

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01832

研究課題名(和文)多血小板血漿による組織修復促進機序の解明と至適調整法の確立

研究課題名(英文)The analysis of tissue repair mechanism by PRP and optimal preparation method

研究代表者

齋田 良知 (Saita, Yoshitomo)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00534885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多血小板血漿(PRP)は、調製方法により含まれる血小板数や細胞種が異なるため調整法により作用も異なると考えられてきた。我々は、様々な方法で調製したPRPを比較し、PRP中の成長因子は、血小板と白血球両方と関連するもの、どちらか一方とのみに関連のものがある事を明らかにした。また、PRPは血小板が放出する成長因子が直接的に組織に作用し修復を促進することが主たる作用機序と考えられていたが、組織修復に寄与する組織修復マクロファージを損傷部位へ動員させることによっても間接的にも組織修復を促進することを、動物実験モデルにて明らかにした。これらの結果は、PRP療法の発展に結びつくものと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多血小板血漿(PRP)療法は、スポーツ外傷・障害の治療や変形性関節症の治療に用いられているが、その作用メカニズムは不明な点が多い。今回の検討では、PRPは作成方法により含有される細胞種に差があり、そのため成長因子もPRP調製方法により異なることをしめした。また、PRPが直接的に患部に存在する細胞に作用するのみではなく、組織の修復に寄与する細胞を動員することで損傷組織の修復を促進する可能性が示唆された。この研究によりPRPの作用機序の一部を解明し、病態に応じてPRPを使い分けることでより効果的なPRP療法を行うことが出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Researchers have investigated the use of platelet-rich plasma (PRP) therapy. However, the mechanisms through which PRP affects tissue repair remain unclear. We hypothesized that PRP may promote tissue repair not only by affecting local cells directly but also recruiting reparative cells indirectly. Here, we elucidated the effects of macrophages on the mechanisms of PRP therapy.

Full-thickness defects were created in central third of patellar tendons of 12-week-old B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J mice and in 12-week-old C57BL/6 mice. Mice were treated with or without PRP, and flow cytometry was used to analyze macrophage numbers. In the PRP groups, recruitment of macrophages that were not derived from PRP increased from postoperative day 1. This indicated that PRP promoted the recruitment of macrophages from peripheral tissues and blood. Therefore, we revealed that PRP promoted tissue repair not only by affecting local cells directly but also recruiting reparative cells indirectly.

研究分野：整形外科

キーワード：多血小板血漿療法 再生医療 スポーツ外傷・障害 成長因子 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多血小板血漿(platelet-rich plasma, PRP)は、含有する成長因子が組織修復促進作用を有し、安全・低コスト・低侵襲に治療が行えるため運動器疾患に対する新規治療として注目され、整形外科、スポーツ外傷や障害、皮膚科、形成外科領域など広範な分野で使用されている。

しかし、PRP には明確な定義付けがされておらず、血小板濃縮率や赤血球・白血球混入の有無など内容がかなり異なる血漿を全て PRP と総称して臨床で汎用してしまっているのが現状であり、PRP の効果を検証する上で世界的にも大きな問題となっている。

こうした背景にも拘らず「PRP 自体の質による効果の違いを解析している研究」や「動物モデルで未知の PRP の作用メカニズムの解明を目指す研究」はほとんどなく、PRP 療法の確立における大きな問題点であると考えられる。

2. 研究の目的

PRP 調整法による PRP の質の差を検討し、病態に応じた PRP 療法の使い分けに結び付けること

動物実験モデルにおいて、PRP による組織修復過程に寄与する細胞の種類とその起源を明らかにすること

以上を目的とした。

3. 研究の方法

PRP 精製法の違いによる質の解析 (細胞種・成長因子・サイトカインの測定)

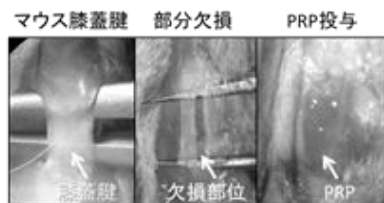
・成人健常ボランティアより末梢血を採血し、「血小板の濃縮率 白血球の濃縮率 白血球の分画」の3点を中心に様々な組み合わせの PRP を調整し、得られる PRP に含まれる「細胞種・成長因子・サイトカイン」を測定する。

動物モデルを用いた分子細胞生物学的手法による PRP の組織修復促進メカニズムの解明

- 1: 軟部組織損傷モデルにおいて組織修復過程に動員される細胞種の同定

実態顕微鏡を用いてマウス膝蓋靭帯中央に部分欠損を作成し(下図)、同部位にゲル化した PRP を投与する。修復過程に寄与する細胞を、免疫染色を用いた組織学的解析、及び修復組織をコラゲナーゼ処置し抽出した細胞の FACS analysis により行い、修復に寄与する細胞種を同定する。

図: マウス膝蓋靭帯への部分欠損作成と PRP 投与



- 2: 修復過程におけるマクロファージ (M ϕ) の寄与の解析

PRP による組織修復促進への骨髄由来 M ϕ の寄与が示唆されており(Kajikawa ら 2008 年)、この証明のため、M ϕ を GFP で標識した遺伝子改変マウス (CX3CR1gfp/+) を使用した。

PRP 群と対照群で靭帯組織の経時的な FACS 解析と組織切片解析を行い、組織修復過程における M ϕ の寄与と、そこに PRP が及ぼす影響を解析した。

M ϕ が特異的に GFP 陽性となるマウス (CX3CR1gfp/+) の膝蓋靭帯中央に実態顕微鏡を用いて部分欠損を作成。12 週齢 WT マウス (C57BL/6) から 1 ml の血液を採取し、血小板濃度を揃え調製した Leukocyte Rich (LR)-PRP (白血球が全血以上) と Leukocyte poor (LP)-PRP (白血球が全血以下) を膝蓋靭帯欠損部に投与した。対照は、膝蓋靭帯中央に部分欠損のみ作成した PRP 非投与群とした。PRP 投与後 1/2/4/7/14/28/56 日の修復過程の靭帯組織からコラゲナーゼ処理で採取した細胞のフローサイトメトリーを行い、M ϕ 総数、炎症性 M ϕ (M1) と組織修復 M ϕ (M2) の推移を解析した。統計解析は GraphPad Prism ver. 6 を用い、One-way ANOVA 後 Turkey 法で行い、有意水準は 5% に設定した。

4. 研究成果

PRP 精製法の違いによる質の解析 (細胞種・成長因子・サイトカインの測定)

末梢血を遠心分離して得られる PRP であるが、分離の仕方によって 1. 血小板も白血球も多く含まれる PRP (Leukocyte-rich PRP; LR-PRP、外観は赤)、2. 白血球を多少は含む PRP (Leukocyte-poor PRP; LP-PRP、外観は黄色)、3. 白血球はほとんど含まない PRP (Pure-PRP、外観は黄色) に分けられた。これらの PRP 中に含まれる成長因子を測定したところ、血小板由来成長因子 (Platelet derived growth factor, PDGF) や血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) は、PRP 中に含まれる血小板数と相関すると同時に PRP 中の白血球数とも相関することが分かった。いっぽう、トランスフォーミング増殖因子 (Transforming growth factor -1; TGF-1) や線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) は、血小板数とは相関するものの、白血球数とは負の相関を示していた。また、タンパク質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9) は血小板数とは相関せず、白血球数のみと相関することが明らかとなった。これらの成果を Journal of Orthopedic Science にて報告した (Kobayashi et al.)。

また、次世代 PRP と呼ばれる、LR-PRP に脱水処理を加え抗炎症性サイトカインを濃縮させる PRP 作成法 (autologous protein solution (APS) 精製キット, Zimmer Biomet 社) にて調整した PRP 中に含まれる抗炎症性サイトカインである IL1ra (IL-1 レセプターアンタゴニスト) と、LP-PRP と比較し 50 倍以上の IL1ra が含有されることを明らかにした (2019 年国際軟骨修復学会 (ICRS) にて発表予定)。

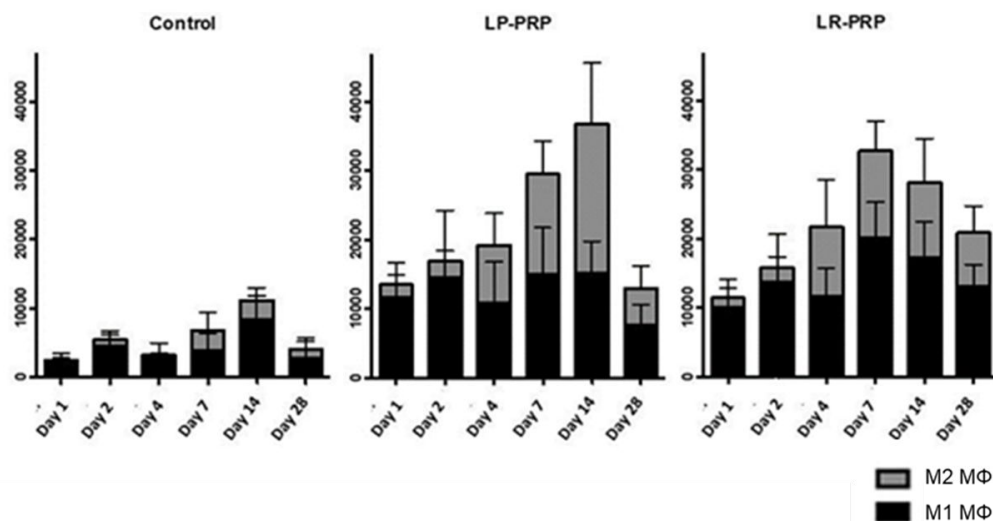
これらの知見から、PRP は作成方法によりその中に含有される成長因子や抗炎症性サイトカインは大きく異なり、病態に応じてそれらを使い分けることでより効果的な PRP 療法を確立できる可能性が示唆された。

- 2 : 修復過程におけるマクロファージ (M) の寄与の解析

PRP 非投与群と比較し、投与群で投与後 1 日目から有意に GFP 陽性の M の増加を認めた。このことにより、PRP 中に含まれる M ではなく、血中若しくは近傍組織由来の M が PRP 投与部位に動員されることが明らかになった。

また、4 日目から LP および LR - PRP 投与群で M2 の割合が増加した (非投与群の M2 比率=13.8% LP 群=46.6% LR 群=55.5) 。また、PRP 投与後 7/14 日目の LP/LR 群を比較すると白血球を豊富に含む LR 群において炎症に関与する M1 の割合が高い傾向を示した (M1 比率 7 日/14 日: LP 群=53.9%/41.6% LR 群=64.3%/65.1%, LP 群 vs LR 群 P 値: 7 日目=0.287 14 日目=0.177) (下図参照) 。マクロファージには M1 (炎症性マクロファージ) /M2 (組織修復マクロファージ) が存在するが、より損傷組織の修復に寄与すると考えられるのは M2 である。今回の結果から、好中球が多い PRP よりも、リンパ球の多い PRP において M2 マクロファージの損傷組織への動員が促進される傾向を見出した。これにより、PRP の質 (特に PRP 中の白血球分画) によって、PRP 投与組織に誘導される細胞が変化する可能性が示唆された。

図：腱損傷部位に誘導されるマクロファージの数とサブタイプ



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Kobayashi Y, Saita Y, Nishio H, Ikeda H, Takazawa Y, Nagao M, Takaku T, Komatsu N, Kaneko K. Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. J Orthop Sci. 21:683-9. 2016,

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Platelet-rich Plasma (prp) Promotes Tendon Repair Through Recruitment Of Macrophages (MPs) Hirofumi Nishio , Yoshitomo Saita , Yohei Kobayashi , Hiroshi Ikeda , Kazuo Kaneko Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018 年
2. Platelet-rich plasma (PRP) promotes tendon repair through recruitment of macrophages (MPs). Nishio H, Saita Y, Kobayashi Y, Ikeda H, Kaneko K. 18th ESSKA, Glasgow, May 9-12, 2018.
3. Concentration rate of the platelet in platelet-rich plasma (PRP) differs from gender and age. Saita Y, Kobayashi Y, Nishio H, Wakayama T, Fukusato S, Uchino S, Kaneko K. ICRS Focus Meeting, Milan, December 13–14, 2018.
4. 組織再生における血管新生 多血小板血漿(platelet-rich plasma、PRP)局所投与は早期の血管新生を介して腱の組織修復を促進する. 小林 洋平, 齋田 良知, 西尾 啓史, 若山 貴則, 池田 浩, 金子 和夫. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2018 年
5. ゲルセパレーターを用いるキットで精製した leukocyte-poor platelet rich plasma 中の細胞種と濃縮率に影響を及ぼす因子の検討. 西尾 啓史, 齋田 良知, 若山 貴則, 小林 洋平, 金子 和夫. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2018 年
6. 多血小板血漿(PRP)はマクロファージの遊走を介して腱の組織修復を促進する 西尾 啓史, 齋田 良知, 小林 洋平, 高久 智生, 金子 和夫 日本整形外科学会 2017 年
7. スポーツ外傷・障害における PRP 療法の基礎と実践 病態に応じた PRP の使い分けの時代へ 齋田 良知 日本整形外科スポーツ医学会 2017 年
8. 膝関節内への多血小板血漿 (PRP) 注射療法の効果に影響を及ぼす因子の検討 小林 洋平, 齋田 良知, 西尾 啓史, 定月 亮, 羽田 晋之介, 長尾 雅史, 高澤 祐治, 池田 浩, 金子 和夫 日本整形外科スポーツ医学会 2017 年
9. 難治性膝蓋腱炎に対する多血小板血漿 (PRP) 療法の効果に影響を及ぼす因子の検討 西尾 啓史, 齋田 良知, 小林 洋平, 高澤 祐治, 池田 浩, 金子 和夫 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2017 年
10. プロサッカー選手のハムストリング肉離れに対する多血小板血漿 (PRP) 療法 20 例の治療経験 小林 洋平, 齋田 良知, 西尾 啓史, 小林 慶司, 長尾 雅史, 池田 浩, 金子 和夫 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2017 年

〔図書〕(計 3 件)

1. 肉離れに対する最新の治療法 肉離れに対する PRP 療法 小林 洋平, 齋田 良知, 池田 浩, 金子 和夫 文光堂 2017 年
2. 【アスリートを支える低侵襲治療の実際】障害の違いによる選択的 PRP 療法. 齋田 良知, 小林 洋平, 西尾 啓史, 若山 貴則. 整形外科最小侵襲手術ジャーナル, 2018, 88 号, 74-78.
3. 【スポーツ傷害の予防・診断・治療】新しい治療機器・薬剤 スポーツ外傷・障害に対する多血小板血漿 (PRP) 療法. 小林 洋平, 齋田 良知, 西尾 啓史, 若山 貴則, 池田 浩, 金子 和夫. 別冊整形外科, 2018, 73 号, 56-62.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

多血小板血漿（PRP）による治療について

<https://www.juntendo.ac.jp/hospital/patient/other/prp.html>

PRP療法とは？整形外科におけるPRP療法の目的や効果について

<https://medicalnote.jp/contents/180305-001-LY>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小林 洋平

ローマ字氏名：KOBAYASHI, youhei

研究協力者氏名：西尾 啓史

ローマ字氏名：NISHIO, hirofumi

研究協力者氏名：池田 浩

ローマ字氏名：IKEDA, hiroschi

研究協力者氏名：金子 和夫

ローマ字氏名：KANEKO, kazuo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。