

| | |
|---------|---|
| 氏名 | 池田 篤司 |
| 授与した学位 | 博士 |
| 専攻分野の名称 | 歯学 |
| 学位授与番号 | 博乙第4485号 |
| 学位授与の日付 | 平成30年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 医歯薬学総合研究科 (学位規則第4条第2項該当) |
| 学位論文の題目 | Functional peptide KP24 enhances submandibular gland tissue growth in vitro (機能性ペプチド KP24 が顎下腺組織成長に及ぼす影響の検討) |
| 論文審査委員 | 長塚 仁 教授 佐々木 朗 教授 小橋 基 准教授 |

学位論文内容の要旨

緒言

唾液腺組織は炎症や腫瘍による機能損傷や加齢にともなう分泌低下などの問題があるが、その治療は多くが対症療法であり、組織再生など新しい治療技術の確立が望まれている。近年の細胞工学、組織工学の進歩からボトムアップアプローチで実験室にて細胞から生体組織を合成する機運が高まっている。この方法を用いた唾液腺組織の作製には、生体内で起こる物理的・化学的刺激を人工材料を用いて再現した生体擬似的環境の構築が有効であると考えられる。多くのハイドロゲルは親水性で生体親和性が高く、官能基などを利用した化学修飾が可能であり、種々の生体擬似的環境の構築に適している。また、リシンとプロリン残基が12回繰り返して構成された塩基性ペプチドのKP24ペプチドは、最近の研究で間葉系幹細胞の細胞凝集塊形成を促進することが報告されている。

この機能は上皮細胞ならびに間葉系細胞の凝集塊から形成される唾液腺組織形成に影響を及ぼすことが考えられる。

そこで、本研究ではハイドロゲルを用いた生体擬似的環境を基盤に、周囲環境に伴う顎下腺成長変化メカニズムの検討、および顎下腺成長制御を目的とし、以下の2つの研究を段階的に進めた。

1. KP24ペプチドの細胞成長に及ぼす影響
2. KP24ペプチドの顎下腺組織成長に及ぼす影響の検討

材料および方法

1. アルギン酸ゲルシートの作製

アルギン酸ナトリウム溶液 (4wt%, Wako, Osaka, Japan) をアルミナプレートで作製した型へ注いだ後、1.5時間塩化カルシウム溶液 (5wt%, Nacalai-tesque, Kyoto, Japan) に浸漬した。

得られたアルギン酸ゲルシートを70%エタノールに24時間以上浸漬し滅菌した後、小片にカットした。滅菌超純水にて一晚浸漬しゲル内溶液を水へ置換した後、実験に使用した。

準備したゲルの堅さはヤング率で184 kPaである。

2. KP24 ペプチド修飾アルギン酸の作製と分析

KP24 はリシンとプロリンが結合した周期性ペプチドである。KP24 修飾アルギン酸の作製は、カルボジイミドを用いてアルギン酸のカルボキシ基とペプチドのアミノ基をアミド結合させることでアルギン酸と KP24 ペプチドを固定化した。超純水にアルギン酸ナトリウムを溶解し、carbodiimide hydrochloride を添加後、N-hydroxysulfosuccimide と KP24 ペプチドを添加し、室温にて 8 時間攪拌した。この溶液を透析膜を用いて 4 日間透析した後、凍結乾燥し、得られた粉末をゲル作製に使用した。また、ペプチドの固定化を確認するため、合成した KP24 修飾アルギン酸ナトリウムを pH2.2 クエン酸バッファーに溶解し、アミノ酸分析装置による解析を行った。

3. 顎下腺の単離と培養

胎生 12.5 日の ICR マウス (Katayama Chem. Osaka, Japan) から顎下腺を取り出した後、堅さが 184KPa のアルギン酸ゲル、KP24 ペプチド修飾ゲル上に静置し、5% CO₂ 存在下のインキュベーター (37 °C) 内で 3 日間培養した。培養した顎下腺組織を一定時間ごとに USB2.0CMOS カメラ (ARTCAM-130SN2) を用いて撮影を行った。

4. KP24 修飾ゲルを用いた細胞培養

・PC12 細胞培養

モデル神経細胞として PC12 細胞 (ATCC, VA, USA) を使用した KP24 ペプチド修飾アルギン酸ゲル上で細胞培養する際、コラーゲンコーティングを行わず、細胞は 5000 cells/cm² でゲル上に播種し、50 ng/ml の NGF (Millipore, CA, USA) を含む培地で培養し、神経突起の長さを測定した。USB2.0CMOS カメラを用いて一定時間ごとに撮影を行った。

・MC3T3-E1 細胞培養

骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞 を使用した。KP24 ペプチド修飾アルギン酸ゲル上で細胞培養する際、5000 cells/cm² でゲル上に播種し USB2.0CMOS カメラを用いて一定時間ごとに撮影した。

・MSC 培養

Balb/C マウス (生後 6~10 週) の大腿骨から取り出した間葉系幹細胞である MSC を使用した。KP24 ペプチド修飾アルギン酸ゲル上で細胞培養する際、5000 cells/cm² でゲル上に播種し、USB2.0CMOS カメラを用いて一定時間ごとに撮影した。

5. 蛍光免疫染色

培養した顎下腺は PBS で洗浄した後、4% paraformaldehyde にて固定後、蛍光免疫染色を行った。使用した抗体は Lectin from Arachis hypogaea (PNA, 1:200, Sigma-Aldrich, MO, USA), anti- β -III-Tubulin (1:1000, R&D system, MN, USA)を用い、二次抗体には Alexa Fluor568 (1:200, Life Technologies) を用いた。染色した顎下腺は共焦点レーザー顕微鏡 (C1 システム, Nikon, Tokyo, Japan) にて観察した。

結果および考察

1. KP24 修飾ゲルが細胞培養に及ぼす影響の検討

KP24 修飾ゲルで細胞を培養したところ、MC3T3-E1, MSC の細胞はゲルに接着せず培養が困難であることが判明した。この傾向は導入ペプチド濃度をかえても変わらなかった。次に、神経細胞様細胞である PC12 を培養した。堅さが同じアルギン酸ゲルにて培養した結果、KP24 導入のゲルにおいてこの細胞は高い細胞接着性を示し、また有意な神経突起伸張を示した。

2. KP24 ペプチド修飾ゲルが顎下腺分枝形態形成に及ぼす影響の検討

顎下腺組織は通常周囲の堅さが堅い環境下では成長が抑制されるが、堅い環境下であるにも関わらず、KP24 ペプチドを導入したゲルでは顎下腺組織の有意な成長促進、つまり bud 数の増加と顎下腺組織面積の増大が認められた。また、蛍光免疫染色の結果からこの成長した唾液腺組織中における活発な神経組織の発達も確認できた。これらの成長はペプチド導入濃度に依存していることがわかった。

これらのことから、KP24 を導入したゲルは神経細胞伸長を促進し、同時に顎下腺組織成長にも関与することが明らかとなった。KP24 ペプチドは人工合成ペプチドであり、合成だけでなく、ハイドロゲルへの導入も容易である。このペプチド修飾ハイドロゲルは、今後の高い必要性が予測される *in vitro* での生体組織成長制御技術の 1 つとして、唾液腺のみならず、他の組織にも有効であるものと期待できる。

論文審査結果の要旨

近年の細胞工学、組織工学の進歩から、ボトムアップアプローチで実験室にて細胞から生体組織を合成する機運が高まっている。この達成には、生体内で起こる物理的・化学的刺激を人工材料を用いて再現した生体擬似的環境の構築が有効であると考えられる。そこで、本研究ではハイドロゲルを用いた生体擬似的環境を基盤に、周囲環境に伴う顎下腺成長変化メカニズムの検討、および顎下腺成長制御の解明を目的とした。

本研究は、以下の結果を得ている。

- 1) **KP24** ペプチドは神経細胞の増殖および神経突起の伸長に影響を及ぼし、顎下腺分枝形態形成の促進に関与していることが示された。
- 2) **KP24** ペプチドは顎下腺の成長を促進させることが明らかとなり、またその成長は神経組織の伸長と関連があり、**KP24** ペプチドによる神経突起の伸長を介した顎下腺組織成長制御の可能性が示唆された。
- 3) ハイドロゲル材料の機能性ペプチドによる修飾が組織制御用基材作製方法として有効であることが示された。

これらの結果は、ハイドロゲル材料に **KP24** のような機能性ペプチドを応用することで、唾液腺分枝形態形成を促進し、再生・移植医療への展開が期待できると同時に、制御機構の新しい歯科医学研究手法として有用であることを示すものである。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。