

日本財団補助金による

1997年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

10年3月2日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 邵青
研究機関 鹿児島大学医学部 研究指導者 丸山征郎 職名 教授
所在地 〒890 鹿児島市桜ヶ丘1丁目35-1 電話 099-275-5437 内線 _____

II. 過去の研究歴

1994.09.10 ~ 1996.09.11 鹿児島大学歯学部 日本学術振興会特別研究員
1996.09.12 ~ 1997.04.01 鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座 研究員
1997.04.01 ~ 現在 鹿児島大学医学部 " " 大学院生

III. 過去の研究実績

"Effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on lipogenesis" J. Biochem. 1996, Vol 119 pp 840~84
"Identification of human hepatocyte growth factor in human liver carcinoma: an immunohistochemical study" Chinese Journal of Physiological Science 1995, Vol 11, pp 94~96.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

第15回 日本骨代謝学会 (見別紙)
Vitamin K & Bone 研究会 (見別紙)

(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

"Bcl-2 prevent human T-cell leukemia virus type I tax induced apoptosis through inhibition of IκB degradation" is submitting to Journal of Biological Chemistry

V. 今後の研究計画及び希望

ヒトT細胞^に白血病ウイルスタキ7° I Tax の誘導するアポトーシスを更にそのメカニズムを中心に研究して行きたい。特に Two-hybrid を用い Tax binding 蛋白について検討していきたい。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

(別紙)



VII. 指導教官の意見

本教室においては成人T細胞性白血病(ATL)細胞のアポトーシスの分子機構について研究し、成果をあげて現在 J. Biol. Chem 誌に投稿中である。短期間に分子生物学、新手法を次々と導入して大いに実績をあげると同時に、匠の、空をこえて力を尽くす。

研究報告

The research under this scholarship at Clinic and Molecular Medical Lab, Kagoshima University Medical School, will finish soon. Under the guidance of Professor Maruyama, my host researcher, and other teachers, researchers and graduate students in this research lab, I have been doing research successfully and obtained some results, and meanwhile had led a significant and rich life of Japanese style.

My working here is about apoptosis, which (also called programmed cell death) is characteristic of the collapse of the nucleus due to chromatin condensation, the formation of globular apoptotic bodies, increased transglutaminase activity, and genomic DNA fragmentation into oligomers of well-organized chains of from one to more than ten nucleosomes, on different cell lines.

First of all, I did the experiment on the inhibitory effect of thrombin on apoptosis induced by serum deprivation in osteoblast like, ME3T3-E1 cell. I found that serum withdrawal could induce apoptosis in E1 cells after cells confluence. Thrombin can inhibit the apoptosis in this cells. To demonstrate that murine clonal osteoblasts MC3T3-E1 cells in response to serum withdrawal undergo apoptosis by flow cytometry assay, detecting the DNA fragmentation and cell stained with Hoechst 33258. Further analysis of cell cycle show that the progressive decline in the numbers of cells in S and G2/M phases of the cell cycles, with an increase in cells in the resting state of G0. The signal pathway of apoptosis induced by serum withdrawal is involved inhibitory activities of transcription factor AP-1. Curcumin, AP-1 inhibitor, alone can induce apoptosis in this cell species. Also, I demonstrate that thrombin can stimulate the activation of AP-1 and prevent the effect of cell accumulating in G0/G1 phase. These data suggest that thrombin plays not only an important role in blood coagulation cascade through its cleavage of fibrinogen to form fibrin, but also in bone remodeling through proliferation of osteoblast. This data have been shown in Bone Metabolism Meeting and the paper is writing.

Next part of my working is about the "Bcl-2 prevents human T cell leukemia virus type I Tax induced apoptosis through inhibition of I κ B degradation". As we all know that human T-cell leukemia virus I (HTLV-I) is an oncogenic retrovirus etiologically associated with adult T-cell leukemia. The HTLV-I encoded Tax protein is central to initiation of

this virally induced T-cell proliferation. Tax has been shown to serve as a potent transcriptional activator inducing expression not only of genes driven by the HTLV-I long terminal repeat but also of various cellular genes involved in T-cell activation and growth, such as those encoding interleukin-2. Tax appears to act indirectly through cellular pathways including activation of the NF- κ B/Rel family of host transcription factors.

In my experiment, we found that inhibitory effect of Bcl-2 against activation of transcription factor- κ B (NF- κ B) in human T-cell leukemia virus type I Tax expressing rat fibroblasts (Rat-1 cell). The transcriptional factor, NF- κ B in stable tax-transfected Rat-1 lines was activated constitutively, and apoptosis occurred constitutively in stable Tax-transfected Rat-1 lines once cells had become confluent, particularly when stimulated by serum-deprivation. Bcl-2 inhibited the activation of NF- κ B and suppressed cell death in the Tax and Bcl-2 cotransfected cells (Tax/ Bcl-2 cells). Trans-activation of a NF- κ B-dependent chloramphenicol acetyltransferase (CAT) construct showed significant elevation in Tax-expressing cell lines, while CAT activity in Tax/Bcl-2 cotransfected cell lines or the Bcl-2-expressing cell line were significantly decreased. Furthermore, Bcl-2 dose-dependent decreased activation of NF- κ B. We excluded the possibilities that Bcl-2 inhibits the synthesis of I κ B α or phosphorylation of I κ B α and confirmed inhibition by Bcl-2 of I κ B α degradation by immunoprecipitation with antibody against I κ B α /MAD3. Immunohistochemistry shown that NF- κ B was detected only in cytoplasm on Bcl-2 expressing and Bcl-2/Tax-co-expression cells. These results suggest that Tax-induced apoptosis requires activation of NF- κ B and that Bcl-2 can suppress activation of NF- κ B by preventing proteolytic degradation of I κ B α .

During the one year of research, I have chances to attend the conference under the support of the scholarship and got the academic exchange with other researcher from other universities.

Japan is Chinese neighbor sharing a long history and culture. This is especially favorable for a Chinese to understand and get to used to Japan society. After the War, Japan has taken in a lot from the western countries, thus forming its own unique culture. I had opportunities to experience and enjoy this culture through miscellaneous activities during

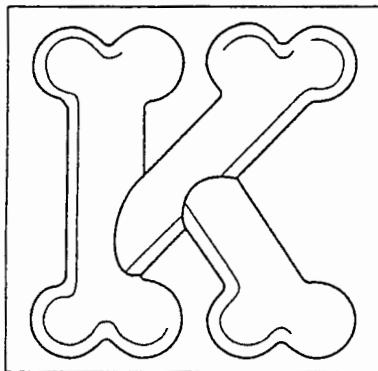
my stay in Japan, such as homestead and various festivals. Additionally the highly developed material life and civilized manners and diligent working attitude in Japan society have impressed me favorably and deeply.

It was really a good chance and significant experience for me to have undertaken scientific research in a surrounding with a reasonable academic system, advanced facilities, hard working researchers. I hope to have such a chance again. The term of scholarship was limited, but my research work which needs many and long experiments will be continued. I will do my best to contribute my bit not only for scientific research work but also for promoting academic exchange between China and Japan.

第2回

VitaminK & Bone研究会

抄録集



日 時

平成10年2月14日(土) 13:00~17:00

会 場

日本海運倶楽部 2 F 国際会議場

VitaminK & Bone研究会
主催 エーザイ株式会社

ビタミンK₂の細胞分化作用と 骨芽細胞における転写因子活性化作用の検討

鹿児島大学医学部臨床検査医学

○北島 勲先生 高崎育子先生 ~~Shao-Qing~~先生 丸山征郎先生

(○は口演者)

【目的】

ビタミンK₂の作用機序として、骨芽細胞に直接作用しオステオカルシンのGla化促進作用や分化誘導作用が知られている。本研究の目的は、ビタミンK₂が細胞増殖、分化にどのような影響を及ぼすのか、またビタミンK₂のシグナル伝達、とくに転写因子活性化作用について検討し、新たなビタミンK₂の薬理作用を明らかにすることである。

【方法】

マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1、ヒト由来骨芽細胞SaM、ヒト急性前骨髄性白血病細胞HL60にビタミンK₂、1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃、Retinoic Acidを投与し細胞分化を検討した。転写因子活性化は、刺激前後の細胞から核蛋白を抽出し、転写因子(NF- κ B, CREB, AP1, AP2, OCT1, GRE)に対するプローブを用い、Electrophoretic mobility gel shift assay(EMSA)にて検討した。NF- κ Bの活性化に関しては、その核内移行をp65に対する抗体を用い免疫組織化学的に検討した。またc-fos, IL-6 mRNA発現をRT-PCR法で検討した。

【結果】

HL60細胞は、1 α ,25(OH)₂D₃刺激で単球へ、Retinoic Acid刺激で顆粒球へ分化したがビタミンK₂刺激ではCD11b, CD14抗原発現に変化が生じなかった。しかし、NBT還元能においてはビタミンK₂単独でも促進し、1 α ,25(OH)₂D₃、Retinoic acidとsynergicに作用することが認められた。骨芽細胞ではビタミンK₂刺激によりコンフルエントに達してから2週間後にカルシウム沈着が誘導された。骨芽細胞におけるビタミンK₂の転写因子活性化はNF- κ B, AP1の結合活性上昇が認められたが、その活性化率は低く1 α ,25(OH)₂D₃、Retinoic acidの刺激と比較すると30%以下に留まった。またビタミンKは刺激15分でNF- κ Bの活性を上昇させ、NF- κ Bの核内移行を誘導した。その他の転写因子活性化には影響を及ぼさなかった。c-fos mRNA発現は刺激30分後、IL-6 mRNA発現は刺激60分後に一過性に上昇した。

【考察】

今回の検討でビタミンK₂は1 α ,25(OH)₂D₃やRetinoic Acidとは異なる生物作用と細胞内シグナル伝達系が存在する可能性が推定された。ビタミンK₂は1 α ,25(OH)₂D₃、Retinoic Acidが有するような細胞のphenotypeの変化誘導作用は示さなかった。さらにビタミンDの受容体に対する結合能にもビタミンKは影響を与えなかった。しかし既知の転写因子については弱いNF- κ BとAP1活性能を有していることが判明した。とくにNF- κ B活性化は15分で上昇することより、ビタミンK₂はI κ Bのリン酸化とその変性過程に作用する可能性も考えられる。また、骨芽細胞にビタミンK₂を刺激したところIL-6, c-fos mRNA 発現が上昇した。NF- κ BとAP1は初期遺伝子発現やサイトカイン発現に関与し、c-fos, IL-6mRNAの発現上昇、細胞増殖やアポトーシスに関連することが知られている。骨芽細胞におけるその発現調節の意義について現在検討中である。

日本財団補助金による
1997年度日中医学協力事業助成報告書

－在留中国人研究者研究助成－

1998年3月10日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 孫 英傑

研究機関 信州大学大学院医学研究科 研究指導者 森泉哲次 職名 教授
所在地 〒390-0802 長野県松本市旭3-1-1 電話 0263-(35)-4600 内線 5167

II. 過去の研究歴

1991年4月1日から1992年3月31日まで1年間、笹川医学奨学金制度研修生として信州大学医学部第2解剖学講座において研修した。

III. 過去の研究実績

Sun Y-J, Komatsu S, Naito A and Watanabe SY: Fine structure of perikaryal myelin sheaths on statoacoustic ganglion cells in 3-day-old chicks. Tohoku J Exp Med 180: 307-317, 1996

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

孫 英傑、内藤輝、渡辺真珠：培養鶏胚内耳神経節細胞の核周囲部髄鞘内にみられるミエリン層板の不連続性、不規則性について。第102回日本解剖学会総会、愛知医科大学、1997. 3. 28. (解剖学雑誌 72: 338, 1997)

(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

Sun Y-J, Naito A and Watanabe SY: perikaryal myelination on cultured chick embryo statoacoustic ganglion cells: An electron microscopic study. Acta Otolaryngol (Stockh) (in press)

V. 今後の研究計画および希望

今後は髄鞘形成に必要なミエリン蛋白質やミエリン接着因子に焦点をあて、髄鞘化の初期メカニズムを追求していきたい。また、分離培養やビデオ撮影などの方法を用いて、髄鞘化におけるシュワン細胞の動態を調べていきたい。

Ⅵ. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いてください。4,000字以上で記載してください。別紙可)

別紙



Ⅶ. 指導教官の意見

孫 英傑君は日中医学協会からの研究助成を受け、「培養鶏胚内耳神経節における核周囲部髄鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、その結果を研究報告(別紙)としてまとめることができました。さらに耳鼻咽喉科領域で一流の国際誌であります「Acta Otolaryngologica」に投稿し、受理されました。ひとえに本人の真面目な研究態度によるものと思われます。研究計画に記載されてあります課題のうち、髄鞘化におけるシュワン細胞の動態につきましては、さらなる今後の研究に委ねざるを得ませんでした。髄鞘形成に関与するシュワン細胞数につきましては明確な結論を得ることができました(研究報告参考)。また本研究で、髄鞘形成・髄鞘変性に影響を及ぼす様々な環境因子・薬剤の効果を検定する上でのすぐれた *in vitro* スクリーニング系を提供できたことは髄鞘化のメカニズムの解明を進める上で有効であると思われます。最後に、日中医学協会からの研究助成に厚く御礼申し上げます。

平成10年3月10日

信州大学医学部

解剖学第2講座

教授 森 泉哲次(發)

研究報告

培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髄鞘化のメカニズムについて

緒言

脊椎動物の第8脳神経節細胞は細胞体（核周囲部）にも髄鞘を持つ。この髄鞘は双極性の神経節細胞の核周囲部全体を包み、一つの髄節となるよう形作っている。また、この核周囲部髄鞘は、compact (major dense line がみられる) な層板だけで構成される軸索部髄鞘とは異なり、compact と未だシュワン細胞細胞質の残る loose な層板により構成されている。

in vitro における核周囲部髄鞘形成に関する報告は、これまで Shimizu (1965) による培養鶏胚内耳神経節細胞の観察以外なされていない。Shimizu は、孵卵 12-15 日目のまだ髄鞘形成の始まっていないニワトリ胚の第8脳神経節を長期培養したところ、培養4週以降で核周囲部髄鞘がみられるようになったこと、この核周囲部髄鞘は *in vivo* 生後3日目のものと同じ構造を示すことなどを光顕的な観察から報告している。しかし、光顕では loose な髄鞘層板の観察は難しく、後の *in vivo* における光顕と電顕を用いた観察では、光顕で無髄（1層のシュワン細胞細胞質に被われる）と判定された部位の多くは2層以上の loose な層板により包まれていることが明らかとなった。そこで本研究では、培養下の核周囲部髄鞘形成について透過電顕を用いて観察した。

材料と方法

材料は孵卵 13 日目鶏胚を使用した。鶏胚の内耳神経節を実体顕微鏡下で取り出し、コラーゲンを塗布したカバーグラスに乗せ、CO₂ 3%、湿度 100% (36°C) で培養した。培養液は Eagle's MEM 80%、鶏胚抽出液 10%、馬血清 10% の組成のものを用い、週2回交換した。培養 1、2、3、4、5、6 週後に、神経節を 2.5% glutaraldehyde と 1% OsO₄ で各々 30 分固定し、脱水、包埋後、厚さ 0.07-0.1 μ m の切片を作製し、透過電顕で観察した。

結果

その結果、培養下では無髄、核周囲部の一部が髄鞘に包まれ残りは無髄の部分的

有髄、全周が髄鞘に包まれた有髄の3種類の神経節細胞が認められた。そこで、培養週数による3種類の神経節細胞（電顕像で核の断面がみられた細胞のみ）の比率の変化を調べた。また培養週数毎に核周囲部髄鞘と軸索部髄鞘の層板の数を数えた。以下は、培養週数ごとに所見を述べる。

1週

155個の神経節細胞を観察したが、全てが無髄であった。軸索も有髄のものはみられなかった。

2週

2層以上のシュワン細胞細胞質により核周囲部の一部が被われた神経節細胞がみられるようになった（本研究ではこのような細胞も部分的有髄に含めた）。神経節細胞170個を観察したところ、無髄は155個（91%）、部分的有髄は15個（9%）であった。

有髄軸索が初めて観察された。髄鞘の層板の数は6から11（ 7.9 ± 1.9 , $n=13$ ）層であった。

3週

有髄神経節細胞および核周囲部髄鞘内にcompactな層板が初めてみられるようになった。しかし、compactな層板により全周を被われた神経節細胞は認められなかった。神経節細胞204個を観察したところ、無髄は162個（80%）、部分的有髄は27個（13%）、有髄は15個（7%）であった。また、有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は2から9（ 5.1 ± 1.8 , $n=14$ ）層であった。

軸索髄鞘の層板の数は9から14（ 11.9 ± 1.7 , $n=19$ ）層であった。

4週

全周をcompactな層板に包まれた有髄神経節細胞が初めてみられるようになった。このような有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘は、軸索小丘の部位で、末梢神経軸索のparanodeでみられるような髄鞘ポケットを形成して終わっていた。神経節細胞178個を観察したところ、無髄は120個（68%）、部分的有髄は36個（20%）、有髄は22個（12%）であった。有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は2から12（ 7.4 ± 3.2 , $n=22$ ）層であった。

軸索髄鞘の層板の数は11から26（ 16.6 ± 3.2 , $n=38$ ）層であった。

5 週

144 個の神経節細胞を観察したところ、88 個 (61%) が無髄、40 個 (28%) が部分的有髄、16 個 (11%) が有髄であった。有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は 2 から 15 (8.2 ± 3.9 , $n=10$) 層であった。

軸索髄鞘の層板の数は 13 から 26 (18.4 ± 3.6 , $n=16$) 層であった。

6 週

130 個の神経節細胞を観察したところ、80 個 (62%) が無髄、34 個 (26%) が部分的有髄、16 個 (12%) が有髄となった。有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は 2 から 15 (8.6 ± 3.7 , $n=12$) 層であった。

軸索髄鞘の層板の数は 12 から 26 (19.6 ± 4.9 , $n=12$) 層となった。

考 察

in vivo ニワトリ内耳神経節細胞では 13 日胚 (stage39) で軸索に 16-17 日胚 (stage42-43) で核周囲部に compact な層板がみられるようになり、2021 日胚で軸索は 2 から 12 層の compact、核周囲部は 2 から 6 層の compact と loose な層板 (ただし神経節細胞には未だ無髄のものが残っている)、生後 3 日目では軸索は 11 から 29 層の compact、核周囲部は 4 から 17 層の compact と loose な層板に包まれるようになる (無髄のものはなくなる)。また、部分的有髄神経節細胞の報告はないことから、髄鞘は核周囲部全周にわたりほぼ一様に形成されることが推定される。

本研究では、培養下の無髄、部分的有髄、有髄の 3 種類の神経節細胞が示された。無髄および有髄については、*in vivo* でも髄鞘形成開始前と後で認められる。しかし、部分的有髄については *in vivo* では報告されず、培養下独特のものと考えられる。一方、本研究から、培養 4 週以降で 11-12% の細胞が有髄となること、これらの細胞の核周囲部髄鞘は loose と compact な層板から構成され、これらの層板の終末は軸索小丘で髄鞘ポケットを形成していることが示された。これらの所見は、*in vivo* のものと一致しており、培養下でも 10% 以上の細胞に *in vivo* と同じ構造の核周囲部髄鞘が形成されることが明らかとなった。

本研究では、軸索の髄鞘と核周囲部髄鞘の compact な層板はそれぞれ培養 2 週以降と 3 週以降で認められるようになった。また、軸索の髄鞘は compact、核周囲部髄鞘は loose と compact な層板が増加することにより形成された。これらの所見は *in vivo* のものと一致しており、軸索と核周囲部髄鞘は培養下でも *in vivo* と同じ順序・同じ過程で形成されることが分かった。一方、髄鞘層板の数は、軸索では、培

養4週以降で12から26層、核周囲部では培養5週以降で2から15層となり、*in vivo* 生後3日目（軸索：11から29層、髓鞘形成開始から11日目、核周囲部：4から16層、髓鞘形成開始から7-8日目）に相当する数となった。このことは培養下の髓鞘形成は *in vivo* に比べ非常にゆっくりとしたものであることを示している。

ま と め

「培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髓鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、以下の結論を得た。

1. 培養下で無髓、部分的有髓、有髓の3種類の神経節細胞が示された。培養4週以降で11-12%の細胞が有髓となり、これらの細胞の核周囲部髓鞘は軸索小丘で髓鞘ポケットを形成していることが示された。培養下でも10%以上の細胞に *in vivo* と同じ構造の核周囲部髓鞘が形成されることが分かった。
2. 軸索部髓鞘の方が核周囲部髓鞘に比べ髓鞘形成が早期に始まった。また、軸索部髓鞘は compact、核周囲部髓鞘は compact と loose な層板により形成されていた。一方、層板の数は各々軸索部髓鞘では培養4週で、核周囲部髓鞘は5週で *in vivo* 生後3日目に相当する数となった。
3. 培養下における内耳神経節細胞の核周囲部髓鞘形成を電顕で詳細に観察し、
(a) 1個のシュワン細胞直下に loose と compact の層板からなる明瞭な髓鞘が形成される、
(b) しかし1個のシュワン細胞だけで核周囲部の全周に髓鞘が形成されることはない、
(c) 逆に核周囲部の全周に髓鞘が形成される場合、1個の神経節細胞のまわりに必ず複数のシュワン細胞が認められるなどの実験結果が得られた。1個のシュワン細胞でも髓鞘形成はおこるが、核周囲部の全周にわたり髓鞘形成がおこるためには、複数のシュワン細胞の関与が不可欠であると結論された。

以上の研究内容は「Acta Otolaryngologica」に受理され、現在印刷中である。