

令和元年6月5日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15203

研究課題名(和文)皮膚創傷治癒促進作用を有する環状ペプチドの作用機序解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms by a cyclic peptide, SEK-1005 promotes skin wound healing

研究代表者

乾 誠 (INUI, Makoto)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70223237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：環状ペプチドSEK-1005は、皮膚創傷治癒促進能や血管誘導能などを有するが、その分子メカニズムは全く分かっていなかった。本研究では、皮膚創傷治癒に関わる表皮細胞及び血管内皮細胞において、SEK-1005が細胞遊走を促進すること、及びそのシグナル伝達系を明らかにした。また、血管内皮細胞ではSEK-1005が管腔形成も促進すること、及びそのシグナル伝達系を明らかにした。さらに、SEK-1005の標的蛋白質を同定するための手段として、ニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)を導入したSEK-1005の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、皮膚創傷治癒促進、血管誘導、免疫抑制など多様な作用を持つ環状ペプチドであるSEK1005に焦点を当て、SEK1005によるTGF- β などの緩徐な分泌促進というユニークな作用機序を明らかにした。さらに、SEK1005が直接結合する蛋白質を同定するための手段を開発した。これにより、物質的基盤に基づいた作用機序解明のための道を開いた。本研究の成果は、今後、皮膚創傷治癒促進、血管誘導、免疫抑制などが関与する様々な疾患に効く治療薬の開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A cyclic peptide, SEK-1005 promotes skin wound healing and angiogenesis. Their mechanisms are, however, unknown. In this study, we found that SEK-1005 promotes migration of skin epithelial cells and vascular epithelial cells. We identified their responsible intracellular signaling. We also found the enhancement of endothelial cell's tube formation by SEK-1005 and elucidated the responsible intracellular signaling. In order to obtain a tool to identify a SEK-1005-binding protein, we synthesized the modified SEK-1005 to which nitrobenzoxadiazole (NBD) is conjugated. The modified SEK-1005 can transfer a fluorophore, NBD from SEK-1005 to its binding protein.

研究分野：薬理学

キーワード：天然環状ペプチド 創傷治癒促進作用 血管誘導作用 蛍光標識架橋薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放線菌から単離された環状ペプチドである SEK-1005 (図1) は、抗菌作用や皮膚創傷治癒促進作用を有する ()。また、SEK-1005 は血管誘導能を有し、SEK-1005 を結合したコイルが脳動脈瘤治療に有効であることが示されている ()。さらに最近、SEK-1005 が糖尿病モデルラットの皮下に血管の豊富な免疫寛容部位を形成し、他家膵島移植で免疫抑制薬を投与することなく長期間生着し、血糖値が正常化することが示唆されている ()。しかし、これらの作用機序に関しては、オートクリン/パラクリンによる TGF- β の分泌増加が関与すると考えられているが、それ以外は全く不明であった。

2. 研究の目的

皮膚創傷治癒では、表皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞などの細胞が互いに相互作用しながら複雑な過程をたどる。SEK-1005 による皮膚創傷治癒促進のメカニズムを明らかにするため、本研究では、これらそれぞれの細胞での SEK-1005 からのシグナル伝達系を明らかにすると共に、SEK-1005 が直接作用する標的蛋白質を同定する手段を開発し、その作用機序を解明することを目的とした。

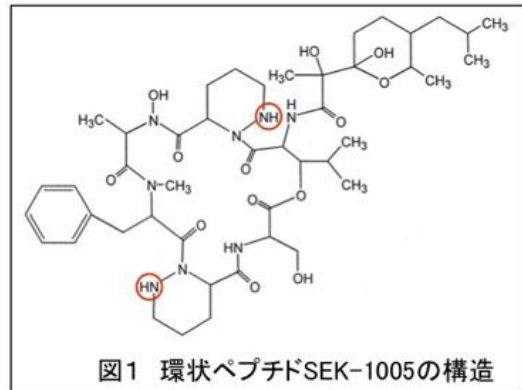


図1 環状ペプチドSEK-1005の構造

3. 研究の方法

(1)細胞遊走能の測定実験

ヒト表皮細胞の不死化株である HaCat 細胞は、Cell Lines Service (Eppelheim 社) から入手し 10% FBS を含有する DMEM 培地で維持した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は、Lonza 社から入手し、成長因子などの添加物を加えた EGM-2 培地で維持した。

インビトロ創傷治癒実験 (スクラッチ・アッセイ)

コンフルエントになった HaCat 細胞或いは HUVEC を DMEM 培地或いは成長因子などの添加物を含まない EBM-2 培地で 12 時間培養した。幅 1 mm の傷をつけ、洗浄した後、種々の試薬を含んだ DMEM 培地或いは EBM-2 培地でさらに 12 時間培養し、傷部分へ入り込んだ細胞の面積を測定した。

単一細胞の遊走実験

HaCat 細胞は DMEM 培地で、HUVEC は EBM-2 培地で 8 時間培養した後、トリプシン-EDTA で細胞を剥がし、3.5-cm ディッシュに 5×10^4 個の細胞を播種し、DMEM 培地或いは EBM-2 培地で 4 時間培養した。その後、必要に応じて試薬を添加し、2 分毎に 1 時間顕微鏡で写真を撮った。この写真から個々の細胞の動いた距離を NIH ImageJ ソフトウェア (<http://imagej.nih.gov/ij>) を用いて測定した。

(2)細胞増殖能の測定実験

96 穴のプレートに 1 ウェル当たり 1×10^3 個の細胞を播種し、10% FBS を含む DMEM 培地 (HaCat 細胞) 或いは EGM-2 培地 (HUVEC) で 16 時間培養した。HEPES バッファーで洗浄した後、細胞を DMEM 培地 (HaCat 細胞) 或いは 1% FBS を含む EBM-2 培地 (HUVEC) で 16 時間培養した。HEPES バッファーで洗浄後、4% のパラホルムアルデヒドで固定、0.05% のクリスタルバイオレットで染色し、細胞数を計測した。

(3)HUVEC の管腔形成実験

EBM-2 培地中の HUVEC をコラーゲン溶液 (BD Biosciences) と混和、96 穴のプレートに入れて 24 時間培養した。HBSS で洗浄後、カルセインで 30 分間染色した。蛍光顕微鏡で観察し、管腔長を NIH ImageJ ソフトウェアを用いて測定した。

(4)TGF- β 及び VEGF の分泌量測定実験

細胞遊走実験或いは管腔形成実験と同じ条件で細胞培養を行い、細胞上清を得た。凍結乾燥で 6 倍に濃縮した後、TGF- β 或いは VEGF 量を Quantkine ELISA 測定キット (R&D Systems) を用いて測定した。

(5)SEK-1005 のビオチン標識

DMSO 中にて低求核性アミン diisopropylethylamine (DIPEA) により SEK-1005 の二級アミンのカチオン化を防いだ状態でアミン基反応性ビオチン標識試薬 (Biotin-(CH₂)₄CONH-(CH₂)₅CO-NHS) を反応させた。SEK-1005/ビオチンのモル比は 10:1 で、6 時間 (2 価ビオチン化は 2 日間) 反応させた後、HPLC にて精製した。

(6)ニトロベンゾオキサジアソール (NBD) を導入した SEK-1005 の合成

ジクロロメタン中 DIPEA 存在下で、トリメチルシラン (TMS) 保護ペンチノールを NBD と反

応させた。順相クロマトグラフィーで精製した後、TMS をフッ化ブチルアンモニウムにて脱保護して粗精製し、NBD-O-ペンチンを得た。ビオチン標識化と同手法にて合成したアジド標識 SEK-1005 を合成し、これと NBD-O-ペンチンを銅イオン共存下でクリック反応を行った。

4. 研究成果

(1) SEK-1005 の表皮細胞への効果並びにシグナル伝達系の解析

ヒト表皮細胞の不死化株である HaCat 細胞を用いて、SEK-1005 の表皮細胞への効果を調べた。SEK-1005 は、HaCat 細胞の接着能並びに増殖能へは何の影響も与えなかった。これに対し、SEK-1005 は、スクラッチ・アッセイ及び単一細胞の遊走測定の方法でも HaCat 細胞の遊走能を濃度依存性に促進した。この際の EC_{50} は、約 1 nM であった。この SEK-1005 による遊走促進効果は、TGF- β の中和抗体の共存下では消失し、HaCat 細胞からの TGF- β の分泌が関与することが示された。実際、HaCat 細胞の培養上清の TGF- β 量を測定した結果、SEK-1005 存在下で著明に増加していることがわかった。さらに下流のシグナルの解析を行った結果、SEK-1005 による遊走促進効果が EGF 受容体の中和抗体で阻害されるが、EGF 受容体のリガンドである EGF、アンフィレグリン、HB-EGF、TGF- α 等の中和抗体では阻害されないことが明らかになった。以上の結果から、SEK-1005 は、HaCat 細胞からの TGF- β の分泌を亢進し TGF- β 受容体を活性化させること、さらに EGF 受容体をリガンドを介さずに活性化し細胞遊走を促進することが明らかとなった。

(2) SEK-1005 の血管内皮細胞への効果並びにシグナル伝達系の解析

SEK-1005 は、スクラッチ・アッセイ及び単一細胞の遊走測定の方法でも HUVEC の遊走能を濃度依存性に促進した。この際の EC_{50} は、約 0.4 nM であった。HUVEC の場合は、HaCat 細胞と異なり、僅かであるが SEK-1005 が増殖能を亢進した。この SEK-1005 による遊走促進効果は TGF- β の中和抗体或いは TGF- β 受容体阻害薬 SB431542 の共存下で消失した。HUVEC の培養上清の TGF- β 量は SEK-1005 存在下で著明に増加していた。さらに、TGF- β による遊走促進効果は VEGF の中和抗体で阻害されたが、VEGF による遊走促進効果は TGF- β の中和抗体では阻害されなかった。これらの結果は、SEK-1005 は、HaCat 細胞と同様に HUVEC からの TGF- β の分泌を亢進し TGF- β 受容体を活性化するが、HaCat 細胞とは異なり、VEGF 及び VEGF 受容体を介して細胞遊走を促進することを示している。実際、培養上清の VEGF 量も SEK-1005 で著明に増加していた。

SEK-1005 は、HUVEC の管腔形成を濃度依存性に促進した。この際の EC_{50} は、約 10 nM であった。管腔形成時の細胞上清の TGF- β と VEGF を測定した結果、SEK-1005 によって分泌量が共に促進していた。SEK-1005 の管腔形成促進効果は、VEGF 中和抗体で消失した。TGF- β の中和抗体はそれのみで著明に管腔形成を促進し、SEK-1005 との共存でもそれ以上の変化はなかった。また、TGF- β の管腔形成への効果を濃度依存性に調べた結果、低濃度 (~1 pg/ml) で管腔形成を促進し、高濃度 (>1 ng/ml) で管腔形成を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、HUVEC の遊走能促進効果とは異なり、SEK-1005 の管腔形成の促進には VEGF からのシグナルが必須であるが、TGF- β からのシグナルが複雑に関係していることが明らかになった。

(3) SEK-1005 のビオチン標識法の開発

SEK-1005 の相互作用相手を探索するために、SEK-1005 への標識付加を検討した。標識付加の反応基点として、SEK-1005 分子内に存在する二級アミンおよびヒドロキシル基が考えられるが、反応性や特異性、他反応基への保護処理の必要性などを考慮すると、二級アミン (図 1 の 2 箇所) の赤丸部位) が最適と思われた。このアミンへの導入には、高いアミン反応性を持つ N-hydroxysuccinimide (NHS) 基を利用することとした。

まず、ビオチン標識の導入を試みた。SEK-1005 分子内において、反応しうるアミンは 2 箇所あり、当初はランダムに導入されるものと予想していた。詳細に反応をトレースしたところ、まず反応の初期段階で 1 分子のビオチンが導入され、その後数時間に渡る反応時間を経て、徐々に第二のビオチンが導入されることが判明した。この反応二相性は、各々のアミンで反応性に違いがある可能性を示しており、2 箇所ランダムに導入されるのではなく、反応性の高い部位に優先的に反応することが推測された。つまり、1 価導入体は異性体が混入したものではなく、単一の分子である可能性が高い。少なくとも、HPLC で詳細にピークを解析した結果、1 価導入体は単一のピークであった。MS ナンバーも 1 価の導入体を示したが、それがどちらのアミン部位かは同定できておらず、NMR で解析できるほどの量を確保することが困難であったため、導入部位に関しては現在まで未同定のままである。

1 価ビオチン化 SEK-1005 は、未修飾 SEK-1005 と同等の HaCat 細胞の遊走促進活性を保持したが、2 価体では著明に減弱していた。

(4) ビオチン標識 SEK-1005 を用いた標的蛋白質の同定

開発したビオチン標識 SEK-1005 を用いて SEK-1005 の標的蛋白質の同定を試みた。HaCaT 細胞にビオチン標識 SEK-1005 を 1 μ M で添加し、30 分インキュベート後、洗浄して 0.5% Triton X-100 含有 PBS で細胞を溶解した。遠心にて不溶性成分を除去した試料を用いて、モノアビジン固定化ビーズにてビオチン化 SEK-1005 をプルダウンし、それと共沈降してきた蛋白質を溶

出し、SDS-PAGEにて分離後、銀染色での検出を試みた。しかしながら、有望な蛋白質バンドは見られなかった。SEK-1005と標的蛋白質との結合が、可溶化で阻害されたことが想定される。その課題を解決するため、SEK-1005と標的蛋白質を共有結合によって架橋して標的蛋白質を同定することとした。そのため、新たなSEK-1005の標識架橋薬を開発することとした。

(5) SEK-1005 標的蛋白質の同定のための標識 SEK-1005 の開発

SEK-1005の標的蛋白質を同定するため、光架橋基を導入したSEK-1005の合成を試みた。まず、光架橋基として高い架橋効率を持つベンゾフェノン基を試みたが、1価導入体においても細胞遊走促進活性が全く見られなかった。ベンゾフェノン構造が大きい上にSEK-1005との間のリンカー長が短かったために立体障害によって失活したと考えられる。

次に分子サイズの小さなジアジリン基を試みた。1価ジアジリン基を導入したSEK-1005は、細胞遊走促進活性を保持した。しかしながら、検出のため“空いているもう一つのアミン”にビオチン標識を導入したところ、細胞遊走促進活性は消失してしまった。

そこで蛍光基ニトロベンゾオキサジアソール(NBD)を搭載したSEK-1005を開発することとした。SEK-1005に導入されたNBD基は、標的蛋白質のアミン成分と共有結合して、SEK-1005から標的蛋白質側に移行する。その結果、標的蛋白質は強い蛍光を発し、高感度の検出が可能となる。また、NBD抗体を用いて免疫沈降することもできる。NBD基を導入したSEK-1005の合成では、ジクロロメタン中DIPEA存在下で、TMS保護ペンチノールをNBDと反応させた。順相クロマトグラフィーで精製した後、TMSをフッ化ブチルアンモニウムにて脱保護して粗精製し、NBD-O-ペンチンを得た。ビオチン標識化と同手法にて合成したアジド標識SEK-1005を合成し、これとNBD-O-ペンチンを銅イオン共存下でクリック反応を行うことによりNBD基を導入したSEK-1005を合成した(図2)。SEK-1005の標的蛋白質の同定のための強力な手段を得ることに成功した。



<引用文献>

- Abe, Y., Inagaki, K., Fujiwara, A., Kuriyama, K. (2000) Wound healing acceleration of a novel transforming growth factor- β inducer, SEK-1005. *European Journal of Pharmacology* 408:213-218.
- Sano, H., Toda, M., Sugihara, T., Uchiyama, N., Hamada, J., Iwata, H. (2010) Coils coated with the cyclic peptide SEK-1005 accelerate intra-aneurysmal organization. *Neurosurgery* 67:984-92.
- Kuwabara, R., Hamaguchi, M., Fukuda, T., Sakai, H., Inui, M., Sakaguchi, S., Iwata, H. (2018) Long-term functioning of allogeneic islets in subcutaneous tissue pretreated with a novel cyclic peptide in the absence of immunosuppressive medication. *Transplantation* 102:417-425.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- Honda, T., and Inui, M. PDZRN3 regulates differentiation of myoblasts into myotubes through transcriptional and posttranslational control of Id2. (2019) *Journal of Cellular Physiology* 234:2963-2972. 査読有
DOI: 10.1002/jcp.27113
- Kuramasu, A., Wakabayashi, M., Inui, M., and Yanai, K. Distinct Roles of Small GTPases Rac1 and Rac2 in Histamine H₄ Receptor-Mediated Chemotaxis of Mast Cells. (2018) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 367:9-19. 査読有
DOI: 10.1124/jpet.118.249706
- Kuwabara, R., Hamaguchi, M., Fukuda, T., Sakai, H., Inui, M., Sakaguchi, S., Iwata, H. (2018) Long-term functioning of allogeneic islets in subcutaneous tissue pretreated with a novel cyclic peptide in the absence of immunosuppressive medication. *Transplantation* 102:417-425. 査読有
DOI: 10.1097/TP.0000000000001923
- Ishiguro, S., Kawabata, A., Zulbaran-Rojas, A., Monson, K., Uppalapati, D., Ohta, N., Inui, M., Pappas, C. G., Tzakos, A. G., Tamura, M. (2017) Co-treatment with a C1B5 peptide of protein kinase C γ and a low dose of gemcitabine strongly attenuated pancreatic cancer growth in mice through T cell activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495:962-968. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.102
- Kaneko, M., Yamamoto, H., Sakai, H., Kamada, Y., Tanaka, T., Fujiwara, S., Yamamoto, S., Takahagi, H., Igawa, H., Kasai, S., Noda, M., Inui, M., Nishimoto, T. (2017) A pyridone derivative activates SERCA2a by attenuating the inhibitory effect of phospholamban. *European Journal of Pharmacology* 814:1-8. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.07.035

〔学会発表〕(計8件)

本田 健ら、筋芽細胞における PDZRN3 蛋白質のアポトーシス制御、第 92 回日本薬理学会、2019

倉増敦朗ら、トランスグルタミナーゼとヒスタミントランスポーターによるマスト細胞のヒスタミン H₄ 受容体シグナル調節、第 92 回日本薬理学会、2019

本田 健ら、PDZRN3 蛋白質による筋芽細胞のアポトーシス制御、第 71 回日本薬理学会西南部会、2018

Atsuo Kuramasu, and Makoto Inui, Modulation of histamine H₄ receptor signaling by transglutaminase in mouse bone marrow derived mast cells. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018

Takeshi Honda et al., PDZRN3 regulates the differentiation of myoblasts into myotubes through Id2-mediated pathway. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018

乾 誠、心筋細胞内カルシウム輸送調節の分子機序と心不全治療薬、第 70 回病態生理学会、2017

本田 健ら、PDZRN3 蛋白質は Id2 を介するシグナル経路を調節することで筋芽細胞の筋分化を制御する、第 90 回日本薬理学会、2017

本田 健ら、Id2 を介した PDZRN3 蛋白質の筋芽細胞分化制御、第 69 回日本薬理学会西南部会、2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：本田 健

ローマ字氏名：HONDA, Takeshi

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：講師

研究者番号(8桁): 30457311

研究分担者氏名：酒井 大樹

ローマ字氏名：SAKAI, Hiroki

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 40464367

(2)研究協力者

なし

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、研究者個人に帰属されます。