

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16741

研究課題名（和文）半月板損傷における多血小板フィブリンの効果とその分子学的メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of Platelet-Rich Fibrin induced accelerated healing of meniscus injury

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） 3,500,000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の半月板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半月板細胞、滑膜幹細胞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Control群、FC群と比較して半月板損傷治癒を促進すること、FGF受容体/Aktシグナルを介して半月板細胞の増殖を活性化させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、PRFは半月板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シグナルを介して半月板細胞の増殖を促し、半月板損傷治癒を促進するというメカニズムを明らかにした。本研究によりPRFを直接半月板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を半月板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ている。

研究成果の概要（英文）：Platelet Rich Fibrin (PRF) is a mass of fibrin containing high concentrations of growth factors and is expected to promote healing in various pathological conditions due to its excellent sustained release properties. We aimed to directly evaluate PRF on meniscal defects in animal models and to identify its effects on meniscal cells and synovial stem cells, which play an important role in tendon repair, as well as its signalling pathways. We found that PRF promoted meniscal fine injury healing compared to the Control and FC groups and activated proliferation of meniscal cells via FGF receptor/Akt signalling.

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 半月板 再生医療 成長因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

半月板損傷は、代表的なスポーツ傷害の一つである。従来、半月板損傷に対する治療は半月板切除が一般的であったが、将来的に変形性関節症をきたす誘因になることが指摘され、現在では半月板をできる限り温存するために半月板縫合が主流となっている。本邦では半月板縫合時に少しでもその治癒率を向上させるために、患者から採取した血液を攪拌して簡単に作成可能な自己血液製剤のフィブリンクロット (FC) が臨床応用されているが、半月板は血流に乏しい組織であるが故に未だ癒合不全例や再断裂例が多い。そのため、現在、滑膜幹細胞移植を含む様々な新規治療法の開発が試みられているが、高度な技術を要する以外にも安全性/倫理問題などで一般の臨床応用には至っていない。そのため、より簡便で広く臨床応用できる有効な新規治療法の開発が模索されている。

自己血液製剤の中でも近年注目されている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する。PRF は FC よりも更に高濃度の血小板および種々の成長因子を含有したフィブリン塊であり、歯科領域ではすでに臨床応用されている。申請者は PRF がアキレス腱損傷の治癒を促進することを明らかにし、さらにその分子学的メカニズムを解明した。一方で、半月板損傷に対する PRF の効果は未だ明らかではなく、PRF が半月板修復に及ぼす影響は分子レベルではほとんど分かっていない。

PRF が半月板損傷修復に及ぼす影響を解明することで、将来的に半月板損傷に対して PRF を臨床応用するための基盤を築きたいと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

研究期間内に以下のことを明らかにする。

PRF が半月板損傷の組織修復に有用であるか

PRF が滑膜幹細胞および半月板細胞に与える影響とそのシグナル経路

半月板欠損モデルラットを用いて PRF の半月板損傷に対する直接的な効果を *in vivo* で評価し、PRF の滑膜幹細胞および半月板細胞に対する影響を *in vitro* で明らかにする。さらに、PRF に含まれる因子の中で key となる分子を同定する。本研究を通じて、PRF の知見を深め、最終的に半月板損傷患者への臨床応用に繋げることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、半月板損傷修復過程における PRF の役割を、

1) 半月板欠損モデルラットの半月板修復に及ぼす影響 (*in vivo*)

2) 滑膜幹細胞および半月板細胞の増殖・遊走・細胞外マトリクス産生・分化に与える影響に着目して検討し、さらに PRF 中に含まれる key となる分子の同定を行う (*in vitro*)。

in vivo : 12 週齢の Lewis ラット雄を用いて半月板欠損モデル (内側半月板の前方 1/2 を切除) を作成し、Control 群、FC 群、PRF 群に分けて、以下の項目について検討を行う。

PRF の作成 : 採取したラット血液を 1.5ml チューブで遠心分離し (3000rpm 13 分)、PRF を作成する。

病理学的・分子学的評価

MRI での画像評価に加え、術後 1・2・4・8・12 週目で半月板を摘出し、半月板修復の程度を Modified Pauli score を用いて病理学的に評価する。マクロ評価は、術後 4・8・12 週目で摘出した半月板の重量・面積測定に加え、Meniscus covering ratio を用いて行う。また組織学的に滑膜幹細胞/半月板細胞の細胞数を CD90 (滑膜幹細胞マーカー)/Collagen2 (半月板細胞マーカー) の免疫染色を行って評価し、更にトリイズンブルー・サフラニン染色を用いて軟骨化の評価を行う。これらに加え、半月板修復過程における滑膜幹細胞/半月板細胞の増殖/アポトーシス耐性についても評価を行う。具体的には Ki-67 (増殖期マーカー)/Tunnel 染色 (apoptosis マーカー) と CD90/Collagen2 の二重蛍光免疫組織染色を行い、それぞれの細胞での増殖能/アポトーシス耐性を評価する。更に採取した半月板から RNA およ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 collagen2 や Aggrecan (ACAN) 等の細胞外マトリクスおよび FGF/TGF- 等の成長因子の発現量を評価する。

運動能の評価

術後1・4日・1・2・4・8・12週目にラットをトレッドミルで6分間慣らし走行をさせた後(ショック電流0.20mA)、速度を10km/hから20km/hまで2分毎に2.5km/hずつ上げて、センサー反応回数およびセンサーON時間を測定する。また、ラット下肢運動機能評価であるBasso, Beattie, Bresnahan score (BBB score)でも評価を行う。

半月板の力学的特性の評価

術後4・8・12週目で半月板を摘出し、三重大学工学部の測定装置を用いて力学的特性の測定を行い、半月板修復の程度を評価する。評価項目には、破断強度・最大応力を用いる。

in vitro: ラット膝滑膜/半月板から培養した滑膜幹細胞/半月板細胞を用いて、PRFがそれらの細胞に及ぼす影響とそのシグナル経路を検討する。

増殖能・アポトーシス耐性の評価

MTS assay・Ki-67染色を用いてPRFが滑膜幹細胞/半月板細胞の増殖能に与える影響を評価する。さらにPRFが滑膜幹細胞/半月板細胞のアポトーシス耐性を強めるか評価するために、TNF- α でアポトーシスを誘導して評価を行う。

遊走能の評価

Wound healing assayを行い、PRF投与による滑膜幹細胞/半月板細胞の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。

細胞外マトリックス発現の評価

Control群/FC群/PRF群のCollagen2/ACAN等の細胞外マトリックスの発現をPCR/ウェスタンブロッティング法/蛍光染色法で評価する。

滑膜幹細胞から半月板細胞への分化能の評価

ラット膝滑膜から培養した滑膜幹細胞(CD90/CD29で確認)を用いて、軟骨分化誘導剤として知られているデキサメサゾン/TGF- β 3/アスコルビン酸/インスリン・トランスフェリン・セレン(ITS)を加えて軟骨分化を誘導し、PRFを追加したときの分化能を評価する。半月板細胞への分化マーカーにはSOX9/Collagen2を用いる。

関与する分子の同定・シグナル解析

上述のin vivo/in vitroの検討で明らかにした滑膜幹細胞および半月板細胞の働きに関与するシグナル経路を同定する。

4. 研究成果

in vivoでは術後8週/12週のマクロ評価で半月板の重量・面積、Meniscus regeneration ratioがPRF群ではControl群、FC群より有意に促進した。組織学的検討では半月板修復(細胞数、血管数、Modified Pauli score)が有意に促進し、運動能(BBB score)も有意に早期改善した。in vitroではPRF群はControl群、FC群と比較し半月板細胞及び滑膜幹細胞の増殖能(MTS assay/Ki-67染色)、遊走能(Wound healing assay)を有意に促進した。また蛍光染色法とウェスタンブロッティング法でPRF群はControl群、FC群より半月板細胞のCollagen1発現を有意に促進し、PRF群は滑膜幹細胞の半月板細胞への分化を促進した。さらにPRF投与により半月板細胞のAktのリン酸化レベルが増加し、PRFによる細胞増殖効果をAkt阻害剤およびFGF受容体阻害剤が有意に抑制した。以上より、PRFはFGF受容体/Aktシグナルを介して滑膜幹細胞及び半月板細胞の増殖を誘導し、半月板損傷の治癒を促進することが明らかとなった。

上記内容を国内・国際学会で発表し、Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2024ではMeniscus SectionのPodium Award Finalistに選出された。また、同研究内容にて三重県医師会の医学研究奨励賞を受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshiyuki Senga, Akinobu Nishimura, Yuki Fujikawa, Akihiro Sudo
2. 発表標題 The mechanism of Platelet-Rich Fibrin induced accelerated healing of meniscus injury
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2023(国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------