

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670590

研究課題名(和文) 蛋白導入ドメインとRCANペプチドを用いた新規免疫抑制剤の開発

研究課題名(英文) A novel NFAT inhibitory peptide (RCAN-11R) provides immunosuppression.

研究代表者

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50378733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制剤の一つであるカルシニューリンインヒビター(CNI)は糖尿病などの副作用が報告されている。以前、申請者はCNIよりも糖尿病の副作用の少ないNFAT抑制ペプチド(11R-VIVIT)を開発したが、有効濃度の5-50倍の濃度を使用すると細胞毒性が認められた。今回の研究目的は、11R-VIVITよりも副作用の少ない免疫抑制剤(RCAN-11R)を開発することであった。RCAN-11RはIL-2の分泌を抑制し、細胞毒性も11R-VIVITよりも低いことを確認し、臍島移植モデルを用いて免疫抑制剤としての効果を確認した。以上よりRCAN-11Rは副作用の少ない免疫抑制剤であることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Calcineurin inhibitors have been used for the transplant therapy. However, the inhibition of calcineurin outside the immune system has a number of side effects such as diabetes. We previously developed a cell-permeable inhibitor of NFAT (nuclear factor of activated T cells). This peptide (11R-VIVIT) did not affect insulin secretion. However, our recent study showed that 11R-VIVIT affected cell viability when used higher concentration because of VIVIT sequence. The aim of this study is to develop another safer NFAT inhibitor (RCAN-11R) without cell viability less toxic than calcineurin inhibitors. The peptide could interfere selectively with calcineurin-NFAT interaction without affecting calcineurin phosphatase activity similar to 11R-VIVIT. RCAN-11R did not affected cell viability when used as same concentration as toxic concentration of 11R-VIVIT. Therefore, RCAN-11R could be useful as a therapeutic agent that is less toxic than current drugs or 11R-VIVIT.

研究分野：細胞移植、再生医療

キーワード：免疫抑制剤 副作用 糖尿病 臍島移植 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

移植療法の問題点のひとつとして免疫抑制剤の副作用がある。FK506 などのカルシニューリンインヒビターの開発により、移植医療は飛躍的に進歩したが、糖尿病などの数多くの副作用が報告されている。その原因の一つに、カルシニューリンがコントロールする経路の多様性があり、カルシニューリンインヒビターがこれらの全てをブロックしてしまうためであると考えられている。そのため、免疫機構に関係あるカルシニューリン-NFAT 経路のみをブロックする薬剤を開発すれば、より副作用の少ない免疫抑制剤としての使用が可能となる。

研究代表者は以前に、「蛋白導入法」という技術を用いて NFAT 抑制ペプチド (11R-VIVIT) を作成し、このペプチドがマウス膵島移植モデルにおいて免疫抑制効果を示し、さらに、カルシニューリンインヒビターでみられるインスリン分泌抑制の副作用を持たないことも証明した。このペプチドは研究試薬として Calbiochem®より販売されており、多くの研究者に利用されている。しかしながら、このペプチドは有効濃度の 5-50 倍の濃度を使用すると細胞毒性が認められることがわかっており、臨床での使用は困難である。

2. 研究の目的

今回の研究期間中に、11R-VIVIT と同様にカルシニューリン-NFAT 経路のみをブロックし、かつ 11R-VIVIT よりも細胞毒性の低い薬剤を開発することが研究の目的である。

3. 研究の方法

ペプチドの選択

これまでいくつかの内因性カルシニューリン抑制物質が同定されているが、そのうちのひとつである RCAN 蛋白 (protein family of regulators of calcineurin) に着目し、そのア

ミノ酸配列の一部を抑制ペプチドとして用いた。

ペプチドの細胞内への導入法として、「蛋白導入法」という新しい技術を用いた。通常 600Da 以上の蛋白はサイズが大きいため、細胞膜を通過することはできないが、ショウジョウバエの転写因子である Antennapedia、HIV ウイルスの転写因子である TAT、ヘルペスウイルスの骨格蛋白である VP22 などのごく一部の蛋白が、細胞膜を通過し細胞内に入ることが報告されている。さらに、これらの蛋白の細胞膜通過に必要な十分なアミノ酸配列 (蛋白導入配列 Protein Transduction Domain) が同定され、この配列を利用した蛋白導入法が確立された。ウイルスベクターを使うことなく目的の蛋白やペプチドを細胞内に導入できる「蛋白導入法」は、欧米で臨床応用化を目指した研究が進められている。

本研究では、RCAN 蛋白のアミノ酸配列の一部と、蛋白導入ドメインと融合させた RCAN-11R を用いた。

新規免疫抑制剤の in vitro での効果判定

RCAN-11R ペプチドがカルシニューリン-NFAT 経路のみをブロックするのかどうかを調べるため、NFAT および NF- κ B の核内移行の確認を行った。NFAT reporter plasmid および NF- κ B reporter plasmid を用いて実験した。またリンパ球を RCAN-11R ペプチドで処理したのち、ionomycin 刺激後の IL-2 分泌を測定した。

新規免疫抑制剤の in vivo での効果判定

RCAN-11R ペプチドの免疫抑制剤としての効果を膵島移植モデルで確認した。C57BL/6 マウスと BALB/c マウスをそれぞれドナー、レシピエントとし、RCAN-11R 投与の有無により、移植膵島の生着率および生着期間を観察した。レシピエントマウスは、ストレプトゾトシンにて糖尿病にした。移植部位は、組

組織学的検索を考慮し腎皮膜下に行った。移植マウスの空腹時血糖、糖負荷試験、組織学的検索などを行い、免疫抑制剤の評価を行った。

新規免疫抑制剤の副作用の判定

11R-VIVITは有効濃度の5-50倍の濃度を使用すると細胞毒性が認められることがわかっており、臨床での使用は困難である。RCAN-11R ペプチドにおける細胞毒性の検討を行った。有効濃度の数十-数千倍のRCAN-11Rを線維芽細胞、肝細胞、膵島細胞などの単離細胞や、cell line 数種類に投与し、細胞毒性の有無をPI染色、Annexin V染色などを用いて判定した。

カルシニューリンインヒビターの副作用のひとつとして糖尿病があるが、これは主に膵ベータ細胞からのインスリンの分泌能を低下させることが原因だといわれている。RCAN-11Rにこの作用があるかどうかをin vitro およびin vivo で確認した。in vitro の実験として、膵ベータ細胞の cell line であるβTC6を用い、培養液中に分泌されるインスリンがRCAN-11R投与の有無により変化するかどうかを観察した。つづいて単離したマウス膵島を用いて同様の実験を行った。in vivo の実験として、移植マウスに関してインスリン分泌に影響があるかどうかを観察するため、同系移植(BALB/c→BALB/cもしくはC57BL/6→C57BL/6)を行い、膵島の生着を確認後、ペプチド投与の有無によるインスリン分泌能の変化を観察した。さらに、C57BL/6→BALB/c移植モデルにおいても同様の検査を行った。

また、上記移植マウスに関して定期的に血液検査を行い、肝・腎機能など全身への影響を確認した。

4. 研究成果

新規免疫抑制剤のin vitroでの効果判定

RCAN-11R ペプチドがカルシニューリン

-NFAT 経路をブロックするかどうか NFAT reporter plasmid を用いて調べたところ、NFATの核内移行が抑制されることが確認された。また、NF-κBの核内移行の確認をNF-κB reporter plasmid を用いて行ったがNF-κBの核内移行は抑制されなかった。以上のことより、RCAN-11R ペプチドがカルシニューリン-NFAT経路のみをブロックことが推察された。

RCAN-11R ペプチドによるIL-2分泌抑制効果を確認したところ、IL-2の分泌はコントロールの1/5まで抑制されていた。

新規免疫抑制剤のin vivoでの効果判定

RCAN-11R ペプチドの免疫抑制剤としての効果を膵島移植モデルで確認した。C57BL/6マウスとBALB/cマウスをそれぞれドナー、レシピエントとして膵島移植を行ったが、コントロール群では20日以内に全例で血糖の再上昇がみられ、拒絶反応が確認された。一方で、RCAN-11R投与した群では、30日以上生着した例が全移植例の50%以上認められ、両群間で有意差を認めた。以上のことより、RCAN-11Rは膵島移植モデルマウスにおいて免疫抑制剤としての効果を認めた。

新規免疫抑制剤の副作用の判定

RCAN-11R ペプチドにおける細胞毒性の検討を行った。有効濃度の数十-数千倍のRCAN-11Rを線維芽細胞、肝細胞、膵島細胞などの単離細胞や、cell line 数種類に投与したが、細胞毒性は確認されなかった。

カルシニューリンインヒビターの副作用のひとつとして糖尿病があるが、これは主に膵ベータ細胞からのインスリンの分泌能を低下させることが原因だといわれている。RCAN-11Rにこの作用があるかどうかを確認した。膵ベータ細胞の cell line であるβTC6を用い、培養液中に分泌されるインスリンがRCAN-11R投与の有無により変化するかどうかを観察したが、免疫抑制剤として有効な濃

度の 100 倍の濃度を投与した場合でも、インスリン分泌の抑制は認められなかった。単離したマウス臍島を用いて同様の実験を行ったが、インスリン分泌抑制は認められなかった。さらに、移植マウスに関してインスリン分泌に影響があるかどうかを観察したが、同系移植 (BALB/c →BALB/c もしくは C57BL/6 →C57BL/6) の場合も、C57BL/6→BALB/c 移植モデルにおいてもインスリン分泌能の変化は認められなかった。

以上より RCAN-11R はカルシニューリンインヒビターや 11R-VIVIT よりも副作用の少ない免疫抑制剤であることが証明された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1: Miyamoto Y, Noguchi H (5 人中 3 番目), et al. Spheroid Formation and Evaluation of Hepatic Cells in a Three-Dimensional Culture Device. Cell Med. 2015, 8(1-2):47-56. 査読有 doi: 10.3727/215517915X689056.
- 2: Noguchi H (8 人中 1 番目), et al. Islet culture/preservation before islet transplantation. Cell Med. 2015, 8(1-2):25-29. 査読有 doi: 10.3727/215517915X689047.
- 3: Miyagi-Shiohira C, Noguchi H (8 人中 8 番目), et al. Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem cells. Cell Med. 2015, 8(1-2):3-7. 査読有 doi: 10.3727/215517915X689100.
- 4: Saitoh I, Noguchi H (14 人中 4 番目), et al. Choice of Feeders Is Important When First Establishing iPSCs Derived From Primarily Cultured Human Deciduous Tooth Dental Pulp Cells. Cell Med. 2015, 8(1-2):9-23. 査読有 doi: 10.3727/215517915X689038.
- 5: Miyamoto Y, Noguchi H (5 人中 3 番目), et al. Three-Dimensional *in vitro* Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device. Cell Med.

- 2015, 7(2):67-74. 査読有 doi:
<http://dx.doi.org/10.3727/215517914X685187>
- 6: Tsugata T, Noguchi H (9 人中 9 番目), et al. Potential factors for the differentiation of ES/iPS cells into insulin-producing cells. Cell Med. 2015, 7(2):83-93. 査読有 doi:
<http://dx.doi.org/10.3727/215517914X685178>
 - 7: Noguchi H, Saitoh I, Tsugata T, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y. Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection. Cell Death Differ. 2015 Jan;22(1):145-55. 査読有 doi: 10.1038/cdd.2014.132.
 - 8: Yukawa H, Noguchi H (18 人中 7 番目), et al. Novel positively charged nanoparticle labeling for in vivo imaging of adipose tissue-derived stem cells. PLoS One. 2014 Nov 3;9(11):e110142. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0110142.
 - 9: Kuise T, Noguchi H (10 人中 2 番目), et al. Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. Biomed Eng Online. 2014 May 27;13:64. 査読有 doi: 10.1186/1475-925X-13-64.
 - 10: Shimoda M, Noguchi H (12 人中 3 番目), et al. A new method for generating insulin-secreting cells from human pancreatic epithelial cells after islet isolation transformed by NeuroD1. Hum Gene Ther Methods. 2014 Jun;25(3):206-19. 査読有 doi: 10.1089/hgtb.2013.122.
 - 11: Noguchi H. Islet Purification for Clinical Islet Transplantation. Current Tissue Engineering. 2014; 3: 34-38. 査読有 doi: 10.2174/2211542002666131230234825

6. 研究組織

(1)研究代表者

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)

琉球大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授

研究者番号 : 50378733