



日中笹川医学奨学金制度
第42期（学位取得コース）
第43期（学位取得コース）

報 告 書

2021年4月～2023年3月

公益財団法人 日中医学協会

目 次

No.	氏名	研究先	指導責任者	頁数
	タイプ	研究先テーマ		
42-1	徐 詩婷	順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科学	高橋 和久 主任教授	1
	論文博士	肺癌薬物治療における効果予測バイオマーカーの探索		
42-2	和 晋渝	長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科	Lina Madaniyazi 助教	17
	課程博士	温度関連の死亡率に対する都市ヒートアイランドの影響		
43-1	姚 利	千葉大学大学院看護学研究科看護学専攻	正木 治恵 教授	25
	課程博士	在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発 -ビデオカンファレンスを活用して-		
43-2	張 茂芮	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座生体補綴歯科学分野	若林 則幸教授	50
	課程博士	歯科疾患に対するmRNA を用いた治療戦略の確立		
43-3	王 喻	京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター	本庶 佑センター長	84
	課程博士	PD-1阻害による免疫賦活化異常疾患の研究		

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)評価書

論文博士：指導教官用



第 42 期

研究者番号： G4204

作成日： 2023 年 1 月 26 日

氏名	徐 詩婷	Xu Shiting	性別	F	生年月日	1992. 10. 28
所属機関(役職)	遼寧省腫瘍医院大東医院内科(医師)					
研究先(指導教官)	順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科学(高橋 和久主任教授)					
研究テーマ	肺癌薬物治療における効果予測バイオマーカーの探索 Predictive marker for response to chemotherapy in lung cancer					
専攻種別	<input checked="" type="checkbox"/> 論文博士			<input type="checkbox"/> 課程博士		

研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	優 ■ 良 可 不可	取得単位数
		取得単位数 / 取得すべき単位数総数
学生本人が行った研究の概要	<p>「肺癌薬物治療における効果予測バイオマーカーの探索」の中でも、特に、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の再投与について、まずは検討を行った。これまでの文献を用いたメタアナリシスにより、ICIの再投与のメリットのある患者の同定を試みた。そして、ICI再投与時の効果が、初回ICI中止時の理由により異なっていることを明らかにした。</p> <p>次に、ICIの投与を受けた患者の、治療前血漿と治療開始後3週間の血漿を用いて、サイトカインパネルで、悪液質やICIへの反応について検討を行った。ベースラインのIL-6、IL-8、IL-10、IL-15、IP-10は悪液質患者で有意に高値であった。一方、eotaxin-1は悪液質患者において低値であった。さらに、ICI投与開始3週間後の血漿中eotaxin-1濃度は、ICIが奏効した患者において、非奏効群よりも有意に高かった。また、IL-6の高値は免疫関連有害事象のリスクと関連し、IL-10の高値は短い全生存期間と関連していた。</p>	
総合評価	<p>【良かった点】</p> <p>与えられたテーマに対して積極的に文献検索などを行い、研究をより発展させるべくアイデアを提示することが出来る。また、指導の下、適切な研究デザインを立案し、得られた結果を考察して、研究方法の改善に対しfeedbackさせ、質の高い研究成果を得て、論文化することが出来る。</p>	
	<p>【改善すべき点】</p> <p>特になし。</p>	
	<p>【今後の展望】</p> <p>上記2つの研究に加え、新たにもう2つの研究も行っている。これらの研究を進め、学会発表・論文作成指導を行って、徐先生の今後の研究者としての発展を支えていきたい。</p>	
学位取得見込	すでに論文が一つアクセプトされており、学位取得の可能性は高い。	
評価者(指導教官名)		高橋 和久

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)報告書 研究者用



第42期

研究者番号: G4204

作成日: 2023年1月26日

氏名	徐 诗婷	Xu Shiting	性別	F	生年月日 1992. 10. 28
所属機関(役職)	遼寧省腫瘤医院大東医院(医師)				
研究先(指導教官)	順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科学(高橋 和久主任教授)				
研究テーマ	肺癌薬物治療における効果予測バイオマーカーの探索 Predictive marker for response to chemotherapy in lung cancer				
専攻種別	論文博士	<input checked="" type="checkbox"/>	課程博士	<input type="checkbox"/>	

1. 研究概要 (1)

Study 1

1) 目的 (Goal)

Outcomes of immune checkpoint inhibitors (ICI) rechallenge in non-small cell lung cancer (NSCLC) remain uncertain. This study estimated the safety and efficacy of ICI rechallenge and compared rechallenge benefit among different reasons of initial ICI discontinuation in NSCLC.

2) 戦略 (Approach)

① Related study search and selection (according to PRISMA guidelines)

② Data extration and quality assessment.

③ Outcomes assessment and statistical analysis

3) 材料と方法 (Materials and methods)

① Data sources and study selection

Study search and selection was conducted in accordance with the PRISMA guidelines. A comprehensive literature search was conducted to identify all relevant articles. The studies were searched in the databases of PubMed, EMBASE, and Cochrane Library. The search terms were the following Medical Subject Headings (Mesh) and their synonyms: 'carcinoma, non-small-cell lung' AND 'immune checkpoint inhibitor' AND 'rechallenge'. The studies were reviewed to evaluate the title, abstract, and full publication sequentially. Case reports, reviews, comments, animal experiments, meta-analyses, abstracts, and meetings with incomplete data or non-English content were also excluded.

②Data extraction and quality assessment

The following information was extracted: first author, year of publication, country, study design, treatment period, number, gender and mean age of patients at initial treatment, regimens and therapy line of initial ICI and ICI rechallenge, tumor proportion status, best response to ICI treatment, number of patients who experienced Grade 3 or 4 irAE after initial treatment and after rechallenge, median progression-free survival (in months), the cessation reasons of initial ICI, and also interval time between initial ICI and ICI rechallenge. Study quality assessments were performed based on Newcastle–Ottawa Scale.

③Outcome assessment and statistical analysis

The best response to treatment was assessed as complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD), or not evaluable (NE) according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST v1.1). Adverse events were graded according to Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 (CTCAE v4.0). Hazard ratio for PFS was estimated using Inverse Variance in RevMan version 5.4.

4) 実験結果 (Results)

Fifteen studies including 442 patients between 2018 and 2022 were eligible for meta-analysis. The incidence of Grade 3/4 irAE was lower in rechallenge than initial ICI (8.6% vs 17.8%, $P < 0.001$). Patients rechallenged with ICI had lower ORR and DCR than initial ICI (13.2% vs 42.4%, $P < 0.001$; 51.1% vs 74.0%, $P < 0.001$). The ORR and DCR to ICI rechallenge were both higher in patients who experienced disease progression after stopping ICI or irAE than patients with disease progression during ICI treatment (ORR: 46.2% vs 20% vs 11.4%, $P = 0.003$; DCR: 84.6% vs 90.0% vs 55.0%, $P = 0.002$). Additionally, 34.7% of 69 patients with individual response to ICI and PFS experienced the same or better response to ICI rechallenge in comparison with initial ICI, although PFS in initial ICI was longer than that in ICI rechallenge (median: 8.90 vs 3.67 months, HR: 0.44, 95% CI: [0.33, 0.59]).

5) 考察 (Discussion)

ICI rechallenge should be considered on an individual scenario. Rechallenge with ICI is a reasonable therapeutic option for those who underwent disease progression after stopping ICI treatment or who discontinued treatment due to toxicity. Additional studies are needed to better understand the molecular characteristics of responding patients.

6) 参考文献 (References)

- [1] Sharma, P., J.P. Allison, Dissecting the mechanisms of immune checkpoint therapy. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20(2): 75-76.
- [2] Gandhi, L., D. Rodriguez-Abreu, S. Gadgeel, E. Esteban, E. Felip, F. De Angelis, M. Domine, P. Clingan, M.J. Hochmair, S.F. Powell, et al., Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018; 378(22): 2078-2092.
- [3] Paz-Ares, L., A. Luft, D. Vicente, A. Tafreshi, M. Gumus, J. Mazieres, B. Hermes, F. Cay Senler, T. Csoszi, A. Fulop, et al., Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018; 379(21): 2040-2051.
- [4] Ettinger, D.S., D.E. Wood, D.L. Aisner, W. Akerley, J.R. Bauman, A. Bharat, D.S. Bruno, J.Y. Chang, L.R. Chirieac, T.A. D'Amico, et al., NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021; 19(3): 254-266.
- [3] Paz-Ares, L., A. Luft, D. Vicente, A. Tafreshi, M. Gumus, J. Mazieres, B. Hermes, F. Cay Senler, T. Csoszi, A. Fulop, et al., Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018; 379(21): 2040-2051.
- [4] Ettinger, D.S., D.E. Wood, D.L. Aisner, W. Akerley, J.R. Bauman, A. Bharat, D.S. Bruno, J.Y. Chang, L.R. Chirieac, T.A. D'Amico, et al., NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021; 19(3): 254-266.

Study 2

1. 研究概要 (2)

1) 目的 (Goal) Immune-checkpoint inhibitors (ICIs) are now standard of care for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Peripheral blood biomarkers would be most convenient method to predict treatment outcome of patients. This study explored the peripheral blood markers that can predict outcome in patients with advanced NSCLC receiving ICI.

2) 戦略 (Approach)

- ① Patient peripheral blood at baseline of ICI and after one cycle of ICI collection
- ② Patient information collection and analysis
- ③ Cytokines assay in patient plasma samples using EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human Cytokine / Chemokine Panel

3) 材料と方法 (Materials and methods)

① 41 patients information and plasma collection

The following information was extracted: gender, age, histology, clinical stage, primary site, ECOG PS, smoking status, PD-L1 expression, line of immunotherapy, type of immunotherapy, actionable mutation, number of metastatic sites, best response to ICI treatment, irAE occurred during ICI treatment, progression-free survival (in months), overall survival (in months).

② Cytokine assay using EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human Cytokine / Chemokine Panel

41 cytokines were measured in patient plasma samples of both before ICI treatment and after one cycle of ICI. Cytokines including EGF, Eotaxin-1, G-CSF, GM-CSF, IFN α 2, IFN γ , IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α , TNF β , VEGF, FGF-2, TGF- α , FIT-3L, Fractalkine, GRO, MCP-3, MDC, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, sCD40L, and IL-9.

4) 実験結果 (Results)

Fifty-five including 49.1% of cachectic patients were prospectively enrolled. Forty-one patients had peripheral blood samples taken at baseline and during treatment with PD-1/PD-L1 blockade. The overall survival was compared between cachectic patients and non-cachectic patients in a total of 55 patients and 41 patients with cytokine assay, respectively. The overall survival was significantly better in patients without cachexia than in those with cachexia, on comparing both cohorts (two-year survival rate: 70.5% vs. 40.0%, $P=0.007$; 71.2% vs. 36.7%, $P=0.022$). Baseline levels of IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, and IP-10 were significantly higher in cachectic patients. In contrast, eotaxin-1 was lower in cachectic patients. The overall survival tended to be better in patients with higher eotaxin-1 (two-year survival rate: 68.6% vs. 30.6%, $P=0.28$). Besides, the level of plasma eotaxin-1 after one cycle of PD-1/PD-L1 blockade treatment in patients who obtained CR or PR was significantly higher than those with SD or PD ($P=0.039$). Higher IL-6 levels, both at baseline and during treatment with PD-1/PD-L1 blockade, were observed in patients experiencing irAEs, compared to those in whom irAEs were absent ($P=0.0098$, $P=0.042$, respectively). Furthermore, patients experiencing severe irAEs were likely to have higher IL-6 at baseline before PD-1/PD-L1 blockade treatment ($P=0.033$). Higher IL-10 both at baseline and during treatment was associated with poorer overall survival (two-year survival rate: 32.5% vs. 72.6%, $P=0.012$; 44.3% vs. 62.3%, $P=0.109$). We found that an early increase in eotaxin-1 after immunotherapy is a favorable factor related to the therapeutic response to PD-1/PD-L1 blockade and overall survival. High IL-6 was associated with the risk of immune-related adverse events, while high IL-10 was associated with poor overall survival. A blood-based, cachexia-related cytokine network assay may yield potential biomarkers for predicting the clinical response to PD-1/PD-L1 blockade therapy and provide clues for improving the outcome of cachectic patients.

5) 参考文献 (References)

- [1] Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S et al (2018) Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 378(22):2078–2092.
- [2] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P et al (2015) Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 373(2):123–135.
- [3] Berardi R, Rinaldi S, Santoni M et al. Prognostic models to predict survival in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with first-line chemo- or targeted therapy. *Oncotarget* 2016;7:26916–26924.

2. 執筆論文 Publication of thesis ※記載した論文を添付してください。Attach all of the papers listed below.

論文名 1 Title	Heterogeneous outcomes of immune checkpoint inhibitors rechallenge in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis (Under review after revision)					
掲載誌名 Published journal	JTO Clinical and Research Reports					
	2022 年 4 月	3 巻(号)	100309 頁 ~	頁	言語 Language	English
第1著者名 First author	Shiting Xu	第2著者名 Second author	Takehito Shukuya	第3著者名 Third author	Jun Tamura	
その他著者名 Other authors	Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Keita Miura, Taichi Miyawaki, Daisuke Hayakawa, Tetsuhiko Asao, Kouji Yamamoto, Kazuhisa Takahashi					
論文名 2 Title	Early detection of therapeutic benefit from PD-1/PD-L1 blockade in advanced lung cancer by monitoring cachexia-related circulating cytokines					
掲載誌名 Published journal	Cancers (Under review)					
	年 月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language	English
第1著者名 First author	Shiting Xu	第2著者名 Second author	Keita Miura	第3著者名 Third author	Takehito Shukuya	
その他著者名 Other authors	Shiting Xu, Keita Miura, Takehito Shukuya, Sonoko Harada, Masahiro Fujioka, Wira Winardi, Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Issei Sumiyoshi, Taichi Miyawaki, Tetsuhiko Asao, Yoichiro Mitsuishi, Ken Tajima, Fumiyuki					
論文名 3 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language	
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 4 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language	
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 5 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language	
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						

3. 学会発表 Conference presentation ※筆頭演者として総会・国際学会を含む主な学会で発表したものを記載してくだ

※Describe your presentation as the principal presenter in major academic meetings including general meetings or international me

学会名 Conference	The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology		
演題 Topic	Safety and Efficacy of immune checkpoint inhibitors rechallenging in patients with Non-Small-Cell Lung Cancer		
開催日 date	2021 年 11 月 20 日	開催地 venue	Kyoto International Conference Center
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input checked="" type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Shiting Xu, Takehito Shukuya, Jun Tamura, Kouji Yamamoto, Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Daisuke Hayakawa, Tetsuhiko Asao, Kazuhisa Takahashi		
学会名 Conference	第62回日本肺癌学会学術集会(The 62nd Annual Meeting of the Japan Lung Cancer Society)		
演題 Topic	Safety and Efficacy of immune checkpoint inhibitors rechallenging in patients with Non-Small-Cell Lung Cancer		
開催日 date	2021 年 11 月 26 日	開催地 venue	パシフィコ横浜 ノース
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Shiting Xu, Takehito Shukuya, Jun Tamura, Kouji Yamamoto, Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Daisuke Hayakawa, Tetsuhiko Asao, Kazuhisa Takahashi		
学会名 Conference	第20回日本臨床腫瘍学会学術集会		
演題 Topic	Development of Hybrid Vision Transformer to Predict Pharmacotherapy Efficacy on Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer Patients (ステージIV非小細胞肺癌患者における薬物療法効果予測のためのハイブリッドビジョントランスフォーマーの開発)		
開催日 date	2023 年 3 月 16 日	開催地 venue	福岡
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Shiting Xu, Takehito Shukuya, Kazuhiro Suzuki, Taichi Miyawaki, Shoko Sonobe Shimamura, Hironari Matsuda, Ryota Kanemaru, Tetsuhiko Asao, Tomoyasu Mimori, Yujiro Otsuka, Kazuhisa Takahashi		
学会名 Conference	第63回日本呼吸器学会学術講演会		
演題 Topic	Longitudinal characterization of cachexia-related circulating cytokines in advanced lung cancer treated with PD-1/PD-L1 blockade		
開催日 date	2023 年 4 月 28 日	開催地 venue	東京
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input checked="" type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Shiting Xu, Keita Miura, Takehito Shukuya, Sonoko Harada, Masahiro Fujioka, Wira Winardi, Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Issei Sumiyoshi, Taichi Miyawaki, Tetsuhiko Asao, Yoichiro Mitsuishi, Ken Tajima, Fumiyuki		

4. 受賞(研究業績) Award (Research achievement)

名称 Award name	国名 Country	受賞年 Year of	年	月
名称 Award name	国名 Country	受賞年 Year of	年	月

5. 本研究テーマに関わる他の研究助成金受給 Other research grants concerned with your research them

受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
助成金名称 Grant name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円
受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
助成金名称 Grant name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
奨学金名称 Scholarship name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

7. 研究活動に関する報道発表 Press release concerned with your research activities

※記載した記事を添付してください。Attach a copy of the article described below

報道発表 Press release	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	発表年月日 Date of release	
発表機関 Released medium			
発表形式 Release method	・新聞 ・雑誌 ・Web site ・記者発表 ・その他()		
発表タイトル Released title			

8. 本研究テーマに関する特許出願予定 Patent application concerned with your research theme

出願予定 Scheduled	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	出願国 Application	
出願内容(概要) Application contents			

9. その他 Others

--



Heterogeneous Outcomes of Immune Checkpoint Inhibitor Rechallenge in Patients With NSCLC: A Systematic Review and Meta-Analysis

Shiting Xu, MD,^a Takehito Shukuya, MD, PhD,^{a,*} Jun Tamura, MSc,^b Shoko Shimamura, MD,^a Kana Kurokawa, MD,^a Keita Miura, MD,^a Taichi Miyawaki, MD, PhD,^a Daisuke Hayakawa, MD, PhD,^a Tetsuhiko Asao, MD, PhD,^a Kouji Yamamoto, PhD,^b Kazuhisa Takahashi, MD, PhD^a

^aDepartment of Respiratory Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

^bDepartment of Biostatistics, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan

Received 3 November 2021; revised 4 February 2022; accepted 6 March 2022

Available online - 19 March 2022

ABSTRACT

Introduction: Outcomes of immune checkpoint inhibitor (ICI) rechallenge in NSCLC remain uncertain. This study estimated the safety and efficacy of ICI rechallenge and compared rechallenge benefit among different reasons of initial ICI discontinuation in NSCLC.

Methods: PubMed, EMBASE, and Cochrane Library were searched for studies on NSCLC retreated with ICI. Immune-related adverse events (irAEs), overall response rate (ORR), disease control rate (DCR), and progression-free survival (PFS) at initial ICI and rechallenge were analyzed.

Results: A total of 15 studies including 442 patients between 2018 and 2022 were eligible for meta-analysis. The incidence of grade 3 or 4 irAE was lower in rechallenge than initial ICI (8.6% versus 17.8%, $p < 0.001$). Patients rechallenged with ICI had lower ORR and DCR than initial ICI (13.2% versus 42.4%, $p < 0.001$; 51.1% versus 74.0%, $p < 0.001$). The ORR and DCR to ICI rechallenge were both higher in patients who experienced disease progression after stopping ICI or irAE than patients with disease progression during ICI treatment (ORR: 46.2% versus 20% versus 11.4%, $p = 0.003$; DCR: 84.6% versus 90.0% versus 55.0%, $p = 0.002$). In addition, 34.7% of 69 patients with individual response to ICI and PFS experienced the same or better response to ICI rechallenge in comparison with initial ICI, although PFS in initial ICI was longer than that in ICI rechallenge (median: 8.90 versus 3.67 mo, hazard ratio = 0.44, 95% confidence interval: 0.33–0.59).

Conclusions: ICI rechallenge had less severe toxicity than initial ICI treatment. Patients undergoing disease progression after ICI cessation or ICI discontinuation owing to irAE are more likely to benefit from ICI rechallenge in NSCLC.

*Corresponding author.

Disclosure: Dr. Shukuya received grants from AstraZeneca, Chugai Pharmaceutical, Boehringer Ingelheim, Novartis, MSD and honoraria from AstraZeneca, Chugai Pharmaceutical, Boehringer Ingelheim, Novartis, MSD, Taiho Pharma, Daiichi-Sankyo, Ono Pharmaceutical, Bristol-Myers Squibb, Nippon Kayaku, Pfizer outside of the submitted work. Dr. Miura received honoraria from Chugai Pharmaceutical and Taiho Pharmaceutical outside of the submitted work. Dr. Asao received honoraria from AstraZeneca, Eli Lilly Japan, Nippon Boehringer Ingelheim, Taiho Pharmaceutical, Chugai Pharmaceutical, MSD, Ono Pharmaceutical and Takeda Pharmaceutical outside of the submitted work. Dr. Yamamoto received grants from Chugai Pharmaceutical, Taiho Pharmaceutical, Boehringer Ingelheim, Ono Pharmaceutical, Takeda Pharmaceutical, Bayer Yakuhin, Daiichi-Sankyo, Astellas, Kyowa Kirin and honoraria from Chugai Pharmaceutical, Otsuka Pharmaceutical, CMIC holdings, J-Pharma, Craif, Johokiko, Triceps and Kanagawa Prefectural Hospital Organization outside of the submitted work. Dr. Takahashi received grants from Chugai Pharmaceutical, Nippon Boehringer Ingelheim, MSD, Glaxo SmithKline Consumer Healthcare Japan, NIPPON SHINYAKU, TSUMURA & CO, Pfizer Inc, Taiho Pharmaceutical, Daiichi-Sankyo, Astellas Pharma, KYORIN Pharmaceutical, KYOWA Hakko Kirin, TEIJIN PHARMA LIMITED, Sanofi, Ono Pharmaceutical, Shionogi & Co., Ltd, Novartis Pharma, Eli Lilly Japan, Actelion Pharmaceuticals Japan, NIPRO PHARMA CORPORATION, Takeda Pharmaceutical Company Limited, Bayer Yakuhin, Torii Pharmaceutical and honoraria from Chugai Pharmaceutical, Nippon Boehringer Ingelheim, MSD, Pfizer, AstraZeneca, Taiho Pharmaceutical, KYORIN Pharmaceutical, Ono Pharmaceutical, Bristol-Myers Squibb Company, Novartis Pharma, Eli Lilly Japan, Meiji Seika Pharma and Abbott Japan LLC outside of the submitted work. Drs. Xu, Tamura, Shimamura, Kurokawa, Miyawaki and Hayakawa declared no conflict of interest.

Address for correspondence: Takehito Shukuya, MD, PhD, Department of Respiratory Medicine, Juntendo University, Graduate School of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8421, Japan. E-mail: tshukuya@juntendo.ac.jp

Cite this article as: Xu S, Shukuya T, Tamura J, et al. Heterogeneous outcomes of immune checkpoint inhibitor rechallenge in patients with NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *JTO Clin Res Rep.* 2022;3:100309.

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the International Association for the Study of Lung Cancer. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ISSN: 2666-3643

<https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2022.100309>

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the International Association for the Study of Lung Cancer. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: Immune checkpoint inhibitors; Non-small cell lung cancer; Rechallenge; Immune-related adverse events; Prognosis

Introduction

Immune checkpoint therapy with antibodies targeting PD-1/PD-L1 and CTLA4 is a new cornerstone of cancer treatment and has been found to have a therapeutic efficacy across various types of cancer in the past 5 years.¹ The number of patients with NSCLC who received immune checkpoint inhibitors (ICIs) is rapidly increasing because growing evidence suggests that ICI induces durable treatment response and prolongs survival in advanced NSCLC, especially to patients with high PD-L1 expression.^{2,3} Recently, immune checkpoint therapy or that plus chemotherapy was further recommended as first-line regimen in metastatic NSCLC without driver oncogene, regardless of PD-L1 levels.⁴

Nevertheless, immune checkpoint therapy was eventually discontinued in many patients with advanced NSCLC owing to disease progression.⁵ Even in patients with favorable therapeutic efficacy, ICI treatment may not last long owing to severe toxicities.⁶ In addition, the discontinuation of ICI in some patients is attributed to clinical decision after a defined time frame treatment such as 2 years or 35 cycles of anti-PD-1.⁷

Along with accumulating experience and evolving understanding of ICI, rechallenge of ICI is emerging in patients with NSCLC who discontinued ICI treatment owing to immune-related adverse events (irAEs) or disease progression during ICI treatment or after stopping ICI therapy after a defined number of cycles or a long period.⁸⁻¹⁰ Nevertheless, the reported small number of patients undergoing ICI rechallenge provided limited or heterogeneous evidence for ICI rechallenge. Thus, the risks and benefits of ICI rechallenge remained uncertain and inconclusive. The purpose of this meta-analysis was to synthesize available data on the safety and efficacy of ICI rechallenge and compare rechallenge benefit among different reasons of initial ICI discontinuation in patients with advanced NSCLC.

Materials and Methods

Data Sources and Study Selection

Study search and selection were conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses guidelines.¹¹ A

comprehensive literature search was conducted to identify all relevant articles. The studies were searched in the databases of PubMed, EMBASE, and Cochrane Library until January 20, 2022. The search terms were the following Medical Subject Headings and their synonyms: “carcinoma, non-small-cell lung” and “immune checkpoint inhibitor” and “rechallenge.”

The studies were reviewed to evaluate the title, abstract, and full publication sequentially. The inclusion criteria were as follows: (1) clinical characteristics and prognosis parameters were described in patients with NSCLC; (2) ICI was used in both the initial treatment and retreatment (Fig. 1). Duplicate studies were excluded using the “remove duplicates” function in Endnote Online. Case reports, reviews, comments, animal experiments, meta-analyses, abstracts, and meetings with incomplete data or non-English content were also excluded.

Data Extraction and Quality Assessment

A standardized data template was used to extract data from studies, and all discrepancies were resolved by consensus between two reviewers. The following information was extracted: first author, year of publication, country, study design, treatment period, number, sex and mean age of patients at initial treatment, regimens and therapy line of initial ICI and ICI rechallenge, tumor proportion status, best response to ICI treatment, number of patients who experienced grade 3 or 4 irAE after initial treatment and after rechallenge, median progression-free survival (PFS) (in mo), the cessation reasons of initial ICI, and interval time between initial ICI and ICI rechallenge (Table 1).¹³⁻²⁷ Study quality assessments were performed according to the Newcastle-Ottawa Scale, which evaluated the study design based on eight questions regarding population selection, comparability, and exposure.¹²

Outcome Assessment and Statistical Analysis

The best response to treatment was accessed as complete response, partial response (PR), stable disease, progressive disease (PD), or not estimated according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1. The overall response rate (ORR) was defined as the percentage of complete response and PR obtained as best response, whereas the disease control rate (DCR) included the ORR and percentage of achieved stable disease. Adverse events were graded according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0. PFS of initial ICI was defined as the time from the start of initial ICI treatment to objective disease progression. PFS of ICI rechallenge was defined as the time from the date of rechallenge of ICI to the date of disease progression or death from any cause. Hazard

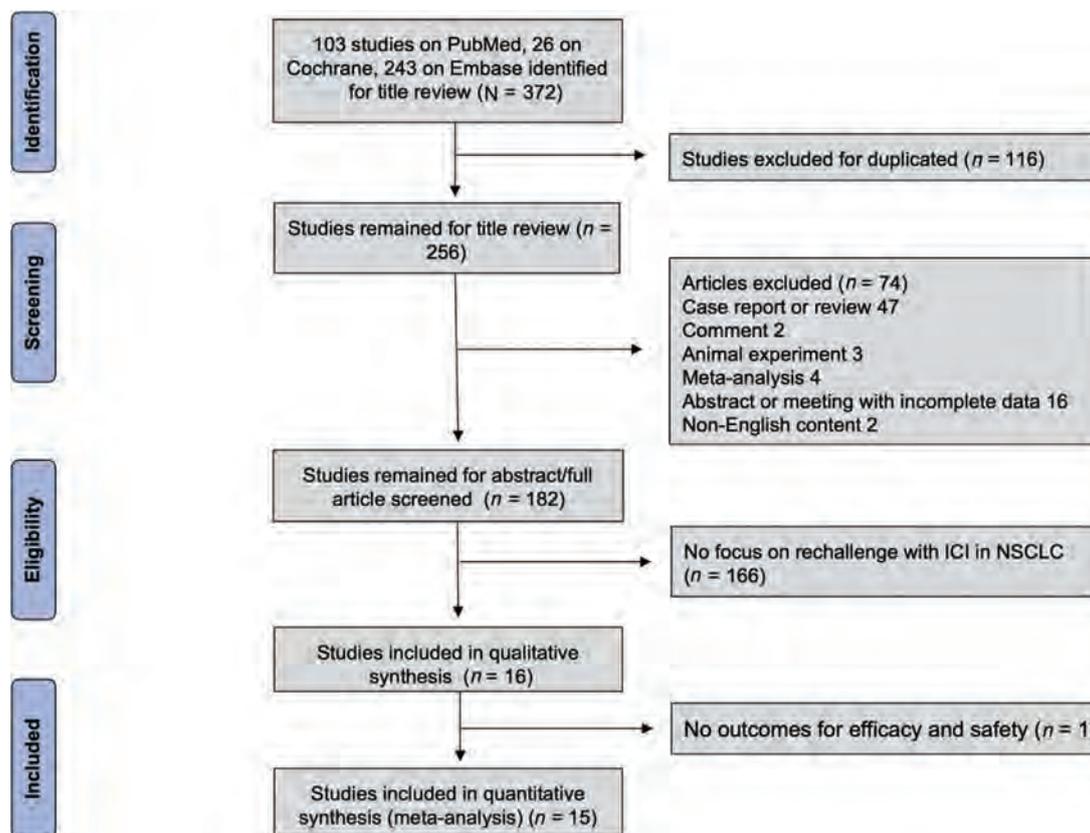


Figure 1. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses flow diagram. ICI, immune checkpoint inhibitor.

ratio for PFS was estimated using Inverse Variance in RevMan version 5.4.

Fixed effect model was used in our meta-analysis when p value is greater than 0.1, I^2 is less than 50% in tests for heterogeneity, otherwise random effect model was adopted. Each study in the fixed/random effect analysis was weighted based on its sample size. The pooled OR with 95% confidence interval (CI) was calculated to evaluate the safety and efficacy of ICI rechallenge in patients with NSCLC who received ICI treatment. Publication bias was evaluated using funnel plots. Differences of categorical data between groups were analyzed using Pearson’s chi-square test or Fisher’s exact test. All the statistical analyses were performed using RevMan version 5.4 (www.training.cochrane.org/), MedCalc software (<https://www.medcalc.org>), or SPSS version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY) software. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Eligible Studies and Quality Assessment

Our search retrieved a total of 372 publications from the databases of PubMed, EMBASE, and Cochrane Library. After excluding duplicates and screening titles of the studies, 182 articles were selected based on the relevance

to the study topic. The study selection scheme is illustrated in [Figure 1](#). In total, 15 retrospective studies were included in the meta-analysis after review of abstract and full article for final qualitative and quantitative analyses.

The Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale was used to evaluate quality of the included studies. All studies scored either 7 or 8. The quality assessment results for the individual studies are found in [Supplementary Table 1](#). There was no evidence of publication bias in the funnel plots of irAE, ORR, DCR, or PFS among the included studies ([Supplementary Fig. 1](#)).

Characteristics of Studies Included in Meta-Analysis

A total of 442 patients who received ICI rechallenge after initial ICI treatment from the 15 eligible studies were included in the meta-analysis. The mean age of patients was 65.8 years, and 69% of the patients were male. The main clinical characteristics and outcomes, including grade 3/4 irAE, the best response to ICI, and PFS, are found in [Table 1](#).¹³⁻²⁷ Among them, the discontinuation of initial ICI occurred in 131 patients owing to different grades of irAE, 251 patients owing to disease progression during ICI treatment, and 42 patients owing to clinical decision such as after a defined

Table 1. Study Characteristics

Study	Country	Study Design	Treatment Period	No. of Patient	Male, %	Mean Age (y)	Regimen(i)	Therapy Line	TPS \geq 50% (%) ^d	PFSi (M)	Best Response						Cessation Reason
											CR	PR	Stable Disease	PD	NR	G3/4 IrAE	
Bernard et al., 2018 ¹³	France	Retrospective	2012.5-2017.10	1	NR	NR	Anti-PD-(L)1	NR	NR	19.9	0	1	0	0	0	0	PD
Fujita et al., 2018 ¹⁴	Japan	Retrospective	2015.12-2018.3	12	66.7	70.8	Nivo	Second~	41.7	6.2	0	7	2	3	0	2	PD
Niki et al., 2018 ¹⁵	Japan	Retrospective	2015.12-2017.12	11	81.8	66	Nivo	NR	NR	4.9	0	5	2	4	0	0	PD
Santini et al., 2018 ¹⁶	America	Retrospective	2011.4-2016.5	38	52.6	64	Anti-PD(L)1/ anti-CTLA4	First~	NR	NR	18		20		0	6	irAE
Fujita et al., 2019 ¹⁷	Japan	Retrospective	2018.1-2018.12	18	61.1	71	Nivo/Pemb	Second	50	NR	0	8	4	5	1	0	NR
Watanabe et al., 2019 ¹⁸	Japan	Retrospective	2015.12-2017.12	14	57.1	61.5	Atezo/nivo/ pemb	NR	50	3.7	0	3	5	6	0	0	PD
Mouri et al., 2019 ¹⁹	Japan	Retrospective	2015.12-2018.8	21	90.5	69.6	Nivo	Second~	NR	13.3	1	12	8	0	0	7	irAE
Fujita et al., 2020 ²⁰	Japan	Retrospective	2018.1-2019.8	15	93.3	71.4	Atezo/durva	Second~	0	3	0	0	5	9	1	0	PD
Gobbini et al., 2020 ²¹	France	Retrospective	2010-2018	144	67.4	63	Anti-PD-(L)1	First~	14.6	13	10	61	38	26	9	27	irAE, PD, clinical decision
Herbst et al., 2020 ²²	Keynote 10	Retrospective	2013.8-2015.2	14	NR	NR	Pemb	First~	NR	NR	0	13	0	0	1	NR	Clinical decision
Katayama et al., 2020 ²³	Japan	Retrospective	2017.4-2018.11	35	68.6	70	Nivo/pemb/ atezo	Third	40	4	0	12	12	10	1	NR	PD
Kitagawa et al., 2020 ²⁴	Japan	Retrospective	2018.4-2019.9	17	64.7	69	Anti-PD-(L)1	First~	17.6	9.7	0	6	9	2	0	3	PD
Furuya et al., 2021 ²⁵	Japan	Retrospective	2018.4-2019.2	38	NR	NR	Nivo/pemb	Second~	NR	NR	0	8	16	11	3	NR	irAE, PD
Takahara et al., 2022 ²⁶	Japan	Retrospective	2016.8-2021.7	24	66.7	NR	Durva/ pemb/nivo	NR	45.8	NR	NR					4	irAE, PD
Xu et al., 2022 ²⁷	People's Republic of China	Retrospective	2018.12-2021.6	40	77.5	NR	Anti-PD-1	NR	NR	5.7	0	14	19	7	0	NR	PD

ICI Rechallenge

Study	Interval Time (Median mo)	Regimen(r)	Therapy Line	TPS \geq 50% (%) ^d	PFSr (M)	Best Response					
						CR	PR	Stable Disease	PD	NR	G3/4 irAE
Bernard et al., 2018 ¹³	10	Anti-PD-(L)1	NR	NR	35.4	0	0	1	0	0	0
Fujita et al., 2018 ¹⁴	NR	Pemb	NR	50	3.1	0	1	4	6	1	0

(continued)

Table 1. Continued

Study	Interval Time (Median mo)	Regimen(r)	Therapy Line	TPS \geq 50% (%) ^a	PFSr (M)	Best Response					G3/4 irAE
						CR	PR	Stable Disease	PD	NR	
Niki et al., 2018 ¹⁵	4.2	Nivo/pemb	NR	NR	2.7	0	3	2	6	0	0
Santini et al., 2018 ¹⁶	NR	Anti-PD-(L)1/anti-CTLA4	NR	NR	NR	NR					8
Fujita et al., 2019 ¹⁷	NR	Atezo	Third~	NR	NR	0	0	7	11	0	2
Watanabe et al., 2019 ¹⁸	6.5	Atezo/nivo/pemb	NR	NR	1.6	0	1	2	11	0	0
Mouri et al., 2019 ¹⁹	NR	Nivo	NR	NR	7.4	0	4	14	2	1	2
Fujita et al., 2020 ²⁰	NR	Nivo/pemb	NR	NR	2.4	0	0	4	9	2	2
Gobbini et al., 2020 ²¹	NR	Anti-PD-(L)1	Second~	NR	4.4	5	18	45	54	22	4
Herbst et al., 2020 ²²	NR	Pemb	NR	NR	NR	0	6	5	2	1	NR
Katayama et al., 2020 ²³	5.2	Nivo/pemb/atezo	Fourth	NR	2.7	0	1	14	18	2	NR
Kitagawa et al., 2020 ²⁴	NR	Anti-PD-(L)1	Second~	NR	4	0	1	9	7	0	2
Furuya et al., 2021 ²⁵	NR	Atezo	NR	NR	NR	0	1	12	20	5	NR
Takahara et al., 2022 ²⁶	NR	Nivo/atezo/pemb	NR	NR	NR	0	2	9	13	0	3
Xu et al., 2022 ²⁷	NR	Anti-PD-1	NR	NR	6.8	0	9	25	6	0	NR

^aPercentage of patients whose TPS is equals to or more than 50%.

Anti-PD-(L)1, immune checkpoint blockade targeting programmed cell death-(ligand)1; Atezo, atezolizumab; CR, complete response; Durva, durvalumab; G3/4 irAE, grade 3/4 immune-related adverse event; ICI, immune checkpoint inhibitor; Nivo, nivolumab; NR, not reported; PD, progressive disease; Pemb, pembrolizumab; PFSi, progression-free survival of initial ICI; PFSr, progression-free survival of ICI rechallenge; PR, partial response; Regimen(i), initial ICI regimen; Regimen(r), ICI rechallenge regimen; TPS, tumor proportion score.

period or cycles of ICI treatment, and no informative reason of cessation was provided in 18 patients. Eight of 15 studies reported systemic therapy (docetaxel + ramucirumab, carboplatin + nanoparticle albumin-bound paclitaxel/pemetrexed, gemcitabine, etc.) or local therapy (radiation therapy or surgery) between initial ICI and ICI rechallenge.

Pooled Analysis of irAE in Initial ICI Treatment Versus ICI Rechallenge

Of the 442 patients, information for grade 3/4 (or not) was reported for 315 patients with both initial ICI treatment and ICI rechallenge. Among them, initial ICI was discontinued in 131 patients owing to irAE. The incidence of grade 3/4 irAE was lower when ICI was rechallenged, compared with initial ICI (8.6% versus 17.8%, $p = 0.001$). The odds of grade 3/4 irAE occurrence was significantly lower in ICI rechallenge than initial ICI treatment (0.44, 95% CI: 0.27–0.71, $p < 0.001$) (Fig. 2).

Among 79 patients with detailed irAE records, 32 patients who discontinued the initial ICI owing to irAE experienced grade 3/4 toxicity and only 4 of the 32 patients developed grade 3/4 irAE again during ICI rechallenge.^{19,21}

Pooled Analysis of Therapeutic Responses and PFS in Initial ICI Treatment Versus ICI Rechallenge

Among the 442 patients, information on therapeutic response in both initial ICI treatment and ICI rechallenge was available in 380 patients of 13 studies. Patients rechallenged with ICI were found to have a decreased ORR (13.2% versus 42.4%, $p < 0.001$) (Fig. 3A and B). DCR after ICI rechallenge reached 51.1%, although it is lower than the rate of 74.0% in the initial ICI treatment ($p < 0.001$) (Fig. 3C and D).

ORR and DCR of ICI rechallenge were analyzed using meta-analysis of proportion among 404 patients in 14

studies which provided exact therapeutic response of ICI rechallenge. The pooled ORR at ICI rechallenge was 12.4%. Nevertheless, the pooled DCR of ICI rechallenge reached 54.9% (Fig. 4A and B). Especially, the therapeutic response of ICI rechallenge was also compared among 10 studies with 180 patients who both had the specific discontinuation reasons of initial ICI (disease progression after stopping ICI therapy, irAE, and PD during initial ICI treatment) and their corresponding therapeutic response. The ORR and DCR of ICI rechallenge were both higher in patients who experienced disease progression after stopping ICI treatment or irAE than in patients with disease progression during ICI treatment (ORR: 46.2% versus 20% versus 11.4%, $p = 0.003$; DCR: 84.6% versus 90.0% versus 55.0%, $p = 0.002$) (Fig. 4C and D).

Furthermore, among 69 patients for whom survival information was available from 5 of the total 15 studies, 13% of the patients were found to have better therapeutic response with longer PFS in ICI rechallenge than in their initial ICI (median: 4.8 versus 2.5 mo, $p < 0.001$). In addition, 21.7% of the patients maintained the same response (PR, stable disease) in ICI rechallenge as in their initial ICI. Overall, the pooled PFS in initial ICI was longer than that in ICI rechallenge (median: 8.9 versus 3.7 mo; hazard ratio = 0.44, 95% CI: 0.33–0.59) (Fig. 5A and B and Supplementary Fig. 2).

Discussion

This is the first meta-analysis in which available data on the safety and efficacy of ICI rechallenge were estimated and rechallenge benefit among different reasons of initial ICI discontinuation was compared in NSCLC. This study revealed that ICI rechallenge was less effective but had a lower incidence of irAE than initial ICI. Patients with disease progression in treatment-free period after initial ICI and patients who experienced irAE in ICI had better therapeutic response to ICI rechallenge, compared with those undergoing PD during initial ICI treatment. Importantly, this study suggests

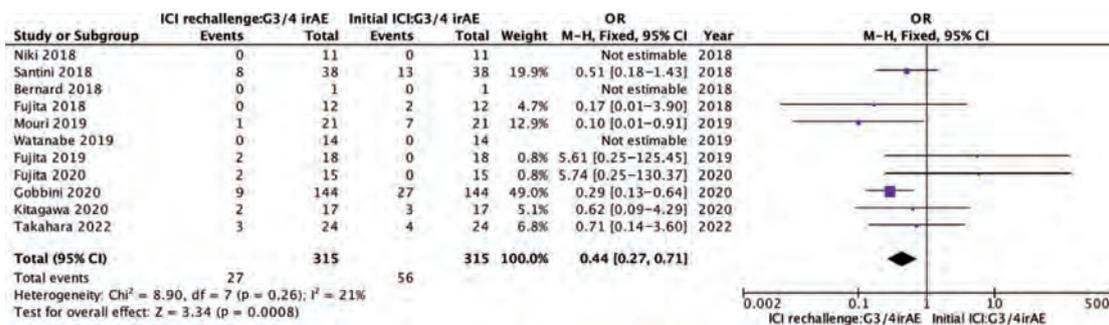


Figure 2. Pooled OR of G3/4 irAE in ICI rechallenge versus initial ICI. Lower OR represents lower incidence of irAE. CI, confidence interval; G3/4, grade 3/4; ICI, immune checkpoint inhibitor; irAE, immune-related adverse event; M-H, Mantel-Haenszel.

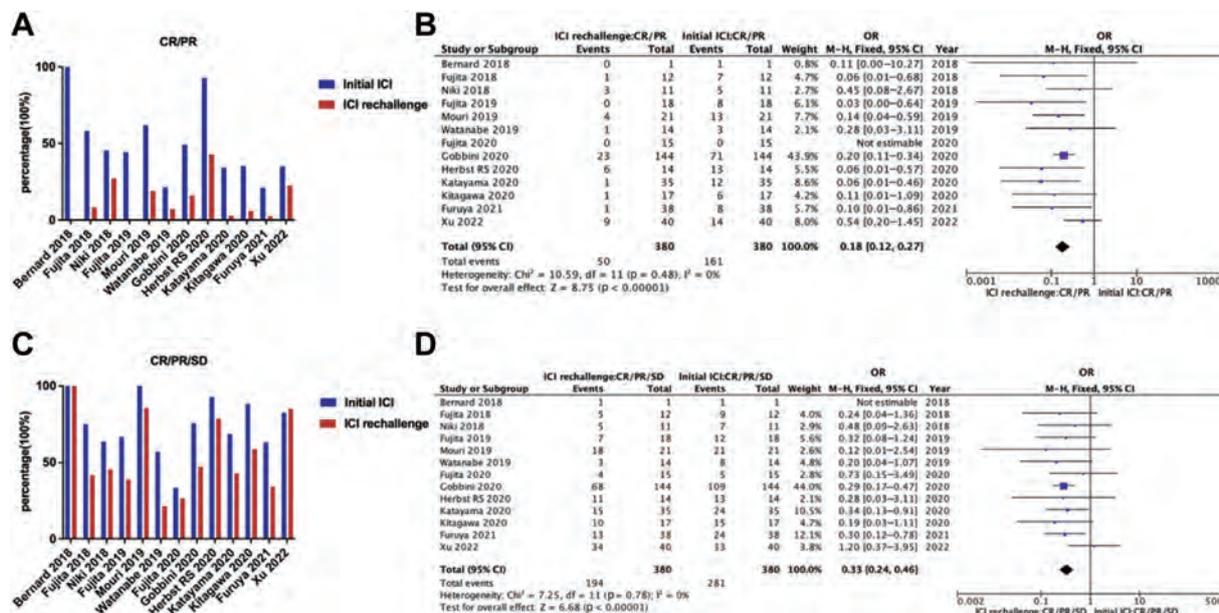


Figure 3. Efficacy analysis of initial ICI versus ICI rechallenge. (A) Overall response rates of initial ICI versus ICI rechallenge in studies with related information. (B) Pooled OR of overall response (CR/PR) in ICI rechallenge versus initial ICI. Lower OR represents lower incidence of overall response. (C) Disease control rates of initial ICI versus ICI rechallenge in studies with related information. (D) Pooled OR of disease control (CR/PR/stable disease) in ICI rechallenge versus initial ICI. Lower OR represents lower disease control rate. CI, confidence interval; CR, complete response; ICI, immune checkpoint inhibitor; M-H, Mantel-Haenszel; PR, partial response.

that patients who experience irAE or disease progression after stopping ICI treatment may be potential candidates for successful rechallenge and achieving disease control.

Lung cancer accounts for the highest number of cancer-related deaths worldwide.²⁸ ICI rechallenge could represent an attractive option in NSCLC, yet no systemic and conclusive analysis supporting this strategy is available. Overall, the current findings indicate that ICI rechallenge in patients with NSCLC is generally safe. Recurrent or new irAE after ICI retreatment seems mild and manageable in comparison with initial immune checkpoint therapy.^{29,30} On the basis of the durable response in previous ICI treatment, patients with disease progression in treatment-free period are supposed to have a more favorable efficacy at ICI rechallenge. Consistently, the present pooled study revealed that patients with disease progression in treatment-free period after ICI treatment had the best therapeutic efficacy of ICI rechallenge.

Clinical irAE, which was associated with the immunotherapeutic efficacy, may represent a clinical biomarker for ICI response.³¹ The mechanism of irAE may reflect the bystander effect from activated T cells, and patients responding to ICIs may have greater likelihood of autoimmune toxicities owing to a more competent/treatment-responsive immune system or cross-reactivity between the tumor and host tissue.³² Interestingly, our pooled analysis found that patients with irAE at initial ICI treatment had high therapeutic efficacy at ICI rechallenge

among different reasons of initial ICI discontinuation (Fig. 4). Nevertheless, the ORR of ICI rechallenge in our NSCLC study is still lower than that in the pan-cancer studies.^{30,33}

Although recent studies have begun to evaluate the clinical outcomes of ICI rechallenge in patients with cancer who had previously discontinued ICI treatment, the uncertain risks and benefits of ICI retreatment may impede the decision to resume ICI as an alternative therapy option in the clinical settings.³⁴ In the studies included in the present meta-analysis, the switch from PD-1/PD-L1 to PD-L1/PD-1 at disease progression that occurred during ICI treatment revealed limited clinical efficacy.^{14,17,20,23,24} Theoretically, a switch from anti-PD-(L)1 to anti-CTLA-4 therapy or vice versa may be reasonable. CTLA-4 inhibition works by increasing the diversity of the antitumor immune response in the lymph node and perhaps by depleting highly CTLA-4-expressing regulatory T cells in the tumor microenvironment, whereas PD-1/PD-L1 blockade mostly works at the tumor site by locally reactivating the exhausted tumor-infiltrating lymphocytes.³⁵ Outcomes of ICI rechallenge have also been reported in patients with melanoma.^{36,37} Nivolumab and pembrolizumab in ipilimumab-refractory patients were found to have an ORR of 20% to 30%, although response rates were lower with anti-PD-1 rechallenge after prior anti-PD-1. Owing to these nonoverlapping mechanisms, treatment

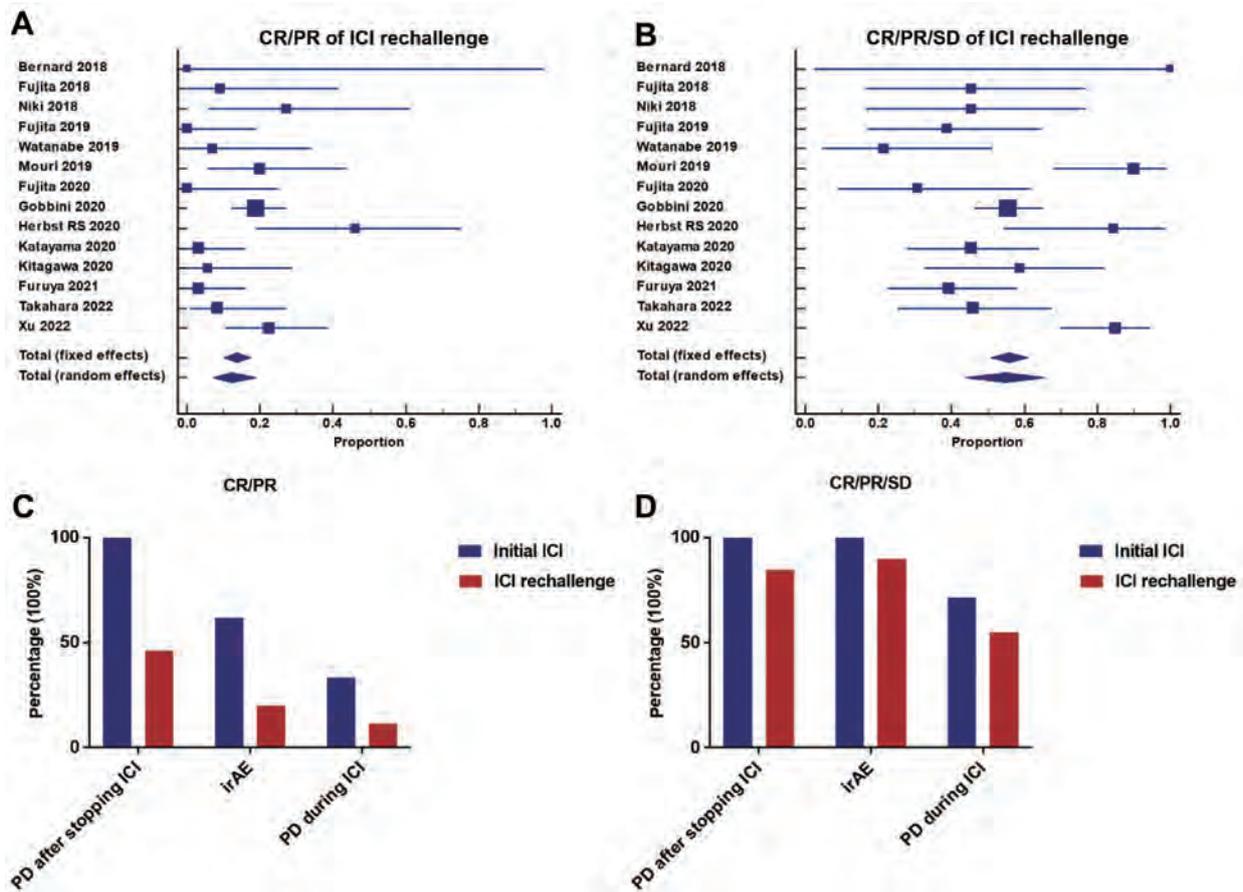


Figure 4. Therapeutic responses of ICI rechallenge and efficacy comparison based on different initial ICI discontinuation reasons (PD after stopping ICI therapy versus irAE versus PD during ICI). (A) Pooled ORR (CR/PR) of ICI rechallenge in meta-analysis of proportion (12.4%, $p = 0.0016$, random effects). (B) Pooled DCR (CR/PR/stable disease) of ICI rechallenge in meta-analysis of proportion (54.9%, $p < 0.0001$, random effects). (C) ORR of initial ICI versus ICI rechallenge based on different initial ICI discontinuation reasons in 10 studies. The ORR of ICI rechallenge was higher in patients who experienced PD after stopping ICI treatment or irAE than in patients with PD during ICI treatment (ORR: 46.2% versus 20% versus 11.4%, $p = 0.003$). (D) DCR of initial ICI versus ICI rechallenge based on different initial ICI discontinuation reasons. The DCR of ICI rechallenge was higher in patients who experienced PD after stopping ICI treatment or irAE than in patients with PD during ICI treatment DCR: 84.6% versus 90.0% versus 55.0%, $p = 0.002$. CR, complete response; DCR, disease control rate; ICI, immune checkpoint inhibitor; irAE, immune-related adverse event; ORR, overall response rate; PD, progressive disease; PR, partial response.

sequencing from one class to the other or their combination may be feasible and beneficial for patients.

Although this study is the first meta-analysis published to date analyzing the safety and efficacy of ICI rechallenge after initial ICI treatment in NSCLC, there were some limitations to this study. First, the meta-analysis was based on retrospective studies, which have their inherent biases. For example, recurrent or new irAE after ICI retreatment seems mild and manageable in comparison with initial ICI, but physicians seemed to select the patients for rechallenging of ICI more safely, that is, selection bias. Larger scale prospective studies are warranted to validate the findings of this study. Second, there were insufficient raw data to conduct meta-analysis for long-term survival

after ICI rechallenge. Many studies lacked mature PFS data necessary for meta-analysis. Third, ideally, the safety and efficacy of ICI rechallenge should be compared with second- or further-line docetaxel or pemetrexed, but this was not possible, as the data on the safety and efficacy of ICI rechallenge were compared with those of initial ICI in the previous studies included in this meta-analysis.

To conclude, ICI rechallenge should be considered on an individual scenario. Rechallenge with ICI is a reasonable therapeutic option for those who underwent disease progression after stopping ICI treatment or who discontinued treatment owing to toxicity. Additional studies are needed to better understand the molecular characteristics of responding patients.

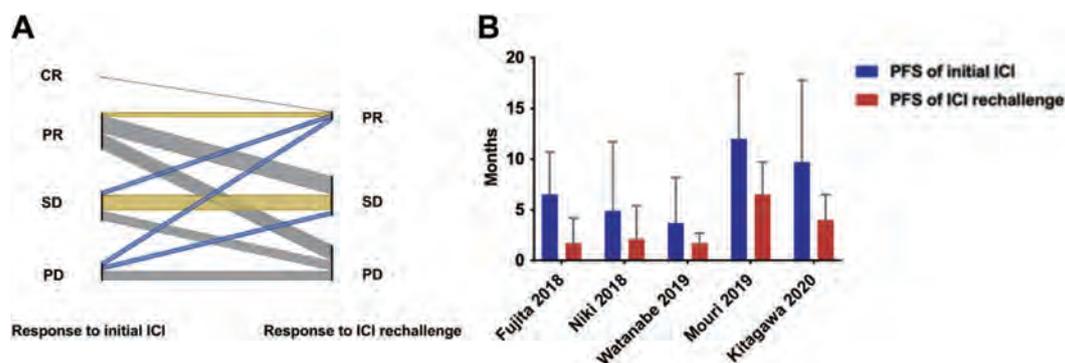


Figure 5. Therapeutic responses and PFS in initial ICI versus ICI rechallenge among 69 patients. (A) Therapeutic response change from initial ICI to ICI rechallenge. (B) The pooled PFS of initial ICI and ICI rechallenge. CR, complete response; ICI, immune checkpoint inhibitor; PD, progression disease; PFS, progression-free survival; PR, partial response; SD, stable disease.

CRedit Authorship Contribution Statement

Takehito Shukuya: Conceptualization.
Shiting Xu, Takehito Shukuya: Methodology.
Shiting Xu, Jun Tamura: Software.
Jun Tamura, Kouji Yamamoto: Data curation.
Shiting Xu: Writing - original draft preparation.
Takehito Shukuya, Shiting Xu: Formal analysis, Visualization.
Kazuhisa Takahashi, Takehito Shukuya: Supervision.
Kouji Yamamoto: Validation.
Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Keita Miura, Taichi Miyawaki, Daisuke Hayakawa, Tetsuhiko Asao, Kazuhisa Takahashi: Writing - review & editing.

Acknowledgments

Dr. Xu received Japan-China Sasakawa Medical Fellowship from the Sasakawa Memorial Health Foundation.

Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of the *JTO Clinical and Research Reports* at www.jtocrr.org and at <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2022.100309>.

References

- Sharma P, Allison JP. Dissecting the mechanisms of immune checkpoint therapy. *Nat Rev Immunol.* 2020;20:75-76.
- Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;378:2078-2092.
- Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;379:2040-2051.
- Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. NCCN Guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021;19:254-266.
- Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017;376:2415-2426.
- Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387:1540-1550.
- Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;393:1819-1830.
- Dolladille C, Ederhy S, Sassi M, et al. Immune checkpoint inhibitor rechallenge after immune-related adverse events in patients with cancer. *JAMA Oncol.* 2020;6:865-871.
- Giaccone G, Felip E, Cobo M, et al. 120MO Activity of OSE-2101 in HLA-A2+ non-small cell lung cancer (NSCLC) patients after failure to immune checkpoint inhibitors (ICI): Step 1 results of phase III ATALANTE-1 randomised trial. *Ann Oncol.* 2020;31(suppl):S814-S815.
- Leal TA, Berz D, Rybkin I, et al. 1191O MRTX-500: phase II trial of sitravatinib (sitra) + nivolumab (nivo) in patients (pts) with non-squamous (NSQ) non-small cell lung cancer (NSCLC) progressing on or after prior checkpoint inhibitor (CPI) therapy. *Ann Oncol.* 2021;32(suppl):S949.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6:e1000097.
- Wells GA, Shea B, O'Connell D, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. The Ottawa Hospital. http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp. Accessed January 20, 2022.
- Bernard-Tessier A, Baldini C, Martin P, et al. Outcomes of long-term responders to anti-programmed death 1 and anti-programmed death ligand 1 when being rechallenged with the same anti-programmed death 1 and anti-programmed death ligand 1 at progression. *Eur J Cancer.* 2018;101:160-164.

14. Fujita K, Uchida N, Kanai O, Okamura M, Nakatani K, Mio T. Retreatment with pembrolizumab in advanced non-small cell lung cancer patients previously treated with nivolumab: emerging reports of 12 cases. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;81:1105-1109.
15. Niki M, Nakaya A, Kurata T, et al. Immune checkpoint inhibitor re-challenge in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2018;9:32298-32304.
16. Santini FC, Rizvi H, Plodkowski AJ, et al. Safety and efficacy of re-treating with immunotherapy after immune-related adverse events in patients with NSCLC. *Cancer Immunol Res*. 2018;6:1093-1099.
17. Fujita K, Uchida N, Yamamoto Y, et al. Retreatment with anti-PD-L1 antibody in advanced non-small cell lung cancer previously treated with anti-PD-1 antibodies. *Anticancer Res*. 2019;39:3917-3921.
18. Watanabe H, Kubo T, Ninomiya K, et al. The effect and safety of immune checkpoint inhibitor rechallenge in non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49:762-765.
19. Mouri A, Kaira K, Yamaguchi O, et al. Clinical difference between discontinuation and retreatment with nivolumab after immune-related adverse events in patients with lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;84:873-880.
20. Fujita K, Yamamoto Y, Kanai O, et al. Retreatment with anti-PD-1 antibody in non-small cell lung cancer patients previously treated with anti-PD-L1 antibody. *Thorac Cancer*. 2020;11:15-18.
21. Gobbi E, Toffart AC, Pérol M, et al. Immune checkpoint inhibitors rechallenge efficacy in non-small-cell lung cancer patients. *Clin Lung Cancer*. 2020;21:e497-e510.
22. Herbst RS, Garon EB, Kim DW, et al. Long-term outcomes and retreatment among patients with previously treated, programmed death-ligand 1-positive, advanced nonsmall-cell lung cancer in the KEYNOTE-010 study. *J Clin Oncol*. 2020;38:1580-1590.
23. Katayama Y, Shimamoto T, Yamada T, et al. Retrospective efficacy analysis of immune checkpoint inhibitor rechallenge in patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Med*. 2019;9:102.
24. Kitagawa S, Hakoziaki T, Kitadai R, Hosomi Y. Switching administration of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies as immune checkpoint inhibitor rechallenge in individuals with advanced non-small cell lung cancer: case series and literature review. *Thorac Cancer*. 2020;11:1927-1933.
25. Furuya N, Nishino M, Wakuda K, et al. Real-world efficacy of atezolizumab in non-small cell lung cancer: a multicenter cohort study focused on performance status and retreatment after failure of anti-PD-1 antibody. *Thorac Cancer*. 2021;12:613-618.
26. Takahara Y, Tanaka T, Ishige Y, et al. Efficacy and predictors of rechallenge with immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2022;13:624-630.
27. Xu Z, Hao X, Yang K, et al. Immune checkpoint inhibitor rechallenge in advanced or metastatic non-small cell lung cancer: a retrospective cohort study [e-pub ahead of print]. *J Cancer Res Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03901-2>. Accessed January 20, 2022.
28. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209-249.
29. Simonaggio A, Michot JM, Voisin AL, et al. Evaluation of readministration of immune checkpoint inhibitors after immune-related adverse events in patients with cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5:1310-1317.
30. Zhao Q, Zhang J, Xu L, et al. Safety and efficacy of the rechallenge of immune checkpoint inhibitors after immune-related adverse events in patients with cancer: a systemic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2021;12:730320.
31. Ricciuti B, Genova C, De Giglio A, et al. Impact of immune-related adverse events on survival in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with nivolumab: long-term outcomes from a multi-institutional analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145:479-485.
32. Das S, Johnson DB. Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2019;7:306.
33. Inno A, Roviello G, Ghidini A, et al. Rechallenge of immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;165:103434.
34. Haanen J, Ernstoff M, Wang Y, et al. Rechallenge patients with immune checkpoint inhibitors following severe immune-related adverse events: review of the literature and suggested prophylactic strategy. *J Immunother Cancer*. 2020;8:e000604.
35. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov*. 2018;8:1069-1086.
36. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:908-918.
37. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:375-384.

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)評価書

課程博士：指導教官用



第 42 期

研究者番号： G4209

作成日： 2023 年 3 月 10 日

氏名	和 晋渝	He Jinyu	性別	F	生年月日	1985.05.04
所属機関(役職)	重慶市疾病予防控制中心公共衛生与安全観測所(主治医師)					
研究先(指導教官)	長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科(Lina Madaniyazi 助教)					
研究テーマ	温度関連の死亡率に対する都市ヒートアイランドの影響 The impact of urban heat island on temperature-related mortality					
専攻種別	<input type="checkbox"/> 論文博士			<input checked="" type="checkbox"/> 課程博士		

研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	優 学業成績係数=	取得単位数
		取得単位数/取得すべき単位数総数 16/16
学生本人が行った 研究の概要	With a global warming climate, public health threat related with heat has been exacerbated in urban areas due to the Urban Heat Island (UHI) effect. In this study, the student aims to assess and project the impact of UHI on heat-related mortality in Tokyo Metropolitan Area (TMA) under a changing climate. The student collected daily time series data on temperature and mortality, applied a time-series regression with distributed lag non-linear functions, and assessed the excess heat-related mortality in association with UHI under several scenarios. The results for TMA suggest that future burden of UHI on heat-related mortality is likely to increase due to the warming climate. This indicates that the urgent need for the development of public strategies to mitigate UHI impacts on heat-related mortality.	
総合評価	【良かった点】 <ul style="list-style-type: none"> The student works very hard and is always eager to learn new knowledge and skills. - Her research topic requires a good knowledge in epidemiology and statistics and a strong skill in data analysis. She has finished data analysis quickly and summarized the results in a good manner. - In addition, she is always reading literatures and books to update her knowledge in research. The student also has a strong communication skill, which enables her to discuss her research and work smoothly with other students and researchers. 	
	【改善すべき点】 <p>During the last two years, the student has been working hard to improve her presentation skills. I would recommend the student continue working on this in her next career.</p>	
	【今後の展望】 <p>I'm impressed by the student's strong motivation in research and learning abilities. On top of that, the student has shown her strong communication skills to work in a team. Thus, I believe the student will become a strong, independent, and responsible researcher in the future who would contribute to the research collaborations and communications between China and Japan.</p>	
学位取得見込	Ph. D.	
評価者(指導教官名) Lina Madaniyazi		

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)報告書 研究者用



第42期

研究者番号: G4209

作成日: 2023年3月 07 日

氏名	和 晋渝	He Jinyu	性別	F	生年月日 1985. 05. 04
所属機関(役職)	重慶市疾病予防控制中心公共衛生与安全観測所(主治医師)				
研究先(指導教官)	長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科(Lina Madaniyazi助教)				
研究テーマ	温度関連の死亡率に対する都市ヒートアイランドの影響 The impact of urban heat island on heat-related mortality				
専攻種別	論文博士	<input type="checkbox"/>	課程博士	<input checked="" type="checkbox"/>	

1. 研究概要(1)

1) 目的(Goal)

This study aims to assess and project the impact of urban heat island (UHI) on heat-related mortality in the Tokyo Metropolitan Area, Japan.

The specific objectives are to:

- a) Quantify UHI intensity and define UHI-anomaly zones
- b) Estimate the impacts of the UHI on temperature-related mortality
- c) Project the excess deaths due to the UHI under climate change scenarios

2) 戦略(Approach)

We quantified the UHI intensity using municipality-specific UHI-anomaly (UHIIa) and classified them into decile zones. And then, we investigated the temperature-mortality association for each UHIIa zone and then assessed its association with the UHIIa zone. We estimated the heat-attributable mortality due to UHI effect under one factual and one counterfactual scenario in the past. Finally, we projected the heat-related excess death due to UHI under two climate change scenarios with two different assumptions on UHI and adaptation in the future.

3) 材料と方法(Materials and methods)

Data collection

We collected daily mean and maximum air temperature at a 1-km grid resolution from Agro-Meteorological Grid Square Data (AMGSD) between 2010 and 2019. Individual all-cause mortality records defined in the International Classification of Diseases Tenth Revision (ICD-10) were collected from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (MHLW).

Data analysis

First, we quantified the UHI intensity using anomalies from the TMA average of daily mean temperature at the municipality level. We defined ten UHIIa zones by the decile of distribution of municipality-specific UHI-anomaly (UHIIa).

Next, the temperature-mortality association was estimated based on a space-time stratified case-crossover design (Wu et al., 2021) for each zone, and then its association with the UHIIa was investigated using a linear mixed-effect model (Sera et al., 2019) with and without adjusting for other confounders. We estimated the heat-attributable mortality due to UHI effect under one factual and one counterfactual scenario in the past. The difference between scenarios was considered as the contribution of UHI to heat-related excess death.

Finally, we projected the excess death due to heat under two climate change scenarios for each UHIIa zone, by allowing for two different assumptions on UHI and adaptation in the future. The difference under each climate change scenario was interpreted as the future impact of UHI on heat-related excess death.)

1. 研究概要(2)

4) 実験結果(Results)

The mean UHI_a ranged from $-2.80\text{ }^\circ\text{C}$ in Zone 1 to $1.29\text{ }^\circ\text{C}$ in Zone 10. The RR for heat ranged from 1.012 (95% CI: 0.987,1.037) to 1.042 (95% CI: 1.028,1.057). A $1\text{ }^\circ\text{C}$ increase in mean UHI_a was associated with an increase of 0.005 (95% CI: $-0.001,0.011$) in heat-related log-RR, which was 0.018 (95% CI: 0.002 to 0.034) after the full adjustment of all the other confounders. The heat-related excess death attributable to UHI was 12735.5 (95% empirical CI [eCI]: 8089.8,17131.2) in TMA, corresponding to around 0.42% (95% eCI: 0.26,0.56) of all deaths between 2010 and 2019. Under the pessimistic scenario, heat-related attributable fraction in TMA is projected to increase from 0.76% (95% eCI: 0.44,1.24) in the 2010s to 2.04% (95% eCI: 1.19,3.05) in the 2090s, and the contribution of UHI to the increase ranged from 0.52% (95% eCI: 0.33,0.77) to 1.02% (95% eCI: 0.67,1.40). Under the optimistic scenario, heat-related AF in TMA is projected to increase from 0.76% (95% eCI: 0.45, 1.18) in the 2010s to 0.99% (95% eCI: 0.62, 1.38) in the 2090s, and the contribution of UHI to the increase ranged from 0.28% (95% eCI: $-0.41,1.03$) to 0.40% (95% eCI: $-0.39,1.26$).

5) 考察(Discussion)

A higher mean UHI_a was associated with higher heat risk, however it was not strongly associated with MMT and MMTP. More heat-related deaths were caused by UHI in zones with higher UHI_a mean temperatures. Future burden of UHI on heat-related mortality is likely to increase due to the warming climate, even assuming full adaptation. This indicates that the urgent need for the development of public strategies to mitigate UHI impacts on heat-related mortality.

6) 参考文献(References)

SERA, F., ARMSTRONG, B., BLANGIARDO, M. & GASPARRINI, A. 2019. An extended mixed-effects framework for meta-analysis. *Statistics in Medicine*, 38, 5429-5444.

WU, Y., LI, S. & GUO, Y. 2021. Space-time-stratified case-crossover design in environmental epidemiology study. *Health Data Science*, 2021.

2. 執筆論文 Publication of thesis ※記載した論文を添付してください。Attach all of the papers listed below.

論文名 1 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						
論文名 2 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						
論文名 3 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						
論文名 4 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						
論文名 5 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						

3. 学会発表 Conference presentation ※筆頭演者として総会・国際学会を含む主な学会で発表したものを記載してくだ

※Describe your presentation as the principal presenter in major academic meetings including general meetings or international me

学会名 Conference	The East Asia Science and Innovation Area Joint Research Program (e-ASIA JRP)			
演題 Topic	The impact of urban heat island on temperature-related mortality			
開催日 date	2022 年 2 月 18 日	開催地 venue	online	
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				
学会名 Conference	Assessing Impact of Climate Change and Air Pollution - Challenges and Insights			
演題 Topic	The impact of urban heat island on heat-related mortality			
開催日 date	2023 年 2 月 17 日	開催地 venue	Nagasaki	
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				
学会名 Conference				
演題 Topic				
開催日 date	年 月 日	開催地 venue		
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				
学会名 Conference				
演題 Topic				
開催日 date	年 月 日	開催地 venue		
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				

4. 受賞(研究業績) Award (Research achievement)

名称 Award name	国名 Country	受賞年 Year of	年 月
名称 Award name	国名 Country	受賞年 Year of	年 月

5. 本研究テーマに関わる他の研究助成金受給 Other research grants concerned with your research theme

受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
助成金名称 Grant name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円
受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
助成金名称 Grant name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

受給実績 Receipt record	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	Nagasaki University Student Education Support Division
奨学金名称 Scholarship name	Nagasaki University Special Research Scholarship
受給期間 Supported period	2022 年 10 月 ~ 2023 年 3 月
受給額 Amount received	300,000 円

7. 研究活動に関する報道発表 Press release concerned with your research activities

※記載した記事を添付してください。Attach a copy of the article described below

報道発表 Press release	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	発表年月日 Date of release	
発表機関 Released medium			
発表形式 Release method	・新聞 ・雑誌 ・Web site ・記者発表 ・その他()		
発表タイトル Released title			

8. 本研究テーマに関する特許出願予定 Patent application concerned with your research theme

出願予定 Scheduled	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	出願国 Application	
出願内容(概要) Application contents			

9. その他 Others

--

指導責任者(記名) Lina Madaniyazi

Dissertation Summary

Title The impact of urban heat island on heat-related mortality

Supervisors Assistant Prof. Lina Madaniyazi
Prof. Masahiro Hashizume
Prof. Yasushi Honda
Assistant Prof. Ai Milojevic

Department of Global Health Doctoral Programme
School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University

Admission October 2020

Name Jinyu He

BACKGROUND With a warming climate, public health threat related to heat has been exacerbated in urban areas due to the Urban Heat Island (UHI) effect (higher temperature in cities compared with surrounding rural or suburban areas). However, few studies have attempted to estimate the UHI effect on heat-related mortality.

OBJECTIVES To assess the current and future impact of UHI on heat-related mortality in the Tokyo Metropolitan Area (TMA), Japan, in the context of climate changes.

METHODS I collected daily time series data on mean ambient temperature and all-cause mortality from 2010 to 2019 for 242 municipalities in the TMA. I quantified the UHI intensity using the municipality specific UHI anomaly (UHIA) and classified them into decile zones. I examined the heat-related mortality for each UHIA zone and then assessed its association with the UHIA. The UHI-attributable deaths were examined by comparing the observed UHI-related mortality with that under an assumption of no UHI effect in the past for the TMA. Next, I estimated the number of heat-related deaths under climate change scenarios (RCP 2.6 and 8.5) for each UHIA zone by allowing for two assumptions on UHI

in the future. In relation to every climate change scenario examined, the difference with and without UHI effect was interpreted as the future impact of UHI on heat-related deaths.

RESULTS Approximately 4°C difference in mean temperature between Zone 1 and Zone 10 was observed in the TMA. The zone-specific UHI_a ranged from -2.80°C in Zone 1 to 1.29°C in Zone 10. A 1°C increase in mean UHI_a was associated with a relative increase of 1.018 (95% confidence interval (CI): 1.002 to 1.034) in heat-related relative risk (RR) after the full adjustment of all the other confounders. The UHI-attributable deaths was 12736 (95% empirical confidence interval (eCI): 8090, 17131) in the TMA), corresponding to over 72% of heat-related deaths. In the future, UHI-attributable deaths between the 2010s and 2090s was projected to increase from 16198 (95% eCI: 10496, 22882) to 19084 (95% eCI: 12681, 25805) under RCP 2.6 and from 15804 (95% eCI: 10012, 23432) to 31038 (95% eCI: 20441, 42594) to under RCP 8.5.

CONCLUSIONS Our findings suggest the UHI contributes to heat-related mortality in the TMA, and its impact is projected to increase under a warming climate. The UHI appears to have nonnegligible impacts on the projected heat-attributable health burden in the TMA, Japan. Further research is required to investigate the potential impacts of UHI on health and develop mitigation measures within the context of climate change scenarios, aiming to address and alleviate this crucial aspect.

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)評価書

課程博士：指導教官用



第 43 期

研究者番号： G4303

作成日： 2023 年 3 月 10 日

氏名	姚利	Yao Li	性別	F	生年月日	1990. 11. 20
所属機関(役職)	千葉大学大学院 看護学研究科看護学専攻(大学院生)					
研究先(指導教官)	千葉大学大学院 看護学研究院(正木 治恵教授)					
研究テーマ	在留中国人高齢者を介護する家族支援プログラムの開発 Development of a support program for elderly Chinese residents' family caregivers in Japan					
専攻種別	<input type="checkbox"/> 論文博士			<input checked="" type="checkbox"/> 課程博士		

研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	<input checked="" type="checkbox"/> 優 <input type="checkbox"/> 良 <input type="checkbox"/> 可 <input type="checkbox"/> 不可 学業成績係数=	取得単位数
		12/12
学生本人が行った研究の概要	姚氏は、修士論文の研究を発展させ、博士後期課程において「在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発ービデオカンファレンスを活用してー」と題する研究に取り組んだ。開発した教育プログラムは、在留中国人高齢者の要介護生活の送り方に関する認識の広がりや老後の生活の方向性の明確化を促すなど要介護生活に焦点を当てた老いへの準備に有用であること、また、ビデオカンファレンスを活用したプログラムは便利で参加しやすく、参加者の経験を共有しつつ多様な意見を交換できたことから、実現可能であることが確認できた。看護援助が十分に行き届かない在留中国人高齢者に対して、ビデオカンファレンスという新たな教育方法を用いた老いへの準備性を高めるプログラム開発は新規性があり、今後の普及が期待できる研究であると高く評価された。	
総合評価	【良かった点】 姚氏は、積極的に博士研究を遂行し、規程の3年間でやり遂げた。その過程で3本の論文を執筆・投稿している。また、研究能力向上のための研修を自ら探して受講したり、中国語と日本語に堪能であることからオリンピックの通訳なども担った。向上心を持ち、何事にも果敢にチャレンジする積極性は群を抜いている。明るい性格で、後輩育成に尽力するなど人望も厚い。	
	【改善すべき点】 様々なことにチャレンジするため、提出期限が定められているものに対して、ギリギリになることもある。好奇心旺盛であることは評価できるので、それを維持しつつ、期限を意識した計画的な遂行ができるとなお良いと思われる。	
	【今後の展望】 大学教員として必要な教育・研究能力を高め、博士課程で培った能力を人材育成と研究の発展に思う存分発揮してほしい。また、看護学分野での中国と日本の架け橋となり、両国の親交に寄与することを期待する。	
学位取得見込	2023年3月に博士(看護学)の学位を取得予定。	
評価者(正木治恵)		

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)報告書

研究者用



第43期

研究者番号: G4303

作成日: 2023年3月8日

氏名	姚 利	Yao Li	性別	F	生年月日	1990. 11. 20
所属機関(役職)	千葉大学大学院看護学研究科看護学専攻(大学院生)					
研究先(指導教官)	千葉大学大学院看護学研究院(正木治恵)					
研究テーマ	在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発ービデオカンファレンスを活用してー Development of an education program on aging-related preparation through videoconference for old Chinese migrants in Japan					
専攻種別	論文博士	<input type="checkbox"/>	課程博士	<input checked="" type="checkbox"/>		

1. 研究概要 (1)

1) 研究背景と目的

在留外国人高齢者の増加に伴い、要介護リスクが高い在留中国人高齢者も増えている。言語の障壁で日本の介護保険制度の認知度が低いことに加え、母国に介護保険制度はなく、高齢者の介護は外部の支援を得ず家庭内で担うといった文化の違いがある。そのため、要介護在留中国人高齢者及びその家族は、介護保険サービスの理解や利用に困難がある。老いに伴う「母国語がえり」現象(日本語の忘れが多く、母国語での会話が増えること)によって、専門職との意思疎通はさらに困難である。加えて、介護サービスの提供側も文化・言語の障壁があるため、外国人高齢者のニーズや意思の把握に困難を抱えている。そして、これから要介護生活を迎える在留中国人高齢者およびその家族が、いざとなったとき困難に陥らず自分が望んだ要介護生活や介護に関する意思を専門職に伝え、適時に専門的な支援を得るための準備が必要であると考えた。しかしながら、将来のケアニーズの予測困難、ケアに関する資源・情報の欠如、計画を組み立てる自信がないなどが将来のケアニーズの準備に影響を与えると報告されている。これらのことから、要介護生活に焦点を当てた老いへの準備教育支援が必要と考える。よって、本研究の目的は、ビデオカンファレンスを活用して要介護生活に焦点を当てた老いへの準備教育プログラムの開発とした。

2) 用語の定義

(1) 在留中国人高齢者

本研究では、中長期在留資格を持つ日本に住んでいる65歳以上の中国国籍を持つ者、日本の国籍を取得した華僑・華人と、長年に中国で生活していた中国残留邦人とする。

(2) 要介護生活に焦点を当てた老いへの準備性

加齢とともに心身が衰えることに起因した要介護状態に対して、介護が必要となる心身的健康状態・生活状態への理解や態度、社会資源の知識、要介護生活の準備に関する認識および自己意思表示の能力などを指す。

3) 戦略と方法

本研究は以下の2段階に構成された。

【研究1】要介護生活に焦点を当てた老いへの準備教育プログラムの作成

(1) 研究1-1: 教育プログラム原案の設計

システマティック・レビューを通して、中国国内および海外に在住する中国人高齢者の施設及び自宅での療養生活のあり様と課題を明らかにし、プログラム原案の内容を作成した。また、ジェロゴジ理論(高齢者の学習理論)を基盤として、教育プログラムの実施形態を設計し、教育プログラム原案を作成した。

(2) 研究1-2: 教育プログラム原案の妥当性の検討

勤務経験5年以上の看護学研究者3名と訪問看護師1名、ケアマネジャー1名に教育プログラム原案の資料(講義の動画と冊子)及び評価アンケートを送り、アンケートに回答した結果を踏まえて専門家会議を実施し、教育プログラム原案の妥当性を検討した。

【研究2】作成した教育プログラムの実現可能性と有用性の検討

この段階の研究デザインはpre-post testを用いた混合的研究法の説明的順次デザインであった。有用性は介入前後に中国語版の老いへの態度尺度(The Attitudes To Aging Questionnaire: AAQ)及び将来のケアニーズへの準備尺度(Preparation for Future Care Needs Scale-14: PFCN-14)の回答を通して検討した。実現可能性は介入中に各回授業の評価アンケートを回答した結果を踏まえて、参加経験に関するインタビューの実施を通して検討した。

研究実施にあたり、千葉大学大学院看護学研究院倫理審査委員会の承認を得ていた(承認番号: RN4-13, RN4-26)。

データ分析は単純集計と質的帰納的分析を実施した。

4) 結果

(1) 対象者の基本属性

本研究は首都圏のA県とB県、関西のC県から7組(14名)の研究対象者を募集した。夫婦関係のペアが6組であり、母と娘の親子関係のペアが1組であった。性別について、男性が6名で、女性が8名であった。年齢は53歳から84歳であり、平均年齢は74.9歳であった。在日年数は4年から40年であり、平均在日年数は27.1年であった。

(2) 参加経験の全体分析結果

個々対象者が語った参加経験の個別分析で得られた79枚の最終ラベルから、4段階の集めを経て、6つのカテゴリーが生成された。これらは【支援が得られる老後の生活環境を確かめた安心感】【健康で充実した日々と不確定な将来によって抑えられた老いへの準備姿勢】【老いや老後の生活に関する認識の広がりや啓発】【授業中に起こった老後の生活を備える認識や行動の変容】【オンライン授業のアクセスしやすさ】【自立と持病状況に影響された自己健康評価】であった。

(次のページに続く)

(3) 各回授業アンケートの分析結果

14名の対象者から6章分の授業評価アンケートを計84部（100%）回収した。アンケートは選択項目と自由記載欄を設けた。選択項目について、「4回目：今回の授業を通して、自宅や施設の介護サービスの利用を始めたい状況を述べるようになった」を「当てはまらない」と評価した対象者は1名であり、「授業中の音声の聞きやすさ」を「当てはまらない」と評価した対象者は2名があった。その他の評価項目はすべて「大体当てはまる」「かなり当てはまる」「非常に当てはまる」と評価された。自由記載欄のコメントは、質的帰納的分析を経て、次の6つのカテゴリーが生成された。これらは、「オンライン授業を参加するメリットと不便」「講義内容は実用性がある自分のニーズに満たした」「要介護生活への関心が高くなり、考えられるようになった」「将来の生活の予測困難」「講義内容と資料は多様性があり、わかりやすかった」「ビデオの活用と議論を加えることで、講義が豊かになり、講義内容をより深く理解でき、イメージしやすくなった」であった。

(4) 介入前後のAAQ及びPFCN-14の変化

14名の対象者からAAQ尺度とPFCN-14尺度は介入前後にわたって、計28部（100%）を回収した。その結果、介入後にAAQとPFCN-14の総点数が両方とも高くなった対象者は4名（28.6%）であり、いずれが高くなった対象者は9名（64.3%）であった。つまり、13名（92.9%）の対象者に老いへの態度や将来のケアニーズへの準備性の向上にポジティブな効果があった。また、9名（62.3%）の対象者に将来のケアニーズへの準備性の向上にポジティブな効果が見られた。AAQとPFCN-14尺度の各ドメインの変化について、AAQの心理的獲得ドメイン（78.6%）とPFCN-14の意識ドメイン（85.7%）にポジティブな変化が最も多かった。しかし、1名（7.1%）の対象者は老いへの態度および将来のケアニーズへの準備性にポジティブな効果が見えなかった。

5) 考察

【オンライン授業のアクセスしやすさ】「オンライン授業を参加するメリットと不便」という参加者の参加経験と授業評価のコメントがあった。Chenら（2016）は、高齢者に対してICTの活用は、社会とのつながり、興味がある活動の参加、ソーシャルサポートを得ることに効果があると報告している。在留中国人高齢者は文化や言語の違いから地域で開催される支援プログラムに参加しにくい上に、地域で中国人高齢者向け講座は少なく、各地域に散住している彼らを1つの地域に集めることは困難である。そこで、中国人高齢者が社会や他者とのつながる重要な手段となっているICTの活用が有効と考え、ビデオカンファレンスを活用して教育プログラムを開催した。ビデオカンファレンスの活用は、便利かつアクセスしやすく、高齢者にとって外出疲労の軽減や地域での支援を得にくい現状の改善に貢献できるため、在留中国人高齢学習者に良い学び場の提供に新規性があると考えられる。

一方、各回授業評価アンケートでは、「ビデオの活用と議論を加えることで、講義が豊かになり、講義内容をより深く理解でき、イメージしやすくなった」というコメントが多く見られた。ジェロゴジーという高齢者学習援助理論では、ライフスパンに渡って重ねてきた経験は高齢者の学習に貢献できるため、高齢者の人生経験を活用できる学習セッションを設ける必要性が述べられている（John, 1988）。本研究はジェロゴジー理論を基盤として教育プログラムの実施形態を検討し開発した。教育プログラムの実施では、講義内容をスライドに示しながら、講義内容を伝えるビデオや写真を活用した。また、講義後に参加者間の議論も設けた。議論では老後の生活と老いの経験について多様な意見を交換でき、要介護生活の理解を深めることと認識の広がり促した。その理由は、在留中国人高齢者にとって、これから迎える要介護生活は未経験であり、周りに参考となるケースも少ない。議論では、同じ背景がある参加者が講義内容と自身の状況に合わせて個々の意見や経験を共有し、現実的な事例を提供していた。対象者は議論を通して、今経験している高齢期の生活及び将来の要介護生活の計画に参考となる新たなアイデアや情報入手でき、講義内容を深く理解することに促しうると言える。また、講義中のビデオや写真の活用は、授業中に挙げられた事例をリアルに示され、授業内容のイメージしやすさと理解の深さにつながった。よって、本研究で開発した教育プログラムは在留中国人高齢者にとって実現可能であり、ジェロゴジー理論は中国人高齢者にとって効果的な学習援助方法であると考えられる。

毎回事業評価アンケートの回収結果では、授業内容を「実用性がある自分のニーズに満たした」「将来に役に立つ」と高く評価された。また、彼らが語った参加経験から【支援が得られる老後の生活環境を確かめた安心感】というカテゴリーが生成された。堀（2012）は、60代より70代以上の高齢者は「老後」や「老後の生き方」に関する内容の学習要求率が比較的に高いと報告している。本研究に参加した14名の対象者の平均年齢は74.9歳であり、そのうち、後期高齢者は11名であった。教育プログラムの内容は要介護生活に焦点を当てた学習であり、老いの自覚症状を経験している対象者自身の状況に強く関連し、在留中国人高齢者の学習ニーズに満たし、将来、日本での老後の生活を安心して送ることに寄与できると言える。

介入後のAAQやPFCN-14のいずれかがポジティブになった対象者は9割弱であり、老いへの準備意識が強まった対象者は8割強だった。また、彼らの参加経験では、【老いや老後の生活に関する認識の広がりと啓発】【授業中に起こった老後の生活を備える認識や行動の変容】というカテゴリーがあった。春日（2018）は「老いの支度」を高齢期で生じる様々なリスクを最小限にとどめるために、まだ判断力や自己決定力がある元気な間に、必要な福祉や医療・介護に関する制度的知識や情報収集、対処方法を学び、暮らしのあり方や人間関係を組み替え、自分自身の将来のために自ら備える活動であると定義し、さらに、高齢者はその支度に着手する必要性を主張している。しかし、一般的な高齢者はその支度について、何をどのように備えるのかはわからないと述べられている。本研究で開発した教育プログラムの内容は老いに伴う変化、自宅及び施設での療養生活のあり様、日本における介護保険制度、老いへの準備の必要性、要介護生活の計画が含まれた。教育プログラムの参加を通して、老後の生活の変移、要介護生活のイメージ付き及びその準備の方向性が明瞭になったから、対象者の将来のケアニーズの準備性の向上に見られたと言える。これらのことから、本研究で開発した教育プログラムは一般市民向けの講座として開催し、地域に在住する元気な中国人高齢者の生涯学習に期待できる。また、保健や福祉に関する行政や医療の専門職にとって、在留中国人高齢者の老いへの準備の支援策の検討に貢献できると考えられる。

7) 参考文献

- Chen, Y.-R. R. (2016). The Effect of Information Communication Technology Interventions on Reducing Social Isolation in the Elderly: A Systematic Review. *Journal of medical Internet research*, 18(1), e18.
<https://doi.org/10.2196/jmir.4596>
- John, M. T. (1988). *Geragogy: a theory for teaching the elderly*. Haworth Press.
- 堀薫夫. (2012). 教育老年学と高齢者学習. 学文社.
- 春日キスヨ. (2018). 百まで生きる覚悟：超長寿時代の「身じまい」の作法. P101, 光文社.

1. 研究概要 (2)

1) 研究題名

在留中国人高齢者の健康に関する思い -中国人が集まる地域活動に参加する対象者に焦点を当てて- (投稿論文一原著)

2) 目的

中国人が集まる地域活動に参加する在留中国人高齢者を対象に異国在住での健康に関わる経験の調査を通して、彼らの健康に関する思いを明らかにすることである。

2) 用語の定義

(1) 在留中国人高齢者: 中長期在留資格を持ち日本に住む65歳以上の中国国籍を持つ人, 日本の国籍を取得した華僑, 華人と, 中国で生まれ50年以上中国で生活していた中国残留孤児とする。

(2) 健康に関する思い: 日本に住んでいることの影響を含めた, 自分自身の身体的・精神的・社会的健康及びそれに関連する受診や健康増進について感じる事・希望すること・気にかけて考えを持つことやその内容とする。

3) 研究方法

(1) 対象者および募集方法

対象者は, 本研究で定義する在留中国人高齢者とした。ただし, 認知機能障害を持つ者は除外した。首都圏都市部にある公民館およびコミュニティーセンター, 中国語対応が可能な施設で対象者を募集した。また, 対象者の多様性を確保するため, 雪だるま式募集方法を併用した。

(2) データ収集期間

2019年3月~10月

(3) 調査方法

調査はインタビューガイドを用いて対象者に半構造化面接を1~3回, 1回60分を目安に行った。面接内容は, 対象者の同意を得てICレコーダーに録音し, 逐語録を作成した。個別面接で使用した言語は対象者の希望に沿い, 中国語とした。

(4) 調査内容

調査内容は対象者の基礎情報と健康に関する思いや考えとした。先行研究を参考に, インタビューガイドを作成した。基礎情報は年齢, 収入, 家族構成, 学歴, 在留年数とした。

インタビューガイドの内容は, 在留外国人の健康阻害要因と健康に関する異文化体験に関する先行研究 (Jiang, 2016; 中嶋, 2015; 平野, 2003) を参考に, 在留期間中の受診経験, 日常生活の過ごし方, 健康増進方法, 今後の生活や健康上の心配や希望, 日本語の自己評価理由についてどのような考えや思いを持っているかを含めた。

(5) 分析手法

対象者の基礎情報と日本語能力の自己評価は記述的統計学で分析した。面接データは質的帰納的に分析した。本研究の対象者は社会的・文化的背景に強く影響を受け, 個性が高いと考え, 個々の事例が持つ個性・独自性を把握できる質的統合法 (KJ法) (山浦, 2012) を参考にした。

4) 倫理的配慮

本研究は, 千葉大学大学院看護学研究科倫理審査委員会の承認と対象者が活用する組織や施設の承認を得て実施した (承認番号30-97)。

5) 結果

(1) 対象者の概要

本研究の対象者は男性5名, 女性8名の計13名であった。対象者全員が首都圏在住であった。在留年数は, 5年から30年以上であり, 平均22.8年であった。10名の対象者は日本の病院を受診した経験があった。対象者は生活支援金や中国あるいは日本の年金で生活を送っていた。日本語能力の自己評価について, 日常会話, 医療会話が「まあ良い」と評価した対象者はそれぞれ5名と7名であったが, 日本人の友人を持ち, 主に日本人で構成されたメンバーでの活動に定期的に参加する人は1名だけだった。対象者は全員中国人が集まる活動や中国人向け地域活動に参加していた。

(2) 健康に関する思い

全体分析結果は, テーマを【 】, サブテーマを〈 〉で示す。全体分析結果は80枚の各個別分析の最終ラベルを素材とし, 類似性に沿って統合し, 以下の8つのテーマ, 16のサブテーマを生成した。

【身体機能や精神状態から主観的に健康の良し悪しを評価している】

これは健康状態の評価に関する思いであり, 〈病弱による良くない自己健康評価〉と〈老いを感じながらも良い自己健康評価〉が含まれた。

【安全で便利な社会に住むことを安心だと感じている】

これは自分にとって, 困難がなく医療機関を利用でき, 安全で便利な社会環境に住んでいることに安心しているという〈自分にとって安心できる住む環境〉に関する思いであった。

(次のページに続く)

- 【他者の支援を受けることで安心して生活できている】
これは、他者の支援に関する思いであり、〈支援された生活〉、〈助けを求める生活〉と〈助けを求める対象がいない大変さ〉が含まれた。
- 【老いを受け止めて前向きに生きている】
これは老いの受容に関する思いであり、〈余生への希望〉と〈前向きな生き方〉を含んでいた。
- 【言葉の壁で生活は制限されたが中国人との関わりや趣味を通して気楽に生活している】
これは、言葉の壁があり日本人とのコミュニケーションが難しいことによる制限された生活の中で、中国人との関わりや趣味を通して、社会とのつながりを作り、気楽に生活しているという、〈制限された生活の中での楽しさ〉に関する思いであった。
- 【家族で互いに支える生活を継続したい】
これは家族関係への思いであり、〈子供に迷惑をかけたくない〉と〈家族の支え〉を含んでいた。
- 【良い医療サービスをうまく利用できるので安心して】
これは、医療サービスの利用に関する思いであり、〈心配のない医療サービス〉と〈言語の壁に影響された受診〉を含んでいた。
- 【健康を維持するため中医学に基づき自主的に健康管理をしている】
これは、中医学に基づいた健康管理に関する思いであり、〈健康情報の入手〉〈中医学に基づく健康促進〉と〈総合的な健康管理〉を含んでいた。

6) 考察

本研究では、中国人が集まる地域活動に参加する在留中国人高齢者に焦点を当てた8つの健康に関する思いを明らかにした。高齢期の発達課題や、言葉による制限、中国文化に影響された思いが含まれていた。本研究は、高齢期の発達課題や、言語による制限、儒教思想や中医学の影響から対象者の特徴を考察する。

(1) 高齢期の発達課題に影響した健康に関する思い

【身体機能や精神状態から主観的に健康の良し悪しを評価している】【安全で便利な社会に住むことを安心だと感じている】【他者の支援を受けることで安心して生活できている】【老いを受け止めて前向きに生きている】という思いは高齢期に直面する健康や生活の変化に関連していた。

対象者は健康上の変化に適応するために身体・精神面の状態をとらえると同時に、生活上の支援や居心地のよい便利な住まい環境を整えていた。対象者らは高齢期における変化への対応を踏まえて、加齢に伴う現状を受容していたと考える。健康の衰退に適応し、生活を満足におくれるように（住まいを）準備することや、自分の人生の受容は高齢期の発達課題として挙げられている。本研究の対象者は健康の衰退およびそれによって変化した現状への適応は、異国での老後の生活の中で、高齢期の発達課題に直面しつつ発達し続けていると考えられる。

(2) 言葉による制限が影響した健康に関する思い

【言葉の壁で生活は制限されたが中国人との関わりや趣味を通して気楽に生活している】【良い医療サービスをうまく利用できるので安心して】という思いは言葉の制限が社会活動の参加と医療機関の利用に関連したことを示した。

本研究の対象者が居住する首都圏都市部では、在留中国人高齢者が多く、中国人が自発的に集まる活動や外国人向けの活動がさかんであった。そこでは交通が便利で、高齢者に対する交通費の公的な補助制度があるため、中国人が集まる活動にアクセスしやすいと考える。一方、本研究の対象者は、老いに伴う身体機能や記憶力の衰えによって外出が制限され、日本語を忘れることが増えた実感から、今後も療養生活を自宅で送ることを希望していた。今後自宅で療養生活を送る在留中国人高齢者が増えると推測されるため、医療・福祉分野における専門的通訳ボランティアの養成やICTを活用して遠方から通訳を受ける仕組みづくりなど、医療サービスにアクセスしやすい環境の整備が必要であると考えられる。

(3) 儒教思想や中医学に影響される健康に関する思い

【家族で互いに支える生活を継続したい】【健康を維持するため中医学に基づき自主的に健康管理をしている】という思いは中国文化に影響していた。

本研究の対象者の健康に関する思いには、子は親の面倒を見るべきであり、できる限り健康に生きることで子供の負担を軽減しようとする親としてのあり方が反映された中国の伝統的な親子関係が継承されており、それは対象者の老後生活の希望、健康を維持する意欲につながっていたと考える。また、在留中国人高齢者では、移住後の生活においても中医学の影響が継続しており、ケアを提供する際は、健康への対処方法に中医学が根づいていることを理解する必要がある。中医学の健康促進方法の特徴や効果を考慮して食生活や運動習慣などにケアに活かすことは、彼らにとって馴染みがある継続可能な支援となると考える。

7) 結論

在留中国人高齢者においては、高齢期の発達課題や、中国文化、言葉の壁が彼らの健康に関する思いに影響を与えていることが明らかとなった。言葉による制限や母国文化の継承は彼らの安心感や、健康促進、老後生活の希望に強く影響を及ぼすため、言葉の壁を取り除く環境整備や彼らに馴染んだ文化や健康促進方法に基づいたケアの提供の重要性が示唆された。

8) 参考文献

- (1) Jiang Y, Huang CY, Yoon H, et al. (2016). Correlates of Self-Rated Health and Self-Rated Mental Health in Older Chinese Americans. Soc Work Public Health, 31(4), 309-315.
- (2) 中嶋知世, 大木秀一 (2015). 外国人住民における健康課題の文献レビュー. 石川看護雑誌, 12, 93-104.
- (3) 平野裕子 (2003). 在日外国人の身体的・精神的健康 保健学・看護学的視点から. 福岡医学雑誌, 94(8), 241-249.
- (4) 山浦晴男 (2012). 質的統合法入門 : 考え方と手順. 医学書院.

2. 執筆論文 Publication of thesis ※記載した論文を添付してください。Attach all of the papers listed below.

論文名 1 Title	在留中国人高齢者の健康に関する思い — 中国人が集まる地域活動に参加する対象者に焦点を当てて —					
掲載誌名 Published journal	文化看護学会誌(原著)					
	2022 年 5 月	14(1) 巻(号)	21 頁 ~ 30 頁	言語 Language	日本語	
第1著者名 First author	姚利	第2著者名 Second author	石井優香	第3著者名 Third author	山崎由利亜	
その他著者名 Other authors	石橋みゆき,正木治恵					
論文名 2 Title	日本に長期在住する中国人高齢者の健康管理—地域で自立した生活を送る1事例の語りより—					
掲載誌名 Published journal	日中医学(一般投稿)					
	2023 年 2 月	37(4) 巻(号)	26 頁 ~ 32 頁	言語 Language	日本語/中国語	
第1著者名 First author	姚利	第2著者名 Second author	石井優香	第3著者名 Third author	正木治恵	
その他著者名 Other authors	無					
論文名 3 Title	Older Chinese people's experiences of relocation to long-term care facilities: A literature review of qualitative studies					
掲載誌名 Published journal	Journal of International Nursing Research(査読中)					
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language	英語	
第1著者名 First author	Li Yao	第2著者名 Second author	Harue Masaki	第3著者名 Third author	無	
その他著者名 Other authors	無					
論文名 4 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 5 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						

3. 学会発表 Conference presentation ※筆頭演者として総会・国際学会を含む主な学会で発表したものを記載してくだ

※Describe your presentation as the principal presenter in major academic meetings including general meetings or international me

学会名 Conference	World Academy of Nursing Science The 7th International Nursing Research Conference of WANS		
演題 Topic	Chinese older adults' perspective of home care: A systematic review of qualitative studies(査読あり)		
開催日 date	2022 年 10 月 18~19 日	開催地 venue	Taiwan
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input checked="" type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Yang Huiching; Masaki Harue; Zhou Wei		
学会名 Conference	第14回文化看護学会学術集会		
演題 Topic	中国人高齢者の施設での療養生活に関する認識 ―文献検討を通して―(査読あり)		
開催日 date	2022 年 3 月 12 日	開催地 venue	栃木県下野市
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input checked="" type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	正木治恵		
学会名 Conference	日本老年看護学会 第28回学術集会 合同開催 第33回 日本老年学会総会		
演題 Topic	在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの有用性の検討(採択)(査読あり)		
開催日 date	2023 年 6 月 16~18 日	開催地 venue	日本・横浜
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input checked="" type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	正木治恵、呉小玉		
学会名 Conference	International Association of Gerontology & Geriatrics(IAGG) Asia/Oceania Regional Congress 2023		
演題 Topic	Verification of the feasibility of an education program on aging-related preparation through videoconferences for old Chinese migrants in Japan(査読中)		
開催日 date	2023 年 6 月 12~15 日	開催地 venue	Japan/Yokohama
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Masaki Harue		

4. 受賞(研究業績) Award (Research achievement)

名称 Award name	国名 Country	受賞年 Year of	年	月
名称 Award name	国名 Country	受賞年 Year of	年	月

5. 本研究テーマに関わる他の研究助成金受給 Other research grants concerned with your research theme

受給実績 Receipt record	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	文化看護学会
助成金名称 Grant name	2021年度文化看護学会研究助成金
受給期間 Supported period	2022 年 1 月 ~ 2024 年 12 月
受給額 Amount received	100,000 円
受給実績 Receipt record	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	公益財団法人 在宅医療助成 勇美記念財団
助成金名称 Grant name	2021年度在宅医療助成(後期)一般公募「在宅医療研究への助成」
受給期間 Supported period	2022 年 3 月 ~ 2024 年 3 月
受給額 Amount received	885,396 円

6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
奨学金名称 Scholarship name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

7. 研究活動に関する報道発表 Press release concerned with your research activities

※記載した記事を添付してください。Attach a copy of the article described below

報道発表 Press release	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	発表年月日 Date of release	
発表機関 Released medium			
発表形式 Release method	・新聞 ・雑誌 ・Web site ・記者発表 ・その他()		
発表タイトル Released title			

8. 本研究テーマに関する特許出願予定 Patent application concerned with your research theme

出願予定 Scheduled	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	出願国 Application	
出願内容(概要) Application contents			

9. その他 Others

--

指導責任者(記名) 正木治恵

原著論文

在留中国人高齢者の健康に関する思い — 中国人が集まる地域活動に参加する対象者に焦点を当てて —

Health Perspective of Elderly Chinese Migrants in Japan:
Focus on Participants of Chinese Attracted Community Activities

姚 利¹⁾, 石井優香¹⁾, 山崎由利亜¹⁾, 石橋みゆき²⁾, 正木治恵²⁾

Li Yao, Yuka Ishii, Yuria Yamasaki, Miyuki Ishibashi, Harue Masaki

キーワード：主観的健康感, 健康に関する思い, 高齢者, 在留中国人, 文化看護

Key words : self-rated health, health perspective, elderly, Chinese migrant, Transcultural Nursing

Abstract

Purpose

To investigate the health perspectives regarding to self-rated health and health experiences of elderly Chinese migrants who were involved in Chinese attracted community activities in Japan.

Method

Participants were 13 elderly Chinese residents who were recruited in the Tokyo Area; individual semi-structured interviews and qualitative and inductive analyses were performed.

Results

From the results of the overall analysis, eight health perspectives were identified: (1) subjectively examining health according to physical and mental faculties; (2) feeling secure by living in a safe and amenity social environment; (3) feeling peaceful by accepting support from others to solve daily life issues; (4) keeping a positive frame of mind by accepting the realities of aging; (5) communicating and engaging with other Chinese residents, so that daily life is not restricted by the language barriers; (6) preferring to reside with family members and support each other; (7) feeling relieved to be able to access Japanese healthcare services successfully by themselves; and (8) independently using traditional Chinese medicine to manage health and keep fit.

Conclusion

We confirmed that late adulthood developmental tasks, Chinese culture, and language barriers affected the health perspectives of elderly Chinese migrants in Japan. Because the language barriers and continuity of the native culture influenced their security, health promotion, and expectation of later life, it is important to create

受付日：2021年9月30日

採択日：2022年3月9日

1) 千葉大学大学院看護学研究科 Doctoral Program, Graduate School of Nursing; Chiba University

2) 千葉大学大学院看護学研究科 Graduate School of Nursing; Chiba University

姚 利 Li Yao

〒260-8672 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1

1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-8672, JAPAN

E-mail: yaoyong134193@gmail.com

an accommodating environment to resolve language barriers and provide care based on the cultural and health promotion standards that are familiar to elderly Chinese migrants.

要 旨

目 的

中国人が集まる地域活動に参加する在留中国人高齢者を対象に異国在住での主観的健康感と健康に関わる経験の調査を通して、彼らの健康に関する思いを明らかにすることである。

方 法

日本の首都圏に在住する中国人高齢者13名を対象に個別に半構造化面接を実施し、質的帰納的に分析した。

結 果

全体分析により、【身体機能や精神状態から主観的に健康の良し悪しを評価している】【安全で便利な社会に住むことを安心だと感じている】【他者の支援を受けることで安心して生活できている】【老いを受け止めて前向きに生きている】【言葉の壁で生活は制限されたが中国人との関わりや趣味を通して気楽に生活している】【家族で互いに支える生活を継続したい】【良い医療サービスをうまく利用できるので安心してている】【健康を維持するため中医学に基づき自主的に健康管理をしている】という8つの健康に関する思いが明らかとなった。

結 論

在留中国人高齢者においては、高齢期の発達課題や、中国文化、言葉の壁が彼らの健康に関する思いに影響を与えていることが明らかとなった。言葉による制限や母国文化の継続は彼らの安心感や、健康促進、老後生活の希望に強く影響を及ぼすため、言葉の壁を取り除く環境整備や彼らに馴染んだ文化や健康促進方法に基づいたケアの提供の重要性が示唆された。

I. 背 景

2020年末時点で65歳以上の在留外国人の総数は197,197人に達し、2019年より0.7%増え、日本全人口の6.7%を占めている。そのうち、中国人高齢者は23,080人(11.7%)であり、在留外国人高齢者総数の第2位である(出入国在留管理庁, 2021)。彼らは、1978年の日中国交正常化および1980年代後半の外国人労働力の受け入れ政策によって、就職するために来日し、現在、高齢期を迎えている。また、2012年には、高度外国人材の優遇措置の一つとして「親の帯同」を許可し始め(法務省入国管理局, 2012)、母国にいる高齢の親を日本に呼び寄せることが少なくない。そのため、現在の在留中国人高齢者には、中国で生まれ中国文化の中で長年過ごし、来日した人が多いと思われる。

先行研究では、外国人患者の看護提供において、言葉(近藤, 2021)、文化、病気に関する考え方の違い(久保, 2014)による困難が多く報告されている。今

後、外国人患者への看護ケア提供の機会の増加に伴い、ケア提供上の困難も増えることが推察される。一方、在日外国人にとって、保健医療機関を利用する際の言葉の壁・異なる文化や価値観の壁・異文化不適応から生じた悩みの解消の壁は、彼らの健康問題を及ぼす要因である(呉, 2016)と指摘されている。つまり、日本に移住することによる言葉や文化の壁は、在留外国人の健康に影響を及ぼしていると考えられる。

Leininger (1995) は、看護の対象となる多くの人々に健康と安寧をもたらすために文化に適したケアの提供を目標とし、多様な文化を理解することが不可欠であることを提唱している。高齢者ケアでは、高齢者を支えている内在化した「文化」を十分に理解した上で、ケアに生かすことが重要である(正木, 2004)。在留中国人高齢者が、日本で高齢期の変化を経験しつつ心身ともに健康で安寧に暮らし続けるために、看護師は彼らが持っている文化、価値観や習慣を理解し、文化を考慮したケアを提供する必要があると考えられる。しかし、異国で老いを経験している中国人高齢者

の健康に対する内在化された中国文化の影響と、移住したことの影響は明らかになっていない。

一方、個々の生活様式や価値観が多様化してきた現在、主観的健康感などの、個人レベルでみた主観的な健康指標が重視されている（小田，2007）。芳賀（1984）は主観的健康感とは身体的、精神的、社会的な統合体としての健康の主観的認識を表していると示唆している。主観的健康感を1つの指標として、中国の文化が内在化した在留中国人高齢者の健康状態及び健康に関する思いを理解できるのではないかと考える。本研究は、在留中国人高齢者の主観的健康感と日本での健康に関わる経験を明らかにすることで、より適切なケア提供への示唆が得られると考える。また、各地域に散住している在留中国人高齢者にアクセスするため、中国人が集まる地域活動に参加する対象者に焦点を当てた。

II. 研究目的

中国人が集まる地域活動に参加する在留中国人高齢者を対象に異国在住での主観的健康感と健康に関わる経験の調査を通して、彼らの健康に関する思いを明らかにすることである。

III. 用語の定義

在留中国人高齢者：中長期在留資格を持ち日本に住む65歳以上の中国国籍を持つ人、日本の国籍を取得した華僑、華人と、中国で生まれ50年以上中国で生活していた中国残留孤児とする。

主観的健康感 (Self-Rated Health)：生活機能の状態や疾病の有無にかかわらず、自分自身が自己の健康状態をどのようにとらえるかを評価するもの（大内，2010）とする。

健康に関する思い：日本に住んでいることの影響を含めた、自分自身の身体的・精神的・社会的健康及びそれに関連する受診や健康増進について感じること・希望すること・気にかけて考えを持つことやその内容とする。

IV. 研究方法

1. 対象者および募集方法

対象者は、本研究で定義する在留中国人高齢者とし

た。ただし、認知機能障害を持つ者は除外した。

首都圏都市部にある公民館およびコミュニティーセンター、中国語対応が可能な施設で対象者を募集した。また、対象者の多様性を確保するため、雪だるま式募集方法を併用した。

2. データ収集期間

2019年3月～10月

3. 調査方法

調査はインタビューガイドを用いて対象者に半構造化面接を1～3回、1回60分を目安に行った。面接内容は、対象者の同意を得てICレコーダーに録音し、逐語録を作成した。個別面接で使用した言語は対象者の希望に沿い、中国語とした。

4. 調査内容

調査内容は対象者の基礎情報と主観的健康感、健康に関する思いや考えとした。先行研究を参考に、インタビューガイドを作成した。

基礎情報は年齢、収入、家族構成、学歴、在留年数とした。

主観的健康感とは健康に関する思いの1つの指標として調査を行い、その測定方法は杉澤ら（1995）が明らかにした測定方法を参考に、「自分の健康状態を全体的にどう評価しますか」「他の同年齢の方と比べて自分の健康をどう評価しますか」の問いに、「とても良い」から「良くない」まで4段階での回答を求めた。また、「去年の自分の状態と比較すると、現在の健康状態をどう評価しますか」の問いに対しては、「いつも通り」を含めた5段階での回答を求めた。

インタビューガイドの内容は、在留外国人の健康障害要因と健康に関する異文化体験に関する先行研究（Jiang, 2016；中嶋，2015；平野，2003）を参考に、在留期間中の受診経験、日常生活の過ごし方、健康増進方法、今後の生活や健康上の心配や希望、主観的健康感の評価理由および日本語の自己評価理由についてどのような考えや思いを持っているかを含めた。日常会話および受診時の言葉の壁は在留外国人の精神的健康・主観的健康感に影響を及ぼす（大植，2018）ため、日本語の自己評価についても「日本語の日常会話能力をどう評価しますか」と「日本語の医療会話能力をどう評価しますか」の問いに、「とても良い」から「良くない」まで4段階での回答を求めた。

5. 分析手法

対象者の基礎情報、主観的健康感、日本語能力の自己評価は記述的統計学で分析した。面接データは質的

帰納的に分析した。本研究の対象者は社会的・文化的背景に強く影響を受け、個性が高いと考え、個々の事例が持つ個性・独自性を把握できる質的統合法（KJ法）（山浦，2012）を参考にした。

個別分析は、面接の逐語録から一つの「健康に関する思い」が含まれるようにラベルを作成し、ラベル内容の類似性に沿ってグループを編成し表札を作成した。最終ラベルが5～7枚になるまで同じ作業を繰り返した。

全体分析は、個別分析の最終ラベルを内容の類似性に沿って集め、サブテーマをつけた。さらにサブテーマを類似性に沿って集め、テーマとした。ただし、類似する内容がないサブテーマはテーマとした。

6. 信憑性

研究者は質的統合法（KJ法）研修会へ参加し、分析手法の精度の向上に努めた。分析の全過程において老年看護学ならびに質的統合法（KJ法）に精通する研究者のスーパーバイズを受けた。

収集したデータはすべて中国語であった。日本語でスーパーバイズを受けて分析方法の妥当性を確保するため、最初の5名の個別分析は中国語から日本語に訳したあと行った。訳したデータの妥当性を確保するため、研究者の所属する大学の日本語支援室に添削を依頼した。言語のニュアンスを確保するために、6人目からは中国語で分析を行った。ただし、最終ラベルは日本語と中国語で作成し、指導教員のスーパーバイズを受けた。

V. 倫理的配慮

本研究は、千葉大学大学院看護学研究科倫理審査委員会の承認と対象者が活用する組織や施設の承認を得て実施した（承認番号30-97）。

対象者に対して研究の目的と参加の自由、個人情報保護の方法、研究に参加しない場合であっても不利益を受けないこと、研究結果の公表の可能性などの倫理事項について分かりやすい言葉と文章で説明し、書面にて同意を得られた後に面接を実施した。

VI. 結 果

1. 対象者の概要

本研究の対象者は男性5名、女性8名の計13名であった（表1）。対象者全員が首都圏在住であった。

在留年数は、5年から30年以上であり、平均22.8年であった。10名の対象者は日本の病院を受診した経験があった。対象者は生活支援金や中国あるいは日本の年金で生活を送っていた。日本語能力の自己評価について、日常会話、医療会話が「まあ良い」と評価した対象者はそれぞれ5名と7名であったが、日本人の友人を持ち、主に日本人で構成されたメンバーでの活動に定期的に参加する人は1名だけだった。対象者は全員中国人が集まる活動や中国人向け地域活動に参加していた。

各対象者の総面接時間は30分から140分であり、平均時間は50分であった。個別分析に用いた元ラベルは40枚から80枚であった。

2. 研究対象者が活用する組織や施設の概要

1) X県健康教室

X県健康教室は中国残留邦人と在留中国人が日本の社会に入れるように、日本文化を学び、健康知識や日本語能力を高めるため、自発的に立ち上げられた組織である。活動の頻度は週1回である。およそ35名の参加者は全員70歳以上である。

2) X県日本語サークル

X県都市部の公民館で週1回、近隣に住む中国人に、日常会話能力の向上と日本の文化の学習を目的として、日本語授業を開催している。参加者12名のうち、70歳以上の中国人高齢者は4名である。

3) Y県デイサービス

中国残留邦人や中国人高齢者に介護サービスを提供するデイサービスである。サービス内容は中華風の食事や入浴、健康チェック、機能訓練、中国の昔のゲームなどである。職員は看護師1名、生活相談員6名、調理人1名である。生活相談員は全員介護職経験が長く、日本語が堪能な中国人や中国残留邦人2世である。看護師は日本人で中国語を翻訳する機器を用い、コミュニケーションを取っている。

4) その他

1) - 3) 以外の地域活動に参加する対象者は雪だるま式を通して募集した。これらの活動は、公園など公的な場所で近所の中国人が自発的に集まり、活動の内容・参加人数・参加時間などは明確に決められておらず自由に参加できる。

3. 全体分析結果

1) 主観的健康感

主観的健康感の結果を表2に示す。全体的評価、同年齢者との比較に対し、「とても良い」及び「まあ良

表1 対象者概要 (n = 13)

性別	年齢	学歴	在留年数 (年)	在留 資格	世帯 状況	収入	日本語能力の 自己評価		ADL	募集 方法	
							日常会話	医療会話			
A氏	男	60代後半	高校	5-9	永住	同	年金	良くない	良くない	自立	雪
B氏	女	70代前半	小学校	30-34	永住	同	生活支援金	良くない	良くない	自立	健
C氏	女	60代後半	大学	25-29	永住	独	年金	まあ良い	まあ良い	自立	雪
D氏	男	70代後半	大学	30-34	永住	同	年金	良くない	まあ良い	自立	健
E氏	女	70代後半	中学校	20-24	定住	独	生活支援金	良くない	まあ良い	自立	日
F氏	女	70代後半	中学校	30-34	定住	同	生活支援金	良くない	まあ良い	要介護	デイ
G氏	男	60代後半	高校	5-9	特定活動	同	年金	良くない	良くない	自立	雪
H氏	女	70代後半	大学	35-39	日籍華人	同	年金	まあ良い	まあ良い	自立	健
I氏	女	70代前半	無	20-24	永住	独	年金	まあ良い	良くない	自立	健
J氏	男	60代後半	高校	5-9	特定活動	同	年金	良くない	良くない	自立	雪
K氏	女	60代後半	高校	20-24	永住	同	自営業収入	まあ良い	まあ良い	自立	雪
L氏	女	70代後半	無	25-29	永住	同	生活支援金	良くない	良くない	自立	健
M氏	男	70代後半	大学	35-39	定住	同	年金	まあ良い	まあ良い	自立	健

※特定活動：法務大臣が個々の外国人について特に指定する活動
 ※定住者：法務大臣が特別な理由を考慮し一定の在留期間を指定して居住を認める者。残留孤児を含む
 ※日籍華人：日本の国籍を取得した中国系住民
 ※永住者：法務大臣が永住を認める者
 ※同：同居
 ※独：独居
 ※雪：Z県雪だるま式で募集
 ※健：X県健康教室
 ※日：X県日本語サークル
 ※デイ：Y県デイサービス

表2 主観的健康感 (n = 13)

	とても 良い	まあ良い	いつも 通り	あまり 良くない	良くない
全体的評価	5(39%)	6(46%)	—	2(15%)	0(0%)
同年齢者と比較	4(31%)	8(61%)	—	0(0%)	1(8%)
去年と比較	1(8%)	3(23%)	5(38%)	1(8%)	3(23%)

い」と評価したのはそれぞれ11名(85%)、12名(92%)であった。去年との比較に対し、「とても良い」及び「まあ良い」と評価したのはそれぞれ1名(8%)、3名(23%)であった。

2) 健康に関する思い

全体分析結果は、テーマを【】、サブテーマを〈〉、研究対象者の語りの内容を斜字で示す。全体分析結果は80枚の各個別分析の最終ラベルを素材とし、類似性に沿って統合し、以下の8つのテーマ、16のサブテーマを生成した。

(1) 【身体機能や精神状態から主観的に健康の良し悪しを評価している】

これは健康状態の評価に関する思いであり、〈病弱による良くない自己健康評価〉と〈老いを感じながらも良い自己健康評価〉が含まれた。〈病弱による良く

ない自己健康評価〉は、重病や自立して生活できないことで健康状態が良くないと思っていることだった。〈老いを感じながらも良い自己健康評価〉は、老いを感じているが、体や精神の状態が良いから、健康状態は相対的に良いと思っていることだった。

(2) 【安全で便利な社会に住むことを安心だと感じている】

これは自分にとって、困難がなく医療機関を利用でき、安全で便利な社会環境に住んでいることに安心しているという〈自分にとって安心できる住む環境〉に関する思いであった。

日本の食品は天然で体には無害、加えて空気はきれいだし、安心できる(A氏)。

(私は)近所に中国語が対応できる病院があり、(高齢者が)無料で乗れる電車の駅の近く、南向きで静かな部屋に引っ越した。外出と受診が便利だから(B氏)。

(3) 【他者の支援を受けることで安心して生活できている】

これは、他者の支援に関する思いであり、〈支援された生活〉、〈助けを求める生活〉と〈助けを求める対象がいない大変さ〉が含まれた。〈支援された生活〉

は、日本の行政機関の生活支援を受けながら安心して暮らしていることだった。〈助けを求める生活〉は、困難を取り除くために周りの人や行政機関に助けを求めることだった。一方で、〈助けを求める対象がいない大変さ〉について、C氏は、自分は独身で、将来認知症や他の病気で自立して生活できなくなったら、介護保険を利用して支援を得るが、介護保険に認定されない期間に急に病気になって面倒を見てくれる人がいない状況になることを心配していると語った。

(4) 【老いを受け止めて前向きに生きている】

これは老いの受容に関する思いであり、〈余生への希望〉と〈前向きな生き方〉を含んでいた。

〈余生への希望〉は人生の最期は死であり、老いに伴う身体機能の衰え、社会の役割の制限等の現状を受け止めて、思うように生きたいという思いだった。

人生の最期は死なので、生活に希望や心配はないが、寝たきりや虚弱になり、不自由や苦しみを味わい、他の人に面倒をかけることが嫌なので、最期はコロリと逝きたい(D氏)。

〈前向きな生き方〉は加齢や疾病などの現状を受け止めて、前向きに生きているという思いだった。

人間の生死は運命であり、楽あれば苦ありを信じていて、毎日後悔なく楽しんで大事に過ごせば、人生は有意義になる(E氏)。

(5) 【言葉の壁で生活は制限されたが中国人との関わりや趣味を通して気楽に生活している】

これは、言葉の壁があり日本人とのコミュニケーションが難しいことによる制限された生活の中で、中国人との関わりや趣味を通して、社会とのつながりを作り、気楽に生活しているという、〈制限された生活の中での楽しさ〉に関する思いであった。

(中国人向けの) デイサービスでは中国語で活動に参加し友達と雑談することが楽しい(F氏)。

違う言語や文化(の影響)で日本人とのコミュニケーションができないから、朝中国人が集まる公園で太極拳を見たり、中国人の床屋さんで散髪したりして、のんびりと過ごしている(A氏)。

年をとって記憶力が衰えるため、日本語を覚えるより忘れる方が多い……楽しく、有意義な生活を過ごすため、毎日外出して(中国人の)友達と歓談したり、互いに助けあったり、優しい言葉をかけて人間関係を維持している(E氏)。

(6) 【家族で互いに支える生活を継続したい】

これは家族関係への思いであり、〈子供に迷惑を

かけたくない〉と〈家族の支え〉を含んでいた。

〈子供に迷惑をかけたくない〉は老後は子供に迷惑をかけないように過ごしたいということだった。

一家団欒の方が安心だと思い、将来の老後の生活は、(病気になると子供に迷惑をかけるから)子供に迷惑をかけず健康で(子供と)同居生活を送りたい(G氏)。

今後私は寝たきりになって(自分で)病院にも行けなくなり、娘も仕事があるから、迷惑をかけたくないし。もし仕方がないなら、老人ホームに行くしかない…でも私は本当に老人ホームに入りたくない、自分の家がいい(H氏)。

〈家族の支え〉は家族の支えで悩みがなく暮らしていることだった。

夫が亡くなった後、(私に)寂しさを感じさせないように孫が同居してくれて、日常生活に悩みがある時、娘が相談にのってくれるし、孝行な家族に支えられて、悩みや辛い時期を乗り越えた。日常生活に解決できないことはない(I氏)。

(7) 【良い医療サービスをうまく利用できるので安心して生きている】

これは、医療サービスの利用に関する思いであり、〈心配のない医療サービス〉と〈言語の壁に影響された受診〉を含んでいた。

〈心配のない医療サービス〉は医療サービスを心配なく利用できるので安心を感じるという思いだった。

年を取ったら必ず病気をすると思うが、病気になる事を心配しながらも日本の医者は責任を持って薬を処方してくれるし、自分も中国と日本の健康保険があるから、病気になっても経済的な心配がなく、安心して速やかに受診できるので、病気になっても怖くない(J氏)。

〈言語の壁に影響された受診〉は、日本語がわからない対象者の受診の困難さであった。一方で、日本語が概ねわかる人にとって、あるいはよく受けている医療行為であれば、一人で受診する自信があること、対応できない場合でも家族や役所の通訳者に同伴してもらい、中国語が対応できる医療機関を利用することであった。

日本語は大体わかるので、いつも受診や入院している主治医や病院があり、救急車を呼んだ経験もあるし、自分一人で受診や入院することに問題はない(F氏)。

入院期間中や受診時の悩みは、子供に迷惑をかけな

いように自分で解決し……遠い病院に行くときや受診時に日本語が分からないなど自分で解決できない場合は夫と娘に同伴してもらった (H氏)。

(8) 【健康を維持するため中医学に基づき自主的に健康管理をしている】

これは、中医学に基づいた健康管理に関する思いであり、〈健康情報の入手〉〈中医学に基づく健康促進〉と〈総合的な健康管理〉を含んでいた。その中でも、老いを感じたため中医学に基づく多様な方法で健康を促進しているという〈中医学に基づく健康促進〉についての思いが多かった。

蓮の葉や枸杞を使って調理するという「求人不如求自己」の中医学の本に書かれたコレステロール値をコントロールできる料理を食べたり、毎朝ツボマッサージをして風邪を予防したりしている (I氏)。

長生きのためにカシュウを調理して白髪を予防したり、天然の蜂蜜を食べて免疫力を高めたり、辛い食べ物を減らしたりという健康な飲食習慣を守っている (A氏)。

〈健康情報の入手〉は、健康を管理するため、メディアから中国や日本の健康促進情報を入手することだった。〈総合的な健康管理〉は、健康な体を守るため、自主的に運動や飲食、外出の増加などを通して、身体的、精神的、社会的健康を総合的に管理していることだった。

自分の体を鍛えるため、毎朝公園で太極拳を実践している……毎日家にいることは良くない。家で寝るより活動に参加することが良い。活動に参加した後は、(家にいるより) 精神状態が違う (気分が晴れる) (D氏)。

Ⅶ. 考 察

本研究では、中国人が集まる地域活動に参加する在留中国人高齢者に焦点を当てた8つの健康に関する思いを明らかにした。高齢期の発達課題や、言葉による制限、中国文化に影響された思いが含まれていた。本研究は、主観的健康感や、高齢期の発達課題、言語による制限、儒教思想や中医学の影響から対象者の特徴を考察する。

1) 主観的健康感

全体的および同年齢者と比較した健康感が良いと評価した対象者が8割以上を占めた。一方、先行研究(胡, 2007)では、日本に在住する中国残留孤児の主

観的健康感は低かった。この違いの要因は2つ考えられる。

1つ目は、本研究の対象者は定期的に中国人や中国残留孤児が集まる地域活動に参加していた。于ら(于, 2019)は、中国都市部に居住する高齢者は付き合い・交流の頻度が高いほど主観的健康感が高かったと明らかにしている。本研究の対象者の主観的健康感是中国人或中国残留孤児が集まる組織活動の参加の楽しさの影響を受けていたと考える。

2つ目は、本研究の対象者は身体機能や精神状態から主観的に健康の良し悪しを評価していた。13名の対象者のうち11名は、健康状態を同年齢者と比べた際、大きな持病がなく、精神状態が良く、さらに自立して生活できるので、自分の健康に自信を持っていた。先行研究では、疾病への罹患、精神的な安定感(五十嵐, 2006; 山内, 2015)、慢性的な健康障害や機能障害(Jiang, 2016)は主観的健康感に影響を与えると報告している。本研究の対象者は、老いに伴う体力の低下などを経験していたが、重病がなくADLが高い者が多かった。そのことが、主観的健康感を良いと評価した対象者の割合が高かったことに関連していると考えられる。

2) 高齢期の発達課題に影響した健康に関する思い

【身体機能や精神状態から主観的に健康の良し悪しを評価している】【安全で便利な社会に住むことを安心だと感じている】【他者の支援を受けることで安心して生活できている】【老いを受け止めて前向きに生活している】という思いは高齢期に直面する健康や生活の変化に関連していた。

対象者は健康上の変化に適応するために身体・精神面の状態をとらえると同時に、生活上の支援や居心地のよい便利な住まい環境を整えていた。対象者らは高齢期における変化への対応を踏まえて、加齢に伴う現状を受容していたと考える。健康の衰退に適応し、生活を満足におくれるように(住まいを)準備すること(Havighurst, 1995)や、自分の人生の受容(Newman, 1988)は高齢期の発達課題として挙げられている。本研究の対象者は健康の衰退およびそれによって変化した現状への適応は、異国での老後の生活の中で、高齢期の発達課題に直面しつつ発達し続けていると考えられる。

3) 言葉による制限が影響した健康に関する思い

【言葉の壁で生活は制限されたが中国人との関わりや趣味を通して気楽に生活している】【良い医療サー

ビスをうまく利用できるので安心している】という思いは言葉の制限が社会活動の参加と医療機関の利用に関連したことを示した。

社会活動の参加について、現在、日本では、在留外国人が日本社会で孤立しないようにするために、多文化共生の地域づくり活動を通して、地域社会へ参画できる仕組みを整備している（総務省、2020）。本研究の対象者が居住する首都圏都市部では、在留中国人高齢者が多く、中国人が自発的に集まる活動や外国人向けの活動がさかんであった。そこでは交通が便利で、高齢者に対する交通費の公的な補助制度があるため、中国人が集まる活動にアクセスしやすいと考える。彼らは日本人とのコミュニケーションが難しい中で、中国人との関わりや趣味を通して社会とのつながりを持っていた。Maoら（2020）が行った中国系アメリカ人高齢者を対象にした健康行為と文化変容に関する研究では、中国の文化背景を有する海外移住高齢者は、中国の生活行動パターンを保つことや言葉の障壁で、中国人との関わりを好み、地元の人との関わりが乏しく、移住社会に入りにくいことが多いことが示唆された。つまり、同じ文化背景を有する在留中国人同士の交流にアクセスしやすくするため、交通や地域活動の開催・情報の提供を含む環境の整備が必要であると考える。

医療機関の利用について、本研究の対象者は、在日してすぐの頃は医療サービスを利用する際に困難があったと語ったが、現在、受診の困難があると語ったのは13人の対象者のうち1人だけだった。また、在留年数が10年未満の対象者の方が、医療会話と日常会話能力の自己評価について、両方とも良くない傾向があった。対象者からは在留年数が長いほど受診の経験は多いため、よく受けている医療行為は1人で対応できると語られた。そして、健康教室や日本語サークルに参加している対象者は、日常会話や医療会話能力のいずれかを「まあ良い」と自己評価する人が多かった。対象者の日本での在留期間が長いこと、日本語を学ぶことができる地域活動に参加していることは、日本語での受診時の自信につながると考えられる。

一方、本研究の対象者は、老いに伴う身体機能や記憶力の衰えによって外出が制限され、日本語を忘れることが増えた実感から、今後も療養生活を自宅で送ることを希望していた。自分で対応できない場合は、家族や行政機関の通訳者に同伴してもらい、中国語が対応できる医療機関を利用し、家族の手助けを受けら

れ、公的医療通訳者や中国語が対応できる医療機関にアクセスしやすい地域に在住していることが受診時の言語の障壁を取り除いていた。Luiら（2017）は、イギリスに在住する中国系移民高齢者は言語の障壁で医療サービスの利用に困難はあるが、家族や、慈善組織、公的通訳者はこの困難を乗り越えるための橋わたしの役割をもつことを報告している。今後自宅で療養生活を送る在留中国人高齢者が増えると推測されるため、医療・福祉分野における専門的通訳ボランティアの養成やICTを活用して遠方から通訳を受ける仕組みづくりなど、医療サービスにアクセスしやすい環境の整備が必要であると考えられる。

4) 儒教思想や中医学に影響される健康に関する思い

【家族で互いに支える生活を継続したい】【健康を維持するため中医学に基づき自主的に健康管理をしている】という思いは中国文化に影響していた。

本研究の対象者は、〈家族の支え〉を受けながら異国で生活し、今後も家族に〈迷惑をかけたくない望み〉を抱いており、健康に老後生活を送りたいという思いがあった。黄ら（2010）は中国系移民高齢者は、青年期までに中国で経験した文化や価値観が移住生活の中でも主導的な価値観となり、老いへの態度・経験に影響を与えていると明らかにしている。これは、本結果と一致する。「中華人民共和国の婚姻法」（1985）では、親に孝行することは法的な義務である。中国の伝統的な文化の主流である儒教思想によると、子供は親孝行すべきであり、親の老後生活は自宅で子供が身体的な介助を担うべきで、家族で全員を支え合いながら老後の生活を送るべきと考えられている。対象者の健康に関する思いには、子は親の面倒を見るべきであり、できる限り健康に生きることで子供の負担を軽減しようとする親としてのあり方が反映された中国の伝統的な親子関係が継承されており、それは対象者の老後生活の希望、健康を維持する意欲につながっていたと考える。

健康の維持について、本研究の対象者からは、生理的老化を予防するため、カシユウ（生薬の一つ）を調理して食べたり、ツボマッサージや太極拳をするなど中医学の健康促進方法について多く語られた。中医学は中国の春秋時期から記載が始まり、1991年には、「中医学と西洋医学を同等に重視する」方針が中国の憲法に記された。中医学の「医食同源」（薬膳）の基本的な考え方によると、食事は薬であり、薬としての効能が働く食べ物を食べて健康を促進する。また、太

極拳は中医学の陰陽概念を取り入れた武道や護身術の一つとして、古代中国で始まった。中華人民共和国が誕生した後、国民の健康促進方法として採用され大衆化した。太極拳はゆったりとした動きが筋力の向上や身体バランスの改善に効果的で(胡, 2007)、転倒リスクの低下や身体機能改善に有用であると示唆されている(Yu, 2012)。つまり、在留中国人高齢者では、移住後の生活においても中医学の影響が継続しており、ケアを提供する際は、健康への対処方法に中医学が根づいていることを理解する必要がある。中医学の健康促進方法の特徴や効果を考慮して食生活や運動習慣などにケアに活かすことは、彼らにとって馴染みがある継続可能な支援となると考える。

VIII. 研究の限界と課題

本研究は、活動の参加中や終了直後にデータ収集を実施したため、結果に影響を与えた可能性がある。また、本研究の対象者は中国人が集まる地域活動へ参加する者を対象者とした。今後は、中国人同士での活動に参加していない対象者を調査する必要があると考える。さらに、在留中国人高齢者に対する内在化した文化を考慮した健康促進方法を検討する必要があると考える。

IX. 結 論

本研究は、在留中国人高齢者の健康に関する思いを明らかにすることを目的に調査を行い、8つの健康に関する思いを明らかにした。その結果、在留中国人高齢者の健康に関する思いは高齢期の発達課題に影響を受けた一方で、言葉の壁および中国文化に強く影響されており、中国人同士の関わりの中での楽しさや医療サービスをうまく利用できる安心感は言葉の壁を乗り越えることに関連していた。儒教思想や中医学の健康促進方法という母国文化の継続は彼らの老後生活の希望、健康促進に影響を及ぼしていた。そして、言葉の壁を取り除く環境整備や在留中国人高齢者が馴染んだ文化や健康促進方法に基づいたケアの提供の重要性が示唆された。文化に配慮したケアは在留中国人高齢者の生活の効果的な支援につながると考えられる。

謝 辞

本研究にご理解とご協力をいただいた研究参加者の皆様に謹んで御礼申し上げます。本研究は、2019年度千葉看護学会研究支援金支給事業と日中笹川医学奨学金より助成を受け実施し、2020年度千葉大学大学院修士論文を加筆・修正したもので、要旨は2020TWINC台湾国際看護学会学術集會にて発表した。本研究において利益相反は存在しない。

引用文献

- 出入国在留管理庁 (2021). 在留外国人統計 (旧登録外国人統計) 統計表. http://www.moj.go.jp/isa/policies/statistics/toukei_ichiran_touroku.html (2021.9.5 閲覧)
- 芳賀博 (1984). 健康度自己評価と社会・心理・身体的要因. 社会老年学 (20), 15-23.
- 平野裕子 (2003). 在日外国人の身体的・精神的健康 保健学・看護学的視点から. 福岡医学雑誌, 94(8), 241-249.
- Havighurst, R.J (著), 莊司雅子 (監訳) (1995). 人間の発達課題と教育. 玉川大学出版部. 278-284.
- 法務省入国管理局 (2012). 高度人材に対するポイント制による出入国管理上の優遇制度. https://www.bunka.go.jp/seisaku/bunkashingikai/kondankaito/nihongo_suishin/03/pdf/siryou_8_1.pdf (2021.12.20 閲覧)
- 黄一帆, 王大華, 刘永广ほか (2010). 老化態度問卷 (AAQ) 中文版的初步試用. 中国臨床心理學雜誌18(04), 447-450.
- 胡秀英 (2007). 中国帰国高齢者の身体機能および主観的健康感に及ぼす太極拳の効果: 無作為割付け比較試験. 体力科学, 56(4), 409-418.
- 胡秀英, 石垣和子, 山本則子 (2007). 帰国10年以上の中国帰国者1世およびその中国人配偶者の精神的健康とその関連要因. 日本公衆衛生雑誌, 54(7), 454-464.
- 五十嵐久人 (2006). 主観的健康感に影響を及ぼす生活習慣と健康関連要因. 山梨大学看護学会誌, 4(2), 19-24.
- Jiang Y, Huang CY, Yoon H, et al. (2016). Correlates of Self-Rated Health and Self-Rated Mental Health in Older Chinese Americans. Soc Work Public Health, 31(4), 309-315.
- 近藤暁子, 上林千佳, 小泉麻美ほか (2021). 日本の看護師が外国人患者をケアするときの困難感に関連する要因. 国際保健医療, 36(2), 39-47.
- 久保陽子, 高木幸子, 野元由美 (2014). 日本の病院における救急外来での外国人患者への看護の現状に関する調査. 厚生指針, 61(1), 17-25.
- Leininger, M (著), 稲岡文昭 (監訳) (1995). レイニンガー看護論: 文化ケアの多様性と普遍性. 医学書院. 36-48.
- Liu, X (2017). Support networks for Chinese older immigrants accessing English health and social care services: the concept of Bridge People. Health, 25(2), 667-677.

- Mao, W (2020). Acculturation and health behaviors among older Chinese immigrants in the United States: A qualitative descriptive study. *Nursing & health sciences*, 22(3), 714-722.
- 正木治恵 (2004). 老年看護における文化と家族看護. *家族看護学研*, 10(1), 57-61.
- 中嶋知世, 大木秀一 (2015). 外国人住民における健康課題の文献レビュー. *石川看護雑誌*, 12, 93-104.
- Newman, B. M, Newman, P. R (著), 福富護 (訳) (1988). *生涯発達心理学：エリクソンによる人間の一生とその可能性*. 川島書店. 452-464.
- 小田利勝, 宮原洋八 (2007). 地域高齢者の主観的健康感と運動能力, 生活機能, ライフスタイル, 社会的属性間との関連. *理学療法科学*, 22(3), 397-342.
- 大植崇 (2018). 地域に住む在留外国人の健康に影響する諸要因の検討. *兵庫大学論集* (23), 35-43.
- 大内尉義, 秋山弘子, 折茂肇 (2010). *新老年学* (第3版). 東京大学出版会. 1651-1655.
- 杉澤秀博, 杉澤あつ子 (1995). 健康度自己評価に関する研究の展開：米国での研究を中心に. *日本公衆衛生雑誌*, 42(6), 366-378.
- 総務省 (2020). 「地域における多文化共生推進プラン」の改訂. https://www.soumu.go.jp/menu_news/s-news/01gyosei05_02000138.html (2021.12.20 閲覧)
- 呉小玉, 佐藤文子, 中田涼子ほか (2016). 在日外国人住民の健康を支援するための「国際まちの保健室」に関する実践報告. *兵庫県立大学地域ケア開発研究所活動報告集*, 1, 19-27.
- 山内加奈子, 齊藤功, 加藤匡宏ほか (2015). 地域高齢者の主観的健康感の変化に影響を及ぼす心理・社会活動要因5年間の追跡研究. *日本公衆衛生雑誌*, 62(9), 537-547.
- 山浦晴男 (2012). *質的統合法入門：考え方と手順*. 医学書院.
- Yu D.H, Yang H. X (2012). The effect of Tai Chi intervention on balance in older males. *Journal of Sport and Health Science*, 1(1), 57-60.
- 于進, 小林恵子, 成田太一ほか (2019). 中国都市部における高齢者の主観的健康感と健康習慣, ソーシャル・キャピタルとの関連. *新潟大学保健学雑誌*, 16(1), 23-31.
- 中华人民共和国婚姻法 (1981). http://www.gov.cn/banshi/2005-08/21/content_25037.htm (2021.9.5 閲覧)

日本に長期在住する中国人高齢者の健康管理 —地域で自立した生活を送る1事例の語りより—

Health Promotion Narratives of an Older Chinese Migrant Living Independently in a Community in Japan

千葉大学大学院看護学研究院看護学研究科
博士後期課程

姚 利

東京情報大学看護学部看護学科
助教

石井優香

千葉大学大学院看護学研究院看護学研究科
教授

正木治恵

【Abstract】

In this case study, we used a semi-structured interview to clarify the health promotion and perspectives of an older Chinese migrant living independently in a community in Japan. The KJ method, a qualitative data synthesis method was used to analyze the data. We found that based on the life attitude of actively problem-solving, Mr. A visited physicians without language barriers, felt comfortable managing his health, and accepted the realities of aging. As a result, he was satisfied with his health and hoped to spend the rest of his life pain-free.

【Key words】

Aged, Case reports, Chinese, Migrant, Health promotion

はじめに

在日中国人永住者は296,600人(2021年末時点)であり、そのうち65歳以上の高齢者は22,885人に達し、今後も増加していくと予想される^[1]。法務省は、外国人との共生社会のビジョン実現に向けて、中長期的課題及び具体的施策を公表しており、高齢の外国人を取り巻く実態・課題把握の不十分さとそれらを踏まえた支援策の検討の必要性を主張している^[2]。

高齢者は、加齢に伴い身体機能の低下など老いの自覚症状が増えるため、健康管理への関心が高くな

る。また、健康管理の方法は長年の生活体験とともに築かれるものであり、その人の文化背景や生活環境から影響を受けている^[3]。移住期間^[4]、移住した国の文化や言葉、医療システムの違いなどは、外国からの移住者の健康管理行動において困難が生じる要因であり、これらの要因は心身の健康に影響を及ぼす^[5,6]。以上のことから、日本に長期在住する中国人高齢者が直面した健康管理上の課題と対応方法を明らかにすることは重要であり、在日中国人高齢者の健康促進のための支援策検討に寄与することができる。

家高^[7]は1事例の特殊性と複雑さの解明は重要な諸状況における活動の理解を通して、様々な類似

事例の理解を促すと述べている。また、石川ら^[8]は、高齢者が語るライフストーリー中で一般的には健康づくりとして認識されない内容や本人が健康づくりとしてこれまで意識していなかった内容についても、健康づくりとして意味付けられたと述べている。したがって、本研究の目的を日本に長期在住する中国人高齢者1事例の健康管理に関する語りを通して、地域で自立した生活を送る在日中国人高齢者の健康管理と健康管理に関連する考えを明らかにすることとした。

方法

1. 研究デザイン

本研究は事例研究である。

2. 対象者募集

本研究は地域のコミュニティーセンターで開催されている外国人向けの活動を通して対象者を募集した。

3. データ収集方法

研究者はインタビューガイドを用いた半構造化インタビューを行い、データを収集した。インタビューガイドは日本における医療機関の受診経験、日常生活の過ごし方、健康増進の方法、今後の生活を含めた健康上の不安や望み、主観的健康感の評価理由などで構成されている。なお、インタビューガイドは外国人住民の健康問題に関する先行研究^[5]をもとに作成した。インタビューは対象者居住地域のコミュニティーセンター内にあるプライバシーが確保された静かな個室で行われた。全てのインタビューは研究者によって録音された。

4. データ収集期日

2019年4月X日に行った。

5. データ分析方法

研究者はインタビューの逐語録をデータ源とし、質的統合法（KJ法）^[9]を用いた質的分析を行った。まず、研究者は“日常生活の中でどのように健康管理を行っているか”を分析テーマとしてインタビュー逐語録を単位化し、元ラベルを作成した。次に、類似したラベルを集めてグループ化し、集めたラベル群に対してその内容を最もよく表す一文をラベルとして作成した。同じ作業を類似性がなくなるまで繰り返し、最終的に残ったラベルを最終ラベルとした。その後、最終ラベル同士の相互関係を表す空間配置図を作成し、分析テーマに基づいて空間配置図の構造が直観的にわかるシンボルマークをつけ、関係性を叙述化した。シンボルマークは【健康管理に関する要因：その方法】と示した。分析過程において、老年看護学ならびに質的統合法（KJ法）に精通する研究者のスーパーバイズを受けた。

6. 倫理的配慮

本研究は千葉大学大学院看護学研究科倫理審査委員会の承認を得た（承認番号30-97）。対象者に対して研究の目的、個人情報の保護、インタビューを録音すること、研究結果の公表などの倫理事項について中国語で分かりやすい言葉と文章で説明し、書面にて同意を得た後にインタビューを実施した。

結果

1. 事例の概要

A氏はB県に在住する70代後半の永住在留資格を持つ男性である。A氏はデータ収集時点から32

年前に妻と息子2人と共に家族4人で日本に移住した。中国では大学卒業後に研究者として働き、来日後は技術者として定年まで働いた。現在は、妻の介護をしながら夫婦2人で生活している。A氏は骨折によって日本の病院を受診した経験はあったが、インタビュー時点では持病はなかった。A氏は主観的健康感を去年と比べて“悪くなった”が、同年齢者と比べると“とてもいい”と評価した。また、A氏は中国人向け健康増進教室に1回/週の頻度で参加し、地域の日本人及び中国人に対して、中国語と日本語の授業を行っていた。毎朝、公園で太極拳やラジオ体操を行い、毎日、約8,000歩以上を歩いていた。

2. 分析結果

インタビュー逐語録から65枚の元ラベルが作成され、5段階のグループ化を経て、6つの最終ラベルとシンボルマークが生成された。以下本文において、シンボルマークを【 】、最終ラベルを〈 〉、シンボルマークの内容を表している元ラベルを斜字にて示した上で、シンボルマークの内容及びそれらの関係性が反映された空間配置図(図1)について説明している。

(1) A氏の健康管理のシンボルマークの内容

【人生の基本姿勢: 入手できるところから適切な解決方法を探し困難を取り除く】

この最終ラベルは〈研究者として、日常生活や健康に問題があった時、メディアや社会資源など手の届く範囲で解決方法を探求し、自分に合う物を判断し、手に入れて困難を取り除く〉であった。

もし(健康情報が)欲しいなら、情報を入手するためにその情報を探す方法を自分で考えるはず。解決方法を自分で考える。…研究に関する仕事をする人(自分)は、分からないままにはしない。分から

ないなら、自分で解決方法を探す。

【受診への自信: 言葉の壁がなく受診できている】

この最終ラベルは〈言葉の壁により日本の病院の受診が難しい人と違い、自分は必要な時に医療用語を自分で調べることができるので言葉の問題はなく、日本での病院受診に自信がある〉であった。

(医師の話は)全部わかったよ。…私は通訳者は1回も呼ばなかった。…他の人は言葉(日本語)の問題がある。(彼らは)病気になった時、日本で治療を受けたが、なかなか(病気が)治らなかった。結局中国の病院に行った(中国に戻って受診した)。彼らは言葉(の意味)も通じないし、通訳者も彼らの考えを医師にうまく伝えられなかったからだ。

【健康管理による心地よさ: 運動や団体活動の参加が楽しい】

この最終ラベルは〈運動で健康を維持することが当然だと思ったり、授業の準備や団体活動への参加を楽しんだり、自らの健康をきちんと管理している〉であった。

他の人に太極拳を教えるのが私の目的ではない。お金ももらっていない。毎朝、自分ひとりでやる。一緒にやりたい人(日本人)がいたらやるし、誰もいなくても大丈夫。(その理由は)自分の体を鍛えるのが目的だから。…(授業を準備する事は)楽しい。暇を潰せるから。朝から晩まで寝るより良い。

【現実の受容: 自分でコントロールできない現実を素直に受け入れる】

この最終ラベルは〈老いに伴う体の衰え、社会役割の喪失、受診の待ち時間が長いことなどに対しては対処方法を探し、どうしても対処出来ない場合、現実を受け入れる〉であった。

今、歯が19本しか残ってない。元々は24本ある

はず、5本なくなってしまった。…日本の“8020(運動)”によると、私は今1本足りない。…しょうがない、このままでいい。

【健康への自負：老いなどの現実を含め自分の健康には相対的に満足している】

この最終ラベルは〈人生の終点は死である事や老い、自分の経済状況などの現実を受け止めた上で、今の健康状態は、相対的にいいと思っている〉であった。

同年齢の人と比べ(自分の健康状態は)、私のほうがいい。日本人でも、中国人でも、私より健康な人はいない。…身体、心理状態、知識も。私の知識は広い。

【最期に対する希望：不自由や苦しみをなく逝きたい】

この最終ラベルは〈人生の終点は死なので、将来の生活に心配はないが、最期は不自由や苦しみをなく、他者に迷惑をかけずに逝きたい〉であった。

(将来の生活に)心配はない。人間はどうせ死ぬから。心配してもしなくても、変わらない。体が不自由になってから死ぬより、自由に動ける間に死んだほうがいい。他の人に迷惑をかけるより、今死んだほうがいい。社会に負担をかけないし、自分も苦しくない。

(2) A氏の健康管理の空間配置図(図1)

空間配置図(図1)に含まれた6つのシンボルマーク【健康管理に関する要因：その方法】の関係

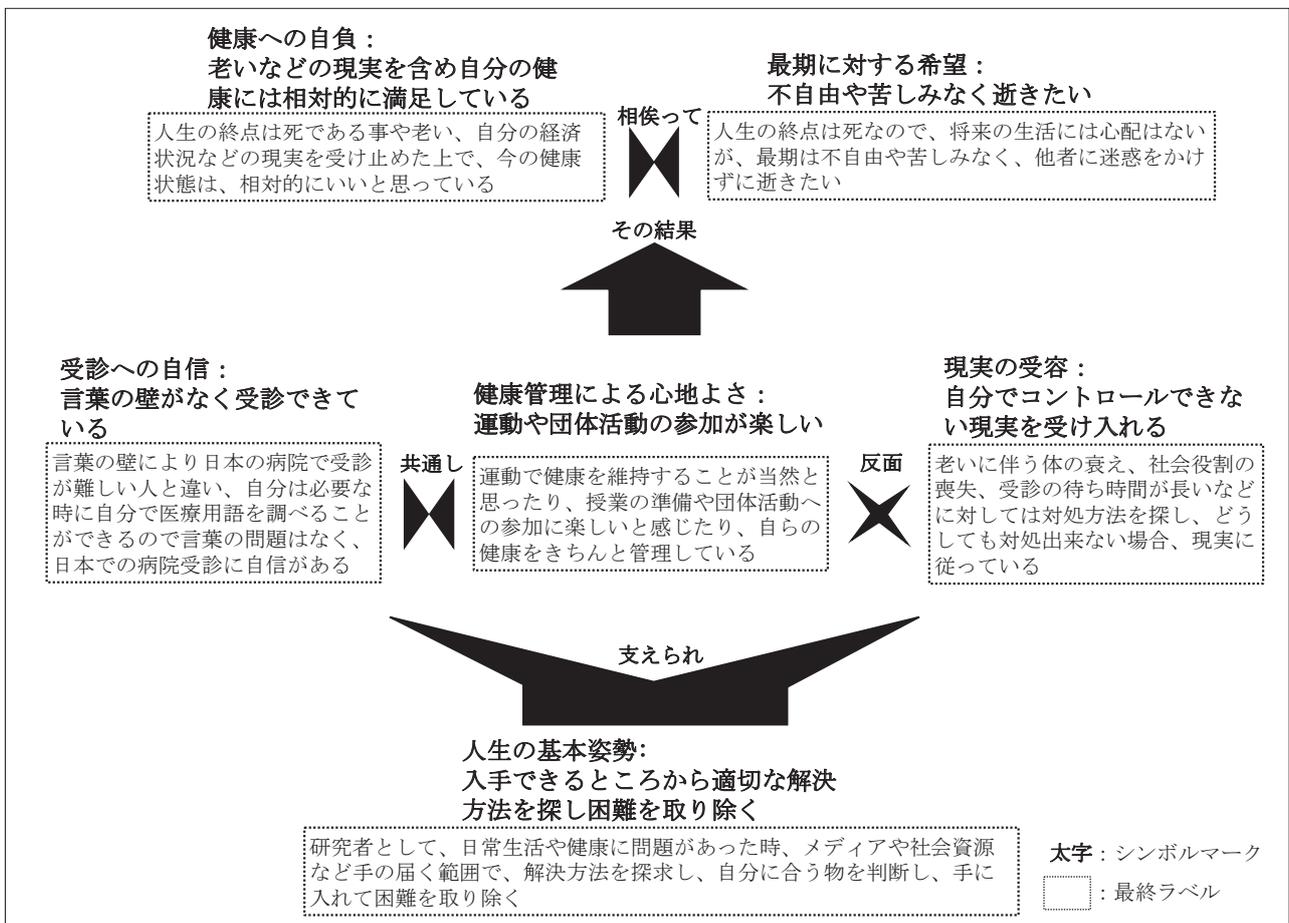


図1 A氏の健康管理の空間配置図

性を以下のように叙述化した。[]はシンボルマークにおける「健康管理に関する要因」、「」はシンボルマークにおける「その方法」を示している。

A氏は「言葉の壁がなく受診できている」という「受診への自信」と「運動や団体活動の参加が楽しい」という「健康管理による心地よさ」を共通して感じている。一方、「自分でコントロールできない現実を素直に受け入れる」という「現実の受容」をしている。

そして、これらの健康管理の結果、「老いなどの現実を含め自分の健康には相対的に満足している」という「健康への自負」と「不自由や苦しみなく逝きたい」という「最期に対する希望」を持っている。

これらの健康管理は「入手できるところから適切な解決方法を探し、困難を取り除く」という「人生の基本姿勢」に支えられている。

考 察

A氏の健康管理に関する語りの分析から得られた6つのシンボルマークについて考察する。

A氏は必要時にわからない言葉を調べることで「言葉の壁がなく受診できている」という「受診への自信」を持っていた。世界保健機関はヘルスリテラシーを自身と周囲の人々の健康と幸福を促進し維持するために、情報やサービスへアクセスし、それを理解し利用するための個人的な知識とコンピテンシーと定義している^[10]。これは健康に関する情報の理解や医療従事者に自分の心配を伝えるなどのヘルスケアに関するスキルに影響を及ぼす^[11]。A氏のように受診時に医療用語を調べるといった言葉の不安に対する事前の対応策を講じることは、在日中国人高齢者のヘルスリテラシーの発揮を促すと考え

られる。

A氏は太極拳やラジオ体操をきっかけにした地域の人との関わりなど「運動や団体活動の参加が楽しい」という「健康管理による心地よさ」を感じていた。移住者は文化や言葉の違いで移住した社会において、つながりを持つことに困難を感じる^[5]。一方で、高齢者は社会参加機会の増加によって、地域における社会的ネットワークやサポートが充実し、社会的孤独やメンタルヘルスの改善、より良い身体的活動に繋がる^[12]ことが報告されている。つまり、太極拳など中国文化にある健康管理方法は移住した社会における社会的つながりを促し、社会的サポートの充実とさらなる健康増進が期待できると言える。

A氏は積極的な健康管理を行う一方で、歯の喪失や定年による引退などの「自分でコントロールできない現実を素直に受け入れる」という「現実の受容」をしていた。高齢期における生涯発達の課題には身体的健康の危機と引退の危機が含まれている^[13]。守屋^[14]は、高齢者は身体的機能の低下ならびに社会の役割などの喪失に直面せざるを得ないが、これらの事実を受け止めることは高齢期の自我発達につながると述べている。つまり、老いに伴う自分でコントロールできない「現実の受容」は、高齢者の心理社会的健康管理において重要であると考ええる。

これらの健康管理の結果として、A氏は「老いなどの現実を含め自分の健康については相対的に満足している」という「健康への自負」と同時に、「不自由や苦しみなく逝きたい」という「最期に対する希望」を持っていた。そして、A氏が実施した健康管理は「入手できるところから適切な解決方法を探し、困難を取り除く」という「人生の基本姿勢」に支えられていた。地域で暮らす高齢者は「自分の理想とする逝き方」、「いずれ訪れる死への準

備”に取り組んでおり、理想の最期を実現するために生前から死への準備を行うという特徴がある^[15]。また、遠藤ら^[16]は日常的に生じる困難や問題の解決策を見つけることができるという対処可能感は、直接男性高齢者の健康行動につながる促進要因であると報告している。A氏が実施している健康管理は健康への自負を生み出すとともに、最期の迎え方の希望につながっており、A氏の研究者としての経験が健康管理の行動を支えていた。医療従事者が在日外国人高齢者に対する健康促進策を検討する際、彼/彼女らの健康管理方法を理解することが重要であり、そのためには、彼/彼女らがそれまでの経験を通して構築してきた人生に対する姿勢を理解することの必要性が示唆された。

研究の限界

本研究は事例研究であるため、結果における個人的な傾向が強く、結果の一般化には限界がある。一方で、長期在日中国人高齢者であるA氏が日常生活の中で実施した健康管理およびそれに関する考えを深く探究できたことは、今後の在日中国人高齢者の健康促進の方策を検討するための一助となると考える。今後、在日中国人高齢者を対象とした研究成果を蓄積する必要がある。

結論

本研究は地域で自立した生活を送る長期在日中国人高齢者A氏が行っている健康管理およびそれに関連する考えを明らかにした。A氏は「人生の基本姿勢」に支えられた「受診への自信」を持ち、「健康管理による心地よさ」を感じている。一方

「現実の受容」をしており、これらの健康管理の行動の結果、「健康への自負」と「最期に対する希望」を持っていた。

謝辞

本研究にご理解とご協力をいただいたA氏に謹んで御礼申し上げます。本研究は日中笹川医学奨学金より助成を受けて実施し、研究者の千葉大学大学院修士論文の一部を加筆・修正したものであり、The 9th Hong Kong International Nursing Forum cum 1st Greater Bay Area Nursing Conferenceにてポスター発表した。本研究における利益相反は存在しない。

引用文献：

- [1] 出入国在留管理庁：在留外国人統計（旧登録外国人統計）統計表. http://www.moj.go.jp/isa/policies/statistics/toukei_ichiran_touroku.html（最終閲覧2022年11月20日）
- [2] 法務省：外国人との共生社会の実現に向けたロードマップ. https://www.moj.go.jp/isa/policies/coexistence/04_00033.html（最終閲覧2022年11月20日）
- [3] 橘里佳子、畠中香織、河井伸子ほか：外来通院中の中長期在留者が日本で2型糖尿病と共に生きる生活体験のあり様. 日本看護科学会誌、40(0)、661-671、2020.
- [4] 高久道子、市川誠一、金子典代：愛知県に在住するスペイン語圏の南米地域出身者におけるスペイン語対応の医療機関に関する情報行動と関連する要因. 日本公衆衛生雑誌、62(11)、684-693、2015.
- [5] 中嶋知世、大木秀一：外国人住民における健康課題の文献レビュー. 石川看護雑誌、1293-104、2015.
- [6] 大植崇：地域に住む在留外国人の健康に影響する諸要因の検討. 兵庫大学論集、(23)、35-43、2018.
- [7] 家高洋：看護実践の事例研究の学術性. 家族看護学研究、27(1-2)、191-196、2022.
- [8] 石川麻衣、宮崎美砂子：高齢者のライフストーリーから捉えた健康づくりの構造—独居女性高齢者の健康づくりの意味付けを通して—. 千葉看護学会誌、14(2)、10-19、2008.
- [9] 山浦晴男：質的統合法入門：考え方と手順. 医学書院、2012.

- [10] Nutbeam Don, Muscat Danielle M.: Health Promotion Glossary 2021. Health Promotion International, 36(6), 1578-1598, 2021.
- [11] Berkman Nancy D.: Low health literacy and health outcomes: an updated systematic review. Annals of internal medicine, 155 (2), 97-107, 2011.
- [12] Hashidate Hiroyuki, Shimada Hiroyuki, Fujisawa Yuhki.et al: An Overview of Social Participation in Older Adults: Concepts and Assessments. Physical Therapy Research, 24(2), 85-97, 2021.
- [13] 下仲順子: 老人と人格: 自己概念の生涯発達プロセス. p.32-35, 川島書店、1988.
- [14] 守屋国光: 老年期の自我発達心理学的研究. p.1, 風間書房、1994.
- [15] 大崎涼菜、岡林真、谷口桃花ほか: 地域で暮らす高齢者の死生観—“いきいき百歳体操”に参加する高齢者に焦点を当てて—. 高知女子大学看護学会誌、46(1)、75-84、2020.
- [16] 遠藤寛子、中山和久、鈴木はる江: 首都圏在住中高年者における健康行動を促進する心理社会的要因の研究 共分散構造分析を用いた因果関係モデルの検討. 心身健康科学、14(1)、2-16、2018.

◆ 著者連絡先 ◆

姚 利

千葉大学大学院看護学研究科 博士後期課程

E-mail : yaoyong134193@gmail.com



**糖尿病患者さんの日々を、
よりよいものにするために。**

「糖尿病患者さんにとって、
制限のない世界を創造する」それが私たちのビジョン。
LifeScan, Inc.は世界中で2,000万人以上の
糖尿病患者の方々に製品をご利用いただいている、
血糖測定器のリーディングカンパニーです。
糖尿病患者さんが使用される測定器をはじめ、
センサーや穿刺針、また医療機関で使用される
院内専用測定器など、様々な製品をご提供して35年。
糖尿病患者さんの日々を、
よりよいものにするために、
これからも変わることなく貢献してまいります。

LifeScan

LifeScan Japan株式会社
東京都中央区日本橋室町3-4-4 OVOL 日本橋ビル

©LifeScan Japan K.K. 2022

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)評価書

課程博士：指導教官用



第 43 期

研究者番号： G4304

作成日： 2023 年 3 月 10 日

氏名	張 茂芮	Zhang Maorui	性別	F	生年月日	1993.06.23
所属機関(役職)	西南医科大学附属口腔医院インプラント科(医師)					
研究先(指導教官)	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座生体補綴歯科学分野(若林 則幸教授)					
研究テーマ	歯科疾患に対する mRNA を用いた治療戦略の確立 Establishment of mRNA therapy for dental disease					
専攻種別	<input type="checkbox"/> 論文博士			<input checked="" type="checkbox"/> 課程博士		

研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	優 学業成績係数=3.75	取得単位数
		30/30
学生本人が行った研究の概要	<p>本研究は、歯科口腔外科・歯周外科分野において、大規模に骨欠損を生じた症例における効率的な骨再生を促進する治療方法を提案するために、①mRNA を用いて投与する骨誘導治療因子の選定および最適化、②ラットを用いた動物モデルにおける骨再生治療効果を明らかにすることを目的としている。</p> <p>本年度は、ラット顎骨にクリティカルサイズの骨欠損を作製し、前年度に最適化した 2 種の骨誘導治療因子を投与し、骨再生の促進を検討した。初めに投与するキャリアの部位および経時的代謝を評価するために、Gluc mRNA を内包するキャリアを投与したところ、投与した骨欠損部に一致した発光を認め、96 時間まで持続した発現を認めた。次に 2 種の治療因子を投与し骨形成量をマイクロ CT により評価を行った。投与 1 週間後では骨増生は認められなかったが、投与 2 週間後より母床骨より骨再生が生じた。また、単一因子の投与と比較して、2 種の因子を同時に投与した際に有意に骨再生の促進が認められた。このことは、複数の治療因子を同時投与することにより治療の短期間化が望めることを示唆している。</p>	
総合評価	<p>【良かった点】</p> <p>本年度は、昨年度行った in vitro の実験を発展させ、臨床応用に向けた in vivo の実験を行った。動物事件に関わる研究スキルの習得と実験データの解析を行い、十分な研究活動を行ったと評価できる。また、論文作成にあたり、十分な過去の知見を引用しながら自分の考えと新たな知見を記載できたことは特筆すべき点であると考えられる。また、研究室の移動に伴い、新たなチームとも協調性をもって活動することができ、十分な議論も行っている。</p>	
	<p>【改善すべき点】</p> <p>今後、自立した研究者として活躍するためには、後輩への教育も必要と考えられる。現在の所、直接指導する後輩がいないため難しいが、次年度以降に学生が配属されるため、教育係としても活躍を期待している。</p>	
	<p>【今後の展望】</p> <p>治療因子の投与による骨再生の促進が達成されたが、他の手法による骨再生速度と比較すると、未だ十分でない事が問題とされる。治療因子の生体内での拡散が原因の一つとして考えられるため、新たなキャリアや東洋方法の検討など、次年度より新たな実験を開始する予定である。</p>	
学位取得見込	<p>研究は順調に進捗しており、本学が定める学位取得の単位も到達している。論文執筆が完了し、本年度中に学術雑誌への投稿を予定しており、十分に学位取得の要件を満たすと考える。</p>	
評価者 若林 則幸		

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)報告書 研究者用



第43期

研究者番号: G4304

作成日: 2023年 2 月 28 日

氏名	張 茂芮	ZHANG Maorui	性別	F	生年月日	1993. 06. 23
所属機関(役職)	西南医科大学附属口腔医院インプラント科(医師)					
研究先(指導教官)	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 生体補綴歯科学分野(若林 則幸 教授)					
研究テーマ	骨誘導因子Runx2 mRNAとVEGF mRNA医薬を用いた顎骨再生 Co-delivery of VEGF and RUNX2 Messenger RNA by Polyplex Nanomicelles improves the process of mandibular bone regeneration					
専攻種別	論文博士		<input type="checkbox"/>	課程博士		<input checked="" type="checkbox"/>

1. 研究概要(1)

1) 目的 (Goal)

The combine use of different kinds of osteogenic proteins (Runx2 and VEGF) may have some positive implications on the treatment of bone regeneration who suffers from bone fractures and bone defects. Using Runx2 and VEGF for bone repair and regeneration is feasible for mRNA delivery treatment strategies in future. The objective of this study is to explore whether local delivering of Runx2 and VEGF mRNA would enhance mandibular defects repair of rat by in vivo and in vitro study. From this study, I hope to find evidence that Runx2 and VEGF mRNA promote bone repair and provide reliable experimental results for mRNA treatment in the field of bone regeneration.

2) 戦略 (Approach)

From the literature reviews, there are a lot of evidences that Runx2 and VEGF are important promoters of osteogenic differentiation[1,2]. But the intrinsic interactions among Runx2 and VEGF in bone regeneration still needs to be well documented. In this study, I plan to use mRNA encoding Runx2 and VEGF sequences as the method of osteogenic factor transmission, establish an mandibular defect model of SD rat, and explore the effect of Runx2 and VEGF mRNA on bone repair. By comparing the different effects of two factors and their combination of mRNA on mandibular bone defect using histological and molecular biological analysis, I want to find one candidate one mRNA or one mRNA pair which has the most effective osteo-induction effect.

3) 材料と方法 (Materials and methods)

Materials: VEGFa165 mRNA, Runx2 mRNA, Gluc mRNA, Luc2 mRNA, pladmid, Lipofectamin MessengerMAX, Renilla-Glo™ Luciferase Assay System, NIPPON GENETICS mRNA extraction, TOYOBO Reverse transcription kit, GeneAce SYBR® qPCR Mix α, PEG-PAspDET(43-63) polymer, Hepes aqueous solution, Masson golden staining, CD-31 antibody, ALP antibody, OCN antibody, 8-week-old male SD rat, low speed minimotor and handpiece, 4-mm circle drill, micro-CT, in vivo imaging system(IVIS).

Methods:

a) mRNA transfection Lipofectamin MessengerMAX: Seeding primary-osteoblasts(POBs) to be 70% confluent at transfection at day0. 24 hours later, dilute MessengerMAX Reagent(5μl) in Opti-MEM Medium(175μl) and prepare diluted mRNA master mix by adding mRNA(2μg) to OptiMEM Medium(175μl). Then mixing diluted mRNA to each tube of Diluted MessengerMAX Reagent(1:1 ratio). Finally, change the medium 24 hours later.

b) Gluc expression analyze: Add 100μl of Renilla Luciferase Assay Reagent to the luminometer tube. Add 20μl of cell lysate. Mix quickly by flicking the tube or vortexing for 1-2 seconds. Place the tube in a luminometer and initiate measurement. Luminescence should be integrated over 10 seconds with a 2-second delay. Other integration times may be used. If the luminometer is not connected to a printer or computer, record the Renilla luciferase activity measurement.

c) Runx2 and VEGF mRNA transfection: P4-primary cells are seeding into 6-well-plate(1×10⁵ cells/well), group setting: A-only medium, B-Lipofectamine+Luc2, C-Lipofectamine+RUNX2, D-Lipofectamine+VEGF, E-Lipofectamine +RUNX2 (1 μg/well)+VEGF(1 μg/well), F-Lipofectamine+osteogenic medium.

d) Realtime PCR: mRNA extraction by fastGene™ RNA Basic Kit. Reverse transfection the RNA by ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix kit. Target gene(ocn and opn) are analyzed by real-time qPCR using SYBR Green I dye method. All the data are calculated by 2^{-ΔΔCT} method.

e) Mandibular defect: 8-week-old male rats are conducted mandibular defect surgery(4mm defect hole) under anesthesia.

f) IVIS: Luc2 mRNA(10μg)+PEG-PAspDET(43-63) polymer with total 50μl volume is injected into mandibular defect area. 4h, 24h, 48h, 72, 96h, 1week after injection, Luciferase expression is imaged by IVIS.

g) Runx2 and VEGF mRNA in vivo treatment: group: A-Hepes solution, B-Runx2(10μg), C-VEGF(10μg), E-RUNX2 (10μg)+VEGF(10μg), from post-surgery 1week, conduct mRNA injection treatment every week.

h) micro-CT: post-surgery 4week, conduct microCT to analyze the bone mineral density and bone volume for new bone formation.

i) Immunofluorescence staining: 8week mandibular samples are collected to making frozen slides, then using CD-31 antibody to mark the angiogenesis and ALP and OCN antibody to mark the osteogenesis of the bone defect area by immunofluorescence staining.

1. 研究概要(2)

4) 実験結果 (Results)

- a) mRNA synthesis and validity verification: western blot image showed that Runx2 and Vegf mRNA made in our lab successfully produced protein in Hela cells (Figure1a). successful Gluc mRNA transfection: Gluc expression curve demonstrated that the mRNA expression peaked at 24 hours post-transfection and gradually decrease with time.
- b) Runx2 mRNA and VEGF mRNA promoted the osteogenic markers in vitro: After transfected with mRNA in different groups, the RT-PCR results showed that expression of osteopontin and osteocalcin were relatively highest in RUNX2+VEGF group, while using RUNX2 or VEGF mRNA alone weakly stimulates osteogenic differentiation compared with blank group and Luc2 group (Figure 1d-f). The β -catenin, Lef1, and Osterix mRNA expression at 7 days also showed a slight increase in Runx2 mRNA/VEGF mRNA transfection group than the Blank and Luc2 group. These in vitro data revealed that the use of Runx2 mRNA or VEGF mRNA alone only upregulated the expression of OCN at 11 days.
- d) PEG-PAsp(DET)-nanomicelles successfully delivered Luc2 mRNA into target area: IVIS observed the luciferase signal 4 hours after Luc2 mRNA injection. The images demonstrated the luciferase expression peaked at 24 h then decreased with time. The distribution of ZsGreen1 from microscopic images verified that ZsGreen1 mRNA-loaded by polyplex nanomicelles was nonspecifically delivered into multiple cells in vivo. And the ZsGreen1 signal was dispersed in the mandibular defect area.
- e) mandibular defect model identification and mRNA treatment by microCT: 3D construction image showed a clear \varnothing 4mm-circle bone defect was established. The results showed local co-administration of Runx2/VEGF mRNA accelerated the new bone regeneration and bone mineralization in the early phase of mandible bone healing. After the first mRNA injection, the new bone tissue was observed in the Runx2 mRNA group, VEGF mRNA, and Runx2/VEGF mRNA group, and the process of bone regeneration continued after weekly administration. The ROI of mandible defect showed a large amount of new bone tissue was produced in the Runx2/VEGF mRNA group, followed by VEGF mRNA group.

5) 考察 (Discussion)

The combination of Runx2 and VEGF mRNA treatment in bone tissue regeneration is an exploration of an mRNA-based therapeutic strategy. In this study, Runx2 and VEGF mRNA transfection enhanced the expression of osteogenic differentiation genes in osteoblasts, which was confirmed by in vitro experiments. The subsequent in vivo animal experiments provided strong evidence that co-delivery of Runx2 and VEGF mRNA by polyplex nanomicelles accelerated mandibular defect healing and enhanced new bone formation over the Runx2 or VEGF mRNA single-administration groups. The morpho-histological analyses of ALP, OCN, and CD31 proteins expression revealed that osteogenesis and angiogenesis coupling was activated by co-administration in the early phase of bone repair. Our in vitro and in vivo results substantiated that the co-administration of Runx2 and VEGF mRNA has the advantage of synergistic effect on bone tissue regeneration and osteogenesis and angiogenesis coupling compared with the single factor administration within a mandibular defect model. In the complicated bone healing period, not only bone mesenchymal progenitors and osteoblasts lineages but also endothelial progenitors are recruited into the bone defect area, and the cellular interactions between different types of cells participate in the process of osteogenesis and angiogenesis[3]. Based on this concept of co-administration therapy, our study provides a feasible approach to add more candidates of osteogenic factors for combination therapy in bone regeneration medicine.

The mRNA delivery achieves the combined administration of Runx2 and VEGF in the mandible defect area based on its characteristics of efficiently, low cost, and safely stimulating cells to produce activity proteins. As a protein-replacement therapy, IVT mRNA is designed to be structurally similar to those that occur naturally in eukaryotic cells and stimulates cells to produce the target bioactive protein, which overcomes the difficulties such as the high cost of artificial recombinant protein synthesis and strict manufacturing conditions[4]. And it is also easy to evaluate the optimal dose by adjusting different mRNA doses and dosage ratios, hence achieving better efficacy in bone regeneration treatment.[5].

mRNA therapeutics have made rapid progress in the fields of cancer immunotherapies and infectious disease vaccines in recent years, but their application in bone tissue regeneration is still in its infancy. In our study, the dose ratio and administration time of Runx2 and VEGF mRNA in the treatment of mandibular defects need to be further optimized. And the mechanism of synergistic effect between RUNX2 and VEGF mRNA in osteogenesis and angiogenesis coupling also requires our in-depth exploration. Although this study has some limitations, the successful application of co-delivery Runx2 and VEGF mRNA for early bone healing in our research has expanded the idea of mRNA medicine. Our results provide a reliable experimental basis for the treatment of bone regeneration based on mRNA administration and support the feasibility of mRNA-loaded polyplex nanomicelles drugs for bone regeneration.

6) 参考文献 (References)

- [1] Komori T. R. International journal of molecular sciences. 2019;20
- [2] Hu K, Olsen BR. Bone. 2016;91:30-38.
- [3] Liu WC CS, Zheng L, et al. Adv Healthc Mater. 2017;6(5):1600434.
- [4] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. Nature Reviews Drug Discovery 2014; 13:759-780.
- [5] Lee E KJ, Kim J, et al. Biomater Sci. 2019;7(11):4588-602.

2. 執筆論文 Publication of thesis ※記載した論文を添付してください。Attach all of the papers listed below.

論文名 1 Title	Metformin Rescues the Impaired Osteogenesis Differentiation Ability of Rat Adipose-Derived Stem Cells in High Glucose by Activating Autophagy					
掲載誌名 Published journal	Stem Cells and Development					
	2021 年 9 月	30 巻(号)	1017 頁 ~ 1027 頁	言語 Language	English	
第1著者名 First author	Maorui ZHANG	第2著者名 Second author	Bo YANG	第3著者名 Third author	Shuanglin PENG	
その他著者名 Other authors	Jingang XIAO					
論文名 2 Title	Downregulation of DNA methyltransferase-3a ameliorates the osteogenic differentiation ability of adipose-derived stem cells in diabetic osteoporosis via Wnt/ β -catenin signaling pathway					
掲載誌名 Published journal	Stem Cell Research & Therapy					
	2022 年 8 月	13 巻(号)	397 頁 ~ 414 頁	言語 Language	English	
第1著者名 First author	Maorui ZHANG	第2著者名 Second author	Yujin GAO	第3著者名 Third author	Qing LI	
その他著者名 Other authors	Huayue CAO, Jianghua YANG, Xiaoxiao CAI, Jingang XIAO					
論文名 3 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 4 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 5 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						

3. 学会発表 Conference presentation ※筆頭演者として総会・国際学会を含む主な学会で発表したものを記載してください

※Describe your presentation as the principal presenter in major academic meetings including general meetings or international meetings

学会名 Conference	第22回日本再生医療学会総会			
演題 Topic	mRNA Therapeutics for the Treatment of Mandibular Bone Defect: Co-administration of Runx2/VEGF mRNA			
開催日 date	2023 年 3 月 24 日	開催地 venue	京都 国立京都国際会館1階(Event Hall)	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input checked="" type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				
学会名 Conference				
演題 Topic				
開催日 date	年 月 日	開催地 venue		
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				
学会名 Conference				
演題 Topic				
開催日 date	年 月 日	開催地 venue		
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				
学会名 Conference				
演題 Topic				
開催日 date	年 月 日	開催地 venue		
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語	
共同演者名 Co-presenter				

4. 受賞(研究業績) Award (Research achievement)

名称 Award name	国名 Country		受賞年 Year of award	年 月
	国名 Country		受賞年 Year of award	年 月

5. 本研究テーマに関わる他の研究助成金受給 Other research grants concerned with your research theme

受給実績 Receipt record	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	国立研究開発法人科学技術振興機構
助成金名称 Grant name	次世代研究者挑戦的研究プログラム[東京医科歯科大学卓越大学院生制度(Ⅱ)]
受給期間 Supported period	2021 年 10 月 ~ 2024 年 3 月
受給額 Amount received	月額16万円
受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
助成金名称 Grant name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
奨学金名称 Scholarship name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

7. 研究活動に関する報道発表 Press release concerned with your research activities

※記載した記事を添付してください。Attach a copy of the article described below

報道発表 Press release	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	発表年月日 Date of release	
発表機関 Released medium			
発表形式 Release method	・新聞 ・雑誌 ・Web site ・記者発表 ・その他()		
発表タイトル Released title			

8. 本研究テーマに関する特許出願予定 Patent application concerned with your research theme

出願予定 Scheduled	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	出願国 Application	
出願内容(概要) Application contents			

9. その他 Others

--

指導責任者(記名) 若林 則幸

Metformin Rescues the Impaired Osteogenesis Differentiation Ability of Rat Adipose-Derived Stem Cells in High Glucose by Activating Autophagy

Maorui Zhang,^{1-3,i} Bo Yang,⁴ Shuanglin Peng,^{1,2} and Jingang Xiao^{1,2}

The incidence and morbidity of diabetes osteoporosis (DOP) are increasing with each passing year. Patients with DOP have a higher risk of bone fracture and poor healing of bone defects, which make a poor quality of their life. Bone tissue engineering based on autologous adipose-derived stem cells (ASCs) transplantation develops as an effective technique to achieve tissue regeneration for patients with bone defects. With the purpose of promoting auto-ASCs transplantation, this research project explored the effect of metformin on the osteogenic differentiation of ASCs under a high-glucose culture environment. In this study, we found that 40 mM high glucose inhibited the physiological function of ASCs, including cell proliferation, migration, and osteogenic differentiation. Indicators of osteogenic differentiation were all downregulated by 40 mM high glucose, including alkaline phosphatase activity, runt-related transcription factor 2, and osteopontin gene expression, and Wnt signaling pathway. At the same time, the cell autophagy makers BECLIN1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3 I/II) were decreased. While 0.1 mM metformin upregulated the expression of BECLIN1 and LC3 I/II gene and inhibited the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) and GSK3 β , it contributed to reverse the osteogenesis inhibition of ASCs caused by high glucose. When 3-methyladenine was used to block the activity of metformin, metformin could not exert its protective effect on ASCs. All the findings elaborated the regulatory mechanism of metformin in the high-glucose microenvironment to protect the osteogenic differentiation ability of ASCs. Metformin plays an active role in promoting the osteogenic differentiation of ASCs with DOP, and it may contribute to the application of ASCs transplantation for bone regeneration in DOP.

Keywords: metformin, adipose-derived stem cells, autophagy, Wnt signaling pathway, GSK3 β , osteogenic differentiation

Introduction

THE BONE TISSUE complication caused by a persistent high blood glucose of diabetes mellitus (DM) is called diabetic osteoporosis (DOP), which is characterized by bone loss, destruction of the bone microstructure, increased bone fragility, and high fracture risk [1]. Hyperglycemia is one of the main manifestations of DM patients, and the abnormal glucose metabolism in the internal environment leads to osteogenesis disorder in bone tissue. Literature showed that the number of mesenchymal stem cells and osteoblasts decreased, and the synthesis and secretion of regulatory factors of osteogenic differentiation were also impeded in DM [1,2]. The insufficient osteogenic differentiation and bone formation in DM made it difficult to repair and regenerate bone tissue. The poor bone healing and remaining bone defects in

DOP patients after the bone defect or fracture leading to a decline in the quality of life of patients. So it is of great significance and urgent necessity to explore the treatment to improve the osteogenesis differentiation process in DOP.

In recent years, the induction of autologous mesenchymal stem cells for tissue regeneration and cell-based tissue-engineered bone provides a new therapy for promoting DOP bone defect repair. Adipose-derived stem cells (ASCs) are a type of adult mesenchymal stem cells from fat tissue that have a capacity for self-renewal [3]. ASCs can be directionally differentiated into osteogenesis, adipogenesis, and chondrogenesis, which have a wide application prospect in the research fields of bone regeneration, bone healing, and bone integration. Under somatic osteogenic induction conditions, ASCs differentiate into osteogenic precursors expressing genes and proteins related to osteogenic differentiation such

¹Department of Oral Implantology and ²Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, People's Republic of China.

³Division of Oral Health Sciences, Department of Fixed Prosthodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

⁴Department of Anesthesiology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, People's Republic of China.

ⁱORCID ID (<https://orcid.org/0000-0002-1420-6515>).

as runt-related transcription factor 2 (Runx2), osteopontin (Opn), DLX5, and Osterix. However, studies have proved that the internal environment disturbance caused by diabetic hyperglycemia had an impact on the metabolism of ASCs, leading to significantly impaired ASCs bone-orientation differentiation ability under the DOP microenvironment. However, the reasons for the osteogenic differentiation injury of ASCs in the diabetes microenvironment are not fully understood, and the treatment of bone repair and regeneration using autologous ASCs from DOP still needs further exploration.

Metformin (MF) is one of the first-line drugs for type 2 diabetes treatment. Recent studies presented that metformin maintained the stability of cell metabolism, activate autophagy, and also had a relieving effect on osteoporosis [4–6]. Autophagy is a process in which cells self-regulate and degrade intracellular macromolecules and damaged organelles. The cell degradation products are recycled by cell autophagy, which maintains the homeostasis of the intracellular environment [7]. Researchers found an increasing number of autophagic vesicles in femur tissue during postnatal development, while the femur and tibia were underdeveloped in *Fgf18^{+/-}* transgenic mice [8]. Gao et al. demonstrated that metformin regulated the development of bone marrow cells and promoted the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to osteogenesis by regulating the expression of *Cbfa1*, *LRP5*, and *COL1* genes [9]. Although studies have shown that metformin promoted the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell lines, the regulatory mechanism of metformin on ASCs osteogenic differentiation under the high-glucose environment is still not clear, and the relationship between autophagy and ASCs osteogenic differentiation needs to be clarified.

Our previous study found that the DOP microenvironment significantly inhibited the osteogenic differentiation of ASCs; then, we want to further study the effect of metformin in the osteogenic differentiation process of ASCs. Therefore, in this project, rat ASCs from fat tissue were cultured in vitro and treated with high glucose, metformin, and 3-methyladenine (3-MA) to explore whether metformin can activate cell autophagy level to promote the process of bone orientation differentiation of ASCs, as well as the molecular mechanism and signaling pathway involved.

Materials and Methods

Isolation of ASCs

This animal research was approved by the Animal Ethics Committee of Southwest Medical University, Luzhou, China. All the procedures, including anesthesia, surgery, nursing, and euthanasia, were conducted according to the guidelines of the National Institutes of Health of China.

The Sprague-Dawley male rats were given general anesthesia. After removing the inguinal adipose tissue, the skin wound was sutured and resuscitated. The tissue sample was cultured by the tissue block culture method under aseptic conditions. First, adipose tissue was washed by phosphate-buffered solution (PBS; HyClone) containing 1% penicillin–streptomycin solution (FBS; HyClone). Then, it was carefully cut into mince and laid on the bottom of the culture flask. Next, we gently added alpha-modified eagle's medium (α -MEM; HyClone) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone), and cultured in an incubator in 5% CO₂ at 37°C for primary cell culture.

The culture medium was changed every 3 days. The multilineage differentiation capacity of ASCs was proved by our previous article [10]. The cells were passed to third-generation for the following experiments.

Cell proliferation analysis after reagents treatment

Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, China) was used to detect the toxicity of different glucose concentration of ASCs. The third-passage ASCs (5×10^4 cells/mL, 100 μ L/well) were cultured in 96-well plates with α -MEM for 24 h. Then, ASCs were treated with different concentrations of glucose (10, 25, 50, 75, and 100 mM; MedChemExpress). After 48 and 96 h, we added a reagent of the CCK-8 into medium and incubated for 2–3 h. The optical densities of the incubated medium in different groups were measured at 450 nm by an automatic microplate reader (Spectra Thermo, Switzerland).

Cell wound healing assay

The third-passage ASCs (5×10^4 cells/well) were seeded into 6-well plates, and then, ASCs were treated with 40 mM glucose and 0.1 mM metformin (MedChemExpress) [11,12]. When the cell density reached 95%–100%, a 100 μ L pipette tip (Thermo Scientific) was used to make a straight scratch in the center of each plate. Images were collected at 6-h intervals to observe the wound healing ability of ASCs.

Alizarin red-S staining

ASCs (5×10^4 cells/well) were seeded into 6-well plates and cultured in an osteogenic medium (Cyagen Biosciences, Inc.) with high glucose, metformin, and 3-MA. The components of osteogenic medium were as follows: basal medium (175 mL), FBS (20 mL), glutamine (2 mL), penicillin–streptomycin (2 mL), ascorbate (400 μ L), β -glycerophosphate (2 mL), and dexamethasone (20 μ L). After 21 days, the number of mineralized nodes with alizarin red stain was used to demonstrate the osteogenic differentiation ability of ASCs. After 21 days, PBS was used to wash cells thrice, and 4% paraformaldehyde was used to fix ASCs for 30 min. Then ASCs with mineralized matrix was stained with Alizarin red-S dye for 1 h and the images were collected by inverted light microscope (Olympus, Japan).

Alkaline phosphatase staining

After drug treatment cultured with osteogenic induction medium in 7 days, ASCs were fixed by 4% paraformaldehyde and washed by PBS thrice. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was examined by 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Color Development Kit (Beyotime, China) overnight. Also, the stained cells were observed by an inverted light microscope.

Western blot assay

Total protein of ASCs was lysed using the Total Protein Extraction Kit (Keygen Biotech, China) after drug treatment. Then, we detected the concentration of total protein by Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Then, different proteins among each group were divided by 8% or 10% or 12% (v/v) sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel

(Beyotime) with 90 V for 1 h and 120 V for 1 h. Also, the SDS-PAGE gel was transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad) at a constant current of 100 mA for 1 h. All PVDF strips were blocked with 5% skim milk (Bio-Rad), which was diluted in 0.05% (v/v) Tween-20 Tris-buffer saline (TBST) and incubated with target primary antibodies (1:1,000) overnight at 4°C, including glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; ab181602), OPN (ab91655), GSK3 β (ab32391), mammalian target of rapamycin (mTOR) (ab32028) and BECLIN1 (ab62557; Abcam, United Kingdom), and RUNX2 (12556s), LEF1 (2230p), β -catenin (D10A8), and light chain 3 (LC3) I/II (12741T; Cell Signaling Technology). Membranes were washed with TBST thoroughly for 30 min and immersed in goat-anti-rabbit secondary antibodies (Beyotime) for 1 h. The image results were visualized using an Enhanced Chemiluminescence Detection System (Bio-Rad).

Immunofluorescence staining and confocal laser scanning

ASCs (1×10^4 cells) were inoculated on confocal dishes (Corning) and treated as previously described with high glucose and metformin for 4 days. Cells were gently washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Permeabilized the cytomembrane of ASCs by 0.5% Triton X-100 and immersed them in 5% goat serum (Beyotime) for 1 h. Next, rabbit primary antibodies of BECLIN1 and GSK3 β (1:200) were used to incubate ASC samples overnight at 4°C, and a fluorescence-conjugated goat-anti-rabbit secondary antibody (Beyotime) was used to combine the primary antibody for 1 h. Finally, the nucleus of ASCs was stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole (Beyotime). The fluorescence images were captured by the inverted fluorescence microscope (Olympus).

RNA extraction and real-time fluorescent polymerase chain reaction

Total RNA of ASCs in each group was extracted by Total RNA Extraction Kit (BioFlux, China). The mRNAs were

reverse transcribed into cDNA by PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio, Japan). Then real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted by SYBR Premix ExTaq kit (Takara Bio) with ABI 7900 system machine (Applied Biosystems) as follows: 95°C for 45 s; then 40 cycles of 95°C for 5 s; and finally 60°C for 30 s. All the primer sequences details are shown in Table 1. The quality of the PCR product was examined by melting curve, while the gene cycle threshold (CT) values from all groups were calibrated with Gapdh CT values and calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical analysis

Experimental results were repeated over three times independently, and the data were calculated by SPSS 19.0 software (SPSS, Inc.) with Student's *t*-test or one-way ANOVA. Differences were marked as statistically significant if $P < 0.05$.

Results

High glucose restrained cell proliferation and cell migration

Cultured with different differentiation induction mediums, ASCs derived from adipose tissue were induced into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes, which demonstrated the multidirectional differentiation ability of ASCs (Fig. 1A). After osteogenic induction, ASCs changed their morphology from spindle shape of fibroblasts to typical polygon shape of osteoblast, and mineralized matrix accumulates around the cells. While in the adipogenic medium, the shape of ASCs became ovoid and filled with lipid, which was dyed orange by Oil Red O. When ASCs differentiate into chondroblasts, they secreted proteoglycan, collagen, and other extracellular matrices to make the cells stick together.

Excessive glucose concentrations are toxic to the proliferation, migration, and differentiation of ASCs. The CCK-8 results showed that the cell proliferation ability of ASCs was gradually

TABLE 1. PRIMER SEQUENCES INFORMATION FOR AMPLIFICATION OF GENES

Gene name	RefSeq transcripts	Sequence (5' → 3')
Gapdh	NM_017008.4	Forward: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC Reverse: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT
Runx2	NM_001278483.1	Forward: AGGACTATGGCGTCAAACA Reverse: GGCTCACGTCGCTCATCTT
Opn	NM_012881.2	Forward: CACTCCAATCGTCCCTACA Reverse: CTTAGACTCACCGCTCTTCAT
β -Catenin	NM_053357.2	Forward: AAGTTCTTGGCTATTACGACA Reverse: ACAGCACCTTCAGCACTCT
Gsk3 β	NM_019827.7	Forward: AACTCCACCCAGAGGCAATCG Reverse: CGTTGCACTCTTAGCCCTGT
Lef1	NM_130429.1	Forward: CAGACCTGTCACCCTTCAGC Reverse: GTGAGACGGATTGCCAAACG
mTOR	NM_019906.2	Forward: AGTGGGAAGATCCTGCACATT Reverse: TGGAAACTTCTCTCGGGTCAT
Beclin1	NM_053739.2	Forward: AGCACGCCATGTATAGCAAAGA Reverse: GGAAGAGGGAAAGGACAGCAT
LC3 II	NM_022867.2	Forward: GAGTGGAAAGATGTCCGGCTC Reverse: CCAGGAGGAAGAAGGCTTGG

Gapdh, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; LC3, light chain 3; mTOR, mammalian target of rapamycin; Opn, osteopontin; Runx2, runt-related transcription factor 2.

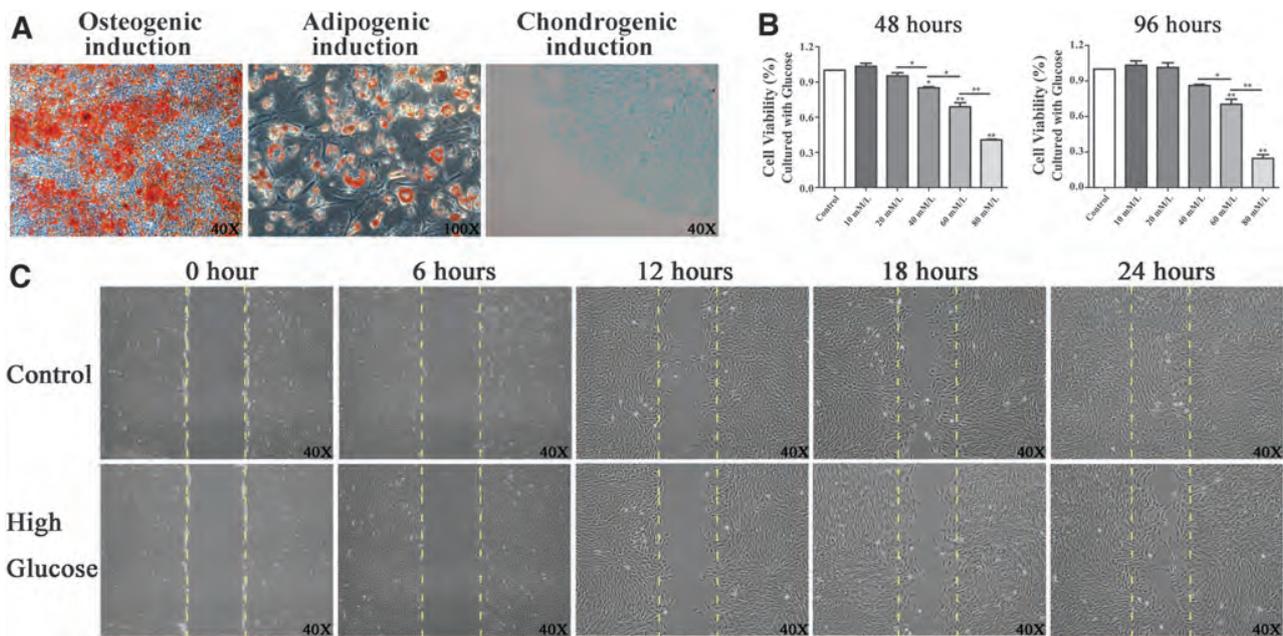


FIG. 1. ASCs had multidirectional differentiation ability, but high-glucose inhibited the cell proliferation and migration of ASCs. (A) ASCs multidirectional differentiation was analyzed by Alizarin red-S staining (in red), Oil Red O staining (in orange), and Alcian blue assay (in blue) after induction culture; (B) CCK-8 assay data showed that the high-glucose concentration inhibited the cell proliferation activity at 48 and 96 h. At 40 mM high glucose, the cell proliferation activity was reduced to 80% which was statistically different from the control group; (C) cell wound healing progress was detected every 6 h with an inverted light microscope, the images showed that the cell migration ability was suppressed in the high-glucose group and its scratch was not healed within 24 h. The yellow dotted line shows the initial boundary of the scratch. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ASC, adipose-derived stem cell; CCK-8, Cell Counting Kit-8. Color images are available online.

declined with the increase of glucose concentration in 48 and 96 h (Fig. 1B). Also, the cell migration ability of ASCs was depressed under 40 mM glucose treatment compared with the control group at different time points (Fig. 1C). Then, we studied the inhibiting effect of high glucose on osteogenic differentiation of ASCs in the following part of our research.

High glucose inhibited osteogenic differentiation capacity and Wnt signaling pathway in ASCs

To explore the relationship between high glucose and ASCs osteogenic differentiation, we treated ASCs with 40 mM glucose and 0.1 mM metformin and detected the changes of cell mineralization, ALP activity, osteogenic factors, and Wnt signaling pathway. After osteogenic differentiation induction for 21 days, the mineralized external matrix produced by ASCs was stained by Alizarin red-S staining. The staining results demonstrated that high-glucose treatment caused the lower formation of mineralized nodules in the high-glucose group, while the addition of metformin in high glucose promoted the formation of mineralized nodules to a certain extent (Fig. 2A). The ALP staining results of ASCs after osteogenic differentiation for 7 days also proved that a high-glucose environment inhibited ALP activity, while metformin upregulated its expression (Fig. 2C). RUNX2 and OPN were the represent proteins for osteogenic differentiation, β -CATENIN and LEF1 represented the activity of the Wnt signaling pathway. After 4 days of ASCs osteogenic differentiation, the western blot and RT-PCR results were consistent with the results of Alizarin red-S staining and ALP staining (Fig. 2B, D).

High glucose suppressed the autophagy level and metformin modulated autophagy inhibition induced by high glucose

Our results showed a correlation between osteogenic differentiation potential damage of ASCs and the inhibition of autophagy level by high glucose. After being cultured under high glucose and metformin condition, the protein and mRNA of ASCs in different groups were analyzed. The western blot images showed that high glucose inhibited the expression of two key proteins in autophagy: BECLIN1 and LC3 I/II, while they were upregulated by metformin (Fig. 3A, B). However, the expression of mTOR and GSK3 β , which negatively regulated the autophagy signaling pathway, was increased in the high-glucose group. The gene expression results detected by RT-PCR were consistent with western blot results (Fig. 3D). Then, the fluorescence signal images showed that the expression of Beclin1 was the weakest in the high glucose group, while metformin activated the expression of Beclin1 and showed the strongest fluorescence (Fig. 3C).

3-MA antagonized the effect of metformin on osteogenic differentiation and cell autophagy in ASCs

To further prove the important role of autophagy in promoting osteogenic differentiation of ASCs, we added 3-MA, an inhibitor of metformin, to verify that once inhibited by 3-MA, metformin was not able to recover the damaged osteogenic differentiation potential of ASCs by high

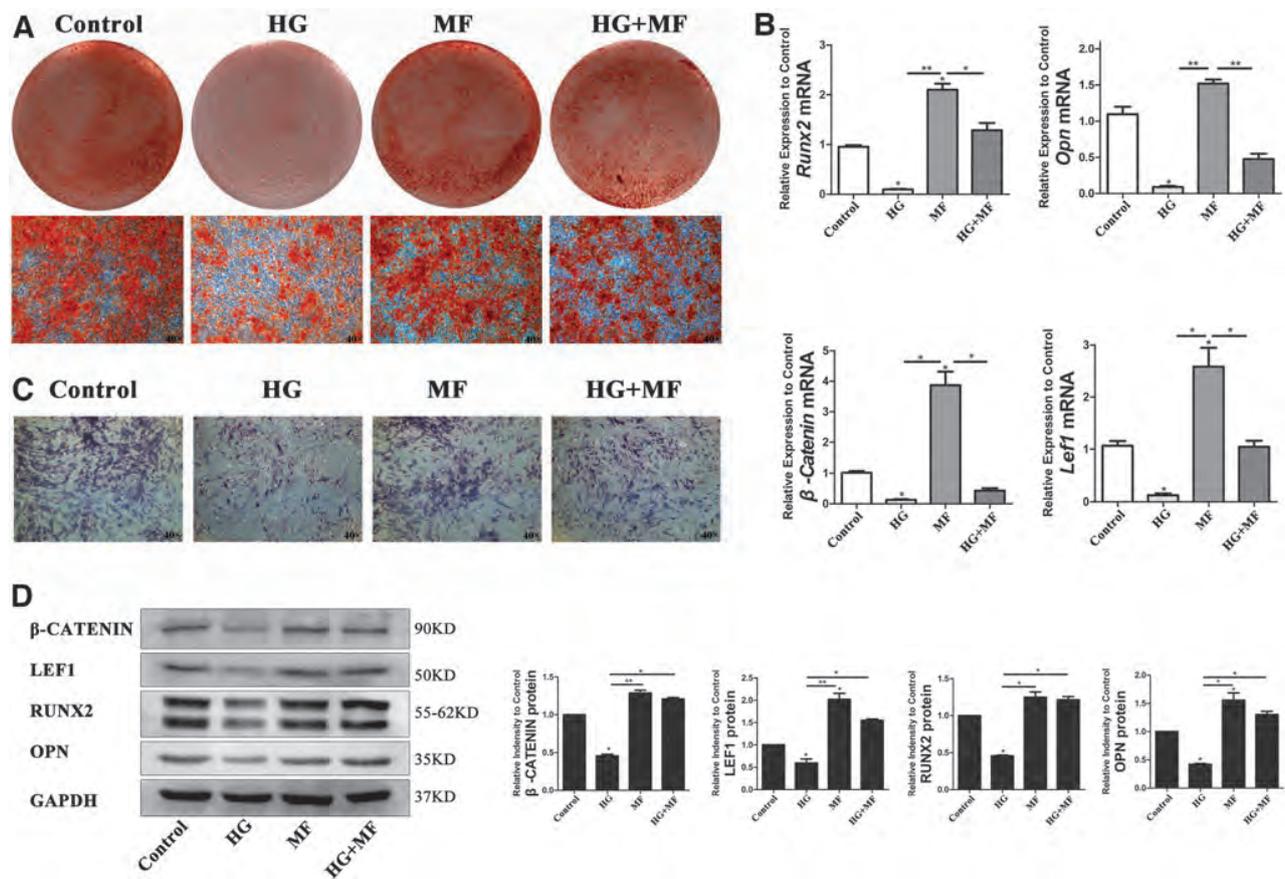


FIG. 2. The osteogenic differentiation capacity of ASCs and the Wnt signaling pathway were detected after glucose and metformin treatment. (A) Osteogenesis cultured for 21 days, mineralized nodules were stained by Alizarin red-S; (C) osteogenesis cultured for 7 days, and the active ALP in ASCs was dyed purple. Metformin group had the highest of mineralized nodules formation and ALP activity; (B, D) RT-PCR and western blot data showed that the expression of typical osteogenic genes *Runx2* and *Opn* and Wnt signaling pathway genes β -catenin and *Lef1* was higher in the metformin group than that of the high-glucose group. Although the expression level of the HG+MF group was not as good as that of the metformin group, it was also higher than that of the HG group. The difference was statistically significant. All the results showed that metformin resisted the negative effect of high glucose and promoted bone formation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ALP, alkaline phosphatase; MF, metformin; Opn, osteopontin; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; Runx2, runt-related transcription factor 2. Color images are available online.

glucose. The Alizarin red-S staining images demonstrated that after the addition of 3-MA, the ability of metformin to promote osteogenic differentiation was offset by 3-MA (Fig. 4A). The results of western blot and RT-PCR demonstrated that the expression of Beclin1 and LC3 I/II was successfully inhibited by 3-MA, and metformin could not upregulate their expression (Fig. 4B, C). The expression of RUNX2 and OPN was higher in the HG+MF group than in the HG group. When 3-MA inhibited the effect of metformin, the expression of RUNX2 and OPN was downregulated in the 3-MA+MF+HG group compared with the MF+HG group (Fig. 4B, C). The results meant that the positive effect of metformin on ASCs osteogenesis was inhibited by 3-MA.

Metformin-modulated autophagy activated Wnt signaling pathway in the process of osteogenic differentiation

So far, we have proved that high glucose inhibited the osteogenic differentiation potential of ASCs through auto-

phagy, while metformin reversed this negative effect. However, we still need to find the clues behind the osteogenesis damage of ASCs and autophagy. The literature review found that GSK3 β could not only negatively regulate the level of autophagy but also targeted to bind the β -CATENIN to inhibit the Wnt signaling pathway [13,14]. Therefore, we were committed to exploring whether GSK3 β is a link between the Wnt signaling pathway and cell autophagy. After treatment with high glucose, metformin, and 3-MA, we detected the expression activity of mTOR, GSK3 β , β -CATENIN, and Lef1 among each group (Fig. 5A, C). The protein expression of mTOR and GSK3 β was upregulated in the high-glucose group, and metformin could not depress them in the HG +3-MA+MF group. The expression of β -CATENIN and Lef1 was higher in the HG+MF group than that in the HG group and the HG +3-MA+MF group. The results demonstrated that the Wnt signaling was activated when the cell autophagy level was upregulated by metformin, which promoted the progress of osteogenic differentiation. The fluorescence staining of GSK3 β showed that it was highly

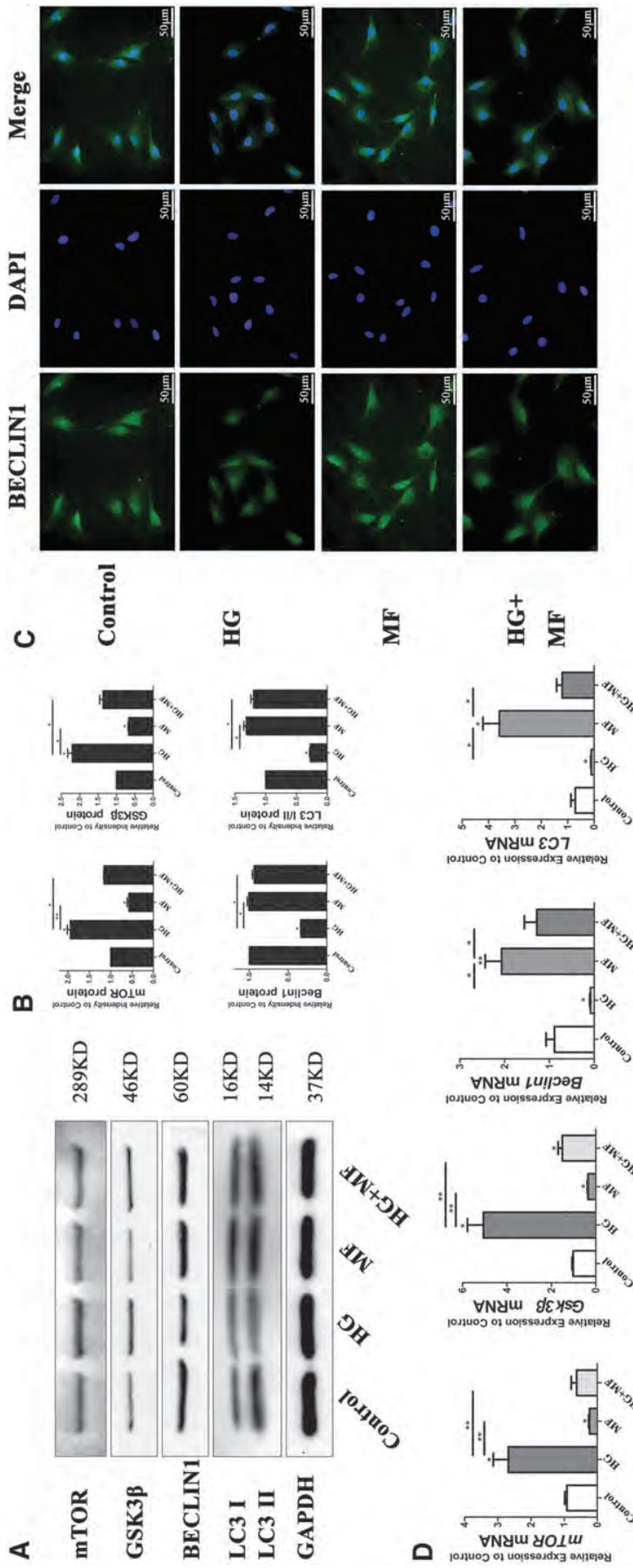


FIG. 3. Metformin upregulated the expression level of autophagy protein BECLIN1 and LC3 I/II was significantly less at 0.5 times in the high-glucose group than that of the control group, while metformin was able to upregulate them in the HG+MF group. The expression of mTOR and GSK3β was suppressed in the metformin group compared with the high-glucose group, which was the opposite results of BECLIN1 and LC3 I/II; (C) fluorescence staining image of BECLIN1 showed the weakest expression in the high-glucose group, while it was strongest in the HG+MF group; (D) the gene expression trend of *Beclin1*, *LC3 II*, *mTOR*, and *Gsk3β* in each group was consistent with that of western blot. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. LC3, light chain 3; mTOR, mammalian target of rapamycin. Color images are available online.

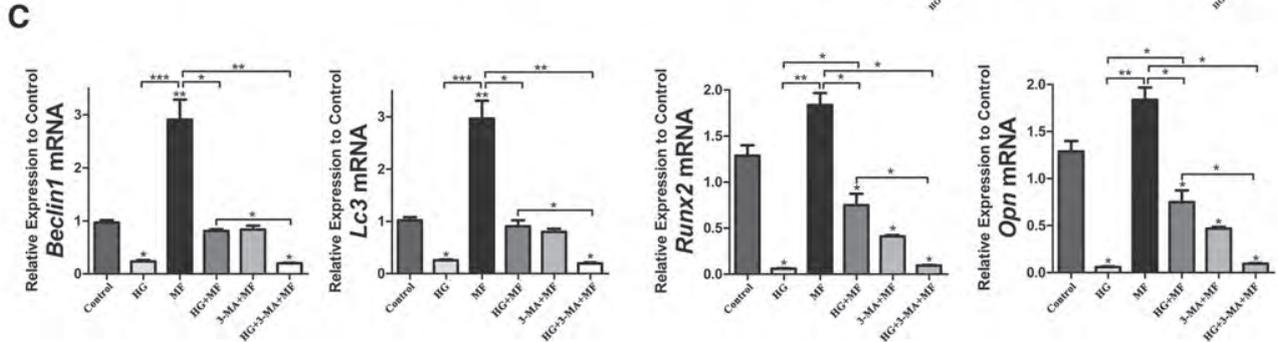
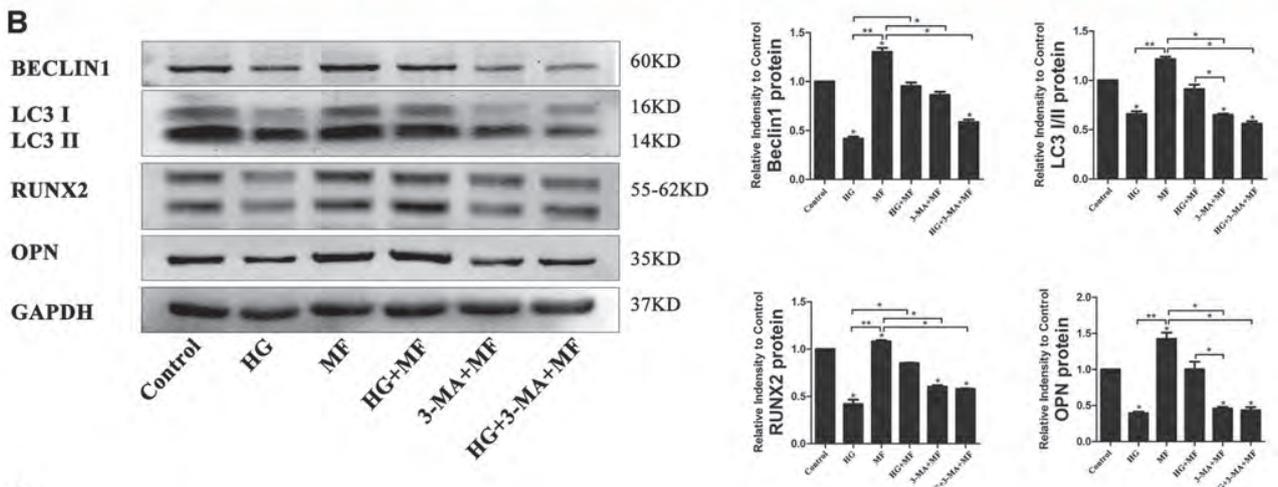
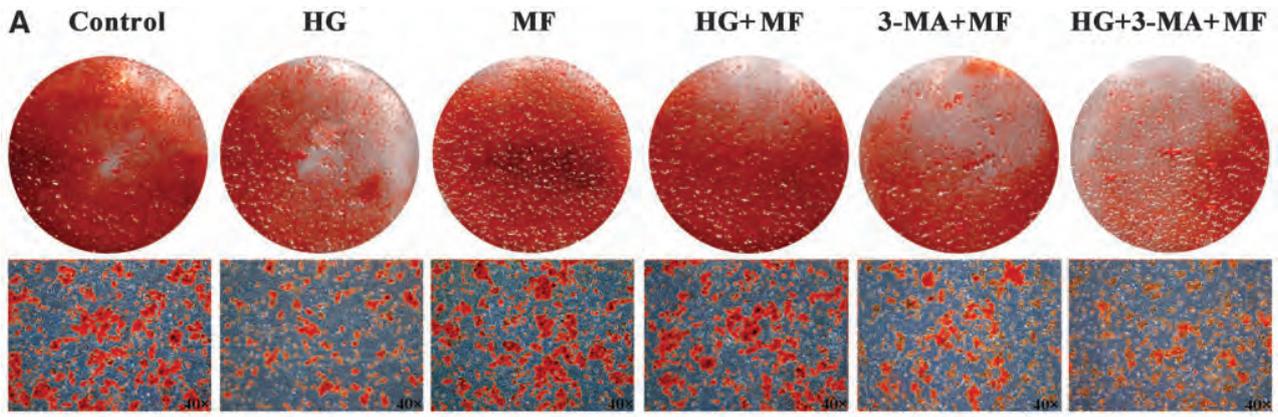
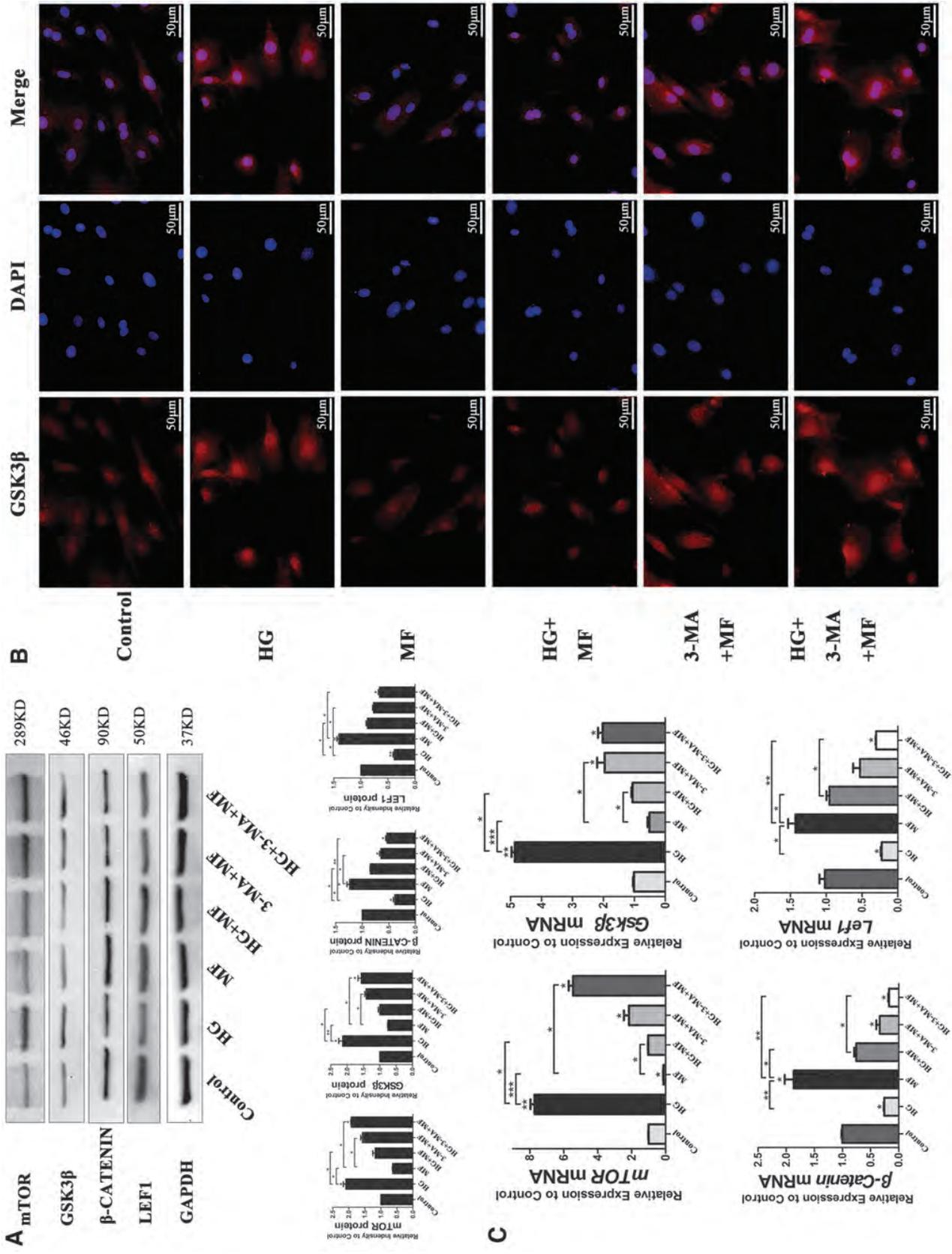


FIG. 4. Metformin alleviated the high glucose-induced damage to the osteogenic capacity of ASCs by activating autophagy. (A) The Alizarin red-S staining images showed that metformin was helpful for osteogenesis and promoted the production of mineralized nodules even in the HG+MF group. But after adding 3-MA, the size and the number of mineralized nodules were reduced, especially in the HG +3-MA+MF group; (B, C) the protein and gene expression of Beclin1 and LC3 I/II was downregulated in the 3-MA+MF group and the HG +3-MA+MF group. The expression of Runx2 and Opn was also decreased and could not recover in the HG +3-MA+MF group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. 3-MA, 3-methyladenine. Color images are available online.

FIG. 5. Metformin regulated Wnt signaling pathway. (A) Western blot image and bar graph showed that the expression of mTOR and GSK3 β was the lowest in the MF group, but was increased under the treatment of 3-MA. Because of the inhibitory effect of 3-MA on metformin, the expression of β -CATENIN and LEF1 was suppressed in the HG +3-MA+MF group. The activation effect of metformin on the expression of β -CATENIN and LEF1 was negatively influenced by 3-MA. (B) The red fluorescence showed the expression of GSK3 β of ASCs. It was obvious that the fluorescence signal of GSK3 β was weakest in the MF group, and it was weaker in the HG+MF group than the HG group and HG +3-MA+MF group. These images showed that GSK3 β was significantly inhibited by metformin. (C) The mRNA expression results of β -Catenin, LEF1, mTOR, and GSK3 β were consistent with western blot analysis, which demonstrated that the depress effect of metformin on GSK3 β activated the Wnt signaling pathway. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Color images are available online.



expressed in the HG group and downregulated by metformin in the HG+MF group. But metformin failed to work on GSK3 β in the presence of 3MA in the 3-MA+MF group and HG +3-MA+MF group (Fig. 5B).

Discussion

Although studies have reported that the risk of bone metabolic disease due to diabetes is not consistent across ethnic groups, it has become a global public health issue affecting over 422 million individuals all over the world [15–19]. It was found that skeletal fragility in diabetes caused an increased incidence of osteoporosis, a higher risk of fracture and poor bone healing [20]. Rodent models of diabetes proved that obesity, insulin resistance, and hyperglycemia of the T2D diabetes model caused skeletal abnormalities, including lower femoral cortical thickness, decreased stiffness, and abnormalities of multiple trabecular and cortical microarchitectural [21]. Studies of osteoblast cell lines based on diabetes and hyperglycemia environment also showed that diabetes has a significant negative effect on cell physiological function. Previous studies in my research group showed that the osteogenic differentiation ability of ASCs was significantly suppressed by advanced glycation end products, which is a kind of glucose and protein metabolites due to hyperglycemia [10,22]. In this study, we used high-dose glucose to simulate a hyperglycemia environment, and the results showed that the proliferation, migration, and osteogenic differentiation of ASCs are significantly inhibited, which is consistent with the published literature.

To solve the problem of osteogenic differentiation inhibition of ASCs with high glucose, we set our sights on the first-line hypoglycemic drugs, trying to find the positive effect of metformin on osteogenic differentiation of ASCs. Numerous researches give experimental evidence for a promising benefit of metformin for skeletal metabolism [23,24]. *In vitro* studies (Wang P et al.) found that metformin contributed to the differentiation of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell to osteoblast cell line by mediating the LKB1/AMPK pathway [25]. Agnieszka S et al. proposed that low concentration metformin promoted the metabolic activity of ASCs, while high-concentration metformin inhibited it [26]. On the flip side, high-concentration metformin had a stronger effect on osteogenesis, while low-concentration metformin appeared to have a weak effect. According to existing literatures, 0.1 mM metformin is a nontoxic concentration for different types of cells and showed good effects on osteogenic differentiation [11,12]. Therefore, the 0.1 mM metformin was used in our study as the treatment concentration. Our research data based on ASCs proved a positive effect of 0.1 mM metformin in expediting the osteogenic differentiation of ASCs. Most intuitively, there is a significant increase in the production of mineralized nodules visible to the naked eye after 0.1 mM metformin treatment. In addition, the expression of osteogenic markers and the Wnt signaling pathway was upregulated by metformin.

In recent years, the role of metformin as an autophagy activator has been gradually discovered. Our study analyzed the expression of autophagy key proteins Beclin1 and LC3 I/II, which was significantly inhibited under high-glucose conditions while was rescued by metformin. At the same time,

metformin decreased the expression of the negative regulatory factors of autophagy, mTOR, and p-GSK3 β (Fig. 3). Some research work has demonstrated that the disturbance of physiological activity of cells in a high-glucose environment is closely related to the change of autophagy level [27,28]. Metformin prominently regulates the osteoprotegerin-mediated inhibition of osteoclasts differentiation by upregulating the level of autophagy [29]. Another study on metformin showed that the autophagic capacity, antiaging ability, and osteogenic differentiation were positively improved after being treated with metformin every day [6]. In this study, we demonstrated that the high expression of autophagy-related genes and proteins altered by adding metformin, and their changes are positively correlated with osteogenic differentiation of ASCs. Therefore, the activating effect of metformin on autophagy maybe its key mechanism to promote osteogenesis.

With the development of autophagy study, researchers revealed that the negative regulator of autophagy is also an important factor affecting autophagy. A close relationship between autophagy level and cell osteogenesis was found not only in osteoblasts and osteoclasts but also in hematopoietic progenitors and macrophagocyte [30,31]. GSK3 β was reported to have negative regulatory effects on the autophagy pathway in cancer cells but also in other diseases [32,33]. Azoulay-Alfaguter et al. reported that a high level of GSK3 α and GSK3 β activated mTORC1 and suppressed Beclin1 expression in MCF-7 human breast cancer cells, contributing to cancer therapy [34]. It was also showed a negative correlation between Akt/GSK3 β / β -catenin signaling and autophagy in atrial fibrosis of human atrial fibroblasts [32]. Our data found that the inhibition of high glucose on the autophagy pathway was related to the over-expression of GSK3 β and mTOR1 in ASCs. Metformin appeared to inhibit the expression of GSK3 β while activating autophagy.

As we know, GSK3 β is also an important protein that inhibited the key factor, β -Catenin, in the Wnt signaling pathway [10,14,22,35]. Glucagon-like peptide-1 improved the glucose tolerance and insulin tolerance in a diabetic mouse model and promoted the expression of osteogenic markers via the Wnt/GSK3 β / β -catenin pathway [14]. The osteogenic differentiation ability of human BMSCs was activated by Ginsenoside Rg1 because of its inhibitory effect on GSK3 β [35]. What's more, it is worth noting that direct evidence showed that GSK3 β is a link factor between the autophagy pathway and the Wnt signaling pathway [36]. The authors proved that electroacupuncture pretreatment provided neuroprotective effects and ischemic stroke prevention by up-regulating autophagy and β -catenin through the inhibition of GSK3 β in the cerebral ischemia injury model. Therefore, based on the literature and our research, we believe GSK3 β might be an important connection point on the impetus of metformin on osteogenic differentiation of ASCs. When metformin activated the cell autophagy of ASCs, it also gave a negative feedback effect on GSK3 β . The expression suppression of GSK3 β by metformin relieved its inhibiting effect on the cell autophagy and Wnt signaling pathway ultimately promoted the recovery of osteogenic differentiation ability of ASCs. In our next stage, we will continue to in-depth study about the molecular mechanisms of metformin and GSK3 β regulating the osteogenic

differentiation of ASCs in the diabetic microenvironment and provide more experimental evidence to promote the application of metformin in bone repair and regeneration with diabetic osteoporosis.

Conclusion

Current results demonstrated that the expression of autophagy and the Wnt signaling pathway was significantly inhibited under the high-glucose culture environment, resulting in the damage of the osteogenic differentiation ability of ASCs. As an autophagy agonist, metformin resisted the negative effects of high glucose and restored the activity of autophagy and the Wnt signaling pathway, playing a positive role in the osteogenic differentiation process of ASCs. This study elaborated a mechanism of metformin reducing the inhibitory effect of high glucose on the osteogenic differentiation of ASCs by activating cellular autophagy and the Wnt signaling pathway, which provided a possibility for the application of metformin in transplantation of ASCs for bone repair under diabetes osteoporosis conditions.

Acknowledgments

The authors thank Oral & maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University for experimental equipments in this research.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This work was funded by National Natural Science Foundation of China (81870746), Program of Southwest Medical University (2019ZQN167, 2019ZQN143), Program of The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University (202017), Climb Plan Project of The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University (2020QY04), and Open Project of the State Key Laboratory of Oral Disease Research (SKLOD2021OF08).

References

- Hofbauer LC, CC Brueck, SK Singh and H Dobnig. (2007). Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 22:1317–1328.
- Tan J, L Zhou, Y Zhou, P Xue, G Wu, G Dong, H Guo and Q Wang. (2017). The influence of diabetes mellitus on proliferation and osteoblastic differentiation of MSCs. *Curr Stem Cell Res Ther* 12:388–400.
- Wallner C, S Abraham, JM Wagner, K Harati, B Ismer, L Kessler, H Zöllner, M Lehnhardt and B Behr. (2016). Local application of isogenic adipose-derived stem cells restores bone healing capacity in a type 2 diabetes model. *Stem Cells Transl Med* 5:836–844.
- Aung M, S Amin, A Gulraiz, FR Gandhi, JA Pena Escobar and BH Malik. (2020). The future of metformin in the prevention of diabetes-related osteoporosis. *Cureus* 12:e10412–e10418.
- Bahrambeigi S, B Yousefi, M Rahimi and V Shafiei-Irannejad. (2019). Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomed Pharmacother* 109:1593–1601.
- Lin J, R Xu, X Shen, H Jiang and S Du. (2020). Metformin promotes the osseointegration of titanium implants under osteoporotic conditions by regulating BMSCs autophagy, and osteogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 531:228–235.
- Djadjadikerta A, S Keshri, M Pavel, R Prestil, L Ryan and DC Rubinsztein. (2020). Autophagy induction as a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* 432:2799–2821.
- Greenhill C. (2016). Bone: autophagy regulates bone growth in mice. *Nat Rev Endocrinol* 12:4.
- Gao Y, Y Li, J Xue, Y Jia and J Hu. (2010). Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol* 635:231–236.
- Zhang M, Y Li, P Rao, K Huang, D Luo, X Cai and J Xiao. (2018). Blockade of receptors of advanced glycation end products ameliorates diabetic osteogenesis of adipose-derived stem cells through DNA methylation and Wnt signaling pathway. *Cell Prolif* 51:e12471–e12482.
- Ma J, Z-L Zhang, X-T Hu, X-T Wang and AM Chen. (2018). Metformin promotes differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells into osteoblast via GSK3 β inhibition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 7962–7968.
- Jia L, Y Xiong, W Zhang, X Ma and X Xu. (2020). Metformin promotes osteogenic differentiation and protects against oxidative stress-induced damage in periodontal ligament stem cells via activation of the Akt/Nrf2 signaling pathway. *Exp Cell Res* 386:111717.
- Ren J, T Liu, Y Han, Q Wang, Y Chen, G Li and L Jiang. (2018). GSK-3 β inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer. *Diagn Pathol* 13:33–43.
- Li Y, H Fu, H Wang, S Luo, L Wang, J Chen and H Lu. (2020). GLP-1 promotes osteogenic differentiation of human ADSCs via the Wnt/GSK-3 β /beta-catenin pathway. *Mol Cell Endocrinol* 515:110921.
- Koromani F, L Oei, E Shevroja, K Trajanoska, J Schoufour, T Muka, OH Franco, MA Ikram, MC Zillikens, et al. (2020). Vertebral fractures in individuals with type 2 diabetes: more than skeletal complications alone. *Diabetes Care* 43:137–144.
- Moayeri A, M Mohamadpour, SF Mousavi, E Shirzadpour, S Mohamadpour and M Amraei. (2017). Fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus and possible risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag* 13:455–468.
- Looker AC, MS Eberhardt and SH Saydah. (2016). Diabetes and fracture risk in older U.S. adults. *Bone* 82:9–15.
- Hothersall EJ, SJ Livingstone, HC Looker, SF Ahmed, S Cleland, GP Leese, RS Lindsay, J McKnight, D Pearson, et al. (2014). Contemporary risk of hip fracture in type 1 and type 2 diabetes: a national registry study from Scotland. *J Bone Miner Res* 29:1054–1060.
- World Health Organization. (2016). *World Health Organization: Global Report on Diabetes*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Rubin MR. (2017). Skeletal fragility in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1402:18–30.
- Gimble JM. (2011). Leptin's balancing act between bone and fat. *J Bone Miner Res* 26:1694–1697.

22. Li Y, L Wang, M Zhang, K Huang, Z Yao, P Rao, X Cai and J Xiao. (2020). Advanced glycation end products inhibit the osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signalling pathway via DNA methylation. *Cell Prolif* 53: e12834-e12847.
23. Hampp C, V Borders-Hemphill, DG Moeny and DK Wysowski. (2014). Use of antidiabetic drugs in the U.S., 2003-2012. *Diabetes Care* 37:1367-1374.
24. Jang WG, EJ Kim, IH Bae, KN Lee, YD Kim, DK Kim, SH Kim, CH Lee, RT Franceschi, HS Choi and JT Koh. (2011). Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone* 48:885-893.
25. Wang P, T Ma, D Guo, K Hu, Y Shu, HHK Xu and A Schneider. (2017). Metformin induces osteoblastic differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 12:437-446.
26. Agnieszka S, AT Krzysztof, K Katarzyna and M Krzysztof. (2018). Metformin promotes osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells and exerts pro-osteogenic effect stimulating bone regeneration. *J Clin Med* 7:482-507.
27. Zhou DM, F Reng, HZ Ni, LL Sun, LXiao, XQ Li, WD Li. (2020). Metformin inhibits high glucose-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *Aging* 12:5352-5361.
28. Zhao K, H Hao, J Liu, C Tong, Y Cheng, Z Xie, L Zang, Y Mu and W Han. (2015). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose-induced beta-cell injury through modulation of autophagy. *Cell Death Dis* 6:e1885-e1898.
29. Tong X, C Zhang, D Wang, R Song, Y Ma, Y Cao, H Zhao, J Bian, J Gu and Z Liu. (2020). Suppression of AMP-activated protein kinase reverses osteoprotegerin-induced inhibition of osteoclast differentiation by reducing autophagy. *Cell Prolif* 53:e12714-e12730.
30. Li Z, X Liu, Y Zhu, Y Du, X Liu, L Lv, X Zhang, Y Liu, P Zhang and Y Zhou. (2019). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase regulates osteogenic differentiation by modulating AMPK/ULK1-dependent autophagy. *Stem Cells* 37:1542-1555.
31. Chen Z, S Ni, S Han, R Crawford, S Lu, F Wei, J Chang, C Wu and Y Xiao. (2017). Nanoporous microstructures mediate osteogenesis by modulating the osteo-immune response of macrophages. *Nanoscale* 9:706-718.
32. Lin R, S Wu, D Zhu, M Qin and X Liu. (2020). Osteopontin induces atrial fibrosis by activating Akt/GSK-3beta/beta-catenin pathway and suppressing autophagy. *Life Sci* 245:117328.
33. Mancinelli R, G Carpino, S Petrunaro, CL Mammola, L Tomaipitca, A Filippini, A Facchiano, E Ziparo and C Giampietri. (2017). Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017:4629495.
34. Azoulay-Alfaguter I, R Elya, L Avrahami, A Katz and H Eldar-Finkelman. (2015). Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth. *Oncogene* 34: 4613-23.
35. Peng S, S Shi, G Tao, Y Li, D Xiao, L Wang, Q He, X Cai and J Xiao. (2021). JKAMP inhibits the osteogenic capacity of adipose-derived stem cells in diabetic osteoporosis by modulating the Wnt signaling pathway through intragenic DNA methylation. *Stem Cell Res Ther* 12:120-135.
36. Chen C, Q Yu, K Xu, L Cai, BM Felicia, L Wang, A Zhang, Q Dai, W Geng, J Wang and Y Mo. (2020). Electroacupuncture pretreatment prevents ischemic stroke and inhibits Wnt signaling-mediated autophagy through the regulation of GSK-3beta phosphorylation. *Brain Res Bull* 158:90-98.

Address correspondence to:

Dr. Jingang Xiao
Department of Oral Implantology
The Affiliated Stomatology Hospital
of Southwest Medical University
No. 2 Jiangyang South Road
Luzhou 646000
People's Republic of China

E-mail: drxiaojingang@163.com

Received for publication July 23, 2021

Accepted after revision August 30, 2021

Prepublished on Liebert Instant Online September 5, 2021

RESEARCH

Open Access



Downregulation of DNA methyltransferase-3a ameliorates the osteogenic differentiation ability of adipose-derived stem cells in diabetic osteoporosis via Wnt/ β -catenin signaling pathway

Maorui Zhang^{1,2†}, Yujin Gao^{1,3†}, Qing Li⁴, Huayue Cao¹, Jianghua Yang⁴, Xiaoxiao Cai^{2*} and Jingang Xiao^{1,3,4*} 

Abstract

Background: Diabetes-related osteoporosis (DOP) is a chronic disease caused by the high glucose environment that induces a metabolic disorder of osteocytes and osteoblast-associated mesenchymal stem cells. The processes of bone defect repair and regeneration become extremely difficult with DOP. Adipose-derived stem cells (ASCs), as seed cells in bone tissue engineering technology, provide a promising therapeutic approach for bone regeneration in DOP patients. The osteogenic ability of ASCs is lower in a DOP model than that of control ASCs. DNA methylation, as a mechanism of epigenetic regulation, may be involved in DNA methylation of various genes, thereby participating in biological behaviors of various cells. Emerging evidence suggests that increased DNA methylation levels are associated with activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. The purpose of this study was to investigate the influence of the diabetic environment on the osteogenic potential of ASCs, to explore the role of DNA methylation on osteogenic differentiation of DOP-ASCs via Wnt/ β -catenin signaling pathway, and to improve the osteogenic differentiation ability of ASCs with DOP.

Methods: DOP-ASCs and control ASCs were isolated from DOP C57BL/6 and control mice, respectively. The multipotency of DOP-ASCs was confirmed by Alizarin Red-S, Oil Red-O, and Alcian blue staining. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), immunofluorescence, and western blotting were used to analyze changes in markers of osteogenic differentiation, DNA methylation, and Wnt/ β -catenin signaling. Alizarin Red-S staining was also used to confirm changes in the osteogenic ability. DNMT small interfering RNA (siRNA), shRNA-Dnmt3a, and LVRNA-Dnmt3a were used to assess the role of Dnmt3a in osteogenic differentiation of control ASCs and DOP-ASCs. Micro-computed

[†]Maorui Zhang and Yujin Gao contributed equally to this work

*Correspondence: xcai@scu.edu.cn; dxiaojingang@163.com

¹ Department of Oral Implantology, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

² State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

tomography, hematoxylin and eosin staining, and Masson staining were used to analyze changes in the osteogenic capability while downregulating Dnmt3a with lentivirus in DOP mice *in vivo*.

Results: The proliferative ability of DOP-ASCs was lower than that of control ASCs. DOP-ASCs showed a decrease in osteogenic differentiation capacity, lower Wnt/ β -catenin signaling pathway activity, and a higher level of Dnmt3a than control ASCs. When Dnmt3a was downregulated by siRNA and shRNA, osteogenic-related factors Runt-related transcription factor 2 and osteopontin, and activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway were increased, which rescued the poor osteogenic potential of DOP-ASCs. When Dnmt3a was upregulated by LVRNA-Dnmt3a, the osteogenic ability was inhibited. The same results were obtained *in vivo*.

Conclusions: Dnmt3a silencing rescues the negative effects of DOP on ASCs and provides a possible approach for bone tissue regeneration in patients with diabetic osteoporosis.

Keywords: DNA methyltransferase-3a, Diabetic osteoporosis, Adipose-derived stem cells, Osteogenic differentiation, Wnt/ β -catenin signaling pathway

Background

Diabetic osteoporosis (DOP) is a systemic metabolic bone disease that involves bone mass reduction, destruction of the bone tissue microstructure, and prone fractures [1, 2]. The high glucose environment and metabolic disorders caused by diabetes disrupt physiological activities such as cell growth, proliferation, and differentiation [3]. Glucose metabolism disorders break the balance between osteogenesis and osteoclast processes, which reduces the numbers of osteoblasts and mesenchymal stem cells (MSCs), and activation of osteoclasts [4, 5]. The imbalance of bone metabolism also reduces the bone differentiation ability and makes it difficult to repair bone tissue and regenerate bone [6].

In recent years, bone tissue engineering technology has provided a new approach for regeneration of bone defects. Adult stem cells are a major element of bone regeneration and have become a major research topic [7–9]. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs), as a type of MSC, have a multi-directional differentiation potential for osteogenic, cartilage, and adipose cell lineages [10–12]. They are widely used in studies of bone defect repair and regeneration, and have positive application prospects. However, the proliferation and differentiation of ASCs may be affected in the diabetic environment. Therefore, it is worth exploring whether DOP-ASCs have a normal osteogenic differentiation ability.

DNA methylation is a mechanism of epigenetic regulation. It is generally believed that the hypermethylation status of DNA sequences is related to inhibition of gene expression [13, 14]. There are three kinds of DNA methyltransferases (DNMTs) in animals, namely DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b [15–17]. Studies have shown that DNMT3a is essential for establishment of mammalian DNA methylation during development [18, 19]. Scholars believe that the increased expression of DNMT3a regulates the increased DNA methylation

level [19, 20]. Under catalysis mediated by DNMTs, the cytosines of two nucleotides of CG in DNA are selectively conjugated with methyl groups to form 5-methylcytosine (5-MC). The occurrence of various skeletal diseases, which include osteoporosis and osteoarthritis, is closely related to impaired DNA methylation in stem cells [10, 13, 21].

The canonical Wnt pathway is activated when β -catenin transfers to the nucleus and binds to TCF/LEF in the nucleus to regulate target genes [22]. β -catenin and LEF1 may reflect the status of Wnt/ β -catenin pathway [23, 24]. Emerging evidence indicates that increased DNA methylation levels are associated with activation of Wnt/ β -catenin pathway [25–28]. Liu T et al. [26] reported that miR708-5p inhibits the expression of Dnmt3a, resulting in the reduced global DNA methylation and, preventing β -catenin nuclear transport, thereby inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. Exploring the role of DNA methylation in osteogenic differentiation of DOP-ASCs via Wnt/ β -catenin signaling is not only conducive to elucidate the mechanism of DOP, but also to develop bone tissue engineering.

In our previous study, we found that advanced glycation end products inhibit the osteogenic differentiation ability of normal ASCs with a high level of DNA methylation [5]. This suggested that DNA methylation is a cause of the decline in the osteogenic differentiation ability of DOP-ASCs in the diabetic environment. In this study, we isolated ASCs from control and DOP C57BL/6 mice and compared their osteogenic differentiation potentials. Moreover, we investigated whether DNA methylation inhibits the osteogenic differentiation potential of DOP-ASCs by modulating Wnt/ β -catenin signaling pathways.

Methods

Isolation and culture of ASCs and DOP-ASCs

All procedures that involved animals were reviewed and approved by the Southwest Medical University

Ethical Committee. Anesthesia and animal care were implemented by following the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (Ministry of Science and Technology of China, 2006). Adipose tissue in the inguinal region was collected from C57BL/6 DOP and control mice under sterile conditions. The adipose tissue was cut finely and fragments were seeded in 25-cm² culture flasks (Corning Inc., NY) and cultured in alpha-modified Eagle's medium (α -MEM, Hyclone, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone) and 1% penicillin/streptomycin (Hyclone) at 37 °C with 5% CO₂. The medium was changed every 3 days. Adherent cells were cultured and non-adherent cells were removed.

DOP-ASCs were passaged three times to obtain relatively pure ASCs. Osteogenic, adipogenic, and cartilage media (Cyagen, USA) were used to define the multipotential differentiation capacity of DOP-ASCs. DOP-ASCs (5×10^4 cells) were seeded in a 6-well plate for osteogenic induction. DOP-ASCs (1×10^5 cells) were also seeded for adipogenic induction. All cells were cultured for 21 days. Then, the cells were washed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h. Alizarin Red-S (osteogenic dye) and 0.3% Oil Red-O (adipogenic dye) were used to stain mineralized nodules and lipid droplets, respectively, for 30 min. The stained cells were imaged under an inverted phase contrast microscope (Nikon, Japan). For cartilage induction, DOP-ASCs (2.5×10^5 cells) were centrifuged and cell aggregates were cultured in cartilage medium. After 21 days, the cell aggregates were washed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. The cartilage pellets were imaged under a stereo fluorescence microscope (Carl Zeiss Microscopy, Germany). Then, they were embedded in paraffin and sections were stained with Alcian blue. Cartilage matrix was imaged under an optical microscope (Nikon).

Proliferation assay

A Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and xCelligence system for real-time cellular analysis (RTCA) (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) were used to assess cell proliferation. For the CCK-8 assay, cells were seeded in 96-well plates (Corning Inc.) at a density of 3×10^3 cells per well and cultured in α -MEM with 10% FBS for 5 days. A BioTek ELX800 (Bio-Tek, USA) was used to measure absorbance at 450 nm. For RTCA, cells were seeded in 96-well E-plates (Roche Diagnostics GmbH) at 3×10^3 cells per well. Cell proliferation in the RTCA SP xCelligence system was monitored in real-time as the impedance value over 5 days. Data were analyzed by the provided RTCA software.

Alizarin red-S staining

Mineralized nodule formation in ASCs was stained by Alizarin Red-S (Cyagen). DOP-ASCs and control ASCs (5×10^4 cells) in 6-well plates were treated with osteogenic medium for 21 days. Cells were then washed with PBS three times, fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, and stained with Alizarin Red-S for 30 min.

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted using a Total mRNA Extraction Kit (Takara Bio, Japan). cDNA was synthesized by reverse transcription using a Prime Script Reverse Transcription Reagent Kit (Takara Bio). Then, RT-PCR was conducted to measure the gene expression of Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), osteopontin (*Opn*), DNA methyltransferase 1/3a/3b (*Dnmt1/3a/3b*), β -catenin, and lymphoid enhancer-binding factor-1 (*Lef1*). Primer sequences are shown in Table 1. Samples were analyzed using a SYBR Premix ExTaq kit (Takara Bio), following the standard procedure, in an ABI 7900 system (Applied Biosystems, USA), which included melting curve analysis and obtaining CT values. The results were normalized to *Gapdh* CT values and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate gene expression.

Western blot assay

A Total Protein Extraction Kit (Keygen Biotech, China) was used to extract total cellular proteins. A bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was used to measure the protein concentration. Proteins were separated by 10% (v/v) sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and then

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

Genes		Sequence (5' → 3')
<i>Gapdh</i>	Forward	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG
	Reverse	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG
<i>Runx2</i>	Forward	CCGAAGTGGTCCGCACCGAC
	Reverse	CTTGAAGGCCACGGGCAGGG
<i>Opn</i>	Forward	GGATTCTGTGGACTCGGATG
	Reverse	CGACTGTAGGGACGATTGGA
<i>Dnmt1</i>	Forward	CCGAAGTGGTCCGCACCGAC
	Reverse	CTTGAAGGCCACGGGCAGGG
<i>Dnmt3a</i>	Forward	GAGGGAAGTGGAGACCCAC
	Reverse	CTGGAAGGTGAGTCTTGGCA
<i>Dnmt3b</i>	Forward	AGCGGGTATGAGGAGTGCAT
	Reverse	GGGAGCATCTTCGTGTCTG
β -Catenin	Forward	AAGTCTTGGCTATTACGACA
	Reverse	ACAGCACCTTCAGCACTCT
<i>Lef1</i>	Forward	ACAGATCACCCACCTTCTTG
	Reverse	TGATGGGAAAACCTGGACAT

transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane at 200 mA for 1 h. Tris-buffered saline with 0.05% (v/v) Tween-20 (TBST) was used to dissolve dry skimmed milk (Keygen Biotech). PVDF membranes were blocked with 5% dry skimmed milk for 1 h and then incubated with antibodies against GAPDH (ab181602), DNMT3a (ab188470), DNMT3b (ab79822), and OPN (ab91655) (Abcam, UK), RUNX2 (12556 s), DNMT1 (5032S), β -catenin (D10A8), or LEF1 (2230p) (Cell Signaling Technology, USA) for 1 day at 4 °C. Then, PVDF membranes were washed three times with TBST and incubated with a goat anti-rabbit secondary antibody (Beyotime, Shanghai, China) for 1 h. They were then washed again with TBST and developed with an enhanced chemiluminescence detection system (Bio-Rad, USA).

Immunofluorescence staining

Cells were seeded on round coverslips (Corning Inc.) and cultured for 4 days. After various treatments, the cells were carefully washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min. Then, they were blocked with 5% goat serum (Beyotime) for 1 h and incubated for 1 day at 4 °C with antibodies against RUNX2, OPN, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, 5-MC (28692S), β -catenin, or LEF1. The next day, the samples were incubated with a fluorescent dye-conjugated secondary antibody (Beyotime) for 1 h. Nuclei were counterstained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (Beyotime) for 10 min and phalloidin (Beyotime) was used to stain microfilaments

for 10 min. Cells were imaged under a laser scanning confocal microscope (Olympus, Japan).

Transfection of small interfering RNA (siRNA)

Small interfering RNA (siRNA) that targeted *Dnmt1*, *Dnmt3a*, and *Dnmt3b* was designed and provided by GenePharma Co., Ltd (Shanghai, China). siRNA sequences are shown in Table 2. DOP-ASCs (5×10^4 cells) were seeded in a 12-well plate before siRNA transfection. The transfection reagent (Lipofectamine 2000; Thermo Fisher Scientific) was diluted with Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Hyclone) and incubated at room temperature for 5 min. The siRNA was added to the diluted Lipofectamine 2000 and gently mixed to form the siRNA-lipofectamine-Opti-MEM complex. Then, the mixture was added to cells at 1 ml per well and incubated at 37 °C with 5% CO₂.

Transduction of shRNA-*Dnmt3a* and LVRNA-*Dnmt3a*

The *Dnmt3a* overexpression lentiviral vector (pLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro-CMV-*Dnmt3a*-3Flag) and *Dnmt3a*-silencing lentiviral vector (pLDK-CMV-EGFP-P2A-Puro-U6-shRNAD*Dnmt3a*) were designed and manufactured by OBiO Technology Corp., Ltd. (Shanghai, China). The oligonucleotide sequences of shRNA with *Dnmt3a* RNA interference targets are shown in Table 3. Various virus concentrations were used to determine the multiplicity of infection (MOI). The transduction efficiency was evaluated by analyzing the percentage of green fluorescent protein (GFP)-positive cells under a fluorescence microscope. ASCs at a density of 5×10^4 /ml were seeded in a 6-well plate at 2 ml per well. After 12 h of culture, the medium was replaced with a lentivirus suspension medium (MOI:80; 0.6 μ g/ml puromycin; 5 μ g/ml polybrene). The gene and protein expression were analyzed by RT-PCR and western blotting, respectively, after 4 days of osteogenic induction and their osteogenic ability was assessed by Alizarin Red-S staining after induction for 21 days.

Analysis of DOP-ASCs seeded on BCP by scanning electron microscopy (SEM)

Before seeding DOP-ASCs, scaffolds sterilized by ultraviolet light were placed in 12-well plates. Then, 1 ml of

Table 2 siRNA sequences for gene silencing

siRNA		Sequence (5' → 3')
<i>Dnmt1</i>	Sense	CCGAAGAUAACAUCACCAATT
	Antisense	UUGGUGAGUUGAUUCUGGTT
<i>Dnmt3a</i>	Sense	CCAUGUACCGCAAAGCCAUTT
	Antisense	AUGGCUUUGCGGUACAUGGTT
<i>Dnmt3b</i>	Sense	CCUCAAGACAAAUAGCUAUTT
	Antisense	AUAGCUAUUUGUCUUGAGGTT
Negative control	Sense	UUCUUCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

Table 3 Dnmt3a shRNA sequences

5'		STEM	Loop	STEM	3'
sh-Dnmt3a-F	Ccgg	CCACCAGGTCAAACCTCTAT	TTCAAGAGA	ATAGAGTTTGACCTGGTGG	TTTTTTg
sh-Dnmt3a-R	aattcaaaaa	CCACCAGGTCAAACCTCTAT	TCTCTTGAA	ATAGAGTTTGACCTGGTGG	
sh-NC-F	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	TTTTTTg
sh-NC-R	AATCAAAAAA	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TCTCTTGAA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	

passage 2 DOP-ASCs at a density of 5×10^4 /ml was seeded on the surface of BCP in each well. After culture at 37 °C with 5% CO₂ for 3 days, samples were fixed with paraformaldehyde. After alcohol gradient dehydration, critical point drying, and spraying the cells with gold, scaffolds were observed by SEM.

Implantation of BCP seeded with DOP-ASCs transduced with shRNA into a DOP mouse model with critically sized calvarial defects

DOP-ASCs were divided into DOP-blank, negative control, and Dnmt3a shRNA groups. DOP-ASCs infected with the silence-Dnmt3a lentivirus were cultured in osteogenic induction medium. A 1-ml cell suspension (5×10^4 cells/ml) was added to the surface of BCP in a 12-well plate and cultured for 48 h. Nine DOP mice received calvarial surgery to establish critically sized calvarial defect models. After anaesthetization, the DOP mice were subjected to prone fixation, skin preparation, and disinfection at the top of the skull. An incision was made along the median of the calvarium and the periosteum was bluntly separated to expose the calvarial bone surface. Then, a 4-mm diameter trephine bur was applied to drill a standardized round defect on the side of the sagittal suture. A 0.9% saline solution was used to irrigate the skull surface during drilling. Subsequently, the BCP seeded with DOP-ASCs was implanted into the skull defect area and the periosteum and dermis were sutured in position. After 8 weeks, mice were euthanized and skull specimens were obtained.

Micro-computed tomography (Micro-CT), hematoxylin and eosin staining (HE) staining, and Masson staining

At 8 weeks, the calvarium was removed intact and fixed in freshly prepared 4% formaldehyde for 24 h at 4 °C. Micro-CT scans of skull defects were performed to observe new bone formation. Then, three-dimensional reconstructed images were analyzed. The ratio of the bone volume to total volume available in the scaffold (BV/TV) was calculated. A high ratio indicated that more bone had grown into the scaffolds. Then, tissue samples of the mouse skull defect were decalcified for HE and Masson staining. Next, the samples were dehydrated in an alcohol gradient, clarified, and embedded in paraffin for sectioning. Lastly, the sections were stained with hematoxylin and eosin and Masson trichrome.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times independently. Two group comparisons were made by the independent-samples t-test and multiple comparisons were made by one-way ANOVA with SPSS 18.0 software

(SPSS Inc., Chicago, USA). $P < 0.05$ was regarded to be statistically significant.

Results

Cell proliferation and multipotent differentiation of DOP-ASCs

ASCs from inguinal adipose tissue were isolated and passaged three times (Fig. 1A). RTCA (Fig. 1B) and CCK-8 assays (Fig. 1D) showed that the proliferation rate of the DOP group was relatively lower than that of the control group. After culture in osteogenic and adipogenic media, the morphology of DOP-ASCs had distinctly changed to osteogenic-like in osteogenic medium and adipose-like in adipogenic medium (Fig. 1C). In cartilage medium, ASCs were aggregated to culture for 21 days and then stained with Alcian blue to indicate cartilage-like cells. The findings demonstrated the multipotency of DOP-ASCs (Fig. 1C).

Osteogenic differentiation capacity decreases in DOP-ASCs

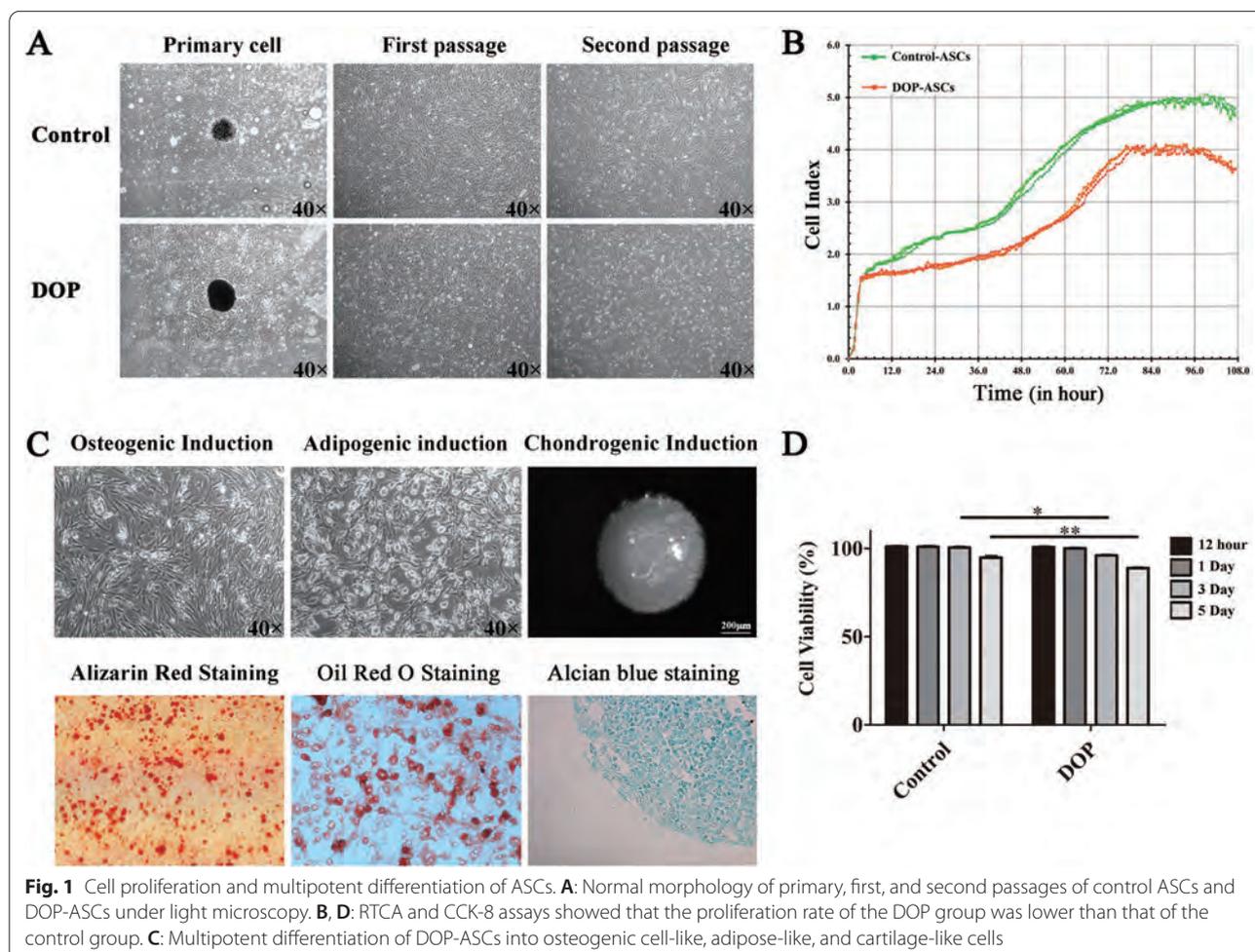
To investigate the osteogenic differentiation capacity, we cultured control ASCs and DOP-ASCs to analyze mineralized nodule formation as well as gene and protein expression of OPN and RUNX2. Alizarin Red-S staining showed that the degree of mineralized nodule formation was reduced in DOP-ASCs compared with control ASCs (Fig. 2A). RT-PCR showed that the mRNA levels of *Runx2* and *Opn* in DOP-ASCs were significantly lower than those in control ASCs at 3 and 7 days (Fig. 2B). The protein levels of OPN and RUNX2 were analyzed by immunofluorescence and western blotting, which showed that the fluorescence signals (Fig. 2C) and band intensities (Fig. 2D) at 4 days in DOP-ASCs were weaker compared with those in control ASCs.

DNA methylation increases in DOP-ASCs

DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b are major enzymes in DNA methylation and 5-MC is the product of this process. We analyzed the expression of these factors by RT-PCR, western blotting, and immunofluorescence. The expression of *Dnmt1*, *Dnmt3a*, and *Dnmt3b* in DOP-ASCs increased compared with that in control ASCs (Fig. 3A, B). Immunofluorescence confirmed the increases in 5-MC, DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b at 4 days (Fig. 3C–F).

Wnt/ β -Catenin signaling pathway is suppressed in DOP-ASCs

The Wnt/ β -Catenin signaling pathway is a major regulatory pathway in the process of osteogenic differentiation [29, 30]. Therefore, the main factors, which included *β -catenin* and *Lef1*, were detected to demonstrate the activation level of Wnt/ β -Catenin signaling pathway.



RT-PCR showed that the expression of β -catenin and *Lef1* decreased in DOP-ASCs compared with that in CON-ASCs, and the results of western blotting were consistent with those of RT-PCR (Fig. 4A, B). Immunofluorescence confirmed that the expression of β -catenin and LEF1 was low in DOP-ASCs (Fig. 4C, D).

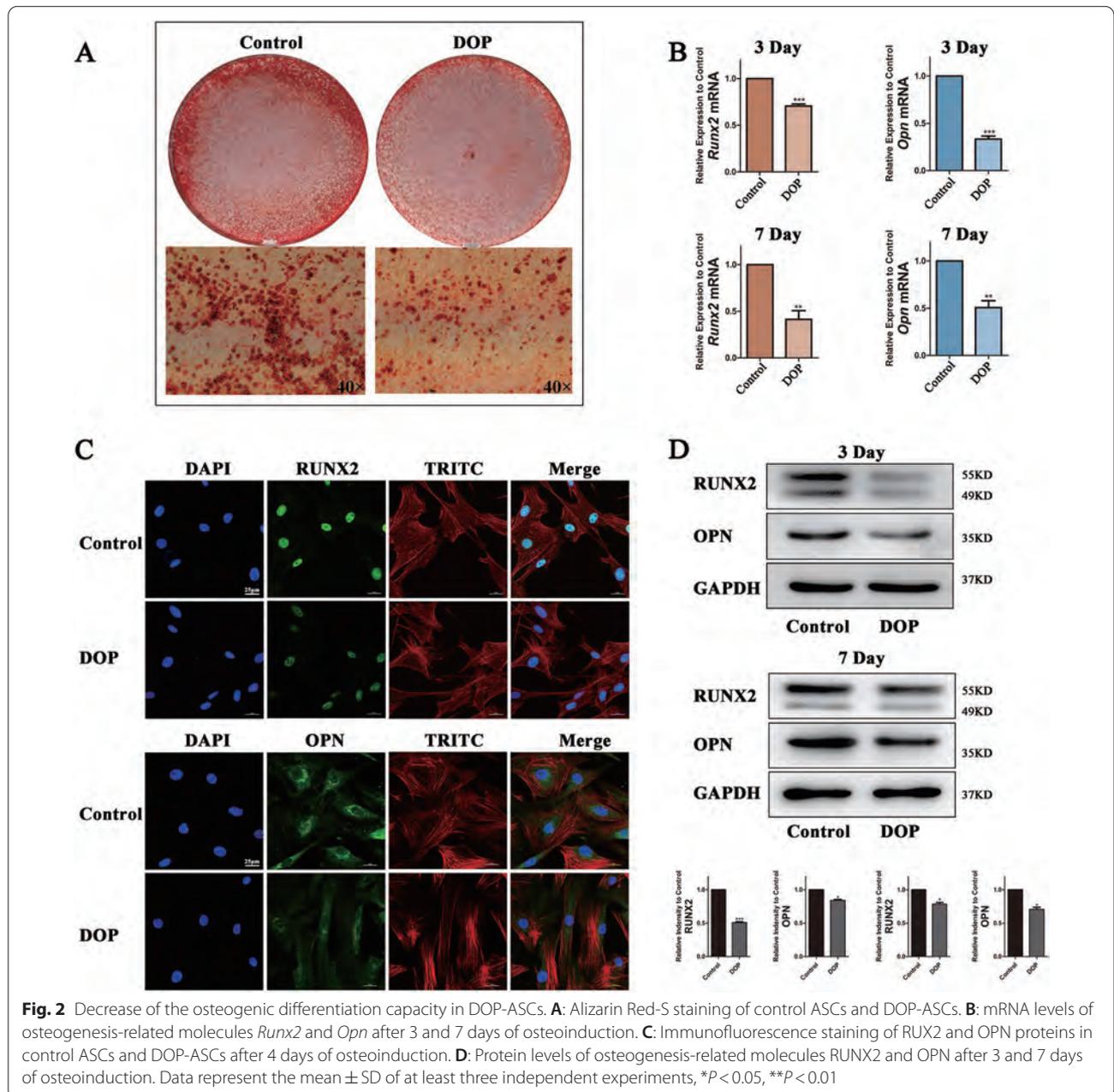
Inhibiting DNA methyltransferases rescues loss of the osteogenic potential in DOP-ASCs

The results showed that the reduced osteogenic differentiation capacity of DOP-ASCs was related to increases in DNA methylation levels and suppression of Wnt/ β -Catenin signaling pathway. Next, we used siRNA to inhibit the expression of DNA methylation enzymes and explored the relationship between DNA methylation and the osteogenic differentiation ability of DOP-ASCs. After siRNA treatment, the formation of mineralized nodules was increased when the DNA methylation level was downregulated (Fig. 5A). RT-PCR and western blotting showed that RUNX2 was increased in Dnmt1-siRNA, Dnmt3a-siRNA, and Dnmt3b-siRNA groups, and OPN

was particularly increased in the Dnmt3a-siRNA group (Fig. 5B, C). In terms of Wnt/ β -Catenin signaling pathway, β -catenin and LEF1 were upregulated after siRNA treatment and their expression was the highest in the Dnmt3a-siRNA group compared with the other groups (Fig. 5D, E). These data suggested that downregulation of Dnmt3a inhibited osteogenic differentiation and activity of Wnt/ β -Catenin signaling pathway.

Knockdown of Dnmt3a promotes osteogenic differentiation of DOP-ASCs

To further demonstrate the effect of Dnmt3a on osteogenic differentiation of DOP-ASCs, we used lentiviruses to knockdown or overexpress Dnmt3a in DOP-ASCs. The cells were successfully infected by the lentiviruses and showed green fluorescence at an MOI of 80 (Fig. 6A). RT-PCR and western blotting showed that Dnmt3a was successfully knocked down by Dnmt3a shRNA and overexpressed by Dnmt3a LVRNA. 3-Flag was a marker of positive overexpression (Fig. 6B, D). Immunofluorescence confirmed the differences in expression of



DNMT3a among the DOP-blank group, Negative Control, Dnmt3a shRNA and Dnmt3a LVRNA. (Fig. 6C).

Next, we found that the formation of mineralized nodules was the highest in the Dnmt3a shRNA group and the lowest in the Dnmt3a LVRNA group (Fig. 7A). Expression of *Opn* and *Runx2* was upregulated in the Dnmt3a shRNA group compared with the other three groups and the results of western blot assays were consistent with those of RT-PCR (Fig. 7B–D). Detection of osteogenic differentiation by Alizarin Red-S staining, RT-PCR, and western blotting showed that knockdown

of Dnmt3a rescued the osteogenic differentiation capacity of DOP-ASCs. Although Dnmt3a LVRNA treatment decreased the expression of β -catenin and *Lef1* compared with DOP-ASC and negative control groups, the expression of these factors was recovered by Dnmt3a shRNA treatment. This suggested that the low activity of the Wnt signaling pathway in DOP-ASCs was recovered by knocking down Dnmt3a (Fig. 7E–G). Taken together, these results suggested that knockdown of Dnmt3a decreased the DNA methylation level, alleviated inhibition of Wnt by DNA methylation,

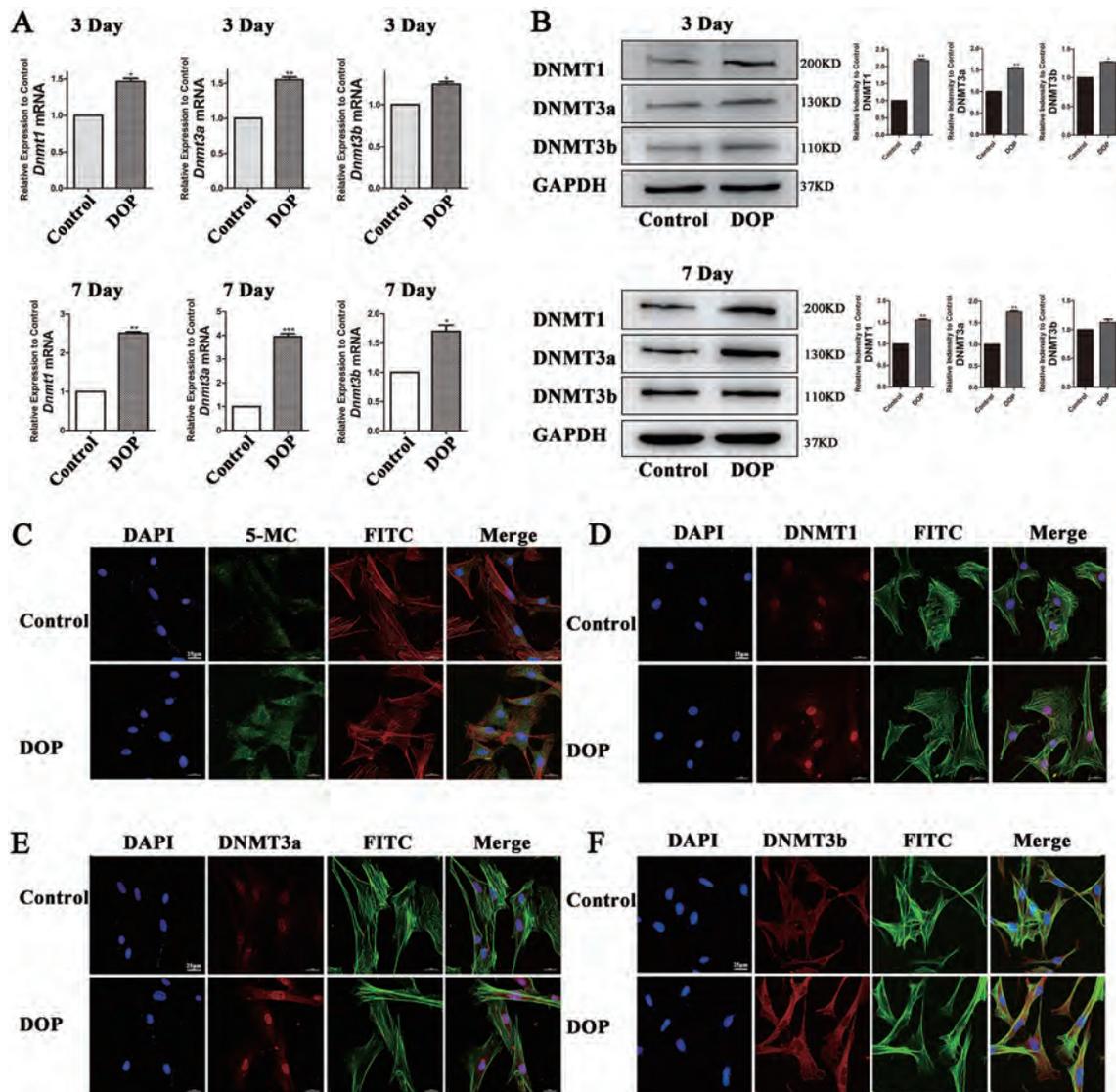


Fig. 3 Increase of the DNA methylation level in DOP-ASCs. **A, B:** RT-PCR and western blot analyses showing that the expression of Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b in DOP-ASCs was increased compared with that in control ASCs. **C, D:** Immunofluorescence showing increases in 5-MC, DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b after 4 days of osteoinduction. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

and rescued the loss of the osteogenic capacity of DOP-ASCs.

Downregulation of Dnmt3a promotes the osteogenic capacity of DOP-ASCs in vivo

RT-PCR and western blotting showed that Dnmt3a was successfully knocked down by Dnmt3a shRNA (Fig. 8A, B). SEM and fluorescence microscopy showed that DOP-ASCs grew adherently on the surface and pores of BCP (Fig. 8C). The DOP mouse model with critically sized calvarial defects was successfully established and BCP seeded with transfected DOP-ASCs were implanted into

the defect area (Fig. 8D). Eight weeks later, Micro-CT showed new bone matrix on BCP at sagittal and coronal levels. Three-dimensional reconstruction showed that the amount of new bone matrix in the Dnmt3a shRNA group was significantly larger than that in DOP-ASC and negative control groups. BV/TV, BS/BV, and TbTh analyses further demonstrated that the osteogenic capacity was greatly increased when Dnmt3a was downregulated by shRNA in vivo (Fig. 9A, B). HE and Masson staining were also used to observe the osteogenic capacity of DOP-ASCs in vivo. HE staining showed new bone matrix as red and Masson staining showed new bone matrix as

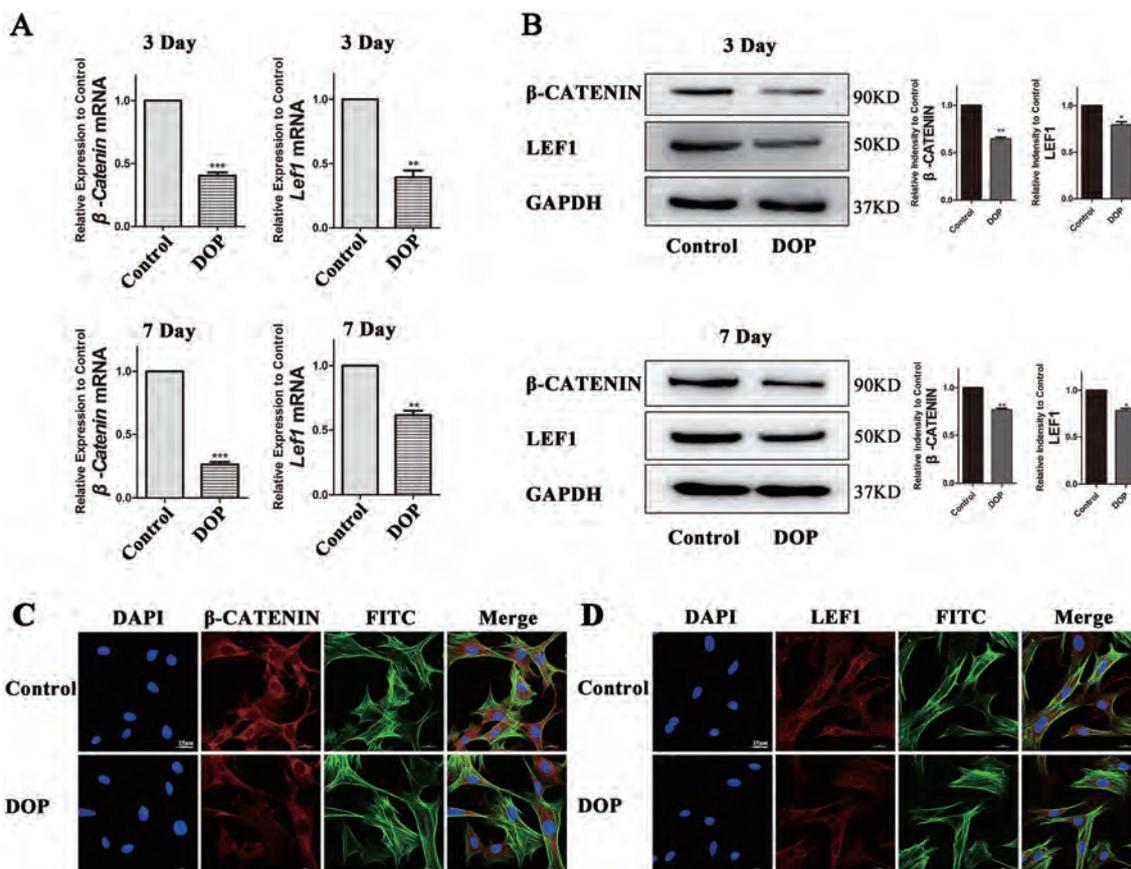


Fig. 4 Wnt/ β -Catenin signaling pathway is suppressed in DOP-ASCs. **A, B**: RT-PCR and western blot analyses showing that the expression of β -catenin and LEF1 was decreased compared with that in CON-ASCs. **C, D**: Immunofluorescence staining of β -catenin and LEF1. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

blue. Both staining showed that the staining degree in the Dnmt3a shRNA group was stronger than that in DOP-ASC and negative control groups (Fig. 9C). These results suggested that knockdown of Dnmt3a rescued the loss of the osteogenic capacity of DOP-ASCs.

Discussion

Many studies have shown that hyperglycemia and the glycolytic metabolites of diabetes decrease cell viability and proliferation, and even promote apoptosis of MSCs, which impairs osteogenic differentiation [29–33]. Heilmeyer et al. found that serum miR-550a-5p inhibited the osteogenic differentiation of ASCs in postmenopausal women with type 2 diabetes [34]. Liu et al. reported that osteogenic differentiation of hPDLSCs was significantly inhibited in a high glucose environment and the levels of osteoblast-related factors expressed by cells were reduced significantly [35]. In this study, DOP-ASCs were isolated from DOP mice by the tissue block method, which had osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation

abilities. However, the expression of osteogenic-related genes *Runx2* and *Opn* was downregulated in DOP-ASCs compared with control ASCs, which demonstrated inhibition of the differentiation process of DOP-ASCs to osteoblasts.

The differentiation of MSCs into osteogenic progenitor cells is regulated by various growth factors and signaling pathways [36, 37]. The Wnt/ β -Catenin signaling pathway plays a major role in regulating the proliferation and differentiation of MSCs. Activation of Wnt/ β -Catenin signaling pathway promotes osteogenic differentiation of ASCs [38, 39]. Moldes et al. reported that β -catenin expression was higher in 3T3-L1 precursor adipocytes and the expression level of β -catenin was significantly reduced during adipogenesis [40]. In our previous studies, after activation of Wnt/ β -Catenin signaling pathway, the expression of Wnt-related signaling molecules, such as β -catenin and LEF1, was upregulated in normal ASCs, which promoted the expression of osteogenic differentiation factors such as *Opn* and *Runx2* [5, 41]. In this

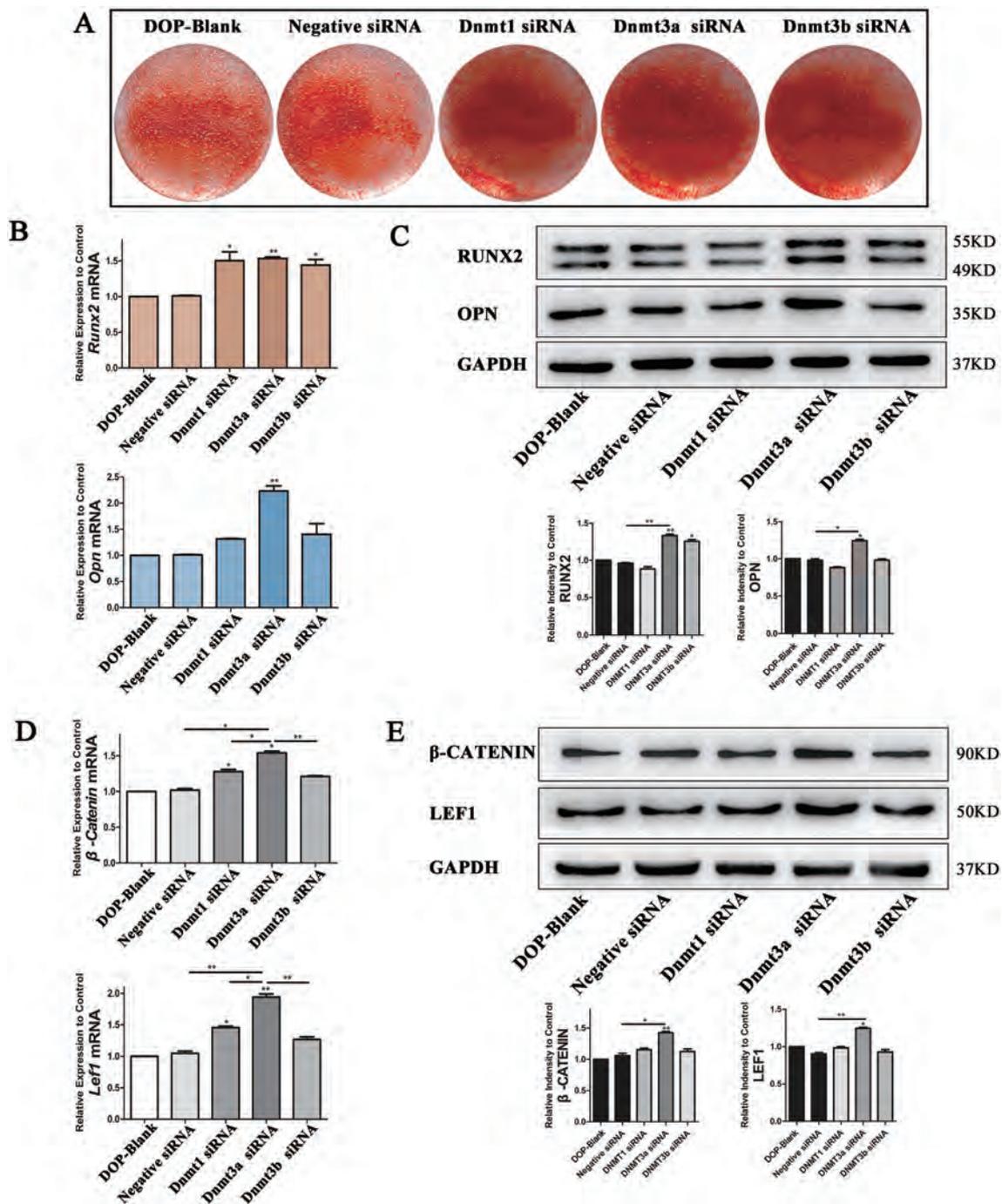
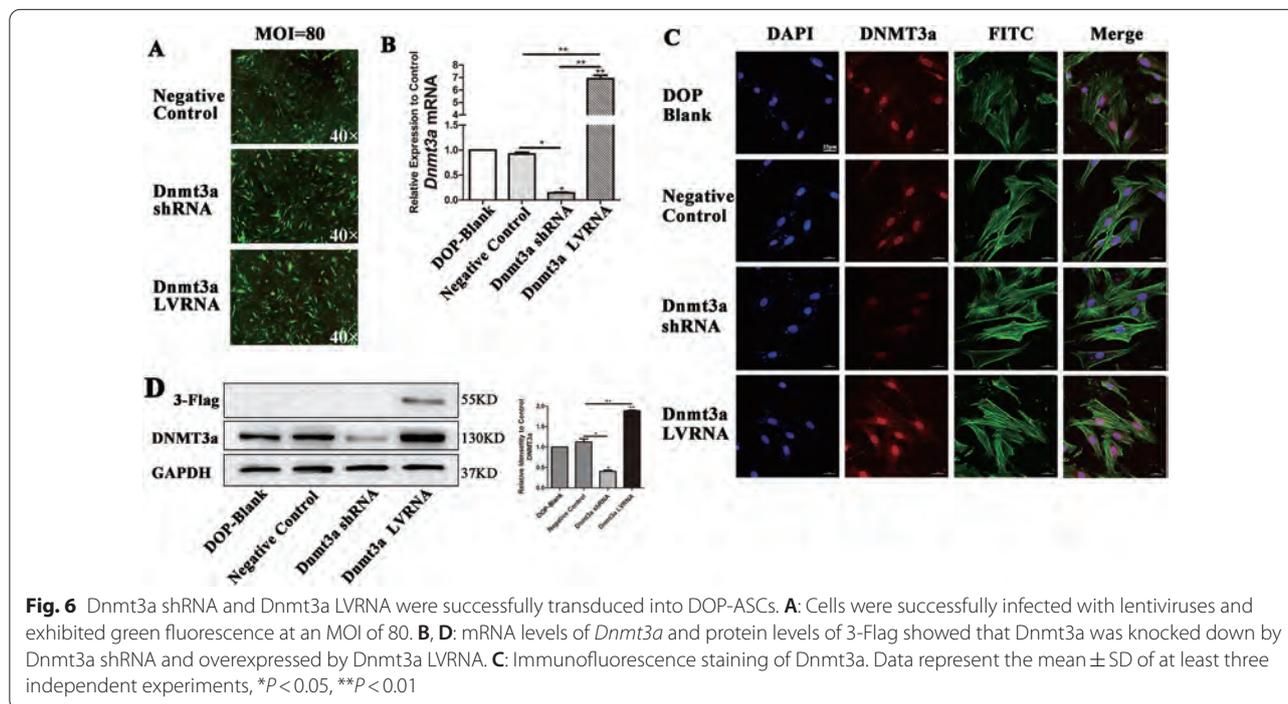


Fig. 5 *Dnmt* siRNAs increase the osteogenic potential of DOP-ASCs. **A:** Alizarin Red-S staining showing that the formation of mineralized nodules in *Dnmt3a* shRNA was increased compared with that in Negative Control after *Dnmt* siRNA treatment of DOP-ASCs (osteoinduction for 21 days). **B–E:** mRNA and protein levels of Wnt/ β -Catenin signaling pathway markers and osteogenesis-related molecules were upregulated after *Dnmt* siRNA transfection into DOP-ASCs (osteoinduction for 4 days). Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$



study, we compared DOP-ASCs and control ASCs and demonstrated that osteogenic differentiation and Wnt/ β -Catenin signaling pathway were suppressed in ASCs of DOP mice.

The high glucose environment caused by diabetes increases DNA methylation in cells, which affects their differentiation processes [42, 43]. Many studies have suggested that DNA methylation is involved in the osteogenic differentiation of stem cells [44–48]. Wang et al. reported that KDM6A promoted chondrogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by demethylation of SOX9 [49]. Zhang et al. reported that a demethylated Runx2 gene in bone marrow mesenchymal stem cells promoted their differentiation into osteoblasts [47]. These studies showed that, during the process of osteogenic differentiation of ASCs, the DNA methylation levels of osteogenesis-specific genes *Dlx5* and *Runx2*, and the CpG island region of the Osterix promoter were downregulated significantly, and the expression of these genes was upregulated. Seman et al. found that the DNA methylation level of the promoter region of the *SLC30A8* gene in a diabetic population was higher than that in non-diabetic patients, which suggested that high DNA methylation of the *SLC30A8* gene affects the occurrence of diabetes [50]. We observed that the DNA methylation levels and expression of DNMT genes in DOP-ASCs were upregulated significantly. After decreasing DNMTs by siRNA, we found that the expression of osteogenic differentiation factors *RUNX2* and *OPN* was relatively

increased, which indicated that DNA methylation had a close relationship with the osteogenic differentiation process of ASCs.

DNA methylation at specific sites is catalyzed by DNMTs, which might play various roles in cell differentiation. Dnmt3a, as the main methyltransferase in embryonic development and differentiation, is mainly located in the chromatin region and is highly expressed in oocytes, spermatogonia, and stem cells [51, 52]. Mark A. Casillas Jr NL et al. found that the expression of Dnmt3a was highly abundant in oocytes, but gradually decreased during maturation [53]. They observed that the overall methylation level of genomic DNA in senescent cells was reduced, which corresponded to the decrease in expression of Dnmt1, while some genes were hypermethylated with high expression of Dnmt3a and Dnmt3b [53]. Disturbances in epigenetic regulation may be a factor that contributes to diseases [54, 55]. In our study, RNA interference was used to silence the expression of Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b. Silencing of Dnmt3a promoted the expression of bone-related genes and Wnt/ β -Catenin signaling pathway-related genes were induced, thereby promoting the osteogenic differentiation of DOP-ASCs. Overexpression of Dnmt3a by lentivirus infection confirmed that Dnmt3a significantly inhibited the expression of osteogenic-related genes and Wnt/ β -Catenin signaling pathway in DOP-ASCs and the osteogenic differentiation ability of DOP-ASCs was restored after inhibition of Dnmt3a.

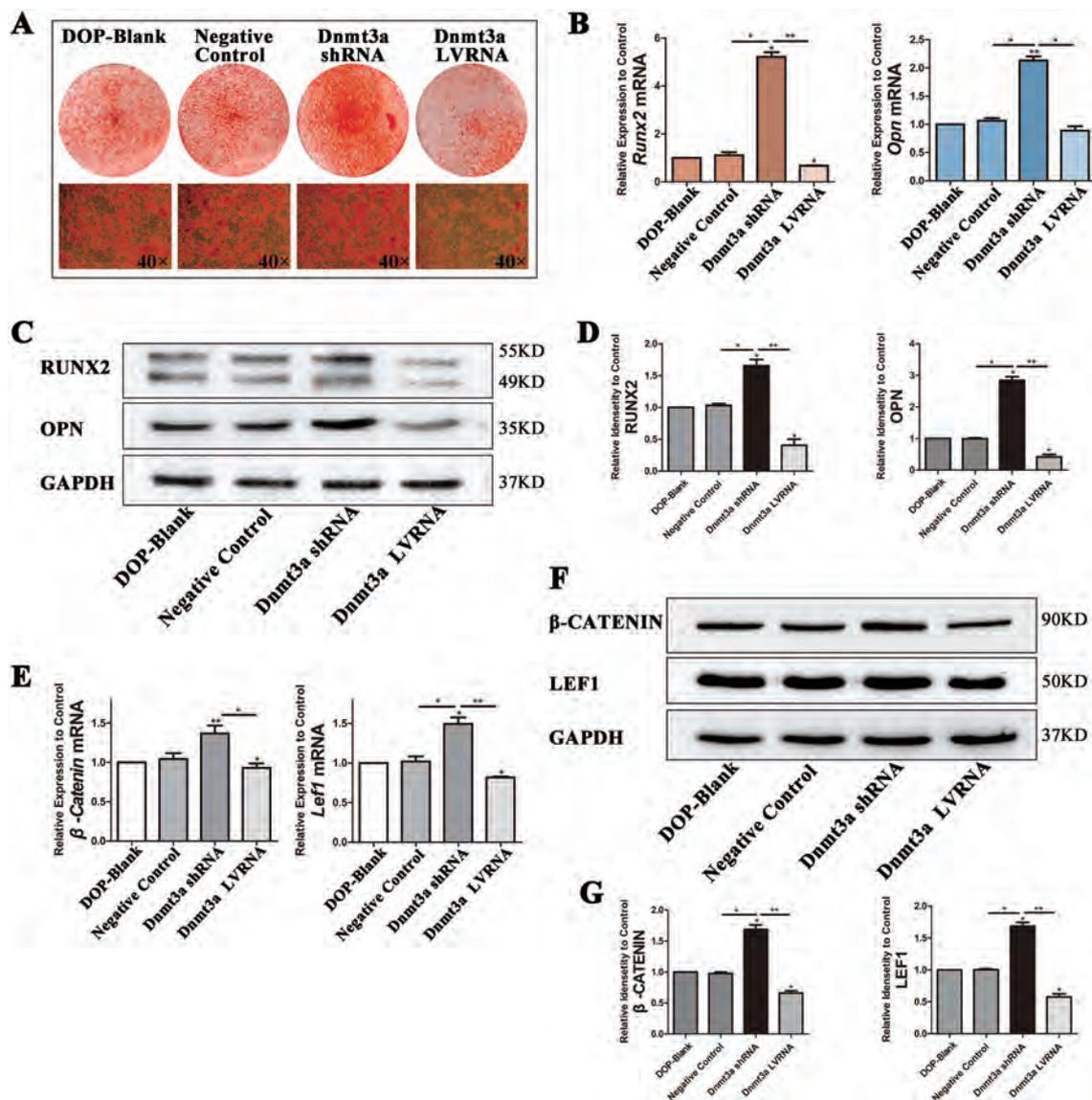


Fig. 7 Knockdown of Dnmt3a promotes osteogenic differentiation of DOP-ASCs. **A:** Alizarin Red-S staining showing that the formation of mineralized nodules was the highest in the Dnmt3a shRNA group and the lowest in the Dnmt3a LVRNA group (osteinduction for 21 days). **B–D:** mRNA and protein levels of osteogenesis-related molecules were upregulated in the Dnmt3a shRNA group compared with the other three groups (osteinduction for 4 days). **E–G:** mRNA and protein levels of Wnt signaling pathway markers were recovered by knockdown of Dnmt3a. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

We also confirmed the osteogenic effects of Dnmt3a in DOP mice in vivo. BCP is considered to be a biomaterial with high porosity and penetration, which creates a favorable microenvironment for bone regeneration [56, 57]. Tang et al. implanted various BCP scaffolds into a critically sized bone defect model in OVX rats and applied Micro-CT to analyze new bone formation [58–60]. In our study, we seeded DOP-ASCs on BCP and implanted the scaffold into a mouse critically sized

skull defect to assess the osteogenic capacity in vivo. Three-dimensional reconstruction of Micro-CT images showed that new bone formation in the Dnmt3a shRNA group had obviously increased compared with that in DOP-ASC and negative control groups. Furthermore, histology of the corresponding tissue samples was consistent with the results of Micro-CT, i.e., the amount of new bone formation in the Dnmt3a shRNA group was more obvious than that in DOP-blank and Negative Control.

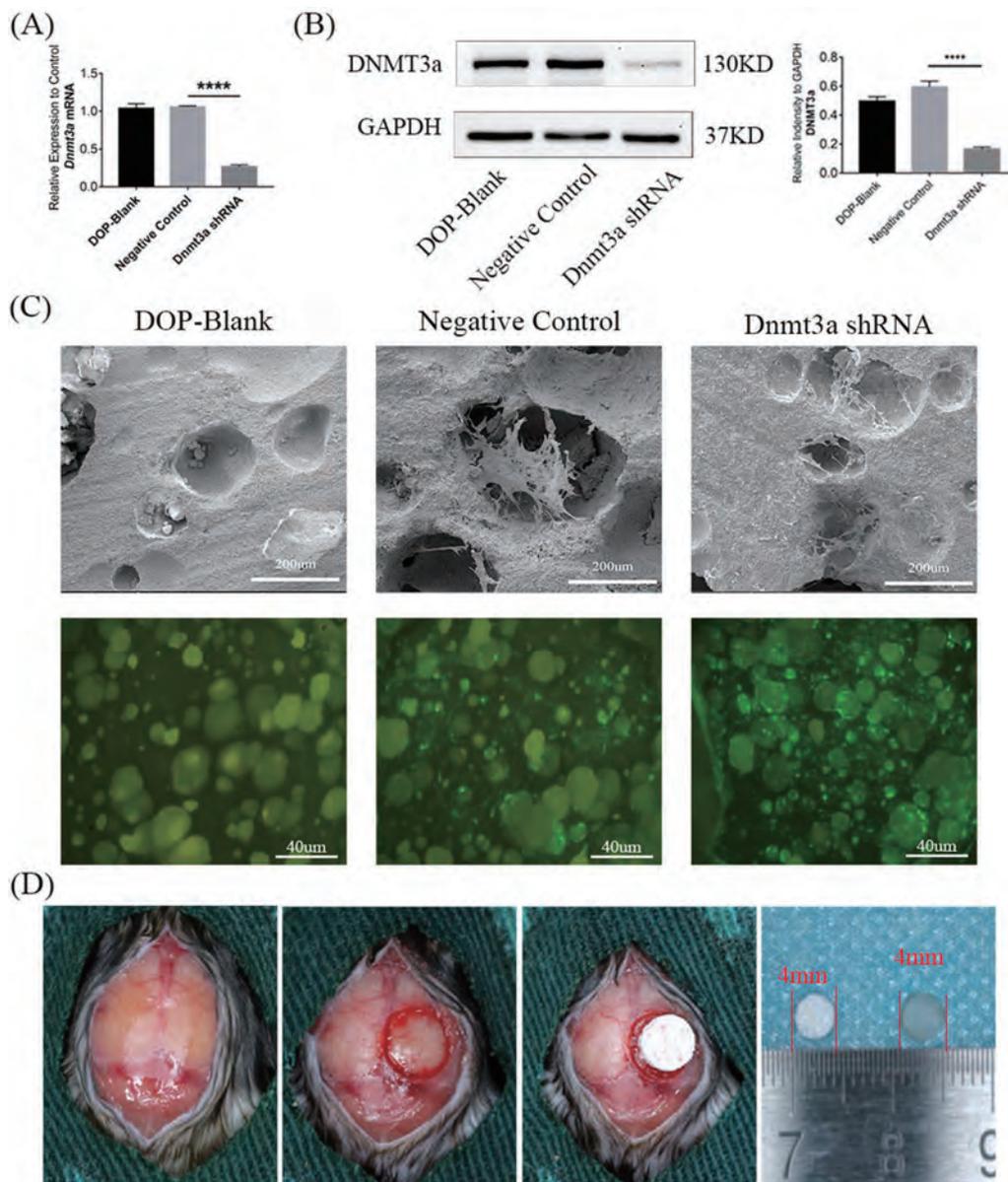


Fig. 8 BCP was successfully implanted into the skull defect of mice. BCP seeded with transfected DOP-ASCs were implanted into critically sized calvarial defects in DOP mouse models. **A, B:** mRNA and protein levels of Dnmt3a were successfully knocked down by Dnmt3a shRNA (osteinduction for 3 days). **C:** SEM and fluorescence microscopy showing that DOP-ASCs grew adherently on the surface and pores of BCP. **D:** The DOP mouse model with critically sized calvarial defects was successfully established and BCP seeded with transfected DOP-ASCs were implanted into the defect area

DOP has become a severe public health problem. DNA methylation as a kind of stable epigenetic alteration is involved in bone formation and resorption [61]. Epigenetic modifications play an important role in cell differentiation and development [62]. Many studies have demonstrated that DNA methylation is a therapeutic target for bone diseases [61]. Our study

demonstrated that a high level of Dnmt3a may impair the osteogenic ability of ASCs, and the osteogenic differentiation ability of DOP-ASCs was restored after inhibition of Dnmt3a. Therefore, this study explains the decrease in the osteogenic capacity of DOP-ASCs from the viewpoint of epigenetics and provides a potential therapeutic target for the prevention and treatment of DOP.

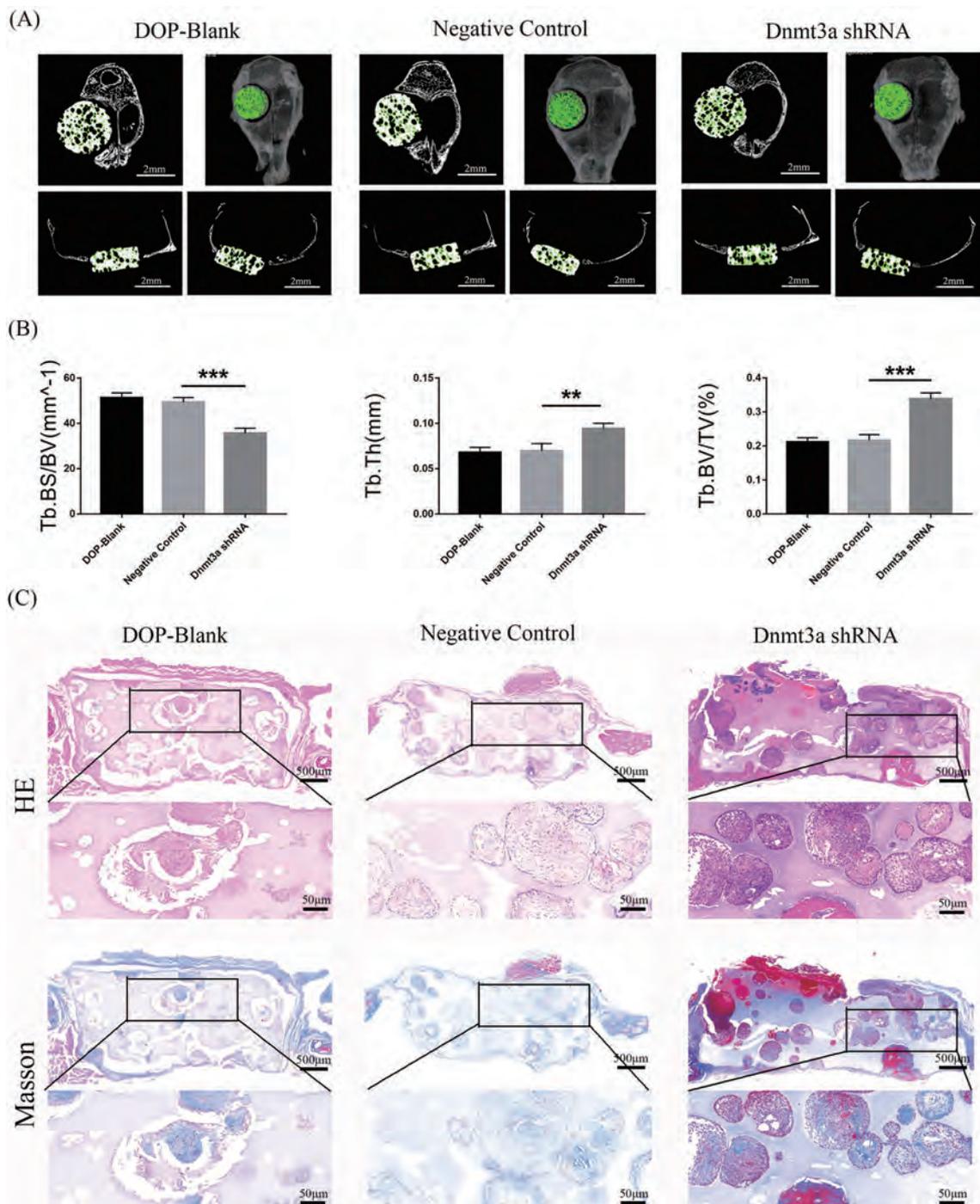


Fig. 9 Downregulation of Dnmt3a promotes the osteogenic capacity of DOP-ASCs in vivo. **A** Micro-CT showed that the amount of new bone matrix (green) in the Dnmt3a shRNA group was significantly higher than that in DOP-ASC and negative control groups. **B** BV/TV, BS/BV, and TbTh analysis demonstrated that the osteogenic capacity was greatly increased when Dnmt3a was downregulated by shRNA in vivo. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **C**: HE and Masson staining of BCP showed that the staining degree in the Dnmt3a shRNA group was stronger than that in DOP-ASC and negative control groups

Conclusions

Our study showed that Wnt/ β -catenin signaling pathway is a major player in the process of osteogenic differentiation of DOP-ASCs and DNA methylation is an important factor that affects the osteogenic differentiation of DOP-ASCs, which has significance for bone regeneration in DOP. Downregulation of Dnmt3a activated Wnt/ β -catenin pathway, and promoted the osteogenic differentiation of DOP-ASCs. These findings indicate that Dnmt3a knockdown rescues the impaired osteogenic ability of DOP-ASCs *in vitro* and *in vivo*, thereby providing a possible approach for bone regeneration using DOP-ASCs in DOP patients.

Abbreviations

DOP: Diabetic osteoporosis; DM: Diabetes mellitus; ASCs: Adipose-derived stem cells; PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; ALP: Alkaline phosphatase; β -Catenin: Cadherin associated protein; Runx2: Runt-related transcription factor 2; Opn: Osteopontin; GAPDH: Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; DNMT1: DNA methyltransferases 1; DNMT3a: DNA methyltransferases 3a; DNMT3b: DNA methyltransferases 3b; BV/TV: Ratio of bone volume to tissue volume; BS/BV: The area of bone tissue per unit volume; TbTh: Trabecular thickness.

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

All authors have made important contributions to this research. MZ conducted *in vitro* experiments, executed the analysis of the data, and wrote the main manuscript. YG conducted *in vivo* experiments and wrote the main manuscript. QL reviewed and revised the manuscript. HC collected the data. JY established the animal model of diabetic osteoporosis. XC designed the experimental project, analyzed data, and revised the manuscript. JX conceived and designed the experiment, analyzed data, revised the manuscript, and provided funding. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

This work was funded by National Natural Science Foundation of China (81870746, 81970986, 81771125), Open Project of the State Key Laboratory of Oral Disease Research (SKLOD2021OF08), Joint project of Luzhou Municipal People's Government and Southwest Medical University (2020LZXNYDZ09), Program of Southwest Medical University (2019ZQN167), Program of The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University (202017), Climb Plan Project of The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University (2020QY04), Key Program of Southwest Medical University (2021ZKZD009), and Project of Stomatological Institute of Southwest Medical University (2021XJYS01).

Availability of data and materials

The datasets generated or analyzed during the current study can be obtained from the corresponding author in accordance with reasonable requirements.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The Ethics Committee of Southwest Medical University reviewed and approved the experimental animal procedures, and we conducted animal care and anesthesia in accordance with the guidelines of the Care and Use of Laboratory Animals (Ministry of Science and Technology of China, 2006).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Author details

¹Department of Oral Implantology, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. ²State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China. ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. ⁴Luzhou Key Laboratory of Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

Received: 20 March 2022 Accepted: 23 July 2022

Published online: 04 August 2022

References

- Motyl KJ, Mccauley LK, McCabe LR. Amelioration of type I diabetes-induced osteoporosis by parathyroid hormone is associated with improved osteoblast survival. *J Cell Physiol.* 2012;227(4):1326–34.
- Zheng HX, Chen J, Zu YX, Wang EZ, Qi SS. Chondroitin sulfate prevents STZ induced diabetic osteoporosis through decreasing blood glucose, antioxidative stress, anti-inflammation and OPG/RANKL expression regulation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5303.
- Wang N, Xu P, Wang X, Yao W, Wang B, Wu Y, Shou D. Timosaponin AIII attenuates inflammatory injury in AGEs-induced osteoblast and alloxan-induced diabetic osteoporosis zebrafish by modulating the RAGE/MAPK signaling pathways. *Phytomedicine.* 2020;75: 153247.
- Chen S, Du K, Zou C. Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):275.
- Zhang M, Li Y, Rao P, Huang K, Luo D, Cai X, Xiao J. Blockade of receptors of advanced glycation end products ameliorates diabetic osteogenesis of adipose-derived stem cells through DNA methylation and Wnt signalling pathway. *Cell Prolif.* 2018;51(5): e12471.
- Oliveira PAD, Oliveira AMSD, Pablos AB, Costa FO, Silva GA, Santos JN, Cury PR. Influence of hyperbaric oxygen therapy on peri-implant bone healing in rats with alloxan-induced diabetes. *J Clin Periodontol.* 2012;39(9):879–86.
- Wallner C, Abraham S, Wagner JM, Harati K, Ismer B, Kessler L, Zöllner H, Lehnhardt M, Behr B. Local application of isogenic adipose-derived stem cells restores bone healing capacity in a type 2 diabetes model. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(6):836–44.
- Wu R, Ruan J, Sun Y, Liu M, Sha Z, Fan C, Wu Q. Long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates adipose-derived stem cells (ASCs) osteogenic differentiation through miR-665/IL6 axis via PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):348.
- Li S, Liu Y, Tian T, Zhang T, Lin S, Zhou M, Zhang X, Lin Y, Cai X. Bioswitchable delivery of microRNA by framework nucleic acids: application to bone regeneration. *Small.* 2021;17(47): e2104359.
- Vanhatupa S, Ojansivu M, Autio R, Juntunen M, Miettinen S. Bone Morphogenetic protein-2 induces donor-dependent osteogenic and adipogenic differentiation in human adipose stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(12):1391–402.
- Zhou N, Li Q, Lin X, Hu N, Liao JY, Lin LB, Zhao C, Hu ZM, Liang X, Xu W, Chen H, Huang W. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. *Cell Tissue Res.* 2016;366(1):101–11.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726–36.
- Vrtacnik P, Marc J, Ostanek B. Hypoxia mimetic deferoxamine influences the expression of histone acetylation- and DNA methylation-associated genes in osteoblasts. *Connect Tissue Res.* 2015;56(3):228–35.
- Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat Rev Genet.* 2016;17(12):733–43.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057–68.

16. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23–38.
17. Law PP, Holland ML. DNA methylation at the crossroads of gene and environment interactions. *Essays Biochem*. 2019;63(6):717–26.
18. Deplus R, Denis H, Putmans P, Calonne E, Fourrez M, Yamamoto K, Suzuki A, Fuks F. Citrullination of DNMT3A by PAD14 regulates its stability and controls DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(13):8285–96.
19. Veland N, Lu Y, Hardikar S, Gaddis S, Zeng Y, Liu B, Estecio MR, Takata Y, Lin K, Tomida MW, Shen J, Saha D, Gowher H, Zhao H, Chen T. DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(1):152–67.
20. Antehh H, Fang J, Song J. Structural basis for impairment of DNA methylation by the DNMT3A R882H mutation. *Nat Commun*. 2020;11(1):2294.
21. Ghayor C, Weber FE. Epigenetic regulation of bone remodeling and its impacts in osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1446.
22. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, Zhou Z, Shu G, Yin G. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):3.
23. Peng S, Gao Y, Shi S, Zhao D, Cao H, Fu T, Cai X, Xiao J. LncRNA-AK137033 inhibits the osteogenic potential of adipose-derived stem cells in diabetic osteoporosis by regulating Wnt signaling pathway via DNA methylation. *Cell Prolif*. 2022;55(1): e13174.
24. Yu AX, Xu ML, Yao P, Kwan KK, Liu YX, Duan R, Dong TT, Ko RK, Tsim KW. Corylin, a flavonoid derived from *Psoralea Fructus*, induces osteoblastic differentiation via estrogen and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *FASEB J*. 2020;34(3):4311–28.
25. Svedlund J, Aurén M, Sundström M, Dralle H, Akerström G, Björklund P, Westin G. Aberrant Wnt/ β -catenin signaling in parathyroid carcinoma. *Mol Cancer*. 2010;9:294.
26. Liu T, Wu X, Chen T, Luo Z, Hu X. Downregulation of DNMT3A by miR-708-5p inhibits lung cancer stem cell-like phenotypes through repressing Wnt/ β -catenin signaling. *Clin Cancer Res*. 2018;24(7):1748–60.
27. Wong CC, Xu J, Bian X, Wu JL, Kang W, Qian Y, Li W, Chen H, Gou H, Liu D, Yat Luk ST, Zhou Q, Ji F, Chan LS, Shirasawa S, Sung JJ, Yu J. In colorectal cancer cells with mutant KRAS, SLC25A22-mediated glutaminolysis reduces DNA demethylation to increase WNT signaling, stemness, and drug resistance. *Gastroenterology*. 2020;159(6):2163–2180.e6.
28. Wu B, Li Y, Li B, Zhang B, Wang Y, Li L, Gao J, Fu Y, Li S, Chen C, Surani MA, Tang F, Li X, Bao S. DNMTs play an important role in maintaining the pluripotency of leukemia inhibitory factor-dependent embryonic stem cells. *Stem Cell Rep*. 2021;16(3):582–96.
29. Luo W, Zhang L, Huang B, Zhang H, Zhang Y, Zhang F, Liang P, Chen Q, Cheng Q, Tan D, Tan Y, Song J, Zhao T, Haydon RC, Reid RR, Luu HH, Lee MJ, El Dafrawy M, Ji P, He TC, Gou L. BMP9-initiated osteogenic/odontogenic differentiation of mouse tooth germ mesenchymal cells (TGMCS) requires Wnt/ β -catenin signalling activity. *J Cell Mol Med*. 2021;25(5):2666–78.
30. Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y, Zhang J, Shui W, Lamplot J, Rogers MR, Zhao C, Wang N, Rajan P, Tomal J, Statz J, Wu N, Luu HH, Haydon RC, He TC. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013;5(1):13–31.
31. Wang C, Wang M, Xu T, Zhang X, Lin C, Gao W, Xu H, Lei B, Mao C. Engineering bioactive self-healing antibacterial exosomes hydrogel for promoting chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration. *Theranostics*. 2019;9(1):65–76.
32. Abdulameer SA, Sulaiman SA, Hassali MA, Subramaniam K, Sahib MN. Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? *Patient Prefer Adherence*. 2012;6:435–48.
33. Heilmeyer U, Hackl M, Skalicky S, Weilner S, Schroeder F, Vierlinger K, Patsch JM, Baum T, Oberbauer E, Lobach I, Burghardt AJ, Schwartz AV, Grillari J, Link TM. Serum miRNA signatures are indicative of skeletal fractures in postmenopausal women with and without type 2 diabetes and influence osteogenic and adipogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 2016;31(12):2173–92.
34. Tencerova M, Figeac F, Ditzel N, Taipaleenmäki H, Nielsen TK, Kassem M. High-fat diet-induced obesity promotes expansion of bone marrow adipose tissue and impairs skeletal stem cell functions in mice. *J Bone Miner Res*. 2018;33:1154–65.
35. Liu Z, Chen T, Sun W, Yuan Z, Yu M, Chen G, Guo W, Xiao J, Tian W. DNA demethylation rescues the impaired osteogenic differentiation ability of human periodontal ligament stem cells in high glucose. *Sci Rep*. 2016;6:27447.
36. Fan T, Qu R, Yu Q, Sun B, Jiang X, Yang Y, Huang X, Zhou Z, Ouyang J, Zhong S, Dai J. Bioinformatics analysis of the biological changes involved in the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2020;24(14):7968–78.
37. Saidova AA, Vorobjev IA. Lineage commitment, signaling pathways, and the cytoskeleton systems in mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020;26(1):13–25.
38. Wang CG, Hu YH, Su SL, Zhong D. LncRNA DANCER and miR-320a suppressed osteogenic differentiation in osteoporosis by directly inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Exp Mol Med*. 2020;52(8):1310–25.
39. Hang K, Ying L, Bai J, Wang Y, Kuang Z, Xue D, Pan Z. Knockdown of SERPINE2 enhances the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):525.
40. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR. Peroxisome-proliferator-activated receptor γ suppresses Wnt/ β -catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J*. 2003;376:607–13.
41. Li Y, Wang L, Zhang M, Huang K, Yao Z, Rao P, Cai X, Xiao J. Advanced glycation end products inhibit the osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signalling pathway via DNA methylation. *Cell Prolif*. 2020;53(6): e12834.
42. Davegårdh C, García-Calzón S, Bacos K, Ling C. DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Mol Metab*. 2018;14:12–25.
43. Ling C, Rönn T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2019;29(5):1028–44.
44. An Y, Zhang H, Wang C, Jiao F, Xu H, Wang X, Luan W, Ma F, Ni L, Tang X, Liu M, Guo W, Yu L. Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis. *FASEB J*. 2019;33(11):12515–27.
45. Sun B, Shi Y, Yang X, Zhao T, Duan J, Sun Z. DNA methylation: a critical epigenetic mechanism underlying the detrimental effects of airborne particulate matter. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;161:173–83.
46. Kornicka K, Szlapka-Kosarzewska J, Śmieszek A, Marycz K. 5-Azacytidine and resveratrol reverse senescence and ageing of adipose stem cells via modulation of mitochondrial dynamics and autophagy. *J Cell Mol Med*. 2019;23:237–59.
47. Zhang RP, Shao JZ, Xiang LX. GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*. 2011;286:41083–94.
48. Ma W, Zhan Y, Zhang Y, Mao C, Xie X, Lin Y. The biological applications of DNA nanomaterials: current challenges and future directions. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):351.
49. Li ZF, Meng DD, Liu YY, Bi FG, Tian K, Xu JZ, Sun JG, Gu CX, Li Y. Hypoxia inducible factor-3 α promotes osteosarcoma progression by activating KDM3A-mediated demethylation of SOX9. *Chem Biol Interact*. 2021;351: 109759.
50. Seman NA, Mohamud WN, Östenson CG, Brismar K, Gu HF. Increased DNA methylation of the SLC30A8 gene promoter is associated with type 2 diabetes in a Malay population. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):30.
51. Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9627–34.
52. Zhang ZM, Lu R, Wang P, Yu Y, Chen D, Gao L, Liu S, Ji D, Rothbart SB, Wang Y, Wang GG, Song J. Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation. *Nature*. 2018;554(7692):387–91.
53. Casillas MA Jr, Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyl-transferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 2003;252(1–2):33–43.
54. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*. 2018;19(2):81–92.
55. Jung YD, Park SK, Kang D, Hwang S, Kang MH, Hong SW, Moon JH, Shin JS, Jin DH, You D, Lee JY, Park YY, Hwang JJ, Kim CS, Suh N. Epigenetic regulation of miR-29a/miR-30c/DNMT3A axis controls SOD2 and mitochondrial oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Redox Biol*. 2020;37: 101716.

56. Mofakhami S, Salahinejad E. Biphasic calcium phosphate microspheres in biomedical applications. *J Control Release*. 2021;338:527–36.
57. Liao J, Cai X, Tian T, Shi S, Xie X, Ma Q, Li G, Lin Y. The fabrication of biomimetic biphasic CAN-PAC hydrogel with a seamless interfacial layer applied in osteochondral defect repair. *Bone Res*. 2017;5:17018.
58. Wu T, Yao Z, Tao G, et al. Role of Fzd6 in regulating the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells in osteoporotic mice. *Stem Cell Rev Rep*. 2021;17(5):1889–904.
59. Tang Q, Hu Z, Jin H, Zheng G, Yu X, Wu G, Liu H, Zhu Z, Xu H, Zhang C, Shen L. Erratum: Microporous polysaccharide multilayer coated BCP composite scaffolds with immobilised calcitriol promote osteoporotic bone regeneration both *in vitro* and *in vivo*: Erratum. *Theranostics*. 2021;11(13):6524–5.
60. Wu J, Chen T, Wang Z, Chen X, Qu S, Weng J, Zhi W, Wang J. Joint construction of micro-vibration stimulation and BCP scaffolds for enhanced bioactivity and self-adaptability tissue engineered bone grafts. *J Mater Chem B*. 2020;8(19):4278–88.
61. Yu L, Xia K, Cen X, Huang X, Sun W, Zhao Z, Liu J. DNA methylation of noncoding RNAs: new insights into osteogenesis and common bone diseases. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):109.
62. Qi Q, Wang Y, Wang X, Yang J, Xie Y, Zhou J, Li X, Wang B. Histone demethylase KDM4A regulates adipogenic and osteogenic differentiation via epigenetic regulation of C/EBP α and canonical Wnt signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(12):2407–21.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)評価書

課程博士：指導教官用



第 43 期

研究者番号： G4309

作成日： 2023 年 3 月 8 日

氏名	王 喻	Wang Yu	性別	F	生年月日	1989. 12. 18
所属機関(役職)	京都大学大学院医学研究科医学専攻免疫ゲノム医学(大学院生)					
研究先(指導教官)	京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター(本庶 佑センター長)					
研究テーマ	PD-1 阻害による免疫賦活化異常疾患の研究 Studies on diseases caused by hyperimmune activities due to PD-1 blockade					
専攻種別	<input type="checkbox"/> 論文博士			<input checked="" type="checkbox"/> 課程博士		

研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	優 学業成績係数=	取得単位数
		26/30
学生本人が行った研究の概要	PD-1 阻害抗体治療を受けた 200-300 人のがん患者(複数のがん種)から収集した plasma を用いて、約 300 種類のメタボライトを測定した。臨床データから統計解析を行い、irAE(自己免疫様副作用)を予測できる複数のメタボライト A を同定した。そのうちの一つはマウス自己免疫疾患モデルにおいても高値であることを発見した。さらにそのメタボライト A が結合するリガンドタンパクを同定した。	
総合評価	<p>【良かった点】まさに寝食を忘れて実験に没頭できる優秀な学生である。コロナにより入国が遅れ 1 年少ないにもかかわらず確実に成果を出し、大きな論文として完成間近である。また礼儀正しく、正直で素直なため、新しい技術や知識に対する吸収力が非常に高い。それらを用いたアウトプットも正確に出すことができるため、データに対する信用性も高い。Discussion も活発に行い、好奇心旺盛な学生である。新しい技術を他人教えることもでき、既にリーダー的存在である。</p> <p>【改善すべき点】大変よく働く反面、体を壊さないか多少心配になることもある。ただその時は無理せず休むように勧めている。自分でよく考えよく実験を行うが、それらを他人にアピールする方法はまだ改善の余地がある。2 年の経験を経て、英語で理論的に論文作成する能力は確実に伸びたが、プレゼンテーションスライドを用いた発表技術等についてはまだ改善余地がある。</p> <p>【今後の展望】王さんは、飲み込みが早く手技も正確なため、研究の方は予想以上に順調に進んでいる。また行っている研究はがん免疫治療分野においても非常に注目されつつあるテーマであり、早期に完成させることで世界に大きなインパクトを与えることができると確信している。</p>	
学位取得見込	本奨学金終了後、おそらく 2 年以内に論文発表できると思われる。行っている研究内容も次の課題を生み出す末広がりなテーマであり、生理学の根源を開拓する良いテーマである。予測不能なことが起こらない限り、予定通り学位を取得できる見込みである。	
		評価者(指導教官名) 本庶佑

日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)報告書 研究者用



第43期

研究者番号: G4309

作成日: 2023年3月 3 日

氏名	王 喻	Wang Yu	性別	F	生年月日 1989. 12. 18
所属機関(役職)	京都大学大学院医学研究科医学専攻免疫ゲノム医学(大学院生)				
研究先(指導教官)	京都大学大学院 医学研究科附属がん免疫総合研究センター(本庶 佑センター長)				
研究テーマ	PD-1阻害による免疫賦活化異常疾患の研究 Studies on diseases caused by hyperimmune activities due to PD-1 blockade				
専攻種別	論文博士	<input type="checkbox"/>	課程博士	<input checked="" type="checkbox"/>	

1. 研究概要(1)

1) 目的(Goal)

Cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs) represented by PD-1 blockade antibodies has prevailed in the world as the first line therapy these days. However, since the PD-1 molecule on lymphocytes serves as an immune brake, the administration of PD-1 blockade antibody sometimes induces adverse events called Immune-Related Adverse Events (irAEs), which resemble autoimmune diseases in cancer patients (Figure 1). IrAE is generated by the over-activation of T cell immunity, which is kind of off-target of ICI therapy (Ye, W. et al. Br J Cancer 124, 1661-1669 (2021)(1). The incidence of clinical irAEs is around 10 % among the ICI-treated patients, and 30-40% are severe (more than grade 3) among those who experienced irAEs at any level (Golnaz Moradet al. cell 184, October 14, 2021)(2). Mechanism investigation and biomarkers identification of irAEs is therefore important for better-personalized medicine, and prevention or earlier intervention of irAEs. (Jing, Y. Nat Commun 11, 4946 (2020)(3). Our laboratory has studied responsive and unresponsive mechanisms to PD-1 blockade cancer immunotherapy from the view of immune metabolism in order to develop combination therapy and biomarkers (Al-Hansi et al. Science, 378:eabj3510, 2022)(4). However, solid metabolite biomarkers for irAE prediction have not been reported. In this project we explored the candidate of irAE biomarkers and the mechanisms involved in the found biomarker.

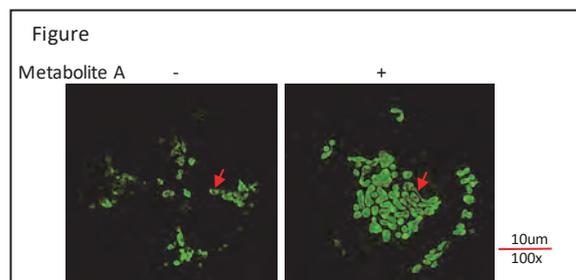
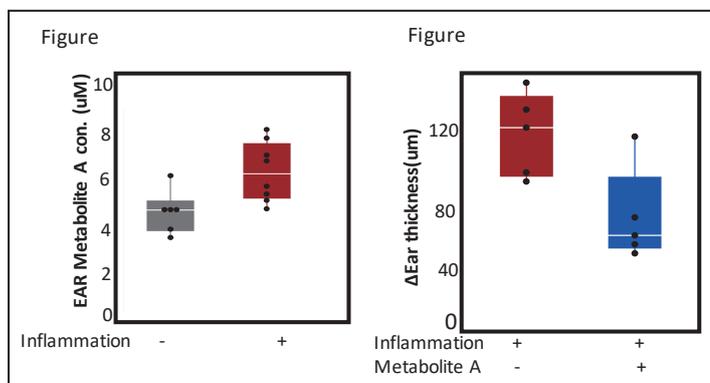
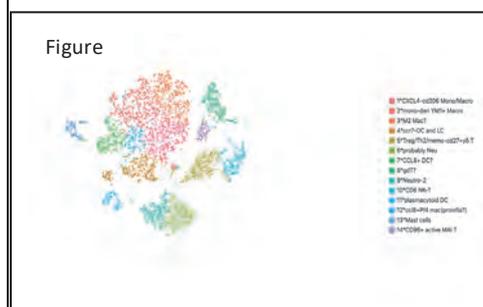
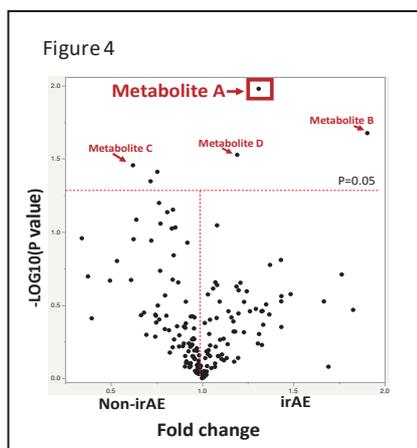
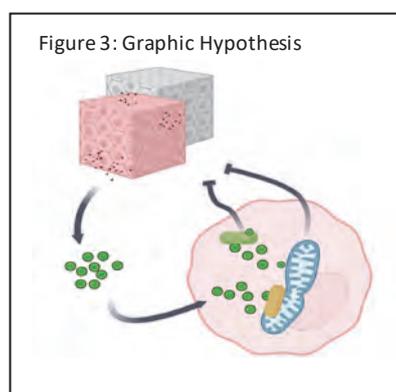
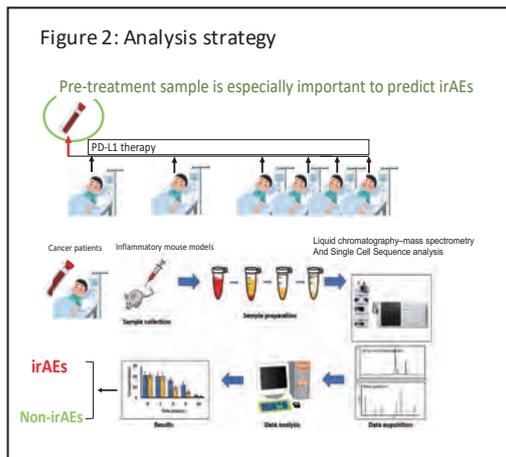
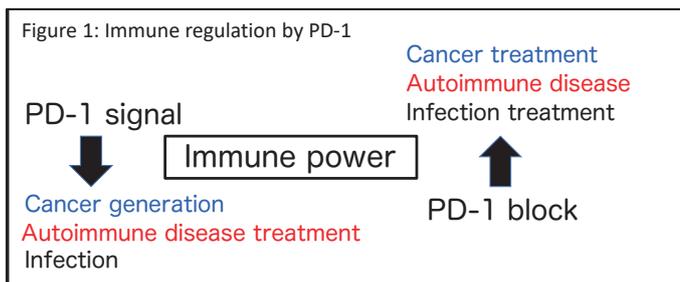
2) 戦略(Approach) Our laboratory has studied immune metabolism in the field of cancer immunotherapy. Our group already published the prediction biomarker of ICI responsiveness using plasma metabolites which are related to microbiota (Hatae et al, JCI insight 5:e133501, 2020)(5). We will use similar methods to identify the prediction biomarkers of irAEs. Note that as plasma metabolites were identified using the patients' blood before the first ICI treatment, these metabolite markers could be predictive. After the identification of metabolite biomarkers, we investigated the physiological meaning and mechanism of the metabolite biomarkers using cross-disciplinary methods and technologies.

3) 材料と方法 (Materials and methods) Collaborated with Kyoto University hospital, we collected the plasma from 200-300 patients who suffered non-small cell lung cancer, renal cell carcinoma, and urothelial carcinoma. Around 200-300 metabolites were measured from the patient's plasma by liquid chromatography-mass spectrometry before the 1st injection of PD-1 blockade therapy. In order to identify the metabolites which discriminate between the patients with irAE and without irAE group, we compared each metabolite level between the patients with irAE and without irAE. To understand the physiological meaning of the identified metabolite markers, we tested the target metabolite in the autoimmune disease mouse models including NOD diabetes models and contact hypersensitivity models (CHS: skin inflammation model) which is one of the most frequent symptoms of irAE. To understand the function of the candidate metabolite biomarkers, we analyzed the inflamed tissues and the infiltrated immune cells, by integrating the latest technologies such as metabolomics, single-cell sequencing analysis. We collaborated with Tohoku University and further examined the regulation function and molecular mechanisms of the metabolite by Seahorse, confocal microscopy and super resolution microscopy, and molecular biology methods (Fig. 2 and 3).

4) 実験結果 (Results) By comparison of the plasma metabolites between patients with irAE and without irAE, we detected several metabolites which could predict irAE patients before starting the treatments. Among the candidates, metabolite A is prominently high in the irAE patients (Fig. 4). We found this metabolite was also upregulated in inflammatory ears in the CHS model (Fig. 5). Interestingly, when we intravenously injected the metabolite A, the skin inflammation of CHS was attenuated (Fig.6), indicating that metabolite A serves as an immune modulator and this might be evolved in a negative feedback system of inflammation. Single cell analysis demonstrated that the metabolite A modulated the immune cells populations (Fig.7), which is now under the detail analysis. Molecular biology analysis revealed that metabolite A could bind to a mitochondrial protein and promote the mitochondria respiration accompanying with the mitochondria fusion (Fig.8).

5) 考察(Discussion) We successfully identified the candidate of metabolite biomarker for irAE patients before the treatment. This discovery should improve the diagnosis of cancer immunotherapy and personalized medicine. Molecular biology methods and single-cell sequencing analysis uncovered its molecular mechanism and functions which are very novel among previous studies of metabolite A. Based on these findings, we have hypothesized the mechanism as follows. 1) The patients who might develop irAE by the treatment have preexisting inflammatory diseases or microinflammation niches. 2) The systemic circulation of metabolite was upregulated to reduce these inflammatory niches but insufficient. 3) The exogenous metabolite A supplement can help to reduce the inflammation sufficiently. We will search more and complete this project in the next year utilizing the conditional KO mouse and transgenic mouse of the related genes to investigate the detail mechanisms in vivo. Thank you very much for the support of my scientific life. 日中笹川医学奨学金.

1. 研究概要(2)



6) 参考文献 (References)

1. Ye, W., Olsson-Brown, A., Watson, R.A. et al. Checkpoint-blocker-induced autoimmunity is associated with favourable outcome in metastatic melanoma and distinct T-cell expression profiles. *Br J Cancer* 124, 1661–1669 (2021).
2. Golnaz Morad, Beth A. Helmink, Padmanee Sharma. et al. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. *Cell* 184, October 14, 2021 a 2021 Elsevier Inc.
3. Jing, Y., Liu, J., Ye, Y. et al. Multi-omics prediction of immune-related adverse events during checkpoint immunotherapy. *Nat Commun* 11, 4946 (2020).
4. Muna Al-Habsi, Kenji Chamoto, Tasuku Honjo, et al. Spermidine activates mitochondrial trifunctional protein and improves antitumor immunity in mice. *Science*. abj3510. Epub 2022 Oct 28.
5. Ryusuke Hatae, Toyohiro Hirai, Tasuku Honjo. et al. Combination of host immune metabolic biomarkers for the PD-1 blockade cancer immunotherapy. *JCI Insight*. 2020;5(2):e133501.

2. 執筆論文 Publication of thesis ※記載した論文を添付してください。Attach all of the papers listed below.

論文名 1 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author	第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors					
論文名 2 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author	第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors					
論文名 3 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author	第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors					
論文名 4 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author	第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors					
論文名 5 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author	第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors					

3. 学会発表 Conference presentation ※筆頭演者として総会・国際学会を含む主な学会で発表したものを記載してください。

※Describe your presentation as the principal presenter in major academic meetings including general meetings or international meetings.

学会名 Conference					
演題 Topic					
開催日 date	年	月	日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語	<input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter					
学会名 Conference					
演題 Topic					
開催日 date	年	月	日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語	<input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter					
学会名 Conference					
演題 Topic					
開催日 date	年	月	日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語	<input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter					
学会名 Conference					
演題 Topic					
開催日 date	年	月	日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語	<input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter					

4. 受賞(研究業績) Award (Research achievement)

名称 Award name	国名	受賞年	年	月
	Country name	Year of award		
名称 Award name	国名	受賞年	年	月
	Country name	Year of award		

5. 本研究テーマに関わる他の研究助成金受給 Other research grants concerned with your research theme

受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
助成金名称 Grant name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円
受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
助成金名称 Grant name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

受給実績 Receipt record	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	
奨学金名称 Scholarship name	
受給期間 Supported period	年 月 ~ 年 月
受給額 Amount received	円

7. 研究活動に関する報道発表 Press release concerned with your research activities

※記載した記事を添付してください。Attach a copy of the article described below

報道発表 Press release	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	発表年月日 Date of release	
発表機関 Released medium			
発表形式 Release method	・新聞 ・雑誌 ・Web site ・記者発表 ・その他()		
発表タイトル Released title			

8. 本研究テーマに関する特許出願予定 Patent application concerned with your research theme

出願予定 Scheduled application	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	出願国 Application country	
出願内容(概要) Application contents			

9. その他 Others

--

指導責任者(記名) 本庶 佑

公益財団法人日中医学協会
TEL 03-5829-9123
FAX 03-3866-9080
〒101-0032 東京都千代田区岩本町 1-4-3
住 泉 K M ビ ル 6 階
URL : <https://www.jpcnma.or.jp/>