

令和元年6月24日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10436

研究課題名(和文)p38MAPK抑制ペプチドの開発と膵島移植への応用

研究課題名(英文)Development and usage of p38MAPK inhibitory peptides

研究代表者

来間 清人(Kurima, Kiyoto)

琉球大学・医学部・委託非常勤講師

研究者番号：10755713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回われわれはp38蛋白内にある一部のアミノ配列(MKKなどの蛋白質と結合する部位)を用いたp38抑制ペプチドを合成した。p38抑制ペプチドはMKKとの結合を阻害し、p38の活性化を抑制した。p38抑制ペプチドの膵島移植への効果を確認するため、マウス及びブタ膵島の培養時にp38Iを添加した。培養後の膵島の残存率はコントロールペプチドを投与した時に比べ、有意に高いことが証明された。また、糖尿病マウスへ移植後の血糖改善率はp38I投与群のほうが有意に高いことが証明された。これらのデータよりp38I投与により膵島のアポトーシスが抑制され、膵島移植成績を向上させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p38MAPKの抑制薬は、研究試薬として様々な実験に使用されるのみならず、膵島の抗アポトーシスペプチドとして臨床応用化することも期待できる。また、この方法が確立されれば、他の抑制剤も同様の手法によって作成が可能となるため、本研究は新規性が高く、独創的で画期的な研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Here we synthesized peptides to inhibit p38, which were derived from the sites on p38 that mediate binding to proteins such as MAPK kinases (MKKs). The p38 inhibitory peptides (p38I) significantly inhibited the activation of p38. To evaluate the effects of p38I, mouse and porcine islets were incubated with 10 micromole p38I. After culture, the numbers of islets in the p38I-treated cultures were significantly higher compared with those of cultures treated with control peptide. After islet transplantation, blood glucose levels reached the normoglycemic range in 58.3% and 0% of diabetic mice treated with p38I or control peptide, respectively. These data suggest that p38I inhibited islet apoptosis and improved islet function.

研究分野：細胞移植・膵島移植

キーワード：p38MAPK アポトーシス 蛋白導入システム ペプチド 膵島移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p38 MAPK はセリン/スレオニンキナーゼで MAPK ファミリーの主要なメンバーであり、p38 シグナル伝達経路における中心的な分子である。p38 シグナル伝達経路は、トポイソメラーゼ II やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、浸透圧ショック、微小管分解や紫外線のような多種にわたるストレスにより急速に活性化される。この p38 経路は 以前からストレスおよび免疫応答と関連したものとされていたが、最近になってアポトーシスおよび分化過程に関与していることが明らかとなっている。膵島移植に関しても、膵島分離中および膵島移植直後に p38MAPK は活性化され、膵島細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。

本研究の独創的な点は、蛋白導入法 (Protein Transduction System) というウイルスが不要で安全性の高い手法を用いて p38MAPK 抑制ペプチドを作成することであり、そのペプチドを細胞内へ導入することによりアポトーシスを防ぐ点にあった。従来のウイルスベクターを用いた遺伝子導入はそれ自体に細胞毒性があり、安全性を考えると臨床応用への道が遠い。安全性の高い「蛋白導入法」を用いて p38MAPK の活性化を抑制するという手法は、臨床応用が期待できる。今回用いた「蛋白導入法」は、欧米でも注目されている手法であり、アメリカでは皮膚癌などに対する臨床試験がはじまっている (Personal Communication)。現在まで、この導入法の副作用は報告されておらず、臨床応用を考えた場合、非常に優れた手段となり得る。

2. 研究の目的

本研究は「蛋白導入システム」を用いて、p38MAPK の抑制剤を開発することを目的とした。はじめに、p38MAPK 抑制に重要なアミノ酸配列を同定し、p38MAPK 抑制ペプチドを合成した。複数のペプチドより有効性・安全性の高いペプチドを選択し、マウス (小動物) の膵島細胞を用いて p38MAPK 抑制剤の効果判定を行った。さらに前臨床試験としてブタ (大動物) の膵島細胞と用いて p38MAPK 抑制剤の効果判定を行った。

3. 研究の方法

p38MAPK 抑制ペプチドの開発

p38MAPK のアミノ酸配列のうち、同蛋白の活性化に関与する 10-30 アミノ酸配列を数箇所選択し、蛋白導入システムで最も導入効率が良いと考えられているポリアルギニンを付加したペプチドを複数個作製した。各ペプチドを膵ベータ細胞株である MIN6 細胞に投与し、p38MAPK の活性化を最も抑制するペプチドを決定した。p38MAPK の活性化には anisomycin を用い、Western blot にて判定を行った。同時に JNK や ERK の活性化も測定し、他の kinase に対する影響を確認した。これらの判定により、p38MAPK を効果的に、かつ選択的に抑制するペプチドを選び出した。

p38MAPK 抑制剤投与によるマウス膵島細胞への効果確認 (次ページ図)

マウスの膵島細胞を用いて p38MAPK 抑制剤の効果を判定した。現在までに、膵保存、膵島分離、分離後の培養、および移植直後の非特異的炎症反応により、膵島細胞内にストレス関連キナーゼである p38MAPK が誘導され、アポトーシスがおこることが報告されており、これが、生着率低下に大きく関わっているものと考えられている。はじめにマウスの膵島を分離後、p38MAPK 抑制ペプチドを投与し抗アポトーシス効果を判定した。

また、同ペプチドを膵臓保存時および膵島分離時の溶液にも添加し、アポトーシス抑制効果を判定した。判定は、p38MAPK の活性度の比較、islet equivalents の変化、アポトーシス細胞の割合、インスリン分泌率の変化などで判定した。同時に、蛋白導入法の安全性についても検討した。

次に p38MAPK 抑制ペプチドで処理した膵島を動物に移植し、移植効果を確認した。ドナーと同種同型マウスをストレプトゾトシンにて糖尿病にし、p38MAPK 抑制ペプチド処理した膵島細胞の移植を行った。空腹時血糖、糖負荷試験、組織学的検索などを行い、移植細胞の評価を行った。同時に p38MAPK 抑制ペプチドの *in vivo* における安全性を確認した。

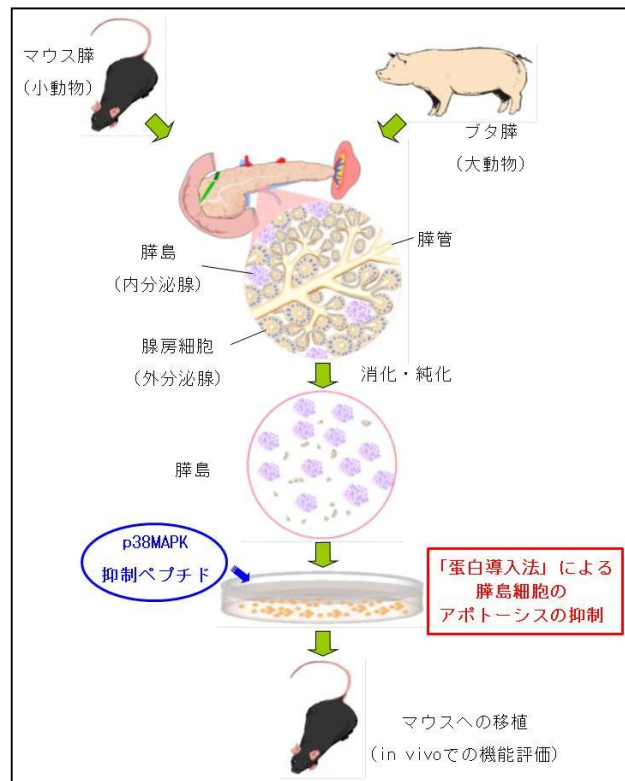


図 . p38MAPK 抑制剤の膵島細胞への効果

p38MAPK 抑制剤投与によるブタ膵島細胞への効果確認 (前臨床試験：上図)

前臨床試験としてブタ (大動物) の膵臓を用いて膵島分離を行い、マウスの試験と同じ検討を行った。臨床応用化に向けて、有効性・安全性を大動物で確認した。

4 . 研究成果

p38MAPK 抑制ペプチドの開発

p38MAPK のアミノ酸配列のうち、同蛋白の活性化に關与する 10-30 アミノ酸配列を 3 箇所選択し、蛋白導入システムで最も導入効率が良いと考えられているポリアルギニンを付加したペプチドを複数個作製した。各ペプチドを膵β細胞株である MIN6 細胞に投与し、p38MAPK の活性化を判定したところ 1 つのペプチド (p38I) が有意に活性化を抑制することが確認された。このペプチドは JNK や ERK の活性化には影響がなく、p38MAPK の活性を特異的に抑制するものと考えられた。

p38MAPK 抑制剤投与によるマウス膵島細胞への効果確認

マウスの膵島細胞を用いて p38I による p38MAPK 抑制効果を判定した。膵保存、膵島分離、分離後の培養、および移植直後の非特異的炎症反応により、膵島細胞内にストレス関連キナーゼである p38MAPK が誘導され、アポトーシスがおこることが本研究でも確認されたが、膵島分離後に p38I を投与すると、膵島分離後のアポトーシスが抑制された。

また、同ペプチドを膵臓保存時および膵島分離時の溶液にも添加し、アポトーシス抑制効果を判定したところ、培養液投与時と同様、抗アポトーシス効果を確認することができ、膵島残存量やインスリン分泌率の向上が認められた。

次に p38I で処理した膵島を動物に移植し、移植効果を確認した。ドナーと同種同型マウスをストレプトゾトシンにて糖尿病にし、p38MAPK 抑制ペプチド処理した膵島細胞の移植を行った。

血糖改善率は p38I 投与群において有意に改善率が高いことが明らかとなった。糖負荷試験でも p38I 投与群のほうが有意に血糖値が低く、組織学的検索でも膵島生着量は p38I 投与群のほうが有意に生着率が高いことが確認された。

上記 in vitro、in vivo 試験において、p38I の副作用は確認されず、安全性が高いペプチドであると考えられた。

p38MAPK 抑制剤投与によるブタ膵島細胞への効果確認（前臨床試験）

前臨床試験としてブタ（大動物）の膵臓を用いて膵島分離を行った。p38I を膵臓保存時および膵島分離時の溶液に添加し、アポトーシス抑制効果を判定したところ、マウスの実験と同様、抗アポトーシス効果を確認することができ、膵島残存量やインスリン分泌率の向上が認められた。またブタ膵島を糖尿病マウスへ移植し、移植効果を確認した。血糖改善率は p38I 投与群において有意に改善率が高いことが明らかとなった。糖負荷試験でも p38I 投与群のほうが有意に血糖値が低く、組織学的検索でも膵島生着量は p38I 投与群のほうが有意に生着率が高いことが確認された。

上記 in vitro、in vivo 試験において、p38I の副作用は確認されず、安全性が高いペプチドであると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔査読ありの雑誌論文〕(計 32件)(下記抜粋)

- 1: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Shapiro AMJ, Kin T. Induction of Expandable Tissue-Specific Progenitor Cells from Human Pancreatic Tissue through Transient Expression of Defined Factors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019 Jan 29;13:243-252. doi: 10.1016/j.omtm.2019.01.011.
- 2: Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Primary Cultured Cells and Subcultured Cells Using Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2019 Jan 10;2019:7274057. doi: 10.1155/2019/7274057.
- 3: Soda M, Saitoh I, Murakami T, Inada E, Iwase Y, Noguchi H, Shibasaki S, Kurosawa M, Sawami T, Terunuma M, Kubota N, Terao Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M. Repeated human deciduous tooth-derived dental pulp cell reprogramming factor transfection yields multipotent intermediate cells with enhanced iPS cell formation capability. *Sci Rep.* 2019 Feb 6;9(1):1490. doi: 10.1038/s41598-018-37291-2.
- 4: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kitamura S, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M. A Novel Preservation Solution Containing a JNK Inhibitory Peptide Efficiently Improves Islet Yield for Porcine Islet Isolation. *Transplantation.* 2019 Feb;103(2):344-352. doi: 10.1097/TP.0000000000002555.
- 5: Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease. *World J Stem Cells.* 2018 Nov 26;10(11):146-159. doi: 10.4252/wjsc.v10.i11.146.
- 6: Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I,

- Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. A Comparison of Proteins Expressed between Human and Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by a Proteome Analysis through Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 6;19(11). pii: E3497. doi: 10.3390/ijms19113497.
- 7: Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Kitamura S, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. Induction of Expandable Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Aged Mesenchymal Stem Cells by a Synthetic Self-Replicating RNA. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 6;19(11). pii: E3489. doi: 10.3390/ijms19113489.
- 8: Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. A Comparison of the Preservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Using the University of Wisconsin Solution and Hank's Balanced Salt Solution. *Stem Cells Int*. 2018 Sep 6;2018:1625464. doi: 10.1155/2018/1625464.
- 9: Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of the Proteins Secreted by Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2018 Oct;27(10):1469-1494. doi: 10.1177/0963689718795096.
- 10: Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. Characterization of induced tissue-specific stem cells from pancreas by a synthetic self-replicative RNA. *Sci Rep*. 2018 Aug 17;8(1):12341. doi: 10.1038/s41598-018-30784-0.
- 11: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M. Modified cell-permeable JNK inhibitors efficiently prevents islet apoptosis and improves the outcome of islet transplantation. *Sci Rep*. 2018 Jul 23;8(1):11082. doi: 10.1038/s41598-018-29481-9.
- 12: Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Cells Cultured in DMEM 10% FBS and Chemically Defined Medium Using Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 13;19(7). pii: E2042. doi: 10.3390/ijms19072042.
- 13: Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Noguchi H, Omasa T. Atorvastatin Inhibits the HIF1 α -PPAR Axis, Which Is Essential for Maintaining the Function of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Ther*. 2018 Jul 5;26(7):1715-1734. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.06.005.
- 14: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y. Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 21;19(4). pii: E930. doi: 10.3390/ijms19040930.
- 15: Noguchi H, Sugimoto K, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y. RCAN-11R peptide provides immunosuppression for fully mismatched islet allografts in mice. *Sci Rep*. 2017 Jun 8;7(1):3043. doi:10.1038/s41598-017-02934-3.

16: Saitoh I, Sato M, Soda M, Inada E, Iwase Y, Murakami T, Ohshima H, Hayasaki H, Noguchi H. Tissue-Specific Stem Cells Obtained by Reprogramming of Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse-Derived Pancreatic Cells Confer Insulin Production in Response to Glucose. PLoS One. 2016 Sep 23;11(9):e0163580. doi: 10.1371/journal.pone.0163580.

〔学会発表〕(計 21件)(下記抜粋)

1: Hirofumi Noguchi. Modified Cell-Permeable JNK Inhibitors Efficiently Prevent Islet Apoptosis. The 1st Congress of Asian Pancreas and Islet Transplant Association. 2019/2/22, Seoul, Korea.

2: Hirofumi Noguchi. Cell Therapy at University of the Ryukyus. 18th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR 2016). 2016/9/1, Shanghai, China.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ヒト組織特異的幹/前駆細胞の人工製法

発明者: 野口洋文、潮平知佳、中島義基

権利者: 琉球大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-228996

出願年: 2018年

国内外の別: 国内特許

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 野口洋文

ローマ字氏名: NOGUCHI hirofumi

所属研究機関名: 琉球大学

部局名: 医学(系)研究科(研究院)

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50378733

(2)研究協力者: なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。