

日本医療研究開発機構      医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム    基本スキーム (ACT-M)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 新規リコンビナント型プロテアーゼを用いた安全で高性能な革新的細胞分離用酵素剤の開発  
(英 語) Development of a safe and highly efficient novel enzyme for cell separation by constructing recombinant proteases

研究開発実施期間：2016 年 11 月 24 日～2019 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 後藤 昌史  
(英 語) Goto Masafumi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立大学法人東北大学・大学院医学系研究科・教授  
(英 語) Tohoku University・Graduate School of Medicine・Professor

## II 研究開発の概要

### (研究開発の目的)

糖尿病は人工透析による医療費の高騰を招き、医療保険制度を脅かしており、理想的な低侵襲糖尿病治療として膵島移植の普及が望まれている。膵島移植の普及を阻んでいる一因として、膵島分離酵素剤のロット格差や膵島分離成功率の低さが挙げられる。申請者らは細胞分離酵素剤の開発に取り組み、コラゲナーゼ成分に関しては既にリコンビナント化製品を上市し、もう一つの主成分である中性プロテアーゼに関しては、コラゲナーゼと高い生物学的相乗作用を発揮する同菌由来の *Clostridium histolyticum* derived Neutral Protease (ChNP) 及び Clostripain(CP) が有用である事を小動物で確認済みである。本研究では、連携企業と共に新規中性プロテアーゼのリコンビナント型 GMP グレード品を構築し、ヒト膵臓における POC の取得を目指す。

(1) 新規リコンビナント中性プロテアーゼ CP 及び ChNP の特異的対象基質の同定

### <成 果>

- ① CP は膵臓の主要細胞外マトリックスタンパク質であるラミニン、フィブロネクチンおよびビトロネクチンを分解することを確認したが、CP 単独では膵組織の消化は確認されなかった。
- ② CP および ChNP がラミニンを切断する部位を複数同定し、特にヘパラン硫酸などとの総合作用に関わる部位である LG ドメインの C 末端での切断を確認した。
- ③ CP および ChNP は、それぞれフィブロネクチンを 5 ヶ所および 14 ヶ所で分解することを確認した。
- ④ ChNP はラミニンを主に  $\gamma$  鎖で分解することを確認した。

### <意 義>

本検証結果をヒト臍組織で応用することにより、臍島分離の際に使用する中性プロテアーゼ量の最適化に寄与することが期待される。

#### (2) 新規リコンビナント中性プロテアーゼ CP の活性評価法及び効率的活性化法の確立

### <成 果>

- ① 活性評価用の最適基質を検証した結果、t-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-seryl-L-threonyl-L-arginine 4-methylcoumaryl-7-amid (Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA)を用いることにより、CP の分解活性を正確に評価できる事を確認した。
- ② CP は Cys 残基を還元して SH 型としなければ活性が発現しないため、安全かつ安価な活性化法の検証を行った結果、DTT を用いる活性化法が効果的である事を見出した。

### <意 義>

測定条件に起因するばらつきが解消され、CP の活性評価を正確に行う事が可能となり、この評価法を活用する事により精製工程中の効率的 CP 活性化法を樹立する事ができた。

#### (3) 新規リコンビナント中性プロテアーゼ ChNP の活性評価法の確立

### <成 果>

ColG、ColH、CP によって切断されず ChNP によってのみ分解される新基質として、3-(2-furyl) acryloyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-tyrosyl amide (FAGFYA)を同定する事に成功した。

### <意 義>

Azocasein/FAGFYA の活性比率を求めることにより、ChNP 製品の不純タンパク質含有の有無を高精度で短時間に判定する事が可能となり、有用な新規品質評価法を樹立する事に成功した。

#### (4) 新規リコンビナント中性プロテアーゼ ChNP 及び CP のスケールアップ

### <成 果>

- ① ChNP のラボレベルでの製造において、培地に 100 mM の酢酸カルシウムを投入することにより発現量が高くなる事を見出だしていたが、工場での製造には使用できないので代替法を検討した結果、4.5 mM の塩化カルシウムが効果的である事が明らかとなった。
- ② ChNP のスケールアップ検討において、His-tag カラムを用いない新たな精製方法の構築を行い、比活性が高く、さらにエンドトキシン値が目標の規格値を満たす製法を確立した。
- ③ CP のスケールアップ検討において、疎水クロマトカラムの導入、及び精製工程途中に活性化工程を導入することにより目標の規格値を満たす製法を確立した。

### <意 義>

本検証で樹立したスケールアップ法に基づき、GMP 化の検討を行う事が可能となった。

#### (5) 新規リコンビナント中性プロテアーゼの小動物安全性・有効性試験の実施

### <成 果>

- ① *in vivo* 毒性評価 (マウス体内注射による毒性試験)

膵島分離に使用する注入酵素が全て膵島に残存し、移植とともに全量が体内に入ったと仮定したあり得ない高濃度でのマウス毒性試験を実施したが、ChNP、CPともに異常所見は確認されず、両中性プロテアーゼの生物毒性は極めて低い事が確認できた。

## ② 膵島障害性試験

開発中性プロテアーゼと分離膵島の共培養試験により、ChNP群は培養液群（対照群）と比べて膵島形態に差異は認められず、ADP/ATP ratio及びATP/DNAは共に同等の値となっており、臨床濃度での膵島障害性は限りなく低いと考えられた。一方、TL（サーモリシン）群はADP/ATP ratio、ATP/DNAの値は良好であったものの、膵島形態は明らかに対照群と異なっており、直接的な膵島障害性が示唆された。

## ③ 膵島分離試験

ChNPとCPの相乗作用は確認できたが、小動物モデルではTLでも良質な膵島が回収されるため、ChNPとCPの膵島分離試験に関する評価は困難であった。

## <意 義>

開発した ChNP 及び CP の生物毒性は極めて低く、また現行の TL に比較して ChNP は膵島障害性も低い事を確認できた。

## （６）新規リコンビナント中性プロテアーゼの大動物安全性・有効性試験の実施

## <成 果>

前臨床大動物モデルとしてブタ膵島分離試験を実施した。

### ① 膵組織消化時間

膵組織消化時間は概ね目標値内に収まり、開発酵素剤による膵組織の断片化が良好に行われた事がうかがえる。

### ② 膵組織消化率

膵組織消化率はいずれも目標値を凌駕しており、開発酵素剤による膵組織の消化工程が良好に行われた事がうかがえる。

### ③ 膵島収量

膵島収量は、一部の試験で期待をやや下回る傾向が観察されたが、概ね良好であった。

### ④ 膵島形態

膵島の形態はほぼ全例で良好であった。

### ⑤ 分離膵島の Survival rate (%)

分離回収された膵島の Survival rate は全例で良好であり、開発酵素剤により質の高い膵島が回収できた事がうかがえる。

### ⑥ ADP/ATP ratio

分離回収された膵島の ADP/ATP ratio は全例とも正常範囲であり、開発酵素剤により質の高い膵島が回収できた事がうかがえる。

⑦ ATP/DNA

分離回収された膵島の ATP/DNA は全例とも正常範囲であり、開発酵素剤により質の高い膵島が回収できた事がうかがえる。

⑧ 呼吸活性

分離回収された膵島の呼吸活性は一部を除き全例正常範囲内に収まっており、開発酵素剤により質の高い膵島が回収できた事がうかがえる。

⑨ *In vivo* bioassay

全例において分離回収された膵島は糖尿病マウスを治癒させる事が可能であり、開発酵素剤により質の高い膵島を回収できた事がうかがえる。

<意 義>

工業レベルにスケールアップしたリコンビナント中性プロテアーゼでも、大動物膵島分離が可能である事が判明した。分離膵島の質は全ての評価試験において良好であったが、一部の試験において膵島収量が期待値をやや下回る傾向が確認された。ブタ膵島とヒト膵島では膵島周囲被膜の構成が大きくことなる事が知られているため、膵島収量や消化時間に関しては実際にヒト膵臓を用いる試験を実施しない限り、正確な評価は困難であると思われた。

(7) 新規リコンビナント中性プロテアーゼ ChNP 及び CP の GMP 化

<成 果>

工業レベル化を目的としたスケールアップに基づき ChNP 及び CP について製品設計を行い、GMP 準拠の細胞分散用酵素剤製造工場として管理されている天野エンザイム株式会社養老工場第6工場にて GMP 化試作品を製造した。製造された試作品は目的とする品質を満たし、製造工程においても設計された製造基準に対して異常は認められなかった。また、試作品はブタ膵島分離試験により安全性と有効性が確認された。

<意 義>

臨床 POC 試験を実施する事が可能となった。

(8) 新規リコンビナント中性プロテアーゼのヒト膵島分離 POC 試験

<成 果>

下記の三群（各群 n=5）で比較検証を実施した。

	(コラゲナーゼ)	(中性プロテアーゼ)
第一群	Liberase	TL
第二群	Liberase	ChNP・CP
第三群	ColG・ColH（リコンビナント）	ChNP・CP

予定した 15 例のうち、10 例（第一群：5 例、第二群：3 例、第三群：2 例）は実施できたが、GMP 化工程の遅延により本研究期間内に予定症例全てを実施する事はできなかった。

<意 義>

TL 群の膵島分離成功率が 20% (1/5) であったのに対し、ChNP・CP 群は 75% (3/4) (1 例は若年ドナーであった

ため評価から除外)に達する事が明らかとなった。本臨床 POC 試験の評価項目である膵組織消化時間 (<25 分)、膵組織消化率 (>85%)、分離膵島の糖負荷試験指数 (>2.0) に関しても、ChNP・CP 群の基準達成率はそれぞれ 75%、100%、100%であり、ここまでの検討範囲においては開発中性プロテアーゼがヒト膵島分離に対しても有用である事が示唆された。

英文：

**(Aim of this research)**

Diabetes has caused a surge in medical costs due to artificial dialysis, threatening the medical insurance system, and the spread of islet transplantation as an ideal minimally invasive diabetes treatment is desired. Factors that have hindered the spread of islet transplantation include the lot disparity of islet isolation enzymes and the low islet isolation success rate. We have been working on the development of cell-separating enzymes, and have already completed recombinant products for the collagenase component. It has been confirmed in small animals that *Clostridium histolyticum* derived Neutral Protease (ChNP) and Clostripain (CP) are useful. In this study, we will construct a recombinant GMP grade product of a novel neutral protease together with a partner company, aiming to acquire POC using human pancreases.

(1) Identification of specific target substrates for novel recombinant neutral protease (CP and ChNP)

CP was confirmed to degrade laminin, fibronectin and vitronectin, which are the major extracellular matrix proteins of the pancreas, but CP alone was not enough to digest pancreatic tissues. We also identified multiple sites where CP and ChNP cleave laminin, especially confirmed the cleavage at the C-terminal of the LG domain, which is involved in the overall action with heparan sulfate. Furthermore, CP and ChNP were confirmed to degrade fibronectin at 5 and 14 sites, respectively. ChNP was also confirmed to degrade laminin mainly by  $\gamma$  chain. By applying this outcome to human pancreatic tissues, it is expected to contribute to optimization of the amount of neutral proteases used for islet isolation.

(2) Establishment of evaluation and efficient activation methods for a novel recombinant neutral protease (CP)

As a result of verifying the optimal substrates for activity evaluation, t-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-seryl-L-threonyl-L-arginine 4-methylcoumaryl-7-amid (Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA) was confirmed to evaluate the degradation activity of CP accurately. Moreover, CP does not have its activity unless the Cys residue is reduced to the SH type, the verification on a safe and inexpensive activation method has revealed that the activation method using DTT is effective. By this study, variations due to measurement conditions were eliminated, and it became possible to accurately evaluate CP activity. By using this novel evaluation method, an efficient CP activation method during the purification process could be established.

(3) Establishment of activity evaluation method for a novel recombinant neutral protease (ChNP)

We succeeded in identifying 3- (2-furyl) acryloyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-tyrosyl amide (FAGFYA) as a new substrate that is not cleaved by ColG, ColH, and CP but is only degraded by ChNP. By

determining the activity ratio of Azocasein / FAGFYA, it became possible to determine the presence or absence of impure proteins in ChNP products with high accuracy in a short time, and succeeded in establishing a useful new quality evaluation method.

(4) Scale-up of novel recombinant neutral proteases (ChNP and CP)

In the production of ChNP at the laboratory level, it was found that the expression level was increased by adding 100 mM calcium acetate to the medium, but as a result of examining an alternative method since it could not be used for production in the factory, it turned out that 4.5 mM calcium chloride was also effective. In the ChNP scale-up study, we constructed a new purification method that does not need a His-tag column, and established a production method with high specific activity and an endotoxin value that meets the target standard value. Furthermore, in the CP scale-up study, a manufacturing method that satisfies the target standard value was established by introducing a hydrophobic chromatographic column and an activation process during the purification process. Based on the scale-up method established in this study, it became possible to study GMP process.

(5) Safety and efficacy studies on novel recombinant neutral proteases by using small animal model

The biotoxicity of the developed ChNP and CP was extremely low, and it was confirmed that ChNP also has low damage on isolated islets compared to the current standard, Thermolysin (TL).

(6) Safety and efficacy studies on novel recombinant neutral proteases by using large animal model

It was shown that developed recombinant neutral proteases, which were scaled up to industrial level, were also effective for islet isolation in large animal model. The quality of isolated islets was satisfied in all evaluation tests, but in some tests, the islet yield tended to be slightly lower than expected. Since it is well known that the composition of the capsule around the islets is greatly different between porcine islets and human islets, it appeared that accurate assessment of islet yield and digestion time is difficult unless a test using human pancreas is actually performed.

(7) Production of GMP grade of novel recombinant neutral proteases (ChNP and CP)

Product design for ChNP and CP were conducted based on scale-up for the purpose of industrialization. Then, prototype GMP production was manufactured at No. 6 factory of Amano Enzyme Co., Ltd, which is managed as a GMP-compliant cell dispersion enzyme production factory. The manufactured prototype satisfied the required quality, and no abnormality was observed in the manufacturing process with respect to the designed manufacturing standard. The prototype was confirmed to be safe and effective for islet isolation by performing the porcine islet isolation test.

(8) Human islet isolation POC test on novel recombinant neutral proteases

Out of planned 15 cases, 10 cases (Liberase / TL group : 5 cases, Liberase / ChNP / CP group: 3 cases, rColG / rColH / ChNP / CP group: 2 cases) could be implemented, but due to the delay of the GMP process, we could not complete entire study during the study period. **The success rate of islet isolation in the TL group was 20% (1/5), whereas it was shown that the ChNP / CP group reached 75% (3/4) (excluded from the evaluation because one was a young donor).**

### III 事後評価総合所見

2種の新規リコンビナントプロテアーゼの酵素学的特性解析やGMPグレード品製造までに至った製造・品質管理面では、ほぼ目標が達成されました。産学間の技術移転や連携も良好であり、これらは高く評価できます。GMPグレード品を用いたヒトPOC試験で既存プロテアーゼに対する優位性が示唆された点も評価できますが、例数が計画に対し未達であった点は惜しまれます。

全成分がリコンビナントとなる細胞分離酵素剤が我が国から誕生する事は意義があり、他の細胞移植分野等への展開も可能です。

今後は、既存品に対する優位性の更なるエビデンス構築や使用条件の更なるブラッシュアップ等に努め、より市場の大きい海外へ展開を図ることを期待します。