

令和 6 年 6 月 1 4 日現在

機関番号：3 2 6 2 0

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021 ~ 2023

課題番号：2 1 K 2 0 9 9 7

研究課題名（和文）多血小板血漿 (PRP) 点眼の角結膜上皮障害創傷治癒促進機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of accelerated corneal epithelial wound healing in keratoconjunctival epithelial disorders induced by platelet-rich plasma eye-drops.

研究代表者

奥村 雄一 (Okumura, Yuichi)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：8 0 9 0 7 3 6 1

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、冷蔵保存した多血小板血漿 (platelet-rich plasma, PRP) 点眼の安全性および有効性を明らかにした。PRP点眼は既存治療が奏効しない難治性角結膜上皮障害に対する新たな治療法として期待されている。一方で、冷蔵保存後のPRP点眼の安全性や有効性に関する報告はなく、臨床応用を阻んでいた。本研究では、冷蔵保存後のPRP点眼の無菌性を証明し、冷蔵保存後のPRPが血清よりも有意に高濃度の生理活性物質を含有することを示した。さらに、培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷モデルおよびマウス角膜上皮創傷モデルにて、冷蔵保存後のPRPが血清と比較して有意に創傷治癒を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRP点眼は既存の治療が奏効しない難治性角結膜上皮障害に対する新たな治療法として期待されている。一方で、患者がPRP点眼を利用する際には自宅等での冷蔵保存が必要となるが、今まで冷蔵保存後のPRP点眼の安全性や有効性に関する報告はなく、臨床応用を阻んでいた。本研究では、冷蔵保存したPRP点眼の安全性および有効性を明らかにした。本研究により、冷蔵保存したPRP点眼は、無菌性を維持した状態で角膜上皮障害の創傷治癒を促進することが明らかとなり、PRP点眼が難治性角結膜上皮障害に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。本研究はPRP点眼の臨床応用に向けた社会的意義のある橋渡しの研究であったと考える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to assess the efficacy and sterility of stored at 4 °C for 4 weeks platelet-rich plasma (PRP) eye-drops for corneal epithelial wound healing. There is an urgent need to develop effective therapeutic agents for keratoconjunctival epithelial disorders that do not respond to existing eye-drops. Here, the levels of different growth factors and active ingredients were examined during the storage of PRP eye-drops. Furthermore, the stability and sterility of PRP were investigated for future clinical use. None of the post-storage samples of PRP eye-drops showed a positive culture result for either bacteria or fungi. After storage, transforming growth factor (TGF)- α , epidermal growth factor (EGF), and fibronectin levels were significantly higher in PRP than in autologous serum (AS) eye-drops. In vitro and in vivo, PRP eye-drops stored for 4 weeks significantly promoted corneal wound healing compared with AS eye-drops.

研究分野：眼科学

キーワード：眼科 角結膜 角結膜上皮障害創傷治癒 多血小板血漿 platelet-rich plasma 創傷治癒 再生医療

1. 研究開始当初の背景

移植片対宿主病・角膜移植・シェーグレン症候群や重症ドライアイ等では、難治性の角結膜上皮障害を生じ、疼痛・視力低下・感染性角膜炎・角膜穿孔等を引き起こすことが問題となっている。この難治性角結膜上皮障害に対する治療は点眼療法が主体だが、既存の点眼薬では奏効しない難治性角結膜上皮障害が存在し、新規治療薬開発の必要性がある。

角結膜上皮障害に対する治療は、人工涙液の点眼から始まり、1990年代後半からは血清点眼が用いられるようになった。血清点眼は、transforming growth factor (TGF)- β 、epidermal growth factor (EGF)、ビタミン A 等の生理活性物質を多く含み、角結膜上皮障害に対して人工涙液よりも有効であることが示唆された (Tsubota K, Ophthalmology 1999)。しかし、この血清点眼でも改善しない難治性の角結膜上皮障害が多く存在する。そこで、2010年代より、血清点眼より多くの生理活性物質を含む多血小板血漿 (Platelet-rich plasma: PRP) が新たな点眼薬として注目されている (Kyoung MK, Jpn J Ophthalmol 2012)。

PRP は、自己の静脈血より作製する血小板を多く含有する血漿であり、血小板が活性化・崩壊する際に様々な生理活性物質を産生し、創傷治癒を促進する。PRP 治療は再生医療治療として、主に歯科領域や整形外科領域で提供されているが、眼科領域での使用は限られている。他科における PRP 治療は PRP 作製後すぐに使用されるが、PRP 点眼の眼科臨床応用では、冷蔵下で数週間保存し、点眼使用することが想定される。血清 (Autologous serum) 点眼においては冷蔵保存下での生理活性物質の安定性ならびに無菌性の検討が行われ、保存方法が示されている (Tsubota K, Br J Ophthalmol 1999) が、PRP 点眼においてはこのような検討はされておらず、明確な保存可能期間は確立していない。また、PRP 点眼の角結膜上皮障害に対する有効性に関する分子生物学的な検討もされていない。そのため、PRP 点眼の臨床応用において、保存期間における生理活性物質の安定性、無菌性ならびに PRP 点眼の角結膜上皮障害治癒メカニズムの解明が眼科臨床応用に向けた学術的課題である。

2. 研究の目的

本研究では、PRP 点眼の冷蔵保存可能期間の確立および、角膜上皮障害治癒促進メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) PRP 点眼と AS 点眼の作製

PRP の作製は、健康人から静脈血 20mL を採取し、MyCells PRP 作製キット (Kaylight Ltd, Ramat-Hasharon, Israel) を用いて 2,054G で 7 分間遠心分離し作製する。血清 (AS) の作製は、静脈血 20mL を採取し、500G で 20 分間遠心分離し作製する。その後マイクロフィルター (0.22 μ m) を通し、滅菌済み点眼用器にて 4℃ で保存する。

(2) 生理活性物質の定量化

作製直後、4℃ 保存 1 週間後、4℃ 保存 4 週間後の血清、PRP における TGF- β 1、EGF、Fibronectin の含有濃度を Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法で定量化する。

(3) PRP 点眼の無菌性試験

作製直後、4℃ 保存 4 週間後の血清、PRP を用いて、羊血液寒天/チョコレート寒天培地、サプロ-寒天培地、アネロコロンピア寒天培地、HK 半流動正培地による細菌培養検査を行い、冷蔵保存後の無菌性を調査する。

(4) マウス角膜上皮創傷モデルによる創傷治癒促進効果の検証 (*in vivo*)

角膜上皮を直径 2mm 剥離したマウス角膜上皮創傷モデルを作製し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、AS および PRP を 2 μ l ずつ 6 時間毎に点眼する。創傷面積は ImageJ で定量化し、角膜上皮創傷治癒促進効果を比較する。

(5) 培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷モデルによる創傷治癒促進効果の検証 (*in vitro*)

培養正常ヒト角膜上皮細胞 (ATCC, USA) を 96well プレートに 4×10^4 cells/well の密度で播種する。24 時間培養し 100% confluent になったところで、96-pin wound maker (Essen Bioscience, USA) により幅 700 μ m の均一な創傷を作成する。PBS、AS および PRP を基礎培地に添加し、培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷モデルを作成し、3 時間毎に写真撮影する。創傷面積は ImageJ で定量化し、角膜上皮創傷治癒促進効果を比較する。

4. 研究成果

(1) PRP 点眼と AS 点眼の生理活性物質の定量化

冷蔵保存 4 週間後の PRP 点眼と AS 点眼における TGF- β 1、EGF ならびに Fibronectin の含有量を ELISA 法で定量化した。TGF- β 1、EGF、Fibronectin のすべてにおいて、PRP 点眼の方が AS 点眼よりも有意に高値となった (TGF- β 1: 63.0 ± 22.4 ng/mL vs. 5.9 ± 2.9 ng/mL, EGF: 891.8 ± 1052.6 pg/mL vs. 108.0 ± 72.4 pg/mL, Fibronectin: 226.9 ± 30.0 μ g/mL vs. 54.7 ± 25.1 μ g/mL, それぞれ N=6, paired t-test, P < 0.001) (図 1 A, B, C)。

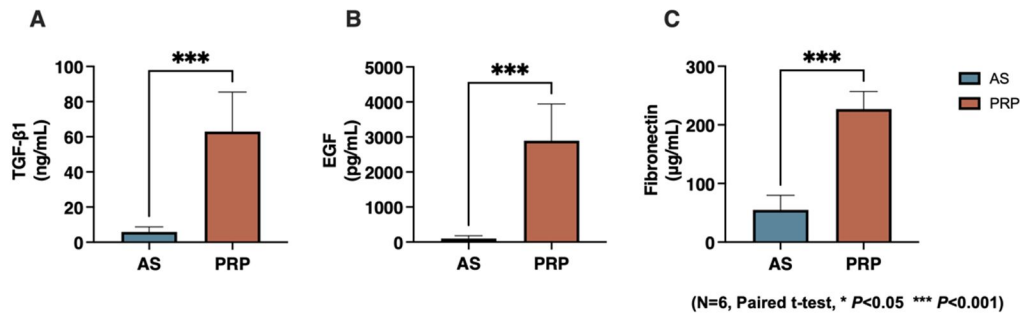


図1 4週保存後のPRP点眼における生理活性物質の含有量

(2) PRP点眼の無菌性評価

4で4週間保存したPRP点眼および血清点眼の細菌培養を実施し、無菌性を評価した。PRPおよび血清全てのサンプルから菌の検出はなかった(図2)。

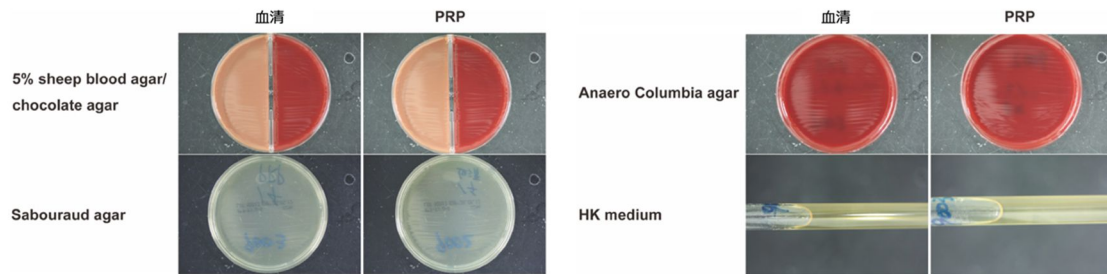


図2 4週保存後のPRPおよび血清における培養検査結果

(3) マウス角膜上皮創傷モデルによる創傷治癒促進効果の検証 (in vivo)

マウス角膜上皮創傷モデルを用い、冷蔵保存後のPRP点眼の角膜上皮創傷治癒促進効果を検証した。PBS点眼群、AS点眼群、PRP点眼群の各群における6時間毎の角膜創傷治癒過程の写真を図3Aに示す。角膜上皮創傷面積に関しては、点眼開始12、18、24時間後においてPRP点眼群でPBS点眼群と比較して有意に角膜上皮創傷面積の縮小を認め(N=5, one way ANOVA, それぞれ $p < 0.002$, $p < 0.002$, $p < 0.05$)、また、点眼開始12、18時間後において、PRP点眼群はAS点眼群と比較して有意に角膜上皮創傷面積の縮小を認めた(N=5, one way ANOVA, それぞれ $p = 0.013$, $p = 0.006$) (図3B)。また、PRP点眼群はPBS点眼群と比較し、有意に創傷治癒に要する時間を短縮した(PBS点眼群: 40.8 ± 2.7 時間, PRP点眼群: 33.6 ± 5.4 時間, N=6, One-way ANOVA, $P = 0.040$) (図3C)。

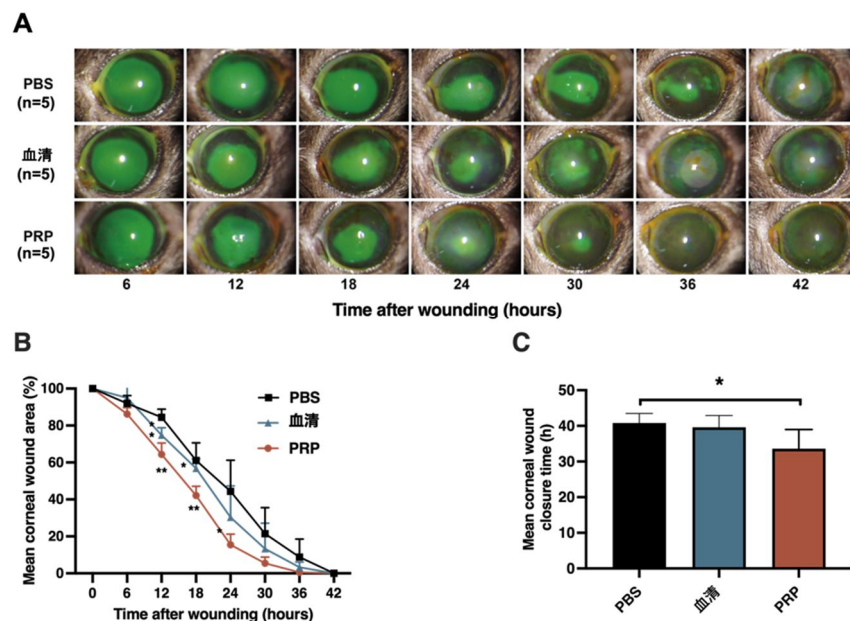


図3 4週保存後のPRP点眼の創傷治癒促進効果 (in vivo)

(4) 培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷モデルによる創傷治癒促進効果の検証 (in vitro)

培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷モデルを用い、冷蔵保存後の PRP 点眼の角膜上皮細胞創傷治癒促進効果を検証した。PBS 点眼群、AS 点眼群、PRP 点眼群の各群における培養正常ヒト角膜上皮細胞の創傷治癒過程（創傷作成直後、12 時間後、24 時間後）の写真を図 4A に示す。角膜上皮創傷面積に関して、PRP 点眼群は PBS 点眼群および AS 点眼群と比較し、有意に創傷面積を縮小した (N=6, One-way analysis of variance (ANOVA), とともに $P < 0.001$) (図 4B)。また、PRP 点眼群は PBS 点眼群および AS 点眼群と比較し、有意に創傷治癒に要する時間を短縮した (PBS 点眼群: 59.5 ± 1.2 時間, AS 点眼群: 28.0 ± 4.1 時間, PRP 点眼群: 20.5 ± 2.3 時間, それぞれ N=6, One-way ANOVA, とともに $P < 0.001$) (図 4C)。

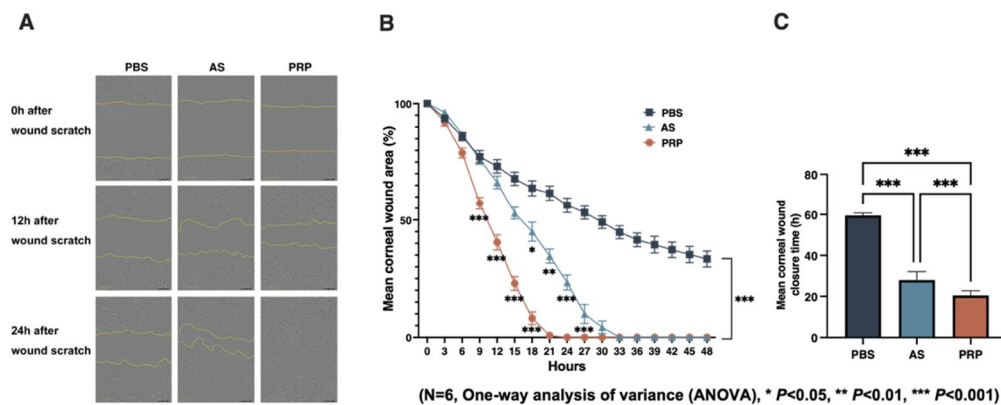


図 4 4 週保存後の PRP 点眼の創傷治癒促進効果 (*in vitro*)

以上の結果から、4 で 4 週間冷蔵保存した PRP は、無菌性を維持した状態で血清と比べて高濃度の生理活性物質を含有し、角結膜上皮障害の創傷治癒を促進することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okumura Yuichi, Inomata Takenori, Fujimoto Keiichi, Fujio Kenta, Zhu Jun, Yanagawa Ai, Shokirova Hurramhon, Saita Yoshitomo, Kobayashi Yohei, Nagao Masahi, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Biological effects of stored platelet-rich plasma eye-drops in corneal wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjo-2022-322068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥村雄一, 猪俣武範, 藤本啓一, 藤尾謙太, 柳川愛, 廣澤邦彦, 三浦真里亜, 桑原瑞, 赤崎安序, 村上晶
2. 発表標題 冷蔵保存した多血小板血漿点眼の角膜上皮創傷治癒促進効果の検討
3. 学会等名 フォーサム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村雄一, 猪俣武範, 藤本啓一, 藤尾謙太, 柳川愛, 廣澤邦彦, 三浦真里亜, 桑原瑞, 赤崎安序, 村上晶
2. 発表標題 ヒト角膜上皮細胞創傷モデルにおける多血小板血漿点眼と血清点眼の創傷治癒効果の比較
3. 学会等名 角膜カンファランス2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村雄一
2. 発表標題 マウス角膜上皮障害モデルを用いた多血小板血漿点眼と血清点眼による角膜上皮治癒解析
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村雄一
2. 発表標題 多血小板血漿点眼と血清点眼における4週間の冷蔵保存後の成分比較および無菌性の調査
3. 学会等名 角膜カンファランス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichi Okumura
2. 発表標題 The stability and sterility of platelet-rich plasma eye drops during storage.
3. 学会等名 The 7th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting
4. 発表年 2021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
---------	---------