

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15821

研究課題名(和文)筋線維芽細胞・Collagen を増加させる口蓋形成術の開発

研究課題名(英文)Effect of Osteopontin Derived Peptide on Palatal Surgery

研究代表者

古郷 幹彦(Kogo, Mikihiko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：20205371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物を用いて軟口蓋の骨格筋損傷に対しての新たな治療法を確立するために、SVペプチドが損傷骨格筋の再生治癒に及ぼす影響を生理学的機能評価および形態学的評価を用いて検討を行った。SVペプチドの投与は骨格筋の自己再生能力を賦活化し、筋損傷後の機能回復に有意に働くことが示され、有効な筋機能再生治療の1つとなる可能性が示唆された。SVペプチドが再生修復過程に如何なる影響を及ぼすか組織学的検討を行った。SVペプチドは筋芽細胞の増殖能、遊走能、移動能を賦活化させ、筋管細胞分化誘導因子であるMyogeninの発現を上昇させることで、骨格筋再生が促進させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a new treatment method for skeletal muscle damage of soft palate using experimental animals, SV peptide was examined using physiological functional evaluation and morphological evaluation. The effect of the regeneration healing of the damaged skeletal muscle. The administration of the SV peptide is activated the self-regeneration ability of skeletal muscle, it is shown to work significantly in the functional recovery after muscle damage, it was suggested that it is possible to become one of the effective muscular function regeneration treatment. An histological study was conducted on the effect of the SV peptide on the regeneration restoration process. SV peptide proliferative capacity of the muscle bud cells, migration ability, the movement ability is activated, and by increasing the expression of myogenin which is a muscle tube cell differentiation inducing factor, skeletal muscle regeneration has been suggested to be promoted.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口蓋裂 骨格筋 オステオポンチン SV 再生

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂術後の患者に鼻咽腔閉鎖不全が認められた場合、軟口蓋の筋を増強させる方法はなく咽頭弁移植術を行わざるを得ない状況がある。解剖学的形態が全く変わる。新しい方法の開発が必要であった。

2. 研究の目的

本研究は筋肉の形成不全があり筋肉量に問題があっても、組織を増量させる治療を開発し手術に役立てるものである。いままで世界的にこの概念はないが、近年大阪大学で用いられている心筋に対する人工シートを応用することにより可能となると考えた。筋線維芽細胞・Collagen を増加させる口蓋筋の機能再生を目的とする。

3. 研究の方法

筋損傷モデルの作製：実験動物に三種混合麻酔薬の腹腔内投与による全身麻酔下で両側咬筋を全層切断し、断端周囲に SV ペプチド (20 ng / ml) または PBS を 1 ml 注入投与した。摂食行動の観察では両側咬筋に薬剤の注入を行い、その他の実験に関しては左側のみ注入とし、右側を対照側として筋切断のみ行った。SV ペプチドを投与した群を SV 群、PBS を投与した群を PBS 群とし、片側投与の場合は左側の投与側をそれぞれ、SV 側・PBS 側とした。摂食行動特性について術後 1, 2, 4, 6, 8 週で評価を行い、術後 1 週時点での測定値を基準として検討を行った。また術後 8 週目に組織形態回復の評価を行い、その際は同一個体内でのコントロール側を基準とした。

筋損傷モデルの筋機能低下を評価するために、筋損傷モデル (n=6) で後述の摂食効率に関して、術前、術後 1, 2, 4 週で測定し、未処置のラット (n=4) と比較検討した。

研究 1. SV ペプチド局所投与が咀嚼筋損傷後の摂食行動特性に及ぼす影響

1-1: 摂食行動の観察

暗期 4 時間での摂食行動を観察ケージ内でビデオカメラを用いて 2 方向から記録した。SV 群 (n=8), PBS 群 (n=6) における毎時間の摂食量、摂食時間から、摂食効率を算出した。平均摂食効率 (mg / s)、累積摂食量 (mg)、累積摂食時間 (s)、体重 (g) を計測項目とし、両群間で比較検討した。

1-2: 咬筋筋電図での評価

SV 群 (n=5), PBS 群 (n=6) の両側咬筋筋腹の遠位切断端に径 0.25 mm、極間距離 1 mm の双極ワイヤー電極を埋入し、歯科用レジンをういて頭頂部頭蓋骨に固定した。導出用コネクタを介して自由摂食行動時の筋活動を記録した。50 以上の臼磨相の咬筋バーストを無作為に抽出し、整流平滑化 (ARV) 処理を行い分析に用いた。各群におけるバースト持続時間 (ms)、バースト周期 (ms)、バースト最大振幅 (mV)、バースト積分値 (mV・ms) を比較検討した。また同時に記録した左右の咬筋 ARV 波形よりリサージュ筋電図を作製し、顎運動の動作分析を行った。各咀嚼ストロークでの近似直線より平均傾き、平均 R² 値を求め、作業側の内訳に関しても比較検討した。

研究 2. SV ペプチド局所投与が咀嚼筋損傷後の組織形態回復に及ぼす影響

研究 2-1: CT 画像での評価

動物用 micro CT を用いて SV 群 (n=6), PBS 群 (n=6) の頭部の撮影を行い、得られた DICOM データより、前鼻棘先端・両側下顎頭上縁を通る平面を基準平面とした MPR 像を作製した。咬筋切断部を含む咬合平面の高さでの筋横断面積 (CSA) (μm^2)、平均 CT 値 (HU)、% CSA (計測領域における筋 CT 値を有する面積割合) (%) を算出して比較検討した。

研究 2-2: 組織学的評価

SV 群 (n=6), PBS 群 (n=6) の咬筋を摘出し、パラフィン包埋後、筋横断組織切片を作製した。ヘマトキシリンエオジ (HE) 染色に

より筋損傷部位の再生筋線維の組織学的性状を評価し、シリウスレッド染色により癒痕組織形成量および筋線維径を計測し、比較検討した。

研究3

SV ペプチド、および非機能性 SV ペプチド (random SV) は自動ペプチド合成機 (PSSM-8) を用いて合成した。

研究 3-1 *in vitro* における SV ペプチドの細胞生物学的検討:

細胞はヒト由来筋衛星細胞 (Human Skeletal Muscle Satellite Cells: HskSMC)、ヒト由来骨格筋筋芽細胞 (Human Skeletal Muscle Myoblasts: HSMM) を用いた。

a) 細胞増殖能の検討 (WST assay): 96 穴マルチプレート各ウェルに 2.0×10^4 cells/ml の HskSMC および HSMM を播種させ、SV ペプチド (20ng/ml)、random SV (20ng/ml)、もしくは PBS 含有培地で培養した。12~72 時間培養後の細胞増殖能を WST-1 Cell Proliferation Assay Kit を用いて評価した。

b) 細胞接着能の検討 (Adhesion assay): 96 穴マルチプレート各ウェルをフィブロネクチンで 2 時間ウェットコーティングした。コーティング処理後、各ウェルに 2.0×10^4 cells/ml に調整した HskSMC および HSMM を播種させ、SV ペプチド (20ng/ml)、random SV (20ng/ml)、もしくは PBS 含有培地にて 2 時間培養した。その後、プレート底面に接着した細胞をクリスタルバイオレットで染色し評価した。

c) 細胞遊走能の検討 (Boyden chamber assay): ポアサイズ $8 \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブレンをフィブロネクチン溶液に室温で 30 分浸漬し、コーティングを行った。ケモアトラクタントとして SV ペプチド (20ng/ml)、random SV (20ng/ml)、および PBS 含有培地をチャンパーの下層に加えた。チャンパーの上層には 2.0×10^4 cells/ml の HskSMC および HSMM を播種させた。12 時間後、

ヘマトキシリンにて染色し、メンブレンの下面へ遊走した細胞数を光学顕微鏡で計測した。

d) 細胞移動能の検討 (Wound healing Assay): シャーレ (60mm) 上で HskSMC、および HSMM を 100% コンフルエント状態まで培養した。その後細胞を帯状に剥離し、SV ペプチド (20ng/ml)、random SV (20ng/ml)、および PBS 含有培地にて培養後、6 時間毎の剥離部への細胞移動量を測定した。

e) 遺伝子発現量の検討 (Real-time polymerase chain reaction (PCR)): HSMM を SV ペプチド (20ng/ml)、random SV (20ng/ml)、および PBS 含有培地で 48、72 時間培養し、それぞれ mRNA を抽出した。抽出した mRNA から逆転写を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートとして用い、Real-time PCR により骨格筋分化マーカーである Myogenin 遺伝子の発現を検討した。

f) 免疫蛍光染色: HSMM を SV ペプチド (20ng/ml)、random SV (20ng/ml)、PBS 含有培地、および筋芽細胞の筋管形成を誘発する 2% Horse Serum (HS) 含有培地で 48、72 時間培養し、それぞれ筋管形成の特異マーカーである Myogenin による免疫蛍光染色を行い、発現の検討を行った。全細胞核数に対する、Myogenin 陽性細胞核数を計測し、Myogenin 陽性率として比較検討した。

研究 3-2 *in vivo* における骨格筋形成能の検討: 骨格筋損傷モデルとして、両側咬筋浅深層に頬骨弓から下顎角にかけて筋損傷 (度: 完全断裂) を加え、左側筋切断端に SV ペプチド (20ng/ml) を 1ml 注入投与し、右側を筋切断処置のみとした (SV 群)。対照群として、同処置を施した後、左側に PBS を注入投与した (PBS 群)。筋損傷後 1 週間で両側咬筋を摘出しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、MyoD および Myogenin の特異抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。HE 染色標本では損傷部の肉芽組織面積を評価し、免疫組織化学

染色標本では損傷部の MyoD および Myogenin 陽性細胞数を計測した。それぞれ非投与側の免疫染色陽性核数に対する投与側の免疫染色陽性核数の比を求め、SV 群、PBS 群で比較した

4. 研究成果

*in vitro*において、SVペプチドは筋芽細胞に対して、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞移動能を顕著に向上させることを見出した。SVペプチドは筋衛星細胞に対して直接的な関与はないものの、筋芽細胞へ分化後、細胞機能が促進されると考えられる。創傷治癒ならびに組織再生において、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞移動能は重要な役割を担うことから、筋芽細胞の機能が賦活化されることは筋損傷後の組織再生修復過程を促進する可能性がある。また筋芽細胞においてMyogeninの発現量が増加したことから、SVペプチドは筋芽細胞の筋管形成を誘発することが示唆された。*in vivo*の結果、SVペプチドは骨格筋損傷後の肉芽組織形成を抑制、または減少させることが示唆された。さらに、SVペプチド投与側の筋損傷部でMyoDおよびMyogenin陽性細胞が増加したことから、SVペプチドが筋損傷部での筋芽細胞の増殖を増加させ、筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導に関与していることが考えられた。これらの結果から、筋損傷後の骨格筋再生促進作用に寄与する可能性が考えられた。

本研究での咬筋損傷モデルにおいて、筋のもつ自己再生能力によりある程度の組織再生修復が認められ、摂食機能の回復や咬筋筋活動の増加が認められたが、SVペプチドを投与し速やかに筋治癒が進むことで、内部に瘢痕組織の少ない、収縮能を有する筋線維の多い治癒となり、摂食効率および咬筋筋活動のより大きな増加がもたらされたと考えられた。このことは外傷や手術侵襲などによる筋損傷後の機能低下の予防に対し、SVペプチドが有効に働くことを示唆する結果であ

り、通常では筋機能低下が起こるような筋損傷であっても、SVペプチドを投与することで機能低下が回避できる可能性が示された。口唇・口蓋裂患者や顎顔面領域の腫瘍の患者など、顎口腔領域においては外科的手術に伴い筋機能障害が残存することが多く、またその治療法も確立されていないのが現状である。詳細な機序については今後の細胞生物学的検索が必要であるが、SVペプチドは筋損傷に対しての有用な治療法となり得ることが示唆された。頭頸部外傷や手術時にSVペプチドを利用することにより、骨格筋再生が促進され、瘢痕形成抑制や機能障害を抑制する生体材料の開発に繋がることを期待できる。すなわちSVシートの臨床応用に向かえる結果を得たと考える。次のステップへの基本結果となった。また特許を申請する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

作成中

〔学会発表〕(計 0 件)

特許申請準備のため遅れている

〔図書〕(計 0 件)

特に予定なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

出願準備中

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古郷 幹彦 (KOGO, Mikihiro)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：20205371