

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591863

研究課題名(和文)血小板を用いた縫合不全をゼロにする手技の開発研究

研究課題名(英文)Development of new technique using platelet for prevention of anastomotic leakage

研究代表者

寺島 秀夫(Terashima, Hideo)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10361338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多血小板血漿(PRP)が消化管吻合部の創傷治癒を促進するメカニズムの解明を行った。ヒトPRPはヒト大腸線維芽細胞に対して細胞増殖促進効果を発揮するが、その効果は高濃度になると鈍化した(所謂“天井効果”)。コラーゲン産生は、共培養上清中コラーゲンの濃度を増加させたが、個々の線維芽細胞に対する産生能増強ではなく、細胞増殖の強化に起因していることが示唆された。また、ヒトPRPはコラーゲン産生時期を前倒しできず、その産生をほとんど刺激しなかった。ヒト大腸線維芽細胞に対するヒトPRPの主要効果は細胞増殖促進作用にあり、その結果としてコラーゲン産生量を増加させると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate how human platelet rich plasma (PRP) enhances intestinal anastomotic healing. In the in vitro setting, human PRP exerted the cell growth-promoting effect on human colonic fibroblasts, however its effect was reduced in high concentration (so-called “ceiling effect”). In terms of collagen production, human PRP increased the collagen type I concentration in the co-culture supernatant, which might be induced by promoting proliferation of human colonic fibroblasts but not enhancement of each cell's ability to produce collagen. In other words, human PRP could not accelerate collagen production, and hardly stimulated collagen production. The main effect of human PRP on human colonic fibroblasts appeared to be the cell growth-promoting action, thereby allowing for increased production of collagen.

研究分野：消化器外科学

キーワード：外科総論 創傷治癒 消化管吻合 PRP 線維芽細胞 Collagen

### 1. 研究開始当初の背景

消化管手術後の吻合部縫合不全は、外科医が最も注意を払う合併症の一つである。なぜならば、縫合不全は致命的となるリスクが非常に高く、さらに消化管悪性腫瘍手術後に発生した場合、短期的予後のみならず長期的予後を悪化させる。縫合不全が手術後の mortality, morbidity の双方に対して最大級の悪影響を与え、巨視的には医療経済にも悪影響を及ぼすことになる。

現況として、消化管の吻合を行う手術手技ならびにデバイス（縫合糸、手術器械）はほぼ完成の域に到達しているため、縫合不全の発生率はプラトーを示しており、これ以上の減少を期待することができない。故に、消化管手術の領域においては、消化管吻合部の縫合不全ゼロを達成する新機軸の治療法開発が時代的要請であることは論を待たない。

そこで、私どもが着目したのは多血小板血漿(platelet rich plasma: 以下, PRP)である。しかしながら、消化管吻合部に対する PRP の創傷治癒促進効果が controversial な状況にあり、相反する研究結果が混在していたため、先ず、その原因の検索に取り組んだ。その結果、PRP には至適な血小板濃度が存在し、最大効果が得られる濃度を超えると創傷治癒が逆に抑制される“Bimodal effect”を明らかにした (J Surg Res 2012; 173:258-266)。

### 2. 研究の目的

本研究では、最大効果を得る血小板濃度を明らかにし、PRP の創傷治癒促進効果とそのメカニズムを解明することで PRP の創傷治癒促進効果とそのメカニズムを解明し、縫合不全率の高い悪条件下でも縫合不全をゼロにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)異なる濃度のヒト PRP に含まれる growth factor

ヒト PRP・洗浄血小板作成方法

ヒト血液と Acid citrate dextrose 液を 4:1 で混和し 1200rpm 24 10 分で遠心分離させる。遠心分離物は 3 層に分かれ、上 2 層を再度 1000 Xg 24 15 分で遠心する。上清をヒト乏血小板血漿(platelet poor plasma: 以下ヒト PPP)とし、上清を除いたものをヒト PRP とした。ヒト PRP 中に含まれる血小板数を計測し、ヒト PRP はヒト PPP を用いて  $5 \times 10^9$ /ml と濃度を調整した。作成した PRP を citrate buffer で洗浄し 1000Xg 24 15 分遠心を 2 度施行したものを洗浄血小板とした。

ヒト PRP 中の growth factor

ヒト PRP ( $5 \times 10^9$  個/ml) を 0~10% の各濃度に調整し、それぞれに含まれる TGF- $\beta$ 1 および PDGF-BB を測定する。TGF- 1 および

PDGF-BB は細胞増殖およびマトリックスマデリングを調節していると報告されているため (J Cell Biol 1989; 109:429-440), この 2 種を選択した。また、PPP においても検討した。

(2)ヒト大腸線維芽細胞株に対するヒト PRP の細胞増殖促進効果及びコラーゲン産生促進効果

ヒト大腸線維芽細胞株 CCD18Co を異なる濃度のヒト PRP と共培養し細胞増殖促進効果を検討した。共培養 24 時間後の DNA 合成能・細胞増殖能を WST-8・BrdU を用い検討し、共培養 1 時間後の細胞内増殖シグナルを Western blot 法を用いて測定した。

CCD18Co を異なる濃度の洗浄血小板と共培養し、共培養 72 時間後の細胞増殖促進効果を WST-8 を用いて検討した。

CCD18Co とヒト PRP(1%) を共培養し 24 時間後と 48 時間後の上清中に含まれるコラーゲン type I の濃度を検討した。

CCD18Co と 0~2% ヒト PRP を共培養し 72 時間後の上清中に含まれるコラーゲン type I 濃度を測定した。またその時点の細胞数を WST-8 で評価し、上清中のコラーゲン type I / WST-8 を検討した。

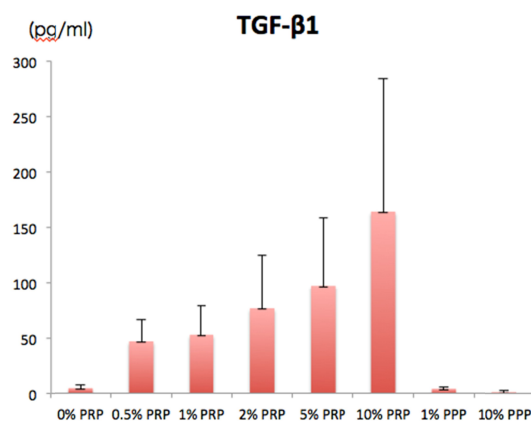
CCD18Co とヒト PRP を共培養し 24 時間後のコラーゲン type I mRNA(COL1A1)を測定した。

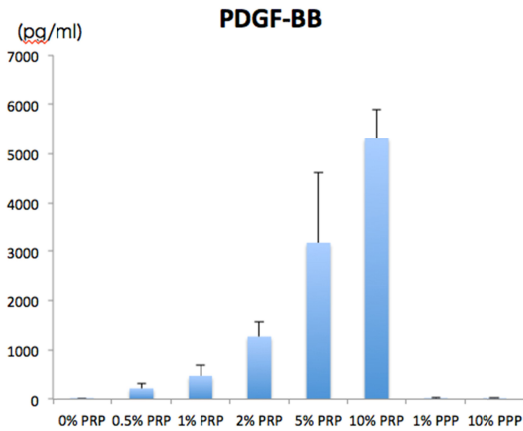
### 4. 研究成果

(1)ヒト PRP 中の成長因子

ヒト PRP およびヒト PPP を異なる濃度に調整し、Transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 1 および Platelet-derived growth factor (PDGF) -BB の濃度を測定するとヒト PRP の濃度増加に伴い各成長因子の濃度は増加した。その一方で、PPP は成長因子を含んでおらず、PPP 濃度による増加は認めなかった。(Figure1)。

Figure1 PRP, PPP に含まれる成長因子





(2)ヒト大腸線維芽細胞株に対するヒト PRP の細胞増殖促進効果及びコラーゲン産生促進効果

共培養 24 時間後における細胞増殖促進効果および細胞内増殖シグナル伝達

ヒト大腸線維芽細胞株である CCD18Co とヒト PRP 共培養 24 時間後の DNA 合成能を BrdU によって評価したところ、ヒト PRP の濃度依存性に増加していた (Figure 2)。一方、共培養 1 時間後において Western blot 法による細胞シグナル伝達の検討では、ヒト PRP 濃度依存性に AKT 経路および ERK 経路のリン酸化を認めた (Figure 3)。WST-8 を用いてヒト PRP の細胞増殖促進効果の評価してみると、濃度依存性であるが、5%濃度で plateau に達する傾向が認められた (Figure 4)。

Figure 2 CCD19Co に対するヒト PRP の細胞増殖促進効果 (BrdU)

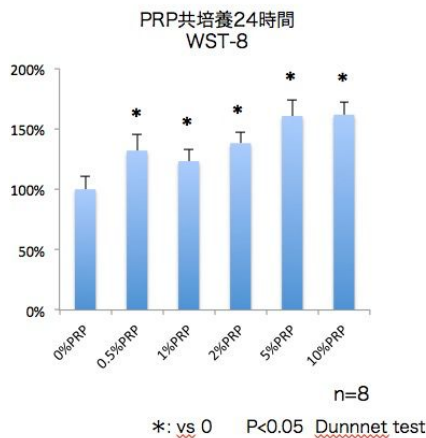
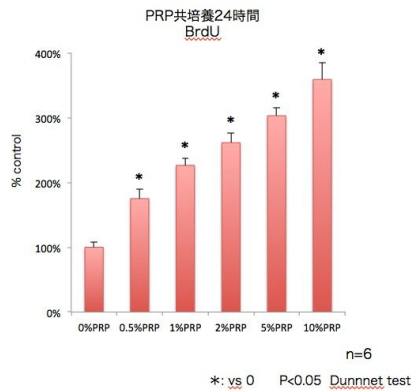
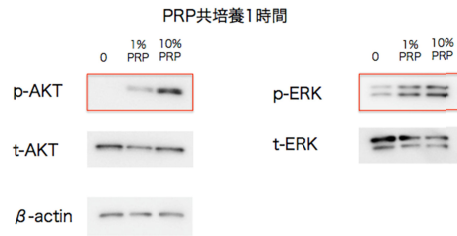


Figure 3 CCD18Co に対するヒト PRP の細胞増殖促進効果 (Western blot)

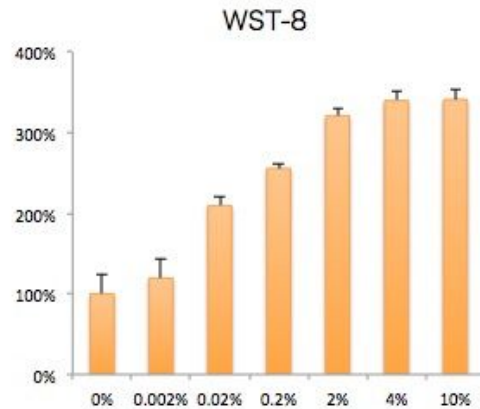


共培養 72 時間後における細胞増殖促進効果

洗浄血小板を用いて CCD18Co と共培養 72 時間行ったところ、線維芽細胞の増殖促進作用には“天井効果 (Ceiling effect)”が存在し、血小板  $2 \times 10^8$ /ml (PRP4%濃度に相当) 以降に増殖促進効果は plateau に達した (Figure 5)。故に、コラーゲン産生に対する PRP の効果の検討は、ヒト PRP2%を濃度の上限として検証した。

Figure 5 CCD18Co に対するヒト洗浄血小板の細胞増殖促進効果

洗浄血小板共培養72時間

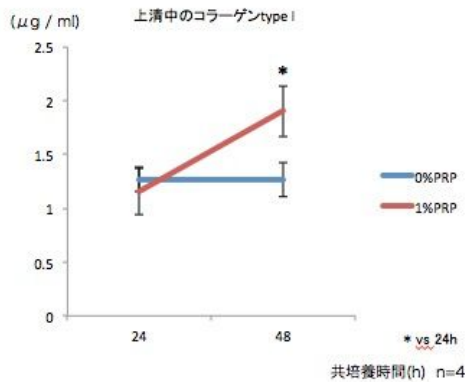


\* 血小板  $5 \times 10^9$ /ml を 100%として換算

ヒト大腸線維芽細胞株に対するヒト PRP のコラーゲン産生促進効果 (上清中のコラーゲン type I)

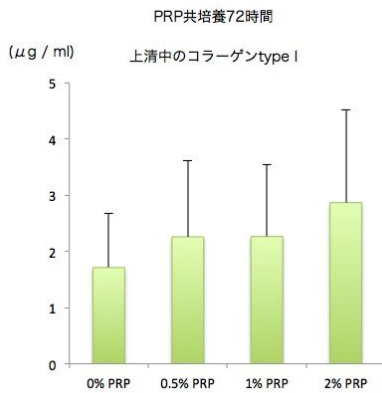
PRP のコラーゲン産生促進効果を検討するため、1%PRP 共培養 24 時間と 48 時間行った上清中のコラーゲン type I 濃度を測定した (Figure 6)。24 時間の時点では、コントロール群と比較して、1%PRP を添加した群の有意差はなく、この時点ではコラーゲン産生促進効果は発現していなかった。共培養 48 時間後では、1% PRP 群においてコラーゲン産生促進効果を認めた。PRP と線維芽細胞を共培養した場合、実際にコラーゲン産生が促進されるのは 24 時間以降であることが示唆された。

Figure 6 CCD18Co に対するヒト PRP のコラーゲン産生促進効果 (時間)



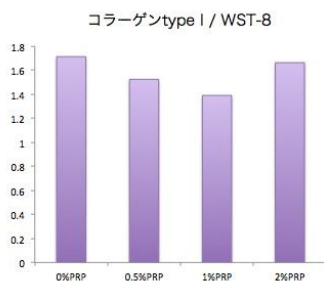
CCD18Co と PRP 共培養 72 時間後の細胞増殖およびコラーゲン産生を同時に検討するため、上清中のコラーゲン type I の濃度を測定した。細胞増殖及び上清中のコラーゲンは PRP の濃度依存性に増加した(Figure 7)。

Figure 7 CCD18Co に対するヒト PRP のコラーゲン産生促進効果



PRP によるコラーゲン産生パフォーマンスを評価するために、共培養 72 時間時点での WST-8 を測定した。上清中のコラーゲン type I (µg/ml) を WST-8 細胞増殖率 (コントロールを 1 とした場合の倍率) によって除することで補正を加え、Figure 8 を作製した。結果として、細胞数の増加率によって補正を行うと、ヒト PRP はコラーゲン産生を促進していないことが判明した(Figure 8)。

Figure 8 コラーゲン type I (µg/ml) / WST-8 細胞増殖率



(3) ヒト大腸線維芽細胞株に対するヒト PRR のコラーゲン type I mRNA 誘導効果

CCD18Co と PRP 共培養 24 時間後のコラーゲン type I mRNA (COL1A1) を測定したところ、PRP と共培養を行うことで、COL1A1 の発現は抑制されていた(Figure 8)。細胞培養液中の FBS (ウシ胎仔血清: fetal bovine serum) による影響を除外するために、1%PRP において FBS 添加ある/なしで検証を行ったが、両者とも COL1A1 は同様に抑制されていた(Figure 9)。

Figure 8 CCD18Co に対する PRP のコラーゲン type I mRNA 誘導効果

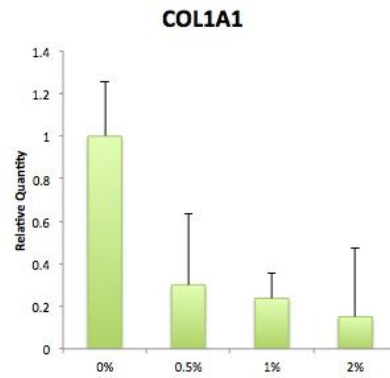
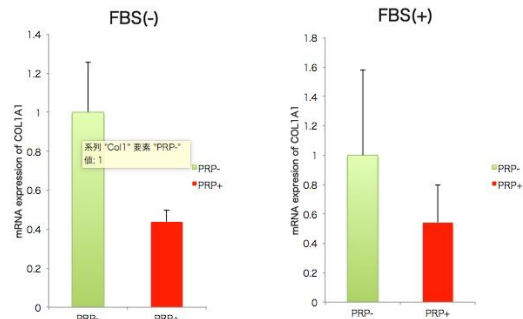


Figure 9 FBS 添加有無において、1%PRP が COL1A1 に与える影響



## 5. 研究結果の総括

ヒト PRP を用いてヒト大腸線維芽細胞に対する効果を 24 時間と 72 時間、2 つの時点において検討した。24 時間は早期に相当し、72 時間目は臨床において消化管吻合部において細胞外マトリックスが増生され組織学的癒合が始まる時期である。

PRP と線維芽細胞の共培養開始 24 時間の時点において、細胞増殖促進効果は十分に発揮されており、この事実は DNA 合成能及び細胞内増殖シグナルによって裏付けられた。

PRP と線維芽細胞の共培養開始後 24 時

間の時点において、コラーゲン type I mRNA は0.5～2%いずれの濃度においても抑制されており、その時点においては上清液中コラーゲン type I 濃度はコントロールと有意差が認められなかった。実際に上清中のコラーゲン濃度が増加するのは24時間以降であった。

共培養後72時間において、PRPは線維芽細胞に対して細胞増殖ならびにコラーゲン産生において促進効果を発揮していたが、天井効果“Ceiling effect”が存在した。

細胞増殖促進効果の場合、2%PRPが最大効果であり、それよりも高濃度になるとplateauに達した。

共培養開始後72時間の時点における上清中のコラーゲン濃度をその時点(72時間)での細胞数で補正すると、PRPは個々の線維芽細胞に対してはコラーゲン産生促進効果を発揮していなかった。

結論として、ヒト大腸線維芽細胞に対するPRPの主要効果は細胞増殖促進作用にあり、PRPは個々のヒト大腸線維芽細胞に対してコラーゲン産生促進作用を有しないことが示唆される

## 6. 研究結果の考察

PRPの効果としてコラーゲン産生時期の“前倒し”を期待することは無理であり、つまり、吻合部創傷治癒のスタートダッシュを実現することは困難である。この時期(24時間後)においては、PRPによって刺激を受けた線維芽細胞は細胞増殖に専念していることが示唆される。

創傷治癒プロセスにおいて、血小板の関与は48時間までであり、72時間以降はマクロファージが中心的な役割を果たすことは既定の事実である。加えて、抗血小板抗体を用いた動物実験系ではマクロファージの増加によって正常な創傷治癒が得られることが明

らかにされている(TRENDS in Cell Biology 2005; 15: 599-607)。すなわち、創傷治癒プロセスにおける血小板の役割は、止血(凝血塊形成)が第一義であり、次いで、48～72時間に開始される細胞外マトリックスの修復(肉芽形成)に対して準備を進めておくことにあると考えられる。具体的には、細胞外マトリックスの修復を円滑に進めるために線維芽細胞数を十分に増やしておくことである。故に、本研究において、PRPによってコラーゲン産生時期を24時間以内に前倒しすることは不可能であり、さらに、個々の細胞に対するコラーゲン産生促進作用はなく、細胞増殖促進作用が主要な効果であるとの結論に至ったことは理の当然と捉えるべきである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

松村英樹、寺島秀夫、只野惣介、村田聡一郎、大河内信弘

血小板は消化管吻合部における創傷治癒を促進する：ヒト腸管由来線維芽細胞を用いた検討。

第114回日本外科学会定期学術集会 2014.4.3～5. 京都

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

寺島 秀夫 (TERASHIMA Hideo)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10361338

### (2)研究分担者

大河内 信弘 (OHKOHCHI Nobuhiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673

只野惣介 (TADANO Sosuke)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70570688

(平成25年度まで研究分担者)