

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 常葉大学・大学院 健康科学研究科
 職名 教授
 研究代表者 最上秀夫
 勤務先所在地 〒431-2102
 浜松市北区都田 1230
 電話番号 053-428-7796
 ファックス番号 053-428-7796
 E-メール hmogami@hm.tokoha-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	プロジェクト名: (1)「代謝疾患ゲノム研究プロジェクト」、 (○で表示) ○(2)「代謝シグナル機能研究プロジェクト」 (3) その他、((1)と(2)のいずれにも関連し区分できない場合等) 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24年4月1日 ~ 平成25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
(申請代表者) 最上秀夫 (分担研究者)	最上秀夫	53	健康科学研究科	教授	研究立案・遂行
田中祐司	田中祐司	55	防衛医科大学	教授	動物実験
吉田理恵	吉田理恵	30	防衛医科大学	大学院生	バイオイメーjing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	
		教授			

※ 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。

6. 共同研究計画

7. 共同研究の内容

インスリン投与を必要とする、特に1型糖尿病患者にとって膵島移植は臨床的に非常に魅力的な方法であるが、その目的を達成するのは、様々な側面から困難であることがわかってきている。その最重要課題の一つは、膵島移植後に起こる超急性期の炎症反応 (instant blood-mediated inflammatory reaction; IBMIR) による膵島機能の喪失を防止することである。本研究の目的は、超急性期における IBMIR のトリガーとなる 1) 門脈内血液凝固反応を介した血管内膵島破壊シグナルの解析と 2) 遺伝子工学的手法を用いて膵β細胞、膵ラ氏島、個体レベルで膵島の破壊防止策及び膵島移植前処理法の基礎的検討を昨年度より行っている。本年度も引き続き上記内容にて研究継続予定である。

※ 承認が必要となる以下の実験等を本学で実施する予定がある場合は、○印でお示し下さい。

() 遺伝子組換え実験 (○) 動物実験 () RI実験 () 倫理委員会審査 () その他()

7. 共同研究の成果

これまでに「膵島移植時に全血暴露時、血小板をはじめとした血小板凝集及び血液凝固反応により、膵・細胞に発現する温度感受性及び活性酸素感受性の環境センサイオンチャネルである TRPM2 チャネルが活性化し、TRPM2 チャネルを介したカルシウム(Ca)反応が膵島細胞死の責任シグナルの一つとなる。」という作業仮説を基に以下の実験結果を得ている。ラットインスリン産生細胞(INS-1)に発現する TRPM2 チャネルノックダウン安定細胞株(KD-INS)を作製した。全血、多血小板血漿(PRP)、フィブリノーゲン(FBG)に対する Ca 応答及び全血、多血小板血漿(PRP)により誘発される INS-1 細胞死を観察した。KD-INS 細胞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 ADP Ribose にはほとんど反応しなかったが、電位依存性 Ca チャネル機能は保存されていた。KD-INS 細胞を用いて全血、PRP、FBGに対するKD-INS細胞のCa応答及び全血、PRPにより誘発されるINS-1細胞死を観察した。INS-1細胞においてCa応答は、全血、PRP及びFBGによって誘発された。このCa応答は、インテグリン阻害ペプチドやTRPM2チャネルの非特異的阻害薬2-APBによって阻害された。KD-INS細胞では、全血、PRP、FBGに対するCa応答は減弱していた。TRPM2チャネルを介したカルシウム(Ca)反応が膵島細胞死の責任シグナルの一つとなるどうか細胞イメージング法により検証した。多血小板血漿(PRP)により誘発される細胞死(赤)はKD-INS細胞ではほとんど惹起されず、INS細胞では多数の細胞で観察された。PRPを投与すると偽膵島の中心部の細胞死(赤)が観察された。KD-INSでは中心部の細胞死はほとんど惹起されなかった。また、H2O2投与による細胞死は偽膵島周辺部より観察されることより、フィブリン網形成に与るPRPによる凝固反応を介した細胞死は、化学シグナルに基づく細胞死をよりも力学的応答に基づく細胞死が引き起こされることを示唆している。研究テーマである「膵島移植をモデル系とした機械-化学応答細胞死」をイメージング技術を用いて明らかにすることができた。結論として、膵島が血液と接触し、血液凝固因子フィブリノーゲン及びフィブリン網形成により膵・細胞TRPM2チャネルが活性化され、TRPM2チャネル介したカルシウム応答が細胞死を惹起して膵島破壊の一因となっていることが示唆された(論文準備中)。

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) Ni Hou, Hideo Mogami, Chisato Kubota-Murata, Meng Sun, Toshiyuki Takeuchi1, Seiji Torii Preferential Release of Newly Synthesized Insulin Assessed by a Multi-Label Reporter System Using Pancreatic β-Cell Line MIN6 PLOSone 7: e47921 (2012)
- 2) Tomasz Brzoska, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Hideto Sano, and Tetsumei Urano. Binding of thrombin-activated platelets to a fibrin scaffold through $\alpha_{11b}\beta_3$ evokes phosphatidylserine exposure on their cell surface. PLOSone8: e55466 (2012)