

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890144  
 研究課題名(和文) 2-ベンズアゼピン誘導体による皮膚創傷治癒促進作用の検討  
 研究課題名(英文) 2-benzazepine derivative promotes skin epithelial cell migration and wound healing.  
 研究代表者  
 松浦 健二 (MATSUURA KENJI)  
 山口大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：20452641

研究成果の概要(和文)：本研究代表者はこれまで、2-benzazepine 誘導体が表皮細胞の遊走を促進することで皮膚創傷治癒を促進することを報告してきた。そこで、種々の2-benzazepine 誘導体の構造機能連関の解明と作用メカニズムの検討を行った。その結果、2-benzazepine 誘導体の窒素上の置換基がメチル基もしくはエチル基のとき細胞遊走活性が最大になること、表皮細胞から TGF- $\beta$  の分泌を促進することで遊走を促進していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In search of biological activity of 2-benzazepine derivatives, we found that one of 2-benzazepine derivatives (compound A) promoted cell migration of human keratinocyte-derived cell line (HaCat cells) and wound healing of the skin in mouse. Here a structure-function relationship of 2-benzazepine derivatives was evaluated using in vitro wound healing assay (scratch assay) with HaCaT cells. A side chain at N-2 position was important for this biological activity of 2-benzazepine derivatives. The steric size between methyl and ethyl seems optimal at this side chain position, and longer alkyl chain than propyl group at N-2 position spoiled the biological activity. In the scratch assay, compound A -induced migration was blocked by the neutralizing antibody against transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), while neutralizing antibody against EGF had no effect. Those results indicate that compound A promotes the epithelial migration increasing the release of TGF- $\beta$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,250,000	375,000	1,625,000
2009年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,370,000	711,000	3,081,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：皮膚、上皮、創傷治癒、細胞遊走

## 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒は血液凝固期、炎症期、細胞増殖期、再構築期という4つの段階を経

て行われる。細胞増殖期において傷口周辺の表皮細胞が創面を埋めるように増殖・遊走することで創傷部位の縮小が行

われるため、この段階が効率の良い創傷治癒を達成するのに重要なステップであることが知られている。本研究代表者は新規に化学合成した2-ベンズアゼピン誘導体が表皮細胞の増殖に影響を与えず、細胞遊走を加速することで、効率的に傷の修復が達成できることを見出している。現在の臨床の場には直接的に細胞の遊走を促進する創傷治癒薬は存在しないため、2-ベンズアゼピン誘導体はまったく新しい作用機序の創傷治癒薬となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

2-ベンズアゼピン誘導体による細胞遊走促進作用のメカニズムの解明と創傷治癒薬となる可能性の検討を目的とし、以下の実験を行った。

- (1) 表皮細胞を用いた細胞遊走アッセイにより2-ベンズアゼピン誘導体の構造機能関連の検討
- (2) 2-ベンズアゼピン誘導体による細胞遊走促進作用のシグナル伝達系を解明
- (3) 皮膚以外の組織への有効性の検討

## 3. 研究の方法

- (1) 表皮細胞(HaCaT cells)を用いた細胞遊走アッセイは以下のような *in vitro* の創傷治癒モデルを用いて行った。

### ① 2-ベンズアゼピン誘導体の構造機能関連の解明

コンフルエントに培養した表皮細胞に200  $\mu$ l のピペットチップで傷をつけ、そこに化学合成した種々の30  $\mu$ M の2-ベンズアゼピン誘導体を作作用させた。その12時間後細胞の伸展を計測し、細胞伸展促進効果を比較した(図1)。これにより2-ベンズアゼピン誘導体の構造機能関連を明らかにした。

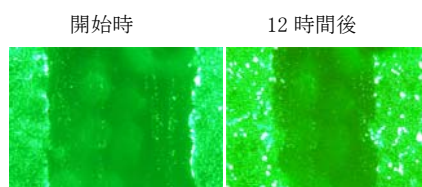


図1 表皮細胞での *in vitro* の創傷治癒モデル

### ② 2-ベンズアゼピン誘導体による細胞

遊走促進作用のシグナル伝達系の検討  
種々の細胞成長因子の中和抗体の存在下、30  $\mu$ M のCompound A(図2)で細胞遊走アッセイを行い、Compound Aによる細胞遊走促進作用に関するシグナル伝達系を検討した。

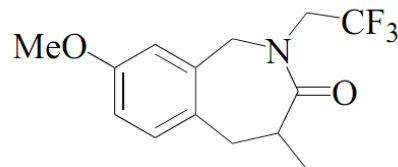


図2 Compound Aの分子構造

- (2) 皮膚以外の組織への有効性の検討するため、腸管上皮細胞(CaCo-2 cells)による細胞遊走アッセイを行った。腸管上皮細胞は非常に剥がれやすい細胞であったため、図3のようにカミソリで細胞に傷をつけ、傷の片方の細胞を綿棒で剥がしことで、創傷部位を作成した。30  $\mu$ M のCompound A を作用させ、18時間後の細胞の伸展を計測し、細胞伸展促進効果を比較した。

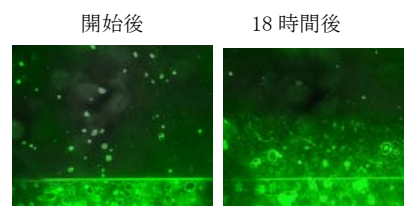


図3 腸管上皮細胞での *in vitro* の創傷治癒モデル

## 4. 研究成果

- (1) 表皮細胞を用いた細胞遊走アッセイにより2-ベンズアゼピン誘導体の構造機能関連を検討した。窒素上の置換基を水素(H)、メチル基(Me)、エチル基(Et)、トリフルオロエチル基(Compound A)、プロピル基(nPr)、イソプロピル基(iPr)、ブチル基(Bu)、ペンチル基(Pen)、ベンジル基(Bn)にしたものを化学合成して用いた。その結果、アゼピン環の窒素の側鎖がメチル基、エチル基のときは細胞遊走促進作用を示したが、さらに立体的に大きい側鎖であるプロピル基ではその作用はなくなった(図4)。このことからアゼピン環の窒素の側鎖の立体的な大きさが細胞遊走の促進に重要であることが明らかになった。なお、他の部位においては活性に影響はなかった。

検討した2-ベンズアゼピン誘導体において、もっとも細胞遊走活性が高

かったものはメチル基もしくはエチル基を有する2-ベンズアゼピン誘導体であったが、以下の作用メカニズムの検討は化学合成する際の合成収率が良いCompound Aを用いて行った。

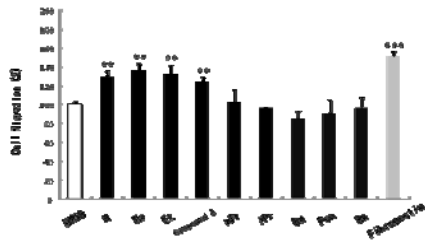


図4 2-ベンズアゼピン誘導体の構造機能連関

(2) 2-ベンズアゼピン誘導体による細胞遊走促進作用のシグナル伝達系を解明するため、種々の細胞成長因子の中和抗体の存在下、細胞遊走アッセイを行った。細胞増殖には影響を与えることなく、細胞遊走を促進する細胞成長因子として、TGF-βとEGFが知られているのでそれぞれの中和抗体を用いて検討を行った。その結果、TGF-βの中和抗体存在下では2-ベンズアゼピン誘導体による細胞遊走促進効果が顕著に抑制されることが明らかになったが、EGFの中和抗体では細胞遊走促進効果には影響は見られなかった(図5)。これにより、2-ベンズアゼピン誘導体はTGF-βの分泌を亢進することで遊走を促進している可能性が示唆された。

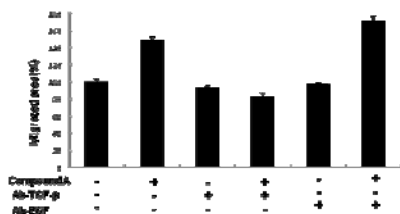


図5 TGF-βとEGFの中和抗体による遊走抑制効果

(3) 皮膚以外の組織への有効性を探ることを目的として、腸管上皮細胞における2-ベンズアゼピン誘導体の細胞遊走促進作用について細胞遊走アッセイにより検討した。その結果、皮膚と同様に腸管上皮細胞においても2-ベンズアゼピン誘導体は濃度依存的に細胞遊走促進作用を発揮することが明らかとなった(図6)。このことから、2-ベンズアゼピン誘導体は消化器潰瘍治療薬となる可能性も示された。

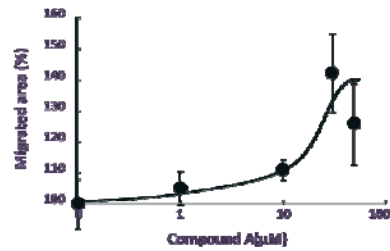


図6 腸上皮細胞での創傷治癒促進効果

## 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1件)

- ① Tanaka Y., Honda T., Matsuura K., Kimura Y., Inui M., “In Vitro Selection and Characterization of DNA Aptamers Specific for Phospholamban.” *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 329. 57-69 (2009) 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 松浦健二、本田健、乾 誠、インスリン様成長因子Cドメイン由来のテトラペプチドによる皮膚上皮細胞遊走促進のメカニズム、第83回日本薬理学会年会、2010年3月16日、大阪国際会議場
- ② 松浦健二、西田輝夫、乾 誠、インスリン様成長因子-1Cドメイン由来のテトラペプチドSSSRによる皮膚創傷治癒促進作用、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日、リジェール松山
- ③ 松浦健二、榎藤俊一、西田輝夫、乾 誠、インスリン様成長因子-1由来のSSSRペプチドによる表皮細胞伸展促進及び皮膚創傷治癒促進作用、第82回日本薬理学会年会、2009年3月18日、パシフィコ横浜会議センター
- ④ 松浦健二、榎藤俊一、西田輝夫、乾 誠、インスリン様成長因子-1由来のテトラペプチドSSSRによる皮膚創傷治癒促進作用、第61回日本薬理学会西南部会、2008年11月28日、米子コンベンションセンター

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：消化器疾患治療剤  
発明者：松浦 健二  
権利者：山口大学  
種類：特許  
番号：特願 2009-257569  
出願年月日：2009年11月11日  
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松浦 健二 (MATSUURA KENJI)  
山口大学 ・ 大学院医学系研究科 ・ 助教  
研究者番号：20452641

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし