

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590452

研究課題名(和文) 細菌性コラゲナーゼの基質結合ドメインを用いた薬物送達システムの開発型研究

研究課題名(英文) Translational research on a drug delivery system using substrate binding domain derived from bacterial collagenases

研究代表者

松下 治 (MATSUSHITA OSAMU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00209537

研究成果の概要(和文)：「人喰いバクテリア」が産生するコラーゲン分解酵素は、コラーゲン細線維に結合する領域(CBD)をもつ。まず CBD の中で結合に直接関与する部位を明らかにした。次に CBD はコラーゲン分子の三重らせん構造が緩んだ部位を志向して一定の向きに結合することを示した。さらに、CBD の接続部はカルシウムを結合して構造が変わり、CBD の安定性と結合能が向上することを示した。最後に、CBD を用いて種々の生理活性物質を組織に結合させる新規の技術が種々の再生医療に応用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：'Flesh-eating bacteria' produce collagenases to hydrolyze collagen fibrils in tissue. These enzymes possess domain(s) to bind to this insoluble substrate (CBD). We identified amino acid residues responsible for the binding. We also showed that CBD binds preferentially to the under-wound region in the collagen molecule, and that the binding is unidirectional.  $Ca^{2+}$  binds to the linker region of CBD. We showed that the binding modifies CBD into a more stable and more efficient conformation. Finally, we showed the potential benefits of matrix anchoring of various bioactivity substances using CBD, which are applicable to various therapies in regenerative medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：ガス壊疽菌群、毒素、構造活性相関、コラーゲン結合ドメイン、成長因子、骨新生、鼓膜閉鎖術、人工皮膚

## 1. 研究開始当初の背景

細菌が感染する宿主の細胞外マトリックス(ECM)には不溶性コラーゲンが豊富に含まれている。コラーゲンは三重らせん構造をとる分子が集積した不溶性繊維であり、通常のプロテアーゼでは水解されない。*Clostridium* や *Vibrio* はコラゲナーゼ産生してコラーゲンを水解し、ECM を破壊して感染巣を拡大する。我々は、本課題の研究開始当初までに次

のことを明らかにしていた。

(1) 本酵素は複数のドメインによって構成されている(J. Bacteriol., 176:149-56, 1994; *ibid.* 176:6489-96, 1994; *ibid.* 181:923-33, 1999; *ibid.* 181:2816-22, 1999)。

(2) C末端ドメインはコラーゲン結合ドメイン(CBD)であり(J. Biol. Chem., 273:3643-8, 1998)、コラーゲン細線維に特異的に結合する(J. Biol. Chem., 276:8761-70, 2001)。

(3) CBD の立体構造を X 線回折によって決定したところ、 $\beta$ -サンドイッチ構造をとっていることが判明した。また、特定のアミノ酸残基に変異を導入して結合能を測定したところ、CBD は片側の  $\beta$ -シートの中央部で基質に結合することが推察された。これは類似した構造をとる抗体分子が超可変ループにより抗原を認識する機構とは全く異なると考えられた。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合により CBD の N 末端側リンカーの構造が  $\alpha$ -ヘリックスから  $\beta$ -ストランドに変換されることが判明した。(EMBO J., 22:1743-52, 2003)。

(4) CBD のマトリックス結合能を利用して、生理活性物質のひとつである細胞成長因子 (bFGF) を細胞外マトリックスにアンカーリングし局所で持続的に細胞増殖を促進することができた (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95:7018-7023, 1998)。

(5) CBD は種々の型のコラーゲンに結合できたため、軟骨などの多様な細胞外マトリックスに生理活性物質をアンカーリングしうる (Connect. Tissue Res., 42:281-90, 2001)。そこで、米国アルバート・アインシュタイン大学の Robert C. Gensure 博士と共に、骨疾患に適応しうる薬物送達システム (DDS) を目指す translational study に着手した (平成 17~18 年度科学研究費補助金)。骨粗鬆症は高齢化に伴って急増する疾患であり、米国では副甲状腺ホルモン (PTH) が新たな治療薬として認可されている。しかし PTH は 34 アミノ酸残基と小さいために体内での半減期が短く、毎日 1 回の注射を 18 カ月間連続で実施する必要があり、患者のコンプライアンス、医療費の両面で問題を抱えている。そこで PTH(1-33) と細菌性コラゲナーゼ由来 CBD との融合タンパク質による DDS の検討を行った。マウスに 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PTH 当量の PTH-CBD を週 1 回のみ 8 回注射した場合、約 17% の骨塩量の増加が認められ、これは Vehicle (約 5%) や PTH 単体 (約 7%) に比し有意に多かった。PTH 単体の副作用である高カルシウム血症は PTH-CBD では認められなかった。さらに PTH-CBD の月 1 回投与でも 4 カ月後に有意な骨塩量の増加が認められた。(特許申請 PCT/US2008/004589, 特願 2010-503048)

## 2. 研究の目的

これらの研究結果を受け、本課題では主に次の三つのテーマで研究に取り組むこととした。

(1) CBD とコラーゲン分子の結合機構を原子レベルで詳細に理解すること。合理的薬物設計によってマトリックス・アンカー型 DDS のための分子標的薬をデザインするため、CBD とコラーゲンの結合反応を原子レベルで理解することを目指した。細菌性コラーゲン・アドヘジンを含めても、CBD はコラーゲン結

合タンパク質のうち最小 (13 kDa) であり、このような解析に好適である。

(2) CBD を用いた生理活性物質のマトリックス・アンカーリング技術を実用化すること。PTH-CBD を用いた骨新生誘導に関する知的財産については、本補助金申請後に米国のベンチャー企業にライセンスされることとなり、実用化研究は商業ベースで進められることとなった。そこで、マトリックス・アンカーリングの臨床応用の基盤となる CBD の体内動態を明らかにすることを旨とする。

(3) CBD を用いたマトリックス・アンカーリング技術の全く新しい応用例を示すこと。再生医療分野において実用化に近い事例を具体的に示し、本技術の迅速な社会還元を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

(1) CBD の NMR 解析とコラーゲン様ペプチドによる perturbation assay これまでの NMR 解析で帰属が困難であった Arg, Ile, Asn, Lys の各残基について、 $^{15}\text{N}$ -リバース標識 CBD を製産・精製する。組換え大腸菌を  $^{15}\text{N}$ -塩化アンモニウムと特定の  $^{14}\text{N}$ -アミノ酸を含む Tanaka 培地で培養し、さらに  $^{14}\text{N}$ -アミノ酸を添加して IPTG により発現を誘導する。GST 融合タンパク質をアフィニティー精製、GST タグを切断・除去し、イオン交換クロマトにより高度に精製する。安定同位体による標識効率は、TOF-MS により分子量測定を行い、native タンパクとの分子量の差を求めて推定する。これにより残された 10 残基分のピークを帰属し、perturbation assay のためのマップ作りを完了する。

次に NMR perturbation assay を行う。コラーゲン様ペプチド (POG)<sub>10</sub> (0 はヒドロキシプロリン) を  $^{15}\text{N}$  標識 CBD に添加してシフト/消失するピークを同定し、結合に関与するアミノ酸残基を網羅的に特定する。また、N 末端または C 末端をスピン標識したペプチドを作製し、これらの標識ペプチドを用いた NMR perturbation により標識の結合部位を明らかにして、CBD に結合する際の基質の方向性を特定する。(米国 University of Arkansas, Joshua Sakon 博士との共同研究)

(2) Whole body autoradiography による PTH-CBD の体内分布の解明 PTH-CBD にはドメインの間に短いリンカーが存在する。PTH-CBD を放射標識するため、このリンカー部に protein kinase A (PKA) の認識配列 (RRASV) を挿入した PTH-RRASV-CBD 融合タンパク質を生産する。まず PCR により生産用プラスミド (pCHC305PTH) に部位特異的変異を導入する。これを大腸菌発現系により GST 融合タンパク質として生産・精製する。[ $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ ]ATP と PKA を用いて  $^{35}\text{S}$  標識を行った後、GST をトロンビン切断し、 $^{35}\text{S}$  標識 PTH-CBD の

精製を行う。Whole body autoradiography により生体内分布を調べるため、マウスの腹腔内または静脈内に  $^{35}\text{S}$  標識 PTH-CBD を投与し、 $\text{CO}_2$  ガスで安楽死させた後、ドライアイス・エタノールで徐々に凍結させる。この後の操作はすべて  $-20^\circ\text{C}$  で行う。カルボキシメチルセルロースで全身を包埋後、autocryotome で厚さ  $50\ \mu\text{m}$  の切片を切り出し、乾燥後イメージング・プレートに露光させる。なお、放射ラベル (Miyata et al., J. Biol. Chem. 277: 39463-39468, 2002) 及び whole body radioautography (Tamai et al., Infect. Immun. 71:5371-5375, 2003) の系は確立済みである。

(3a) 鼓膜再生への応用 鼓膜穿孔は、慢性炎症や外傷等の原因で生じ、鼓膜閉鎖術、鼓膜形成術等が必要となることがある。鼓膜閉鎖術は外来で実施可能であるが、大学附属病院等に紹介される患者では、すでに鼓膜閉鎖術を何度も試みたにもかかわらず治癒に到らない症例が多い。このような場合は鼓膜形成術が必要となるが、3日から2週間の入院を要し、費用負担も保険適応後で 20 万円を超える。この場合でも、鼓膜形成術 (耳内法) は 70% 強の成功率であり、術後に再穿孔を生じることも稀ではない。

鼓膜閉鎖術は、キチン膜や Steri-Strip<sup>TM</sup> テープ、コラーゲンスポンジ等を用いて一時的に鼓膜穿孔をパッチし閉鎖を促す治療法である。これらの材料では閉鎖率が低い等の限界があったため、数年前より、コラーゲンスポンジを用いて穿孔をパッチし、その後毎日通院して成長因子をコラーゲンスポンジに投与することで閉鎖率を高める治療が行われている。しかしながら、この方法でも、毎日の通院を必要とする上、穿孔が閉鎖に到らない症例が 20% 以上存在する。

そこで、生体の結合組織に近い高密度コラーゲンシートに、鼓膜再生に必要な成長因子をアンカーリングさせた人工材料について、臨床応用を念頭に動物実験に着手する。プラスチックカニューレ型穿刺針を用いて、ラット (n=3) の両耳の鼓膜に穿孔を形成する。片側には、生分解性メッシュ付高密度コラーゲンパッチを  $2.4\ \mu\text{g}/\text{ml}$  のコラーゲン結合型上皮成長因子 (EGF-CBD) 溶液に浸漬し、外耳道側から穿孔部分を覆うように移植する (Overlay 法)。対側はコントロールとして自然経過を観察する。

(3b) 人工皮膚の形成 高密度コラーゲンシート作成時の還流液に線維芽細胞を添加することにより、「真皮層」を再構成できた (安達ら)。この人工結合組織の表面に、CBD を用いて成長因子をアンカーリングし、細胞の分化・増殖を誘導して、層構造を持つ人工組織を構築できると考えられた。「真皮層」の表面を、EGF-CBD 融合タンパク質 ( $0.95\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )

とヒト表皮細胞 (hEK,  $4 \times 10^5$  個) を含む培養液 ( $0.4\ \text{ml}$ ) で覆い、24 時間静置した。その後、通常の培養液に置換して 14 日間培養し、「表皮層」の形成を試みた。

#### 4. 研究成果

(1a) コラーゲン様ペプチドを用いた NMR perturbation assay を行って、基質の結合に関与する残基を網羅的に決定した。まず *C. histolyticum* class I コラーゲナーゼ (ColG) の CBD (S3b) を  $^{15}\text{N}$  などの重原子により標識し HSQC 解析によりアミド基を帰属した (図 1)。

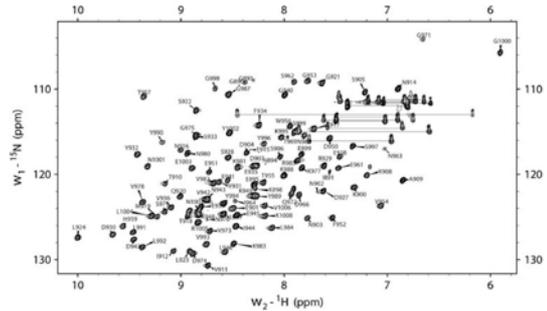


図 1.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 解析によるアミノ基の帰属。

次に、コラーゲン様ペプチド ( $(\text{POG})_{10}_3$  (O はヒドロキシプロリン残基)) を用いて perturbation assay を行った。ペプチドの添加により S928, W956, G971, K995, Y996 の主鎖アミド基のシグナルが消失した。L924, T957, Q972, D974, L991, V993 ではシフトが見られた (図 2)。

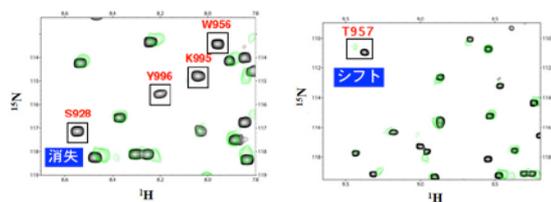


図 2. コラーゲン様ペプチドによる perturbation assay. 黒, CBD 単体; 緑, ペプチド添加時。

基質は、これらの残基の近傍に結合すると考えられる (図 3)。

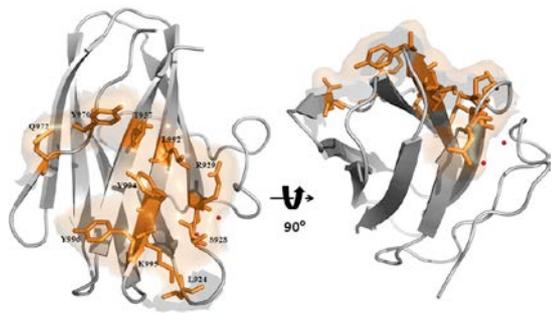


図 3. CBD の基質結合部位。



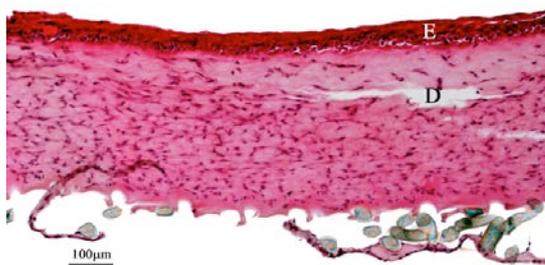


図9. 「人工皮膚」の光顕像.

電子顕微鏡観察では、表皮細胞(図 10E)内に多数のケラチン繊維(図 10K)とミトコンドリアやライソソームが認められた。真皮(図 10D)には多数のコラーゲン細繊維が錯綜し、表皮の基底細胞との境界部に基底膜(図 10LD)が断続的に形成されていた。

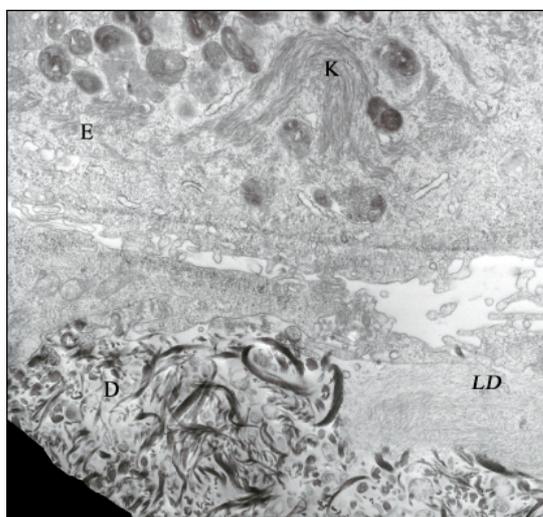


図 10. 「人工皮膚」の電顕像.

これらの研究成果のうち、基礎研究については下記の論文6編として報告した。また応用研究については、下記の特許出願3件を申請した。これらの応用研究については、今後より詳細な解析を行なって、論文として報告する予定である。

#### 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6件)

- ① Ponnappakkam T., Katikaneni, R., Miller, E., Ponnappakkam, A., Suda, H., Miyata, S., Suva, L.J., JSakon, J., Matsushita, O., Gensure, R.C., Monthly administration of a novel PTH-vollagen binding domain fusion protein is anabolic in mice. *Calcif. Tissue Int.* in press,

2011, 査読有

- ② Okano-Kosugi, H., Matsushita, O., Asada, S., Herr, A.B., Kitagawa, K., Koide, T., Development of a high-throughput screening system for the compounds that inhibit collagen-protein interactions. *Anal. Biochem.* 394:125-131, 2009, 査読有
- ③ Philominathan, S.T., Matsushita, O., Gensure, R., Sakon, J.,  $Ca^{2+}$ -induced linker transformation leads to a compact and rigid collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* collagenase. *FEBS J.* 276:3589-3601, 2009, 査読有
- ④ Philominathan, S.T., Koide, T., Hamada, K., Yasui, H., Seifert, S., Matsushita, O., Sakon, J., Unidirectional binding of clostridial collagenase to triple helical substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 10868-10876, 2009, 査読有
- ⑤ Philominathan, S.T.L., Matsushita, O., Jordan, J.B., Sakon, J.  $^1H$ ,  $^{13}C$  and  $^{15}N$  resonance assignments of  $Ca^{2+}$ -bound collagen-binding domain derived from a clostridial collagenase. *Biomol. NMR Assign.* 2:127-129, 2008, 査読有
- ⑥ Tamai, E., Miyata, S., Tanaka, H., Nariya, H., Suzuki, M., Matsushita, O., Hatano, N., Okabe, A., High-level expression of his-tagged clostridial collagenase in *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:627-635, 2008, 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① Matsushita, O., Collagen anchoring: From bacterial toxin to drug. 11th Joint Symposium Robert Koch Institute and The Kitasato Institute Kitasato University, 平成22年10月26日、東京都港区
- ② 松下 治、西 望、小杉日登美、小出隆規、安達栄治郎、坂本恵子、服部雅一、ガス壊疽菌群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57回トキシンシンポジウム、平成22年7月16日、滋賀県長浜市
- ③ 松下 治、宮田 茂、コラーゲン結合ドメインの構造解析と薬物送達システムへの応用、第83回日本細菌学会、平成22年3月27日、神奈川県横浜市
- ④ 松下 治、ガス壊疽菌群コラゲナーゼの基質結合様式と積層型人工組織作製への応用、第56回トキシンシンポジウム、平成21年8月27日、岐阜県岐阜市
- ⑤ Matsushita, O., Nishi, N., Koide, T., Philominathan, S.T.L., Sakon, J., Gensure, R.C., Iwashiro, H., Adachi, E., Substrate recognition of collagen-binding domains derived from bacterial collagenases. 8th Pan-pacific connective tissue societies

symposium, 41st Annual meeting of the Japanese society of connective tissue research, 56th Annual meeting of the Japan matrix club, 平成 21 年 6 月 4 日、神奈川県逗子市

- ⑥ 松下 治、小出隆規、安達栄治郎、ガス壊疽菌群コラゲナーゼの基質認識機構と再生医学への応用、第 82 回日本細菌学会総会、平成 21 年 3 月 12 日、愛知県名古屋市
- ⑦ 松下 治、ガス壊疽菌群コラゲナーゼのセグメント 2 の構造解析、第 91 回日本細菌学会関東支部総会、平成 20 年 10 月 23 日、千葉県長生郡長塚町

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称：粘膜、上皮および鼓膜の少なくとも一つの再生材および再生評価方法

発明者：宮下武憲、森 望、西 望、安達栄治郎、松下 治、服部雅一、伊藤周平、坂本恵子

権利者：国立大学法人香川大学、学校法人北里研究所

種類：特許

番号：特願 2010-110694

出願年月日：2010 年 5 月 12 日

国内外の別：国内

名称：積層型高密度培養人工組織の製造方法及び積層型高密度培養人工組織

発明者：安達栄治郎、松下 治、岩城啓修、細谷 智、西 望

権利者：学校法人北里研究所、国立大学法人香川大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/51123

出願年月日：2010 年 1 月 28 日

国内外の別：外国

名称：積層型高密度培養人工組織の製造方法及び積層型高密度培養人工組織

発明者：安達栄治郎、松下 治、岩城啓修、細谷 智、西 望

権利者：学校法人北里研究所、国立大学法人香川大学

種類：特許

番号：特願 2009-17475

出願年月日：2009 年 1 月 19 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/microbio/toxin.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松下 治 (MATSUSHITA OSAMU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00209537

### (2) 研究分担者

小出 隆規 (KOIDE TAKAKI)

早稲田大学・先進理工学部・教授

研究者番号：70322253

(H20→H21：連携研究者)

玉井 栄治 (TAMAI EIJI)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：40333512

(H20→H21：連携研究者)

宮田 茂 (MIYATA SHIGERU)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：90314913

(H20→H21：連携研究者)

### (3) 連携研究者

南 純三朗 (MIMAMI JUNZABURO)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40157566