



Title	機能性ペプチドSVVYGLRによる損傷骨格筋・粘膜の機能再生ならびに修復促進に関わる機序の解明
Author(s)	島岡, 祐加子
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91835
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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 （ 島 岡 祐 加 子 ）

論文題名

機能性ペプチドSVVYGLRによる損傷骨格筋・粘膜の機能再生ならびに修復促進に関わる機序の解明

論文内容の要旨

【研究背景と目的】

顎口腔領域の骨格筋や粘膜は摂食、嚥下、発音そして呼吸等の重要な身体活動を担っており、自己再生修復能を有する。しかしながら臨床現場において、口腔癌の筋あるいは粘膜の切除を伴う場合や、先天的な筋形態・発育異常を伴う口蓋裂に対して形成術を行う場合など、組織の自己再生修復能力を超えた重度の外科的侵襲が加わることで、創部に形成される癒痕による組織の拘縮により十分な筋あるいは粘膜の再生が得られず、長期的な機能障害をもたらす。広範囲の組織欠損に対し、人工膜、組織移植および再建手術等を適用することで一定の成果が得られるものの、損傷部の完全な機能回復を得ることは困難であり、患者のQOLを向上させるための新たな機能再生治療が必要と考えられる。

細胞外基質の1つであるオステオポンチンから合成された7アミノ酸配列ペプチドSVVYGLR(SV)は、骨格筋前駆細胞や粘膜上皮細胞の細胞遊走能を上昇させ、細胞分化を促進するとともに、咬筋損傷モデルや粘膜損傷モデル動物に局所投与することで、骨格筋や粘膜の創傷治癒を促進することが明らかとされている。しかしながら、SVペプチドの効果発現に関わるアミノ酸残基や、SVペプチド投与後の組織内動態、バイオマーカーの発現様相など未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、損傷骨格筋の修復促進および筋機能再生、硬口蓋損傷モデルにおける顎発育においてSVペプチドの効果発現に関わる機序を明らかにする目的で、骨格筋前駆細胞および咬筋・硬口蓋損傷モデル動物を用いて細胞生物学および組織形態学的に検討を行った。

【研究方法】

実験1：SVペプチドの効果発現に関わるアミノ酸配列の検討

Fmoc法を用いて、SVVYGLRの各アミノ酸をアラニン(A)に置換した7種類の変異体ペプチドおよびSVペプチドのN末端のセリン(S)を除いたVVYGLR、C末端側のアルギニン(R)を除いたSVVYGLの、N末端、C末端削除ペプチドを合成した。ヒト由来筋衛星細胞(HSkMSC)およびヒト由来筋芽細胞(HsMM)を用いてSVペプチド(20 ng/mL)、アラニン置換ペプチド(20 ng/mL)、N末端、C末端削除ペプチド(20 ng/mL)および対照群としてPBSおよびランダムSVペプチド(GYRVLSV; rSV, 20 ng/mL)の細胞遊走能に与える影響を比較検討した。また、咬筋損傷モデル(10週齢SD系ラット)を用いて、SVペプチド(20 ng/mL)、アラニン置換変異体ペプチド(20 ng/mL)、N末端、C末端削除ペプチドと対照群としてPBSを投与し、3日後、14日後に損傷部を含めて咬筋を摘出しanti-CD31抗体およびanti- α SMA抗体の発現、あるいはシリウスレッド染色を行い損傷部再生筋線維径ならびに線維化率についてそれぞれ検討した。

実験2：抗SVポリクローナル抗体を用いたSVペプチドの組織内代謝動態についての検討

Kbs：JWウサギに2週間毎にSVペプチド抗原を免疫し、免疫後19週時点で採取した血清から抗原アフィニティーカラムを用いて抗SVポリクローナル抗体を精製した。抗原結合性について抗SVポリクローナル抗体、19週抗血清、0週血清を用いて関節ELISA法で検討した。さらに抗原特異性について、SVペプチドを抗原としrSVおよびBSAを対照群として同じく間接ELISA法で評価した。また咬筋損傷モデルを用いてSVペプチド(20 ng/ml×0.5mL)または対照群としてPBS(0.5mL)を、筋損傷断端表層から約3 mmの深さに局所投与した。損傷後12, 24, 36, 48, 72時間後に咬筋を摘出し、精製した抗SVポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。

実験3：SVペプチドが硬口蓋及び損傷骨格筋に及ぼす作用の濃度条件に関する検討

3-1: 線維芽細胞を用いた細胞遊走能実験：ヒト口腔由来線維芽細胞(NHGF)を用いて、SVペプチド 1) 20 ng/mL, 2) 200 ng/mL, 3) 2000 ng/mL および対照群としてPBSおよびランダムSVペプチド(rSV, 20 ng/mL)の細胞遊走能に与える影響を比較検討した。

3-2: 硬口蓋損傷モデルに関する検討：SD系ラット(4週齢)の硬口蓋正中部に粘膜骨膜を含む軟組織実質欠損(7×1 mm)を作成し(硬口蓋損傷モデル)、SVペプチドを1) 20 ng/mL, 2) 200 ng/mL, 3) 2000 ng/mLの条件でそれぞれ0.2mlずつ損傷部断端周囲に局所注射した。対照群としてPBS(0.2 mL)を用いた。創傷形成前の測定値を基準に1)両側第一臼歯(M1)間歯

槽幅径 2)両側第三臼歯(M3)間歯槽幅径 3)歯槽前後径(M1-M3間)を損傷後6週(10週齢)まで経時的に測定した。

3-3: 咬筋損傷モデルに関する検討：咬筋損傷モデルを用いて、SVペプチドを1) 20 ng/mL, 2) 200 ng/mL, 3) 2000 ng/mLの条件でそれぞれ1mLずつ局注した。対照群としてPBS(1mL)を用いた。損傷後3, 7, 14日目に損傷部を含めて咬筋を摘出し、1) anti-Collagen type I 抗体 2) anti-Collagen type III 抗体 3) anti- α SMA抗体をそれぞれ用いて免疫組織学的に検討した。

【研究結果】

1. HSkMSC, HsMMともにSV群は、7種類のアラニン置換ペプチド群と比較して有意に高い細胞遊走能を示した。またSVVAGLRは、他のアラニン置換ペプチドと比較して細胞遊走能は有意に低いことが明らかとなった。さらに、チロシン残基(Y)を含む6アミノ酸配列群(VVYGLR, SVVYGL)と比較してもSV群の細胞遊走能は有意に高値を示した。ラット咬筋損傷モデルにおいても、SV群はSVVAGLR群、N末端, C末端アミノ酸削除ペプチド群と比較して損傷部修復組織中の筋線維径は高値を示し、新生血管数および α SMA陽性細胞数も有意に増加した。
2. 間接ELISA法にて、SV群は対照群(rSV, BSA)と比較して抗SVポリクローナル抗体との結合性において有意に高値を示した。また12, 24, 36時間後に摘出された咬筋組織において、SV群では対照群(PBS)と比較して筋損傷部の抗SVポリクローナル抗体陽性率が有意に上昇した。
3. NHGFにおいてSV群は対照群と比較して有意に高い細胞遊走能を示し、SV群の細胞遊走能は濃度依存性に上昇した。硬口蓋損傷モデルにおいてSVペプチドの異なる投与濃度条件で創傷治癒経過と硬口蓋の成長変化を比較検討したところ、20 ng/ml投与群では、対照群(PBS)および200 ng/ml, 2000 ng/mlと比較して、創傷形成6週間までの歯槽幅径、前後径ともに有意に高値を示した。また咬筋損傷モデルにおいて、損傷後3日目ではCollagen type III/ I 比はSVペプチドの濃度が上昇すると増加する傾向にあったが、損傷後14日目ではSV 20 ng/mL群が他群と比較して有意に高い比を示した。 α SMA陽性細胞数は3, 7, 14日目のいずれもSVペプチドの濃度が上昇すると有意に増加した。

【考察】

本研究より、SVペプチドによる骨格筋再生修復促進作用において、チロシン残基(Y)が効果発現に強く関与していること、ならびに既存の7アミノ酸配列SVVYGLRが最も有用であることが明らかとなった。また、損傷骨格筋への局所投与においてSVペプチドは時間依存性に代謝されるものの、投与後少なくとも36時間程度は完全に代謝、吸収されることなく組織中に分布している可能性が示唆された。さらにSVペプチド濃度条件の検討において、若年ラット硬口蓋損傷モデルにおける顎発育は、先行研究における咬筋損傷モデルを用いた骨格筋再生修復促進効果と同様に、低濃度条件(20 ng/mL)が最も良好であった。咬筋損傷モデルを用いた研究において、創傷治癒が進む7日目時点ではSVペプチド濃度依存的にCollagen type IIIの発現低下とCollagen type I の発現上昇が認められ、 α SMAでマーカーされる筋線維芽細胞についても発現の増加がみられた。先行研究より、SVペプチドによる骨格筋前駆細胞ならびに口腔由来線維芽細胞の遊走能上昇には、TGF- β シグナルが関与していることが明らかとなっていることから、SVペプチドを高濃度で投与した際のTGF- β シグナル刺激の増強が、低濃度条件時と比較してCollagen type I の発現増加や線維化の増強に関与している可能性が示唆された。

【結語】

SVペプチドによる骨格筋再生修復促進作用において、既存のアミノ酸配列が効果発現に最も有用であることが明らかとなった。また、SVペプチドは損傷骨格筋に局所投与後36時間は組織中に滞留し、高濃度条件下ではCollagen type I および筋線維芽細胞の発現が増加して線維化を増強させ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 (島 岡 祐 加 子)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	田中 晋
	副 査	教授	田熊 一敬
	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、オステオポンチン由来の機能性ペプチド SVVYGLR (SV ペプチド) による損傷骨格筋、粘膜の再生修復促進効果発現に関わるアミノ酸残基の同定、SV ペプチド局所投与後の組織内動態ならびに損傷部に形成される癒痕組織中の collagen の発現様相を明らかにする目的で、細胞生物学的および組織形態学的に検討を行ったものである。 その結果、SV ペプチドの効果発現にチロシン残基が強く関与し、既存のアミノ酸配列が最も有効であることが明らかとなった。また、局所投与後 36 時間は損傷筋組織中に滞留し、高濃度投与条件下では collagen type I および筋線維芽細胞が増加して損傷部の癒痕化を増強させることが明らかとなった。 以上の結果は、SV ペプチドの適正な局所投与条件を検討する上で重要な知見であり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。			