

氏名	藤尾 淳
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	膵島分離におけるコラゲナーゼ H の作用機序に関する研究
論文審査委員	主査 教授 大内 憲明 教授 後藤 昌史 教授 海野 倫明 教授 江川 新一

論文内容要旨

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る。この新しい細胞移植療法は、従来行なわれてきた膵臓移植と比べ、安全・簡便・低侵襲などの利点を有しているが、現状では克服すべき課題も多い。その一つとして膵島分離の際に使用される酵素の問題があげられる。現在主に使われている酵素は *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いる。*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) の二種類に分類される。二つのコラゲナーゼの役割については、これまでにいくつかの報告が散見されるが、いまだ議論がわかれるところである。その原因の一つとして、研究に使用されたコラゲナーゼサブタイプの精製法が挙げられる。これまでのほとんどの研究においては、陰イオン交換クロマトグラフィーによって ColG と ColH を分離精製していたため、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った。そこで本研究においては、リコンビナントタイプのコラゲナーゼをサブタイプ毎に作製し、高純度に精製された酵素剤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た。また、免疫組織化学分析、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ついても検討を行った。

リコンビナントタイプのコラゲナーゼ G (ColG)、コラゲナーゼ H (ColH)、またはその両方に、中性プロテアーゼとしてサーモライシン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た。また、ColG と ColH の役割を明確にするために、各々の酵素を二段階に経時的に膵管へ注入し、収量を比較検証した。さらに、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の検討を行う

ために、膵組織の質量分析、免疫組織化学分析、コラーゲン消化試験を行った。

ラットの膵臓を消化したところ (各 n=9)、膵島収量は ColG/ColH 群で最も高かったが ($4,101 \pm 153$ islet equivalents)、ColH 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 ($2,811 \pm 194$ islet equivalents)。一方 ColG 群においては、全く膵島が分離されなかった ($p < 0.01$)。また、最初に ColH を注入し、その後 ColG を追加した場合、ColH のみの場合と比べて約 20% の収量の増加を認めしたが ($3,410 \pm 222$ IEQs, n=6 vs. $2,811 \pm 194$ IEQs)、逆の順番で注入した場合、収量の増加は認められなかった。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た。また免疫組織化学分析においては、コラーゲン I、III はいずれも外分泌組織に発現していたが、コラーゲン III がより多く発現していた。コラーゲン消化試験においても、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した。

本研究により、ラットの膵島分離において、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った。また、ColH が作用する膵臓の細胞外マトリックスの一つがコラーゲン III であることが示唆された。したがって、今後、膵組織におけるコラーゲン III を半定量化して、それに対する ColH の量を至適化することにより、膵島分離の成功率が高まる可能性があるかと推察された。

審査結果の要旨

博士論文題目 膵島分離におけるコラゲナーゼ H の作用機序に関する研究.....

所属専攻・分野名 医科学専攻 先進外科学 分野.....

学籍番号 氏名 藤尾 淳.....

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るが、現状では克服すべき課題も多い。その一つとして膵島分離の際に使用される酵素の問題があげられる。現在主に使われている酵素は *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いる。*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) の二種類に分類されるが、その役割は明らかではない。その原因の一つとして、市販の酵素剤には未知の成分が混入されており、高純度の ColG および ColH を検討に使用できないことがあげられる。

そこで筆者は、リコンビナントタイプの ColG (ColG 群)、ColH (ColH 群)、またはその両方 (ColG/ColH 群) に、中性プロテアーゼを加えて調合し、ColG および ColH の分離膵島の収量と機能を測定することで、ColG および ColH の役割の解明を検討した。また、各々の酵素を二段階に注入し、収量を比較検証した。さらに、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の検討を行うために、膵組織片の質量分析、免疫組織化学分析、*in vitro* コラーゲン消化試験を行った。

ラットの膵臓を消化したところ、膵島収量は ColG/ColH 群で最も高かったが、ColH 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。一方 ColG 群においては、全く膵島が分離されなかった。また、最初に ColH を注入し、その後 ColG を追加した場合、ColH のみの場合と比べて約 20% の収量の増加を認めしたが、逆の順番で注入した場合、収量の増加は認められなかった。また質量分析により、ColH の特異的対象基質の一つとしてコラーゲンⅢが示唆された。免疫組織化学分析、コラーゲン消化試験においても、同様にコラーゲンⅢが ColH により効果的に消化されることが判明した。

以上の検討結果より、ラットの膵島分離において、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った。また、ColH が作用する膵臓の細胞外マトリックスの一つがコラーゲンⅢであることが示唆された。

本研究は、膵島分離における ColH の重要性とその対象マトリックスを明らかにし、さらに今後、膵組織におけるコラーゲンⅢを半定量化して、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高まる可能性があるという有意義な知見をもたらした。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。