



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

学位論文

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

2019 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻

顎口腔疾患制御学講座

口腔外科学第一教室

安田 卓司

緒 言

口腔粘膜の創傷治癒は、皮膚の創傷治癒よりも速やかに得られると考えられており、口腔粘膜は皮膚と同様に治癒形態は一次治癒、二次治癒に大別される。悪性腫瘍の切除、顎骨嚢胞の開窓術、良性腫瘍の摘出術後に広範囲の粘膜欠損が生じる場合や、口蓋裂等形成手術時に粘膜欠損や骨露出部位が生じる場合等においては、二次治癒によって欠損部の修復治癒を図ることになる¹⁾。欠損部は先ず、創傷部の止血凝固により血餅で満たされた後、好中球の浸潤による異物の貪食作用と、線維芽細胞の増殖や血管新生により、肉芽組織に置換される。さらに線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化とコラーゲンの分泌により、肉芽組織の瘢痕線維化と創縁の収縮が起こる。これらの反応と共に、上皮創縁部では、上皮細胞の増殖と上皮組織の伸展が起こることによって、最終的に創部は上皮で被覆され治癒に至る²⁾。

口腔の外科的手術において、広範囲に粘膜欠損が生じて創部の二次治癒が必要となる場合、上皮組織の形成、伸長が促進され治癒期間が短縮されることは、周術期の QOL 向上につながる。そのため近年、従来行われてきた自家遊離植皮術に加えて、他の動物種由来のコラーゲン膜や人工膜の局所貼付が、症例によって適用されている^{3,4)}。自家植皮は恵皮部への侵襲が必要となることや、皮膚を口腔内に移植することによる粘膜との性質の違いが欠点である。さらに人工医療材料、特に生体由来の材料については、プリオンをはじめ、感染症のリスクが否定できない。また、唾液や食物、その他外部からの刺激等による貼付材料の早期脱落⁵⁾、アレルギー反応によるショック症状⁶⁾や肉芽の過剰増殖等の異常治癒を来す場合も少な

1 なく、新たな治療法の開発が望まれる。

2 オステオポンチン(OPN)は、骨組織、腎臓等で認められ、組織障害による炎症やリモデリン

3 グに際して発現が亢進されることから、マトリセルラータンパク質の一種と考えられている。さら

4 に OPN は、創傷治癒、骨代謝、血管疾患、腫瘍形成、免疫応答など多くの生命現象に関与

5 している事が知られている^{7,8)}。これまでの研究から、OPNがトロンビンにより切断された際にN-

6 末端に表出する7つのアミノ酸配列 Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg (SVVYGLR)は、細胞接着

7 分子であるインテグリンと相互作用を有することや⁹⁾、これらのアミノ酸残基より合成されたペプ

8 チド(SV ペプチド)は、強力な血管新生作用を有し、虚血性心筋症モデルラットにおいて、線

9 維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を促進することで心機能を改善させることなどが報告され

10 ている^{10,11)}。創傷治癒に関して、皮膚欠損動物モデルを用いた最近の研究より、SV ペプチド

11 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

12 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¹²

13)、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及ぼすかについては未だ明

14 らかとされていない。皮膚と粘膜上皮では、組織構造や生理機能的役割にいくつかの相違点

15 が認められるが、同じ上皮組織であることから、SV ペプチドが口腔粘膜の創傷治癒過程に効

16 果的に作用する可能性があり、得られた知見は粘膜の広範囲欠損をきたす様々な病態に対し

17 て治癒促進をもたらす新規治療法の開発に寄与するものと考えられる。

18 そこで本研究では、SV ペプチドが口腔粘膜欠損を伴う創傷の治癒過程に如何なる影響を

- 1 及ぼすかを明らかにする目的で、*in vivo* として口腔粘膜損傷モデルを作製し組織形態学的検
- 2 討を行うとともに、*in vitro* では口腔由来細胞に対する SV ペプチドの作用を、細胞生物学的に
- 3 検討した。
- 4

材料と方法

本研究における動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定（動物実験委員会承認番号:動歯-30-013-0）と動物の愛護および管理に関する法律に基づいて行なった。

1. SV ペプチドの合成と確認

SV ペプチド、および非機能性 SV ペプチド(random SV; アミノ酸配列 GYRVLSV)は、ポリエチレングリコールとポリスチレンのグラフト共重合レジン TentaGel®（粒径 80 μm）を支持体として、多種品目同時固相法自動ペプチド合成機（PSMM-8: 島津製作所）を用いて、9-フルオレニルメトキシ基(Fmoc 基)で保護したアミノ酸(Fmoc-アミノ酸)を用いたペプチド固相合成法の一つである Fmoc 法で合成した。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）で検定したところ、SV ペプチドの質量理論値と一致し、高純度の SV ペプチドの合成が確認された。

2. 口腔粘膜損傷モデルの作製

実験には、Sprague-Dawley 系雄性成獣ラット（11 週齢、体重 350-400 g）71 匹を供した。実験動物は温度 20-22℃、湿度 40-50%、12 時間ごとの明期・暗期に管理された環境で、個別のケージ内で飼育した。飼料および飲料水は自由に摂取させた。

1 ラットを三種混合麻酔薬（ミダゾラム、メテドミジン、ブトルファノール）の腹腔内投与により全
2 身麻酔を施し、ラットが触覚刺激に反応しない適切な麻酔深度に達した段階で処置を行った。
3 口腔粘膜損傷モデルの作製にあたっては、左側頬粘膜を対象部位とし、以下の手順で行
4 った。①ラットを仰臥位で固定した後、上下顎切歯間距離 15 mm の位置まで開口させた。②
5 左側頬粘膜の口角から 7.5 mm 後方を中心とした領域に対して、皮膚生検用パンチ（径 5 mm）
6 を用いて咬筋筋膜上の深さまで全層で粘膜組織を切除した¹³⁾。③局所止血後、リン酸緩衝生
7 理食塩水（Phosphate buffered saline: PBS）（PBS 群）、SV ペプチド（20 ng/ml; SV 群）、もしくは
8 random SV ペプチド（20 ng/ml; RSV 群）計 1 ml を粘膜切除断端周囲 4 カ所に分割して粘膜
9 下に局注投与した（図1）。

10

11 研究 1. SV ペプチド局所投与が頬粘膜損傷後の創傷治癒過程に及ぼす影響

12 1-1: 創部の経時的修復変化の検討

13 口腔粘膜損傷モデルラットを、SV 群（n=5）、PBS 群（n=5）、そして RSV 群（n=7）の 3 群に
14 分けて実験に用いた。

15 創部の経時的変化は、肉眼的に上皮化が得られていない創部の残存面積を計測し、創収
16 縮率で評価した^{12,14,15)}。創部作製翌日以降、2 日おきに創部をデジタルカメラ（TG-5;
17 OLYMPUS, Japan）を用いて 22.2 倍の倍率で写真撮影を行った。撮影した画像を画像解析ソ
18 フト Image J（NIH, USA）を用いて残存創部の面積を計測した。創縮小率を、（0 日目の創部

面積 — 計測時の創部面積) / 0 日目の創部面積 × 100 の計算式で求め、PBS 群、RSV 群、SV 群の 3 群間で比較検討した。

3

4 1-2: 組織学的検討

5 類粘膜損傷モデルを、PBS 群 (n= 18)、RSV 群 (n= 18)、SV 群 (n= 18)の 3 群に分け、組
6 織学的検討を行った。創部作製後 1、3、9 日目でイソフルラン吸入麻酔液 (Pfizer 社, USA)を
7 用いて安楽死させ、損傷部位を含む類粘膜組織を摘出した。摘出組織は 10%中性緩衝ホル
8 マリン溶液にて 24 時間浸漬固定し、パラフィン包埋を行った後、創部の中心を通り、頭尾側
9 方向に対し垂直となる方向で、厚さ 4 μm のパラフィン切片を作製した。

10 免疫組織化学染色には、創部作製後 1、3 日目の薄切切片を用いた。1 次抗体として血管
11 内皮細胞のマーカーである抗 von Willebrand Factor ラビットポリクローナル抗体 (vWF)
12 (abcam, UK)¹⁶⁾、線維芽細胞のマーカーである抗 Heat shock protein 47 マウスモノクローナ
13 ル抗体 (Hsp47) (Santa Cruz, USA)¹⁷⁾および筋線維芽細胞のマーカーである抗 alpha smooth
14 muscle actin マウスモノクローナル抗体 (αSMA) (abcam, UK)¹⁸⁾を用いた。vWF は、proteinase
15 K (DAKO, Denmark) によって、Hsp47 と αSMA は熱処理により抗原賦活を行った。1 次抗
16 体は 4℃で 1 晩反応させた。2 次抗体として vWF はビオチン標識 抗 Rabbit IgG
17 (VECTASTAIN; VECTOR LABORATORIES, USA)を用い、Hsp47と αSMA はビオチン標識
18 抗 Mouse IgG (VECTASTAIN ; VECTOR LABORATORIES, USA) を用いて、室温で 30 分

1 反応させた。その後、Horseradish peroxidase 標識 streptavidin (VECTASTAIN ; VECTOR
2 LABORATORIES, USA)にて 20 分間反応させた。呈色反応は 3,3-diaminobenzidine (DAB)
3 solution (Sigma, USA)を用いて行った。

4 染色終了後、光学顕微鏡を用いて各マーカーに対する陽性細胞数を計測した。vWF は損
5 傷領域と正常組織の境界領域に存在する陽性細胞数を計測し、Hsp47 は損傷領域における
6 陽性細胞数を計測し、 α SMA は損傷領域の血管以外の間質に存在する陽性細胞数を計測し
7 た。評価は無作為に 1 切片あたり 3 視野を選択し、3 視野の陽性細胞数を平均した値をその
8 切片の陽性細胞数とし、PBS 群、RSV 群、そして SV 群の 3 群間で比較検討した。

9 また、創部作製後 3、9 日目のパラフィン切片を用いて、膠原線維を特異的に染色するピク
10 ロシリウスレッド染色を行い、同様に 3 群間で比較検討した。

11

12 研究 2. SV ペプチドが口腔由来細胞に及ぼす影響

13 細胞と培養条件

14 本研究では、正常ヒト歯肉由来線維芽細胞(Normal Human Gingival Fibroblasts (NHGF);
15 Lifeline Cell Technology, USA)および正常ヒト口腔粘膜由来ケラチノサイト(Human Oral
16 Mucosa Keratinocytes (HOMK) ;Cell Research Corporation, Singapore)の二種類の細胞を使
17 用した。

18 NHGF は、10%ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum (FBS) ; EQUITECH-BIO, USA)、

1 1 %penicillin/streptomycin solution (Sigma, USA) を添加した基礎培地 Dulbecco's Modified
2 Eagle's Medium (DMEM; Sigma, USA) を増殖培地として使用し、37℃、5 %二酸化炭素
3 気層下で培養した。また、HOMK は 1%EpiLife Defined Growth Supplement (Gibco, USA)、
4 および 1 %penicillin/streptomycin solution (Sigma, USA) を添加した基礎培地 EpiLife Basal
5 Medium (Gibco, USA) を増殖培地として使用し、37℃、5 %二酸化炭素気層下で培養し
6 た。

7 8 **2-1: 細胞増殖能の検討 (WST assay)**

9 96 穴マルチウェルプレート (Corning, USA) 各ウェルに NHGF を 3.0×10^4 cells/ml で、
10 HOMK は 4.0×10^4 cells/ml で播種し、SV ペプチド (20 ng/ml; SV 群)、random SV (20
11 ng/ml; RSV 群)、あるいは PBS (PBS 群) 含有培地中で 37℃、5%二酸化炭素気層下で 0,
12 24, 48, 72 時間培養した。細胞増殖試験では Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System
13 (同仁化学; Japan)を各ウェルに 10 μ l ずつ添加し、2 時間呈色反応を行い、マイクロプレート
14 リーダー (Thermo Scientific, USA)を用い検査波長 450 nm、対照波長 630 nm の吸光度 (OD)
15 を測定した。

16 17 **2-2: 細胞接着能の検討 (Adhesion assay)**

18 96 穴マルチウェルプレート (Corning, USA) 各ウェルをフィブロネクチン (10 μ g/ml) で 37℃、

2 時間ウェットコーティングした。またコントロールとして、3% Bovine Serum Albmin (BSA) でウェルをウェットコーティングした。各ウェルに NHGF あるいは HOMK を 2.0×10^5 cells/ml ずつ播種し、次に SV ペプチド (20 ng/ml)、random SV ペプチド (20 ng/ml)、もしくは PBS 含有培地にて、37°C、5%二酸化炭素気層下で 1 時間培養した。その後上清を吸引し、0.04%クリスタルバイオレット溶液 100 μ l を入れ、PBS にて洗浄を行い、Dimethyl sulfoxide 20 μ l で色素を可溶化し室温で 10 分間おき、蒸留水を 80 μ l 加え、マイクロプレートリーダーを用い、検査波長 550 nm、対照波長 630 nm の吸光度 (OD) を測定した。

2-3:細胞遊走能の検討(Boyden chamber assay)

ポアサイズ 8 μ m のポリカーボネートメンブレン (Chemotaxicell ; Kurabou, Japan) をフィブロネクチン (10 μ g/ml) 溶液に室温で 30 分浸漬しコーティングを行った。その後、ケモアトラクタントとして SV ペプチド (20 ng/ml)、random SV ペプチド (20 ng/ml)、もしくは PBS 含有培地をチャンバー下層に加えた。チャンバーの上層には 1.0×10^5 cells/ml に調整した NHGF あるいは HOMK の細胞含有液を加えた。チャンバーを 37°C、5%二酸化炭素気層下で 16 時間インキュベートした後、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定、水洗後、マイヤー・ヘマトキシリン溶液を用いてヘマトキシリン染色を行い、メンブレン上面の細胞を綿棒で剥離し、メンブレン下面へ遊走した細胞数を光学顕微鏡 (ECLIPSE TS100 ; Nikon, Japan) で計測した。

2-4:細胞運動能の検討(Wound healing assay)

24 穴マルチウェルプレート(Corning, USA)の各ウェルに NHGF あるいは HOMK を播種し、37°C、5%二酸化炭素気層下で 100%コンフルエントとなるまで単層培養した。培養後、ウェル底面中央部に 1 mm 幅となるよう、帯状に細胞を剥離して創傷フィールドを作製し、SV ペプチド(20 ng/ml)、random SV ペプチド(20 ng/ml)、もしくは PBS 含有培地にて培養を行った。NHGF は 6, 12, 24 時間培養後、また HOMK は 12, 24, 36 時間培養後、細胞剥離部へ移動した細胞の面積を画像解析ソフトウェア Image J(NIH, USA)にてピクセル単位で計測した。作製した創傷フィールド面積を基準として、剥離部へ移動した細胞が占める面積の割合を細胞剥離部の回復率(創閉鎖率)とし、細胞運動能を評価した。

3. 統計処理

実験結果は平均値±標準偏差(S.D.)の形で表示した。全ての統計分析には Statcel4(オ一エムエス出版, Japan)を用い、以下の方法で統計学的に比較検討した。頬粘膜修復率および、細胞運動実験(Wound healing assay)の経時的データは Two-way repeated measures ANOVA にて分散分析を行い、交互作用が有意であった場合は Scheffe's F test を用いて、また交互作用が有意でない場合は群間比較を Tukey-Kramer 法、あるいは Steel-Dwass 法を用いて post hoc test を行った。免疫組織化学染色における陽性細胞数の比較、細胞増殖実験(WST assay)、細胞接着実験(Adhesion assay)、細胞遊走実験(Boyden chamber assay)は、

- 1 Tukey-Kramer 法を用いて一元配置分散分析法を行った。なお、各検定の有意水準は 5%と
- 2 した。
- 3

結 果

研究 1. SV ペプチド局所投与が頬粘膜損傷後の創傷治癒過程に及ぼす影響

1-1:創部の経時的修復変化の検討

ラットの頬粘膜に作製した創部は、PBS 群および RSV 群と比較して、SV 群において創傷治癒が促進される傾向を示した。また創部の修復率は、創部作製後 1、3、5、7 日目において SV 群が、他の 2 群と比較して有意に高値を示した(図 2)。

1-2:組織学的検討

免疫組織化学染色の結果、vWF 陽性細胞は、SV 群において PBS 群および RSV 群と比較して 1、3 日目で有意に多く認められた($p < 0.01$, 図 3)。Hsp47 陽性細胞は処置後 1 日目では認められなかったが、創部作製後 3 日目において肉芽組織の底部にみられ、創部作製後 3 日目では陽性細胞数は PBS 群および RSV 群と比較して SV 群で有意に多く認められた($p < 0.05$, 図 4)。αSMA 陽性細胞は創部作製後 1 日目において認められなかったが、創部作製後 3 日目では認められた。創部作製後 3 日目における陽性細胞数は PBS 群及び RSV 群と比較して SV 群で有意に増加していた($p < 0.05$, 図 5)。

シリウスレッド染色では、創部作製後 3 日目で創部に肉芽様の未熟な結合組織の形成を認め、PBS 群、RSV 群、そして SV 群で性状や大きさに明らかな違いは認められなかった。一方、創部作製後 9 日目では、結合組織が瘢痕組織に置換され、創部表層には連

続した上皮組織の再生が認められた。SV 群は、PBS 群、RSV 群と比較して修復上皮組織の肥厚を認め、良好な治癒経過が確認された(図 6)。

研究 2. SV ペプチドが口腔由来細胞に及ぼす影響

2-1:SV ペプチドがヒト口腔由来細胞の細胞増殖能におよぼす影響

NHGF および HOMK の両細胞において、PBS 群、RSV 群、SV 群のいずれの群でも時間経過と共に細胞数は増加したが、3 群間で細胞増殖能に有意差は認められなかった(図 7)。

2-2:SV ペプチドがヒト口腔由来細胞の細胞接着能におよぼす影響

NHGF および HOMK のフィブロネクチンへの細胞接着能に関して、SV 群は PBS 群および RSV 群と比較し、いずれも有意な差は認められなかった(図 8)。

2-3:SV ペプチドがヒト口腔由来細胞の細胞遊走能におよぼす影響

NHGF、HOMK とともに、SV 群の細胞遊走能は他の 2 群と比較して有意に高かった(NHGF; $p < 0.01$, HOMK; $p < 0.05$, 図 9)。

2-4:SV ペプチドがヒト口腔由来細胞の細胞運動能におよぼす影響

NHGF の細胞運動能は、細胞剥離後 12 時間までは、3 群間で有意な差が認められなかつ

- 1 たが剥離後 24 時間では、SV 群は他の 2 群と比較して有意に高い細胞運動能を示した($p <$
- 2 0.01 , 図 10)。一方、HOMK における細胞運動能についても剥離後早期(24 時間まで)は 3
- 3 群間で有意差が認められなかったが、細胞剥離後 36 時間では、PBS 群および RSV 群に比
- 4 較して SV 群において細胞運動能は有意に高かった ($p < 0.05$, 図 11)。

考 察

口腔粘膜は、口腔表層全体を被覆して、外部からの機械的あるいは物理化学的刺激や細菌、ウイルス等の感染源から深部組織を保護する役割を果たしている。口内炎にみられるように、粘膜上皮の欠損は、自発痛や刺激痛を引き起こすことで摂食、嚥下、構音といった口腔の機能に影響を及ぼすだけでなく、粘膜の治癒不全は、粘膜壊死や、ビスフォスフォネート製剤投与後に発症する顎骨壊死にみられるように、深部組織に重篤かつ永続的な障害をきたすことも少なくない。口腔粘膜は、同じ体表組織である皮膚組織と比べてもともと修復能力は高く、軽微な損傷であれば速やかに再生治癒するが¹⁹⁾、放射線や薬剤により再生修復に関わる細胞の機能に重篤な障害が及ぶ場合や、外傷、手術などで広範囲に粘膜欠損を引き起こす場合には、治癒が遷延、あるいは瘢痕線維化を伴い正常な治癒が得られないことで、可動域が減少するなどの機能障害が起こることがある。

広範囲の皮膚欠損や重度の熱傷に対する治療法として、自家培養表皮を用いた再生治療は一部実用化されているが、適応症が限定されていること、移植用シート作製に一定時間を要すること、培養細胞移植による未知の副作用について発症のリスクが否定できないこと、医療コストが高価であること等課題も多い²⁰⁾。口腔粘膜欠損をきたす病態に対しても同様に、生薬または他動物種由来ゲル製剤、あるいは自己の粘膜組織から採取した粘膜上皮細胞、線維芽細胞、血漿フィブリン等を用いて作製した上皮細胞シートの有用性について近年、動物実験レベルで様々な報告がみられる^{21,22)}。最近の研究では、移植後の細胞定着や粘膜上皮

1 の増殖を促進させる上で、局所における血管新生能が重要であることから、移植前の段階で
2 血管新生を誘導できる口腔粘膜細胞シートを用いることで、より速やかな粘膜創傷治癒が得ら
3 れるとの報告もみられる²³⁾。しかし、ゲル製剤については局所において薬剤を一定時間安定
4 して作用させる上での問題点があり²⁴⁾、粘膜上皮シートについては皮膚培養表皮と同様の問
5 題点も含めて、いずれも実用化には至っていない。

6 本研究で使用した SV ペプチドは、これまでに内皮細胞の接着能および移動能が活性化さ
7 れておこる血管新生促進作用や²⁵⁾、SV ペプチドと Transforming growth factor- β (TGF- β) 受
8 容体との相互作用で引き起こされる線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化促進により、虚血性
9 心筋症モデルラットにおいて心機能が改善されたことが報告されている¹⁰⁾。ラットの皮膚損傷
10 モデルを用いた最近の研究¹²⁾では、皮膚欠損部位に SV ペプチドを作用させることにより、上
11 皮化治癒が明らかに促進し、皮膚由来の線維芽細胞、ケラチノサイトの細胞運動能が SV ペ
12 プチド存在下で有意に上昇したことから、同じ上皮組織である口腔粘膜の創傷治癒過程にお
13 いても SV ペプチドが有益に作用する可能性が考えられた。

14 皮膚と口腔粘膜は組織構築上、含まれる分泌腺の種類が異なることや、後者には真皮層が
15 なく、粘膜固有層を有するなどの違いがみられる。また、両者ともにケラチノサイトを主成分と
16 するが、皮膚と比較して口腔粘膜は細胞層が厚く、部位によって角化または非角化を呈して
17 いる。さらに、口腔ケラチノサイトは皮膚ケラチノサイトよりも高い細胞増殖能、細胞遊走能を有
18 しており²⁶⁾、皮膚の真皮層と口腔粘膜の粘膜固有層に共通して含まれる線維芽細胞は、組織

1 損傷時の TGF- β への反応の違いにより、筋線維芽細胞の発現量が口腔粘膜組織では皮膚
2 組織よりも多くなる性質を有している。そのため、皮膚と比較して口腔粘膜の創傷治癒は速い
3 と考えられている^{27,28)}。さらに、口腔粘膜は、舌背部、口蓋、歯肉などの角化重層扁平上皮か
4 らなる咀嚼粘膜や、味覚を担う舌乳頭に存在する特殊粘膜、およびそれら以外の非角化重層
5 扁平上皮である被覆粘膜に大別される。被験部位を選定するにあたり、1) 一定条件の創部作
6 製に再現性があること、2) 創部の経時的観察が容易な部位であること、3) 摂食行動等、外的
7 刺激による創傷治癒への影響が少ないことを考慮して、本研究では被覆粘膜である頬粘膜を
8 選択した。

9 創傷治癒速度を定量的に解析する方法として、面積測定法を用いた。面積測定法は同一
10 条件での連続的な観察のみを必要とし、簡便かつ低侵襲であるため、口腔内の創傷修復過
11 程を評価するのに適当であると考えられた。本研究において頬粘膜に作製した粘膜欠損部は、
12 SV 群において早期に治癒する傾向が認められ、創部作成後 1 日目から残存する創部面積は
13 有意に縮小した。また、免疫組織化学染色の結果、創部作製後 1 日目における vWF 陽性
14 細胞数の割合は SV 群で増加した。新生毛細血管は創傷領域に栄養や酸素を供給し、創傷
15 部の治癒開始に非常に重要な因子である^{29,30)}。これまでに報告されている SV ペプチドによる
16 血管新生作用³¹⁾が粘膜損傷モデルにおいて、創傷治癒を促進した可能性が推察された。さ
17 らに、SV 群において、Hsp47 および α SMA の陽性細胞数が創部作製後 3 日目の組織にお
18 いて多く認めた。Hsp47 および α SMA はそれぞれ線維芽細胞および筋線維芽細胞のマーカー

一であり、損傷領域に早期に誘導される線維芽細胞は、TGF- β 1 などのサイトカインの働きにより筋線維芽細胞に分化し膠原線維が産生される^{28,32)}。本研究で筋線維芽細胞の発現数が SV 群で増加したことは、SV ペプチドが TGF- β 受容体と結合し、シグナル伝達経路を介して筋線維芽細胞を誘導するとして過去の報告³³⁾と一致しており、SV ペプチドの作用により膠原線維の産生が促されることで、口腔粘膜創傷治癒が促進されたと考えられた。

本研究の *in vivo* 実験において、SV ペプチド局所投与が粘膜創傷治癒を促進した。口腔由来の各種細胞の生物学的特性に SV ペプチドが如何なる影響を及ぼし得るかを検討する目的で、*in vitro* での分子生物学的実験を行った。実験対象とする細胞を決定するにあたり、*in vivo* 実験において SV ペプチド存在下で線維芽細胞の発現量が増加したこと、皮膚損傷モデルにおいて SV ペプチドによる皮膚由来ケラチノサイト、線維芽細胞の細胞特性変化が報告されていることより、ヒト歯肉由来線維芽細胞を選択した³⁴⁾。また、口腔粘膜ケラチノサイトは、上皮損傷時に TGF- β がその受容体を介してシグナル伝達経路を活性化し、インテグリン、またはフィブロネクチンの受容体を活性化し、細胞移動が促され上皮化を促進することが知られていることから、ヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトを選択した³⁵⁾。

本研究の細胞増殖実験より、線維芽細胞、ケラチノサイト共に SV 群、PBS 群、RSV 群のいずれにおいても細胞増殖変化を認めたが、3 群間で細胞増殖能に有意差は認めなかった。すなわち、SV ペプチドは細胞毒性を示さず、線維芽細胞とケラチノサイトの細胞増殖能にも影響を及ぼさないことが明らかとなった³⁶⁾。また、SV ペプチドは線維芽細胞、ケラチノサイト共に

細胞接着能についても有意な変化を示さなかった。線維芽細胞とケラチノサイトは、細胞外基質への接着、細胞質の伸長、収縮を伴って細胞移動(遊走)が行われ、創傷治癒に関わっていると考えられている³⁷⁾。本研究において、SV ペプチド存在下で両細胞の細胞遊走能、および細胞運動能は増大したことから、口腔粘膜損傷部において SV ペプチドが作用した結果、創縁ならびに創底部を含む周囲組織から線維芽細胞およびケラチノサイトが損傷領域に速やかに移動することで創傷治癒が促進されたものと考えられた³⁸⁾。

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を促進したと考えられる。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が促進されたと考えられる。

SV ペプチドは、低分子量のペプチドで抗原性が低く、代謝が速やかで、生体に安全に適用できる利点があることに加え、比較的低コストでかつ効率的な合成法も既に確立されている。また、単回投与で創傷治癒を促進する効果が明らかであったことも含めて、今後、SV ペプチ

- 1 ドの局所投与は、広範囲あるいは難治性の粘膜欠損病態を有する様々な口腔粘膜疾患に対
- 2 して適用できる新規の治療法となる可能性が期待される。
- 3

結 語

1

2 オステオポンチン由来 SVVYGLR ペプチドは、口腔粘膜損傷部において、創傷治癒促進に

3 有用であることが示された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔疾患制御学講座(口腔外科学第一教室)古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔疾患制御学講座(口腔外科学第一教室)田中晋先生、大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻分子病理学講座 河口直正先生、濱田吉之輔先生に深甚なる謝意を表します。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔疾患制御学講座(口腔外科学第一教室)の教室員諸兄に深甚なる謝意を表します。

参考文献

1. Nomura, T. Wound healing and residual scar tissue in oral cavity. *J. Jpn. Soc. Laser Dent.* **27**, 21–26 (2016).
2. Tracy, L. E. *et al.* Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv. Wound Care.* **5**, 119–136 (2016).
3. Eo, S. *et al.* Vacuum-assisted closure improves the incorporation of artificial dermis in soft tissue defects : Terudermis[®] and Pelnac[®]. *Int Wound J.* **8**, 261–267 (2011).
4. Mochizuki, Y. *et al.* Clinical evaluation of coverage of open wounds: Polyglycolic acid sheet with fibrin glue spray vs split thickness skin. *Ann Maxillofac Surg.* **6**, 228–234 (2016).
5. Murata, M. *et al.* Application of polyglycolic acid sheet (Neoveil[®]) and fibrin glue spray (Bolheal[®]) for open wounds in oral surgery. *Journal Japanese Stomatol. Soc.* **60**, 232–239 (2011).
6. Shirai, T. *et al.* Anaphylaxis to aprotinin in fibrin sealant. *Intern. Med.* **44**, 1088–1089 (2005).
7. Lund, S. A. *et al.* The role of osteopontin in inflammatory processes. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 311–322 (2009).
8. Wang, W. *et al.* Osteopontin activates mesenchymal stem cells to repair skin wound. *PLoS One.* **12**, 1–15 (2017).
9. Yokosaki, Y. *et al.* The integrin $\alpha 9\beta 1$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* **274**, 36328–36334 (1999).
10. Uchinaka, A. *et al.* Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts. *Cardiovasc. Res.* **99**, 102–110 (2013).

11. Mizuno, Y. *et al.* Improvement of cardiac function after implanting the osteopontin-derived peptide SVVYGLR in a hamster model of dilated cardiomyopathy. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **21**, 506–514 (2015).
12. Uchinaka, A. *et al.* Evaluation of dermal wound healing activity of synthetic peptide SVVYGLR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**, 714–720 (2017).
13. Fahim, A. *et al.* Effect of carbonated drinks on wound healing of oral epithelium. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* **6**, 49–53 (2015).
14. Billingham, R. E. *et al.* Studies on wound healing, with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin. *Ann. Surg.* **144**, 961–981 (1956).
15. Mert, İ. *et al.* Topical application of olive oil macerate of *Momordica charantia* L . promotes healing of excisional and incisional wounds in rat buccal mucosa. *Arch. Oral Biol.* **60**, 1708–1713 (2015).
16. Koerdts, S. *et al.* An expression analysis of markers of radiation-induced skin fibrosis and angiogenesis in wound healing disorders of the head and neck. *Radiat. Oncol.* **10**, 1–10 (2015).
17. Kuroda, K. *et al.* HSP47 is a useful marker for skin fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 241–246 (2004).
18. Tomasek, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–363 (2002).
19. Szpaderska, A. M. *et al.* Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J. Dent. Res.* **82**, 621–626 (2003).
20. Roh, J.L. *et al.* Promotion of oral surgical wound healing using autologous mucosal cell sheets. *Oral Oncol.* **69**, 84–91 (2017).

21. Camacho-Alonso, F. *et al.* Effects of topical applications of porcine acellular urinary bladder matrix and Centella asiatica extract on oral wound healing in a rat model. *Clin. Oral Investig.* (2018). <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00784-018-2620-x#citeas> (accessed 2019-1-21)
22. Izumi, K. *et al.* Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: A preliminary report. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **32**, 188–197 (2003).
23. Lee, J. *et al.* Accelerated oral wound healing using a pre-vascularized mucosal cell sheet. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
24. Zhu, T. *et al.* Effects of dimethyloxalylglycine on wound healing of palatal mucosa in a rat model. *BMC Oral Health.* **15**, 1–8 (2015).
25. Hamada, Y. *et al.* Osteopontin-derived peptide SVVYGLR induces angiogenesis in vivo. *Dent. Mater. J.* **23**, 650–655 (2004).
26. Turabelidze, A. *et al.* Intrinsic differences between oral and skin keratinocytes. *PLoS One.* **9**, 1–10 (2014).
27. Glim, J. E. *et al.* Detrimental dermal wound healing: What can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen.* **21**, 648–660 (2013).
28. Lee, H. G. *et al.* Differences between fibroblasts cultured from oral mucosa and normal skin: Implication to wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **21**, 176–182 (1999).
29. Tonnesen, M. G. *et al.* Angiogenesis in wound healing. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **5**, 40–46 (2000).
30. Hamada, Y. *et al.* Synthetic osteopontin-derived peptide SVVYGLR can induce neovascularization in artificial bone marrow scaffold biomaterials. *J. Dental Materials.* **26**, 487–492 (2007).
31. Hamada, Y. *et al.* Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 153–157 (2003).

- 1 32. Montesano, R. *et al.* Transforming growth factor β stimulates collagen-matrix contraction
2 by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 4894–4897
3 (1988).
4
- 5 33. Uchinaka, A. *et al.* SVVYGLR motif of the thrombin-cleaved N-terminal osteopontin
6 fragment enhances the synthesis of collagen type III in myocardial fibrosis. *Mol. Cell.*
7 *Biochem.* **408**, 191–203 (2015).
8
- 9 34. Hakkinen, L. *et al.* Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol 2000*. **24**, 127–
10 152 (2000).
11
- 12 35. Gailit, J. *et al.* TGF- β 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-
13 epithelialization of cutaneous wounds. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 221–227 (1994).
14
- 15 36. Egusa, H. *et al.* Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide
16 SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. *Biomaterials*. **30**, 4676–4686 (2009).
17
- 18 37. Nardini, J. T. *et al.* Modeling keratinocyte wound healing dynamics: Cell-cell adhesion
19 promotes sustained collective migration. *HHS Public Access*. **400**, 103–117 (2016).
20
- 21 38. Huynh, N. C. *et al.* Rinsing with saline promotes human gingival fibroblast wound healing
22 in vitro. *PLoS One*. **11**, 1–13 (2016).
23

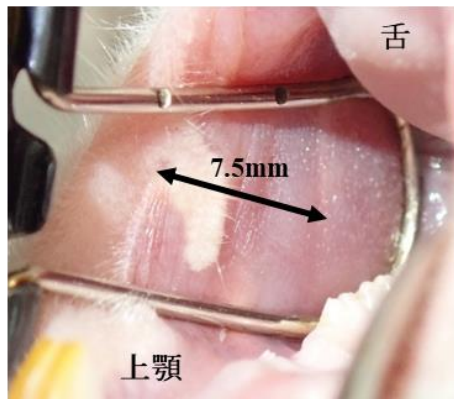
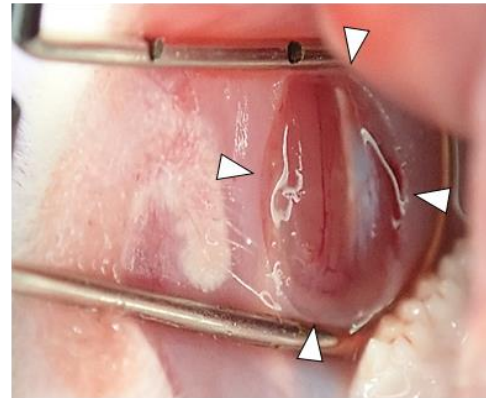
A**B**

図 1. 頬粘膜損傷モデルの作製

A: ラットを仰臥位に固定し、左側頬粘膜部（口角より 7.5 mm 後方を中心に設定）に、直径 5 mm の皮膚生検用パンチを用いて粘膜組織を全層で切除した。

B: 頬粘膜切除後の口腔内写真

作製した粘膜欠損部周囲の粘膜下に、SV ペプチド(20 ng/ml)、random SV ペプチド(20 ng/ml)、または PBS を分割（4 カ所）して投与（計 1 ml）した。

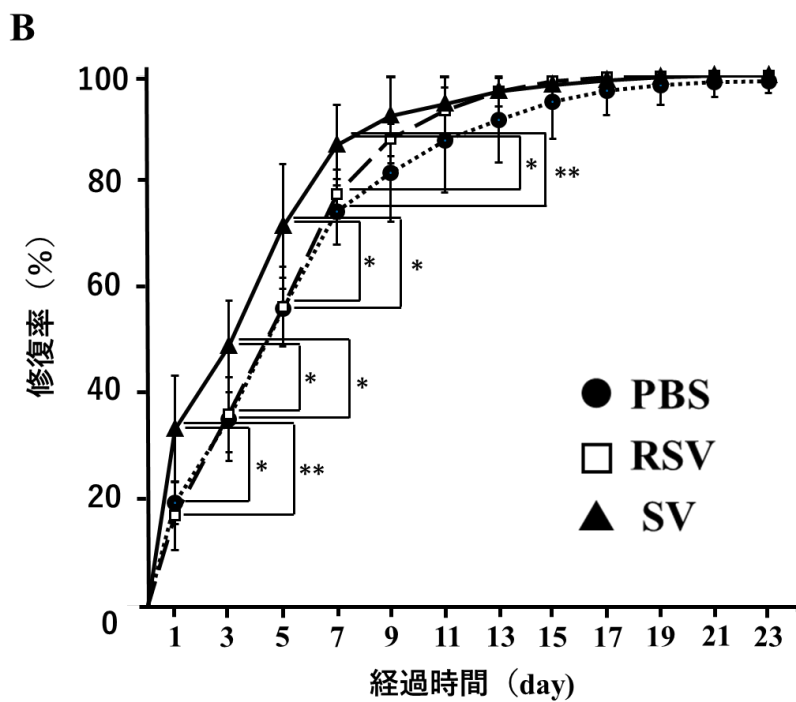


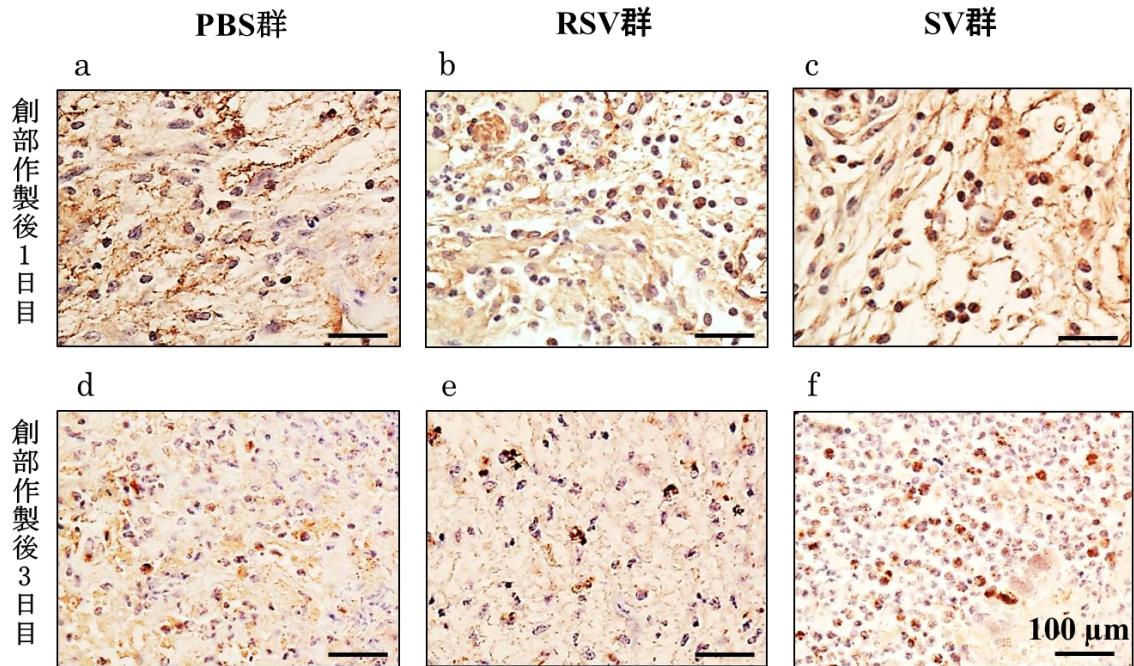
図 2. 粘膜欠損部の経時的修復変化

A: 頬粘膜欠損部の治癒経過の典型例を示す。創部作製翌日以降は2日毎に創部の観察を行った。

SV群では創部作成後11日目で完全上皮化を認めた。

B: 創部の修復率の変化を示す。創部作製後1,3,5,7日目においてSV群はPBS群、RSV群と比較して有意に高い修復率を示した (PBS群: n=5, RSV群: n=7, SV群: n=5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

A



B

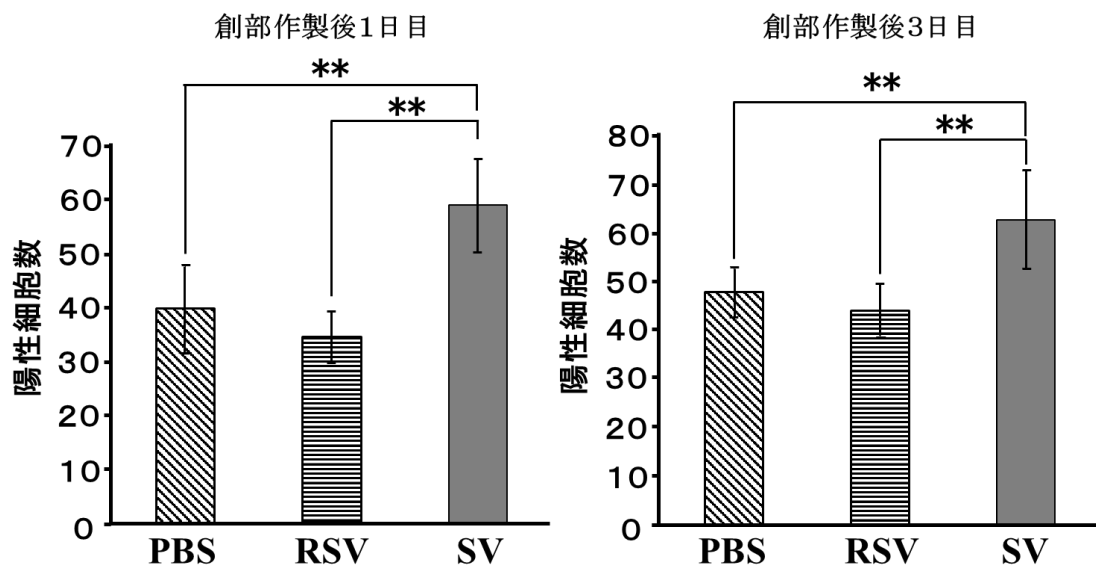


図 3. 粘膜欠損部創傷治癒過程における vWF 陽性細胞の発現様相

A: 創部作製後 1 日目、3 日目共に SV 群 (c,f) は PBS 群 (a,d) 、 RSV 群 (b,e) と比較して多くの vWF 陽性細胞を認めた (対物 40 倍)。

B: vWF 陽性細胞数は創部作製後 1 日目、3 日目共に SV 群において有意に多かった (PBS 群: n=6, RSV 群: n=6, SV 群: n=6, ** $p < 0.01$)。

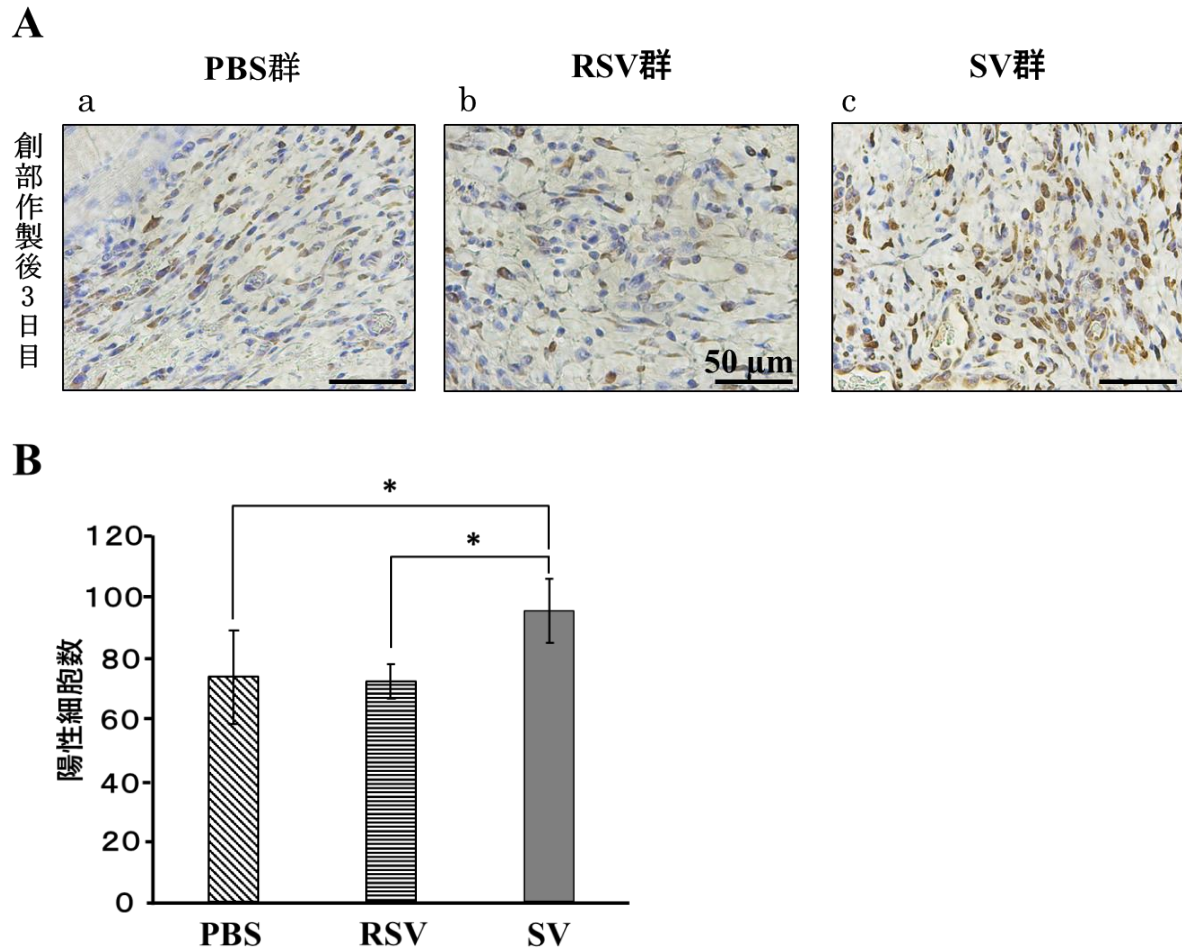
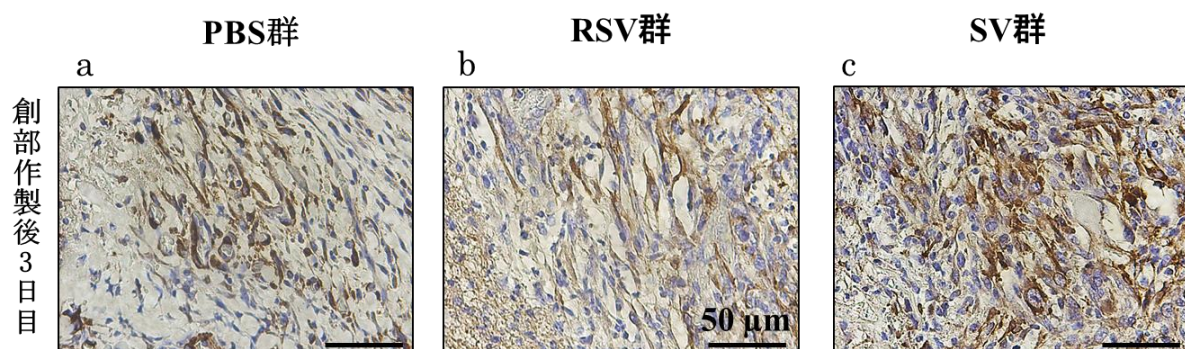


図 4. 粘膜欠損部創傷治癒過程における Hsp47 陽性細胞の発現様相

A: 創部作製後3日目のSV群(c)において、PBS群(a)およびRSV群(b)と比較して多くのHsp47陽性細胞が観察された(対物40倍)。

B: Hsp47陽性細胞数は創部作製後3日目において、SV群で有意に高値を示した(PBS群: n=6, RSV群: n=6, SV群: n=6, * $p < 0.05$)。

A



B

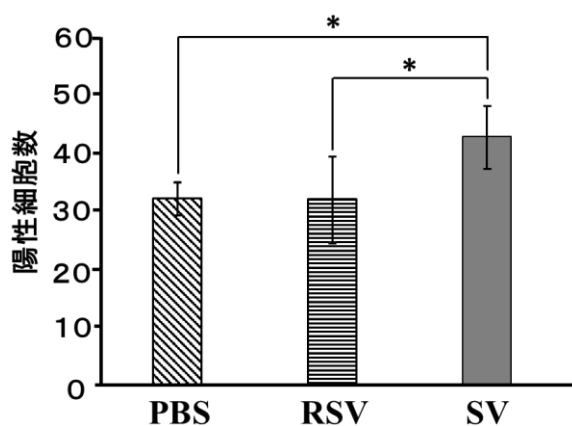
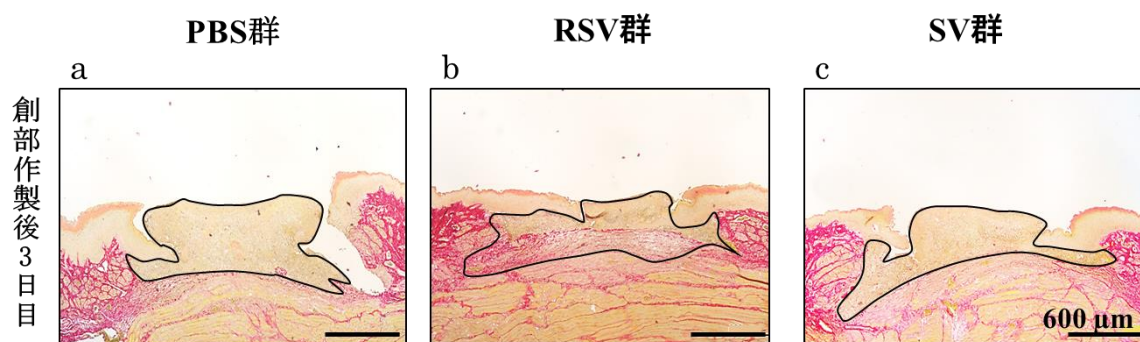


図 5. 粘膜欠損部創傷治癒過程における α SMA 陽性細胞の発現様相

A: 創部作製後3日目のSV群(c)において、PBS群(a)およびRSV群(b)と比較して多くの α SMA陽性細胞が観察された(対物40倍)。

B: α SMA陽性細胞は創部作製後3日目において、SV群で有意に高値を示した(PBS群: n=6, RSV群: n=6, SV群: n=6, * $p < 0.05$)。

A



B



図 6. 粘膜欠損部における上皮再生修復変化

- A: 創部作製後3日目のシリウスレッド染色像を示す（対物 2.5 倍）。上皮欠損部（創縁間）に一致した領域に、染色性の異なる領域（肉芽組織：黒線）を認めた。
- B: 創部作製後9日目のシリウスレッド染色像を示す（対物 10 倍）。PBS, RSV, SV 群ともに結合組織上に連続した上皮組織（黒線）の再生を認めるが、SV 群（f）は他の2群（d,e）と比較して、より厚みのある上皮層を形成した。

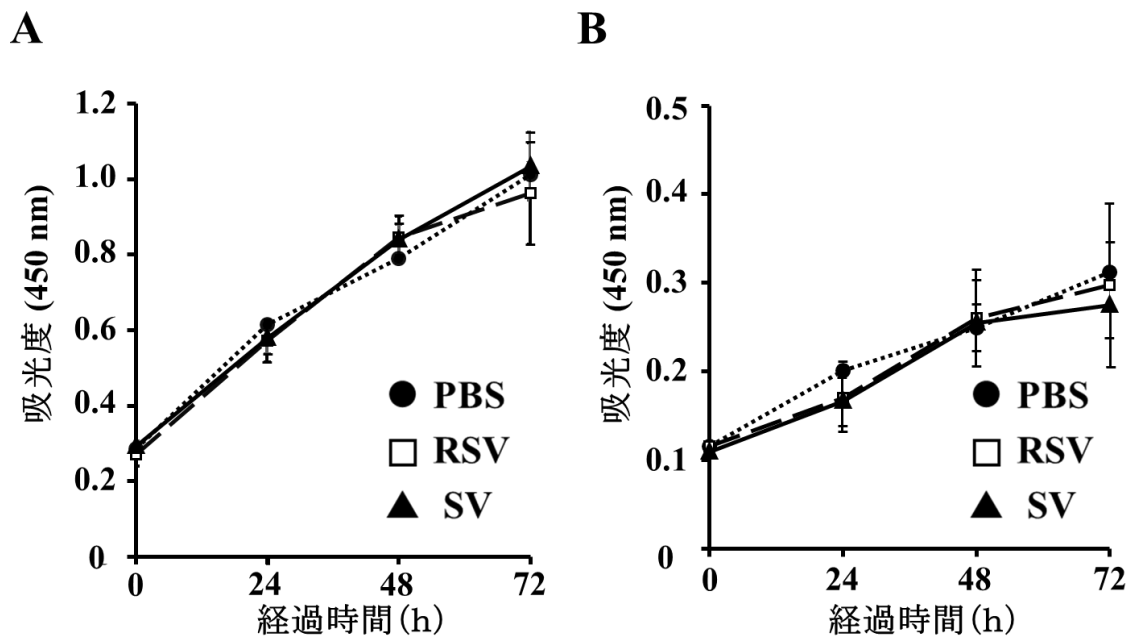


図 7. SV ペプチドがヒト口腔由来細胞の細胞増殖能におよぼす影響

A: NHGF における細胞増殖曲線 (吸光度 450 nm)

B: HOMK における細胞増殖曲線 (吸光度 450 nm)

NHGF、HOMK 共に PBS, RSV, SV 群において経時的な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 (NHGF : n= 4, HOMK : n= 7)。

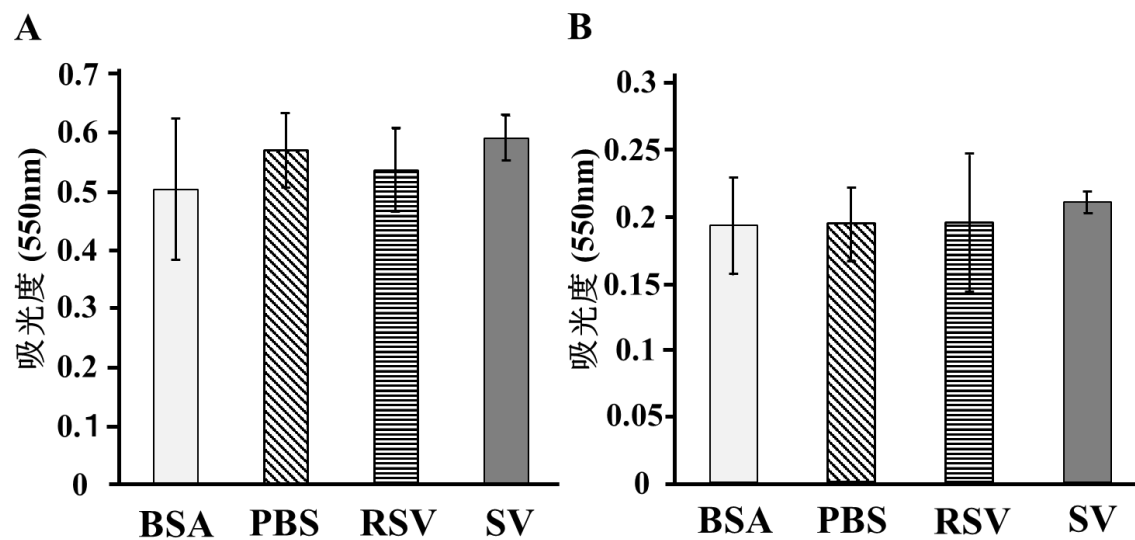


図 8. SV ペプチドがヒト口腔由来細胞の細胞接着能におよぼす影響

A: NHGF における細胞接着活性 (吸光度 550 nm)

B: HOMK における細胞接着活性 (吸光度 550 nm)

MHGF、HOMK 共に BSA, PBS, RSV, SV 群間で細胞接着能に有意差は認められなかった。

(NHGF : n= 4, HOMK : n= 4)

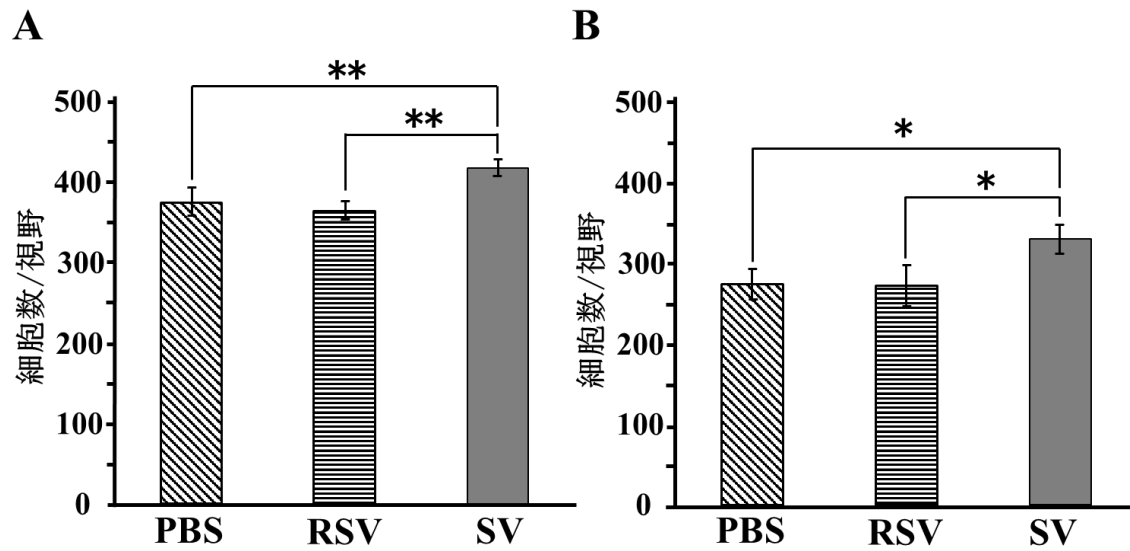


図 9. SV ペプチドがヒト口腔由来細胞の細胞遊走能におよぼす影響

A: NHGF の細胞遊走活性

B: HOMK の細胞遊走活性

NHGF、HOMK 共に SV 群は他の 2 群と比較して、メンブレン下面に遊走した細胞数が有意に多かった (NHGF : $n = 3$, HOMK : $n = 4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

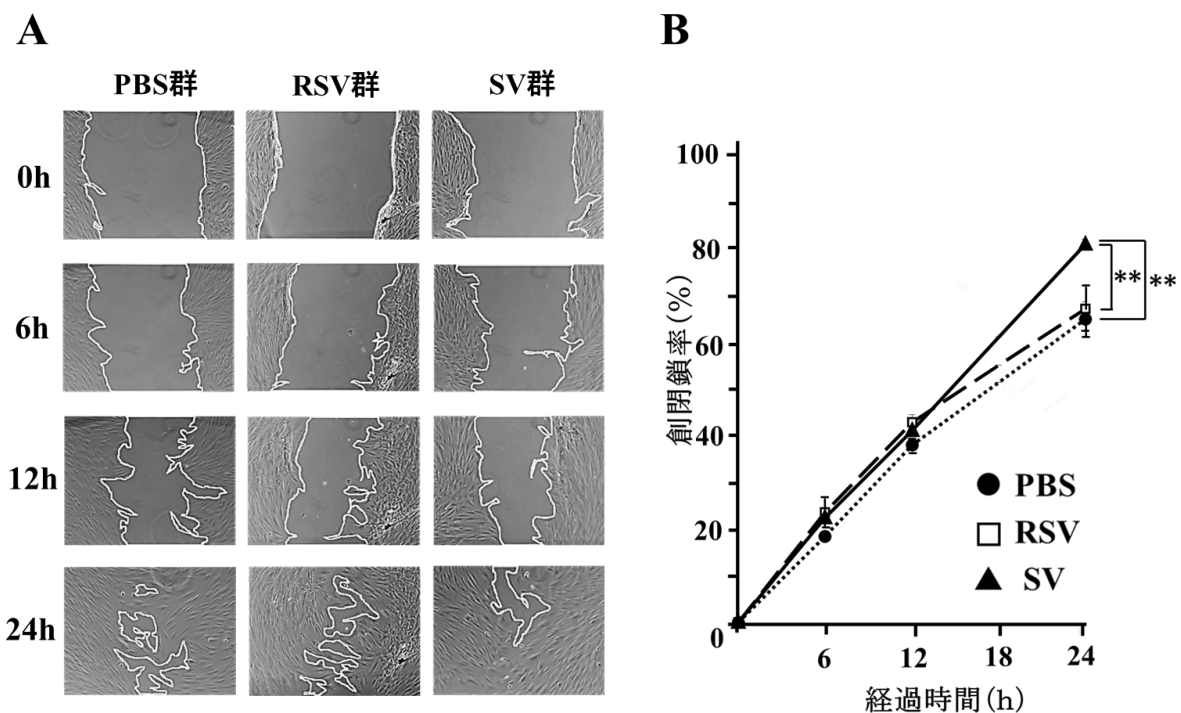


図 10. SV ペプチドが NHGF の細胞運動能におよぼす影響

A: NHGF を用いた Wound healing assay

単層培養した NHGF に 2 mm 幅で作製した創傷フィールド(白線)の経時的変化を示す。

SV 群は他の 2 群と比較して 24 時間後に明らかなフィールドの縮小傾向を示した。

B: NHGF を用いた Wound healing assay における創閉鎖率

創傷作製 6, 12, 24 時間後の残存フィールド面積を測定して創閉鎖率を求めた。

鏡検所見と一致して SV 群は他の 2 群と比較して 24 時間後に有意なフィールドの縮小を認めた (PBS 群: n= 3, RSV 群: n= 3, SV 群: n= 3, ** $p < 0.01$)。

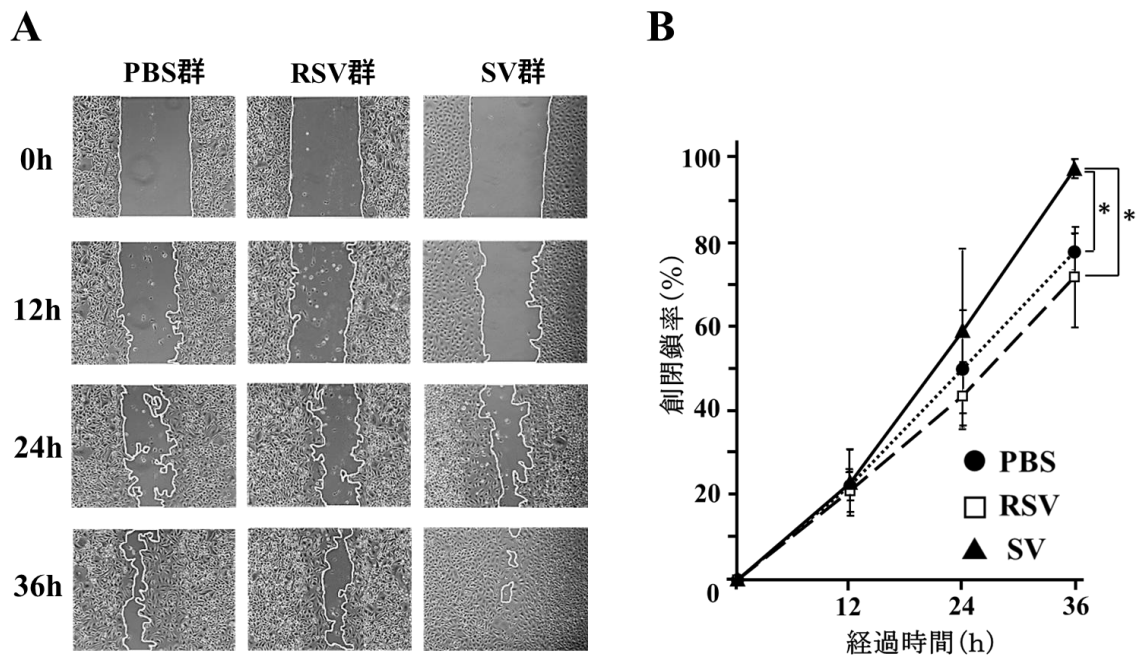


図 11. SV ペプチドが HOMK の細胞運動能におよぼす影響

A: HOMK を用いた Wound healing assay

単層培養した HOMK に 2 mm 幅で作製した創傷フィールド(白線)の経時的変化を示す。

SV 群は他の 2 群と比較して 36 時間後に明らかなフィールドの縮小傾向を示した。

B: HOMK を用いた Wound healing assay における創閉鎖率

創傷作製 12, 24, 36 時間後の残存フィールド面積を測定して創閉鎖率を求めた。

鏡検所見と一致して SV 群は他の 2 群と比較して 36 時間後に有意なフィールドの縮小を認めた (PBS 群: n= 4, RSV 群: n= 4, SV 群: n= 4, * $p < 0.05$)。