様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 24 年 4 月 30 日

群馬大学生体調節研究所長　殿

所属機関名　浜松大学
職名　　教授
研究代表者　最上秀夫
勤務先所在地　〒431－2102

電話番号 053-428-7796
ファックス番号 053-428-2900
E-メール hmogami@hamamatsu-u.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

（課題番号　10012　　）

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	膵島移植超急性期における膵島破壊シグナルの検討
2. 共同研究目的	膵島移植直後の膵β細胞を含む膵島機能喪失の原因の解明を細胞から個体レベルで行う
3. 共同研究期間	平成23年4月1日　～　平成24年3月31日

4. 共同研究組織

氏　　名	年齢	所属部局等	職名等	役 割 分 担
（研究代表者） 最上秀夫	53	健康栄養学科	教授	研究・立案遂行
（分担研究者） 田中祐司	55	防衛医科大学	教授	動物実験
吉田理恵	30	防衛医科大学	大学院生	バイオイメージング実験・遺伝子工学的実験

5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	細胞調節	氏名	小島　至

※　次の6，7，8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6，7，8の項目全体では1頁に収めて下さい。

（課題番号　10012　　）

6. 共同研究計画

申請者らは膵β細胞に発現する環境センサイオンチャネルである TRPM2 が責任シグナルの一つであり、全血暴露時に血小板をはじめとした血小板凝集及び血液凝固反応がその TRPM2 活性化のトリガーとなると考えている。そこで、TRPM2 チャネルが責任シグナルかどうかの検証を TRPM2 阻害薬や TRPM2 ノックダウン細胞を用いて活性酸素種または全血暴露時の膵島細胞死を指標にリアルタイムイメージング法にて行う。

・全血に暴露された膵β細胞死に惹起されるシグナルを単一細胞レベルで検出する。㋐アポトーシスに関連する活性酸素（ROS）など酸化ストレスにより惹起される TRPM2 を介した Ca^{2+}、NO シグナルそして caspase 活性化や㋑β細胞膜上にフォスファチジルセリンが表出してくるか、リアルタイムイメージングにてモニターするする。血小板との関連を明らかにするために、血小板の少ない platelet poor plasma （PRP）に暴露された時の膵β細胞に惹起されるシグナルとの違いも検討する。

・同様に上記のパラメータ変化を、インスリン産生細胞群で作成した偽膵島及び単離膵島を用いて in vitro 実験にて明らかにする。また、生化学的にも DNA の fragmentation や caspase の活性化を確認し、短時間でアポトーシスが惹起されていることを証明する。最終的には、血管内へ偽膵島及び単離膵島を注入し、血管内での変化を観察する。

7. 共同研究の成果

インスリン産生細胞（INS-1 細胞）に発現する TRPM2 チャネルノックダウン安定細胞株（KD-INS）を作成してその全血またはフィブリノーゲンに対するカルシウム応答を観察した。KD-INS の電気生理学的検討より、TRPM2 チャネルの内因性リガンドである ADPRibose にはほとんど反応しなかったが、電位依存性 Ca チャネルは保存されていた。KD-INS 細胞では温度依存的カルシウム応答がみられなかった。TRPM2 チャネルの調節因子の一つである過酸化水素（H2O2）に対するカルシウム応答も著明に減弱していた。KD-INS 細胞は TRPM2 のチャネル活性はほとんど抑制されていた。この KD-INS 細胞に全血を投与するとカルシウム応答は減弱していた。更に、フィブリン-ゲンに対するカルシウム応答も減弱していた。上記結果より血液成分の接触が TRPM2 を介して INS-1 細胞に対するカルシウム応答を惹起している可能性が高いと考えられた。現在、その結果として細胞死の惹起する惹起するどうかを検討中である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

（本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。）

1) Surface-retained tPA is essential for effective fibrinolysis on vascular endothelial cells. Suzuki Y, Yasui H, Brzoska T, Mogami H, Urano T. Blood 118:3182-3185, 2011

2) In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall.Rybaltowski M, Suzuki Y, Mogami H, Chlebinska I, Brzoska T, Tanaka A, Banno F, Miyata T, Urano T. Pflugers Arch. 461:623-33, 2011