

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20015

研究課題名(和文)細菌分子によるマトリックスアンカー機構を応用した骨折治癒促進シーズの実用化研究

研究課題名(英文)Acceleration of fracture healing by growth factor fused with tandem collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase

研究代表者

内田 健太郎 (Uchida, Kentaro)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50547578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン結合型bFGF(CB-bFGF)による骨形成促進法を最適化するために異なるコラーゲンアンカーを有する4種類のCB-bFGF(bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b, bFGF-s3a-s3b)を作製し検討を行った。その結果、クロストリジウムヒストリチカムコラゲナーゼCoIG由来のコラーゲン結合ドメインを二つ有するs3a-s3bが最も高いコラーゲン結合性を有していた。そこで、bFGFとs3a-s3bの融合タンパクを作製し、人工コラーゲンとともにマウス骨折モデルに投与した結果、bFGF-s3a-s3bが高い骨形成促進能を有していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We examined the binding affinity of four collagen anchors derived from the two clostridial collagenases to H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)<sub>12</sub>-NH<sub>2</sub>, a collagenous peptide, by surface plasmon resonance and found that tandem CBDs (s3a-s3b) have the highest affinity for the collagenous peptide. We also constructed four fusion proteins consisting of bFGF and s3 (bFGF-s3), s2b-s3b (bFGF-s2b-s3), s3b (bFGF-s3b), and s3a-s3b (bFGF-s3a-s3b) and compared their biological activities to those of a previous fusion construct (bFGF-s2b-s3) using a cell proliferation assay in vitro and a mouse femoral fracture model in vivo. Among these CB-bFGFs, bFGF-s3a-s3b showed the highest capacity to induce mesenchymal cell proliferation and callus formation in the mice fracture model. The poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s3a-s3b construct may therefore have the potential to promote bone formation in clinical settings.

研究分野：整形外科

キーワード：骨折治癒促進 コラーゲン結合型成長因子 コラーゲン結合ドメイン

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い骨折患者数は年々増加している。高齢者における骨折は脳血管疾患、高齢による衰弱に次ぐ寝たきり原因の3位である。寝たきりは認知症や肺炎、褥瘡など、重篤な合併症を引き起こすことから、高齢者の骨折治療は極めて重要である。申請者は、細菌性コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインをアンカーにもつコラーゲン結合型成長因子とブタ型アテロコラーゲン材料の併用により局所の骨形成促進に成功した。さらに、高齢者を模擬したマウス骨折モデルの骨折治癒促進に成功した。一方、狂牛病の蔓延をきっかけに、動物組織から抽出したコラーゲンの安全性が疑問視されはじめた。

### 2. 研究の目的

本研究では、シーズ実用化を見据え、コラーゲンに特徴的なアミノ酸配列(プロリン、ヒドロキシプロリン、グリシン)を有する人工コラーゲン poly(Pro-Hyp-Gly)10 を担体とした骨折治癒促進法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### コラーゲン結合型成長因子の作製

クロストリジウムヒストリティカム由来コラゲナーゼ Col H, Col G に存在するコラーゲン結合ドメイン(CBD)、PKD ドメインと bFGF の融合タンパクを4種類 (bFGF-s3、bFGF-s2b-s3、bFGF-s3b、bFGF-s3a-s3b) を作製した。

#### 円偏光二色性

poly(Pro-Hyp-Gly)10 の形態的特徴を明らかにするために、円偏光二色性(CD)を用いた。poly(Pro-Hyp-Gly)10 を4-5 mM 酢酸溶液中で24時間透析を行った。15分間の遠心後CD分析前に0.1 mg/ml 濃度に調節した。20と80 nm において、波長190-250 nm の円偏光二色性スペクトルをCDスペクトロスコープ(JASCO Corporation, Tokyo, Japan)を用いて測定した。コントロールとして、ペプシン可溶性ウシ型コラーゲンを用いて、20と50 nm において、円偏光二色性スペクトルを行った。また、poly(Pro-Hyp-Gly)10 とペプシン可溶性ウシ型コラーゲンの波長220 nm でのモル楕円率を測定した。

#### コラーゲン結合性試験

BIACORE 装置(Biacore, Uppsala, Sweden)を用いてコラーゲンアンカー(s3a-s3b, s3b, s2b-s3, s3)とコラーゲン様ミニペプチドの結合性を検討した。

#### 細胞増殖試験

10週齢雄性 Wistar rats の大腿骨遠位から骨膜を採取した。採取した骨膜は0.2% 型コラゲナーゼ溶液中で37℃ 2時間酵素処理を行った。酵素処理後の細胞懸濁液をセルストレーナーで濾過し、骨膜細胞(PMCs)を得た。PMCs を6well plate に播種後、10%ウシ胎児

血清を含む -minimum essential medium(-MEM)培地も用いて37℃、7日間培養した。7日後、0.25% トリプシン-EDTA 溶液で処理し、得られた PMCs(1.25×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>)を96-well plates 上(BD Falcon, NJ, USA)で-MEM 培地を用いて培養した。濃度が0(コントロール), 0.1 pM, 1 pM, 10 pM である bFGF, bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b, bFGF-s3a-s3b で PMC s 細胞を刺激し、細胞増殖活性を WST-8 kit(Nacalai Tesque, Tokyo, Japan)を用いて評価した。

#### 大腿骨骨折モデル作成

4種類のコラーゲン結合型 bFGF の最適化の実験を行った。すべての手技は北里大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。9週齢雄性 C57/BL6J マウスを用いて骨折モデルを作成した。骨折モデルを作成後、骨折部には、リン酸緩衝液(PBS コントロール)、0.058 nmoles bFGF(0.058 nmoles poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF)、0.058 nmoles bFGF-s3(0.058 nmoles poly(Pro-Hyp-Gly)10 /bFGF-s3)、0.058 nmoles bFGF-s2b-s3(0.058 nmoles poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s2b-s3)、0.058 nmoles bFGF-s3b(0.058 nmoles poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3b)、0.058 nmoles bFGF-s3a-s3b(0.058 nmoles poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b)を添加した。(各 n=8)

#### 新生骨量と骨塩量の測定

マウスは4週で屠殺後、大腿骨を4%パラホルムアルデヒドで固定した。μ-CT(inspeXio SMX-90CT; ShimaDzu, Tokyo, Japan)を用いて大腿骨の撮影を行った。撮影条件は、acceleration voltage, 90 kV; current, 110 mA; voxel size, 1024×1024とした。解析範囲は大腿骨中央から10 mmの範囲とした。撮影後、CV、BMC を3D イメージ解析ソフト(Tri-3D-Bon; Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan)を用いて行った。300 mg/cm<sup>3</sup> の骨密度を持つ骨を新生骨と定義した。

#### 組織学的評価

poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b の骨形成促進メカニズムを調べるために、組織学的検討を行った。各群(PBS, poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF, poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3, poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s2b-s3, poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3b, poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b)で、大腿骨骨折モデルを作成後、2週後に屠殺し、大腿骨を採取した。20%EDTA 溶液で28日間脱灰を行った。脱灰、パラフィン包埋後に薄切切片を作成し HE 染色を行った。

#### 統計学的評価

新生骨量と骨塩量の比較には、一元配置分散分析、多重比較(Fisher's LSD 法)検定を用いた。P 値が0.05 以下を有意差ありとした。

統計解析ソフトは SPSS Ver 11 (IBM, Cicago, America) を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 円偏光二色性

CD スペクトルの結果では、ペプシン可溶性ウシ型コラーゲンで 20 において、コラーゲンに特徴的な特徴的な 220 nm 付近で極大がみられた。50 で処理すると、220 nm 付近の極大は消失した。一方、poly(Pro-Hyp-Gly)10 では、80 で処理しても、220 nm 付近での極大は、消失しなかった。このことから、poly(Pro-Hyp-Gly)10 は高い熱耐性を持つことが示唆された。

##### コラーゲン結合性試験

4 種類のコラーゲンアンカー (s3a-s3b, s3b, s2b-s3, s3) とコラーゲン様ミニペプチド (H-Gly-Pro-Gly-(Pro-Hyp-Gly)12-NH<sub>2</sub>) の解離係数を表面プラズモン共鳴を用いて測定した。s2b-s3 は s3 よりも解離係数が低かった。また、ColG アンカー (s3a-s3b, s3b) は ColH アンカー (s2b-s3, s3) に比べて、約 10 倍解離係数が低かった。以上より、ColG アンカーは ColH アンカーよりも強固にコラーゲンペプチドと結合することが示唆された。

##### 細胞増殖試験

4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の生物学的活性を調べるために、ラット骨膜細胞増殖試験を行った。0.1 pM では bFGF-s3a-s3b を添加した群ではコントロール群 (-MEM) に比較して有意に PMCs の増加を認めた。一方、bFGF, bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b を添加した群では明らかな増加を認めなかった。1, 10 pM では bFGF, 4 種類のコラーゲン結合型 bFGF とともに、コントロール群 (-MEM) に比較して有意に PMCs の増加を認めた。

##### 投与後の新生骨量と骨塩量

作製した 4 種類のコラーゲン結合型 bFGF 群はコントロール群 (PBS 群) に比較して、新生骨量、骨塩量ともに有意に高値を認めた。また、poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3b 群、poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b 群は poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF 群よりも新生骨量が有意に高かった。poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b 群は新生骨量、骨塩量ともに全群と比較して有意に高値を認めた。

##### 組織学的評価

poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b の新生骨形成効果のメカニズムを調べるために、骨折後 2 週での組織学的評価を行った。【図 9】 poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3 群、poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s2b-s3 群、poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3b 群でコントロール群と比較して大きな仮骨形成を認めた。

poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b 群は他群に比較して最も大きな仮骨形成を認めた。poly(Pro-Hyp-Gly)10/bFGF-s3a-s3b 群が最も軟骨形成を促進することが示唆された。

poly(Pro-Hyp-Gly)10 は高い熱耐性を持つことが分かった。また、ColG 由来の CBD を二つ有する tandem CBD (s3a-s3b) は高いコラーゲン結合活性を有していた。さらに、bFGF-s3a-s3b は高い細胞増殖活性と骨形成促進能を有することが明らかになった。本研究結果から poly(Pro-Hyp-Gly)10/ tandem CBD (s3a-s3b) は動物由来コラーゲンをを用いない新規骨形成促進法として有用である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Sekiguchi H, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Masuda R, Hamamoto N, Koide T, Shoji S, Takaso M. Basic fibroblast growth factor fused with tandem collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase ColG increases bone formation. *BioMed Res Int*, 2018 : 8393194, 2018. doi: 10.1155/2018/8393194. (査読有)
2. Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Horikawa K, Sekiguchi H, Saito W, Takano S, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M. Basic fibroblast growth factor-anchored multilayered mesenchymal cell sheets accelerate periosteal bone formation. *BioMed Res Int*, 2017:4371469, 2017. doi: 10.1155/2017/4371460. (査読有)
3. 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*, 11(4):1165-1172, 2017. doi: 10.1002/term.2019. (査読有)
4. 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*, 42(17):E995-E1001. doi:

- 10.1097/BRS.0000000000002074. (査読有)
5. 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)<sub>10</sub> and basic fibroblast growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. J Biomed Mater Res A, 104(6):1372-8, 2016. doi: 10.1002/jbm.a.35670. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 関口裕之、内田健太郎、井上玄、宮城正行、相川淳、高野昇太郎、名倉直重、中脇充章、庄司真太郎、大貫裕子、高相晶士. 難治性骨折に対する新規コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子/人工コラーゲン複合体の有用性の検討. 第32回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017年10月26-27日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県那覇市)
2. 関口裕之、内田健太郎、井上玄、高相晶士. 新規コラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨形成法の開発. 第36回日本運動器移植・再生医学研究会, 2017年9月29-30日, 京都ホテルオークラ(京都府京都市)
3. 関口裕之、内田健太郎、井上玄、相川淳、齊藤亘、宮城正行、松下治、藤巻寿子、高野昇太郎、名倉直重、高相晶士. 新規コラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨形成促進法の開発. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016年10月13-14日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称 : COLLAGEN-BINDING AGENT COMPOSITIONS AND METHODS OF USING THE SAME

発明者 : Joshua Skaon, Jeffery Rosser, Katarzyna Janowska, Ryan Bauer, Kentaro Uchida, Msamu matsushita, Keisuke Tanaka.

権利者 : Kitasato University, University of Arkansas

種類 : 特許

番号 : 62/457,410

出願年月日 : 2017年2月10日

国内外の別 : 国外

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 健太郎 (UCHIDA, Kentaro)

北里大学・医学部・講師

研究者番号 : 50547578