

蛋白導入システムによる薬剤開発と膵島移植への応用

野口 洋文^{a,b,*}, 松下 正之^c, 小林 直哉^d, Susan Bonner-Weir^e, 松井 秀樹^c, 田中 紀章^d, 田中 紘一^f, 松本 慎一^g

^a京都大学医学部附属病院 移植外科, ^b日本学術振興会特別研究員 (SPD), ^c岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学, ^d岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学, ^eハーバード大学ジョスリン糖尿病センター, ^f先端医療振興財団先端医療センター, ^g京都大学医学部附属病院 臓器移植医療部

キーワード：蛋白導入システム, 膵島移植, 膵島再生, 免疫抑制剤, 膵島分離技術

はじめに

膵島移植は、アルバータ大学からいわゆる「エドモントンプロトコール」が報告¹⁾されて以来、現在までに少なくとも50施設で500例をこえる患者に実施されている。日本でも我々の施設が2004年の4月に日本初となる膵島移植を行い、2005年4月現在で、生体移植を含め²⁾7例の患者に膵島移植を施行している。いずれも、重症低血糖発作の消失とHbA_{1c}の正常化を認め、非常に良好な成績を取めている。

しかしながら、膵島移植はインスリン離脱までに複数回の移植を必要とするなど改善すべき点が未だ多くあり、膵島移植成績向上のためには基礎研究が非常に重要となる。京都大学膵島移植グループでは、1) 1ドナーからの移植によるインスリン離脱を目指した膵島分離技術の改良、2) 安全性の向上、自己免疫再発

防止を目指した免疫抑制剤の改良・免疫寛容の誘導、3) ドナー不足解消と自己膵島の再生を目指した再生療法の確立、の3つを研究戦略の柱としている。これらの研究の中で、特に中心的に行っているのが「蛋白導入システム (Protein Transduction System)」を用いた研究である。

蛋白導入システム

通常、蛋白やペプチドはサイズが大きいため細胞膜を通過できないが、ごく一部の蛋白が、細胞内へ導入されることが1980年代後半から1990年代前半に報告されていた。ショウジョウバエの転写因子のひとつである Antennapedia, HIV 蛋白のひとつである TAT, ヘルペスウイルス蛋白のひとつである VP22などがそれである。それらの蛋白において、細胞導入に重要な配列が、1990年後半に解明された。この配列は蛋白導入ドメイン (Protein Transduction Domain: PTD) とよばれ、この配列を通常細胞内に導入されない蛋白に融合させることにより、細胞内へ導入できるようになった。これが蛋白導入システムである。現在は、この蛋白導入システムを用いて、ペプチドや

平成17年6月受理

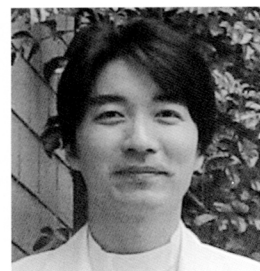
*〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

京都大学医学部附属病院 移植外科

電話：075-751-4699 FAX：075-751-3896

E-mail：noguchih@kuhp.kyoto-u.ac.jp

◆ プロフィール ◆



野口 洋文

平成8年、岡山大学医学部卒、第一外科（現消化器・腫瘍外科）入局。平成10年より小林直哉先生の指導の下、肝細胞移植の研究を行い、Science（共著）、Hum Gene Ther（学位論文）などの論文発表を行う。その後、細胞生理学教室で、松下正之先生の指導の下、免疫抑制剤開発の研究を行い、Nat Medへ発表。平成14年より、ハーバード大学にて、Dr Susan Bonner-Weirの指導の下、膵島再生の研究を行うとともに、Dr. Gordon C. Weirの指導の下、臨床膵島移植に携わる。研究内容をDiabetesなどに発表。平成15年より、京都大学移植外科所属となり、松本慎一先生をチームリーダーとして平成16年、日本初となる心停止ドナーからの膵島移植を実施。平成17年には、世界初となる生体膵島移植を成功させ、Lancetに発表（共著）。上記の研究が評価され、平成16年、日本再生医療学会優秀演題賞、平成17年岡山医学会結城賞、同年、日本肝胆膵外科学会会長賞を受賞。平成17年4月より日本学術振興会特別研究員 (SPD) となる。

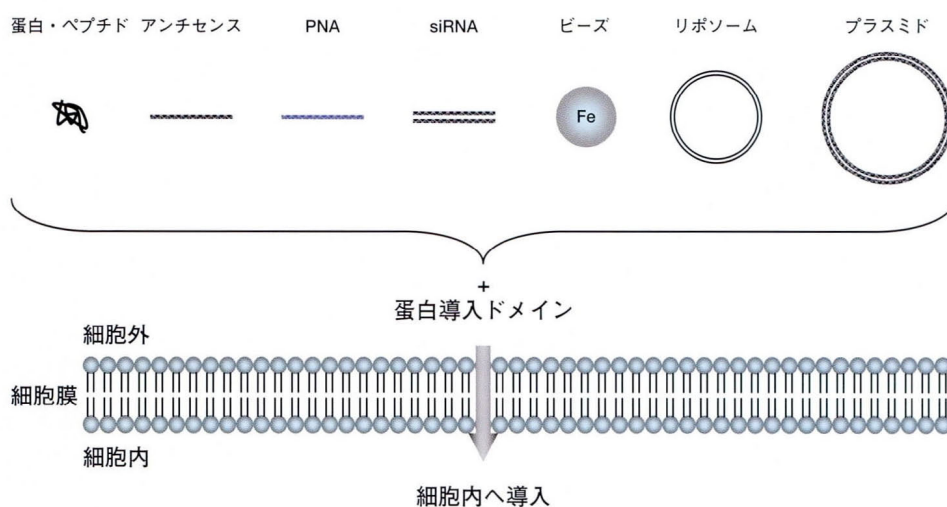


図1 蛋白導入システム

通常細胞内に導入されない蛋白に蛋白導入ドメインを融合させることにより、細胞内へ導入することが可能となる。この蛋白導入システムを用いて、ペプチドや蛋白のみならず、アンチセンスやビーズ、リボソームなど様々な物質を細胞内へ導入できることが報告されている。

蛋白のみならず³⁻¹²⁾、アンチセンスやビーズ、リボソームなど様々な物質を細胞内へ導入した研究が行われている (図1)¹⁰⁾。

蛋白導入システムのメカニズム

蛋白導入システムのメカニズムは、初期の頃はさまざまな報告があったが、最近ではほぼ一定の見解が得られている。蛋白導入ドメインはアルギニンやリジンという陽性電荷を帯びたアミノ酸を多く含む配列を有するため、陰性電荷をおびた細胞表面との接着がしやすい状況にある。電気的な接着の後 macropinocytosis という endocytosis のひとつのメカニズムで細胞内へ導入され、endosome から retrograde transport というシステムで release されることにより、蛋白として機能することが報告されており、われわれの実験でも確認された^{5,13-15)}。

抗アポトーシスペプチド投与による膵島移植成績の向上

膵島移植は、膵管からコラゲナーゼ溶液を注入し、膵臓を消化したのち、膵島細胞を分離し移植するというものであるが、これらのステップで様々なストレスを細胞は受ける。そのため、一部の細胞はアポトーシスに陥り、これが移植成績低下に影響していると考えられている¹⁶⁾。われわれは蛋白導入システムを用い、抗アポトーシスペプチドを作成し、移植前に投与することによる移植成績への効果を調査した。

今回注目した因子は、ストレス時に活性化されることが知られている c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) である。この因子は膵島分離時に活性化されることが報告されており、また糖尿病状態でも酸化ストレスにより、活性化されることがわかっている。われわれは、JNK を特異的に抑制するアミノ酸配列 (JNKI)¹²⁾に、蛋白導入ドメイン (Protein Transduction Domain ; PTD) の中で現在最も導入効率が良いと考えられているポリアルギニン⁴⁾を付加したペプチド (11R-JNKI) を合成した。このペプチドは JNK の活性を抑え、移植成績が向上することが確認された¹¹⁾。

副作用の少ない免疫抑制剤の開発

移植医療で幅広く使われており、膵島移植でも使用されている、FK506や Cyclosporine A などの Calcineurin Inhibitor は、T細胞内で Immunophilin と結合したのち、Calcineurin が NFAT の脱リン酸化を起こすのをブロックする。しかしながら、Calcineurin が NFAT のみならず、他の多くの因子を制御しているため、Calcineurin inhibitor がおさえる NFAT 以外の経路は副作用につながると考えられる。また、Calcineurin inhibitor は Immunophilin と結合するため、この Immunophilin が制御している因子にも影響を与えると考えられる。われわれは、この Calcineurin-NFAT の経路のみをブロックするようなアミノ酸配列 (VIVIT)¹⁷⁾にポリアルギニンを付加したペプチド(11

R-VIVIT) を作成した。

今回開発した11R-VIVIT を用いて，BALB/c をドナー，C3H をレシピエントとする，マウスアロ膵島移植への効果を検討した。無処理のマウス，コントロールペプチドを投与されたマウスでは20日以内に移植膵島が全例拒絶されたのに対し，11R-VIVIT を投与した群では生着の延長がみられた。また，FK506などの Calcineurin Inhibitor は糖尿病原性の副作用が認められるのに対し，11R-VIVIT ではインスリン分泌抑制効果が無く，副作用がより少ないと考えられた⁷⁾。

PDX-1 蛋白導入による膵 β 細胞への分化誘導

膵島分離時に通常移植されない組織内に Stem Cell がいるという報告が現在まで数多くあるが，効率的な分化誘導法はまだ確立されていない。われわれが試みたのは，蛋白導入システムを用いた転写因子の強発現による分化誘導法である。

PDX-1 は，膵発生初期に発現する転写因子であり，それと同時に分化後の β 細胞においてインスリン転写を制御するという，膵内分泌細胞でもっとも重要な転写因子の1つだといえる。PDX-1 をアデノウイルスなどで強発現させることにより，Stem Cell がインスリン産生細胞へ分化することはいくつかの論文で証明されている^{3,18)}。われわれは当初，PDX-1 に蛋白導入ドメインを付加し細胞内へ導入することを計画していた。しかしながら，PDX-1 が Antennapedia 蛋白導入ドメインと非常に類似の配列を保有することに気づいた。そこでわれわれは，PDX-1 蛋白が何も付加することなく細胞内へ導入され，細胞の分化誘導を促進させるかどうか調べた。膵幹細胞と考えられている膵管細胞^{19,20)}に PDX-1 蛋白を投与したところ，PDX-1 は細胞内へ導入され，その細胞はインスリンの mRNA を発現するようになった。また，PDX-1 蛋白の投与により PDX-1 自身の mRNA の発現も増強された。 *pdx-1* 遺伝子はそのプロモータ領域に PDX-1 自身が結合する配列を有し，PDX-1 が結合することにより自らの mRNA を増幅させる作用があることが報告されている²¹⁾。このことは，少量の PDX-1 蛋白が細胞内へ導入されれば，その細胞自身が PDX-1 蛋白を合成し始め，分化誘導を自ら行う可能性があることを示唆している³⁾。

おわりに

蛋白導入システムの膵島移植への応用を示した。現

在のところ，蛋白導入システムの安全性が確立していないこと，蛋白自身の不安定性による導入効率の低下，コスト面など，改善すべき点はまだ数多くある。しかしながら，このような点が改善されれば，蛋白導入システムは今後，臨床の場で一つの治療戦略として使用されるであろう。

文 献

- 1) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV : Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* (2000) **343**, 230-238.
- 2) Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y, Fukuda K, Tsukiyama K, Suzuki H, Kawasaki Y, Shimodaira M, Matsuoka K, Shibata T, Kasai Y, Maekawa T, Shapiro J, Tanaka K : Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet* (2005) **365**, 1642-1644.
- 3) Noguchi H, Kaneto H, Weir GC, Bonner-Weir S : PDX-1 protein containing its own antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells. *Diabetes* (2003) **52**, 1732-1737.
- 4) Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, Li ST, Terada H, Matsui H : A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation. *J Neurosci* (2001) **21**, 6000-6007.
- 5) Matsushita M, Noguchi H, Lu YF, Tomizawa K, Michiue H, Li ST, Hirose K, Bonner-Weir S, Matsui H : Photo-acceleration of protein release from endosome in the protein transduction system. *FEBS Lett* (2004) **572**, 221-226.
- 6) Matsumura T, Takesue M, Westerman KA, Okitsu T, Sakaguchi M, Fukazawa T, Totsugawa T, Noguchi H, Yamamoto S, Stolz DB, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N : Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation* (2004) **77**, 1357-1365.
- 7) Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, Li ST, Kobayashi N, Matsumoto S, Tanaka K, Tanaka N, Matsui H : A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* (2004) **10**, 305-309.
- 8) Watanabe T, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, Totsugawa T, Maruyama M, Matsumura T, Noguchi H, Yamamoto S, Hikida M, Ohmori A, Reth M, Weber A, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N : Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial

- livers. *Transplantation* (2003) **75**, 1873-1880.
- 9) Okitsu T, Kobayashi N, Totsugawa T, Maruyama M, Noguchi H, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Tanaka N : Protein transduction domains enable isolated islets to efficiently internalize the target protein. *Transplant Proc* (2003) **35**, 479.
 - 10) Wadia JS, Dowdy SF : Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol* (2002) **13**, 52-62.
 - 11) Noguchi H, Nakai Y, Matsumoto S, Kawaguchi M, Ueda M, Okitsu T, Iwanaga Y, Yonekawa Y, Nagata H, Minami K, Masui Y, Futaki S, Tanaka K : Cell Permeable Peptide of JNK Inhibitor Prevents Islet Apoptosis Immediately After Isolation and Improves Islet Graft Function. *Am J Transplant* (2005) **5**, 1848-1855.
 - 12) Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF : Cell-permeable peptide inhibitors of JNK : novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* (2001) **50**, 77-82.
 - 13) Noguchi H, Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Yonekawa Y, Nagata H, Matsushita M, Wei FY, Matsui H, Minami K, Masui Y, Futaki S, Tanaka K : PDX-1 protein is internalized by lipid raft-dependent macropinocytosis. *Cell Transplant* (2005) in press.
 - 14) Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF : Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* (2004) **10**, 310-315.
 - 15) Fischer R, Kohler K, Fotin-Mleczek M, Brock R : A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* (2004) **279**, 12625-12635.
 - 16) Abdelli S, Ansite J, Roduit R, Borsello T, Matsumoto I, Sawada T, Allaman-Pillet N, Henry H, Beckmann JS, Hering BJ, Bonny C : Intracellular stress signaling pathways activated during human islet preparation and following acute cytokine exposure. *Diabetes* (2004) **53**, 2815-2823.
 - 17) Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A : Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* (1999) **285**, 2129-2133.
 - 18) Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A : Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* (2000) **6**, 568-572.
 - 19) Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ : In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 7999-8004.
 - 20) Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T : Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* (2003) **52**, 2007-2015.
 - 21) Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D : Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene : PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3 beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* (2000) **20**, 7583-7590.