



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

# 中間報告書

2021年4月～2022年3月

公益財団法人 日中医学協会

# 目 次

No.	氏名	所属機関	研究先	指導責任者	頁数
G42-1	徐 詩婷 ジョー シーイ  (論文博士)	遼寧省腫瘤医院大東医院 医師  研究テーマ：肺癌薬物治療における効果予測バイオマーカーの探索	順天堂大学大学院医学研究科 呼吸器内科学	高橋 和久 主任教授	……P1
G42-2	和 晋渝 ワ シンユ  (課程博士)	重慶市疾病予防控制中心公共衛生与安全観測所 主治医師  研究テーマ：温度関連の死亡率に対する都市ヒートアイランドの影響	長崎大学大学院 熱帯医学・グローバルヘルス研究科	Lina Madaniyazi 助教	……P7
G43-1	姚 利 ヨウ リ  (課程博士)	千葉大学大学院 大学院生  研究テーマ：在留中国人高齢者を介護する家族支援プログラムの開発	千葉大学大学院 看護学研究科 看護学専攻	正木 治恵 教授	……P13
G43-2	張 茂芮 チョウ モセイ  (課程博士)	西南医科大学附属口腔医院 医師  研究テーマ：歯科疾患に対するmRNA を用いた治療戦略の確立	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 咬合機能健康科学分野	笹木 賢治 教授	……P21
G43-3	王 喻 ワ ユ  (課程博士)	京都大学大学院 大学院生  研究テーマ：PD-1阻害による免疫賦活化異常疾患の研究	京都大学大学院医学研究科 医学専攻 免疫ゲノム医学	本庶 佑 センター長	……P38

日中笹川医学奨学金制度 (学位取得コース) 中間評価書

論文博士：指導教官用



第 42 期

研究者番号： G4204

作成日： 2022 年 3 月 7 日

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

研究者評価 (指導教官記入欄)

成績状況	優 ■ 良 可 不可	取得単位数
		取得単位数 / 取得すべき単位数総数
学生本人が行った研究の概要	<p>「肺癌薬物治療における効果予測バイオマーカーの探索」の中でも、特に、免疫チェックポイント阻害薬の再投与について、検討を行った。これまでの文献を用いたメタアナリシスにより、免疫チェックポイントの再投与のメリットのある患者の同定を試みた。そして、免疫チェックポイント阻害薬再投与時の効果が、初回免疫チェックポイント阻害薬中止時の理由により異なっていることを明らかにした。</p> <p>また、免疫チェックポイント阻害薬の投与を受けた患者の、治療前血漿と治療後血漿で、サイトカインパネル等を用い、悪液質や免疫チェックポイント阻害薬への反応について検討を行っている。今後、得られた結果を患者組織検体等を用いて validate する予定である。</p>	
総合評価	<p>【良かった点】</p> <p>与えられたテーマに対して積極的に文献検索などを行い、研究をより発展させるべくアイデアを提示することが出来る。得られた結果を考察し、研究方法の改善に対し feedback させることが出来る。</p>	
	<p>【改善すべき点】</p> <p>特になし。</p>	
	<p>【今後の展望】</p> <p>上記二つの研究に加え、新たにもう一つの研究も開始する予定である。様々な研究手法を身に着け、徐先生の今後の研究者としての発展を支えていきたい。</p>	
学位取得見込	すでに論文が一つアクセプトされており、学位取得の可能性は高い。	
		評価者 (指導教官名) 高橋 和久

# 日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間報告書 研究者用



第42期

研究者番号: G4202

作成日: 2022年3月7日

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

Study 1 1. 研究概要 (2)

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

2) 戦略 (Approach)

① Related study search and selection (according to PRISMA guidelines) ② Data extraction and quality assessment. ③ Outcomes assessment and statistical analysis

3) 材料と方法 (Materials and methods)

① Data sources and study selection  
Study search and selection was conducted in accordance with the PRISMA guidelines. A comprehensive literature search was conducted to identify all relevant articles. The studies were searched in the databases of PubMed, EMBASE, and Cochrane Library. The search terms were the following Medical Subject Headings (Mesh) and their synonyms: ‘carcinoma, non-small-cell lung’ AND ‘immune checkpoint inhibitor’ AND ‘rechallenge’. The studies were reviewed to evaluate the title, abstract, and full publication sequentially. Case reports, reviews, comments, animal experiments, meta-analyses, abstracts, and meetings with incomplete data or non-English content were also excluded.

② Data extraction and quality assessment  
The following information was extracted: first author, year of publication, country, study design, treatment period, number, gender and mean age of patients at initial treatment, regimens and therapy line of initial ICI and ICI rechallenge, tumor proportion status, best response to ICI treatment, number of patients who experienced Grade 3 or 4 irAE after initial treatment and after rechallenge, median progression-free survival (in months), the cessation reasons of initial ICI, and also interval time between initial ICI and ICI rechallenge. Study quality assessments were performed based on Newcastle - Ottawa Scale.

③ Outcome assessment and statistical analysis  
The best response to treatment was assessed as complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD), or not evaluable (NE) according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST v1.1). Adverse events were graded according to Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 (CTCAE v4.0). Hazard ratio for PFS was estimated using Inverse Variance in RevMan version 5.4.

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

## 5) 考察 (Discussion)

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

## 6) 参考文献 (References)

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

## Study 2

## 研究概要

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

## 2) 戦略 (Approach)

- ① Patient peripheral blood at baseline of ICI and after one cycle of ICI collection
- ② Patient information collection and analysis
- ③ Cytokines assay in patient plasma samples using EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human Cytokine / Chemokine Panel
- ④ Results validation with lung cancer tissue immunohistochemistry

## 3) 材料と方法 (Materials and methods)

## ① 41 patients information and plasma collection

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

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

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

## 4) 実験結果 (Results)

A total of 41 patients with NSCLC treated with ICIs were included. Patients were predominantly male (73%), smokers (92%) and had a good PS (ECOG PS of 0 or 1 in 89% of cases). 68% of the patient received pembrolizumab, and another 27%, 5% treated with atezolizumab and nivolumab respectively.

Eotaxin-1 increase after one cycle of ICI therapy in all the patients who received complete response or partial response, compared with that in patient had stable disease or progressive disease during ICI (P=0.023)

Patients with eotaxin-1 change after one cycle of ICI therapy over than median had higher PFS than that in patients with eotaxin change lower than median after one cycle of IC (P=0.025).

## 5) 参考文献 (References)

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

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

論文名 1 Title	Heterogeneous outcomes of immune checkpoint inhibitors rechallenge in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis (Under review after revision)					
掲載誌名 Published journal	JTO Clinical and Research Reports					
	in print 年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author	Shiting Xu		第2著者名 Second author	Takehito Shukuya		第3著者名 Third author Jun Tamura
その他著者名 Other authors	Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Keita Miura, Taichi Miyawaki, Daisuke Hayakawa, Tetsuhiko Asao, Kouji Yamamoto, Kazuhisa Takahashi					
論文名 2 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						
論文名 3 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						
論文名 4 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						
論文名 5 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁	言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author			第3著者名 Third author
その他著者名 Other authors						

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

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

学会名 Conference	The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology		
演題 Topic	Safety and Efficacy of immune checkpoint inhibitors rechallenging in patients with Non-Small-Cell Lung Cancer		
開催日 date	2021 年 11 月 20 日	開催地 venue	Kyoto International Conference Center
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input checked="" type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Shiting Xu, Takehito Shukuya, Jun Tamura, Kouji Yamamoto, Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Daisuke Hayakawa, Tetsuhiko Asao, Kazuhisa Takahashi		
学会名 Conference	第62回日本肺癌学会学術集会(The 62nd Annual Meeting of the Japan Lung Cancer Society)		
演題 Topic	Safety and Efficacy of immune checkpoint inhibitors rechallenging in patients with Non-Small-Cell Lung Cancer		
開催日 date	2021 年 11 月 26 日	開催地 venue	パシフィコ横浜 ノース
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input checked="" type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	Shiting Xu, Takehito Shukuya, Jun Tamura, Kouji Yamamoto, Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Daisuke Hayakawa, Tetsuhiko Asao, Kazuhisa Takahashi		
学会名 Conference			
演題 Topic			
開催日 date	年 月 日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter			
学会名 Conference			
演題 Topic			
開催日 date	年 月 日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral <input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language	<input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter			

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

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

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

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

## 6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

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

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

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

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

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

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

## 9. その他 Others

--



日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間評価書

課程博士：指導教官用



第 42 期

研究者番号： G4209

作成日： 2022 年 3 月 9 日

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

研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	<input checked="" type="radio"/> 優 <input type="radio"/> 良 <input type="radio"/> 可 <input type="radio"/> 不可 学業成績係数=	取得単位数
		取得単位数/取得すべき単位数総数 4/16
学生本人が行った研究の概要	The study aims to investigate how Urban Heat Island (UHI) impact the risk of temperature on mortality under climate change in Tokyo Metropolitan Area (TMA), Japan. The student has collected daily meteorological data from Agro-meteorological Grid Square Data and daily all-cause mortality from the Ministry of Health, labor and Welfare of Japan for 242 municipalities in TMA between 2010 and 2019. The student will use a time stratified case crossover study design and the state-of-art modelling strategy to estimate the acclimatization to UHI, and project the temperature-related mortality by taking into account UHI effects in the future. The student has conducted initial data analysis and reported the preliminary results in an international symposium.	
総合評価	<b>【良かった点】</b> The student works very hard, and has a very strong motivation for research and strong initiative for learning.	
	<b>【改善すべき点】</b> Since the project involves very complex statical models, the student needs to improve her knowledge and skills in statistical analysis.	
	<b>【今後の展望】</b> I believe the student is making progress towards timely completion of her PhD study, and hope the student will be able to publish her research in high level peer-reviewed journals. More importantly, I hope this collaboration will bring more opportunities for future collaborations on climate change between Japan and China.	
学位取得見込	I believe the student is making progress towards timely completion of her PhD study.	
評価者(指導教官名)		Lina Madaniyazi

# 日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間報告書 研究者用



第42期

研究者番号: G4209

作成日: 2022年3月 9 日

氏名	和 晋渝	He Jinyu	性別	F	生年月日	1985. 05. 04
所属機関(役職)	重慶市疾病予防控制中心公衆衛生与安全観測所(主治医師)					
研究先(指導教官)	長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科(Lina Madaniyazi助教)					
研究テーマ	温度関連の死亡率に対する都市ヒートアイランドの影響 The impact of urban heat island on temperature-related mortality					
専攻種別	論文博士	<input type="checkbox"/>	課程博士	<input checked="" type="checkbox"/>		
<p>1) 目的(Goal) Aim: This study aims to investigate how UHIs impact the risk of temperature on mortality and influence the future temperature-related mortality under a changing climate in Tokyo Metropolitan Area (TMA), Japan, including Saitama, Chiba, Tokyo and Kanagawa. Objectives a. Assess the association between temperature and mortality for each municipality and the whole TMA. b. Examine and quantify the acclimatization to UHI effects on temperature-mortality relation. c. Project the future temperature-related mortality only under temperature changes by taking into account UHI effects.</p> <p>2) 戦略(Approach) A conditional Poisson regression with a distributed lag non-linear model and meta-analysis will be used to estimate the prefecture-specific association between temperature and mortality and the pooled association for the whole TMA. And then, the two approaches, "Comparison of RRs" and "shifted spline" will be applied to estimate the acclimatization to UHI effects on temperature-mortality association. Finally, we will conduct our projection by considering only the temperature changes in future, and combine the results from our previous study (acclimatization to UHI) with the projected temperature to project temperature-related mortality.</p> <p>3) 材料と方法(Materials and methods) Data collection For temperature data, we collected daily mean and maximum air temperature at a 1-km grid resolution from Agro- Meteorological Grid Square Data (AMGSD) between 2010 and 2019. Daily temperature series for historical (1981-2005) and future (2006-2100) periods will be obtained from the Climate Change Scenario Grid Square Data (CCSGSD) to project the future temperature-related mortality. For mortality data, we will obtain daily time-series data on all-cause mortality from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (MHLW) for all 242 municipalities within the entire TMA during the period of 2010-2019. We will collect historical population, air pollutants (daily mean concentration for PM10, PM2.5, NO2 and O3), socioeconomic factors (local tax per capita, the number of students in universities and rooms per dwelling), the percentage of individuals ages 65 or above and the numbers of beds in hospital from local government websites during 2010-2019 for each municipality.</p> <p>Data analysis Firstly, a conditional Poisson regression with a distributed lag non-linear model(Gasparrini et al., 2014) will be applied to estimate prefecture-specific association between temperature and mortality, and the association for the whole TMA by meta-analysis. And then, we will use the urban heat island anomaly to quantify the UHI effects. We will calculate the municipality-specific UHIAs, and they will be classified into ten decile groups. The mean of each UHIAs group will be calculated for the further analysis. After that, the two approaches, "Comparison of RRs" and "shifted spline", will be used to model the impact of UHI on temperature-mortality association by quantifying the degree of acclimatization to UHIAs. Finally, we will project the temperature-related mortality by considering only temperature changes in the future, and combine the results from previous section (acclimatization to UHI) with the projected temperature to project temperature-related mortality. We will calculate the annual UHIAs between 1980 and 2019 and quantify the changing pattern of annual UHIAs. And then, we will classify the UHIAs into ten decile groups, and compute the mean of each group. The municipality-specific RR will be estimated by assuming the same changing pattern for UHIAs for the future period (2031-2100). Finally, we will combine the projected temperature with RR to project the temperature-related mortality in the future.</p>						

1. 研究概要(2)

4) 実験結果 (Results)

Figure 1 shows overall cumulative exposure–response associations in 4 prefectures to represent each prefecture, with the corresponding minimum mortality temperature and the cutoffs to define extreme temperature. Risk increases slowly and linearly for heat temperature above the minimum temperature, although Chiba shows no change for heat effect. By contrast, risk increases quickly at low temperature for cold effect. Result from the multivariate meta–regression suggests there is a higher increase for cold temperature than heat in figure 2.

The municipality–specific UHIAs are estimated and classified into ten decile groups (figure 3). It ranged from 0.41°C to 6.39°C, with a higher value observed in eastern Tokyo and Kanagawa, Northern Saitama and central Chiba, and a lower value in western areas.

5) 考察 (Discussion)

The present results for temperature–mortality association were consistent with those of many previous studies conducted in Japan (Chung et al., 2018, Ng et al., 2014).

As for the distribution of UHIAs, there are more urbanized and larger population density in eastern Tokyo and Kanagawa areas with higher UHIAs, while northern Saitama and central Chiba with higher UHIAs are less urbanized within smaller population density. The reason for the less urbanized areas with higher UHIAs is probably geographical factors (e.g., basin and coastal city) (Chang, 2016, Chen et al., 2018). We will include the less urbanized areas with higher UHIAs to conduct the sensitive analysis later.

6) 参考文献 (References)

CHANG, H.-T. 2016. A TEMPORAL AND SPATIAL ANALYSIS OF URBAN HEAT ISLAND IN BASIN CITY UTILIZING REMOTE SENSING TECHNIQUES. *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing & Spatial Information Sciences*, 41.

CHEN, Y.-C., YAO, C.-K., HONJO, T. & LIN, T.-P. 2018. The application of a high–density street–level air temperature observation network (HiSAN): Dynamic variation characteristics of urban heat island in Tainan, Taiwan. *Science of the Total Environment*, 626, 555–566.

CHUNG, Y., YANG, D., GASPARRINI, A., VICEDO–CABRERA, A. M., FOOK SHENG NG, C., KIM, Y., HONDA, Y. & HASHIZUME, M. 2018. Changing susceptibility to non–optimum temperatures in Japan, 1972–2012: the role of climate, demographic, and socioeconomic factors. *Environmental health perspectives*, 126, 057002.

GASPARRINI, A., GUO, Y., HASHIZUME, M., LAVIGNE, E., ZANOBETTI, A., SCHWARTZ, J., TOBIAS, A., TONG, S., ROCKLÖV, J. & FORSBERG, B. 2014. Mortality risk attributable to high and low ambient temperature: a multi–country study. *The Lancet*.

NG, C. F. S., UEDA, K., TAKEUCHI, A., NITTA, H., KONISHI, S., BAGROWICZ, R., WATANABE, C. & TAKAMI, A. 2014. Sociogeographic variation in the effects of heat and cold on daily mortality in Japan. *Journal of epidemiology*, JE20130051.

Table 1. Descriptive statistics by municipality in TMA, Japan, 2010–2019.

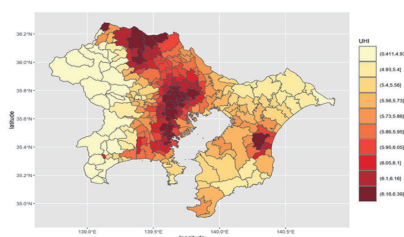
Variable	Minimum	Median	IQR	Maximum
Temperature (°C); mean	-7.50	15.80	14.52	33.35
Temperature (°C); maximum	-3.23	17.34	16.09	33.34
All-cause deaths; no.	0	2	4	39



▲ Figure 1. Overall cumulative exposure–response associations in 4 prefectures

▲ Figure 2. The pooled association between temperature and mortality

▼ Figure 3. The distribution of municipality–specific UHIa and decile groups



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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

受給実績 Receipt record	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	Nagasaki University Student Education Support Division
奨学金名称 Scholarship name	Nagasaki University Special Research Scholarship
受給期間 Supported period	2021 年 10 月 ~ 2022 年 3 月
受給額 Amount received	300,000 円

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

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

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

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

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

## 9. その他 Others

--

日中笹川医学奨学金制度 (学位取得コース) 中間評価書

課程博士：指導教官用



第 42 期

研究者番号： G4303

作成日： 2022 年 3 月 10 日

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

研究者評価 (指導教官記入欄)

成績状況	<input checked="" type="checkbox"/> 優 良 可 不可 学業成績係数=2.75	取得単位数
		取得単位数/取得すべき単位数=4/4
学生本人が行った研究の概要	姚氏の修士論文の結果や文献検討から、早期から老いを準備することは老年期の健康状態の変化に応じた生活にうまく対応するために重要であると考えられた。そこで姚氏は、インターネットを活用し、要介護に関わる社会資源の活用に着目する文化を考慮した在留中国人高齢者およびその家族における老いへの準備教育プログラムを開発する研究計画を立案した。それに合わせ、博士論文の研究題目も「ビデオカンファレンスを活用する在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発」と修正した。現在、開発しようとする教育プログラムの目的、設計方法、ならびに基盤理論と教育内容・評価項目の作成に取り組んでいる。	
総合評価	<b>【良かった点】</b> 姚氏は、博士論文の研究を主体的に取り組むと共に、研究助成金の申請にも積極的にチャレンジし、獲得してきた。また、学会発表や投稿にも意欲的に取り組んでいる。そのプロセスでは思うように進まないことがあっても、自己学習を積み重ねたり、周囲の仲間と討議するなどして、乗り越えてきた。東京オリンピックにも通訳ボランティアで参加するなど、何事にもチャレンジする姿勢は群を抜いている。特に、明るく素直な性格の姚氏は、周囲の学生達の協調性を育むことに貢献している。	
	<b>【改善すべき点】</b> 何事にも臆せずチャレンジする姿勢は継続してほしいが、じっくり調べる前に行動したり、指導教員にすぐに尋ねたりすることがあるので、まずは自分でよく調べることを習慣化してほしい。	
	<b>【今後の展望】</b> 明るく素直で優しく、かつ積極的な姿勢は、今後あらゆる分野で生かされていくと思われる。日中の看護学の交流に貢献することが期待できる。	
学位取得見込	博士 (看護学) を 2023 年 3 月に取得できる見込みである。	
		評価者 (指導教官名) 正木 治恵

# 日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間報告書 研究者用



第42期

研究者番号: G4303

作成日: 2022年3月1日

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

## 1. 研究概要 (1)

### 1) 研究題名

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

### 2) 目的

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

### 2) 用語の定義

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

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

### 3) 研究方法

#### (1) 対象者および募集方法

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

#### (2) データ収集期間

2019年3月~10月

#### (3) 調査方法

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

#### (4) 調査内容

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

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

#### (5) 分析手法

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

## 4) 倫理的配慮

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

## 5) 結果

### (1) 対象者の概要

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

### (2) 健康に関する思い

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

( 次ページに続く )



【身体機能や精神状態から主観的に健康の良し悪しを評価している】  
 これは健康状態の評価に関する思いであり、〈病弱による良くない自己健康評価〉と〈老いを感じながらも良い自己健康評価〉が含まれた。

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

【他者の支援を受けることで安心して生活できている】  
 これは、他者の支援に関する思いであり、〈支援された生活〉、〈助けを求める生活〉と〈助けを求める対象がいない大変さ〉が含まれた。

【老いを受け止めて前向きに生きている】  
 これは老いの受容に関する思いであり、〈余生への希望〉と〈前向きな生き方〉を含んでいた。

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

【家族で互いに支える生活を継続したい】  
 これは家族関係への思いであり、〈子供に迷惑をかけたくない〉と〈家族の支え〉を含んでいた。

【良い医療サービスをうまく利用できるので安心して利用している】  
 これは、医療サービスの利用に関する思いであり、〈心配のない医療サービス〉と〈言語の壁に影響された受診〉を含んでいた。

【健康を維持するため中医学に基づき自主的に健康管理をしている】  
 これは、中医学に基づいた健康管理に関する思いであり、〈健康情報の入手〉〈中医学に基づく健康促進〉と〈総合的な健康管理〉を含んでいた。

## 6) 考察

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

### (1) 高齢期の発達課題に影響した健康に関する思い

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

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

### (2) 言葉による制限が影響した健康に関する思い

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

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

### (3) 儒教思想や中医学に影響される健康に関する思い

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

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

## 7) 結論

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

## 8) 参考文献

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

## 研究概要 (2)

## 1. 博士研究題名:

ビデオカンファレンスを活用する在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発

## 2. 研究の目的・動機

申請者は、博士前期課程に入学してから地域密着型のデイサービスで看護師をしている。デイサービスを利用する高齢者は、認知症を患い家族による介護が困難であり、虚弱で外出が難しく家で閉じこもりになり、独居の人も少なくない。彼らはデイサービスで、家で出来ない事は職員のサポートを受けながらできるようになり、自分らしく楽しい日々を過ごしている。年を取っても、病弱になっても、ひとりで暮らしてあっても、毎日自分らしく過ごしていることは最善の老後生活と考える。申請者は外国人で、日本で人生の晩年を迎えたとしたら、彼らと同じように自分らしく過ごせるかという疑問があった。それを踏まえ、現在、地域の在留中国人高齢者は健康に関して、どのような心配をしているか、どのような悩みを持っているか、健康を維持するために何の支援が欲しいかということに疑問を持ちながら、博士前期課程で、「在留中国人高齢者の健康に関する思い」をテーマとする研究を実施した。その結果、長年日本に在住する中国人高齢者に内在する中国文化は彼らの健康に関する思いに影響を与えていることが明らかとなった。母国文化の継続は彼らの健康促進や、安心感、老後生活の希望に影響を及ぼすため、彼らにとって、馴染んだ文化や健康促進方法に基づいたケアの提供・環境の整備の重要性が示唆された。修士の研究結果を踏まえ、在留中国人高齢者が異国で虚弱になっても最善な老後生活を送る支援方法を探究するため、博士後期課程に進学し、ビデオカンファレンスを活用する在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発を目的とする研究にた着目した。

## 3. (1) 研究背景

## 【在留中国人高齢者が直面する介護が必要となる生活の課題】

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

## 【ビデオカンファレンスを活用する在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発】

高齢者の学習は老いに伴う身体機能の変化に影響される可能性があるため、高齢期の特性を活かした学習援助が必要と考える。ジェロゴジー理論は成人教育理論をもとにして開発され、学習潜在能力に影響を与える高齢期の変化や特性を配慮する高齢者の学習支援理論であり、この理論を基盤として開発したプログラムは高齢者およびその家族にとって効果的な学習につながると考える。そして、在留中国人高齢者は文化や言語の違いから地域で開催される支援プログラムに参加しにくい上に、地域で中国人高齢者向け講座は少なく、各地域に散住している彼らを1つの地域に集めることは困難である。そこで、中国人高齢者が社会や他者とのつながる重要な手段となっているICTの活用が有効と考える。特に、ビデオカンファレンスは参加者の学習実態を把握できる特徴がある。ビデオカンファレンスを活用する教育プログラムは、アクセスしやすく地域での支援を得にくい現状の改善に貢献できると考える。しかし、申請者の文献検討の結果、ICTを活用する在留外国人高齢者向け教育プログラムが少ないことがわかった。特に、在留中国人高齢者向けのICT教育プログラムは見当たらない。よって、ビデオカンファレンスを活用した在留中国人高齢者の老いへの準備教育プログラムの開発は必要であり、新規性があると考えられる。

## (2) 研究意義

本研究の特色は以下の4つであると考えられる。

## 【ビデオカンファレンスを活用するプログラムは地域での支援を得にくい現状の改善につながる】

ICTを活用する介入はアクセスしやすい特徴があるため、各地域に散在する高齢者やその家族が移動せずより簡単に同じ文化がある仲間とともに中国の文化が配慮したプログラムに参加でき、地域での支援を得にくい状況の改善に貢献できると考えられる。

## 【家族とともにプログラムに参加することは異国での老後生活の自分らしさにつながる】

家族と同席して参加することは、老後の生き方やケアに関する意思を事前に考え、家族と話し合うチャンスとなる。また、プログラムの参加は在留中国人高齢者の将来の介護の準備能力・知識の向上に貢献し、今後虚弱になっても家族と互いに支え合いながら、自分らしく老後生活を送ることにつながると考えられる。

## 【地域の医療専門職と在留中国人高齢者との認識ギャップを埋める戦略となる】

専門職に対しては、実現可能性と有用性を検討した教育プログラムは介護に関連する知識をわかりやすく整理された支援対策となり、在留中国人高齢者にケアを提供する時、介護が必要となる生活およびそれに関連するケアへの認識・文化上のギャップを埋める戦略を提供できると考えられる。

## 【ジェロゴジー理論を基盤とするプログラムの開発はより効果的な高齢者学習に寄与できる】

ジェロゴジー理論を基盤とするプログラムの実現可能性と有用性の検討を通して、高齢者にとって、高齢期の学習特性を配慮したより効果的な高齢者学習に貢献できると考える。また、ジェロゴジー理論はアメリカで開発された高齢者学習理論であり、高齢者の退院教育に多く使われている。しかしながら、現在、ジェロゴジー理論は中国人高齢者の学習活動に活用されていない。そして、本研究ではジェロゴジー理論の文化的適応性の検討につながり、今後、在留中国人高齢者の教育に寄与できると考えられる。

4. 倫理面での配慮

申請者は2020年にeAPRINの研究倫理教育を受講した。今後、千葉大学看護学研究院倫理審査委員会の承認を得てから研究を行う。

5. 研究方法

本研究では、在留中国人高齢者およびその家族を対象として、老いへの準備性を高める教育プログラムの原案を作成し、プログラムの実現可能性と有用性を検証するために図1のように段階的に実施する。

【研究1】プログラムの原案の作成及び妥当性の検討  
 JBIのsystematic reviewの方法を参考にし、中国語、英語、日本語で公表された中国人高齢者の介護生活の準備に関する先行研究を検討して教授内容を作成する。ジェロゴジー理論を参考にし、高齢者の学習特徴を配慮する教授形態、学習資料の形式を検討し、ジェロゴジー理論の教授プログラムの構成要素に沿って、プログラムの教授原案を設計する。

その後、在留中国人高齢者との関わりがある専門家6名にグループインタビューを行い、プログラム原案の全体の構成、目標と内容の整合性、内容の理解しやすさ、授業形態、参加者の配慮およびその他全体に対する意見を収集教授原案の意見を踏まえて修正し、洗練された教授原案を作成する。

【研究2】プログラムの実現可能性と有用性の検討

研究対象者：

日本に在住する65歳以上の中国人高齢者およびその家族とする。認知機能障害を持つ対象は除外する。

研究対象者の募集：

中国人高齢者が参加する首都圏各地域の公民館やコミュニティーセンターの日本語サークルおよび中国人がよく使うWeChatアプリを通して、在日中国人高齢者とその家族10組を募集する。

6. データ収集方法・内容：

本研究は表1で示したようにデータ収集を行う。研究対象者を訪問するとき、属性情報を収集し、pre-post test法を用いて、プログラムの実現可能性と有用性を検討する。

実現可能性は教授内容や参加過程について、毎回の学習直後にオンラインでアンケート調査を行う。主な内容はプログラム実施中分かりづらい・説明が不足な内容、講師の話のわかりやすさ、音声の聞き取り状況、資料の分かりやすさ、時間の長さ、その他の疑問点や感想を含む。

有用性はプログラム参加前後対象者の認識の変化を通して検討する。主な内容は参加前後と追跡調査では老いへの態度尺度(AAQ)と将来のケアニーズへの準備スケール(PFCN-14)を用いて認識の変化を評価し、老いへの認識や要介護生活への準備状況・困難点の変化は半構造化インタビューで調査する。

7. データ分析方法：

インタビューのデータは質的帰納的分析手法を使い、基本属性や尺度、アンケートから得られたデータは記述的統計学を用いて分析を行う。

8. タイムスケジュール

本研究は表2のように実施する。

【研究1】

プログラム原案の内容の作成：2021年9月～2022年3月

プログラム原案の妥当性の検討：2022年3月～2022年6月

【研究2】

プログラム実施期間：週1回で約2ヶ月間

データ収集期間：2022年8月～2022年11月

データ分析期間：2022年8月～2022年12月

各段階は指導教員のスーパーバイズを受ける

9. 結果 (進行中)

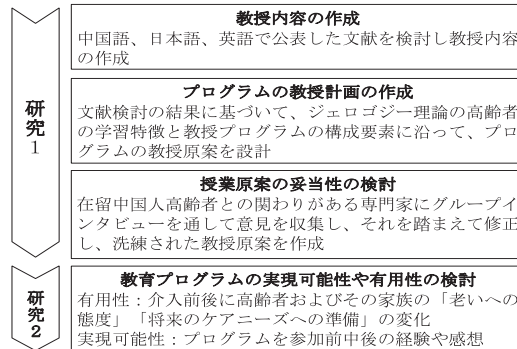


図1 プログラムの開発の流れ

表1 プログラムの実現可能性と有用性の評価手順

	実施1 週間前	実施				終了1 週間内	終了1 ヶ月後
		1回目	2回目	……	最終回		
基本属性	○						
AAQ	○					○	○
PFCN-14	○					○	○
アンケート		○	○	○	○		
インタビュー	○					○	○

※ AAQ: Attitudes to Ageing Questionnaire (中国語版) ○: 評価を実施すること  
 PFCN-14: Preparation for Future Care Needs Scale-14 (中国語版)

表2 研究スケジュール

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
原案の内容の作成	■											
原案の倫理審査申請				■								
原案の妥当性の検討					■							
プログラムの倫理審査申請							■					
プログラムの対象者募集								■				
プログラムの有用性・実現可能性の検討									■			
実施前後のデータ収集										■		
プログラムの実施											■	
データ分析												■

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

論文名 1 Title	在留中国人高齢者の健康に関する思い -中国人が集まる地域活動に参加する対象者に焦点を当てて-				
掲載誌名 Published journal	文化看護学会誌(2022年3月9日、掲載決定の通知)				
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author	姚利		第2著者名 Second author	石井 優香	
第3著者名 Third author	正木 治恵				
その他著者名 Other authors	山崎由里亜 石橋みゆき				
論文名 2 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author		
第3著者名 Third author					
その他著者名 Other authors					
論文名 3 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author		
第3著者名 Third author					
その他著者名 Other authors					
論文名 4 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author		
第3著者名 Third author					
その他著者名 Other authors					
論文名 5 Title					
掲載誌名 Published journal					
	年	月	巻(号)	頁 ~	頁
					言語 Language
第1著者名 First author			第2著者名 Second author		
第3著者名 Third author					
その他著者名 Other authors					

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

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

学会名 Conference	文化看護学会		
演題 Topic	中国人高齢者の施設での療養生活に関する認識 ―文献検討を通して―		
開催日 date	2022 年 3 月 12 日	開催地 venue	栃木県下野市
形式 method	<input checked="" type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language <input checked="" type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter	姚利、正木治恵		
学会名 Conference			
演題 Topic			
開催日 date	年 月 日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language <input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter			
学会名 Conference			
演題 Topic			
開催日 date	年 月 日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language <input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter			
学会名 Conference			
演題 Topic			
開催日 date	年 月 日	開催地 venue	
形式 method	<input type="checkbox"/> 口頭発表 Oral	<input type="checkbox"/> ポスター発表 Poster	言語 Language <input type="checkbox"/> 日本語 <input type="checkbox"/> 英語 <input type="checkbox"/> 中国語
共同演者名 Co-presenter			

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

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

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

受給実績 Receipt record	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	文化看護学会
助成金名称 Grant name	2021年度文化看護学会研究助成金
受給期間 Supported period	2022 年 1 月 ~ 2023 年 12 月
受給額 Amount received	100,000 円
受給実績 Receipt record	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
助成機関名称 Funding agency	公益財団法人 在宅医療助成 勇美記念財団
助成金名称 Grant name	2021年度在宅医療助成(後期)一般公募「在宅医療研究への助成」
受給期間 Supported period	2022 年 3 月 ~ 2023 年 3 月
受給額 Amount received	885,396 円

## 6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

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

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

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

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

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

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

## 9. その他 Others

1. ボランティア活動: 1)2021年7月、東京2020オリンピックのサーフィン競技場のfield castとしてボランティア活動に参加し貢献した。 2)2021年11月～現在、中国帰国者支援・交流センターの登録ボランティアとして、施設に入所する中国帰国者の孤独の改善を目指す施設への訪問活動を参加している。
---

指導責任者(記名) 正木治恵

# 日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間評価書

## 課程博士：指導教官用



第 42 期

研究者番号： G4304

作成日： 2022 年 3 月 日

氏名	張 茂芮	Zhang Maorui	性別	F	生年月日	1993. 06. 23
所属機関(役職)	西南医科大学附属口腔医院インプラント科(医師)					
研究先(指導教官)	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科咬合機能健康科学分野(笹木 賢治教授)					
研究テーマ	歯科疾患に対する mRNA を用いた治療戦略の確立 Establishment of mRNA therapy for dental disease					
専攻種別	<input type="checkbox"/> 論文博士			<input checked="" type="checkbox"/> 課程博士		

### 研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	優 学業成績係数=3.75	取得単位数
		12/30
学生本人が行った研究の概要	<p>本研究は、歯科口腔外科・歯周外科分野において、大規模に骨欠損を生じた症例における効率的な骨再生を促進する治療方法を提案するために、①mRNA を用いて投与する骨誘導治療因子の選定および最適化、②ラットを用いた動物モデルにおける骨再生治療効果を明らかにすることを目的としている。本年度は、マウスより単離した前骨芽細胞への mRNA 治療因子のトランスフェクションを試み、その発現効率を評価した。2 種の治療因子の導入により骨関連遺伝子であるオステオポンチンとオステオカルシンの向上を認めた。このことは、mRNA 治療因子の導入に成功したことを示唆する。また、ラット下顎骨に骨欠損を作製し、in vitro で確認した治療因子の投与実験を行った。投与するキャリアの部位および経時的代謝を評価するために、Gluc mRNA を内包するキャリアを投与したところ、投与した骨欠損部に一致した発光を認め、96 時間まで持続した発現を認めた。このことから、in vivo における mRNA 治療の可能性が示唆され、今後、治療因子を内包したキャリア投与を行う予定である。</p>	
総合評価	<p><b>【良かった点】</b> 本年度は、実験計画の立案から、核酸医薬を用いた治療方法の習得までを行い、十分な研究活動を行ったと評価できる。特に、過去の報告を基に十分なエビデンスを構築したうえで、実験計画の立案をすることができた。実験においては、核酸医薬を用いた実験の手技の習熟に努め、独立して実験を遂行することが可能となった。また、研究室のチームとも協調性をもって活動することができた。</p>	
	<p><b>【改善すべき点】</b> 今後、自立した研究者として活躍するためには、過去の報告を検討する上で良質な論文を探すことが重要である。また、そのデータを吟味し参考にすることが必要であるが、論文の読み込みが不十分であることが見受けられた。改善の傾向が見受けられるが、今後一層の研鑽が必要である。</p>	
	<p><b>【今後の展望】</b> 治療因子の投与による骨再生を in vivo の系で検討を行う。また、複数の治療因子による骨再生促進が報告されているが、各治療因子を投与する最適なタイミングは不明である。今後、経時的な投与のタイミングを含めての検討を行い、骨再生に適した治療技術の開発を行う予定である。</p>	
学位取得見込	<p>研究は順調に進捗しており、本学が定める学位取得の単位も到達している。次年度は論文の執筆にとりかかり、学術雑誌への投稿を予定しており、十分に学位取得の要件を満たすと考える。</p>	
評価者(笹木賢治)		

# 日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間報告書 研究者用



第43期

研究者番号: G4304

作成日: 2022年2月22日

氏名	張 茂芮	Zhang Maorui	性別	F	生年月日	1993. 06. 23
所属機関(役職)	西南医科大学附属口腔医院インプラント科(医師)					
研究先(指導教官)	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座(笹木 賢治教授)					
研究テーマ	歯科疾患に対するmRNAを用いた治療戦略の確立 Establishment of mRNA therapy for dental disease					
専攻種別	論文博士	<input type="checkbox"/>	課程博士	<input checked="" type="checkbox"/>		

1. 研究概要 (1)

1) 目的 (Goal)

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

2) 戦略 (Approach)

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

3) 材料と方法 (Materials and methods)

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

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

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

c) Runx2 and VEGF mRNA transfection: P4-primary cells are seeding into 6-well-plate(1×10<sup>5</sup> cells/well), group setting: A-only medium, B-Lipofectamine+Luc2, C-Lipofectamine+RUNX2, D-Lipofectamine+VEGF, E-Lipofectamine +RUNX2 (1 μg/well)+VEGF(1 μg/well), F-Lipofectamine+osteogenic medium.

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

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

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

g) Runx2 and VEGF mRNA in vivo treatment: group: A-Hepes solution, B-Runx2(10μg), C-VEGF(10μg), E-RUNX2 (5μg)+VEGF(5μg), from post-surgery 1week, conduct mRNA injection treatment every week.

h) micro-CT: post-surgery 4week, 6week, 8week, conduct microCT to analyze the bone mineral density and bone volume for new bone formation.

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

4) 実験結果 (Results)

a) mRNA synthesis and validity verification: western blot image showed that Runx2 and Vegf mRNA made in our lab successfully produced protein in Hela cells and HuH-7 cells, which meant that Runx2 and VEGF mRNA were able to be used in the following expirments.

b) successful Gluc mRNA transfection in to POB: Gluc expression curve demonstrated that the mRNA expression peaked at 24 hours post-transfection and gradually decreased with time.



## 1. 研究概要 (2)

c) Runx2 mRNA and VEGF mRNA promoted the expression of osteogenic markers in vitro: After transfected with mRNA in different groups, the RT-PCR results showed that expression of osteopontin(*Opn*) and osteocalcin(*Ocn*) were relatively with time course. The combination of RUNX2 and VEGF induced the highest level of *Opn* and *Ocn*, while using RUNX2 or VEGF mRNA alone weakly stimulates osteogenic differentiation compared with blank group and Luc2 group.

d) PEG-PAsp(DET)-nanomicelles successfully delivered Luc2 mRNA into target area: IVIS was used to detect the maintenance time of Luc2 mRNA+nanomicelles. Luciferase signal was observed at 4 hours after Luc2 mRNA injection. The images demonstrated the luciferase expression peaked at 24 h then decreased with time until 96 hours.

e) mandibular defect model identification by microCT: 3D construction image showed a clear 4mm-circle bone defect was established.

f) The above are my current results. The next ongoing experiment is to deliver Runx2, VEGF, Runx2+VEGF mRNA nanomicelles to the mandibular defect and examine the effect of mRNA on new bone formation in the defect.

## 5) 考察 (Discussion)

Many strategies have been proposed to improve the regeneration of damaged bone tissue. Among them, the delivery of osteo-inductive growth factors or derivatives to the lesion site remains a promising approach to promote bone healing[1]. However, delivery of supraphysiological dose induced deleterious side effects, including significant inflammation, swelling, and heterotopic ossification, that had limited the extent of their clinical use. Messenger RNA (mRNA)-based gene therapies represent alternative approaches for locally delivering growth factors[2]. They allow an in-situ expression of growth factors in host cells, and undergo precise post-translational modifications required for optimal activity. And another advantage of mRNA is that it does not need to enter the nucleus to produce protein, allowing it to transfect a larger portion of cells without causing DNA mutations[3]. mRNA treatment is a promising and safe method to enhance the expression of osteogenic factors.

It was reported that Runx2 is a major target of the TGF- $\beta$ /BMP pathway, BMP2 regulated the BMSCs differentiation by Promoting Runx2 Phosphorylation[4, 5]. On the other hand, Runx2 also have a positive relationship with VEGF, Runx2 and VEGF activated osteogenic differentiation and angiogenesis of human amniotic mesenchymal stem cells[6]. VEGF and its receptor regulated RUNX2 expression in Human Periodontal Ligament Stem Cells[7]. In our study, we prepared Runx2 and VEGF mRNA to transfect into POB cells, which proved that the over-expression of Runx2 and VEGF activate the process of osteogenic differentiation in POB.

The current results support our hypothesis that Runx2 and VEGF have the positive effect on bone formation. Then the next step of my in vivo study is to explore the function of Runx2 and VEGF.

## 6) 参考文献 (References)

- [1] Zhang Q, Tan K, Zhang Y, Ye Z, Tan W-S, Lang M: In Situ Controlled Release of rhBMP-2 in Gelatin-Coated 3D Porous Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffolds for Homogeneous Bone Tissue Formation. *Biomacromolecules*, 15(1): 84-94, 2013.
- [2] Wang P, Perche F, Logeart-Avramoglou D, Pichon C: RNA-based therapy for osteogenesis. *Int J Pharm*, 569: 118594, 2019.
- [3] Matsui A, Uchida S, Ishii T, Itaka K, Kataoka K: Messenger RNA-based therapeutics for the treatment of apoptosis-associated diseases. *Sci Rep*, 5: 15810, 2015.
- [4] Dai G, Xiao H, Zhao C, Chen H, Liao J, Huang W: LncRNA H19 Regulates BMP2-Induced Hypertrophic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Promoting Runx2 Phosphorylation. *Front Cell Dev Biol*, 8: 580, 2020.
- [5] Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, Ryoo HM, Choi JY, Yoshida M, Nishino N, Oh BC, Lee KS, Lee YH, Bae SC: Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem*, 281(24): 16502-11, 2006.
- [6] Li Y, Liu Z, Tang Y, et al. Schnurri-3 regulates BMP9-induced osteogenic differentiation and angiogenesis of human amniotic mesenchymal stem cells through Runx2 and VEGF. *Cell Death Dis*. 11(1):72;2020.
- [7] Marconi GD, Diomedea F, Pizzicannella J, et al. Enhanced VEGF/VEGF-R and RUNX2 Expression in Human Periodontal Ligament Stem Cells Cultured on Sandblasted/Etched Titanium Disk. *Front Cell Dev Biol*. 8:315; 2020.

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

論文名 1 Title	Metformin Rescues the Impaired Osteogenesis Differentiation Ability of Rat Adipose-Derived Stem Cells in High Glucose by Activating Autophagy					
掲載誌名 Published journal	Stem Cells and Development					
	2021 年 9 月	30 巻(号)	1017 頁 ~ 1027 頁	言語 Language	英語 English	
第1著者名 First author	MAORUI ZHANG	第2著者名 Second author	BO YANG	第3著者名 Third author	SHUANGLIN PENG	
その他著者名 Other authors	第4著者名 Forth author JINGANG XIAO					
論文名 2 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 3 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 4 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						
論文名 5 Title						
掲載誌名 Published journal						
	年 月	巻(号)	頁 ~ 頁	言語 Language		
第1著者名 First author		第2著者名 Second author		第3著者名 Third author		
その他著者名 Other authors						

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

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

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

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

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

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

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

## 6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

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

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

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

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

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

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

## 9. その他 Others

--

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

Maorui Zhang,<sup>1-3,i</sup> Bo Yang,<sup>4</sup> Shuanglin Peng,<sup>1,2</sup> and Jingang Xiao<sup>1,2</sup>

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

**Keywords:** metformin, adipose-derived stem cells, autophagy, Wnt signaling pathway, GSK3 $\beta$ , osteogenic differentiation

## Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Materials and Methods

### Isolation of ASCs

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

The Sprague-Dawley male rats were given general anesthesia. After removing the inguinal adipose tissue, the skin wound was sutured and resuscitated. The tissue sample was cultured by the tissue block culture method under aseptic conditions. First, adipose tissue was washed by phosphate-buffered solution (PBS; HyClone) containing 1% penicillin–streptomycin solution (FBS; HyClone). Then, it was carefully cut into mince and laid on the bottom of the culture flask. Next, we gently added alpha-modified eagle's medium ( $\alpha$ -MEM; HyClone) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone), and cultured in an incubator in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for primary cell culture.

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

### Cell proliferation analysis after reagents treatment

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

### Cell wound healing assay

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

### Alizarin red-S staining

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

### Alkaline phosphatase staining

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

### Western blot assay

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

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

#### Immunofluorescence staining and confocal laser scanning

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

#### RNA extraction and real-time fluorescent polymerase chain reaction

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

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

#### Statistical analysis

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

## Results

### High glucose restrained cell proliferation and cell migration

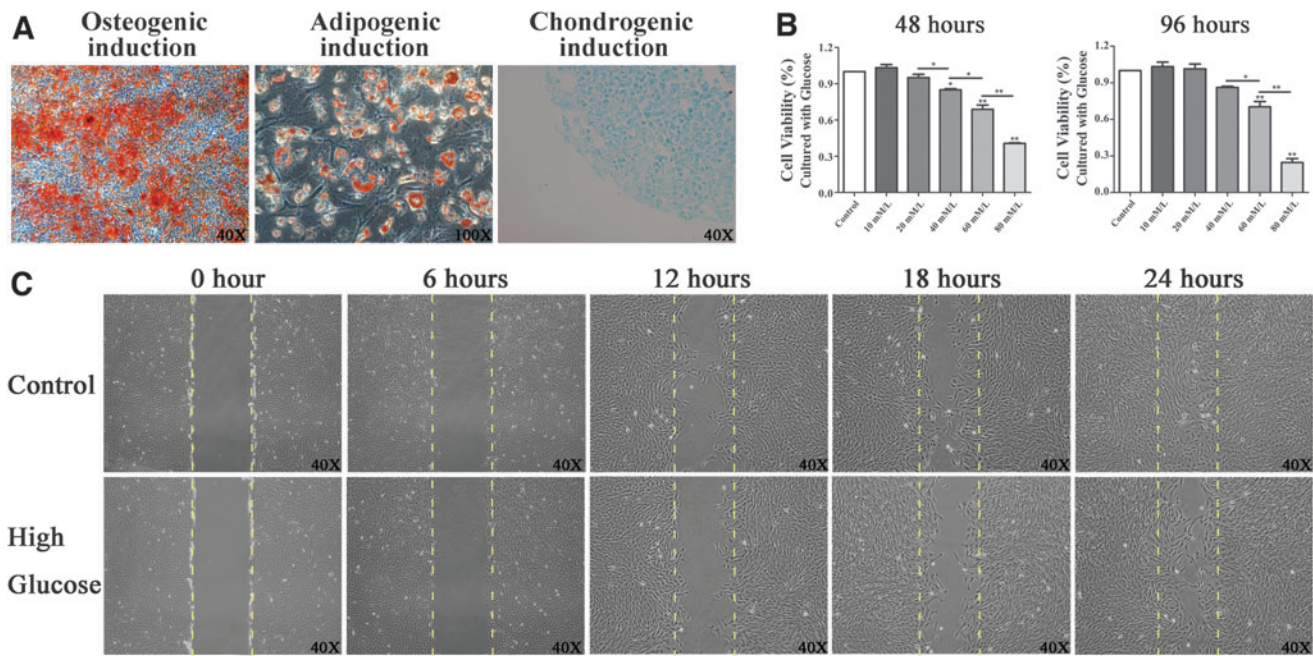
Cultured with different differentiation induction mediums, ASCs derived from adipose tissue were induced into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes, which demonstrated the multidirectional differentiation ability of ASCs (Fig. 1A). After osteogenic induction, ASCs changed their morphology from spindle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

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

TABLE 1. PRIMER SEQUENCES INFORMATION FOR AMPLIFICATION OF GENES

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

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



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

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

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

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

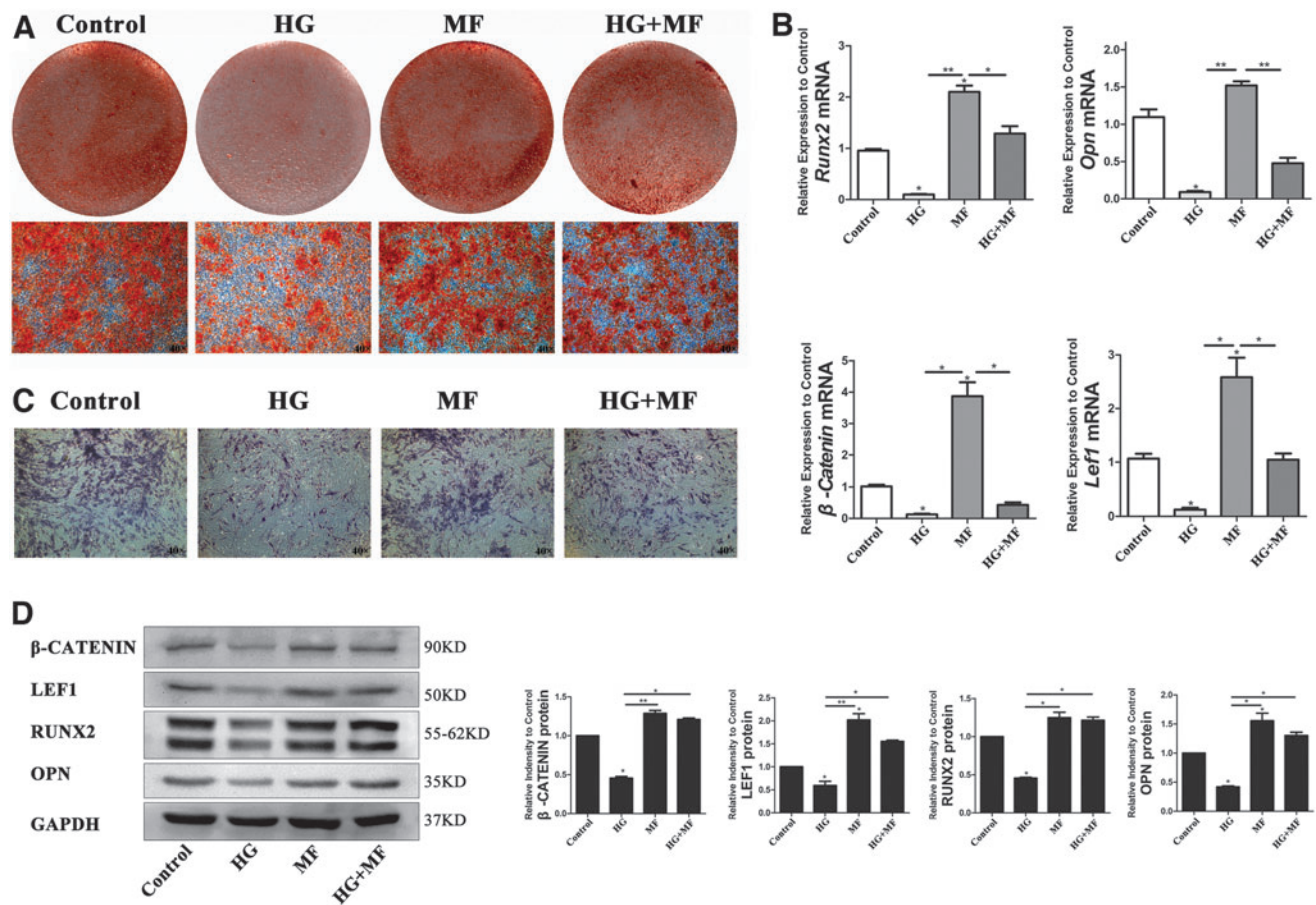
#### High glucose suppressed the autophagy level and metformin modulated autophagy inhibition induced by high glucose

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

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

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





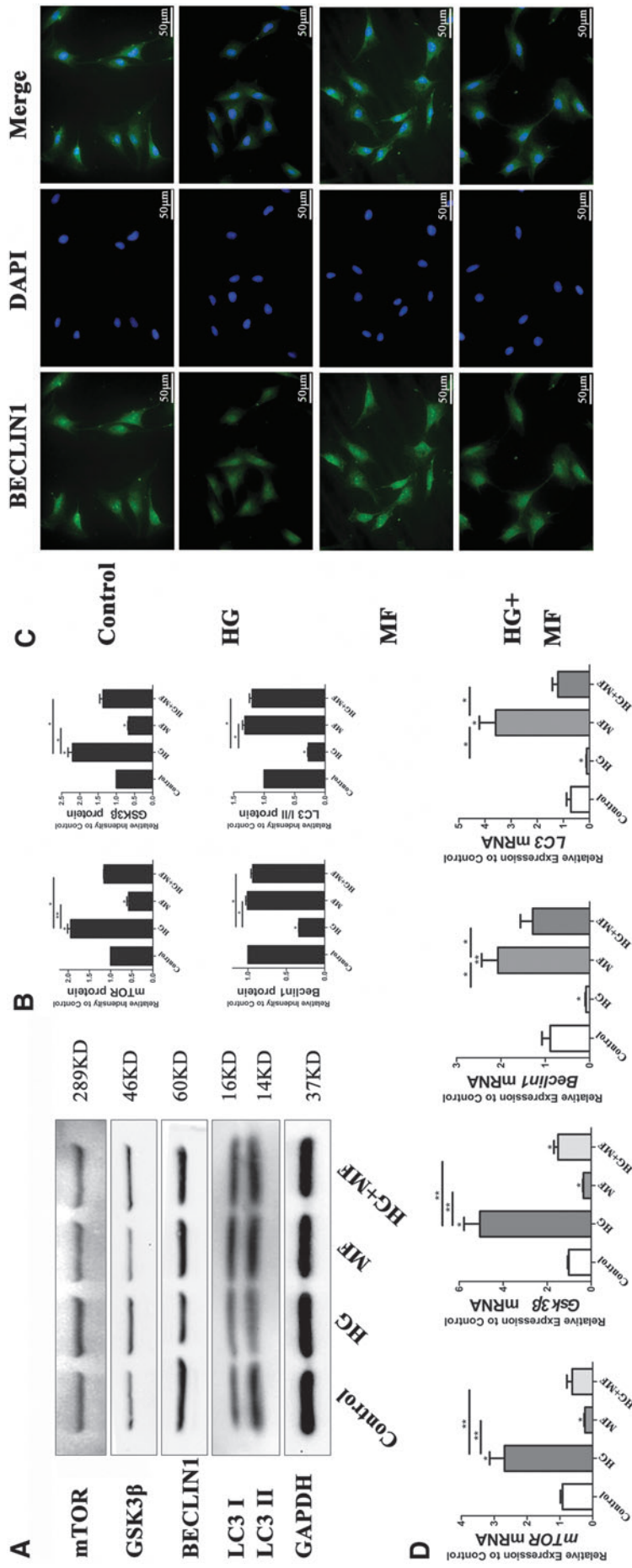
**FIG. 2.** The osteogenic differentiation capacity of ASCs and the Wnt signaling pathway were detected after glucose and metformin treatment. (A) Osteogenesis cultured for 21 days, mineralized nodules were stained by Alizarin red-S; (C) osteogenesis cultured for 7 days, and the active ALP in ASCs was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

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

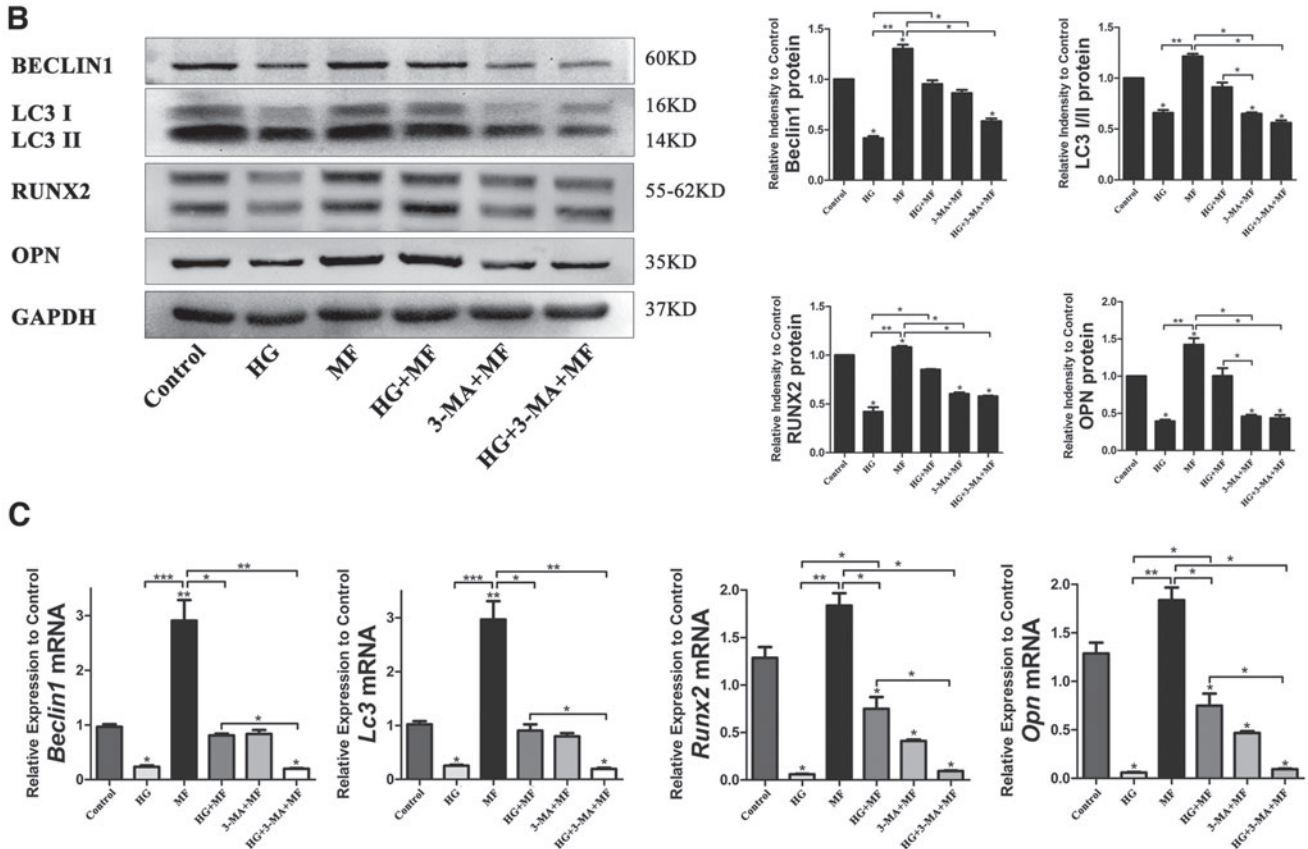
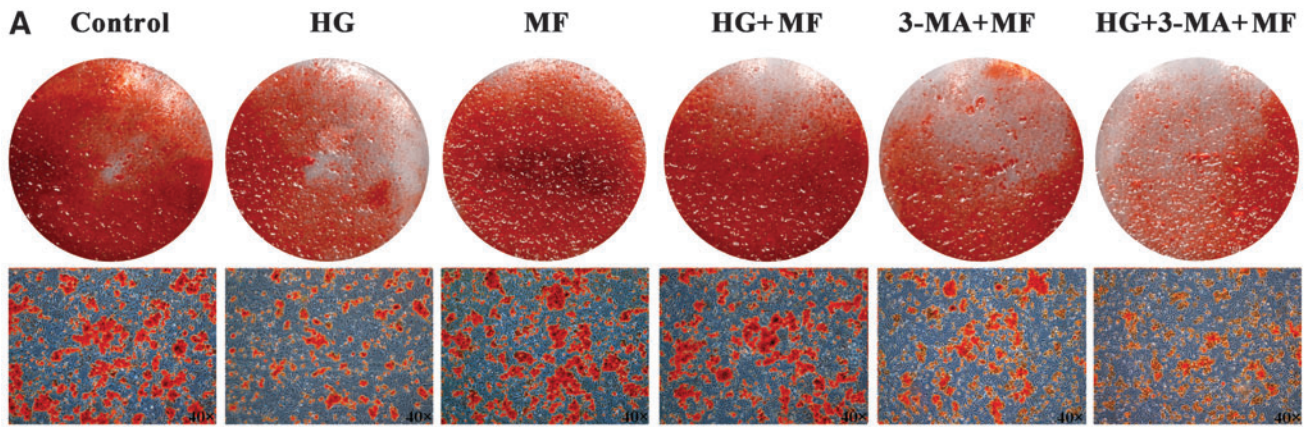
#### Metformin-modulated autophagy activated Wnt signaling pathway in the process of osteogenic differentiation

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

phagy, while metformin reversed this negative effect. However, we still need to find the clues behind the osteogenesis damage of ASCs and autophagy. The literature review found that GSK3 $\beta$  could not only negatively regulate the level of autophagy but also targeted to bind the  $\beta$ -CATENIN to inhibit the Wnt signaling pathway [13,14]. Therefore, we were committed to exploring whether GSK3 $\beta$  is a link between the Wnt signaling pathway and cell autophagy. After treatment with high glucose, metformin, and 3-MA, we detected the expression activity of mTOR, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -CATENIN, and LEF1 among each group (Fig. 5A, C). The protein expression of mTOR and GSK3 $\beta$  was upregulated in the high-glucose group, and metformin could not depress them in the HG +3-MA+MF group. The expression of  $\beta$ -CATENIN and LEF1 was higher in the HG+MF group than that in the HG group and the HG +3-MA+MF group. The results demonstrated that the Wnt signaling was activated when the cell autophagy level was upregulated by metformin, which promoted the progress of osteogenic differentiation. The fluorescence staining of GSK3 $\beta$  showed that it was highly

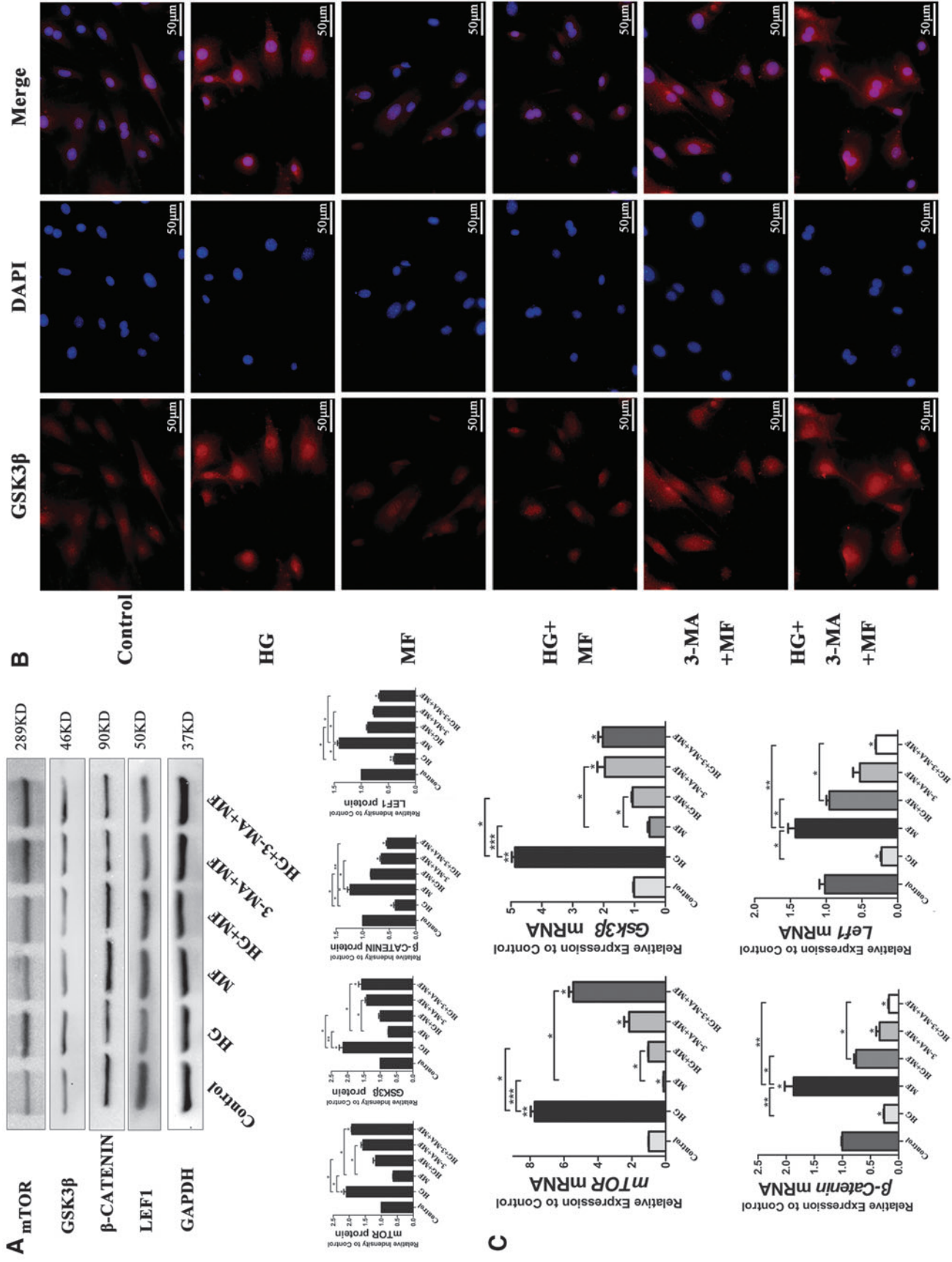


**FIG. 3.** Metformin upregulated the expression level of autophagy protein BECLIN1 and LC3 I/II was significantly less at 0.5 times in the high-glucose group than that of the control group, while metformin was able to upregulate them in the HG+MF group. The expression of mTOR and GSK3 $\beta$  was suppressed in the metformin group compared with the high-glucose group, which was the opposite results of BECLIN1 and LC3 I/II; (C) fluorescence staining image of BECLIN1 showed the weakest expression in the high-glucose group, while it was strongest in the HG+MF group; (D) the gene expression trend of *Beclin1*, *LC3 II*, *mTOR*, and *Gsk3 $\beta$*  in each group was consistent with that of western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . LC3, light chain 3; mTOR, mammalian target of rapamycin. Color images are available online.



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

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



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

## Discussion

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

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

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

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

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

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

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

## Conclusion

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

## Acknowledgments

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

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## Funding Information

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

## References

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

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

Address correspondence to:

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

*E-mail: drxiaojiangang@163.com*

Received for publication July 23, 2021

Accepted after revision August 30, 2021

Prepublished on Liebert Instant Online September 5, 2021

# 日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間評価書

## 課程博士：指導教官用



第 42 期

研究者番号： G4309

作成日： 2022 年 3 月 8 日

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

### 研究者評価(指導教官記入欄)

成績状況	優 学業成績係数=	取得単位数
		12/30
学生本人が行った研究の概要	PD-1 阻害抗体治療を受けた 200-300 人のがん患者(複数のがん種)から収集した plasma を用いて、約 300 種類のメタボライトを測定した。臨床データから統計解析を行い、irAE(自己免疫様副作用)を予測できる複数のメタボライを同定した。そのうちの一つはマウス自己免疫疾患モデルにおいても高値であることを発見した。現在は、これらのメタボライトが自己免疫疾患においてどういう意味を持つのか、その生理学的作用機序と、血中値の意義を検証している。	
総合評価	<p><b>【良かった点】</b> まさに寝食を忘れて実験に没頭できる優秀な学生である。1 年足らずで確実に成果を出し、さらに自分から意見をどんどん出す積極的な学生である。また礼儀正しく、正直で素直なため、新しい技術や知識に対する吸収力が非常に高い。それらを用いたアウトプットも正確に出すことができるため、データに対する信用性も高い。Discussion も活発に行い、好奇心旺盛な学生である。新しい技術を他人教えることもでき、リーダー的存在になりつつある。</p> <p><b>【改善すべき点】</b> 大変よく働く反面、体を壊さないか多少心配になることもある。ただその時は無理せず休むように勧めている。自分でよく考えよく実験を行うが、それらを他人にアピールする方法はまだ改善の余地がある。また 1 年生のため経験不足もあるが、英語で理論的に論文作成する能力を伸ばしていく必要がある。この一年、彼女のプレゼンテーションスライドを直し、確実に実力を伸ばしているが、まだ改善余地はある。</p> <p><b>【今後の展望】</b> 王さんは、飲み込みが早く手技も正確なため、研究の方は予想以上に順調に進んでいる。また行っている研究はがん免疫治療分野においても非常に注目されつつあるテーマであり、早期に完成させることで世界に大きなインパクトを与えることができると確信している。</p>	
学位取得見込	本奨学金 2 年間終了後、おそらく 2 年以内に論文発表できると思われる。行っている研究内容も次の課題を生み出す未広がりなテーマであり、生理学の根源を開拓する良いテーマである。予測不能なことが起こらない限り、予定通りかそれより早く学位を取得できる見込みである。	
		<p>評価者(指導教官名) 本庶佑</p>



# 日中笹川医学奨学金制度(学位取得コース)中間報告書 研究者用



第42期

研究者番号: G4309

作成日: 2022年3月 8 日

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

## 1. 研究概要

1) 目的(Goal) PD-1 blockade cancer immunotherapy has prevailed in the world as the first line of cancer therapy these days. However, this immunotherapy sometimes induces adverse events Immune Relating Adverse Events (irAEs) are the major side effect of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in cancer immunotherapy, such as PD-1 blockade antibody administration. irAE is generated by the over-activation of T cell immunity and the off-target(Ye, W. et al. Br J Cancer 124, 1661-1669 (2021))(1). The incidence of clinical irAEs is around 10 % among the ICI-treated patients, and 30-40% are severe (more than grade 3) among those who experienced irAEs at any level(Golnaz Moradet al. cell 184, October 14, 2021)(2). Mechanism investigation and biomarkers identification of irAEs is important for better-personalized medicine, and prevention or earlier intervention of irAEs1.(Jing, Y. Nat Commun 11, 4946 (2020))(3).

2) 戦略(Approach) This laboratory has studied immune metabolism in the field of cancer immunotherapy. Our group already published the prediction biomarker of ICI responsiveness using plasma metabolites which are related to microbiota (Hatae et al, JCI insight 5:e133501, 2020)(4). We will take similar methods to identify the prediction biomarker of irAE. Note that as plasma metabolites will be identified using the patients' blood before the first ICI treatment, these metabolite markers will be predictive, but not prognostic. After the identification of metabolite biomarkers, we will investigate the physiological meaning and mechanism of the metabolite biomarkers using cross-disciplinary methods and technologies.

3) 材料と方法(Materials and methods) In collaboration with Kyoto University hospital, we gathered the plasma from 200-300 patients who experienced ICIs including those with non-small cell lung cancer, renal cell carcinoma, and urothelial carcinoma. Around 300 metabolites were measured in the plasma before the 1st injection of PD-1 blockade antibody by liquid chromatography-mass spectrometry. In order to identify the metabolites which discriminate the patients with irAE and without irAE, we compared each metabolite level between the patients with irAE and without irAE. To understand the physiological meaning of the identified metabolite markers, we tested the blood metabolites in the autoimmune disease mouse models including NOD diabetes models and contact hypersensitivity models (skin inflammation model) which is one of the most frequent symptoms of irAE. To understand the function of the candidate metabolite biomarkers, we analyzed the inflamed tissues and the infiltrated immune cells. Integrating the latest technologies such as metabolomics, single-cell sequencing analysis and comprehensive cytokine detection assays, we will analyze the mechanism by which the candidate metabolites regulate the onset of autoimmune responses. Please see the overall picture of the analysis strategy in Fig. 1.

4) 実験結果(Results) By comparison of the plasma metabolites between patients with irAE and without irAE, we detected several metabolites which could predict irAE patients before starting the treatments. Among the candidates, metabolite A is prominently high in the irAE patients (Fig. 2). We found this metabolite was also upregulated in the NOD diabetes mouse model before the onset of disease and gradually increased by aging (Fig. 3). When we intravenously injected the metabolite A, the skin inflammation of CHS was attenuated, indicating that metabolite A serves as an immune modulator. Interestingly, the transporter of metabolite A is ubiquitously expressed on the cells, the expression of which is reduced by inflammatory cytokines.

5) 考察(Discussion) We successfully identified the candidate of metabolite biomarker for irAE patients before the treatment. This discovery should improve the diagnosis of cancer immunotherapy and personalized medicine. Although the physiological meaning of upregulation of metabolite A in the irAE patients even before the treatment still remains largely unknown, we will dig further using molecular biology methods and single-cell sequencing analysis of the inflamed tissues. Nevertheless, we hypothesize the mechanism as follows. 1) The patients who will have irAE by the treatment have micro-inflammation in the organs. 2) The systemic circulation of low doses of inflammatory cytokines in such patients reduces the transporter of metabolite A. 3) The reduction of transporter results in the upregulation of metabolite A in the blood. We will search more in the next year. Thank you very much for the support of my scientific life. I really appreciate the 日中笹川医学奨学金.

1. 研究概要(2)

6)参考文献(References)

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

Fig.1

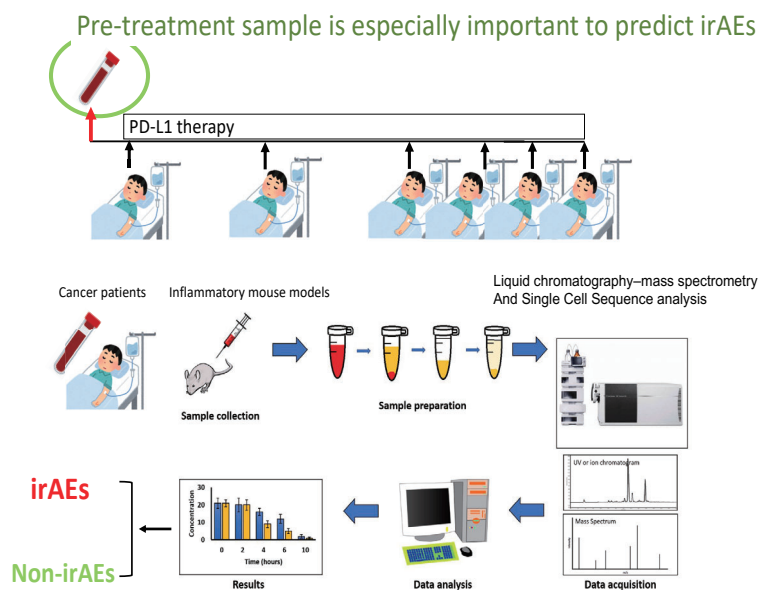


Fig.2

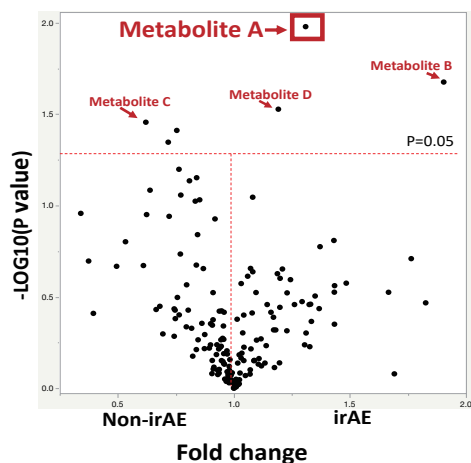
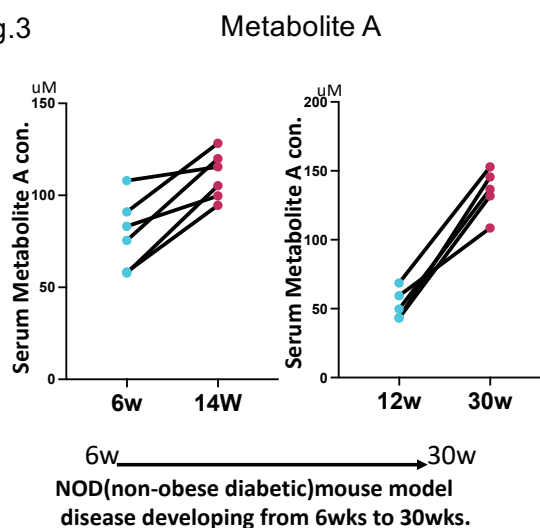


Fig.3



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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 6. 他の奨学金受給 Another awarded scholarship

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

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

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

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

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

出願予定 Scheduled application	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	出願国 Application country	国際特許
出願内容(概要) Application contents	irAEを予測するバイオマーカー		

## 9. その他 Others

--

指導責任者(記名)

中倉 光

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