

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04916

研究課題名(和文)テーラーメイド型細胞分離システムの構築による次世代糖尿病治療の創成

研究課題名(英文) Establishment of next-generation diabetes treatment by construction of tailor-made cell isolation system

研究代表者

後藤 昌史 (Goto, Masafumi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50400453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ドナー膵組織の基質組成に対応し得る“テーラーメイド型膵島分離法”の基盤を構築する事を目的として実施した。その結果、これまで同定されていなかったコラゲナーゼGの特異的対象基質がコラーゲンIV及びVである事を明らかとし、既に同定済みであったコラゲナーゼHの対象基質に関する知見と組み合わせる事により、ドナー種に対応するテーラーメイド型膵島分離法の樹立が可能である事を動物モデルで実証し報告した。中性プロテアーゼに関しても、ラミニンやフィブロネクチンが主要対象基質であり、新規に構築した2つの中性プロテアーゼ(ChNP及びClostripain)それぞれの切断エピトープを特定する事に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、膵島分離用酵素剤を構成する各酵素成分の対象基質を初めて明らかにする事ができた。それにより、これまでの常識である盲目的な酵素量の増加といった姑息的な手法ではなく、脳死ドナーより提供頂く膵組織の基質組成に対応する酵素成分を科学的に至適化するという、時代を先取りするテーラーメイド型膵島分離システムの基盤を構築する事ができた。この研究成果は、質の高い膵島の安定的確保を通じて膵島移植の発展、普及に貢献するものと期待される。また、本研究で基盤を構築したテーラーメイド型細胞分離システムは、膵島移植のみならず様々な再生医療への応用が可能であり、医学的に大きな意義を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to establish the basis of "tailor-made islet isolation method" that can correspond to the extracellular matrix component of donor pancreatic tissues. As a result, it has been clarified that the specific target substrates of collagenase G which have not been identified until now are collagens IV and V, and by combining it with the knowledge about the target substrates of collagenase H which has already been identified by our team, it has been reported that it is possible to establish a tailor-made islet isolation method for specific donor species by using animal models. Regarding the neutral proteases, we have revealed that laminin and fibronectin are the main target matrices, and we succeeded in identifying the cleavage epitopes of each of the two newly constructed neutral proteases (ChNP and Clostripain).

研究分野：移植外科、細胞移植、膵島移植

キーワード：膵島移植 細胞分離酵素 糖尿病 移植医療 再生医療

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵島移植は、安全・簡便・低侵襲であり患者に優しい画期的治療法であるため、今後の糖尿病治療の中心を担っていくと期待されている。しかし、現状においては質の高い十分量の膵島細胞を効果的かつ安定的に得る事が困難であるという致命的課題を有しているため、未だ一般医療に至っていない。

(2) 膵島分離において中心的役割を担う酵素剤として、2種のコラゲナーゼサブタイプ(G & H)と中性プロテアーゼが存在する事が知られている。しかし、現状では提供膵組織に応じて酵素組成比を変更する事は不可能である。言い換えれば、極めて限局されたツールによって、マトリックス組成が全く異なる種々の膵組織から効果的かつ安定的に膵島細胞を回収しなければならないという無理難題を強いられているのが膵島移植の実状である。したがって、各酵素成分の役割や作用機序の学理究明を介して特異的对象基質を同定し、酵素成分と対象基質の方程式を樹立する事により、年齢や体型に起因する膵組織マトリックス組成の個体差に幅広く対応できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者等が世界に先駆け作製してきたサブタイプ別リコンビナント細胞分離酵素剤を用い、移植外科学・酵素工学・分子生物学・タンパク構造解析学の最新知見を革新的に融合させ、従来成し得なかった対象膵組織のマトリックス組成に使用酵素成分を至適化させる“テラーメイド型細胞分離システム”の基盤を構築しようとするものである。それにより膵島移植が抱える課題の解決を図り、膵島移植を国民病である糖尿病に対する理想的な次世代細胞療法として確立する事を目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) コラゲナーゼサブタイプの役割およびコラゲナーゼGが膵組織を消化する際に対象となり得る基質について、基質消化試験および質量分析法を用いて検証を行った。

(2) 申請者等が独自に開発してきた2種類の新規中性プロテアーゼ(ChNP および Clostripain)が膵組織を消化する際に対象となり得る基質について、基質消化試験および質量分析法を用いて検証を行った。

(3) 膵島分離酵素剤を構成する各酵素成分の特異的对象基質の膵組織内発現量を半定量化する事で、使用する膵島分離酵素剤の成分の最適化を図る事が可能であるかについて、実際に各種比率条件下で膵島分離試験を実施し検証を行った。評価には以下の項目を活用した。

- 膵島収量
- 分離膵島のADP/ATP ratio
- 各種対象基質の免疫組織化学染色
- 各種対象基質のリアルタイムPCR
- 各種対象基質のウェスタンブロットニング
- 各種対象基質の質量分析法

### 4. 研究成果

(1) コラゲナーゼHは消化工程を強力に推進するのに対し、コラゲナーゼGは消化工程初期においてはコラゲナーゼHと連携し膵組織の消化を促進するものの、消化後半の過消化状況においては、分解された膵外分泌組織由来の内因性プロテアーゼによる膵島障害から膵島を保護する作用を有している事が判明した。さらに、TMPPによる二段階修飾を導入した膵組織の質量分析と *in vitro* 基質消化試験の検証により、コラゲナーゼGの有力な

対象基質としてコラーゲン IV とコラーゲン V を同定する事ができた（下記論文 2）。コラーゲン IV に関しては、膵組織のみならず肝組織の免疫組織化学染色においても同様の所見を示す事が確認できた。

（2）*In vitro* 基質消化試験の実施により、膵組織に豊富に発現しているラミニンやフィブロネクチンはコラゲナーゼ G やコラゲナーゼ H では全く消化できず、中性プロテアーゼに強く依存している事が明らかとなった。ラミニンに関しては、申請者等が新たに開発した 2 種の中性プロテアーゼのうち ChNP は 鎖に、CP は 鎖に切断部位を有する事を明らかとし、そのエピトープの同定にも成功した。今後、それらの知財化を目指す予定である。またフィブロネクチンについても、ChNP と CP との間で分解部位の顕著な相違が確認され、ChNP による分解の方が CP による分解よりも優位である事が判明した。

（3）実際の動物モデルを用いた膵島分離試験の結果、Lewis ラットではコラゲナーゼ H を増量する事で膵島収量の増加がみられたのに対し、SD ラットではコラゲナーゼ G:コラゲナーゼ H 比が 1:1 群に比して 1:5 群で膵島収量の低下が認められた事から、Lewis ラットでは SD ラットと比較して膵組織中にコラゲナーゼ H の特異的対象基質であるコラーゲン III が豊富に存在する可能性が示唆された。免疫組織化学染色、リアルタイム RT-PCR による検討では、膵島分離結果との相関が認められなかった。しかし、免疫組織化学染色と同じく抗体を用いた検査であるウェスタンブロッティング法による検討では、Lewis ラットの膵組織におけるコラーゲン III の発現が SD ラットと比較して有意に高く、膵島分離結果との相関が認められた。また、質量分析法による検討でも 1 型コラーゲン 1 鎖/3 型コラーゲン 1 鎖比および 1 型コラーゲン 2 鎖/3 型コラーゲン 1 鎖比は Lewis ラットで SD ラットよりも有意に低く、Lewis ラットの膵組織では SD ラットよりもコラーゲン III が多く発現している可能性が考えられた。また、1 型コラーゲン 1 鎖/1 型コラーゲン 2 鎖比は Lewis ラットにおいて高い傾向にあり、この事は 3 本の 1 鎖からなるホモ三量体 1 型コラーゲンの比率と膵島分離成績との相関を示唆する結果であった。今回の検討の結果から膵組織中のコラーゲン量を測定するためには、コラーゲンの特徴である三重らせん構造を考慮した適切な方法が必要な事が確認された。また、質量分析法によるコラーゲン III やコラーゲン I に占めるホモ三量体の比率の測定は、ドナー膵組織特異的なテラーメイド型膵島分離の実現に向けた重要な要素となり得る事が示唆された（下記論文 1）。これらの結果により、これまでの常識である盲目的な酵素量の増加といった姑息的な手法ではなく、脳死ドナーより提供頂く膵組織の基質組成に対応する酵素成分を科学的に至適化するという、テラーメイド型膵島分離システムの基盤を構築する事ができた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)(全て査読有)

Miyazaki Y, Murayama K, Fathi I, Imura T, Yamagata Y, Watanabe K, Maeda H, Inagaki A, Igarashi Y, Miyagi S, Shima H, Igarashi K, Kamei T, Unno M, Goto M. Strategy towards tailored donor tissue-specific pancreatic islet isolation.

*PLoS ONE* 10:14(5):2019:e0216136:

doi: 10.1371/journal.pone.0216136.

Shima H, Inagaki A, Imura T, Yamagata Y, Watanabe K, Igarashi K, Goto M, Murayama K. Collagen V is a potential substrate for clostridial collagenase G in pancreatic islet isolation,

*Journal of Diabetes Research* 2016:4396756

doi:10.1155/2016/4396756.

Maeda H, Nakagawa K, Murayama K, Goto M, Watanabe K, Takeuchi M, Yamagata Y. Cloning a neutral protease of *Clostridium histolyticum*, determining its substrate

specificity, and designing a specific substrate.

*Applied Microbiology and Biotechnology* 99(24):2015:10489-10499

doi: 10.1007/s00253-015-6923-4.

[学会発表](計 19 件)

前田 浩、猪村武弘、村山和隆、渡邊君子、後藤昌史、山形洋平。膵島分離に用いる新規中性プロテアーゼ 2 種の品質評価に有用な特異的基質の同定。第 45 回日本膵膵島移植研究会 (2018 年 3 月 2-3 日、仙台)

宮崎勇希、猪村武弘、村山和隆、山形洋平、前田 浩、渡邊君子、稲垣明子、宮城重人、内藤 剛、海野倫明、亀井 尚、里見 進、後藤昌史。ドナー膵組織のマトリックス組成に対応するテーラーメイド型膵島分離法の確立へ向けた試み。第 45 回日本膵膵島移植研究会 (2018 年 3 月 2-3 日、仙台)

猪村武弘、前田 浩、山形洋平、村山和隆、渡邊君子、稲垣明子、里見 進、後藤昌史。工業グレードへスケールアップした新規中性プロテアーゼの膵島分離における安全性及び有効性に関する検証。第 45 回日本膵膵島移植研究会 (2018 年 3 月 2-3 日、仙台)

後藤昌史、稲垣明子、山形洋平、村山和隆、渡邊君子、前田 浩、猪村武弘、五十嵐康宏、植松智海、宮崎勇希、水井崇浩、戸子台和哲、宮城重人、角 昭一郎、藤盛啓成、大内 憲明、里見 進。東北大学における次世代膵島移植確立へ向けた技術革新。第 44 回日本膵膵島移植研究会 (2017 年 3 月 10-11 日、京都)

後藤昌史。安全で高性能な細胞分離酵素剤の開発による膵島移植の技術革新。第 16 回日本再生医療学会 (2017 年 3 月 7-9 日、仙台)

宮崎勇希、猪村武弘、山形洋平、前田 浩、村山和隆、渡邊君子、稲垣明子、五十嵐康宏、大内憲明、里見 進、後藤昌史。膵島分離における消化酵素剤の膵島障害性に関する検討。第 52 回日本移植学会 (2016 年 9 月 29 日-10 月 1 日、東京)

後藤昌史、山形洋平、村山和隆、渡邊君子、前田 浩、猪村武弘、稲垣明子、五十嵐康宏、里見 進。実用化へ向けた膵島分離用新規中性プロテアーゼカクテルの構築。第 52 回日本移植学会 (2016 年 9 月 29 日-10 月 1 日、東京)

Satoru Yoshida, Youhei Yamagata, Kanako Nakagawa, Kazuhisa Maeda, Kazutaka Murayama, Kimiko Watanabe, Takehiro Imura, Akiko Inagaki, Yasuhiro Igarashi, Shigehito Miyagi, Kazuo Ohashi, Noriaki Ohuchi, Susumu Satomi, Masafumi Goto. The investigation on target matrix of collagenase G for achieving tailor-made islet isolation. 26th International Congress of The Transplantation Society (2016 年 8 月 18-23 日、香港)

Yuki Miyazaki, Takehiro Imura, Youhei Yamagata, Hiroshi Maeda, Kazutaka Murayama, Kimiko Watanabe, Akiko Inagaki, Yasuhiro Igarashi, Noriaki Ohuchi, Susumu Satomi, Masafumi Goto. The influence of dissociation enzymes on isolated islets during pancreatic islet isolation procedures. 26th International Congress of The Transplantation Society (2016 年 8 月 18-23 日、香港)

後藤昌史、山形洋平、村山和隆、渡邊君子、前田 浩、猪村武弘、稲垣明子、五十嵐康宏、宮城重人、Olle Korsgren、大内憲明、里見 進。新規リコンビナント型コラゲナーゼの膵島移植への臨床応用。第 116 回日本外科学会 (2016 年 4 月 14-16 日、大阪)

吉田 諭、山形洋平、中川香奈子、前田憲寿、村山和隆、渡邊君子、猪村武弘、稲垣明子、五十嵐康宏、宮城重人、大橋一夫、大内憲明、里見 進、後藤昌史。テーラーメイド膵島分離実現へ向けたコラゲナーゼサブタイプ G の対象基質の検証。第 43 回日本膵膵島移植研究会 (2016 年 3 月 4-5 日、広島)

宮崎勇希、猪村武弘、山形洋平、前田 浩、村山和隆、渡邊君子、稲垣明子、五十嵐康宏、大内憲明、里見 進、後藤昌史。膵島分離工程において消化酵素剤が分離膵島へ及ぼす影響。第 43 回日本膵膵島移植研究会 (2016 年 3 月 4-5 日、広島)

後藤昌史, 山形洋平, 村山和隆, 渡邊君子, 前田 浩, 猪村武弘, 稲垣明子, 五十嵐康宏, 佐藤真実, 宮崎勇希, 植松智海, 宮城重人, 藤盛啓成, 大内憲明, 里見 進. 膵島分離成否の鍵を握る中性プロテアーゼ使用法に関する戦略. 第 43 回日本膵膵島移植研究会 (2016 年 3 月 4-5 日、広島)

Satoru Yoshida, Youhei Yamagata, Kanako Nakagawa, Kazutaka Murayama, Kimiko Watanabe, Takehiro Imura, Yasuhiro Igarashi, Akiko Inagaki, Shigehito Miyagi, Kazuo Ohashi, Noriaki Ohuchi, Susumu Satomi, Masafumi Goto. Characterization and optimization of enzyme components for hepatocyte isolation. 2015 International Pancreas and Islet Transplant Association (2015 年 11 月 15-19 日、メルボルン)

Satoru Yoshida, Youhei Yamagata, Kazutaka Murayama, Kimiko Watanabe, Takehiro Imura, Yasuhiro Igarashi, Akiko Inagaki, Shigehito Miyagi, Kazuo Ohashi, Noriaki Ohuchi, Susumu Satomi, Masafumi Goto. The influence of the synergistic effect of neutral protease derived from Clostridium histolyticum and clostripain on the hepatocyte isolation. 2015 International Pancreas and Islet Transplant Association (2015 年 11 月 15-19 日、メルボルン)

Masafumi Goto, Andrew Friberg, Magnus Stahle, Takehiro Imura, Youhei Yamagata, Kimiko Watanabe, Kazutaka Murayama, Akiko Inagaki, Yasuhiro Igarashi, Susumu Satomi, Olle Korsgren. Proof of concept for the clinical application of animal component free recombinant collagenase for isolating pancreatic islets. 2015 International Pancreas and Islet Transplant Association (2015 年 11 月 15-19 日、メルボルン)

猪村武弘, 山形洋平, 村山和隆, 渡邊君子, 前田 浩, 稲垣明子, 五十嵐康宏, 後藤昌史. 膵島分離酵素剤が膵島へ及ぼす影響. 第 51 回日本移植学会 (2015 年 10 月 1-3 日、熊本)

後藤昌史, 山形洋平, 村山和隆, 渡邊君子, 前田 浩, 猪村武弘, 稲垣明子, 五十嵐康宏, 宮城重人, 田頭真実, 藤盛啓成, Olle Korsgren, 大内憲明, 里見 進. 安全で高性能な新規膵島分離用酵素剤のヒト膵臓における POC 樹立および今後の戦略. 第 51 回日本移植学会 (2015 年 10 月 1-3 日、熊本)

吉田 諭, 山形洋平, 中川香奈子, 村山和隆, 渡邊君子, 猪村武弘, 稲垣明子, 五十嵐康宏, 宮城重人, 大橋一夫, 大内憲明, 里見 進, 後藤昌史. 肝細胞分離用酵素剤の最適化. 第 14 回日本組織移植学会 (2015 年 8 月 29 日、大阪)

〔図書〕(計 1 件)

TRANSPLANTATION, BIOENGINEERING AND REGENERATION OF THE ENDOCRINE PANCREAS, ELSEVIER, in press

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山形 洋平  
ローマ字氏名：(YAMAGATA, youhei)  
所属研究機関名：東京農工大学  
部局名：農学研究科  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：40230338

研究分担者氏名：村山 和隆  
ローマ字氏名：(MURAYAMA, kazutaka)  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：医工学研究科  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：40400452

研究分担者氏名：岡田 秀親  
ローマ字氏名：(OKADA, hidechika)  
所属研究機関名：名古屋市立大学  
部局名：医学研究科  
職名：研究員  
研究者番号(8桁)：30160683