

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17270

研究課題名（和文）MRONJにフリーズドライ超濃縮PRPを応用した新規DDSの開発

研究課題名（英文）Development of new DDS applied freeze-dried platelet-rich plasma to MRONJ

研究代表者

古賀 喬充 (KOGA, Takamitsu)

長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：50779428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：FD-PRP徐放性ゼラチンハイドロゲルシートの作製技術を確立させ、ラット背部皮膚欠損モデルへの移植を行った。保持良好であった個体ではコントロールと比較し上皮化の促進が確認できたが、個体差もあり統計学的な有意差は認めなかった。またラットMRONJ発症モデルの作出を試みたが、すべての個体で発症を確認できず、MRONJ発症モデルにFD-PRP徐放性ゼラチンハイドロゲルシートの移植を行うには至らなかった。現在、FD-PRP徐放性ハイドロゲルシートの創傷治癒への有効性について、一部知見を得たことから、濃度設定に注目し詳細に検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではFD-PRP徐放性ゼラチンハイドロゲルシートをMRONJ治療薬として応用することを試みたが、現段階では疾患モデルへの移植を行うに至っておらず、有効性が確認できていない。ただし、FD-PRP徐放性ゼラチンハイドロゲルシートの作製技術の確立と、一部軟組織再生への有効性が示されたことから、難治性口腔粘膜疾患への応用が可能ではないかと考えられる。

研究成果の概要（英文）：FD-PRP controlled release gelatine hydrogel sheet was created and performed to transplant to rat back skin wound model. Promotion of the epithelization was observed in a part of FD-PRP transplant group, however there was no statistical significant difference in comparison with control group. Also we tried to create the rat MRONJ onset model. However the onset of MRONJ was not able to confirm in all individuals, it was not achieved that FD-PRP controlled release gelatine hydrogel sheet applied to MRONJ onset model.

We obtained some findings about efficacy of FD-PRP controlled release gelatine hydrogel sheet for wound healing, the density of FD-PRP was examined in detail.

研究分野：口腔外科

キーワード：多血小板血漿

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) は骨代謝制御作用を持つ薬物の副作用として発症し、口腔外科領域では近年、解決すべき重要な疾患となっている。MRONJ 発症の明確なメカニズムは解明されていないが、破骨細胞による骨吸収が抑制されることで、正常な骨代謝起点が破綻することが要因の一つと考えられている。顎骨壊死をきたした部位には血流が途絶えるため、全身薬物療法では十分な治療効果が得られずコントロールが極めて困難となることが多い。そのため創傷治癒を促進する薬剤を局所投与し血管新生を促すことで、全身薬物療法が奏功しやすい環境を整えることが効果的と考えられるが、口腔内は体表面と異なり唾液が存在する流動的な特殊環境であるため、一定期間局所にとどまり薬効を持続する治療法の開発は困難であった。

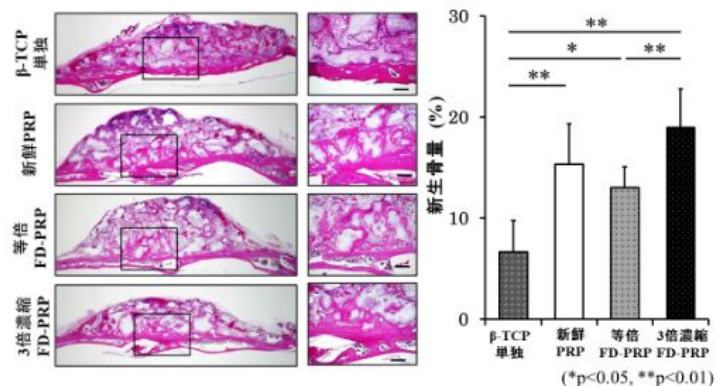
多血小板血漿 (PRP) による創傷治癒促進作用が明らかとなり、特に歯科領域や形成外科領域での臨床応用が進んでいる。申請者らはこれまでの研究で、フリーズドライ超濃縮多血小板血漿 (FD-PRP) の骨再生能を検討し、PRP をフリーズドライ保存しても即時調製した新鮮な PRP と同等の骨形成能を保持していることを明らかにした (特許公開番号: 2015-125916)。さらに、FD-PRP には再溶解する際に血小板濃縮液を調製できるという利点があり、3 倍に濃縮した FD-PRP では、等倍の FD-PRP と比較し有意に骨形成を促進することを示した。FD-PRP は口腔粘膜創傷治癒に対しても有効であるが、口腔内の特殊な環境の中で FD-PRP を局所に保持することは困難で、FD-PRP 応用における課題であると考えていた。

また、FD-PRP は細胞移植と異なり、成長因子を徐放することで組織修復を促進するため、徐放された細胞増殖因子の生物活性を体内で増強するためには、FD-PRP の長期徐放化技術と局所保持技術が必要不可欠である。

本研究では FD-PRP をゼラチンハイドロゲルと併用することでこれらの問題を解決し MRONJ の制御を試みている。

3倍濃縮FD-PRPは等倍FD-PRPより有意に骨形成を促進する

β-TCPに新鮮PRP、等倍FD-PRP、3倍濃縮FD-PRPを添加しヌードマウス頭蓋骨膜下に移植した結果、3倍濃縮FD-PRPを移植した群で新生骨量は最大となった。



2. 研究の目的

本研究は、FD-PRP を徐放担体に浸透させ MRONJ に伴う病的骨露出部に応用することで、血流改善、創傷治癒促進、感染制御を図る新規ドラッグデリバリーシステムを開発することを目的とした。

研究代表者らは PRP のフリーズドライ保存を実現し、それを基に調製した超濃縮 FD-PRP は、等倍 FD-PRP より優れた骨再生能をもつことを明らかにした。FD-PRP は密なフィブリンネットワークの形成により、持続的な成長因子徐放効果が期待できるが、本研究では、さらに徐放担体としてゼラチンハイドロゲルを応用することによって、FD-PRP の成長因子徐放効果を増強し、局所保持効果を付与することによって MRONJ 治療薬としての開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシートの作製

PRP の調整

ドナーの静脈から末梢血を採取し、真空採血管を専用の遠心分離機 (Medifuge MF 200; Silfradent) に設置し、遠心分離する。注射針を用いてパフィーコートおよび血小板層を抽出し PRP とした。PRP 作製前の末梢血と作製後の PRP について血球数を計測し、血小板濃縮率を算出し、骨再生促進効果に必要とされる 5 倍以上の血小板濃縮率となっていることを確認した。

FD-PRP の作製

PRP をエッペンチューブに分注し、-80 のディープフリーザーで 24 時間予備凍結を行った。凍結乾燥器を用いて -50 , 15Pa の条件で凍結乾燥を行ない、FD-PRP を得た。その後、FD-PRP を -20 で保存した。

FD-PRP の再構成

FD-PRP を滅菌水と混和し再構成を行った。滅菌水に混和する FD-PRP の量を変化させ、等倍、3 倍濃縮、5 倍濃縮の PRP を再構成した。

FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシート

再構成した PRP をゼラチンハイドロゲルシートに含浸させ、移植担体とした。

(2) ラット背部皮膚欠損部への FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシート移植

ラットの背部に 1cm² の皮膚欠損を形成し、以下のいずれかの群に振り分けた。

ゼラチンハイドロゲルシートのみ移植

ゼラチンハイドロゲルシート + FD-PRP の移植

移植なし（コントロール）

<評価方法>

組織学的評価：ヘマトキシリン・エオジン染色

マッソントリクローム染色（移植部位の線維化を評価）

免疫学的評価：vWF, CD31 免疫組織染色（血管新生を評価）

（3）ラット MRONJ 発症モデルの作出

MRONJ 発症モデルの作出では、8 週齢のラットに対してゾレドロネート（ビスフォスフォネート製剤）とシクロホスファミド（抗悪性腫瘍剤）を 20 週間投与し、12 週目以降に抜歯を行った。

4. 研究成果

（1）FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシートの作製

上記の方法に従い、FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシートを安定的に作製可能であることが分かった。

（2）ラット背部皮膚欠損部への FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシート移植

ゼラチンハイドロゲルシート + FD-PRP を移植した群で上皮化の促進を認めたものの、個体差が大きく、ゼラチンゲルシートのみを移植した群との統計学的有意差は得られなかった。一方、FD-PRP の濃縮倍率で効果を比較すると、5 倍濃縮までは濃度依存的に効果が増強する傾向が示された。

（3）ラット MRONJ 発症モデルの作出

すべての個体で発症を確認できず、MRONJ 発症モデルに FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシートの移植を行うには至らなかった。

（考察）

本研究では FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシートを MRONJ 治療薬として応用することを試みたが、現段階では疾患モデルへの移植を行うに至っておらず、有効性が確認できていない。ただし、FD-PRP 徐放性ゼラチンハイドロゲルシートの作製技術の確立と、一部軟組織再生への有効性が示されたことから、難治性口腔粘膜疾患への応用を期待できると考えている。

また PRP に含まれる白血球分画のプロテアーゼが血小板活性の低下を引き起こすことが報告されている。今後、白血球を除去した PRP を用いることにより、より高い組織再生作用を期待することができると考えている。さらに白血球を除去することで、免疫反応を抑制する効果も期待することができる。同種移植の可能性を検討することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----