

2010年度 共同研究等助成事業報告集

財団法人 日中医学協会

2010年度共同研究等助成事業報告集目次

1. 調査・共同研究

廣島 健三	浙江省余姚市において多発する中皮腫症例の臨床病理学的検討および石綿曝露の解析・・・・・・・・・・・・・・・・	1
太田 伸生	中国の日本住血吸虫症流行地に分布する中間宿主貝に対する住血吸虫の感受性の地理的特異性に関する研究・・・・・・・・	7
喬 善楼	脱共役タンパク質UCP2を標的にした大腸癌漢方治療法の研究・・	12
秋山 泰身	自己免疫疾患の抑制に必須な胸腺環境とT細胞の分化制御・・	18
高島 成二	エネルギー代謝関連酵素の心疾患における役割解明・治療への応用・・・・・・・・	23
顧 艶紅	中国神経管閉鎖障害高発地域における繰り返し流産する女性の甲状腺機能を含むヨード代謝及び葉酸代謝に関する研究・・・・・・・・	28
加藤 直也	C型肝炎ウイルスコア蛋白変異と発癌および抗ウイルス治療効果	32
近藤 格	プロテオーム解析による肝細胞癌の病態解明に基づく個別化医療実現のための新規診断技術の開発および創薬シーズの探索・・	37
下野 勉	妊婦および乳幼児歯科保健に関する研究・・・・・・・・	42
吉成 正雄	チタン表面改質による即時荷重インプラントシステムの開発・・	47
唐 寧	中国上海における多環芳香族炭化水素／ニトロ多環芳香族炭化水素の大気汚染と生殖発生毒性との関連に関する基礎研究・・	52
藤井 聡	早期動脈硬化症に特異的変動を示し血管病変を効率よく評価しうる新規マイクロRNAバイオマーカーの同定と日本人・中国人での比較・・・・・・・・	57
呉 小玉	過剰介護予防を焦点にした主介護者のエンパワーメントと要介護者の日常生活動作との関連性に関する日中の比較・・・・・・・・	62

2. 中国人研究者・技術者招聘

新正由紀子	先天性難聴児の新生児聴覚スクリーニングの効果に関する比較研究	70
真部 淳	小児の骨髄異形成症候群(MDS)の診断と治療	72
裏出 良博	アデノシンA2A受容体の睡眠調節の役割	76

3. 在留中国人研究者

王 紅霞	医療への応用に最適化されたチャンネルロドプシンの開発	82
王 喆	薬剤耐性ウイルス出現における自然免疫効果分子APOBECの役割	87
呼和哈斯	サイログロブリン(Tg)が持つ細胞増殖遺伝子発現調節機能を担う活性部位の同定	91
石 秀玉	Dravet症候群患者におけるmodifier遺伝子異常	98
李 賓	子宮筋腫細胞増殖・線維化における低酸素細胞内シグナル伝達機構解析	103
謝 琳	既存抗体陽性移植の克服および臓器移植後新規抗体産生機序の解明とその制御に関する研究	108
王 霜	インターロイキン11(IL-11)による骨シアロタンパク質の転写調節	115
周 鑫	分裂酵母におけるRan GTPase新規変異体の単離と解析	119

4. トラベルグラント

真柳 誠	第2回日中韓医史学会合同シンポジウム	125
平馬 直樹	日本中医学会設立記念シンポジウム	126

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 3 月 7 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：廣島 健三

所属機関名：東京女子医科大学八千代医療センター

所属部署名：病理診断科

職名：教授

所 在 地：千葉県八千代市大和田新田 477-96

電 話：047-450-6000

内線：7063



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

浙江省余姚市において多発する中皮腫症例の臨床病理学的検討および石綿曝露の解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：廣島 健三

職名：教授

所属機関名：東京女子医科大学八千代医療センター

部署名：病理診断科

中国側研究者氏名：高 志斌

職名：主任

所属機関名：浙江省余姚市人民医院

部署名：病理科

4. 当該研究における発表論文等

2011 年 2 月 23 日現在 なし

浙江省余姚市において多発する中皮腫症例の臨床病理学的検討および石綿曝露の解析

日本側研究者代表 廣島 健三

所属機関 東京女子医科大学八千代医療センター病理診断科 教授

中国側研究者代表 高 志斌

所属機関 浙江省余姚市人民医院病理科 主任

要 旨

浙江省寧波近辺では石綿加工業が 1958 年から始まり、1970 年代にクリソタイルの原石を手紡績でほぐしたり、石綿紡績に従事する者が大勢いた。森永らの 1997 年と 2007 年の調査で、胸膜プラーク、石綿肺、石綿肺癌が増えていることが分かったが、中皮腫はみられなかった。2008 年になって、浙江省余姚市人民医院において中皮腫と診断されている症例が多数いるとの情報を得て、同院を訪問し、中皮腫症例を確認した。本研究では、同院を再訪問し、過去 6 年間に中皮腫と診断された 37 例の生検標本の組織ブロックを貸借し、日本で免疫染色を行い、病理診断の妥当性を再評価した。その結果、腹膜中皮腫の 80%、胸膜中皮腫の 47%が中皮腫と診断できた。腹膜中皮腫は全員女性で、胸膜中皮腫も男女比は 1:2.4 で女性が多かった。今回検討した症例の多くは、かつて手紡績に従事した症例であった。また、家庭内で曝露した症例や、工場の周辺に居住していたために発症したと推測される症例もみられた。予後は不良なものが多かったが、化学療法により 3 年以上生存している胸膜中皮腫症例も存在した。また、腹部の手術で偶然に見つかった腹膜中皮腫症例が 2 例含まれていた。同地域では、現在も中皮腫症例は増えている。胸腔鏡の導入による胸膜中皮腫の早期診断、早期治療により予後の改善が期待できる。また、早期の腹膜中皮腫症例が見つかってきており、その組織学的特徴を解析することにより、腹膜中皮腫発生の機序を解明できる。

緒 言：

浙江省寧波近辺では石綿加工業が 1958 年から始まり、1970 年代にクリソタイルの原石を手紡績でほぐしたり、石綿紡績に従事する者が大勢いた。森永らは、1997 年と 2007 年に寧波地区の慈溪市の住民を対象に胸部レントゲン検査を行った。その結果、1997 年に胸膜プラークを 1.3%に、石綿肺を 0.4%に認め、2007 年には胸膜プラークを 32%に、石綿肺を 9%に認めた。肺癌症例もみられたが、中皮腫はみられなかった^{1,2}。廣島と森永は、2008 年に、余姚市人民医院を訪問し、同院において女性の腹膜中皮腫が 4 年間で 20 件以上診断されていることを確認した。しかし、腹膜中皮腫の診断は困難なことが多く、女性の腹膜中皮腫の場合、正診率は約 22%であると報告されているため³、再評価が必要である。一方、2009 年の第 2 回日中共同石綿シンポジウムで、余姚市人民医院の張継賢（呼吸器内科医）は、1999 年から 2008 年の間に同医院で診断された胸膜中皮腫 27 例の検討結果を発表した。本研究では、余姚市人民医院の腹膜および胸膜中皮腫症例の標本を用いて種々の免疫染色を行うことにより中皮腫の診断を確定する。

Key Words 中皮腫、石綿、手紡績、余姚市、免疫染色

対象と方法：

2004 年から 2010 年 8 月までに余姚市人民医院で中皮腫と診断された症例は 37 例あり、腹膜中皮腫と診断さ

れた症例は20例、胸膜中皮腫と診断された症例は17例である。腹膜中皮腫と診断された症例は、全員女性で、年齢は43歳から71歳で平均52.1歳、胸膜中皮腫と診断された症例は、男性5例、女性12例で、年齢は38歳から85歳で平均60.6歳である。

広島と森永は2010年5月に余姚市人民医院を訪問し、これらの症例のブロックを貸借し、東京女子医科大学で再薄切し、HE染色と免疫染色を行った。用いた抗体名、希釈倍率、賦活化を表1に示す。

表1. 使用した抗体

抗体名	メーカー	希釈倍率	賦活化
CKAE1/AE3	DAKO	1:500	0.1%トリプシン 37度 30分
CAM5.2	Becton	希釈済み	なし
Calretinin	DAKO	1:100	MW クエン酸 Buffer(pH6.0) 40分
WT1	DAKO	1:400	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
D2-40	COVANCE	1:200	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
CEA	DAKO	1:100	なし
BerEP4	DAKO	1:50	0.05%プロテアーゼ 室温 10分
MOC31	DAKO	1:100	MW クエン酸 Buffer(pH6.0) 40分
ER	DAKO	1:100	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
PgR	DAKO	1:500	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
TTF-1	DAKO	1:200	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分

2010年12月に、再度、余姚市人民医院を訪問し、臨床病理検討会を行った。臨床病理検討会には、日本側からは広島（病理学）、森永（疫学および産業医学）が参加し、中国側からは余姚市人民医院の高志斌（病理学）、その他の病理医、吴晓东（呼吸器内科）、張継賢（呼吸器内科）、その他の呼吸器内科医、婦人科医、放射線科医、浙江省医学科学院の張幸（院長）が参加した。中国側の医師が臨床経過、石綿曝露歴、レントゲン所見、手術所見を説明したのちに、広島が病理所見を発表した。この検討会ののち、検討症例をcategory 1から5に分類した。中皮腫でないとは診断できる症例をcategory 1、中皮腫らしくない症例をcategory 2、中皮腫の可能性はあるが、中皮腫ではない可能性もある症例をcategory 3、中皮腫らしい症例をcategory 4、確実に中皮腫と診断できる症例をcategory 5とした。

結 果：

症例のまとめを表2、3に示す。

腹膜中皮腫と診断された症例は、category 1が3例、category 2はなく、category 3が1例、category 4が4例、category 5が12例であった。中皮腫と診断できるcategory 4あるいは5は20例中16例（80%）であった。中皮腫と診断した症例の組織型は上皮型が12例、二相型が4例であった。

胸膜中皮腫と診断された症例は、category 1が3例、category 2が2例、category 3が4例、category 4が1例、category 5が7例であった。中皮腫と診断できるcategory 4あるいは5は17例中8例（47%）であった。中皮腫と診断した症例の組織型は上皮型が6例、二相型が1例、肉腫型が1例であった。

代表的な症例を示す。

（症例PE04）44歳の女性で、職業的な石綿曝露歴はないが、石綿を使用する石綿紡績加工を行う工場の周辺に居住していた。開腹による腹膜生検により上皮型中皮腫と診断され、上海大学で治療を受けるために転院をした。組織学的に、好酸性の細胞質を有する細胞が管状乳頭状構造を示して脂肪組織に浸潤をしている。免疫染色はcalretinin(+), WT1(-), D2-40(+), CEA(-), BerEP4(-), MOC31(-), ER(-), PgR(-)であり、category 5、上皮型中皮腫と診断した（図1）。

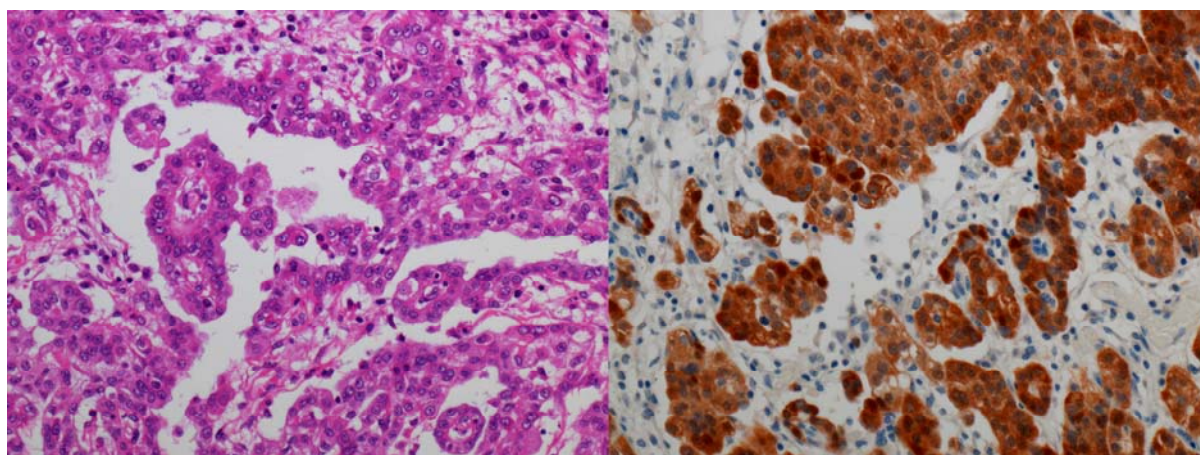


図1. HE 染色 (左) および免疫染色(calretinin) (右) (症例 PE04)

表2. 腹膜中皮腫と診断されていた症例

症例	年齢	性別	レントゲン所見	臨床経過	職業	暴露期間 (年)	Category	組織型
PE01	49	女	フィルムなし		手紡績	7 年	4	E
PE02	50	女	フィルムなし	腹水, 子宮に接して腫瘍	手紡績	8 年	1	
PE03	68	女			手紡績	10-12 年	5	B
PE04	44	女	フィルムなし	上海大学に転院	環境暴露		5	E
PE05	47	女	フィルムなし	上海大学に転院	不詳		5	E
PE06	71	女	PQ. 腸間膜の肥厚, 腫瘍なし.	腸間膜はもち状, 横隔膜上に結節. 5 か月後に死亡.	手紡績	10 年	5	E
PE07	48	女					1	
PE08	47	女	フィルムなし	他院で診断され, 治療のために受診. 2 か月後に死亡.	手紡績	4-5 年	5	B
PE09	52	女	フィルムなし	11 か月後に死亡.	手紡績	5-8 年	5	E
PE10	47	女		15 か月後に死亡.	手紡績	1-2 年	4	E
PE11	50	女	腸間膜の肥厚, AS. 腫瘍なし.	便秘. 6 か月後に死亡.	手紡績	5 年	3	
PE12	44	女	PQ. AS, 腫瘍あり.	広範に腫瘍を認め, 試験開腹. 1-2 週後に死亡.	手紡績		4	E
PE13	55	女		腹水. 化学療法を行ったが, 腹水は減少しなかった.	手紡績	10 数年	5	E
PE14	58	女	胸部に SCLS. 腸間膜の肥厚.		手紡績	12 年	5	E
PE15	51	女		胆嚢摘出術中に胆嚢表面に結節.	手紡績	10 数年	5	E
PE16	56	女	フィルムなし	子宮摘出術中に卵巣表面に結節. 他院に転院.	手紡績	5-7 年	4	E
PE17	55	女		腹痛			1	
PE18	43	女	PQ なし. AS.	腹痛. 経過観察中.	手紡績	4-5 年	5	B
PE19	48	女	フィルムなし	腹痛. 腹水. 腸間膜はもち状. 経過観察中.	手紡績	10 年	5	B
PE20	48	女	PQ. 腸間膜肥厚. AS (少量)	下腹部痛. 上海大学に転院.	環境暴露		5	E

E, 上皮型; B, 二相型; PQ, 胸膜プラーク; AS, 腹水; SCLS, subpleural curve linear shadow.

表 3. 胸膜中皮腫と診断されていた症例

症例	年齢	性別	レントゲン所見	臨床経過	職業	暴露期間 (年)	Cate gory	組織型
PL01	63	女	フィルムなし		不詳		1	
PL02	38	女	びまん性胸膜肥厚. PE.	呼吸困難. 上海大学に転院. 1年後に死亡.	家庭内暴露		5	E
PL03	59	女			なし		3	
PL04	65	女	胸膜肥厚. PE.		手紡績	8 年	5	E
PL05	71	男					3	
PL06	42	女	フィルムなし		手紡績	10 年	5	E
PL07	47	女	胸膜の不整結節. PE.	死亡	手紡績	7-8 年	5	E
PL08	69	男	フィルムなし		不詳		3	
PL09	61	男					1	
PL10	60	女	PQ. 限局性の胸膜腫瘍. PE. リンパ節腫大.	上海大学に転院. 化学療法を 8 コース施行. 経過観察中.	手紡績	暴露期間 不詳	4	B
PL11	49	男	PQ. PE. 胸膜肥厚なし.	上海大学に転院. 生存.	家庭内暴露		1	
PL12	60	女	胸膜肥厚. PE. PQ なし.		手紡績	7 年	5	E
PL13	74	男	PQ. PE. 右胸壁の限局性腫瘍. 肋骨浸潤.		石綿工	5 年	3	
PL14	58	女	胸膜肥厚. 左下葉の腫瘍.	臨床的に肺癌	手紡績	10 年	2	
PL15	82	女	左胸膜肥厚. 左胸膜に石灰化.	咳嗽, 呼吸困難, 持続する発熱. 3 か月後に死亡.	手紡績	20 年以上	5	S
PL16	67	女	胸膜肥厚.	3 か月後に死亡.	手紡績	11 年	5	E
PL17	85	女					2	

E, 上皮型; B, 二相型; S, 肉腫型; PQ, 胸膜ブランク; PE, 胸水.

考 察:

中皮腫は組織学的特徴により上皮型と肉腫型および両者が混在する二相型に分類される. 上皮型の腫瘍細胞は類円形の核を有し, 核の大小不同は比較的乏しく, 細胞質は好酸性である. 核分裂像や壊死は稀である. これらの腫瘍細胞は乳頭状にあるいは管腔を形成して増殖し, 充実性増殖もみられる. 肉腫型は紡錐形の異型細胞が花むしろ状に, あるいは特定のパターンを示さずに増殖する.

中皮腫は癌腫との鑑別が難しい. そこで, 免疫染色により, 中皮腫の陽性マーカー, 陰性マーカーを検討し, 中皮由来の腫瘍であることを確認する必要がある. 陽性マーカーとしては, calretinin, WT1, D2-40 を用い, 陰性マーカーとしては CEA, MOC-31, Ber-EP4 などを用いる. 腹膜中皮腫と腹膜あるいは卵巣の漿液性腺癌の鑑別においては, ER, PgR は有用である. 腹膜及び卵巣の漿液性腺癌では ER, PgR が陽性で calretinin は陰性であるのに対して, 腹膜中皮腫では, calretinin が陽性で ER, PgR は陰性である.

肉腫型は免疫染色による中皮腫の陽性マーカーがしばしば陰性であるため, 診断は上皮型よりも難しい. 肉腫型中皮腫では, CK AE1/AE3 は 77%で陽性, calretinin は 39%で陽性, thrombomodulin と CK 5/6 は 29%で陽性であると報告されている⁴.

本研究では, 余姚市人民医院で中皮腫と診断された症例の標本を用いて, 診断の再検討を行った. 中皮腫は組織学的な特徴があるが, 免疫染色の結果, 腹膜中皮腫と診断された症例の 80%, 胸膜中皮腫と診断された症例の 47%が中皮腫と診断できた. 胸膜中皮腫の正診率が低い理由は, 経皮的生検で診断をしているため標本が小さく, 十分病理学的な検討ができないことによる. 胸腔鏡を用いた胸膜生検で大きな標本を採取することにより, 正診率が向上すると考えられる.

今回検討した症例は, 男性 5 例, 女性 32 例で, 男女比は 1:6.4 であり, 女性が多く含まれることが特徴である. 今回検討した症例のうち, 19 名 (51%) は手紡績に従事した女性であった. また, 石綿加工業が行われて

いた地域に居住していたため、環境曝露により発症したと考えられる症例が2例、家庭内手紡績で曝露したと考えられる症例が2例含まれていた。

検討した中皮腫症例は、診断されてから数か月から1年で死亡しており、一般的な中皮腫と同様に予後が不良であった。しかし、早期の腹膜中皮腫と考えられる症例も2例含まれていた。一例は胆嚢摘出術を行った時に胆嚢表面に不整な小結節を認め(PE15)、他の一例は子宮摘出術を行った時に卵巣表面に不整な小結節を認めた(PE16)。いずれも、病変は限局をしており、化学療法を加えることにより、良好な予後が期待できる。また、胸膜中皮腫のうち一例(PL10)は上海大学で化学療法を受け、3年間生存をしている。中皮腫でも化学療法が奏功し、長期間生存する症例があることを示す。また、胸膜中皮腫と診断された症例のうち一例(PL11)は、胸水を認めるが、胸膜肥厚がなく、病理学的には category 1 であり、3年間生存をしていることから、良性石綿胸水であると考えられる。良性石綿胸水は中皮腫との鑑別に重要であり、今後も症例が増えることが予測される。

現在も同院では中皮腫症例は増えており、胸膜中皮腫は胸腔鏡を用いた早期診断、早期治療が必要である。また、腹膜中皮腫の早期病変が含まれていることから、このような症例を詳細に検討することにより、中皮腫発生の機序が解明されることが期待される。

参考文献：

1. 森永謙二，張幸. 浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者の健康影響調査. 日中医学 1998;13:14.
2. 森永謙二，張幸. 浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者のコホート調査. 日中医学 2008;23:46.
3. Takeshima Y, et al. Accuracy of pathological diagnosis of mesothelioma cases in Japan: clinicopathological analysis of 382 cases. Lung Cancer 2009;66:191-7.
4. Attanoos RL, et al. Anti-mesothelial markers in sarcomatoid mesothelioma and other spindle cell neoplasms. Histopathology 2000;37:224-31.

作成日：2011年2月23日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011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： 太 田 伸 生

所属機関名：東京医科歯科大学

所属部署名：大学院医歯学総合研究科

所 在 地：東京都文京区湯島 1-5-4 5

電 話：03-5803-5191

内線：



職名：教授

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

中国の日本住血吸虫症流行地に分布する中間宿主貝に対する住血吸虫の感染感受性の地理的特異性に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 太田伸生

職名： 教授

所属機関名：東京医科歯科大学

部署名：大学院医歯学総合研究科

中国側研究者氏名： 陸 紹紅

職名：副所長（教授）

所属機関名：浙江省医学アカデミー

部署名：寄生虫病研究所

4. 当該研究における発表論文等

Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R et al. Schistosomicidal and anti-fecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89.

Parasitol Int, 2011, 印刷中

中国の日本住血吸虫症流行地に分布する中間宿主貝に対する住血吸虫の感受性の地理的特異性に関する研究

研究者氏名 太田伸生

所属機関 東京医科歯科大学大学院

国際環境寄生虫病学分野・教授

共同研究者 陸 紹紅、聞 礼永、汪 天平

下河原理江子、熊谷 貴、二瓶直子、斎藤康秀

要旨

日本住血吸虫症の日本国内での流行は終息したが、今日でも中国揚子江流域とフィリピンなど地理的に隔離されて流行地が散在する。住血吸虫は中間宿主である貝とヒトを含む哺乳動物宿主で生活史が成立するが、異なった流行地の貝と住血吸虫との間での感染が成立するかは十分に解明されていない。日本では患者発生はないが中間宿主貝が存在する状況下で、外国から住血吸虫が持ち込まれるリスクを評価するための情報が十分でない。本研究ではアジア域内で住血吸虫または中間宿主貝の移動が発生した場合のリスク評価の資料として、中国、フィリピンまたは日本産の中間宿主貝が異なる流行地の住血吸虫に如何なる感染感受性を示すかを比較検討した。中間宿主貝である *Oncomelania hupensis* とその亜種に対する日本および中国株日本住血吸虫の感染効率を PCR と LAMP 法による遺伝子検出により調べた。その結果、日本株の *O.h.nosophora* は日本と中国の住血吸虫の感染を受容するのに対して、中国の *Oncomelania* 属貝は検討した何れの流行地の住血吸虫株に対しても感受性が低く、中間宿主貝の生体防御機能には大きな地理的特徴が認められた。本研究では貝の感染を従来よりも高い感度で検出する方法を応用することにより、精度の高い情報が得られた。モノの交流活性化に伴ってリスクが高くなる住血吸虫のアジア域内移動に対して、エビデンスに基づいたリスク評価を行うための基礎資料となると考えた。

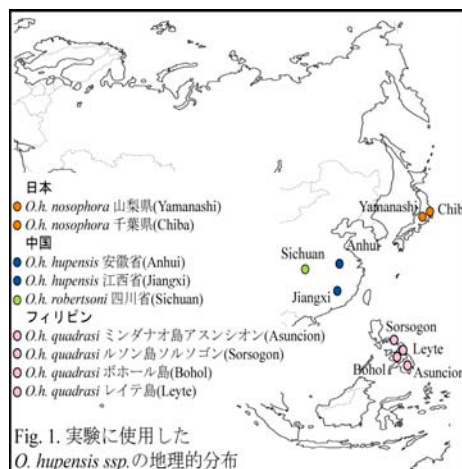
Key Words :日本住血吸虫 *Oncomelania*、感染感受性、LAMP 法、リスク評価

緒言

日本住血吸虫症は東アジアに流行地を抱える重要な熱帯感染症で、血管内寄生吸虫である日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* が原因となる寄生虫病である¹⁾。日本中間宿主とし、ヒトを含む哺乳動物を終卵が外界で孵化して幼虫が中間宿主貝にセルカリアとよぶ感染幼虫が水中で主体内では血管内で雌雄がペアを形成虫卵に対する宿主の免疫応答として

日本住血吸虫症は日本、中国、フィリピンが存在したが、日本では1996年には中国の揚子江流域と雲南省の一部、レイテ、パラワン島など、インドネシ

流行地である。日本住血吸虫の中間宿主 *Oncomelania hupensis* spp であり、その生息地は湿った草地である。日本ではミヤイリガイと呼ばれ (*Oh.nosophora*)、甲府盆地、備後平野、筑後平野などに分布して病気も流行していた。中国では *Oh. hupensis* と *Oh. robertsoni* が主に揚子江流域に生息し、特に前者が中国における主要な媒介者である。フィリピンでは *Oh. quadrasi* という小型の貝が媒介している。日本住血吸虫は一応一属一種とされるが、地理的に隔絶された環境下で、アジア域内相互に中間宿主貝と住血吸虫の組合せがどの程度厳密



住血吸虫は淡水産の巻き貝を中宿主とする生活史を形成する。虫に侵入し、一定の発育を遂げた後終宿主に経皮的に感染する。終宿して産卵し、毛細血管に塞栓した様々な病変が起こってくる。フィリピンおよびインドネシアに流公式に流行終息を宣言した。現在フィリピンのミンダナオ、ルソン、アのスラウェシ島の一部などが主は小型の淡水産巻き貝である

であるのかはよく判っていない。しかし、上記に示したように中間宿主貝は日本、中国、フィリピンそれぞれで別種（亜種）であるので、相互の地理的距離が住血吸虫-中間宿主貝の感受性に反映されていることも考えられる²⁾。日本国内で言えば、旧流行地である甲府と久留米とでは、それぞれの地理的分布に応じたミヤイリガイ株がその地域の住血吸虫だけを媒介するという報告もある。

経済発展が著しいアジア地域ではヒトとモノの交流が活発になり、様々な感染症の移動も容易になってきた。住血吸虫は生活史が複雑であるために流行域の移動は本来起こりにくいが、アジア域内に中間宿主貝の生息域が散在していることを考えると、流行地からヒトを含む終宿主が移動する事により病気発生地域の拡大も可能性を否定する根拠はない。日本では流行は終息したが、甲府盆地にはミヤイリガイの生息地域が散在し、対策事業の終息に伴って生息域はむしろ拡大している。中国から何らかの方法で寄生虫が持ち込まれた場合の流行再興について、リスク評価のためのエビデンスが得られていない。

中間宿主貝の住血吸虫幼虫に対する感受性は、古典的には有毛幼虫（ミラシジウム）の暴露後16週間を待ってヒトへの感染幼虫であるセルカリアの遊出の有無を確認して判定していた。しかし、この方法では時間がかかることに加えて、貝の中での発育経過を追う研究は不可能であった。当研究室ではPCRやLAMPによる寄生虫遺伝子の検出系を利用し、中間宿主の各地理的分離株の住血吸虫株に対する感受性を評価する方法を確立したので³⁾、本研究においてその応用により中間宿主株と日本住血吸虫の感受性を時間経過で追いながら評価し、日本住血吸虫症のアジア域内での拡散のリスク評価を試みた。

対象と方法

Oncomelania 属貝: 使用した中間宿主貝は山梨県産（山梨株）および千葉県産（木更津株）の *O. h. nosophora*、中国安徽省産（Tonglin 株）および Anqin 株）および江西省産（Jiangxi 株）の *O. h. hupensis*、中国四川省産（Sichuan 株）の *O. robertsoni*、およびフィリピン産の *O. quadrasi* を用いた。山梨株を除いて他はすべて、実験室内飼育貝を用いた。



日本住血吸虫: 日本住血吸虫は山梨株と中国安徽省株を用いた。ともに実験室内でマウスを用いて継代維持してきたものを用いた。

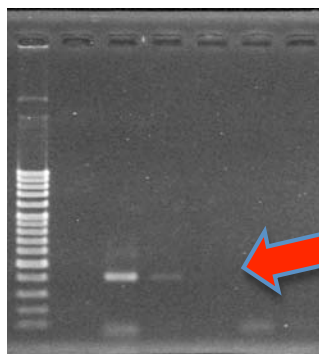
PCR法およびLAMP法: PCRとしては日本住血吸虫の28SリボソーマルDNAを標的として（GeneBank Accession# Z46504）*Oncomelania* 貝からの住血吸虫DNAの増幅を行った。396 bpのバンドの増幅を確認して感染を判定した。LAMP法には28SリボソーマルDNAのほかに *SjR2* (GeneBank Accession# AF412221) も用いて検討した。

住血吸虫感染検出: *Oncomelania* 貝を24穴プレートに1個ずつ加えてRPMI1640培地で満たしておき、そこに日本住血吸虫ミラシジウム20匹を添加した。顕微鏡で遊離しているミラシジウムがないことを確認して貝を別のプレートに移した。その24時間後以降、一定時間経過ごとに検出を行い、最終的には16週後のセルカリアの遊出まで追跡した。

(Sj:10pg 1pg 100fg DNA)

結果

貝からPCRによる住血吸虫感染の検出: 貝は殻ごと試験管した後PCRおよびLAMPに用いた。予備実験として行った検出DNAをテンプレートした場合は28SリボソーマルDNA検出を示した（右図）。LAMP法による検出の場合も同等の感度がこれをDNA量換算した場合、1匹のミラシジウムが存在する感染を検出できる事が確認された。一方、より高感度で検出としたLAMP測定だが⁴⁾、われわれの方法では全く検出がで



内で破碎し、DNA抽出を行うでは日本住血吸虫ゲノムの場合、100fgの検出感度を得られ（データ不提示）、る貝であれば、その検出できるとされた *SjR2* を標的せず、遺伝子検出のための

標的としては必ずしも至適の標的遺伝子とは考えられなかった。

ミラシジウムの貝への侵入効率：貝にミラシジウムを添加24時間後にPCR実施した場合、貝への侵入効率についてのデー

Habitat		Snail ssp	Sj Yamanashi		Sj Chinese	
			number of snails	Ratio *	number of snails	Ratio *
Japan	Yamanashi	<i>O.h.nosophora</i>	28/29	97%	6/12	50%
	Chiba		19/20	95%	0/10	0%
China	Anhui (Tongling)	<i>O.h.hupensis</i>	0/30	0%	3/13	23%
	Anhui (Anqing)		1/10	10%	0/10	0%
	Jiangxi		0/30	0%	3/12	25%
	Hunan		-	-	0/10	0%
	Sichuan	<i>O.h.robertsoni</i>	18/20	90%	-	-
Philippine	Luzon	<i>O.h.quadrasi</i>	13/20	65%	-	-
	Leyte		15/20	75%	-	-
	Bohol		11/20	55%	0/10	0%
	Mindanao		14/20	70%	0/10	0%

タが観察されると考えた。検討した結果、日本の住血吸虫は山梨株、木更津株の *Oh. nosophora* にほぼ 100% の侵入効率を示した一方、中国の *Oh. hupensis* にはほとんど侵入ができなかった。しかし、*Oh. robertsoni* の Sichuan 株には *Oh. nosophora* と同等の侵入を示し、中国の中間宿主貝でも亜種の異なる2種類の貝では住血吸虫の侵入感受性が異なることがわかった。日本産住血吸虫はフィリピンの貝に対しては中等度に侵入効率を示した (上表)。

一方、中国の日本住血吸虫はアジア域内全ての中間宿主貝に対して侵入効率が低く、同じ流行地の貝に対してでも 10-20% 程度の低い侵入効率しか示さなかった。フィリピンの貝に対しては日本の住血吸虫と同様に、中間レベルの侵入効率しか示さず、中国の寄生虫に対して高い侵入効率を許容する中間宿主貝は観察することができなかった。

中間宿主貝内での感染幼虫への発育：ミラシジウム暴露後16週待ってセルカリア遊出までの期間のフォローを幾つかの寄生

Habitat		Snail ssp	1Day	16Wks
			% *	% *
Japan	Yamanashi	<i>O.h.nosophora</i>	97%	67%
	Chiba		95%	ND
China	Anhui (Tongling)	<i>O.h.hupensis</i>	0%	0%
	Anhui (Anqing)		10%	5%
	Jiangxi		0%	ND
	Hunan		ND	ND
	Sichuan	<i>O.h.robertsoni</i>	90%	ND
Philippines	Luzon	<i>O.h.quadrasi</i>	65%	ND
	Leyte		75%	ND
	Bohol		55%	0%
	Mindanao		70%	0%

虫-中間宿主貝の組合せについて実施した。長期間の実験室内の貝飼育の困難性のために情報整理は困難であったが、可能な範囲で情報を整理した (左図)。最も注目した点は、Yamanashi 株の住血吸虫は Yamanashi 株の貝に16週後も高い感受性を示したのに対して、侵入効率では中等度の数値を示したフィリピン

の貝については、16週後ではセルカリア遊出が全く認められなかったことである。同様に高い侵入効率を示した千葉県産の貝や中国四川省の *Oh. robertsoni* での16週後までの発育効率の結論は残念ながら本報告の時点では得ることができなかった。少なくともミラシジウムの侵入と発育とが独立の規定機構を持っていることを示すデータであると考えた。一方、中国の貝に対しては日本産の住血吸虫の侵入効率が元々低かったが、侵入に成功したミラシジウムは感染幼虫まで発育可能であることが示唆

された。

考察

本研究では、日本住血吸虫ミラシジウムが、同じ *Oncomelania* 属の中間宿主貝であっても異なった感染感受性を示すことを明らかにすることができた。最も注目した所見は、日本の中間宿主貝がアジア域内の多くの寄生虫株に対して比較的高い感受性を示した一方で、中国揚子江流域に生息する中間宿主貝は恐らく物理的バリアも含めて、住血吸虫の侵入を許容しない事が推測された点である。さらに、侵入効率という観点からは、日本の住血吸虫が中国の貝でも、最も地理的距離が大きい四川省産の *O. h. robertsoni* に特に高い侵入効率を示したことは興味深い。*O. h. robertsoni* は形態学的に *O. h. nosophora* と類似しており、中国国内でも特異な共進化を遂げた寄生虫-中間宿主貝と考えらる。日本産の住血吸虫が *O. h. robertsoni* で感染幼虫まで発育できるか否かは未だ検討が終了していないが、*O. h. robertsoni* と *O. h. nosophora* は形態的にも類似しており、その起源の比較が興味深い。今後は揚子江下流域に分布する住血吸虫の *O. h. robertsoni* に対する感受性も整理する必要がある。

その一方で、中国住血吸虫株のミラシジウムをそれぞれの貝に暴露したところ、何れにおいても限られた侵入効率しか得ることができなかった。中国安徽省の寄生虫を安徽省の貝に暴露した場合でさえも同様の結果しか得られなかったので、中国産の中間宿主貝ではもともと自然防御免疫系が強く機能していることが考えられた。特に侵入後 24 時間にすでに PCR でも検出不能になるということは、強い虫体破壊機序が働いていることが推測され、中国の *Oncomelania* 属貝の生物学的特性を決定する機序の解明が興味深い。

中間宿主貝の住血吸虫に対する感受性を考える時、今回の研究から明らかなことはミラシジウムの侵入と貝体内での発育の 2 つの因子が独立して関与しているということである。日本産の住血吸虫は山梨株の貝体内に高率に侵入して、そのまま発育した。一方、日本産の住血吸虫は中国株の貝に侵入効率は悪いが、一旦侵入したらそのまま発育できることが推定される。しかし、日本産住血吸虫はフィリピン産の貝に侵入することは比較的容易であるが、その貝体内では強い発育阻害がかかっているデータであった。この事は中間宿主貝の住血吸虫ミラシジウムに対して、物理的バリアと生物学的バリアの 2 つの異なった機序が機能していることを示唆する。これらの機序解析を通して、中間宿主貝の日本住血吸虫に対する感染感受性の概要が解明されれば、それを応用して住血吸虫症対策戦略やリスク評価に新たな展望が拓かれると期待される。

参考文献

- (1) Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000; 77:41-51.
- (2) Zhou XN, Wang LY, Chen MG, Wu XH, Jiang QW, Chen XY, Zheng J, Utzinger J, 2005. The public health significance and control of schistosomiasis in China—then and now. *Acta Trop* 96: 97–105.
- (3) Kumagai T,* Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu SH, Chen R, Wen LY, and Ohta O. Detection of Early and Single Infections of *Schistosoma japonicum* in the Intermediate Host Snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay. *Am J Trop Med Hyg*. 83:542-8, 2010.
- (4) Xu J, Rong R, Zhang HQ, Shi CJ, Zhu XQ, Xia CM, 2010. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol* 40: 327–331.

注意・参考文献

本研究は20010年の第79回日本寄生虫学会にて口演発表した。

- (1) 中国安徽省における日本住血吸虫症中間宿主のサーベイランスツールの開発
- (2) LAMP法を用いた日本住血吸虫中間宿主貝の感染モニタリングとその疫学的応用の検討

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 03 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： 喬 善楼

所属機関名：中部大学

所属部署名：生命健康科学部

職名：准教授

所 在 地：愛知県春日井市松本町 1200

電 話：0568-51-1111

内線：8115



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

脱共役タンパク質 UCP2 を標的にした大腸癌漢方治療法の研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 喬 善楼

職名：准教授

所属機関名：中部大学

部署名：生命健康科学部

中国側研究者氏名：李 曉涛

職名：教授

所属機関名：華東師範大学

部署名：生命医学研究所

4. 当該研究における発表論文等

投稿準備中。

脱共役タンパク質 UCP2 を標的にした大腸癌漢方治療法の研究

日本側研究者氏名 喬 善棲 准教授

所属機関 中部大学 生命健康科学部

中国側研究者氏名 李 曉濤 教授

所属機関 華東師範大学 生命医学研究所

要旨

食生活の欧米化に伴い、近年日本を始め、中国でも大腸癌の発病率が急増している。特に沿海地区の都市部では顕著な傾向が認められる。西洋医学における癌治療には、外科手術、放射線療法、抗癌剤による化学療法などは、癌細胞を攻撃するだけでなく、正常の細胞や組織にもダメージが及ぶという欠点がある。癌治療における最近の動向の1つとして、癌細胞に特有の解糖代謝亢進(ワールブルグ効果)に基づき、癌細胞だけを殺す理想的な新しい癌治療法への関心が高くなっている。我々はワールブルグ効果を制御する可能性のあるUCP2を注目し、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている漢方薬から、UCP2抑制を示した白花蛇舌草(Baihuasheshecao)、半枝蓮(Banzhilian)を見出した。さらに、蛇舌草、半枝蓮による大腸癌細胞のミトコンドリア膜電位低下、細胞内ROSの増加、またはAktの活性低下などが明らかになった。半枝蓮、白花蛇舌草の抗癌薬物としての歴史的な背景に加え、今回明らかにしたUCP2抑制の結果は、将来UCP2に抑制作用のある成分を特定し、癌細胞だけを殺す理想の薬開発につながると期待される。[キーワード：大腸癌；漢方；UCP2]

緒言：

食生活の欧米化に伴い、日本では欧米諸国に多い大腸癌が非常に増えている。近年中国でも、大腸癌の発病率が急増している。特に沿海地区の都市部では顕著な傾向が認められる。西洋医学癌治療には、外科手術、放射線療法、抗癌剤による化学療法、ならびに免疫療法などがあり、今日の癌治療はこれらの方法を組み合わせて行われている。しかしこれらの治療法は、癌細胞を攻撃するだけでなく、正常の細胞や組織にもダメージが及ぶという欠点がある。最近、癌治療における漢方薬の有効性は、さまざまな基礎研究によって、科学的に立証され、国際的に見直され大きな注目を集めている。一方、大腸癌などの細胞は、酸素が充分にある環境でも嫌氣的にエネルギー(ATP)を生産す傾向があり、ワールブルグ効果と呼ばれている。しかし、なぜ癌細胞がこのような非効率な方法によるエネルギー生産(好氣的エネルギー生産のおよそ1/20の効率)を行っているのかについては、ノーベル賞科学者オットー・ワールブルグ博士によるワールブルグ効果の発見後、80年以上も経つが、今でも未解決な部分が多い。UCP2は細胞の代謝経路(解糖由来のピルビン酸、脂肪酸、グルタミン)の再プログラミング[1]、またはP53を介して好氣性代謝と嫌氣性代謝を決定する可能性が示唆されている[2]。従ってUCP2は大腸癌治療の新しいターゲットとして十分考えられる。本研究は、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている生薬として、三稜(Sanleng)、莪朮(Ezhu)、白花蛇舌草(Baihuasheshecao)、半枝蓮(Banzhilian)などを用い、UCP2抑制作用のある漢方薬を探索し、更に抗大腸癌作用機序について検討したので報告する。

材料及び方法：

1、生薬としての三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮を大晃生薬有限会社より購入し、それぞれ50gを精製水500mlで3時間熱湯抽出、次に抽出液を減圧下で乾燥した。乾燥品を50mMリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、抽出物を最終濃度100mg/mlとなるように調整した。

2、細胞および細胞培養：SW480細胞(Human colon adenocarcinoma cell line)を使用した。細胞は、10%牛胎児血清(以下FBS、GIBCO社)、streptomycin(Invitrogen社)100U/ml、およびpenicillin(invitrogen社)0.1mg/mlを含むRPMI1640(wako社)を用いて、5%CO₂内、でインキュベートした。細胞の剥離は0.25% Trypsin

1mM EDTA によった。細胞数を 2×10^5 個/ml に調整したのち、三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮を添加して 24 時間インキュベートしたものを実験系に用いた。

3、細胞内活性酸素の測定：細胞内 ROS の測定として、非蛍光の DCFH-DA (2, 7'-dichloro fluorescein diacetate) が ROS に反応して蛍光の DCF に変化するところから、その蛍光を測定することによって生成された ROS 量を求めた。

4、ミトコンドリア膜電位の解析：細胞のミトコンドリア膜の電位 (potential) を観察するために $2 \mu\text{M}$ rhodamine123 を含む Medium で 10 分間培養しミトコンドリアを蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結果、Mm1 細胞のミトコンドリア膜電位は M1 細胞より弱いことが明らかとなった。

5、MTT Assay: *In vitro* の抗腫瘍効果の評価は、MTT 試薬 (3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide; Sigma) を用いた。細胞浮遊液を、96 穴マイクロプレート (Costar) に生細胞 10^5 cells/0.1 mL/well となるよう調整分注した上、漢方添加 (対照は漢方非添加) 後 48 時間培養し、MTT 試薬を添加して生細胞量の測定を行った。

6、Western blot 法：細胞溶解液 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate) を用いた。総蛋白 $25 \mu\text{g}$ を 5-15% SDS-PAGE を用いて電気泳動した後、PVDF 膜に転写して 3% アルブミンで約 1 時間室温にてブロッキングを行った後、Akt/Ser473 (AnaSpec 社, 1:250), NFkB (BD Bioscience 社, 1:250)、UCP2 抗体 (SantaCruz 社, 1:1000 希釈) と一晩反応させた。0.05% の Tween 20 含んだ PBS にて 3 回洗浄後ペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG (SantaCruz 社, 1:1000 希釈) と室温で 1 時間反応させ、洗浄後 ECL 法にて発色させ、FUJIFILMLAS-3000 (露光時間: 2 分、検出感度: High) で検出した。

結果：

1、細胞生存率に及ぼす漢方薬の影響。三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮添加における SW480 細胞の生存率を調べ、対照との比較から、漢方添加による増殖抑制率を算出した (図 1)。白花蛇舌草は濃度依存的に SW480 細胞の生存率が顕著に減少した。莪朮と半枝蓮処理した細胞は軽度 (30~40%) の増殖抑制作用を示したが、三稜は効果が認められなかった。

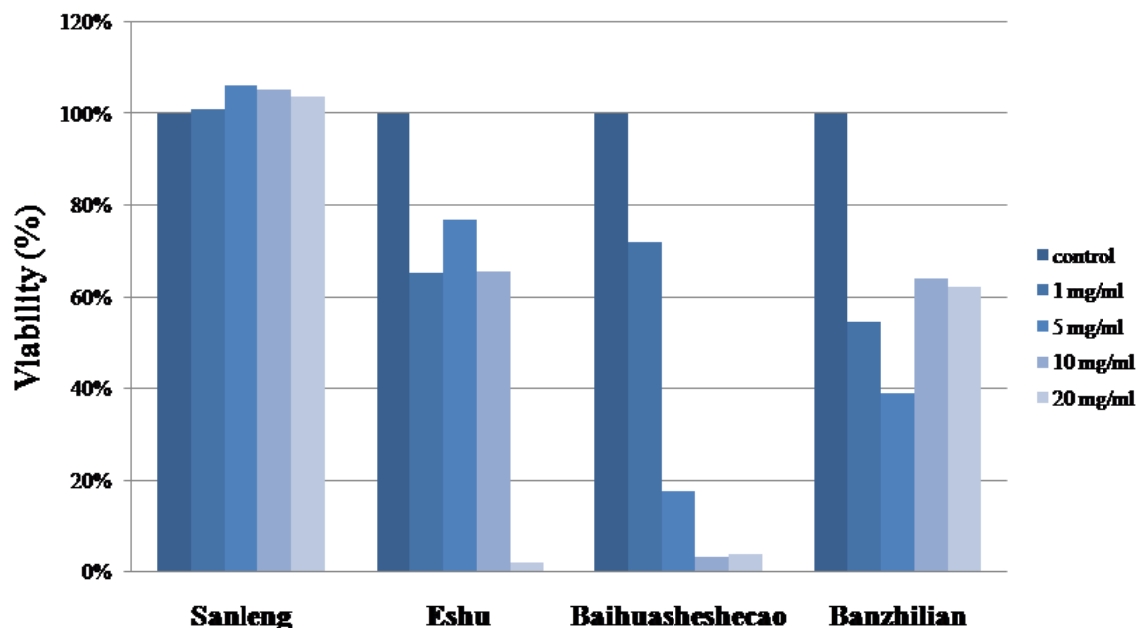


Fig. 1

2、細胞内活性酸素におよぼす漢方の影響。漢方による癌細胞抑制作用に ROS が関与するかを検討したところ、白花蛇舌草と半枝蓮添加群では、SW480 細胞内 ROS の顕著な増加が認められた (図 2)。一方三稜、莪朮処理した

場合は軽度な ROS の産生が確認できた。

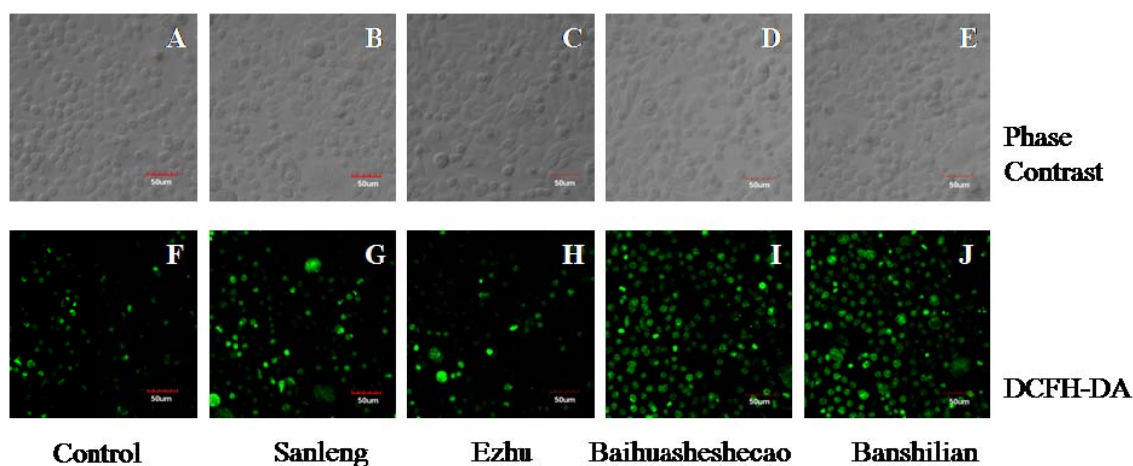


Fig. 2

3、W480 細胞のミトコンドリア膜電位におよぼす漢方の影響。MTT Assay および細胞内活性酸素産生の結果より、本研究は白花蛇舌草と半枝蓮に注目し、細胞のミトコンドリア膜の電位(potential)を観察するために 5 μ MMitoTracker を含む Medium で 10 分間培養しミトコンドリアを蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、SW480 細胞のミトコンドリア膜電位は白花蛇舌草、半枝蓮処理によって低下することが明らかとなった (図 3)。

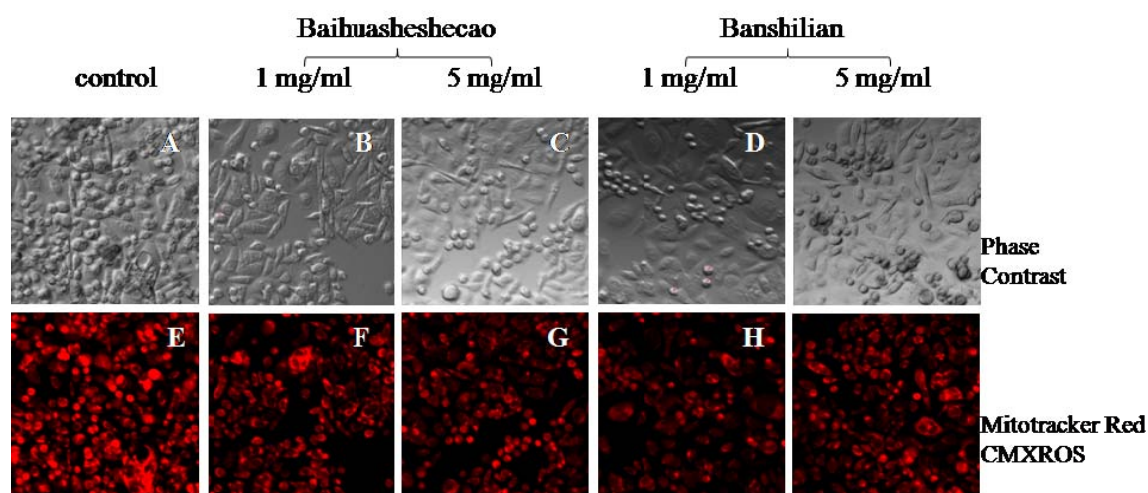


Fig. 3

4、UCP2 の発現におよぼす白花蛇舌草と半枝蓮の影響。UCP2 は白花蛇舌草と半枝蓮処理濃度が上がるにつれ発現が減少した。Akt では経時的にリン酸化が減少した (図 4)。NF- κ B 蛋白量の変化は白花蛇舌草と半枝蓮添加前後で変化は認められなかった。

考察：

正常細胞は、エネルギー産生に主にクエン酸回路（クレブス回路）を用いるが、癌細胞はこれとは異なり、嫌気性解糖系を経て生産されるエネルギーに多くを依存している特異的代謝現象ワールブルグ効果がある[3]。現在癌検出法である PET 検査は、癌細胞がグルコースを正常細胞よりも大量に消費する特異的代

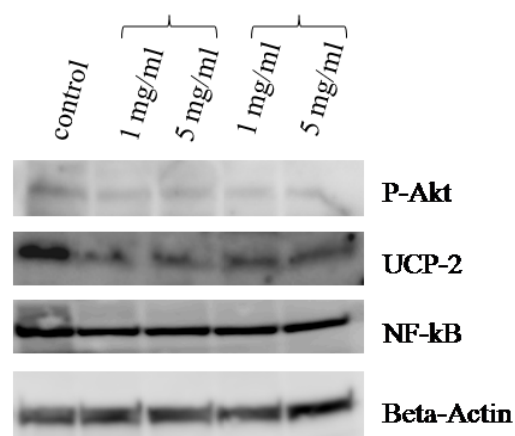


Fig. 4

謝現象を利用している。この機序については、未解決の点が多い。最近 UCP2 は細胞の代謝経路（解糖由来のピルビン酸、脂肪酸、グルタミン）の再プログラミング[1]、または P53 を介して好気性代謝と嫌気性代謝を決定する可能性が示唆されている[2]。UCP はミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリアの電子伝達系と ATP の合成は、内膜を介するプロトン濃度勾配を解消する特殊なチャンネルであり、今は UCP2, 3, 4, 5 など UCP ファミリーを成している[4]。UCP2 は 1997 年クローニングされ、生体各臓器に広くその発現が認められた。UCP2 が大腸癌を含め、胆管癌[5]、甲状腺オンコサイトーマ、肝癌細胞株[6]、Hela 細胞[7]、大腸癌細胞株 (Caco2, SW480)、乳癌細胞株 (MCF7) [8]、抗癌剤耐性癌細胞株などに高発現していることが明らかとなった[9-11]。大腸癌分化度は UCP2 の発現量に比例することがわかっている[11]。我々もマウス骨髄白血病細胞において正常より UCP2 タンパクは 10 倍以上上昇する報告をした[12]。また、UCP2 ノックアウトマウスにおいて大腸癌が出来やすいことが報告され、その原因として大腸粘膜上皮に活性酸素の蓄積と NF- κ B の活性化が示唆された[13]。これらの一連の研究は、UCP2 は細胞内の活性酸素を感知・制御することにより、癌細胞増殖促進に深く関与していると推測される[14, 15]。UCP2 は大腸癌治療の新しいターゲットとして十分考えられる。UCP2 の antagonist として、漢方薬で使用されているクチナシ果物抽出エキスクチナシの主成分である (genipin) が有名、癌細胞においては UCP2 抑制効果がなかった (未発表データ)。今回、我々は、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている 生薬として莢朮、三稜、白花蛇舌草、半枝蓮のうち、半枝蓮と白花蛇舌草の UCP2 抑制作用を見出した。

白花蛇舌草と半枝蓮は中国の民間療法として外傷・化膿性疾患・各種感染症や肺癌や胃癌などの治療に使用されてきた。培養癌細胞を用いた実験で、白花蛇舌草によるヒトの乳癌細胞や前立腺癌細胞の増殖を抑える効果も報告されている。半枝蓮には、癌細胞の増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用、抗変異原性作用、抗炎症作用、発癌過程を抑制する抗プロモーター作用などが報告されている[16]。さらに最近、米国では進行乳癌患者に対する臨床試験も実施され、半枝蓮の有効性を示唆する結果が得られている[17]。半枝蓮の熱水抽出エキス BZL101 は嫌気性解糖系を阻害し、癌細胞をエネルギー不足に追い込む[18]。これにより癌細胞には細胞死が起こるが、正常細胞はほとんどダメージを受けない。大腸癌株 SW480 における半枝蓮と白花蛇舌草による UCP2 タンパクの低下は、酸化的リン酸化を亢進させ、ミトコンドリアに大量の ROS が産生されるため、腫瘍抑制に繋がる可能性が示唆される。

また癌細胞サバイバルメカニズムとして多くの細胞で観察されているものに、PI3K/Akt/mTOR シグナルの亢進がある[19]。Akt には 2 つの調節ドメインが知られており、PDK1 により Thr308 が、Ser473 は PDK2 などいくつかのキナーゼによりリン酸化される。このリン酸化が癌化、増殖および Bcl-2 ファミリー-Bad、caspase-9、Forkhead transcription factor、I κ B キナーゼなどのリン酸化による抗アポトーシス活性を含む Akt の活性化に重要である。従って Akt 活性の抑制は、癌化学療法の重要な標的となる。本研究では半枝蓮、白花蛇舌草処理による Akt Ser473 リン酸化レベルの低下は、大腸癌の増殖抑制にも寄与する可能性が示唆された。

以上の結果から、半枝蓮、白花蛇舌草は単味生薬としても *in vitro* での抗大腸癌作用があり、そのメカニズムとして、ミトコンドリアの UCP2 発現抑制、ミトコンドリア膜電位の低下、ROS の増加、または Akt の活性制御によるものであると考えられる。

References

1. Samudio I, M Fiegl and M Andreeff (2009) Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* 69:2163-2166
2. Matoba S, JG Kang, WD Patino, A Wragg, M Boehm, O Gavrilova, PJ Hurley, F Bunz and PM Hwang (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650-1653
3. Warburg O, F Wind and E Negelein (1927) The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8:519-530
4. Krauss S, CY Zhang and BB Lowell (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-261
5. Berthiaume EP and J Wands (2004) The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*

6. Carretero MV, L Torres, U Latasa, ER Garcia-Trevijano, J Prieto, JM Mato and MA Avila (1998) Transformed but not normal hepatocytes express UCP2. *FEBS Lett* 439:55-58
7. Mills EM, D Xu, MM Fergusson, CA Combs, Y Xu and T Finkel (2002) Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem* 277:27385-27392
8. Fine EJ, A Miller, EV Quadros, JM Sequeira and RD Feinman (2009) Acetoacetate reduces growth and ATP concentration in cancer cell lines which over-express uncoupling protein 2. *Cancer Cell Int* 9:14
9. Harper ME, A Antoniou, E Villalobos-Menuet, A Russo, R Trauger, M Vendemelio, A George, R Bartholomew, D Carlo, A Shaikh, J Kupperman, EW Newell, IA Beshpalov, SS Wallace, Y Liu, JR Rogers, GL Gibbs, JL Leahy, RE Camley, R Melamed and MK Newell (2002) Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 16:1550-1557
10. Savagner F, B Franc, S Guyetant, P Rodien, P Reynier and Y Malthiery (2001) Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4920-4925
11. Horimoto M, MB Resnick, TA Konkin, J Routhier, JR Wands and G Baffy (2004) Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 10:6203-6207
12. Nishio K, S Qiao and H Yamashita (2005) Characterization of the differential expression of uncoupling protein 2 and ROS production in differentiated mouse macrophage-cells (Mm1) and the progenitor cells (M1). *J Mol Histol* 36:35-44
13. Derdak Z, P Fulop, E Sabo, R Tavares, EP Berthiaume, MB Resnick, G Paragh, JR Wands and G Baffy (2006) Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-kappaB activation and oxidative stress. *Carcinogenesis* 27:956-961
14. Mattiasson G, M Shamloo, G Gido, K Mathi, G Tomasevic, S Yi, CH Warden, RF Castilho, T Melcher, M Gonzalez-Zulueta, K Nikolich and T Wieloch (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9:1062-1068
15. Teshima Y, M Akao, SP Jones and E Marban (2003) Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 93:192-200
16. Kim EK, KB Kwon, MJ Han, MY Song, JH Lee, YS Ko, BC Shin, J Yu, YR Lee, DG Ryu, JW Park and BH Park (2007) Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med* 20:123-128
17. Perez AT, B Arun, D Tripathy, MA Tagliaferri, HS Shaw, GG Kimmick, I Cohen, E Shtivelman, KA Caygill, D Grady, M Schactman and CL Shapiro A phase 1B dose escalation trial of *Scutellaria barbata* (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 120:111-118
18. Fong S, M Shoemaker, J Cadaoas, A Lo, W Liao, M Tagliaferri, I Cohen and E Shtivelman (2008) Molecular mechanisms underlying selective cytotoxic activity of BZL101, an extract of *Scutellaria barbata*, towards breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 7:577-586
19. Tsuruo T, M Naito, A Tomida, N Fujita, T Mashima, H Sakamoto and N Haga (2003) Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 94:15-21

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 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： 秋山 泰身 
所属機関名：東京大学 医科学研究所
所属部署名： 分子発癌分野 職名：准教授
所 在 地： 東京都港区白金台 4-6-1
電 話： 03-5449-5276 内線：75276

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

自己免疫疾患の抑制に必須な胸腺環境と T 細胞の分化制御

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：秋山 泰身	職名： 准教授
所属機関名： 東京大学 医科学研究所	部署名：分子発癌分野
中国側研究者氏名：Yu Zhang	職名： 教授
所属機関名： 北京大学	部署名：

4. 当該研究における発表論文等

なし

自己免疫疾患の抑制に必須な胸腺環境と T 細胞の分化制御

研究者氏名 秋山泰身

日本研究機関 東京大学医科学研究所

中国側共同研究者 Yu Zhang

中国研究機関 北京大学

要 旨

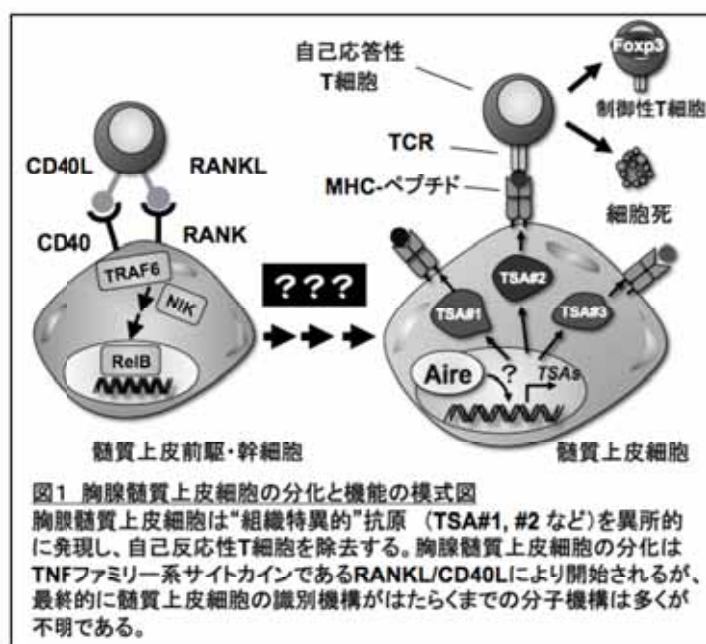
胸腺髄質上皮細胞は自己免疫疾患の抑制に必須と考えられている。これまで胸腺髄質上皮細胞は、自己臓器反応性 T 細胞が発生途中にアポトーシスにより除去することで自己免疫疾患の抑制を行っていると考えられてきた。ところが最近、胸腺髄質上皮細胞が、胸腺内の T 細胞の最終分化段階にも関与することが明らかとなってきた。そのメカニズムを解明するために、胸腺髄質上皮細胞の成熟に必須なシグナル伝達因子である TRAF6 を欠損するマウスにおいて、胸腺内の T 細胞の分化を検討したところ、髄質で起きる分化段階の中で、最終段階が抑制されていることが判明した。ついで TRAF6 に依存して分化する胸腺髄質上皮細胞がどのような機構で T 細胞分化を制御するのか調べるために、TRAF6 の上流のサイトカインシグナルである RANKL が、*in vitro* で胸腺髄質上皮細胞を分化誘導する際に、発現が上昇誘導する遺伝子をマイクロアレイ法により同定した。その結果、RANKL 刺激依存的な胸腺髄質上皮細胞の分化誘導に伴い、I 型インターフェロンの 1 つ IFN β および I 型インターフェロン誘導遺伝子群が誘導されるとの実験結果を得た。今後、I 型インターフェロンと T 細胞の胸腺内分化の関連、および胸腺髄質上皮細胞による自己免疫疾患の抑制における I 型インターフェロンおよびその誘導遺伝子の役割について検討することで、自己免疫疾患制御や T 細胞分化における新たな知見が得られると考えられる。

緒 言

個体の防御システムの 1 つである免疫系は、自己と非自己を巧妙に識別する。この識別機構は自己組織に対する免疫応答を抑制し、さらには食物などの無害な非自己に対しても免疫応答を抑制する。その一方で、外来病原体など有害な非自己のみならず癌のような有害な自己に対しても免疫応答は惹起する。これら識別機構の異常は、自己免疫疾患、アレルギー、癌などの難知性疾患発症の原因となり得る。

免疫系の識別機構がどのようにして成立するのか、未だに謎な部分が多く、その解明は基礎医学や免疫学における重要課題の 1 つである。また免疫系の識別機構を人為的に制御できれば、自己免疫疾患やアレルギーあるいは癌などの治療応用へと展開が期待できる。

獲得免疫応答に重要な T 細胞は、ほとんどが胸腺で分化成熟する。その際、自己に反応し得る T 細胞は胸腺で除去される。さらに、免疫反応を抑制する制御性 T 細胞も、そのほとんどが胸腺で分化する。これらの機構は、個体の自己-非自己識別機構に重要であり、その異常はヒトに自己免疫疾患を引き起こす(参考文献 1)。すなわち胸腺は T 細胞を産生するだけでなく、免疫系の自己-非自己識別能も制御していると考えられる。



胸腺が T 細胞の“識別能”を決定する上で重要なのが、T 細胞表面の抗原受容体(TCR)と抗原提示細胞の主要組織適合抗原(MHC) ペプチド複合体との相互作用である。その際に抗原提示細胞として機能する細胞の一群が、胸腺の髄質領域に局在する「髄質上皮細胞」であり、他の細胞には見られないユニークな性質を持つ。すなわち、髄質上皮細胞は、(インシュリンのように) 特定組織に固有に発現するタンパク質を、微量であるが多種類にわたり「異所的に」発現する(図 1;参考文献 2)。これまでに、髄質上皮細胞はこれら“組織特異的”抗原を、胸腺内で T 細胞へ“異所的”に提示することで、自己組織に応答する T 細胞を除去する、あるいは転写因子 Foxp3 を発現する制御性 T 細胞の分化を誘導する、との仮説が提唱され(図 1)、この機構は個体の自己-非自己識別に必須と考えられている(参考文献 2)。実際、ヒト自己免疫疾患の原因遺伝子である Autoimmune regulator (AIRE)は髄質上皮細胞において、一部の組織特異的抗原の発現を制御することで自己免疫疾患を抑制する、と判明した(参考文献 3)。一方で、本研究課題の中国側の共同研究者である Yu Zhang 博士は、Aire 欠損マウスで T 細胞の最終分化が異常となることを発見している(参考文献 4)。この結果は、これまでに考えられていた機構以外に胸腺髄質上皮細胞による自己免疫疾患の抑制機構が存在することを示唆している。そこで本研究課題は、胸腺髄質上皮細胞の分化研究を行ってきた報告者と、胸腺髄質での T 細胞の最終分化を研究してきた中国側研究者とが情報交換しながら共同研究を行うことで、自己免疫に必要な胸腺髄質上皮細胞と T 細胞の分化機構の関連を明らかにすることを目的とした。

研究対象と方法

<マウス>

TRAF6 欠損マウスは以前に報告したものをを用いた(参考文献 5)。胸腺器官培養に用いた胎仔マウスは、日本クレアより購入した妊娠マウスより調製した。

<抗体、試薬類>

APC-Cy5 ラベル抗 CD4 抗体、PE-Cy5 ラベル抗 CD8 抗体、FITC ラベル抗 CD69 抗体、PE ラベル抗 Qa2 抗体はファーマンジェンより購入した。組み換え RANKL は和光純薬より購入した。

<胎仔胸腺器官培養の調製と組み換え RANKL タンパク質による刺激実験>

胎生 14 日目の野生型 および TRAF6 遺伝子欠損の胎仔マウス胸腺を採取し、2'-DG (2'-Deoxyguanosine), 10%FBS を含む R10 培地に浮かべたフィルター上で 4 日間培養した。ついで組み換え RANKL の存在下、様々な時間培養した。培養した胸腺ストローマから RNeasy micro Kit (QIAGEN)を用いて、RNA を調製した。RNA は Superscript III cDNA synthesis kit (Invitrogen)を用いて、cDNA を合成した。cDNA を鋳型とし、各々の遺伝子に特異的なプライマーと Fast Start Universal SYBR-Green Master MIX を用いた SYBR-Green 法により、ABI 7300 Real time PCR system を用いて定量的 RT-PCR を行った。定量した値は各々のサンプルの Gapdh の発現量で補正した。

<胸腺細胞の調製とフローサイトメーターによる解析>

生後約 14 日の TRAF6 欠損マウスおよび野生型コントロールマウスから胸腺を採取した。ついで得られた胸腺を、スライドグラスによりすりつぶし、胸腺細胞とした。胸腺細胞を蛍光ラベルした表面抗原抗体により常法に従って染色した。染色後、フローサイトメーター(FACS Calibur II; BD バイオサイエンス)により解析した。死細胞は 7-amino-actinomycin D により除外して解析した。

<倫理的な考慮>

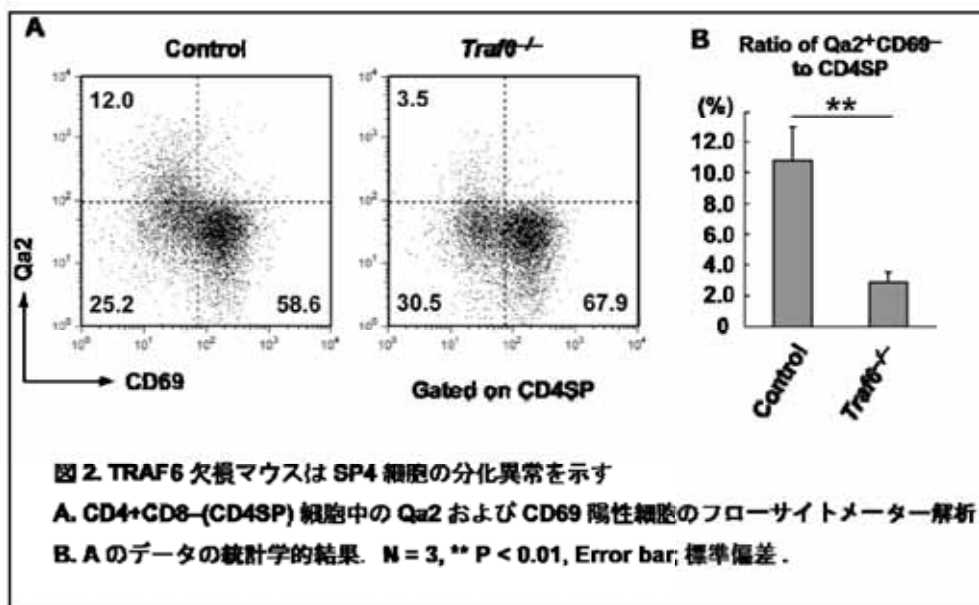
本研究課題ではヒトを対象とする研究は行っていない。マウスの飼育及び実験は東京大学の定める規定に従い行った。

結 果

1. 胸腺髄質上皮細胞の形成が不全になる遺伝子改変マウスにおける T 細胞の後期分化

胸腺細胞は、その前駆細胞が胸腺に移入した後、いくつかの分化段階を経て、最終的にリンパ節など他の組織で免疫応答を

行う成熟した T 細胞へと分化する。その際、分化する T 細胞と胸腺内に存在する上皮細胞などの相互作用が重要となる。胸腺は皮質と髄質に分かれるが、胸腺に移行した前駆細胞はまず皮質に移行し、CD4 と CD8 の両方の表面抗原を持つ T 細胞へ分化した後、髄質へ移行する。ついで T 細胞は胸腺髄質上皮細胞と相互作用することで、自己反応性 T 細胞が除去される。同時に T 細胞は髄質で、SP1 (6C10+CD69+Qa-2-), SP2 (6C10+CD69+Qa-2-), SP3(6C10-CD69-Qa-2-), SP4(6C10-CD69-Qa-2+)の過程を経て分化する (参考文献4)。



T 細胞の後期分化における胸腺髄質上皮細胞の役割を明らかにするために、成熟した胸腺髄質上皮細胞をほとんど持たない TRAF6 欠損マウス (参考文献5) について、CD4+CD8-画分内の CD69 と Qa-2 の発現をフローサイトメーターで検討した (図2)。野生型マウスでは、これまでの報告と一致して、SP1/SP2 画分、SP3 画分、SP4 画分に分離できた。一方、TRAF6 欠損マウスの胸腺では CD69-Qa-2+ の SP4 画分が有意に減少していた。

この結果は、TRAF6 依存的に分化した胸腺髄質上皮細胞は T 細胞の後期分化、特に SP3 から SP4 への移行に重要な役割を果たすことを強く示唆している。

2. RANK シグナル依存的に胸腺髄質上皮細胞で発現するサイトカインの同定

実験1の結果は、成熟した胸腺髄質上皮細胞は T 細胞の後期分化を制御していることを示しているが、その制御がどのような分子機構でなされているのか不明である。そこで TRAF6 依存的に胸腺髄質上皮細胞が分化するに伴い発現上昇するサイトカインを検討した。TRAF6 は

TNF レセプターファミリーからのシグナルを伝達し、NF- κ B など転写因子を活性化するシグナル伝達因子である。胸腺髄質上皮細胞は TRAF6 の上流で機能する TNF レセプターファミリーメンバーの RANK のシグナルにより分化が誘導されることを以前に報告した (参考文献6)。これまでの報告者らの研究において、未熟な胸腺上皮細胞を含む胎仔胸腺ストローマ器官培養に TNF ファミリーに属する Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を作用させ

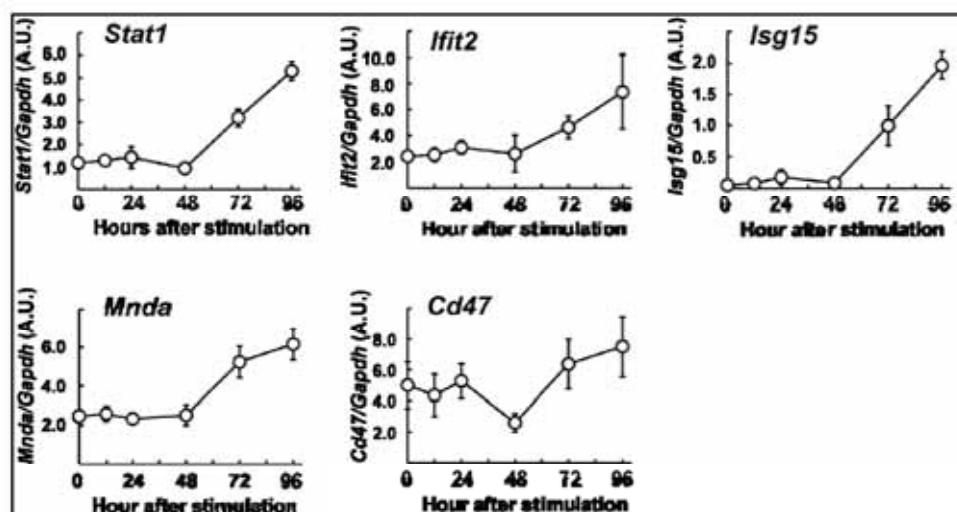


図 3. 胸腺ストローマ器官培養における I 型インターフェロン誘導遺伝子の RANKL 依存的な発現変動

胎仔胸腺ストローマ (胎齢 14.5 日) に組み換え RANKL タンパク質 (1 μ g/ml) を作用させ、Stat1, Ifit2, Isg15, Mnda, Cd47 の遺伝子発現を定量的な RT-PCR で検討した。

ることで成熟した胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導できることを見いだしている(参考文献6)。そこで、この実験系を利用して、髄質上皮細胞が分化するに伴い、変動する遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定した。興味深いことに、それらの遺伝子群の中には、I型インターフェロンにより発現が誘導される遺伝子が多く含まれていた。まず、RANKL 依存的にこれらのI型インターフェロン誘導遺伝子が発現誘導することを確認するために、RANKL 刺激した胸腺ストローマ器官培養から得られるcDNA を定量的RT-PCR 法により解析した(図3)。その結果、複数のI型インターフェロン誘導遺伝子がRANKL 刺激依存的に誘導されることが証明した。

図3の結果は、I型インターフェロンが胸腺髄質上皮細胞でRANKL 依存的に発現誘導していることを示唆する。どこでI型インターフェロンの発現を定量的RT-PCR 法で解析したところ、胎仔胸腺ストローマでRANKL 依存的にIFN β が発現誘導することが分かった(図4)。

考 察

本研究課題でTRAF6欠損胸腺の解析により、TRAF6シグナルに依存して分化した胸腺髄質上皮細胞がT細胞の後期分化を制御していることが明らかとなった。さらにTRAF6を活性化して胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導するRANKLシグナルは、胸腺上皮細胞より成る胸腺ストローマでI型インターフェロンであるIFN β およびI型インターフェロン誘導遺伝子群が発現誘導されることが明らかとなった。I型インターフェロンは末梢組織でのT細胞の分化に関与することが知られているが、胸腺で機能については報告がなく、I型インターフェロンが胸腺内T細胞の分化や自己免疫応答性T細胞の除去にどのように関与するのか、引き続き検討を行っている。

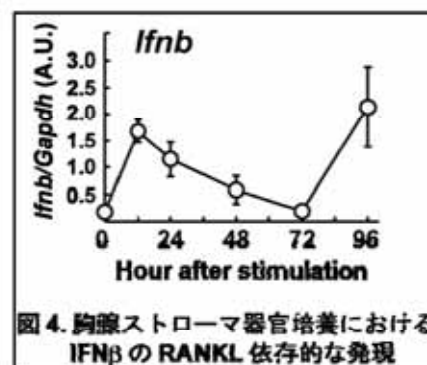


図4. 胸腺ストローマ器官培養におけるIFN β のRANKL 依存的な発現

参 考 文 献

1. Kamradt T. et al., *N. Engl. J. Med.*, 344, 655-664 (2001)
2. Kyweski B & Klein L., *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 571-606 (2006)
3. Peterson P. et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 948-957 (2008)
4. Li J., et al., *Proc. Natl. Acad. Scie., USA*, 184, 18175-18180 (2007)
5. Akiyama T. et al. *Science* 308, 248-251 (2005)
6. Akiyama T* *Immunity* 29, 423-437 (2008)

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 2 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： 高島 成二
所属機関名： 大阪大学
所属部署名： 医学系研究科 職名： 准教授
所 在 地： 大阪府吹田市山田丘 2－2
電 話： 06-6879-3492 内線： 3492



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

エネルギー代謝関連酵素の心疾患における役割解明・治療への応用

3. 成果の概要

心臓のエネルギー代謝にかかわる新たな経路としてAMPKと呼ばれる酵素
の器質を精製・同定した。AMPKの活性化を介する微小管制御という新たな
ストレス応答メカニズムを明らかにした。

※発表論文等

Nakano T. et al. Nature Cell Biology 12 (6): 583-590 (2010)

4. 研究組織

日本側研究者氏名：	高島 成二	職名：	准教授
所属機関名：	大阪大学大学院	部署名：	医学系研究科
中国側研究者氏名：	廖 禹林	職名：	教授
所属機関名：	南方医科大学	部署名：	病態生理部門

エネルギー代謝関連酵素の心疾患における役割解明・治療への応用

研究者氏名 高島 成二

所属機関 大阪大学 大学院医学系研究科・准教授

中国側共同研究代表者 廖 禹林

所属機関 南方医科大学 病態生理部門・教授

要 旨

心臓の特異性を決定するシグナル因子の同定を行い、それらの機能解析を行うことにより、心血管疾患の病態解析から新しい治療法の開発につなげることを目的とする。心臓で特異的に発現誘導される因子として GS という蛋白質を同定し、低酸素ストレス時にエネルギー代謝酵素を活性に調節する因子であることを明らかにした。またストレス応答酵素の新規器質 CLI-170 を心臓から同定し、その機能を明らかにした。2つのストレス応答機構の発見が、今後心不全の病態解明と新規の治療法の開発につながると期待される。

Key Words 心臓、代謝、微小管、細胞極性

緒 言：

分裂して同化反応を積極的に行う癌細胞などの細胞とは異なり、生後間もなく分裂を中止し収縮のためのエネルギー産生と異化反応を積極的に行う心筋細胞は、エネルギー代謝につながるシグナル、増殖シグナルに大きな差があることが予想される。こういった心臓としての臓器特異性に注目し、独自のシグナル経路を同定する。そしてこれらにかかわる因子の機能を明らかにすることにより新しい心疾患の診断・治療法の開発につながると考え本研究を考案・実行することとした。

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要な増殖因子シグナルを中心とした機能分子を新たに同定することにより心筋特有の生存維持機構・ストレス応答機構を解明する。

そのために独自のスクリーニング系を開発するとともに、敏速な生体内での分子機能評価系を確立し、重要な因子の同定を敏速化させる。それらの相互作用から心臓の生存の分子機構を解明し、心不全の病態解明、さらには新たな治療法への展開を図る。

研究の対象と方法：

(1) 心臓の特異的機能維持にかかわる分子の同定

①心筋の非分裂性を規定する分子の同定

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要なシグナルの解析を通して、心臓特異的な生存維持機構の解明を行った。心臓は生後まもなく細胞分裂を中止し、さらに決して癌化をおこさない唯一の器官である。そこで、この細胞分裂抑制機構の解明を主な目的として、細胞分裂

に必要な転写因子に対する心臓の反応性を比較した。心臓特異的な転写誘導をきたす分子を同定、機能解析を行った。

②心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

リン酸化酵素は特定の器質のリン酸化により多彩な生理作用を有することが知られているが、細胞内局所、あるいは各臓器で独自の作用を有している。リン酸化酵素はその標的器質によって機能を空間的・時間的に多様化させていることが近年明らかになりつつある。ストレス応答に関与すると考えられている AMPK ファミリー分子も心臓での強発現が確認されている。そこで心臓特異的な AMPK の器質を新たに検索同定しその生理的役割の解明を行った。

(2) 独自の技術による新規リン酸化酵素器質の同定法の確立

上記の計画を実行するために、蛋白精製手法と *in vitro* リン酸化反応を組み合わせた新たな器質同定法を確立した。この手法は心臓組織を最初に高分離能のカラムで精製することにより脱リン酸化酵素を効率よく除くことが可能である。また分離されたたんぱくを器質として *in vitro* でリン酸化反応を行うため K_m の低い(アフィニティの高い)器質を同定することが可能である。そのため臓器において特異的に重要なシグナルの同定につながった。

(3) 同定された分子機能のゼブラフィッシュ等を利用した生体内解析

上記で新たに同定されたシグナルをゼブラフィッシュを使ったアッセイ系を利用して機能解析を行った。解析には心臓特異的 GFP 発光個体、GAL4-UAS システムを利用した心臓特異的遺伝子高発現系などを利用した。

結 果：

(1) 心臓の特異的機能維持にかかわる特異的分子の同定

我々は以前、HB-EGF と呼ばれる増殖因子が心臓の機能維持に重要な役割を果たすことを報告してきた。この増殖シグナルの働きにより心臓においても分裂細胞と同様 *c-fos* や *c-myc* と呼ばれる癌遺伝子の誘導がおこる。しかしその後は特異的な遺伝子の調整機構が働き心臓の非分裂性が規定されている。特に *c-myc* は最近 iPS 細胞の誘導に使用されるなど細胞運命決定とも深い関与が示唆されている。そこで *c-myc* を心臓および分裂細胞で発現させ、それにより誘導される遺伝子の差を網羅的に解析した。

結果、GS という蛋白が心臓特異的に *c-myc* により発現誘導されることが明らかになった。GS は今日までほとんど、その機能が解析されていなかった。そこで、GS の結合蛋白の精製・同定を行い F-ATP synthase という蛋白との結合を証明した。

F-ATP synthase はミトコンドリアに存在する酸化的リン酸化に関与する重要な分子であり、特にミトコンドリアの発達した心臓においてはその細胞機能に直接かかわることが考えられた。そこで、ATP 感受性 FRET を使用した実験により細胞内では GS が F-ATP synthase の活性を上昇させること、低酸素により強く発現誘導されることなどを明らかにした。つまり、GS は F-ATP synthase の働きを動的に制御し低酸素などのストレスに応答する重要な適応物質であることが明らかになった。

今後はさらに GS の分子メカニズムを解明し、ATP の産生の直接調整という新しい心不全治療への可能性を検討していく。

(2) 心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

ストレス応答蛋白として知られる AMPK の新しい器質として CLIP-170 を心臓組織から同定し、

その微小管動態における役割を明らかにした。まず心筋ホモジネートを高分離能のカラムにて分離し、その各フラクションにおいて *in vitro* リン酸化反応を行い、放射線標識されたたんぱくをさらに高分離能のカラムにより精製することにより同定した。同定された CLIP-170 は微小管の先端に結合することは既知であったがその機能は不明であった。

そこでその機能を解析するために、まずリン酸化部位 (S311) を同定し、S311 リン酸化 CLIP-170 抗体を作成することにより、*in vivo* においても AMPK が CLIP-170 の S311 をリン酸化することを証明した (図 1)

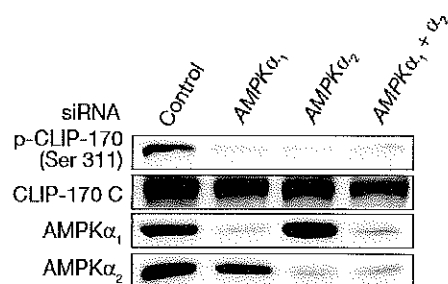


図 1、AMPK の阻害により CLIP-170 のリン酸化が抑制される。p-CLIP-170 は CLIP-170 のリン酸化特異的抗体、CLIP-170C はリン酸化非特異的抗体によるウエスタンブロットングをそれぞれ示す。AMPK の活性を siRNA により抑制すると CLIP-170 のリン酸化レベルは著明に低下する。

さらに AMPK を抑制すると微小管スピードが減少するという興味深い現象が観察された (図 2)。

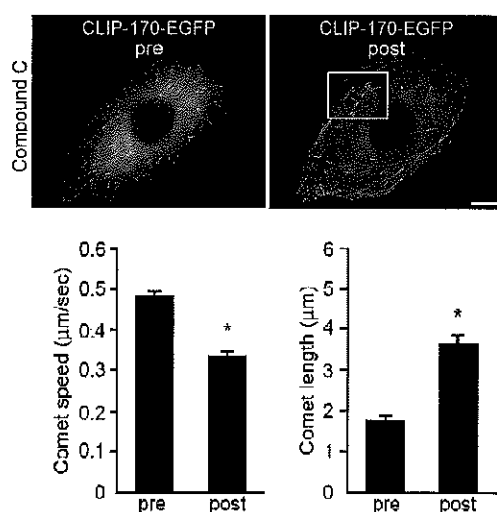


図 2、AMPK 抑制剤 Compound C による微小管伸長スピード抑制作用。CLIP-170-GFP を安定発現させた細胞に Compound C を投与した。CLIP-170 は上図のように comet 状に微小管のスピードに合わせて中心体から細胞膜側に向かって移動する。Compound C により AMPK の活性が抑制されると CLIP-170 の comet の長さが伸びるとともに微小管の伸長スピードを表す comet のスピードも顕著に減少した (下図)。

これまで微小管の伸長スピードを動的に制御する酵素は知られておらず、エネルギー代謝の異常をはじめとした様々なストレスによって活性化される AMPK が CLIP-170 のリン酸化を介して微小管制御を介して何らかのストレス応答をおこなっていると考え

られた。

さらに CLIP-170 のリン酸化を抑制するあるいは CLIP-170 の非リン酸化変異体を導入すると、微小管の伸長スピードの低下のみならず退縮距離の短縮も観察された。これにより微小管の安定性が過剰に増加し、微小管を構成するチューブリンの N 末端のチロシンが脱落した微小管が増加することも観察された。安定化した微小管は通常細胞遊走の方向にのみ伸長しているが AMPK が抑制された状態では安定化した微小管が全方向性に広がり、細胞極性の消失および細胞遊走が極端に抑制された (図 3)。

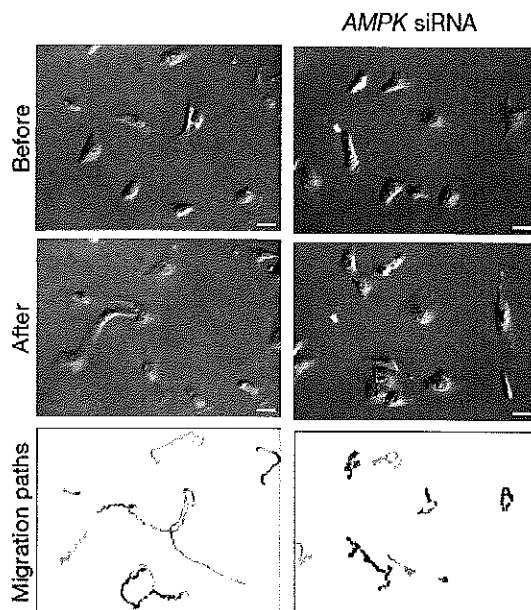


図3、AMPKの抑制により細胞遊走が障害される。

線虫やショウジョウバエでは早期からAMPKが細胞極性を規定する因子として注目されていたが長年その器質・および分子メカニズムは不明であった。本実験からAMPKによる極性形成にはこのCLIP-170が関与することが強く示唆された。

さらにzebrafishを使った実験によりin vivoでもCLIP-170が極性形成に重要であることを証明した。

これらの発見は、ストレスにตอบสนองして活性化され解糖系などを変化させてATP産生に働くと考えられていたAMPKが、実は微小管の活性化による細胞機能全体の補強を行

っているという全く新しい分子メカニズムを明らかにした。これは細胞生物学的にも大変興味深い発見でありNature Cell Biology誌にcurrent topicsとして取り上げられた。

考察：

近年、AMPKの活性促進剤が心不全を改善すること、AMPKが虚血障害に抑制的に働くことなどが報告されているが、本発見はこれらの分子メカニズムにも深く関与することが示唆される。今後さらにこのAMPK-CLIP-170の生体内での作用が明らかとなれば、心臓特異的な保護機構の解明、治療法の開発につながると期待される。

参考文献：

Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S.

AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation.

Nat Cell Biol. 12 (6) :583-590. 2010

作成日：2011年2月10日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 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： 顧 艶 紅  ㊞
所属機関名：（独）国立成育医療研究センター研究所
所属部署名：成育政策科学研究部 職名：上級研究員
所 在 地：〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1
電 話：03 3416 0181 内線：03 3417 2694

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

中国神経管閉鎖障害高発地域における繰り返し流産する女性の甲状腺機能を含むヨード代謝及び葉酸代謝に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 顧 艶紅	職名： 上級研究員
所属機関名： （独）国立成育医療研究センター研究所	部署名：成育政策科学研究部
中国側研究者氏名： 張 霆	職名： 副所長・研究員
所属機関名： 北京市首都小児科研究所	部署名：分子免疫研究室

4. 当該研究における発表論文等

論文 “Maternal thyroid hormones protect against fetal neural tube defects in pregnant women with hyperhomocysteinemia” GU YH et al 投稿中。

論文 “Spectrum of additional congenital malformations in fetus with neural tube defects in a high occurrence area of China” GU YH et al 投稿中。

中国神経管閉鎖障害高発地域における繰り返し流産する女性の甲状腺機能を含む

ヨード代謝及び葉酸代謝に関する研究

日本側研究者氏名	顧 艶紅
所属機関名	(独) 国立成育医療研究センター 研究所 成育政策科学研究部
中国側研究者氏名	張 霆
所属機関名	北京市首都小児科研究所 分子免疫研究室

要旨

中国の山西省で神経管閉鎖障害 (NTDs) の発症率は約出生 1 万対 199 であった。さらに、この地域はかつてはヨード欠乏地域でもあったが、ヨード添加食塩の政策で、他の地域のようなヨード過剰摂取の恐れがある。山西省の山間地域では NTD 児、特に無脳児の妊娠により、繰り返し流産する女性が多かった。今回、これらの女性を対象に血清中の甲状腺ホルモン (fT_3 , fT_4)、血清甲状腺刺激ホルモン thyroid stimulating hormone (TSH)、血清総ホモシステイン (total homocysteine; tHCY) 及び尿中のヨードの排泄 (urine iodine; UI) を測定した。症例対照研究でヨード代謝を含む甲状腺機能及び葉酸代謝に関する研究を行った。甲状腺機能亢進症と思われる妊婦がいなかった。甲状腺機能低下症の妊婦を除いて解析を行った。NTD 児を妊娠していない妊婦を対照群、NTD 児を妊娠した妊婦を症例群とした。tHCY $\leq$ あるいは $>13 \mu\text{mol/L}$ の割合、UI $>250\mu\text{g/L}$ の割合及び年齢は対照群と症例群の間に有意差がなかった。tHCY $>13 \mu\text{mol/L}$ かつ妊娠 20 週以下場合は 1) 症例群より対照群の方は血清甲状腺ホルモンのレベルが有意に高かった; 2) 二項ロジスティック回帰分析で、 fT_3 、TSH、UI、年齢と妊娠週数等の因子の影響を補正した後、 fT_4 のオッズ比は 0.60 (95%信頼区間: 0.42-0.86) であり ($P=0.006$)、保護作用を示した; 3) 対照群で fT_4 サージをみられたが、症例群ではみられなかった。さらに今は血清抗甲状腺抗体、血清 hCG 等を調べているところである。

Key Words 神経管閉鎖障害、高ホモシステイン血症、甲状腺ホルモン、尿中ヨードの濃度、母子保健

緒言:

中国の山西省で神経管閉鎖障害 (NTD) の発症率は約出生 1 万対 199 であり、特徴として無脳児が多かった。主な原因は葉酸欠乏であった。さらに、この地域はかつてはヨード欠乏地域でもあったが、1996 年からの全国一斉ヨード添加食塩の政策で、他の地域のようなヨード過剰摂取の恐れがある。NTD の病態を解明するため、流産した高ホモシステイン血症の妊婦において、血清中の甲状腺ホルモン及び尿中ヨードの濃度について検討することを目的とした。

対象と方法:

対象は中国の山西省にある山間地域の妊婦計 173 人、妊娠週数は 5-40 週、年齢は 18-21 歳。病理専門医が病理診断を行った。NTD 児ではなく他の原因で人工流産治療を受けた妊婦を対照群 (90 人)、NTD 児を妊娠し、人工流産をした妊婦を症例群 (83 人) とし、対照症例研究を行った。検体を冷凍保存した。血清甲状腺ホルモンと TSH は Abbott 社の ARCHITECT® アナライザー、血清中 tHCY は酵素法、尿中ヨードの濃度は Catalytic Spectrophotometry で北京市首都小児科研究所で測定した。2007 年に公表された「妊婦甲状腺機能異常ガイドライン」(J Clin Endocrinol Metab 2007;98(8):S1-S47) に基づいて、TSH $>2.5\text{mIU/L}$ の妊婦を甲状腺機能低下症、TSH $<0.1\text{mIU/L}$ の妊婦を甲状腺機能亢進症と定義した。匿名のデータを日本で分析した。統計分析は PASW17.0

を用いて行った。文書でインフォームド・コンセントを得た。研究計画は首都小児科研究所の倫理委員会の承諾を得た。

結果：

1) 対象者の基本情報：

今回の基準では甲状腺機能低下症はみられなかったが、17.8% (16/90) の対照群の妊婦、及び22.9% (19/83) の症例群の妊婦が甲状腺機能低下症であり、両者の有意差はなかった。これらの妊婦を除いてから解析した。妊娠週数 (20 週) と tHCY ($13 \mu\text{mol/L}$) 濃度別でグループ分け、解析した。対照群と症例群の間に tHCY $\leq$ あるいは $>13 \mu\text{mol/L}$ の割合、UI $>250 \mu\text{g/L}$ の割合及び年齢には有意差がなかった。他の基本情報は表 1 で示す。

2) 甲状腺ホルモンが NTD に対する保護作用：

妊娠週数 20 週以下かつ tHCY $>13 \mu\text{mol/L}$ の妊婦では、症例群より対照群の方は血清甲状腺ホルモンのレベルが有意に高かった (表 1)；二項ロジスティック回帰分析で fT_3 、TSH、UI、tHCY、年齢と妊娠週数等の因子の影響を補正した後、 fT_4 のオッズ比は 0.60 (95%信頼区間：0.42–0.86, $P=0.006$) であり、保護作用を示した；対照群で fT_4 サージをみられたが、症例群ではみられなかった；tHCY $\leq 13 \mu\text{mol/L}$ の妊婦と比べて、パターンが異なった (図 1)

考察：

妊娠週数 20 週以下かつ tHCY $>13 \mu\text{mol/L}$ の妊婦では NTD に対する保護作用がみられた。詳細なメカニズムはホモシステイン代謝関連酵素を介すると思われる。妊婦健診の際に、血中ホモシステインと甲状腺ホルモンのレベルを同時にモニターリングする必要がある。さらに 1) 抗甲状腺抗体 TPOAb、TGAb、及び既往歴等を調べ、甲状腺疾患のハイリスク妊婦の割合を比較すること；2) 甲状腺疾患のハイリスク妊婦を取り除いて、もう一度検証すること；3) この地域の妊婦のために妊娠初期、中期と後期に応じた甲状腺機能測定値のそれぞれの正常範囲を検討することが必要である。

参考文献：

1. Abalovich M, Amino N, Barbour LA, Cobin RH, De Groot LJ, Glinoe D, Mandel SJ, Stagnaro-Green A. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Aug;92(8 Suppl):S1–47.
2. 顧 艷紅、張 霆、加藤忠明：神経管閉鎖障害の発症要因と予防：中国現地調査と文献考察, 小児保健研究 Vol69 : 85–90 (2010).
3. Hustad S, Nedrebø BG, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Ulvik A, Lien EA. Phenotypic expression of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and flavin cofactor availability in thyroid dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004 Oct;80(4):1050–7.
4. Zhang BY, Zhang T, Lin LM, Wang F, Xin RL, Gu X, He YN, Yu DM, Li PZ, Zhang QS, Zhao J, Qin YF, Yang XF, Chen G, Liu JF, Song XM, Zheng XY. Correlation between birth defects and dietary nutrition status in a high incidence area of China. *Biomed Environ Sci.* 2008 Feb;21(1):37–44.
5. Zhang T, Xin R, Gu X, Wang F, Pei L, Lin L, Chen G, Wu J, Zheng X. Maternal serum vitamin B12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. *Public Health Nutr.* 2009 May;12(5):680–6.

注：2010 年 9 月 17 日「第 57 回日本小児保健学会」(新潟市)ポスター発表。また、本論文 “Maternal thyroid hormones protect against fetal neural tube defects in pregnant women with hyperhomocysteinemia” GU YH et al は投稿中。

作成日：2011 年 3 月 14 日

表 1. 20 週以下かつ TSH 値が 2.5mIU/L 以下の対象者の甲状腺ホルモンと尿中ヨードの値

tHcY≤13 μmol/L						tHcY>13 μmol/L					
fT3 (pg/ml)			fT4 (ng/dl)			fT3 (pg/ml)			fT4 (ng/dl)		
CTL	NTD		CTL	NTD		CTL	NTD		CTL	NTD	
妊娠週数≤20 週						CTL, n=23; NTD, n=18					
中央値	4.6	4.6	14.7	13.6	148.2	5.5	4.5	18.6	12.5	200.4	235.4
範囲	3.8-8.1	2.9-5.9	9.9-37.7	12.3-18.7	45.0-525.0	3.5-8.7	3.1-4.9	11.1-34.9	9.0-17.0	46.0-855.0	60.0-839.0
Mann-Whitney の U 検定の P 値*	-	-	-	-	-	P 値=0.002		P 値=0.000		-	-
妊娠週数>20 週						CTL, n=8; NTD, n=19					
中央値	4.1	4.2	12.4	13.8	215.3	4.3	4.2	14.9	13.8	161.2	185.0
範囲	2.9-4.8	3.6-5.3	9.8-16.4	11.0-17.0	54.0-609.0	3.8-5.8	3.1-5.8	11.8-18.4	9.5-18.2	49.0-782.0	57.0-612.0
Mann-Whitney の U 検定の P 値*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CTL:対照群 ; NTD : 症例群。 *P<0.05 のみの項目を表示してある。

図 1 の説明 : CTL : 対照群、NTD : 症例群。

A: 妊娠週数 20 週以下かつ tHcY≤13 μmol/L 対照群と症例群の fT₄ (中央値) の時系列曲線。

対照群において、妊娠 11-13 週と 17-20 週に fT₄ サージがみられたが、対照群において、fT₄ サージがみられなかった。

B: 妊娠週数 20 週以下かつ tHcY>13 μmol/L 対照群と症例群の fT₄ (中央値) の時系列曲線

対照群において、妊娠 5 週と 14-19 週に複数の fT₄ ピークがみられたが、tHcY≤13 μmol/L 対照群の fT₄ サージパターンと異なった。

症例群において、18-20 週に小さい fT₄ ピークが一つだけみられた。

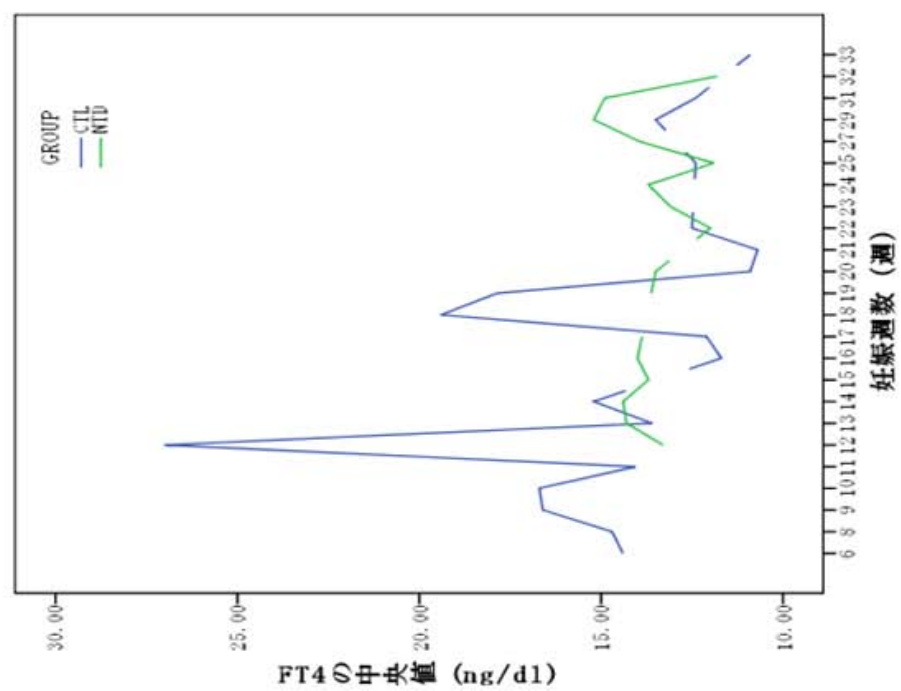


図1A

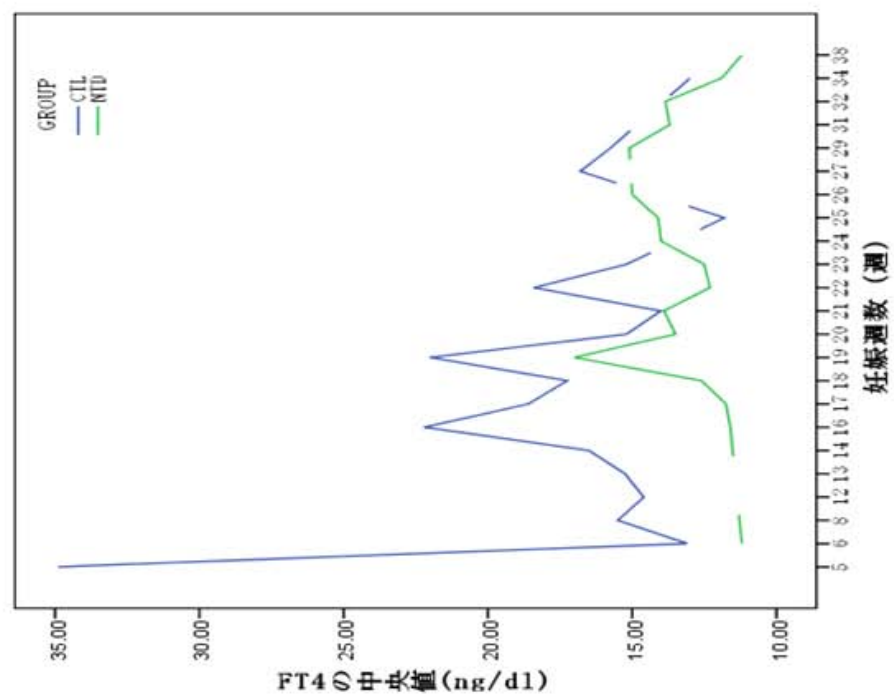


図1B

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 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： 加藤 直也
所属機関名： 東京大学医科学研究所
所属部署名： 疾患制御ゲノム 職名： 特任准教授
医学ユニット
所 在 地： 東京都港区白金台 4-6-1
電 話： 03-3443-8111 内線： 72335



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

C型肝炎ウイルスコア蛋白変異と発癌および抗ウイルス治療効果

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 加藤 直也	職名： 特任准教授
所属機関名： 東京大学医科学研究所	部署名： 疾患制御ゲノム 医学ユニット
中国側研究者氏名： 王 岳	職名： 研究員
所属機関名： 中国疾病対策予防センター	部署名： ウイルス肝炎

4. 当該研究における発表論文等

学会発表

加藤直也、室山良介、五藤 忠. C型肝炎ウイルスコア領域 70 の置換により

ペグインターフェロン/リバビリン併用療法に対する感受性は変わるか？ 第

46 回日本肝臓学会総会 2010/5/27-28 山形

C型肝炎ウイルスコア蛋白変異と発癌および抗ウイルス治療効果

日本側研究者氏名	加藤 直也
所 属 機 関	東京大学医科学研究所 特任准教授
共同研究者氏名	李 雯雯、胡 中傑、室山良介、古渡礼恵
中国側研究者氏名	王 岳
所 属 機 関	中国疾病対策予防センター 研究員

要 旨

C型肝炎のペグインターフェロン・リバビリン併用治療抵抗性に最も関与しているウイルス側因子は、コア蛋白第 70 番のアミノ酸変異である。われわれはコア蛋白第 70 番目アミノ酸の野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスのリアルタイム PCR アッセイによる個別定量法を確立し、それぞれのダイナミクスを詳細に検討した。

まず、1 型高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者のシリーズ血清を用いて、治療前・中・後の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスのダイナミクスを検討した。次に、治療前の野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスの比率と治療効果につき検討した。

治療前血清においては、36 例中 26 例 72%が野生型と変異型の混在型であった。その比率は治療中も変化せず、野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスの治療に対する初期感受性は同等であった。治療前に野生型優位であった再燃例では、治療後のウイルス再出現時早期（治療後第 4 週目）には変異型が優位に変化しており、その後野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスの比率は治療前と同様に野生型優位に復した。また、変異型 C 型肝炎ウイルスの比率が高くなるほどウイルス学的著効は得られにくかった。

多くの患者においてコア蛋白アミノ酸第 70 番目の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスが混在しており、変異型 C 型肝炎ウイルスの比率が高い患者ほどペグインターフェロン・リバビリン併用療法に抵抗性である。変異型 C 型肝炎ウイルスは排除されにくいと考えられた。

Key Words C型肝炎ウイルス、コア蛋白、アミノ酸置換、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法、治療効果

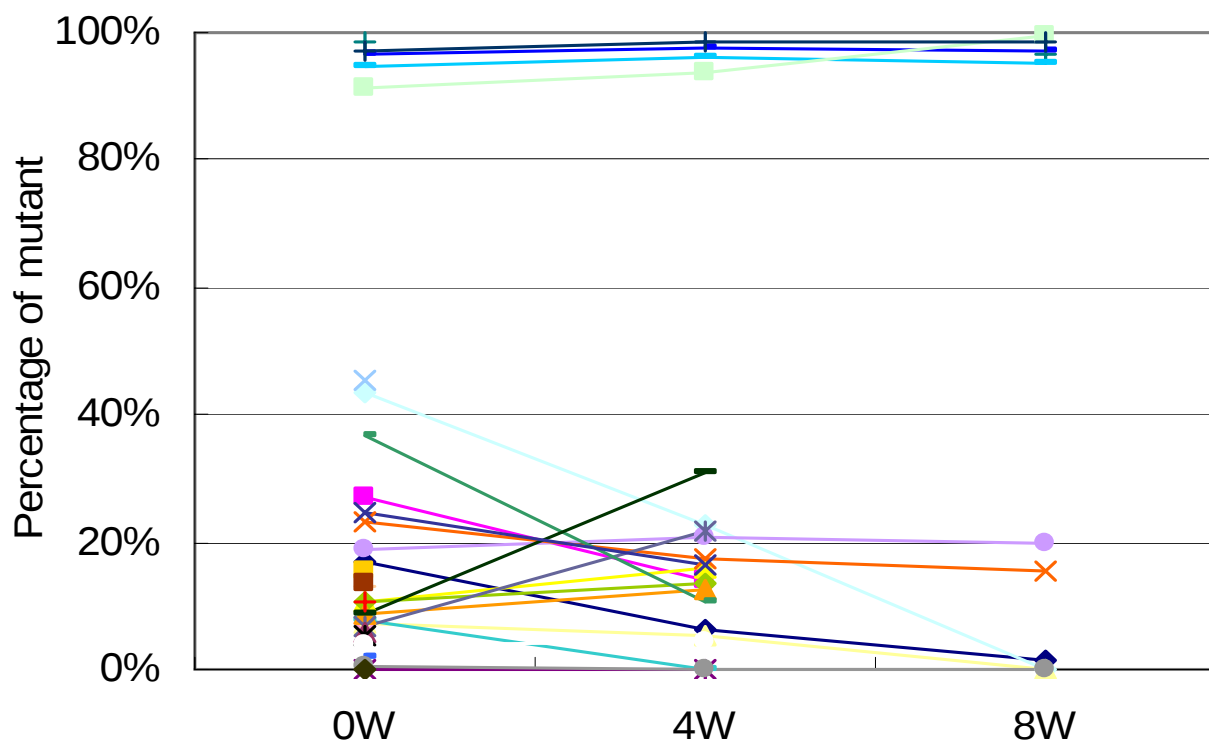
緒 言：

世界中には実に 1 億 7 千万人もの C 型肝炎ウイルス感染者がいるとされる。日本の国民の約 2%、また、中国の国民の約 3%が C 型肝炎ウイルスに感染している。C 型肝炎ウイルスは、急性・慢性肝炎のみならず、肝硬変・肝癌の主要な原因である。したがって、日中両国にとって、C 型肝炎は健康上の大いなる脅威となっている。C 型慢性肝炎に対しては、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法が標準治療として行われているが、その奏功率は最も多い遺伝子型 1 型の C 型肝炎ウイルスに対しては、たかだか 50%に過ぎず、より治療効果を上げる方策が必要である。

最近になり、治療抵抗例では C 型肝炎ウイルスコア蛋白の第 70 番目アミノ酸が変異していることが多いことが報告された。また、このコア蛋白アミノ酸変異は治療抵抗性のみならず、肝発癌とも関連していることが報告された。実際に、われわれは本アミノ酸変異が肝癌と関連していることをグローバルデータベースを用いた解析で確認した。

そこで、まず、コアアミノ酸第 70 番目変異の高感度検出法を開発し、ペグインターフェロン・リバビリン

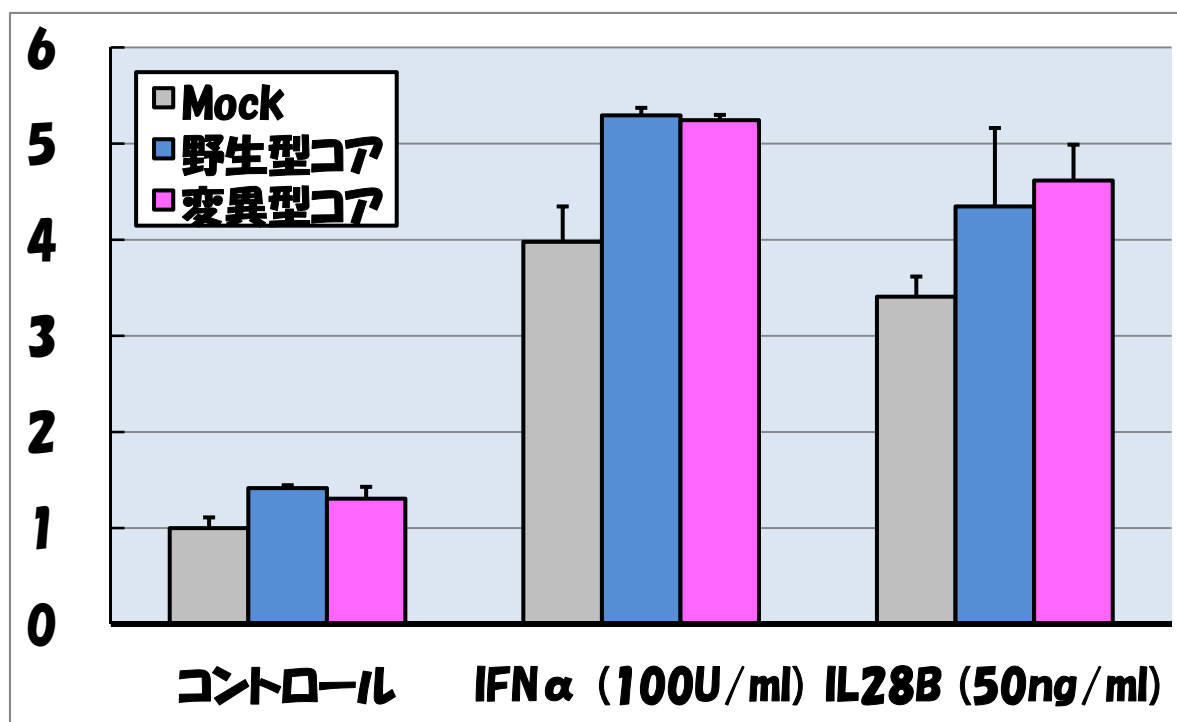
しかしながら、治療経過中の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスのダイナミクスを検討すると、治療経過中の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスの比率は変化せず、野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスのペグインターフェロン・リバビリン併用療法に対する感受性は少なくとも治療初期には同等であることが判明した。



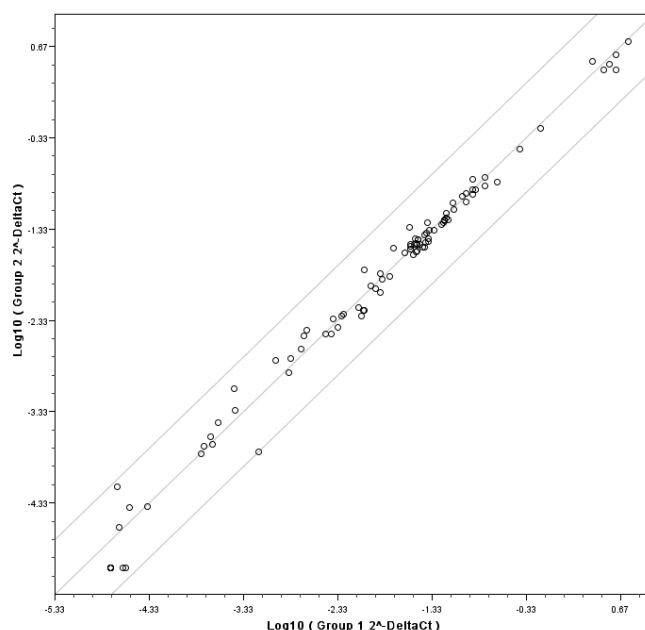
しかしながら、治療前に野生型優位であった再燃例では、治療後のウイルス再出現時早期（治療後第 4 週目）には変異型が優位に変化しており、その後野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスの比率は治療前と同様に野生型優位に復していた。

3) 変異型が優位な場合と野生型が優位な場合では変異型 C 型肝炎ウイルスに 2 塩基の有意な違いがあり、これらはウイルス増殖能に関連している可能性が考えられた。

4) 野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスコア蛋白はインターフェロンシグナル伝達系を活性化する傾向にあったが、両者の及ぼす影響には差がなかった。また、同様に、インターロイキン 28B シグナル伝達系に野生型および変異型コア蛋白が及ぼす影響には差がなかった。



5) 野生型および変異型コア蛋白がアポトーシスに及ぼす影響には差がなかった。



考 察：

ほとんどの患者においては、C型肝炎ウイルスコア蛋白第70番目アミノ酸の野生型と変異型が混在していた。変異型優位の症例ではペグインターフェロン・リバビリン併用療法に治療抵抗性であるにもかかわらず、同一患者内における野生型と変異型C型肝炎ウイルスのダイナミクスには違いがなかった。しかしながら、再燃時には一時的に変異型が優位となり、変異型C型肝炎ウイルスは排除されにくいことが明らかとなった。

なぜある患者では変異型が優位になるのかについては、コア領域の変異と関連している可能性が示唆された。

しかしながら、変異型コア蛋白のペグインターフェロン・リバビリン併用量に対する治療抵抗性を生ずるメカニズム、あるいは肝発癌に関わるメカニズムについては、なお検討の必要がある。

参考文献：

1. Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N: Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. Cancer Sci Vol 100, 2465-2468 (2009)

注：本研究は、2010年5月27日『46回日本肝臓学会総会』にて口演発表、2010年8月1日『BIT's 1st Annual Inaugurate Symposium of Hepatitis (SHV-2010)』にて口演発表、2010年9月10-14日『17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses』にてポスター発表、2010年10月28日『第1回疾患医科学ミニシンポジウム』にて口演発表、2010年12月17日『The APASL 7th Single Topic Conference “Hepatitis C Virus”』にてポスター発表、2011年2月18日『The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)』にて口演発表。

作成日：2011年3月14日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011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： 近藤格

所属機関名： 国立がん研究センター

所属部署名：創薬プロテオーム研究分野

所 在 地：東京都中央区築地5-1-1

電 話：03-3542-2511

職名：分野長

内線：3004



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

プロテオーム解析による肝細胞癌の病態解明に基づく個別化医療実現のための新
規診断技術の開発および創薬シーズの探索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：近藤格

所属機関名：国立がん研究センター

中国側研究者氏名：樊 嘉

所属機関名：復旦大学

職名：研究職、分野長

部署名：創薬プロテオ
ーム研究分野

職名：外科医、教授

部署名：中山医院

4. 当該研究における発表論文等

1. 第8回 日本プロテオーム学会 シンポジウム 「Cancer Proteomics for Biomarker Development」 近藤格
2. 第51回 日本癌学会学術総会 シンポジウム 「がんプロテオーム解析によ

プロテオーム解析による肝細胞癌の病態解明に基づく 個別化医療実現のための新規診断技術の開発および創薬シーズの探索

研究者氏名：近藤 格

所属機関：国立がん研究センター 創薬プロテオーム研究分野

研究者氏名：樊 嘉

所属機関：復旦大学中山医院外科

共同研究者：黄成、バイオマトリックス研究所

要旨

肝細胞癌は本邦でも中国でも悪性腫瘍による死亡原因としては主要な位置を占めている。肝細胞癌の患者の予後は一般にきわめて不良であり、新しい予防、診断、治療法の開発が求められている。遺伝背景を共有する日本と中国とが協力し、肝細胞癌の治療成績の向上を目指した研究にあたることは、国民の健康福祉の向上のみならず、両国の将来をともに形作ることにもつながるため重要な課題である。国立がん研究センターでは、かねてから復旦大学中山医院と共同で肝細胞癌の治療成績の向上を目指した基礎研究を行ってきた。臨床的には肝細胞癌では手術後の再発が大きな問題となっている。再発する臓器としては肝臓がもっとも多く、早期に肝内再発（転移）を来す症例の予後はきわめて不良である。肝内再発の分子機構を解明し、肝内再発を予測して未然に防いだり、肝内再発を見越した治療戦略を立てることによって、肝細胞癌の治療成績の向上が見込まれると考えられている。

国立がん研究センター研究所では、悪性腫瘍を対象とした大規模なプロテオーム解析が行われてきた。大型の二次元電気泳動装置や質量分析装置を用いた一般的なプロテオーム解析に加え、多数の抗体を用いた解析を行っていることが特色である。具体的には、転写因子やアポトーシス構成因子など、悪性腫瘍の発生や進展に関わることがわかっている分子経路に含まれているタンパク質について抗体を入手し、ウェスタンブロッティングを行うことで発現解析を行うというものである。一般的なプロテオーム解析では微量なタンパク質（たとえば転写因子など）を観察することはきわめて困難であり、しかも特定の分子パスウェイに含まれるタンパク質に的を絞って解析することはほぼ不可能である。しかしながら、抗体を用いた解析であれば可能である。たとえば、目的とする分子パスウェイに含まれるタンパク質すべてについて一つずつ抗体を使って調べることでパスウェイワイドな解析が可能になる。国立がん研究センター研究所ではいくつかの学術機関や民間企業との共同研究によって多数の抗体が使用できる環境にあり、このたびの研究ではその抗体を用いた解析を実施した。具体的には約600種類の核内因子に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施した。

復旦大学中山医院は、中国でもっとも肝細胞癌の切除術が多く行われている医療機関であり、

年間約2000症例が肝細胞癌の手術を受けている。臨床のみならず手術検体を用いた基礎研究でも実績をあげている。術後の追跡調査も十分に行われており、臨床情報を用いた研究が可能である。

本研究では、国立がん研究センターのユニークなプロテオーム解析システムと復旦大学の臨床検体を用いて、肝細胞癌の早期再発に関わる核内因子を網羅的に調べた。結果的に、早期再発に関わると考えられる核内因子24種類、発癌に関わると考えられる核内因子148種類と特定した。免疫染色は中国国内でしかできないため、現在復旦大学にて組織アレイを用いた解析を実施中である。

Key Words: hepatocellular carcinoma, proteomics, western blotting, early intrahepatic recurrence, nuclear factors

緒言

肝細胞癌の治療成績の向上のための基礎研究として、早期の肝内再発に着目した研究はきわめて重要である。肝細胞癌は予後不良な疾患であるが、早期に再発を来す症例の予後はきわめて不良であること、さらに早期に再発を来す症例が多いこと、などからである。本研究では、国立がん研究センターのプロテオーム解析技術と、復旦大学中山医院の手術検体および臨床情報を用いた解析を実施した。

対象と方法

対象としたのは、復旦大学中山医院において肝細胞癌の根治切除術を施行された症例であり、手術検体を用いた解析を行った。手術検体としては、腫瘍組織50検体および非腫瘍組織50検体を使用した。手術検体はかならずしも同一の症例に由来するものだけではない。臨床検体を医学研究の目的に使用することについて文書による同意を提供者から得ている場合にのみ、検体を使用した。また、本研究は、復旦大学の倫理委員会の承認および国立がん研究センターの倫理委員会の承認を得て実施した。

発現解析の目的で、579種類の市販モノクローナル抗体を使用したウェスタンブロッティングを行った。国立がん研究センターと共同研究契約を締結しているバイオマトリックス研究所の抗体を使用した。手術検体より高濃度のウレアを含むバッファー（7M urea, 2M thiourea, 3% CHAPS, 1% Triton X-100）にてタンパク質を抽出した。SDS-PAGEによってタンパク質を分子量にしたがって分離した。分離はディスポーザブルの市販のゲル（ATTO社製）を使用した。予測される分子量にしたがってゲルの濃度を決定した。次に、分離されたタンパク質を電気的に膜に転写した。転写されたタンパク質に対して上記の抗体を反応させ、化学発光（ECL-Plus, GE）によって抗原抗体複合体を検出した。検出系にはLAS-3000（富士フイルム）を使用した。検出されたシグナルの定量を画像解析ソフトを用いて行った。発現の有意性の基準は、p値が0.05より小さく、しかもグループ間の平均の差が2倍より大きいこととした。

組織アレイは復旦大学中山医院で作成されたものを使用した。上記のウェスタンブロッティングに使用した抗体を用いて組織アレイを対象に免疫染色を行った。免疫染色の判定は復旦大学中山医院の病理医および外科医が行い、その結果の確認を国立がん研究センターの共同研究者とともに行った。

結果

手術後2年以内に再発を来した25症例と、2年以上の観察期間中に再発を来していない25症例の比較を行った。腫瘍組織どうしの比較においては、21種類の核内因子が有意な発現差を示していた。同様の比較を非腫瘍組織どうしに行うと、3種類の核内因子が有意な発現差を示していた。

非腫瘍組織（50検体）と腫瘍組織（50検体）の比較を同様にウェスタンブロッティングで行い、148種類の核内因子が有意な発現差を示していることがわかった。

次に、同定された核内因子が肝細胞癌および非腫瘍組織のどの細胞に発現しているかを確認する目的で、組織アレイを用いた解析を行った。まず、再発に関わるとして同定された上気の24種類の核内因子、腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差が認められた26種類の核内因子について免疫染色を実施した。すべての抗体が免疫染色にて反応性を示したわけではないが、ウェスタンブロッティングと同様な発現差を示す核内因子が同定された。さらに興味深いことに、ウェスタンブロッティングにおいて腫瘍組織で発現が高いとして同定された核内因子の中には、腫瘍内の血管内皮細胞に特異的に発現するものが含まれていることが分かった。

考察

本研究において、肝細胞癌の再発に関わる核内因子、発癌に関わると考えられる核内因子を同定することができた。核内因子はヒトゲノム上には約2000種類がコードされていると考えられている。我々は今回、その約3分の1を調べたことになる。このような解析は抗体を用いてのみ可能であるが、同様の解析が実施できる研究室は国立がん研究センター以外には国内外に存在しない。また、今回は臨床情報が付随した100検体の手術検体を使用した。国内では肝細胞癌の手術数は減っており、再発の情報が付加されたこれだけの数の手術検体を研究に使用することはかなり困難である。したがって、本研究は日本と中国のそれぞれの長所を活かした研究であると言える。

核内因子の異常がどのような遺伝子発現の異常を引き起こし、ひいては腫瘍細胞の形質に影響を与えているのかを調べるのが今後の課題である。その目的では、siRNAを用いて対象とする核内因子の発現を低下される実験を肝細胞癌の培養細胞を用いて実施しているところである。また、同定された核内因子がどのように臨床上有用であるのかを調べるのが最終的な目的であり、そのためには上記の機能解析の実験に加え、さらに多数症例にあたる必要がある。

今回の研究成果をもとにして、現在、復旦大学において組織アレイを用いた大規模な検証実験を行っているところである。対象とする核内因子は上記の50種類だけでなく、今回の解析で

発現差があると認められたものすべてである。

日本と中国との共同研究が、本研究助成金をもとにさらに発展し、両国の共同研究の成果として肝細胞癌の治療成績の向上を宣言できる日を目指してこれからも研究に励みたいと考えている。

2011年3月15日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 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 下野 勉
所属機関名： 岡山大学大学院
所属部署名：医歯薬総合研究科 職名：特命教授
所 在 地：岡山市鹿田町 2 - 5 - 1
電 話：086-235-7151 内線：6715

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

妊婦および乳幼児の歯科保健に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：下野 勉	職名：特命教授
所属機関名：岡山大学大学院	部署名：医歯薬学総合研究科
中国側研究者氏名：葛 立宏	職名：教授
所属機関名：北京大学口腔医学院	部署名：小児歯科

4. 当該研究における発表論文等

発表予定論文；・日中両国における妊婦の歯科保健の比較

・乳幼児歯科健診における妊婦歯科教室の効果

妊婦および乳幼児歯科保健に関する研究

研究者氏名	下野 勉
日本研究機関	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
中国研究機関	北京大学口腔医学院 小児歯科
共同研究者名	教授 葛 立宏

要旨

「暮らしの病」と呼ばれるがごとく、齲蝕症の発病に至るまでの過程に、日々の生活習慣が大きく影響を及ぼしている。従って、齲蝕予防対策を講じるためには、生活リズムの基礎が形成される乳幼児期における養育者と子供の行動科学的要因を分析する必要がある。また、細菌学的要因としての齲蝕原性細菌が伝播し、発病に至る過程を解明することは公衆衛生学的にもきわめて重要である。

他の先進国と比べて少子化傾向の著しい日本と、一人っ子政策の進む中国においては、小児期から成人期にかけてのライフサイクルの中でも乳幼児期に齲蝕が急増しており、その発生に関与する様々な要因を早期に見出し、適切な歯科のアプローチを行うことが望まれる。

そこで本研究では 2010 年度に大阪府交野市保健センターと中国北京市海淀区婦幼保健院で行われた妊婦歯科保健指導において妊婦の齲蝕細菌学的要因を齲蝕活性度試験により調べ、母親の齲蝕発生に関する生活習慣をアンケート調査により調べ、両国の結果を比較検討したところ、齲蝕活動性試験カリオスタットで調べた齲蝕活性度は、ハイリスク者の割合が日本人妊婦が中国人妊婦と比べて約 2 倍大であり、自分は虫歯が多いという自覚症状を有する割合は、日本人妊婦が中国人妊婦とは比べて 3 倍以上も大であった。しかし未処置の虫歯の存在に関する意識は中国、日本の間で差が認められなかった。齲蝕原性細菌の伝播に関係すると思われる噛み与えをする危険性に関しては、中国人妊婦のほうが少ない傾向がみられた。

Key Words 妊婦、歯科保健、カリオスタット、齲蝕活動性、アンケート

諸言：

近年、“80 歳まで自分の歯を 20 本以上持とう”という 8020 運動のスローガンのもと、各地で運動歯科保健事業への取り組みが展開されている。しかし、80 歳で平均残存歯数 5.1 本の現状を考えると、より早期からの継続的な歯科健診体制の確立が望まれる。そこで、出生前からの歯科のアプローチに着目し、大阪府交野市において妊婦歯科教室を実施し、妊婦自身の口腔内状況の改善と出生した乳幼児の齲蝕発生の抑制に著しい成果を上げてきた。今回、一人っ子政策が進み、乳幼児の養育方法の変化に伴い、乳幼児の重症齲蝕が散見される中国において、その予防策の一つとして、中国北京市で日本と同じ形式の妊婦教室を行い、妊婦の保健指導に用いたアンケートとカリオスタット検査結果を分析し、日本と中国の比較検討を行った。

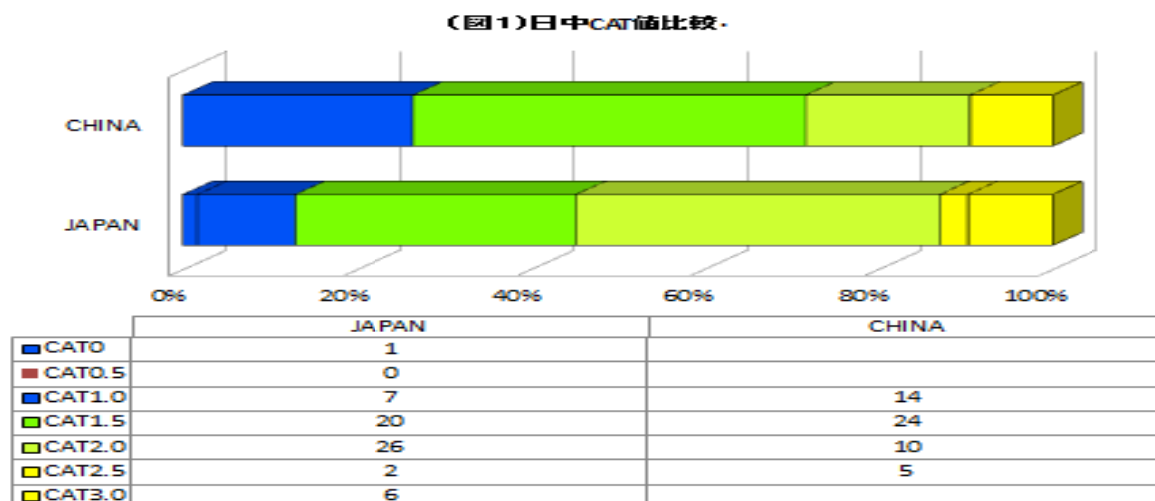
対象と方法：

2010 年 4 月から 2011 年 3 月までに日本、大阪府交野市保健センターと中国、北京市海淀区婦幼保健院で行われた妊婦歯科保健教室を受講した妊婦、日本側 62 名、中国側 53 名にたいしてビデオやスライドを用いて集団指導を実施し、初回の産科教室の時にいったカリオスタット検査と生活習慣に関するアンケートの結果に基づき、間食や生活習慣の改善、歯磨き指導を行い、妊婦自身の口腔健康観の向上を図った。

結果：

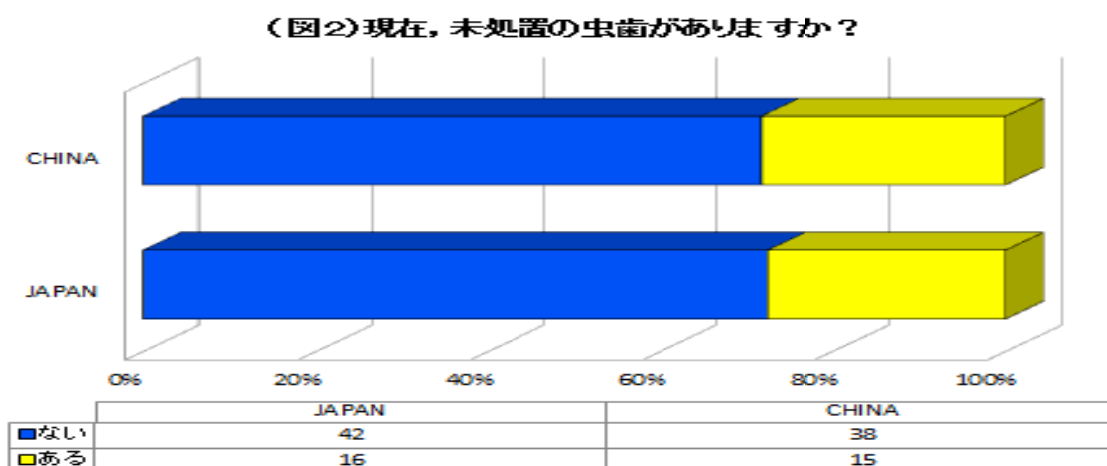
日本人妊婦と中国人妊婦の齲蝕活性度の比較

交野市の妊婦の齲蝕活性度の分布は北京市の妊婦の齲蝕活性度の分布に比べてハイリスク者の分布が多く、CAT値 2.0 以上(肉眼判定；黄緑色、pH；4.7 以下)のハイリスク者の割合は交野市では 54.8%に対して北京市では 23.8%日本人妊婦のほうがハイリスク者の割合が約 2 倍高率であった（図 1）

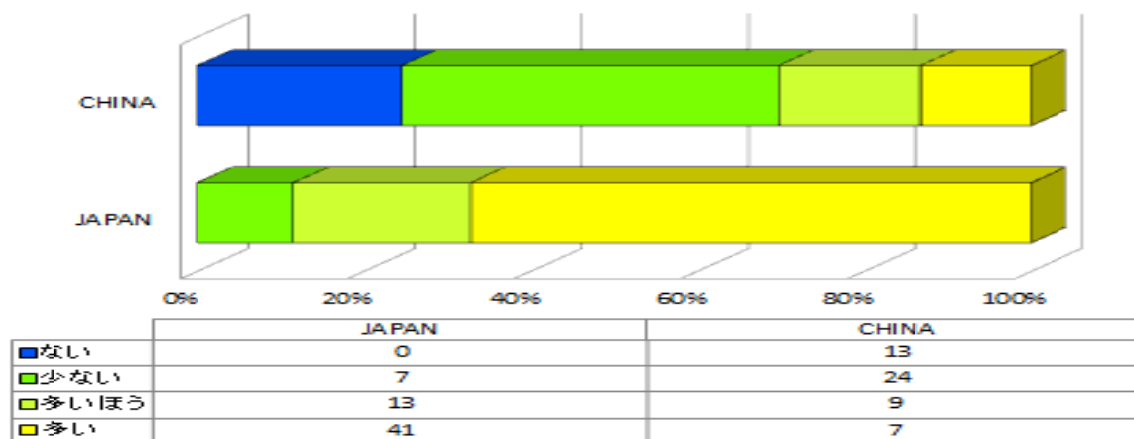


口腔内症状に関する質問

未処置の虫歯の有無に関する質問に対しては、日本では 33%、中国では 28.3%が現在未処置の虫歯を有している、と答えており、回答の分布には差を認めなかった（図 2）が自分は虫歯が多いほうだと思うかの質問に対しては、日本で 67.2%、中国で 13.2%と 5 倍以上の回答率の差を認めた（図 3）。



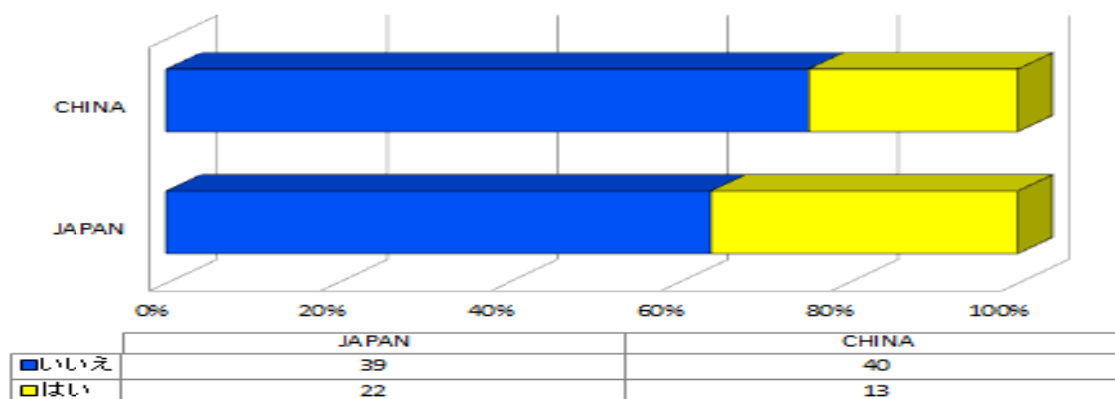
(図3) 自分は虫歯が多いほうだと思いますか？



間食に対する質問

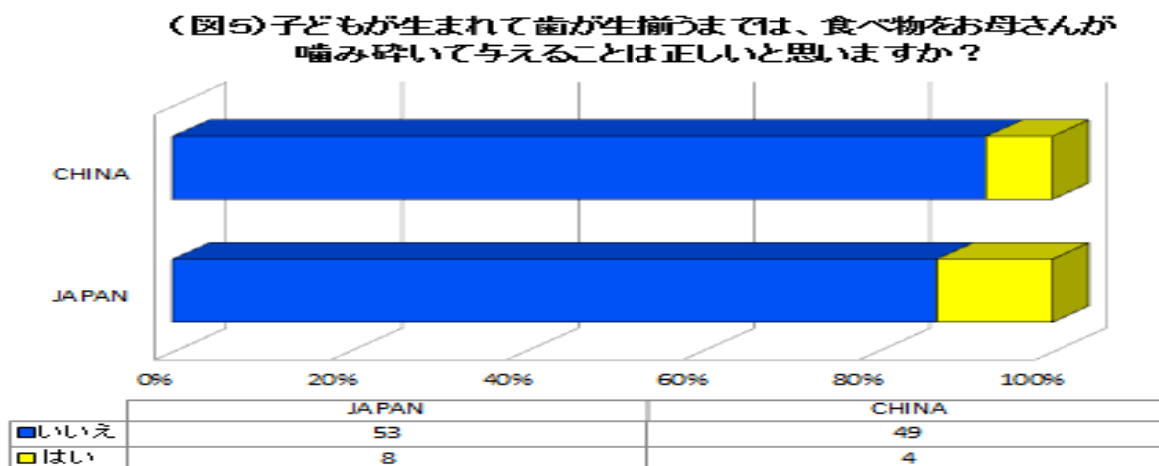
飴やチョコレート、ジュースなど齲蝕誘発性の高い食品をいつも買い置きしているかの質問に対して日本では 36.1%であるのに対して、中国では 24.5%と日本のほうが高い回答率を示した (図 4)

(図4) あめ、チョコレート、ジュース(コーラ、紅茶等)は常に買い置きしていますか？



噛み与えに関する質問

歯の萌出期から始まる離乳食を育児担当者が食品を噛み砕いて児に与えることがあるが、もし、育児担当者が齲蝕原性細菌を有していて、しかもショ糖含有食品が口腔内に存在している状態であるとすれば噛み与えは非常に危険な行動であり、齲蝕原性細菌の伝播が危惧される行動である。そこで、子供が生まれて歯が生えそろうまでは、食べ物をお母さんが噛み砕いて与えることは正しいと思いますかという質問を行ったところ、日本では13.1%が中国では7.5%が正しいと答えており、日本のほうが約2倍高い割合が示された。



考察：

2010年4月から2011年3月までに日本大阪府交野市保健センターと中国北京市海淀区婦幼保健院で行われた妊婦歯科保健指導において採取した齲蝕活性度試験（カリオスタット）の結果とアンケート調査の結果を比較検討したところ、カリオスタットで調べた口腔内の齲蝕細菌の酸産生能力から見た齲蝕活性度（CAT値）の分布は日本人妊婦のほうがハイリスク者の割合が約2倍であり、自覚症状としては中国人妊婦の3倍以上の割合の日本人妊婦が自分は虫歯が多いほうだと答えている。しかし未処置の虫歯の存在に関する意識は中国、日本の間で差が認められなかった。すなわち、自分は虫歯が多いほうだと思っている人の中での未処置歯を持っている人の割合は中国人のほうが高く、日本人のほうが処置率の高いことが窺われる。虫歯の要因として考えられるアンケート項目では菓子類の買い置きは中国のほうが少なく、また、出生後の育児の中で見かけられる食物を母親が噛み砕いて与える齲蝕原性細菌の伝播につながるリスク行動も中国人妊婦のほうが少ない傾向がみられた。人口規模の大きな中国においては例え少しの虫歯増加も医療需給バランス壊すことになる。急激な増加しつつある中国の乳幼児を対象としてスクリーニングを行い、ハイリスク者を重点的に教育指導を行うことで、重症齲蝕を持つ乳幼児の発生を抑制できる可能性が示唆される。虫歯水を経験してやっと最近乳幼児の虫歯発生の減少の兆しがみられる日本の経験をもとにして、日中間での協力を益々さかんにする必要性がある。

参考文献：

1. 下野勉 壺内智郎 中村由貴子 福島康祐 岡崎好秀：口腔衛生会誌 J.Dent. Hlth.49:544-545,1999
2. 山岡瑞佳 壺内智郎 中村由貴子 岡崎好秀 下野勉：口腔衛生会誌 J.Dent. Hlth.51:572-573,2001

作成日：2011年3月13日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 3 月 4 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： 吉成 正雄

所属機関名： 東京歯科大学

所属部署名：口腔科学研究センター

口腔インプラント学研究部門

所 在 地：千葉県千葉市美浜区真砂 1-2-2

電 話：043-270-3536

職名：教授

内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

チタン表面改質による即時荷重インプラントシステムの開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 吉成 正雄

職名：教授

所属機関名： 東京歯科大学

部署名：口腔科学研究センター

中国側研究者氏名： 魏 建華

職名：講師

所属機関名： 第四軍医大学口腔医学院

部署名：口腔外科

4. 当該研究における発表論文等

第 32 回日本バイオマテリアル学会（2010 年 11 月 30 日、広島）、シンポジウム

第 3 回口腔先端応用医科学会議（2011 年 1 月 22 日、東京）、招待講演

5. 成果の概要

現在、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献する即時荷重インプラントを開発する要求が高まっており、チタンに生体活性やオッセオインテグレーションを向上させる様々な表面改質法

チタン表面改質による即時荷重インプラントシステムの開発

研究者氏名	魏 建華
中国所属機関	第四軍医大学口腔医学院
日本研究機関	東京歯科大学 口腔科学研究センター
指導責任者	教授 吉成正雄
共同研究者名	三浦 直, 田辺耕士, 江黒 徹

要 旨

即時荷重インプラントは、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献することから、チタンに生体活性を向上させる表面改質法により本試システムを実現する試みがなされているが、最適な表面改質法は未だ明らかになっていない。本研究は、インプラント表面の濡れ性が細胞の初期接着及びその後の細胞動態に重要な役割を果たすことから、チタン表面の濡れ性に及ぼす表面形状と表面性状を変化させた表面処理、ならびに保存条件の影響を明らかにすることを目的とした。粒度の異なるアルミナブラスト処理および酸処理を行った後、酸素プラズマ処理(O₂plasma)、紫外線照射処理 (UV)、過酸化水素処理(H₂O₂)が施され、濡れ性（水に対する接触角）を計測した。その後、保存条件が表面親水性の持続性に及ぼす影響を調査した。さらに、それらの表面処理が骨芽細胞の動態に及ぼす影響を調査した。

表面形状に関し、ブラスト処理後に酸処理を施した条件で接触角がほぼゼロである超親水性を示した。表面性状に関し、O₂plasma 処理、UV 処理を施した試料は全ての表面形状で超親水性を示した。この親水性は大気中保存で急速に失われたが、水中保存では超親水性を維持した。また、超親水性表面は骨芽細胞の増殖、分化を促進することが明らかとなった。以上より、早期骨形成に寄与するべく親水性を得るための表面形状と表面性状を制御する処理法、また親水性を持続する保存法が明らかとなった。

Key Words : 歯科インプラント, チタン, 酸素プラズマ, 紫外線照射, 骨芽細胞

緒 言 :

インプラント骨接触部へ骨芽細胞の早期接着・増殖あるいは分化を促す環境を作り出すことは、オッセオインテグレーションを早期に実現するための重要な因子の一つである。細胞のインプラントへの接着、増殖、分化はインプラント表面の性質、すなわち表面形状 (surface topography) および表面性状 (surface physicochemistry) に影響される。表面形状は細胞の接着、伸展、配列、集簇に大きく影響するばかりではなく、細胞の分化・発現形態に重要な役割を与えることはよく知られている。一方、表面性状は、インプラントとタンパクや細胞の吸着や接着に影響を与える。表面の性状を決定する物理化学的な因子は表面エネルギー（濡れ性、接触角などで評価）と表面荷電（ゼータ電位、等電点などで評価）であり、これらの性質は表面官能基の形成情況に支配される。

近年、表面濡れ性が骨芽細胞の動態、ひいてはオッセオインテグレーションに影響を及ぼすことが指摘され、親水性を付与したインプラントも市販されている。親水性と細胞接着の関係では、親水性が大きな表面で細胞接着性が増大傾向にあることが報告されている。さらには、チタン表面への低温プラズマ処理（グロー放電）による親水性処理によって、各種細胞の初期接着性や分化特性が向上することが報告されている。我々は、酸素プラズマ処理により創製された超親水性表面は骨芽細胞、線維芽細胞の初期接着の促進に有効であることを報告した^{1,2)}。

親水性を付与する方法として、低温プラズマ法（グロー放電処理）、紫外線 (UV) 照射法、過酸化水素水 (H₂O₂) 浸漬法などが提案されている。低温プラズマ法は、低温でプラズマ（電離状態）をつくりだす処理法であり、

表面に官能基を導入し表面エネルギーや表面荷電などの表面性状が制御できることから、生体材料への応用が拡大している。UV 照射法は、チタン酸化物の光触媒効果によりチタン表面に親水性を付与し、骨芽細胞の増殖、分化に有効に働くことが報告されている。H₂O₂ 浸漬法は、主に整形外科領域で提案されてきた処理法であり、表面に水酸基を導入することにより親水性を付与すると云われている。

一方、各種処理により得られた親水性はその後の大気中保存により急速に親水性が失われて疎水化に転じることから、本法を臨床へ応用するためには親水性を持続させる方法を開発することも重要な課題である。

そこで本研究は、表面形状と表面性状を変化させた表面処理がチタンの濡れ性に与える影響、および親水性を維持する保存条件の影響を明らかにすることを目的とした。同時にこれらの表面処理が骨芽細胞の動態に与える影響を調査した。

材料と方法：

1. 試験片の作製および表面処理

使用したチタンは直径 13mm、厚さ 1mm の JIS2 種チタン板 (Kobe steel, Japan) である。表面形状に関し、鏡面 (MS)、各々の粒度のアルミナブラスト処理を施した表面 (SB25, SB50 および SB150)、および SB150 に酸エッチングを施した表面 (SB150E) を調製した。表面性状に関し、表面形状調製直後 (大気中で 10 分間保存) の試料をコントロールとして用いた (As)。さらに、酸素プラズマ処理を 10 分間施した試料 (O₂Plasma)、紫外線照射 (励起波長 254 および 365nm) を 2 時間施した試料 (UV)、および酸性 H₂O₂ 溶液 (pH4.0, 60°C) に 1 日間浸漬した試料 (H₂O₂) を作製した。

2. 表面形状観察および表面粗さ測定

表面形状観察は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた。また、表面粗さの測定は表面形状測定器を用い算術平均粗さ (Ra) および最大高さ (Rmax) を算出した。

3. 接触角の測定、接触角の経時的変化

各処理表面の純水に対する濡れ性 (接触角) を表面形状および表面性状の調製 10 分後に測定した。処理面を純窒素でブローした後、水滴量 4μL の条件で液滴 15 秒後に接触角を計測した。また、接触角の経時的変化は SB150E を用い、大気中 (Air)、純水中 (DW) およびエタノール中 (Eth) と保存条件を変化させて測定した。

4. 骨芽細胞の培養試験

表面形状を SB150E に調製後、大気中 (As-Air)、蒸留水中 (As-DW) また、SB150E を O₂ 処理後蒸留水中 (O₂-DW)、UV 処理後蒸留水中 (UV-DW)、H₂O₂ 処理後蒸留水中 (H₂O₂-DW) に 1 週間保存した。これらの試料表面上で、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を通法にしたがった培養した。細胞播種後 1,3,5,7 日後の増殖を WST-1 法により評価した。また、播種後 7, 14 日後の ALP 活性を測定した。

結 果：

1. 表面形状および表面粗さ

MS は表面が平滑であり、表面粗さも $Ra=0.08\pm0.02\mu m$ と鏡面を呈していた。SB 処理は、ブラスト粒子が大きくなるに従って凹凸が激しくなり、表面粗さも大きくなった。SB150E は、SB150 と比較してエッチピットによる微細な凹凸が多くなった。また、表面粗さは、Rmax が顕著に大きくならなかったのに対して Ra は顕著な増大を示し、SB150E は大きなうねりを持つ山に微細な凹凸が付与されている様相を呈していた。

2. 表面処理 10 分後の接触角

表面形状および表面性状を変化させたチタン表面の調製 10 分後の接触角を図 3 に示す。

表面形状の違いについて、大気中保存 10 分の試料 (As, コントロール) についてみると、MS が約 70° の接触角であったのに対し、表面粗さが大きい条件では接触角が小さくなった。特に、SB150E においては接触角がほぼ 0° と超親水性を示した。それ以外の表面性状を変化させた試料 (O₂, UV, H₂O₂) に関しては、表面形状の違いによる顕著な差が見られなかった。

表面性状の違いについて、特に O₂、UV 処理を行った試料は全ての表面形状で超親水性を示した。

H₂O₂ 試料は MS において As より接触角が小さくなったものの、SB150E では逆に接触角が大きくなった。

3. 接触角の経時的変化 (SB150E)

保存条件の違いによる接触角の経時的変化は、As 試料 (調製直後の接触角 0°) において、大気中保存 (Air) では急速に接触角が大きくなり 7 日後で約 100° と疎水性表面となり、その後は一定となった。Eth 保存においては 7 日後で As より小さい約 80° を示した。一方、純水中保存 (DW) では保存後 21 日においても接触角 3° と超親水性を維持した。O₂ および UV 試料 (調製直後の接触角 0°) では、As 試料より全体的に小さな接触角で推移しているものの、保存条件の違いにおいては As 試料と同様な傾向を示した。H₂O₂ 試料 (調製直後 17.5°) は他の試料と同様に Air、Eth 保存では経時的に接触角が大きくなるものの DW 保存では小さくなった。

3. 骨芽細胞の培養結果 (SB150E)

表面形状 SB150E 上における骨芽細胞の増殖傾向を図 2 に示す。水中に保存した As-DW (未処理) に比較し、特に O₂-DW、UV-DW 試料上では、培養 3 日後に増殖が増加し、増加傾向は 5 日後で顕著になった。ALP 活性は、As-DW に比較し、O₂-DW、UV-DW、H₂O₂-DW は 7 日後から有意に増加した。

考 察：

本研究は、先ず処理直後 (10 分) の表面形状がチ

タンの濡れ性に与える影響 (As) を検討した。その結果、ブラスト処理面は鏡面に比べ親水性を示した。特に、ブラスト処理に酸エッチングを施した表面 (SB150E) においては接触角がほぼ 0° と超親水性を示した。この結果は、Wenzel model³⁾により説明できる。表面形状が異なるときの接触角 $\cos\theta_r$ は、 $\cos\theta_r = r \cos\theta$ で表せる (r : 表面構造因子、 $\cos\theta$: 平坦表面の接触角)。この model は、平坦面で接触角が 90°未満の親水性表面では、表面が粗造化するとより親水性に、疎水性表面ではより疎水性になることを意味している。表面構造因子 r には表面積が大きく関与し、表面積が無限大になるような表面 (フラクタル表面) は超親水性や超疎水性表面になりうる。

本研究における SB150E 表面は、SB150 と比較し微細な凹凸が多くなり、表面粗さ計測では R_{max} が顕著に大きくならなかったのに対して R_a が顕著な増大を示し、大きなうねりを持つ山に微細な凹凸が付与されている様相を呈していた。したがって、SB150E 表面では表面積が極端に大きくなり、超親水性に転じたと考えられる。

本研究では次に、表面性状を変化させる各種表面処理がチタンの濡れ性に与える影響を検討した。その結果、特に O₂、UV 処理を行った試料は全ての表面形状で超親水性を示した。

チタンに酸素プラズマ照射や紫外線照射を施すと、表面は親水性に変化する。酸素プラズマ照射に関しては、高エネルギー分子の衝突によって有機物質が分解される、また酸化チタンがプラズマ状態酸素により励起され同時に雰囲気中の水分子が反応し水酸基が形成されると報告されている。UV 照射に関しては、250nm 付近以下で有機化合物を分解する、酸化チタン (アナターゼ型) は波長が 387nm 以下で光触媒反応により OH ラジカル

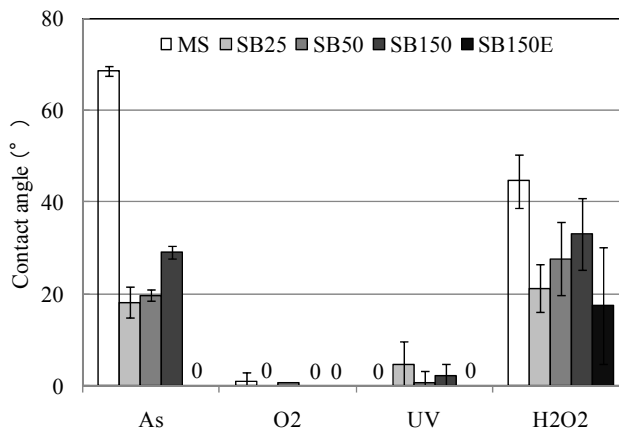


図 1 表面形状および表面性状を変化させたチタン表面の接触角 (調製 10 分後)

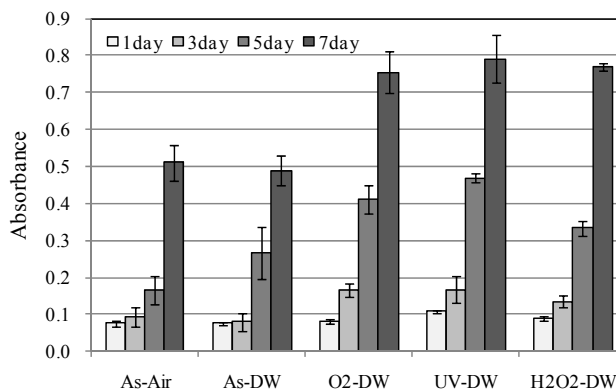


図 2 各種表面処理チタン上での細胞増殖 (SB150E)

および空気中の水分子の解離吸着により水酸基を形成すると報告されている。以上の如く、酸素プラズマ処理と UV 照射では本質的に差はなく、量的な違いこそあれ、表面に吸着した疎水性有機物（ハイドロカーボン）が分解される効果と、表面に水酸基が導入される効果が相まって、超親水性を発揮するものと考えられる。なお本研究では、処理時間を O2Plasma では 10 分に、UV 処理では 120 分としたが、文献も参考にすれば処理効率は O2Plasma が有利と考えられる。

本研究において、過酸化水素 (H_2O_2) 処理は、水酸基が生じやすくチタンを腐食しない濃度と pH に設定した。その結果、MS において As より接触角が小さくなったものの、SB150E では逆に接触角が大きくなった。この理由は判然としないが、疎水性有機物の分解が不十分だったことが一因として考えられる。

以上の処理による親水性（接触角）の評価は、処理直後（10 分）に行った。しかし、本法の臨床応用を考慮すると、処理後に親水性を安定的に持続する方法を見いだすことが重要になると考えられる。そこで、本研究は親水性を維持する保存条件の影響を調査した。その結果、SB150E 試料において、全ての表面性状を変化させた条件（コントロールを含む）で、大気中保存では急速に接触角が大きく親水性は退行したが、純水中保存では親水性を持続した。また、エタノール中保存では純水中ほどの効果はなかった。

一般に O2Plasma および UV 処理表面は、大気中保存により、処理により活性化された表面へ大気中の表面汚染物質が吸着する、活性種により分解した親水性の低分子物質が離散してしまう、などの理由で親水性が退行するとされ、この現象は Aging などと呼ばれている。本研究において、O2Plasma および UV 処理は極性溶媒中に浸漬することで親水性が持続するものと推定される。また、純水中保存でより有効であった理由は、水分子が水酸基の保持に有効に働いた結果と考えられる。

本研究の結果、ブラスト後の酸エッチング処理（SB150E）を行い、水中に保存すれば、特別な処理を施さなくてもチタン表面は超親水性が持続することが判り、本処理は臨床上に簡便で有効な方法であると判断される。しかし、この接触角の計測は、処理面を純窒素でブローしてから行ってはいるが、吸着した水分子が一層残存していたとも考えられ、さらなる検討が必要であろう。事実、細胞培養試験の結果、同様な親水性を有している As-DW と O2-DW、UV-DW、H2O2-DW は増殖、分化とも後者が有意に増加した。この結果は、接触角の測定のみでは細胞の動態を評価できないことを示している。すなわち、親水性をもたらす要因（表面エネルギーや表面水酸基）についても検討する必要がある。特に生体のように水環境においては、表面エネルギーの極性成分や水酸基チタン上に存在する塩基性水酸基が骨芽細胞の増殖と分化に重要な役割を演ずることが考えられる。以上より、本実験で得られた親水化処理の有効性を検証するためには、表面エネルギーや表面水酸基の生成状態を評価することが必要であると考えられる⁴⁾。

本研究では、親水性を付与するための表面形状と表面性状を制御する処理法、また親水性を持続する保存法について明らかになった。本結果が骨形成に寄与するかは今後の *in vitro* および *in vivo* 試験を待たねばならないが、臨床により近いチタンの親水性表面処理技術が提供できたと考える。

参考文献：

- 1) Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B, Oda Y. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability, J Biomed Mater Res 2007; 81B: 66-75.
- 2) Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, Yoshinari M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. Biomed Mater 2009; 4 doi:10.1088/1748-6041/4/4/045002.
- 3) Wenzel RN. Resistance of solid surfaces to wetting by water. Ind Eng Chem 1936; 28: 988-994.
- 4) Yoshinari M, Matsuzaka K, Inoue T. Surface modification by cold-plasma technique for dental implants -Bio-functionalization with binding pharmaceuticals-. Japanese Dental Science Review 2011; in press.

注：本研究の一部は、2010 年 11 月 30 日『第 32 回日本バイオマテリアル学会』（シンポジウム）で、また 2011 年 1 月 22 日『第 3 回口腔先端応用医科学会議』（招待講演）で報告した。

作成日：2011 年 3 月 4 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成 23 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： 唐 寧
所属機関名： 金沢大学
所属部署名： 医薬保健研究域 職名： 助教
所 在 地： 石川県金沢市角間町
電 話： 076-234-4458 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国上海市における多環芳香族炭化水素／ニトロ多環芳香族炭化水素の大気汚染と生殖発生毒性との関連に関する基礎研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：	唐 寧	職名：	助教
所属機関名：	金沢大学	部署名：	医薬保健研究域
中国側研究者氏名：	呉 慶	職名：	准教授
所属機関名：	復旦大学	部署名：	公共衛生学院

4. 当該研究における発表論文等

1. Xiao, W.S., Zhang, J., Liang, J.R., Zhu, H.Y., Zhou, Z.J. and Wu, Q., Adverse effects of neonatal exposure to 3,3', 4,4', 5,5'-hexachlorobiphenyl on hormone levels and testicular function in male sprague-dawley rats, *Environmental Toxicology*, in press.
2. Tang, N., Tokuda, T., Izzaki, A., Tamura, K., Ji, R.N., Zhang, X.M., Dong, L.J., Kameda, T., Toriba, A. and Hayakawa, K., Recent change in atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in Shenyang, China, *Environmental Forensics*, Submitted.

中国上海における多環芳香族炭化水素／ニトロ多環芳香族炭化水素の大気汚染と

生殖発生毒性との関連に関する基礎研究

研究者氏名	唐 寧
日本所属機関	金沢大学医薬保健研究域助教
研究者氏名	呉 慶
中国所属機関	復旦大学公共衛生学院准教授

要 旨

上海は中国内陸最大の商業、金融及び工業都市であり、30 年ほど前に始まった改革・開放政策のシンボルでもある。本研究では、上海で選ばれた代表的な3 地点で、アンダセン式ローボリュームエアサンプラーを用いて夏と冬に、大気中粒子状物質を粒径別に捕集し、強い発がん性／変異原性／内分泌かく乱性を有する多環芳香族炭化水素 (PAH) 及びニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) の汚染実態とそれらの主要発生源を明らかにした。

3 地点の大気中総 PAH, NPAH の平均濃度と、夏ではそれぞれ $8.0 \sim 9.9 \text{ pmol/m}^3$, $97 \sim 272 \text{ fmol/m}^3$ であり、冬ではそれぞれ $35 \sim 61 \text{ pmol/m}^3$, $551 \sim 694 \text{ fmol/m}^3$ であった。また、これら PAH, NPAH は季節、地点によらず 80% 以上が呼吸器経路で肺胞まで沈着できる微細粒子画分 ($< 2.1 \mu\text{m}$) に存在した。さらに、PAH, NPAH の幾つかの組成比を用いて解析したところ、上海の大気中 PAH, NPAH の主要発生源は夏と冬ともに自動車であることを明らかにした。一方、PAH, NPAH の生殖発生毒性をより正確に評価するために、今後、ダイオキシンのような他汚染物質との同時モニタリングの必要性が見出された。

Key Words 多環芳香族炭化水素, ニトロ多環芳香族炭化水素, ベンゾ[a]ピレン, 生殖発生毒性, 大気汚染

緒 言:

13 億人を超える人口を擁する中国では、改革・開放政策をとってから 30 年間、急速な経済成長を遂げた一方で、環境問題が深刻化している。申請者らは、これまでに中国の東北部都市（瀋陽、撫順、鉄嶺）の市街地で大気粉じんを捕集して、主に石炭、石油などの化石燃料の不完全燃焼に由来する発がん性／変異原性多環芳香族炭化水素 (PAH) 及びニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) の発生と挙動を解析してきた。その結果、中国の上記都市の大気中 PAH, NPAH 濃度はいずれも日本の都市（札幌、金沢、富山、東京、北九州）より高いこと、特に冬に著しく高いことが分かった。石炭ストーブや自動車排ガス粉じんの PAH, NPAH 組成解析から、その主原因が中国の東北地方で冬暖房として石炭を多量に消費するためであることがわかった¹⁾。しかし、冬暖房を使用しない南の地方の大気中 PAH, NPAH の汚染レベルや主要発生源等については、殆んど把握されていない。さらに、PAH, NPAH の中には、エストロゲン系やアンドロゲン系の作用をかく乱するものがあることが次第に明らかとされてきた²⁾。そこで、本研究では、上海の都心部と住宅地域の計 3 地点で夏と冬に大気粉じんを粒径別に捕集し、PAH, NPAH を分析することにより、上海の大気中これらの汚染レベルと主要発生源を把握し、更に生殖発生毒性との関連に関する基礎検討を行った。

対象と方法:

大気試料のサンプリング (Figure 1)

- ★ 昌邑 (Changyi): 上海市浦東新区崂山東路 10 号, 幹線道路近傍, 地上 20 m
- ★ 宝山 (Baoshan): 上海市宝山区密山東路宝林五村 45 号, 郊外に近い住宅地, 地上 15 m
- ★ 東安 (Dongan): 上海市徐へい区東安路 130 号, 都心に近い住宅地, 地上 15 m

上記3地点に、アンダセン式ローボリュームエアースAMPLER (AN-200) を設置し、夏季(8月2~16日)及び冬季(2月10~24日)に大気試料を粒径別(>7.0 µm, 7.0-2.1 µm, <2.1 µm)にフッ素樹脂バインダーガラスフェルター(TX40HI20WW)上に捕集した。なお、捕集フェルターは2日間ごとに交換した。

分析方法

捕集したフェルターは、PAHの内部標準物質(ピレン-d₁₀, ベンゾ[a]ピレン-d₁₂)及びNPAHの内部標準物質(2-フルオロ-7-ニトロフルオレン)を添加し、著者が所属する研究室で開発した所定の方法³⁾に従って処理をし、最終的にエタノールに溶解して検液とした。NPAHは、化学発光検出/HPLC法³⁾を、PAHは、蛍光検出/HPLC法を用いて分析した。

NPAHとして、1,3-ジニトロピレン(1,3-DNP), 9-ニトロアントラセン(9-NA), 1-ニトロピレン(1-NP), 6-ニトロクリセン(6-NC)及び6-ニトロベンゾ[a]ピレン(6-NBaP)の5種類を分析対象とした。一方、PAHは4環以上の構造をもつフルオランテン(FR), ピレン(Pyr), ベンゾ[a]アントラセン(BaA), クリセン(Chr), ベンゾ[b]フルオランテン(BbF), ベンゾ[k]フルオランテン(BkF), ベンゾ[a]ピレン(BaP), ベンゾ[ghi]ペリレン(BgPe)およびインデノ[1,2,3-cd]ピレン(IDP)の9種類を分析対象とした。

生殖発生毒性試験

交尾後0.5日、1.5日と2.5日に雌マウスの卵管から1, 2及び8細胞期胚をそれぞれ採取し、2,3,7,8-四塩素化ダイオキシン(PCDD)を含むM16培養液中で12時間及び24時間培養した後、2, 8細胞期胚及び胚盤胞胚の形成率をそれぞれ計測した。また、AhR, Arnt及びCYP1A1mRNA発現量を半定量RT-PCR法で比較を行った。PCDD曝露胚を仮親に移植し、着床率と妊娠14日の胎児重量を測定した。さらに、PCDD共存下によるBaP-DNA付加体の形成についても検討した。

結果:

大気中PAH, NPAH濃度

Table 1は各サンプリング地点の大気中PAH, NPAH平均濃度(n=1~5)を示す。Changyiの大気中総PAH, 総NPAH濃度は、夏ではそれぞれ9.5 pmol/m³と272 fmol/m³であり、冬ではそれぞれ35 pmol/m³と551 fmol/m³であった。Baolinの大気中総PAH, 総NPAH濃度は、夏ではそれぞれ9.9 pmol/m³と175 fmol/m³であり、冬ではそれぞれ38 pmol/m³と601 fmol/m³であった。Donganの大気中総PAH, 総NPAH濃度は、夏ではそれぞれ8.0 pmol/m³と97 fmol/m³であり、冬ではそれぞれ61 pmol/m³と694 fmol/m³であった。いずれの地点においても冬高夏低の季節変動を示した。夏期に3地点の大気中総PAH濃度に大差が見られなかったが、大気中総NPAH濃度は都心に位置し、幹線道路に

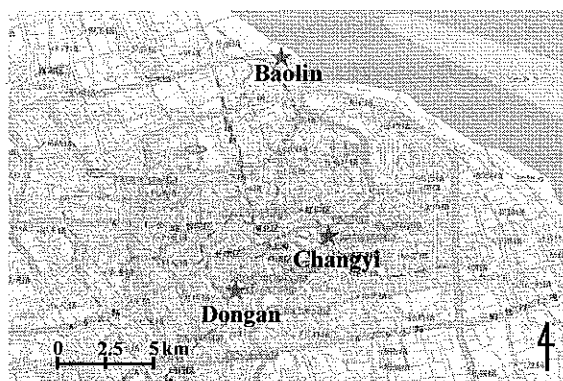


Figure 1 A map of Shanghai

Table 1 Atmospheric concentrations of PAH and NPAH at each site in Shanghai

Compound		Changyi		Baolin		Dongan		
		Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	
(pmol/m ³)	PAH	FR	1.1	2.8	1.3	3.7	0.8	7.0
		Pyr	1.1	2.5	1.2	3.4	0.8	5.6
		BaA	0.3	1.6	0.4	1.9	0.3	5.0
		Chr	0.8	3.1	0.9	3.6	0.6	9.2
		BbF	1.7	7.6	1.6	7.4	1.4	9.8
		BkF	0.6	2.4	0.6	2.6	0.5	4.1
		BaP	0.5	2.4	0.8	3.3	0.7	5.7
		BgPe	2.2	8.0	2.0	7.6	1.8	9.0
		IDP	1.3	4.7	1.2	4.6	1.2	5.9
		Total PAHs	9.5	35	9.9	38	8.0	61
(fmol/m ³)	NPAH	1,3-DNP	2.2	2.8	1.1	2.7	1.0	3.0
		9-NA	43	263	7.9	164	14	312
		1-NP	165	121	128	175	34	204
		6-NC	55	148	34	234	41	162
		6-NBaP	6.4	16	3.7	25	7.0	13
		Total NPAHs	272	551	175	601	97	694

も近い Changyi で比較的に高かった。一方、冬季に3地点の大気中総 PAH、総 NPAH 濃度ともに、都心に近い住宅地域の Dongan で高値が観測された。

大気中 PAH、NPAH の粒径分布

Figure 2 は3地点における大気中 PAH、NPAH の粒径別に存在する割合を示す。いずれの地点においても、季節によらず、大気中 PAH、NPAH は、約 80% 以上が微小粒子 (< 2.1 μm) 側に、約 10 ~ 15% が粒径 2.1 ~ 7 μm に存在したことに対し、粗大粒子 (> 7 μm) 側にわずかに数パーセントしか存在しなかった。

大気中 PAH、NPAH の主要発生源

大気中 PAH、NPAH の主要発生源及びそれらの挙動を推定するために、いくつかの PAH、NPAH の濃度比がしばしば用いられる。文献値によると、[1-NP]/[Pyr]比は、自動車では 0.36¹⁾、石炭燃焼施設では 0.0008¹⁾であり、[BaA]/([Chr]+[BaA]) 比は、自動車では 0.22 ~ 0.64^{4,5)}、石炭燃焼施設では 0.5¹⁾であり、[IDP]/([BgPe]+[IDP])比は、自動車では 0.35 ~ 0.70⁶⁾、石炭燃焼施設では 0.33 であった。Table 2 に示されるように、本研究で得られた上海3地点の夏季と冬季の大気中[1-NP]/[Pyr]比、[BaA]/([Chr]+[BaA]) 比と[IDP]/([BgPe]+[IDP])比は、いずれも自動車に近かった。

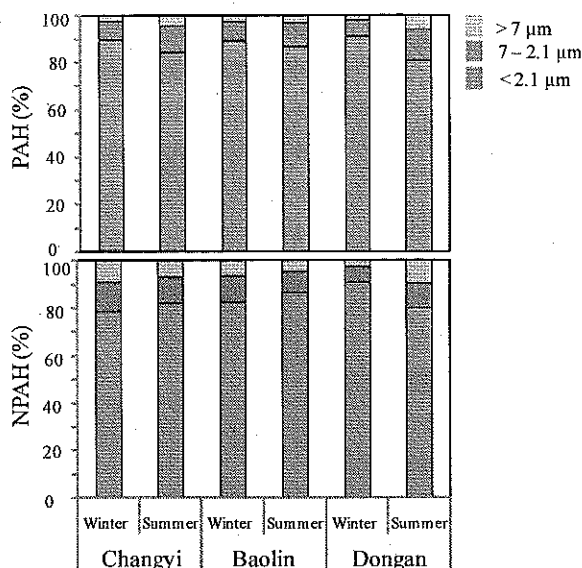


Figure 2 Atmospheric PAH and NPAH concentrations in three different size fraction at three in Shanghai

Table 2 Concentration ratios of PAH and NPAH in the atmosphere at each site in Shanghai, and in particulates from automobile and coal combustion system

	Changyi		Baolin		Dongan		Automobile	Coal combustion ¹⁾
	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter		
[1-NP]/[Pyr]	0.15	0.05	0.10	0.05	0.04	0.04	0.36 ¹⁾	0.0008
[BaA]/([BaA]+[Chr])	0.26	0.33	0.31	0.35	0.33	0.35	0.22 - 0.64 ^{4,5)}	0.5
[IDP]/([IDP]+[BgPe])	0.37	0.37	0.38	0.38	0.40	0.40	0.35 - 0.70 ⁶⁾	0.33

PCDD 曝露の影響

2 および 8 細胞期胚および胚盤胞胚の形成率は各群 80%以上であり、TCDD 曝露による影響はみられなかった。AhR、Arnt mRNA は 1 細胞期胚で検出できたが、2 細胞期では検出できず、8 細胞期に再び発現し、胚盤胞胚期にそのレベルは上昇した。AhR、Arnt mRNA レベルには TCDD 曝露群と対照群の間に差はみられなかった。CYP1A1 mRNA は対照群胚の各ステージに発現していなかった。TCDD 曝露群によっても、1 および 2 細胞期胚では発現誘導はみられなかったが、胚盤胞胚期では顕著な上昇が認められた。これらの TCDD 曝露胚と対照胚を同一の仮親の左右子宮にそれぞれ移植して妊娠 14 日目に解剖したところ、着床率と胎児重量に

TCDD 曝露による影響は見られなかった。さらに、Figure 3 に示されるように、PCDD 共存下における BaP 曝露

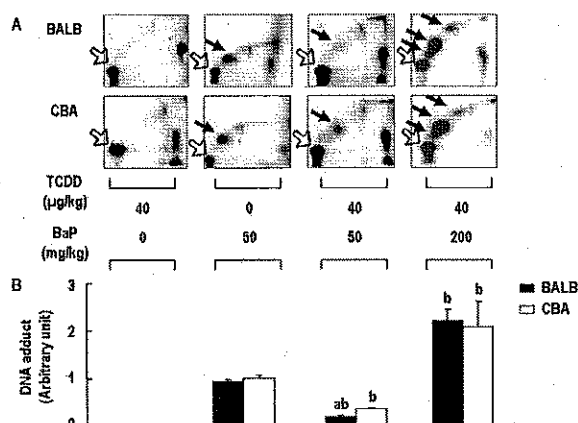


Figure 3 A representative result of DNA adduct formation. (A) Autoradiogram of B[a]P-DNA adducts detected by two-dimensional thin-layer chromatography using the ³²P-post labeling method. (B) Results are expressed as the mean $\pm$ SE (n = 3).

による BaP-DNA 付加体は、低濃度 (BaP; 50 mg/kg, PCDD; 40 µg/kg) 曝露では、BaP 単独曝露より生成量が低かったが、高濃度 (BaP; 200 mg/kg, PCDD; 40 µg/kg) 曝露では、マウスの種類 (BALB 種と CBA 種) によらず曝露濃度依存的に生成量が高かった。

考 察:

上海は中国東沿岸部に位置し、中国内陸最大の商業、金融、工業都市である。常住人口は約 2,000 万人、面積は約 6,340 km²である。改革・開放政策をとってから約 30 年間、上海は、航空、鉄道、道路、海運等、中国で最も交通が発達している都市の一つとなった。2009 年に上海の GDP は全国の約 4.5%を占め、自動車保有台数は約 280 万台であった⁷⁾。しかし、その一方で、急速な経済発展に伴って、環境汚染は深刻化となり、大きな社会問題にまで発展した。

大気中 PAH, NPAH は主に石炭、石油等の化石燃料の不完全燃焼や有機物の熱分解に由来して発生する。その中、強い発がん性/変異原性/内分泌かく乱性を有するものが多く存在する。国際がん研究機関 (IARC) によりヒトへの発がん性が認められるとされるグループ 1 に BaP, ヒトへの発がん性が疑われるとされるグループ 2B に 1-NP, BaA, BbF, BkF, Chr などが位置づけられている。今回、上海市環境保護局に公表されている大気汚染指数 (API) に基づき、選択した代表的な 3 地点の大気中 PAH, NPAH 濃度は、瀋陽 (PAH: 41 pmol/m³, NPAH: 403 fmol/m³), 北京 (PAH: 20 pmol/m³, NPAH: 267 fmol/m³) などの北部の都市より低いものの、日本の金沢 (PAH: 2.6 pmol/m³, NPAH: 27 fmol/m³) より、それぞれ約 3 倍と 2 倍高かった。また、上海の大気中 PAH, NPAH 濃度が沿道や都心に近い地点で高かったこと、組成が自動車のそれらに近似していたことと主に燃焼由来とされている微小粒子側 (80%以上) に存在したことから、上海の大気中 PAH, NPAH の主要発生源は自動車であることが明らかにされた。

一方、PAH, NPAH のほかにも、大気中に汚染物質が多種多様に存在する。本研究で捕集した大気試料から抽出された PAH, NPAH を含む有機可溶性画分はマウスを用いる動物実験に十分な量が得られなかったが、標準物質を用いる動物への曝露実験の結果より、共存物質による相乗効果が認められたため、今後、ダイオキシン類を含め、より多種類の環境汚染物質を同時にモニタリングする必要があると考えられた。

参考文献:

- 1) Tang, N., Hattori, T., Taga, R., Igarashi, K., Yang, X.-Y., Tamura, K., Kakimoto, K., Mishukov, V.-F., Toriba, A., Kizu, R. and Hayakawa, K., Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulates and their relationship to emission sources in the Pan-Japan Sea countries, *Atmos. Environ.*, 39, 5817-5826, 2005.
- 2) Kizu, R., Ishii, K., Kobayashi, J., Hashimoto, T., Koh, E., Namiki, M. and Hayakawa, K., Antiandrogenic effect of crude extract of C-heavy oil, *Mater. Sci. Eng.: C*, 12, 97-102, 2000.
- 3) Hayakawa, K., Kitamura, R., Butoh, M., Imaizumi, N. and Miyazaki, M., Determination of diamino- and aminopyrenes by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Anal. Sci.*, 7, 573-577, 1991.
- 4) Sicre, M.A., Marty, J.C., Salot, A., Aparicio, X., Grimalt, J. and Albaiges, J., Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: Occurrence and origin, *Atmos. Environ.*, 21, 2247-2259, 1987.
- 5) Simcik, M.F., Eisenreich, S.J. and Lioy, P.J., Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan, *Atmos. Environ.*, 33, 5071-5079, 1999.
- 6) Rogge, W.F., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass, G.R. and Simoneit, B.R.T., Sources of fine organic aerosol. 2. Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy-duty diesel trucks, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 636-651, 1993.
- 7) 上海市統計局 (<http://www.stats-sh.gov.cn/2008shjtj/index.asp>).

作成日: 2011 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 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： 藤 井 聡
所属機関名：名古屋市立大学大学院
所属部署名：薬学研究科 職名：教授
所 在 地：名古屋市瑞穂区田辺通 3-1
電 話：0528363451 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

早期動脈硬化症に特異的変動を示し血管病変を効率よく評価しうる新規バイオマーカーの同定と日本人・中国人での比較

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：藤井 聡	職名：教授
所属機関名：名古屋市立大学大学院薬学研究科	部署名：病態解析学
中国側研究者氏名：馬 明月	職名：教授
所属機関名：瀋陽医学院	部署名：環境医学

4. 当該研究における発表論文等

動脈硬化症の発症・進展に關与する microRNA の解析

平成 22 年度 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程
論文内容要旨集 169-170 頁 森 智恵子

早期動脈硬化症に特異的変動を示し血管病変を効率よく評価しうる 新規バイオマーカーの同定と日本人・中国人での比較

研究者氏名 藤井 聡

日本研究機関名 名古屋市立大学大学院薬学研究科

共同研究者名 岩城 壮一郎、森 智恵子

中国研究者 馬 明月 教授

中国所属機関 瀋陽医科大学環境医学

共同研究者名 奉天医院副院長孫曉先生、循環器内科医師張曼先生

要旨:

高血糖状態は内皮細胞の機能を障害する。高血糖状態を模倣した 25 mM グルコース濃度で血管内皮細胞を培養したところ、通常血糖状態を模倣した 5 mM グルコース濃度で培養した細胞に比べて内皮細胞に特異的に発現するマイクロ RNA の一種である miR-126 の発現量が減少することが示された (リアルタイム PCR)。動脈硬化症の危険因子として高血圧および狭心症を持つ患者に対して、健常者との血漿中 miRNA-126 の発現量を比較した。各臨床検査値と miRNA-126 の発現量について Kendall の相関係数を求めた結果 miR-126 の発現量は血糖値との間に相関があることが示され、患者の miR-126 の発現量は健常者に比べて減少することが示された。miR-126 の発現量が減少したのは、血圧や血糖値の上昇により内皮細胞に傷害が生じ、内皮機能が低下したためではないかと推測される。以上のことから、miR-126 の発現変化は内皮機能の障害時期に特異的であり、動脈硬化症の病態を診断するのに有力な指標になり得ると考えられる。

Key Words 動脈硬化症, 冠動脈疾患, 高血圧症, 糖尿病, マイクロ RNA

緒言:

動脈硬化症の危険因子には、糖尿病や高血圧症、脂質異常症などの生活習慣病や肥満、喫煙、加齢、ストレスなどがある。また、その発症には血管内皮細胞の傷害が深く関与していることが知られている。血管内皮細胞が傷害を受けると、単球や好中球は内皮細胞へ接着し、内膜内への浸入へとつながり、単球のマクロファージへの分化やコレステロールの取り込みによる泡沫化を経て、内膜が肥厚し、さらにはプラーク形成が誘導される。この内皮細胞の傷害には、酸化 LDL や活性酸素、炎症性サイトカイン、スフィンゴ脂質などが関与している。なかでも、腫瘍壊死因子 (TNF- α) やスフィンゴシン1-リン酸 (SIP) は、E-セレクトリンや VCAM-1 などの内皮細胞表面における接着分子の発現を誘導し、単球などの内皮細胞への接着や血管壁内への侵入を促進することが知られている。最近では、このような内皮細胞の障害機構を制御する因子としてマイクロ RNA (miRNA) が注目を集めている。miRNA はタンパク質をコードしない低分子量 RNA であり、標的 mRNA の 3'-UTR に存在する認識配列と結合することで、mRNA の分解あるいは翻訳抑制を行うと考えられている。内皮細胞に特異的に発現する miRNA は、血管新生および内皮細胞の増殖や分化、アポトーシスに関与することが知られている。また、これらの miRNA は冠動脈疾患や糖尿病などで発現変化が見られることが報告されており、動脈硬化症にも深く関与していることが考えられる。

対象と方法:

本研究では、ヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 細胞を用いて内皮細胞の機能障害に miRNA がどのように関わっているのか解析を行った。さらに、ヒトの血漿中 miRNA を測定することで動脈硬化症の危険因子による発現変化

を調べ、動脈硬化症の診断指標となり得るかを検討した。RNA は TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen)を用いて抽出した。その後、TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用い逆転写反応を行い、cDNA にし TaqMan[®] MicroRNA Assays を使用してリアルタイム PCR を行った。

結果:

本研究では、EA.hy926 細胞に対して SIP や TNF- α 、高血糖、低酸素によって刺激を行い、内皮細胞に特異的に発現する miR-126 および miR-221、miR-210 について、刺激に対する発現変化を検討した。SIP および TNF- α は VCAM-1 などの接着分子の発現を誘導することが知られている。SIP により miR-126 および miR-221 の発現量が増加することを見出した。しかし、TNF- α は miR-126 および miR-221 の発現量に影響を与えなかった。

高血糖状態は内皮細胞の機能を障害することが知られている。高血糖状態を模倣した 25 mM グルコース濃度で細胞を培養したところ、通常血糖状態を模倣した 5 mM グルコース濃度で培養した細胞に比べて miR-126 の発現量が減少した(図 1)。また、miR-221 の発現量も減少した。

動脈硬化病変では血栓形成による狭窄により虚血状態となることが知られている。低酸素 (1%O₂) によって miR-210 の発現量が増加した。さらに低酸素によって増加した miR-210 の発現量は、通常酸素状態に戻すと減少する傾向が見られた。

次に、動脈硬化症の危険因子として高血圧および狭心症を持つ 5 名に対して、健常者 5 名との血漿中 miRNA の発現量を比較した。各臨床検査値と miRNA の発現量について Kendall の相関係数を求めた結果、疾患の有無に関わらず、miR-126 および miR-221 の発現量は血糖値との間に相関があることが示され、患者の miR-126 の発現量は健常者に比べて減少することが示された(図 2)。miR-210 については、患者は健常者との発現量の差が見られなかった。

考察:

miR-126 は VCAM-1 の発現を抑制することが知られており、miR-126 は SIP による VCAM-1 の発現増加を抑制することが予想される。一方で、miR-126 は増殖因子を負に制御する Spred-1 を抑制することが知られており、VEGF を活性化させることでプラークの形成が促進されることが予想される。したがって、miR-126 は動脈硬化症に対して抑制と促進の両作用を示すと考えられる。また、miR-221 は SIP による eNOS mRNA の発現増加におけるネガティブフィードバック機構に作用し、血管拡張作用を抑制する可能性があると考えられる。さらに、miR-126 および miR-221 はそれぞれ VCAM-1 および E-セレクトリンを標的遺伝子とすることが予測されているが、本研究では TNF- α によって誘導されるこれらの接着分子の発現増加には関与していないことが示唆された。

高血糖状態は内皮細胞の機能を障害する。高血糖状態を模倣したグルコース濃度で細胞を培養したところ、miR-126 の発現量が減少したことから、miR-126 は血管内皮細胞における高血糖状態の指標となり、高血糖により内皮機能が障害されることが示唆された。動脈硬化病変では血栓形成による狭窄により虚血状態となることが知られている。低酸素 (1%O₂) によって miR-210 の発現量が増加したことから、miR-210 は血管内皮細胞における低酸素状態の指標となると考えられる。

高血圧および狭心症を持つ患者の血漿で miR-126 の発現量が減少したのは、血圧や血糖値の上昇により内皮細胞に傷害が生じ、内皮機能が低下したためではないかと推測される。以上のことから、miR-126 の発現変化は内皮機能の障害時期に特異的であり、動脈硬化症の病態を診断するのに有力な指標になり得ると考えられる。また、miR-221 も患者での発現量は減少していた。しかし、これまでに冠動脈疾患では miR-221 の発現量は増加するこ

A

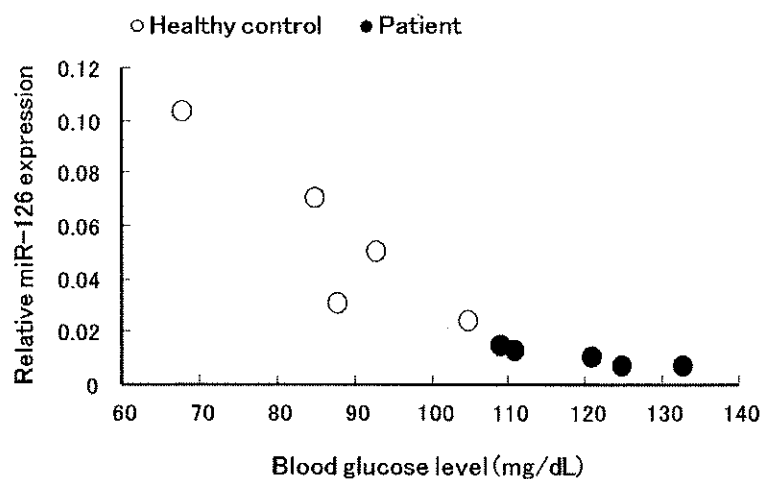
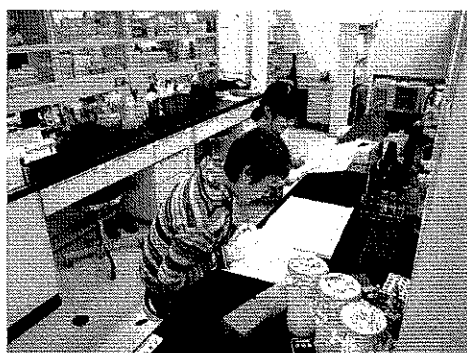


図3 名古屋市立大学薬学研究科での瀋陽医学院、奉天病院研究者(手前)との共同研究



参考文献

O'Sullivan JF, Martin K, Caplice NM. Microribonucleic acids for prevention of plaque rupture and in-stent restenosis: "a finger in the dam". J Am Coll Cardiol. 2011; 57:383-9.

Qin S, Zhang C. MicroRNAs in vascular disease. J Cardiovasc Pharmacol. 2011; 57:8-12.

Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. Circ Res. 2010; 107:1047-57.

注 本研究の一部は平成 22 年度 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程論文内容要旨集 169-170 頁(森 智恵子)で発表した。

作成日 2011 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 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：呉 小玉

所属機関名：名寄市立大学

所属部署名：看護学科

職名：教授

所 在 地：北海道名寄市西四条北八丁目 1

電 話：01654-2-4199

内線：3121



1. 助成金額：900,000 円

2. 研究テーマ

過剰介護予防を焦点にした主介護者のエンパワーメントと要介護者の日常生活動作との関連性に関する日中の比較

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：呉 小玉

職名：教授

所属機関名：名寄市立大学

部署名：看護学科

中国側研究者氏名：徐迅迪

職名：准教授

所属機関名：湘雅二医院

部署名：肝胆外科

4. 当該研究における発表論文等

1) The study of Main Care-givers Empowerment in China

11 月 19～21 日東京で開かれた第 2 回日中韓看護学会にて口演発表

2) 中国の地域における要介護者と主介護者の実態分析

12 月 4 日札幌で開かれた第 30 回日本看護科学学会にて口演発表

5. 成果の概要

主介護者と要介護者それぞれ日本側 102 ペアと中国側 153 ペアを対象にして、主介護者のエンパワーメントと要介護者の ADL 自立度の関連性について調査した。結果より、介護者エンパワーメントを活した過剰介護予防プログラムの開発と実践するための指針を得た。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

役割：研究フィールドの確保、研究調査の協力、分析のアドバイス

過剰介護予防を焦点にした主介護者のエンパワーメント と要介護者の日常生活動作の自立度との関連性に関する日中の比較

研究者氏名 呉 小玉

日本所属機関 名古屋市立大学看護学科

共同研究者 徐 迅迪

中国所属機関 湘雅二医院肝胆外科

〈要旨〉

本研究は主介護者のエンパワーメント（以下は「MCEM」に簡略）と要介護者の日常生活動作（以下はADLに簡略）との関連性に関する日本と中国の実態を明らかにすることによって、文化に合わせた過剰介護予防教育の指針を得ることを目的にした。主介護者と要介護者それぞれ日本側 102 ペアと中国側 153 ペアを対象にした。結果、1. 「MCEM」尺度のCronbach α 信頼係数に関して、中国 $\alpha=0.89$ 、日本 $\alpha=0.88$ であり、日中のいずれにも、信頼性の高い尺度であることが検証された。2. 「MCEM」の高群は低群より、要介護者の「ADL」の平均得点が有意($p<0.05$ と 0.01)に高く、「MCEM」は要介護者のADLの維持向上に影響を与えると判断できる。3. 「MCEM」の高群は低群より、介護の自己効力感（以下は「SE」に簡略）の平均得点が有意($p<0.05$ と 0.01)に高く、「MCEM」の高い介護者は、「SE」も高いとの仮説が検証できた。4. 「MCEM」・「SE」と要介護者の「ADL 自立度」との相関係数のいずれにも、有意な正の相関が見られ、「MCEM」が要介護者のADLの維持向上に影響が大きいことを明らかにした。結果より、「MCEM」を活用した過剰介護予防プログラムの開発と実践するための指針を得たと考える。

<Key Words> 主介護者, エンパワーメント, 要介護者, 日常生活動作, 過剰介護予防

I. 緒言

日本では、世界一長寿国と言われ、高齢者の増大は要介護者の増大を招き、その一方で少子化により介護力が減少している。中国でも、高齢化の進展と一人っ子政策によって、4人の祖父母、2人の父母、1人の子どもという「421家庭」がますます多くなり、高齢者介護の問題が日増しに突出してきている。高齢社会に伴って要介護者が増加しているが、中国も日本も、現時点では高齢者や介護者に対する支援の社会化がまだ不十分であるといえる。そのため、要介護者ADLの維持向上は、家族による介護に依存する部分がある。日中における少子化現象・家族の形態がよく似ており、「血濃于水（水より血が濃い）」や「気兼ね」というような東洋の儒教文化が家族介護意識に浸透し、高齢者自身ができることでもつい介助してしまうという過剰介護の傾向も類似している¹⁾。「できるADL」と「しているADL」差の存在を放置することは、老人の場合容易に廃用現象による活動能力の低下につながりやすいといわれている。盛田ら²⁾は、「ADL差」に及ぼす要因として「過剰介護」がその一つであると報告され、香西ら³⁾は、患者の退院後においてFIM(ADLの評価尺度)の低下が認められたことは、家族の過剰介護が原因であると報告した。このことから、高齢者のADL維持向上を目指すために、「MCEM」を高めることが重要であると考えた。

エンパワーメント（以下は「EM」に簡略）は、1980年代からアメリカの看護、ヘルスプロモーションなどの領域で、住民自身の潜在的な力を重視する理論である。「EM」を高めることが、対象者の生活の質

を高めることに重要な関連があるという報告があった⁴⁾⁵⁾。このことから、「MCEM」を活かすことは、要介護者のADLの維持向上に役立つと考えられる。研究者は、先行研究で「MCEM」の構造を解明し、欧米由来の「EM」の概念と中国の「自力更生」の概念を分析・統合して、「MCEM」尺度を開発した⁶⁾⁷⁾⁸⁾。この尺度を利用して「MCEM」と要介護者のADL自立度の関係性を明らかにすることができれば、高齢者のADLを維持向上するための看護の示唆を得ることができ、日本と中国の介護社会において研究の成果を活用する期待ができると考えた。従って、本研究の目的は、「MCEM」と要介護者のADLとの関連性及び日中の違いを明らかにし、「MCEM」を活かした過剰介護予防プログラムの開発の指針を得ることであった。

研究の目標について、下記の仮説を検証することであった。

1. 「MCEM」は中国においても日本においても信頼性が高いであろう。
2. 「EM」の高い介護者は「SE」も強いであろう。
3. 「MCEM」や「SE」が高いと、その要介護者のADL自立度も高くなるであろう。

II. 研究の対象と方法

1. 調査対象

対象者の選定は、要介護者では65歳以上、ADL移動に部分介助が必要、認知症がないこと。主介護者では、自宅で3ヶ月以上の介護経験があること。日中とは、同様の条件で対象者を選定した。中国では3箇所の総合病院で、日本では10箇所の総合病院で調査を行った。標本数は、統計上の必要数を保つために100人以上を基準とし、回答の欠損値や回収率を考慮して日中それぞれ200ペアを抽出した。

2. 調査内容

介護者に対する調査項目は、介護者の概要や主介護者の健康状態及び呉が開発した「MCEM」尺度51項目、斉藤⁹⁾が開発した「介護者の自己効力感スケール(SE)」9項目。

要介護者に対する調査項目は、介護者の概要、退院時の状況、「ADL」8項目。

3. 調査方法と倫理的配慮

データ収集方法は、大学倫理審査委員会の承認後、看護部長を通して病棟の看護師長から、対象の条件にあわせて対象者を抽出してもらった。対象者には研究の主旨、データの守秘、強制でないこと、自由意志等を説明し、同意を得たうえで調査を行い、留置法または郵送回収法で回収した。

4. データの分析方法

分析は「中国語版DPS統計ソフト」と「日本語版SPSS18.0J」を用いた。要介護者と主介護者のデータを合わせて、日中の違いを分析し、3つの目標に従って、Cronbach α の信頼性係数・Mann-Whitney の「順位和検定法」とSpearman のノンパラメトリック相関係数の算出法で仮説を検証した。

III. 研究結果

1. 調査対象の概要

200ペアのうち、回収された調査用紙は、中国では153ペアであり、回収率は76.5%であった。日本では102ペアであり、回収率は51.0%であった。

表1で示したように、主介護者の概要は、日本では、男性22名(21.6%)、女性80名(78.4%)であり、年齢は43歳から91歳まで、平均年齢60.1歳(±10.0)であった。要介護者との続柄は、夫婦18名(17.6%)、息子13名(12.7%)、娘20名(19.6%)、嫁45名(44.1%)、その他6名(5.9%)であった。職業は、有職者48

名(47.1%)、無職者54名(52.9%)であった。学歴は、未就学13名(12.7%)、小学校42名(41.2%)、中学校17名(16.7%)、高校以上30名(29.4%)であった。主観的健康状態は、61名(59.8%)が「健康」、30名(29.4%)が「余り健康でない」、11名(10.8%)が「健康でない」と答えた。一方中国では、男性54名(35.3%)、女性99名(64.7%)であり、年齢は20歳から79歳まで、平均年齢51.7歳(±13.9)であった。要介護者と

表1. 介護者の概要

属性・生活要因		日本 (N=102)	中国 (N=153)
年齢	最小	43歳	20歳
	最大	91歳	79歳
	平均	60.06歳(SD10.01)	51.7歳(SD13.9)
性別	男	22(21.6%)	54(35.3%)
	女	80(78.4%)	99(64.7%)
要介護者との続柄	夫婦	18(17.6%)	52(34.0%)
	息子	13(12.7%)	47(30.7%)
	娘	20(19.6%)	35(22.9%)
	嫁	45(44.1%)	14(9.2%)
	その他	6(5.9%)	5(3.3%)
職業	有職者	48(47.1%)	77(50.3%)
	無職者	54(52.9%)	76(49.7%)
学歴	就学経験なし	13(12.7%)	17(11.1%)
	小学校卒	42(41.2%)	40(26.1%)
	中学校卒	17(16.7%)	36(23.5%)
	高校卒以上	30(29.4%)	60(39.2%)
健康状態	健康	61(59.8%)	99(64.7%)
	あまり健康でない	30(29.4%)	48(31.4%)
	健康でない	11(10.8%)	6(3.9%)

の続柄は、夫婦52名(34.0%)、息子47名(30.7%)、娘35名(22.9%)、嫁14名(9.2%)、その他5名(3.3%)であった。職業は、有職者77名(50.3%)、無職者76名(49.7%)であった。学歴は、未就学17名(11.1%)、小学校40名(26.1%)、中学校36名(23.5%)、高校以上60名(39.2%)であった。主観的健康状態は、99名(64.7%)が「健康」、48名(31.4%)が「余り健康でない」、6名(3.9%)が「健康でない」と答えた。

表2 要介護者の概要

属性項目		日本 (N=102)	中国 (N=153)
要介護者年齢	最小	62歳	52歳
	最大	101歳	91歳
	平均	83.24歳(SD7.9)	71.9歳(SD6.7)
要介護者性別	男	36(35.3%)	90(58.8%)
	女	66(64.7%)	63(41.2%)
退院時状況	治癒	9(8.8%)	27(17.6%)
	軽快	70(68.6%)	117(76.5%)
	変化なし	23(22.5%)	6(3.9%)

要介護者の概要について、日本では、男性36名(35.3%)、女性66名(64.7%)、年齢は62歳から101歳、平均年齢83.2歳(±7.9)。退院時の状態は治癒9名(8.8%)、軽快70名(68.6%)、変化なし23名(22.5%)であった。中国では、男性90名(58.8%)、女性63名(41.2%)、年齢は52から91歳、平均年齢71.9

歳(±6.7)。退院時の状態は治癒27名(17.6%)、軽快117名(76.5%)、変化なし6名(3.9%)であった。

表3 要介護者のADLの日中比較 (t検定)

日常生活動作の項目	中国N=153		日本N=102		t値	p値
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		
食事	2.29	.58	2.12	.75	2.035	.043
整容	2.59	.63	1.79	.75	9.189	.000
入浴	2.00	.63	1.47	.64	6.583	.000
着替え	2.42	.69	1.78	.74	7.082	.000
移動	2.24	.82	1.72	.78	5.075	.000
歩行	2.33	.67	1.64	.66	8.135	.000
階段昇降	1.92	.58	1.43	.65	6.177	.000
トイレ	2.21	.65	1.62	.78	6.573	.000

要介護者のADL自立度の結果は、表3で示した。すべての項目は、中国のほうが日本より自立度が有意($p < 0.05$ と 0.01)に高かった。

2. 「MCEM」に関する日中の違い

表4 「MCEM」の日中比較

エンパワーメント		項目	日本 (N=102)	中国 (N=153)	t値	p値
尺度全体		51	137.4±15.4	154.76±19.28	7.631	.000
下 位 尺 度	個人的リソース	7	16.7±3.8	18.4±4.0	3.351	.001
	介護の主体性	6	15.8±3.5	18.6±3.4	6.256	.000
	介護の信念	5	12.9±2.8	15.1±3.0	5.643	.000
	介護知識と技術	3	7.8±2.0	8.4±2.5	1.968	.050
	周囲への気兼ね	6	12.7±3.5	16.1±4.1	6.818	.000
	介護者との絆	6	18.1±3.4	20.3±3.4	4.903	.000
	介護の役割認識	6	19.3±3.0	20.4±3.2	2.679	.008
	介護という善行	6	15.5±2.6	16.8±3.7	3.274	.001
	介護の結果期待	6	18.4±3.1	20.7±3.1	5.820	.000

「MCEM」に関して表4で示した。尺度全体もそれぞれの下位尺度も、中国のほうが日本より有意($p < 0.05$, $p < 0.01$)に高かった。

3. 日中における介護者の「SE」について
介護者の「SE」に関して、表5で示した。日本では平

均値22.13±4.79、中国では27.45±5.12であった。それぞれの項目から見たところ、床づれいかけなど

表5 介護者の「SE」の日中比較

質問項目	中国N=153		日本N=102		t値	p値
	平均値	SD	平均値	SD		
自己効力感スケール全体	27.45	5.12	22.13	4.79	8.348	.000
1. 体や心の変化に気づいてあげられる自信がありますか	2.97	.76	2.44	.61	5.833	.000
2. 食事を作ったり、食べさせたりすることに自信がありますか	3.30	.77	2.35	.71	9.915	.000
3. 入浴や体を拭くなどの清潔の世話について自信がありますか	3.01	.94	2.55	.77	4.154	.000
4. トイレ介助、オムツ交換などの排泄の世話について自信がありますか	2.93	.95	2.52	.82	3.609	.000
5. 寝返りや車椅子の利用などの体を移動する世話について自信がありますか	3.15	.84	2.59	.69	5.595	.000
6. 床づれや風邪などの身体的な悪化を予防する方法について自信がありますか	2.57	.96	2.36	.74	1.825	.069
7. 薬を飲ませたり、その管理をすることについて自信がありますか	3.37	.72	2.81	.73	6.070	.000
8. 今後とも体系的に介護を続けていく自信がありますか	3.10	.87	2.25	.70	8.372	.000
9. 今後とも意欲的に介護に取り組んでいく自信がありますか	3.04	.85	2.25	.68	7.785	.000

身体的な悪化予防の自信に有意差が無く、他の項目はすべて中国が日本より有意($p < 0.01$)に高かった。

4. 仮説の検証

表6 要介護者のADLと「MCEM」との関係

ADL項目	エンパワーメントの得点状況			ADL得点状況		2群検定結果	
	4分位法	N	得点範囲	平均値	SD	t値	p値
食事	≤25%	66	71~133	2.12	.71	-1.790	.075
	≥75%	126	163~198	2.30	.64		
整容	≤25%	66	71~133	2.00	.80	-4.346	.000
	≥75%	126	163~198	2.49	.71		
入浴	≤25%	66	71~133	1.55	.71	-3.906	.000
	≥75%	126	163~198	1.94	.65		
着替え	≤25%	66	71~133	1.89	.81	-4.059	.000
	≥75%	126	163~198	2.36	.72		
移動	≤25%	66	71~133	1.86	.86	-2.399	.017
	≥75%	126	163~198	2.17	.82		
歩行	≤25%	66	71~133	1.85	.77	-3.519	.001
	≥75%	126	163~198	2.23	.68		
階段昇降	≤25%	66	71~133	1.67	.73	-1.689	.093
	≥75%	126	163~198	1.83	.60		
トイレ	≤25%	66	71~133	1.88	.83	-2.260	.025
	≥75%	126	163~198	2.13	.70		

1) 「MCEM」は日中両方においても信頼性が高いであろうという仮説を Cronbach α 法で検証した。中国では $\alpha = 0.89$ であり、日本では $\alpha = 0.88$ とほぼ同じ結果であった。2)

「MCEM」の得点の高い介護者は、要介護者のADL 自立度の点数も高ければ、仮説が成り立つと設定したため、「MCEM」の得点の高低群の分け方に関して、以下のようにした。

「MCEM」51項目に回答した255人の得点昇順を4分位法で≤25%と≥75%間の得点人数

をカットしてから、≤25%の得点者を低群とし、≥75%の得点者を高群として、「ADL」の得点を比較した。

結果は表6に示した。低群は66名で、「MCEM」の得点範囲は71～133であり、高群は126名で、得点範囲が、163～198であった。「ADL」の平均得点は、食事と階段昇降には、有意差がなかったが、それ以外の項目すべては、「MCEM」の高群は、低群より有意($p < 0.05$ と 0.01)に高くなっている。

3) 上述と同じように「MCEM」の得点を4分位法でグループ化し、My-Whitney 検証法で「SE」の平均ランクや順位和を比較した。

表7 介護者の「MCEM」と「SE」との関係

自己効力感(SE) 項目	エンパワーメントの得点状況			SE得点状況		My-Whitney	
	4分位点	N	得点範囲	平均ランク	順位和	z値	p値
自己効力感スケール全体	≤25%	66	71~133	59.83	3948.50	-6.631	.000
	≥75%	126	163~198	115.71	14579.50		
1. 体や心の変化に気づいてあげられる自信	≤25%	66	71~133	71.67	4730.00	-4.890	.000
	≥75%	126	163~198	109.51	13798.00		
2. 食事を作ったり、食べさせたりすることに自信	≤25%	66	71~133	63.78	4209.50	-6.206	.000
	≥75%	126	163~198	113.64	14318.50		
3. 入浴や体を拭くなどの清潔の世話をこつて自信	≤25%	66	71~133	70.39	4645.50	-4.942	.000
	≥75%	126	163~198	110.18	13882.50		
4. トイレ介助、オムツ交換などの排泄の世話をこつて自信	≤25%	66	71~133	71.43	4714.50	-4.735	.000
	≥75%	126	163~198	109.63	13813.50		
5. 寝返りや車椅子の利用などの体を移動する世話をこつて自信	≤25%	66	71~133	70.26	4637.00	-5.014	.000
	≥75%	126	163~198	110.25	13891.00		
6. 床ずれや風邪などの身体的な悪化を予防する方法をこつて自信	≤25%	66	71~133	79.51	5247.50	-3.211	.001
	≥75%	126	163~198	105.40	13290.50		
7. 薬を飲ませたり、その管理をすることについて自信	≤25%	66	71~133	67.42	4449.50	-5.715	.000
	≥75%	126	163~198	111.73	14078.50		
8. 今後とも体力的に介護を続けていく自信	≤25%	66	71~133	68.47	4519.00	-5.319	.000
	≥75%	126	163~198	111.18	14009.00		
9. 今後とも意欲的に介護に取り組んでいく自信	≤25%	66	71~133	66.81	4409.50	-5.643	.000
	≥75%	126	163~198	112.05	14118.50		

結果は表7に示したように、4分位50%得点群 63 人をカットして、≤25%の得点群と≥75%得点群で比較した。「MCEM」の高群は、「SE」全体やそれぞれ項目の平均ランクや順位和も高く、「MCEM」の低群は、「SE」も有意($p < 0.05$ と 0.01)に低くなっている。

表8 介護者の「MCEM」・「SE」と要介護者のADLの関係性

	介護者の「SE」	「MCEM」	要介護者のADL
介護者の「SE」	1	0.55**	0.25**
「MCEM」	0.55**	1	0.29**
要介護者のADL	0.25**	0.29**	1

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

4) 主介護者の「EM」や「SE」が高いと、要介護者のADL自立度も高くなるという仮説をSpearman相関係数で検証したところ、「MCEM」と「SE」間には $r = 0.55$ 、要介護者の「ADL自立度」との間は $r = 0.29$ 、「SE」

と「ADL自立度」との間は $r = 0.25$ であった。いずれにも、 $p < 0.01$ と有意な正の相関が見られた。

IV. 考察

1. 研究対象の特性

介護者と要介護者の年齢は、中国より日本のほうが10歳ほど高かった。それは日本国民の平均寿命(83)は、中国の平均寿命(74)より、9歳ほど延びている¹⁰⁾ことと一致している。介護者と要介護者の続柄に関して、中国は夫婦や息子であることが最も多かったのに対して、日本はお嫁が最も多かった。これは中国の「養児防老(自分の老後のため子どもを育てる)」、「血濃与水」という考え方が基盤にある為と考えられる。介護者の健康状態は、「あまり健康でない」「健康でない」と答えた介護者が、日本では約40%、中国では35.3%であったため、日本も中国も介護者への支援が重要であることが示唆された。

2. 要介護者のADL自立度について

日中の違いからみると、中国は日本より要介護者のADLの自立度が高かったが、日本の要介護者の年齢が10以上も高いことで解釈できると考えられる。退院した時点において、日中のいずれも、80%以上の要介護者は介護がある程度必要であったため、要介護者ADLの自立に焦点を当てた効果的な看護の介入は必要であることが示唆されている。

3. 介護者の「MCEM」と「SE」について

中国は日本より「MCEM」と「SE」が有意に高かったという結果は、日中における要介護者との続柄の違いからの影響が大きいと考えられる。日本はお嫁のほうが多かったため、嫁である主介護者の得点が低かったことは、前に述べたように、「水より血が濃い」という考え方によるもので、周囲への気兼ねや要介護者との関係に大きな影響があると考えられる。南¹⁰⁾は、「甘えネットワーク」の概念を親密関係層、親しい関係層及び義理関係層からなり、親密関係層であるほど、自然に感情が湧いてきて、負担であっても大切に感じる。そして遠慮やうんざりした感じが少なくなると述べている。杉澤ら¹²⁾は、上海市と東京都の日中比較から、要介護者が問題行動の有無に関して、主介護者との続柄によって大きな違いが見られた。今回日中の主介護者と要介護者との続柄の差という研究結果は、家族介護者の援助態勢を積極的にしようとするには、介護者の続柄の違いを区別して効果的に介入していくことに繋がると考えられる。

中国の古い言葉には「家丑不可外言」（家族内の恥は外に知らせない）ということがある。つまり、家族関係がよくななくても、親密的な関係を他人に見せることにもあることを否定できない。それによって二つのマイナス結果があると考えられる。一つは、主介護者が要介護者に対して実際に世話を良くせずに、周りの人に良いふりをする。もう一つは、気兼ねをして過剰なケアを提供する。その二つの結果で介護を提供することには、要介護者の自分の本来持っている潜在的な能力を発揮することにマイナスの結果となるだろう。気兼ねすることは、中国の介護者だけではなく、日本の介護者においても存在する要素である。米田ら¹³⁾は、在宅介護者のストレスとその対処行動に介護者の「近所への気兼ね」という因子が含まれる。官澤ら¹⁴⁾は、介護者に関する研究で「家族や周りからの評価」という因子を見出し、介護者にとってその評価がプラス評価なら、介護の意欲や介護者の主体性に繋がるという結果を示した。このことから、日本のほうは、周囲への気兼ねが中国よりも「MCEM」に影響を受けているのではないかと考えられる。

4. 仮説の検証

「MCEM」のCronbach信頼性係数について、中国 $\alpha=0.89$ 日本 $\alpha=0.88$ であった。羽山¹⁵⁾は、 α 係数0.7以上は必要であると述べたが、本研究では、日中のいずれも、その基準値を上回っていたことから、尺度の信頼性が支持された。また、「MCEM」の高群は低群より、「ADL」の平均得点が有意に高くなっている。それは当初設定した「MCEM」得点の高い介護者は、その要介護者のADL自立度も高いとの仮説が検証できたといえる。さらに、介護者の「EM」・「SE」と要介護者の「ADL自立度」とは有意な正の相関が見られたため、「MCEM」や「SE」が要介護者の自立度の維持向上に影響が大きいと判断できる。

5. 看護への示唆

野嶋¹⁶⁾は、「EM」はケアを受ける者とケアを提供する者が、パートナーシップを形成し、協働して問題解決に取り組む可能となると述べたことから、介護者の「EM」は要介護者ADLの維持向上に繋がっていると推測される。本研究で明らかになった「MCEM」とADLの維持向上との関連性はこの推測が検証できた。結果より、「MCEM」を活した過剰介護予防プログラムの開発と実践するための指針を得たと考える。

引用文献

1. 吳小玉, 森口育子: 「主介護者のエンパワーメント尺度」に関する理論的妥当性の研究 2006年8月日中看護学会学術会論文集 p125-128, 2006
2. 盛田寛明, 塩中雅博, 古井透, 他: 在宅高齢脳卒中片麻痺者の「できるADL」と「しているADL」の差に影響する心理・環境要因 構造方程式モデルによる分析, 総合リハビリテーション 31 巻 2 号 p167-174, 2003
3. 香西恵利子, 水谷和子, 安川恵美子, 他: 回復期リハビリテーション病棟での在宅復帰に向けての看護師の役割 在宅復帰した患者 10 事例のFIMの変動分析から 日本リハビリテーション看護学会学術大会集録 16 回 p51-53, 2004
4. Mok, E., Chan, F., Chan, V., & Yeung, E: Perception of empowerment by family caregivers of patients with a terminal illness in Hong Kong. International Journal of Palliative Nursing, 8(3), 137-145, 2002
5. Heflinger, C. etc: A theory driven intervention and evaluation to explore family caregiver empowerment. Journal of Emotional and Behavioral Disorders, 5(3), 184-191, 1997
6. 吳小玉, 森口育子: 主介護者エンパワーメント尺度のプレテストに関する研究 国際看護学会発表論文集 p161 2007
7. 吳小玉: 主介護者のエンパワーメント尺度の内容妥当性と翻訳妥当性 日本看護科学会誌第 27 巻 1 号 p23-33, 2008
8. 吳小玉: 主介護者エンパワーメント尺度 (MCEM) の中国版の作成 日本看護科学会誌第 28 巻 3 号 p3-13, 2009
9. 斉藤基: 家族介護における介護行動及び介護者の QOL に関する研究 介護行動スケールの開発とその信頼性・妥当性の検討. 日本看護科学会誌 23(3), p57-68, 2003
10. WHO: 平均寿命ランキング http://memorva.jp/ranking/unfpa/who_2010_life_expectancy.php 2010
11. 南裕子: 甘えネットワーク質問紙の作成と検定 (その1). 看護研究, 19, 67-78, 1986
12. 杉澤秀博, 中谷陽明, 冷水豊: 中国上海市における在宅要介護老人と家族介護者の援助態勢に関する研究 日本公衆衛生雑誌 38, 546-552, 1995
13. 米田かおり, 河村鈴子, 山下光恵, 他: 神経難病患者の在宅介護者が経験する介護上のストレスとその対処行動 第33回日本看護学会論文集 成人看護 II, 66-68, 2003
14. 官澤文彦, 川西恭子, 増田安代, 他: 要介護高齢者を在宅ケアする介護者の生活満足に関する研究 九州看護福祉大学紀要, 4(1), 249-256, 2002
15. 羽山由美子: 看護研究の進め方とその実際 調査研究法を中心に. 看護 42(2), 161-171, 1990
16. 野嶋佐由美: エンパワーメントに関する研究の動向と課題 看護研究, 29, 453-464, 1996

注: 本研究から抜粋の一部は、2010年11月20日東京での『第2回日中韓看護学会』・札幌での『第30回日本看護科学学会』にて口演発表。

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

平成 22 年 8 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：新正 由紀子

所属機関名：東京医療センター

所属部署名：臨床研究センター 職名：研究員

所 在 地：〒152-8902 東京都目黒区東が丘 2-5-1

電 話：03-3411-1712



1. 助成金額： 370,000 円

2. 研究テーマ

先天性難聴児の新生児聴覚スクリーニングの効果に関する比較研究

3. 成果の概要

新生児聴覚スクリーニングに関し、中国におけるトップの指導者である黄麗輝先生の招聘により、わが国との比較を行い、同時に今後の共同研究について検討した。

4. 被招聘者

被招聘者氏名：黄 麗輝

職名：教授

所属機関名：首都医科大学附属北京同仁病院

部署名：耳鼻咽喉科

5. 滞在日程概要

H22.6.21 (月)：来日、6.22 (火)：厚生労働省訪問、日中医学協会訪問、6.23 (水)：東京医療センター・耳鼻科外来見学、Otology & Neurotology Conference にて講演、6.26-27 (土・日)：第 5 回小児耳鼻咽喉科学会に参加、6.28 (月) 東京医療センター・耳鼻科外来見学、6.29 (火)：東大耳鼻科訪問、6.30 (水)：帰国

先天性難聴児の新生児聴覚スクリーニングの効果に関する比較研究

招 聘 者 氏 名	新 正 由 紀 子
所 属 機 関	東京医療センター・臨床研究センター 研究員
被招聘者氏名	黄 麗 輝
中国所属機関	首都医科大学附属北京同仁病院

要旨

黄麗輝先生は中国における新生児聴覚スクリーニングに取り組み、本年教授に昇進し、中国におけるトップ指導者として新生児聴覚スクリーニングに取り組んでいる。その現在の状況の報告と現在のわが国の新生児聴覚スクリーニングとの比較を行った。同時に今後の共同研究について検討した。

Key Words :

新生児聴覚スクリーニング、先天性難聴、ABR、人工内耳

緒言（目的や研究背景）

日本では新生児聴覚スクリーニングは全出生児の 60%に行われている。中国では北京や上海のような大都市でのみ行われている。日本と中国のそれぞれの場合を比較し、問題点を検討することにした。

研究（治療）対象と方法

新生児聴覚スクリーニングと人工内耳手術が中国と日本ではどのように行われ、どのような成果をあげているか、何が問題点かを比較検討する。

成績（結果）

- ①わが国では年間の出生数は 100 万人であるが、中国では 2000 万人である。
- ②わが国の新生児聴覚スクリーニングは全国的に行われ、約 60%が対象となっている。中国では北京や上海のような大都市でのみ行われ、全出生児の数%にしかすぎない。
- ③先天性難聴児の人工内耳手術は毎年先天性難聴の 30%が対象となっているが、保険加入者の少ない中国では 0.5%程度と考えられる。

考察

新生児聴覚スクリーニングの中国の問題点は大都市でのみ行われていることである。これは財政上の問題であろう。新生児の数が年間 2000 万人とわが国の 20 倍と多いことにも原因がある。人工内耳の普及率が中国では低いのは保険制度がまだ普及していないためであろう。

参考文献

- 加我君孝、新正由紀子他：新生児聴覚スクリーニング．小児科臨床ピクシス pp55-59、中山書店 2010
- 加我君孝、新正由紀子他：幼小児の人工内耳手術—先天性および後天性高度難聴児に聴覚を回復させる新しい医療—．BIO INDUSTRY 26(3) : 92-98, 2009

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－中国人研究者招聘－

2011 年 1 月 4 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：真部 淳



所属機関名：聖路加国際病院

所属部署名：小児科

職名：医長

所 在 地：東京都中央区明石町 9-1

電 話：03-3541-5151 (代表) 内線：PHS77-223

1. 助成金額：900,000 円

2. 研究テーマ

小児の骨髓異形成症候群 (MDS) の診断と治療

3. 成果の概要

小児の骨髓異形成症候群 (MDS) は、頻度は低いものの、診断が難しく、また予後不良の疾患群である。国内での発症例は1年間に50-100例と少ない。天津の中国医科学院血液学研究所の若手研究者を日本に招き、小児のMDSの診断と治療を学ぶ機会を設けた。場所は聖路加国際病院で、2010年7月から12月までの6ヶ月間である。被招聘者は、日本小児血液学会のMDS委員会が行う中央診断システムを通じて全国から同院小児科に送られてくる標本（毎週約5件）を用いて、小児MDSの診断学を学んだ。また、日本国内で過去10年間に中央診断された約600例について臨床像を整理し、2008年に出されたWHOの新しい疾患分類に照らし合わせて検討を行ったところ、小児MDSについての新たな知見が得られ、現在論文化を進めている。今後は中国においても中央診断を用いた前方視的登録が開始されることを目指す。現在、世界的には中央ヨーロッパ地方および日本から小児MDSの治療研究が提案されているが、その他では行われていない。小児MDSは予後不良疾患であり、多くの症例で骨髓移植が適応であるが、同治療法の晩期障害を考えるとより洗練された治療の開発が必須である。症例数の多い東アジアから共同治療研究が提案されることの意義は大きいであろう。

小児の骨髓異形成症候群（MDS）の診断と治療

研究者氏名：陳 曉娟

中国所属機関：中国医学科学院血液学研究所小児科

日本研究機関：聖路加国際病院小児科

指導責任者：医長 真部 淳

共同研究者名：細谷 亮太

要 旨

小児の骨髓異形成症候群（MDS）は、頻度は低いものの、診断が難しく、また予後不良の疾患群である。国内での発症例は1年間に50-100例と少ない。天津の中国医科学学院血液学研究所の若手研究者を日本に招き、小児のMDSの診断と治療を学ぶ機会を設けた。場所は聖路加国際病院で、2010年7月から12月までの6ヶ月間である。被招聘者は、日本小児血液学会のMDS委員会が行う中央診断システムを通じて全国から同院小児科に送られてくる標本（毎週約5件）を用いて、小児MDSの診断学を学んだ。また同院および名古屋第一赤十字病院や名古屋大学において症例カンファレンスに出席し、小児MDSの診断と治療を学んだ。さらに日本国内で過去10年間に中央診断された約600例について臨床像を整理し、2008年に出されたWHOの新しい疾患分類に照らし合わせて検討を行ったところ、小児MDSについての新たな知見が得られ、現在論文化を進めている。今後は中国においても中央診断を用いた前方視的登録が開始されることを目指す。現在、世界的には中央ヨーロッパ地方および日本から小児MDSの治療研究が提案されているが、その他では行われていない。小児MDSは予後不良疾患であり、多くの症例で骨髓移植が適応であるが、同治療法の晩期障害を考えるとより洗練された治療の開発が必須である。症例数の多い東アジアから共同治療研究が提案されることの意義は大きいであろう。

Key Words

骨髓異形成症候群、MDS、小児、中央診断、国際協力

緒 言：

小児の骨髓異形成症候群（MDS）は、頻度は低いものの、診断が難しく、また予後不良の疾患群である。国内での発症例は1年間に50-100例と少ない。日本小児血液学会のMDS委員会の事業である中央診断を用いた前方視的登録により、国内の症例を把握することは可能となっ

たが、症例数が少ないため、治療方法の確立は容易ではない。中国との共同研究を行うことにより、小児 MDS 診断の標準化ならびに治療研究の推進が可能になると考えられる。

申請者は 2008 年 10 月に天津にある中国医科学院血液学研究所に 1 週間滞在し、小児血液学者を対象に講義ならびに顕微鏡を用いた講習を行った。残念ながら現段階では中国の研究者は本疾患（小児 MDS）について十分に習熟しているとはいいがたい。そこで、本研究では同研究所の若手研究者を日本に招いて小児 MDS の診断と治療の実際を習得することを目指した。

方法と結果：

天津の中国医科学院血液学研究所の若手研究者を日本に招き、小児の MDS の診断と治療を学ぶ機会を設けた。場所は聖路加国際病院で、2010 年 7 月から 12 月までの 6 ヶ月間である。被招聘者は、日本小児血液学会の MDS 委員会が行う中央診断システムを通じて全国から同院小児科に送られてくる標本（毎週約 5 件）を用いて、小児 MDS の診断学を学んだ。また同院および名古屋第一赤十字病院や名古屋大学において症例カンファレンスに出席し、小児 MDS の診断と治療を学んだ。さらに日本国内で過去 10 年間に中央診断された約 600 例について臨床像を整理し、2008 年に出版された WHO の新しい疾患分類に照らし合わせて検討を行ったところ、小児 MDS についての新たな知見が得られ、現在論文化を進めている。

考 察

将来的には中国においても中央診断を用いた前方視的登録が開始されることを目指す。世界的には中央ヨーロッパ地方および日本から小児 MDS の治療研究が提案されているが、その他では行われていない。小児 MDS は予後不良疾患であり、ほとんどの病型で骨髄移植が適応であるが、同治療法の晩期障害を考えるとさらに洗練された治療の開発が必須である。人口が多く症例数も多い東アジアから共同治療研究が提案されることの意味は大きいと考えられる。

そのためにまず、中国において中央診断を用いた前方視的登録を開始する準備を始める必要がある。具体的には、小児 MDS の診断・病型分類についての合意を形成するとともに、疾患登録に用いるフォームを日本で用いられているものと共通化させる作業を行う。このような作業においては、日本のシステムに習熟している被招聘者が今後中心となって活躍することが期待される。

参考文献

1. 平林真介、真部淳：MDS の中央診断：445 例の追跡調査。日小血会誌 23:53-57, 2009
2. 長谷川大輔、真部淳：小児不応性血球減少症-2010 年における最新の知見。日小血会誌 24:161-167, 2010

3. Kamiya T, Manabe A: Congenital dyserythropoietic anemia. Int J Hematol 92:432-438, 2010
4. Hasegawa D, Manabe A, Yagasaki H, Ohtsuka Y, Inoue M, Kikuchi A, Ohara A, Tsuchida M, Kojima S, Nakahata T: Treatment of children with refractory anemia: the Japanese Childhood MDS Study Group Trial (MDS99). Pediatr Blood Cancer 53:1011-1015, 2009
5. Manabe A, Okamura J, Yumura-Yagi K, Akiyama Y, Sako M, Uchiyama H, Kojima S, Koike K, Saito T, Nakahata T: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the International JMML Working Group. Leukemia 16:645-649, 2002
6. Sasaki H, Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Okamura J, Koike K, Ohara A, Ishii E, Komada Y, Hibi S, Nakahata T: Myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 189 patients in Japan. Leukemia 15:1713-1720, 2001

作成日 2011年1月 4日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－中国人研究者・技術者招聘－

2011 年 3 月 7 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： 裏出 良博 
所属機関名： (財)大阪バイオサイエンス研究所
所属部署名： 分子行動生物学部門 職名：研究部長
所在地： 大阪府吹田市古江台 6-2-4
電 話： 06-6872-4851 内線：

1. 助成金額： 900,000円

2. 研究テーマ

アデノシン A2A 受容体の睡眠調節の役割

3. 成果の概要

アデノシン A2A 受容体などが高密度に局在している側坐核 (Nucleus cuumbens; NAc) の核部及び殻部がいずれも睡眠－覚醒調節に不可欠であり、核部は殻部よりも重要であることを発見した。

4. 被招聘者

被招聘者氏名： 邱 梅紅 職名：講師
所属機関名： 復旦大学上海医学院 部署名：神経生物学部門

5. 滞在日程概要(日付・主な活動・工程など)

第1回 2010年7月5日－9月30日

- ・ アデノ随伴ウイルスベクターを用いた RNA 干渉法の習得
- ・ 睡眠中枢の候補部位局所で A2A 受容体の knockdown 実験
- ・ 脳波による睡眠－覚醒の判断

第2回 2011年1月11日－2月10日

- ・ 追加実験、データ解析、論文作成

アデノシン A_{2A} 受容体の睡眠調節の役割

研究者氏名	邱 梅紅
中国所属機関	復旦大学上海医学院
日本研究機関	(財) 大阪バイオサイエンス研究所
指導責任者	裏出 良博
共同責任者名	黄 志力

要旨

側坐核 (Nucleus accumbens; NAc) は報酬、喜び、笑い、嗜癖、攻撃性、恐怖、プラセボ効果に重要な役割を担っているが、睡眠-覚醒調節に対する効果は未だに明らかになっていない。NAc の核部と殻部のいずれの部位にもドパミンD₁およびD₂受容体 (R)、アデノシンA₁RおよびA_{2A}Rが高密度に局在し、睡眠-覚醒調節に強く関与していると考えられる。本研究では、イボテン酸により、NAc核部または殻部を部位特異的に損傷させたNAc 損傷ラットを用いてドパミン受容体に作用するモダフィニルやA_{2A}Rに作用するカフェインの睡眠-覚醒に及ぼす効果を調べた。NAc核部を損傷させたラットは、対照のラットと比較して、24時間の累積覚醒量が25.8%増加した。また、このラットを6時間断眠させると、その後のリバウンド睡眠量は、対照のラットに比べて少なかった。睡眠反跳を示し、モダフィニルやカフェインの覚醒効果はより小さかった。さらに、NAc核部損傷ラットでは生理食塩水の腹腔内投与によって、睡眠潜時が165%延長された。同様に、NAc 殻部を損傷させたラットは、対照のラットと比較して、24時間の累積覚醒量が17.4%増加した。しかし、モダフィニルおよびカフェインの覚醒作用に対する効果は対照ラットと同程度であった。これらの結果はNAcの核部および殻部がいずれも睡眠-覚醒調節に不可欠であり、核部は殻部よりも重要であることを示している。

Key Words 側座核、A_{2A} 受容体、睡眠、覚醒、ドパミン

緒言：

近代社会の発展とともに、睡眠障害は医学的、社会的にますます深刻な問題となってきた。しかし、睡眠-覚醒調節の生理学的機構は未だに明らかになっていない。神経薬理学的な研究結果は、断眠後に脳内のプロスタグランジン (PG) D₂やアデノシンレベルが上昇していることから、PGD₂ 受容体 (DPR) や A_{2A}R の活性化が強力な睡眠促進作用をもたらすことを示している。さらに、いくつかの実験によって、睡眠に対する PGD₂ の情報はアデノシンレベルの上昇に伝達されること、A_{2A}R がアデノシンの睡眠促進作用に関与していることが明らかにされている。これらのデータは、アデノシンが重要な内因性の睡眠物質であることを示している。

腹側外側視索前野 (VLPO) は睡眠の誘発や維持に関与するため(Ref)、睡眠中枢であることが知られ、一方で、結節乳頭体核 (TMN) は覚醒の調節に関与する覚醒中枢であることが広く知られている(Ref)。A_{2A}R 作動薬は VLPO ニューロンを活性化させ (VLPO 領域の c-fos

発現の増加により示される)、GABA/ガラニン抑制性神経を介して、TMN の神経活動を阻害することにより、睡眠を促進させる。しかし、VLPO には $A_{2A}R$ は存在しないので、 $A_{2A}R$ がどのように VLPO の活性化させるのかは未だに明らかになっていない。VLPO に加え、 $A_{2A}R$ 作動薬の投与後に NAc での c-fos 発現も同様に上昇する。従って、我々は、 $A_{2A}R$ 作動薬が NAc の $A_{2A}R$ を活性化させ、VLPO に睡眠を誘発するシグナルが伝達される可能性があると考えた。本研究の目的は睡眠-覚醒調節における NAc の役割を明らかにすることである。

目的と方法

目的:

1. 睡眠-覚醒調節における NAc の役割を明らかにすること。
2. NAc 損傷ラットにおける睡眠-覚醒特性について、ドパミン受容体に作用するモダフィニルやアデノシン $A_{2A}R$ に作用するカフェインの覚醒効果を観察すること。

方法:

ラットの両側の NAc にイボテン酸 (Sigma) を投与して部位特異的な損傷を起こした。睡眠-覚醒の変化を評価するため脳波 (EEG) および筋電 (EMG) 記録用電極をラットに埋め込んだ。ラットは抱水クロラルで麻酔し、NAc (AP:+1.2 mm、ML:±1.8 mm、DV:-7.0 mm) にイボテン酸 (1%溶液) を定位的に微量注入した。続いて、睡眠-覚醒周期を評価するため、EEG および EMG 記録用電極を埋め込んだ。手術から 10 日間回復させた後、ラットを記録用チャンバーに入れ、記録用電極にケーブルを接続し、3 日間馴化させた。次に、自発的な睡眠-覚醒周期を調べるため、それぞれのラットについて明期開始である午前 8 時より、24 時間、EEG と EMG の記録を行った。その後、薬理学的研究を開始し、48 時間の EEG と EMG を記録した。6 時間断眠後のリバウンド睡眠に対する影響を調べるために、柔らかいティッシュの球でケージを軽く叩くことによりラットに 6 時間 (14:00 から 20:00 まで) の断眠を受けさせた。実験後、ラットを中性ホルマリンで灌流固定した後に脳を摘出し、40 μ m 厚の切片を作製した。これらの連続切片は、損傷部位の確認のため、ニッスル染色を行った。

結果

ラットの NAc をイボテン酸を用いて部位特異的に損傷させると覚醒が強く促進されることが明らかとなった。

NAc核部損傷ラットでは、対照ラットと比較して、自発的な覚醒が25.8%増加した。6時間断眠後のリバウンド睡眠は、対照ラットと比較して弱い反応を示した。また、モダフィニルやカフェインによる覚醒効果は、対照ラットに比べてより小さかった。さらに、NAc核部損傷ラットに生理食塩水を腹腔内投与すると、睡眠潜時が165%延長された。一方、NAc殻部を損傷させたラットでは覚醒が17.4%増加した、モダフィニル (90 mg/kg) およびカフェイン (15 mg/kg) の覚醒効果は対照ラットと同程度であった。

要約:

1. NAcの損傷は強力に覚醒を増加させるす。
2. NAc核部損傷ラットは睡眠の恒常性調節の機能低下を示した。

3. NAc核部損傷ラットは対照ラットと比較して、モダフィニルおよびカフェインの覚醒効果が顕著に減少した。
4. NAc核部損傷ラットは刺激（生理食塩水腹腔内投与）に対し、高い反応を示し、興奮性行動を見せた。

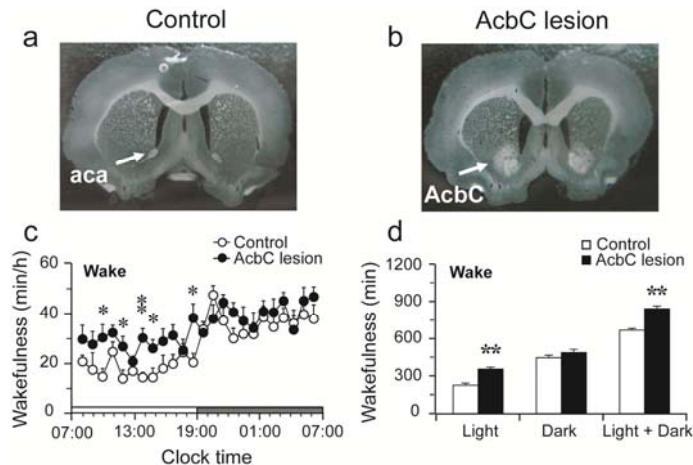


図 1. a および b: 対照 (a) および損傷例 (b) の冠状断面写真。b の矢印(淡い染色)部分は NAc の核部損傷領域を示す。c: 対照と NAc 核部損傷ラットの 1 時間当たりの覚醒量の経時変化。d: 明期、暗期、24 時間中の累積覚醒時間。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ (aca: 前交連; AcbC: 側座核核部。対照群: $n=6$; 損傷群: $n=8$)

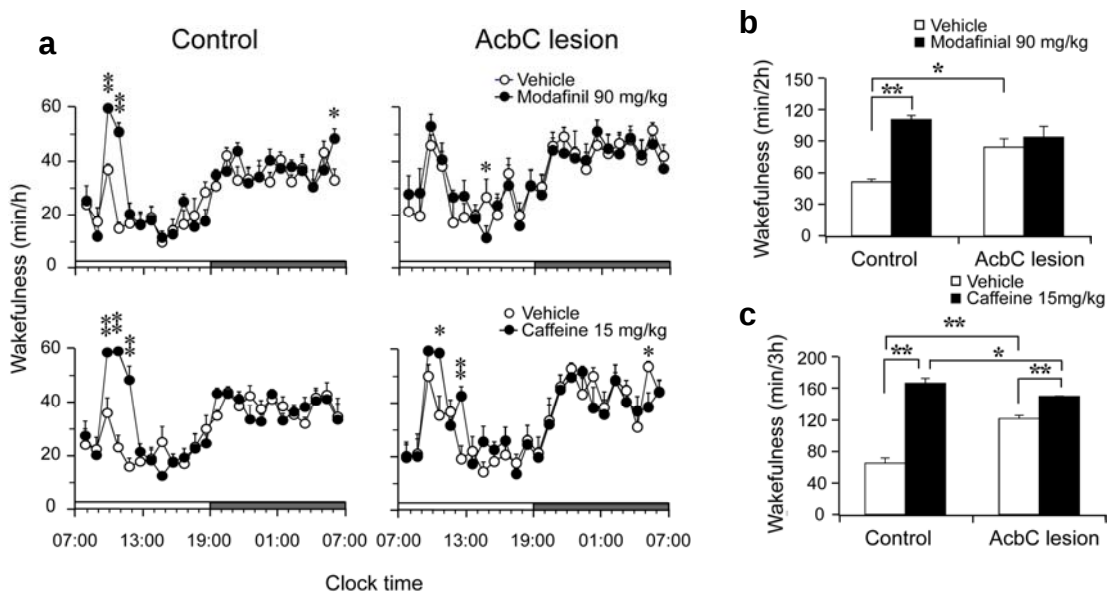


図 2. a および b: モダフィニルまたはカフェイン処理した対照群 (a) および NAc 核部損傷ラット (b) の覚醒量の経時変化。c: 溶媒またはモダフィニル投与後 2 時間の対照と NAc 核部損傷ラットの累積覚醒時間。d: 溶媒またはカフェイン投与後 4 時間の対照と NAc 核部損傷ラットの累積覚醒時間。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ (対照群: $n=6$; 損傷群: $n=8$)

考察

本研究の結果は、NAc 核部および殻部はいずれも睡眠-覚醒調節に不可欠であり、核部は殻部よりもより重要であることを示している。そして、核部は覚醒促進薬剤であるモダフィニルやカフェインの主要な標的部位でことが示唆される。

アデノシン $A_{2A}R$ およびドパミン D_1R , D_2R は、NAc 領域に高密度に存在しているが、これらの受容体を介した機能は全く逆である。つまり、 $A_{2A}R$ の活性化は睡眠を誘発するのに対し、ドパミン D_1R , D_2R は覚醒促進を生じさせる。NAc 損傷が覚醒の強い増加を起こすことは、NAc は $A_{2A}R$ が制御する睡眠の主要な領域であることを示唆している。

NAc は前頭前皮質(PFC)、扁桃体、腹側被蓋領域の3領域から主に入力を受けている。神経画像、神経病理学的、損傷解析等の結果から、通常感情処理に関与する神経回路は気分障害に強く関与していることが示されている。これらの回路の構造はPFCや扁桃体や海馬のような辺縁皮質下を含んでいる。そのため、NAcの核部損傷ラットの興奮性行動は通常感情神経処理回路の割り込みによって生じた可能性がある。

参考文献

- 1 Hayaishi, O., Urade, Y., Eguchi, N. and Huang, Z.L., Genes for prostaglandin synthase and receptor as well as adenosine A_{2A} receptor are involved in the homeostatic regulation of nrem sleep, *Arch Ital Biol*, 142 (2004) 533-9.
- 2 Urade, Y., Eguchi, N., Qu, W.M., Sakata, M., Huang, Z.L., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S. and Hayaishi, O., Sleep regulation in adenosine A_{2A} receptor-deficient mice, *Neurology*, 61 (2003) S94-6.
- 3 Huang, Z.L., Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness, *Curr Opin Pharmacol*, 7 (2007) 33-8.
- 4 Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W. and McCarley, R.W., Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness, *Science*, 276 (1997) 1265-8.
- 5 Mizoguchi, A., Eguchi, N., Kimura, K., Kiyohara, Y., Qu, W.M., Huang, Z.L., Mochizuki, T., Lazarus, M., Kobayashi, T., Kaneko, T., Narumiya, S., Urade, Y. and Hayaishi, O., Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 11674-9.
- 6 Basheer, R., Strecker, R.E., Thakkar, M.M. and McCarley, R.W., Adenosine and sleep-wake regulation, *Prog Neurobiol*, 73 (2004) 379-96.
- 7 Hong, Z.Y., Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Urade, Y. and Hayaishi, O., An adenosine A_{2A} receptor agonist induces sleep by increasing GABA release in the tuberomammillary nucleus to inhibit histaminergic systems in rats, *J Neurochem*, 92 (2005) 1542-9.
- 8 Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fredholm, B.B., Urade, Y. and Hayaishi, O., Adenosine A_{2A} , but not A_1 , receptors mediate the arousal effect of caffeine, *Nat Neurosci*, 8 (2005) 858-9.
- 9 Saper, C.B., Scammell, T.E. and Lu, J., Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms, *Nature*, 437 (2005) 1257-63.
- 10 Scammell, T.E., Gerashchenko, D.Y., Mochizuki, T., McCarthy, M.T., Estabrooke, I.V., Sears, C.A., Saper, C.B., Urade, Y. and Hayaishi, O., An adenosine A_{2A} agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons, *Neuroscience*, 107 (2001) 653-63.
- 11 Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G. and Linden, J., Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system, *J Comp Neurol*, 401 (1998) 163-86.
- 12 Chou, T.C., Bjorkum, A.A., Gaus, S.E., Lu, J., Scammell, T.E. and Saper, C.B., Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus, *J Neurosci*, 22 (2002) 977-90.
- 13 Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. and Linden, J., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol Rev*, 53 (2001) 527-52.
- 14 Rye, D.B. and Jankovic, J., Emerging views of dopamine in modulating sleep/wake state from an unlikely source: PD, *Neurology*, 58 (2002) 341-6.

- 15 Isaac, S.O. and Berridge, C.W., Wake-promoting actions of dopamine D1 and D2 receptor stimulation, *J Pharmacol Exp Ther*, 307 (2003) 386-94.
- 16 Wisor, J.P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G.H., Mignot, E. and Edgar, D.M., Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness, *J Neurosci*, 21 (2001) 1787-94.
- 17 Lena, I., Parrot, S., Deschaux, O., Muffat-Joly, S., Sauvinet, V., Renaud, B., Suaud-Chagny, M.F. and Gottesmann, C., Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep--wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats, *J Neurosci Res*, 81 (2005) 891-9.
- 18 Salmi, P., Chergui, K. and Fredholm, B.B., Adenosine-dopamine interactions revealed in knockout mice, *J Mol Neurosci*, 26 (2005) 239-44.
- 19 Maletic, V, Robinson, M, Oakes, T, Iyengar, S, Ball, SG, and Russell, J, Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract*, 2007. 61(12):2030-40.

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 03 月 03 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 紅霞

指導責任者名： 八尾 寛

所属部署名： 東北大学大学院
生命科学研究科

職名：産学官連携
研究員

所 在 地： 宮城県仙台市青葉区片平 2－1－1

電 話： 022－217－6210

内線：6210



1. 助成金額： 600, 000 円

2. 研究テーマ

医療への応用に最適化されたチャネルロドプシンの開発

3. 成果の概要

Channelrhodopsins (ChRs, including ChR1 and ChR2) function as light gated cation channels. In recent years, ChR2 mediated optogenetic stimulation is widely applied to fire neuronal spiking. However, ChR2 preferred to short wavelength light (470 nm) with rapid desensitization in the photocurrent. To modify the properties of ChRs and identify the molecular structures which affect the photocurrent properties, we exchanged G segment (containing the seventh helix) of ChR1 with the counterpart of ChR2 and examined the effect of exchanging segment between ChR1 and ChR2 on the photocurrent properties using whole cell recording. This G to g substitution between ChRs resulted in a shift in the wavelength sensitivity. The mutations of Ile291Leu and Asp292Glu in the seventh helix caused marked red shift in the wavelength sensitivity respectively. These new findings indicated that the residues close to the retinal binding position in the G^N(g^N), especially Asp and Ile/Leu, play important role in the determination of the wavelength sensitivity of ChRs. More red shifted I291LD292E may be applied to activate neurons in the deep brain.

4. 研究業績

(1) 学会における発表

☒ 有 (学会名・演題)

医療への応用に最適化されたチャネルロドプシンの開発

研究者氏名 王 紅霞
日本研究機関 東北大学 生命科学研究科 脳機能解析分野
指導責任者 八尾 寛
共同研究者名 石塚 徹

要旨

Channelrhodopsins (ChRs, including ChR1 and ChR2) function as light gated cation channels. In recent years, ChR2 mediated optogenetic stimulation is widely applied to fire neuronal spiking. However, ChR2 preferred to short wavelength light (470 nm) with rapid desensitization in the photocurrent. To modify the properties of ChRs and identify the molecular structures which affect the photocurrent properties, we exchanged G segment (containing the seventh helix) of ChR1 with the counterpart of ChR2 and examined the effect of exchanging segment between ChR1 and ChR2 on the photocurrent properties using whole cell recording. This G to g substitution between ChRs resulted in a shift in the wavelength sensitivity. The mutations of Ile291Leu and Asp292Glu in the seventh helix caused marked red shift in the wavelength sensitivity respectively. These new findings indicated that the residues close to the retinal binding position in the G^N(g^N), especially Asp and Ile/Leu, play important role in the determination of the wavelength sensitivity of ChRs. More red shifted I291LD292E may be used to excite neurons in the deep brain.

Key words: channelrhodopsin; optogenetics; mutation; wavelength sensitivity

緒言 :

Channelrhodopsins are seven transmembrane helix opsins, are involved in the photomovement of *Chlamydomonas Reinhardtii*. It is reported that ChR1 and ChR2 function as light gated cation channels (Nagel G et al, 2003). Light illumination on ChR expressing mammalian cells evoked inward photocurrents. In recent years, with precise temporal and neuronal population control, ChRs, especially, ChR2 mediated optogenetic stimulation is becoming an effective and popular tool to fire specific neuronal spiking (Bamann C, et al, 2010; Hegemann P and Möglich A, 2011).

Although sharing high similarities in the residue sequence, the ChR2 photocurrent was maximally activated at about 470 nm with rapidly desensitization while ChR1 was maximally activated at 505 nm with negligible desensitization. To modify the properties of ChRs and identify the molecular structures which differentiate the photocurrent properties, we examined the effect of exchanging the G (g) segment containing the seventh transmembrane helix between ChR1 and ChR2 on the photocurrent properties using whole cell recording, and found that the substitution of seventh helix from ChR1 to ChR2 resulted in a significant shift in the wavelength sensitivity. This new findings indicated that the residues close to the retinal binding position in the G (g) segment, especially Asp and Ile/Leu, play important role in the determination of the wavelength sensitivity of ChRs.

対象と方法 :

ChR variants were created by PCR and KOD plus mutagenesis Kit (Toyobo). These ChR variants were transfected into HEK293 cells using Effectene transfection reagent (Qiagen, Tokyo, Japan). The photocurrent of each ChR variant was measured under whole cell voltage clamp. All the data in the text are analyzed with Clampfit software (Axon Instrument) and presented as means $\pm$ S.E. (number). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U test.

結果：

1. Effect of the substitution of G segment of ChR1 with g segment of ChR2 on the wavelength sensitivity

Previously, the N terminal regions of ChR1 (residues 1-345) and ChR2 (residues 1-315) were divided into seven segments (namely, A, B, C, D, E, F, G in ChR1 and a, b, c, d, e, f, g in ChR2) containing the corresponding transmembrane helix as much as possible (Wang H et al, 2009). We replaced the G segment of ChR1 with the counterpart of ChR2, and obtained ChR-ABCDEFg. Compared with ChR1, the maximal sensitivity of ChR-ABCDEFg photocurrent was 20 nm blue-shifted (Fig.1 A). However, the F to f segment replaced chimera, ChR-ABCDEFg didn't show any wavelength shift (Fig.1 B), almost being identical to that of ChR1. Chimera ChR-ABCDEFg showed similar wavelength sensitivity to that of ChR-ABCDEFg (Wang H et al, 2009). These results revealed the importance of G (g) in the determination of wavelength sensitivity.

2. Effect of exchanging the differential residue from g^N to G^N on the wavelength sensitivity

G segment was divided into two parts: G^N subsegment and G^C subsegment (Fig.2A.). Correspondingly, g segment of ChR2 was subdivided into g^N and g^C (Fig.2A.). ChR-ABCDEF $g^N g^C$ and ChR-ABCDEF $g^N G^C$ were generated. The maximal sensitivity of ChR-ABCDEF $g^N g^C$ was almost equal to that of ChR-ABCDEFg whereas the maximum of ChR-ABCDEF $g^N G^C$ was clearly 20 nm blue shifted (Fig.2B and C). These results reflected that the G^N (g^N) subsegment determined the wavelength sensitivity. Our previous results indicated that compared with wild ChRs, ChR-ABCDEFg photocurrent was large in the amplitude with enhanced membrane expression. In order to investigate the effect of differential residues between G^N and g^N , We used ChR-ABCDEFg as a backbone to generate residue-exchanged mutants. We substituted each differential residue in g^N with the counterpart of G^N and found that only the wavelength sensitivity of ChRABCDEFg-I291L was partially red-shifted and its G/B ratio was significantly enhanced (Fig.3). The reverse mutant, ChR(ABCDEFg)-L291I showed a blue shift in wavelength sensitivity (Fig.3C). Taken together, these results indicated that Ile²⁹¹ in the g^N act as an more important role in the wavelength shift.

3. Effect of the mutation of Asp to Glu in helix G^N (g^N) on the wavelength sensitivity.

Asp²⁹² in g^N of ChR-ABCDEFg is a unique negative charged residue in the vicinity region of retinal chromophore (Fig 4A). Considering the narrow space around chromophore, this charged residue might affect on the wavelength sensitivity through exerting an influence on to the microenvironment around Schiff base. To test this possibility, the Asp²⁹² was substituted with Glu. ChR-ABCDEFg, D292E caused the maximal sensitivity shifted from 480 nm to 500 nm (Fig.4B). Double mutation, ChRABCDEFg-I291L/D292E was generated. As shown in, this double mutation induced a more 20 nm red shift (Fig.4C). These results demonstrated the importance of Ile291 and Asp292 in the determination of the wavelength sensitivity.

考察：

In this study, we identified that the g^N to G^N replacement caused a noticeable red-shift and the exchange of Ile291 to Leu in g^N induced a pronounced red-shift. It is noted that the retinal chromophore binds to Lys in G (g) segment. Probably the minor structural change from Ile to Leu affected the microenvironment in the neighboring region of retinal Schiff base and changed the wavelength sensitivity. It is reported that Asp212 to Asn in bR resulted in a red shift of light adapted spectrum (Needleman R, et al. 1991). Consistently, the equal site in ChR1, mutation of Asp292 to Glu produced a similar red-shift. The double mutation, I291L/D292E, unexpectedly led to a more red-shift in the wavelength sensitivity. Up to now, there is no other report about the effect of residue replacement around chromophore binding region in g/G segment (helix) on the wavelength sensitivity or other properties. Probably the tiny change in the structure and properties of Ile 291 exerted a strong impact onto the neighbor, Asp292, and further disrupted the surrounding environment of retinal Schiff base. More red shifted I291LD292E may be used to excite

neurons in the deep brain.

In conclusion, the present study demonstrates that the residues close to the retinal binding position in the $G^N(g^N)$, especially Asp and Ile/Leu, play important role in the determination of the wavelength sensitivity of ChRs.

参考文献：

Bamann C, Nagel G, Bamberg E. Microbial rhodopsins in the spotlight. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 ; 20(5):610-6.

Hegemann P, Möglich A. Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. *Nat Methods.* 2011; 8(1):39-42.

Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *PNAS*, 2003; 100: 13940 - 5.

Needleman R, Chang M, Ni B, et al. Properties of Asp212----Asn bacteriorhodopsin suggest that Asp212 and Asp85 both participate in a counterion and proton acceptor complex near the Schiff base. *J Biol Chem.* 1991; 25; 266(18):11478-84.

Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, et al. Molecular Determinants Differentiating Photocurrent Properties of Two Channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 5685 - 5696.

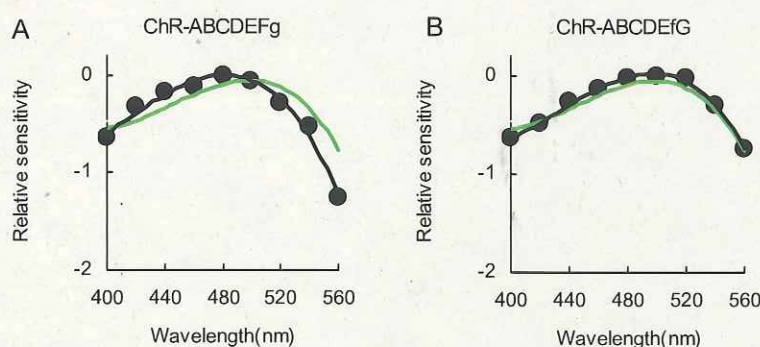


Figure .1. The effect of exchanging F and G segment of ChR1 with f and g of ChR2 on the wavelength sensitivity.

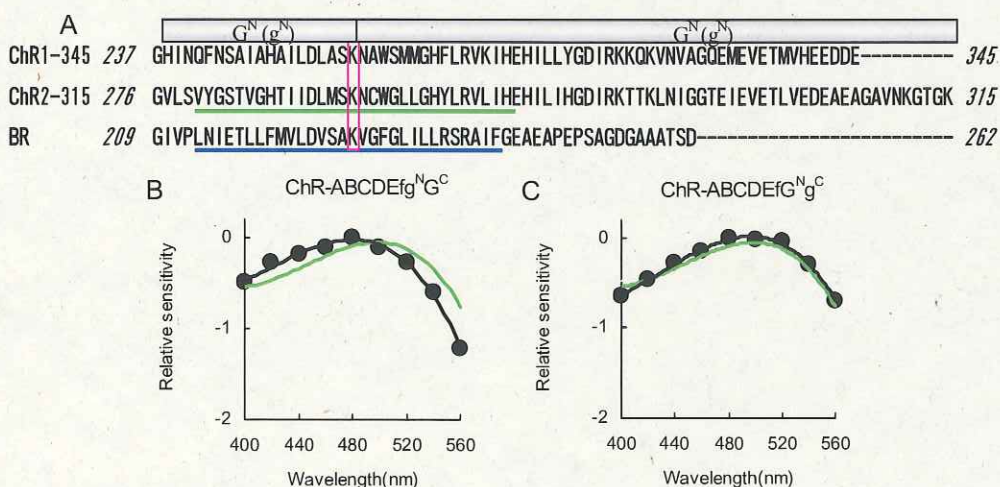


Figure .2. The effect of exchanging G^N and G^C with g^N and g^C on the wavelength sensitivity.

$$G^N/g^N$$

Chr1-345 237 GHINQFNSAIAHAILDASK 257
Chr2-315 276 GVLSVYGSTVGHTIIDMSK 296
BR 209 GIVPLNIETLLFMVLDSAK 229

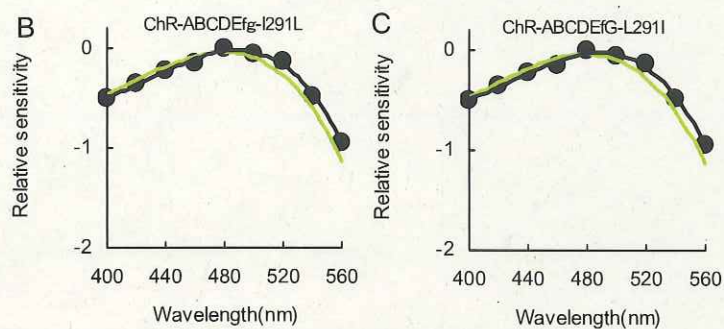


Figure.3. The effect of the mutation ChR-ABCDEFg-I291L (black) and ChR-ABCDEFg-I291I (black) on the wavelength sensitivity.

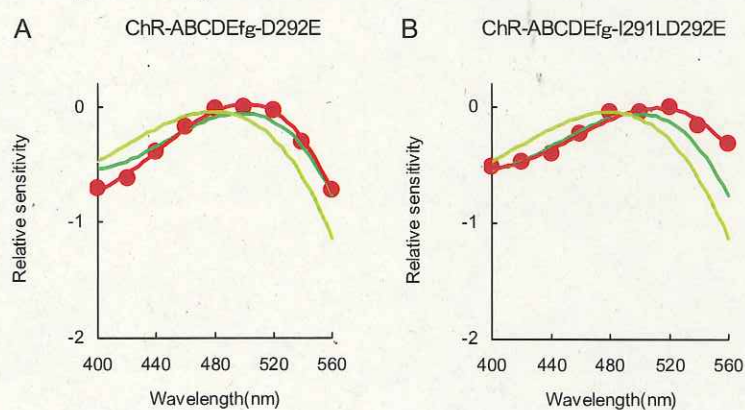


Figure.4. The effect of mutation ChR-ABCDEfg-D292E (red) and the ChR-ABCDEfg-I291LD292E(red) on the wavelength sensitivity.

作成日：2011 年 3 月 3 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2011 年 3 月 8 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 喆
指導責任者名： 村松 正道
所属部署名：金沢大学 医学系 職名：教授
所 在 地：金沢市宝町 13 番 1 号
電 話：076-265-2176 内線：2175



1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

薬剤耐性ウイルス出現における自然免疫効果分子 APOBEC の役割

3. 成果の概要

B 型肝炎病態をモデル化した実験系において APOBEC ファミリーの発現プロファイリングを行い、インターフェロンで APOBEC3G と F, TGFβ で AID の発現誘導を見いだした。さらに APOBEC3G と AID の強制発現でラミブジン耐性変異の源泉となりうる遺伝子変異がおこる事を見いだした。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ☒ 有 (学会名・演題)

・日本生化学会 北陸支部第 28 回大会(2010 年 5 月 29 日 福井)

B 型肝炎ウイルス高頻度突然変異における塩基除去修復因子 UNG の作用”

喜多村晃一、Zhe Wang、Sajeda Chowdhury、Guoxin Liang、村松正道

・第 14 回国際免疫学会議(2010 年 8 月 22 日～27 日 神戸)

“Base excision repair by uracil DNA glycosylase counteracts interferon-induced hypermutation on hepatitis B virus DNA”

Kouichi Kitamura, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, Guoxin Liang, Yoshiko Mitsuya, Miyuki Simadu,

Miki Koura, Taketomo Ozaki, and Masamichi Muramatsu

薬剤耐性ウイルス出現における自然免疫効果分子APOBECの役割

研究者氏名 王 喆
日本研究機関 金沢大学医学系 分子遺伝学
指導責任者 教授 村松 正道

Background:

In HBV story, lamivudine strongly suppresses HBV replication, so that prognosis of chronic hepatitis due to HBV is much improved. However, long-term cohort studies revealed surprisingly rapid emergence of lamivudine resistant HBVs in the chronic HBV infected patients. Point mutation in drug target gene is responsible for such drug resistance. It is proposed that such point mutations are generated by error of DNA polymerases during virus replication.

On the other hand, numerous cytokines are involved in immune responses, as well as antiviral activity, viral clearance, apoptosis, and fibrogenesis. In HBV study, it has been known that IFN and TGF- β 1 can inhibit HBV replication in vitro experiment. In clinic treatment, Moreover, IFNs are quite classical approach to cure the HBV infected patient. It is also known that both IFNs and TGF- β 1 can induce some APOBECs expression. Since APOBECs can mutate HBV genomic DNA, it is plausible that APOBECs upregulated by cytokine stimulation during hepatitis generate a drug resistant clone. To evaluate the possibility, first of all, expression profiling has been performed to decide which APOBECs can be a generator of drug resistant virus.

Results:

Fig1, IFN- α -induced expression of APOBEC genes in HepG2 cells. Expression of APOBEC cytidine deaminases and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). cDNA pools were synthesized from human hepatoma cells(HepG2 cells), which had been cultivated for 9 hours with and without IFN- α , and were analysed by Reverse Transcription-PCR for the expression of APOBEC3s and ADAR1. β -actin cDNA was amplified as a loading control. The PCR products were analysed on 2% agarose gel and then stained with SYBR Green .

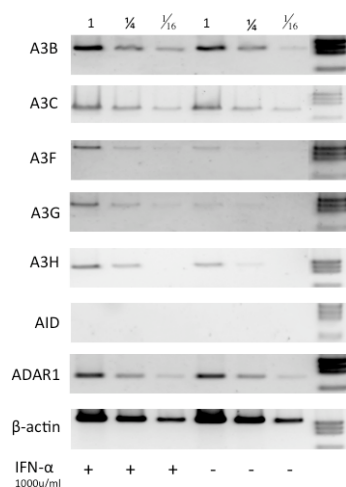


Fig2, IFN γ -induced expression of APOBEC genes in HepG2 cells. Expression of APOBEC cytidine deaminases and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). cDNA pools were synthesized from human hepatoma cells(HepG2 cells), which had been cultivated for 48 hours with and without IFN- γ , and were analysed by Reverse Transcription-PCR for the expression of APOBEC3s and ADAR1. β -actin cDNA was amplified as a loading control. The PCR products were analysed on 2% agarose gel and then stained with SYBR Green .

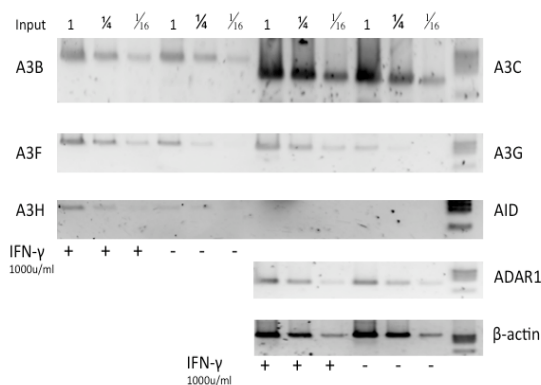


Fig3, TGF-β1-induced expression of APOBEC genes in HepG2 cells. . HepG2 cells total RNA was isolated before(0 hr), 12hr and 15hr after stimulation with human TGF-β1(10ng/ml).APOBEC gene expression were assessed by RT-PCR. The PCR products were analysed on 2% agarose gel and then stained with Ethidium bromide.

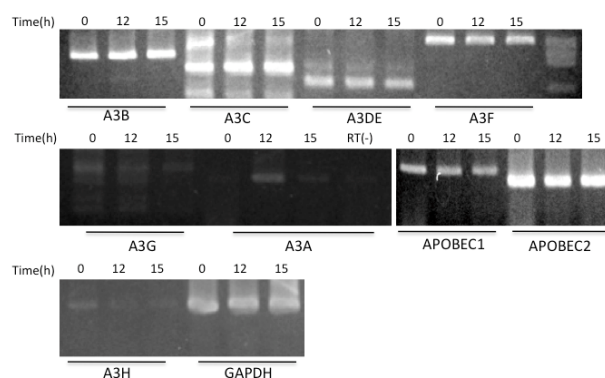


Fig4, TGF-β1-induced expression of APOBEC genes in Huh7 cells. Fig.4. HuH7 cells total RNA was isolated before and 48hr after stimulation with human TGF-β1(10ng/ml). APOBEC genes expression were assessed by RT-PCR. The PCR products were analysed on 2% agarose gel and then stained with Ethidium bromide.

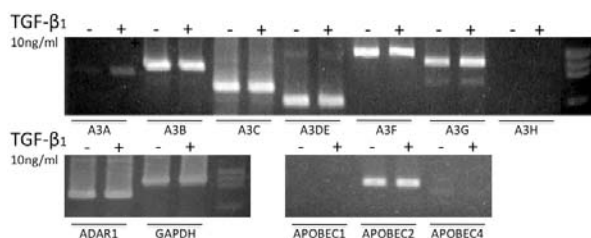
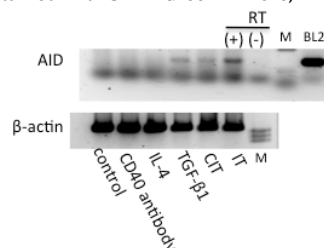


Fig5, AID expression by CIT stimulation 2 days in Huh7 cells. Induction of AID mRNA expression in Huh7 cells. cells were either unstimulated or stimulated for 2 days with anti-CD40(10ug/ml), IL-4(150ng/ml), TGF-β1(10ng/ml) and antiCD40+IL-4+TGF-β1. AID gene expression was assessed by RT-PCR. The PCR products were analysed on 2% agarose gel and then stained with SYBR Green . Here, BL2 serves as postive control.



Conclusion:

In our semi-quantitative PCR experiment, we find that a: IFN-α not only could robustly induce APOBEC3G expression but also modest induce APOBEC3F and APOBEC3H expression in HepG2 cell line, however, no significant induction in APOBEC3A, 3B, 3C, ADAR1. b: IFN-γ has the twin feature in APOBEC family genes expression in HepG2 cell line. c: TGF-β could remarkably up-regulate APOBEC3A expression in both HepG2 and Huh7 cell line. d: in Huh7 cells, we found not TGF-β1 but also CIT(antiCD40+IL-4+TGF-β1) or IT(IL-4+TGF-β1) could induce AID transcript expression. But anti-CD40 or IL-4 alone did not exhibit any apparent induction. This synergic effect is first time proposed by us in hepatoma cell.

Summary:

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most prevalent of human malignancies, and individuals who are chronic

Hepatitis B virus(HBV) carries have a greater than 100 fold increased relative risk of developing HCC. Lamivudine treatment has been very useful in reducing HBV DNA leveles in patient sera and shows very limited side effects(8).It was reported that drug resistant HBV appears in high frequency(2), with the incidence of resistance after 1 year of treatment ranging from 17% to 32%(3,9). Moreover, 65% of patients who have been treated with lamivudine for 5 years appear drug resistant (1). Most of HBV researchers accept that cytokines, like IFNs, IL-4 and TGF- β 1, are participated in HBV infection process. During HBV infection period, our immune system releases these factors to defend ourself. Cytidine deaminase is a member of a much larger family of tissuse-restricted deaminases that exhibit RNA editing and/or DNA mutating activity. In human, APOBEC family which includes activation-induced deaminase(AID)、APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A~H and APOBEC4 is a dominant cytidine deaminase. Many study already shown that some of APOBECs could inhibit viral replication, like HIV、HBV as well HPV, in vitro and vivo.

In our detection system, Semi-quantitative RT-PCR confirmed induction of APOBEC3G and F expression with both IFN α and IFN γ stimulations in our cell lines. Consistent with previous studies from other research groups, APOBEC3G is the major responder of interferon stimulation among APOBEC3 families in our cell lines(4-7). Besides, we further proposed that another APOBEC predominant member, namely AID, was induced by CIT(antiCD40+IL-4+TGF- β 1) in Huh7 cells. We also observed that TGF- β 1 had robust suppression effect in HBV replication in vitro experiment (data not shown). These results might reflect that potential mediator between cytokines and viral is deaminase. Finally we assume that point mutation in HBV drug resistant might be resulted from deaminase reaction by APOBECs, especially G(Guanine) to A(Adenine) and C(Cytosine) to T(Thymine), during HBV replication process.

References:

1. Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-Term Safety of Lamivudine Treatment in Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 2003;125: 1714-1722
- 2.Allen MI, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27:1670 -1677.
- 3.Mauss and Wedemeyer. Treatment of chronic hepatitis B and the implications of viral resistance to therapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2008;6:191-199.
4. Proto S. Proto S, Taylor JA, Chokshi S, Navaratnam N, Naoumov NV. APOBEC and iNOS are not the main intracellular effectors of IFN- γ -mediated inactivation of Hepatitis B virus replication. *Antiviral Research* 2008; 78: 260-267
5. Bonvin M, Achermann F, Greeve I, Stroka D, Keogh A, Inderbitzin D, Candinas D, Sommer P, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Greeve J. Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 2006; 43: 1364-74
6. Tanaka Y, Marusawa H, Seno H, Matsumoto Y, Ueda Y, Kodama Y, Endo Y, Yamauchi J, Matsumoto T, Takaori-Kondo A, Ikai I, Chiba T. Anti-viral protein APOBEC3G is induced by interferon-alpha stimulation in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 341: 314-319
7. Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Chayama K. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *Journal of General Virology* 2007; 88: 432-440
8. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med.*1999;341:1256-63.
- 9.Chang TT, Lai CL, Chien RN, Guan R, Lim SG, Lee CM, Ng KY, Nicholls GJ, Dent JC, Leung NW. Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* (2004) 19, 1276-1282.

Materials and methods

IFN α (recombinant IFN α -2b) and IFN γ (recombinant IFN γ -1a) were purchased from Schering-Plough and Shionogi, respectively. Huamn TGF- β 1, (R&B. Systems, Minneapolis, MN). SYBR Green was purchased from Invitrigene.

Cell culture

Human hepatoma HuH-7 and HepG2 cells were cultivated at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal calf serum(Wako, Osaka, Japan).

Semi quantitative RT-PCR

RNA was prepared from cultivated human liver cells using TRIsure according to the manufacturer's instruction. Five micrograms total RNA from hepatoma cells was reverse transcribed using a commercially available cDNA synthesis kit(SuperScript® III Reverse Transcriptase, invitrogen, CA) and oligo-dT primer. Conventional polymerase chain reaction (PCR) amplification of target cDNAs was performed.

作成日：2011年3月8日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 2 月 21 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：呼和哈斯

指導責任者名：鈴木幸一

所属部署名：感染制御部第8室 職名：室長

所在地：東京都東村山市青葉町4-2-1

電話：042-394-9092 内線：431



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ サイログロブリン(Tg)が持つ細胞増殖遺伝子発現調節機能を担う活性部位の同定

3. 成果の概要

本研究により、TgはMAPK経路のERKを介して甲状腺細胞増殖を誘導すること

を明らかにし、甲状腺細胞では、インスリンと血清非存在でTgにより誘導される細胞増殖は

複数のシグナル伝達カスケードを介して誘導されていることを示唆しました。

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・有(雑誌名・題名)

サイログロブリン (Tg) が持つ細胞増殖遺伝子発現調節機能を担う活性部位の同定

研究者氏名	呼和哈斯
中国所属機関	中国・内モンゴル・内蒙古中蒙医院
日本研究機関	国立感染症研究所ハンセン病研究センター
指導責任者	室長：鈴木幸一
共同研究者名	鈴木幸一、須江真理子

要旨

サイログロブリン(Tg)は660kDaの巨大なタンパク質であり、甲状腺ホルモン合成の基質として存在するだけでなく、甲状腺機能に関わる遺伝子発現を転写レベルで制御する強力な自己調節因子として作用することが知られ、ラット甲状腺細胞(FRTL-5)においては細胞増殖機能を示していることが報告されてきました。しかし、その分子機序に関してはまだ未知のままである。本研究ではラット甲状腺細胞 FRTL-5 細胞を用いて Tg の細胞増殖分子機序について検討を行った。マイクロアレイ解析で、Tg が MAPK 経路に関わる遺伝子 MEK と ERK の発現を高進させ、実際 MAPK/ERK 経路に関与する Raf, MEK 1/2 と ERK1/2 などのタンパクの発現も Tg により増加を示し、その細胞増殖が PD98059 (MEK 1/2 と ERK1/2 の抑制剤)により抑制された。c-myc, c-fos, and c-jun などの ERK 下流の転写因子も Tg により活性化され、CDKs と Rb のリン酸化も Tg により誘導された。

これらの結果から、Tg が MAPK 経路の ERK を介して甲状腺細胞増殖を誘導することを明らかにした。以前の Akt 経路の関与の報告を加え、我々の結果は甲状腺細胞ではインスリン、血清および甲状腺刺激ホルモン (TSH) 非存在で、Tg により誘導される細胞増殖は、複数のシグナル伝達カスケードによって媒介されていることを示唆した。

Key Words サイログロブリン (Tg), FRTL-5 細胞、細胞増殖、シグナル伝達カスケード。

緒言

サイログロブリン (Tg) は、濾胞内に蓄積する、ヨード有機化の担体であり、甲状腺ホルモン合成の基質であると長い間考えられてきた。しかし、近年濾胞内に蓄積した Tg の濃度によって、甲状腺機能を担う様々な遺伝子発現や細胞増殖がダイナミックに調節されることが明らかになった。

甲状腺細胞の増殖と機能は TSH、インスリン/IGF-1 シグナリングによって規制されていると考えられていた。一方、我々は、ラット甲状腺 FRTL-5 細胞では、TSH、インスリンと血清非存在で、低濃度の Tg が PI3K/Akt 経路を介して細胞増殖を誘導することと高濃度の Tg が細胞増殖を抑制することを報告し、Tg は TSH と同様 PI3K/Akt 経路を介して細胞増殖を誘導することを明らかにした。しかし、Tg と TSH の甲状腺細胞での異なった機能から細胞増殖に対しても異なった作用機序が存在する可能性があると考えられる。本研究は、Tg により誘導する PI3K/Akt 非依存細胞増殖経路を同定することを目的とした。

対象と方法

- 1)、Tg 処理と処理しない FRTL-5 細胞から RNA を精製、DNA マイクロアレイにより Tg 刺激に応じた遺伝子の変動を解析した。
- 2)、Tg 処理と処理しないおよび TSH 処理、MAPK/ERK 阻害剤 (PD98059) 処理 FRTL-5 細胞群の MAPK/ERK 経路に関わる遺伝子の変動をウェスタンブロッティングで評価し、BrdU により細胞増殖機能を確認した。
- 3)、Tg 処理と TSH 処理 FRTL-5 細胞の細胞増殖に関わる転写因子の mRNA とタンパクの変動を RT-PCR とウェスタンブロッティングにより評価した。

結果

- 1) FRTL-5 細胞で TSH、インスリン、血清非存在で Tg 刺激に応じた遺伝子
DNA マイクロアレイの解析により、FRTL-5 細胞では TSH、インスリン、血清非存在 Tg のみの刺激で 1095 の遺伝子発現が高進され、862 の遺伝子発現が減少を示し、MEK1, Fos, ERK1 など MAPK 経路関連遺伝子の発現が顕著に増加することを明らかにした。(図 1)
- 2) Tg により活性化した MAPK/ERK 経路
ウェスタンブロッティングによりリン酸化 c-Raf、MEK1/2 と ERK1/2 など MAPK/ERK 経路関連タンパクの変動を確認したところ、Tg 処理しない群に比べ Tg 処理群では発現増加が観察され、その増加が MAPK/ERK 阻害剤 (PD98059) により抑制された。Tg 処理と TSH 処理群の BrdU アッセイの比較で、PD98059 により抑制される Tg の細胞増殖活性が TSH 処理群では認められなかった。(図 2)
- 3) MAPK/ERK の下流の細胞増殖因子が Tg により活性化された
RT-PCR とウェスタンブロッティングにより MAPK/ERK 経路の下流の遺伝子の mRNA とタンパク活性を評価したところ、c-myc, c-fos と c-jun などの転写因子が Tg 刺激により顕著に増加され、TSH では増加が認められなかった。また、細胞周期に関する遺伝子 cyclin D1, cyclin D2, CDK2 と CDK4 も Tg 刺激により経時的に増加、Rb のリン酸化が誘導された。(図 3)

考察

本研究では、我々は FRTL-5 細胞では、Tg が MAPK/ ERK 経路を活性化することにより CDKs など細胞周期関連遺伝子の DNA 合成と Rb のリン酸化を促進することを示唆した。Tg により誘導される細胞増殖は TSH と異なって MAPK/ ERK 経路を経由していることを示した。

MAPK/ERK 経路は、細胞増殖に関与する重要な経路であって、主に MEK、Raf と ERK から構成されている。本研究では、Tg がリン酸化 c-Raf、MEK1/2 and ERK1/2 の発現増加を誘導、その細胞増殖作用が MAPK/ERK 阻害剤 (PD98059) により抑制されたことをウェスタンブロッティングと BrdU アッセイで確認した。一方、TSH により誘導する細胞増殖は PD98059 処理に応答を示さなかった。ERK がリン酸化すると c-myc、c-fos と c-jun などの転写因子が活性化され、細胞周期に関わる遺伝子 cyclin D1、cyclin D2、CDK2、CDK4 と Rb のリン酸化が誘導され、細胞が G1 期から S 期に移動細胞周期を活性化する。c-myc、c-fos と c-jun などの mRNA とタンパクが Tg により活性化され cyclin D1、cyclin D2、CDK2、CDK4 の増加と Rb のリン酸化が誘導されたが、TSH では顕著な変化を示さなかった結果も Tg は TSH と異なった MAPK/ ERK 経路を介して細胞増殖を誘導していることを示した。

TSH は細胞膜に存在する TSH レセプターと結合、PI3K- Akt 経路を活性化させ、細胞増殖を誘導していると報告されている。最近、Rafp21 が TSH 誘発細胞分裂に関与し、その作用が Raf- ERK 経路を経由しないことが報告している。

一方、我々は、FRTL-5 細胞では、TSH、インスリンと血清非存在で低濃度の Tg が PI3K/ Akt 経路を介して細胞増殖を誘導することと高濃度の Tg が細胞増殖を抑制することを報告し、Tg は TSH と同様 PI3K/Akt 経路を介した細胞増殖をも誘導すること報告した。

これらのことから、Tg によって誘導される細胞増殖は TSH と同様な PI3K/Akt 経路を介する経路と PI3K/Akt を介さない MAPK/ ERK 経路の二つの経路を介していることを示唆した。

図

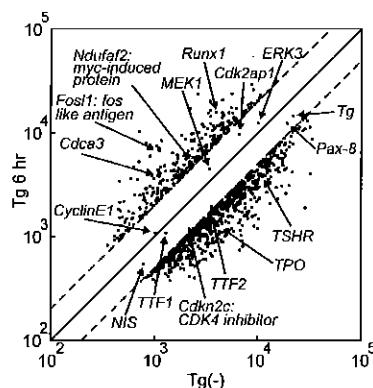


FIG. 1. DNA microarray analysis of genes expressed on FRTL-5 thyroid cells after stimulation of Tg without TSH, insulin, and serum. FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were exposed to 5 mg/ml of Tg for 6 hr, and total RNA was extracted. Scattered plot of the gene expression levels with Tg treatment are shown

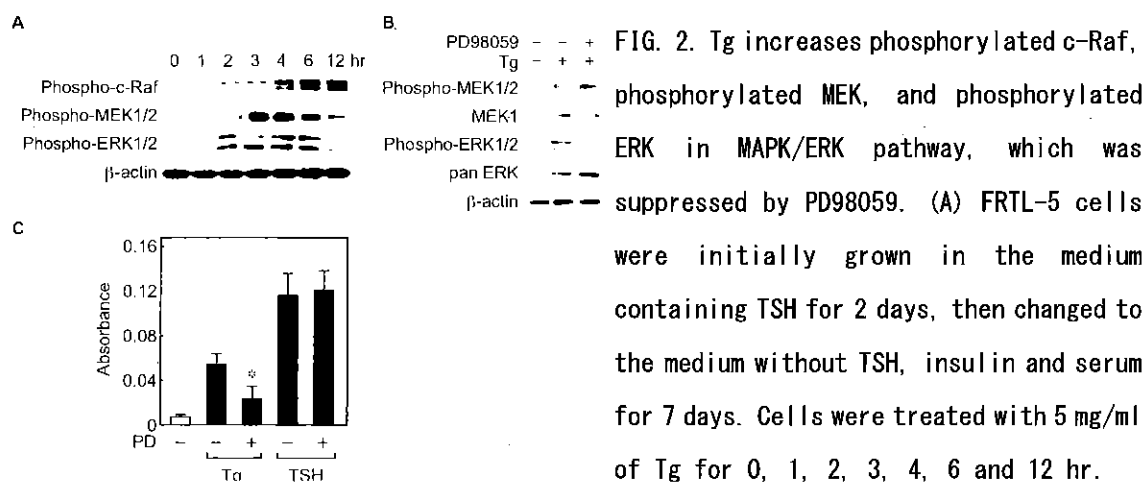


FIG. 2. Tg increases phosphorylated c-Raf, phosphorylated MEK, and phosphorylated ERK in MAPK/ERK pathway, which was suppressed by PD98059. (A) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin and serum for 7 days. Cells were treated with 5 mg/ml of Tg for 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 12 hr.

Total proteins were extracted and analyzed by Western blot as described in Materials and Methods. (B) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were treated in the medium containing PD98059 with the final concentration of 50 μ M 30 min prior to the Tg stimulation. Total proteins were extracted after 24 hr of Tg treatment, and analyzed by Western blot as described in Materials and Methods. (C) PD98059 inhibits the Tg induced BrdU incorporation. FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were treated in the medium containing PD98059 with the final concentration of 50 μ M, 30 min prior to the Tg stimulation. Proliferation analysis was performed by BrdU incorporation as described in Materials and Methods. Results are the mean $\pm$ SD of triplicate assays from three different experiments. *, $P < 0.001$.

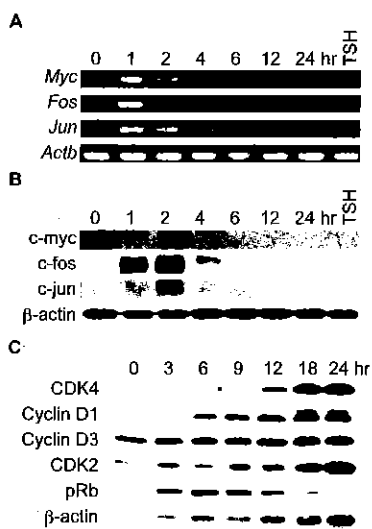


FIG. 3. Tg increases mRNA and protein levels of transcriptional genes. (A) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were challenged by Tg for 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 hr. Total RNA was extracted and analyzed by RT-PCR. The PCR products were analyzed on a 2% agarose gel electrophoresis. (B) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were challenged by Tg for 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 hr. Total proteins were extracted and analyzed

by Western blot as described in Materials and Methods. (C) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were challenged by Tg for 0, 3, 6, 9 12, 18 and 24 hr. Total proteins were extracted and analyzed by Western blot as described in Materials and Methods.

参考文献

1. Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarello M, Kimura S, Katoh R, Kawaori A and Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8251-8256, 1998.
2. Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ulianich L and Kohn LD. Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake through suppression of gene expression in the thyroid. *Endocrinology* 140: 5422-5430, 1999.
3. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 141:839-845, 2000.
4. Suzuki K and Kohn LD. Differential Regulation of Apical and Basal Iodide Transporters in the Thyroid by Thyroglobulin. *J Endocrinol* 189:247-255, 2006.
5. Nedachi T, Akahori M, Ariga M, Sakamoto H, Suzuki N, Umesaki K, Hakuno F, Takahashi SI. Tyrosine kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation are required for cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent potentiation of deoxyribonucleic acid synthesis induced by insulin-like growth factor-I in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 141:2429-38, 2000.
6. Noguchi Y, Harii N, Giuliani C, Tatsuno I, Suzuki K and Kohn LD. Thyroglobulin (Tg) induces thyroid cell growth in a concentration-specific manner by a mechanism other than thyrotropin/cAMP stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 391:890-894, 2010.
7. Sellitti DF, Suzuki K, Doi SQ, Lagranha C, Machado M, Matos T and Kohn LD. Thyroglobulin increases cell proliferation and suppress Pax-8 expression in mouse mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285:795-799, 2001.
8. Wu H, Suzuki S, Sellitti D, Doi SQ, Tanigawa K, Aizawa S, Akama T, Kawashima A, Mishima M, Ishii N, Yoshida A, Hisatome I, Koles NL, Katoh R and Suzuki K. Expression of a thyroglobulin (Tg) variant in mouse kidney glomerulus. *Biochem Biophys Res Commun* 389:269-273, 2009.

9. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* 4(1):82-89, 1994.
10. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science.* 249(4964):64-7, 1990.
11. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 369(6476):156-60, 1994.
12. Ekokoski E, Webb TE, Simon J, Törnquist K. Mechanisms of P2 receptor-evoked DNA synthesis in thyroid FRTL-5 cells. *J Cell Physiol.* 187(2):166-75, 2001.
13. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* 13(7):1610-9, 1994.
14. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 265(5174):966-70, 1994.
15. Pomerance M, Abdullah HB, Kamerji S, Correze C, Blondeau JP. Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 275(51):40539-46, 2000.
16. Corrèze C, Blondeau JP, Pomerance M. The thyrotropin receptor is not involved in the activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases by thyrotropin preparations in Chinese hamster ovary cells expressing the human thyrotropin receptor. *Thyroid.* 10(9):747-52, 2000.

2011年2月21日

財団法人 日中医学協会

2010 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：石秀玉

指導責任者名：廣瀬 伸一

所属部署名：福岡大学医学部

職名：主任教授

所在地：福岡市城南区七隈 7 丁目 4 5-1

電話：092-801-1011 (3393)

内線：3393



1. 助成金額： 600, 000 円

2. 研究テーマ

—日中医学協会助成事業—

Dravet 症候群患者における modifier 遺伝子異常

3. 成果の概要

Our results suggest that SCN9A mutations by themselves do not cause Dravet syndrome, on the other hand, some of their mutations role as possible genetic modifiers causing Dravet syndrome when combined with SCN1A mutation.

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・☒ (学会名・演題)

Prevelence and character of SCN1A mutation in genetic diagnosis of Dravet syndrome and Intractable Childhooh Epilepsy Xiuyu Shi, Jiwen Wang, Kurahashi K, Fukuma G, Ishii A, Higurashi N, Kaneko S, Hirose S. XIth World Congress Of ICNC 2010.5/2-7 Egypt

(2) 発表した論文 無・☒ (雑誌名・題名)

Shi X, Huang MC, Ishii A, Yoshida S, Okada M, Morita K, Nagafuji H, Yasumoto S, Kaneko S, Kojima T, Hirose S. Mutational analysis of GABRG2 in a Japanese cohort with childhood epilepsies. J Hum Genet 2010;55(6):375-8.

The developmental changes of Nav1.1 and Nav1.2 expression in the 6 human hippocampus and temporal lobe. Wenze Wang, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Su-Kyeong Hwang, Nabeshima K, Takeshita M, Hirose S. B RES in press

Dravet syndrome での SCN9A の遺伝子変異分析—

研究者氏名 石秀玉
中国所属機関 中国人民解放军总医院小児科
日本研究機関 福岡大学医学部小児科
指導責任者 教授 廣瀬 伸一
共同研究者名 黄壽卿

<要旨>

Background: Dravet syndrome is an intractable epileptic disorder occurring in the first year of life, mutations in SCN1A encoding the sodium channel Nav1.1 are a major cause of it. Recently, concurrent SCN9A and SCN1A mutations in Dravet syndrome have been reported which provide models for potential genetic modifier effects. This was significant as SCN9A is known to cause inherited pain syndromes, and no previous reports have linked it to epilepsy. To clarify their role and association with SCN1A in Dravet syndrome, screening for genetic SCN9A abnormalities was performed using direct sequencing methods.

Materials and methods: We analyzed 492 chromosomes from Dravet syndrome patients and 572 from healthy volunteers. Dravet syndrome patients were divided into two groups; one without, and one with SCN1A mutations (consisted of 256 and 236 chromosomes, respectively). We next analyzed 58 chromosomes from patients with milder forms of SCN1A related epilepsies to evaluate whether SCN9A influences on seizure phenotype.

Results: A sequencing of SCN9A yielded eight missense variants including four novel ones: M787V, S802G, V861E, and Y1175C. All novel variants had relatively high phyloP scores and three of them, M787V, V861E, and Y1175C were predicted to be deleterious. Nevertheless, M787V and V861E were also found in the control group. S802G and Y1175C were found in the SCN1A mutation (+) Dravet syndrome group, but not in milder forms of SCN1A related epilepsies, nor in the controls.

Conclusions: Our results suggest that SCN9A mutations by themselves do not cause Dravet syndrome, on the other hand, some of their mutations role as possible genetic modifiers causing Dravet syndrome when combined with SCN1A.

<Key Words>

Dravet syndrome, SCN1A, SCN9A, mutation, genetics

〈本文〉

緒言：

Dravet syndrome, also known as Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy (SMEI; OMIM 607208), is an intractable epileptic disorder occurring in the first year of life in infants who previously had shown normal development. Initial seizures are hemiclonic or generalized tonic-clonic, usually begin with fever, and often lead to status epilepticus. Later episodes begin to occur without fever, and patients manifest other seizure types, including myoclonic, complex-partial, and atypical absences. Prognosis is poor, with psychomotor impairment and intractable seizures. Mutations in SCN1A encoding the sodium channel Nav1.1 are a major cause of Dravet syndrome. To date, nearly 700 mutations of the SCN1A have been found in Dravet syndrome patients, accounting for 50-80% of them. SCN1A mutations show various penetrance and expressivity even within the same family, and have extreme heterogeneity. Thus the disease's pathogenesis is not completely understood by SCN1A alone, and many reports have suggested that it is genetically heterogeneous. Recently, concurrent SCN9A and SCN1A mutations in Dravet syndrome have been reported providing models for potential genetic modifier effects. It was significant because SCN9A is known to cause inherited pain syndromes, and no previous reports suggested it as a contributor to epilepsy. To clarify their role and association with SCN1A mutations in Dravet syndrome, we performed genetic analyses of SCN9A.

対象と方法：

1. Subjects

We analyzed 492 chromosomes from Dravet syndrome patients and 572 from healthy volunteers. Dravet syndrome patients were divided into two groups; one without, and one with SCN1A mutations (consisted of 256 and 236 chromosomes, respectively). We next analyzed 58 chromosomes from patients with milder forms of SCN1A related epilepsies to evaluate whether SCN9A influences on seizure phenotype. Most samples were from Japan although a few were from India. The diagnoses were made at departments of child neurology in various regional tertiary hospitals and detailed clinical reports and questionnaires were completed for each patient. SCN1A mutation analyses for patients and controls were previously examined in our lab.

2. Genetic analysis

Screening for genetic SCN9A abnormalities was performed using direct sequencing methods. Each of the participants or their parent/ guardian signed an informed consent form approved by the Ethics Review Committee of Fukuoka University or similar committees of participating institutions. Genomic DNAs were prepared from ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated whole blood samples using a QIAamp DNA Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sequencing was carried out in both directions using 28 specific primer pairs amplifying SCN9A's 27 exons. Screening for genetic abnormalities was performed by direct sequencing methods using dye terminator chemistry (Big-Dye, Applied Biosystems, Foster City, CA). Details of PCR conditions and the primers are available upon request. Reference sequences of messenger RNA (mRNA) were based on information available from RefSeq (accession numbers): Human SCN1A, NM 006920; Human SCN9A, NM 002977.

結果：

All patients had a clinical history consistent with Dravet syndrome, and patients with SCN1A mutations carried SCN1A missense or splice site mutations. No SCN1A mutations were found in the controls. A sequencing of SCN9A yielded eight missense variants including four novel ones: M787V, S802G, V861E, and Y1175C. As shown in Table 1, all novel variants had relatively high phyloP scores and three of them (with low SIFT score), M787V, V861E, and Y1175C were predicted to be deleterious. Nevertheless, M787V and V861E were also found in the control group. S802G and Y1175C were found in the

SCN1A(+) Dravet syndrome group, but not in 58 chromosomes with less severe forms of SCN1A related epilepsies, nor in the controls (Table 2). For these two mutations, Fisher's exact two-tailed test yielded $p=0.02$ (3/236 SCN1A(+) Dravet syndrome group and 0/572 controls), while other six variants including M787V and V861E showed no statistical differences between each groups. Our results suggest that SCN9A mutations by themselves do not cause Dravet syndrome, on the other hand, some of their mutations role as possible genetic modifiers causing Dravet syndrome when combined with SCN1A.

考察：

Our results suggest that SCN9A mutations by themselves do not cause Dravet syndrome, on the other hand, some of their mutations role as possible genetic modifiers causing Dravet syndrome when combined with SCN1A.

参考文献：

1. Depienne, C., O. Trouillard, et al. (2009). Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet* 46(3): 183-91.
2. Singh, N. A., C. Pappas, et al. (2009). A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome. *PLoS Genet* 5(9): e1000649.

Table 1. Overview of all identified SCN9A missense variants.

Exon	EX15		EX16		EX17	EX19	EX27	
Amino acid level	M787V	*S802G	V861E	M932L	V991L	*Y1175C	R1893H	D1908G
Nucleotide level	c.2359A>G	c.2404A>G	c.2582T>A	c.2794A>C	c.2971G>T	c.3524A>G	c.5678G>A	c.5723A>G
dbSNP ID	novel	novel	novel	rs12478318	rs4369876	novel	rs79805025	rs3750904
†phyloP	0.96937	2.2588	5.10491	3.44324	0.0215039	1.53396	2.0388	1.16176
‡SIFT score	0.01	0.54	0.00	0.97	0.23	0.01	0.11	0.33
Prediction	Deleterious	Tolerable	Deleterious	Tolerable	Tolerable	Deleterious	Tolerable	Tolerable

Table 2. Allelic frequencies of all identified SCN9A missense variants.

	M787V	*S802G	V861E	M932L	V991L	*Y1175C	R1893H	D1908G
SCN1A(-)	4/256	0/256	0/256	9/256	9/256	0/256	1/256	18/256
Dravet	(1.56%)	(0%)	(0%)	(3.52%)	(3.52%)	(0%)	(0.39%)	(7.03%)
(n=256)								
SCN1A(+)	3/236	2/236	0/236	7/236	7/236	1/236	1/236	15/236
Dravet	(1.27%)	(0.86%)	(0%)	(2.97%)	(2.97%)	(0.42%)	(0.42%)	(6.36%)
(n=236)								
SCN1A(+)	1/58	0/58	0/58	4/58	4/58	0/58	1/58	7/58
Less severe epilepsies	(1.72%)	(0%)	(0%)	(6.90%)	(6.90%)	(0%)	(1.72%)	(12.07%)
(n=58)								
Controls	5/572	0/572	1/572	13/572	13/572	0/572	2/572	40/572
(n=572)	(0.87%)	(0%)	(0.17%)	(2.27%)	(2.27%)	(0%)	(0.35%)	(6.99%)

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 3 月 8 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： 李賓

指導責任者名：武田 卓

所属部署名：東北大学先進漢方

職名：准教授

治療医学講座

所 在 地：仙台市青葉区星陵町 1 番 1 号

電 話：022-717-7000

内線：7254



1. 助成金額： 60 万 円

2. 研究テーマ

子宮筋腫細胞増殖・線維化における、低酸素細胞内シグナル伝達機構解析

3. 成果の概要

子宮筋腫は非常に頻度が高く、多くの女性の QOL を著しく障害する。手術以外の治療としては、GnRH アゴニストによる薬物治療が行われるが、骨粗鬆症や卵巣機能欠落症状等で長期投与できない。一方、メトホルミンは糖尿病治療薬として古くより汎用され、婦人科領域では多嚢胞卵巣の排卵障害改善薬としても使用される。近年、種々の癌細胞増殖に対しメトホルミンが AMPK シグナルを介して抑制的に作用することが明らかとなり、癌治療への応用でも注目を集めている。メトホルミンの子宮筋腫細胞増殖および低酸素状態で誘導される血管新生因子である VEGF 発現に与える影響を検討した。子宮筋腫モデル細胞株である ELT-3 細胞を用いて、細胞増殖への影響を MTS アッセイで検討した。AMPK, p70S6, S6 蛋白質のリン酸化に対する効果をウエスタンブロット法で検討した。また、Cleaved PARP 抗体によるウエスタンブロット法、TUNEL 染色と Caspase-3 活性によりアポトーシスを検討した。患者検体から作

子宮筋腫細胞増殖・線維化における、低酸素細胞内シグナル伝達機構解析

メトホルミンによる子宮筋腫細胞増殖抑制効果～子宮筋腫モデル細胞株・ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討

研究者氏名 : 李 賓
中国所属機関 : 吉林大学中日聯誼病院産婦人科
日本研究機関 : 東北大学先進漢方治療医学講座
指導責任者 : 准教授 武田 卓
共同研究者名 : 築地謙治 近藤亜希子

要旨:

子宮筋腫は非常に頻度が高く、多くの女性の QOL を著しく障害する。手術以外の治療としては、GnRH アゴニストによる薬物治療が行われるが、骨粗鬆症や卵巣機能欠落症状等で長期投与できない。一方、メトホルミンは糖尿病治療薬として古くより汎用され、婦人科領域では多嚢胞卵巣の排卵障害改善薬としても使用される。近年、種々の癌細胞増殖に対しメトホルミンが AMPK シグナルを介して抑制的に作用することが明らかとなり、癌治療への応用でも注目を集めている。メトホルミンの子宮筋腫細胞増殖および低酸素状態で誘導される血管新生因子である VEGF 発現に与える影響を検討した。子宮筋腫モデル細胞株である ELT-3 細胞を用いて、細胞増殖への影響を MTS アッセイで検討した。AMPK, S6 蛋白質のリン酸化に対する効果をウェスタンブロット法で検討した。また、Cleaved PARP 抗体によるウェスタンブロット法、TUNEL 染色と Caspase-3 活性によりアポトーシスを検討した。患者検体から作製したヒト子宮筋腫モデルマウスにメトホルミンを腹腔内投与し、8 週後に摘出した組織を TUNEL 染色、Ki67 抗体および VEGF 抗体を用いた免疫染色で検討した。メトホルミンは *in vitro*・*in vivo* で子宮筋腫細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。さらに、子宮筋腫組織での VEGF の発現を低下させた。メトホルミンのこれらの効果のメカニズムとして AMPK を活性化させ、mTOR 下流の蛋白質リン酸化低下の関与が考えられた。子宮筋腫治療における細胞増殖抑制・血管新生抑制効果からのメトホルミンの治療効果が期待される。

Key Words 子宮筋腫、メトホルミン、AMPK、NOG マウス、VEGF

緒言:

子宮筋腫は、子宮の筋層に発生する平滑筋細胞由来の良性腫瘍である。生殖年齢の女性のうち 20% の割合で発生する。これらの腫瘍は閉経前の女性の子宮摘出の一番の適応となり、米国での一年間での子宮摘出の 33% を占める (1, 2)。一方メトホルミンは、タイプ II 糖尿病の治療において広く使われている薬剤である。メトホルミンは糖尿病患者における乳癌発症抑制効果が報告されたことから、癌治療領域においても注目を集めている。乳がん細胞における研究では、メトホルミンは AMPK (AMP-activated protein kinase) をリン酸化し mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路を抑制し、その下流にある S6 蛋白質のリン酸化を抑制し細胞増殖・タンパク質合成を抑制することが示されている。これよりメトホルミンは、他のがんや良性腫瘍の増殖を抑制する可能性が考えられる (3, 4)。子宮筋腫モデル細胞株の ELT3 細胞、子宮筋腫モデルラット Eker rat での筋腫増殖での mTOR シグナルの重要性が報告されていることから、メトホルミンによる子宮筋腫増殖抑制効果が期待される。

子宮筋腫研究が進まない大きな原因の 1 つは、良い生体内モデルシステムの欠如であるが、我々は免疫不全マウスに手術にて摘出した子宮筋腫組織を移植したヒト子宮筋腫モデルを開発した (NOD/SCID/ γ c-null : NOG) (5)。In vitro での検討に加えてこのモデルを使用して、メトホルミン投与が子宮筋腫増殖におよぼす *in vivo* での影響を検討した。子宮筋腫には VEGF が高発現しており、子宮筋腫の病態における VEGF の関与が考えられるが (6)、低酸素誘導性の転写因子である HIF-1 の制御を介して VEGF は mTOR の下流にある。メトホ

ルミンによる mTOR シグナル抑制からの VEGF 発現抑制効果も期待できる。

対象と方法:

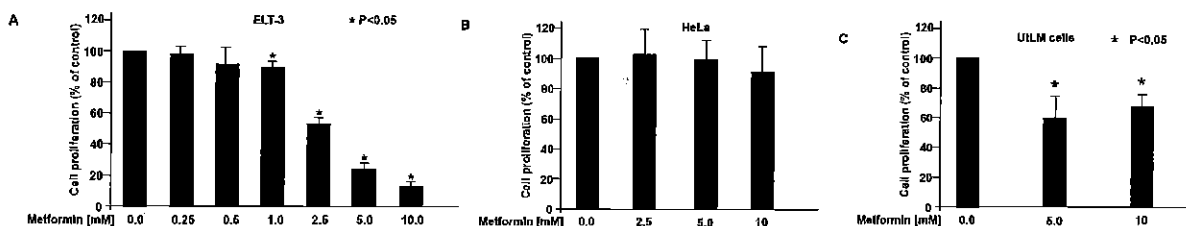
- 1) 子宮筋腫細胞増殖に対するメトホルミンによる抑制効果の in vitro での検討
 - ・子宮筋腫細胞株である ELT-3 細胞、UtLM 細胞を実験に用いた。
 - ・MTS アッセイを用いて細胞増殖を検討した。
 - ・アポトーシスの関与を cleaved PARP の発現、および TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色で評価した。
 - ・mTOR シグナル伝達経路下流のタンパク質のリン酸化抗体を使用した Western blotting を検討した。
- 2) 子宮筋腫細胞増殖に対するメトホルミンによる抑制効果の in vivo での検討
 - ・ヒト子宮筋腫をヌードマウスに移植した子宮筋腫モデルマウスを作製した。
 - ・子宮筋腫モデルマウスにメトホルミンを経口投与し、腫瘍サイズの変化を経時的に測定した。これより摘出した組織を用いて、細胞増殖・血管新生・アポトーシスをタネル染色、Ki-67・VEGF 抗体を用いた免疫染色で、mTOR シグナルへの抑制効果をリン酸化 S6 抗体を用いた免疫染色で検討した。

結果:

1. メトホルミンは子宮筋腫細胞増殖を抑えた。

メトホルミンは、ELT-3 細胞 (Fig. 1A) において、増殖を抑えることを示した。Dose-response は、ELT-3 細胞の増殖がメトホルミンによって 1mM から増殖を抑えることを示した。LKB1 は、AMPK のメトホルミンによって活性化されるキナーゼであるが、LKB1 を欠損した HeLa 細胞ではメトホルミンによって増殖を抑制しなかった (Fig. 1B)。ヒト平滑筋腫細胞 (UtLM) (Fig. 1C) でも同様にメトホルミンは増殖を抑制した。

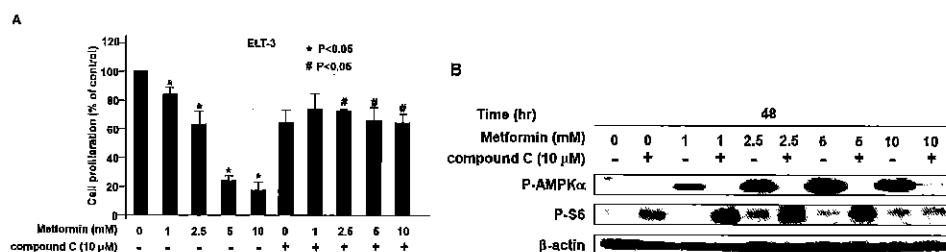
Fig. 1



2. AMPK に対する compound C は、メトホルミンの抑制作用から細胞を rescue した。

AMPK が ELT-3 細胞でメトホルミンの増殖抑制作用することに関係していることを確認するため、compound C (AMPK の抑制剤) を使用した。Fig. 2A で示すように、compound C を加えると、MTS アッセイによってメトホルミンで増殖を抑えた細胞を rescue した。compound C は、メトホルミンによりリン酸化された AMPK を抑制し、S6 (Ser^{235/236}) のリン酸化を活性化した。

Fig. 2



3. ELT-3 細胞はメトホルミンによってアポトーシスが誘導される。

メトホルミンが ELT-3 細胞でプロアポトーシスを誘導するかを調べた (7, 8)。Fig. 3A で示すように、メトホルミンは 2.5mM から 10mM に PARP を増加した。Fig. 3B は、compound C を加えると cleaved-PARP を低下させ

ることを示した。TUNEL 染色では、メトホルミンによりアポトーシス (DNA 断片化) が起こることが示された (Fig. 4)。

Fig. 3

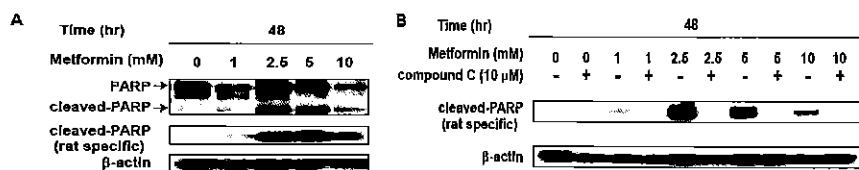
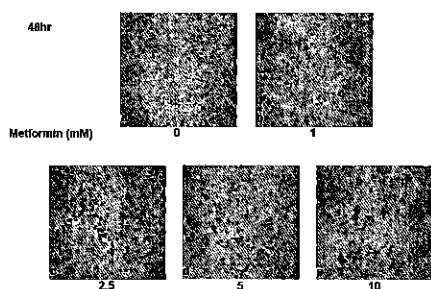


Fig. 4



4. In vivo の検討でも、メトホルミンはアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制した。

メトホルミンは増殖を妨げて、生体内で平滑筋腫細胞のアポトーシスを誘発した。メトホルミン治療の生体内有効性を測定するために、ヒトの子宮筋腫モデルマウスを使用した。免疫染色は、8 週間のメトホルミン治療が Ki-67 レベル (Fig. 5) の抑制を引き起こすことを示した。また、TUNEL 染色の結果は、8 週間のメトホルミン治療によりアポトーシスが起こることを示した (Fig. 6)。mTOR の活性化の指標として、そのシグナルの下流にあるリン酸化 S6 (Ser^{235/236}) を免疫染色で確認した。8 週間のメトホルミン治療はリン酸化 S6 (Ser^{235/236}) レベル (Fig. 7C) を抑制することを認めた。さらに、子宮筋腫組織での VEGF の発現を低下させた (Fig. 8)。

Fig. 5

Fig. 6

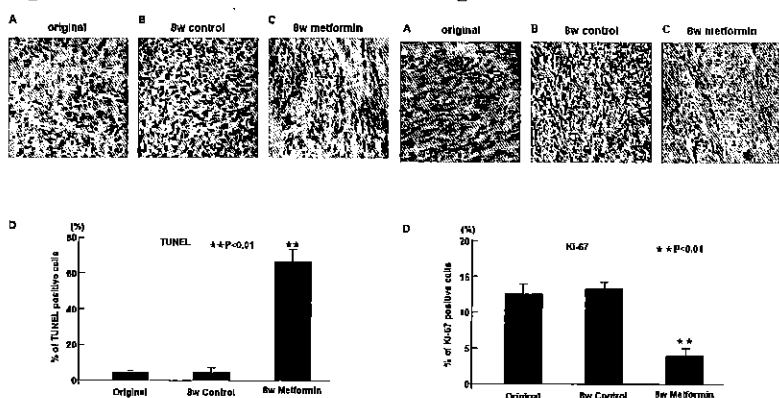
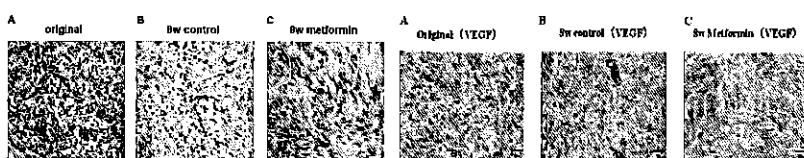


Fig. 7

Fig. 8



考察:

近年、種々の癌細胞増殖に対しメトホルミンが AMPK シグナルを介して抑制的に作用することが明らかとなり、癌治療への応用でも注目を集めている。メトホルミンはすでに乳がん、前立腺がん、大腸癌、卵巣がん (3、9、

10) で細胞増殖を抑えることが示されているが、今回の実験は、子宮筋腫細胞でメトホルミンの抗腫瘍を *in vitro*・*in vivo* で示した最初の研究である。

メトホルミンによるガン細胞増殖抑制研究において、AMPK/mTOR 経路は、代謝とタンパク質合成(11)の中心的な役割を演じます。compound C (AMPK の抑制剤) を使用した実験結果からも、子宮筋腫においてもメトホルミンが AMPK/mTOR 経路に作用して増殖抑制することが示された。

従来は AMPK が複合体 (TSC2) (mTOR シグナリングを関する TSC1/TSC2 (hamartin/tuberin) のサブユニット) のリン酸化を通して mTOR を抑制して細胞増殖を抑制するとされていた。今回の研究においては、TSC2^{-/-}である ELT-3 細胞を使用していることから TSC2 のリン酸化の他に、AMPK は mTOR シグナリングの未知の抑制メカニズムがあると考えられる。

今回の研究においてヒトの子宮筋腫モデルマウスで *in vivo* の検討を行った。メトホルミンは、モデルマウスに対する毒性なしで子宮筋腫組織の発達を抑えた。さらに、実際の臨床では、メトホルミンは多嚢胞卵巣症候群 (PCOS) の治療において広く処方されている。多くのレポートは、PCOS (12) で、メトホルミンの治療的な有用性を支持する。これより、生殖年齢女性でのメトホルミンの長期使用は、比較的安全であると考えられる。

メトホルミンのこれらの効果のメカニズムとして AMPK を活性化させ、mTOR 下流の蛋白質リン酸化低下の関与が考えられた。子宮筋腫治療における細胞増殖抑制・血管新生抑制効果からのメトホルミンの治療効果が期待される。

参考文献:

1. Cramer SF, Patel A 1990 The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 94:435 - 438
2. Wilcox LS, Koonin LM, Pokras R, Strauss LT, Xia Z, Peterson HB 1994 Hysterectomy in the United States, 1988 - 1990. *Obstet Gynecol* 83:549 - 555
3. Osborne CK, Bolan G, Monaco ME, Lippman ME 1976 Hormone responsive human breast cancer in longterm tissue culture: effect of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4536 - 4540
4. Belfiore A 2007 The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des* 13:671 - 686
5. Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N 2010 Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice. *Tohoku J Exp Med* 222(1):55-61
6. Takeda T, Osuga K, Miyake A, Wakabayashi A, Morishige K, Kimura T 2008 Elevated level of plasma vascular endothelial growth factor after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for leiomyomata. *Gynecol Endocrinol* 24:724-726
7. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE, Thor AD 2009 Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* 8:2031 - 2040
8. Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM 2008 Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 14:7192 - 7198
9. Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN 2008 The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila)* 1:369 - 375
10. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, Bruchim I 2008 In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 14 110:246 - 250
11. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F 2010 Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther* 9:1092-1099
12. Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F Jr 2009 Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev* 30:1-50

作成日: 2011 年 3 月 24 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 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： 謝 琳

指導責任者名： 高原 史郎、梨 井康

所属部署名： 大阪大学大学院 職名： 大学院生

所 在 地：大阪府吹田市山田丘 2-2

電 話：06-6879-3746

内線：



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

既存抗体陽性移植の克服および臓器移植後新規抗体産生機序の解明とその制御に関する研究

3. 成果の概要

Heterotopic cardiac transplantation was performed from F344/EGFPTg and F344/HLA-B27Tg rats to F344 rats. The F344 recipients accepted the F344/EGFPTg transplants, whereas they rejected the cardiac tissue from the F344/HLA-B27Tg rats by 39.4 ± 6.5 days, due to high production of anti-HLA-B27 IgM- and IgG-specific antibodies. the F344 recipients rejected cardiac grafts from double transgenic F344/HLA-B27&EGFPTg rats within 9.0 ± 3.2 days, and this was associated with a significant increase in the infiltration of lymphocytes by day 7, suggesting a role for cellular immune rejection. Hence, our data indicate that HLA-B27 and/or GFP transgenic proteins are useful for establishing a unique animal transplantation model to clarify the mechanism underlying the allogeneic cellular and humoral immune response, in which the transplant antigens are specifically presented.

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・☒ (学会名・演題)

Z. Liu, K. Kato, N. Hatayama, L. Xie, Y. Nagahara, X-K.Li. Eicosapentaenoic acid attenuate allograft rejection in HLA-B27/EGFPtransgenic rat cardiac transplantation model. 第 37 回日本臓器保存生物医学学会. 新潟. 2010. 11. 19-20.

(2) 発表した論文 ☒・有(雑誌名・題名)

臓器移植後抗体産生機序の解明に関する研究

研究者 氏名 謝琳
日本研究機関 大阪大学大学院移植基盤医療学
国立成育医療研究センター研究所 RI 管理室
指導 責任者 教授 高原史郎、室長 梨井康
共同研究者名 劉忠、 畑山直行、加藤賢

Abstract

The development of an animal model bearing definite antigens is important to facilitate the evaluation and modulation of specific alloantigen responses after transplantation. In the present study, heterotopic cardiac transplantation was performed from F344/EGFP^{Tg} and F344/HLA-B27^{Tg} rats to F344 rats. The F344 recipients accepted the F344/EGFP^{Tg} transplants, whereas they rejected the cardiac tissue from the F344/HLA-B27^{Tg} rats by 39.4 ± 6.5 days, due to high production of anti-HLA-B27 IgM⁺ and IgG-specific antibodies. In addition, immunization of F344 rats with skin grafts from F344/HLA-B27^{Tg} rats resulted in robust production of anti-HLA-B27 IgM and IgG antibodies, and accelerated the rejection of a secondary cardiac allograft (7.4 ± 1.9 days). Of interest, the F344 recipients rejected cardiac grafts from double transgenic F344/HLA-B27&EGFP^{Tg} rats within 9.0 ± 3.2 days, and this was associated with a significant increase in the infiltration of lymphocytes by day 7, suggesting a role for cellular immune rejection. Hence, our data indicate that HLA-B27 and/or GFP transgenic proteins are useful for establishing a unique animal transplantation model to clarify the mechanism underlying the allogeneic cellular and humoral immune response, in which the transplant antigens are specifically presented.

Key words: Allograft, GFP, HLA-B27, regulatory T-cell, tolerance, transgenic rat

Introduction

The development of an animal model bearing definite antigens is important to facilitate the evaluation and modulation of the specific alloantigen response after transplantation. In the present study, we first used HLA-B27^{Tg} rats in a transplantation study, and found that F344 recipients rejected cardiac grafts from the F344/HLA-B27^{Tg} rats via a process of chronic rejection, resulting from high production of anti-HLA IgM⁺ and IgG-specific antibodies. In contrast, the F344 recipients rejected cardiac grafts from double transgenic F344 /HLA-B27&EGFP^{Tg} rats through acute rejection, associated with a significant increase in the infiltration of lymphocytes, which indicated that the HLA-B27 and/or GFP

transgenic proteins are useful for establishing a unique animal transplantation model to clarify the mechanism(s) underlying the allogeneic cellular and humoral immune responses.

Materials & Methods

Rats

F344 (Fisher) rats were purchased from Shizuoka Laboratory Animal Center (Shizuoka, Japan), F344/HLA-B27Tg rats were purchased from Taconic Farms, Inc. (Hudson, NY), and F344/EGFPTg rats were produced by injecting the purified pCAG-EGFP plasmid DNA into F344 rat fertilized eggs[1]. Double F344/HLA-B27&EGFPTg rats were the offspring of mating F344/HLA-B27 and F344 /EGFPTg rats, and were identified by PCR. All rats were maintained under standard conditions and fed rodent food and water, in accordance with the guidelines of the Animal Use and Care Committee of the National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

Heterotopic cardiac transplantation

Heterotopic cardiac transplantation was performed from sex-matched F344 /HLA-B27, F344/EGFP and F344/HLA-B27&EGFPTg donors into F344 recipients by the cuff techniques. The cervical heterotopic rat cardiac transplantation was performed as previously described [2, 3]. In brief, after thoracotomy under inhalation anesthesia, the donor heart was harvested. The heart graft was rapidly cooled and flushed with 5 ml physiological saline (4°C) containing 200 U/ml heparin, which was infused via the aorta and pulmonary artery. The heart graft was preserved in physiological saline at 4°C. Cardiac graft survival was determined by daily palpation from the skin above the cervical grafted heart. Rejection was considered complete at the time of cessation of a palpable heart beat, and confirmed visually by laparotomy.

Lymphocyte proliferation assays

The mixed lymphocyte reaction (MLR) was performed with F344 rat nylon-wool column (Wako) enriched T cells (1×10^5 /well) as responders, and 20-Gy irradiated F344, F344/EGFP, F344/HLA-B27 and F344/HLA-B27&EGFPTg rat splenocytes (1×10^5 /well) as stimulators, incubated in a flat-bottom 96-well white plate (Costar; Corning, NY) at a final volume of 200 μ l/well of the GIT medium containing 50 μ M 2-mercaptoethanol (Wako) in a humidified atmosphere at 37°C for five days. The proliferation of T cells was measured with cell-proliferation ELISA kits (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany).

Measurement of serum anti-HLA-B27 IgM and IgG antibodies

The titers of anti-HLA-B27 IgG or IgM in rat sera were determined by flow cytometry. Sera (1:10 diluted) were incubated with F344 thymocytes for 1hr. Cells were washed and incubated with goat anti-rat IgM or IgG antibodies (SouthernBiotech, Birmingham, AL), then stained cells were analyzed with a BD FACSCalibur flow cytometer and analyzed using the CellQuest software program (BD Biosciences, San Jose, CA).

Histological analysis

Cardiac graft specimens were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. The sections were cut (1µm-thick) and stained with hematoxylin and eosin. A light microscopic analysis was performed to assess the overall cellularity and myocardial damage.

Statistical analysis

Student's t-tests were used to compare the paired and unpaired analyses. A statistical evaluation of mouse survival was performed using the Kaplan-Meier test. P values <0.05 were considered statistically significant. All in vitro experimental data were representative of three independent experiments and represented the mean ratio of triplicate results for each experiment.

Results

F344 recipients rejected cardiac allografts from F344/HLA-B27 and F344/HLA-B27&EGFPTg donors

Heterotopic cardiac transplantation was performed first from F344/EGFP, F344 /HLA-B27 and F344/HLA-B27&EGFPTg donor rats into the F344 recipient rats. We found that F344 recipients accepted cardiac grafts from F344/EGFPTg donors (n=8, MST>100days), whereas they rejected cardiac grafts from F344/HLA-B27Tg donors at 39.4±6.54 days (n=5). Of interest, we found that F344 recipients rejected cardiac grafts from double transgenic F344/HLA-B27&EGFPTg donors via acute rejection (n=8, MST: 9.0±3.16 days, p<.001; Fig1)

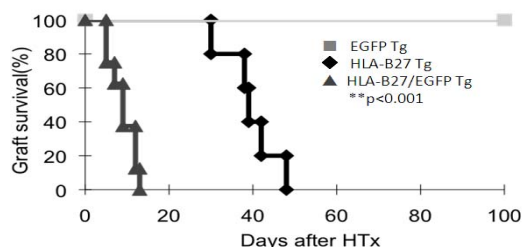


Figure 1. F344 recipients rejected cardiac allografts from F344/HLA-B27Tg and F344/HLA-B27&EGFPTg donors. Heterotopic cardiac transplantation was performed, in which F344 rats were recipients and sex-matched F344/EGFPTg, F344/HLA-B27Tg or F344/HLA-B27&EGFPTg rats were donors. MST= median survival time. The results are shown as the MST ± SD. **p < .001 for the difference between two groups.

Then, a MLR assay was performed to assess the effects of the HLA-B27 and/or EGFP

transgenes on the alloantigen response in vitro. We found that the splenic T cells obtained from naive F344 rats showed the same proliferative response to irradiated F344 naive and F344/EGFPTg spleen cells, in the case of irradiated spleen cells obtained from F344/HLA-B27 and F344/HLA-B27&EGFPTg rats, however, the proliferative response was significantly enhanced ($p=.014$ and $.012$; Fig. 2).

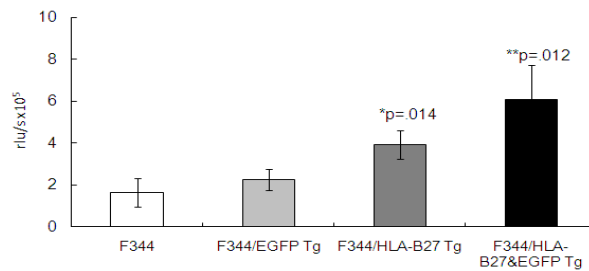


Figure 2. The alloantigen response was significantly enhanced by HLA-B27 and HLA-B27&EGFP, but not by the EGFP transgene. MLR was performed with F344 rat nylon-wool column enriched T cells as responders, and irradiated F344/EGFP, F344/HLA-B27 or F344/HLA-B27&EGFP rat splenocytes as stimulators. The results are shown as the means $\pm$ SD. * $p=.014$, ** $p=.012$, the difference between F344 and F344/EGFP, F344/HLA-B27, and F344/HLA-B27&EGFP, respectively.

Vigorous production of anti-HLA-B27 IgG and IgM antibodies following allogeneic sensitization

Because allo-antibodies, whose main targets are MHC molecules, can also contribute to acute and chronic graft rejection, we analyzed the serum concentration of anti-HLA-B27 IgG and IgM antibodies by flow cytometry at different time points after cardiac transplantation. As shown in Fig. 3A, the total IgG titers steadily increased on postoperative day (POD) 7 and 14, and peaked at POD21 in F344 recipients that received cardiac grafts from F344/HLA-B27 and F344/HLA-B27&EGFP donors. In contrast, the total IgM titers showed the reverse tendency, with a gradual decrease post-transplantation in F344 recipients with cardiac grafts from F344/HLA-B27 and F344 /HLA-B27&EGFP donors. In comparison, the IgG and IgM titers showed no difference between F344 recipients who were transplanted with cardiac grafts from isograft F344 or F344/EGFP donors at different time points post-transplantation (Fig. 3B).

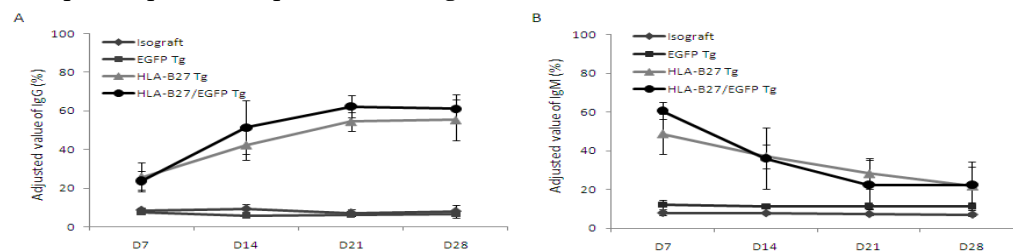


Figure 3. There is vigorous production of specific anti-HLA-B27 IgG and IgM antibodies following allogeneic sensitization. FACS measurement of serum IgG (A) and IgM (B) at different time points post cardiac transplantation, showing that the total serum IgG increased steadily while the IgM decreased gradually in F344 recipients transplanted with cardiac grafts from F344/HLA-B27 or F344/HLA-B27&EGFP donors. In comparison, the IgG and IgM titers showed no difference between F344 recipients who were transplanted with cardiac grafts from isograft F344 or F344/EGFP donors at different time points post cardiac transplantation.

Histopathological features

We then compared the histopathological features of the allograft between these four groups. The F344/EGFPTg cardiac grafts were free of myocardial injury and had markedly reduced inflammatory cells infiltration even on POD100, while the histopathological features of F344/HLA-B27Tg cardiac grafts on POD40 showed the features of chronic rejection, including mild interstitial infiltration of inflammatory cells, hemorrhage, and fibrosis. In contrast, classic signs of acute rejection could be seen in the F344/HLA-B27&EGFPTg cardiac grafts and F344/HLA-B27Tg cardiac grafts from skin graft-primed rats on POD5, including strong interstitial infiltration of inflammatory cells, severe hemorrhage, edema, and necrosis (Fig. 4).

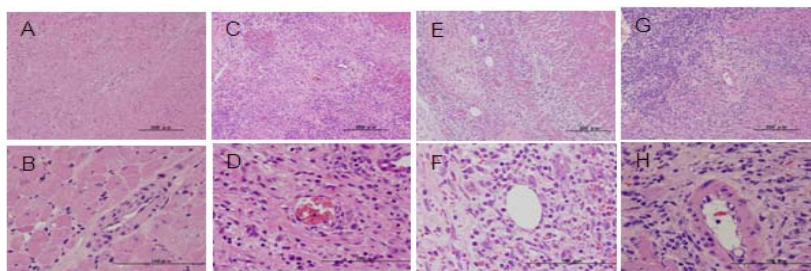


Figure 4. Histopathological features of cardiac allografts between F344/EGFP, F344/HLA-B27, and F344/HLA-B27&EGFPTg rats and skin-primed F344/HLA-B27Tg rats. The F344/EGFPTg cardiac grafts were free of myocardial injury and had markedly reduced inflammatory cell infiltration even on POD100 (A, B), while the histopathological features of F344/HLA-B27Tg cardiac grafts on POD40 (C, D) showed chronic rejection, including mild interstitial infiltration of inflammatory cells, hemorrhage, and fibrosis. In contrast, classic signs of acute rejection could be seen in the F344/HLA-B27&EGFPTg (E, F) cardiac grafts and cardiac grafts implanted into skin-primed rats (G, H) on POD5 including strong interstitial infiltration of inflammatory cells, severe hemorrhage, edema, and necrosis. Scale bars represent 100, 200mm.

Discussion

We herein described a unique and useful animal transplantation model in which grafts from F344/HLA-B27Tg rats mainly provoke a humoral immune response and grafts from F344/HLA-B27&EGFPTg rats represent a typical cellular immune response. T cells are essential for allograft rejection, but allo-antibodies, whose main targets are MHC molecules, can also contribute to acute and chronic graft rejection [4]. Clinical studies have shown a correlation between the presence of anti-HLA antibodies, complement C4d deposition, and graft failure [4, 5]. The removal of alloantibodies by IVIg or plasmapheresis, or by the depletion of B cells, can improve the longevity of transplants [6]. We found that F344 recipients rejected cardiac grafts from F344/HLA-B27Tg donors via the process of chronic rejection (Fig. 1), due to high production of anti-HLA-B27 IgM- and IgG-specific antibodies (Fig. 3). These data showed that F344 rats reject F344/HLA-B27Tg cardiac allografts via cellular immunity.

Green fluorescent protein (GFP) is an intracellular reporter molecule widely used to assess gene transfer and expression [7, 8]. Enhanced green fluorescent protein (EGFP) is a red-shifted GFP variant which fluoresces about 35 times more intensely than wild-type GFP [9, 10], and can be readily detected by using fluorescence microscopy, flow cytometry, or

macroscopic imaging. The double transgenic F344/HLA-B27&EGFPTg rats we used were the offspring of mating F344/HLA-B27Tg and F344/EGFPTg rats. We found that F344 recipients rejected cardiac grafts from double transgenic F344/HLA-B27&EGFPTg rats via acute rejection (Fig. 1), associated with a significant increase in the infiltration lymphocytes (Fig. 4), thus suggesting a role for cellular immune rejection. All of these data revealed that F344/HLA-B27Tg and F344HLA-B27&EGFPTg rats represent a unique and very useful animal transplantation model in which the transplant antigens are specifically presented.

Reference

1. Watanabe, H., et al., *Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(4): p. 841-5.
2. Funeshima-Fuji, N., et al., *Prolongation of rat major histocompatibility complex-compatible cardiac allograft survival during pregnancy*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(2): p. 176-82.
3. Iwami, D., et al., *Purified eicosapentaenoic acid induces prolonged survival of cardiac allografts and generates regulatory T cells*. Am J Transplant, 2009. **9**(6): p. 1294-307.
4. Colvin, R.B. and R.N. Smith, *Antibody-mediated organ-allograft rejection*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 807-17.
5. Crespo, M., et al., *Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics*. Transplantation, 2001. **71**(5): p. 652-8.
6. Mauiyyedi, S., et al., *Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 574-82.
7. Snanoudj, R., et al., *Immunological strategies targeting B cells in organ grafting*. Transplantation, 2005. **79**(3 Suppl): p. S33-6.
8. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
9. Stripecke, R., et al., *Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy*. Gene Ther, 1999. **6**(7): p. 1305-12.
10. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.

注：本研究は 2010 年 11 月 19 日、第 37 回日本臓器保存生物医学学会にて口演発表、(Cell Transplantation)に投稿中。

作成日 2011年3月15日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 3 月 8 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：王 霜

指導責任者名：小方 頼昌

所属部署名：日本大学松戸歯学
部

職名：歯周治療講座

所 在 地：千葉県松戸栄町西 2-870-1

電 話：047-360-9365

内線：365



1. 助成金額： 600.000 円

2. 研究テーマ

インターロイキン 11 にする骨シアロタンパク質の転写調節

3. 成果の概要

IL-11 は骨芽細胞の分化を誘導し 石灰化結合組織特異的に発現する骨シアロタンパク質 (BSP) の遺伝子発現を増加させた。この転写調節に BSP 遺伝子プロモーター中の CRE, FRE および HOX 配列が重要な役割をしている。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・有(学会名・演題)

第 96 回アメリカ歯周病学会 共催日本歯周病学会 2010 年大会

Effect of Interleukin-11 on Bone Sialoprotein Gene Transcription

第 53 回春季日本歯周病学会

Calcium Hydroxide Regulates Bone Sialoprotein Gene Transcription

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

「Gene」掲載 Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene by Interleukin-11

「日大口腔科学」掲載 Regulation of Bone Sialoprotein Gene Transcription by Keampferol and Calcium Hydroxide

インターロイキン-11による骨シアロタンパク質の転写の調節

研究者 氏名	王 霜
中国所属機関	中国天津医科大学口腔医院歯内科
日本研究機関	日本大学松戸歯学部歯周治療講座
指導 責任者	教授 小方 頼昌
共同研究者名	佐々木庸子 周黎明 松村浩禎 荒木正大 目澤優 高井英樹 陈阵

要旨

Interleukin-11 (IL-11) is a stromal cell-derived cytokine. IL-11 has many biological activities and has roles in hematopoiesis, immune responses, the nervous system and bone metabolism. Bone sialoprotein (BSP) is a mineralized tissue-specific protein expressed in differentiated osteoblasts that appears to function in the initial mineralization of bone. IL-11 (20 ng/ml) increased BSP mRNA levels at 12 h in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. In a transient transfection assay, IL-11 (20 ng/ml) increased luciferase activity of the construct (-116 to +60) in ROS 17/2.8 cells and rat bone marrow stromal cells. Introduction of 2 bp mutations to the luciferase constructs showed that the effects of IL-11 were mediated by a CRE, a FRE and a HOX. Luciferase activities induced by IL-11 were blocked by protein kinase A inhibitor, tyrosine kinase inhibitor and ERK1/2 inhibitor. Gel shift analyses showed that IL-11 (20 ng/ml) increased nuclear protein binding to CRE, FRE and HOX. CREB1, phospho-CREB1, c-Jun, JunD and Fra2 antibodies disrupted the formation of CRE-protein complexes. Dlx5, Msx2, Runx2 and Smad1 antibodies disrupted FRE- and HOX-protein complex formations. These studies demonstrate that IL-11 stimulates BSP transcription by targeting CRE, FRE and HOX sites in the proximal promoter of the rat BSP gene. Moreover, CREB1, c-Jun, JunD, Fra2, Dlx5, Msx2, Runx2 and Smad1 transcription factors appear to be key regulators of IL-11 effects on BSP transcription.

Key Words 骨シアロタンパク質, インターロイキン-11, 骨芽細胞, 転写

緒言

Interleukin-11 (IL-11) is a stromal cell-derived cytokine that belongs to the interleukin-6 family of cytokines (1, 2). IL-11 has many biologic activities and has roles in hematopoiesis, immune responses, the nervous system and bone metabolism (2-6). IL-11 increased alkaline phosphatase (ALP) activities, which are a marker of osteoblasts (7); therefore, it is possible that IL-11 may have an important role in osteogenesis. however, little is known about the role of IL-11 in osteogenesis, osteoblast differentiation and bone formation.

Bone sialoprotein (BSP) is a highly sulfated, phosphorylated, and glycosylated protein that is expressed almost exclusively in mineralizing tissues (8, 9). Regulation of the BSP gene appears to be important in the differentiation of osteoblasts, in bone matrix mineralization and in tumor metastasis.

To elucidate the molecular mechanism of IL-11 regulation of the BSP gene, we analyzed the effects of IL-11 on the expression of the BSP gene in osteoblast-like cells.

対象と方法

対象は、Rat osteoblast-like ROS 17/2.8 cells and rat stromal bone marrow cells (RBMC)

方法は、Northern Hybridization, Transient Transfection Assays and Gel Mobility Shift Assays.

結果

1. Effects of IL-11 on BSP mRNA

To study the regulation of BSP transcription by IL-11, we performed Northern hybridization analysis of total RNA extracted from osteoblastic ROS 17/2.8 cells. First, In dose-response IL-11 increased BSP mRNA levels at 1, 5, 20 and 100 ng/ml and had a maximal effect at 20 ng/ml (Fig. 1A). Thus, 20 ng/ml IL-11 was used to determine the time courses of BSP mRNA expression. IL-11 (20 ng/ml) induced BSP mRNA levels at 3 h and reached maximal at 12 h (Fig. 1B).

2. Transient transcription analyses of rat BSP promoter constructs

To determine the site of IL-11-regulated transcription in the 5'-flanking region of the BSP gene, we did transient transcription analyses. The transcriptional activity of pLUC3, pLUC4, pLUC5 and pLUC6 was increased after 12 h treatment with 20 ng/ml IL-11 in ROS 17/2.8 and RBMC cells (Fig. 2A, B). Since protein kinases mediate IL-11 signaling activities, we investigated the effects of the PKC inhibitor H7, the PKA inhibitors H89 and KT5720, the tyrosine kinase inhibitor HA and the ERK1/2 inhibitor inhibitor U0126 on IL-11-mediated transcription. Whereas IL-11-induced pLUC3 promoter activation was inhibited by U0126, HA, KT5720 and H89, no effect was observed for H7 (Fig. 3). After introducing 2 bp mutations into the putative response elements within pLUC3 and pLUC4, transcriptional induction by IL-11 (20 ng/ml) was partially inhibited in the M-CRE (pLUC3), M-FRE and M-HOX (pLUC3 and pLUC4) constructs (Fig. 4).

3. Gel mobility shift assays

To identify nuclear proteins that bind to the CCAAT, CRE, FRE, Pit-1 and HOX elements and mediate IL-11 effects on transcription, we did gel mobility shift assays. Inverted CCAAT and Pit-1-protein complexes did not change after stimulation by IL-11 (Fig. 5, lanes 1-4, 13-16). After stimulation by 20 ng/ml IL-11 (3-12 h), CRE- and FRE-protein complexes were increased at 12 h (Fig. 5, lanes 5-8, 9-12), and HOX-protein complexes were increased at 3 h and reached maximal at 12 h (Fig. 5, lanes 17-20). To further characterize the proteins in the complexes formed with CRE, FRE and HOX, we used antibodies to several transcription factors. The addition of phospho-CREB1 antibody induced supershift (Fig. 6A, lane 5), and CREB1, c-Jun, JunD and Fra2 antibodies partially disrupted CRE-protein complex formation (Fig. 6A, lanes 4, 7-9). Dlx5, Msx2, Runx2 and Smad1 antibodies partially disrupted FRE- and HOX-protein complex formation (Fig. 6B and C, lanes 4-7).

考察

These studies show that IL-11 increases BSP transcription in osteoblast-like cells by targeting CRE, FRE and HOX elements in the proximal promoter of the BSP gene. IL-11 (20 ng/ml) induced BSP mRNA expression in ROS17/2.8 cells (Fig. 1). When we used rat stromal bone marrow cells (RBMC), IL-11 also increased BSP transcription (Fig. 2B); therefore, IL-11 increases BSP transcription not only in transformed ROS 17/2.8 cells but also in normal osteoprogenitors (RBMC). Transcriptional regulation by IL-11 was abrogated by M-CRE, M-FRE and M-HOX in pLUC3 or pLUC4 (Fig. 4). The involvement of CRE, FRE and HOX elements is further supported by gel shift assays in which nuclear proteins that formed complexes with CRE, FRE and HOX elements were

increased by IL-11 (20 ng/ml) in ROS 17/2.8 cells (Fig. 5). Results of gel shift assays using antibodies (Fig. 6) suggest that IL-11 induced BSP transcription through CREB1, phospho-CREB1, c-Jun, JunD and Fra2 targeting CRE, and through Dlx5, Msx2, Runx2 and Smad1 targeting FRE and HOX in the rat BSP gene promoter. The ERK1/2 inhibitor U0126, the tyrosine kinase inhibitor HA and the PKA inhibitors H89 and KT5720 inhibited the effects of IL-11 on BSP transcription, suggesting that ERK1/2, tyrosine phosphorylation and PKA signaling pathways are crucial for IL-11 effects on BSP transcription.

In conclusion, we have characterized a region of the rat BSP gene promoter that is required for IL-11 mediated transcription. This region contains CRE, FRE, and HOX, which are required for the IL-11 response. Further, IL-11-induced transcription was inhibited by tyrosine kinase inhibitor HA and protein kinase A inhibitor. Moreover, CREB1, C-Jun, JunD, Fra2, Dlx5, Msx2, Runx2 and Smad1 transcription factors appear to be key regulators of IL-11 effects on BSP transcription and bone formation.

参考文献

1. Paul, S.R., Bennett, F., Calvetti, J.A., Kelleher, K., Wood, C.R., O'Hare, R.M., Leary, A.C., Sibley, B., Clark, S.C., Williams, D.A., Yang, Y.C., 1990. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin-11, a stromal cell derived lymphopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,7512-7516.
2. Yin, T.G., Schendel, P., and Yang, Y.C. 1992. Enhancement of in vitro and in vivo antigen-specific antibody responses by interleukin 11. *J. Exp. Med.* 175. 211-216.
3. Du, X.X., Williams, D.A., 1994. Interleukin-11; a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood* 83, 2023-2030.
4. Du, X.X., Williams, D.A., 1997. Interleukin-11; review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood* 89, 3897-3908.
5. Mehler, M.F., Rozental, R., Dougherty, M., Spray, D.C., and Kessler, J.A., 1993. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature* 362, 62-65.
6. Musashi, M., Yang, Y.C., Paul, S.R., Clark, S.C., Sudo, T., and Ogawa, M. 1991. Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 765-769.
7. Gimble, J.M., Wanker, F., Wang, C.S., BAS, H., Wu, X., Kelly, K., Yancopoulos, G.D., Hill, M.R., 1994. Regulation of bone marrow stromal cell differentiation by cytokines whose receptors share the gp130 protein. *J. Cell. Biochem.* 54, 122-133.
8. Oldberg, Å., Franzen, A., and Heinegård, D., 1988. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.* 263,19430-19432.
9. Fisher, L.W., McBride, O.W., Termine, J.D., Young, M.F., 1990. Human bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.* 265, 2347-2351.

注 本研究は、2010年11月1日「第96回アメリカ歯周病学会」にてポスター発表、「Gene」(2011Jan 26)に掲載、「日大口腔科学」(2011)に掲載。

作成日：2011年3月1日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 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：

周 鑫



指導責任者名：

久野 高義

所属部署名：神戸大学大学院医学研究科

職名：教授

生化学・分子生物学講座

分子薬理・薬理ゲノム学分野

所 在 地：650-0017

神戸市中央区楠町 7-5-1

電 話：078-382-5441

内線：5441

1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

分裂酵母における Ran GTPase 新規変異体の単離と解析

3. 成果の概要

分裂酵母の温度感受性変異株 (KP3272) を用い、関連遺伝子 (抑圧遺伝子群) の分離と機能解析を行っている。現在まで、① *spi1⁺*、*pim1⁺* と SPAC6G9.14 (*puf1⁺*) 三つの 相補遺伝子を取得した； ② *spi1⁺* と *pim1⁺* が KP3272 の温度感受性を 36 度まで、*puf1⁺* が KP3272 の温度感受性を 34 度まで相補することを確認した；③ KP3272 の表現型は *spi1-25* の表現型と違って、*pim1-46* の表現型と一致である。

4. 研究業績

① 学会における発表

Ⓓ・有 (学会名・演題)

② 発表した論文

Ⓓ・有 (雑誌名・題名)

分裂酵母における Ran GTPase 新規変異体の単離と解析

研究者氏名	周 鑫
中国所属機関	中国医科大学細胞生物教室 助教
日本研究機関	神戸大学大学院医学研究科 分子薬理・薬理ゲノム 大学院生
指導責任者	教授 久野 高義
共同研究者名	馬 艶 ウガンダリ

<Abstract>

Spilp of *Schizosaccharomyces pombe* is a structural homolog of the mammalian GTPase Ran, and *spi1⁺* is an essential gene. In a screen designed to identify fission yeast genes required for living in high temperature (36°C), we identified a strain that carries a point mutation in the SpRan GTPase. Ran is an abundant Ras-like small GTPase, which is mainly localized in the nucleus¹, like other GTPases, switches between a GTP-bound and a GDP-bound form. The Ran family of GTPases, have been implicated in variety of nuclear processes including cell cycle progression, nucleocytoplasmic transport of protein and RNA, initiation of DNA replication, RNA metabolism, nucleolar and chromatin structure, and transcriptional regulation^{2,3,4}. Ran and its structural and functional homologs interact with proteins that modulate its nucleotide-bound state: Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that stimulate the exchange of GDP for GTP and GTPase-activating proteins (GAPs) that catalyze the intrinsic GTPase activity, hydrolyzing the bound GTP to GDP. In fission yeast, the functioning of the spilp GTPase system require a precise balance between the GDP- and GTP-bound forms of Ran GTPase spilp, that the nucleotide-bound state of the GTPase correlates with its intracellular localization. Pimlp has been found in *S. pombe* the spilp GEF and rna1p, has been shown to have GAP activity. Here, we describe the isolation and characterization of *spi1-93*, a mutant allele of the *spi1⁺* gene. The Ran guanine nucleotide GEF Pim1 mutant (*pim1-46*)⁵ cells and *spi1-93* cells exhibited similar phenotypes. Overexpression of wild-type *spi1⁺* and *pim1⁺* suppressed the ts phenotype of *spi1-93* and *pim1-46* mutant cells and overexpression of SPAC6G9.14(*puff⁺*), pumilio-family RNA binding protein coding gene, only partially suppressed the TS phenotype of these two mutant cells. We also found another *spi1* mutant cells(*spi1-25*)⁶ with different mutation site in *spi1⁺* gene showed different phenotypes with *spi1-93* and *pim1-46*, and the obtained two multicopy suppressor genes *pim1⁺* and *puff⁺* didn't suppress TBZ sensitivity of *spi1-25*. Further studies are needed to reveal the mechanism underlying the regulation of suppressants and more multicopy suppressor genes are needed to be identified in future.

<Key words>

Ran GTPase, *Schizosaccharomyces pombe*, GEF, GAP, temperature sensitive (TS)

<Introduction>

Spilp of *Schizosaccharomyces pombe* is a structural homolog of the mammalian GTPase Ran, and *spi1⁺* is an essential gene. Ran is an abundant Ras-like small GTPase, which is mainly

localized in the nucleus, like other GTPases, switches between a GTP-bound and a GDP-bound form. The distribution between the GTP- and GDP-bound forms of the protein is regulated by evolutionarily conserved gene products, Rna1p and Pim1p, functioning as GTPase-activating protein (GAP) and guanine nucleotide exchange factor (GEF), respectively. Cells are sensitive to the balance between the two forms (spi1p-GDP/spi1p-GTP) of the GTPase. The Ran family of GTPases, have been implicated in variety of nuclear processes including cell cycle progression, nucleocytoplasmic transport of protein and RNA, initiation of DNA replication, RNA metabolism, nucleolar and chromatin structure, and transcriptional regulation. However, the primary role(s) of this system has yet to be determined, and many other questions relating to the functioning and regulation of the Ran system remain unanswered. Here, we describe the isolation of temperature mutant *spi1-93*, an allele of the *spi1+* gene encoding a homolog of Ran GTPase and in addition, we also provided the results that the function of Spi1 was regulated by suppressants Guanine nucleotide exchange factors (GEF) Pim1 and pumilio-family RNA binding protein Puf1.

<Materials and methods>

Strains, media, and genetic and molecular biology methods—*Schizosaccharomyces pombe* strains used in this study are listed in Table 1. The complete medium YPD and the minimal medium EMM have been described previously⁷. Standard genetic and recombinant-DNA methods⁸ were used except where noted.

Isolation of the *spi1-93* mutant—The *spi1-93* mutant (KP3272) was isolated in a screen of cells that had been mutagenized with nitrosoguanidine as described previously⁹. To clone the mutated gene, the *spi1-93* mutant was grown at 27° C and transformed with a fission yeast genomic DNA library as described previously⁹. The Leu⁺ transformants were replica-plated onto YPD plates at 36° C, and the plasmid DNA was recovered from transformants that showed plasmid-dependent rescue.

These plasmids complemented the temperature sensitivity of *spi1-93* mutant. By DNA sequencing, the suppressing plasmids were identified to contain the *spi1+* gene (SPBC1289.03c). The fragment of *spi1+* gene from genome of KP3272 was amplified by PCR and was sequenced. We found the 69th glutamic acid (E) of Spi1p in KP3272 was mutated to lysine (K).

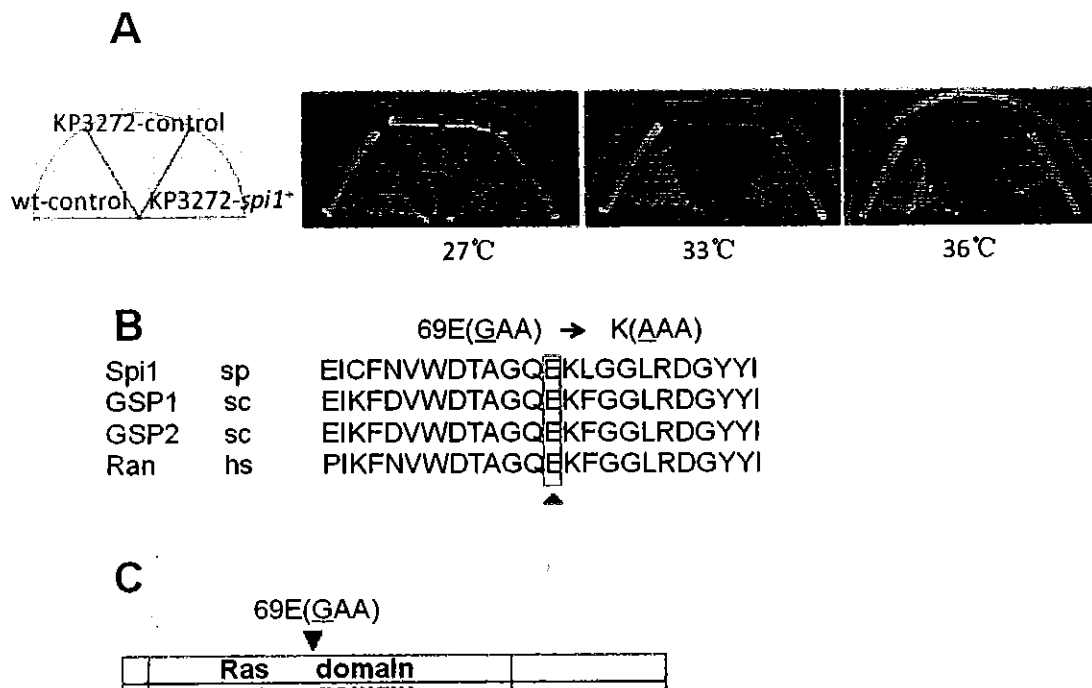
Isolation of the multicopy suppressor genes—To screen for other suppressors of the *spi1-93* mutation, the mutant was transformed with a fission yeast genomic DNA library, and the Leu⁺ transformants were replica-plated onto both YPD plates at 34° C, 35° C and 36° C. The plasmids that complemented the ts phenotype were recovered from the cells and the nucleotide sequences of the regions flanking the inserts were determined. By Southern blot analysis, the suppressing plasmids fell into two classes, with one class containing the Guanine nucleotide exchange factors (GEF) Pim1 encoding gene *pim1+* (SPBC557.03c), and the other class containing the pumilio-family RNA binding protein Puf1 encoding gene *puff1+* (SPAC6G9.14).

<Results>

1. Isolation of new *spi1-93* mutant cells.

On YPD plate at 27° C, KP3272 grew equally well as compared with that of the wild-type cells (Fig. 1A); however, at 33° C and 36° C, the cells showed temperature sensitivity (TS) phenotype. The suppressing plasmids was obtained by complementation of the ts growth defect of KP3272, and nucleotide sequencing revealed the plasmids contained the *spi1⁺* gene (SPBC1289.03c). The fragment of *spi1⁺* gene from genome of KP3272 was amplified by PCR and was sequenced. We found the 69th glutamic acid (E) of Spi1p in KP3272 was mutated to lysine (Fig. 1B, C).

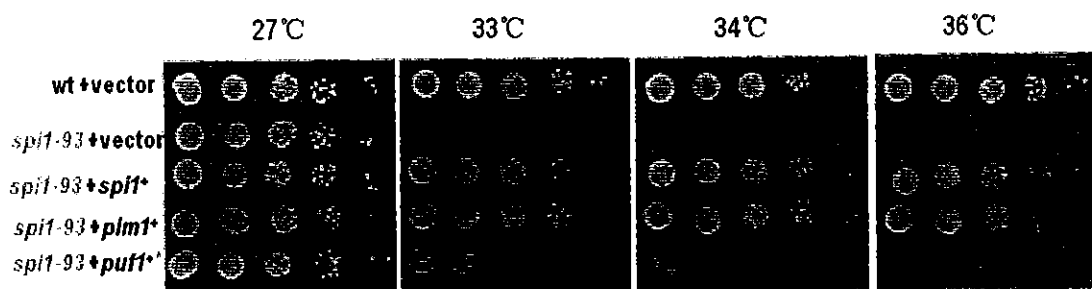
Fig. 1



2. *pim1⁺* (SPBC557.03c) and *puff1⁺* (SPAC6G9.14) are multicopy suppressor genes of *spi1-93*.

Overexpression of wild-type *spi1⁺* and Ran GEF encoding gene *pim1⁺* completely suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells and overexpression of pumilio-family RNA binding protein coding gene, SPAC6G9.14(*puff1⁺*), only partially suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells (Fig. 2).

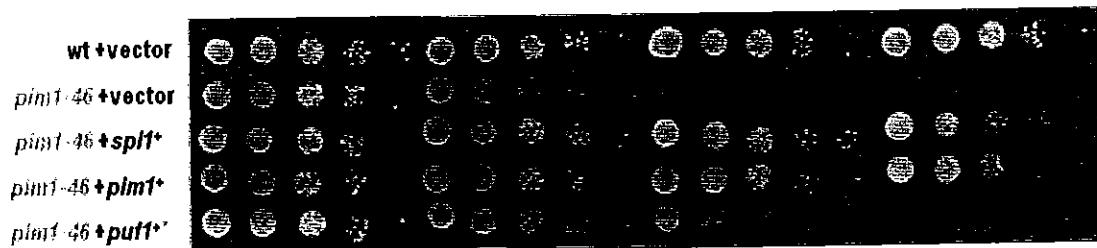
Fig. 2 *spi1-93*: *spi1^{E69K}*, the 69th glutamic acid (E) of Spi1p was mutated to lysine (K).



3. *pim1-46* exhibited similar phenotypes with *spi1-93*.

Overexpression of wild-type *spi1** and *pim1** also completely suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells and overexpression of SPAC6G9.14(*puff**) also partially suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells (Fig. 3).

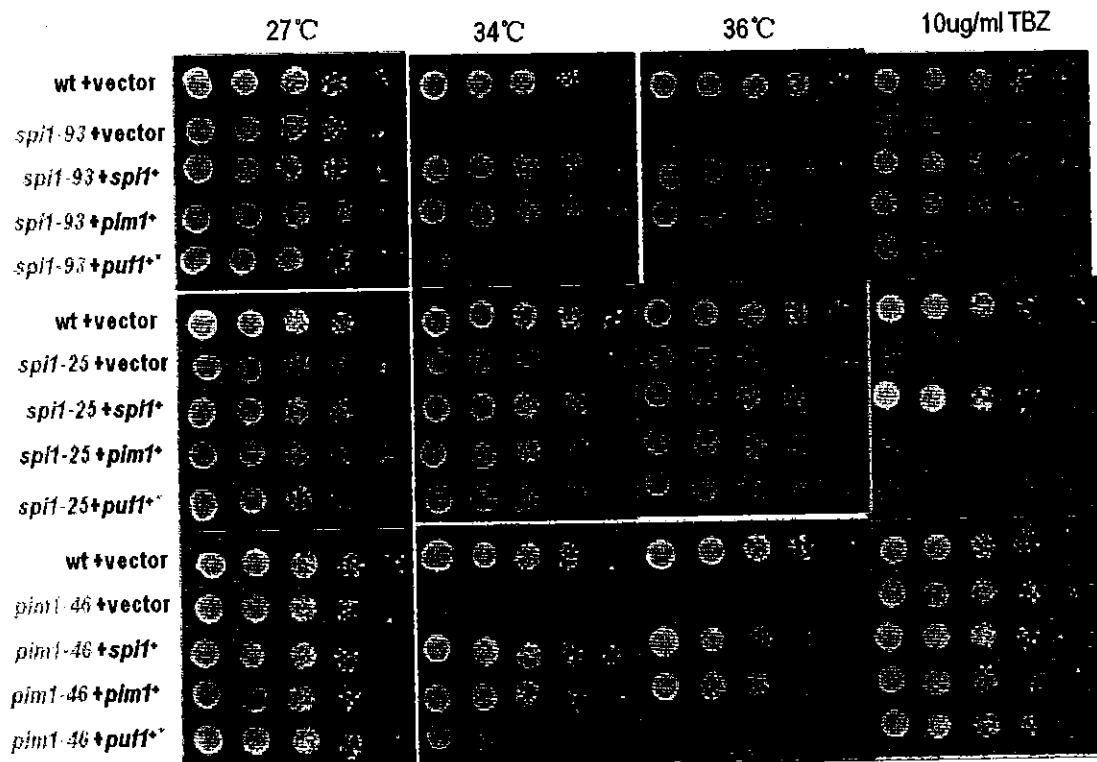
Fig. 3 *pim1-46*: *pim1*^{L113S}, the 113rd leucine (L) of Pim1p was mutated to serine(S).



4. *spi1-25* including different mutation site in *spi1** gene exhibited different phenotypes with *spi1-93* and *pim1-46*.

spi1-25 exhibited thiabendazol (TBZ) sensitivity but not ts phenotype which is different with those of *spi1-93* and *pim1-46*. And we also found that overexpression of wild-type *pim1** and SPAC6G9.14(*puff**) didn't suppress the TBZ sensitivity of *spi1-25* mutant cells (Fig. 4).

Fig. 4 *spi1-25*: *spi1*^{V44I}, the 44th valine (V) of Spi1p was mutated to isoleucine (I).



<Discussion>

In our present study, we have identified a temperature-sensitive mutant *spi1-93* that is allelic to the *spi1⁺* gene encoding Ran GTPase, an abundant Ras-like small GTPase, which is mainly localized in the nucleus. We showed here that overexpression of wild-type *spi1⁺* and Ran GEF encoding gene *pim1⁺* completely suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells and overexpression of pumilio-family RNA binding protein coding gene, SPAC669.14(*puff1⁺*), only partially suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells. And we also found that *spi1-93* exhibited similar phenotype with *pim1-46* but different with *spi1-25*. In future, we will continue to look for other multicopy suppressors of *spi1-93* mutant cells by screening to clarify the relationships between the identified multicopy suppressors and Ran GTPase Spi1. We will also investigate the interactions of Ran GTPase or mutated Ran GTPase with RanGEF or mutated RanGEF using the method of immunoblot.

Table1. Strains used in this study.

Strain	Genotype
KP3272	<i>h⁻ leu1-32 spi1-93 (spi1^{E69K})</i>
KP3842	<i>h⁻ leu1-32 pim1-46 (pim1^{L113S})</i>
KP4113	<i>h⁻ leu1-32 spi1-25 (spi1^{V44I})</i>

<References>

1. Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. (1991) Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10830-10834.
2. Gruss, O. J. and Vernos, I. (2004). The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. J Cell Biol. 166, 949-955.
3. Harel, A. and Forbes, D. J. (2004). Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. Mol. Cell 16, 319-330.
4. Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 570-594.
5. Eiji Hirose, Mari Mukai, Atsushi Shimada, Hideo Nishitani, Yosaburo Shibata, Takeharu Nishimoto. (2006). Loss of RanGEF/Pim1 activity abolishes the orchestration of Ran-mediated mitotic cellular events in *S. pombe*. Genes Cells. 11(1), 29-46.
6. Fleig, U., S. S. Salus, I. Karig, and S. Sazer. (2000). The fission yeast ran GTPase is required for microtubule integrity. J. Cell Biol. 151, 1101-1112.
7. Toda T, Dhut S, Superti-Furga G, Gotoh Y, Nishida E, Sugiura R, Kuno T (1996). The fission yeast *pmk1⁺* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. Mol Cell Biol. 16, 6752-6764.
8. Moreno S, Klar A, Nurse P (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol 194, 795-823.
9. Zhang Y, Sugiura R, Lu Y, Asami M, Maeda T, Itoh T, Takenawa T, Shuntoh H, Kuno T (2000). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. J Biol Chem 275, 35600-35606.

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2010 年 6 月 30 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： 真柳 誠

所属機関名：茨城大学大学院

所属部署名：人文科学研究科

所 在 地：水戸市文京 2-1-1

電 話：029-228-8194

職名：教授

内線：直通



1. 助成金額：300000円

2. 会議名称・テーマ

第2回日中韓医史学会合同シンポジウム「越境する伝統、飛翔する文化—漢字文化圏の医史」

3. 会議の概要

第111回日本医史学会総会・学術大会（2010年6月12日13日）に付設のシンポジウムで、大会前日の11日に中華医学会医史分会・韓国医史学会の共催で実施した。報告者は中国3名・韓国3名・日本2名・ベトナム1名（諸事情で急遽欠席、真柳代演）、座長は中韓米各1名で行った。シンポジストの報告論文全文を日中韓3言語に翻訳した論文集を参加者に配布し、当日の報告も日中韓3言語のパワーポイントを同時放映した。参加者は報告者・座長を含め韓国24名・中国13名・アメリカ1名・ドイツ1名・オーストラリア1名、および日本104名の6カ国計144名だった。

4. 被招聘者概要

1. 被招聘者氏名：鄭 金生

所属機関名：中国中医科学院

職名：研究員

部署名：中医薬情報研究所

2. 被招聘者氏名：廖 育群

所属機関名：中国科学院

職名：研究員・前所長

部署名：自然科学史研究所

3. 被招聘者氏名：梁 永宣

所属機関名：北京中医薬大学

職名：教授

部署名：医史教研室

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2010 年 9 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： 平馬直樹 
所属機関名： 日本医科大学
所属部署名： 東洋医学科 職名： 非常勤講師
所 在 地： 東京都文京区千駄木 1-1-5
電 話： 03-3822-2131 内線：

1. 助成金額： 100,000 円

2. 会議名称・テーマ

日本中医学会設立記念シンポジウム

3. 会議の概要

日本中医学会の発足にあたり、8月29日、都内北とびあにて上記の会議を
開催しました。別添のコピーの内容で「現代医療における中医学の役割」を総合テーマに、300名余りが参加しました。招待講演「糖尿病の中医治療の現況」の演者、高彦彬氏の招待に、貴協会のトラベルグラントの助成をいただきました。

4. 被招聘者概要

- | | |
|----------------|------------|
| 1. 被招聘者氏名： 高彦彬 | 職名： 教授 |
| 所属機関名： 首都医科大学 | 部署名： 中医薬学院 |
| 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： |

日本中医学会設立記念 シンポジウム

メイン
テーマ

現代医療における中医学の役割

主催：日本中医学会設立準備委員会

助成：(財)日中医学協会

日時：2010年8月29日(日) 午前10時00分～午後5時30分
会場：東京都北区「北とぴあ」飛鳥ホール (JR王子駅徒歩1分)

参加費：10,000円 懇親会費：5,000円

(参加者には日本中医学会の初年度の会費が免除されます。)

申込方法：「日本中医学会のホームページ」(<http://www.jtcma.org>)からお申し込み下さい。

日本中医学会設立記念シンポジウムのお知らせ

中医学は、世界の伝統医学の中でも最も理論体系が整い、長い歴史を有する医学であります。さらに養生法と呼ばれる、疾病予防や健康増進に活用できる医療技術を備えております。私どもは、中医学の伝統的な身体観、病態観、弁証論治の診断治療を研究するとともに、先端科学技術を活用して中医学の本質を究明し、現代の医学と医療に寄与するため、日本中医学会を設立する準備を進めております。そして、本学会に医療関係者の方々が多数で参加頂けるよう、日本中医学会設立記念シンポジウムを開催いたします。本シンポジウムでは、日本や中国の第一線の臨床家、研究者の先生から、メインテーマである「現代医療における中医学の役割」についてご講演いただく予定です。参加者の皆さまには、シンポジウムを活発に討論していただけるように企画しております。全国の中医学に関わる皆様のご参加を心よりお願いします。なお、本シンポジウム参加者は、日本中医学会の初年度の年会費(1万円)が免除されます。

(日本中医学会設立準備委員会 一同)

プログラム

講演

(10:30～12:30)

- 招待講演 『糖尿病の中医治療の現況』 とうしょうりん 全小林 (中国中医科学院・广安門医院、副院長)
- 特別講演 1.『新型インフルエンザにたいする漢方治療の経験』 加島雅之 (熊本赤十字病院内科)
2.『認知症に対する鍼灸の取り組みについて』 兵頭明 (学校法人後藤学園・中医学研究所所長)

シンポジウム テーマ：『中医学と先端医療の融合に向けて』

(13:30～16:10)

1. 田平 武 (順天堂大学大学院・認知症診断予防治療学講座、教授)
2. 正山 征洋 (長崎国際大学・薬学部・物質薬学分野・薬品資源学、教授)
3. 田村 守 (中国・清華大学医学院、客員教授)
4. 酒谷 薫 (日本大学医学部・脳神経外科学系・光量子脳工学分野、教授)

総合討論

(16:30～17:30)

懇親会

(18:00～20:00)

この助成事業は競艇の交付金による
日本財団の助成金を受けて実施しました

2010年度共同研究等助成事業報告集
財団法人 日中医学協会
〒101-0032 東京都千代田区岩本町1-4-3
TEL:03-5829-9123 FAX:03-3866-9080
発行日 2011年4月
発行人 安達 勇