



Title	機能性ペプチドSVVYGLRが骨格筋前駆細胞の遊走および分化に及ぼす作用と機序の解明
Author(s)	藤下, 陽平
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76274
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

論文内容の要旨

氏 名 (藤 下 陽 平)	
論文題名	機能性ペプチドSVVYGLRが骨格筋前駆細胞の遊走および分化に及ぼす作用と機序の解明
論文内容の要旨	
<p>【緒言】</p> <p>オステオポンチン由来の7アミノ酸残基から成るSVVYGLR (SV) ペプチドは、ラット咬筋損傷モデルを用いた先行研究において、損傷部の癒痕形成抑制と再生筋線維径の増大を伴って骨格筋の再生修復過程を促進し、機能的にも筋活動量を増大し、摂食効率を上昇させることが報告されている。作用発現に関わる要因の一つとして、SVペプチドがヒト由来骨格筋前駆細胞である筋芽細胞の遊走能、運動能を上昇させることや、筋特異的転写調節因子の発現を増強して分化を促進することが示唆されているが、詳細な機序については未だ明らかとされていない。</p> <p>本研究は、SVペプチドによる骨格筋前駆細胞の遊走能上昇と分化促進に関わる作用機序を明らかにする目的で細胞生物学的検討を行った。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>骨格筋前駆細胞として、ヒト由来筋衛星細胞 (Human Skeletal Muscle Satellite Cells:HskMSC) 及び、ヒト由来筋芽細胞 (Human Skeletal Muscle Myoblasts:HSMM) を使用した。また、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞にhuman integrin $\beta 3$ cDNAを導入してインテグリン$\alpha\beta 3$発現させた細胞株である $\beta 3$-CHO細胞および vectorのみ導入した細胞株であるmock-CHO細胞を用いた。SVペプチド、およびrandom SV (rSV; アミノ酸配列 GYRVLSV) ペプチドは自動ペプチド合成機(PSSM-8)を用いて合成した。</p> <p>研究1: SVペプチドが骨格筋前駆細胞の遊走能に及ぼす影響</p> <p>ポリカーボネートメンブレン ($\phi 8 \mu\text{m}$) をフィブロネクチンでウェットコーティングし、PBS, rSVペプチド (20 ng/ml), SVペプチド (0.2-2000 ng/ml) 含有培地をケモアトラクタントとしてチャンバー下層に加え、チャンバー上層に1.0×10^5 cells/mlに調整したHskMSCあるいはHSMM含有液をそれぞれ加えて12時間培養後、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光学顕微鏡で計測した。</p> <p>研究2: SVペプチドによる骨格筋前駆細胞遊走能へのTGF-β受容体の関与</p> <p>2-1. TGF-β I型受容体阻害薬を用いた遊走能の検討</p> <p>TGF-β I型受容体阻害薬であるSB431542 (10 μM) またはSB505124 (10 μM) をPBS, rSVペプチド (20 ng/ml), SVペプチド (20 ng/ml), TGF-$\beta 1$ (5 ng/ml) 含有培地に添加してチャンバー下層に加えて、HskMSCあるいはHSMMの細胞遊走数を比較検討した。</p> <p>2-2. Western Blotting法によるTGF-β シグナル関与の検討</p> <p>HsKMSCにおいて、PBS rSVペプチド (20 ng/ml), SVペプチド (20 ng/ml), TGF-$\beta 1$ (5 ng/ml)をそれぞれ培地に添加し、60分間培養した。その後、細胞をRIPA Bufferで溶解させ、スクレイパーで細胞を回収し、遠心分離後ライセートを回収した。ライセートをSDS-PAGEで分離し、メンブレンに転写した。メンブレンを抗TGF-β I 型受容体, 抗リン酸化TGF-β I 型受容体, 抗total-Smad, 抗リン酸化Smad3, 抗α-tubulinで反応させ、二次抗体としてHorse-radish peroxidase標識抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ラビットIgG抗体を用いて反応させた。その後、検出用発光基質としてPierce™ ECL Western Blotting Substrate、画像取込解析装置としてThermo Scientific™ myECL imagerをそれぞれ用いてバンドを検出した。</p> <p>研究3: SVペプチドによる骨格筋前駆細胞遊走能へのインテグリンの関与</p> <p>3-1. インテグリン$\alpha\beta 3$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$阻害薬を用いた遊走能の検討</p> <p>SVVYGLRアミノ酸配列との相互作用がこれまでに確認されているインテグリン$\alpha\beta 3$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$受容体の関与について検討するために、インテグリン$\alpha\beta 3$阻害薬であるRGDfK (10 μM), RGDyK (10 μM), あるいはインテグリン$\alpha 9\beta 1/\alpha 4\beta 1$二重阻害薬であるBOP (1 μM) をPBS, rSVペプチド(20 ng/ml), SVペプチド (20 ng/ml) 含有培地に添加後、チャンバー下層に加えてHskMSCあるいはHSMM遊走細胞数を比較検討した。</p>	

3-2. SVペプチドのインテグリン $\alpha v \beta 3$ への接着能の検討

96穴マルチプレート各ウェルを、0.2%BSA, rSVペプチド (2 $\mu\text{g/ml}$), SVペプチド (2 $\mu\text{g/ml}$) で、ドライコーティングした。次に、 1.0×10^6 cells/mlに調整した β -CHO細胞またはmock-CHO細胞を播種させ、37 °C, 5% CO₂ 環境下で6時間培養した後、上清を吸引し、接着した細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、細胞をCrystal Violetで染色し、マイクロプレートリーダーを用いて検査波長 595 nmにて吸光度を測定した。

研究4: SVペプチドが骨格筋前駆細胞の分化誘導に及ぼす影響

4-1. SVペプチドが筋衛星細胞の分化誘導に及ぼす影響

HskMSC を PBS, rSV ペプチド (1 $\mu\text{g/ml}$), SV ペプチド (1 $\mu\text{g/ml}$) 含有培地で培養し、筋特異的調節因子の一つである Pax7 に対する免疫蛍光染色を行い、Pax7 の発現を培養 2 日目と 7 日目の細胞で比較検討した。

4-2. 筋管細胞への分化の検討

HSMCを増殖培地で培養し、50 %コンフルエント状態に達した時点で、2% Horse Serum含有分化培地に変更し、PBS, rSVペプチド (20 ng/ml), SVペプチド (20 ng/ml) を添加し培養した。筋管形成マーカーとしてMyosin Heavy Chain (MHC) を用いて免疫組織化学染色を行い、MHC陽性かつ2核以上の細胞数を3群間で比較検討した。

【結果】

研究1. SVペプチド含有条件下でHskMSC, HSMCともに、細胞遊走能はPBS, rSVペプチドと比較して有意に上昇した。また、遊走能はHskMSC, HSMCとも濃度依存性に増大することが明らかとなった。

研究2. HskMSC, HSMCともにSB431542またはSB505124添加条件下において、SVペプチド含有条件下で観察された細胞遊走能の上昇変化は有意に抑制された。HskMSCを用いたWestern Blotting法において、SVペプチド添加条件下ではTGF- β 1添加条件ほど顕著ではなかったものの、PBS, rSVペプチドと比較してリン酸化TGF- β 1受容体, リン酸化Smad3の検出は強い傾向が観察された。

研究3. HskMSC, HSMCともにRGDfK,またはRGDyK添加条件下においてSVペプチド含有条件下で観察された細胞遊走能の上昇変化は有意に抑制された。一方、BOP添加条件下では、HskMSC, HSMCともにSVペプチドによる細胞遊走能上昇変化に有意な変化はみられなかった。また、SVペプチド条件下ではmock-CHO細胞と比較して β 3-CHO細胞の細胞接着能は有意に上昇する傾向が観察されたが、rSVペプチド条件下では両細胞間での接着能に有意差は認めなかった。

研究4. HskMSCにおけるPax7の発現は、PBS, rSVペプチドと比較して、培養7日目においてSVペプチド添加条件下で減少する傾向が観察された。また、SV群では類円形の核を持つ細胞がより多く出現する傾向が観察された。さらに、SVペプチド添加条件下でHSMCにおけるMHC陽性細胞の発現率は、PBS, rSVペプチドと比較して分化培地培養4,5日目において有意に上昇した。

【考察】

SVペプチドは、HsKMSC, HSMCの細胞遊走能を濃度依存性に上昇させることが明らかとなった。SVペプチドによる遊走能は、TGF- β I型受容体阻害薬存在下で有意に抑制された。また、HsKMSCにおいて、Western Blotting法によるリン酸化TGF- β I型受容体, リン酸化Smad3の検出はTGF- β 1添加条件下と比較して弱かったことから、TGF- β I型受容体はSmad非依存性の伝達経路も含めて、SVペプチドによる遊走能発現に関与している可能性が示唆された。また、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 阻害薬存在下で、SVペプチドによるHsKMSC, HSMCの細胞遊走能は有意に抑制され、 β 3-CHOを用いた接着実験結果から、SVペプチドとインテグリン $\alpha v \beta 3$ が細胞膜上で結合する可能性が示されたことから、インテグリン $\alpha v \beta 3$ についてもSVペプチドによる遊走能発現に深く関与していると推察された。一方、SVペプチド添加条件下でHskMSCにおけるPax7の発現が、より早期に減弱したことや、HSMCにおいてMHC陽性細胞の発現が有意に増加したことから、SVペプチドは、骨格筋の再生修復に関わる筋衛星細胞から筋芽細胞、さらに筋管形成に至る一連の分化誘導を促進することが明らかとなった。

【結語】

SVペプチドは、ヒト由来骨格筋前駆細胞である筋衛星細胞と筋芽細胞の遊走能を上昇させた。また、本作用機序にTGF- β 受容体活性とインテグリン $\alpha v \beta 3$ が関与している可能性が示唆された。さらに、SVペプチドは筋衛星細胞におけるPax7の発現を早期に減弱し、筋芽細胞から筋管細胞への分化を促進することで、骨格筋損傷後の再生修復に寄与することが推察された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藤 下 陽 平)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	古郷 幹彦
	副 査	教授	田熊 一徹
	副 査	准教授	伊藤 祥作
	副 査	講師	山下 元三

論文審査の結果の要旨

本研究は、オステオポンチン由来の7アミノ酸残基から成る SVVYGLR ペプチドによる骨格筋前駆細胞の遊走能上昇と分化促進に関わる作用機序を明らかにする目的で細胞生物学的検討を行ったものである。

SVVYGLR ペプチドは、ヒト由来骨格筋前駆細胞の遊走能を上昇させ、その作用機序に TGF- β 受容体活性とインテグリン $\alpha v\beta 3$ が関与していることを示した。さらに、SVVYGLR ペプチドは筋衛星細胞における Pax7 の発現を早期に減弱し、筋芽細胞から筋管細胞への分化を促進することで、骨格筋損傷後の再生修復に寄与することが推察された。

SVVYGLR ペプチドによる骨格筋の再生修復に関わる作用機序の一端を明らかに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。