

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26460527
 研究課題名(和文)細菌分子による宿主細胞外マトリックスの認識機構の解明と薬物シーズの探索・顕在化

 研究課題名(英文)Structure-function analysis of bacterial toxins in tissue destruction to apply their functional domains to regenerative medicine

 研究代表者
 松下 治(MATSUSHITA, Osamu)

 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

 研究者番号：00209537
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：人喰いバクテリアと呼ばれる細菌は、膠原線維を水解するコラーゲナーゼを産生して組織を侵襲する。本酵素は触媒ドメインの他にPKDドメインとコラーゲン結合ドメインを持つ。PKDはコラーゲンへの結合に関与しており、線維芽細胞成長因子をPKD-CBDを用いてコラーゲン基剤にアンカリングした骨新生誘導用の新規複合剤について特許を取得した。また、PKDの立体構造を決定してコラーゲン結合に関する分子基盤を解明した。

研究成果の概要(英文)：Flesh-eating bacteria produce collagenases to degrade collagen fibrils and to destruct the host tissue. The enzymes consist of a catalytic domain, PKD domain(s) (PKD), and collagen-binding domain(s) (CBD). Since PKD enhanced the binding of CBD to insoluble collagen, PKD-CBD region derived from a collagenase was used to anchor growth factors to collagenous matrix, e.g. high-density collagen sheet or demineralized bone matrix. These composite materials were utilized to induce osteogenesis at bone defect sites. 3D-structure of PKD was determined by X-ray crystallography, which gave an insight into the molecular basis of the collagen anchoring. Furthermore, dimeric CBD was shown to be an appropriate anchor for a synthetic collagenous matrix.

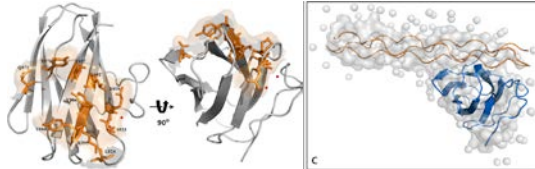
研究分野：基礎医学・細菌学

キーワード：細菌毒素 コラーゲン結合ドメイン 細胞外マトリックス 膠原線維 アンカリング 再生医療 骨新生 技術移転

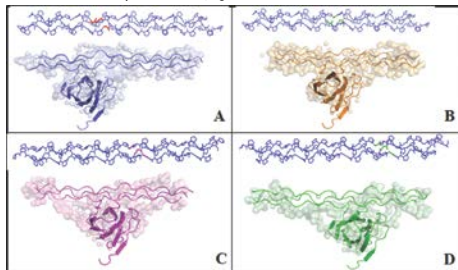
1. 研究開始当初の背景

(1) 宿主の組織には、三重らせん構造を持つコラーゲン分子が会合した不溶性の膠原繊維が豊富に含まれている。*Clostridium*属や*Bacillus*属などの組織侵襲性細菌は、コラゲナーゼを産生して膠原繊維を水解し感染巣を拡大する。本酵素群は三種のドメインからなり(J. Bacteriol. 176:149, 1994; ibid. 176:6489, 1994; ibid. 181:923, 1999; ibid. 181:2816, 1999; unpublished data)、C末端のコラーゲン結合ドメイン(CBD)はコラーゲンに特異的に結合する(J. Biol. Chem. 273:3643, 1998; ibid. 276:8761, 2001)。

C. histolyticum class I酵素(CoIG)由来のCBDは β -サンドイッチ構造をとり、片側の β -シートの中央で基質に結合する(下左図; EMBO J. 22:1743, 2003; FEBS J. 276:3589, 2009)。CBDに Ca^{2+} が結合すると、立体構造が変化してタンパク質が安定化し、基質結合能が向上する(J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23:505, 2012)。CBDはコラーゲン様ペプチドのらせん構造が緩んだC末端に結合する(下右図; J. Biol. Chem. 284:10868, 2009)。

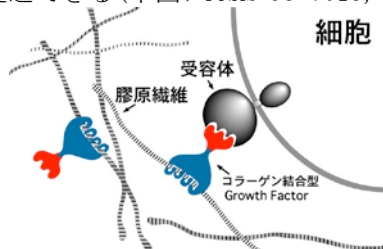


コラーゲン様ペプチドの中央部にらせん構造が緩んだ部位を導入すると、CBDはその部位に結合した。CBDはそのような部位を特異的に認識すると考えられる(下図; Protein Sci. 21:1554, 2012)。



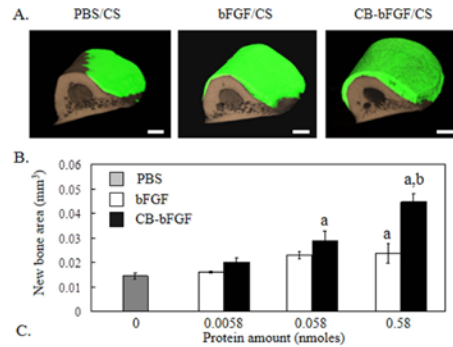
class II酵素(CoIH)由来のCBDは、CoIG由来CBDとアミノ酸配列の同一性は約30%と低いものの、全体の立体構造、 Ca^{2+} 結合機構、基質結合ポケットの構造は類似している(J. Bacteriol. 195:318, 2013)。

(2) CBDの膠原線維結合能を利用して、細胞成長因子等の生理活性物質を細胞外マトリックス(ECM)にアンカーリングし、持続的に細胞増殖を促進できる(下図; PNAS 95:7018, 1998)。

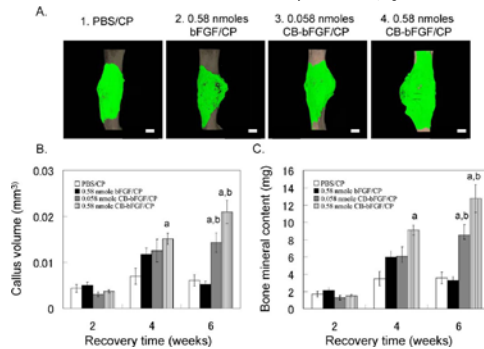


CoIH酵素C末端の、PKDドメイン(PKD)とCBDからなるアンカー領域を用いて塩基性線維芽

細胞増殖因子(bFGF)をコラーゲン基剤にアンカーリングし、骨新生を誘導する複合剤を開発した。本融合タンパク質を高密度コラーゲン膜(CS)または脱灰骨顆粒(DBM)に結合させ、これらをモデル動物の骨表面に移植したところ、何れの場合もコラーゲン結合型bFGF(CB-bFGF)は有意に高い骨新生誘導能を示した(下図; J. Biomed. Mater. Res. A. 102:1737, 2014)。



手術による移植が不要な複合剤として、注射可能なコラーゲン細粒にCB-bFGFを結合させた複合剤を作製した。骨折モデルを用いて骨新生誘導能を検討したところ、CB-bFGF群は有意に高い誘導能を示した(下図; J. Biomed. Mater. Res. A. 102:3049, 2014)。



2. 研究の目的

(1) CB-bFGFでは、マトリックス・アンカーとして*Clostridium*属細菌由来のコラゲナーゼの基質結合断片を用いてきた。この領域はコラーゲン結合ドメイン(CBD)に加えてPKD 1コピー(PKD2)を含む。PKDの構造解析を行い、コラーゲン基質への結合における本ドメインの機能について考察する。

(2) 他方で、技術移転においては生産性が高く抗原性が低い物質が有用となる。そこでPKDを欠くbFGF-CBDを生産し、その骨形成誘導能を検討する。

(3) コラーゲン-CB-bFGF複合剤の医薬品承認に必要な臨床試験に継ぐため、上述のProof of Conceptモデル、骨折モデルに加え、骨移植モデルを用いた前臨床研究を実施して基礎データを蓄積する。

(4) 複合剤の基剤として、動物由来材料から製造されたCS、DBM、またはコラーゲン細粒を用いてきた。このような基剤には、未知の病原体感染や免疫反応惹起の可能性がある。以前の研究で、CBDは合成コラーゲン様ペプチド(Pro-Hyp-Gly)₁₀三量体に結合することを示した。近年このペプチドのポリマー

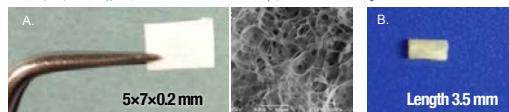
[(Pro-Hyp-Gly)₁₀]_{3n}が量産可能となった。合成ペプチドは原理的に病原体を含まず、抗原性を示すテロペプチドを欠いている。加えて物性がゲル状で骨折部位に容易に注入し得る。そこで、動物由来基剤に替えて本ポリマーを基剤とした複合剤を開発することを目的に、種々のコラーゲン・アンカーを持つCB-bFGFを作製して新規の骨新生複合剤を開発する。

3. 研究の方法

(1)マトリックス・アンカーの構造解析（特にPKDについて） 組換え大腸菌系を用いて *Clostridium histolyticum* class Iコラーゲナーゼ (ColG) のPKDと class IIコラーゲナーゼ (ColH) のPKD (PKD1およびPKD2)をGST融合タンパク質として生産し、タグを除去した後、X線結晶学的に立体構造を決定した。また、本ドメインの構造安定性に対するCa²⁺の効果について、Ca²⁺存在下と非存在下で結晶構造を検討するとともに、種々の濃度の塩酸グアニジン存在下で蛍光分光光度計を用いて分子内部のトリプトファン残基による蛍光強度を測定した。

(2) 基質結合におけるPKDの寄与に関する検討 生理活性物質をコラーゲン基剤にアンカリングするため、これまではColH酵素由来のPKDとCBDを含む領域をアンカーとして利用してきた。CBDは単独で膠原線維に結合することから、PKDをbFGF融合タンパク質から除去することで、生産性が向上し抗原性が低下すると期待された。そこで、bFGF-PKD2-CBDからPKD2ドメインを欠失させたbFGF-CBDをGST融合タンパク質として生産後、タグを除去して精製した。まず、*in vitro*で2種類のCB-bFGFの細胞増殖促進活性が同等であることを確認した。次に、骨折モデルを用いて高密度コラーゲン膜に各CB-bFGFをアンカリングした複合材の骨新生誘導能を検討した。マイクロCTを用いて経時的に新生骨量と骨塩量を測定した。

(3)コラーゲン結合性ヒト型生理活性物質の前臨床研究（骨移植モデルによる検討） Proof of Conceptモデル、骨折モデルに続き、骨移植モデルを用いてCB-bFGFとコラーゲン基剤を用いた複合剤の臨床応用について検討した。マウスの大腿骨骨幹部を3.5-mm長にわたって除去し、同種骨を移植して髓内釘で固定した。CB-FGFをアンカーした高密度コラーゲン膜を骨移植部に留置した。コラーゲンシートとその走査型電子顕微鏡像、および骨欠損部に移植した同種骨を示す。



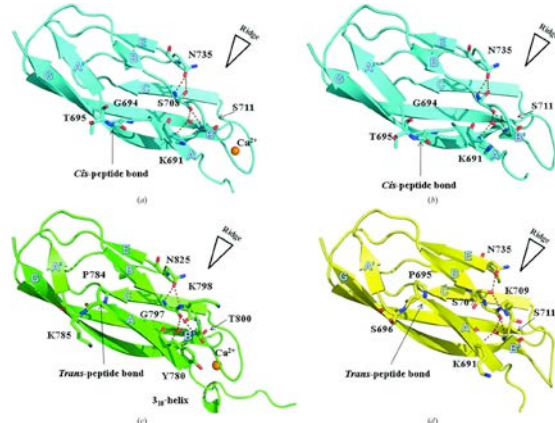
X線写真撮影により骨癒合を経時的に判定するとともに、マイクロCTを用いて新生骨量と骨塩量を経時的に測定した。

(4)コラーゲン結合性ヒト型生理活性物質の前臨床研究（合成ペプチド基剤による最適化） コラーゲン様合成ペプチド・ポリマー

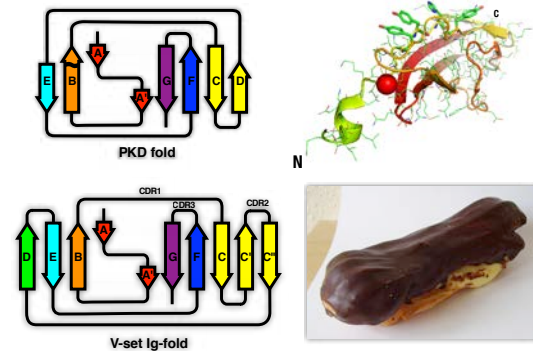
[(Pro-Hyp-Gly)₁₀]_{3n} は、株式会社PHGより購入した。 *C. histolyticum* ColG酵素由来のCBD 1ないし2コピーをアンカーとして持つbFGF融合タンパク質を、組換え大腸菌系を用いてGST融合タンパク質として生産し、タグを除去した後、骨折モデルを用いて新規複合剤の骨新生誘導能を検討した。マイクロCTを用いて新生骨量と骨塩量を経時的に測定するとともに、組織学的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) ColH由来のPKD1, PKD2とColG由来のPKDの構造を、Ca²⁺存在下と非存在下でX線結晶学的に決定した(下図)。



全体構造は免疫グロブリンのVドメインに類似していたが、2本のβストランド(C'', D)を欠いていた。βストランドA, Bには中断が見られ、この部位は尾根のように突出していた。ColH PKD2では、この部位の周辺に4つの芳香族アミノ酸残基が集簇して露出しており、この領域がコラーゲンへの結合に寄与すると考えられた(下図;全体構造をエクレーに例えれば、この領域はチョコレートコーディングに相当する)。



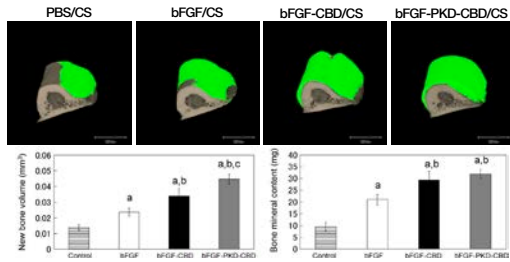
PKDにCa²⁺（上右図の赤色球）が結合すると、β-サンドイッチ構造が安定化した。

(2)これまでのCB-bFGFではコラーゲン・アンカーとしてColH由来のPKD2-CBDを用いてきた(下図左)。技術移転を念頭に、PKDを欠く融合タンパク質(bFGF-CBD)を作製した(下図右)。

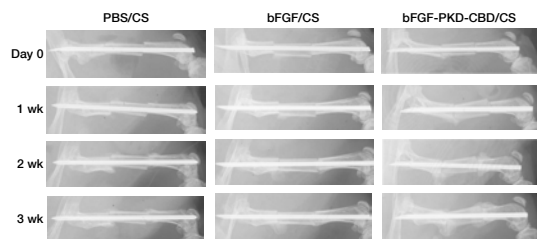


これらを高密度コラーゲン膜に結合させて骨膜上に移植し、骨新生誘導能を検討した。bFGF-PKD2-CBDはbFGF-CBDより高い骨新生誘

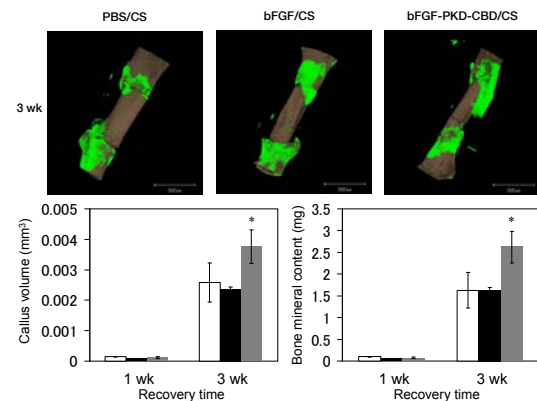
導能を示した。また、48時間後に膜上に残存した融合タンパク量は、bFGF-PKD2-CBDがbFGF-CBDより有意に多かった(下図)。この結果は、PKDがコラーゲンへの結合に寄与することを支持するものである。



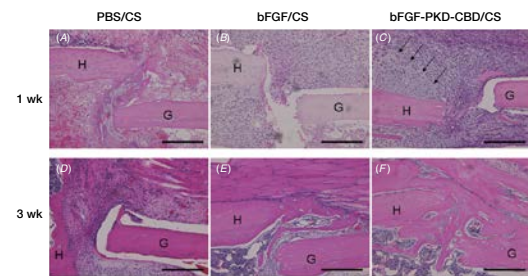
(3) マウスの大腿骨欠損部に同種骨移植を行った後、PBS, bFGF, またはbFGF-PKD2-CBDのいずれかを添加した高密度コラーゲン膜 (CS) を移植部位に留置した。3週間後、bFGF-PKD2-CBD群では対照およびbFGF群に比し大きな新生骨が形成された(下図)。



3DマイクロCT分析でも同様の結果が確認され、bFGF-PKD2-CBD群では新生骨量、骨塩量が有意に多かった(下図)。



白, PBS/CS; 黒, bFGF/CS; 灰色, bFGF-PKD2-CBD/CS 母床骨と移植骨の接合部をHE染色したところ、bFGF-PKD2-CBD群では組織学的な骨癒合を認めた(下図)。



G, 移植骨; H, 宿主骨; 矢印, 軟骨形成部位

(4) 新規のポリマー基剤 [(Pro-Hyp-Gly)₁₀]_{3n} は動物由来基剤とはbFGFの結合/遊離特性が

異なると考えられた。他方、細菌性コラゲナーゼのコラーゲン・アンカーはドメイン・シヤフリングによる多様性を示す。これを利用して種々のアンカーを有するCBD-bFGFを生産し、新規基剤への適合性を検討した。これまでのCol1H酵素由来アンカーを有する融合タンパク質 (bFGF-PKD2-CBD, bFGF-CBD) に加え、タンデム・リピートしたCBDを有するCol1G酵素由来のアンカーを持つ融合タンパク質 (bFGF-CBD1-CBD2, bFGF-CBD2) を作製した。

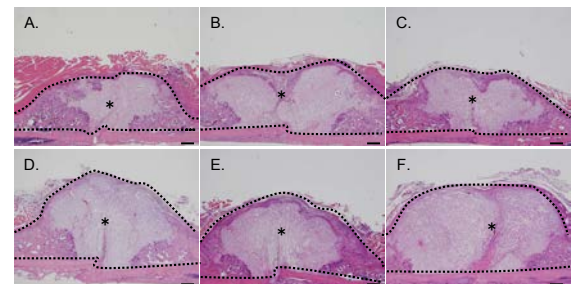
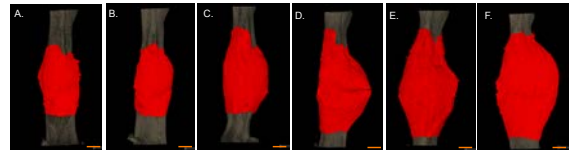
N bFGF CBD1 CBD2 C N bFGF CBD2 C

これらの融合タンパク質の *in vitro* における細胞増殖促進能は同等であった。しかし、コラーゲン様ペプチドに対する結合能はCol1G由来アンカーの方が高かった(下表)。

Table. Binding affinity of various collagen anchors to a collagenous peptide, H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂.

Collagen anchor	K _D (× 10 ⁻⁵ M)
CBD	75.2 ± 0.41
PKD-CBD	44.5 ± 0.55
CBD2	4.54 ± 0.15
CBD1-CBD2	4.46 ± 0.45

各融合タンパク質をポリマー基剤にアンカリングし、骨折モデルを用いて骨新生誘導能を検討したところ、Col1G由来タンデムCBDをアンカーとするbFGF-CBD1-CBD2群が他群に比し有意に高い骨新生誘導を示した(下図)。



A) PBS, B) bFGF, C) bFGF-CBD, D) bFGF-PKD2-CBD, E) bFGF-CBD2, and F) bFGF-CBD1-CBD2

展望: 膠原線維内には多数のトロポコラーゲン分子が積層している。病原細菌による膠原線維の加水分解と組織侵襲機構を明らかにするため、まず新規骨新生複合剤のコラーゲン・アンカーとして有用であることが明らかとなったCBDダイマー (CBD1-CBD2) とトロポコラーゲンとの結合様式を解明し、さらにPKDを含むコラーゲン・アンカー全体とトロポコラーゲンとの複合体の構造を明らかにする予定である。「人喰いバクテリア」による組織侵襲の全貌を俯瞰しつつ、得られた知見を今後もすみやかに知財として医療に活用したいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計11件)

- ① Inoue G, Uchida K, Matsushita O, Fujimaki H, Saito W, Miyagi M, Sekiguchi H, Nishi N, Ohtori S, Yogoro M, Takaso M. Effect of freeze-dried allograft bone with human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase on bone formation after lumbar posterolateral fusion surgery in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017; in press. 査読有
doi:10.1097/BRS.0000000000002074.
- ② Uchida K, Matsushita O, Nishi N, Inoue G, Horikawa K, Takaso M. Enhancement of periosteal bone formation by basic fibroblast-derived growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11(4):1165-1172. 査読有
doi: 10.1002/term.2019.
- ③ Fujimaki H, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Nemoto N, Saku T, Isobe Y, Inage K, Matsushita O, Yagishita S, Sato J, Takano S, Sakuma Y, Ohtori S, Takahashi K, Takaso M. Oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor promote peripheral nerve regeneration in a 15 mm sciatic nerve defect rat model. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105(1):8-14. 査読有
doi: 10.1002/jbm.a.35866.
- ④ Sekiguchi H, Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Saito W, Aikawa J, Tanaka K, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀ and basic fibroblast growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A*. 2016; 104(6):1372-1378. 査読有
doi: 10.1002/jbm.a.35670.
- ⑤ Saito W, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, Fujimaki H, Takaso M. Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen-binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. *J Orthop Surg Res*. 2015; 10:59. 査読有
doi: 10.1186/s13018-015-0201-0.
- ⑥ Bauer R, Janowska K, Taylor K, Jordan B, Gann S, Janowski T, Latimer EC, Matsushita O, Sakon J. Structures of three polycystic kidney disease-like domains from *Clostridium histolyticum* collagenases ColG and ColH. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2015; 71(Pt 3):565-577. 査読有
doi: 10.1107/S1399004714027722.
- ⑦ Ueno M, Uchida K, Saito W, Matsushita O, Yogoro M, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Inoue G, Tanaka K, Takahira N, Takaso M. Acceleration of bone union after structural bone grafts with a collagen-binding basic fibroblast growth factor anchored-collagen sheet for critical-size bone defects. *Biomed Mater*. 2014; 9(3):035014. 査読有
doi: 10.1088/1748-6041/9/3/035014.
- ⑧ Fukata Y, Itoh A, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Matsushita O, Nishi N. Direct cytotoxic effect of galectin-9 localized on collagen matrices on human immune cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(6):1892-1901. 査読有
doi:10.1016/j.bbagen.2014.01.019.
- ⑨ Saito W, Uchida K, Ueno M, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Fujimaki H, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(9):3049-3055. 査読有
doi: 10.1002/jbm.a.34974.
- ⑩ Katicaneni R, Ponnappakkam T, Matsushita O, Sakon J, Gensure R. Treatment and prevention of chemotherapy-induced alopecia with PTH-CBD, a collagen-targeted parathyroid hormone analog, in a non-depilated mouse model. *Anticancer Drugs*. 2014; 25(1):30-38. 査読有
doi: 10.1097/CAD.0b013e3283650bfff.
- ⑪ Uchida K, Matsushita O, Naruse K, Mima T, Nishi N, Hattori S, Ogura T, Inoue G, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of periosteal bone formation by human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(6):1737-1743. 査読有
doi: 10.1002/jbm.a.34841.

[学会発表] (計5件)

- ① Osamu Matsushita, Kentaro Uchida, Hiroyuki Sekiguchi, Takehiko Mima, Kazuyoshi Goto, Yumiko Yamamoto, Kenji Yokota, Masashi Takaso, Ryan Bauer, Joshua Sakon, Structural analysis of a matrix anchor in bacterial collagenase to develop a therapeutic to induce

osteogenesis. 第90回日本細菌学会総会、2017年3月19日、仙台国際センター展示棟（宮城県仙台市）

②濱本奈々、内田健太郎、関口裕之、美間健彦、後藤和義、山本由弥子、横田健治、高相晶士、松下 治、合成コラーゲン様基剤とコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子を用いた複合剤による骨形成促進法の開発、第89回日本細菌学会総会、2016年3月24日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）

③松下 治、内田健太郎、西 望、小出隆規、Joshua Sakon、細菌毒素の機能性ドメインを用いた新規再生医療用複合材料、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24日、あわぎんホール(徳島県徳島市)

④松下 治、美間健彦、後藤和義、山本由弥子、横田憲治、内田健太郎、Growth factor delivery based on substrate-binding domains derived from a clostridial collagenase. 第88回日本細菌学会総会、2015年3月27日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

⑤松下 治、美間健彦、山本由弥子、後藤和義、西 望、小出隆規、内田健太郎、高相晶士、他5名、ガス壊疽菌コラゲナーゼの基質結合ドメインと再生医療への応用（第2報）、第61回トキシシンポジウム、2014年9月5日、ルネッサンスリゾートナルト(徳島県鳴門市)
〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

① 名称：Collagen-binding agent compositions and methods of using same
発明者：Ryan Bauer, Kataryna Janowska, Keisuke Tanaka, Jeffery Roeser, Osamu Matsushita, Kentaro Uchida, Joshua Sakon
権利者：The board of trustees of the University of Arkansas, Kitasato University
種類：特許

番号：United States Provisional Patent Application 62/457,410
出願年月日：2017年2月10日
国内外の別：外国

②名称：神経再生用移植材料、神経再生用移植材料の製造方法、及び神経再生用移植材料製造用キット

発明者：内田健太郎、井上玄、藤巻寿子、高相晶士、佐久太郎、磯部仁博、松下 治、美間健彦、西 望、服部俊治、田中啓友、小倉孝之

権利者：学校法人北里研究所、国立大学法人香川大学、株式会社アトリー、株式会社ニッピ

種類：特許
番号：PCT/JP2015/079334

出願年月日：2015年10月16日
国内外の別：外国

③名称：神経再生用移植材料、神経再生用移植材料の製造方法、及び神経再生用移植材料

製造用キット

発明者：内田健太郎、井上玄、藤巻寿子、高相晶士、佐久太郎、磯部仁博、松下 治、美間健彦、西 望、服部俊治、田中啓友、小倉孝之

権利者：学校法人北里研究所、国立大学法人香川大学、株式会社アトリー、株式会社ニッピ

種類：特許

番号：特願2014-212085

出願年月日：2014年10月16日

国内外の別：国内

○取得状況（計2件）

① 名称：Fusion proteins of collagen-binding domain and parathyroid hormone
発明者：Robert C. Gensure, Joshua Sakon, Osamu Matsushita, Tulasi Ponnakkam

権利者：Ochsner Clinic Foundation, National university corporation Kagawa University, The board of trustees of the University of Arkansas

種類：特許

番号：US9,528,099

出願年月日：2015年6月18日

取得年月日：2016年12月27日

国内外の別：外国

②名称：コラーゲン結合領域と副甲状腺ホルモンとの融合タンパク

発明者：松下 治、ジェンシュア ロバート シー、サコン ジョシュア、ポンナパッカム トウラシ

権利者：ザ ボード オブ トラストィーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ アーカンソー、国立大学法人 香川大学、オクスナー クリニック ファウンデーション

種類：特許

番号：特許第5989876号

出願年月日：2015年9月3日

取得年月日：2016年9月7日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/saikin/6>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 治 (MATSUSHITA, Osamu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00209537

(2) 研究分担者

内田 健太郎 (UCHIDA, Kentaro)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50547578

美間 健彦 (MIMA, Takehiko)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80596437

(3) 研究協力者

SAKON, Joshua

University of Arkansas・Fulbright college of Arts and Sciences, Chemistry and Biochemistry Department・Professor