

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10265

研究課題名(和文) オステオポンチン由来機能性ペプチドによる顎口腔筋機能再生治療確立のための基礎研究

研究課題名(英文) Establishment of a new strategy for the treatment of functional restoration in skeletal muscle injury by tissue engineering using osteopontin derived SVVYGLR peptide

研究代表者

田中 晋 (Tanaka, Susumu)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00367541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋損傷後の運動機能低下に対する新たな筋機能再生治療法を確立する目的で、創傷治癒に関与するオステオポンチン由来のSVVYGLR(SV)ペプチドに着目し、分子生物学的解析ならびに骨格筋損傷動物モデルを用いて生理学的解析を行った。SVペプチドは、ヒト由来筋衛生細胞ならびに筋芽細胞の増殖能には影響なく、遊走能を有意に上昇させることや、特異的転写調節因子の発現増強を伴い筋管細胞への分化を促進することが明らかとなった。また種々の筋損傷モデルに対してSVペプチドを局注投与すると、損傷部における癒痕形成を抑制し、より成熟した筋線維による再生修復が誘導され筋機能再生に有効に作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は、運動や軽微な損傷に対しては、速やかな修復、再生が行われるが、外傷、手術による筋組織の重篤な損傷や発育不全を有する先天性疾患においては、従来の治療、形成手術を行ったとしても十分な機能回復、機能獲得が得られないケースも少なくない。筋肉の再生医療について、骨格筋を対象とした再生医療技術として臨床応用されているものは未だ存在しない。本研究結果より、生体由来の機能性ペプチドである本被検物を損傷骨格筋に局所投与することで、筋組織の再生を促進し、良好な機能再生をもたらすことが明らかとなり、新たな骨格筋の機能再生治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Severe skeletal muscle injury by trauma or surgery could cause repair with excessive scar tissue and leads to persistent functional impairment. This project aimed to investigate the effects of osteopontin-derived synthetic peptide SVVYGLR (SV) on the biological properties of myogenic precursor cells and functional regeneration of injured skeletal muscle using volumetric muscle loss animal models. Synthetic SV peptide showed no influence on the proliferation property of human-derived satellite cells and myoblasts, while cell migratory activity of those cells was significantly increased. In addition, local administration of SV peptide in animal models revealed the facilitation of regeneration of muscle tissue with matured myofibers and scarless healing, which contributed to favorable functional recovery after muscle injury. These results suggest that SV peptide could be a powerful alternative option as a new regenerative treatment for severe muscle injury.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨格筋 オステオポンチン SVVYGLR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、生命維持に重要な身体活動を構成する重要な一器官であり、運動や軽微な損傷に対しては自己再生修復能により速やかな再生修復が得られる。しかしながら、手術や外傷による筋組織の重篤な損傷や筋束の断裂や発育不全を有する先天疾患に対して行われる形成手術において、筋組織が十分に再生修復されず、瘢痕組織により置換され瘢痕拘縮を引き起こすことにより、十分な筋機能回復が得られず、小児においては組織の線維化・拘縮により硬組織の成長を抑制し、醜形や新たな機能障害をきたすケースも少なくない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋損傷による断裂や瘢痕線維化、萎縮、変性による運動機能不全に対する筋再生治療法の確立にある。これまでに細胞外基質の一種であるオステオポンチン内に存在する7アミノ酸(SVVYGLR)からなるペプチド(SV ペプチド)が、血管新生作用、間葉系細胞の増殖促進作用を有することを明らかとしている。本ペプチドは VEGF, HGF, bFGF などの増殖因子と異なり、抗原性の点から副作用が起こりにくく、安全性が高く、代謝が容易であり、ペプチドのデザインが簡単で高効率な合成法や検定法が確立されているといった利点を有している。

3. 研究の方法

(1) SV ペプチドが骨格筋前駆細胞の生物学的特性に及ぼす影響

ヒト由来骨格筋衛生細胞(HSkSMC)と、衛生細胞から分化した筋芽細胞(HSMM)を用いた。細胞増殖能の検討: HSkSMC および HSMM を、SV ペプチド、非機能性 SV ペプチド(random SV:rSV)、もしくは PBS 混和培地で懸濁、播種し、5% CO₂ 37°C下、12~72 時間培養後の細胞増殖能をマイクロプレートリーダーで吸光度を測定(WST assay)した。細胞遊走能の検討: HSkSMC および HSMM を無血清培地にて懸濁し、メンブレン(マイクロポア径 8 μm)の Chemotaxicell の上層に播種させ、下層には 20ng/ml SV あるいは非機能性 SV ペプチドをケモアトラクタントとして混和した培地を加え、インキュベート後、10%ホルマリンにて固定、ヘマトキシリンにて染色後、遊走した細胞数を測定した。また TGF-β-Smad シグナル伝達経路の関与について TGF-β1 阻害剤ならびに Western blotting(WB)法を用いて検討を行った。

(2) SV ペプチドが咀嚼筋損傷後の摂食機能回復に及ぼす影響

咀嚼筋損傷モデルとして 10 週齢の Wistar 系雄性成獣ラット(体重 250-300 g)を用いた。腹腔内麻酔下で頸部皮切後、両側咬筋筋腹を明示し、浅部、深部ともに中央部約 5-10mm の厚さで全層切断した。両側筋損傷部位に SV ペプチド(20-50 ng/ml)あるいは、PBS を局所注入した。機能評価として注入後 2,4,8W における摂食量、摂食効率(mg/s)等の摂食特性に加えて、両側咬筋に双極電極(テロン被覆スチルス線(径 0.25 mm))を埋入して自由摂食行動時の筋電図活動を記録し、最大振幅値、筋活動量、活動周波数を比較検討した。また、損傷後 3 日目に筋組織を摘出して anti-HSP47 抗体、anti-αSMA 抗体、anti-CD31 抗体、anti-Collagen type I, III 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

(3) SV ペプチドが軟口蓋筋損傷後の鼻咽腔閉鎖機能回復に及ぼす影響

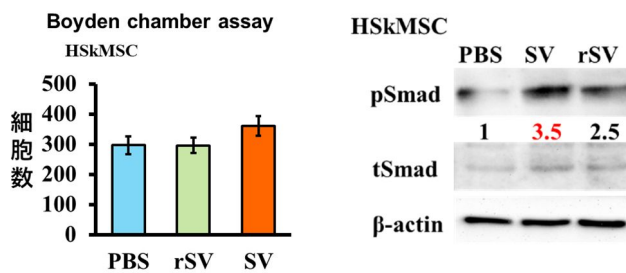
ビーグル成犬(10-12 kg)を用いて、軟口蓋挙上筋を中央部 10mm の厚さで切断両側筋損傷部位に SV ペプチド(2 μg/ml)あるいは、PBS を局所注入した。損傷後 2 週、4 週、8 週モデルを対象に、再呼吸条件下における口蓋帆挙筋からの筋電図活動を記録して活動特性を比較検討した。再呼吸条件は閉鎖式麻酔回路を用いて付与し、筋活動記録には表面筋電図(5×0.5 mm 白金箔電

極：厚さ 0.02 mm, 電極間距離 9.5 mm)を用いた。また軟口蓋挙上に伴う鼻咽腔閉鎖機能を視覚的に評価する目的で鼻咽腔ビデオスコープを用いて鼻咽腔形態変化についても検討した。

4. 研究成果

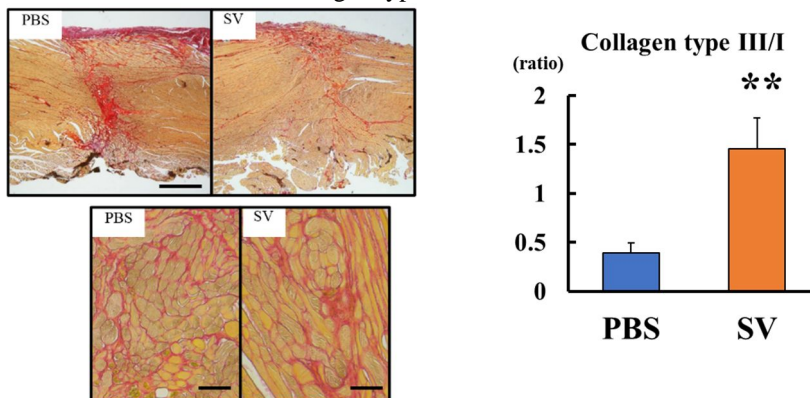
(1) SV ペプチドが骨格筋前駆細胞の生物学的特性に及ぼす影響

HSkSMC, HSMM とともに SV ペプチド添加培地条件下において細胞増殖能に対照群と比較して有意な変化はみられなかったが、細胞遊走能、運動能は有意に上昇した。また、HSMM から筋管細胞への分化誘導に関わる特異的転写調節因子である myogenin の発現は SV ペプチド添加条件下で上昇し、筋管細胞への分化が促進することが明らかとなった。SV ペプチドによる遊走能上昇は TGF- β 1 阻害剤添加条件下で抑制され、WB 法にてリン酸化 Smad3 の検出傾向が強く観察されたことから、TGF- β -Smad シグナルが作用機序に関与している可能性が示唆された。



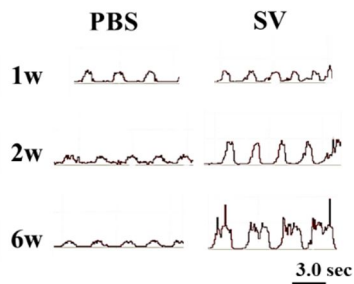
(2) SV ペプチドが咀嚼筋損傷後の摂食機能回復に及ぼす影響

咬筋損傷モデルにおいて、筋損傷 1W 後を基準として損傷後の経時的摂食機能、活動変化について評価を行ったところ、SV ペプチド局注群では対照群と比較して、損傷後 4-8W にかけて有意な筋活動量の増大(最大振幅値の増大と筋活動持続時間の延長)と自由摂食行動における摂食効率の上昇を認めた。また片側のみ SV ペプチドを局注して両側の筋活動を同時に記録し、リサーチ筋電図を作成したところ、対照群と比較して SV 局注群では局注側の筋活動量が増大する結果、slope 値は有意に減少した。また、組織形態学的検索により SV 群では対照群より再生筋線維径の増大傾向を認め、シリウスレッド染色にて損傷部位の癒痕形成量が有意に少ないことが明らかとなった。さらに、損傷後 3 日目の筋組織に対して免疫組織化学染色を施行したところ、SV 群では骨格筋損傷領域において、血管新生数、線維芽細胞および筋線維芽細胞の細胞数は有意に増加した。また Collagen type III/I 比は対照群と比較して有意に高値を示した。



(3) SV ペプチドが軟口蓋筋損傷後の鼻咽腔閉鎖機能回復に及ぼす影響

軟口蓋筋損傷モデルにおいて、閉鎖式麻酔回路（換気量 1.5L）を用いて再呼吸条件（SpO₂ 82-90%）を付与した際に誘発される口蓋帆の挙上運動を指標に、SV ペプチドの局注効果について検討を行ったところ、SV 投与群では吸気相に一致してみられる phasic な筋放電とそれに続いて出現する補助呼吸筋による筋放電の最大振幅値および筋活動量の経時的変化（回復率）が、対照群と比較して優位に増大することが明らかとなった。また、筋活動量の増大と一致して、再呼吸条件下で観察される鼻咽腔の板状の閉鎖運動は SV 群において視覚的にも閉鎖が賦活化される傾向がみられた。



以上の研究成果より、SV ペプチドは骨格筋損傷後の筋再生修復過程において、骨格筋前駆細胞の遊走能を上昇させ、筋管形成に至る分化を促進することで、より成熟した筋線維の形成と瘢痕形成の抑制をもたらすことが明らかとなった。筋組織の再生修復促進は開閉口運動に関わる咀嚼筋や鼻咽腔閉鎖に関わる軟口蓋筋の損傷後の筋機能回復を改善させることで、摂食機能や鼻咽腔機能の機能再生にも効果的に作用したことから、本被検ペプチドは損傷骨格筋に対する新たな筋機能再生治療薬として有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka S, Yasuda T, Hamada Y, Kawaguchi N, Fujishita Y, Mori S, Yokoyama Y, Yamamoto H, Kogo M.	4. 巻 134
2. 論文標題 Synthetic peptide SVVYGLR upregulates cell motility and facilitates oral mucosal wound healing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2020.170405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka S, Fujishita Y, Kawaguchi N, Usuki T, Yokoyama Y, Wu X, Mori S, Yamamoto H, Kogo M.	4. 巻 Feb 10
2. 論文標題 The synthetic peptide SVVYGLR promotes cell motility of myogenic cells and facilitates differentiation in skeletal muscle regeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamada Y, Tanaka S, Fujishita Y, Cho J-S, Usuki T, Yokoyama Y, Wu X, Mori S, Yamamoto H, Kogo M.	4. 巻 Mar 13
2. 論文標題 The synthetic peptide SVVYGLR promotes myogenic cell motility via the TGF- β 1/Smad signaling pathway and facilitates skeletal myogenic differentiation in vitro.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka S, Hamada Y, Yokoyama Y, Yamamoto H, Kogo M	4. 巻 57
2. 論文標題 Osteopontin-derived synthetic peptide SVVYGLR upregulates functional regeneration of oral and maxillofacial soft-tissue injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 174 - 181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2021.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中晋, 藤下陽平, 趙 正秀, 安田卓司, 松下豊, 薄木崇介, 島岡祐加子, 古郷幹彦
2. 発表標題 機能性ペプチドSVVYGLRによる損傷骨格筋の修復ならびに筋機能再生治療法の開発
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 趙 正秀, 田中晋, 藤下陽平, 古郷幹彦
2. 発表標題 機能性ペプチドSVVYGLRの複数回投与が損傷骨格筋の創傷治癒に及ぼす作用
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙 正秀, 田中晋, 島岡祐加子, 古郷幹彦
2. 発表標題 機能性ペプチドSVVYGLRが口蓋損傷後の筋機能再生と顎発育に及ぼす作用
3. 学会等名 第45回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱田 吉之輔 (Hamada Yoshinosuke) (10362683)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河口 直正 (Kawaguchi Naomasa) (70224748)	森ノ宮医療大学・保健医療学研究科・教授 (34448)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関