

Program

Sunday, November 5th, 2006

9:00~ **Registration Open**

10:00-10:10 **Opening Talk**

東 超 会長 (奈良県立医科大学)

李 茂森 領事 (中華人民共和国駐大阪総領事館教育室)

鄭 正勝 特別顧問 (京都華僑總會會長、鄭醫院理事長)

10:10-10:50 **Special Lectures: Session**

Chair Person: Dr 黄海瑛 (医薬基盤研究所)

S1 A Novel Drug for Treatment of Epstein-Barr Virus Related B Cell Lymphomas

Ping Zou, Junichi Kawada, Lesley Pesnicak, and Jeffrey I. Cohen

Medical Virology Section, Laboratory of Clinical Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health

S2 AID:免疫球蛋白多様性研究的疑惑

王冀妹

京都大学医学研究科 免疫ゲノム医学講座

10:50-11:50 **Special Lectures: Session**

Chair Person: Dr 孟文翔 (理化研究所)

S3 Insight into Membrane Protein Binding Site by Solid-State NMR

Xin Zhao

Institute for Protein Research, Osaka University

S4 Differential Effects of GATA-1 on Proliferation and Differentiation of Erythroid Lineage Cells

Jie Zheng,

Department of Pathology, Medical School and Frontier Biosciences, Osaka University

11:50-12:20 **Special Lectures: Session**

Chair Person: Dr 宋健 (Inter Cyto Nano Science 株式会社)

S5 DNA チップによる体質検査と疾病リスク評価

陳 建君

上海潤東バイオテックジャパン株式会社

S6 クレイドルおよび工学と医療 CRADLE & Engineering and Medicine

范 秦 寅

Software CRADLE Co. Ltd.

12:20-13:00 **Lunch**

自己紹介

司会 張 吉天 副会長

13:00-14:30 **Basic Research**

Chair Person: Dr 呂玉泉 (大阪大学)

Dr Xin Zhao (大阪大学)

B1 Generation and Characterization of RA-GEF-1 Knockout Mice

Ping Wei , Tohru Kataoka

Division of Molecular Biology, Department of Molecular and Cell Biology, Kobe University Graduate School of Medicine

B2 HPC 2 与 LIM 蛋白 KyoT2 相結合抑制 RBP-J 介導的转录激活

秦 鴻雁

京都大学医学研究科免疫ゲノム医学講座

B3 Galectin-3 Keeps Hematopoietic Stem Cell Quiescence via Ang1/Tie2 Signaling

Lingyu Kong, Nobuyuki Takakura

Kanazawa University Cancer Research Institute Division of Stem Cell Biology
Osaka University Research Institute for Microbial Diseases Department of
Signal Transduction

B4 Adenosine Induces Apoptosis in HuH-7 Human Hepatoma Cells by Tuning Expression of Multiple Regulatory Molecules Relevant to Caspase Activation

Dongqin Yang, Hideyuki Yamamoto, Takahiro Yaguchi, Rika Hi,
Tomoyuki Nishizaki
Department of Physiology, Hyogo College of Medicine

B5 The High Selectivity of a Novel 6-Zinc Finger Peptide with Polyarginine Linker

Wei Yan, Miki Imanishi, Tatsuya Morisaki, Yukio Sugiura
Institute for Chemical Research, Kyoto University

B6 Acetylcholinesterase inhibitor-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity: involvement of NMDA receptor internalization and attenuation of caspase-3 activation

Huilian Shen, Takeshi Kihara, Keiko Yazawa, Tetsuhiro Niidome and Hachiro Sugimoto
Department of Neuroscience for Drug Discovery, Graduate School of Pharmaceutical science, Kyoto University.

B7 The absorption improvement of polyamines on macromolecules with different routes

He Lin Akiro Yamamoto
Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University

14:30-15:00 **自己紹介**

司会 張 吉天 副会長

15:00-16:30 **Clinical Research and Applied Research**

Chair Person: Dr 程繼東 (国立循環器病センター)

Dr 馬 嘯 (京都大学)

C1 Molecular Imaging: Current Status and Future Prospects

Zhouen ZHANG

¹ASTEM Kyoto Institute ²Graduate School of Engineering, Kyoto University

C2 アフリカツメガエルを用いた POU - V 因子の機能と転写制御関係

李 羽中

関西学院大学 理工学研究科 生命科学専攻 木下研究室

C3 在大白鼠梗塞心臓局部緩釋促細胞血紅素改善心功能且不引起紅細胞增多症

林 雪, 藤田 正俊, 金光 尚樹, 木村 祐, 丹原 圭一, 高迪 帕馬拉提, 長澤 淳, 池田 義, 田畑 靖彦, 米田 正始

京都大学医学研究科 心脏血管外科

C4 活体肝移植后免疫寛容儿童患者外周末梢血淋巴細胞亜型分析

李穎

京都大学移植外科

C5 ナンキョウに含まれている1'-acetoxychavicol acetateのガン細胞増殖抑制効果のメカニズムについて

徐 聖輝¹⁾、湯浅 (小島) 明子¹⁾、東 秀紀²⁾、湯浅 勲¹⁾

¹⁾ 大阪市大院・生活科学・栄養機能科学、²⁾ 大阪市大院・工・生体機能工学

C6 疼痛発症にかかわる末梢でのグルタミン酸とオピオイドの相互作用

金幼虹、上崎善規

大阪大学大学院歯学研究科歯学薬理系 (統合機能口腔学)

C7 FluorVivo システムにより腫瘍の in vivo イメージングの応用
叢 雅琳 (インターメディカル)、Bruce Peters (INDEC Biosystems)、
楊萌 (AntiCancer Incorporated)

16:30-18:30 **受賞式および懇親会**

総合司会：程継東 副理事長 (国立循環器病センター)

S 1 A Novel Drug for Treatment of Epstein-Barr Virus Related B Cell Lymphomas

Ping Zou, Junichi Kawada, Lesley Pesnicak, and Jeffrey I. Cohen

Medical Virology Section, Laboratory of Clinical Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health

ABSTRACT

Bortezomib, an inhibitor of the 26S proteasome, is currently approved for treatment of multiple myeloma and is being studied for therapy of non-Hodgkin's lymphoma. We found that EBV-positive B cells with type III latency were more susceptible to killing by bortezomib, than those with type I latency. Bortezomib induced apoptosis of EBV lymphoblastoid cells lines (LCLs) by inducing cleavage of caspases-8 and -9; apoptosis was inhibited by pretreatment with a pan-caspase inhibitor. Bortezomib reduced the ability of LMP-1 to activate the NF- κ B promoter, and the drug inhibited expression of p52, a component of the non-canonical NF- κ B pathway, which is induced by EBV LMP-1. Bortezomib inhibited expression of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP, which are regulated by NF- κ B, and function as inhibitors of apoptosis. Bortezomib did not inhibit expression of several other anti-apoptotic proteins including Bcl-2 or Bcl-XL. Finally, bortezomib significantly prolonged the survival of severe combined immunodeficiency (SCID) mice inoculated with LCLs. These findings suggest that bortezomib may represent a novel strategy for the treatment of certain EBV-associated lymphomas.

S 2 AID: 免疫球蛋白多样性研究的疑惑

王冀姝

京都大学医学研究科 免疫ゲノム医学講座

免疫球蛋白（抗体）能够识别、中和以及清除抗原。正常的人体内有 10^8 以上的不同种类、识别不同抗原的抗体。这种多样性的特性是 B 淋巴细胞内的三种不同生物学反应（reaction）的结果：VDJ 重组（VDJ recombination），超突变(somatic hypermutation, SHM)，类型转换(class switch recombination, CSR)。抗体的多样性研究一直是免疫学界的一大热点。VDJ 重组的研究获得了 1987 年的医学和生理学诺贝尔奖（Tonegawa, Japan）。但是 SHM 和 CSR 一直困扰着免疫学家。1999 年，京都大学本庶佑（Honjo Tasuku）教授所领导的研究组首先发现了一个小分子 AID (activation induced cytidine deaminase)，并发表了 AID 同时调控 SHM 和 CSR 的研究结果。这一结果在免疫学界引起巨大震动。但是 AID 的工作机理却成为争执的热点，并形成了两种截然相反的假说：RNA 模式和 DNA 模式。

S3 Insight into Membrane Protein Binding Site by Solid-State NMR

Xin Zhao

Institute for Protein Research, Osaka University

Membrane proteins perform essential roles in the cell, act as receptors, transporters and channels, and are responsible for key functions such as development, cell-cell interactions, energy conversion, nerve transmission, muscle contraction, signalling, and apoptosis. One-third of the genome of any organism encodes membrane proteins. However, due to challenges inherent in their isolation and stability, very limited structural information is currently available on membrane proteins, their mechanisms of action, and the roles they play in disease.

Solid-state NMR has been proven as a powerful method for resolving structural information for large biomolecular complexes, such as membrane embedded proteins because it has no requirement on sample form (advantage over diffraction methods), and in principle, there is no molecular weight limit to the use of the approach (advantage over liquid-state NMR). High-resolution multiple dimensional solid-state NMR has been successfully applied to various biological systems, including membrane proteins, to resolve structure and functions detail.

Rhodopsin is a G-protein coupled receptor responsible for dim light vision in vertebrates. The light-sensitive element of rhodopsin is the retinylidene chromophore, which is attached to the lysine-296 residue of the opsin protein by a protonated Schiff base (PSB) linkage. The 11-*Z* chromophore is isomerized to 11-*E* by absorption of a photon. The light-induced conformational change of the chromophore triggers a series of structural changes in the protein which eventually lead to activation of the cytoplasmic surface domain followed by binding and activation of the G-protein transducin. Selected pairs of carbon-carbon bond lengths of the

retinal polyene chain have been measured using symmetry-based double-quantum (DQ) solid-state NMR spectroscopy. Localized perturbation of the carbon-carbon bond length of the retinylidene chromophore has been detected with a spatial resolution of 3 picometres. The results indicate that the second extracellular loop and the associated water assist the rapid selective photo-isomerization of the retinylidene chromophore by stabilizing a partial positive charge in the centre of the polyene chain.

Quite often, 1% natural abundant ^{13}C signal heavily interferes with the study of membrane protein-ligand interactions, especially those of large protein complexes. Acetylcholinesterases (AChEs) are the enzymes which preferentially hydrolyze acetyl esters, containing 543 amino acid residues with a molecular weight of 240 kDa in the *Ee*AChE form and arranged as a 12-stranded β -sheet surrounded by 14 α -helices. AChE inhibitors are of commercial and medical interest as pesticides and as therapeutics in the treatment of Alzheimer's disease, understanding of the conformation of inhibitors at the binding site enables the rational design of novel inhibitors with increased potency and specificity. A new homonuclear DQ experiment has been successfully developed to suppress natural abundant ^{13}C signals and study the interaction between AChE and its inhibitor R414983. By combining the solid-state NMR data and docking simulations, a model has been proposed to describe the bound conformation of the protein and its inhibitor in the binding pocket.

S 4 Differential Effects of GATA-1 on Proliferation and Differentiation of Erythroid Lineage Cells

Jie Zheng,

Department of Pathology, Medical School and Frontier Biosciences, Osaka University

The zinc finger transcription factor GATA-1 is essential for both primitive (embryonic) and definitive (adult) erythropoiesis. To define the roles of GATA-1 in the production and differentiation of primitive and definitive erythrocytes, we established GATA-1-null embryonic stem cell lines in which GATA-1 was able to be conditionally expressed by using the tetracycline conditional gene expression system. The cells were subjected to hematopoietic differentiation by co-culturing on OP9 stroma cells. We expressed GATA-1 in the course of primitive and definitive erythropoiesis and analyzed the ability of GATA-1 to rescue the defective erythropoiesis caused by the GATA-1 null mutation. Our results show that GATA-1 functions in the proliferation and maturation of erythrocytes in a distinctive manner. The early-stage expression of GATA-1 during both primitive and definitive erythropoiesis was sufficient to promote the proliferation of red blood cells. In contrast, the late-stage expression of GATA-1 was indispensable to the terminal differentiation of primitive and definitive erythrocytes. Thus, GATA-1 affects the proliferation and differentiation of erythrocytes by different mechanisms.

S5 DNA チップによる体質検査と疾病リスク評価

陳 建君

上海潤東バイオテクジャパン株式会社

近年、ヒトゲノムの読解が完了し、その DNA 塩基配列が解明されたことで、さまざまな疾患の治療法が発見・開発され、医薬・創薬の分野における遺伝子技術は画期的な進歩を遂げています。

現在、先進国における主な死因として癌、心筋梗塞及び脳卒中が挙げられます。発症には、遺伝的要素、環境因子及び生活習慣が関与していますが、遺伝子技術の発展に伴い疾患の発病リスクが遺伝子レベルで説明が可能となりました。予め、これらの疾患の発症リスクを遺伝子レベルで検査していれば、発症を未然に防いだり、早期発見することがより確実に行うことができるようになると言えます。

弊社では、高血圧、高脂血症、脳卒中及び胃癌などの疾病を検査する DNA チップの販売事業を行っております。DNA チップによる遺伝子検査を実施することで、その疾病リスクを予測し、個人のリスクに合わせた健康管理サポートを可能としています。

また、弊社のその他事業内容として日本企業様の中国における医薬品、保健食品及び医療機器の開発支援サービスを行っており、日中両国の医療の発展と健康の増進に貢献することを理念としています。

S6 クレイドルおよび工学と医療

CRADLE & Engineering and Medicine

范 秦 寅

Software CRADLE Co. Ltd.

工学と医療の現状を総合的に述べた上で、流体力学と心臓医療の関係を紹介する。人工心臓は弁の働きで、関節は軸受けの働き、人体はエンジンの働きと考えられる。そうすると、まさに、機械製造はシステムとしての生命に学ばなければならない。その反対、機械製造の進歩で機械の部品を人工の臓器として設計、製造が出来る。そのことで医療に大きく影響し再編させることもある。“医工連携”はとっても重要で、工学系流体力学の関係者も責任がある。工学には流体工学がとっても重要である。医工連携の場合も流体工学が重要な働きをする。人体の最も重要な臓器は心臓である。流体工学は心臓と直接に関与する。流体力学を心臓の研究に適用する場合、主に2つに分けられると思う。一つ目は心臓のシミュレーションである。血液の流動、心臓の各部分の挙動と機能などを調べるために、流体と構造解析の連成を必要である。二つ目は人工心臓の設計と製造に重要な情報を提供できる。アメリカは血管のシミュレーションしたのは約20年前で、ここではTom Hughsさんの例を挙げたいと思う。最後に、著者の仕事と直接関係した歯の強度予測、血管と心臓血液流れの予測及び早産児保育器内気流予測を紹介し、留日中国生命科学協会と中国留日同学会が生命現象シミュレーション委員会を設立することを提案する。

B1 Generation and Characterization of RA-GEF-1 Knockout Mice

Ping Wei , Tohru Kataoka

Division of Molecular Biology, Department of Molecular and Cell Biology, Kobe University Graduate School of Medicine.

Abstract

RA-GEF-1 is newly identified GEF for Rap1, a member of Ras family small G protein. This protein has one cyclic nucleotide monophosphate-binding domain, one Ras-exchanger motif (REM) domain, one PDZ domain, one Ras/Rap1-associating (RA) domain, one GEF catalytic domain and a C-terminal consensus motif for binding to the PDZ domain of the neural scaffolding protein S-SCAM. RA-GEF-1 is translocated to the Golgi complex by association with Rap1-GTP through its RA domain and catalyzes activation of Rap1 there, amplifying Rap1-dependent cellular responses. To address the physiological role of RA-GEF-1 in mammals, We have generated RA-GEF-1-knockout mice utilizing the Cre/loxP system. No viable RA-GEF-1 ^{-/-} mice were born from heterozygous intercrossing, indicating that homozygosity for the RA-GEF-1 mutation is embryonic lethal. RA-GEF-1 deficient mice die at embryonic day 9.5 (E9.5) with profound vascular defects in yolk sac. Mutant embryos showed growth retardation, hemorrhage, undulated neural tube and abnormalities in heart. These phenotypes are similar to that of fibronectin-deficient embryos and VE-cadherin-deficient embryos, suggesting a critical role of RA-GEF-1 in vascular development. The defects associated with RA-GEF-1-deficiency could be due to insufficient extracellular matrix support or impaired cell-cell interaction.

B2 HPC2 与 LIM 蛋白 KyoT2 相结合抑制 RBP-J 介导的转录激活

秦鸿雁

京都大学医学研究科免疫ゲノム医学講座

Notch/RBP-J 信号途径是相邻细胞间调节分化的重要信号途径之一，在多种胚胎前体细胞以及干细胞的分化中发挥重要作用，而且与多种人类疾病相关。Notch 为 I 型单次跨膜受体，其配体 Delta 家族分子也是跨膜蛋白。当相邻细胞间的 Notch 受体和配体相互作用后，由蛋白酶催化在 Notch 受体的跨膜区发生蛋白裂解，使 Notch 胞内区 (Notch intracellular domain, NIC) 从细胞膜内侧释放并进入核内。进入核内的 NIC 可通过 RAM (RBP-J association molecule) 结构域与转录因子 RBP-J 相互作用，激活含有 RBP-J 识别位点的启动子的转录，从而调节细胞分化相关基因的表达。当不存在转录激活物时，RBP-J 则介导转录抑制作用。在哺乳动物细胞中，多种 RBP-J 相互作用蛋白，如组蛋白脱乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 和核基质蛋白 MINT (MSX2-interacting nuclear target protein) 都可抑制 NIC 激活的 RBP-J 介导的转录。然而，RBP-J 介导的转录抑制作用的机理仍不完全清楚。深入研究 RBP-J 的转录调控机理对于理解 Notch 信号途径对细胞分化的调控具有重要意义。

KyoT2 是一种与 RBP-J 相互作用的 LIM 结构域蛋白，可通过竞争 RBP-J 上的结合位点抑制 NIC 对 RBP-J 介导的转录的激活作用。但是，大量文献报道证实 LIM 结构域是一种蛋白质间相互作用界面。因此，我们提出：KyoT2 在通过其 RBP-J 结合位点竞争性抑制 NIC 的转录激活作用外，还可能通过其 LIM 结构域向 RBP-J 募集其它转录调控分子。

为了证实这一观点，本研究在以往工作的基础上，通过酵母双杂交，GST-pull down，免疫共沉淀及报告基因等实验深入研究了 KyoT2 与 PcG (Polycomb group) 蛋白 HPC2 之间的物理和功能相互作用，并且探讨了这些相互作用对 RBP-J 介导的转录激活的影响。目前的研究结果发现 KyoT2 与 HPC2 蛋白之间存在物理和功能的相互作用，PcG 蛋白 HPC2 可通过与 KyoT2 相互作用被募集到转录因子 RBP-J，从而抑制 RBP-J 介导的转录。据此，我们得出结论：KyoT2 可以通过两种机制抑制 RBP-J 介导的转录：一种是与转录激活物 NIC 或 EBNA2 竞争结合 RBP-J；另一种是募集共抑制复合物 RING1 和 HPC2。

B3 Galectin-3 Keeps Hematopoietic Stem Cell Quiescence via Ang1/Tie2 Signaling

Lingyu Kong, Nobuyuki Takakura

Kanazawa University Cancer Research Institute Division of Stem Cell Biology

Osaka University Research Institute for Microbial Diseases Department of Signal Transduction

It has been widely accepted that the signaling system of the Angiopoietin-1/Tie2 receptor is very important on promoting vessel sprouting, capillary formation and stability in the secondary stages of blood vessel formation (Angiogenesis). Recently it was also reported that Ang-1 enhanced the ability of HSCs to become quiescent and protected the HSC compartment from myelosuppressive stress in the BM niche. However, which is the target factor down-regulated by Ang1/Tie2 pathway is not extremely clear. Here we detected a β -galactose-binding gene, Galectin-3, which was specially expressed on Constitutive Active Tie2 transfection BaF cell line by PCR-Select cDNA subtraction analysis. Further experiment data show Galectin-3 protein expression is also induced by recombinant human Ang-1 protein in Wild Type Tie2 transfection BaF cells, and that is dependent on PI3K/AKT stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. Galectin-3 is multi-biology function protein, seems to be related to cell adhesion, cell cycles, anti-apoptosis, and angiogenesis. The Galectin-3 transfected BaF cells became growth slowly, cell cycle enter delay and survived from hypoxia-induced cell death. Furthermore, we demonstrated that Galectin-3 express mainly on Tie2+KSL HSCs in BM , and increased by rhAng-1 induction ex vivo. These data suggest that Galectin-3 may play a critical role in the maintenance of long-term HSCs in the BM niche regulated by Ang-1/Tie2 signaling. To confirm this hypothesis and analysis the role of Galectin-3 in angiogenesis in vivo, we constructed a conditional Galectin-3 transgenic mouse model, and analyze the phenotype of the Tg mouse continually.

B4 Adenosine Induces Apoptosis in HuH-7 Human Hepatoma Cells by Tuning Expression of Mutiple Regulatory

Molecules Relevant to Caspase Activation

Dongqin Yang, Hideyuki Yamamoto, Takahiro Yaguchi, Rika Hi,
Tomoyuki Nishizaki*

Department of Physiology, Hyogo College of Medicine

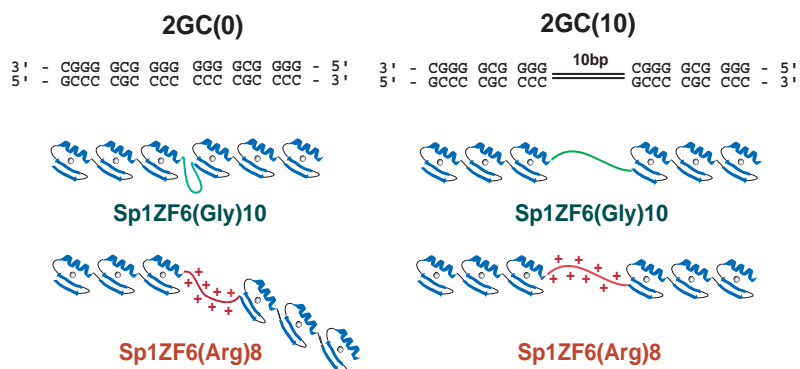
Abstract

Extracellular adenosine induced apoptosis in HuH-7 cells, a Fas-deficient human hepatoma cell line by being taken up into cells through adenosine transporters and converted to AMP by adenosine kinase, regardless of adenosine receptors. Adenosine significantly activated caspase-3 and -8, but not caspase-9, and the effect was inhibited by the adenosine transporter inhibitor dipyridamole. Moreover, adenosine disturbed mitochondrial membrane potentials. In the real-time RT-PCR analysis, adenosine significantly downregulated expression of genes such as BclXL, IAP3, c-Myc, FLIPs, but adenosine otherwise upregulated expression of DIABLOs gene. The adenosine effects on the gene expression was also inhibited by dipyridamole. Taken together, it appears that adenosine induces HuH-7 cell apoptosis at least via two pathways in association with adenosine uptake into cells. For one way, mitochondrial damage may initiate a decrease in BclXL, causing an increase in DIABLOs followed by a decrease IAP3, leading to activation of caspase-3. For another way, a decrease in c-Myc and FLIPs may be a trigger to activate caspase-8, independently of receptor-mediated caspase-8 activation, and the resultant activation of the downstream caspase caspase-3. The results of the present study may provide further insight into molecular apoptotic pathways relevant to adenosine signaling.

B5 [The High Selectivity of a Novel 6-Zinc Finger Peptide with Polyarginine Linker](#)

Wei Yan, Miki Imanishi, Tatsuya Morisaki, Yukio Sugiura
Institute for Chemical Research, Kyoto University

A zinc finger motif, which is one of the most common DNA binding motifs in eukaryotes, presents an attractive framework for the design of novel DNA binding peptides. Artificial zinc finger peptides with desired sequence specificity are important for regulation of gene expression. In order to expand the varieties of target DNA sequences in the huge genome, artificial proteins that could bridge discontinuous specific sequences are required. In addition, the ability to distinguish discontinuous sequences from continuous ones would be important for increasing the DNA binding selectivity. We created a 6-zinc finger peptide, Sp1ZF6(Arg)8, by connecting two DNA binding domains of transcription factor Sp1 with a cationic polyarginine linker. The DNA binding properties to continuous and discontinuous target sequences, 2GC(0) and 2GC(10), respectively, were examined and compared to those of Sp1ZF6(Gly)10, which contains a flexible and neutral polyglycine linker. The gel mobility shift assays demonstrated that Sp1ZF6(Arg)8 has an obvious DNA binding preference to discontinuous target sequences, while Sp1ZF6(Gly)10 binds to the continuous and discontinuous target sequences with comparable dissociation constants. DNase I footprinting analyses and methylation interference assays indicated that Sp1ZF6(Arg)8 binds to one of the two continuous target sequences, though it binds to both of the discontinuous target sequences. Sp1ZF6(Gly)10, on the contrary, does not distinguish between the continuous and discontinuous sequences. Bulky and cationic side chains of the polyarginine linker may inhibit the suitable binding of the 6-zinc finger peptide to the continuous long sequence, resulting in strong preference to the discontinuous target sequences (Figure). The results provide helpful information for the linker design of more adaptable zinc finger peptides to various states of DNA in addition to the desired sequence as gene expression regulators.



(Figure) Putative DNA binding modes of Sp1ZF6(Gly)10 and

B6 Acetylcholinesterase inhibitor-induced neuroprotection against glutamate

excitotoxicity: involvement of NMDA receptor internalization and attenuation of caspase-3 activation

Huilian Shen, Takeshi Kihara, Keiko Yazawa, Tetsuhiro Niidome and Hachiro Sugimoto

Department of Neuroscience for Drug Discovery, Graduate School of Pharmaceutical science, Kyoto University.

Alzheimer's disease (AD) is one of the neurodegenerative diseases presenting dementia in the elderly. It is characterized by the presence of senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles, and by extensive neuronal loss. Beta amyloid, a major component of SPs, potentiates excitotoxic insult such as glutamate. Ischemic insult followed by glutamate release also contributes to the pathogenesis of AD. Therefore, we employed glutamate-induced toxicity as a culture model for the neuronal death found in AD.

Using primary rat cortical neurons, the number of viable neurons was evaluated by LDH assay. Glutamate induced excitotoxicity, and it was inhibited by MK801. Calcium removal and Ac-DEVD-CHO, indicating that the toxicity mediated via NMDA receptors, intracellular overload of calcium, and caspase-3 activation. A 48h-pretreatment of neurons with nicotine or acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) reduced excitotoxicity in a concentration dependent manner. Protective effect of AChEI was inhibited by nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) antagonists, such as mecamylamine, indicating the involvement of nAChR. Fura-2 imaging showed that pretreatment with AChEI significantly reduced glutamate-induced calcium influx. Furthermore, glutamate-induced caspase-3 activation was attenuated by AChEI pretreatment. Using surface biotinylation assay, protein level of the cell surface NMDA receptor was examined. Pretreatment with AChEI reduced cell surface level of NMDA receptors, indicating the reduction of the glutamate-induced death signals.

AChEIs are approved in many countries for the treatment of AD, and it is reported that AChEIs counter the progress of AD. Neuroprotective effect of AChEIs through nAChR might be mediated via NMDA receptor regulation, which is one of the cellular bases for the clinical effects.

B7 The absorption improvement of polyamines on

macromolecules with different routes

He Lin Akiro Yamamoto

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto, 607-8414, Japan

Abstract

The enhancement effect of polyamines (spermine, spermidine and putrescine) on the macromolecules' absorption were examined by means of an in situ absorption method. 5(6)-carboxyfluorescein(CF), fluorescein isothiocyanate-labelled dextrans(FDS) with different average molecular weights(4000-70 000), insulin, and calcitonin were chosen as the model macromolecules. Of all the three polyamines enhancers, spermine appeared to be more effective than the other two and three different concentrations of it with 1mM, 5mM and 10mM were specially studied. Comparing with intestinal administration, spermine showed more absorption improvement after pulmonary administration and it displayed the capacity of increasing not only the absorption content but also the absorption speed to all the macromolecules.

C1 Molecular Imaging: Current Status and Future Prospects

Zhouen ZHANG

¹ ASTEM Kyoto Institute

² Graduate School of Engineering, Kyoto University

Molecular imaging is an emerging field that aims to develop imaging agents and devices to visualize the specific molecular and cellular information in vivo. Molecular imaging has been identified as a potential method allow for noninvasive disease diagnosis at its earliest stage, better clinical risk stratification, optimal selection of disease therapy, and real-time monitoring of therapeutic response. In USA and Japan, molecular imaging has also been locked as one of the most important near-future high-tech industries.

Noninvasive imaging technologies have become indispensable tools in clinical application such as X-ray computed tomography (CT), ultrasound imaging (US) magnetic resonance imaging (MRI), and positron emission tomography (PET). For successful molecular imaging in clinical, more sensitive and faster imaging systems with higher resolution are still pursued. Recently, several modalities with high-spatial-resolution such as micro-MRI, micro-PET, and CT-PET, PET-MRI hybrid were developed to successfully apply to molecular imaging in small animal models. Such advanced imaging systems could be translated into the clinical context in the near future. Simultaneously, a lot of molecular imaging probes have been developed, and several prototypes used in clinical to improve the diagnosis and treatment of some diseases. However, to widen the application of molecular imaging, it is still urgent necessary to develop various kinds of specific and sensitive imaging probes, especially for earlier detection of diseases including cancer and Alzheimer's disease. Potential molecular imaging targets and advanced strategies for developing imaging probes will also discussed.

C2 アフリカツメガエルを用いた POU - V 因子の機能と転写制御

関係

李 羽中

関西学院大学 理工学研究科 生命科学専攻 木下研究室

現在、胚性幹細胞(ES細胞)を中心に再生医療の研究が急速に進んでいる。哺乳類動物のES細胞は胞胚期の胚盤胞に由来し、細胞の未分化性を維持したまま、培養細胞が可能で、培養条件により様々な分化細胞を生み出すことができる。ここまでの研究により、ES細胞の分化と未分化維持のメカニズムが少しずつ明らかになってきた。哺乳類のヒトやマウスでは、POU(Pit, Oct, Unc)ファミリークラスV転写因子である*Oct-4*が未分化細胞の維持と細胞分化の制御に関わる因子であることがわかってきた。POUファミリーはPOU特異的ドメインとPOUホメオドメインを持つ転写因子である。マウスでは*Oct-4*が発現すると、細胞分化が抑えられ、未分化性が維持されるために、*Oct-4*はマウスの初期化因子と考えられてきた。ところが、最近の研究により、*Oct-4*が*Sox2*、*Nanog*と結合し、300種類以上の遺伝子を誘導し、細胞の分化を制御することが報告され、*Oct-4*が初期発生の細胞分化に積極的に関わることを示唆されている。

アフリカツメガエルではPOUファミリークラスV転写因子(以降、POU-V転写因子と表記)として*Xoact25*、*Xoact60*、*Xoact91*の3分子が存在し、いずれもPOU特異的ドメインとPOUホメオドメインのアミノ酸相同性が高く、3つの因子はともに*Oct-4*のホモログと考えられている。3つのPOU-V転写因子の発現時期は互いに異なることが知られているが、それぞれの因子の機能及び転写相互関係は不明である。

本研究ではPOU因子の機能を明らかにする糸口として、初期発生における3つのPOU因子の転写相互関係を検討した。POU因子の過剰発現及により、胚形成の異常が見られた。マーカー因子の転写も制御された。また、POUの欠損型分子を過剰発現すると、プログラム細胞死が誘導されることも考え合わせる。*Xoact60*を過剰発現させると、原腸胚期に起こる*Xoact25*、*Xoact91*のサイゴティックな遺伝子発現が増加することがわかった。逆に、*Xoact60*の欠損型分子をコ

ードする mRNA を注入すると、*Xoxt25* 及び *Xoxt91* の転写が抑制されることがわかった。これらの結果は、*Xoxt60* が *Xoxt25* や *Xoxt91* の転写誘導に密接に関わることを示唆している。同様にして、野生型及び欠損型分子をコードする mRNA を注入して、*Xoxt25* と *Xoxt91* の転写相互関係を調べた結果、*Xoxt25* と *Xoxt91* は互いに転写を抑制することがわかった。以上の結果は、卵形成期に転写される *Xoxt60* と原腸胚期に新たに転写される *Xoxt25*、*Xoxt91* とが互いに密接な転写制御関係を持っていることを示唆している。ツメガエル POU ファミリー - クラス V 転写因子は、これらの転写制御機構を通して、原腸胚期に起こる多様な細胞分化の方向を制御しているものと思われる。

C3 在 大 白 鼠 梗 塞 心 脏 局 部 缓 释 促 细 胞 血 红 素 改 善 心 功 能

且不引起红细胞增多症

林雪, 藤田 正俊, 金光 尚树, 木村 祐, 丹原 圭一, 高迪 帕马拉提, 长泽 淳, 池田 义, 田畑 靖彦, 米田 正始
京都大学医学研究科 心脏血管外科

我们验证了在大白鼠心梗模型局部缓释促红细胞生成素能在不引起红细胞增多症的情况下提高左室功能。

我们使用 50 只 Sprague-Dawley 大白鼠分成 5 组进行实验。将大白鼠的左前降支冠状动脉结扎, 4 周后对这些慢性心梗模型进行超声评价, 随意分成 5 组。对照组移植 20x20mm 凝胶缓释片, 治疗组分别移植带有不同剂量促红细胞生成素的凝胶缓释片, 共有四组: 0.1U, 1U, 10U, 100U。移植后, 进行心脏超声, 心脏导管, 血液学和组织学评价。超声数据显示 1U 和 10U 的实验组群的心功能明显优于对照组和 0.1U, 100U 治疗组群。心脏导管数据也显示了与超声数据同样的结果。血液学样本显示, 10U 和 100U 治疗组的血液中, 红细胞数据高于正常范围。而 0.1U 和 1U 治疗组与对照组无明显差别, 均处于正常范围。组织学新生血管免疫染色结果显示, 1U 治疗组的 50 μ m 以上的新生血管数量明显高于其他各组。

由以上数据, 我们可以看出 1U 的微量治疗组有最好的改善心功能的效果并且没有引起红细胞增多的副作用。因此, 我们可以做出结论, 使用凝胶缓释的局部移植方法, 可以使用不引起红细胞增多的少量剂量的促红细胞生成素改善梗塞心脏的心功能。这个方法有望于在今后的临床治疗中与 bypass 搭桥手术并用, 以期望于提高搭桥手术后的血管新生, 提高手术成功率。

C4 活体肝移植术后免疫宽容儿童患者外周末梢血淋巴细胞亚型分析

肝移植是治疗终末期肝病的一种治疗方法。近年来，随着肝移植外科技术日臻成熟、新一代免疫抑制药物的不断涌现、肝移植的术后存活率已经有相当大的提高。但是，术后免疫抑制药物长期使用带来的一系列毒副作用，以及停用或是减用免疫抑制药物期间又会引起免疫排斥的再发而不得不重新使用的情况，还有原发肝病 HBV、HCV 的复发都是目前困扰移植学界的难题。因此，术后寻找停用免疫抑制药物的指标对于移植患者来说是十分重要的。免疫宽容就是指停用免疫抑制药物但不引起受体免疫排斥的一种状况。这也是我们临床脏器移植的最终目标。

在动物实验中，参与免疫调节并可能与免疫宽容有关的淋巴细胞有：天然表达 CD4CD25 的免疫调节 T 细胞（CD4 阳性 CD25 强阳性，即 CD4⁺CD25^{high+}），NKT 细胞，CD8⁺CD28⁻ 细胞， $\gamma\delta$ T 细胞等。现在在京都大学有约 50 例的肝移植患者成功的停用了免疫抑制药物。但是参与肝移植术后具有免疫调节功能的淋巴细胞以及他们的调节机理现在还不清楚。

我们对京都大学附属病院 12 名肝移植术后免疫宽容儿童患者，9 名停用免疫抑制药物失败患者以及年龄一致的 24 名健康儿童患者的末梢外周淋巴细胞亚型进行了分析。首先使用比重分离法分离患者和正常儿童的末梢淋巴细胞。然后，用标识抗体来标记各种淋巴细胞亚型，例如 CD3 T 细胞，CD19 B 细胞，CD56⁺ NK 细胞，CD4⁺ T 细胞，CD8⁺ T 细胞，CD4⁺CD25⁺ 细胞，CD4⁺CD25^{high+} 细胞，TCR $\alpha\beta$ T 细胞，TCR $\gamma\delta$ T 细胞，V δ 1 T 细胞，V δ 2 T 细胞，V α 24⁺V β 11⁺ NKT 细胞。最后，我们通过流式细胞仪来分析患者外周血中淋巴细胞亚型的比例。

与正常对照组相比，参与免疫调节的细胞：调节性 T 细胞（CD4 阳性 CD25 强阳性 T 细胞），V δ 1 T 细胞，B 细胞在免疫宽容患者中有增高，两者比较有显著性差异。然而在免疫宽容患者中 NK 细胞和 NKT 细胞比正常对照组要低。值得我们重视的是，在停用免疫抑制药物失败患者中，调节性 T 细胞（CD4 阳性 CD25 强阳性 T 细胞）比免疫宽容患者中的调节性 T 细胞要低，两者比较有显著性差异。这可能是与免疫抑制药物对调节性 T 细胞有抑制作用有关。

分析肝移植术后免疫宽容患者外周末梢血淋巴细胞亚型有助于我们研究参与免疫调节机能相关的细胞类型，并指导我们进一步对它们在免疫耐受的作用机理进行研究。使我们能找出停用免疫抑制药物的指标，进行细胞治疗，并最终在移植术后诱导免疫宽容有十分重要的意义。

C5 ナンキョウに含まれている1'-acetoxychavicol acetateの ガン細胞増殖抑制効果のメカニズムについて

徐 聖輝¹⁾、湯浅 (小島) 明子¹⁾、東 秀紀²⁾、湯浅 勲¹⁾

¹⁾ 大阪市大院・生活科学・栄養機能科学、²⁾ 大阪市大院・工・
生体機能工学

【目的】我々はすでに、東南アジア原産のナンキョウに含まれる (1'S)-1'-acetoxychavicol acetate ((S)-ACA) の抗ガン作用メカニズムとして、細胞内グルタチオン(GSH)量の減少、さらに caspase-3 活性の亢進によってアポトーシス細胞死が誘導されることを報告している。ACA は合成可能であるため、本研究では光学異性体である(S)-ACA および(R)-ACA を用いて、ガン細胞増殖抑制効果とその作用メカニズムについて検討した。

【方法】ガン細胞として EATC (Ehrlich ascites tumor cells) を用いて、細胞数、細胞生存率、細胞内 GSH 量、細胞内 H₂O₂ 量、p27^{kip1} タンパク質、細胞周期を測定した。

【結果】ガン細胞の生存率および細胞増殖能は、(S)-ACA、(R)-ACA とも添加濃度に依存して有意に低下した。また、その効果は(R)-ACA の方が顕著であった。(S)-ACA および(R)-ACA は、細胞内 GSH 量を有意に低下させたが、細胞内 H₂O₂ 量を有意に増加させた。細胞増殖抑制メカニズムを調べるために細胞周期を測定したところ、(S)-ACA は G1 期から S 期への進行を阻止したが、(R)-ACA は G2/M 期で停止させた。さらに、細胞周期の調節因子である p27^{kip1} タンパク質の挙動は、(S)-ACA では低リン酸化状態を維持していたが、(R)-ACA では p27^{kip1} タンパク質を高リン酸化させた。

【考察】(S)-ACA および(R)-ACA には、ガン細胞増殖抑制効果を有することが明らかとなった。しかし、これらの作用メカニズムは異なることが示唆された。

C6 疼痛発症にかかわる末梢でのグルタミン酸とオピオイドの相互作用

金幼虹、上崎善規

大阪大学大学院歯学研究科歯学薬理系 (統合機能口腔学)

「緒言および目的」

グルタミン酸は侵害受容線維に高濃度存在し、痛覚伝導路第一次中継核では痛覚情報に関わる伝達物質として働いている。

本研究では、侵害受容線維末梢端でのグルタミン酸の役割を明らかにするため、侵害受容線維末梢端からのグルタミン酸遊離の有無、ならびにグルタミン酸末梢投与に伴う逃避反応と痛覚伝導路第一次中継核での c-Fos 陽性ニューロン発現について検討した。これらの変動に対するオピオイド末梢投与の影響を検討した。

「実験方法」

1. 興奮性アミノ酸遊離

SD 系雄性ラット(300 g 前後)を使用し、灌流実験はウレタンを 1g/kg で腹腔内投与し、プローブを後肢足蹠皮下に挿入し、リンゲル液を 15 μ l/分の流速で灌流した。灌流液はフラクションコレクターを用い氷冷下 20 分毎に 300 μ l 採取した。

2. アミノ酸測定方法

灌流液中のアミノ酸の量は、HPLC - 蛍光検出器 (o-phthalaldehyde 法) により測定した。

分析条件はカラム C18ODS (4.6mm x 150mm)を用い、移動相は pH 6 のリン酸緩衝液と 27% メタノールと 10 mM EDTA を使用した。

3. カプサイシン前処置

カプサイシンを 1 日目 (30mg/kg)、2 日目 (50mg/kg)、3 日目 (70mg/kg) 頸部皮下に投与し、投与開始 4 日目に灌流実験を行った。

4. 疼痛行動

疼痛行動は、プランターテストを用い測定した。薬物投与側(左側後肢)対照側(右側後肢)を交互に熱刺激し左右の逃避潜時を調べた。1 測定あたり熱刺激を 4 回繰り返し(1 分間隔) 平均値を求めた。

5. 組織化学 (c-Fos 染色)

ラット左側後肢、足蹠皮下に薬物を 50 μ l 投与した。2 時間後 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定し、L4-L6 を摘出、厚さ 60 μ m の切片を作成した。c-Fos 染色は、抗体を ABC 法により行った。

「実験結果」

1. 坐骨神経に電気刺激と足蹠に熱刺激にしたがってラット後肢足蹠皮下灌流液へのグルタミン酸遊離が認められた。

2. ラットの足蹠に 1% カプサイシン塗布しますと、皮下組織へのグルタミン酸遊離が増加した。

しかし、カプサイシン前処置されたラットはカプサイシンを塗布しますと、グルタミン酸遊離増加は見られなかった。

3. モルヒネ (10mg/kg) を静脈内に投与したあとでカプサイシンのクリームを塗るとグルタミン酸のリリースを引き起こしなかった。さらに、ナ

ロキソン(5mg/kg)を投与し、モルヒネを投与した場合はグルタミン酸のリリースを引き起こした。

4. モルヒネ(10^{-5} M)を皮下に投与して、次にカプサイシン・クリームを塗るとグルタミン酸のリリースを引き起こしなかった。だが、ナロキソン(10^{-5} M)とモルヒネ(10^{-5} M)を同時に皮下に投与して、カプサイシンのクリームを塗るとグルタミン酸のリリースを引き起こした。

5. モルヒネ(10mg/kg)とナロキソン(5mg/kg)を単独で投与すると、15分からラットの逃避潜時が変化しなかった。グルタミン酸(100mM/50ul)を単独で投与すると、15分からラットの逃避潜時が下がった；モルヒネとグルタミン酸を同時に投与すると、15分からラットの逃避潜時がグルタミン酸ラットより上がった；ナロキソンとモルヒネとグルタミン酸を同時に投与すると、15分からラットの逃避潜時がモルヒネとグルタミン酸ラットより下がった。

6. グルタミン酸を単独で投与した後 c-Fos 陽性ニューロン数は有意に増加した；グルタミン酸とモルヒネを同時に投与した後 c-Fos 陽性ニューロン数はカプサイシンラットにより減少した；カプサイシンとナロキソンとモルヒネを同時に投与した後 c-Fos 陽性ニューロン数はグルタミン酸とモルヒネラットにより増加した。L5 の III/IV c-Fos 陽性ニューロン数はいずれも変化しなかった。

「結論と考察」

1、侵害刺激に伴い侵害受容線維末梢端からグルタミン酸が放出された。
2、モルヒネを全身投与や末梢に投与すると、モルヒネはカプサイシンによる増やされたグルタミン酸量が抑制された。モルヒネの抑制効果にはナロキソンで拮抗された。

4、グルタミン酸末梢投与による痛覚過敏反応は、モルヒネ末梢投与により抑制された。モルヒネの抑制作用は、ナロキシソンの併用投与により拮抗された。

5、グルタミン酸とモルヒネを同時に末梢投与すると c-Fos 陽性ニューロン数は減少した。モルヒネの抑制効果は、ナロキシソンの併用投与により拮抗された。

以上の結果からみると、侵害刺激により侵害受容線維末梢端から放出される興奮性アミノ酸は、侵害受容線維末梢端に存在するグルタミン酸受容体を介し痛みの増強を行っている；このグルタミン酸の痛覚増強作用は、末梢オピオイド受容体を介しオピオイドにより調節を受けることが明らかになった。

C7 FluorVivo システムにより腫瘍の in vivo イメージングの応用

叢 雅琳 (インターメディカル)、Bruce Peters (INDEC)

Biosystems)、
楊萌 (AntiCancer Incorporated)

抄録

蛍光タンパクは、これまで目に見えなかった生物の現象を目に見えるようにし、生物学に革命的变化をもたらした。即ち、蛍光タンパクは腫瘍細胞の動き、浸潤、転移や血管新生などのような生きた動物の体内での癌の重要な側面を目で見ることを可能にした。多様な蛍光タンパクは *in vivo* で成育する癌細胞の色による識別を可能にし、また癌細胞と宿主細胞の相互作用をリアル・タイムで観察することができる。今回アメリカ INDEC 社製の FluorVivo システムにより、*in vivo* における癌の発生や進行及び転移などの応用について紹介します。