

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18029

研究課題名(和文) アキレス腱損傷における多血小板フィブリンの影響とその分子学的メカニズムの解明

研究課題名(英文) The effects of platelet-rich fibrin on Achilles tendon injury and tenocytes

研究代表者

千賀 佳幸 (Senga, Yoshiyuki)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70828368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多血小板フィブリン(Platelet Rich Fibrin: PRF)は高濃度の成長因子を含んだフィブリン塊で、徐放性に優れるため様々な病態への治癒促進することが期待されている。我々はPRFのアキレス腱欠損に対する直接的な評価を動物モデルで行い、さらに腱修復に重要な役割を担うtenocyteに対する影響およびシグナル経路を特定することを目的に研究を行なった。結果、PRFはFGF受容体/Aktシグナルを介してtenocyteの増殖、TGF- β 受容体/Smad3を介してtenocyteを活性化させ、アキレス腱損傷治癒を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、PRFはアキレス腱損傷の治癒促進に有用であること、特にPRFに含まれるFGF受容体/Aktシグナルを介してtenocyteの増殖を促し、TGF- β 受容体/Smad3シグナルを介してtenocyteを活性化させるというアキレス腱損傷治癒のメカニズムを明らかにした。本研究によりPRFを直接アキレス腱損傷の治療に応用できる可能性や特に重要な成長因子であるFGFやTGF- β を腱損傷の治療に応用できる可能性が示唆されており、今後の新規治療法の開発への一助になったものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Platelet Rich Fibrin (PRF) is a fibrin mass containing high growth factors concentrations. It is expected to promote healing in various pathological conditions due to its sustained release properties. We evaluated PRF directly on Achilles tendon defects in an animal model. We aimed to identify its effect on tenocytes, which play an essential role in tendon repair, and the signaling pathways involved. We found that PRF promotes tenocyte proliferation via FGF receptor/Akt signaling and tenocyte activation via TGF- β receptor/Smad3 signaling to promote Achilles tendon injury healing.

研究分野：整形外科/スポーツ医学/膝・足の外科/再生医療

キーワード：多血小板フィブリン PRF アキレス腱 再生医療 成長因子 スポーツ外傷・障害 シグナル

1. 研究開始当初の背景

スポーツ外傷の代表であるアキレス腱断裂は、良好に治癒するものの数カ月には渡る長期間の安静期間を必要とし、早期社会復帰の観点からすると決して満足できる治療法が確立されていないわけではない。また、外傷や陳旧性断裂、初期治療がうまくいかなかった場合に生じるアキレス腱欠損は、現状では他の組織を犠牲にして再建する治療が一般的であり、完璧な機能を回復する治療方法は未だ確立されていない。アキレス腱断裂は保存的あるいは外科的治療を行うのが一般的であったが、近年、自己血液製剤を用いた生物学的アプローチの併用が注目されている。様々な自己血液製剤の中でも新しい多血小板フィブリン (Platelet Rich Fibrin: PRF) は患者血液を遠心分離して作成される。PRF は高濃度の血小板を含有したフィブリン塊であり、様々な成長因子(TGF- β , VEGF, PDGF, IGF 等)を含み、これらが様々な病態への治癒促進することが期待されている。実際に歯科領域では PRF の臨床応用が多数報告されている。一方で整形外科領域での臨床応用例は少なく、アキレス腱欠損に対する臨床応用の報告はない。さらに PRF が腱修復に及ぼす影響も基礎医学的文献を含め、ほとんど分かっていない。PRF は豊富な成長因子を含むだけでなく、固形物であり体内に投与すれば長期にわたり成長因子を提供する、つまり徐放能に優れている。そこでアキレス腱の欠損部位にこの PRF を投与することで、腱修復を促進するのではと思い、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

PRF のアキレス腱欠損に対する直接的な評価を動物モデルで行い、さらに腱修復に重要な役割を担う tenocyte に対する影響およびシグナル経路を特定することで、PRF の知見を深め、アキレス腱損傷患者への臨床応用に繋げることが最終的な目的である。

3. 研究の方法

本研究では、アキレス腱損傷の腱修復過程における PRF の役割を、

- 1) アキレス腱欠損モデルラットのアキレス腱修復に及ぼす影響 (in vivo)
- 2) tenocyte の増殖・遊走・細胞外マトリクス/MMP 産性能・遊走能に与える影響 (in vitro) に着目して検討する。さらに PRF 中に含まれる key となる成長因子・分子の同定を行う。

In vivo: アキレス腱断裂モデルラットを用いて、PRF が腱修復を促進するか評価する。

PRF の作成: ラットから心臓採血を行い、1.5ml チューブで遠心分離し(3000rpm 13分)、PRF を生成する。

8週齢の Fischer ラット雄を用いてアキレス腱欠損モデルを作成し、control 群と PRF 投与群に分けて評価を行う。

腱修復過程の病理学的評価

処置後 1・4・7・14・28・42・84 日目でアキレス腱を摘出し、腱修復の程度を病理学的に評価する。アキレス腱修復の病理学的評価は Bonar scale (細胞数、血管密度、コラーゲン・ムチン)を用いて行う。

Tenocyte の細胞数・増殖能の評価

PRF 投与群で tenocyte の細胞数が増加しているか、tenomodulin(tenocyte 特異的マーカー)の免疫染色を行い評価する。また tenocyte の増殖能については、Ki-67(増殖期マーカー)/tenomodulin の二重蛍光免疫組織染色を行い評価する。

アキレス腱の力学的特性の評価

処置後 14・28 日目でアキレス腱を摘出し、腱修復の程度を力学的特性の測定により評価する。力学的特性の評価項目には、破断強度・最大応力・伸長率・弾性率を用いる。

炎症性サイトカイン・コラーゲンの割合の評価

14・28 日目のアキレス腱を摘出し、DNA 及びタンパク質を抽出し、PCR/ウェスタンブロッティング法で collagen や fibronectin 等の細胞外マトリクスタンパク発現を評価する。また腱の治癒過程における I 型・III 型コラーゲンの経時的な局在変化を免疫組織染色で評価する。

運動能の評価

下肢運動機能の指標である Basso, Beattie, Bresnahan score (脊髄損傷モデルで用いられる下肢運動機能評価) を用いて運動能を評価する。

In vitro: PRF が tenocyte に及ぼす影響、およびそのシグナル経路を検討する。

腱修復過程の病理学的評価

PRF の徐放能を調べるため、ラットから採取した PRF と medium(DMEM) を混合し、冷蔵保存(4℃) で 1-35 日目まで保存し、その上澄み液を用いて、tenocyte の増殖に与える影響を検討した。Tenocyte の細胞数に最も影響を与えた 7 日目の PRF 検体を用いて、以下の実験を行う。

1) 細胞遊走能の評価

細胞の機能として重要な遊走能について Wound healing assay と Transwell migration assay (pore size 8µm) を行い、PRF 投与による遊走能の変化を評価する。Wound healing assay に関しては増殖の影響を除外するため mitomycin-C をスクラッチ前に投与する。

2) 細胞外マトリックス/MMP 産生能の評価

Control/PRF 投与群から RNA 抽出後に cDNA を合成し、RT-PCR 法で Collagen/fibronectin 等の細胞外マトリックスやタンパク分解酵素である MMP-2/9 の発現を評価する。同様にウェスタンブロッティング法でそれらのタンパク発現についても評価する。

3) 関与する分子の同定・シグナル解析

予備検討で、PRF が増殖に重要な働きを持つ Akt のリン酸化レベルを増加させること、Akt 阻害剤が PRF による tenocyte の細胞増殖効果を完全に抑制することを確認した。次のステップとして、Akt のリン酸化に関わる受容体について、成長因子に着目して検討を行う。具体的には、それぞれの成長因子の受容体阻害剤を用いて、PRF による Akt リン酸化が阻害できるか検討する。Akt リン酸化を抑制できる受容体が見つければ、増殖能・および遊走能に及ぼす影響も検討し、PRF の中で重要な成長因子・および受容体を同定する。

4. 研究成果

In vivo では PRF 投与群は control 群と比較し、組織学所見(Bonar score)・運動能(BBB score)・力学的特性が改善し、血管数(CD31)、リンパ管数(Lyve1)も増加した。また PRF 投与群は SCXA、Tenomodulin、collagen1 の産生が増加した。さらに組織中の tenocyte の細胞数/増殖能 (Ki-67 陽性 tenocyte)/コラーゲン 1 産生能(Collagen1 陽性 tenocyte) は PRF 投与群で増加した。これらの結果から PRF がアキレス腱欠損の治療を促進することを明らかにした。

In vitro では PRF は tenocyte の細胞数(MTS assay)、増殖能(Ki-67 染色)、遊走能(wound closure)を増加させ、α-SMA、Tenascin-C、Collagen I /III 発現も増加させた。また、PRF は FGF 受容体/Akt シグナルを介して tenocyte の増殖に、TGF-β 受容体/ Smad3 を介して活性化に関わることを見出した。また、実際に組織染色にて Ki-67/Akt 陽性細胞、Collagen1/Smad3 陽性細胞は PRF 群で増加していた。

上記の研究内容は国内外で発表し Orthopaedic Research Society(ORS)2021 で New Investigator Recognition Award、第 53 回日本結合組織学会学術大会で Young Investigator Award、2022 年度日本結合組織学会 International Travel Award を受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yoshiyuki Senga, Akinobu Nishimura, Akihiro Sudo
2. 発表標題 Platelet-rich Fibrin accelerates the Achilles tendon healing by promoting the proliferation of tenocytes via FGFR/Akt signaling
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiyuki Senga, Akinobu Nishimura, Akihiro Sudo
2. 発表標題 The effects of platelet-rich fibrin on tenocytes
3. 学会等名 American Academy of Orthopaedic Surgeons Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiyuki Senga, Akinobu Nishimura, Akihiro Sudo
2. 発表標題 Platelet-rich Fibrin accelerates the Achilles tendon healing by promoting the proliferation of tenocytes via FGFR/Akt signaling
3. 学会等名 1st Virtual European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiyuki Senga, Akinobu Nishimura, Akihiro Sudo
2. 発表標題 Platelet-rich fibrin accelerates the healing of Achilles tendon defect by promoting the proliferation and activation of tenocytes
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiyuki Senga, Akinobu Nishimura, Akihiro Sudo
2. 発表標題 Platelet-rich fibrin (PRF) accelerates the healing of Achilles tendon defect by promoting the proliferation and activation of tenocytes via FGFR/Akt signaling and TGF- /Smad3 signaling
3. 学会等名 American Academy of Orthopaedic Surgeons Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千賀佳幸、西村明展、須藤啓広
2. 発表標題 多血小板フィブリンはtenocyteの増殖と活性化を誘導しアキレス腱欠損の治癒を促進する
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千賀佳幸、西村明展、須藤啓広
2. 発表標題 多血小板フィブリンはtenocyteの増殖/活性化を誘導しアキレス腱欠損の治癒を促進する
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------