

## 財団法人 日中医学協会

2009年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

2010年2月12日

財団法人 日中医学協会 御中

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

添付資料：研究報告書

受給者氏名：中 尾 稔

所属機関名：旭川医科大学

所属部署名：寄生虫学講座

所在地：北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号

電 話：0166-68-2423

職名：准教授

内線：



1. 助成金額： 900,000 円

### 2. 研究テーマ

中国四川省における囊虫症流行に関する免疫、分子疫学研究

### 3. 成果の概要

2009年11月に実施した現地調査で入手したサンプル（糞便、寄生虫、血清）

について、免疫、遺伝子検査を行った。 その結果、3村落におけるテニア症流行

の基礎成績が得られた。

### 4. 被招聘者

被招聘者氏名：李 調 英

所属機関名：中国CDC・寄生虫病研究所

職名：主任研究員

部署名：人獣共通条虫症対策部

### 5. 滞在日程概要（日付・主な活動・工程など）

2月18日、19日：研究打合せ、技術指導を行った。

2月22日～26日：サンプルの解析を実施した。

3月1日、2日：解析成績の報告会、論文作成の指導、打合せを実施した。

## 中国四川省における囊虫症流行に関する免疫、分子疫学研究

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

### 要 旨

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

### Key Words

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

### 緒 言

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

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

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

## 対象と方法

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

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

## 結果

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

## 考察

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

## 参考文献

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

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

2009 年 12 月 25 日

財団法人 日中医学協会 御中

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

添付資料：研究報告書

受給者氏名：菱田明



所属機関名：浜松医科大学

所属部署名：医学部内科学第一 職名：教授

所在地：静岡県浜松市東区半田山 1-20-1

電話：053-435-2261 内線：2259, 2261

1. 助成金額： 900,000 円

### 2. 研究テーマ

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

### 3. 成果の概要

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

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

### 4. 被招聘者

被招聘者氏名：羅 景慧

職名：薬剤師

所属機関名：南方医科大学附属南方医院

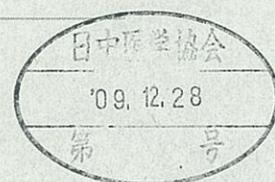
部署名：薬剤部

### 5. 滞在日程概要(日付・主な活動・工程など)

2009. 6. 23 来日

2009. 11. 28

帰国



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

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

### 要旨

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

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

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

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

**Key Words** 急性腎不全 抵抗性獲得 NF $\kappa$ B シスプラチン

## 緒言：

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

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

## 対象と方法：

対象：雄SDラット(体重200-250g)。

方法：以下の3グループを作成

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

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

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

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

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

## 結果：

### 1) 腎機能 (A)

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

### 2) NF $\kappa$ B 活性化 (B,C)

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

### 3) PCNA と HSP72 の発現 (B,C)

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

### 考察：

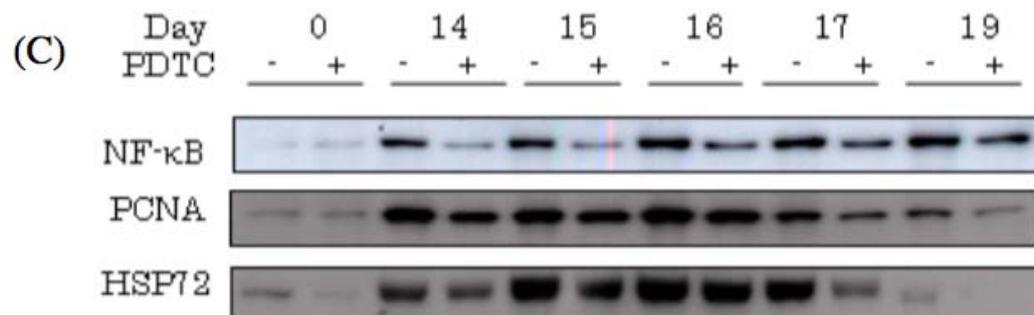
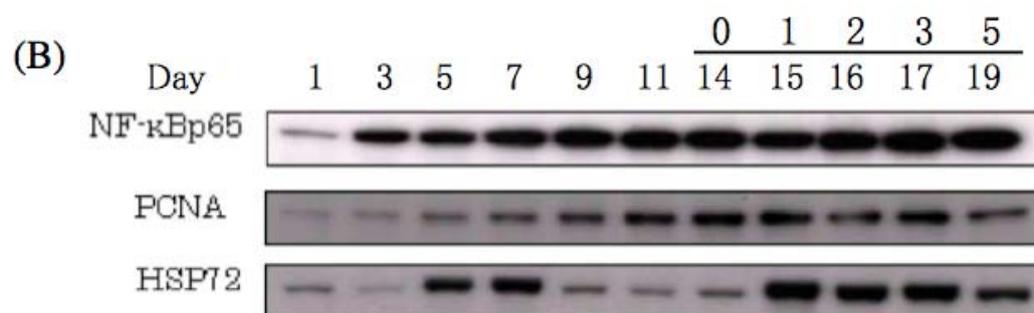
CDDP 初回投与後腎内 NF $\kappa$ B は活性化し、day14 までその活性化は維持された。day14 に 2 回目の CDDP 投与後も NF $\kappa$ B 活性化は持続した。PDTC によって day14 から day19 まで 2 回目の CDDP 投与においても腎内 NF $\kappa$ B 活性化は抑制された。さらに PDTC によって day17 において腎機能低下が有意に惹起された。このことから、シスプラチン誘発急性腎不全の抵抗性獲得に NF $\kappa$ B 活性化が重要な役割を果たすことが示唆された。

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

(A)

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

P < 0.05 v.s. CDDP+CDDP群





## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010年 3月11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

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



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

Na<sub>v</sub>1.6 をコードする遺伝子欠損マウスを用いた平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャンネルの生理学的役割の解明

3. 成果の概要

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

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

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

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ (学会名・演題)

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

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

第83回 日本薬理学会年会・Characterization of Na<sub>v</sub>1.6-mediated resurgent Na<sup>+</sup> currents in mouse vas deferens myocytes.

(2) 発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

Journal of Cellular Physiology・Characterization of Na<sub>v</sub>1.6-mediated Na<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens.

-日中医学協会助成事業-

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

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

### 要 旨

興奮性細胞の活動電位における速い立ち上がり成分はフグ毒の投与にて可逆的に消失することから、主に電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル (voltage-gated Na<sup>+</sup> channels : NaV) の活性化にて引き起こされ、細胞の興奮発生に重要な生理的役割を果たしていると考えられてきた。本研究において平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネルのチャネル主要タンパク質でかつチャネル孔を形成する αサブユニットタンパク質 (Nav1.6) をコードする *Scn8a* の遺伝子欠損マウス (Nav1.6<sup>-/-</sup>マウス) およびその野生型マウス (Nav1.6<sup>+/+</sup>マウス) を用い、Nav1.6 の有無にて両輸精管平滑筋において機能的特性の違いを組織および細胞レベルで比較した。平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネル (Nav1.6) は膜電流における内向き電流を活性化させる電位の閾値を下げ、より負極側で内向き電流が活性化されやすい状態に遷移させるという生理学的な役割を有することを明らかにした。また平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネルの補助的制御を行っている βサブユニットについて分子生物学的手法を用いて検索し、β1サブユニットのみが検出された。これらの結果から平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネルを構成する αサブユニットタンパク質と βサブユニットタンパク質の組み合わせは Nav1.6 (*Scn8a* 遺伝子にてコード) / β1サブユニット (*Scn1b* 遺伝子にてコード) であることが初めて明らかとなった。

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

### 緒 言 :

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

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

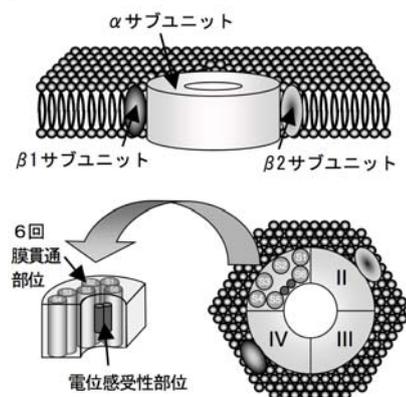


図 1 電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルの分子構造

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

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

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

### 対象と方法：

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

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

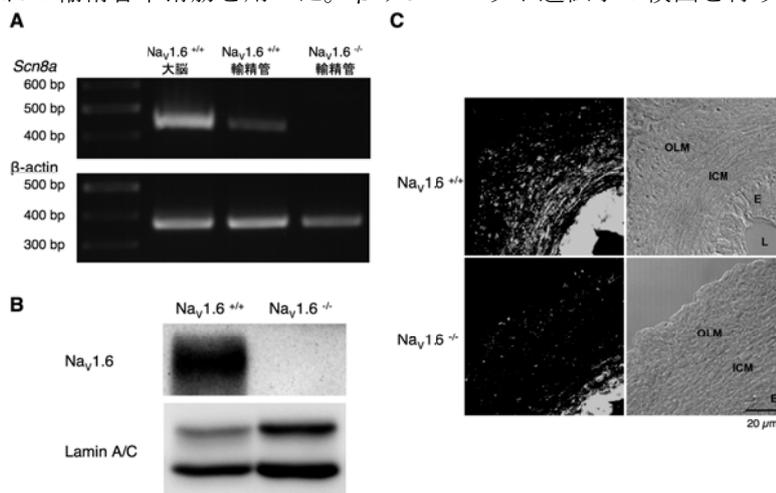


図2 NaV1.6 の分子生物学的特徴

**結果：**

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

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

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

NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスと NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス輸精管平滑筋単離細胞に対してパッチクランプ法を適用し、両マウスにおける電気生理学的特性を比較し、平滑筋型 NaV チャンネル (NaV1.6) の生理学的役割について調べた。図 3 に示すランプ型脱分極電位波形を与えると NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス輸精管平滑筋細胞において内向き膜電流が生じた (コントロール: 図 3 A)。フグ毒 (TTX) を投与すると膜電流は抑制され、さらにニフェジピン (L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル遮断薬) および Cd<sup>2+</sup> (非選択的チャンネル遮断薬) を各々、追加投与すると膜電流はさらに抑制された (図 3 A)。コントロールの膜電流波形から全ての遮断薬が存在の時の膜電流波形を差し引くと全ての遮断薬で抑制された膜電流波形が得られ、またフグ毒存在下で膜電流波形を差し引くとフグ毒非感受性膜電流成分が得られた (図 3 B)。これらの結果からフグ毒感受性膜電流、ニフェジピン感受性膜電流およびニフェジピン非感受性膜電流成分が得られた (図 3 C)。また各々の膜電流成分の活性化閾値の

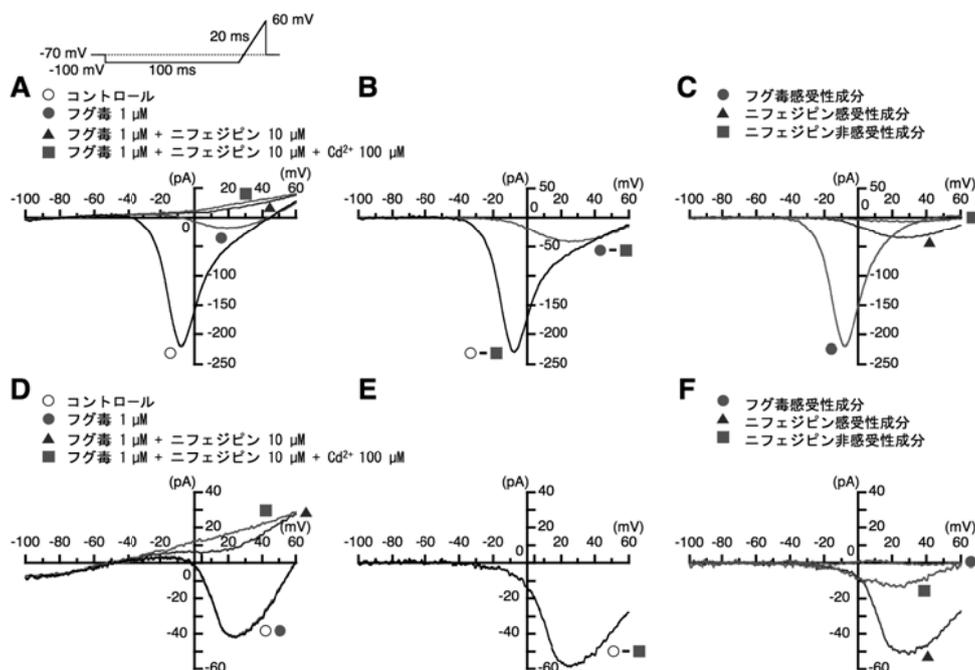


図 3 NaV1.6<sup>+/+</sup>および NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス輸精管平滑筋細胞における膜電流成分

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

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

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

### 3) RT-PCR 法によるβサブユニット遺伝子の検出

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

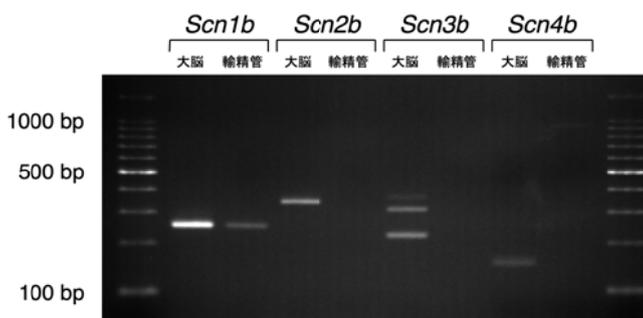


図4 マウス輸精管平滑筋細胞におけるβサブユニット遺伝子の検出

### 考 察 :

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

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

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

#### 参考文献：

1. Goldin AL : Resurgence of sodium channel research. Annual Review of Physiology 63, 871-894 (2001).
2. Holman ME, Tonta MA, Parkington HC, Coleman HA : Tetrodotoxin-sensitive action potentials in smooth muscle of mouse vas deferens. Journal of the Autonomic Nervous System 52, 237-240 (1995).
3. Seda M, Pinto FM, Wray S, Cintado CG, Noheda P, Buschmann H, Candenas L : Functional and molecular characterization of voltage-gated sodium channels in uteri from nonpregnant rats. Biol Reprod 77, 855-863 (2007).
4. Zhu HL, Aishima M, Morinaga H, Wassall RD, Shibata A, Iwasa K, Nomura M, Nagao M, Sueishi K, Cunnane TC, Teramoto N : Molecular and biophysical properties of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in murine vas deferens. Biophysical Journal 94, 3340-3351 (2008).
5. Zhu HL, Shibata A, Inai T, Nomura M, Shibata Y, Brock JA, Teramoto N : Characterization of Na<sub>v</sub>1.6-mediated Na<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens. Journal of Cellular Physiology 233, 234-243 (2010).
6. Zhu HL, Wassall RD, Takai M, Morinaga H, Nomura M, Cunnane TC, Teramoto N : Actions of veratridine on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na<sup>+</sup> currents, Na<sub>v</sub>1.6, in murine vas deferens myocytes. British Journal of Pharmacology 157, 1483-1493 (2009).

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

作成日：2010年3月11日

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 3 月 3 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

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



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

新しく見つけた血管平滑筋収縮制御の解析

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1)学会における発表  無・有(学会名・演題)

(2)発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

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

## アラキドン酸に対する血管平滑筋の遊走：

### ミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化が阻害される条件での検討

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

#### 要 旨

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

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

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

## 緒言

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

## 対象と方法

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

## 結果

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

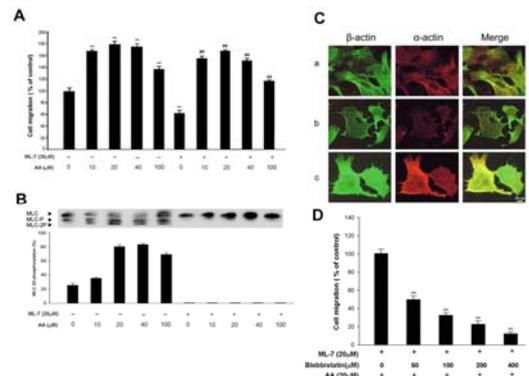


Fig. 1

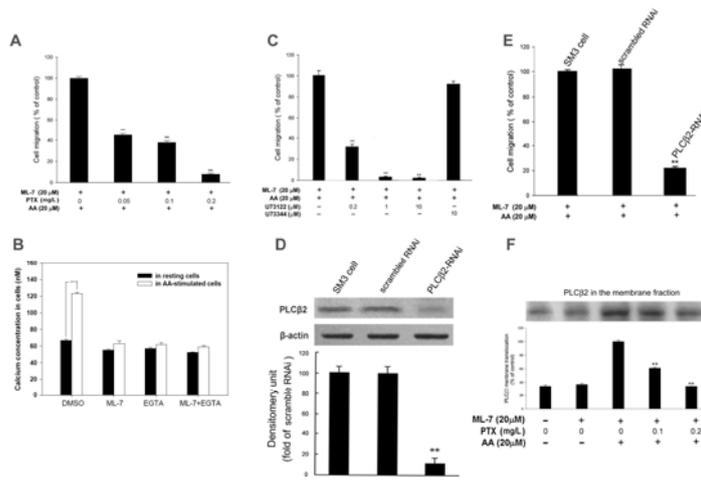


Fig. 2

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

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

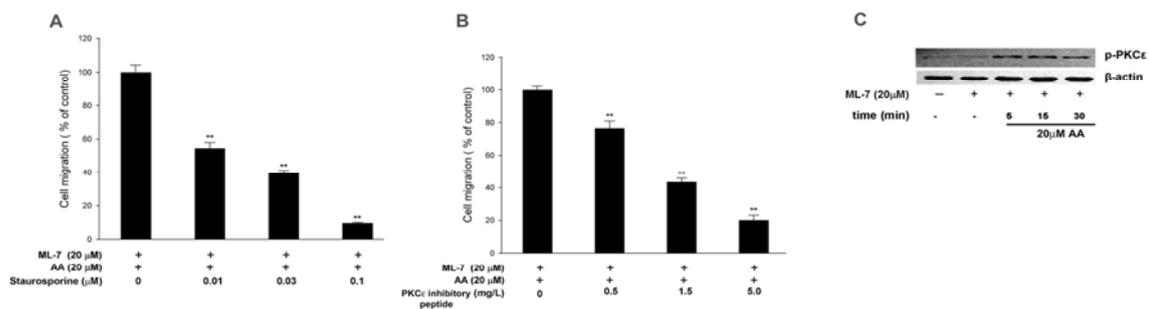


Fig. 3

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

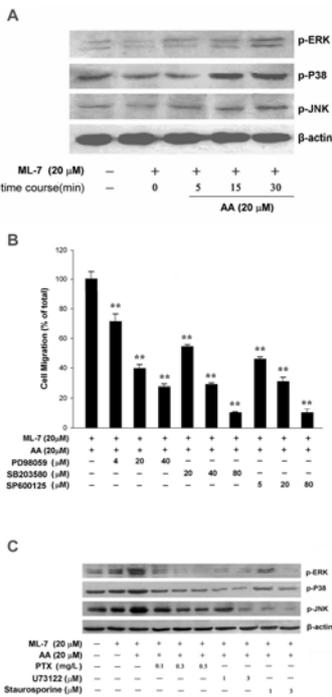


Fig. 4

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

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

## 考察

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

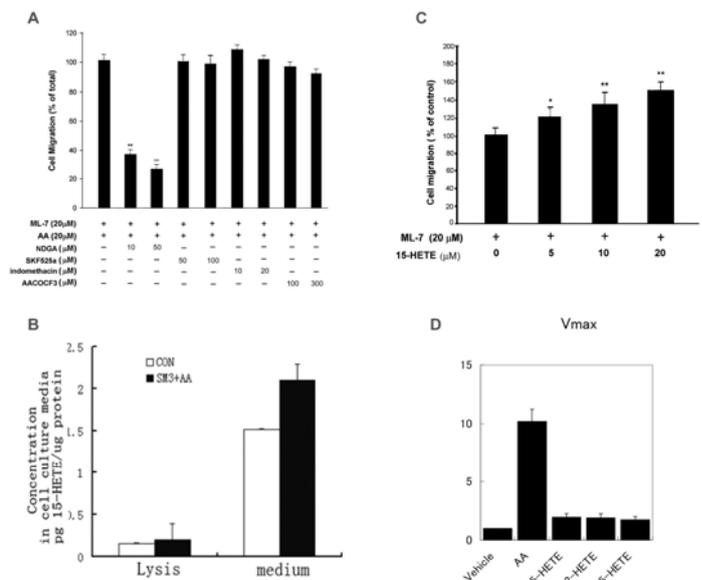


Fig. 5

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

### 参考文献

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

作成日：2010年3月1日

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

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

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

アルツハイマー病動物モデルを用いた silibinin の薬効評価

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

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

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

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

(2)発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

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

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

## アルツハイマー病動物モデルを用いた silibinin の薬効評価

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

### Abstract:

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

**Key Words** A $\beta$ , memory, silibinin, TNF $\alpha$ , iNOS

### Introduction:

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

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

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

## Methods:

### Animals.

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

### Treatment.

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

### Cued and contextual fear-conditioning tests.

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

### Western blotting.

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

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

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

### Statistical analyses.

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

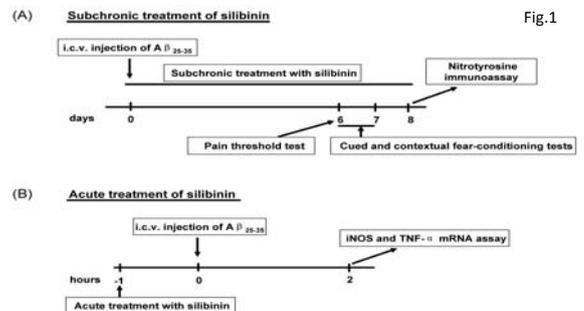


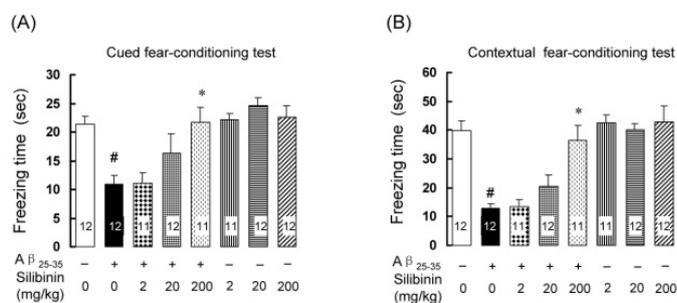
Fig.1

## Results:

### Effect of silibinin on memory impairment induced by A $\beta_{25-35}$ in fear-conditioning tests.

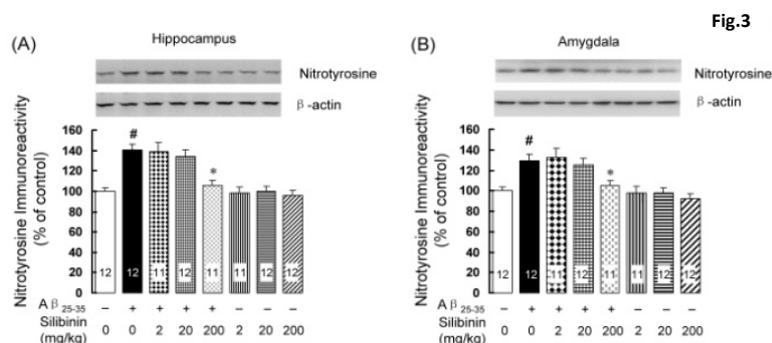
A $\beta_{25-35}$ -injected mice exhibited less of a cued or contextual-dependent freezing response than distilled water-injected mice ( $p < 0.05$ , Fig. 2A;  $p < 0.05$ , Fig. 2B), indicating an impairment of associative memory. Silibinin dose-dependently attenuated the impairment of cued and contextual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

Fig. 2



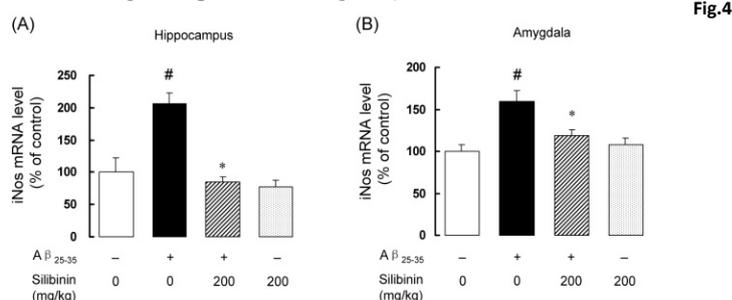
### Effect of silibinin on the level of nitrotyrosine.

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



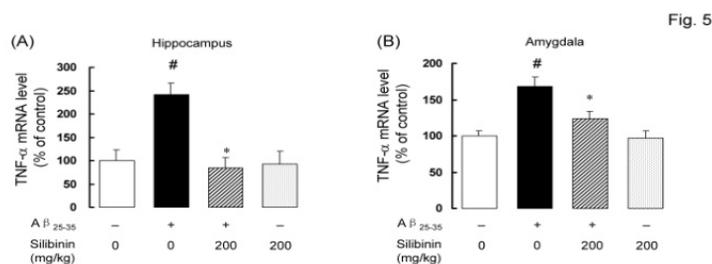
### Effect of silibinin on iNOS mRNA expression.

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



### Effect of silibinin on TNF $\alpha$ mRNA expression.

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



## Discussion:

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

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

In conclusion, the present study confirmed that silibinin could ameliorate memory impairment induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub>. The effect of silibinin may be attributed to the blocking of inflammatory responses and oxidative stress in the hippocampus and amygdala.

## References:

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

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

作成日: 2010年3月4日

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 03 月 06 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

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



1. 助成金額：600000 円

2. 研究テーマ

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

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

有

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

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

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

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

無

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

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

### Abstract

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

### Keywords

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

## Introduction

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

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

## Materials and Methods

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

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

## Results

### 1. Proteinuria, renal histology and the expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA

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

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

#### 2. Blood pressure

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

#### 3. PRA

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

#### 4. Intrarenal renin and prorenin

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

#### 5. Intrarenal AT1-R and (P)RR

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

#### 6. Intrarenal AngII

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

### Discussion

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

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

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

### References

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

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

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

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

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

#### Presentations

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

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

March 06, 2010

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 王 偉

指導責任者名： 矢野聖二

所属部署名：金沢大学がん研究所

職名：博士研究員

所在地：石川県金沢市宝町13-1

電話：076-265-2794

内線：2794



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

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

### 3. 成果の概要

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

いる。

#### 4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

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

(2)発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

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

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

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

### 要旨

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

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

### 緒言：

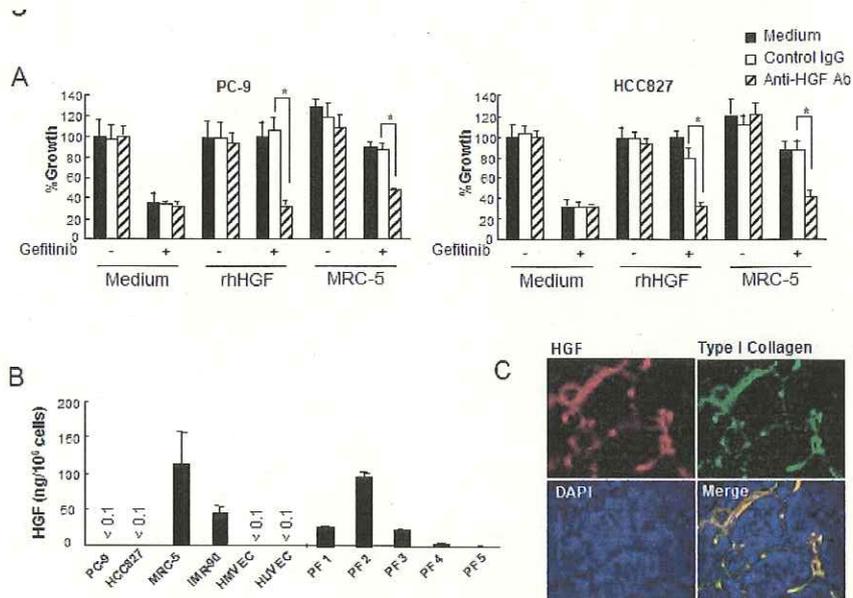
Lung cancers with *EGFR* activating mutations show good clinical response to gefitinib and erlotinib, selective TKIs to epidermal growth factor receptor (EGFR), but these tumors invariably develop drug resistance. Host stromal cells have been found to have a considerable effect on the behavior of cancer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

### 対象と方法：

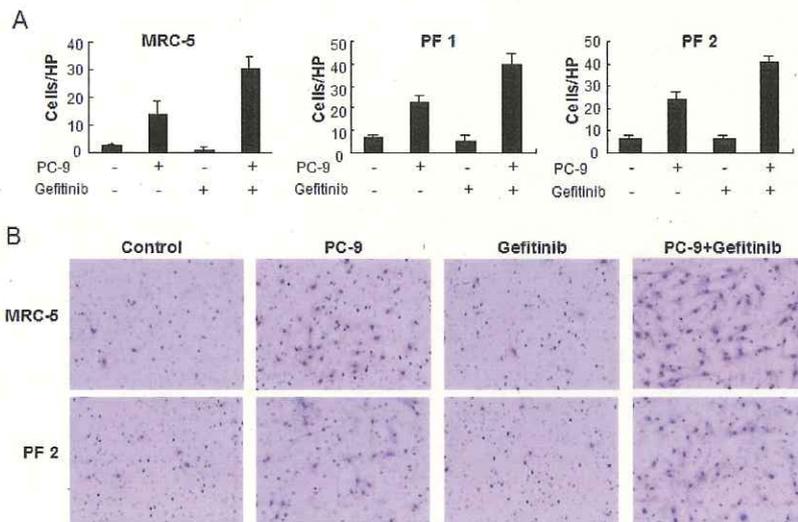
We evaluated the gefitinib sensitivity of lung cancer cells with *EGFR* activating mutations, PC-9 and HCC827, when co-cultured with fibroblasts and co-injected into SCID mice. We also examined the effect of lung cancer cells to fibroblasts recruitment.

### 結果：

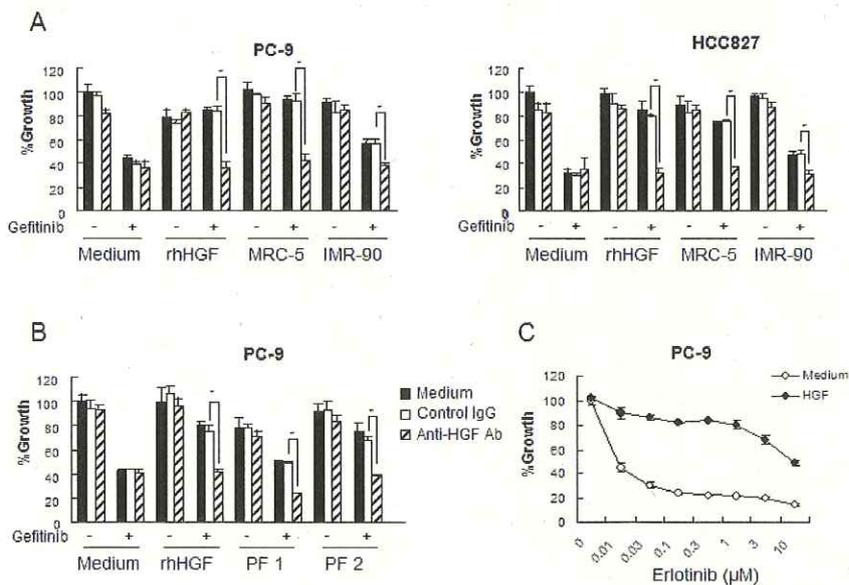
1. Fibroblast-derived HGF induces gefitinib resistance in lung cancer cells.



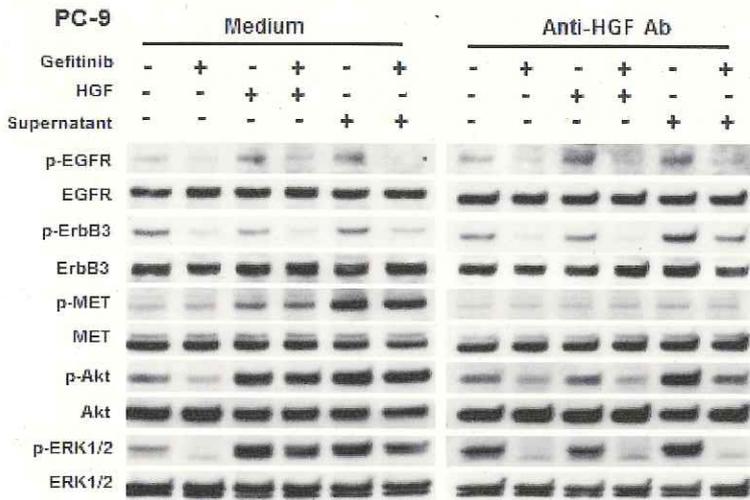
2. Lung cancer cells induce migration of fibroblasts.



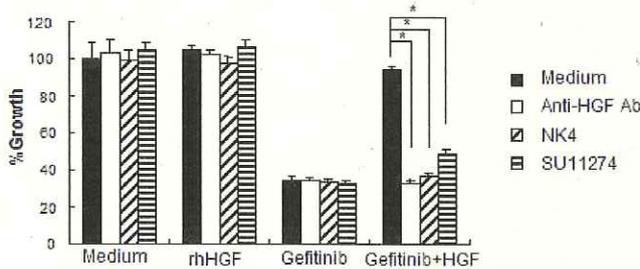
3. Fibroblast supernatants induce gefitinib resistance in lung cancer cells.



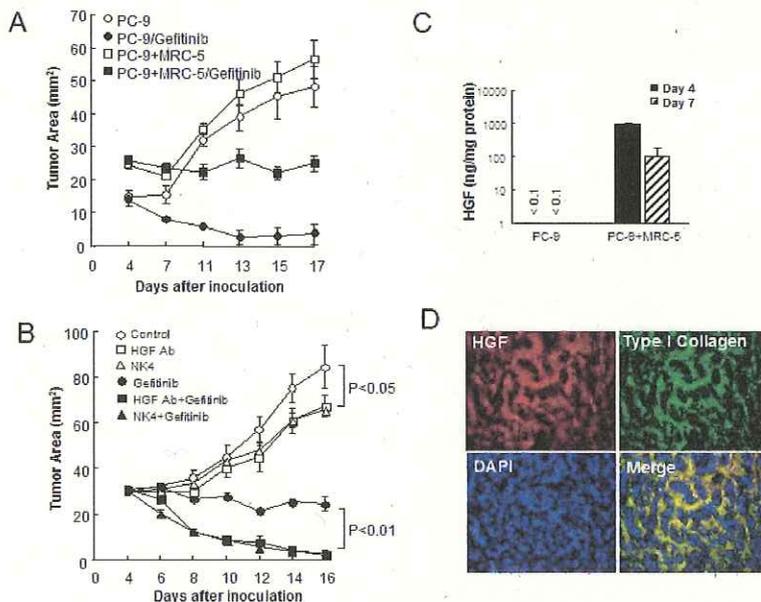
4. Fibroblast-derived HGF restores PI3K/Akt pathway via MET but not EGFR or ErbB3.



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



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



考察：

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

参考文献：

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

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

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

作成日：2010年3月15日

## 財団法人 日中医学協会

2009年度共同研究等助成金報告書 在留中国人研究者

2010年 3 月 1 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

### 添付資料 研究報告書

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



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

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

3. 成果の概要

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

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

なお進行中であるが、近日中に終了する予定である。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 有(学会名・演題)

学会名： The 40<sup>th</sup> Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan

Pancreas Society

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

(2) 発表した論文 有(雑誌名・題名)

雑誌名 Biomaterials

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

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

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

### 要旨

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

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

### 緒言 :

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

## 対象と方法 :

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

## 結果 :

### 1 .Morphological changes and islet recovery rate

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

### 2. Static incubation

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

### 3. MEI xeno-transplantation

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

### 4. IPGTT

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

## 5. Serum insulin and C-peptide

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

## 6. Histological findings

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

### **考察：**

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

### **結論：**

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

### **参考文献：**

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

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

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

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

作成日：2010年3月1日

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2010 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 王 麗楊

指導責任者名： 米田 俊之

所属部署名：

職名：特任研究員

阪大・歯学研究科・生化学

所在地：大阪府吹田市山田丘 1-8

電話：06-6879-2887

内線：2887



1. 助成金額： 600000 円

2. 研究テーマ

### 前立腺がんの造骨性骨転移のメカニズム解明

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

の恒常的活性化によるレプチンの産生増加は自己/傍分泌性に前立腺癌の造骨

性増大に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・㊦(学会名・演題)

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

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

(2) 発表した論文 ㊦・有(雑誌名・題名)

## 前立腺がんの造骨性骨転移のメカニズム解明

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

### 要旨

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

**Key words** 前立腺ガン, 骨転移, 肥満, レプチン, STAT3

### 緒言:

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

ける leptin および STAT3 の役割を検討した。

#### **対象と方法:**

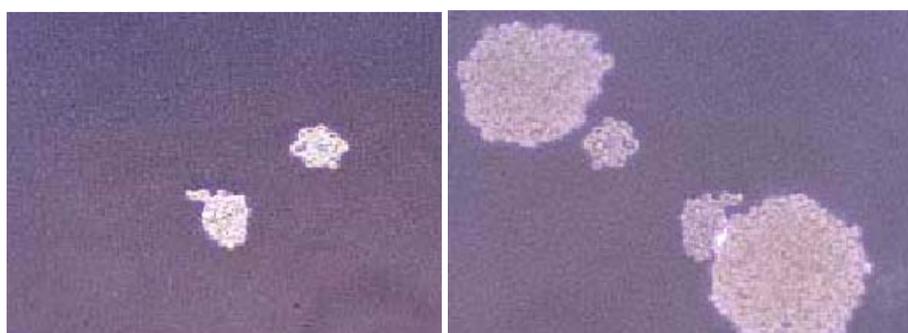
1. 最初の実験として、LNCaP 細胞における leptin signaling について検討した。
2. STAT3 の役割を詳細に検討するために、LNCaP に恒常的活性型 STAT3 を過剰発現させた LNCaP/caStat3 細胞を樹立し、皮下移植モデルと脛骨骨髓内移植モデルを作成した。
3. LNCaP/caStat3 細胞から産出するレプチンは造骨性増大に関与するかどうか、また leptin は autocrine 増殖因子であるかどうかについて、検討した。
4. レプチンの造骨性増大の促進するメカニズムを検討するために、ヒト顎骨細胞由来、初代培養骨芽細胞様細胞である HAOB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

#### **結果:**

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

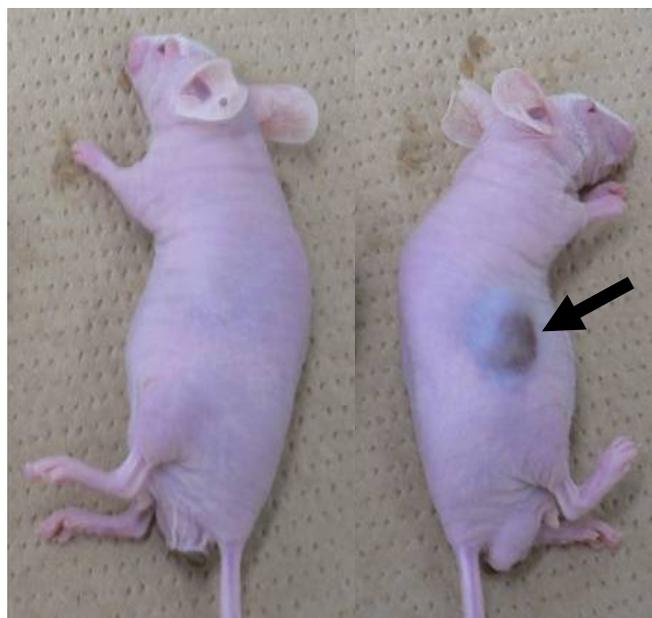
**考察:**

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



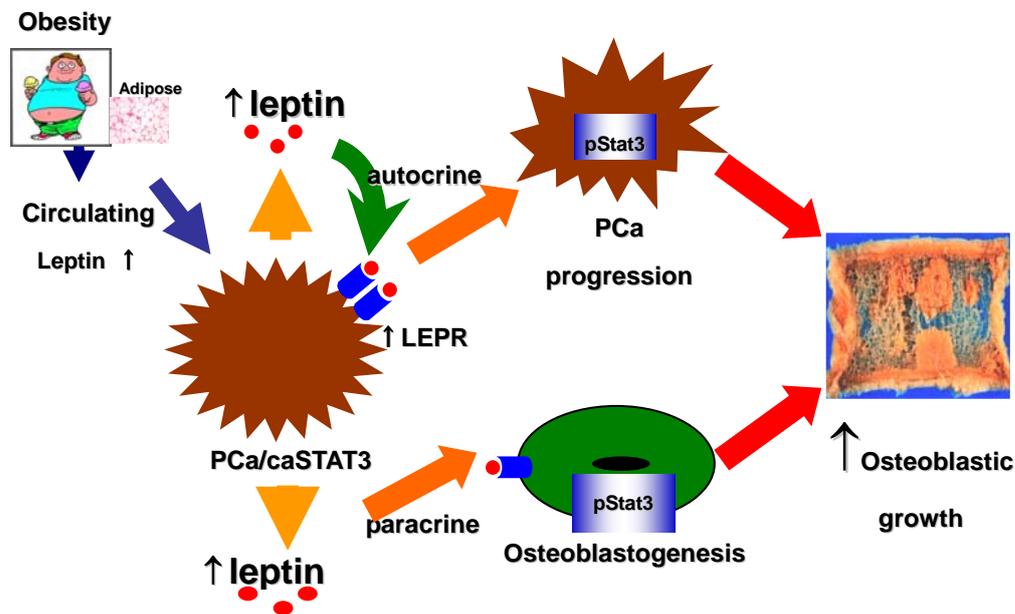
**EV**

**caSTAT3**



**EV**

**caSTAT3**



#### 参考文献:

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

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

作成日:2010年3月9日



## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2009 年 6 月 25 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 森 山 紀 之 

所属機関名：国立がんセンター

所属部署名：がん予防・検診研究センター

職名：がん予防・検診研究センター長

所 在 地：東京都中央区築地 5-1-1

電 話：03-3542-2511

内線：3437

1. 助成金額：100,000 円

2. 会議テーマ

第 32 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会

3. 会議の概要

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

医師の参加で行われ、呼吸器内視鏡に関する研究発表が行われた。

李教授は中国における気管支異物の講演をされ、日本人研究者に裨益する

ところ極めて大であった。

4. 被招聘者概要

1. 被招聘者氏名： 李时悦

職名：医師

所属機関名：広州医学院第一附属医院

部署名：呼吸器科

2. 被招聘者氏名：

職名：

所属機関名：

部署名：

3. 被招聘者氏名：

職名：

所属機関名：

部署名：

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

平成 21 年 11 月 29 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

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



1. 助成金額：100,000 円

### 2. 会議テーマ

中国の中西結合医学

### 3. 会議の概要

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

### 4. 被招聘者概要

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

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2010 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名：戴 昭宇

所属機関名：東京有明医療大学

所属部署名：保健医療学部鍼灸  
学科

所在地：東京都江東区有明 2-9-1

電話：03-6703-7049

  
職名：准教授

内線

1. 助成金額： 300,000 円

### 2. 会議テーマ

シンポジウム 日中伝統医学における診断の最前線

### 3. 会議の概要

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

### 4. 被招聘者概要

1. 被招聘者氏名：王 天芳

所属機関名：北京中医薬大学基礎医学院

職名：主任、教授

部署名：中医診断系

2. 被招聘者氏名：王 億勤

所属機関名：上海中医薬大学基礎医学院

職名：主任、教授

部署名：証候研究室

3. 被招聘者氏名：陸 小左

所属機関名：天津中医薬大学

職名：学院長、教授

部署名：中医薬工程学院