

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590104

研究課題名（和文）酸化ストレス感受性チャネル TRPM2 活性化による心臓の虚血 - 再灌流障害の増悪機構

研究課題名（英文）Aggravation mechanism of cardiac ischemia-reperfusion injury through oxidative stress-sensitive channel TRPM2

研究代表者

清水 俊一 (SHIMIZU SHUNICHI)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：60196516

研究成果の概要（和文）：Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2)は、酸化ストレスにより活性化される非選択的陽イオンチャネルであり、好中球や心筋細胞に発現が認められている。本研究は、酸化ストレスや炎症反応が関わっている心臓の虚血再灌流障害に TRPM2 が関与しているかどうか検討した。野生型(WT)および TRPM2 欠損(KO)マウスの左冠動脈を結紮・開放することにより心臓の虚血再灌流モデルを作製した。その結果、虚血再灌流による心筋壊死は WT マウスと比較して KO マウスでは抑制されていた。一方、虚血のみによる心筋壊死は WT マウスと KO マウスで差が認められなかった。また、虚血再灌流による心機能低下も KO マウスで抑制された。さらに、再灌流領域における好中球の浸潤が、KO マウスで抑制されていた。次に、摘出心臓の虚血再灌流障害モデルを作製し、多形核白血球(PMNs)の導入を行ったところ、KO マウス由来の PMNs を導入しても心筋壊死は軽度であったが、WT マウス由来の PMNs を導入すると著しい心筋壊死の促進が認められた。そこで、WT マウス由来の PMNs に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)を添加したところ、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められ、この上昇は好中球の血管内皮細胞への粘着に関わっていた。以上の結果から、TRPM2 は心臓の虚血再灌流障害の進展に関与していることが明らかとなった。この機構には、再灌流時に好中球の TRPM2 が活性化され、その結果、好中球の血管内皮細胞への粘着亢進による心臓への遊走が関与していると思われる。

研究成果の概要（英文）：**Aims.** Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) is a Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel activated by oxidative stress, and is expressed in neutrophils and cardiomyocytes. This study examined whether TRPM2 contributes to myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury, in which acute inflammation with oxidative stress is closely involved. **Methods and Results.** Wild-type (*Trpm2*<sup>+/+</sup>) and *Trpm2* knockout (*Trpm2*<sup>-/-</sup>) mice were exposed to I/R by ligation of the left coronary artery. Myocardial infarction following I/R but not ischemia alone was reduced in *Trpm2*<sup>-/-</sup> mice compared to *Trpm2*<sup>+/+</sup> mice, and cardiac contractile function was also improved in *Trpm2*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, neutrophil accumulation in the reperfused area was lowered in *Trpm2*<sup>-/-</sup> mice. When *Trpm2*<sup>+/+</sup> or *Trpm2*<sup>-/-</sup> polymorphonuclear leukocytes (PMNs) were administered to the *Trpm2*<sup>-/-</sup> heart *ex vivo* through perfusate or *in vivo* by intravenous injection, *Trpm2*<sup>+/+</sup> PMNs induced more severe cardiac injury following I/R compared with *Trpm2*<sup>-/-</sup> PMNs. In *Trpm2*<sup>+/+</sup> but not in *Trpm2*<sup>-/-</sup> PMNs, the combination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) resulted in enhancement of the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> and their adhesion to endothelial cells. **Conclusions.** These findings indicate that TRPM2 is implicated in the

development of myocardial reperfusion injury. Accumulation of neutrophils in the heart triggered by activation of neutrophil TRPM2 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> is likely to have a crucial role in myocardial I/R injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：虚血再灌流障害、TRPM2、カルシウムイオン、好中球

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における TRP 関連タンパクは、1980年代後半からクローニングされ、現在までに大きく C、M、V などに分類される多くの分子種により構成されていることが明らかにされている。これらの分子種は、長くその分子実態が不明であった膜電位に依存しない Ca<sup>2+</sup>透過性のイオンチャネル群を形成しており、受容体作動性 Ca<sup>2+</sup>流入、温度センサー、侵害受容など様々な機能を担っていることが示されている。TRPM2 は、2002 年に我々が及び他のグループから相次いで形質膜に存在し、活性酸素種の 1 つである過酸化水素により活性化されることが報告された Ca<sup>2+</sup>透過性チャネルである。TRPM2 チャネルの活性化機構については多くの研究がなされ、過酸化水素刺激により NAD<sup>+</sup>を代謝する酵素である poly-ADP ribose polymerase を介して産生される ADP-ribose が C 末端側に存在する Mut-T モチーフに結合することにより活性化されると考えられている。また、TRPM2 の活性化にはチロシン残基のリン酸化が重要であるとの報告もある。我々も、チロシンキナーゼの 1 つである Jaks の阻害剤が過酸化水素刺激による TRPM2 の活性化を抑制することを見出している。

TRPM2 は、発見当初から最近まで Ca<sup>2+</sup>オーバーロードを惹起し細胞死を誘発させる細胞死誘導チャネルであると考えられていた。一方、我々は単球を過酸化水素で刺激するとケモカインである interleukin-8 (IL-8) の産生が亢進され、更に、TRPM2 欠損マウスを用いることにより、TRPM2 の活性化が潰瘍性大腸炎の増悪に関わっていることを明らかにした。この報告は、生体内において TRPM2 の活性化が細胞死だけではなく、炎症性疾患の増悪に関わっていることを明

らかにした世界初の報告となった。心臓の虚血 - 再灌流障害は、好中球の浸潤、活性酸素、炎症性サイトカインなどの関与が明らかにされており、この過程には TRPM2 の活性化が関与している可能性が高いが報告はなかった。我々は、マウスの冠動脈を結紮することによる心筋梗塞モデルを確立し、予備的実験で TRPM2 欠損マウスでは野生型マウスに比較して心筋壊死が強く抑制されることを見出した。

### 2. 研究の目的

TRPM2 (melastatin like transient receptor potential 2) は、細胞の形質膜に存在し、酸化ストレスにより活性化され細胞内に Ca<sup>2+</sup>を流入させるイオンチャネルである。生体内では、好中球や単球などの炎症性細胞に発現しており、TRPM2 チャネルの活性化が様々な炎症性疾患の進展に関与している可能性がある。しかしながら、TRPM2 チャネルの生理的役割については、我々が単球における TRPM2 活性化がケモカインの分泌を促進し、これが潰瘍性大腸炎の進展に関与していることを示した報告が唯一である。心臓の虚血 - 再灌流障害は、遮断された冠動脈の血流を再開すると再開前に比べて心筋壊死が拡大する現象である。再灌流障害は、好中球の浸潤、活性酸素の増加、Ca<sup>2+</sup>オーバーロード、ミトコンドリア障害など多くの因子が関与して惹起されることが知られているが不明な点も多い。最近、我々は野生型マウスと TRPM2 欠損マウスに心筋梗塞を誘発させ再灌流後の心筋壊死を比較したところ、TRPM2 欠損マウスでは心筋壊死の抑制が認められた。本研究は、心臓の虚血 - 再灌流障害の進行過程において、“どの細胞の TRPM2” が “どのような刺激” でかつ “どのような機構

で活性化”され “どのような機構”を介して、心筋壊死に関わっているのか明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

**実験動物：**実験には野生型 (WT) マウス (C57BL/6J)及びTRPM2欠損 (KO) マウスを自家繁殖し、雄性マウス (7~9週齢, 体重20~30 g) を使用した。尚、本研究で用いたすべての実験プロトコールは、昭和大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

**麻酔：**実験は、マウスの腹腔内にペントバルビタールを投与し、麻酔下で行った。

**In vivo虚血再灌流モデル：**気道を切開し人工呼吸器に接続し、開胸して心臓を露出させた。虚血は、左冠動脈(LCA)を結紮することにより作製し、再灌流は結紮を解除することにより行った。好中球を導入する場合には、尾静脈より投与した。

**心機能の評価：**心機能として心拍数、左心室終末拡張期圧、および+と-dP/dtを測定した。心尖部から24ゲージの針を左心室内に差込んだ後、直ちに引き抜き、カテーテルトランスデューサーを挿入して測定した。

**梗塞サイズの解析：**再灌流終了後、LCAを再結紮し、腹部大静脈から生理食塩水に溶解した2%エバンスブルー溶液1 mlを投与した。心臓を摘出し、短軸に平行な厚さ約1 mmの心筋スライスを4切片作製し、1%tri-tetrazolium clolide (TTC) 溶液中で、インキュベートすることにより染色した。得られた画像について、エバンスブルー染色部位 (正常領域)、TTC染色部位 (虚血領域) およびTTC非染色部位 (梗塞領域) を測定した。

**骨髄由来PMNs分画の分離：**骨髄からのPMNsの調製は、大腿骨より骨髄細胞を採取し、percoll (GE Healthcare) による密度勾配遠心法により行った。

**腹腔浸潤PMNsの採取：**マウスの腹腔に1%グリコーゲン投与し、4時間後に腹腔中に浸潤したPMNsを採取した。

**摘出心臓の虚血再灌流モデル：**マウスより心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流装置に装着して逆行性灌流を行った。虚血は、LCAを結紮することにより作製し、再灌流は結紮を解除することにより行った。PMNsを導入する場合には、腹腔より回収したPMNsを導入した。梗塞サイズは、灌流終了時に1%エバンスブルー溶液0.5 mlを導入した以外はin vivo実験と同様に行った。

**細胞内Ca<sup>2+</sup>の測定：**ガラスプレートに、細胞を接着させるためにCell Tak溶液をコートした。

そのガラスプレートを、24ウェルプレート中の各ウェルに2枚ずつセットした。1x10<sup>5</sup>個の細胞をCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬であるFura-2 AM含有溶液 (10% FBS含有RPMI1640) で懸濁し、ガラスプレートをセットした各ウェルに加え、インキュベーションした。インキュベーション後、HEPES buffer saline (HBS) でガラス上の細胞を洗浄し、顕微鏡上の灌流チャンバーにセットした。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は340nmと380 nmの励起光を交互に照射し、生じた蛍光 (510 nm) 強度を蛍光画像解析システムMete Flour (日本ローパー) によって測定し、380 nmの励起光による蛍光強度に対する340 nmの励起光による蛍光強度の比 (340 nm/380nm) で示した。

**MAC-1及びLFA-1発現変化の測定：**骨髄より単離したPMNsに、種々刺激剤を添加してインキュベーションした。PMNsを洗浄後、FITC-Gr-1抗体、E-MAC-1抗体あるいはPE-LFA-1抗体を添加した。反応後、フローサイトメーターにて各発現量を測定した。

**好中球の接着：**好中球の接着能は、予め培養したウシ大動脈内皮細胞への接着により評価した。骨髄より調製したPMNsをCelltracker (CMFDA) で蛍光ラベルした。このラベルしたPMNsを各刺激剤で刺激後、ウシ大動脈内皮細胞と共にインキュベーションした。これを蛍光顕微鏡にて測定し、接着細胞数を測定した。

**好中球の遊走能の測定：**骨髄より調製したPMNsを実験に用いた。遊走能の測定はトランスウェルを用いて行った。下層に刺激剤添加し、上室に1.0 x 10<sup>6</sup>個の好中球懸濁液を加え、2時間37°Cにて反応させた。その後、下室に移動したPMNsを回収し、その数を測定した。

**Total RNAの抽出及び定量的RT-PCR：**Total RNAの抽出は、トライゾール試薬 (Invitrogen) を用いて行った。得られたTotal RNAは、逆転写酵素 (Reverta Ace, Toyobo) を用いて、cDNAに変換した。このcDNAをテンプレートとして、TaqMan Fast Universal PCR Master MixによりリアルタイムPCRを行った。なお、TaqMan probeにはβ-actin、TRPM2を使用し、解析はΔCt法により行い、サンプル間のcDNA量の差はβ-actinで補正した。

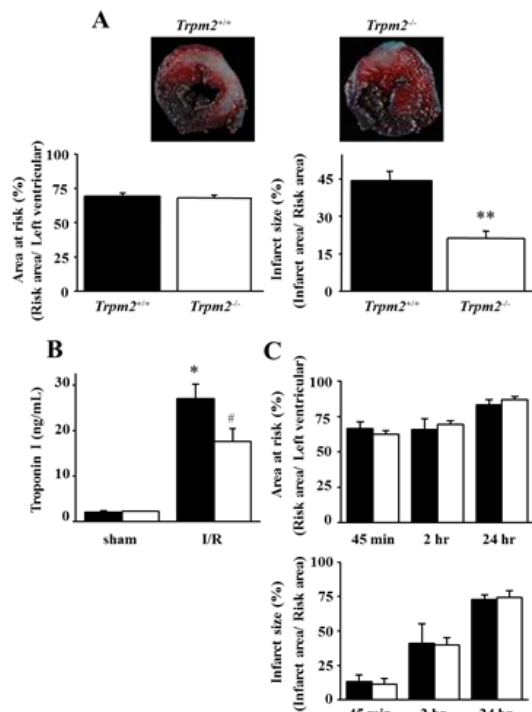
**免疫組織化学染色：**虚血再灌流後の心臓を摘出し、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定した。次に、心臓を虚血領域の1 mm下で切り取りパラフィン包埋し、厚さ4 μmの組織切片を作製した。この切片をAnti-Human Myeloperoxidase抗体を用いて染色した。

**統計処理：**データは、平均値±標準誤差で表した。統計処理は多重比較として

Bonferroni/Dunn法を用い、2群間比較には unpaired student's t-testを用いた。危険率0.05未満を有意とした。

#### 4. 研究成果

##### TRPM2欠損による心臓の虚血再灌流障害への影響



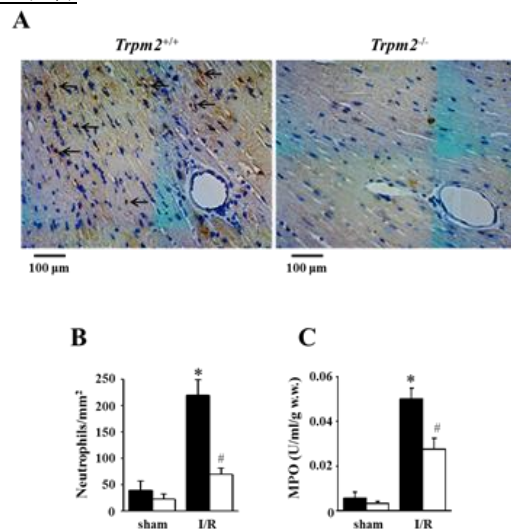
**Figure 1.** Reduction of reperfusion injury in *Trpm2<sup>-/-</sup>* mice. In A, mice were subjected to 45 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion. Typical photographs show the myocardium after TTC staining. Values show the mean ± SEM for 13-15 mice. \*\**P* < 0.01 vs. *Trpm2<sup>+/+</sup>* group. In B, plasma levels of troponin I were determined after 45 minutes of ischemia followed by 2 hours of reperfusion in *Trpm2<sup>+/+</sup>* (■) and *Trpm2<sup>-/-</sup>* (□) mice. Values show the mean ± SEM for 5-9 mice. \**P* < 0.05 vs. sham-operated *Trpm2<sup>+/+</sup>* group, #*P* < 0.05 vs. *Trpm2<sup>+/+</sup>* I/R group. In C, mice were subjected to 45 minutes, 2, and 24 hours of ischemia without reperfusion in *Trpm2<sup>+/+</sup>* (■) and *Trpm2<sup>-/-</sup>* (□) mice. Values show the mean ± SEM of 5-6 mice.

WT マウスおよび KO マウスを用いて虚血再灌流モデルを作製し、再灌流後の心筋壊死を比較した。その結果、WT マウスでは虚血領域の約 45%の領域で壊死が認められたのに対し、KO マウスでは約 20%と強く抑制されていた(Fig. 1A)。また、心筋逸脱酵素である troponin-I の血漿中活性も WT マウスでの上昇に比べて KO マウスでは軽度であった(Fig. 1B)。さらに、心機能を測定したところ、虚血再灌流を施行すると、WT マウスの+dP/dt が 7,307±501 mmHg/s から 4,703±332 mmHg/s

へと低下した。これに対し、KO マウスにおいても 7,331±704 mmHg/s から 5,745±536 mmHg/s へと低下したが、その低下は WT マウスより軽度であった。以上のことから、TRPM2 が心臓の虚血再灌流障害の増悪に関与していることが明らかとなった。

そこで、TRPM2 が虚血による心筋壊死に関わっているのか、あるいは再灌流による心筋壊死に関わっているのか明らかにするために、虚血のみによる心筋壊死について検討した。その結果、WT マウスと KO マウス共に虚血時間に依存した心筋壊死の増大が認められ、どの虚血条件においても両者に違いは認められなかった(Fig. 1C)。以上の結果より、TRPM2 チャネルの活性化は再灌流障害の進展に関与することが明らかとなった。

##### 心臓への好中球の浸潤におけるTRPM2欠損の影響



**Figure 2.** Reduction of neutrophil accumulation in reperfused myocardium in *Trpm2<sup>-/-</sup>* mice. *Trpm2<sup>+/+</sup>* (■) and *Trpm2<sup>-/-</sup>* (□) mice were subjected to 45 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion (A-C). In A, neutrophils were identified in sections using the anti-MPO antibody. Arrows show neutrophil. In B, neutrophils were counted. Values show the mean ± SEM of 3-5 mice. \**P* < 0.05 vs. sham-operated *Trpm2<sup>+/+</sup>* group, #*P* < 0.05 vs. *Trpm2<sup>+/+</sup>* I/R group. In C, MPO activity in the reperfused myocardium was measured. Values show the mean ± SEM of 7-10 mice. \**P* < 0.05 vs. sham-operated *Trpm2<sup>+/+</sup>* group, #*P* < 0.05 vs. *Trpm2<sup>+/+</sup>* I/R group.

虚血再灌流障害の進展には、好中球の心臓への浸潤による炎症の関与が知られている。そこで、再灌流 24 時間後の心臓への好中球の浸潤量を、抗ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 抗体を用いた免疫組織染色により検討した。その結果、KO マウスでは WT マウスと比較して好中球の浸潤が強く抑制され

ていた。次に、心臓に浸潤した好中球の量を、MPO 活性により測定ところ、虚血再灌流により WT マウスの心臓における MPO 活性は高値を示したのに対し、KO マウスでは抑制されていた。以上の結果より、TRPM2 欠損による再灌流障害の軽減は、好中球の浸潤量の低下が関与していることが示された。

#### 再灌流障害における好中球の TRPM2 活性化の関与

TRPM2は、心筋細胞及び好中球に発現していることが報告されている。マウスにおける TRPM2の発現分布を測定したところ、好中球に高い発現が認められ、心臓には低い発現が認められた。そこで、好中球と心筋のどちらの TRPM2が再灌流障害に関与しているのかを明らかにするために、摘出心臓の虚血再灌流モデルへの好中球の導入実験を行った。その結果、WTマウス由来好中球を導入することにより、WT及びKOマウス心臓の心筋壊死は、いずれも約5%程度から約40%に上昇した。一方、KOマウス由来好中球を導入した場合は、心筋壊死が15%程度であり、WTマウス由来好中球を投与した場合より低レベルであった。以上より、心筋壊死が好中球における TRPM2 に依存しており、好中球の TRPM2 が再灌流障害の進展に関わっていると考えられた。また、KOマウス由来の好中球を投与した場合、WTマウスの心臓は、KOマウスの心臓と比較して壊死が大きい傾向であった。この結果は、心臓側の TRPM2 も再灌流障害の進展に一部関与していることを推察させた。

次に、摘出心臓で認められた好中球の TRPM2 活性化による心筋壊死の増大が、*in vivo* の虚血再灌流モデルにおいても認められるかについて検討した。虚血再灌流を施行する動物は KO マウスを用い、予め WT あるいは KO マウス由来の好中球を静注し、虚血再灌流を施行した。その結果、摘出心臓の場合と一致して WT マウス由来の好中球を投与することにより、有意な壊死の増大が認められた。一方、KO マウス由来好中球を投与した群では、壊死の増大は殆ど認められなかった。この結果より、*in vivo* の虚血再灌流モデルにおいても、好中球の TRPM2 が再灌流障害の進展に関与することが確認できた。

#### 好中球における TRPM2 の活性化機構

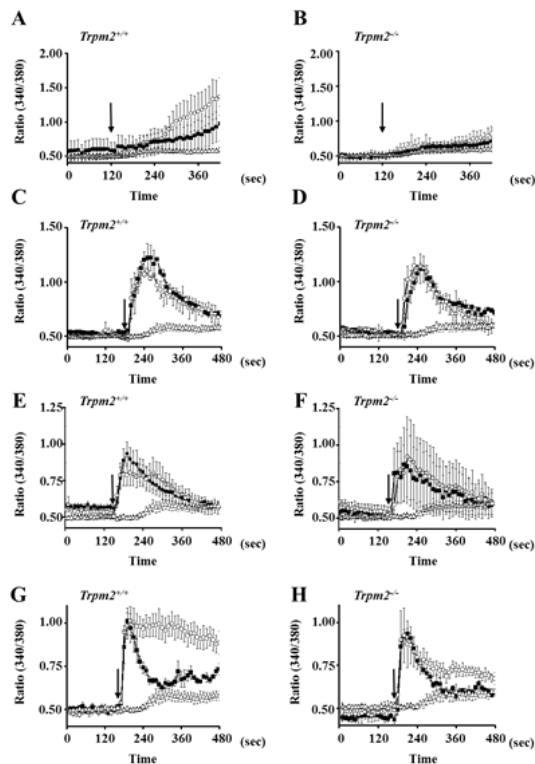
ここまでの検討により、再灌流時に好中球の TRPM2 が活性化され、好中球の浸潤が促進されることが推察された。好中球が生理的応答を示す際には、細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入が重要であることが知られている。TRPM2 が、 $Ca^{2+}$  透過性チャネルであることから、TRPM2 を介した  $Ca^{2+}$  流入が、好中球の生理的応答に関与している可能性を考えた。そこで、まず TRPM2 の活性化物質として知られてい

る過酸化水素を用いて、好中球の  $Ca^{2+}$  応答性について検討した。その結果、500  $\mu M$  以上の高濃度の過酸化水素刺激で細胞内  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇が認められた (Fig. 3A)。しかしながら、このような高濃度の過酸化水素が、虚血再灌流時に発生することは考えられない。そこで、好中球における TRPM2 が、再灌流障害時に遊離される生理活性物質と過酸化水素の相互作用により活性化されるか検討した。生理活性物質には、再灌流時に放出され、好中球の活性化を促す Leukotriene B4 (LTB4)、C5a、Platelet activating factor (PAF) を用いた。過酸化水素は、単独刺激では殆ど反応が認められない 100  $\mu M$  を使用した。LTB4、C5a、PAF を単独で刺激すると、一過性に  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇したが、WT 好中球と KO 好中球の間で差は認められなかった (Fig. 3C-3H)。次に、過酸化水素と LTB4、C5a、あるいは PAF を併用刺激し測定したところ、WT 好中球では LTB4 との併用刺激で持続的な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が認められたが、KO 好中球では認められなかった (Fig. 3C-3H)。これらの結果より、過酸化水素と LTB4 の併用により TRPM2 が活性化されることが強く示唆された。

#### 好中球の TRPM2 活性化による機能発現

TRPM2の活性化を介した  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が、好中球のどのような生理作用に関与しているか検討した。好中球は組織への浸潤過程において、接着分子の発現量あるいは非活性型から活性型への移行を増加させることにより接着し、その後接着に関わる因子を増やし強固な接着を介して浸潤することが知られている。そこで、LTB4と過酸化水素の併用刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が、接着分子の発現量に影響を与えるか検討した。WT好中球に対し、過酸化水素あるいはLTB4を単独で刺激することにより、MAC-1の発現量は、コントロールの約2倍に増加した。また、過酸化水素とLTB4を掛け合わせることで、MAC-1発現はコントロールの約3倍にまで増加した。しかし、どの条件においても、WTとKOマウス由来好中球の間で差は認められなかった。次に、LFA-1の発現を測定したところ、どの刺激においてもLFA-1の発現量に変化は認められなかった。

次に、血管内皮細胞に対する好中球の接着について検討した。WT 好中球に過酸化水素を単独刺激した場合では、コントロールの約 1.5 倍の好中球が接着した。一方、LTB4 の単独刺激では、接着量に変化が認められなかった。これに対し、過酸化水素と LTB4 を併用刺激したところ、好中球の接着量はコントロールの約 3 倍と著しい増加が認められた。一方、KO 好中球は、過酸化水素あるいは LTB4 単独刺激では、WT 好中球と同等であったが、



**Figure 3.**  $\text{Ca}^{2+}$  response to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , C5a, PAF alone and in combination in  $\text{Trpm2}^{+/+}$  and  $\text{Trpm2}^{-/-}$  PMNs. A, C, E, and G depict  $\text{Trpm2}^{+/+}$  PMNs. B, D, F, and H depict  $\text{Trpm2}^{-/-}$  PMNs. Arrows indicate the starting point that applied each substance. (A, B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 100 ( $\Delta$ ), 500 ( $\blacksquare$ ) or 1,000  $\mu\text{M}$  ( $\circ$ ) was applied to each PMN. (C, D)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ,  $\Delta$ ) alone, C5a (1  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$ ) alone, and in combination ( $\circ$ ) were applied to each PMN. (E, F)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ,  $\Delta$ ) alone, PAF (1  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$ ) alone, and in combination ( $\circ$ ) were applied to each PMN. (G, H)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ,  $\Delta$ ),  $\text{LTB}_4$  (1 nM,  $\blacksquare$ ) alone, and in combination ( $\circ$ ) were applied to each PMN. Values show the mean  $\pm$  SEM of 85-105 cells.

過酸化水素と  $\text{LTB}_4$  を併用刺激した場合は、著しい抑制が認められた。次に、好中球の遊走能をと、 $\text{LTB}_4$  の単独刺激により、濃度依存的な遊走量の増加が認められた。一方、過酸化水素はどの濃度を使用しても、遊走の促進は認められなかった。また、 $\text{LTB}_4$  と過酸化水素の併用刺激による遊走を測定したが、WT と KO マウスに差は認められなかった。以上の結果より、好中球における TRPM2 は、過酸化水素と  $\text{LTB}_4$  の併用刺激により活性化され、内皮細胞への接着を強固にする働きを持つことが認められた。

#### まとめ

TRPM2 は心臓の虚血再灌流障害の進展に関与していることが明らかとなった。この機構には、再灌流時に PMN の TRPM2 が活性化され、その結果 PMN の血管内皮細胞への粘着亢進による心臓への遊走に関与していると思われる。

本研究の成果は、好中球における TRPM2

活性化が炎症を増悪させる可能性をはじめて示したのと同時に、TRPM2 をターゲットとした虚血再灌流障害治療薬の開発が可能であることを示している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

清水 俊一 活性酸素感受性  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性チャネル TRPM2 の活性化による炎症反応の増幅 生化学、83、1100-1103、2011(査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

①廣井理人、山本伸一郎、輪島輝明、根来孝治、木内祐二、森泰生、清水俊一 炎症性疾患の発症と進展における TRPM2 の役割 第 5 回 TRP チャネル研究会 2009 年 6 月 5 日 (岡崎)

②廣井理人、輪島輝明、香西大輔、根来孝治、木内祐二、森泰生、清水俊一 マウス心臓の虚血一再灌流の進展における TRPM2 チャネルの関与 第 83 回 日本薬理学会年会 2010 年 3 月(大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

清水 俊一 (SHIMIZU SHUNICHI)  
昭和大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60196516

##### (2) 研究分担者

石井 正和 (ISHII MASAKAZU)  
昭和大学・薬学部・准教授  
研究者番号：30307061

##### (3) 連携研究者

根来 孝治 (NEGORO TAKAHARU)  
昭和大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70218270