

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09595

研究課題名(和文)血小板マイクロパーティクル中の転写因子による抗炎症作用と歯周再生

研究課題名(英文) Possible anti-inflammatory effects of transcription factors contained in platelet microparticles and periodontal regeneration

研究代表者

川瀬 知之 (Kawase, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90191999

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)：CaCl<sub>2</sub>により活性化された血小板は、直径1ミクロン以下の微小顆粒を周囲に放出することを走査型電子顕微鏡のデータとして得た。このような形態学的所見を補強するため、フローサイトメーターによる特異的表面抗原の同定を試みたが、現有の機器では、debrisと明確に区別することができず、同定に至らなかった。

免疫蛍光染色法により、PPAR $\gamma$ が未刺激群では血小板内に局在するが、CaCl<sub>2</sub>刺激により細胞外スペースに拡散することを明らかにした。このようなPPAR $\gamma$ の局在変化は、血小板の顆粒に含まれるPDGFやTGF $\beta$ 1と同様の挙動を示したことから、活性化により微小顆粒として放出される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多血小板血漿(PRP)の組織再生能力は広く知られているが、抗炎症作用については、その実態が解明されていない。本研究によって、PPAR $\gamma$ が血小板中に含まれ、活性化刺激によって血小板外に放出される所見が得られたことは、組織再生機序を包括的に理解するうえで貴重な糸口となりうると確信する。

また、同じく研究途上にあるPRPの抗菌作用とともに、今後のPRP臨床応用に組織再生以外のあたらしい意義(治療効果)をもたらし、停滞気味のPRP研究の発展を加速させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Scanning electron microscopy demonstrated that when stimulated with 0.1% CaCl<sub>2</sub>, washed platelets released microparticles (MPs), of which diameter was 1  $\mu$ m or smaller, into extracellular spaces. To support this morphological data, we used flowcytometry (FCM) to detect specific surface antigens of MPs. However, our FCM failed to clearly distinguish such MPs from contaminated debris.

Immunofluorescent staining demonstrated that PPAR $\gamma$  was distributed in the cytoplasm of platelet in resting state and that the stimulation with CaCl<sub>2</sub> facilitated its release and diffusion to the extracellular spaces. This kind of change in distribution was very similar to representative growth factors, such as PDGF and TGF $\beta$ 1, contained in granules of platelets. Thus, it is suggested that PPAR $\gamma$  is released from platelets in a form of MP upon activation.

研究分野：再生医工学

キーワード：血小板 多血小板血漿 microparticle 抗炎症 PPAR 増殖因子 顆粒

### 1. 研究開始当初の背景

申請者の問いは「炎症性細胞や炎症性サイトカインを含む PCM がどのように抗炎症作用を示すのか?」ということである。

歯科の再生医療分野では、1990年代後半の Marx の発表(OOOOE, 1998;85:638-46)以来、PRP (platelet-rich plasma)などの血小板濃縮材料(PCM)が創傷治癒や組織再生に有効であるということから一躍注目を集めている。しかし、PCM が再生に大きく影響している炎症をどのように制御しているかについての研究は後回しのまま今日に至っている。

文献的には、2007年に El-Sharkawy ら(JOP, 2007;78:661-9)が LXA4 レベルの上昇を根拠として、PRP に抗炎症作用があることを報告しているくらいである。これと前後して、Anitua らは PRP 調製法を改良し、低速遠心で画分化したうえ、Buffy coat を採取しないことにより白血球を排除した PRGF を開発し、その優位性を訴えた(Pract Proced Aesthet Dent, 2001;13:487-93)。それに対して、多血小板フィブリン(PRF)の開発者 Choukroun らは、できるだけ多くの白血球(特に貪食細胞)を取り込むことによって、急性炎症後の組織ターンオーバーを優先することが創傷治癒を促進すると主張している(J Oral Implantol, 2014;40:679-89)。ただ、骨再生への効果が分かれるのは、このような白血球の濃縮度であり、炎症性サイトカインによる起炎活性の程度によるのではないかという根強い疑念がある。

一方、申請者らも確認しているが、「正常免疫マウスへのヒト PRP の貼付が皮膚創傷の炎症を抑え治癒を促進する」という生物学的常識と矛盾する現象を実験的に経験している。また、歯周再生治療の臨床において、PRP/PRF が局所の肉眼的炎症所見を顕著に改善することはしばしば報告されている通りである。

このような PCM の抗炎症活性について、これまでは①抗炎症性サイトカインの濃縮あるいは産生誘導という説明が支配的であったが、ごく最近の免疫学研究の発展から、②活性化血小板から放出される MP に含まれる転写因子 PPAR $\gamma$  の関与を示唆する結果が報告された(Lannan et al., Front Immunol 2015; 6:1)。すなわち、MP を取り込んだ単球が炎症性サイトカインの産生を顕著に低下させ、結果的に炎症を抑制するという説である。

骨代謝の観点から、炎症抑制自体は骨再生を促すものであるが、骨芽細胞前駆細胞に対して PPAR $\gamma$  は 2 系統の直接作用が指摘されている。Sun ら(Stem Cells 2013;31:2183)は、PPAR $\gamma$  が①幹細胞からの骨芽細胞への分化抑制とともに、②脂肪細胞への分化促進によって総合的に骨形成が抑制されると主張する。

局所投与した PCM が、その場に浸潤する免疫細胞や幹細胞に対して、転写因子である PPAR $\gamma$  を介して遺伝子レベルで影響を及ぼしているかという問いへの検証は、学術的のみならず臨治療戦略的な観点からも意義のあることである。

### 2. 研究の目的

PCM が血小板中の PPAR $\gamma$  を介して周辺の炎症性細胞や骨芽細胞の機能を制御している可能性を解明することである。

### 3. 研究の方法

研究計画の骨格は、第一に PRP 中の血小板が活性化に伴って MP を放出する現象を画像として可視化することであり、第二に PRP 中の白血球や幹細胞が MP を取り込む様子も形態学的に可視化することである。そのうえで、細胞の核内に PPAR $\gamma$  が取り込まれ活性化される可能性や、その結果誘導される炎症性サイトカインの放出や貪食作用などの細胞機能の抑制を生化学的に評価する。また、ノックダウンなどの遺伝子工学的技術が使えない無核のヒト血小板に対しては技術的に難しいが、中和抗体などにより抗炎症性サイトカイン自体、あるいはそれらの受容体をブロックすることで、PPAR $\gamma$  の作用の裏付けを得られるようにする。

以下に、研究の実験計画の根幹と方法を要約した。

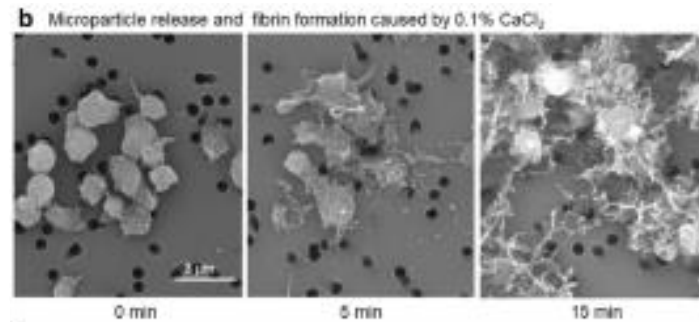
- (1) 活性化によって血小板が MP を放出し、そこに含まれると予想される PPAR $\gamma$  などの転写因子を可視化・定量: フローサイトメーター(FCM)・原子間力顕微鏡(AFM)・SEM・Westernblot・免疫蛍光染色・ELISA 等の方法を組み合わせ、多角的に証明する。比較対象として、抗炎症性サイトカインの IL-10 と TGF $\beta$ 1 なども ELISA にて定量する。
- (2) 白血球や間葉系幹細胞・骨芽細胞前駆細胞などが MP あるいは転写因子を取り込む様子や核内移動を可視化: (1)と同様に複数の方法で多角的に証明する。
- (3) 白血球の炎症性あるいは抗炎症性サイトカインの産生と貪食能に及ぼす影響の評価: 各種

サイトカインレベルを ELISA や FCM により，貪食能は蛍光ビーズ法により検証する．

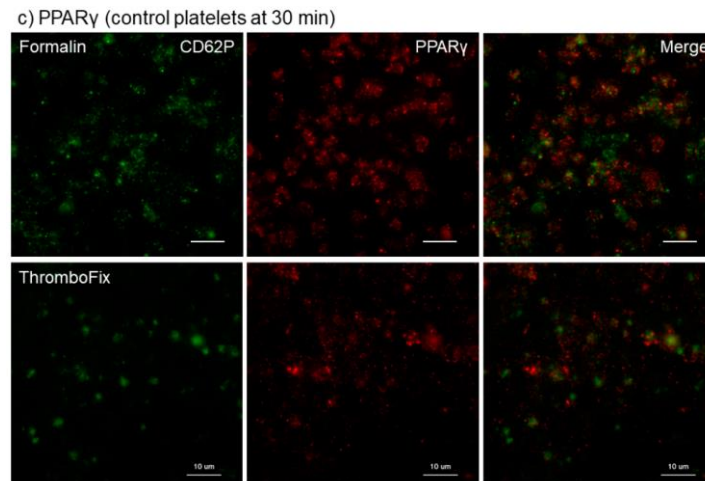
- (4) 間葉系幹細胞の分化誘導に及ぼす影響の評価：骨芽細胞のマーカーである **alkaline phosphatase**・**Osteocalcin**・転写因子 **Runx2** の発現や脂肪細胞のマーカーである脂肪滴を指標として検証する．

#### 4. 研究成果

- (1) **microparticle (MP)**の放出現象の確立と可視化：血小板の活性化に伴う **MP** の放出現象の確立と可視化を第一の目標として取り組んだ．従来は，活性化血小板からの  $\alpha$  顆粒等の放出は透過型電子顕微鏡(TEM)において観察されてきた．しかし，諸般の事情から，走査型電子顕微鏡(SEM)での観察を可能にする条件の最適化を試みた．血漿タンパクを適度に除去できる SEM 試料調製用特殊フィルターを用いて，0.01%  $\text{CaCl}_2$  で血小板を 10 分間程度刺激してところで水分を吸引し血小板をグルタルアルデヒドで固定すると，再現性よく **MP** を SEM で観察できた(下図)．

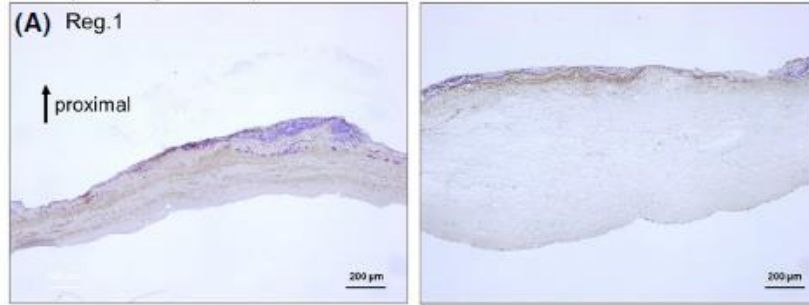


- (2) 洗浄血小板中からの増殖因子放出の可視化：血小板のマーカーともいえる増殖因子(TGF $\beta$ 1, PDGF)は  $\alpha$  顆粒中に貯蔵されていて，活性化に応じて血小板の外に放出される．**MP** と **PPAR $\gamma$**  の局在が一致しているかどうか明らかにすることを目的として検討を重ねたが，結論を得るまでには至っていない．免疫蛍光染色(IF)による継時的な観察の結果から，これらの増殖因子は活性化によって血小板から放出され **MP** 中にとどまってない可能性が高いことが示唆された (下図)．

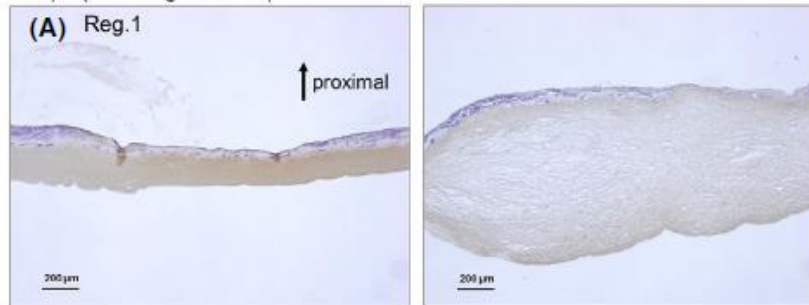


- (3) **PRF** 中の血小板と増殖因子放出の可視化：並行して **PRF** 中の血小板の局在をパラフィン切片に対して抗 **CD41** 抗体を用いて可視化するプロトコールを確立した．低速遠心にて調製する **A-PRF** の場合，血小板は広範囲にびまん性に局在していたのに対して，比較的高速遠心にて調製する **CGF** の場合，血小板は遠心力がかかる採血管との接触面に集中して局在するという所見を得た(下図)．

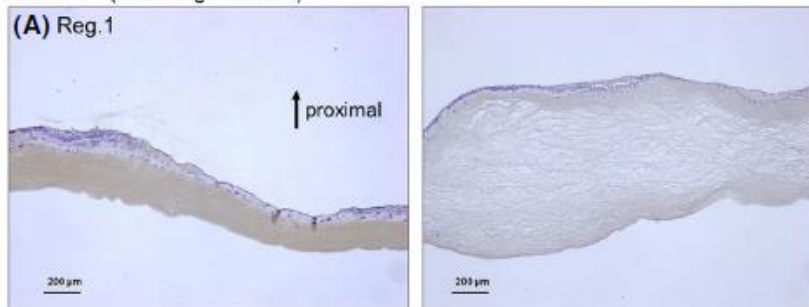
CD41 (Low magnification)



TGFβ1 (Low magnification)

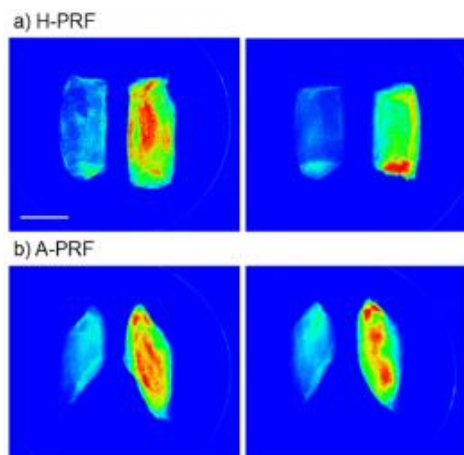


PDGF-BB (Low magnification)



- (4) 調製した PRF 内部における血小板ならびに活性血小板, さらに増殖因子と PPAR $\gamma$  の局在について, 近赤外線イメージャーを用いて可視化を試みた.

特異性の高いモノクローナル抗体が入手可能な CD41 と CD62P について, その局在を非破壊的に 2 次元イメージとして可視化することができた(下図). PRF の調製プロトコルによって, 血小板の局在に相違が認められ, これは免疫組織化学的所見と一致するものであった.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuji no T, Takahashi A, Isobe, K, Kitamura Y, Okuda K, Nakata K, Kawase T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Platelet adhesion on commercially pure titanium plates in vitro II. Immunofluorescence visualization of PDGF-B, TGF 1, and PPAR released from activated, adherent platelets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/dj7040109	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 -

1. 著者名 Takahashi A, Tsujino T, Yamaguchi S, Isobe K, Watanabe T, Kitamura Y, Okuda K, Nakata K, Kawase T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution of platelets, TGF 1, PDGF-BB, VEGF, MMP9 and fibronectin in advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) and concentrated growth factors (CGF) matrices.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Clinical Dentistry	6. 最初と最後の頁 e12458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jicd.12458	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 Takahashi A, Takahashi S, Tsujino T, Isobe K, Watanabe T, Kitamura Y, Watanabe Tk, Nakata K, Kawase T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Platelet adhesion on commercially pure titanium plates in vitro I. Effects of plasma components and involvement of the von Willebrand factor and fibronectin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40729-019-0160-z	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 -

1. 著者名 5) Toyoda H, Isobe K, Tsujino T, Koyata Y, Ohyagi F, Watanabe T, Nakamura M, Kitamura Y, Okudera H, Nakata K, Kawase T	4. 巻 4
2. 論文標題 Direct activation of platelets by addition of CaCl2 leads coagulation of platelet-rich plasma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40729-018-0134-6	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 -

1. 著者名 1) Nakamura M, Aizawa H, Kawabata H, Sato A, Watanabe T, Isobe K, Kitamura Y, Tanaka T, Kawase T	4. 巻 6
2. 論文標題 Platelet adhesion on commercially pure titanium plates in vitro III: effects of calcium phosphate-blasting on titanium plate biocompatibility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry	6. 最初と最後の頁 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40729-020-00270-2	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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kitamura Y, Takahashi A, Isobe K, Tsujino T, Watanabe T, Kawase T.
2. 発表標題 Platelet adhesion on commercially pure titanium plates in vitro: effects of plasma components and involvement of the von Willebrand factor and fibronectin.
3. 学会等名 Academy of Osseointegration 2020 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 璋, 川瀬知之, 高橋章太郎.
2. 発表標題 In vitro における血小板の平坦純チタン表面への接着: 血漿成分の影響およびvonWillebrand factorとfibronectin の関与.
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻野哲弘, 川端秀男, 北村 豊, 佐藤 篤, 磯邊和重, 山口貞博, 奥寺 元, 川瀬知之
2. 発表標題 多血小板フィブリン基質中の血小板分布に関する免疫組織化学的研究: 遠心条件と採血管の影響.
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村雅之, 山口貞博, 磯邊和重, 渡辺泰典, 辻野哲弘, 増木英郎, 奥寺 元, 川瀬知之
2. 発表標題 CaCl <sub>2</sub> 添加によるPRPのゲル化における血小板直接活性化の関与.
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第38回関東・甲信越支部学術大会
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

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