

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07111

研究課題名(和文)細菌性コラゲナーゼによる基質認識機構の解明と血管新生薬物シードへの展開

研究課題名(英文)Elucidation of substrate recognition mechanism of bacterial collagenases to develop angiogenic drug seeds

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性物質を細菌性コラゲナーゼのアンカー・モジュールと融合してコラーゲン基剤や組織膠原線維に結合させ、組織修復能を局所で長期間発揮させることで骨新生を誘導できた。本研究では、1) 複数のドメインよりなるアンカー・モジュールがどのように膠原線維に結合するかを明らかにした。2) 歯周病による歯槽骨欠損モデルを用いて、コラーゲン結合性線維芽細胞増殖因子(CB-bFGF)固相化コラーゲンを欠損部に充填して歯槽骨や歯周組織の再生を誘導できることを示した。3) 神経欠損モデルを用いて、生分解性外鞘にコラーゲンが充填された医療機器にCB-bFGFをアンカリングし、神経再生を誘導できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌は様々な機能性ドメインを進化させ、時には真核細胞から遺伝子の水平伝播により機能性ドメインを獲得して、多様な環境で生存してきた。細菌性コラゲナーゼに着目し、2種類の機能性ドメインよりなる基質アンカーの構造と機能の関係を明らかにした。また、細菌の機能性ドメインを生理活性物質と融合することで、歯科領域の歯槽骨や歯周組織の欠損や整形・形成外科領域の神経欠損に対する組織再生用複合材を創出した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial collagenases are composed of a catalytic module and an anchor module. Fibroblast growth factor (CB-bFGF) was fused with the anchor module to exert local tissue regeneration, e.g. osteogenesis, by binding to collagen matrix or tissue collagen fibrils. In this study, we successfully 1) showed how the multi-domain anchor module binds to collagen fibrils, 2) demonstrated that CB-bFGF-collagen matrix can induce osteogenesis using an alveolar horizontal bone defect model simulating periodontal disease, 3) showed that CB-bFGF can induce nerve regeneration by anchoring CB-bFGF and medical device filled with collagen in the lumen of a biodegradable outer sheath using a nerve defect model.

研究分野：細菌学

キーワード：ガス壊疽菌群 細菌性コラゲナーゼ 基質アンカー・モジュール 構造活性相関 歯槽骨再生 神経再生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

膠原線維は、三重らせん構造を持つトロポコラーゲンが会合した不溶性構造物であり、通常のプロテアーゼでは水解されない。組織侵襲性細菌は、宿主感染時にコラゲナーゼを産生し、膠原線維を水解して感染巣を拡大する。細菌性コラゲナーゼ(Clan M9)は、C末側にコラーゲン結合ドメイン(CBD)を有し、効率よく膠原線維を水解する。細菌性コラゲナーゼの典型例である*Clostridium histolyticum*由来ColG酵素のCBDはβ-サンドイッチ構造をとり(図1上)、片側のβ-シート中央部に基質を結合した(図1上)。CBDは、Ca²⁺により構造が安定化し、溶液中でペプチド基質の末端に結合した(図1下)。これは、CBDがコラーゲンの三重らせん構造が緩んだ部位を選好するためと考えられる。下記の薬物シリーズに用いたColH酵素のCBDも同様の構造と機能を有していた。

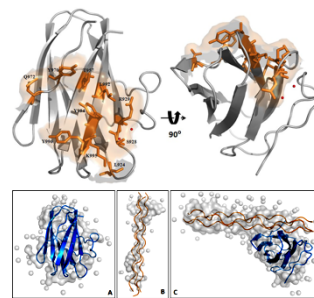


図1 CBDの構造とコラーゲンへの結合

本酵素群の触媒ドメイン(CD)とCBDの間には、PKDドメイン(PKD)が存在する。本ドメインは、ヒトの多発性嚢胞腎の主要原因因子Polycystin 1 (PKD1)でリピートしたドメインと相同であり、遺伝子の水平伝播により獲得したと考えられる。PKD-CBDはCBD単体より高いコラーゲン結合能を示したので、PKDも基質結合に寄与すると考えられる。そこで、ColGおよびColHのPKDの構造をX線結晶学的に決定した。いずれも免疫グロブリンのVDドメインに類似し、ストランドAとBの中断部が尾根状に突出していた。薬物シリーズに用いたPKDでは、突出部周辺に4つの疎水性アミノ酸残基が集簇して露出しており(図2)、この領域が基質結合に寄与すると推察された。しかし、PKDとCBDが協働して不溶性基質に結合し、不溶性基質の加水分解を加速する分子機構は未だ不明であった。[研究協力者 Joshua Sakon博士との国際共同研究]

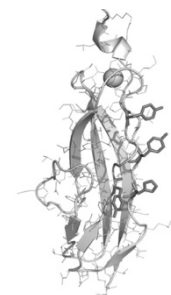


図2 PKDの構造(露出した疎水性残基を示す)

成長因子は強い生理作用を示すものの、速やかに拡散し代謝されるため、医薬としての応用が困難であった。塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)をコラゲナーゼColHのアンカー・モジュール(PKD-CBD)と融合して細胞外マトリクスにアンカリングすることで(図3)、持続的に細胞増殖を促進できた。臨床応用を目指して、次の橋渡し研究を行った。

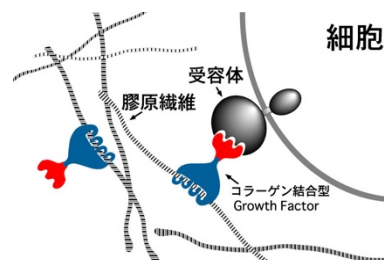


図3 成長因子のマトリクス・アンカリング

1. 骨欠損や重症骨折の治療剤の開発 bFGF-PKD-CBD融合タンパク質(コラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子, CB-bFGF)をコラーゲン基剤にアンカリングし、外科的処置または局注により骨膜近傍に移植することで、間葉系幹細胞の分化増殖を促進し骨新生を誘導できた。また、アンカーとしてPKD-CBDを用いた複合剤は、CBD単体を用いた場合よりも強い骨新生誘導能を示した(図4)。この複合剤は、骨欠損部位への骨移植や難治性骨折の治療に有用な薬物シリーズと考えられる。[研究分担者 内田健太郎博士との共同研究]

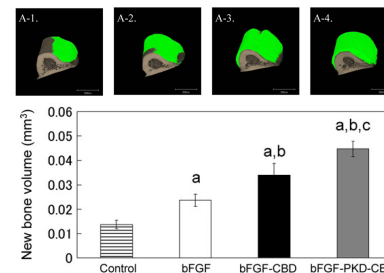


図4 薬物送達におけるPKDの機能

2. 歯周組織の再生剤の開発 歯周病の治療では、歯周組織の再生が課題となっている。口腔内では、治療剤が拡散しやすく、感染リスクも高いため、整形外科領域の骨新生より困難な課題である。ラット病態モデルを用いてCB-bFGFと細粒状コラーゲンからなる複合剤による歯槽骨再生を検討したところ、CB-bFGF群はbFGF群に比し高い歯槽骨再生を示す予備データが得られた。[高柴正悟博士らとの共同研究]

2. 研究の目的

膠原線維は、多数のトロポコラーゲン分子が会合した束(バンドル)構造からなる。細菌がこの不溶性基質を水解するためには、バンドルから1本のトロポコラーゲンを単離し、その三重らせん構造を緩めて、らせん構造に埋没したペプチド結合を切断する反応を順次効率よく行う必要がある。*Bacillus*属菌や*Clostridium*属菌のコラゲナーゼは、M9メタロプロテアーゼである触媒ドメインに、CBDを付加し、水平伝播によりPKDを得て、これらの機能を獲得したと考えられる。

基礎研究では、マルチドメイン化により膠原線維へ結合を最適化したアンカー・モジュールの分子機構を解明し、組織侵襲性細菌の「人喰い」戦略を理解することを目指した。殊に、PKDドメインが不溶性基質へのアンカリングと加水分解に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

トランスレーショナル・リサーチでは、まず整形外科領域で培ったコラーゲン結合型bFGFとコラーゲン基剤の複合剤を用いた再生治療を、歯科領域で歯周病による歯槽骨欠損に展開することを目指した。この領域では、口腔細菌が存在する開放創で複合剤の有用性を発揮させなければならないことが障壁となると予想された。次に整形・形成外科領域での組織欠損に対して有用な血管再生用治療剤、神経欠損に対して有用な神経再生用治療剤を開発することを目指した。この領域では、間葉系組織とは全く異なる神経組織を再生させることに大きな障壁が予想された。

3. 研究の方法

1) アンカー・モジュールと基質の相互作用に関する分子論的解析

CBD1-CBD2の構造決定 *C. histolyticum* ColG酵素由来のCBD1, CBD2, CBD1-CBD2, PKD-CBD1-CBD2を従前の方法によりグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質として発現・精製した。ハイスループットスクリーニングによりCBD1-CBD2の結晶化条件を探索し、ハンギング・ドロップ法により結晶化を試みた。21-26%のポリエチレングリコール3350, 0.1 M HEPES (pH 7.5), 3 mM CaCl₂の存在下で斜方晶系結晶が得られ、格子定数は、a = 51.5 Å, b = 54.7 Å, c = 92.0 Åであった。この結晶は極低温に耐えなかったため、室温で理学007ジェネレーターを用いて分解能1.9 Åの回折データを収集した。データセットをd*TREKで処理した後、CCP4パッケージの分子置換プログラムMolRepを用いて、CBD2 (PDB code 2O80)を検索モデルとして構造を解析した。非対称単位で2つの分子置換解が得られた。Refmac.6.1.13を用いてCBD1-CBD2の構造の精密化を行い、各精密化サイクルの間にMIFitを用いて手動で調整を行った。

小角X線散乱(SAXS)による基質-アンカー複合体の構造解析 Native-PAGEを用いてSAXS測定に適する緩衝条件を検討した。ミニコラーゲン[(POG)₁₀]₃は5 mg/mlとなるよう10 mM酢酸に溶解して4°Cで一晩インキュベートした。PKD-CBD1-CBD2は50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ (pH 7.5)に溶解した。これらの溶液を等量混和し、4°Cで一晩インキュベートした後、種々のpCa緩衝液[10 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2%グリセロールからなる基礎緩衝液にpCa値が3, 4, 5, 6になるようCaCl₂とEGTAを添加した緩衝液]で平衡化した。サンプルごとに3種の濃度でSAXS測定を行った。最後の透析液を用いて背景散乱を得た。同様に[(POG)₁₀]₃とCBD1-CBD2の複合体について解析した。小角散乱データは、Berkeley National LabのAdvanced Light Source (SIBYLSビームライン 12.3.1)においてPilatus 2M検出器を用いて10°Cで収集した。試料検出器間の距離は1.5 m、X線波長は1.127 Åであった。ATSAS 2.6.1 (pCa解析)またはATSAS 2.8.0パッケージのPRIMUSQTを用いてデータ処理を行った。CHI-MERAのMOLMAPを用いてエンベロープを生成した。散乱データの視覚化と初期分析にはPRIMUSQTを使用した。KratkyプロットとPorod-Debyeプロットにより、タンパク質の柔軟性を分析した。

アンカーのコラーゲン線維形成への影響 CBD1-CBD2, CBD1, CBD2がコラーゲンの線維化に与える影響を調べた。I型コラーゲン溶液を氷上で40 mM HEPES (pH7.5), 300 mM NaCl, 2 mM CaCl₂緩衝液で希釈し、終濃度を0.5 mg/ml (1.7 μM)とした。コラーゲン溶液にCBDを種々のモル比で添加した後、マイクロプレートリーダーを用いて37°C、1分間隔で520 nmの濁度を測定して、線維化を評価した。

細菌性コラーゲナーゼのドメイン構成と系統樹作成 blastpサーバーを用いて、*Clostridium*属菌のコラーゲナーゼの3種類のドメイン; CM (Catalytic module), PKD (Polycystic kidney disease-like domain), CBD (Collagen-binding domain)を同定した。PKDとCBDのコピー数は、それぞれ0~2, 1~3であった。これらの酵素の進化的関係を調べるために、CMのアミノ酸配列からインデルのある位置を除いて系統樹を作成した。

アンカーの構造に対するCa²⁺の影響 高速液体クロマトグラフィー法によりSuperdex 75カラム (1 x 30 cm)を用いて室温で0.5 ml/minの流速で見かけの分子量を測定した。

2) 前臨床研究1: 歯周病による歯槽骨欠損に対する複合材の治療効果の検討

動物と被験物質 疾病モデルとしてSprague-Dawleyラット(雄、10週齢から12週齢)を用いた。岡山大学動物実験指針に基づき、岡山大学動物実験委員会の承認(承認番号: OKU-2017054)を得て行った。ヒトbFGFは、Miltenyi Biotec社から購入した。コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF-PKD-CBD, CB-bFGF)は、既報の方法で生産・精製した。

細胞増殖アッセイ ラットの歯根膜組織を採取し、コラーゲナーゼとディスパーゼで60分間処理後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。2% FBSを含むαMEMを用いて3~5回継代した後、96ウェルプレートに1.0 × 10³個/ウェルの密度で播種した。5時間培養した後、bFGFまたはCB-bFGFを種々の濃度で添加した。72時間後にWST-8アッセイを行い、細胞増殖を評価した。

コラーゲン結合アッセイ 0.4 nmolのbFGFまたはCB-bFGFを5 mgのコラーゲン・パウダー(CP)と混合し、4°Cで30分間インキュベートした。CPに結合しなかったタンパク質を含む上清を、SDS-PAGEにより分析した。

コラーゲンシート(CS)の蛍光標識タンパク質保持力の検討 bFGFまたはCB-bFGFを50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ (pH7.5)で6 μMの濃度に調製し、10 μlの1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphineを加え37°Cで30分間インキュベートした。その後、1 mM蛍光色素を10 μl添加し、4°Cで一晩インキュベートした。未反応の色素はスピニングカラムを用いて除去した。5 × 5 × 2 mm (縦 × 横 × 厚)のCSを標識bFGFまたはCB-bFGF (0.58 nmol)溶液に30分間浸漬した。これらのCSを1mLのαMEMを含む12ウェルプレートに入れ、0, 1, 3, 5, 10, 14日後にIVISシステムを用いて蛍光イメージング解析によりタンパク質の保持を検討した。骨欠損モデル ラット上顎第一大臼歯の内側から第二大臼歯の遠位部まで歯肉を切開・剥離した後、歯槽骨に水平骨欠損を作製した。コラーゲンパウダー(CP, 5 mg)と0.58 nmolのbFGFまたはCB-bFGFの複合剤を欠損部に塗布し、手術部位を8-0ナイロン糸で縫合した。4週間後と8週間後にマイクロCTおよび組織学的に骨形成を評価した。

骨量および骨塩量の定量 ラット上顎骨を摘出し、4%リン酸緩衝パラホルムアルデヒドで固定した。加速電圧90 kV、電流110 mA、ボクセルサイズ20 μm/pixel、マトリクスサイズ1,024 × 1,024の条件で骨欠損部のマイクロCT画像を取得した。第一大臼歯と第二大臼歯の接触点から第一大臼歯の内側までの2.4 mmを関心領域(120スライス)とした。口蓋骨のベースラインと歯根に沿って歯冠に向けて引いた垂線で囲まれた領域の骨量と骨塩量を、3次元画像解析ソフトを用いて測定した。

組織学的解析 組織を固定後、10%ギ酸を用いて10日間脱灰し、パラフィン包埋した。骨欠損部の切片をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、またはアザン染色した。HE染色では、画像解析ソフトを用いて新生骨の面積を定量した。骨新生部は、皮質骨の手術断端を基準とし、海綿体と骨髄が確認された領

域と定義した。各サンプルについて50 μmごとに3枚の切片を作成し、平均値を算出した。アザン染色では、画像解析ソフトを用いて上皮接着の長さを測定した。

免疫組織化学的解析 アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合法を用いた。切片をキシロールで脱パラフィンし、0.3% H₂O₂/メタノールに浸漬し、トリプシンで抗原を活性化した後、正常血清溶液でブロッキングした。一次抗体として抗オステオカルシン抗体(1:500)、抗増殖細胞核抗原(PCNA)抗体(1:100)、抗オステオポンチン抗体(1:100)を用い、4°Cで一晩反応させた。二次抗体である抗ウサギ抗体を1:200に希釈し、25°Cで30分間反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を用いて室温で30分処理した後、0.02% H₂O₂を含むジアミノベンジジン溶液で処理した。ヘマトキシリンで対比染色した後、新生骨と歯根表面周囲にある陽性細胞の数を光学顕微鏡を用いて計測した。

3) 前臨床研究2: 神経欠損の治療効果の検討

神経導管 ポリグリコール酸-コラーゲン(PGA-c)チューブ(Nerbridge™, 東洋紡)は、生分解性ポリグリコール酸製のチューブに医療用コラーゲンを充填したものである。

神経導管の作製 神経導管(16-mm長)をPBS (PGA-c/PBS), 0.58 nmoles bFGF/PBS (PGA-c/bFGF), 0.58 nmoles bFGF-PKD-CBD/PBS (PGA-c/bFGF-PKD-CBD)に4°Cで30分間浸漬した。12,000xgで10分間遠心した後、ELISA法により上清中のタンパク量を測定し、PGA-c中のbFGFおよびbFGF-PKD-CBDの量を推定した。

動物実験 北里大学動物倫理委員会の承認(承認番号.2017-101)に沿って実施した。8週齢のSprague Dawleyラット(雄、体重270~300 g)を用いて15-mmの坐骨神経欠損モデルを作製した。PGA-c/PBS群、PGA-c/bFGF群、PGA-c/bFGF-PKD-CBD群、無処置対照群にランダムに割り付けた。PGA-c/PBS群、PGA-c/bFGF群、PGA-c/bFGF-PKD-CBD群のラットは、PBS、bFGF溶液、bFGF-PKD-CBD溶液に浸漬したPGA-cチューブを用いて神経欠損を修復した。坐骨神経の遠位および近位の断端を、9-0ナイロン縫合糸を用いて6か所で縫合した。

行動評価 CatWalkシステムを用いて、ラットの歩行を解析した。このシステムではラットは蛍光灯で照らしたガラス製の歩道を歩き、足底が歩道に直接接触したときに足跡が照らされる。圧力に依存した信号強度が得られるので、足に体重がかかっているほど足跡は強く表示される。ラットが歩道を歩く際の足跡画像をビデオカメラを用いて記録し、画像データを解析して足底の接触面積、平均強度、スイング時間を求めた。移植前、移植後4週、移植後8週に、各個体少なくとも3回の測定を行った。左後肢の術前の平均値と術後の平均値の比を治療群間で比較した。

組織学的評価 投与から8週間後に、ラットを麻酔してPGA-cチューブを採取した。PGA-cチューブは、2%パラホルムアルデヒドおよび2%グルタルアルデヒドに24時間浸漬して固定した。2%四酸化オスミウムで染色し、脱水後、プロピレンオキサイドで処理し、神経の近位端と遠位端の中間にあるPGA-cチューブを包埋し、トルイジンブルーまたは酢酸ウラニルと鉛の染色液で染色した。電子顕微鏡観察は、透過型電子顕微鏡システムJEM-1200EX(日本電子)を用いて行った。

4. 研究成果

本研究課題の成果は、(1) 複数のドメインよりなるアンカー・モジュールがどのように膠原線維に結合するかを明らかにした。(2) 歯科領域で歯周病による歯槽骨欠損の治療に展開した。(3) 整形・形成外科領域で神経欠損の治療に展開したことである。以下、詳述する。

(1) アンカー・モジュールと不溶性線維の結合様式を明らかにするため、まず *C. histolyticum* ColG酵素由来のタンデムCBD (CBD1-CBD2)の立体構造をX線結晶学的に決定した。基質と相互作用する芳香族アミノ酸残基(青)が異なる方向に配向していた(図5A)ことから、各CBDは膠原線維内の異なるトロポコラーゲン分子に結合することが示唆された。カルシウム緩衝液中でゲルろ過とX線小角散乱法(SAXS)により解析したところ、pCa=3-4で見かけの分子量が最小となり結晶構造に符合する構造が得られた(図5B)。

さらにアンカー・モジュール(ドメイン構造PKD-CBD1-CBD2またはCBD1-CBD2)とコラーゲン様ペプチドの複合体の構造をSAXSにより決定した。CBD2はコラーゲン様ペプチドのC末端に結合していた。また、CBD1は別のコラーゲン分子に結合し、PKDは基質のC末端より下流に触媒モジュールを配置することを示唆する結果(図6)が得られた(Caviness *et al.* FEBS J. 2018; 285(17):3254-3269)。

(2) 歯周病による歯槽骨の水平欠損に対する本複合剤の有用性をラット・モデルにより検討した。

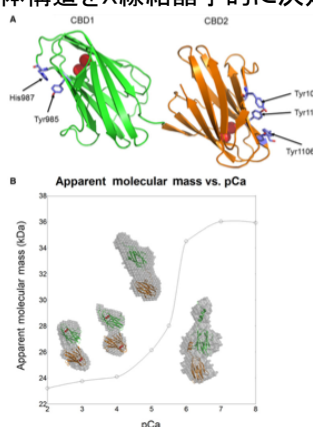


図5 CBD1-CBD2の構造 A, X線結晶学的解析; B, ゲルろ過およびSAXSによる解析

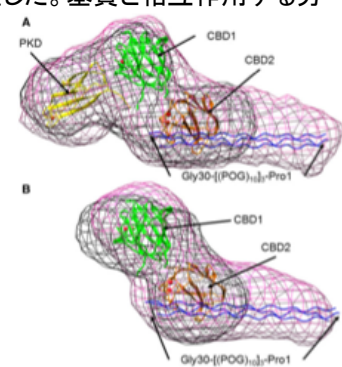


図6 アンカー-基質複合体の構造 A, PKD-CBD1-CBD2-ミニコラーゲン複合体; B, CBD1-CBD2-ミニコラーゲン複合体

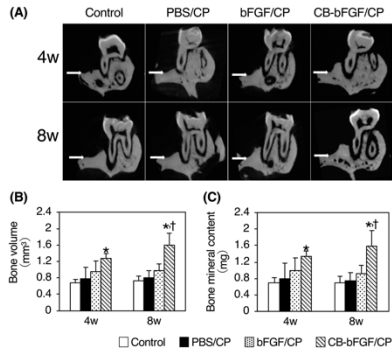


図7 骨欠損部のマイクロCT解析 A, 2次元画像; B, 骨欠損部位の骨量; C, 骨塩量

コラーゲン結合性線維芽細胞増殖因子(CB-bFGF)固相化コラーゲンを欠損部に充填することで、骨新生と歯周組織の再生を有意に誘導できることを明らかにした(図7, 8)。

また、オステオカルシン(OCN)、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、オステオポンチン(OPN)陽性細胞が増加する(図9)ことを示した(Nakamura *et al.* J Periodontol. 2019; 90(9):1043-1052)。

(3) 生分解性の高いポリグリコール酸外鞘の内腔にコラーゲンが充填された医療機器に着目し、外鞘の透過性を利用して内腔のコラーゲンにCB-bFGFをアンカリングし、坐骨神経欠損モデルを用いて、神経再生が有意に促進されることを組織学的に明らかにした(図10)。神経再生に伴って歩行行動も改善した。結合組織の再生を促進することが、神経再生を促進すると示唆された(Fujimaki *et al.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2020; 108(2):326-332)。

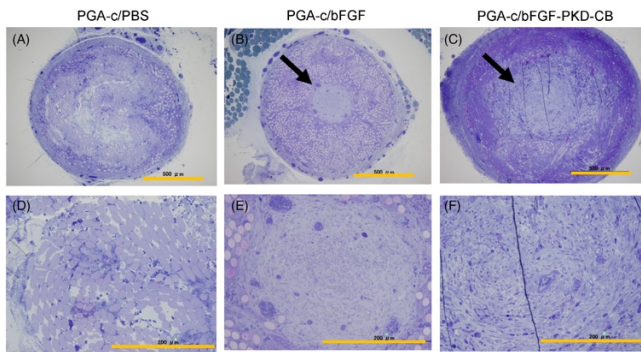


図10 PGA-cチューブの中心部断面の組織像 上図, 光学顕微鏡像; 右図, 電子顕微鏡像. 矢印は再生神経軸索を示す。

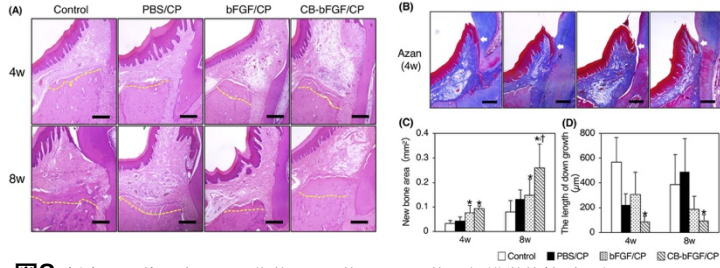


図8 新生骨面積の定量 A, 術後4週間後と8週間後に組織学的検討を行った; B, 4週間後の上皮組織のダウングロース; C, 新生骨の面積; D, 上皮組織のダウングロース長

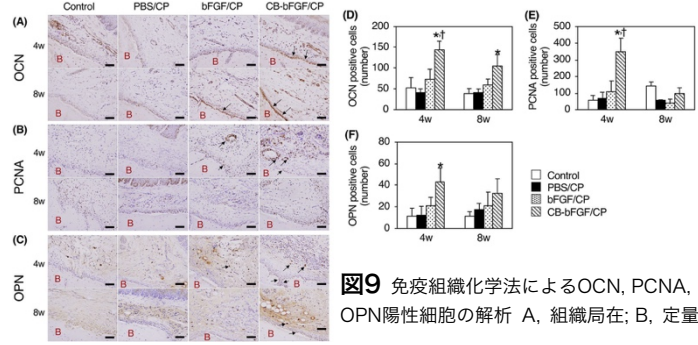


図9 免疫組織化学によるOCN, PCNA, OPN陽性細胞の解析 A, 組織局在; B, 定量

以上の成果を社会還元するため、2件の特許(US 10,358,471, US 10,519,213)を取得し、3件の特許(特願2020-376, 63/151,023, 16/283,468)を出願した。

付記: 本研究では、コラーゲン結合型VEGFを用いた複合剤による血管新生誘導を目指したが、生理活性を示す融合タンパク質を得ることができず目的達成は困難であった。また、2020年度は、共同研究先である米国のアーカンソー大学および神奈川県相模原市の北里大学にそれぞれ2名および1名の学生を派遣する予定であったが、COVID-19蔓延のため中止せざるを得なかった。そこで、これまでとは異なる生理活性を示す新規の物質をアンカー・モジュールと連結して、*in vitro*で生理活性とアンカリング活性が保持されていることを確認した(未発表)。2021年度以降*in vivo*モデルを用いた実験に着手すべく倫理審査を申請した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujimaki Hisako, Uchida Kentaro, Inoue Gen, Matsushita Osamu, Nemoto Noriko, Miyagi Masayuki, Inage Kazuhide, Takano Shotaro, Orita Sumihisa, Ohtori Seiji, Tanaka Keisuke, Sekiguchi Hiroyuki, Takaso Masashi	4. 巻 108
2. 論文標題 Polyglycolic acid collagen tube combined with collagen binding basic fibroblast growth factor accelerates gait recovery in a rat sciatic nerve critical size defect model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 326 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Shin, Ito Takashi, Okamoto Kentaro, Mima Takehiko, Uchida Kentaro, Siddiqui Yasir D., Ito Masahiro, Tai Masako, Okubo Keisuke, Yamashiro Keisuke, Omori Kazuhiro, Yamamoto Tadashi, Matsushita Osamu, Takashiba Shogo	4. 巻 90
2. 論文標題 Acceleration of bone regeneration of horizontal bone defect in rats using collagen binding basic fibroblast growth factor combined with collagen scaffolds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1043 ~ 1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.18-0674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Caviness P, Bauer R, Tanaka K, Janowska K, Roeser JR, Harter D, Sanders J, Ruth C, Matsushita O, Sakon J.	4. 巻 285
2. 論文標題 Ca ²⁺ -induced orientation of tandem collagen binding domains from clostridial collagenase ColG permits two opposing functions of collagen fibril formation and retardation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 3254-3269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松下 治、美間健彦、後藤和義、山本由弥子、Perry Caviness、Joshua Sakon、小出隆規、内田健太郎、中村 心、高柴正悟
2. 発表標題 細菌性コラゲナーゼのコラーゲン・アンカーと歯周組織再生への応用
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下 治、美間健彦、後藤和義、山本由弥子、Perry Caviness、Joshua Sakon、中村 心、岡本健太郎、高柴正悟
2. 発表標題 細菌性コラゲナーゼのコラーゲン・アンカーと歯周組織治療への応用
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下 治
2. 発表標題 悪玉クロストリジウムの毒素を薬に
3. 学会等名 第2回岡山消化器学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 心、伊東 孝、松下 治、岡本 憲太郎、美間 健彦、内田 健太郎、高柴 正悟、他7名
2. 発表標題 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞成長因子とコラーゲン基剤を用いた複合剤の歯周組織再生への応用
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下 治、美間健彦、後藤和義、山本由弥子、Perry Caviness、Joshua Sakon、内田健太郎、藤巻寿子、井上 玄、高相晶士
2. 発表標題 細菌性コラゲナーゼ由来コラーゲン・アンカーの構造活性相関と神経再生への応用
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 コラーゲン結合タンパク質による治療剤の送達	発明者 サコン、レーナ、 トゥラシ、ランジー タ、小出、松下、他	権利者 アーカンソー 大、北里研究 所、モンテフィ
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-376	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Release of Growth Factors at Wound Healing Stages	発明者 Sakon, Beitle, Matsushita, 他2名	権利者 U Ark, Okayama U
産業財産権の種類、番号 特許、63/151,023	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 Delivery of therapeutic agents by a collagen binding protein.	発明者 Sakon, Matsushita, Nishi, 他5名	権利者 U Ark, Kitasato, Kagawa U, 他
産業財産権の種類、番号 特許、16/283,468	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 FUSION PROTEINS OF COLLAGEN-BINDING DOMAIN AND PARATHYROID HORMONE	発明者 Gensure, Sakon, 松 下, Ponnappakkam	権利者 U Ark, Ochsner Clinic, Kagawa U
産業財産権の種類、番号 特許、US 10,358,471	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 FUSION PROTEINS OF COLLAGEN-BINDING DOMAIN AND PARATHYROID HORMONE	発明者 Gensure, Sakon, 松 下, Ponnappakkam	権利者 U Ark, Ochsner Clinic, Kagawa U
産業財産権の種類、番号 特許、US 10,519,213	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病原細菌学分野 http://www.okayama-u.ac.jp/user/saikin/Bacteriology/Welcome.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	美間 健彦 (Mima Takehiko) (80596437)	愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授 (26301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	内田 健太郎 (Uchida Kentaro) (50547578)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	サコン ジョシュア (Sakon Joshua)	アーカンソー大学・化学生化学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	アーカンソー大学			