

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

平成 22 年 8 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

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

添付資料：研究報告書

受給者氏名：新正 由紀子
所属機関名：東京医療センター
所属部署名：臨床研究センター 職名：研究員
所在地：〒152-8902 東京都目黒区東が丘 2-5-1
電 話：03-3411-1712



1. 助成金額： 370,000 円

2. 研究テーマ

先天性難聴児の新生児聴覚スクリーニングの効果に関する比較研究

3. 成果の概要

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

4. 被招聘者

被招聘者氏名：黄 麗輝 職名：教授
所属機関名：首都医科大学附属北京同仁病院 部署名：耳鼻咽喉科

5. 滞在日程概要

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

先天性難聴児の新生児聴覚スクリーニングの効果に関する比較研究

招聘者氏名	新正 由紀子
所属機関	東京医療センター・臨床研究センター 研究員
被招聘者氏名	黄 麗輝
中国所属機関	首都医科大学附属北京同仁病院

要旨

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

Key Words :

新生児聴覚スクリーニング、先天性難聴、ABR、人工内耳

緒言（目的や研究背景）

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

研究（治療）対象と方法

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

成績（結果）

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

考察

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

参考文献

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

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－中国人研究者招聘－

2011 年 1 月 4 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者招聘について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：真部 淳



所属機関名：聖路加国際病院

所属部署名：小児科

職名：医長

所在地：東京都中央区明石町 9-1

電話：03-3541-5151 (代表) 内線：PHS77-223

1. 助成金額：900,000 円

2. 研究テーマ

小児の骨髄異形成症候群 (MDS) の診断と治療

3. 成果の概要

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

小児の骨髄異形成症候群（MDS）の診断と治療

研究者氏名：陈 晓娟

中国所属機関：中国医学科学院血液学研究所小児科

日本研究機関：聖路加国際病院小児科

指導責任者：医長 真部 淳

共同研究者名：細谷 亮太

要 旨

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

Key Words

骨髄異形成症候群、MDS、小児、中央診断、国際協力

緒 言：

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

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

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

方法と結果：

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

考 察

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

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

参考文献

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

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

作成日 2011年1月 4日

財団法人 日中医学協会


2010 年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

2011 年 3 月 7 日

財団法人 日中医学協会 御中

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

添付資料：研究報告書

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

1. 助成金額： 900,000円

2. 研究テーマ

アデノシン A2A 受容体の睡眠調節の役割

3. 成果の概要

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

4. 被招聘者

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

5. 滞在日程概要(日付・主な活動・工程など)

第1回 2010年7月5日—9月30日

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

第2回 2011年1月11日—2月10日

- ・ 追加実験、データ解析、論文作成

アデノシン A_{2A} 受容体の睡眠調節の役割

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

要旨

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

Key Words 側座核、A_{2A} 受容体、睡眠、覚醒、ドパミン

緒言：

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

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

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

目的と方法

目的:

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

方法:

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

結果

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

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

要約:

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

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

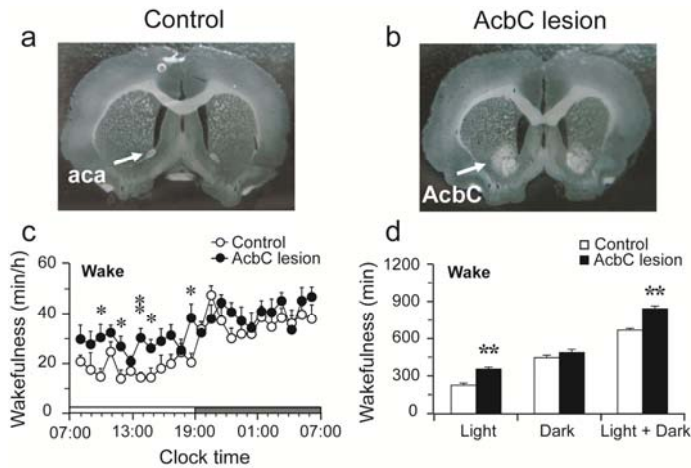


図 1. a および b : 対照 (a) および損傷例 (b) の冠状断面写真。b の矢印(淡い染色)部分は NAc の核部損傷領域を示す。c : 対照と NAc 核部損傷ラットの 1 時間当たりの覚醒量の経時変化。d : 明期、暗期、24 時間中の累積覚醒時間。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (aca: 前交連; AcbC: 側座核核部。対照群: $n=6$; 損傷群: $n=8$)

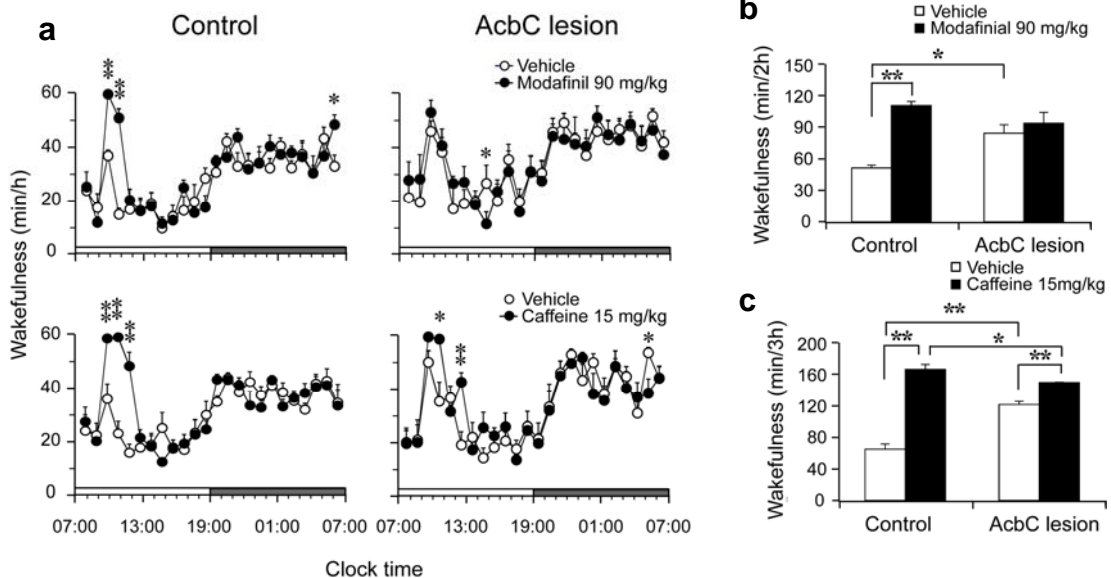


図 2. a および b : モダフィニルまたはカフェイン処理した対照群 (a) および NAc 核部損傷ラット (b) の覚醒量の経時変化。c : 溶媒またはモダフィニル投与後 2 時間の対照と NAc 核部損傷ラットの累積覚醒時間。d : 溶媒またはカフェイン投与後 4 時間の対照と NAc 核部損傷ラットの累積覚醒時間。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (対照群: $n=6$; 損傷群: $n=8$)

考察

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

アデノシン A_{2A}R およびドパミン D₁R、D₂R は、NAc 領域に高密度に存在しているが、これらの受容体を介した機能は全く逆である。つまり、A_{2A}R の活性化は睡眠を誘発するのに対し、ドパミン D₁R、D₂R は覚醒促進を生じさせる。NAc 損傷が覚醒の強い増加を起こすことは、NAc は A_{2A}R が制御する睡眠の主要な領域であることを示唆している。

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

参考文献

- 1 Hayaishi, O., Urade, Y., Eguchi, N. and Huang, Z.L., Genes for prostaglandin d synthase and receptor as well as adenosine A_{2A} receptor are involved in the homeostatic regulation of nrem sleep, *Arch Ital Biol*, 142 (2004) 533-9.
- 2 Urade, Y., Eguchi, N., Qu, W.M., Sakata, M., Huang, Z.L., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S. and Hayaishi, O., Sleep regulation in adenosine A_{2A} receptor-deficient mice, *Neurology*, 61 (2003) S94-6.
- 3 Huang, Z.L., Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness, *Curr Opin Pharmacol*, 7 (2007) 33-8.
- 4 Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W. and McCarley, R.W., Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness, *Science*, 276 (1997) 1265-8.
- 5 Mizoguchi, A., Eguchi, N., Kimura, K., Kiyohara, Y., Qu, W.M., Huang, Z.L., Mochizuki, T., Lazarus, M., Kobayashi, T., Kaneko, T., Narumiya, S., Urade, Y. and Hayaishi, O., Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 11674-9.
- 6 Basheer, R., Strecker, R.E., Thakkar, M.M. and McCarley, R.W., Adenosine and sleep-wake regulation, *Prog Neurobiol*, 73 (2004) 379-96.
- 7 Hong, Z.Y., Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Urade, Y. and Hayaishi, O., An adenosine A_{2A} receptor agonist induces sleep by increasing GABA release in the tuberomammillary nucleus to inhibit histaminergic systems in rats, *J Neurochem*, 92 (2005) 1542-9.
- 8 Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fredholm, B.B., Urade, Y. and Hayaishi, O., Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine, *Nat Neurosci*, 8 (2005) 858-9.
- 9 Saper, C.B., Scammell, T.E. and Lu, J., Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms, *Nature*, 437 (2005) 1257-63.
- 10 Scammell, T.E., Gerashchenko, D.Y., Mochizuki, T., McCarthy, M.T., Estabrooke, I.V., Sears, C.A., Saper, C.B., Urade, Y. and Hayaishi, O., An adenosine A_{2A} agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons, *Neuroscience*, 107 (2001) 653-63.
- 11 Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G. and Linden, J., Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system, *J Comp Neurol*, 401 (1998) 163-86.
- 12 Chou, T.C., Bjorkum, A.A., Gaus, S.E., Lu, J., Scammell, T.E. and Saper, C.B., Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus, *J Neurosci*, 22 (2002) 977-90.
- 13 Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. and Linden, J., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol Rev*, 53 (2001) 527-52.
- 14 Rye, D.B. and Jankovic, J., Emerging views of dopamine in modulating sleep/wake state from an unlikely source: PD, *Neurology*, 58 (2002) 341-6.

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

財団法人 日中医学協会

2010年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2011年 03 月 03 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：王 紅霞

指導責任者名： 八尾 寛

所属部署名： 東北大学大学院
生命科学研究科

職名：産学官連携
研究員

所 在 地： 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1

電 話： 022-217-6210

内線：6210



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

医療への応用に最適化されたチャネルロドプシンの開発

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1)学会における発表 有(学会名・演題)

医療への応用に最適化されたチャネルロドプシンの開発

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

要旨

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

Key words: channelrhodopsin; optogenetics; mutation; wavelength sensitivity

緒言 :

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

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

対象と方法 :

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

結果：

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

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

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

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

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

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

考察：

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

neurons in the deep brain.

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

参考文献：

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

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

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

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

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

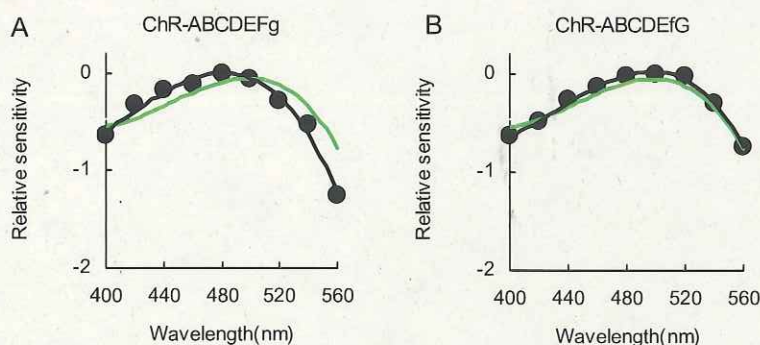


Figure .1. The effect of exchanging F and G segment of ChR1 with f and g of ChR2 on the wavelength sensitivity.

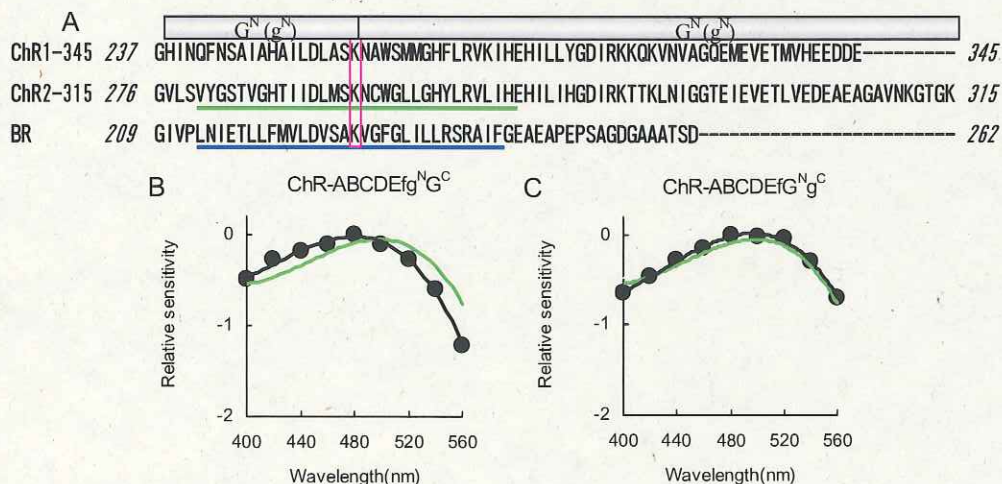


Figure .2. The effect of exchanging G^N and G^C with g^N and g^C on the wavelength sensitivity.

A

		G^N/g^N		
Chr1-345	237	GHINQFNSAIAHA	LDLASK	257
Chr2-315	276	GVLSVYGSTVGHTI	LDLMSK	296
BR	209	GIVPLNIETLLFMVLD	VSAL	229

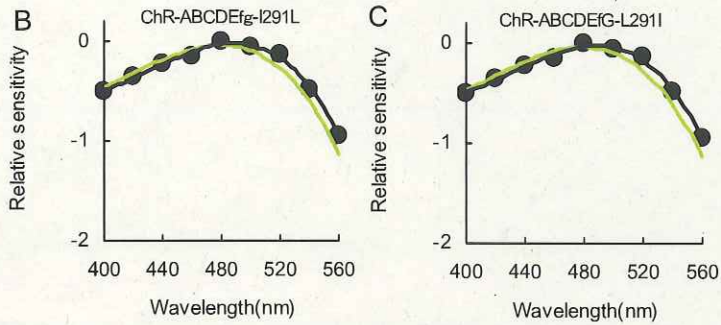


Figure.3. The effect of the mutation ChR-ABCDEFg-I291L (black) and ChR-ABCDEFg-L291I (black) on the wavelength sensitivity.

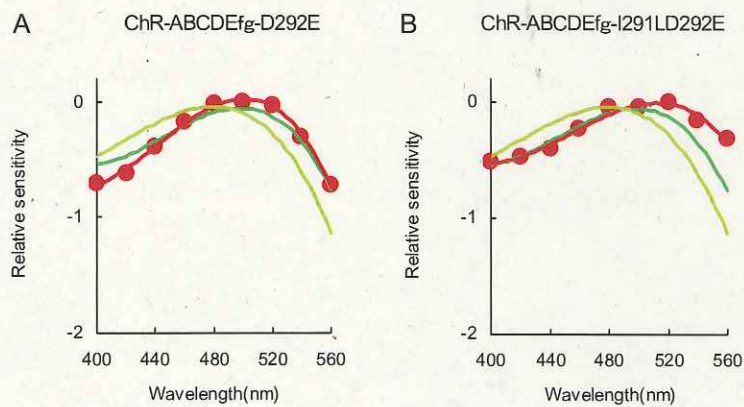


Figure.4. The effect of mutation ChR-ABCDEFg-D292E (red) and the ChR-ABCDEFg-I291LD292E(red) on the wavelength sensitivity.

作成日 : 2011 年 3 月 3 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2011 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 王 喆
指導責任者名： 村松 正道
所属部署名：金沢大学 医学系 職名：教授
所在地：金沢市宝町 13 番 1 号
電 話：076-265-2176 内線：2175



1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

薬剤耐性ウイルス出現における自然免疫効果分子 APOBEC の役割

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 (学会名・演題)

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

“B 型肝炎ウイルス高頻度突然変異における塩基除去修復因子 UNG の作用”

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

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

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

Kouchi Kitamura, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, Guoxin Liang, Yoshiko Mitsuya, Miyuki Simadu, Miki Koura, Taketomo Ozaki, and Masamichi Muramatsu

薬剤耐性ウイルス出現における自然免疫効果分子APOBECの役割

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

Background:

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

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

Results:

Fig1, IFN- α -induced expression of APOBEC genes in HepG2 cells. Expression of APOBEC cytidine deaminases and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). cDNA pools were synthesized from human hepatoma cells(HepG2 cells), which had been cultivated for 9 hours with and without IFN- α , and were analysed by Reverse Transcription-PCR for the expression of AOPBEC3s and ADAR1. β -actin cDNA was amplified as a loading control. The PCR products were analysed on 2% agrose gel and then stained with SYBR Green .

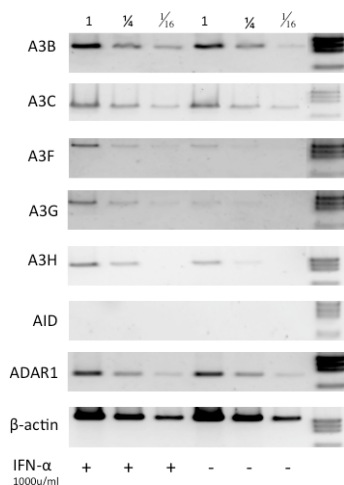


Fig2, IFN γ -induced expression of APOBEC genes in HepG2 cells. Expression of APOBEC cytidine deaminases and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). cDNA pools were synthesized from human hepatoma cells(HepG2 cells), which had been cultivated for 48 hours with and without IFN- γ , and were analysed by Reverse Transcription-PCR for the expression of AOPBEC3s and ADAR1. β -actin cDNA was amplified as a loading control. The PCR products were analysed on 2% agrose gel and then stained with SYBR Green .

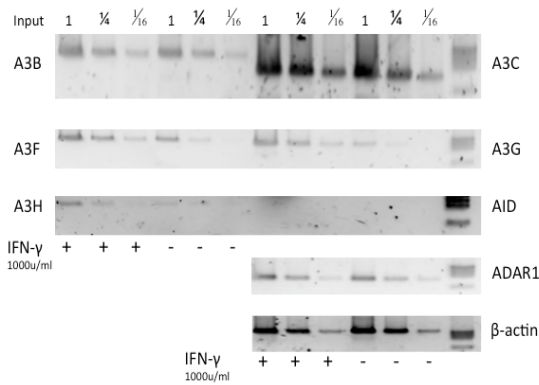


Fig3, TGF-β1-induced expression of APOBEC genes in HepG2 cells. . HepG2 cells total RNA was isolated before(0 hr), 12hr and 15hr after stimulation with human TGF-β1(10ng/ml).APOBEC gene expression were assessed by RT-PCR. The PCR products were analysed on 2% agarose gel and then stained with Ethidium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

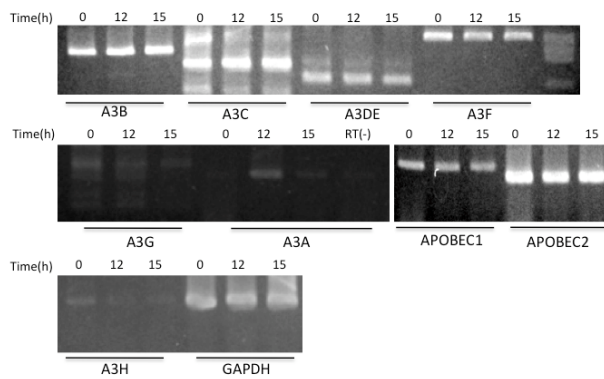


Fig4, TGF-β1-induced expression of APOBEC genes in Huh7 cells. Fig.4. HuHh7 cells total RNA was isolated before and 48hr after stimulation with human TGF-β1(10ng/ml). APOBEC genes expression were assessed by RT-PCR. The PCR products were analysed on 2% agarose gel and then stained with Ethidium bromide.

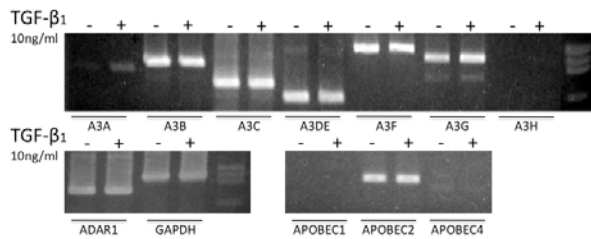
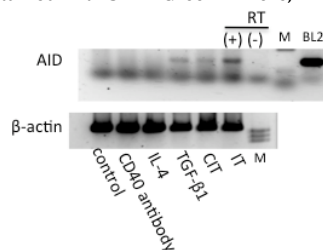


Fig5, AID expression by CIT stimulation 2 days in Huh7 cells. Induction of AID mRNA expression in Huh7 cells. cells were either unstimulated or stimulated for 2 days with anti-CD40(10ug/ml), IL-4(150ng/ml), TGF-β1(10ng/ml) and antiCD40+IL-4+TGF-β1. AID gene expression was assessed by RT-PCR. The PCR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



Conclusion:

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

Summary:

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

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

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

Refrences:

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

Materials and methods

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

Cell culture

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

Semi quantitative RT-PCR

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

作成日 : 2011 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2011 年 2 月 21 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：呼和哈斯

指導責任者名：鈴木幸一

所属部署名：感染制御部第8室 職名：室長

所在地：東京都東村山市青葉町4-2-1

電話：042-394-9092 内線：431



1. 助成金額： 600,000 円
2. 研究テーマ サイログロブリン(Tg)が持つ細胞増殖遺伝子発現調節機能を担う活性部位の同定

3. 成果の概要

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

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

複数のシグナル伝達カスケードを介して誘導されていることを示唆しました。

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

(2)発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

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

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

要旨

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

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

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

緒言

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

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

対象と方法

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

結果

1) FRTL-5 細胞で TSH、インスリン、血清非存在で Tg 刺激に応じた遺伝子
DNA マイクロアレイの解析により、FRTL-5 細胞では TSH、インスリン、血清非存在 Tg のみの刺激で 1095 の遺伝子発現が高進され、862 の遺伝子発現が減少を示し、MEK1, Fos, ERK1 など MAPK 経路関連遺伝子の発現が顕著に増加することを明らかにした。(図 1)

2) Tg により活性化した MAPK/ERK 経路
ウェスタンブロッティングによりリン酸化 c-Raf、MEK1/2 と ERK1/2 など MAPK/ERK 経路関連タンパクの変動を確認したところ、Tg 処理しない群に比べ Tg 処理群では発現増加が観察され、その増加が MAPK/ERK 阻害剤 (PD98059) により抑制された。Tg 処理と TSH 処理群の BrdU アッセイの比較で、PD98059 により抑制される Tg の細胞増殖活性が TSH 処理群では認められなかった。
(図 2)

3) MAPK/ERK の下流の細胞増殖因子が Tg により活性化された
RT-PCR とウェスタンブロッティングにより MAPK/ERK 経路の下流の遺伝子の mRNA とタンパク活性を評価したところ、c-myc, c-fos と c-jun などの転写因子が Tg 刺激により顕著に増加され、TSH では増加が認められなかった。また、細胞周期に関する遺伝子 cyclin D1, cyclin D2, CDK2 と CDK4 も Tg 刺激により経時的に増加、Rb のリン酸化が誘導された。(図 3)

考察

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

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

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

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

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

図

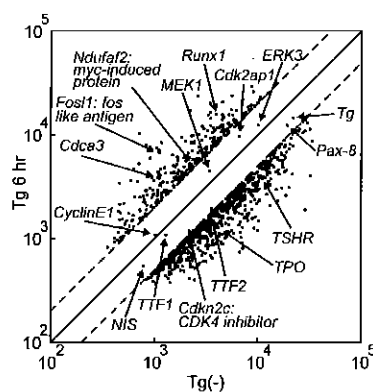


FIG. 1. DNA microarray analysis of genes expressed on FRTL-5 thyroid cells after stimulation of Tg without TSH, insulin, and serum. FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were exposed to 5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

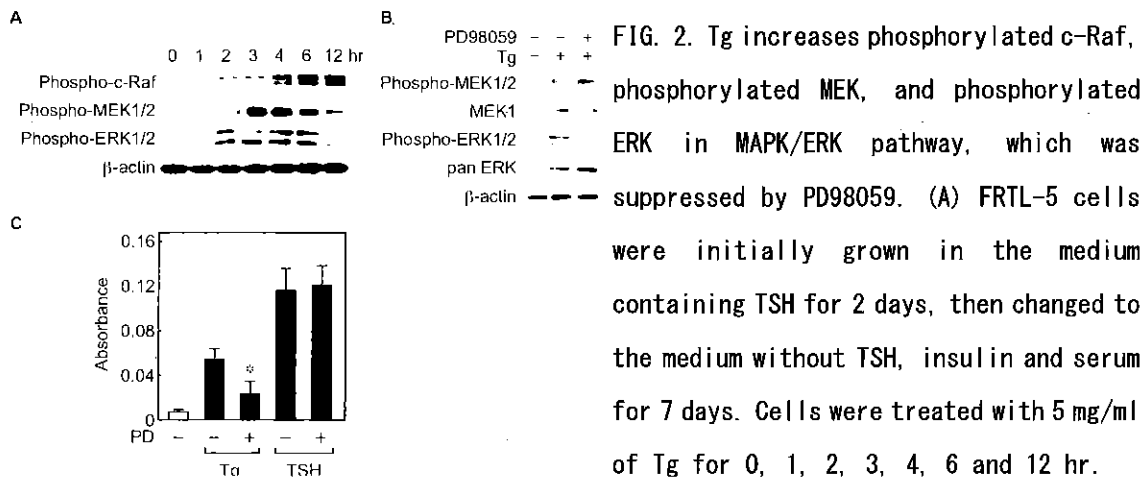


FIG. 2. Tg increases phosphorylated c-Raf, phosphorylated MEK, and phosphorylated ERK in MAPK/ERK pathway, which was suppressed by PD98059. (A) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin and serum for 7 days. Cells were treated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

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

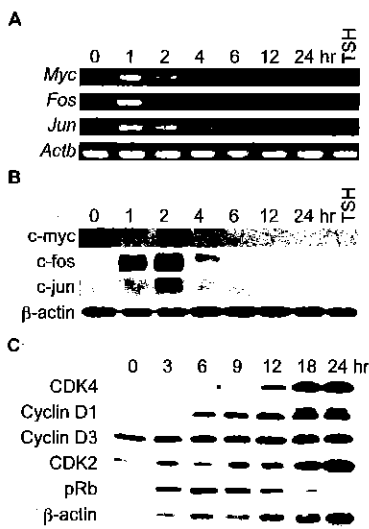


FIG. 3. Tg increases mRNA and protein levels of transcriptional genes. (A) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were challenged by Tg for 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 hr. Total RNA was extracted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

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

参考文献

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

9. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* 4(1):82-89, 1994.
10. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science.* 6:249(4964):64-7, 1990.
11. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 12:369(6476):156-60, 1994.
12. Ekokoski E, Webb TE, Simon J, Törnquist K. Mechanisms of P2 receptor-evoked DNA synthesis in thyroid FRTL-5 cells. *J Cell Physiol.* 187(2):166-75, 2001.
13. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* 1:13(7):1610-9, 1994.
14. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 12:265(5174):966-70, 1994.
15. Pomerance M, Abdullah HB, Kamerji S, Correze C, Blondeau JP. Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 22:275(51):40539-46, 2000.
16. Corrèze C, Blondeau JP, Pomerance M. The thyrotropin receptor is not involved in the activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases by thyrotropin preparations in Chinese hamster ovary cells expressing the human thyrotropin receptor. *Thyroid.* 10(9):747-52, 2000.

2011年2月21日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：石秀玉

指導責任者名：廣瀬 伸一

所属部署名：福岡大学医学部

所在地：福岡市城南区七隈 7 丁目 4 5-1

電話：092-801-1011 (3393)

職名：主任教授

内線：3393



1. 助成金額： 600, 000 円

2. 研究テーマ

—日中医学協会助成事業—

Dravet 症候群患者における modifier 遺伝子異常

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ (学会名・演題)

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

(2) 発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

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

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

—日中医学協会助成事業—

Dravet syndrome での SCN9A の遺伝子変異分析—

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

<要旨>

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

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

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

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

<Key Words>

Dravet syndrome, SCN1A, SCN9A, mutation, genetics

<本文>

緒言：

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

対象と方法：

1. Subjects

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

2. Genetic analysis

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

結果：

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

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

考察：

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

参考文献：

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

Table 1. Overview of all identified SCN9A missense variants.

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

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

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

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 李賓
指導責任者名：武田 卓
所属部署名：東北大学先進漢方 職名：准教授
治療医学講座
所在地：仙台市青葉区星陵町 1 番 1 号
電 話：022-717-7000 内線：7254



1. 助成金額： 60 万 円

2. 研究テーマ

子宮筋腫細胞増殖・線維化における、低酸素細胞内シグナル伝達機構解析

3. 成果の概要

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

子宮筋腫細胞増殖・線維化における、低酸素細胞内シグナル伝達機構解析

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

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

要旨:

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

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

緒言:

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

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

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

対象と方法:

1) 子宮筋腫細胞増殖に対するメトホルミンによる抑制効果の in vitro での検討

- ・子宮筋腫細胞株である ELT-3 細胞、UtLM 細胞を実験に用いた。
- ・MTS アッセイを用いて細胞増殖を検討した。
- ・アポトーシスの関与を cleaved PARP の発現、および TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色で評価した。
- ・mTOR シグナル伝達経路下流のタンパク質のリン酸化抗体を使用した Western blotting を検討した。

2) 子宮筋腫細胞増殖に対するメトホルミンによる抑制効果の in vivo での検討

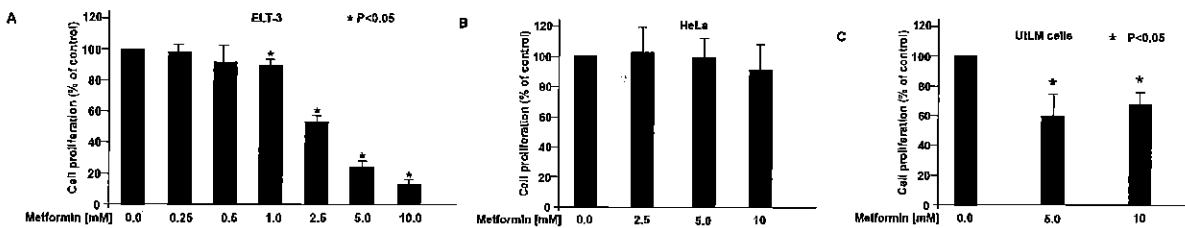
- ・ヒト子宮筋腫をヌードマウスに移植した子宮筋腫モデルマウスを作製した。
- ・子宮筋腫モデルマウスにメトホルミンを経口投与し、腫瘍サイズの変化を経時的に測定した。これより摘出した組織を用いて、細胞増殖・血管新生・アポトーシスをタネル染色、Ki-67・VEGF 抗体を用いた免疫染色で、mTOR シグナルへの抑制効果をリン酸化 S6 抗体を用いた免疫染色で検討した。

結果:

1. メトホルミンは子宮筋腫細胞増殖を抑えた。

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

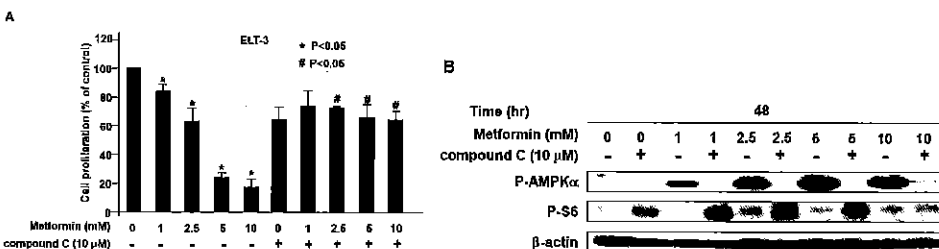
Fig. 1



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

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

Fig. 2



3. ELT-3 細胞はメトホルミンによってアポトーシスが誘導される。

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

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

Fig. 3

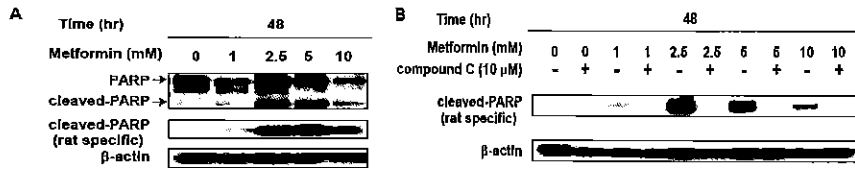
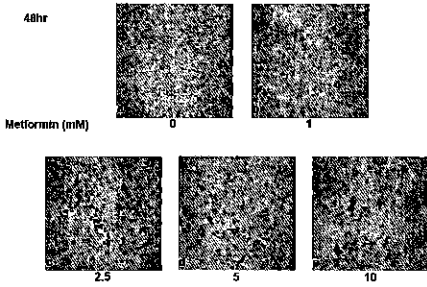


Fig. 4



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

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

Fig. 5

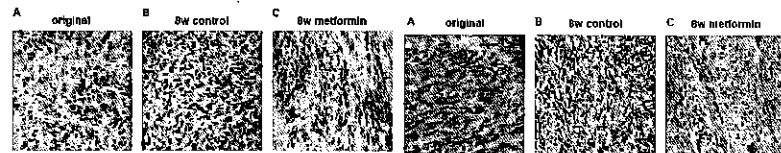


Fig. 6

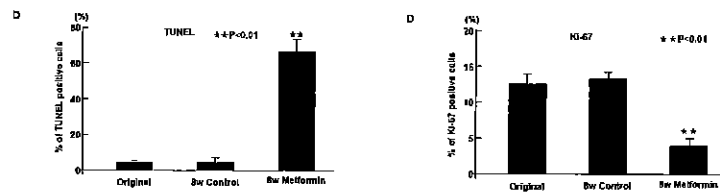


Fig. 7

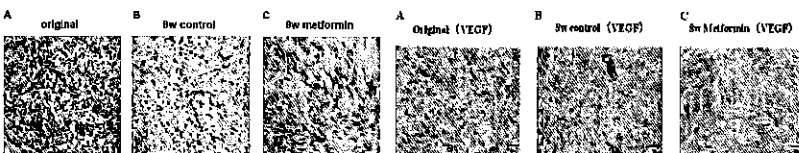


Fig. 8

考察:

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

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

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

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

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

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

参考文献:

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

作成日: 2011 年 3 月 24 日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2011 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 謝 琳
指導責任者名： 高原 史郎、梨 井康
所属部署名： 大阪大学大学院 職名： 大学院生
所 在 地：大阪府吹田市山田丘 2-2
電 話： 06-6879-3746 内線：



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

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

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ (学会名・演題)

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

(2) 発表した論文 ・有(雑誌名・題名)

臓器移植後抗体産生機序の解明に関する研究

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

Abstract

The development of an animal model bearing definite antigens is important to facilitate the evaluation and modulation of specific alloantigen responses after transplantation. In the present study, heterotopic cardiac transplantation was performed from F344/EGFPg and F344/HLA-B27Tg rats to F344 rats. The F344 recipients accepted the F344/EGFPg transplants, whereas they rejected the cardiac tissue from the F344/HLA-B27Tg rats by 39.4 ± 6.5 days, due to high production of anti-HLA-B27 IgM- and IgG-specific antibodies. In addition, immunization of F344 rats with skin grafts from F344/HLA-B27Tg rats resulted in robust production of anti-HLA-B27 IgM and IgG antibodies, and accelerated the rejection of a secondary cardiac allograft (7.4 ± 1.9 days). Of interest, the F344 recipients rejected cardiac grafts from double transgenic F344/HLA-B27&EGFPg rats within 9.0 ± 3.2 days, and this was associated with a significant increase in the infiltration of lymphocytes by day 7, suggesting a role for cellular immune rejection. Hence, our data indicate that HLA-B27 and/or GFP transgenic proteins are useful for establishing a unique animal transplantation model to clarify the mechanism underlying the allogeneic cellular and humoral immune response, in which the transplant antigens are specifically presented.

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

Introduction

The development of an animal model bearing definite antigens is important to facilitate the evaluation and modulation of the specific alloantigen response after transplantation. In the present study, we first used HLA-B27Tg rats in a transplantation study, and found that F344 recipients rejected cardiac grafts from the F344/HLA-B27Tg rats via a process of chronic rejection, resulting from high production of anti-HLA IgM- and IgG-specific antibodies. In contrast, the F344 recipients rejected cardiac grafts from double transgenic F344 /HLA-B27&EGFPg rats through acute rejection, associated with a significant increase in the infiltration of lymphocytes, which indicated that the HLA-B27 and/or GFP

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

Materials & Methods

Rats

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

Heterotopic cardiac transplantation

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

Lymphocyte proliferation assays

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

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

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

Histological analysis

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

Statistical analysis

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

Results

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

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

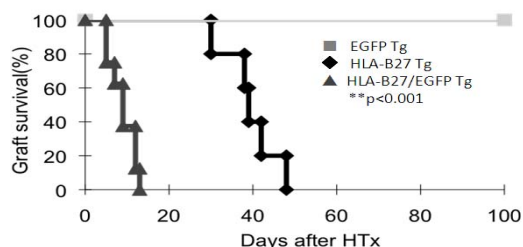


Figure 1. F344 recipients rejected cardiac allografts from F344/HLA-B27 Tg and F344/HLA-B27&EGFP Tg donors. Heterotopic cardiac transplantation was performed, in which F344 rats were recipients and sex-matched F344/EGFP Tg, F344/HLA-B27 Tg or F344/HLA-B27&EGFP Tg rats were donors. MST= median survival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

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

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

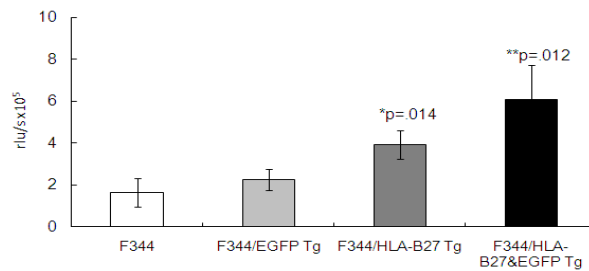


Figure 2. The alloantigen response was significantly enhanced by HLA-B27 and HLA-B27&EGFP, but not by the EGFP transgene. MLR was performed with F344 rat nylon-wool column enriched T cells as responders, and irradiated F344/EGFP, F344/HLA-B27 or F344/HLA-B27&EGFP Tg rat splenocytes as stimulators. The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

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

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

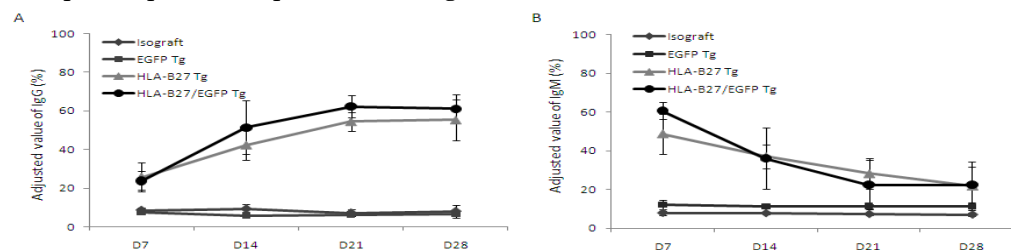


Figure 3. There is vigorous production of specific anti-HLA-B27 IgG and IgM antibodies following allogeneic sensitization. FACS measurement of serum IgG (A) and IgM (B) at different time points post cardiac transplantation, showing that the total serum IgG increased steadily while the IgM decreased gradually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

Histopathological features

We then compared the histopathological features of the allograft between these four groups. The F344/EGFPtg cardiac grafts were free of myocardial injury and had markedly reduced inflammatory cells infiltration even on POD100, while the histopathological features of F344/HLA-B27tg cardiac grafts on POD40 showed the features of chronic rejection, including mild interstitial infiltration of inflammatory cells, hemorrhage, and fibrosis. In contrast, classic signs of acute rejection could be seen in the F344/HLA-B27&EGFPtg cardiac grafts and F344/HLA-B27tg cardiac grafts from skin graft-primed rats on POD5, including strong interstitial infiltration of inflammatory cells, severe hemorrhage, edema, and necrosis (Fig. 4).

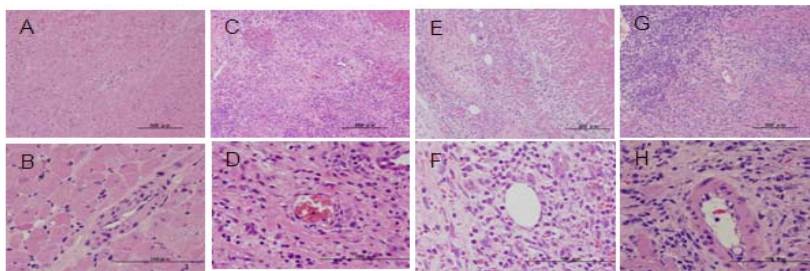


Figure 4. Histopathological features of cardiac allografts between F344/EGFP, F344/HLA-B27, and F344/HLA-B27&EGFPtg rats and skin-primed F344/HLA-B27tg rats. The F344/EGFPtg cardiac grafts were free of myocardial injury and had markedly reduced inflammatory cell infiltration even on POD100 (A, B), while the histopathological features of F344/HLA-B27tg cardiac grafts on POD40 (C, D) showed chronic rejection, including mild interstitial infiltration of inflammatory cells, hemorrhage, and fibrosis. In contrast, classic signs of acute rejection could be seen in the F344/HLA-B27&EGFPtg (E, F) cardiac grafts and cardiac grafts implanted into skin-primed rats (G, H) on POD5 including strong interstitial infiltration of inflammatory cells, severe hemorrhage, edema, and necrosis. Scale bars represent 100, 200mm.

Discussion

We herein described a unique and useful animal transplantation model in which grafts from F344/HLA-B27tg rats mainly provoke a humoral immune response and grafts from F344/HLA-B27&EGFPtg rats represent a typical cellular immune response. T cells are essential for allograft rejection, but allo-antibodies, whose main targets are MHC molecules, can also contribute to acute and chronic graft rejection [4]. Clinical studies have shown a correlation between the presence of anti-HLA antibodies, complement C4d deposition, and graft failure [4, 5]. The removal of alloantibodies by IVIg or plasmapheresis, or by the depletion of B cells, can improve the longevity of transplants [6]. We found that F344 recipients rejected cardiac grafts from F344/HLA-B27tg donors via the process of chronic rejection (Fig. 1), due to high production of anti-HLA-B27 IgM- and IgG-specific antibodies (Fig. 3). These data showed that F344 rats reject F344/HLA-B27tg cardiac allografts via cellular immunity.

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

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

Reference

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

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

作成日 2011年3月15日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏：王 霜

指導責任者名：小方 頼昌

所属部署名：日本大学松戸歯学
部

所 在 地：千葉県松戸栄町西 2-870-1

電 話：047-360-9365



職名：歯周治療講座

内線：365

1. 助成金額： 600.000 円

2. 研究テーマ

インターロイキン 11 にする骨シアロタンパク質の転写調節

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・有(学会名・演題)

第 96 回アメリカ歯周病学会 共催日本歯周病学会 2010 年大会

Effect of Interleukin-11 on Bone Sialoprotein Gene Transcription

第 53 回春季日本歯周病学会

Calcium Hydroxide Regulates Bone Sialoprotein Gene Transcription

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

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

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

インターロイキン-11による骨シアロタンパク質の転写の調節

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

要旨

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

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

緒言

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

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

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

対象と方法

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

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

結果

1. Effects of IL-11 on BSP mRNA

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

2. Transient transcription analyses of rat BSP promoter constructs

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

3. Gel mobility shift assays

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

考察

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

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

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

参考文献

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

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

作成日：2011年3月1日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：

周 鑫



指導責任者名：

久野 高義

所属部署名：神戸大学大学院医学研究科

職名：教授

生化学・分子生物学講座

分子薬理・薬理ゲノム学分野

所在地：650-0017

神戸市中央区楠町 7-5-1

電話：078-382-5441

内線：5441

1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

分裂酵母における Ran GTPase 新規変異体の単離と解析

3. 成果の概要

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

4. 研究業績

① 学会における発表 有 (学会名・演題)

② 発表した論文 有 (雑誌名・題名)

分裂酵母における Ran GTPase 新規変異体の単離と解析

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

<Abstract>

Spilp of *Schizosaccharomyces pombe* is a structural homolog of the mammalian GTPase Ran, and *spit⁺* is an essential gene. In a screen designed to identify fission yeast genes required for living in high temperature (36°C), we identified a strain that carries a point mutation in the SpRan GTPase. Ran is an abundant Ras-like small GTPase, which is mainly localized in the nucleus¹, like other GTPases, switches between a GTP-bound and a GDP-bound form. The Ran family of GTPases, have been implicated in variety of nuclear processes including cell cycle progression, nucleocytoplasmic transport of protein and RNA, initiation of DNA replication, RNA metabolism, nucleolar and chromatin structure, and transcriptional regulation^{2,3,4}. Ran and its structural and functional homologs interact with proteins that modulate its nucleotide-bound state: Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that stimulate the exchange of GDP for GTP and GTPase-activating proteins (GAPs) that catalyze the intrinsic GTPase activity, hydrolyzing the bound GTP to GDP. In fission yeast, the functioning of the spilp GTPase system require a precise balance between the GDP- and GTP-bound forms of Ran GTPase spilp, that the nucleotide-bound state of the GTPase correlates with its intracellular localization. Pim1p has been found in *S. pombe* the spilp GEF and rna1p, has been shown to have GAP activity. Here, we describe the isolation and characterization of *spit-93*, a mutant allele of the *spit⁺* gene. The Ran guanine nucleotide GEF Pim1 mutant (*pim1-46*)⁵ cells and *spit-93* cells exhibited similar phenotypes. Overexpression of wild-type *spit⁺* and *pim1⁺* suppressed the ts phenotype of *spit-93* and *pim1-46* mutant cells and overexpression of SPAC669.14(*puff⁺*), pumilio-family RNA binding protein coding gene, only partially suppressed the TS phenotype of these two mutant cells. We also found another *spit* mutant cells (*spit-25*)⁶ with different mutation site in *spit⁺* gene showed different phenotypes with *spit-93* and *pim1-46*, and the obtained two multicopy suppressor genes *pim1⁺* and *puff⁺* didn't suppress TBZ sensitivity of *spit-25*. Further studies are needed to reveal the mechanism underlying the regulation of suppressants and more multicopy suppressor genes are needed to be identified in future.

<Key words>

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

<Introduction>

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

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

<Materials and methods>

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

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

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

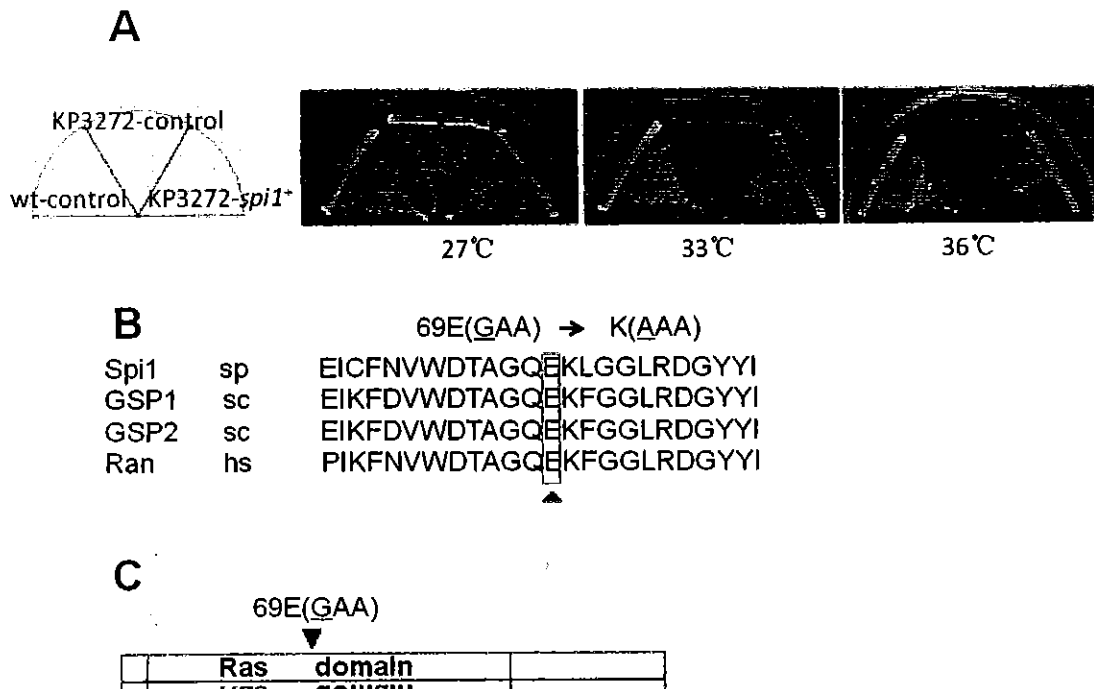
Isolation of the multicopy suppressor genes— To screen for other suppressors of the *spi1-93* mutation, the mutant was transformed with a fission yeast genomic DNA library, and the Leu+ transformants were replica-plated onto both YPD plates at 34° C, 35° C and 36° C. The plasmids that complemented the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

<Results>

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

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

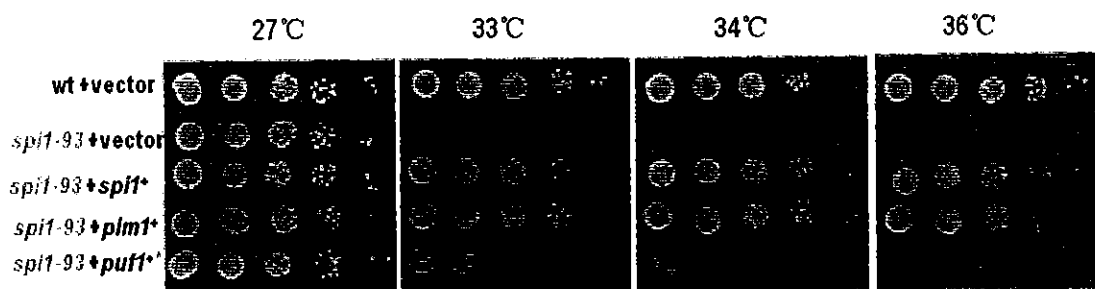
Fig. 1



2. *pim1⁺* (SPBC557.03c) and *puff1⁺* (SPAC669.14) are multicopy suppressor genes of *spi1-93*.

Overexpression of wild-type *spi1⁺* and Ran GEF encoding gene *pim1⁺* completely suppressed the *ts* phenotype of *spi1-93* mutant cells and overexpression of pumilio-family RNA binding protein coding gene, SPAC669.14 (*puff1⁺*), only partially suppressed the *ts* phenotype of *spi1-93* mutant cells (Fig. 2).

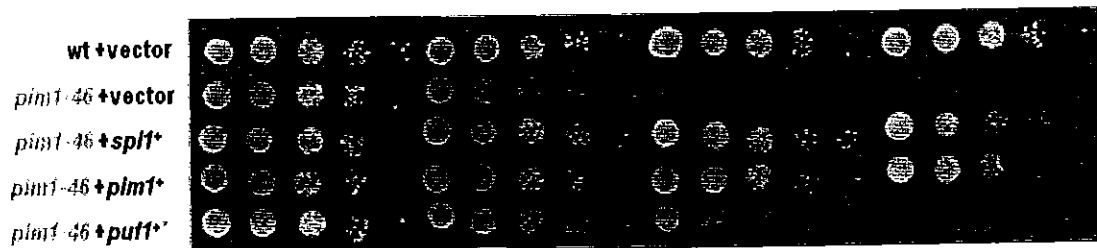
Fig. 2 *spi1-93: spi1^{E69K}*, the 69th glutamic acid (E) of Spi1p was mutated to lysine (K).



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

Overexpression of wild-type *spi1* and *pim1* also completely suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells and overexpression of SPAC6G9.14(*puff1*) also partially suppressed the ts phenotype of *spi1-93* mutant cells (Fig. 3).

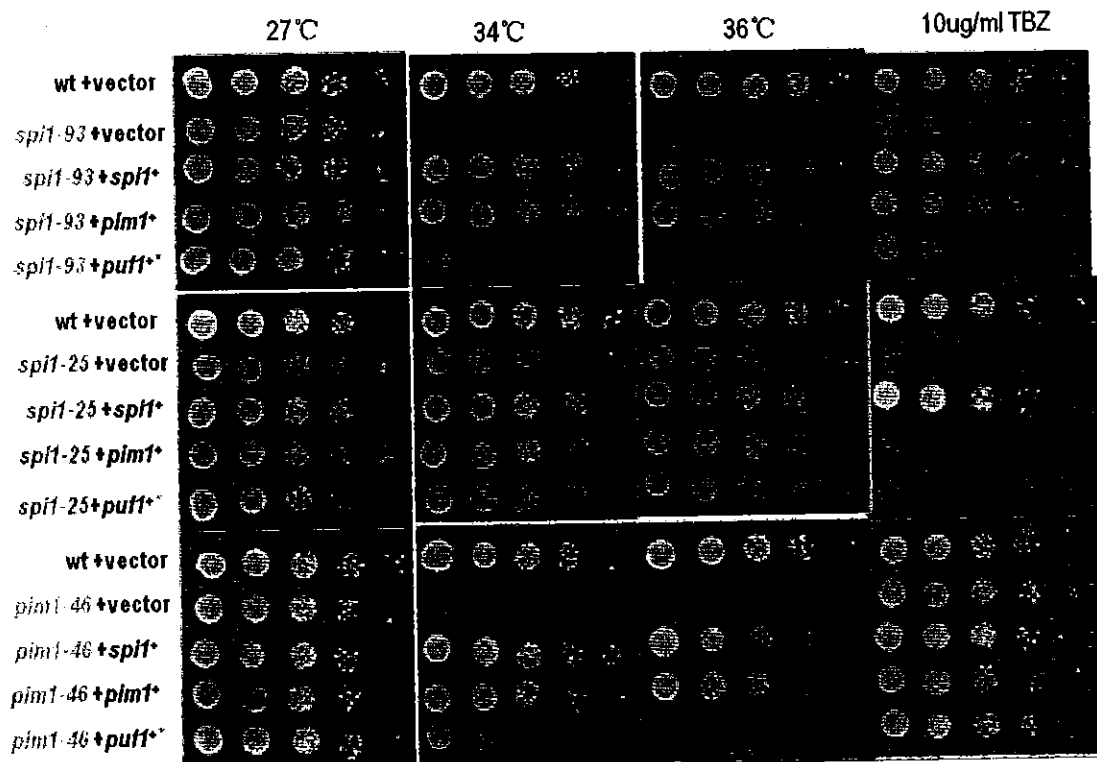
Fig. 3 *pim1-46*: *pim1*^{L113S}, the 113rd leucine (L) of Pim1p was mutated to serine(S).



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

spi1-25 exhibited thiabendazol (TBZ) sensitivity but not ts phenotype which is different with those of *spi1-93* and *pim1-46*. And we also found that overexpression of wild-type *pim1* and SPAC6G9.14(*puff1*) didn't suppress the TBZ sensitivity of *spi1-25* mutant cells (Fig. 4).

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



<Discussion>

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

Table1. Strains used in this study.

Strain	Genotype
KP3272	<i>h⁻ leu1-32 spi1-93 (spi1^{E69K})</i>
KP3842	<i>h⁻ leu1-32 pim1-46 (pim1^{L135})</i>
KP4113	<i>h⁻ leu1-32 spi1-25 (spi1^{V441})</i>

<References>

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

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2010 年 6 月 30 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 真柳 誠

所属機関名：茨城大学大学院

所属部署名：人文科学研究科

所在地：水戸市文京 2-1-1

電 話：029-228-8194

職名：教授

内線：直通



1. 助成金額：300000円

2. 会議名称・テーマ

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

3. 会議の概要

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

4. 被招聘者概要

1. 被招聘者氏名：鄭 金生

所属機関名：中国中医科学院

職名：研究員

部署名：中医薬情報研究所

2. 被招聘者氏名：廖 育群

所属機関名：中国科学院

職名：研究員・前所長

部署名：自然科学史研究所

3. 被招聘者氏名：梁 永宣

所属機関名：北京中医薬大学

職名：教授

部署名：医史教研室


財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2010 年 9 月 29 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 平馬直樹 
所属機関名： 日本医科大学
所属部署名： 東洋医学科 職名： 非常勤講師
所在地： 東京都文京区千駄木 1-1-5
電話： 03-3822-2131 内線：

1. 助成金額： 100,000 円

2. 会議名称・テーマ

日本中医学会設立記念シンポジウム

3. 会議の概要

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

4. 被招聘者概要

- | | |
|----------------|------------|
| 1. 被招聘者氏名： 高彦彬 | 職名： 教授 |
| 所属機関名： 首都医科大学 | 部署名： 中医薬学院 |
| 2. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |
| 3. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |

日本中医学会設立記念 シンポジウム

メイン
テーマ

現代医療における中医学の役割

主催：日本中医学会設立準備委員会

助成：(財)日中医学協会

日時：2010年8月29日(日) 午前10時00分～午後5時30分

会場：東京都北区「北とぴあ」飛鳥ホール (JR王子駅徒歩1分)

参加費：10,000円 懇親会費：5,000円

(参加者には日本中医学会の初年度の会費が免除されます。)

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

日本中医学会設立記念シンポジウムのお知らせ

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

(日本中医学会設立準備委員会 一同)

プログラム

講演 (10:30~12:30)

招待講演 『糖尿病の中医治療の現況』 全小林^{とよしよりん} (中国中医科学院・広安門医院、副院長)

特別講演 1.『新型インフルエンザにたいする漢方治療の経験』 加島雅之 (熊本赤十字病院内科)

2.『認知症に対する鍼灸の取り組みについて』 兵頭明 (学校法人後藤学園・中医学研究所所長)

シンポジウム テーマ：『中医学と先端医療の融合に向けて』 (13:30~16:10)

1. 田平 武 (順天堂大学大学院・認知症診断予防治療学講座、教授)

2. 正山 征洋 (長崎国際大学・薬学部・物質薬学分野・薬品資源学、教授)

3. 田村 守 (中国・清華大学医学院、客員教授)

4. 酒谷 薫 (日本大学医学部・脳神経外科学系・光量子脳工学分野、教授)

総合討論 (16:30~17:30)

懇親会 (18:00~20:00)