

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591735

研究課題名(和文)壊死骨の再生促進に関する研究：自家成長因子を用いた骨再生促進とその臨床応用の開発

研究課題名(英文)The regenerative effect of autologous growth factors on necrotic bone.

研究代表者

橋本 淳一 (HASHIMOTO JUNICHI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：10359565

研究成果の概要(和文):

多血小板血漿 (PRP) と間葉系幹細胞 (MSC) とを用いた骨再生促進について研究した。In vitro における実験の結果、MSC の細胞増殖能は添加する PRP 量に比例して増加すること、および MSC の骨分化能は添加する PRP が高濃度でも低濃度でも低下し、 $125 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、 $62.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ の間が適切な添加量であることが示された。In vivo におけるラット大腿骨骨欠損モデルを用いた実験では、MSC 8×10^6 個に対して血小板 2×10^8 個移植することで良好な骨形成が得られた。

研究成果の概要(英文):

The aim of this study was to determine the appropriate concentration of platelet rich plasma (PRP) for a bone regeneration and evaluate the effect of PRP on MSCs. In in vitro study, we showed that PRP had a concentration-dependent effect on the cell proliferation. MSCs differentiated into osteoblasts with $125 \times 10^4 / \mu\text{l}$ and $62.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ of PRP. In in vivo study, adequate bone regeneration was observed using 8×10^6 of MSCs and 2×10^8 of platelet. PRP could be candidate for safe and useful activator in clinical application.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：筋・神経病学

1. 研究開始当初の背景

一般臨床において、骨折や骨折後の遷延治療、悪性腫瘍切除後の広範囲な骨欠損部に対して骨移植を行う場合がある。骨移植には自家骨移植、同種骨移植、人工骨移植等があり、これまで主に自家骨移植が用いられてきた。再生医療において「細胞」、細胞や成長因子を収容する「担体」、細胞の増殖と分化を促進する「成長因子」の 3 要素が重要である。

自家骨移植はこの 3 要素を満たす効果的な移植法であるが、採骨部の侵襲や採骨量が限られているという短所が挙げられる。同種骨移植や人工骨移植は採骨部の侵襲がなく移植量に制限がない利点はあるが、細胞と成長因子が含まれていないことや、感染などの安全面での問題がある。近年、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell:MSC) を用いた再生医療に関心が寄せられている。これまでに、

MSC は未分化な細胞でかつ自己複製能力をもつ細胞と定義され、1991年 Caplan によりラットの骨髄中に MSC が存在すること、1999年には Pittenger らによりヒトの骨髄中に MSC が存在することが証明された。MSC は生体外培養系で容易に増殖させることができ、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞、線維芽細胞および神経細胞など目的とする系列に意図的に分化させることも可能である。細胞培養にて増殖させた MSC 移植による骨再生の報告はこれまで多くなされている。しかし、MSC 単独移植での十分な骨形成の報告はなく、適切な担体と成長因子を組み合わせることで効果的に骨再生を行うことが多い。

多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) は血液を遠心分離することで血小板を抽出・濃縮し作製され、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor- β : TGF- β) 血管内皮細胞成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) インスリン様成長因子 1 (insulin like growth factor-1: IGF-1) 等の成長因子を含んでいる。顆粒が活性化されることで成長因子が放出され、放出された成長因子は腱の修復や創傷治癒、そして骨再生を促進すると考えられている。PRP は、自己血由来であるため感染症、免疫反応の心配がなく安全性が高いのみならず、簡便な方法で作製可能で安価であるという利点を有する。1998年に Marx らは下顎骨の骨欠損部に対して、自家骨移植に成長因子として PRP を用いることで良好な骨形成を得ており、Hokugo らはウサギの尺骨に 1cm の骨欠損を作製しゼラチンハイドロゲルに含浸させた PRP を移植することで良好な骨形成が得られたと報告している。PRP は歯科口腔外科領域ではすでに臨床応用もされているが、整形外科領域では十分な骨形成が得られていないとする報告もある。これらの報告では、使用する PRP の濃度や量はそれぞれ異なっており、MSC の骨形成への影響は十分検討されていない。MSC を用いた場合の再生骨の骨形成過程についても不明な点が多い。

2. 研究の目的

in vitro における実験にて MSC の増殖・骨分化能に対する PRP の適切な添加量について検討すること。さらに in vivo における実験においてラット大腿骨骨欠損モデルを作製し、効果的な骨再生促進のための PRP の使用方法について検討すること。

3. 研究の方法

(1) in vitro における実験

ラット MSC に異なる濃度の PRP を添加し MSC の細胞増殖能および骨分化能を調べた。細胞数はテトラゾリウム化合物を使用する

方法で測定し、骨分化能はアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase : ALP) 活性を測定し検討した。

・細胞分離・培養

ラット大腿骨骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた。基礎培地 -MEM (alpha minimum essential medium) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) 抗菌薬 (ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml) を添加したものを培地として使用した。Lewis 雄ラット (4週齢) に体重 100g 当たり塩酸ケタミン 6 mg、塩酸メドトミジン 0.04 mg を混合して腹腔内投与し麻酔を施行した。滅菌下に両側大腿骨を摘出し、骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞は細胞懸濁液を作製後に 100mm シャーレに播種し 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で培養を行った。

・PRP 作製

Lewis 雌ラット (8-10週齢) に麻酔を施行した。血液は開胸後に心穿刺を行い採取した。抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム液 (ACD-A 液) を 10% の割合で添加した。

PRP は遠心分離を 2 回行い作製した。まず、採取した血液を 500G、10 分間遠心分離した。1 回目の遠心分離後血液は血漿層、白血球層 (パフィーコート) 赤血球層の 3 層に分離後、上層の血漿成分からパフィーコート直上まで採取し、さらに 2840G、15 分間遠心分離を行った。2 回目の遠心分離後は上層に血小板の少ない血漿層 (platelet poor plasma: PPP) と下層の血小板の多い PRP 層に分離した。PPP を除去後作製された PRP を全自動血球測定器で測定した。血球測定後に除去した PPP を PRP に再度添加、混濁し PRP の血小板数を調整した。

作製した PRP の血小板を活性化するため塩化カルシウムとトロンピンを用いた。2% 塩化カルシウム液 5ml とトロンピン 5000 単位の混合液を作製し PRP に対して 10 : 1 の割合で混和し PRP の活性化を行った。

・細胞増殖能測定

MSC の細胞増殖能の検討を行った。第 2 継代 MSC (1×10^3 /ウェル) を 96 ウェルプレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で培養した。5 時間の細胞吸着期間後に PRP を各 10 μ l /ウェルの割合で添加した。添加する PRP 濃度は安定して作製できる PRP 濃度が 500×10^4 / μ l であったため 500×10^4 / μ l を最高濃度として用い、以下 250×10^4 / μ l、 125×10^4 / μ l、 62.5×10^4 / μ l、 31.25×10^4 / μ l と 15.63×10^4 / μ l の 6 群とした。コントロール群は PRP 無添加とし培養 1, 2, 3, 4, 5 日目の細胞数を測定した。

・骨分化能測定

MSC の骨分化能の検討を行った。骨分化能としての指標である ALP 活性を測定した。

第 2 継代 MSC (2×10^4 /ウェル) を 24 ウェルプレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で培養した。

5時間の細胞吸着期間後に PRP を各 $50\mu\text{l}$ / ウェルの割合で添加した。添加する PRP 濃度は $500\times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $250\times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $125\times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $62.5\times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $31.25\times 10^4/\mu\text{l}$ と $15.63\times 10^4/\mu\text{l}$ の 6 群とした。コントロール群は PRP 無添加とし培養後 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 日目に ALP 活性を測定した。培地交換は 2 日ごとに行った。

ALP の抽出は培養 2・4・6・8・10・12・14 日目に培地を除去し哺乳類細胞溶解/抽出用試薬を $200\mu\text{l}$ / ウェルの割合で添加、その後シェーカーを用いて 4 で 15 分間振盪し細胞を溶解した。溶解した細胞を 12000G で 15 分間遠心分離し、その上清を ALP 活性の測定に使用した。

(2) in vivo における実験

ラット大腿骨骨欠損モデルを作製し以下の通り行った。

i). MSC+PRP、MSC、PRP をそれぞれ移植し、骨再生の差異についての軟 X 線評価。). 再生骨の骨形成過程についての組織学的検討。

). 新生骨における移植 MSC の占有率についての免疫組織化学的検討。). 移植部の新生血管腔数の免疫組織化学的検討。

MSC は Lewis 雄ラット (4 週齢、体重 $95\pm 5.0\text{g}$) 58 匹より作製し、PRP は Lewis 雌ラット (8-10 週齢) より作製した。移植モデルは Lewis 雌ラット (8-10 週齢、体重 $197.6\pm 10.7\text{g}$) 72 匹を用いて作製した。

. 骨欠損モデル

Lewis 雌ラット (8-10 週齢) に麻酔を施行した。左大腿部に前外側進入路にて滅菌下に骨欠損部を作製した。外側広筋と大腿二頭筋を骨膜を温存しながら挙上し、高密度ポリエチレンプレート ($4\times 4\times 23\text{mm}$) を大腿骨に対してスクリュー 4 本で固定した後、さらに 34 ゲージ軟鋼線にてプレートと大腿骨を固定した。プレート固定後、左大腿骨に小型電動切削機を用いて 6mm の骨欠損部を作製した。4-0 ナイロン糸にて外側広筋と大腿二頭筋を縫合後に皮膚を縫合し閉創した。

MSC+PRP 移植群は添加する PRP 濃度を $500\times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $100\times 10^4/\mu\text{l}$ と $20\times 10^4/\mu\text{l}$ にして、それぞれ MSC+PRP(500) 群、MSC+PRP(100) 群と MSC+PRP(20) 群の 3 群を作製した。PRP 単独群、MSC 単独群、骨欠損のみのコントロール群の 3 群を加えて 6 群で移植実験を行った。

MSC+PRP 群の作製は、まず第 2 継代 MSC を 0.05% トリプシン / 0.53mM EDTA・4Na 処理しシャーレから剥離した。新鮮培地に懸濁した後 1100rpm 、3 分間の遠心分離により MSC を集めてペレット化した。遠心分離後に培地のみ除去後、ペレット化した MSC に新しい培地 0.5ml を加えて再懸濁し 8×10^6 個 / 0.5ml の細胞懸濁液を作製した。作製した細胞懸濁液に型コラーゲン (Cellmatrix®) 4ml を加

えさらに、異なる濃度の PRP $500\times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $100\times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $20\times 10^4/\mu\text{l}$ を $200\mu\text{l}$ を加え、MSC+PRP(500) 群、MSC+PRP(100) 群、MSC+PRP(20) 群とした。PRP を活性化するため 2% 塩化カルシウム液 5ml とトロンビン 5000 単位の混合液を $20\mu\text{l}$ ずつ添加した。12 ウェルプレートに 2ml / ウェルずつ分注し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で 30 分培養したのちに新鮮培地 2ml / ウェルを加えた。コラーゲンをプレートから剥離し、さらに一昼夜培養を行い移植実験に用いた。MSC 群の作製は同様に第 2 継代 MSC 8×10^6 個を 0.5ml の培地に再懸濁し、

型コラーゲン 4ml を加え 12 ウェルプレートに 2ml / ウェルずつ分注した。一昼夜培養後に移植実験に用いた。PRP 群の作製は型コラーゲン 4ml に PRP $100\times 10^4/\mu\text{l}$ を $200\mu\text{l}$ を加え、PRP を活性化するため 2% 塩化カルシウム液 5ml とトロンビン 5000 単位の混合液を $20\mu\text{l}$ 添加した。 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下に一昼夜培養し移植実験に用いた。

. 軟 X 線評価

骨形成を評価するために移植後 2, 4, 6, 8 週にて軟 X 線撮像を行った。麻酔を施行後に軟 X 線を 25kV 、 3mA 、30 秒で照射し撮像した軟 X 線写真は、画像処理ソフトを用いて骨欠損部に対する骨形成の割合を算出し定量的に評価した。

. 組織学的評価

移植後 2, 4, 6, 8 週にてラット左大腿骨を摘出した。麻酔施行後に 4% パラフォルムアルデヒド 50ml にて心筋灌流固定を行った。左大腿骨を摘出し 24 時間 4% パラフォルムアルデヒドでさらに固定を行い、その後 14% EDTA を用いて 2 週間脱灰を行った。脱灰後にパラフィン包埋し $5\mu\text{m}$ にて切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin: HE) 染色およびサフラン O 染色を行った。

. 免疫組織化学的評価

). 新生骨部での移植細胞の占有率評価

移植後 2, 4, 6, 8 週における MSC+PRP(100) 群および MSC 群の新生骨における移植細胞の占有率を検討するために蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization: FISH) を行った。ラット Y 染色体プローブを使用した。ラット Y 染色体プローブにジゴキシゲニン-11-dUTP 溶液を加え 15、90 分間保温しジゴキシゲニン標識プローブを作製した。ハイブリダイゼーションオープンを用いて 37°C で一昼夜ハイブリダイズを行った後に DAPI にて対比染色を施行し蛍光顕微鏡で観察した。新生骨骨基質と骨髄中において、細胞核 100 個に対する Y 染色体の陽性率を算出し移植細胞の占有率とした。

). 移植部における新生血管の評価

移植後 2 週、4 週における移植部の血管新生

について検討するため酵素抗体法を用いて免疫染色を行った。脱パラフィン後、抗原賦活化のためにプロテアーゼKにて6分間処理を行った。内在性ペルオキシダーゼ活性を除去するために0.3%過酸化水素にて30分間処理し、ブロッキング用血清を20分間反応させた後にPBSで100倍希釈した一次抗体PECAM-1を20分間反応させた。ビオチン標識二次抗体を滴下し30分間反応させた後にアビジン-ビオチン標識酵素複合体を滴下しさらに30分間反応させた。PBSで洗浄後ジアミノベンチジン過酸化水素水にて5分間基質発色させた後、ヘマトキシリンで核染色をおこない封入した。陰性対照は一次抗体にブロッキングペプチドを添加したものをを用いて染色した。光学顕微鏡を用いて200倍の拡大率で観察し、既存骨と骨欠損部の境界においてそれぞれ1視野ずつ計2視野中の血管腔数を測定した

(3) 統計学的処理

測定値は平均値±標準偏差値として表記した。統計処理にはFISH法による細胞占有率についてはStudent's t検定を用い、その他は一元配置分散分析およびScheffe法にて有意差検定を行った。5%未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) in vitroにおける実験

・細胞増殖能

培養開始後2日目では各群に有意差は認められなかった。培養開始後3日目以降、MSC数は添加するPRP量に比例して増加を認めた。培養開始後3日目のMSC数はPRP濃度が $500 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $40.2 \pm 8.6 \times 10^4/\text{ml}$ 、PRP濃度が $125 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $39.3 \pm 10.6 \times 10^4/\text{ml}$ 、PRP濃度が $15.63 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $23.2 \pm 6.2 \times 10^4/\text{ml}$ であり、コントロール群の $10.5 \pm 3.9 \times 10^4/\text{ml}$ と比べて有意な増加を認めた。培養開始後5日目のMSC数はPRP濃度 $500 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $92.6 \pm 22.9 \times 10^4/\text{ml}$ 、PRP濃度 $125 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $67.1 \pm 12.9 \times 10^4/\text{ml}$ 、PRP濃度 $15.63 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $50.9 \pm 8.3 \times 10^4/\text{ml}$ とコントロール群の $22.4 \pm 8.2 \times 10^4/\text{ml}$ と比べて有意に増加しており、PRP濃度 $500 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群はコントロール群の細胞数と比較して約3.8倍の細胞数増加であった。

・骨分化能

ALP活性は培養開始後4日目ではPRP濃度が $500 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群で $0.70 \pm 0.11 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $125 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群で $1.33 \pm 0.41 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $15.63 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群で $2.13 \pm 0.45 \times 10^{-2}$ units/ μl であった。コントロール群の $2.46 \pm 0.19 \times 10^{-2}$ units/ μl と比べて減少しておりALP活性はMSCに添加するPRP量に比例して低下してい

た。しかし、培養開始後8日目ではALP活性はPRP濃度が $500 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $2.50 \pm 0.48 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $125 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $3.11 \pm 1.02 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $62.5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $3.41 \pm 0.79 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $15.63 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $2.70 \pm 0.29 \times 10^{-2}$ units/ μl であり、コントロール群の $2.62 \pm 0.26 \times 10^{-2}$ units/ μl に比べて高値であった。培養開始後14日目ではALP活性はPRP濃度が $500 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $2.42 \pm 0.37 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $125 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $2.57 \pm 0.79 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $62.5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $2.64 \pm 0.57 \times 10^{-2}$ units/ μl 、PRP濃度が $15.63 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群では $2.29 \pm 0.29 \times 10^{-2}$ units/ μl であり、コントロール群の $2.01 \pm 0.09 \times 10^{-2}$ units/ μl より高値であった。

PRP添加後4日目ではALP活性はMSCに添加したPRP量に比例して減少する傾向があったが8日目以降では添加したPRP濃度が $125 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群と $62.5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 群においてALP活性は高値であった。

(2) in vivoにおける実験

・軟X線評価

移植後2週の骨形成率はMSC+PRP(100)群で $30.0 \pm 11.7\%$ でありMSC群の $8.8 \pm 4.1\%$ 、PRP群の $7.0 \pm 4.5\%$ 、コントロール群の $7.5 \pm 5.0\%$ に比べ増加していたが有意差は認められなかった。移植後6週の骨形成率はMSC+PRP(100)群で $37.5 \pm 12.5\%$ 、MSC群は $10.5 \pm 3.9\%$ 、PRP群は $11.8 \pm 7.3\%$ 、コントロール群は $14.0 \pm 6.9\%$ であった。移植後8週の骨形成率はMSC+PRP(100)群で $46.9 \pm 14.7\%$ とMSC群の $10.9 \pm 4.2\%$ 、PRP群の $12.5 \pm 6.9\%$ 、コントロール群の $18.5 \pm 8.2\%$ であり、移植後6週と8週ではコントロール群に比べMSC+PRP(100)群で有意な骨形成を認めた。

MSC+PRP(500)、MSC+PRP(100)、MSC+PRP(20)の3群では移植後4週の骨形成率がMSC+PRP(500)群で $7.6 \pm 4.5\%$ 、MSC+PRP(20)群で $6.6 \pm 2.9\%$ 、MSC+PRP(100)群で $31.2 \pm 9.5\%$ 、移植後8週の骨形成率はMSC+PRP(500)群で $9.9 \pm 5.4\%$ 、MSC+PRP(20)群で $10.0 \pm 7.7\%$ 、MSC+PRP(100)群で $46.9 \pm 14.7\%$ だった。MSC+PRP(100)群ではMSC+PRP(500)群、MSC+PRP(20)群と比べ有意な骨形成を認めた。

・組織学的評価

移植後2週のHE染色ではMSC+PRP(100)群、MSC群、PRP群ともに一部移植したコラーゲンゲルと思われるものが残存しており、多数のリンパ球を認めた。移植後4週ではMSC+PRP(100)群において、一部線維性骨が認められた。移植後8週ではMSC+PRP(100)群で新生骨部に層状骨と先端部に線維性骨を認めた。移植後8週ではMSC群、PRP群、コントロール群では骨欠損部の両端に骨梁形成を認めたが十分な量ではなかった。

サフラニンO染色ではスクリーホール付近には軟骨形成を認めたが新生骨部には軟骨形成は認められず、内軟骨性骨化は認められなかった。

・移植細胞の占有率の評価

新生骨部における移植MSCの占有率と占有部位について検討するため骨基質と骨髄それぞれに対してFISHを施行した。陽性コントロールは $71 \pm 4.77\%$ の陽性率であった。

骨基質におけるMSCの占有率は移植後2週ではMSC+PRP(100)群 $50.6 \pm 3.1\%$ 、MSC群 $54.7 \pm 1.2\%$ であった。移植後4週ではMSC+PRP(100)群 $43.7 \pm 2.4\%$ 、MSC群 $48 \pm 2.9\%$ であった。さらに移植後8週ではMSC+PRP(100)群 $19.7 \pm 2.4\%$ 、MSC群 $17.4 \pm 2.1\%$ と移植後経時的に占有率の低下を認められたが、2群間に有意差は認められなかった。

骨髄におけるMSCの占有率は移植後2週ではMSC+PRP(100)群 $56.3 \pm 4.0\%$ 、MSC群 $60.7 \pm 2.5\%$ であった。移植後4週ではMSC+PRP(100)群 $39.0 \pm 1.6\%$ 、MSC群 $36.3 \pm 2.6\%$ であった。移植後8週ではMSC+PRP(100)群 $3.5 \pm 1.7\%$ 、MSC群 $5.2 \pm 1.5\%$ と移植後8週ではほぼ消失していた。また、2群間に有意差は認められなかった。骨基質、骨髄ともにMSC+PRP(100)群とMSC群の移植細胞の占有率は経時的に減少しており、また2群間に有意差は認められなかった。

・移植部における血管新生評価

血管腔数は移植後2週ではMSC+PRP(100)群で 49.6 ± 1.52 個、PRP群で 47.0 ± 4.0 個であり、コントロール群の 30.7 ± 4.50 個と比べて有意な血管形成を認めた。さらに、移植後4週でもMSC+PRP(100)群では 85.0 ± 12.12 個、PRP群では 86.7 ± 4.7 個であり、コントロール群の 50.7 ± 7.2 個に比べ有意な血管形成を認めた。しかし、MSC群の血管腔数は移植後2週では 30.0 ± 11.3 個、4週では 56.0 ± 9.8 個であり、コントロール群と比べ有意差はなかった。

PRPの添加によりコントロール群に比べMSC+PRP(100)群、PRP群では有意な血管形成を認めたがMSC+PRP(100)群とPRP群においては2群間で有意差は認められなかった。

考察

本研究ではPRPのMSCに対する影響を検討するため、MSCに添加するPRP濃度を6群に分け、さらにPRP無添加のコントロール群と比較検討した。MSCの細胞数はPRP添加後培養3日目よりコントロール群に比べ有意に増加し、増殖能は添加するPRP量に依存して増加を認めた。一方、MSCのALP活性はPRP添加後4日目ではコントロールと比べて低値であり、添加したPRP量に比例してALP活性が低下する傾向があった。

今回 *in vitro* における実験で用いた PRP

$62.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群と $125 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群は MSC 2×10^4 個に対してそれぞれ 31.25×10^6 個、 62.5×10^6 個の血小板を含んでいる。本研究の結果から、良好な骨分化能のために添加する PRP 量は $500 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群や $15.63 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群を用いるより $62.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群、 $125 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群が有用であると考えられた。

本研究では、骨分化能について検討した *in vitro* における実験から良好な骨分化能が得られる PRP 濃度を $100 \times 10^4 / \mu\text{l}$ とし、*in vivo* における実験では MSC+PRP(100)群として移植実験を行った。さらに *in vitro* における実験の検証を行うために PRP 濃度 $500 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群に相当するものとして MSC+PRP(500)群、また PRP 濃度 $15.63 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群に相当するものとして MSC+PRP(20)群とし MSC+PRP(100)群とあわせて 3 群について移植実験を行った。移植後 8 週の骨形成率は MSC+PRP(20)群の 9.9%、MSC+PRP(500)群の 10.0% と比べて MSC+PRP(100)群では 46.9% であり骨形成に有意差を認めた。*in vitro* における実験で示された骨分化能に相当した骨形成が *in vivo* における実験でも示された。また、MSC+PRP(100)移植群、MSC 移植群、PRP 移植群、コントロール群では移植後 8 週の骨形成率が MSC+PRP(100)群で 46.9% と MSC 群の 10.9%、PRP 群の 12.5%、コントロール群の 18.5% に比べて有意に増加していた。MSC、PRP の単独移植では骨形成は得られなかったが、MSC と PRP を併用することで良好な骨形成が得られた。

移植した MSC の骨形成における役割について、本研究では移植細胞の生存率は低いことから移植細胞自体が分化し骨形成に寄与するよりも、PRP が移植した MSC を介して宿主側の前駆細胞を刺激することで骨形成を促進したことが考えられた。また血管新生について、PRP 単独では増生がみられたが MSC 単独ではみられなかった。しかし PRP 単独では骨形成がなかったことから、PRP と MSC 両者の存在が骨形成に必須と考えられた。

MSC 移植に添加する PRP 量は高濃度であれば有用なわけではなく、MSC 8×10^6 個に対して血小板数を 2×10^8 個として用いるのが効果的であった。本研究では MSC を用い、さらに血液より作製された PRP を成長因子として用いることで簡便で安全に細胞移植を行い骨形成を得ることができた。また、MSC に併用する至適な血小板数について明らかにしたことによって今後の臨床応用に際して有用な治療法になり得ると考えられる。

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 3 件)

Narita A, Takahara M, Ogino T,

Fukushima S, Kimura Y, Tabata Y, Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model, The Knee 16: 285-289, 2009, 査読有

成田 淳, 高原政利, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 田畑泰彦
ゼラチンハイドロゲルと線維芽細胞増殖因子を用いた半月板修復, 日本整形外科学会雑誌 29:119-127, 2009 査読有

Furukawa T, Ito K, Nuka S, Hashimoto J, Takei H, Takahara M, Ogino T
Absence of biglycan accelerates the degenerative process in mouse intervertebral disc, Spine 34:E911-917, 2009 査読有

[学会発表](計 8 件)

. Sato D, Takahara M, Narita A, Yamakawa J, Hashimoto J, Ogino T
The Effect of Platelet-rich Plasma on the Healing of Intrasynovial Flexor Tendons: In Vivo Study. 11th Triennial Congress of the International Federation of Societies for Surgery of Hand (Seoul/Korea), Oct 31-Nov 4, 2010

. Sato D, Takahara M, Narita A, Yamakawa J, Hashimoto J, Ogino T
The effect of platelet-rich plasma on the healing of intrasynovial flexor tendons: in vivo study
7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Society (Kyoto/Japan), Oct 16-20, 2010

. Yamakawa J, Hashimoto J, Takano M, Ogino T,
The bone regeneration using bone marrow derived mesenchymal stem cell with platelet-rich plasma in femoral segmental defect of rats.
56th annual meeting of the Orthopaedic Research Society (New Orleans/USA), March 6-9, 2010

. 佐藤大祐, 高原政利, 成田 淳, 山川淳一, 伊藤和生, 橋本淳一, 荻野利彦
屈筋腱損傷に対する PRP の影響: 器官培養での検討, 第 8 回日本再生医療学会(東京), 2009 年 3 月 5 日~3 月 6 日

. Narita A, Takahara M, Sato D, Ogino T, Fukushima S, Kimura Y, Tabata Y

Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model
The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (Las Vegas/USA), Feb 22-25, 2009

. 山川淳一, 橋本淳一, 荻野利彦
多血小板血漿を併用した骨髄間葉系幹細胞移植による骨再生, 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会(京都), 2008 年 10 月 23~10 月 24 日

. 橋本淳一, 武井 寛, 荻野利彦, 笹木勇人, 長谷川浩士
骨粗鬆症性椎体圧迫骨折後の脊柱後彎変形に対する後方進入脊椎短縮骨切り術・超高分子量ポリエチレンケーブルを用いた SSI 法・第 81 回日本整形外科学会学術総会(札幌), 2008 年 5 月 22 日~5 月 25 日

. 橋本淳一, 武井 寛, 笹木勇人, 石川和彦, 太田吉雄, 長谷川浩士, 千葉克司, 伊藤友一, 荻野利彦, 骨粗鬆症性椎体圧迫骨折後偽関節による遅発性下肢麻痺に対する後方進入脊椎短縮骨切り術・超高分子量ポリエチレンケーブルを用いた SSI 法・第 37 回日本脊椎脊髄病学会学術集会(東京), 2008 年 4 月 24 日~4 月 25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 淳一 (HASHIMOTO JUNICHI)
山形大学・医学部・講師
研究者番号: 10359565

(2) 研究分担者

高木 理彰 (TAKAGI MICHIAKI)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 40241707

菊地 憲明 (KIKUCHI NORIAKI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 90361261

渡邊 忠良 (WATANABE TADAYOSHI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 90422170

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 50211371

成田 淳 (NARITA ATSUSHI)
山形大学・医学部・医員
研究者番号: 60400579