

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
ACceleration Transformative research for Medical innovation
- 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酵素剤の開発
(英語) Development of the safely and highly efficient cell dissociation enzymes by introducing novel recombinant type proteases
- 研究開発担当者
所属 役職 氏名： (日本語) 東北大学大学院医学系研究科
教授
後藤 昌史
(英語) Graduate School of Medicine, Tohoku University
Professor
Masafumi Goto
- 実施期間： 平成28年11月24日 ～ 平成28年3月31日
- 分担研究 (日本語) 開発プロテアーゼの安全性・有効性検証、特異的対象基質の同定、POC試験実施体制の構築およびPOC試験実施
- 開発課題名： (英語) The safety and validity verification, identification of the specific substrate, and construction and implementation of POC test for newly-developed proteases
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 東北大学大学院医学系研究科
助教
稲垣 明子
東北大学大学院医工学研究科

准教授
村山 和隆

東北大学未来科学技術共同研究センター
研究員
渡邊 君子

(英語) Graduate School of Medicine, Tohoku University
Assistant Professor
Akiko Inagaki

Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University
Associate Professor
Kazutaka Murayama

New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University
NICHe Research Fellow
Kimiko Watanabe

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

村山准教授（東北大学大学院医工学研究科）、稲垣助教（東北大学医学系研究科）とともに、臍島分離における Clostripain (CP) の最適使用法を確立することを目的として、臍組織の消化実験ならびに精製基質を用いた消化試験により CP の特異的対象基質の検証を進めた。その結果、(1) CP は細胞外マトリックスタンパク質として天然状態のコラーゲンを分解できない、(2) ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチンを消化できる、ことを見出した。特に臍組織に豊富に存在することが知られているラミニンの α 鎖における特異的消化が確認できており、サブタイプであるラミニン 511 と 411 の解析が一つの鍵になると注目している。

山形教授（東京農工大学大学院農学研究院）のグループは、山口取締役事業部長（天野エンザイム株式会社）らのグループとともに、活性が高く阻害が生じ難い有用な新規 CP 基質として carbobenzoxy-L-leucyl-L-seryl-L-threonyl-L-arginyl-4-methylcoumaryl-7-amide を見出した。また、新たに見出した 3-(2-furyl)acryloyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-tyrosyl amide (FAGFYA) とタンパク性基質 (azocasein) に対する活性比によって、ChNP の品質評価が可能であることも明らかとした。さらに CP の活性保持法として、イオン存在下で透析することで活性の維持が可能であることを見出した。

これらのプロジェクト成果に関し、第 16 回日本再生医療学会のランチョンセミナーを東北大学と天野エンザイム株式会社にて共同で開催し、再生医療を志す研究者へ広く周知することができた。

英文

Under a collaborative work with associate professor Murayama (Graduate School of Biomedical

Engineering, Tohoku University) and assistant professor Inagaki (Graduate School of Medicine, Tohoku University), the investigation for detecting specific target matrices of Clostripain (CP) was performed by digestive examination of pancreatic tissues and by *in vitro* matrix digestion assay in order to optimize the procedures of CP digestion in pancreatic islet isolation. Consequently, the following issues were found out; (1) CP is not able to digest natural state of collagens as extracellular matrices, (2) CP is capable of digesting laminin, fibronectin, and vitronectin. Of particular note, we clarified that α chain of laminin, which is well known to broadly locate on pancreatic tissues, was specifically digested by CP. We believe that both laminin 511 and 411 could be key targets of CP.

Under a collaborative work with Executive Director Yamaguchi (Amano Enzyme Inc.), prof Yamagata (Tokyo University of Agriculture and Technology) found carbobenzoxy-L-leucyl-L-seryl-L-threonyl-L-arginyl-4-methylcoumaryl-7-amide as a novel useful target matrix for measuring CP activity. This matrix is highly active and patient for inhibition from several impurity. In addition, they demonstrated that the difference of activity ratio against 3-(2-furyl) acryloyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-tyrosyl amide (FAGFYA) and azocasein could be effectively used for evaluating the quality of ChNP. Furthermore, they also clarified that CP activity can be well maintained by dialyzing it under certain cations.

Some of these findings were presented to the scientists in the field of regenerative medicine at the luncheon conference in the 16th Japanese Society for Regenerative Medicine held by Tohoku University and Amano Enzyme Inc.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 3 件)

1. Fukuoka K, Inagaki A, Nakamura Y, Matsumura M, Yoshida S, Imura T, Igarashi Y, Miyagi S, Ohashi K, Enosawa S, Kamei T, Unno M, Ohuchi N, Satomi S, Goto M. The optimization of short-term hepatocyte preservation prior to transplantation. *Transplantation Direct*. 2017 in press
2. Eguchi H, Kawamura T, Kashiyama N, Matsuura R, Sakai R, Nakahata K, Lo PC, Asada M, Maeda A, Goto M, Toyoda M, Okuyama H, Miyagawa S. Supplemental Analysis for N-linked Sugars in Adult Pig Islets. *Transplantation Proc*. 2016;48(4):1302-1303
3. 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, 2016:4396756
4. 後藤昌史, 胆道・膵疾患診療の最前線:膵ラ島移植, 胆道・膵疾患診療の最前線 (著書). 2017年3月出版

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 膵消化酵素が膵島分離工程で膵島に与える影響、口頭、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、第43回日本臓器保存生物医学会、2016/11/27、国内
2. 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、口頭 (シンポジウム)、

後藤昌史、第 16 回日本再生医療学会、2017/03/08、国内

3. 新規中性プロテアーゼカクテルの膵島移植への応用、口頭（依頼講演）、後藤昌史、第 16 回日本再生医療学会、2017/03/07、国内
4. 細胞分離酵素剤が分離膵島へ及ぼす影響に関する検証、口頭、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、第 16 回日本再生医療学会、2017/03/08、国内
5. 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、口演（ワークショップ）、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、第 44 回日本膵膵島移植研究会、2017/03/11、国内
6. 膵島分離工程における膵島障害因子の検討、口演、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、第 44 回日本膵膵島移植研究会、2017/03/11、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 新規中性プロテアーゼカクテルの膵島移植への応用、後藤昌史、第 16 回日本再生医療学会におけるランチョンセミナー（天野エンザイム株式会社がサポート）、2017/03/07、国内

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
ACceleration Transformative research for Medical innovation
- 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酵素剤の開発
(英語) Development of the safely and highly efficient cell dissociation enzymes by introducing novel recombinant type proteases
- 研究開発担当者 (日本語) 天野エンザイム株式会社
所属 役職 氏名： 取締役 マーケティング本部 メディカル用酵素事業部長
山口 庄太郎
(英語) Amano Enzyme Inc.
Executive Director, Marketing Headquarter, Medical Enzyme Division
Shotaro Yamaguchi
- 実施期間： 平成28年11月24日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 開発中性プロテアーゼのスケールアップおよびGMP化
- 開発課題名： (英語) Scale-up and GMP modification of newly-developed neutral proteases
- 研究開発分担者 (日本語) 天野エンザイム株式会社
所属 役職 氏名： 開発部長
小嶋 裕三
天野エンザイム株式会社
研究員
南本 千絵

(英 語) Amano Enzyme Inc.
General Manager
Yuzo Kojima

Amano Enzyme Inc.
Researcher
Chie Minamimoto

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者（課題リーダー）：東北大学 大学院医学系研究科 後藤昌史 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
ACceleration Transformative research for Medical innovation
- 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酵素剤の開発
(英語) Development of the safely and highly efficient cell dissociation enzymes by introducing novel recombinant type proteases
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 東京農工大学 大学院農学研究院
教授
山形 洋平
(英語) Tokyo University of Agriculture and Technology
Professor
Youhei Yamagata
- 実施期間： 平成28年11月24日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 開発プロテアーゼの効率的活性化法および活性保持法の改良、活性評価法の樹立
(英語) Improvement of the effective activation and well-preserving procedures for newly-developed proteases, and establishment of a novel assay for detecting specific activity of newly-developed proteases

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者（課題リーダー）：東北大学 大学院医学系研究科 後藤昌史 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（1）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

（2）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 臍島分離に用いる *Clostridium histolyticum* 由来の臨床用組換え活性型 clostripain の調製、口頭、前田 浩、村山和隆、渡邊君子、後藤昌史、山形洋平、日本農芸化学会 2017 年度大会（京都女子大）、2017/3/18

（3）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

（4）特許出願