The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	オステオポンチン由来機能性ペプチドSVVYGLRが骨格筋前駆細胞の生物学的特性に及ぼす影響
Author(s)	薄木, 崇介
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69481
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　薄木　崇介　　）	
論文題名	オステオポンチン由来機能性ペプチドSVVYGLRが骨格筋前駆細胞の生物学的特性に及ぼす影響

論文内容の要旨

【目的】

細胞外基質の一種であるオステオポンチン内に存在する7アミノ酸残基であるSer-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg(SVVYGLR(SV))ペプチドは、*in vitro*における血管新生能、ならびに線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を誘発する能力を持ち、虚血性心筋症モデル動物において心機能改善能を有することから心筋症等の治療への有用性が示唆されている。一方、骨格筋は、心筋同様の横紋筋であるが、前駆細胞が活性化されることで筋損傷後の組織の修復、再生が行われる点で心筋とは大きく異なる。SVペプチドが骨格筋損傷後の再生機序に及ぼす影響、ならびに骨格筋前駆細胞に対する作用はまだ知られていない。そこで本研究の目的は、骨格筋損傷時に活性化する骨格筋前駆細胞に対してSVペプチドが与える影響を細胞生物学的に検討することである。

【方法】

SVペプチド、および非機能性SVペプチド(random SV)は自動ペプチド合成機(PSSM-8)を用いて合成した。

1)*in vitro*におけるSVペプチドの細胞生物学的検討:

細胞はヒト由来筋衛星細胞(Human Skeletal Muscle Satellite Cells：HskMSC) 、ヒト由来骨格筋筋芽細胞 (Human Skeletal Muscle Myoblasts：HSMM)を用いた。

a)細胞増殖能の検討 (WST assay)：96穴マルチプレート各ウェルに2.0×10^4cells/mlのHskMSCおよびHSMMを播種させ、SVペプチド(20ng/ml)、random SV(20ng/ml)、もしくはPBS含有培地で培養した。12～72時間培養後の細胞増殖能をWST-1 Cell Proliferation Assay Kitを用いて評価した。

b)細胞接着能の検討(Adhesion assay)：96穴マルチプレート各ウェルをフィブロネクチンで2時間ウェットコーティングした。コーティング処理後、各ウェルに2.0×10^4cells/mlに調整したHskMSCおよび HSMMを播種させ、SVペプチド(20ng/ml)、random SV(20ng/ml)、もしくはPBS含有培地にて2時間培養した。その後、プレート底面に接着した細胞をクリスタルバイオレットで染色し評価した。

c)細胞遊走能の検討(Boyden chamber assay)：ポアサイズ8μmのポリカーボネートメンブレンをフィブロネクチン溶液に室温で30分浸漬し、コーティングを行った。ケモアトラクタントとしてSVペプチド(20ng/ml)、random SV(20ng/ml)、およびPBS含有培地をチャンバーの下層に加えた。チャンバーの上層には2.0×10^4cells/mlのHskMSCおよびHSMMを播種させた。12時間後、ヘマトキシリンにて染色し、メンブレンの下面へ遊走した細胞数を光学顕微鏡で計測した。

d)細胞移動能の検討(Wound healing Assay)：シャーレ(φ60mm)上でHskMSC、およびHSMMを100%コンフルエント状態まで培養した。その後細胞を帯状に剥離し、SVペプチド(20ng/ml)、random SV(20ng/ml)、および PBS含有培地にて培養後、6時間毎の剥離部への細胞移動量を測定した。

e)遺伝子発現量の検討(Real-time polymerase chain reaction(PCR))：HSMMをSVペプチド(20ng/ml)、random SV(20ng/ml)、およびPBS含有培地で48、72時間培養し、それぞれmRNAを抽出した。抽出したmRNAから逆転写を行い、cDNAを合成した。得られたcDNAをテンプレートとして用い、Real-time PCRにより骨格筋分化マーカーであるMyogenin遺伝子の発現を検討した。

f)免疫蛍光染色：HSMMをSVペプチド(20ng/ml)、random SV(20ng/ml)、PBS含有培地、および筋芽細胞の筋管形成を誘発する2% Horse Serum(HS)含有培地で48、72時間培養し、それぞれ筋管形成の特異マーカーであるMyogeninによる免疫蛍光染色を行い、発現の検討を行った。全細胞核数に対する、Myogenin陽性細胞核数を計測し、Myogenin陽性率として比較検討した。

2) *in vivo*における骨格筋形成能の検討：実験動物にJcl:SD系ラット(10週齢)を用いた。骨格筋損傷モデルとして、ラット両側咬筋浅深層に頬骨弓から下顎角にかけて筋損傷(III度：完全断裂)を加え、左側筋切断端にSVペプチド(20ng/ml)を1ml注入投与し、右側を筋切断処置のみとした(SV群)。対照群として、同処置を施した後、左側にPBSを注入投与し

た(PBS群)。筋損傷後1週間で両側咬筋を摘出しヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、MyoDおよびMyogeninの特異抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。HE染色標本では損傷部の肉芽組織面積を評価し、免疫組織化学染色標本では損傷部のMyoDおよびMyogenin陽性細胞数を計測した。それぞれ非投与側の免疫染色陽性細胞核数に対する投与側の免疫染色陽性核数の比を求め、SV群、PBS群で比較した。

【結果】

1）*in vitro*実験：SVペプチド(20ng/ml)は、HSMMの細胞増殖能は投与後12時間および24時間でrandom SV、PBSと比較し細胞増殖能を有意に向上させた($P<0.05$)。またHSMMの細胞遊走能、細胞移動能においてSVペプチドはrandom SV、PBSと比較し、36時間、48時間培養後、有意に増加させた($P<0.05$)。一方、HskMSCの機能については、SVペプチド、random SV、PBS間で、細胞増殖能、細胞遊走能に差はなかった。HSMMの分化能に関しては、SVペプチド投与後48時間および72時間経過後にMyogeninの遺伝子発現量が多かった。さらに免疫蛍光染色については、48，72時間培養後におけるHSMMのMyogenin陽性率は、いずれもSVペプチドでrandom SV、PBSと比較し有意に高かった($P<0.05$)。さらに72時間培養時には、SVペプチドとHSにおいて同程度のMyogenin陽性率を認めた。

2）*in vivo*実験：HE染色による組織学的評価では、PBS群と比較し、SV群は投与側損傷部における肉芽組織面積は有意に少なかった($P<0.05$)。また免疫組織化学染色の結果、筋損傷部における骨格筋マーカー発現細胞数を計測したところ、PBS群に比較しSV群の筋組織においてMyoD、Myogenin陽性比が有意に増加していた($P<0.05$)。

【考察】

*in vitro*において、SVペプチドは筋芽細胞に対して、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞移動能を顕著に向上させることを見出した。SVペプチドは筋衛星細胞に対して直接的な関与はないものの、筋芽細胞へ分化後、細胞機能が促進されると考えられる。創傷治癒ならびに組織再生において、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞移動能は重要な役割を担うことから、筋芽細胞の機能が賦活化されることは筋損傷後の組織再生修復過程を促進する可能性がある。また筋芽細胞においてMyogeninの発現量が増加したことから、SVペプチドは筋芽細胞の筋管形成を誘発することが示唆された。*in vivo*の結果、SVペプチドは骨格筋損傷後の肉芽組織形成を抑制、または減少させることが示唆された。さらに、SVペプチド投与側の筋損傷部でMyoDおよびMyogenin陽性細胞が増加したことから、SVペプチドが筋損傷部での筋芽細胞の増殖を増加させ、筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導に関与していることが考えられた。これらの結果から、筋損傷後の骨格筋再生促進作用に寄与することが示唆される。

【結語】

SVペプチドは筋芽細胞の増殖能、遊走能、筋管への分化能を促進することで、筋損傷部位の骨格筋再生促進に効果を及ぼすことが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　薄木　崇介　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	古郷幹彦
	副 査	教授	野田健司
	副 査	准教授	前田隆史
	副 査	講師	宇佐美悠

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨格筋再生促進剤を新規開発する目的で、オステオポンチン由来機能性ペプチド Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg(SVVYGLR(SV))が骨格筋再生過程に及ぼす影響について、骨格筋前駆細胞を用いて細胞生物学的に検討したものである。その結果、SV ペプチドが骨格筋再生過程で活性化される骨格筋前駆細胞である筋芽細胞の増殖能、遊走能、ならびに筋管細胞への分化能を促進することで、筋損傷部位の治癒促進や骨格筋再生促進に効果を及ぼすことが示唆された。

本研究は SV ペプチドの新たな作用を示したのみならず、骨格筋の再生を促進し、筋機能を改善する生体材料の一つとして有用であることを見出し、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。