



Title	オステオポンチン由来SVVYGLRペプチドが咀嚼筋損傷後の摂食機能回復に及ぼす影響
Author(s)	松下, 豊
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69486
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (松下 豊)

論文題名 オステオポンチン由来SVVYGLRペプチドが咀嚼筋損傷後の摂食機能回復に及ぼす影響

論文内容の要旨

【緒言】

顎口腔領域の骨格筋は摂食嚥下、呼吸、構音等の身体活動を担う重要な役割があり、外傷・手術による筋組織の重篤な損傷は著しいQOLの低下につながる。しかし重篤な筋損傷に対しての現状で選択しうる治療法では、筋機能の完全な回復は困難であり、今後の新規治療薬の開発が望まれている。

マトリセルラータンパクの一種であるオステオポンチンは SVVYGLR 配列を介したインテグリンとの相互作用により、生体内で様々な機能を示す。SVVYGLR の 7 つのアミノ酸より構成される低分子ペプチド (SV ペプチド) を合成し、その機能に関して様々な細胞・組織で検討してきたが、骨格筋での作用は未だ検討されていない。しかしオステオポンチンは筋芽細胞の細胞接着・増殖に有意に影響を及ぼすことが報告されており、SV ペプチドの損傷骨格筋での治癒促進作用が期待できる。

本研究は、筋損傷後の再生修復過程において SV ペプチドが如何なる影響を及ぼすかを形態学的評価ならびに生理学的機能評価を用いて検討を行った。

【研究方法】

筋損傷モデルの作製：SD 系ラット (10週齢) を用いて三種混合麻酔薬の腹腔内投与による全身麻酔下で両側咬筋を全層切断し、断端周囲に SV ペプチド (20 ng/ml) または PBS を 1 ml 注入投与した。摂食行動の観察では両側咬筋に薬剤の注入を行い、その他の実験に関しては左側のみでの注入とし、右側を非投与側として筋切断のみを行った。SV ペプチドを投与した群を SV 群、PBS を投与した群を PBS 群とし、片側投与の場合は左側の投与側をそれぞれ、SV 側・PBS 側とした。摂食行動特性について術後 1, 2, 4, 6, 8 週で評価を行い、術後 1 週時点での測定値を基準として検討を行った。また術後 8 週目に組織形態回復の評価を行い、その際は同一個体内での非投与側を基準とした。

筋損傷モデルの筋機能低下を評価するために、筋損傷モデル (n=6) で後述の摂食効率に関して、術前、術後 1, 2, 4 週で測定し、未処置のラット (n=4) と比較検討した。

研究1. SV ペプチド局所投与が咀嚼筋損傷後の組織形態回復に及ぼす影響

1-1：CT 画像での評価

動物用 micro CT を用いて SV 群 (n=6), PBS 群 (n=6) のラット頭部の撮影を行い、得られた DICOM データより、前鼻棘先端・両側下顎頭上縁を通る平面を基準平面とした MPR 像を作製した。咬筋切断部を含む咬合平面の高さでの筋横断面積 (CSA) (μm^2)、平均 CT 値 (HU)、% CSA (計測領域における筋 CT 値を有する面積割合) (%) を算出して比較検討した。

1-2：組織学的評価

SV 群 (n=6), PBS 群 (n=6) の咬筋を摘出し、パラフィン包埋後、筋横断組織切片を作製した。ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色により筋損傷部位の再生筋線維の組織学的性状を評価し、シリウスレッド染色により瘢痕組織形成量および筋線維径を計測し、比較検討した。

研究2. SV ペプチド局所投与が咀嚼筋損傷後の摂食行動特性に及ぼす影響

2-1：咬筋筋電図での評価

SV 群 (n=5), PBS 群 (n=6) の両側咬筋筋腹の遠位切断端に径 0.25 mm、極間距離 1 mm の双極ワイヤー電極を埋入し、歯科用レジンをを用いて頭頂部頭蓋骨に固定した。導出用コネクターを介して自由摂食行動時の筋活動を記録した。50 以上の臼磨相の咬筋バーストを無作為に抽出し、整流平滑化 (ARV) 処理を行い分析に用いた。各群におけるバースト持続時間 (ms)、バースト周期 (ms)、バースト最大振幅 (mV)、バースト積分値 ($\text{mV} \cdot \text{ms}$) を比較検討した。また同時に記録した左右の咬筋 ARV 波形よりリサージュ筋電図を作製し、顎運動の動作分析を行った。各咀嚼ストロークでの近似直線より平均傾き、平均 R^2 値を求め、作業側の内訳に対しても比較検討した。

2-2：摂食行動の観察

暗期 4 時間での摂食行動を観察ケージ内でビデオカメラを用いて 2 方向から記録した。SV 群 (n=8), PBS 群 (n=6) における毎時間の摂食量、摂食時間から、摂食効率を算出した。平均摂食効率 (mg / s)、累積摂食量 (mg)、累積摂食時間 (s)、体重 (g) を計測項目とし、両群間で比較検討した。

【結果】

筋損傷モデルの摂食機能変化：

筋損傷モデルは正常ラットより有意に低い摂食効率を示し、摂食機能は正常より低下していた。

研究1. SV ペプチド局所投与が咀嚼筋損傷後の組織形態回復に及ぼす影響

1-1：CT 画像解析より、SV 群は PBS 群と比較して CSA と % CSA の値は有意に高かった。平均 CT 値に関しては両群とも差がなかった。

1-2：組織学的検討では PBS 群、SV 群ともに、HE 染色像で損傷部位に横紋構造および辺縁核を有する成熟した筋線維形成が確認された。シリウスレッド染色で、PBS 群では瘢痕組織が切断部の広範囲に観察されたが、SV 群の SV 側では筋膜周囲に限局しており、瘢痕の占める面積は有意に少なかった。さらに SV 群の SV 側における再生筋線維は径が有意に太く、より成熟した筋線維となっていた。

研究2. SV ペプチド局所投与が咀嚼筋損傷後の摂食行動特性変化に及ぼす影響

2-1：咬筋筋電図で両群ともにバースト周期に有意差を認めなかった。バースト積分値は SV 群で術後 6 週をピークとする経時的な増加を示し、PBS 群と比較して有意な高い値を示した。バースト持続時間は両群とも経時的な変化はなかったが、PBS 群と比較し、SV 群で術後 2, 6, 8 週で有意に高い値を示した。また、バースト最大振幅は両群で有意差を認めなかった。

リサーチ筋電図では平均傾きは SV 群で PBS 群と比較し有意に小さい値となった。平均 R² 値は両群間で有意差はなかった。また作業側の内訳は SV 群で SV 側を作業側とする割合が多くなっており、SV 群が PBS 群より有意に高い値となった。

2-2：摂食行動の観察では、両群間で累積摂食量、累積摂食時間、ならびに体重変化に有意差を認めなかった。平均摂食効率は SV 群で術後 1 週目から摂食効率の経時的な増加傾向を認め、術後 1 から 4 週、6 から 8 週の間では統計学的に有意な増加であった。術後 8 週の時点で術後 1 週目の 1.4 倍程度まで増加しており、PBS 群より有意に高い摂食効率の増加を示した。また PBS 群では術後 2 週から 4 週の間で摂食効率の有意な増加を示すものの、以降は変化がなかった。

【考察】

本研究における咬筋損傷モデルは、咬筋に外科的侵襲を加え、術後の摂食機能の低下を認めたことから、顎顔面領域での外傷や手術などによる筋損傷を想定した実験動物モデルとして研究に用いた。

CT 画像および組織染色の評価では、術後 8 週目に SV 側で筋横断面積が大きく、内部に太い筋線維が多く、瘢痕組織は少ない結果であった。この結果から、SV ペプチドの投与により咬筋切断部に筋線維の再生が多く起こり、瘢痕の形成は抑制されることが示された。また咬筋筋電図の結果からは、筋損傷後の治癒過程において SV ペプチドを投与することで再生筋線維による筋活動が大きくなることが示され、筋線維の再生が亢進していることが示唆された。またリサーチ筋電図の結果から、SV 側での咀嚼が多くなっていた。様々な生理的变化に適応するために咀嚼頻度に偏りが生じることが知られているが、SV ペプチド投与により損傷部の筋再生修復が促進されたことが、作業側の偏りの主な要因であったと推察される。摂食行動の観察からは SV 群で摂食効率の筋損傷 1 週間後から 8 週目まで経時的な上昇がみられた。このことから、SV ペプチドは損傷部における筋再生を早期より開始させ、再生筋の形成、あるいは線維径の増大変化が長期に持続して起こっていた可能性が推察される。

現在、多くの研究者により治療薬の開発が進められているが、その中でも SV ペプチドは安全性や代謝性の面で優れている。詳細な機序は今後の細胞生物学的検索が必要であるが、SV ペプチドは摂食機能障害等の筋損傷後に起こりうる機能低下の予防に対し有効に働くことが示され、筋損傷に対しての有用な治療法となりうることが示唆された。

【結論】

本研究より SV ペプチドの投与は骨格筋の持つ自己再生能力を賦活化し、筋損傷後の機能回復に有意に働くことが示され、SV ペプチドが有効な筋機能再生治療の 1 つとなる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松 下 豊)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 古郷幹彦
	副 査	教授 豊澤 悟
	副 査	准教授 波多賢二
	副 査	講師 岩井聡一
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、筋損傷後の筋機能低下に対する新規治療法の開発を行うことを目的とし、外科的侵襲による顎口腔領域の骨格筋損傷を想定した実験動物モデルを作製し、咬筋損傷ラットモデルを用いたSVVYGLR ペプチドの骨格筋再生治癒に及ぼす影響を検討したものである。</p> <p>その結果、SVVYGLR ペプチドは咬筋損傷後の治癒過程において、骨格筋の再生能を賦活化し、良好な治癒形態が得られることが形態学的・生理学的に明らかとなり、SVVYGLR ペプチドの投与が筋損傷に対しての有用な治療法になる得ることが示された。</p> <p>この結果は、外傷や手術侵襲などによる筋損傷後の機能低下の予防に対し、SVVYGLR ペプチドが有効に働くことを示した点で有意義であり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		