The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	オステオポンチン由来SVVYGLRペプチドが口腔粘膜の創傷治癒に及ぼす影響
Author(s)	安田, 卓司
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72228
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　（　　安田　卓司　　）	
論文題名	**オステオポンチン由来SVVYGLRペプチドが口腔粘膜の創傷治癒に及ぼす影響**

論文内容の要旨

［緒言］

細胞外基質の一種であるオステオポンチン(OPN) は、創傷治癒、骨代謝、免疫応答など多くの生命現象に関与している。OPNがトロンビンにより切断された際にN-末端に表出する SVVYGLR 配列や、これらのアミノ酸残基から生成された低分子ペプチド（SVペプチド）は、これまでに強力な血管新生作用や、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進することで虚血性心筋症モデルにおいて心機能を改善させるなど、生体内で様々な機能を有する事が報告されている。皮膚欠損動物モデルにおいてもSVペプチドは、皮膚線維芽細胞とケラチノサイトの運動能を向上させるとともに、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を促進させることで経時的な創傷治癒率を改善させることが報告されているが、粘膜欠損を伴う創傷治癒過程にSVペプチドが如何なる効果をもたらすかについては未だ明らかとされていない。

そこで本研究では、SVペプチドが口腔粘膜の創傷治癒過程に如何なる影響を及ぼすかを明らかにするため、口腔粘膜損傷モデルを作製し、形態学的、免疫組織学的検討を行うとともに、口腔由来細胞に対するSVペプチドの作用について細胞生物学的に検討を行った。

［研究方法］

研究1．SVペプチド局所投与が頬粘膜損傷後の治癒過程に及ぼす影響

頬粘膜損傷モデルの作製.

SD 系雄性ラット（11週齢、体重350-400 g）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左側頬粘膜（口角から7.5 mm後方）に、直径5 mmの大きさの粘膜損傷を咬筋筋膜上の深さで作製した（頬粘膜損傷モデル）。創周囲粘膜下にPBS(PBS群)、SVペプチド(20 ng/ml；SV群)または非機能性SVペプチド(random SV;アミノ酸配列GYRVLSV、20 ng/ml；RSV群)を4カ所に分割して局注投与（計1 ml）し、以下の検討を行った。

1-1：創部の経時的修復変化の検討

創作製日を0日目として、翌日以降2日おきに創部の写真撮影を行い、創部の残存面積を計測し、創部の修復率を3群間（SV群: n= 5、PBS群: n= 5、RSV群: n= 7）で比較検討した。

1-2：組織学的検討

PBS群（n= 18)、RSV群（n= 18)、SV群（n= 18)の頬粘膜損傷モデルから、創部作製後1,3,9日目の時点で頬粘膜組織を摘出し、連続組織切片を作製した。創部作製後1,3日目の切片に対して血管内皮細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞のマーカーとしてvon Willebrand因子(vWF)、Hsp47、αSMAをそれぞれ用いて免疫組織化学染色を行い、陽性細胞数を3群間で比較検討した。また創部作製後3,9日目の切片に対しては膠原線維を選択的に染色するシリウスレッド染色を行った。

研究2．SVペプチドが口腔由来細胞に及ぼす影響

ヒト歯肉由来線維芽細胞（Normal Human Gingival Fibroblasts：NHGF）、ヒト口腔粘膜由来ケラチノサイト(Human Oral Mucosa Keratinocytes：HOMK)の2種類のヒト口腔由来細胞を用い、PBS、SVペプチド(20 ng/ml)、random SV(20 ng/ml)含有培地条件下で以下の実験を行った。

2-1：細胞増殖能の検討（WST assay）

96ウェルプレートを用いて、NHGFを3.0×10^4cells/ml、HOMKを4.0×10^4cells/mlでそれぞれ播種した。PBS、SVあるいはrandom SVの3種類の含有培地条件下にて0,24,48,72時間培養し、発色試薬を各ウェルに添加し2時間の呈色反応を行い、吸光度を測定し3群間で比較検討した。

2-2：細胞接着能の検討(Adhesion assay)

細胞外基質でウェットコーティングした96ウェルプレートの各ウェルにNHGFおよびHOMKを共に2.0×10^5

cells/mlで播種し、PBS、SVあるいはrandom SVの3種類の含有培地にて2時間培養した。その後クリスタルバイオレット溶液にて染色して吸光度を測定し、3群間で比較検討した。

2-3：細胞遊走能の検討（Boyden chamber assay）

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てコーティングを行った。ケモアトラクタントとしてPBS、SVあるいはrandom SVの3種類の培地をチャンバー下層に加え、チャンバー上層に1.0×10^5cells/mlに調整したNHGFあるいはHOMKの細胞含有液を加えてインキュベートした後、ヘマトキシリン染色を行いメンブレン下層に遊走した細胞数を計測し3群間で比較検討した。

2-4：細胞運動能の検討（Wound healing assay）

24ウェルプレートの各ウェルにNHGFあるいはHOMKをPBS、SVあるいはrandom SVを含有した3種類の培地条件下にて単層培養後、2 mm幅の創傷フィールドを作製した。NHGFは6,12,24時間、HOMKは12,24,36時間培養後の創閉鎖率を計測して3群間で比較検討した。

[結果]

研究1．SVペプチド局所投与が頬粘膜損傷後の治癒過程に及ぼす影響

1-1：頬粘膜欠損創部の経時的な修復変化は、PBS群及びRSV群と比較して、SV群において明らかに創部上皮化治癒までの日数が短縮し、創部作製後7日目までの修復率は、SV群で有意に高値を示した。

1-2：vWFは創部作製後1,3日共にSV群で有意に陽性細胞数は増加した。また、Hsp47及びαSMAともに創部作製1日目では陽性細胞を認めなかったが、3日目では各群ともに陽性細胞を認め、他の2群と比較して陽性細胞数はSV群で有意に高値を示した。シリウスレッド染色では、創部作製後3日目において上皮組織欠損部（創縁間）に3群ともに肉芽組織の形成を認めたが、9日目では3群ともに結合組織上に連続した再生上皮が形成され、SV群は他の2群と比較して、均一で厚みの増大した上皮層を形成した。

研究2．SVペプチドが口腔由来細胞に及ぼす影響

2-1：NHGF及びHOMK共に、PBS群、SV群、RSV群において経時的細胞増殖を認めたが、3群間で細胞増殖能に有意差を認めなかった。

2-2：NHGF及びHOMK共に、3群間で細胞接着活性に有意差は認められなかった。

2-3：メンブレン下層に遊走した細胞数は、NHGF及びHOMK共にPBS群、RSV群と比較して、SV群において有意に増加し、細胞遊走能の向上を認めた。

2-4：創傷フィールドの閉鎖率は、NHGF及びHOMK共にPBS群、RSV群と比較して、SV群で有意に高値を示し、細胞運動能の向上を認めた。

[考察]

本研究における組織学的、細胞生物学的検討より、上皮欠損を伴う口腔粘膜損傷部にSVペプチドを作用させることで、創傷治癒過程の早期に血管新生が促進され、損傷領域へ線維芽細胞が速やかに移動することが明らかとなった。誘導された線維芽細胞は筋線維芽細胞へと分化し、細胞外基質を分泌することが知られているが、SVペプチドは筋線維芽細胞への分化を活性化し、細胞外基質の分泌と瘢痕組織の形成が促進されたと考えられる。さらに、増生した筋線維芽細胞による瘢痕組織の収縮とケラチノサイトの細胞運動能の亢進によって、欠損部が上皮で被覆されるまでの時間が短縮された結果、口腔粘膜損傷部の創傷治癒は促進されたと考えられた。

[結論]

オステオポンチン由来SVペプチドは、口腔粘膜損傷部において創傷治癒促進に有用であることが示された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　安田　卓司　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	古郷幹彦
	副 査	教授	阪井丘芳
	副 査	准教授	北村正博
	副 査	講師	佐々木淳一

論文審査の結果の要旨

本研究は、口腔粘膜の創傷治癒に対する新規治療法の開発を行うことを目的とし、SVVYGLR ペプチドの口腔粘膜の創傷治癒に及ぼす影響を *in vivo* 及び *in vitro* の実験系で検討したものである。

その結果、*in vivo* の実験において、SVVYGLR ペプチドは粘膜損傷後の治癒までの期間を短縮することを示し、また、*in vitro* の実験において、そのメカニズムの一端を明らかにし、SVVYGLR ペプチドの投与が口腔粘膜の治癒促進に有用な治療法になり得ることを示した。

この結果は、口腔内手術後の治癒を得ることに対し、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。