



東北大学



NICHU



平成 25 年 6 月 26 日

報道機関各位

東北大学未来科学技術共同研究センター (NICHU)
東北大学大学院医学系研究科

糖尿病治療のテーラード型膵島分離の実現へ向けて

糖尿病患者への膵島移植に使用される細胞分離酵素においてコラゲナーゼ H が重要であり、そのターゲット基質の一つはコラーゲン III である

東北大学未来科学技術共同研究センター（大学院医学系研究科兼務）の後藤昌史教授、大学院医工学研究科の村山和隆准教授、大学院医学系研究科先進外科の大内憲明教授および藤尾淳医師、大学院医学系研究科生物化学分野の五十嵐和彦教授らのグループは、糖尿病を対象とする細胞移植治療である膵島^{注1}移植において、膵島細胞を分離するために使用されている細胞分離酵素においてコラゲナーゼ H（コラゲナーゼ^{注2}のサブタイプ）が極めて重要であることを明らかにしました。これまで膵島分離におけるコラゲナーゼサブタイプの意義に関する統一見解は得られておらず、コラゲナーゼ H は過消化を惹起するため悪玉とする報告も見受けられましたが、今回サブタイプ毎にクローニングした高純度なりコンビナント^{注3}タイプのコラゲナーゼを用いる事により、コラゲナーゼ H が膵島分離において決定的役割を果たしている事を明らかと致しました。さらに、質量分析法を導入する事により、膵組織上に発現しているコラーゲン^{注4}III がコラゲナーゼ H のターゲット基質の一つである事を見出しました。この結果は、コラーゲン III がコラゲナーゼ H の必要量を最適化する有用なマーカーとなり得る事を示唆しており、現在の膵島移植の最大の課題の一つである低い膵島分離成功率の改善へ向けたテーラード^{注5}型膵島分離法（図1）を構築する上で有用な知見になると思われます。

この研究成果は、米国の国際学術誌 Cell Transplantation に 6 月 13 日（米国東部時間）に掲載されました。

【発表のポイント】

膵島移植は、糖尿病患者にとって理想的な低侵襲治療法ですが、臓器提供者から提供された膵臓から膵島細胞を分離する技術は容易ではなく、**世界のトップレベルの医療機関においても膵島分離成功率はいまだ 50%に満たないのが現状**です。その理由の一因として、細胞分離酵素の使用法が挙げられます。提供された膵臓の組織構成は**年齢や肥満度**により大きく異なることが判明しておりますが、現在、臨床現場で使用される細胞分離酵素剤であるコラゲナーゼはいくつかの異なる種類（サブタイプ）が混ざった組成のものであり、1種類のみ純品を使用することは不可能です。そのため、たまたま細胞分離酵素の組成に合致する範囲の組織組成をもつ膵臓が提供された場合のみ、膵島細胞の分離が成功しているのが現状です。実際、**若年者や痩せ型の提供者由来の膵臓からの膵島分離成功率は極めて低い**事が、これまでの多くの研究論文により明らかとなっております。コラゲナーゼサブタイプの組成を変動させ提供された膵臓の組織構成に至適化するためには、**各コラゲナーゼサブタイプの作用対象となるターゲット基質の同定が不可欠**ですが、これまで全く同定されておりました。そこで、本研究におきましては以下の取り組みを行い、貴重な新知見を得ることができました。

- (1) 提供膵臓の組織構成にあわせて、異なる組成のコラゲナーゼを使用することを可能にすべく、これまでの市販細胞分離酵素剤と異なり、**サブタイプ毎にクローニングした高純度なりコンビナントタイプのコラゲナーゼを産生**した。これにより、現在の市販品が抱えているもう一つの大きな課題である**ロット格差の問題も一気に解決**できることとなった。
- (2) 産生したリコンビナントタイプのコラゲナーゼを使用し、膵島分離において**コラゲナーゼ H が極めて重要である**事を明らかとした。
- (3) 産生したリコンビナントタイプのコラゲナーゼ H を使用し、膵組織上に発現している**コラーゲン III がコラゲナーゼ H のターゲット基質**の一つである事を見出しました。

【研究内容】

膵島移植は、重症1型糖尿病に対する治療法として既に臨床応用が開始されています。この新しい細胞移植療法は、全身麻酔や開腹手術を必要としない、患者にとって理想的な低侵襲治療法ではありますが、臓器提供者から提供された膵臓から膵島細胞を分離する技術は容易ではなく、世界のトップセンターにおいてもいまだ50%に満たないのが現状です。その理由の一因として、膵島分離の際に使用される細胞分離酵素の問題が挙げられます。現在臨床現場で主に使用されている細胞分離酵素は、*Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼを主成分とし、さらに中性プロテアーゼといくつかの未知なプロテアーゼによって構成されております。*Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼは、コラゲナーゼ G (ColG) とコラゲナーゼ H (ColH) の二つのサブタイプに分類されます。二つのコラゲナーゼの役割につきましては、これまでにいくつかの報告が散見されますが、いまだ統一見解は存在しません。その原因の一つが、研究に使用されてきたコラゲナーゼサブタイプの精製法です。これまでのほとんどの研究におきましては、陰イオン交換クロマトグラフィーによって ColG と ColH を分離精製しておりましたため、対象以外のコラゲナーゼサブタイプや *Clostridium histolyticum* 自体に由来する未知のプロテアーゼの混入が不可避でありました。そこで本研究におきましては、サブタイプ毎にクローニングした高純度なリコンビナントタイプのコラゲナーゼを使用することにより、膵島分離における ColG および ColH の役割の解明を試みました。また、免疫組織化学染色分析、コラーゲン消化試験、および質量分析法を用いて、コラゲナーゼサブタイプの作用対象となる細胞外マトリックスに関する検討を行いました。

まず、リコンビナントタイプのコラゲナーゼ ColG、ColH、またはその両方に、中性プロテアーゼを全ての群に加えて調合し、それぞれの群の分離膵島の収量と機能を測定しましたところ (各 n=9)、膵島収量は ColG/ColH 群で最も高値を示しましたが ($4,101 \pm 153$ islet equivalents)、ColH 群におきましても十分量の良質な膵島を回収することが可能でした ($2,811 \pm 194$ islet equivalents) (図 2)。一方、ColG 群におきましては、全く膵島が分離されませんでした ($p < 0.01$) (図 1)。さらに、質量分析により、ColH がコラーゲン I および III (特に III) を分解していることが示唆されました。また、免疫組織化学染色分析におきましても、コラーゲン I、III はいずれも膵臓の外分泌組織に発現しており、特にコラーゲン III がより多く発現している事が判明致しました。コラーゲン消化試験におきましても、

コラーゲンⅢが ColH により効果的に消化されることが判明致しました。

本研究により、ラットの膵島分離におきまして、ColG は補助的な役割に限局されるものの、ColH は極めて重要な役割を担っていることが明らかとなりました。また、ColH が作用する膵臓の細胞外マトリックス^{注6}の一つがコラーゲンⅢであることが示唆されました。したがって、今後、膵組織におきまして発現されているコラーゲンⅢを半定量化し、それに対する ColH の量を最適化することにより、膵島分離の成功率が飛躍的に高まる可能性があるかと推察されました。

本研究は文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム、科学技術振興機構研究シーズ探索プログラム、科学技術振興機構地域産学官共同研究拠点整備事業 (TAMRIC)、および東北大学大学院医学系研究科共通機器室によってサポートされました。

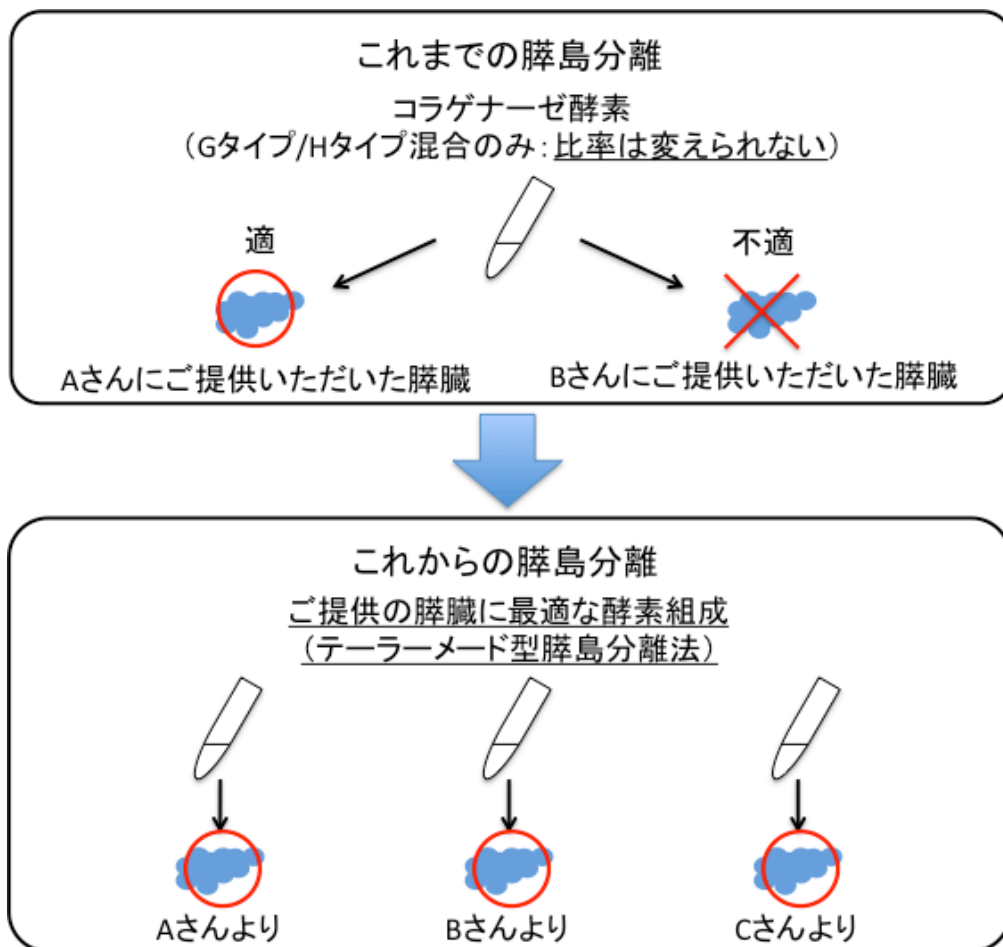
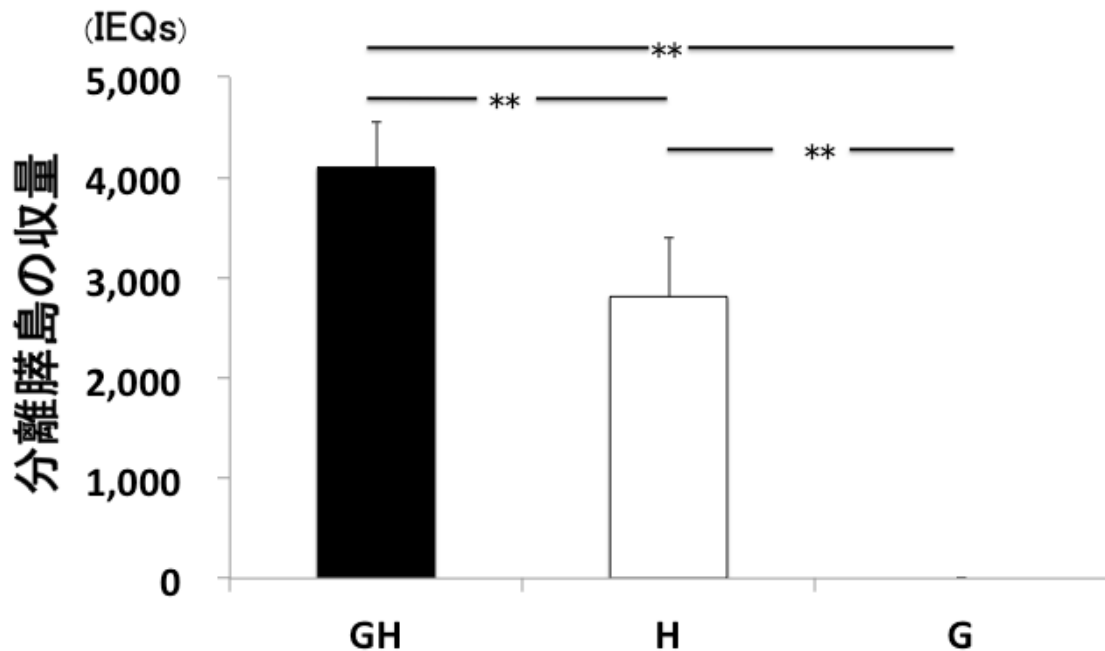


図 1. テーラーメイド型膵島分離



** P<0.01

図2. コラゲナーゼサブタイプの組み合わせが分離膵島の収量へ及ぼす影響
 全ての群に同ロット・同量の中性プロテアーゼを使用し、コラゲナーゼサブタイプの組み合わせのみを各群で変動させて、ラット膵臓からの膵島分離実験を実施した。コラゲナーゼ G およびコラゲナーゼ H を組み合わせさせた群で最も膵島収量が高値を示したが (4,101 ± 153 islet equivalents)、コラゲナーゼ H 群においても十分量の良質な膵島を回収することが可能であった (2,811 ± 194 islet equivalents)。コラゲナーゼ G 群においては、膵組織の消化が殆ど起こらず、膵島は全く回収されなかった。GH 群：コラゲナーゼ G およびコラゲナーゼ H を使用、G 群：コラゲナーゼ G を使用、H 群：コラゲナーゼ G を使用。IEQs^{注7}：膵島の量を示す国際単位 (islet equivalents)。(Cell Transplantation, Fujio A, Goto M et al.より抜粋)

【用語説明】

注1. 膵島：膵臓の中にあるホルモンを分泌する細胞の集団。インスリンを産生するベータ細胞が含まれる。健常人の場合、一つの膵臓内に約100万個の膵島が存在する。

注2. コラゲナーゼ：天然型コラーゲンを分解する酵素をいう。*Clostridium histolyticum*から精製された2つのコラゲナーゼGおよびコラゲナーゼHは、それぞれ分子量約120 kDaの亜鉛金属酵素であり、哺乳類のコラゲナーゼと異なり、コラーゲンを低分子のペプチドにまで分解できる。アミノ末端側にタンパク分解酵素ドメイン、カルボキシル末端側にコラーゲン結合ドメインを持つ。その他のプロテアーゼとの同時使用により、試験管内研究用および組織移植・再生医療等において、細胞等の分離・分散に用いられる。

注3. リコンビナント：遺伝学において、2つの異なる生体の遺伝物質を組み合わせて作られたDNA、蛋白、細胞、臓器などを示す用語。組み換え型の物質は製造ラボにおいて作成され、がん治療やその他の様々な用途のために研究されている。

注4. コラーゲン：生体のマトリックスを構成するタンパク質。1型から28型まで様々な分子種が存在する。もっともよく知られている1型は、約10万kDaの直鎖状のサブユニット3本が螺旋状に寄り集まってその形を形成している。立体構造を保ったコラーゲンは、タンパク質分解酵素によっても分解されにくく、コラゲナーゼによってもみ効率的に分解される。コラーゲンを熱変性させたものがゼラチンで、立体構造を持っていないゼラチンは、多くのタンパク質によって分解可能である。

注5. テーラーメイド：医療では、個々の患者の個性（体質）にあわせた医療を行うことをテーラーメイド医療という。なお、オーダーメイドとも呼ばれるが、オーダーメイドは和製英語である。

注6. 細胞外マトリックス：生体を構成する体細胞の外側にある線維状や網目状の構造体。細胞と細胞の間を満たし、生体組織を支持するだけでなく、細胞の増殖・分化・形質発現の制御にも重要な役割を果たしている。

注7. IEQs (islet equivalents)：膵島の量を示す国際単位。膵島を球形と見立て、直径150umの膵島を1 IEQと定義した。現在の技術では、一つの健常膵臓から30万 IEQsの膵島が回収されれば成功とみなされている。

【論文題目】

Collagenase H is crucial for isolation of rat pancreatic islets

(コラゲナーゼHはラット膵島分離に必須である)

掲載雑誌：*Cell Transplantation*

(お問い合わせ先)

東北大学未来科学技術共同研究センター

(東北大学大学院医学系研究科先進細胞移植学分野兼務)

教授 後藤昌史 (ごとう まさふみ)

電話番号：022-717-7895

E-mail: goto@niche.tohoku.ac.jp

gotokichi@aol.com

(報道担当)

東北大学大学院医学系研究科・医学部 広報室

講師 稲田 仁 (いなだ ひとし)

電話番号：022-717-7891

E-mail: pr-office@med.tohoku.ac.jp