The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	機能性ペプチドSVVYGLRの固定化とその血管新生作用
Author(s)	濱田, 吉之輔
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43653
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【7】

氏　　名	濱　田　吉之輔（はまだ よしのすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　16921　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学　位　論　文　名	**機能性ペプチドSVVYGLRの固定化とその血管新生作用**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　高橋　純造 （副査） 教　授　伊集院直邦　　助教授　村上　伸也　　講　師　岩本　容泰

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

ある程度以上大きな組織再生には、細胞、細胞の足場となる生体材料、成長因子以外に、細胞への栄養補給のための血管新生が求められる。従来からの血管新生促進因子は、副反応等の問題をはらんでおり、液性物質として投与されるために必要な部分に効率よく作用することは厳密には困難であった。生体安全性、代謝性等で大きな利点を有するペプチドは、デザインが容易であり高効率な合成法や検定法が確立されている。血管新生作用を有するペプチドを見出し、それを合成して生体材料に結合させることができれば、大きな有用性が期待される。本研究は細胞がオステオポンチンに接着する際に認識されるアミノ酸配列 Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg（SVVYGLR）に着目し、これを合成し、ゼラチン上に固定化した。このSVVYGLRペプチド固定化ゼラチンの血管新生能を、血管内皮細胞を用いた*in vitro*の実験、およびマウスを用いた*in vivo*での実験により検討した。

【研究方法】

1）ペプチドの合成と検定：自動ペプチド合成機（PSSM-8；島津製作所）を用いて合成した。得られたペプチドを、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LCMS；島津製作所）で検定した。ペプチドをビーズに固定化し、ペプチド単体の機能をAdhesion assayにて検討した。またSVVYGLRを構成する7個のアミノ酸の一つをアラニンに置換し合計7種類のヘプタペプチドを上記と同様に合成した。

2）キャリアタンパク質の決定：キャリアタンパク質として、アレルゲンフリーなゼラチン（FreAlagin AD／分子量4,000～5,000；宮城化学）を使用した。ゼラチンの最適濃度を、コラーゲンのレセプターであるインテグリン$\alpha 2\beta 1$のみ発現しているα2B2細胞を用いてAdhesion assayにて検討した。

3）ペプチドとキャリアタンパク質の結合：ペプチドのN末端のアミノ基と、キャリア中の任意のアミノ基とを、架橋剤としてグルタルアルデヒドを結合した。結合のは薄層クロマトグラフ（TLC；島津製作所）により確認した。

4）*in vitro*でのSVVYGLR固定化ゼラチンの細胞生物学的検討：細胞はTRLEC細胞（Transformed Rat Lung Endothellal Cells）を用いた。

　a）細胞増殖能の検討（WST assay）：SVVYGLR固定化ゼラチンでコートしたプレート上に細胞を播種し、1、2、3日後に増殖した細胞数を測定した。

b）細胞接着能の検討（Adhesion assay）：SVVYGLR 固定化ゼラチンでコートしたプレート上に細胞を播種し、1時間後に接着した細胞数を測定した。

c）細胞移動能の検討（Wound assay）：SVVYGLR 固定化ゼラチンでコートしたシャーレ上でコンフルエントにした細胞を帯状に剥離し、3時間後に剥離部へ移動した細胞の面積を測定した。

d）管腔形成能の検討（3D assay）：最下層のコラーゲンゲル層、中層の血管新生因子 VEGF（0.01μg/ml）または SVVYGLR 固定化ゼラチン（0.02μg/ml）含有コラーゲンゲルへ細胞を播種した細胞層、最上層の培養液層を重層し、管腔形成能を光学顕微鏡で観察した。

5）*in vivo* での血管新生能の検討（DAS assay）：マウスは BALB/cAnNCrj（4週齢、雌）を使用した。VEGF（0.01μg/ml）または SVVYGLR 固定化ゼラチン（0.02μg/ml）を注入したディフュージョンチェンバーを、マウスの背部へ埋入し、5日後の血管新生の状態を観察した。アラニン置換した7種類のペプチドについても同様の実験を行った（Ala-scan assay）。

【研究結果】

1）合成ペプチドは、SVVYGLR の質量理論値と一致する単一成分であった。対照（ビーズのみ）では細胞接着が見られず、ペプチド固定ビーズでは細胞接着が確認できた。

2）濃度10μg/ml の AD ゼラチンは、コラーゲンと同程度の細胞接着能を有した。

3）薄層クロマトグラフ（TLC）により、ペプチドとゼラチンの結合が確認された。

4）0.02～2 μg/ml の SVVYGLR 固定化ゼラチンは、いずれも同程度の細胞増殖能と細胞接着能を示した。細胞移動能は、濃度0.02μg/ml の SVVYGLR 固定化ゼラチン上で、濃度0.2、2 μg/ml のものより有意に亢進した。管腔形成能については、対照（ゼラチンのみ）はまったく管腔形成が見られなかったが、SVVYGLR 固定化ゼラチンおよび VEGF では管腔形成が認められた。

5）*in vivo*（DAS assay）において SVVYGLR 固定化ゼラチンでは、多数のスパイラル状の新生血管が形成された。Ala-scan において4番目のチロシンをアラニンに置換したペプチドにおいてのみ、血管新生作用が全く認められなかった。

【結論】

SVVYGLR ペプチドを合成しゼラチンに固定化した SVVYGLR ペプチド固定化ゼラチンが、顕著な血管新生作用を有することを見出した。SVVYGLR のN末端とC末端のアミノ酸は血管新生作用にとって重要ではないことが明らかになり、その血管新生作用を損なうことなく、N末端またはC末端をキャリアとの結合部位として利用することが可能となり幅広い応用が期待できる。

論文審査の結果の要旨

組織再生には、細胞への栄養補給のための血管新生が求められる。従来からの血管新生促進因子は、副反応等の問題がある。本研究では細胞がオステオポンチンに接着する際に認識される7個のアミノ酸配列 Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg（SVVYGLR）ペプチドを合成し、ゼラチン上に固定化し、その血管新生能を検討した。

血管内皮細胞を用いた in vitro の実験および、マウスを用いた in vivo の実験から、この SVVYGLR ペプチド固定化ゼラチンは、血管新生促進因子 VEGF に匹敵する血管新生能を有することを確認できた。

本研究の結果は、多くの医療分野において有効に利用できる知見であり、博士（歯学）に値するものと認める。