

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09093

研究課題名(和文)凍結乾燥多血小板血症の薬理作用の解明と新規骨形成材料の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pharmacological action of the freeze-dried platelet-rich plasma and development of new bone-forming material

研究代表者

鈴木 昌彦(MASAHIKO, SUZUKI)

千葉大学・フロンティア医工学センター・教授

研究者番号：10312951

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)：Platelet Rich Plasma: PRPと凍結乾燥したfreeze-dried:fd PRPについて、長期保存後の薬理活性を評価した。PDGF, TGF- $\beta$ 1をELISA法により定量したがPRP作製直後と凍結乾燥約52週保存後もタンパク濃度が保たれていた。8週SDラットの脊椎固定術モデルを作成し材料を横突起間に移植した。Sham, 自家骨単独, 人工骨群, 人工骨+fdPRP(作成後52週間保存したもの), 人工骨+PRPで、術後8週で椎体を摘出し、HE染色で組織標本を評価した。凍結乾燥PRPでは組織学的にも自家骨群およびPRP群と有意差なく良好であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Platelet Rich Plasma: PRPと凍結乾燥したfreeze-dried:fd PRP(52週間保存後)の薬理活性はほぼ同程度だった。骨形成機能もBMPと同程度の効果があった。骨欠損のある患者で凍結乾燥したPRPが使用できれば臨床の現場で非常に有効である。今後は3-5年の長期保存の効果を明らかにするとともに、凍結乾燥PRPバンクの構築が実用化に向けて重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pharmacological activities of platelet rich plasma: PRP and freeze-dried: fd PRP were evaluated. ELISA tests of PDGF, FGF, and EGF showed similar concentrations in fresh PRP and 52 weeks saved PRP. Lumbar posterolateral fusion models were allocated to the sham, autologous graft, artificial bone-alone, artificial bone+fdPRP, artificial bone+PRP. Histological examination revealed similar good results in artificial bone+fdPRP and artificial bone+PRP.

研究分野：整形外科

キーワード：多血小板血漿 凍結乾燥 成長因子 platelet rich plasma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会では骨折および、不安定性の伴う変性疾患に対して行われる固定術において早期の迅速な骨癒合が非常に重要であり、ADL・QOL 回復に寄与し臨床上の大きな課題となっている。欧米で使用されている既存の BMP 製剤は、エビデンスの高い論文でも骨癒合促進効果は認められているが、その豊富な骨形成作用から、腫瘍化やその他の重篤な合併症が報告されている。骨形成の複合的なメカニズムを考慮すると、単一の成長因子の使用では、良質な骨形成や安全性の点で疑問視されている。より生理的で安全で良質な骨形成のためには多種の成長因子が複合的相互作用をしていく必要がある。その意味で、PRP は有利であり、骨癒合を含めた組織修復には極めて重要である。申請者のグループは、多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma: PRP) が骨融合促進作用を有することを先行研究で確認してきた (JBJS. Am. 2013, Sci. Rep. 2016)。また、ヒト臨床試験でも、脊椎固定術において約 2 ヶ月間骨癒合期間を短縮したことを確認し報告した (Kubota, et al. Spine J. 2017)。その一方で、臨床的には、高齢者や外傷を含む全ての患者の自己血由来 PRP を安定して調達することは困難である。研究代表者および研究分担を担うグループは、PRP を凍結乾燥させることで、その効果を維持したまま常温での長期保存が可能であること、また動物実験においても骨癒合促進効果があることを示した (Shiga, et al. Sci Rep. 2016, Asian Spine J. 2017)。この技術を応用すれば、事前に大量の PRP 製剤の準備が可能となることが期待できる。

#### 2. 研究の目的

新鮮多血小板血漿と凍結乾燥多血小板血漿の活性を分子生物学的に定量計測し長期保存後の薬理活性について評価する。製造後 52 週常温で保存した凍結乾燥血小板血漿の成長因子について動物実験を用いて有効性を検討する。また、血小板による骨修復の根源的メカニズムに基づくユニバーサルタイプのより高機能の凍結乾燥 PRP 製剤を開発し、その安全性・有効性の確認することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

PRP に含まれる成長因子のうち骨癒合促進能に関する PDGF (platelet-derived growth factor), Transforming Growth Factor 1 について、PRP, fdPRP 中の量を ELISA 法により定量した。さらに、osteoblasts を用いて各成長因子の下流のシグナルである MAP キナーゼ ERK の活性について western blotting によりリン酸化の有無を検出することでその活性を評価した。siRNA による RNA interference の手法を用いてノックダウン後に新鮮 PRP および fdPRP を投与、ERK 活性の抑制効果の検討をした。8 週 SD ラットの脊椎固定術モデルを作成し材料を横突起間に移植した。Sham, 自家骨単独, 人工骨 + PRP, 人工骨 + fdPRP (作成後 52 週間保存したもの), 人工骨 + BMP で、術後 8 週で椎体を摘出し、HE 染色での組織学的評価を施行した。

#### 4. 研究成果

PRP では、PDGF は  $24.1 \pm 8.3$  ng/mL に対し、52 週常温保存した fdPRP では  $20.2 \pm 11.9$  ng/mL だった。TGF 1 は PRP で  $552.3 \pm 459.8$  ng/mL に対して、 $493.6 \pm 311.5$  ng/mL だった。52 週常温保存後も fdPRP は PRP とほぼ同様の成長因子のタンパク濃度が保たれていた。 $1 \times 10^6$  個の Osteoblasts を PRP と 52 週常温保存した fdPRP で刺激し、対照群と比較して最大 1.8 倍の増殖が見られた。両方で platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), その下流に存在する extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化 活性化が western blotting で確認された。リン酸化の程度には両群に有意差は認められなかった。siRNA による RNAi の手法を用いてノックダウン後に新鮮 PRP および fdPRP を投与、ERK 活性の抑制効果の検討を行った結果、PDGFR ノックダウンは western blotting において PDGFR タンパク質の発現を著しく抑制した。

各濃度で骨芽細胞 PDGFR のノックダウンにより新鮮 PRP と fdPRP の両群で下流 ERK 活性化が減衰した。8 週令の SD ラット用いて骨移植した実験では、骨新生した領域全体でみると自家骨移植群では PRP, df-PRP 群より高かった。新生した骨梁の数は PRP, fd-PRP 群では自家骨移植群より高くなっていた。凍結乾燥多血小板血漿は作製後 1 年までの効化は確認できた。更に長期経過を検討する必要があるとともに iPS を用いたユニバーサルタイプの fd-PRP の検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kinoshita H, Orita S, Inage K, Fujimoto K, Shiga Y, Abe K, Inoue M, Norimoto M, Umimura T, Ishii T, Yonemoto T, Kamoda H, Tsukanishi T, Suzuki M, Hirosawa N, Akazawa T, Ohtori S.	4. 巻 Jan 14(1)
2. 論文標題 Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma Induces Osteoblast Proliferation via Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Mediated Signal Transduction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Spine J.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura J, Inoue T, Suguro T, Suzuki M, Sasho T, Hagiwara S, Akagi R, Orita S, Inage K, Akazawa T, Ohtori S	4. 巻 19
2. 論文標題 A comparative study of flat surface design and medial pivot design in posterior cruciate-retaining total knee arthroplasty: a matched pair cohort study of two years.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord.	6. 最初と最後の頁 234-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Kinoshita H, Orita S, Inage K, Yamauchi K, Abe K, Inoue M, Norimoto M, Umimura T, Eguchi Y, Fujimoto K, Shiga Y, Kanamoto H, Aoki Y, Furuya T, Suzuki M, Akazawa T, Takahashi K, Ohtori S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Skeletal Muscle Cell Oxidative Stress as a Possible Therapeutic Target in a Denervation-Induced Experimental Sarcopenic Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 446-455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/BRS.0000000000002891	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 -
1. 著者名 Kawarai Y, Orita S, Nakamura J, Miyamoto S, Suzuki M, Inage K, Hagiwara S, Suzuki T, Nakajima T, Akazawa T, Ohtori S	4. 巻 36
2. 論文標題 Changes in proinflammatory cytokines, neuropeptides, and microglia in an animal model of monosodium iodoacetate-induced hip osteoarthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2978-2986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24065.	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 折田純久 稲毛一秀 志賀康浩 阿部幸喜 井上雅寛 木下英福 乗本将暉 海村朋孝 古矢丈雄 牧聡 大鳥精司
2. 発表標題 OLIF手術における分節動脈損傷回避を担保するための画像的および解剖学的考察
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大鳥精司 久保田剛 志賀康浩 鴨田博人 山下正臣 折田純久 稲毛一秀 牧聡 古矢丈雄
2. 発表標題 多血小板血漿の腰椎後方椎体間固定術後の骨癒合に関する前向き研究
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木昌彦、中村順一、萩原茂雄、井上貴之、山本慶太郎、勝呂徹、大鳥精司
2. 発表標題 Future Knee人工関節の動態解析
3. 学会等名 第49回日本人工関節学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	大鳥 精司  (Ohtori Seiji)  (40361430)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	折田 純久  (Orita Sumihisa)  (60638310)	千葉大学・フロンティア医工学センター・教授    (12501)	

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