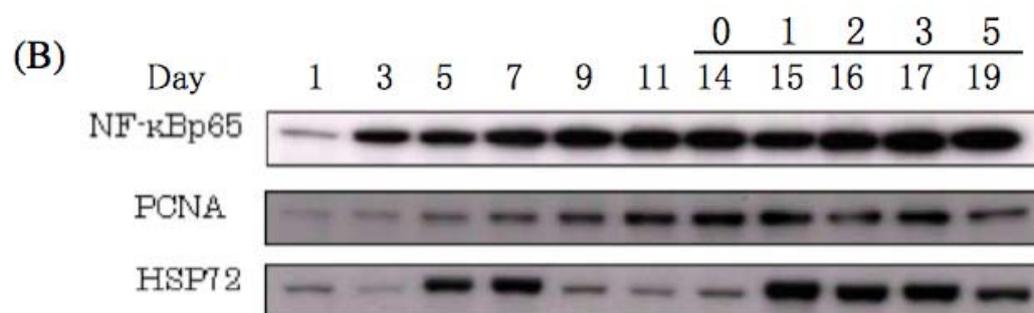
CDDP 初回投与後腎内 NF κ B は活性化し、day14 までその活性化は維持された。day14 に 2 回目の CDDP 投与後も NF κ B 活性化は持続した。PDTC によって day14 から day19 まで 2 回目の CDDP 投与においても腎内 NF κ B 活性化は抑制された。さらに PDTC によって day17 において腎機能低下が有意に惹起された。このことから、シスプラチン誘発急性腎不全の抵抗性獲得に NF κ B 活性化が重要な役割を果たすことが示唆された。

DNA 修復マーカーである PCNA と細胞保護作用を持つ HSP72 は初回 CDDP 投与後より 2 回目 CDDP 投与後早期に腎内に強く発現した。このことは 2 回目 CDDP 投与に対して保護的に働いている可能性を示唆した。PDTC によって PCNA と HSP72 の発現は低下していることから、NF κ B カスケードが 2 回目 CDDP 投与後の PCNA と HSP72 の発現を誘導するように制御している可能性が考えられた。以上のことから、腎内 NF κ B 活性化は PCNA と HSP72 を制御することで CDDP 誘発急性腎不全の抵抗性獲得に重要な役割を果たすと考えられた。

(A)

血清クレアチニン値 (mg/dl)	day15	day17	day19
CDDP+CDDP	0.502±0.071	0.746±0.191	0.766±0.265
CDDP+PDTC+CDDP	0.57±0.086	1.35±0.505*	1.136±0.786

P < 0.05 v.s. CDDP+CDDP群



財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010年 3月11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：朱 海 雷
指導責任者名：寺 本 憲 功
所属部署名：九州大学 大学院 職名：講師
所 在 地：福岡市東区馬出3-1-1
電 話：092-642-6077 内線：



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

Na_v1.6 をコードする遺伝子欠損マウスを用いた平滑筋型 Na⁺チャンネルの生理学的役割の解明

3. 成果の概要

NaV1.6 をコードする Scn8a の遺伝子欠損マウス (NaV1.6^{-/-}マウス) およびその野生型マウス

(NaV1.6^{+/-}マウス) を用い、NaV1.6 の有無にて互いに異なる輸精管平滑筋の機能的特性に

ついて比較し平滑筋型 Na⁺チャンネルの生理学的役割を明らかにし、英文論文発表した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ (学会名・演題)

第51回 日本平滑筋学会・Functional roles of voltage-gated Na⁺ channels, NaV1.6, in murine vas deferens myocytes.

FASEB Summer Research Conferences 2009・Biophysical properties of voltage-gated Na⁺ channels in smooth muscles.

第83回 日本薬理学会年会・Characterization of Na_v1.6-mediated resurgent Na⁺ currents in mouse vas deferens myocytes.

(2) 発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

Journal of Cellular Physiology・Characterization of Na_v1.6-mediated Na⁺ currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens.

-日中医学協会助成事業-

Nav1.6 をコードする遺伝子欠損マウスを用いた平滑筋型 Na⁺チャネルの生理学的役割の解明

研究者氏名	朱 海雷
中国所属機関	第四軍医科大学解剖学教研室
日本研究機関	九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学
指導責任者	講師 寺本 憲功
共同研究者	柴田 篤志

要 旨

興奮性細胞の活動電位における速い立ち上がり成分はフグ毒の投与にて可逆的に消失することから、主に電位依存性 Na⁺チャネル (voltage-gated Na⁺ channels : NaV) の活性化にて引き起こされ、細胞の興奮発生に重要な生理的役割を果たしていると考えられてきた。本研究において平滑筋型 Na⁺チャネルのチャネル主要タンパク質でかつチャネル孔を形成する α サブユニットタンパク質 (Nav1.6) をコードする *Scn8a* の遺伝子欠損マウス (Nav1.6^{-/-}マウス) およびその野生型マウス (Nav1.6^{+/+}マウス) を用い、Nav1.6 の有無にて両輸精管平滑筋において機能的特性の違いを組織および細胞レベルで比較した。平滑筋型 Na⁺チャネル (Nav1.6) は膜電流における内向き電流を活性化させる電位の閾値を下げ、より負極側で内向き電流が活性化されやすい状態に遷移させるという生理学的な役割を有することを明らかにした。また平滑筋型 Na⁺チャネルの補助的制御を行っている β サブユニットについて分子生物学的手法を用いて検索し、 $\beta 1$ サブユニットのみが検出された。これらの結果から平滑筋型 Na⁺チャネルを構成する α サブユニットタンパク質と β サブユニットタンパク質の組み合わせは Nav1.6 (*Scn8a* 遺伝子にてコード) / $\beta 1$ サブユニット (*Scn1b* 遺伝子にてコード) であることが初めて明らかとなった。

Key Words 電位依存性 Na⁺チャネル, 平滑筋, α サブユニット, β サブユニット, 活動電位

緒 言 :

興奮性細胞において活動電位における速い立ち上がり成分はフグ毒 (tetrodotoxin : TTX) 投与にて可逆的に消失することから、主に電位依存性 Na⁺チャネル (voltage-gated Na⁺ channels : NaV チャネル) の活性化にて引き起こされ、興奮の発生に重要な生理的役割を果たしている。さらに近年、NaV チャネルは、神経回路の形成および痛覚伝達にも主要な役割を果たしていることも新たに解明された。

電位依存性 Na⁺チャネルの分子構造は、大きな α サブユニット (約 260kDa) と小さな 2つの β サブユニット (30-40kDa) から構成される 3 量体であることが明らかとなった (図 1)。 α サブユニットは、チャネルポアを形成し、TTX 結合部位、膜電位感受性および Na⁺透過性等の Na⁺チャネルの主な機能を有する。現在までに α サブユニットタンパク質をコードする遺伝子として 10 個の遺伝子 (*Scn1a*~*Scn10a* 遺伝子) が明らかとなり、 α サブユニットタンパク質は選択的な Na⁺透過性を示すことから Nav1.X (voltage-

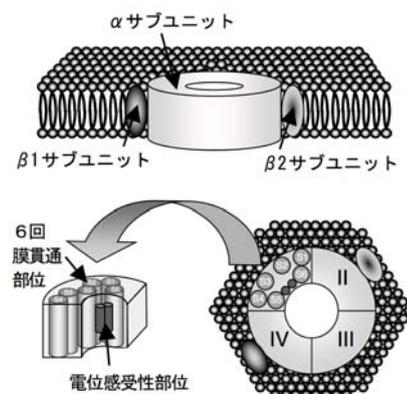


図 1 電位依存性 Na⁺チャネルの分子構造

gated Na⁺ channel type 1.X) と呼ばれる一群のファミリーに分類されている (Goldin, 2001)。一方、βサブユニットはαサブユニットのアクセサリユニットとして細胞内輸送やチャネル開閉機能の補助的な調節機構に関与しており、これまでβサブユニットタンパク質をコードする遺伝子として4個の遺伝子 (*Scn1b*~*Scn4b* 遺伝子) が同定された。しかし平滑筋における NaV チャネルの特性やその分子実体に関する報告はほとんどなく、またその生理学的役割も未だ全く不明のままである。自律神経の機能終末 (神経終末及びバリコシティ等) から放出される興奮性及び抑制性神経伝達物質にてその収縮・弛緩反応が直接制御されている平滑筋において NaV チャネルの活性化にて引き起こされる活動電位の発生や興奮伝播機序を解明することは『効果器』としての平滑筋の運動・制御機序を理解する上で非常に生理学的に重要であると考えられる。本研究ではマウス輸精管平滑筋を標本として選んだ。その主な理由は、下記の理由からである。

- (1) 輸精管は主に交感神経にて支配され、その神経分布や神経制御機序が明らかであること、
- (2) マウス輸精管平滑筋の活動電位は TTX 感受性を示すこと (Holman *et al.*, 1995)、
- (3) マウス NaV チャネルのサブユニット遺伝子や蛋白質の遺伝子情報が全て明らかなこと、
- (4) 主な *Scn8a* 遺伝子欠損マウスが既に作成され、米国ジャクソンラボ社から購入可能なこと、

近年、我々は、様々な分子生物学および電気生理学的手法を用い、マウス輸精管平滑筋における NaV チャネルの主要構造を成すαサブユニットタンパク質は *Scn8a* にてコードされる NaV1.6 であると報告した (Zhu *et al.*, 2008)。さらにその野生型マウス (NaV1.6^{+/+}マウス) における輸精管平滑筋細胞では Na⁺電流は記録されたが、一方、NaV1.6^{-/-}マウス輸精管平滑筋では Na⁺電流は全く記録されなかった (Zhu *et al.*, 2009)。以上の結果から平滑筋型 NaV チャネルのαサブユニットタンパク質の分子実体は NaV1.6 である可能性が強く示唆され、NaV1.6^{-/-}マウスと NaV1.6^{+/+}マウスを用い、両マウスにおける輸精管平滑筋の機能的な特性を比較することにて未だその生理学的役割が全く不明な平滑筋型 NaV チャネルの特性を明らかにすることが出来るのではないかと考えた。本研究では NaV1.6 の有無にて両輸精管平滑筋における異なる機能的特性を比較し、平滑筋型 NaV チャネルの生理学的役割について検討した。また NaV チャネルの補助的制御を行っているβサブユニットについて分子生物学的手法を用いて検索した。

対象と方法：

NaV1.6 をコードする *Scn8a* の遺伝子欠損マウス (NaV1.6^{-/-}マウス) およびその野生型マウス (NaV1.6^{+/+}マウス) のそれぞれの輸精管平滑筋を用いた。βサブユニット遺伝子の検出を行う

ため、特異的な primer を設計し、通法の RT-PCR 法による解析を行った。また特異的反応を示す抗 NaV1.6 抗体を用いてウエスタンブロット法および免疫組織化学染色法を行い、NaV1.6 蛋白質の同定およびその組織学的な局在について検討した。さらに膜電流の電気生理学的特性を明らかにするために通法のパッチクランプ法を適用した (Zhu HL *et al.*, 2010)。

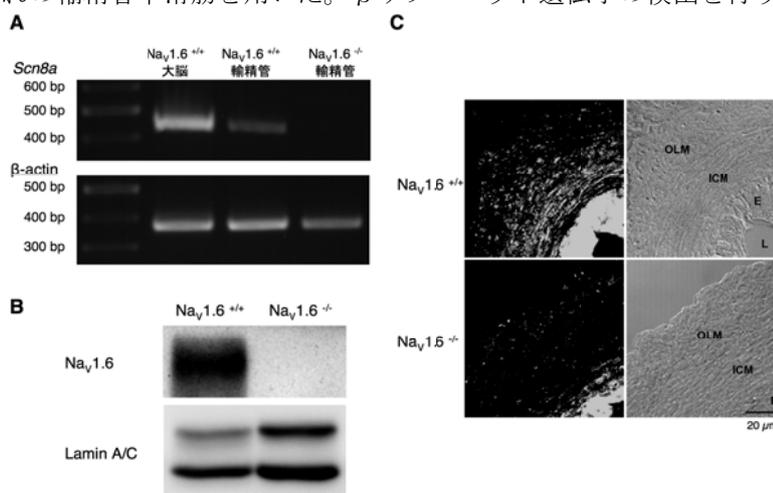


図2 NaV1.6 の分子生物学的特徴

結果：

1) NaV1.6^{+/+}マウスと NaV1.6^{-/-}マウスにおける分子生物学的特徴に関する比較

NaV1.6^{-/-}マウスと NaV1.6^{+/+}マウスを用い、両マウスにおける輸精管平滑筋の分子生物学的特性を比較した。RT-PCR 法にて NaV1.6^{+/+}マウスの大脳および輸精管平滑筋において NaV1.6 をコードする *Scn8a* 遺伝子が検出された。一方、NaV1.6^{-/-}マウスにおける輸精管平滑筋では *Scn8a* 遺伝子は検出されなかった (図 2 A)。NaV1.6 タンパク質に対して特異的な反応を示す抗 NaV1.6 抗体を用いてウェスタンブロット法を行うと NaV1.6^{+/+}マウスの輸精管平滑筋のサンプルにおいては単一のバンドとして NaV1.6 タンパク質 (約 260 kDa) が検出された。しかし NaV1.6^{-/-}マウスの輸精管平滑筋のサンプルにおいては何も検出されなかった (図 2 B)。さらに同じ抗 NaV1.6 抗体を用いて免疫組織化学染色を行うと NaV1.6^{+/+}マウスの輸精管平滑筋層に NaV1.6 タンパク質が特異的に同定された。一方、NaV1.6^{+/+}マウスの輸精管平滑筋層においては NaV1.6 タンパク質との反応は全く観察されなかった (図 2 C)。

2) パッチクランプ法を用いたランプ型脱分極電位波形にて活性化された膜電流の比較

NaV1.6^{-/-}マウスと NaV1.6^{+/+}マウス輸精管平滑筋単離細胞に対してパッチクランプ法を適用し、両マウスにおける電気生理学的特性を比較し、平滑筋型 NaV チャンネル (NaV1.6) の生理学的役割について調べた。図 3 に示すランプ型脱分極電位波形を与えると NaV1.6^{+/+}マウス輸精管平滑筋細胞において内向き膜電流が生じた (コントロール: 図 3 A)。フグ毒 (TTX) を投与すると膜電流は抑制され、さらにニフェジピン (L 型 Ca²⁺チャンネル遮断薬) および Cd²⁺ (非選択的チャンネル遮断薬) を各々、追加投与すると膜電流はさらに抑制された (図 3 A)。コントロールの膜電流波形から全ての遮断薬が存在の時の膜電流波形を差し引くと全ての遮断薬で抑制された膜電流波形が得られ、またフグ毒存在下で膜電流波形を差し引くとフグ毒非感受性膜電流成分が得られた (図 3 B)。これらの結果からフグ毒感受性膜電流、ニフェジピン感受性膜電流およびニフェジピン非感受性膜電流成分が得られた (図 3 C)。また各々の膜電流成分の活性化閾値の

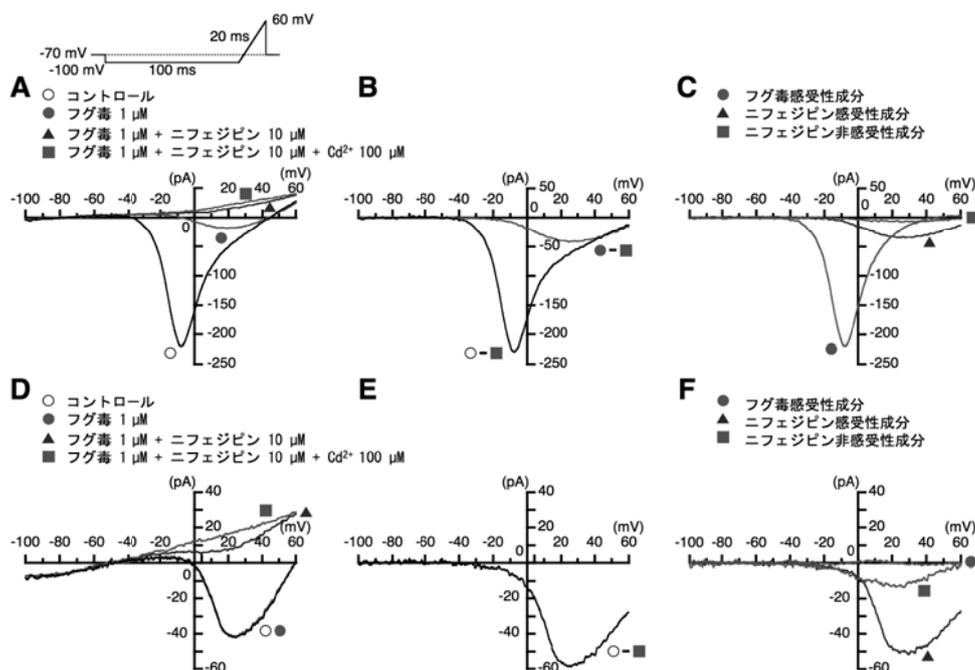


図 3 NaV1.6^{+/+}および NaV1.6^{-/-}マウス輸精管平滑筋細胞における膜電流成分

結果を表1に示した。同様の実験プロトコールを NaV1.6^{-/-}マウス輸精管平滑筋細胞に対して行った(図3D、E)。NaV1.6^{-/-}マウス輸精管平滑筋細胞におけるニフェジピン感受性膜電流およびニフェジピン非感受性膜電流成分は NaV1.6^{+/+}マウス輸精管平滑筋細胞の結果と有意な差は見られなかったが、フグ毒感受性膜電流は全く記録されなかった。NaV1.6^{-/-}マウス輸精管平滑筋細胞における各々の膜電流成分の活性化閾値の結果を表1に示した。

	Na _v 1.6 ^{+/+}	Na _v 1.6 ^{-/-}
膜電流 (コントロール)	-38.5 ± 4.6 mV (n = 6)	-30.4 ± 3.4 mV (n = 5)
膜電流 (+ フグ毒)	-31.2 ± 4.9 mV (n = 6)	-31.6 ± 5.1 mV (n = 5)
フグ毒感受性成分	-39.1 ± 4.0 mV (n = 6)	—————
ニフェジピン感受性成分	-31.3 ± 3.7 mV (n = 6)	-29.2 ± 4.0 mV (n = 5)
ニフェジピン非感受性成分	-32.2 ± 4.4 mV (n = 6)	-31.5 ± 5.1 mV (n = 4)

表1 NaV1.6^{+/+}およびNaV1.6^{-/-}マウス輸精管平滑筋細胞における膜電流成分の活性化閾値

3) RT-PCR 法によるβサブユニット遺伝子の検出

NaV1.6と共発現しているβサブユニットの存在を調べるため、RT-PCR法にてマウス輸精管平滑筋および大脳におけるβサブユニット遺伝子(Scn1b~Scn4b)の検出を行った。遺伝子情報を基にして各々のβサブユニット(β1~4サブユニット)をコードするβサブユニット遺伝子に対して特異的に反応するprimerを設計した。大脳においてはβ1~4サブユニットの全てのβサブユニット遺伝子が検出された。一方、輸精管平滑筋においてはβ1サブユニット遺伝子のみが検出された。

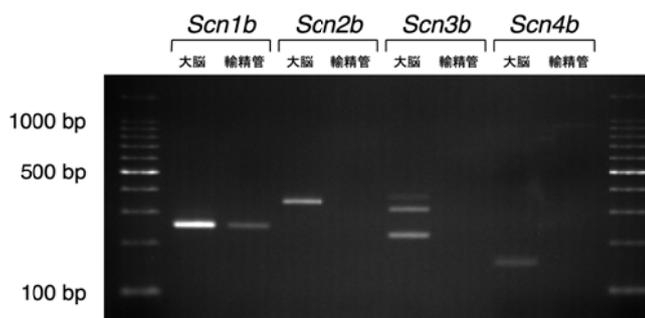


図4 マウス輸精管平滑筋細胞におけるβサブユニット遺伝子の検出

考 察 :

ラット子宮平滑筋においてβサブユニットに関してはScn1b~Scn4bの全ての遺伝子が検出された(Seda et al., 2007)。一方、本研究において特異的に反応するprimerを設計し、マウス大脳においてはScn1b~Scn4bの全ての遺伝子が検出されが、マウス輸精管平滑筋においてはScn1bのみが検出された。この結果からマウス輸精管平滑筋におけるNaVチャネルを構成するαサブユニットタンパク質とβサブユニットタンパク質の組み合わせは、NaV1.6(Scn8a遺伝子にてコード) / β1サブユニット(Scn1b遺伝子にてコード)であることが強く示唆され、平滑筋型NaVチャネルの分子実体が明らかとなった。

また NaV1.6^{-/-}マウスと NaV1.6^{+/+}マウスの輸精管平滑筋細胞における膜電流成分の電気生理学的特性、特にその活性化閾値を比較すると NaV1.6 を介する Na⁺電流はもっとも負極で活性化され、最大振幅値を示した。すなわち、NaV1.6 を介して生じる Na⁺電流は輸精管平滑筋細胞における膜電流成分の活性化をイニシエーションさせるという重要な生理学的役割を果たしていることが考えられる。

以上、本研究をまとめると野生型マウス (NaV1.6^{+/+}マウス) 輸精管平滑筋細胞において NaV1.6 が唯一、機能的に発現している NaV チャネルの α サブユニットであることが明らかとなった。さらに NaV1.6 は脱分極刺激にて生じる最大の内向き電流成分を形成し、細胞の興奮性において重要な生理学的役割を果たしていることが示唆された。

参考文献：

1. Goldin AL : Resurgence of sodium channel research. Annual Review of Physiology 63, 871-894 (2001).
2. Holman ME, Tonta MA, Parkington HC, Coleman HA : Tetrodotoxin-sensitive action potentials in smooth muscle of mouse vas deferens. Journal of the Autonomic Nervous System 52, 237-240 (1995).
3. Seda M, Pinto FM, Wray S, Cintado CG, Noheda P, Buschmann H, Candenias L : Functional and molecular characterization of voltage-gated sodium channels in uteri from nonpregnant rats. Biol Reprod 77, 855-863 (2007).
4. Zhu HL, Aishima M, Morinaga H, Wassall RD, Shibata A, Iwasa K, Nomura M, Nagao M, Sueishi K, Cunnane TC, Teramoto N : Molecular and biophysical properties of voltage-gated Na⁺ channels in murine vas deferens. Biophysical Journal 94, 3340-3351 (2008).
5. Zhu HL, Shibata A, Inai T, Nomura M, Shibata Y, Brock JA, Teramoto N : Characterization of Na_v1.6-mediated Na⁺ currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens. Journal of Cellular Physiology 233, 234-243 (2010).
6. Zhu HL, Wassall RD, Takai M, Morinaga H, Nomura M, Cunnane TC, Teramoto N : Actions of veratridine on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na⁺ currents, Na_v1.6, in murine vas deferens myocytes. British Journal of Pharmacology 157, 1483-1493 (2009).

注：本研究は、2009年7月22日『第51回日本平滑筋学会総会』にて特別選出演題として選ばれ口演発表、2009年7月22日『第51回日本平滑筋学会』、2009年8月3日『FASEB Summer Research Conferences 2009 Smooth Muscle』、2010年3月17日『第83回日本薬理学会年会』にてポスター発表、『Journal of Cellular Physiology』(2010年4月VOL223巻、234-243)に掲載。

作成日：2010年3月11日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 3 月 3 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 王洪輝
指導責任者名： 小濱一弘
所属部署名： 群馬大学大学院 職名： 教授
医学系研究科
所在地： 群馬県前橋市昭和町 3-39-22
電 話：027-220-7960 内線： 7960



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

新しく見つけた血管平滑筋収縮制御の解析

3. 成果の概要

血管は主に平滑筋より成り立ち、アクトミオシン系蛋白質が収縮力を生み出している。その制御はミオシン軽鎖キナーゼ(MICK と略す)によって行われ、ミオシン軽鎖のリン酸化によるものと考えられている。しかし、近年の技術革新によりこの筋書き通りではなく、リン酸化によらなくても収縮が起こる実例が分かってきた。リン酸化を完全に阻害した条件で細胞遊走をおこなわせて、誘引物質にたいする効果を調べた。

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

(2)発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

Xie C, Zhang Y, Wang HH, Matsumoto A, Nakamura A, Ishikawa R, Yoshiyama S, Hayakawa K, Kohama K, and Gao Y. Calcium regulation of non-kinase and kinase activities of recombinant myosin light-chain kinase and its mutants. *IUBMB Life* 61: 1092-1098, 2009

アラキドン酸に対する血管平滑筋の遊走：

ミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化が阻害される条件での検討

研究者氏名	王洪輝
中国所属機構	南開大学生命科学院
日本研究機構	群馬大学医学部
指導責任者	小濱一弘
共同研究者名	呉晶輝、秦宵然、叶麗虹、田中秀幸、片山豪、中村彰男

要 旨

Arachidonic Acid Induces Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Under the Conditions Where Phosphorylation of Myosin Light Chain is Abolished. Migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) plays an important role in vascular development as well as pathogenesis of atherosclerosis. Studying the mechanism involved in VSMCs migration and ultimately finding a way to block the migration of VSMCs in the development of vascular lesion, has been a focus of research. Activation of myosin II by phosphorylating its' myosin light chain (MLC) is widely accepted to be a major, regulated determinant of producing contractile forces in cell motility. To reveal the mechanism for un-phosphorylated myosin to cause migration, we tested the effects of several chemoattractants on migration of SM3 cells in presence of ML-7, which prevented the phosphorylation of MLC. Among the several chemoattractants, we report here migration of VSMCs is induced by arachidonic acid (AA) while phosphorylation level of MLC is totally abolished by ML-7. To evaluate the migratory activity of SM3 cells toward AA in a quantitative way, we used various concentrations of AA as chemoattractants in boyden chamber assay. SM3 cells migrated toward AA maximally at 20 μ M, although intracellular phosphorylation of MLC was totally abolished. Formations of filopodia and lamellipodia were observed by immunofluorescence staining in this condition, indicating the involvement of actin in the migration. However, blebbistatin, specific inhibitor to myosin II head domain, blocks this migration, suggesting the motor activity of myosin II is producing the force of migration. We studied the signaling pathway of this AA-induced migration in which the MLC phosphorylation was blocked by ML-7. PTX inhibited this migration, suggesting the role of G protein coupled receptors (GPCR). Since intracellular calcium wasn't altered in this condition, we further investigated the down-stream signaling factors which were intracellular calcium increase-independent. We used specific inhibitors or siRNA to study the role of several known down-stream signaling factor of GPCR, finding that membrane translocation of PLC β 2, phosphorylation of PKC ϵ , phosphorylation of MAPKs (ERK, p38 and JNK) occurred successively after the stimulation of AA. It was possible that AA interacted GPCR as its ligand, triggering following signal pathway. However, we found that AA increased the secretion of 15-HETE in cell media and 15-HETE also induced this migration, indicating that 15-HETE, a LOX metabolite of AA, is an equally possible ligand. We also indicated that AA penetrated the cellular membrane of VSMCs followed by the stimulation of the ATPase activity of myosin II with

unphosphorylated MLC. Thus, we propose a new signal pathway of the migration of VSMCs which was independent of MLC phosphorylation.

Key words: Vascular smooth muscle cells, Myosin light chain, Phosphorylation, Arachidonic acid, Migration

緒言

Migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) plays an important role in vascular development as well as pathogenesis of atherosclerosis. During atherogenesis, migration of VSMCs from media to intima is believed to contribute intimal thickening (1). Studying the mechanism involved in VSMCs migration and ultimately finding a way to block the migration of VSMCs in the development of vascular lesion, has been a focus of research(2). In cells migratory process, different forces are needed to perform cellular dynamic behaviors such as protrusive forces used to extend lamellipodia, and traction forces to propel the cell body forward (3). Regulation of the contractile forces coupled with cellular adhesion, protrusion, and actin organization depends on activated myosin II-based motors, in which the phosphorylation of the myosin light chain (MLC) is widely believed to be essential (4). Activation of myosin II are attributed for the phosphorylation of MLC which is regulated by two main distinct mechanisms including Ca^{2+} -dependent activation of myosin light chain kinase (MLCK) and Ca^{2+} -independent inhibition of MLCP by Rho Kinase (ROCK) (5). The generation of contractile force in migration of VSMCs was thought to be similar to that of regulating smooth muscle contraction (6). Interestingly, serum and PDGF induced VSMCs contraction was uncoupled to elevation of phosphorylation of MLC (7). The production of contractile forces may not through the elevation in phosphorylation level of MLC (8). In regard to migration, increase of MLC phosphorylation was not involved in PDGF-induced VSMCs migration (9). VSMCs migration may be regulated not only by an MLC phosphorylation-dependent pathway, but also an MLC phosphorylation-independent pathway. Blebbistatin, specific inhibitor to myosin II, blocks both MLC phosphorylation-dependent and independent migration of VSMCs, suggesting the essential role of motor activity of myosin in cell migration (10).

対象と方法

In the whole study, we used SM3 cells, which is a vascular smooth muscle cell line established from rabbit aorta arterial smooth muscle. The block-it RNAi designer (Invitrogen) was used to design a short hairpin RNA molecules (shRNA) specific to PLC- β 2 (5' -GAACAGAAGTTACGTTGTC-3'). The ds oligos were transfected into SM3 cells by using Lipofectamine2000 (Invitrogen). Migration of SM3 cells was assayed by the Boyden chamber method. Cells were lysed followed by western blot. In some cases, membrane fraction got subcellular fractionation purification was used. Phosphorylation of MLC was detected with glycerol-PAGE followed by Western blot. Formation of filopodia and lamellipodia were visualized by immunofluorescence staining followed by observation with confocal microscopy (Bio-Rad). $[Ca^{2+}]_i$ was measured as previously described(11). ELISA was used to assay the concentration level of 15-HETE in media. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA test using Sigma Stat v. 3.1. A value of $p < 0.05$, $p < 0.01$ was considered to be statistically significant.

結果

As shown in Fig. 1, SM3 cells migrated toward AA maximally at $20 \mu\text{M}$. The migration of SM3 cells toward AA (Fig. 1A) was hardly affected by ML-7, although intracellular phosphorylation of MLC was totally abolished (Fig. 1B). Formation of filopodia and lamellipodia as stained by the antibodies to α -actin and β -actin were clearly detected after the stimulation of $20 \mu\text{M}$ AA in presence of $20 \mu\text{M}$ ML-7 (Fig. 1C), indicating the involvement of actin in the migration. Blebbistatin inhibited the AA induced migration of ML-7-treated SM3 cells in a dose-dependent way with $\text{IC}_{50}=40 \mu\text{M}$, indicating the myosin-driven nature (Fig. 1D).

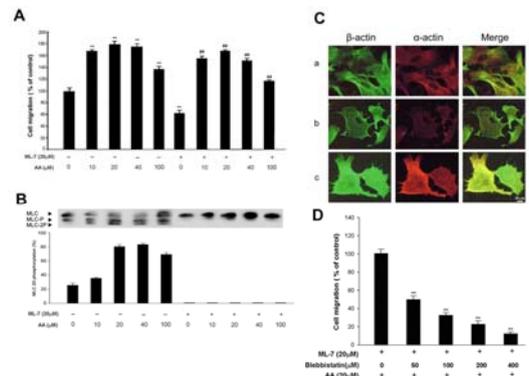


Fig. 1

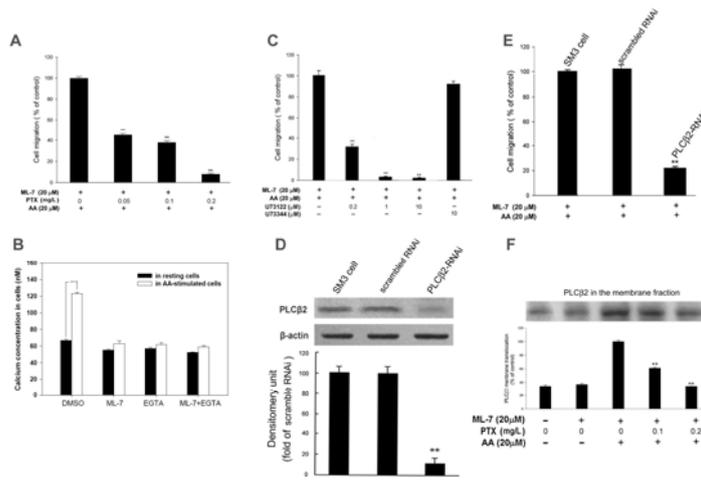


Fig. 2

Then, we carried out the analysis of signal transduction of this migration. We allowed SM3 cells to migrate in the presence of PTX, an inhibitor of a trimeric Gi protein, together with ML-7. Inhibition of the migration was observed in PTX above 0.05 mg/L (Fig. 2A). We measured $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the condition. When $20 \mu\text{M}$ ML-7 existed in the buffer, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not observed (Fig. 2B). This migration was antagonized by U-73122 in a dose-dependent manner, indicating PLC was involved in the signal transduction pathway (Fig. 2C). To clarify the role of PLC $\beta 2$ in the migration, we designed the interfering RNA (RNAi) for PLC $\beta 2$ to decrease the expression of PLC $\beta 2$ as detected by antibody against PLC $\beta 2$ (Fig. 2D). The migration of the SM3 cells treated by PLC $\beta 2$ RNAi decreased remarkably as compared with the migratory activity of SM3 cells treated with scrambled RNAi (Fig. 2E). We further investigate the role of PLC $\beta 2$ translocation in this migration of smooth muscle cells as shown in Fig. 2F.

As shown in Fig. 3A, staurosporine, an inhibitor of PKC, depressed this migration. We further examined the effect of PKC ϵ inhibitory peptide. Fig. 3B showed that the migration

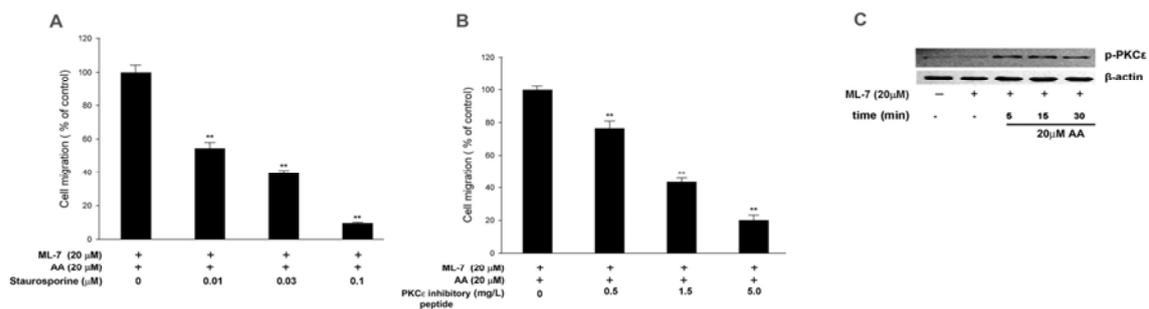


Fig. 3

was inhibited by the peptide. Accordingly, an active form of PKC ϵ was detected by the antibody against phosphorylated PKC ϵ , finding that PKC ϵ was phosphorylated time-dependently in response to stimulation by AA (Fig. 3C).

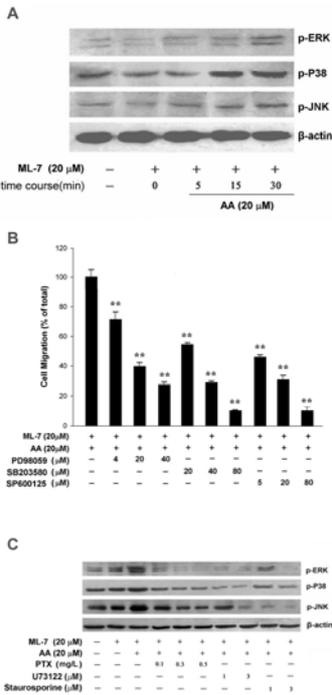


Fig. 4

Next, we confirmed the roles of MAPKs in this migration. As shown in Fig. 4A, ERK, p38 and JNK were phosphorylated after the AA stimulation as examined in the presence of ML-7. SB203580, PD98059 and SP600125 inhibited this migration (Fig. 4B). We examined the effects of inhibitors, i. e., PTX for Gi, U73122 for PLC and staurosporine for PKC, on the phosphorylation of the MAPKs. Our results indicated that ERK, p38 and JNK signal pathways were all subjected to the Gi followed by PLC signaling (Fig. 4C). ERK and JNK signaling pathways, but not p38 were under the PKC signaling. We speculate that PLC directly regulates the phosphorylation of p38.

Then, we hypothesized that AA metabolic pathways of Cox, Lox and p450 may play a role in this signaling. Only the Lox inhibitor of NDGA inhibited this migration, indicating the role of Lox metabolites (Fig. 5A). We found AA stimulated the 15-HETE secretion in media (Fig. 5B). As shown in Fig 5C, we found that it could induce the migration of SM3 cells in the presence of ML-7, confirming 15-HETE mediated the migration of SM3 cells toward AA. We recently published that AA binds to myosin II heads to stimulate the ATPase activity of myosin II of which MLC remains unphosphorylated (12). Fig. 5C confirmed the stimulatory effect. However, the effect of 15-HETE was much lower stimulatory effect.

考察

Production of contractile force to induce migration may be regulated by a MLC phosphorylation-independent way (9). The present report confirmed this possibility. AA is a well-known mediator of atherosclerosis (13). We proposed in this paper that the GPCR that is specific for 15-HETE should be most convincing among eicosanoid receptors. PTX inhibited the abnormal migration of VSMCs towards AA, suggesting the role of GPCRs in this migration. The role of PLC β 2 in this abnormal migration is in coincidence to previous report (14). We reckoned that the activation of PLC β 2 by AA was regulated by Gi protein, implying that Gi protein located in the upstream of PLC β 2. Among more than ten isoforms of PKC, PKC ϵ were closely linked

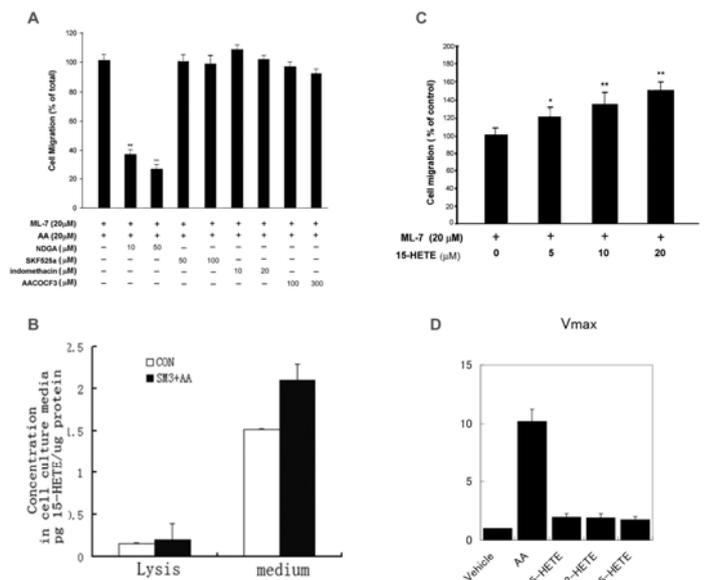


Fig. 5

to VSMCs migration (15). We confirmed the essential role of PKC ϵ in this abnormal migration by specific PKC ϵ inhibitory peptide. In short, although increase of $[Ca^{2+}]_i$ and phosphorylation of MLC were blocked by pretreatment of ML-7, our results suggested that GPCR, PLC β and PKC ϵ transduction pathway were activated by AA. Our results suggested activities of MAPKs were mediated by Gi protein, PLC β and PKC ϵ . To investigate whether other cellular factors participate in the signal pathway of this migration, we further tested the effects of tyrphostin AG112, Herbimycin, wortmannin and Y27632 and found any of the them did not inhibit the AA stimulated migration of SM3 cell with pretreatment of ML-7, excluding the signal pathways of protein tyrosine kinase, phosphoinositide kinase-3 and Rho kinase in the migration without phosphorylation of MLC. In summary, AA induced the migration of smooth muscle cell SM3 when phosphorylation of MLC was inhibited by ML-7. AA metabolites via Lox, 15-HETE, mediated this effect on migration. The successive signaling pathways we hypothesized were: Gi \rightarrow PLC β 2 \rightarrow PKC ϵ \rightarrow MAPKs. This “unusual” migration may contribute to the understanding of the vascular pathology.

参考文献

1. N. M. Tigerstedt, H. Savolainen-Peltonen, S. Lehti, P. Hayry, *J Vasc Res* **47**, 35 (Aug 6, 2009).
2. A. H. Sprague, R. A. Khalil, *Biochem Pharmacol* **78**, 539 (Sep 15, 2009).
3. W. T. Gerthoffer, *Circ Res* **100**, 607 (Mar 16, 2007).
4. R. Horwitz, D. Webb, *Curr Biol* **13**, R756 (2003 Sep, 2003).
5. A. P. Somlyo, A. V. Somlyo, *Physiol Rev* **83**, 1325 (Oct, 2003).
6. A. P. Somlyo, A. V. Somlyo, *Nature* **372**, 231 (Nov 17, 1994).
7. H. Nobe, K. Nobe, F. Fazal, P. De Lanerolle, R. J. Paul, *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C599 (Mar, 2003).
8. T. M. Seasholtz, *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C596 (Mar, 2003).
9. S. Ai *et al.*, *Atherosclerosis* **155**, 321 (Apr, 2001).
10. H. H. Wang *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H2060 (May, 2008).
11. T. Katayama *et al.*, *J Pharmacol Sci* **102**, 339 (Nov, 2006).
12. T. Katayama *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H505 (Feb, 2010).
13. E. A. Kaperonis, C. D. Liapis, J. D. Kakasis, D. Dimitroulis, V. G. Papavassiliou, *Eur J Vasc Endovasc Surg* **31**, 386 (Apr, 2006).
14. W. F. Chiou, H. R. Tsai, L. M. Yang, W. J. Tsai, *Int Immunopharmacol* **4**, 1329 (Oct, 2004).
15. K. Yano, J. R. Bauchat, M. B. Liimatta, D. R. Clemmons, C. Duan, *Endocrinology* **140**, 4622 (Oct, 1999).

作成日：2010年3月1日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 路 平 
指導責任者名： 鍋島 俊隆
所属部署名：名城大学薬学部 職名：教授
所在地：名古屋市天白区八事山 150 (〒468-8503)
電 話：+81-(0)52-839-2735 内線：

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

アルツハイマー病動物モデルを用いた silibinin の薬効評価

3. 成果の概要

アミロイドβペプチド₂₅₋₃₅(Aβ₂₅₋₃₅)処置による恐怖条件付け記憶障害に対して、中国由来の植物、水飛薊(マリアアザミ)から抽出された silibinin を連続投与するとその障害が緩解されることを発見しました。また、silibinin のその効果には海馬と扁桃体におけるニトロ化チロシン、TNFα および iNOS の発現変化が関与していることが明らかとなりました。このことは silibinin がアルツハイマー病治療の候補物質となりうる可能性を示しております。

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

The 6 th Nagoya/Nanjing/Shenyang Symposium of Pharmaceutical Sciences.
Prenatal psychological stress produces anxiety-like behavior in offspring.

The 115 th Kinki Branch Meeting of Japanese Pharmacological Society. Abnormal behavior and NMDA receptor in the postpubertal mice after prenatal exposure to phencyclidine.

The 2 th International Seminar of Meiji Pharmaceutical University Asia/Africa Center for Drug Discovery. Long-lasting effects of prenatal exposure to NMDA receptor antagonist, phencyclidine on behavior in mice.

(2)発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

1. Lu P, Mamiya T, Lu L, Mouri A, Niwa M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Yamada K, Ikejima T,

- Nabeshima T. Silibinin attenuates cognitive deficits and decreases of dopamine and serotonin induced by repeated methamphetamine treatment. **Behav Brain Res.** 2010; 207(2):387-93.
2. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Niwa M, Hiramatsu M, Zou LB, Nagai T, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin attenuates amyloid beta (25-35) peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in mice. **J Pharmacol Exp Ther.** 2009; 331(1):319-326.
 3. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou L, Nagai T, Hiramatsu M, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. **Br J Pharmacol.** 2009; 157(7):1270-1277.

アルツハイマー病動物モデルを用いた silibinin の薬効評価

研究者氏名	路 平
中国所属機関	中国瀋陽薬科大学薬理学
日本研究機関	名城大学薬学部薬品作用学研究室
指導責任者	教授 鍋島 俊隆
共同研究者名	間宮隆吉, 陸玲玲, 毛利彰宏, 丹羽美苗, 平松正行, 邹莉波, 永井拓, 池島乔.

Abstract:

In this study, we examined the effect of silibinin on the fear-conditioning memory deficits, inflammatory response and oxidative stress induced by the intracerebroventricularly (i.c.v.) injection of A β peptide₂₅₋₃₅ (A β ₂₅₋₃₅) in mice. Mice were treated with silibinin from the day of the A β ₂₅₋₃₅ injection (day 0). Memory function was evaluated in cued and contextual fear-conditioning tests (day 6). Nitrotyrosine levels in the hippocampus and amygdala were examined (day 8). The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor α (TNF α) in the hippocampus and amygdala was measured 2 hours after the A β ₂₅₋₃₅ injection. We found that silibinin significantly attenuated memory deficits caused by A β ₂₅₋₃₅ in the cued and contextual fear-conditioning test. Silibinin significantly inhibited the increase in nitrotyrosine levels in the hippocampus and amygdala induced by A β ₂₅₋₃₅. Moreover, real-time RT-PCR revealed that silibinin inhibited the overexpression of iNOS and TNF α mRNA in the hippocampus and amygdala induced by A β ₂₅₋₃₅. These findings suggest that silibinin (i) attenuates memory impairment through amelioration of oxidative stress and inflammatory response induced by A β ₂₅₋₃₅ and (ii) may be a potential candidate for an AD medication.

Key Words A β , memory, silibinin, TNF α , iNOS

Introduction:

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by extraneuronal deposits of amyloid β (A β) peptide. The deposition A β is invariably associated with oxidative stress and inflammatory response (Butterfield et al., 2007). TNF α , a pro-inflammatory cytokine, has been shown to increase in AD patients (Perry et al., 2001). A β -induced expression of TNF α leads to overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in experimental animals. Peroxynitrite (ONOO⁻) is one of the products formed from nitric oxide and superoxide, and has a variety of chemical reactions producing compounds such as nitrotyrosine (Tran et al., 2003). Interestingly, the accumulation of nitrotyrosine correlated with increased levels of cerebral A β and the severity of cognitive impairment (Tran et al., 2003).

A β ₂₅₋₃₅ is the core fragment of full-length A β and possesses many of the characteristics of the full-length A β peptide, including aggregative ability and neurotoxic property. There are reports that the i.c.v. administration of A β ₂₅₋₃₅ peptide into rodent brain is useful animal model for screening new candidates for AD therapy worldwide.

Silibinin is a flavonoid derived from the herb milk thistle, and has been reported to have anti-inflammatory and antioxidative effects. Recently, we have reported that silibinin ameliorates A β ₂₅₋₃₅-induced recognition memory impairment in mice (Lu et al., 2009). However, it is unclear whether silibinin ameliorates impairments of other types of memory such as fear memory. In this study, we investigated the effect of silibinin on memory impairment induced by A β ₂₅₋₃₅ in cued and contextual fear-conditioning tests. We also examined its effect on changes in nitrotyrosine levels as well as TNF α and iNOS mRNA expression in the brain of mice.

Methods:

Animals.

Male ICR mice (5 weeks old) were obtained from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan). They were housed in plastic cages and kept in a regulated environment ($23 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ humidity) with a 12/12-h light/dark cycle (lights on from 08:00 to 20:00). The mice received food and water ad libitum.

Treatment.

$\text{A}\beta_{25-35}$ (1 mg/ml) was aggregated, by incubating it in distilled water at 37°C for 4 days before the injection. $\text{A}\beta_{25-35}$ was injected i.c.v. in a volume of 3 μl (3 nmol/mouse) on day 0 as in our previous report (Fig.1, Lu et al., 2009). Mice were administered orally (p.o.) silibinin (2, 20 or 200 mg/kg/day) or the 0.3% CMC solution by gavage for 8 days after the treatment with $\text{A}\beta_{25-35}$.

Cued and contextual fear-conditioning tests.

For conditioning, mice were placed in the conditioning cage, and then a 15-sec tone (80 dB). During the last 5 sec of the tone stimulus, a foot shock of 0.6 mA was delivered. This procedure was repeated four times with 15-sec intervals. Cued and contextual tests were carried out 24 hours after the fear-conditioning phase on day 7. For the cued fear-conditioning test, the freezing response was measured in a neutral cage for 1 min in the presence of a continuous tone stimulus identical to the conditioned stimulus. For the contextual fear-conditioning test, mice were placed in the conditioning cage, and the freezing response was measured for 2 min without tone and the unconditioned stimulus.

Western blotting.

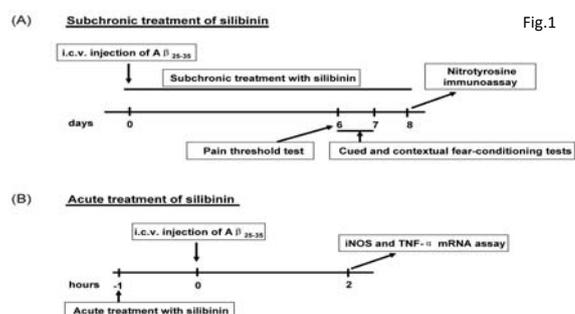
The hippocampus and amygdala were homogenized in an ice-cold extraction buffer. Equal amounts of protein (20 μg), were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred electrophoretically to a polyvinylidene difluoride membrane. It was then incubated in 5% skim milk in a TBS-T washing buffer for 2 hours at room temperature. Then the membranes were incubated with mouse anti-nitrotyrosine clone1A6 (1:1000) or mouse anti-actin primary antibody (1:1000) at 4°C overnight. The membrane was incubated with horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG (1:1000). Immunoreactive complexes on the membrane were detected using Western blotting detection reagents and exposed to X-ray film.

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR).

The hippocampus and amygdala were homogenized and total RNA was extracted using an RNeasy total RNA isolation kit. The primers used were as follows: For iNOS, forward primer: 5'-GGGCAGCCTGTGAGACCTT-3'; reverse primer: 5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3'; TaqMan probe: TGTCGAAGCAAACATCACATTCAGATCC; For TNF α , forward primer: 5'-CTTTCGTTGCTCTTTGGTTGAG-3'; reverse primer: 5'-GCAGCTCTGTCTGTTGGATCAG-3'. PCRs were performed using the One Step SYBR $^{\text{®}}$ PrimeScript $^{\text{TM}}$ RT-PCR Kit. The reaction profile consisted of a first round at 95°C for 3 min and then 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 60°C for 34 sec, and extension at 72°C for 1 min, with a final extension reaction carried out at 72°C for 10 min.

Statistical analyses.

The results are expressed as the mean \pm S.E.M. Statistical significance was determined with the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. A Pearson correlation analysis was performed to elucidate the relationships. $p < 0.05$ was taken as a significant level of difference.

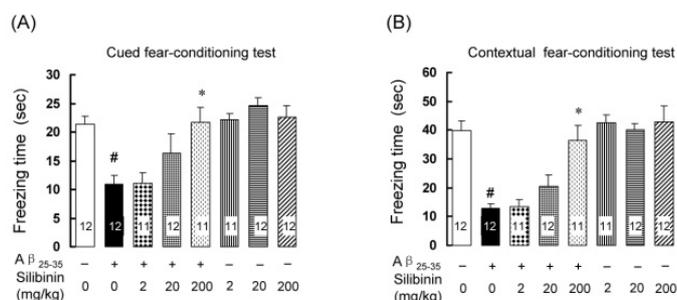


Results:

Effect of silibinin on memory impairment induced by A β_{25-35} in fear-conditioning tests.

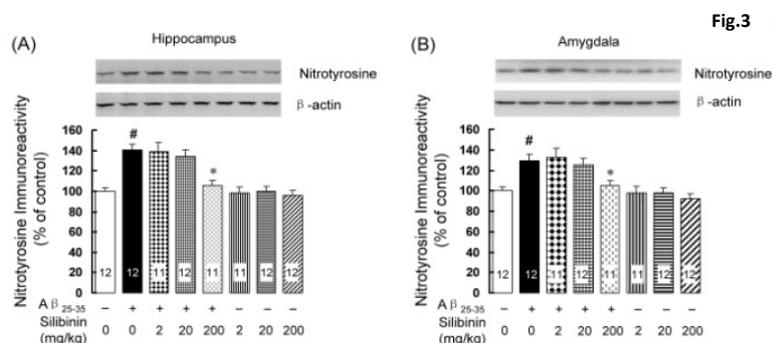
A β_{25-35} -injected mice exhibited less of a cued or contextual-dependent freezing response than distilled water-injected mice ($p < 0.05$, Fig. 2A; $p < 0.05$, Fig. 2B), indicating an impairment of associative memory. Silibinin dose-dependently attenuated the impairment of cued and contextual freezing responses ($p < 0.001$, Fig. 2A; $p < 0.001$, Fig. 2B).

Fig. 2



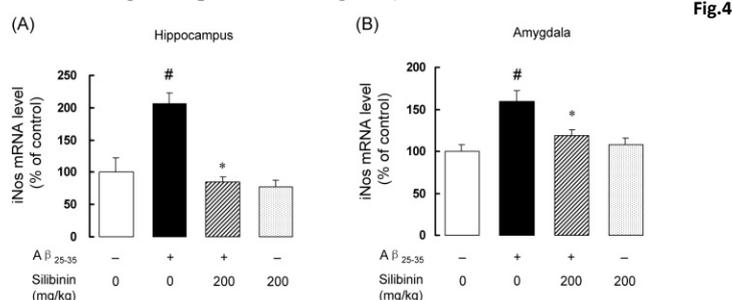
Effect of silibinin on the level of nitrotyrosine.

Silibinin significantly attenuated the increase in nitrotyrosine levels induced by A β_{25-35} ($p < 0.05$, Fig. 3A; $p < 0.05$, Fig. 3B). In addition, nitrotyrosine levels in the hippocampus and amygdala negatively correlated with contextual freezing responses ($r = -0.468$, $p < 0.05$; $r = -0.489$, $p < 0.05$, data not shown), although the negative correlation between nitrotyrosine level and cued freezing response was observed in the amygdala, but not in the hippocampus ($r = -0.305$, $p = 0.136$; $r = -0.565$, $p < 0.05$, data not shown). We also found that the increase in nitrotyrosine immunoreactivity in the hippocampus induced by A β_{25-35} correlates with that in the amygdala ($r = -0.564$, $p < 0.05$, data not shown).



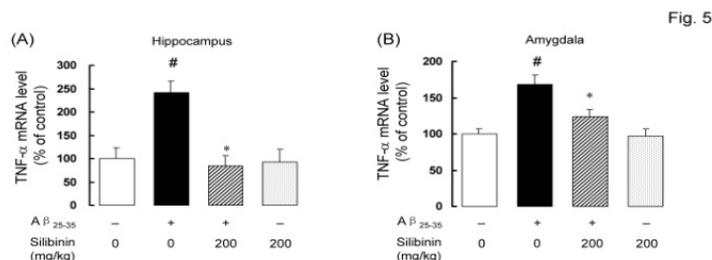
Effect of silibinin on iNOS mRNA expression.

Silibinin significantly attenuated the increase induced by A β_{25-35} in the hippocampus and amygdala ($p < 0.001$, Fig. 4A; $p < 0.001$, Fig. 4B). Silibinin did not affect iNOS mRNA expression in the hippocampus or amygdala of distilled water-injected mice ($p = 0.534$, Fig. 4A; $p = 0.864$, Fig. 4B).



Effect of silibinin on TNF α mRNA expression.

Silibinin significantly attenuated the increase in the TNF α mRNA induced by A β ₂₅₋₃₅ in both the hippocampus and amygdala ($p < 0.05$, Fig. 5A; $p < 0.001$, Fig. 5B). In addition, iNOS mRNA expression correlated with TNF α mRNA expression in the hippocampus and amygdala ($r = 0.416$, $p < 0.05$; $r = 0.429$, $p < 0.05$, data not shown).



Discussion:

In this study, A β ₂₅₋₃₅ caused memory impairment in both cued and contextual fear conditioning tests. Repeated silibinin treatment significantly attenuated the memory impairment induced by A β ₂₅₋₃₅ without affecting the responses to electrical foot shock. It has been confirmed that peroxynitrite-mediated damage contributes to A β -induced neuronal toxicity and cognitive deficits (Tran et al., 2003) and is widespread in the brain of AD patients. In the present study, we found that nitrotyrosine levels in the hippocampus and amygdala negatively correlated with contextual freezing responses. Moreover, silibinin significantly attenuated the elevation of nitrotyrosine in the hippocampus and amygdala induced by A β ₂₅₋₃₅. These findings suggest that protection from peroxynitrite may be involved in the ameliorating effects of silibinin on cognitive deficits.

It has been demonstrated in vitro that the stimulation of neuronal cell lines with TNF α leads to increased expression of iNOS which catalyzes a high-output pathway of NO production and is capable of causing neuronal peroxynitrite-mediated dysfunction (Tran et al., 2003). In the present study, silibinin significantly inhibited the increase in iNOS and TNF α mRNA in the hippocampus and amygdala induced by A β ₂₅₋₃₅. It is possible that silibinin prevents A β ₂₅₋₃₅-induced peroxynitrite-mediated damage by downregulation of TNF α which inhibits iNOS expression.

In conclusion, the present study confirmed that silibinin could ameliorate memory impairment induced by A β ₂₅₋₃₅. The effect of silibinin may be attributed to the blocking of inflammatory responses and oxidative stress in the hippocampus and amygdala.

References:

- Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R (2007) Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol; Med* 43: 658-677.
- Lu P, Mamiya T, Mouri A, Lu LL, Nagai T, Hiramatsu M, Zou LB, Ikejima T, Nabeshima T (2009) Silibinin prevents amyloid β peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol*; 157:1270-7.
- Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC (2001) The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 22: 873-883.
- Tran MH, Yamada K, Nakajima A, Mizuno M, He J, Kamei H, Nabeshima T (2003) Tyrosine nitration of a synaptic protein synaptophysin contributes to amyloid beta-peptide-induced cholinergic dysfunction. *Mol Psychiatry*; 8: 407-412.

注: 本研究は『THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS』(2009年10月VOL331巻)に掲載。

作成日: 2010年3月4日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2010 年 03 月 06 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：黄 岩杰
指導責任者名： 菱田 明
所属部署名：浜松医科大学第一内科 職名：教授
所 在 地：静岡県浜松市東区半田山 1-20-1
電 話：053-435-2261 内線：



1. 助成金額：600000 円

2. 研究テーマ

高塩分摂取による腎線維化の進行における腎組織受容体随伴プロレニン系と
尿細管レニン発現

3. 成果の概要

片腎摘後に抗胸腺細胞抗体の2回投与で作成したラットの慢性進行性腎炎において、血漿レニンを抑制する高塩分摂取が腎線維化病変を増悪させる機序と関連して、高塩分摂取下での腎組織では傍糸球体装置のプロレニン、レニンの発現と血漿レニン活性は低下するが、尿細管のプロレニン、レニン、膜結合の(プロ)レニン受容体の増加と(プロ)レニン受容体への結合で非酵素的に活性化されたプロレニンの増加、腎組織アンジオテンシン II の増加を伴うことが明らかとなった。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・有(学会名・演題)

有

1. Title: Upregulation of intrarenal renin angiotensin system (RAS) in rats with chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis under high salt intake (HSI). 20090605. The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology. Oral presentation.

2. Title: Increased tubular prorenin and renin in rats with chronic

anti-thymocyte serum (ATS) nephritis under high salt intake (HSI). 20091030.
The 42nd Annual Meeting of American Society of Nephrology. Poster
presentation.

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

無

高塩分摂取による腎線維化の進行における腎組織受容体随伴プロレニン系と尿細管レニン発現

研究者氏名 黄 岩杰
中国所属機関 河南中医学院第一附属病院
日本研究機関 浜松医科大学 第一内科
指導責任者 教授 菱田 明
共同研究者名 山本 龍夫

Abstract

Activation of intrarenal renin angiotensin system (RAS) is involved in the progression of kidney fibrosis in chronic kidney disease (CKD). Although high salt intake suppresses the circulating RAS activity, it aggravates the kidney injury in CKD. To elucidate the role of high salt intake in the kidney injury in CKD, we investigated the circulating and intrarenal RAS activities in 1) rats with chronic ATS nephritis induced by uninephrectomy and two consecutive injections of ATS with high salt intake (0.5% NaCl solution as drinking water; UAH), 2) chronic ATS nephritis rats with normal salt intake (tap water as drinking water; UA), and 3) rats received sham operation, no ATS injection, and with normal salt intake (SN). Blood pressure was increased in UAH on day 21. Progressive increases in urinary protein excretion, intrarenal TGF- β expression, and kidney fibrosis were observed in both UAH and UA, however, their levels were significantly higher in UAH than UA. The levels of intrarenal prorenin and renin were higher in UA than SN, and were augmented markedly in UAH on day 14 and 21 despite the concomitant decreases in plasma renin activity in UAH. Immunoreactivity for total renin (prorenin and renin) was noted in the afferent arteriole in the juxtaglomerular apparatus (JGA) in SN. Immunoreactivity for total renin was also observed in some distal and proximal tubules in UA, and was markedly augmented in UAH despite its significant suppression in the JGA in UAH. The increase in non-proteolytically activated prorenin was noted mainly in the distal tubules in UA, and was augmented more in the distal and proximal tubules in UAH. The level of intrarenal angiotensin II was higher in UA than SN, and was increased markedly in UAH. No significant changes were noted in the levels of intrarenal AT1-receptor (AT1-R) and intrarenal total (pro)renin receptor ((P)RR) proteins and mRNA were noted among SN, UA and UAH, but the levels of membrane-bound (P)RR were increased in UAH. These data suggest that despite significant suppression of circulating RAS, and prorenin and renin in the JGA, the increases in tubular prorenin and renin, which are associated with increased intrarenal non-proteolytically activated prorenin, membrane-bound (P)RR and angiotensin II, are involved in the progression of kidney fibrosis in chronic ATS nephritis rats on high salt intake.

Keywords

chronic kidney disease (CKD); prorenin; renin; (pro)renin receptor

Introduction

It has been known that there are two distinct renin-angiotensin systems (RASs), the circulating RAS and the tissue RAS. In the kidney, all of the RAS components are present and the activation of intrarenal (RAS) is involved in the progression of kidney fibrosis in chronic kidney disease (CKD).^[1] Prorenin is a precursor of renin and has a prosegment which covers the enzymatic cleft and obstructs access of angiotensinogen to the active site of renin. On binding to prorenin receptor ((P)RR), prorenin gains renin activity through non-proteolytic activation mediated by conformational change, leads to unfolding of the prosegment from the enzymatic cleft, and becomes enzymatically active.^[2] Renin binding to (P)RR displays four to five times higher catalytic activity than that of free renin.^[3] Renin is synthesized mainly by the juxtaglomerular apparatus (JGA). However, renin mRNA and protein have been detected not only in JGA but also in proximal, connecting tubule and collecting duct cells of rat, mouse, and human kidneys as well as in extrarenal tissues.^[4-8] In the kidney, (P)RR is present in glomerular epithelial cells, mesangium, distal and collecting tubular cells.^[3, 9, 10]

Although high salt intake suppresses the circulating RAS activity, little is known about the effect of high salt intake on the levels of prorenin, renin, (P)RR and non-proteolytically activated (P)RR in the diseased kidneys. In this study, we investigated whether through the binding to (P)RR, upregulation of tubular prorenin and renin is involved in the enhanced renal angiotensin II and the progression of kidney fibrosis in chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis under high salt intake.

Materials and Methods

Male Wistar rats were uninephrectomized seven days before (day -7) induction of ATS nephritis and were fed with tap water (normal salt intake) or 0.5% sodium chloride solution (high salt intake) as drinking water from day -7 to the end of the experiments. To induce nephritis, rats were injected 1.0 mL ATS through the tail veins twice on day 0 and 7. Four groups were studied: SN, rats received sham operation, normal salt intake, and were sacrificed on day 14. UA, rats received uninephrectomy and two ATS injections, normal salt intake, and were sacrificed on day 14. UAH(14), rats received uninephrectomy and two ATS injections, high salt intake, and were sacrificed on day 14. UAH(21), UAH rats which were sacrificed on day 21.

Renal tissue sections were embedded in paraffin for histological and immunohistochemical analyses. The intrarenal levels of prorenin, renin, (P)RR, AT1-R proteins were examined by western blot and those of renin, (P)RR, TGF- β mRNA were detected by quantitative real time reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR). The plasma renin activity (PRA) and angiotensin II (AngII) were measured by radioimmunoassay (RIA). The levels of membrane-bound (P)RR were investigated using tissue fractionation followed by western blot.

Results

1. Proteinuria, renal histology and the expression of TGF- β 1 mRNA

The levels of urinary protein excretion were increased in UAH rats on day 14, and were enhanced progressively on day 21. Mesangial proliferation and matrix accumulation were

observed in UA on day 14. In UAH, mesangial proliferation and matrix accumulation associated with interstitial mononuclear cell infiltration, tubular dilation and atrophy, and interstitial fibrosis were noted on day 14 and grew more severe on day 21. The expression of TGF- β 1 mRNA in renal cortex was enhanced in UA and UAH rats, and was increased progressively on day 21 in UAH.

2. Blood pressure

No significant differences in the levels of blood pressure were noted among SN, UA and UAH on day 14. The levels of mean blood pressure were increased in UAH on day 21 compared with other groups.

3. PRA

PRA was decreased in UA and was further repressed in UAH.

4. Intrarenal renin and prorenin

The levels of prorenin and renin proteins were increased in the proximal, distal tubules, and collecting ducts in UA and UAH. Especially, the levels of cortical prorenin and renin protein were enhanced markedly in UAH on day 14, and were maintained on day 21, despite significant suppression of prorenin and renin in the JGA. Marked increases in immunostaining of non-proteolytically activated prorenin were noted in the tubulointerstitial lesions in UAH kidneys. In contrast, the renal levels of renin mRNA expression were decreased in UA and UAH compared with SN.

5. Intrarenal AT1-R and (P)RR

No significant changes were noted in the levels of intrarenal AT1-R and total (P)RR proteins and its mRNA were noted among SN, UA and UAH, but the levels of membrane-bound (P)RR were markedly increased in UAH.

6. Intrarenal AngII

Cortical AngII contents were enhanced in UA, and were progressively augmented in UAH on day 21.

Discussion

Increases in prorenin and renin were noted in UA and were further augmented in UAH despite marked suppression of prorenin and renin in the JGA, and PRA on high salt intake. The levels of AngII, non-proteolytically activated prorenin, and membrane-bound prorenin were also increased in UAH kidneys, while no significant changes in the levels of AT1-R were noted. Ichihara et al also reported that non-proteolytically activated prorenin was present in podocytes of the kidneys from diabetic rats and stroke-prone spontaneously hypertensive rats fed a high salt diet^[14,15] It is suggested that the augmentation of non-proteolytically activation of prorenin through the binding to (P)RR could be involved in the enhanced generation of renal AngII, resulting in the progression of tubulointerstitial fibrosis in chronic ATS nephritis under high salt intake.

It is known that JGA renin release is directly suppressed by pressure, angiotensin II and sodium chloride via intracellular concentration of calcium. Prieto-Carrasquero MC et al showed collecting duct renin protein and mRNA were upregulated in chronic Ang II infused rats^[11] and these increases are prevented by AT1-R blockers (ARB), suggesting the enhanced tubular renin expression through an AT1-R-mediated mechanism.^[12] In the present study, however, in contrast to the increased renal prorenin and renin protein

levels noted in UA and UAH, the levels of renin mRNA measured by QRT-PCR were decreased in these kidneys. These data suggest that the increases in renal prorenin and renin were not due to enhanced renin expression but to increased tubular uptake. However, it could also be possible that the steady state levels of renin mRNA measured by QRT-PCR cannot simply represent the dynamic renin expression in the nephritic kidneys, resulting in the discrepancy between the steady state mRNA levels and protein levels. It is likely that renin can be partially filtered through the glomerular membrane and most of the filtered load is reabsorbed by the proximal tubule cells under normal physiological conditions. ^[13] But in nephritis rats, some proximal tubular cells were damaged accompanying the decrease of reabsorption function, and renin may be accumulated in renal interstitial. The study which investigates the effect of ARB on kidney fibrosis and intrarenal RAS activity in UA and UAH is now in progress in our laboratory.

References

1. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007;59(3):251-287.
2. Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension.* 2005;46(5):1069-1076.
3. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 2002; 109:1417-1427.
4. Taugner R, Hackenthal E, Inagami T, Nobiling R, Poulsen K. Vascular and tubular renin in the kidneys of mice. *Histochemistry.* 1982;75: 473-484.
5. Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:7552-7556.
6. Chen M, Harris MP, Rose D, Smart A, He XR, Kretzler M, Briggs JP, Schnermann J. Renin and renin mRNA in proximal tubules of the rat kidney. *J Clin Invest.* 1994;94:237-243.
7. Moe OW, Ujiie K, Star RA, Miller RT, Widell J, Alpern RJ, Henrich WL. Renin expression in renal proximal tubule. *J Clin Invest.* 1993;91: 774-779.
8. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E, Zhang S, Cheng T, Inagami T, Ward K, Terreros DA, Lalouel JM. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension.* 1999;34:1265-1274.
9. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor- β 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int.* 2006;69:105-113.
10. G Nguyen. Increased cyclooxygenase-2, hyperfiltration, glomerulosclerosis, and diabetic nephropathy: put the blame on the (pro)renin receptor? *Kidney Int.* 2006;70: 618-620.
11. Prieto-Carrasquero MC, Harrison-Bernard LM, Kobori H, Ozawa Y, Hering-Smith KS, Hamm LL, et al. Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension.* 2004;44(2):223-229.
12. Prieto-Carrasquero MC, Kobori H, Ozawa Y, Gutierrez A, Seth D, Navar LG. AT1

receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:F632-F637.

13. Leyssac PP. Micropuncture study of renin release at the single nephron level. Evidence for some release directly into the circulating blood. *Renal Physiol.* 1978;1:61-73.

14. Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for non-proteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest.* 2004;114:1128-1135.

15. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nakagawa T, Nishiyama A, et al. Contribution of non-proteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2495-2503.

Presentations

1. Title: Upregulation of intrarenal renin angiotensin system (RAS) in rats with chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis under high salt intake (HSI). 20090605. The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology. Oral presentation.

2. Title: Increased tubular prorenin and renin in rats with chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis under high salt intake (HSI). 20091030. The 42nd Annual Meeting of American Society of Nephrology. Poster presentation.

March 06, 2010

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 王 偉

指導責任者名： 矢野聖二

所属部署名：金沢大学がん研究所

職名：博士研究員

所在地：石川県金沢市宝町13-1

電話：076-265-2794

内線：2794



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

宿主由来 HGF による変異型 EGFR 陽性肺癌のゲフィチニブ耐性機構解析とその克服

3. 成果の概要

ヒト肺癌株として、EGFR 活性型変異 (Exon 19 の deletion) を有しているが T790M second mutation や MET 増幅を有しておらず、ゲフィチニブやエルロチニブに高感受性を示す PC-9 および HCC827 を用いた。ヒト線維芽細胞株として MRC-5 と IMR-90 を使用した。これらヒト細胞株の HGF 産生を ELISA で測定したところ、肺癌細胞株や血管内皮細胞株 (HUVEC と HMVEC) ではなく線維芽細胞株が HGF を高発現していた。切除肺癌組織を用いた蛍光染色でも、症例によっては間質の線維芽細胞が HGF を過剰発現していた。また共培養することにより、HGF を高発現する線維芽細胞株および肺癌組織から得た初代培養線維芽細胞は、肺癌細胞株 (PC-9 や HCC827) のゲフィチニブ耐性を誘導した。線維芽細胞由来 HGF はその受容体である MET をリン酸化し、EGFR や ERBB3 とは無関係に PI3K/Akt 経路を活性化することにより、ゲフィチニブ耐性を誘導していた。さらに、SCID マウス皮下に PC-9 とヒト線維芽細胞株 MRC-5 を混合接種するモデルにおいて、腫瘍はゲフィチニブに耐性化した。抗 HGF 抗体や HGF-MET 阻害薬である NK4 併用することで線維芽細胞によるゲフィチニブ耐性を克服した。以上の結果より、腫瘍微小環境を形成する線維芽細胞が産生する HGF が EGFR 活性型変異を有する肺癌のゲフィチニブに対する自然耐性および獲得耐性の原因の一つになっている可能性が示唆された。また、HGF-MET 阻害薬併用により耐性が克服できる可能性が示されたため、現在最適の耐性克服治療法を確立すべくさらに検討を進めて

いる。

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

1. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 13th Japanese Association for Molecular Target Therapy of Cancer. 第13回日本がん分子標的治療学会. June 24-26, 2009. Tokushima.
2. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 18th Annual Meeting of the Japanese Association for Metastasis Research. 第18回日本がん転移学会. July 23-24, 2009. Asahigawa, Hokaido.
3. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 2009 Asia-Pacific Conference of Tumor Biology and Medicine and Fourth Forum of Chinese Young and Middle-aged Oncologists. Oct 24-27, 2009. Xi'An, China.

(2)発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

Wang W, Li Q, Yamada T, Matsumoto K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Kayano Y, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 1;15(21):6630-8.

宿主由来 HGF による変異型 EGFR 陽性肺癌のゲフィチニブ耐性機構解析とその克服

研究者氏名	王 玮
中国研究機関	第四軍医大学唐都医院腫瘍内科
日本研究機関	金沢大学がん研究所腫瘍内科
指導責任者	教授 矢野 聖二

要旨

Most EGFR mutant NSCLCs initially respond to EGFR tyrosine kinase inhibitors, gefitinib and erlotinib, but these tumors invariably develop drug resistance. Wang W, et al, found that lung cancer cells recruited human fibroblasts whereas fibroblasts induced resistance of lung cancer to EGFR-TKIs by secreting HGF. Co-localization of fibroblasts and HGF was detected in both xenograft tumors and lung cancer patient specimens. Anti-HGF antibody, HGF antagonist and MET-TKI could overcome the resistance to EGFR-TKIs of lung cancer. Therefore, crosstalk to stromal fibroblasts plays a critical role in lung cancer resistance to EGFR-TKIs and maybe an ideal therapeutic target for lung cancer.

Key Words EGFR-TKI, HGF, Tumor microenvironment, Fibroblast, Drug Resistance

緒言：

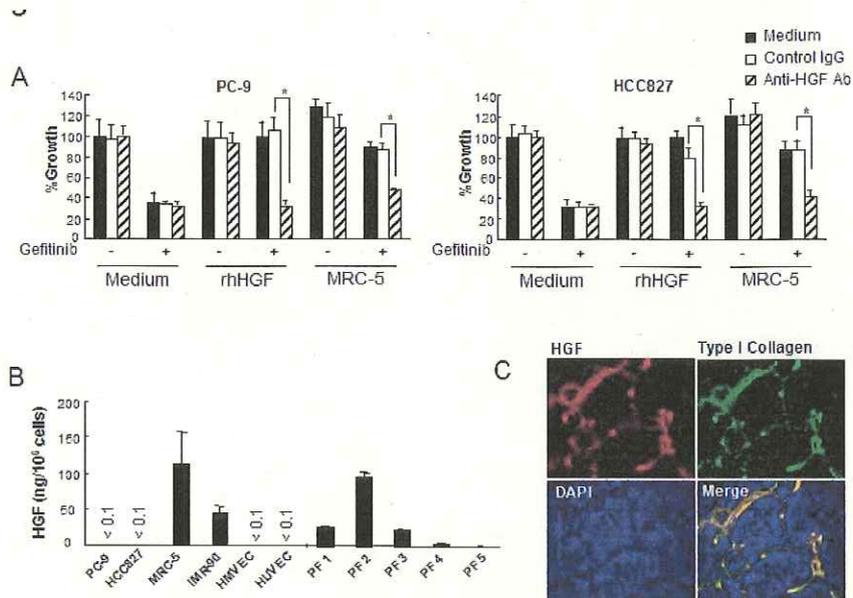
Lung cancers with *EGFR* activating mutations show good clinical response to gefitinib and erlotinib, selective TKIs to epidermal growth factor receptor (EGFR), but these tumors invariably develop drug resistance. Host stromal cells have been found to have a considerable effect on the behavior of cancer cells. Little is known, however, about the role of host cells on the sensitivity of cancer cells to receptor tyrosine kinase inhibitors (TKIs). We have therefore assessed the effect of crosstalk between stromal cells and lung cancer cells harboring *EGFR* mutations on susceptibility to EGFR-TKIs.

対象と方法：

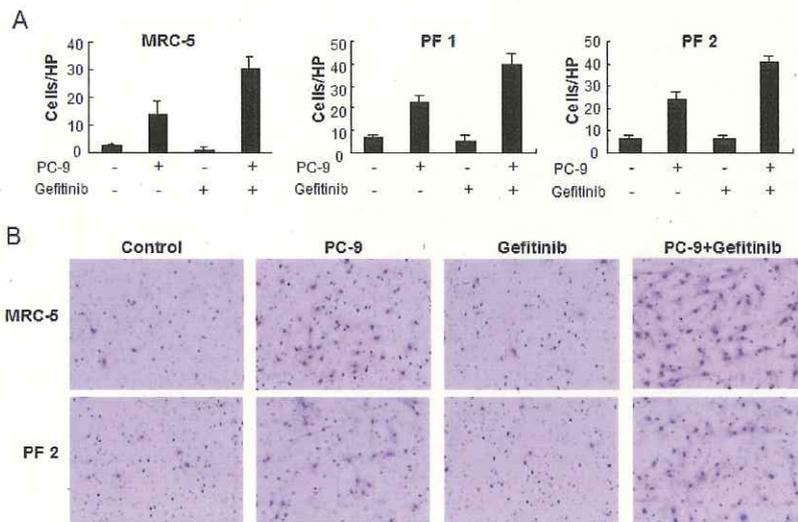
We evaluated the gefitinib sensitivity of lung cancer cells with *EGFR* activating mutations, PC-9 and HCC827, when co-cultured with fibroblasts and co-injected into SCID mice. We also examined the effect of lung cancer cells to fibroblasts recruitment.

結果：

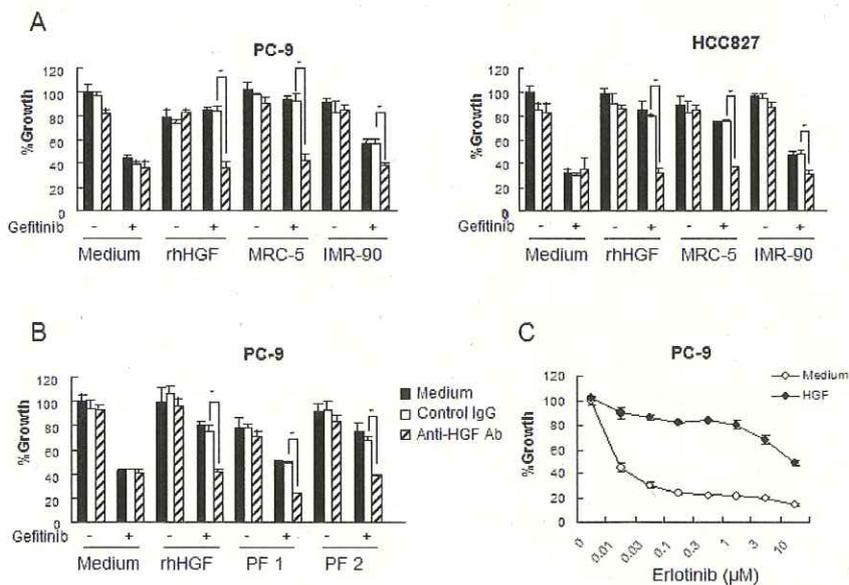
1. Fibroblast-derived HGF induces gefitinib resistance in lung cancer cells.



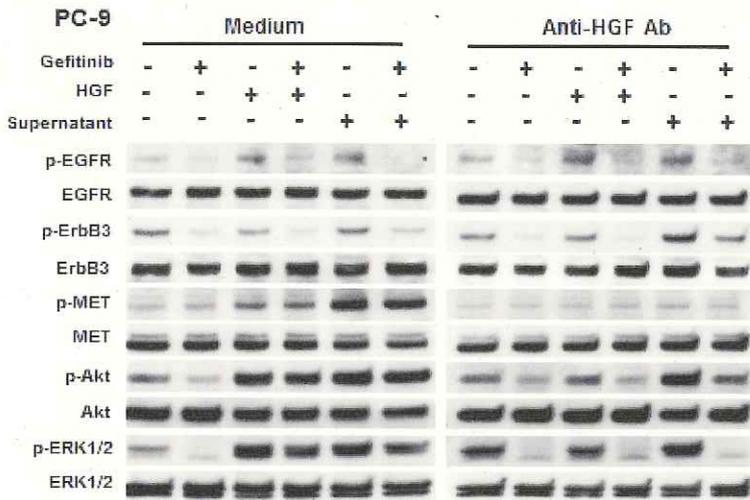
2. Lung cancer cells induce migration of fibroblasts.



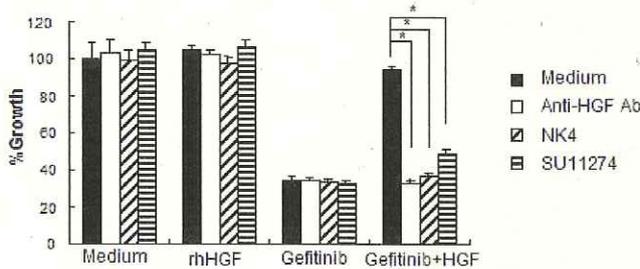
3. Fibroblast supernatants induce gefitinib resistance in lung cancer cells.



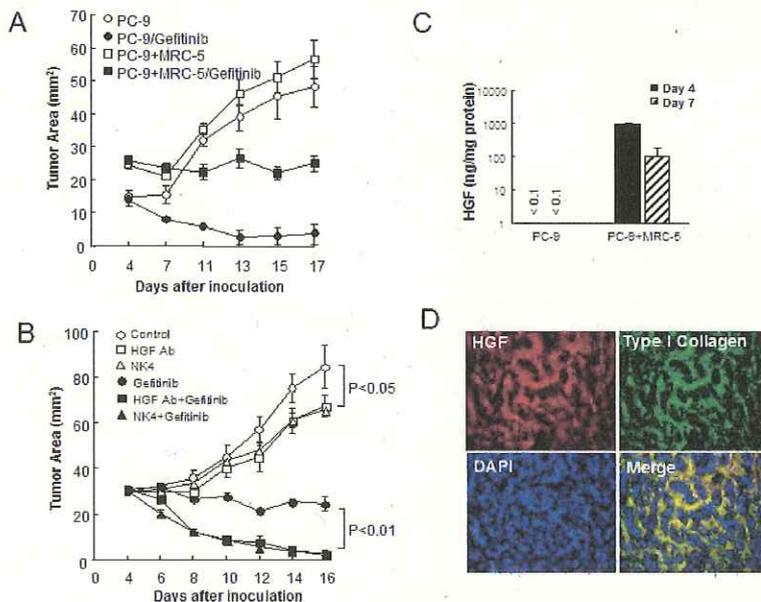
4. Fibroblast-derived HGF restores PI3K/Akt pathway via MET but not EGFR or ErbB3.



5. Anti-HGF antibody, NK4, or SU11274 abrogate HGF induced gefitinib resistance in lung cancer cells.



6. Fibroblast-derived HGF induces gefitinib resistance in PC-9 tumors in SCID mice.



考察：

These findings indicate that crosstalk to stromal fibroblasts plays a critical role in lung cancer resistance to EGFR-TKIs and may be an ideal therapeutic target in lung cancer with *EGFR* activating mutations.

参考文献：

1. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Eastern Cooperative Oncology Group. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2002;346:92-8.
2. Ohe Y, Ohashi Y, Kubota K, et al. Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. **Ann Oncol** 2007;18:317-23.
3. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N Engl J Med** 2004;350:2129-39.
4. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science** 2004;304:1497-500.
5. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. **Cancer Sci** 2007;98:1817-24.
6. Inoue A, Suzuki T, Fukuhara T, et al. Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. **J Clin Oncol** 2006;24:3340-6.
7. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N Engl J Med** 2005;352:786-92.
8. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. **PLoS Med**. 2005;2:e73
9. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. **Science** 2007;316:1039-43.
10. Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007;104:20932-7.
11. Yano S, Wang W, Li Q, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. **Cancer Res** 2008;68:9479-87.
12. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. **Nature** 1989;342:440-3
13. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2003;4:915-25.
14. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. **Int J Cancer** 2006;119:477-83.
15. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature** 2004;432:332-7.
16. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature** 2001;411:375-9.
17. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. **Nat Rev Cancer** 2001;1:46-54.
18. Ogino A, Kitao H, Hirano S, et al. Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line. **Cancer Res** 2007;67:7807-14.
19. Guo A, Villén J, Kornhauser J, et al. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008;105:692-7.

20. Tomioka D, Maehara N, Kuba K, et al. Inhibition of growth, invasion, and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in an orthotopic mouse model. **Cancer Res** 2001;61:7518-24.
21. Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. **Acta Neuropathol** 2003;106:112-20.
22. Barker SE, Grosse SM, Siapati EK, et al. Immunotherapy for neuroblastoma using syngeneic fibroblasts transfected with IL-2 and IL-12. **Br J Cancer**. 2007;97:210-7.
23. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. **J Immunol Methods** 1984;70:257-68.
24. Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer Res** 1987;47:3239-45.
25. Askenasy N, Farkas DL. Antigen barriers or available space do not restrict in situ adhesion of hemopoietic cells to bone marrow stroma. **Stem Cells** 2002;20:80-5.
26. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. **Curr Opin Genet Dev** 2009;19:67-73.
27. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006;6:392-401.
28. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell** 2005;121:335-48.
29. Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 1999;29:209-48.
30. Cao B, Su Y, Oskarsson M, et al. Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001;98:7443-8.
31. Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor, **FEBS Lett** 1997;420:1-6.
32. Matsumoto K, Nakamura T, Sakai K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and Met in tumor biology and therapeutic approach with NK4. **Proteomics** 2008;8:3360-70.
33. Christensen JG, Schreck R, Burrows J, et al. A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. **Cancer Res** 2003;63:7345-55.
34. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. **Nat Rev Drug Discov** 2008;7:504-16.
35. Zou HY, Li Q, Lee JH, et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. **Cancer Res** 2007;67:4408-17.
36. Eder JP, Heath E, Appleman L, et al. Phase I experience with c-MET inhibitor XL880 administered orally to patients (pts) with solid tumors. **J. Clin. Oncol.** 2007;25: (Abstract 3526)

注：本研究は、2009年6月第13回日本がん分子標的治療学会と2009年7月第18回日本がん転移学会と2009年10月Asia-Pacific Conference of Tumor Biology and Medicine and Fourth Forum of Chinese Young and Middle-aged Oncologists 口演発表、**Clin Cancer Res** 2009 Nov 1;15(21) に掲載。

作成日：2010年3月15日

財団法人 日中医学協会

2009年度共同研究等助成金報告書 在留中国人研究者

2010年 3 月 1 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料 研究報告書

中国人研究者氏名： 漆 智
指導責任者名： 角 昭一郎
所属部署名： 京都大学 職名： 研究員
所 在 地： 京都市左京区聖護院川原町 5 3
電 話： 0757514866 内線： 4866



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

膵島の長期保存及び皮下移植における polyvinyl alcohol (PVA)マクロカプセル化膵島の応用

3. 成果の概要

膵島の長期保存における PVAマクロカプセル化膵島の in vitro 及び in vivo にての有用性

を確認し、報告した。膵島の皮下移植における PVAマクロカプセル化膵島の応用の実験の一部は

なお進行中であるが、近日中に終了する予定である。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 有(学会名・演題)

学会名： The 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan

Pancreas Society

演題名 Cryopreservation of polyvinyl alcohol (PVA)- encapsulated islet

(2) 発表した論文 有(雑誌名・題名)

雑誌名 Biomaterials

題名 The in vivo performance of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets

膵島の長期保存における polyvinyl alcohol (PVA) マクロカプセル化膵島の応用

研究者氏名 漆 智
日本研究機関 京都大学再生医科学研究所器官形成応用分野
指導責任者 角 昭一郎
共同研究者名 申艶那、柳井伍一、楊凱強

要旨

Islet transplantation is a method for the treatment of type 1 diabetes mellitus (DM) and has been widely performed around the world. The long-term cryopreservation of islets shows many advantages in the field of islet transplantation. Previous studies have described the development of sheet-type polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islet (MEI) to treat type 1 DM without any immunotherapy. The present study examined their beneficial effects on islet cryopreservation. PVA MEI of Wistar rats were divided into three groups of 1-day, 7-day and 30-day cryopreservation at -80°C . The 30-day group showed a lower recovery rate of the islet number and impaired insulin release in comparison to the 1-day group, whereas no significant differences of the *in vitro* results were observed between the 1-day and 7-day groups. The MEI transplantation recipient mice in the 1-day and 7-day groups reached normoglycemia for a 4-week observation period, and the recipients in 30-day group also showed a significant decrease followed by a slightly higher non-fasting blood glucose level. These results suggest that the PVA MEI are useful for islet long-term cryopreservation, and that the use of cryopreserved PVA MEI may therefore be a promising modality for performing DM therapy.

Key Words Polyvinyl alcohol (PVA), Macro-encapsulated islet (MEI), Islet cryopreservation, Islet transplantation.

緒言 :

Islet transplantation is a method for the treatment of type 1 diabetes mellitus (DM) and has been widely performed around the world [1]. The long-term cryopreservation of islets shows many advantages in the field of islet transplantation: 1. Isolated islets can be shipped to other institutions worldwide. 2. Islets isolated at different time can be accumulated to obtain a sufficient number for transplantation. 3. Cryopreservation provides the time for quality control of islets before transplantation [2]. This study tested 2 periods (7 days and 30 days) of freezing and examined their functions *in vitro* and *in vivo* in comparison to the original method of cryopreservation (1-day freezing).

対象と方法 :

PVA MEI of Wistar rats were divided into three groups of 1-day, 7-day and 30-day cryopreservation at -80°C . Morphological changes of islets, islet recovery rate and insulin secretion test were performed *in vitro*. *In vivo*, Eight hundred encapsulated Wistar rat islets were transplanted into the peritoneal cavity of diabetic C57BL/6 mice. Non-fasting blood glucose (NFBG), the body weights, and IPGTT were observed after transplantation. Blood samples were collected from the sacrificed mice 4 weeks after transplantation, serum insulin and c-peptide levels were measured. Transplanted MEI and recipients' pancreas were retrieved from mice sacrificed 4 weeks after transplantation, HE and insulin staining were performed.

結果 :

1 .Morphological changes and islet recovery rate

The MEI in the three groups showed a normal morphology after freezing-thawing, without islet fragments, and no obvious differences were observed between the three groups. The islet recovery rate in the 1-, 7- and 30-day groups were $74.4 \pm 1.72\%$, $69.6 \pm 3.97\%$ and $62.8 \pm 3.2\%$, respectively (7-day vs. 1-day: $p > 0.05$; 30-day vs. 1-day: $p < 0.05$).

2. Static incubation

The MEI in the three groups showed good insulin secretion abilities in response to high glucose concentration. The stimulation index in the 1-, 7- and 30-day groups was 1.84 ± 0.07 , 1.71 ± 0.1 and 1.66 ± 0.07 , respectively. No significant differences were found between three groups. However, the insulin release in the basal (3.3 mM) and stimulation (16.7 mM) medium of the 30-day group was lower than 1-day group ($p < 0.05$).

3. MEI xeno-transplantation

Mice in the 1-, 7- and 30-day groups showed a significant decrease in the NFBG levels in comparison with those in DM group after PVA MEI xeno-transplantation. Moreover, mice in the 1- and 7-day groups achieved normoglycemia (NFBG $< 200\text{mg/dl}$) within 1 week after transplantation, and maintained normoglycemia for 4 weeks. Although mice in the 30-day group did not achieve normoglycemia, the NFBG significantly decreased from $485.8 \pm 25.1\text{mg/ml}$ to $246.3 \pm 19.6\text{mg/dl}$ (at the 4th week) after transplantation. The MEI groups maintained their body weight for 4 weeks. In contrast, the DM group showed a significant decrease in body weight in a time-dependent manner.

4. IPGTT

IPGTT was performed 2 weeks after transplantation. The 30-day group and DM group showed significantly higher area under the curve (AUC), and the normal group showed a significantly lower AUC in comparison to the 1-day group. No significant difference was observed in the AUC between the 1-day and 7-day groups. Moreover, the AUC in 30-day group was lower than that in DM group ($p < 0.05$).

5. Serum insulin and C-peptide

The 1-, 7- and 30-day groups showed higher serum insulin and C-peptide concentrations than the DM group ($p < 0.05$), and no significant differences were observed among the 1-, 7- and 30-day groups.

6. Histological findings

HE staining of the pancreas of recipient mice was performed in each group to check the regeneration of islets in STZ-induced diabetic mice. No intact islets were observed in the STZ-induced diabetic mice (DM, 1-, 7- and 30-day groups). In contrast, large islets with intact morphology were found in the normal group. These results indicated that the regeneration of islet did not happen in the STZ-induced diabetic mice. Insulin staining was performed in the MEI group (1-, 7- and 30-day groups) to confirm the surviving islets in the PVA MEI 4 weeks after transplantation. The islets in each MEI group were positive for insulin staining.

考察：

Although MEI in the 30-day group showed a slightly worse function *in vitro* in comparison to that seen in the 1-day group, and the recipient mice in the 30-day group did not achieve normoglycemia, there were still some therapeutic benefits with 30-day cryopreserved PVA MEI in comparison to the DM group *in vivo*. In fact, the survival rate of recipients 4 weeks after transplantation was 100% in the 30-day group and 17% in the DM group. The results of the NFBG, body weight and IPGTT in the 30-day group also showed apparent improvements from the DM group. In addition, the MEI in the 7-day group showed similar results to the 1-day group *in vitro* and *in vivo*. These results indicated that the immediate use of PVA MEI after 1 day freezing is not mandatory, furthermore, 7 days is sufficient for islet accumulation for transplantation, islet shipping worldwide and an evaluation of islet quality before transplantation. These results lead us to conclude the use of PVA MEI therefore appears to be an effective modality which can be used for clinical islet transplantation in the near future.

結論：

Long-term cryopreserved PVA MEI showed similar effects to the original PVA MEI (1-day group) both *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that the PVA MEI have advantages over other MEI which may therefore make it possible to overcome the obstacles of insufficient donors and the side effects of immuno-suppressive drugs, because the encapsulation process with cryopreservation technique allows islet accumulation, as well as the shipping and quality control in the field of islet transplantation. Therefore, the use of PVA MEI appears to be an effective modality for improving clinical DM therapy.

参考文献：

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free

immunosuppressive regimen. N Engl J Med 2000;343:230-8.

2. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, et al. Cryopreservation of human pancreatic islets from non-heart-beating donors using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants. Cell Transplant. 2008; 17: 61-7.

注： 本研究は、2009年11月6日 「The 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreas Society」にてポスター発表、「Biomaterials」(In Press)に掲載。

作成日：2010年3月1日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2010 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 王 麗楊

指導責任者名： 米田 俊之

所属部署名：

職名：特任研究員

阪大・歯学研究科・生化学

所在地：大阪府吹田市山田丘 1-8

電話：06-6879-2887

内線：2887



1. 助成金額： 600000 円

2. 研究テーマ

前立腺がんの造骨性骨転移のメカニズム解明

3. 成果の概要 前立腺癌は高頻度に造骨性骨転移を示す。癌遺伝子 STAT3

の恒常的活性化によるレプチンの産生増加は自己/傍分泌性に前立腺癌の造骨

性増大に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・㊦(学会名・演題)

第 27 回日本骨代謝学会 ヒト前立腺癌細胞 LNCaP における STAT3 の活性化は
26th naito confrence レプチンの産生増加を介して造骨性骨転移を促進する

第 31 回米国骨代謝学会 (ASBMR) **STAT3 causes osteoblastic bone metastases
in the LNCaP human prostate cancer cells through promoting leptin production.**

(2) 発表した論文 ㊦・有(雑誌名・題名)

前立腺がんの造骨性骨転移のメカニズム解明

研究者 氏名	王 麗楊
中国所属機関	中国医科大学
日本研究機関	大阪大学歯学研究科
指導責任者	教授 米田 俊之
共同 研究者	相野 誠

要旨

近年日本の男性において急増している前立腺がんは死亡率の第 2 位にランクされている。80%以上の前立腺癌は造骨性の骨転移を示し、患者の QOL および生存期間を著しく低下させる。前立腺がん発生のメカニズムには未だ不明な点が多く、それらを解明するために、動物モデルの確立は不可欠だ。しかしながら、そのような動物モデルはまだ開発されていない。そこで、われわれはまず前立腺の造骨性骨転移の動物モデルの確立を試みた。様々な実験を行った結果、ヒト前立腺がん細胞 LNCaP に恒常的活性化型 STAT3 を過剰発現させた LNCaP/caStat3 細胞を樹立した。この細胞をオスヌードマウスに心注すると、造骨性の骨転移が見られた。したがって、STAT3 の恒常的活性化は前立腺癌の造骨性骨転移を惹起させることが明らかとなった。STAT3 はガン遺伝子であり、恒常的活性化と前立腺がんの悪性度、あるいは転移能との関連がすでに報告されている。前立腺がん発生のメカニズムには未だ不明な点が多いが、危険因子として肥満が知られている。本研究では、前立腺癌の造骨性骨転移における Stat3、ならびに肥満原因遺伝子の一つであるレプチンの関与について検討した。がん遺伝子 Stat3 の恒常的活性化によるレプチンの産生増加が前立腺がんの造骨性骨転移の成立、進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。また本研究により肥満と前立腺がん発生との関連の分子基盤の一端が明らかとなった。

Key words 前立腺ガン, 骨転移, 肥満, レプチン, STAT3

緒言:

近年男性において、急増している前立腺がんは 80%以上が造骨性の骨転移を示し、患者の QOL および生存期間を著しく低下させる。前立腺がん発生のメカニズムには未だ不明な点が多いですが、危険因子として肥満が知られている。前立腺がん患者の血中 leptin が増加していること、また高濃度のレプチンは前立腺癌の進展に関与すること、さらに、ヒト前立腺癌に leptin 受容体が発現することが報告された。一方、leptin の下流因子である STAT3 はがん遺伝子であり、恒常的活性化と前立腺がんの悪性度、あるいは転移能との関連が示唆されている。そこで本研究では前立腺がんの造骨性骨転移にお

ける leptin および STAT3 の役割を検討した。

対象と方法:

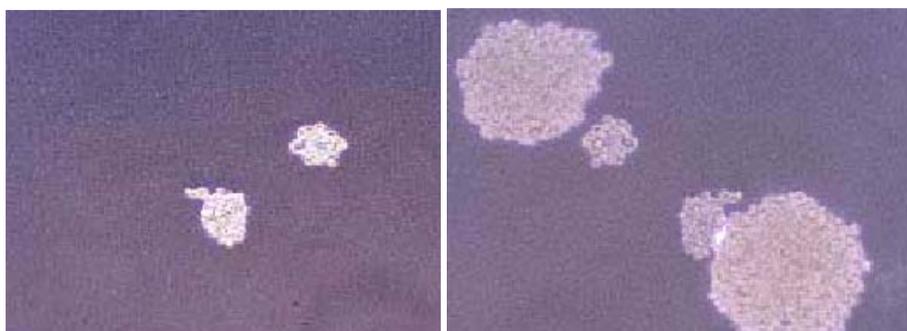
1. 最初の実験として、LNCaP 細胞における leptin signaling について検討した。
2. STAT3 の役割を詳細に検討するために、LNCaP に恒常的活性型 STAT3 を過剰発現させた LNCaP/caStat3 細胞を樹立し、皮下移植モデルと脛骨骨髓内移植モデルを作成した。
3. LNCaP/caStat3 細胞から産出するレプチンは造骨性増大に関与するかどうか、また leptin は autocrine 増殖因子であるかどうかについて、検討した。
4. レプチンの造骨性増大の促進するメカニズムを検討するために、ヒト顎骨細胞由来、初代培養骨芽細胞様細胞である HAOB 細胞を樹立した。

結果:

1. leptin は stat3 のリン酸化を時間依存的に促進した。この結果より、LNCaP 細胞は、機能的な leptin 受容体を有していることが示唆された。また、leptin は LNCaP 細胞の増殖を促進した。さらにこの効果は STAT3 の阻害剤 AG490 により、抑制された。
2. LNCaP/Stat3 細胞は、高い増殖能を示し、またオスヌードマウスの皮下に移植すると、腫瘍形成を認めした。一方 LNCaP/EV 細胞は腫瘍原性を示していなかった。さらに脛骨骨髓に注入すると、腫瘍の造骨性増大を呈した。一方 LNCaP/EV 細胞はこの効果を示していなかった。
3. LNCaP/Stat3 担癌動物においては、血中の人 leptin 濃度が著名に上昇していた。それに一致して、骨内で増大する LNCaP 腫瘍は leptin 受容体発現が増加していた。また MicroArray 法によっても LNCaP/caSTAT3 細胞の leptin 受容体の発現増加が確認された。
4. LNCaP/caStat3 細胞は骨髓中で、著名な造骨性増大を示したが、leptin 中和抗体処理により、この効果は阻害された。
5. さらにレプチンアンタゴニスト及び中和抗体は LNCaP/caStat3 細胞の増殖を抑制した。したがって、レプチンは前立腺がんにおいて autocrine growth factor であることが示唆された。
6. LNCaP/caStat3 の培養上清は、HAOB 細胞の分化及び石灰化を促進した。これらの効果はレプチンアンタゴニストの添加により消失した。
7. leptin は LNCaP/caStat3 培養上清と同様に HAOB の分化を促進した。
8. このようなレプチンの作用の分子メカニズムを検討した結果、leptin は STAT3 及び ERK のリン酸化を促進することが、western 法や免疫蛍光法により、示された。
9. さらに、STAT3 の inhibitor AG490 および ERK の inhibitor U0126 は、leptin により増強された HAOB 細胞のアルカリホスファターゼ活性を抑制した。以上の結果より、leptin による STAT3 及び ERK の活性化が骨芽細胞の分化に密接に関与することが示唆された。

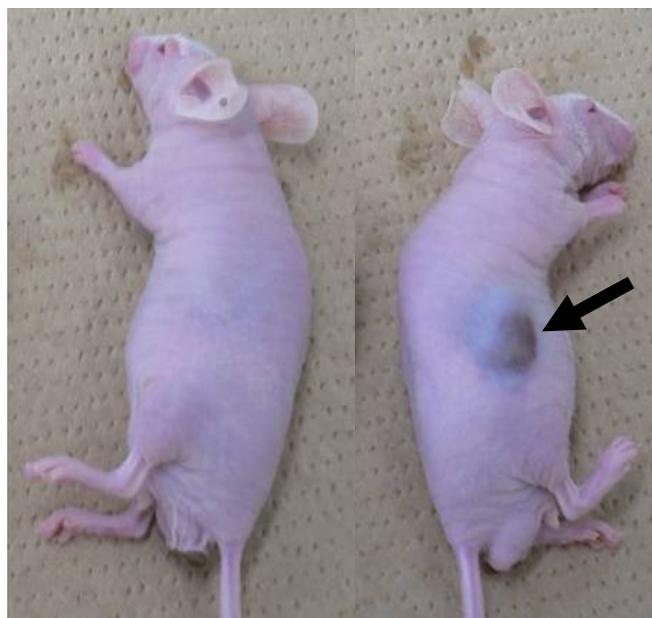
考察:

ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞において、がん遺伝子 Stat3 の恒常的活性化はレプチン産生およびレプチン受容体の発現増加を誘導することがわかった。leptin は autocrine 因子として前立腺癌細胞の増殖を促進し、一方 paracrine 因子として骨芽細胞の分化を促進することにより、前立腺がんの造骨性増大の成立、進展に重要な役割を果たしていると考えられる。STAT3 および ERK の活性化はレプチンの骨芽細胞調節機構に関わることが明らかとなった。また本研究により肥満に伴う血中 leptin 濃度の上昇は、前立腺がんの造骨性増大を促進することが示唆され、したがって肥満と前立腺がん発生との関連の一端が示唆された。



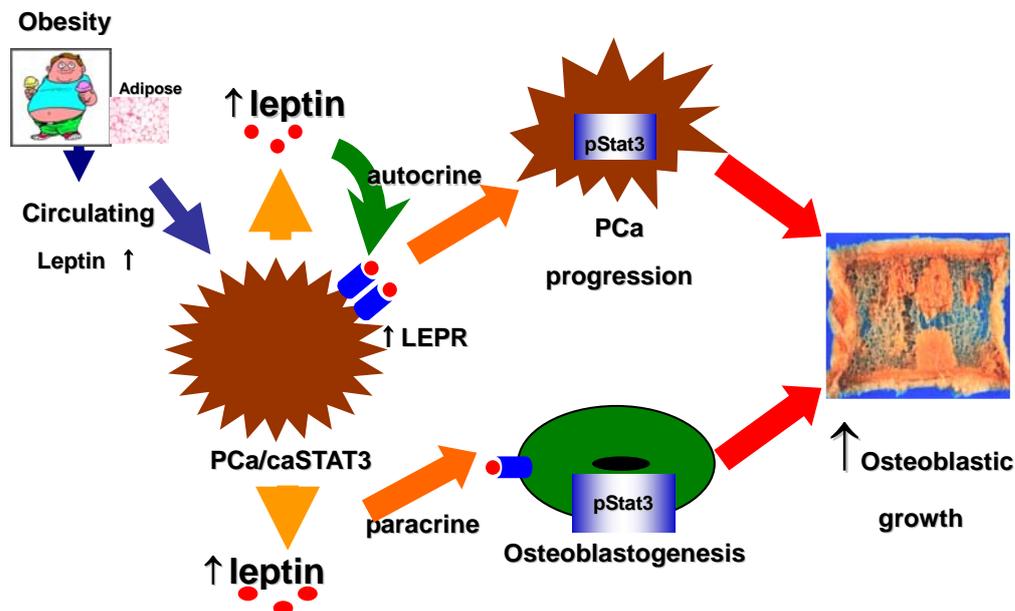
EV

caSTAT3



EV

caSTAT3



参考文献:

1. Abdulghani J et al., Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer. Am J Pathol. 2008 172:1717-28.
2. Sharma D et al., Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. Endocr Relat Cancer. 2006 13:629-40.
3. Baillargeon J et al., Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 15:1331-5.
4. Gade-Andavolu R et al., Molecular interactions of leptin and prostate cancer. Cancer J. 2006; 12:201-6.
5. Handschin AE et al., Leptin increases extracellular matrix mineralization of human osteoblasts from heterotopic ossification and normal bone. Ann Plast Surg. 2007;59:329-33.

注: 本研究は、2009年7月25日<第27回日本骨代謝学会>にて口演発;
2009年9月13日<第31回米国骨代謝学会(ASBMR)>にて口演
発表 2009年11月6日<第26回Naito学会>にてポスター発表

作成日:2010年3月9日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2009 年 6 月 25 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 森 山 紀 之 

所属機関名：国立がんセンター

所属部署名：がん予防・検診研究センター

職名：がん予防・検診研究センター長

所 在 地：東京都中央区築地 5-1-1

電 話：03-3542-2511

内線：3437

1. 助成金額：100,000 円

2. 会議テーマ

第 32 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会

3. 会議の概要

本学術集会は 2009 年 5 月 28 日、29 日に品川プリンスホテルにて 2 千余名の

医師の参加で行われ、呼吸器内視鏡に関する研究発表が行われた。

李教授は中国における気管支異物の講演をされ、日本人研究者に裨益する

ところ極めて大であった。

4. 被招聘者概要

1. 被招聘者氏名： 李时悦

職名：医師

所属機関名：広州医学院第一附属医院

部署名：呼吸器科

2. 被招聘者氏名：

職名：

所属機関名：

部署名：

3. 被招聘者氏名：

職名：

所属機関名：

部署名：

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

平成 21 年 11 月 29 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 武田 卓
所属機関名：東北大学大学院医学系研究科
所属部署名：先進漢方治療医学 職名：准教授
所 在 地：仙台市青葉区星陵町 1-1
電 話：022-717-7254 内線：



1. 助成金額：100,000 円

2. 会議テーマ

中国の中西結合医学

3. 会議の概要

中国における、中医学と西洋医学の交流（中世医結合）についての最新の
情報提供と、スウェーデンのカロリンスカ研究所との協同研究について

4. 被招聘者概要

- | | |
|---------------|-------------|
| 1. 被招聘者氏名： 陳強 | 職名：教授 |
| 所属機関名： 南開大学 | 部署名：生命科学研究院 |
| 2. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |
| 3. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2010 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名：戴 昭宇

所属機関名：東京有明医療大学

所属部署名：保健医療学部鍼灸
学科

所在地：東京都江東区有明 2-9-1

電話：03-6703-7049


職名：准教授

内線

1. 助成金額： 300,000 円

2. 会議テーマ

シンポジウム 日中伝統医学における診断の最前線

3. 会議の概要

貴財団より助成金を頂き、中国側の中華中医薬学会中医診断分会および日本側の東京臨床中医学研究会、NPO 法人日中健康科学会ならびに在日中国科学技術者連盟医薬協会との間で斡旋し、諸団体の共催又は後援のもと、2010 年 3 月 7 日東京医科歯科大学歯学部第一講義室にて同シンポジウムを開催した。中華中医薬学会中医診断分会から 11 人の交流団を組んで頂き、中に助成金を頂いた 3 人の演者(それぞれに北京・上海・天津中医薬大学に所属する中医診断学の専門家)が含まれている。当日の参加者が 80 人に迫り、ホットな交流となった。会議の詳細は抄録集にご参照頂きたいですが、被招聘者らと前記の諸団体から貴財団の助成を高く評価し謝意を表れています。

4. 被招聘者概要

1. 被招聘者氏名：王 天芳

所属機関名：北京中医薬大学基礎医学院

職名：主任、教授

部署名：中医診断系

2. 被招聘者氏名：王 億勤

所属機関名：上海中医薬大学基礎医学院

職名：主任、教授

部署名：証候研究室

3. 被招聘者氏名：陸 小左

所属機関名：天津中医薬大学

職名：学院長、教授

部署名：中医薬工程学院