

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592097

研究課題名（和文） 改良 PRP 療法の歯内療法処置への応用の可能性を探る

研究課題名（英文） The improvement PRP treatment was investigate the applied likelihood to endodontic treatment

研究代表者 須田朋代

研究成果の概要： 本研究は、多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) から分離した、洗浄血小板 (washed platelet, WPLT) がヒト歯髄細胞の増殖に対し、促進的に作用することを明らかにしたものである。細胞増殖に対し PRP は弱い促進作用しか示さなかったが WPLT は、より効果的にその細胞増殖を促進した。また、乏血小板血漿 (platelet poor plasma, PPP) の添加は濃度依存的に培養ヒト歯髄細胞の成長を抑制した。これらの結果から WPLT は PRP よりも効果的にヒト歯髄細胞の増殖を促進することが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：生体材料 再生医学 歯学 歯髄 PRP

1. 研究開始当初の背景

多血小板血漿(platelet-rich plasma; PRP) は、近年その強力な組織再生能力から整形外科領域のみならず、歯科領域においてもインプラント埋入手術などに広く利用されるようになってきた。しかしながら、血小板中に含まれる数多くの成長因子の作用メカニズムや、個々の歯周組織細胞に対する作用など

不明な点が多いまま、経験則的な使用法から臨床応用が開始され現在に至っている。従って、最近では、PRP は組織再生療法に対し、必ずしも十分な効果を発揮しないとす報告も数多く認められる様になってしまった。

一方、歯内療法処置、特に、生活歯髄切断等の歯髄組織保存再生療法には、従来より水酸化カルシウムが使用され、一定の効果を収めている。しかしながら、同薬剤は寛恕的に

歯髄創面を壊死させるだけの作用しか有さず、積極的に歯髄組織を再生・石灰化させるものではない。同薬剤の歯内療法処置への応用は 100 年近くの長い歴史を持つが、逆に、これは他に適当な因子が存在しないという、歯内療法処置の進化が停止している事実を如実に物語っているにすぎない。再生医療の重要性が声高に叫ばれている現在、歯内療法処置にも、感染部位を機械的に除去しガッタパーチャーを充填するだけの治療法から、新たな歯内療法処置を創造する時代に来ているのではなからうか。歯髄組織再生において、積極的な歯髄閉鎖を試みる手段としては、焼成ウシ骨粉や象牙質粉の応用等が試みられているが、現代社会においては交通手段の発達や社会構造の変化に伴い、感染症も世界的規模でリアルタイムに蔓延していく傾向が認められ、これらの危険を前述の処置法から完全に除去することは不可能である。HIV の蔓延やサイトメガロウイルス感染、狂牛病感染等の問題を再生医療用材料から除外しようとした場合、自己由来の生体材料の使用が、最も安全で効率的な方法と思われる。このような観点から見ると、PRP 療法は自己由来増殖因子の供給が容易に、また、確実に行える、最も現実的な治療法であるように思われる。

そこで申請者は、従来の PRP 療法における効果の不確実性を解明するため、様々な細胞や因子が含まれるヒト血液を、各々の血液成分ごとに分離し、各成分の歯周組織細胞に対する増殖活性を *in vitro* で計測した。その結果、血小板と血漿成分との混合物である PRP から、血漿成分を除去して洗浄血小板として作用させることにより、これら細胞に対する安定した増殖活性が得られることが判明した。これに対し、従来の PRP は歯周組織細胞の増殖に対しては、全く効果を示さないか、逆に抑制的に働いた。このように PRP から血漿成分を除去し、洗浄血小板の形態にすれば、微少な生活歯髄切断の創面にも同因子を作用させることが可能となり、また、増殖因子の作用濃度を自由に調節することも可能となってくる。このような結果を踏まえ申請者は、歯髄保存処置に対する効率的な PRP 療法の可能性を検討し、自己由来増殖因

子による、安全で効果的な歯髄組織保存再生療法を確立するための基礎的データを集積することを目的とし、一連の研究を開始した。

2. 研究の目的

血小板には platelet-derived growth factor (PDGF)、transforming growth factor- β (TGF- β) あるいは insulin-like growth factor-I (IGF-I) など多くの成長因子が含まれている。近年、これら成長因子の作用を期待して、歯科領域においても、骨組織や歯周組織の再生治療に対し多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) が盛んに応用されるようになってきた。しかしながら、PRP による創傷治癒促進のメカニズムの解明を試みた報告は骨芽細胞や歯肉線維芽細胞が中心で、歯髄細胞に対する同因子の作用を検討した報告は数少ない。さらに、現在 PRP を応用した臨床報告では、基礎的データに裏付けされた組織再生促進に関する報告は少なく、PRP 中の組織再生を促進する血小板の理想的な濃度や、重要な働きを担う成分などは明確に示されているとは言えない。したがって、最近では、PRP は組織再生療法に対して必ずしも十分な効果を発揮しないと報告も数多く認められるようである。重篤な感染症が世界的にリアルタイムに蔓延する現代社会においては、自己由来生体材料の応用が、最も安全で効率的な再生医療用材料となるものと思われる。このような観点から PRP 療法にも、より安全で確実な効果が期待できるような改良と、これを裏付ける基礎的データの蓄積が必要とされている。

一方、PGE₂ は種々の病態に関与すると共に、増殖や分化、生体の恒常性維持を司る幅広い働きを持った autacoid である。創傷あるいは炎症時には同因子が血管透過性を亢進することにより、炎症性細胞の創傷部位への遊走が促進され、直接または間接的に組織の治癒を促進する。また、硬組織再生における同因子の働きは、骨芽細胞の増殖促進、破骨細胞の分化誘導など、骨の吸収・添加の調節に密接な働きを持つ因子として、古くからその関係が重視されてきた。

そこで、本研究ではヒト歯髄細胞の増殖、

PGE₂ 産生、及び、石灰化関連遺伝子発現に対する PRP および洗浄血小板(washed platelet; WPLT)の作用について検討を加えることにより、将来的に、生活歯髄切断における創面の保護、治癒促進に対する WPLT の応用の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞 ヒト歯髄細胞は、矯正治療上の理由により便宜抜歯を行った患者の小白歯から得た。歯髄を細切した後、 α -MEM 培地に 10%牛胎児血清を添加し、37°C、5%炭酸ガス気相下にて培養し、実験には 5 代から 10 代継代したものを供試した。

(2) 血小板浮遊液の調製

PRP は既報の方法により調整した。PRP の調整は健康成人男性の静脈より、1ml の 3.8%クエン酸 1ml を含有するプラスチック注射器にて 9ml の血液を採取した後、直ちに転倒混和し、ポリプロピレン製遠心管に移した。そして、1700xg、10°C、10 分間遠心し、その上層を PRP 画分として分取した。さらに、下層の赤血球は 1700xg で 30 分間遠心し、乏血小板血漿 (platelet poor plasma; PPP) を得た。PRP の血小板数の調整は、この PPP 画分を用いた。また、洗浄血小板浮遊液 (washed platelet; WPLT) の調整は PRP に 60mM EDTA 溶液 (PH7.4) を 1/10 量添加し、十分に混和した後、1700xg、20°C、20 分間遠心分離した。上層の血漿を除去した後、60mM EDTA 含有 pH 7.4 のリン酸緩衝液を加えて、再度 1700xg、20°C、20 分間遠心分離し、上層を除去した。その後、氷上で冷却しながら氷冷 α -MEM を適量加え、血小板数を開始時の PRP の血小板数と同じになるように調整した。PRP と W-PLT は、凍結融解法により血小板から成長因子を放出させ、その遠心上清を実験に供試した。

(3) 増殖細胞数の定量

細胞の増殖は Cell counting kit-8 を用い、既報の方法によって測定した。96 ウエルプレート (Becton Dickinson, NJ,USA) に 1×10^4 cells/100 μ l/well を播種し、37°C、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。各種サンプルを添加し、さらに 5 日間培養した後、

テトラゾリウム塩である WST-8 を各ウェルに 10 μ l 添加し、1 時間培養後、細胞内脱水素酵素によって、WST-8 が還元されて生成する水溶性ホルマザンの、450nm における吸光度をマルチウェルプレートリーダーで測定した。

(4) Prostaglandin E₂ (PGE₂) の測定

PGE₂ は Prostaglandin E₂ Express EIA Kit (Cayman Chemical, MI, USA)を用いた。24 ウエルプレート (Becton Dickinson, NJ,USA)に 1×10^5 cells/500 μ l/well を播種して、37°C、5%炭酸ガス気相下で 48 時間培養後、培養液を交換して各種サンプルを添加し、同様の条件下でさらに 6 時間培養した。その後、その培養上清を回収し、100 倍希釈した後 PGE₂ の測定に用いた。

(5) Cyclooxygenase-2 (COX-2) 遺伝子発現の測定

COX-2 遺伝子発現の測定は、リアルタイム RT-PCR 解析システム (ABI Prism Sequence Detection System 5700) を使用し、得られた結果を Primer Express Software (PE Biosystems) を用いて解析した。使用した primer は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) の解析に従って合成された human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 の pre-mixed primer を使用した。

(6) 統計処理

実験結果のすべての数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。また、得られたデータについては SPSS 統計ソフトウェアの student-*t* 検定により、有意差検定を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄細胞の増殖に対する PPP, PRP 及び WPLT の作用 まず始めに、PRP、WPLT 及び PPP のヒト歯髄細胞の増殖に対する作用を検討した。結果は、培地中に 5%の濃度で WPLT を添加することにより、同因子は有意にヒト歯髄細胞の増殖を促進した (Fig. 1)。しかしながら、PRP には有意な増殖促進効果は認められなかった。さらに、PPP の添加により、同細胞の増殖は、逆に阻害する傾向が認められた。

(2) WPLT 誘導性ヒト歯髄細胞増殖活性に対する PPP 添加の影響

そこで、PPP の添加が WPLT により誘導されるヒト歯髄細胞の増殖活性に与える影響について、さらに検討を加えた。結果は、WPLT によるヒト歯髄細胞の増殖に対し、PPP は濃度依存的にその増殖を抑制した(Fig. 2)。

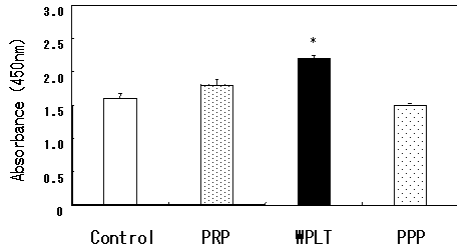


Fig. 1. Effects of WPLTs on proliferation of dental pulp cells. Dental pulp cells were inoculated at 1×10^4 cells/well in 96-well plates, unless otherwise stated. After 13 h, medium was removed, and was replaced with 0.1 ml of fresh medium containing 5% WPLTs, PRP or PPP. Cells were incubated for a further 5 d, and relative viable cell number was measured using Cell Counting Kit-8. Results are expressed as means \pm S. D. of triplicate cultures.

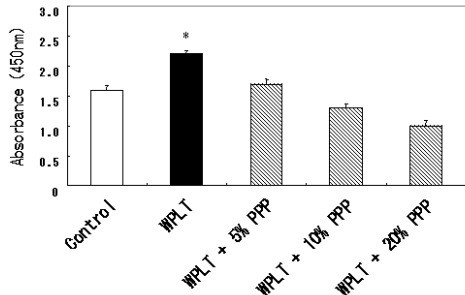


Fig. 2. Effects of PPP on proliferation of dental pulp cells. WPLT-stimulated dental pulp cells were incubated in the presence or absence of various concentrations of PPP in α -MEM. Cells were incubated for a further 5 d, and relative viable cell number was determined by MTT assay.

この結果は、血漿中に血小板中の増殖因子の作用を抑制する、何らかの抑制因子が存在する可能性を示唆している。従って、PRP から血漿成分を除去することにより、血小板中の増殖因子の作用を、より有効に引き出すことができる可能性が考えられた。

(3) ヒト歯髄細胞の増殖に対する PGE₂ の作用

一方、Prostaglandin E₂ (PGE₂)は種々の病態に関与すると同時に、増殖や分化、生体の恒常性維持を司る、幅広い働きを持った autacoid である。特に硬組織の形成と吸収に関しては、古くから、その関係が研究されてきた。そこでまず、PGE₂ のヒト歯髄細胞の増殖に対する作用を検討した。同細胞の培養系に種々の濃度の PGE₂ を添加したところ、PGE₂ は 5 - 500ng/ml の濃度範囲において、

ヒト歯髄細胞の増殖を有意に促進した(Fig. 3)。

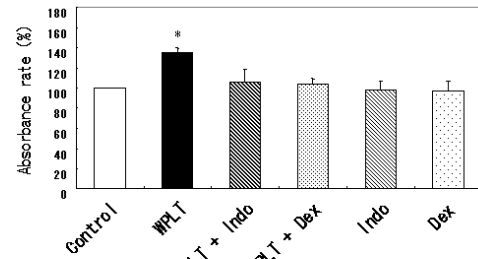


Fig. 3. Effects of PGE₂ on cell proliferation of dental pulp cells. Dental pulp cells were inoculated at 1×10^4 cells/well in 96-well plates, unless otherwise stated. After 13 h, medium was removed, and was replaced with 0.1 ml of fresh medium containing various concentrations of PGE₂. Cells were incubated for a further 5 d, and relative viable cell number was measured using Cell Counting Kit-8. Results are expressed as means \pm S. D. of triplicate cultures. (*P<0.05; **P<0.01)

(4) WPLT 誘導性ヒト歯髄細胞増殖活性に対する dexamethasone 及び indomethacin 添加の影響

次に、WPLT により誘導されるヒト歯髄細胞の増殖促進活性に、この PGE₂ が関与しているか否かを検討するため、アラキドン酸代謝経路の PLA₂ と COX-2 に対する阻害剤である dexamethasone と indomethacin の、ヒト歯髄細胞の増殖に与える影響を調べた。結果は、dexamethasone と indomethacin の添加により、WPLT 誘導性のヒト歯髄細胞の増殖は有意に抑制された(Fig. 4)。また、この抑制活性は、過剰量の PGE₂ の添加により、解除された (データは示さない)。

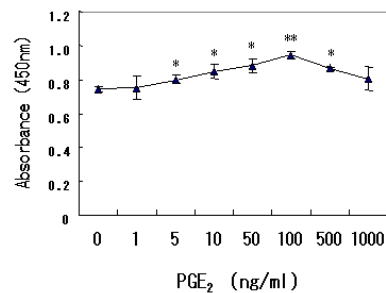


Fig. 4. Effects of indomethacin and dexamethasone on WPLT-induced proliferation of dental pulp cells. Dental pulp cells were cultured in 0.1 ml of α -MEM containing 10% FBS in the presence of indomethacin (10^{-5} M) or dexamethasone (10^{-8} M). After 2 h, cells were treated with or without 5% WPLTs. Cells were incubated for a further 5 days, and relative viable cell number was measured using Cell Counting Kit-8. Results are expressed as means \pm S. D. of triplicate cultures.

(5) ヒト歯髄細胞の PGE₂ 産生に対する WPLT の効果

次に、WPLT が確かにヒト歯髄細胞における PGE₂ の産生を促進するか否かについて実験を行なった。結果は、WPLT を 6 時間の作用させることにより、同因子はヒト歯髄細胞における PGE₂ 産生を明らかに促進した。こ

の促進効果は、100U/mlのIL-1 β の添加とほぼ同程度であった(Fig. 5)。また、興味あることに、WPLTとIL-1 β との併用により、PGE₂の産生量は相乗的に促進された(データは示さない)。

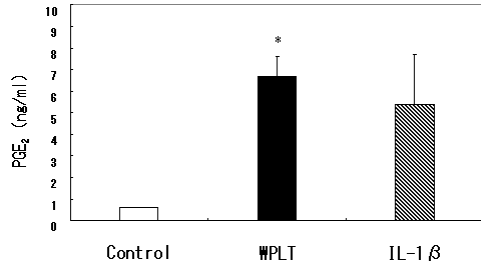


Fig. 5. Effects of WPLTs on PGE₂ production in dental pulp cells. Dental pulp cells were inoculated at 1×10^5 cells/well in 24-well plates, unless otherwise stated. After 48 h, medium was removed, and was replaced with 0.5 ml of fresh medium containing 5% WPLTs and IL-1 β (100 U/ml). Cells were incubated for a further 6 h, and PGE₂ levels in the conditioned medium were measured by enzyme immunoassay. Results are expressed as means \pm S. D. of triplicate cultures.

(6) ヒト歯髄細胞の COX-2 遺伝子発現に対する WPLT の効果

次に、WPLTによるCOX-2遺伝子発現に与える影響について検索した。COX-2発現はリアルタイムRT-PCR法により、18s rRNAをインターナルコントロールとして計測した。結果は、WPLTを作用させてから30分後にCOX-2遺伝子の発現が認められ、そして、3時間には68倍に達した後、速やかに減少した(Fig. 6)。この様に、WPLTはヒト歯髄細胞における増殖を、PGE₂依存的にコントロールしていることが明らかとなった。

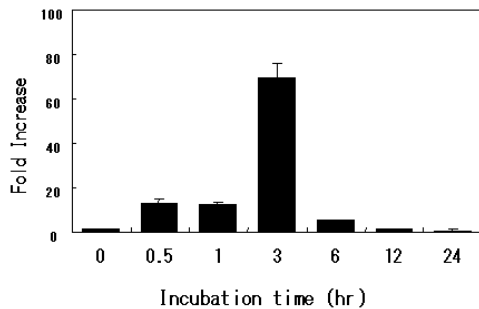


Fig. 6. Effects of WPLTs on COX-2 gene expression in human dental pulp cells. Relative expression of COX-2 in human dental pulp cells was measured by real-time quantitative RT-PCR. Results are shown as means \pm S. D.

(7) ヒト歯髄細胞における WPLT 誘導性 PGE₂ 産生に対する TGF- β シグナル阻害剤 SB-431542 の影響

そこで我々は次に、WPLT中の、どのような因子がヒト歯髄細胞のPGE₂産生に影響を与えているのかについて検討を加えた。

TGF- β は血小板中で最も多量に含まれる

増殖因子の一つであり、また、同因子は硬組織形成におけるカップリングファクターとしても、よく知られている。そこで、TGF- β 1のヒト歯髄細胞におけるPGE₂の産生に対する作用を、TGF- β シグナルの阻害剤であるSB-431542を用いて検討を加えた。

結果はFig. 7に示すように、TGF- β 1及びWPLTの添加は、有意にヒト歯髄細胞におけるPGE₂産生を促進した。ここに、SB-431542を添加したところ、WPLT及びTGF- β 1により誘導されたPGE₂産生は、ほぼコントロールレベルにまで抑制された。

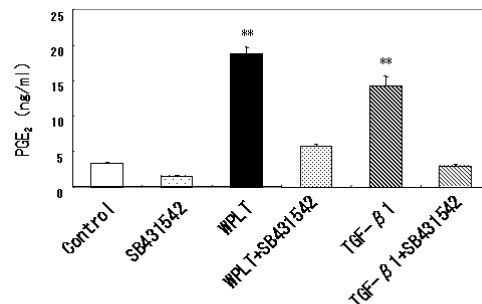


Fig. 7. Effects of SB431542 on WPLT-induced PGE₂ production of dental pulp cells. Dental pulp cells were inoculated at 1×10^5 cells/well in 24-well plates. After 48 h, medium was removed, and was replaced with 0.5 ml of fresh medium containing 5% WPLT and SB431542 (10 μ M). Cells were incubated for a further 6 h, and PGE₂ levels in the conditioned medium were measured by enzyme immunoassay. Results are expressed as means \pm S. D. of triplicate cultures.

(8) ヒト歯髄細胞における WPLT 誘導性細胞増殖活性に対する TGF- β シグナル阻害剤 SB-431542 の影響

さらに、WPLTによるヒト歯髄細胞の増殖促進活性に対する、TGF- β の影響について検討した。その結果、SB-431542はWPLTによるヒト歯髄細胞の増殖を明らかに抑制した(Fig. 8)。

以上の結果から、ヒト歯髄細胞におけるWPLTによるPGE₂産生と、それに伴う同細胞の増殖にはWPLT中のTGF- β が深く関与することが明らかとなった。

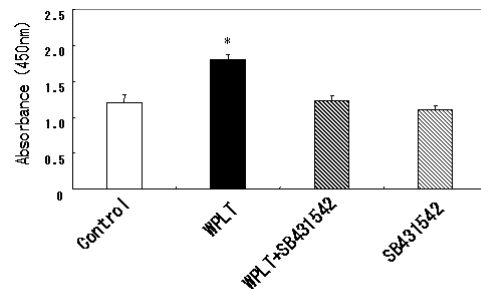


Fig. 8. Effects of SB431542 on WPLT-induced proliferation of dental pulp cells. Dental pulp cells were inoculated at 1×10^4 cells/well in 96-well plates, unless otherwise stated. After 18 h, medium was removed, and was replaced with 0.1 ml of fresh medium containing 5% WPLTs and SB431542 (10 μ M). Cells were incubated for a further 5 d, and relative viable cell number was measured using Cell Counting Kit-8. Results are expressed as means \pm S. D. of triplicate cultures.

Markx らにより PRP の有効性が報告されて以来、同因子は骨組織、及び、歯周組織再建手術に数多く用いられるようになってきた。しかしながら、最近になって PRP はこれらの処置に対し、必ずしも有効な効果を発揮しないと報告も認められる様になってきた。今回の我々の研究においても、PRP はヒト歯髄細胞に対し有意な増殖促進活性を示さなかった。この原因を解明するため、我々はまず、PRP から血小板成分と血漿成分とを分離し、歯周組織を構成する個々の細胞に対する作用を検討した。その結果、PRP から血漿成分を除去し、WPLT として作用させることにより、ヒト歯髄細胞に対する明らかな増殖促進効果が観察できた。また、同細胞における WPLT 誘導性の増殖促進活性は、乏血小板血漿(PPP)の添加により濃度依存的に抑制された。これは、血漿中に血小板中の増殖因子の効果を阻害する何らかの阻害因子が含まれている可能性を示唆するものである。従って、効率的で安定した結果が得られる PRP 療法を確立するためには、血漿中の増殖阻害因子を除去した、新たな血小板の調製方法を確立する必要があるものと考えられる。また、今後、個々の歯周組織細胞に対するこれら因子の適応量を厳密にコントロールできるような調製法の確率が望まれるが、現時点では、チェアサイドでの確にその量を規定できるような基準となる数値は見あたらない。従って、これらの点をより詳細に検討し、臨床応用への基礎データを集積することで、より安全で確実な歯髄組織再生療法を確立したい。

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 5 件)

- ① 菊地寛高, 高橋哲哉, 呉崇史, 杉山 僚, 須田朋代, 小林健二, 片山 直: 臨床分離 *Staphylococcus aureus* に対する水酸化カルシウムの抗菌活性の *in vitro* における評価. 日歯保存誌, 50 (1), 75-79. 2007.
- ② Kikuchi H, Duan J, Kobayashi K, Suda T, Satho M, Sugi Y, Katayama T and Nishikawa H : Inhibitory effects of platelet-rich plasma on osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. J Hard

Tissue Biol. 14(2), 98-100, 2006.

- ③ 段 建民、菊地寛高、須田朋代、佐藤 雅、田島雅道、坂上 宏、片山 直: ヒト歯髄細胞の PGE₂ 産生に対する多血小板血漿(platelet-rich plasma)及び洗浄血小板の作用、日本歯科保存学会誌 49 (3):426-434, 2006.
- ④ 須田朋代, 菊地寛高, 高山直士, 田島雅道, 佐藤 雅, 杉 祐紀, 矢島晃司, 嶋田 淳, 坂上 宏, 西川博文: マクロファージ活性化に対する多血小板血漿および洗浄血小板の効果. 日歯保存誌, 48,152-157, 2005.
- ⑤ 須田朋代, 菊地寛高, 田島雅道, 龍田恒康, 岩坂憲助, 片山 直, 歯界展望 増刊号『めざせ! 健・口・美—未来に向けた歯科医療—』2009

[学会発表] (計 3 件)

- ① 須田朋代, 岩坂憲助, 龍田恒康, 田島雅道, 坂上宏, 島田淳, 片山直. 自己由来増殖因子による歯髄細胞の増殖および分化誘導活性の解析. 日本歯科医学会総会 (横浜) 2008.
- ② 菊地寛高、須田朋代、高橋哲哉、呉崇史、杉山 僚、小林健二、片山 直、洗浄血小板抽出液によるヒト歯髄細胞のオステオカルシン発現の調節. 日本歯科保存学会総会 (大宮) 2007.
- ③ Tomoyo Suda, Hiroataka Kikuchi, and Tadashi Katayama. Effects of Washed Platelets on osteoclast differentiation. JADR. 2007

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田朋代 (SUDA TOMOYO)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号: 60226579

(2) 研究分担者

片山 直 (KATAYAMA TADASHI)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号: 10105596

田島雅道 (TAJIMA MASAMICHI)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号: 70130995

龍田恒康 (TATSUTA TSUNEYASU)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号: 40245163

岩坂憲助 (IAWSAKA KENSUKE)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号: 60424058

(3) 連携研究者 なし