



Title	機能性ペプチドSVVYGLRが老齢マウスにおける骨格筋損傷後の筋再生修復に及ぼす作用
Author(s)	森田, 憲司
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95983
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 (森田 憲司)

論文題名

機能性ペプチドSVVYGLRが老齢マウスにおける骨格筋損傷後の筋再生修復に及ぼす作用

論文内容の要旨

【研究背景と目的】

骨格筋は高い自己再生修復能を有するが、重度の損傷に際しては十分な再生修復が得られず機能障害を引き起こすことも少なくない。特に高齢者においては筋組織内の微小環境の変化や免疫機能の低下等により創傷治癒力は若年者と比較して潜在的に低いとされ、筋損傷後の速やかな筋再生修復は摂食機能を含むADL(Activities of daily living)低下を回避する上で重要である。

細胞外基質の一つであるオステオポンチン(OPN)は、生体内において損傷が生じると酵素による切断を受けて創傷治癒に関与することが知られている。特にN末端側断片化OPNのC末端に表出するSVVYGLRの7アミノ酸配列を基に合成されたペプチド(SVペプチド)は、骨格筋前駆細胞の遊走能を上昇させることで細胞分化と筋線維の再生修復を促進するとともに、瘢痕形成を抑制し、若齢ラット咬筋損傷モデルにおいて損傷後の良好な筋機能再生をもたらすことが明らかとされている。SVの作用発現にはTGF- β シグナルが関与し、前駆細胞である筋衛星細胞を活性化することが示されているが、一般的に筋線維の萎縮と筋衛星細胞の減少がみられる老齢動物において若齢動物同様にSVによる作用効果が得られるかは明らかとされていない。また加齢に伴う筋萎縮は速筋、遅筋を構成する筋線維タイプ別で異なるとされるが、咬筋における加齢に伴うタイプ別筋線維の構成比率や線維径の変化など詳細は明らかにされておらず、筋線維タイプ別でSVによる作用効果に違いがみられるかについても不明である。

本研究は、老齢マウス、老化促進マウスの咬筋を対象として、加齢に伴う筋萎縮、筋線維タイプ別の形態変化について検討するとともに、マウス由来骨格筋前駆細胞、老化促進モデル動物における筋損傷に対するSVの作用効果、筋線維タイプ別での作用効果の違い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。

【研究方法】

研究1：老化に伴いマウス咬筋に生じる組織形態学的変化の検討

C57BL/6Jマウス(10、40、80週齢)、老化促進マウス(Senescence accelerated mouse prone 10 : SAMP10 [20、40週齢])を用いた。ピクロシリウスレッド(PSR)染色にて咬筋筋線維径および線維化率、および蛍光免疫染色にて筋線維タイプ(type I、IIa、IIb)を染色し、各種筋線維タイプの構成割合について加齢変化を比較検討した。筋線維タイプ別の検討については、咬筋浅層、深層に分けて評価を行った。

実験2：マウス由来骨格筋前駆細胞(C2C12細胞)におけるSVペプチドの作用の検討

マウス由来骨格筋前駆細胞であるC2C12細胞を用いて、SVペプチド(20 ng/mL)、対照群としてアミノ酸配列を変更した非機能性ペプチドであるrandom SV(GYRVLSV ; rSV, 20 ng/mL)ペプチドならびにPBSをそれぞれ添加した条件下における細胞運動能、細胞増殖能および細胞遊走能を比較検討した。

研究3：SVペプチドによる若齢SAMP10咬筋損傷後再生修復組織の組織形態学的検討

老化促進マウス(SAMP10, 20週齢)咬筋に径1.5 mmの損傷を加えて咬筋損傷モデルを作製し、損傷部周囲にSVペプチド(20 ng/mL)、対照群としてPBSをそれぞれ0.05 mL投与した。損傷4週後に咬筋を摘出し、PSR染色にて筋線維径および線維化率、蛍光免疫染色にて筋線維タイプ別の構成割合および線維径の比較検討を行った。

研究4：SVペプチドによる老化SAMP10咬筋損傷後再生修復組織の組織形態学的検討

40週齢SAMP10マウスを用いて実験2と同様に咬筋損傷モデルを作製し、SVペプチド(20 ng/mL)、もしくはPBSを0.05mL投与した。損傷4週後に咬筋を摘出してPSR染色、蛍光免疫染色を行い、筋線維径および線維化率、筋線維タイプ別の構成割合および線維径について二群間で比較検討を行った。

研究5：老化とSVペプチドの作用の関連性についての検討

線維化領域、筋線維径、筋線維タイプ別の割合および線維径について、同一マウスのSVペプチド投与側およびPBS投

与側の数値を用いて個体ごとのSV/PBS を求め、20週齢群と40週齢群の間で平均値の比較を行った。

【研究結果】

研究1：C57BL/6Jマウスにおいて、80週齢群では10週齢群に比較して、線維化率の有意な増加と筋線維径の縮小傾向を認めた。また咬筋浅層でのtype II bの占める割合は加齢により有意に減少したが、深層では有意な差は認めなかった。SAMP10マウスでは、40週齢群において20週齢群と比較して線維化率は増加傾向であり、筋線維径は有意に縮小していた。またtype II bの構成割合ならびに筋線維径については40週齢群で有意に低値を示した。

研究2：SVペプチド添加条件下でC2C12細胞の増殖能に変化はみられなかったが、運動能および遊走能は有意に上昇した。

研究3：20週齢のSAMP10マウスにおいて、SV群ではPBS群と比較して咬筋浅層の線維化率は有意に低く、筋線維径は大きかった。また筋線維タイプ別では、type II bの割合が有意に高く、線維径も高値を示した。咬筋深層では、筋線維径は有意に高値を示したが、その他の項目では明らかな差を認めなかった。

研究4：40週齢SAMP10マウスにおいて、咬筋浅層ではSV群でPBS群と比較して線維化率は有意に低く、筋線維径の有意な増大が観察された。深層では線維化率は有意な差を認めなかったが、筋線維径は有意に増大した。筋線維タイプ別にみると、浅層におけるtype II bの構成割合の有意な増加を認めた。

研究5：線維化率、筋線維径、筋線維タイプ別の構成割合および線維径のいずれにおいても20週齢群と40週齢群との間に有意な差は認められなかった。

【考察】

本研究より、マウス咬筋は加齢により筋線維径の縮小、線維化領域の増大を認め、筋線維タイプ別では、浅層におけるtype II Bの割合が減少するとともに、type II A、II Bとも線維径が縮小する傾向を認めた。このことから、咀嚼筋である咬筋は四肢筋と同様に加齢による萎縮をきたし、特に速筋線維に対する影響が大きいことが示唆された。

またこのような変化の形式は生理的な老化とSAMP10に生じる促進老化において共通であったため、SAMP10は咬筋についても老化モデルとして有用であると考えられる。

ヒト由来骨格筋前駆細胞およびラット咬筋損傷モデルと同様に、SVペプチドはマウスの骨格筋前駆細胞の遊走能を上昇させ、咬筋損傷後の線維化抑制と筋再生修復を促進し、特に速筋線維に対する作用が大きいことが明らかとなった。骨格筋前駆細胞の分化と速筋線維を形成する過程には、TGF- β シグナルが関与している可能性が指摘されている。さらに、先行研究よりSVペプチドの作用発現にTGF- β シグナルが関与していることから、速筋線維に優位に作用効果がみられた可能性が推察される。一方、老化促進モデルマウスにおいて形態学的に筋萎縮は観察されたものの、SVペプチドの作用効果については若齢群と有意な差を認めなかった。この点について咀嚼筋である咬筋は四肢の筋と異なり、加齢に伴う筋衛星細胞の減少はみられないとの報告があることや、SVペプチドの作用発現には筋衛星細胞の活性が強く関与していることがその一因として推察される。

【結語】

機能性ペプチドSVVYGLRは、骨格筋損傷部の創傷治癒をtype II b線維において優位に促進した。また咬筋において本被検ペプチドの作用は老化の影響を受けず、若齢期と同等の筋再生修復促進作用を示すことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森 田 憲 司)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 田中 晋
	副 査	教授 加藤 隆史
	副 査	准教授 松永 和秀
	副 査	講師 阿部 真土
論文審査の結果の要旨		
<p>本研究は、機能性ペプチド SVVYGLR(SV ペプチド)が老化動物の咬筋損傷後の筋再生修復に及ぼす作用を明らかにする目的で、加齢に伴う咬筋の組織形態学的変化、骨格筋筋線維タイプ別の SV ペプチドの効果を含めて検討を行った。</p> <p>その結果、咬筋では加齢に伴い速筋線維の顕著な萎縮と線維化領域の増大がみられること、筋損傷部に SV ペプチドを局所投与すると、速筋線維の増加により筋再生修復を促進すること、老化マウスモデルにおいても同様の作用効果を認めることが明らかとなった。</p> <p>以上の結果は、老化動物における SV ペプチドの作用効果を明らかにする上で重要な知見であり、よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		