The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	機能性ペプチドSVVYGLRが間葉系細胞および破骨細胞に及ぼす影響
Author(s)	金田, 善俊
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49256
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

【15】

氏　　名	金　田　善　俊（かねだ よしとし）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２１９１７　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**機能性ペプチド SVVYGLR が間葉系細胞および破骨細胞に及ぼす影響**
論文審査委員	（主査） 教　授　矢谷　博文 （副査） 教　授　天野　敦雄　　准教授　西村　理行　　講　師　松本　卓也

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

オステオポンチン上にはインテグリン（INT-）α４β１、α４β７、α９β１と結合する７個のアミノ酸配列 Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg（SVVYGLR）が存在しており、近年このペプチド断片が *in vitro* および *in vivo* において血管新生能を有することが報告された。欠損組織の再生には細胞への酸素や栄養の供給を行っている血管の新生が不可欠であるため、SVVYGLR ペプチドは歯周組織の再生を促す作用を有する可能性が考えられるが、このペプチドが歯周組織の細胞に及ぼす影響はわかっていない。本研究では機能性ペプチド SVVYGLR が歯周組織の再生において有用である可能性を探索することを目的とし、このペプチドが歯周組織に存在する間葉系細胞および破骨細胞に及ぼす影響を検討した。

［方法］

NH_2-SVVYGLR-COOH 配列のペプチドを合成し、これがヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）、ヒト歯根膜由来線維芽細胞（hPLC）、ヒト歯肉線維芽細胞（hGF）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の接着、増殖能に及ぼす影響を評価した。細胞接着実験では、ペプチドをコートした 96 穴細胞培養プレート上に細胞を播種し、30 分後に付着している細胞をクリスタルバイオレットで染色し吸光度を測定した。また、細胞接着に関与するインテグリンを検討する目的で、抗ヒト INT-α９β１、INT-α４β１、INT-αｖβ３モノクローナル中和抗体を用いた hMSC の接着阻害実験、および INT-αｖβ３の高発現細胞株β３-Chinese Hamster Ovary（CHO）細胞を用いた細胞接着実験を行った。細胞増殖能評価には、WST-1 細胞増殖アッセイを用いた。

次に、SVVYGLR ペプチドが破骨細胞形成に及ぼす影響を検討する目的で、マウス初代骨髄細胞あるいはマウス単球形細胞株 RAW264.7 を、ペプチド存在下あるいは非存在下で RANKL 刺激により破骨細胞に分化誘導した。各条件下で誘導後に、TRAP 染色陽性かつ多核である細胞数のカウント、または培養上清中の TRAP 活性の ELISA 測定により破骨細胞分化を評価した。また、12 週齢 Sprague-Dawley 系雄ラットの頭蓋骨に直径 5 mm の欠損を形成し、10μg の SVVYGLR ペプチドを含浸させたコラーゲンスポンジを埋入した。術後３、５週間で頭蓋骨を摘出し、組織切片を TRAP および H-E 染色し、切片中の破骨細胞数と新生骨量を評価した。

［結果および考察］

細胞接着実験の結果、hMSC、hPLC、hGF、HUVEC の接着能は SVVYGLR コーティング濃度依存的に増加した（$P<0.01$）。ペプチドをコートしたプレートに対する hMSC の接着能は、細胞に抗ヒト INT-αvβ3 抗体を作用させた場合、コントロール IgG、抗ヒト INT-α4 あるいはα9β1 抗体を作用させた場合と比較して有意に抑制された（$P<0.01$）。また、ペプチドをコートした培養プレートに対するβ3-CHO の接着細胞数は、ベクターのみを導入した CHO 細胞の場合と比較して有意に増加した（$P<0.01$）。細胞増殖実験の結果、hMSC、hPLC、HUVEC の増殖能は SVVYGLR 存在下で濃度依存的に増加し、100 ng/ml のペプチドを添加し 6 日間培養した場合、細胞数は非添加の場合と比較して有意に増加した（$P<0.01$）。

マウス初代骨髄細胞に 100 ng/ml の SVVYGLR を添加して破骨細胞に分化誘導した場合、添加 13 日後の破骨細胞の形成数および培養上清中の TRAP 活性は有意に減少した（$P<0.05$）。RAW246.7 細胞株を破骨細胞に分化誘導した場合にも、SVVYGLR は 100 ng/ml で破骨細胞の形成数を最も抑制した（$P<0.01$）。動物実験の結果、コントロール群と比較して、ペプチド含浸コラーゲンスポンジを埋入した切片中の TRAP 陽性破骨細胞数は有意に減少しており（$P<0.05$）、また新生骨量は増加している傾向が認められた。

以上の結果から、SVVYGLR は hMSC、hPLC、などのヒト間葉系細胞の接着能および増殖能を促進することが明らかとなった。また、この細胞接着には SVVYGLR と INT-αvβ3 の相互作用が関与していることが明らかとなった。さらに、このペプチドが RANKL 誘導性の破骨細胞形成を抑制することが示された。

歯周組織の骨欠損部において、血管新生能を有する機能性ペプチド SVVYGLR は組織の再生を担う間葉系細胞の接着能および増殖能を促進し、破骨細胞の形成を抑制することで組織再生に効果的に作用する可能性が考えられる。今後、SVVYGLR の生体内における作用機序を明らかにすることで、このペプチドを応用した骨格系生体材料の開発に繋がる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はペプチド SVVYGLR が間葉系細胞および破骨細胞に及ぼす影響について検討を行ったものである。

その結果、ペプチド SVVYGLR は間葉系細胞の接着能、増殖能を促進するとともに破骨細胞の分化を抑制することが明らかとなった。

以上の結果は、ペプチド SVVYGLR の新たな作用を示したことにのみならず、新規の歯科再生医療材料の開発につながる発見であり、博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。