

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 23 年 4 月 28 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 浜松医科大学
 職名 准教授
 研究代表者 最上 秀夫
 勤務先所在地 〒431-3192
 静岡県浜松市東区半田山1-20-1
 電話番号 053-435-2249
 ファックス番号 053-435-7020
 Eメール hmogami@hama-med.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	臍島移植超急性期における臍島破壊シグナルの検討			
2. 共同研究目的	臍島移植直後の臍β細胞を含む臍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 22 年 4 月 1 日 ~ 平成 23 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	52	生理学第二	准教授	研究立案・遂行
(分担研究者) ヨハン・メディナ	35	豊橋技術科学大学 電気・電子工学	特別研究員	遺伝子工学的実験 バイオイメージング
田中祐司	54	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	細胞調節教授	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。

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。 $\textcircled{1}$ 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 $\textcircled{2}$ 膵 β 細胞膜上にfosfaffatidylserine 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。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

膵島移植細胞死に関しては、アポトーシス及びネクローシスの両者が混在しており、細胞膜リン脂質 fosfaffatidylserine (PS) の細胞外膜への表出は最終的には両者で認められるため、細胞死の指標として用いることが可能であった。 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質(YC)を安定発現させたインスリン産生細胞(YC-INS-1 細胞)に、alexa568 で標識された PS 特異的結合タンパク、アネキシン(568-ANX)含んだヒト全血または platelet rich plasma を 37°C で投与すると、INS-1 細胞は細胞内カルシウム振動を伴いながら 60 分程度で 568-ANX にて標識され、細胞外膜への PS 表出する細胞の増加が見られた。血管内にても偽ラ氏島を形成させた YC-INS-1 は前投与した 568-ANX にて標識され、PS 表出が観察された。568-ANX 標識による蛍光強度は経時的に増加し、また偽ラ氏島内部まで蛍光標識されることが判明した。上記結果より血液成分の接触が細胞死を惹起させていることが判明した。また、TRPM2 の非特異的阻害剤である 2-APB を用いるとカルシウム反応が阻害されることより TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入に基づく機序が関与することが示唆された。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

Rybaltowski, Miroslaw; Suzuki, Yuko; Mogami, Hideo; Chlebinska, Iwona; Brzoska, Tomasz; Tanaka, Aki; Banno, Fumiaki; Miyata, Toshiyuki; Urano, Tetsumei

I

n vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall

Pflüger Archives-Eur J Physiol(in press)