

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861514

研究課題名(和文) 幹細胞と多血小板血漿の混合移植による骨再生を目指した最適多血小板血漿精製法の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the optimal platelet-rich plasma for bone regeneration of a combination of stem cells and platelet-rich plasma

研究代表者

田島 聖士 (TAJIMA, SATOSHI)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80724377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織幹細胞(adipose-derived stem cells: ASCs)と多血小板血漿(platelet-rich plasma: PRP)による硬組織再生の有用性について研究である。研究結果より、PRPはASCsからの成長因子の放出量を増大させることが示唆された。ASCsとPRPの混合物を移植することにより、放出された成長因子が既存骨からの再生を促進させ迅速な硬組織再生の可能性が示唆され、厚みのある骨梁様組織の再生硬組織が確認できた。ヌードラットを用いた移植ASCsの動向実験より、移植したASCsの一部は直接骨芽細胞へ分化したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ASCs) have the potential to differentiate into bone. Platelet-rich plasma (PRP) is an interesting biological means to repair tissue by inducing chemotactic, proliferative, and anabolic cellular responses. This study evaluated bone regeneration using a combination of ASCs and PRP in a rat calvarial defect model. The in vitro study showed that the levels of growth factors secreted by ASCs were significantly increased by the addition of PRP. Transplantation of the ASC/PRP admixture had dramatic effects on bone regeneration overtime in comparison with rats that received other transplants. Furthermore, some ASCs directly differentiated into osteogenic cells in vivo. These findings suggest that the combination of ASCs and PRP has augmentative effects on bone regeneration. The ASC/PRP admixture may be a promising source for the clinical treatment of cranial defects.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪組織幹細胞 多血小板血漿 骨再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 多血小板血漿の作製方法に関する課題
多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) は自己血を遠心分離して得られる血小板を豊富に含有した血漿であり、成長因子を多く含むことから様々な組織再生に有効と考えられている。また PRP は骨再生および骨増大目的や慢性潰瘍の治療のため、歯科口腔外科、皮膚科、形成外科領域において臨床応用されており、2011年9月には褥瘡を含む難治性皮膚潰瘍を対象に第2項先進医療として承認されている。

一方で、PRP は、精製時に使用する抗凝固剤の種類や遠心分離条件などの設定項目が多岐にわたり、組織再生に応用するための適した精製方法に関しては未だ不明な点が多く、確立されていない。さらに PRP 精製方法が組織再生の結果に大きく影響することが報告 (Am J Sports Med, 2009) されており、PRP から徐放される成長因子量が大きく変動する。

(2) 脂肪組織幹細胞の実用性と臨床応用への課題

皮下脂肪に骨髄由来幹細胞と同様な多分化能を有する間葉系幹細胞 (Adipose-derived stem cells; ASCs) の存在が報告されてから (Tissue Eng, 2001)、これまでに ASCs に関する多くの研究がなされてきた。皮下脂肪組織は全身に大量に存在し、局所麻酔下において簡便に、かつ反復的に採取でき、臨床応用に適した細胞源である。また、ASCs は様々な成長因子を産生する能力もあり、ASCs の多分化能だけでなく、そのパラクラインによる効果も組織再生における ASCs 応用の利点とされている (Curr Stem Cell Res Ther, 2010)。しかしながら、近年、ASCs を単独投与しても効果的な組織再生が困難であることが報告され、ASCs と PRP の混合移植による有用性が報告されている。 (Curr Stem Cell Res Ther, 2013)。すなわち組織再生に必要な「幹細胞」と「成長因子」の併用が重要であることが示唆されている。

(3) ASCs と PRP の混合移植による硬組織再生の可能性

これまでに、ASCs と PRP の混合移植による硬組織再生について研究しており、ASCs と PRP の混合移植は硬組織を極めて効果的に再生する能力があることを明らかにしてきた。しかしながら、精製法の異なる PRP を ASCs と混合移植し、硬組織再生能を比較検証した際、再生された硬組織量に著明な相違があることが判明した。間葉系幹細胞と混合移植する際の、PRP 精製方法に関する多角的な検証報告は存在せず、幹細胞との混合移植に最も適した PRP 精製方法は未解明である。

そこで、ASCs と PRP の混合物移植による硬組織再生方法を、「予知性」と「再現性」のある手法を解明し、本手法の有効性及び組織再生機序を明らかにする必要があると考え

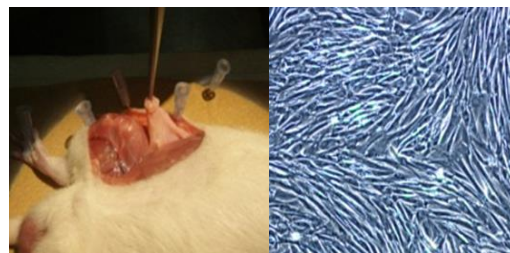
た。さらに、ASCs と PRP との混合物移植により放出された成長因子が骨再生における効果についての検証の必要性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、間葉系幹細胞と多血小板血漿の混合移植による骨再生法を確立することである。間葉系幹細胞と多血小板血漿の混合移植は、硬組織再生をはじめとする様々な組織再生に有用であることが報告されている。しかしこれまでの研究から、採血した血液から多血小板血漿を精製する過程において、作製条件により多血小板血漿から産生される成長因子量が大幅に変動することが明らかとなり、さらに異なる手法により精製した PRP と間葉系幹細胞の混合移植は、動物実験を用いた硬組織再生実験においても著明な差が認められた。このことから本研究では、間葉系幹細胞を用いた硬組織再生に適する多血小板血漿の精製方法を確立と、間葉系幹細胞に対する多血小板血漿の影響 (成長因子の放出による) を基礎解析し、組織再生の機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

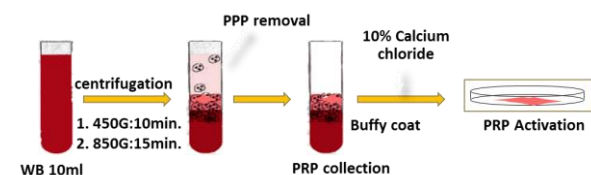
(1) ASCs は F344 ラット鼠径部より脂肪組織を採取 (図 1) し、間質細胞群を分離精製後、基本培地にて第3継代まで培養を行った (図 2)。



(図 1)

(図 2)

PRP はラットの心臓より血液を採取してダブルスピニング法により作製した (図 3)。



(図 3)

第3継代時の ASCs 培養上清と PRP 中の成長因子量 (IGF-1、TGF- β 1、HGF、PDGF-AB、VEGF) を ELISA 法にて測定した。また、活性化後の PRP と ASC/PRP 混合物について SEM による観察も実施した。

(2) ラット頭蓋骨に骨欠損 (Φ 5mm) を作製し、実験群は ASCs/PRP 群、ASCs/Collagen gel 群、PRP 群、Collagen gel 群及び対照群とした (表 1)。移植 4、8 週後に移植部位を採

取し、Micro-CT 解析、HE 染色、Alcian blue 染色及び免疫組織学的観察（オステオカルシン染色、オステオポンチン染色）を行った。

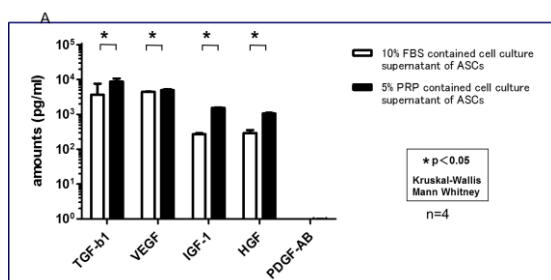
Groups	Number of animals	Implantation materials	Adjustment cells
ASCs/ PRP	10	$2 \times 10^5/20\mu\text{l}$	1×10^7
ASCs/ collagen gel	10	$2 \times 10^5/20\mu\text{l}$	1×10^7
PRP	10	20 μl	—
collagen gel	10	20 μl	—
control	10	20 μl	—

(表 1)

(3) 移植 ASCs の動向調査のため、GFP 陽性マウス (C57BL/6-Tg [CAG-EGFP]) の ASCs と PRP 混合物をスードラットの頭蓋骨欠損に移植し、4 週後に免疫組織学的観察（抗マウス-オステオカルシン染色、抗ラット-オステオカルシン染色）を行った。

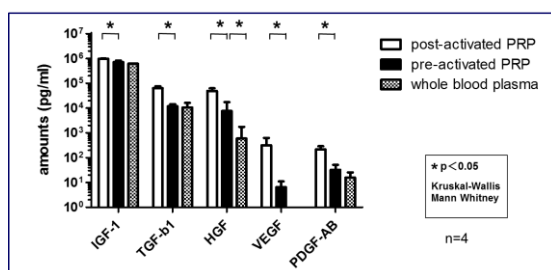
4. 研究の成果

(1) ELISA 解析では、ASCs 培養上清中に VEGF, TGF- β 1, HGF, IGF の 4 つの成長因子の放出が豊富に確認できた。さらに 5%PRP 添加の培養液の方が 10%FBS 添加の培養液と比較して、その 4 つの成長因子放出量は有意に高値を示した (図 4)。



(図 4)

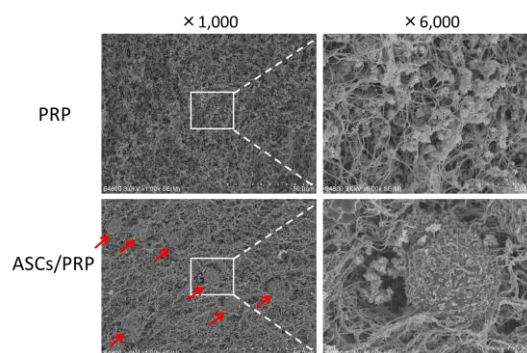
10%塩化カルシウムによる活性化後の PRP 中の 5 つの成長因子 (IGF-1、TGF- β 1、HGF、PDGF-AB、VEGF) は、活性化前と比較し有意に高値であった (図 5)。



(図 5)

また、PRP の SEM 画像では、フィブリン網の間に多くの脱顆粒した血小板が存在しているのが観察され、ASCs/PRP の SEM 画像では、フィブリン網に包まれた ASCs とその周

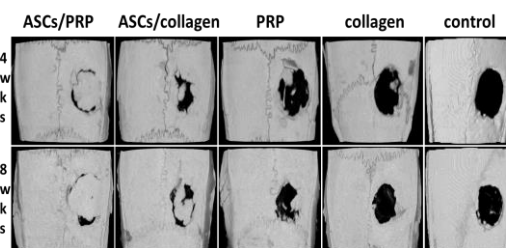
囲に多くの血小板が存在しているのが観察された (図 6)。



(図 6)

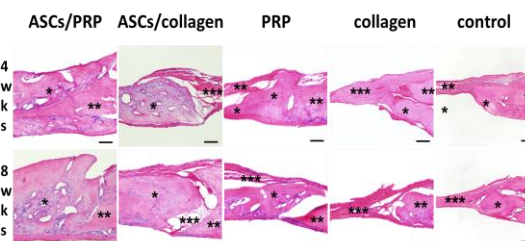
(2) Micro-CT による評価では、移植 4、8 週後、ASCs/PRP 群、ASCs/collagen gel 群は既存骨周囲、及び骨欠損内部からの硬組織再生が認められ、特に ASCs/PRP 群では顕著であった (図 7)。

一方、PRP 群、collagen gel 群では、既存骨周囲からのわずかな硬組織再生のみが観察できた。ASCs/PRP 群の再生硬組織体積率は 65%であり、他群と比較し有意に高値を示した。



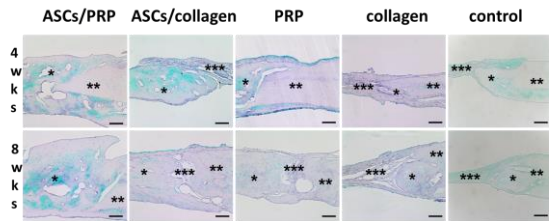
(図 7)

H.E 染色による組織学的観察では、ASCs/PRP 群は、既存骨と連続し、明確な骨小腔構造を伴った骨梁様組織の新生骨様組織が確認でき、さらに移植後 8 週においては厚みのある新生骨様組織の確認ができた (図 8)。



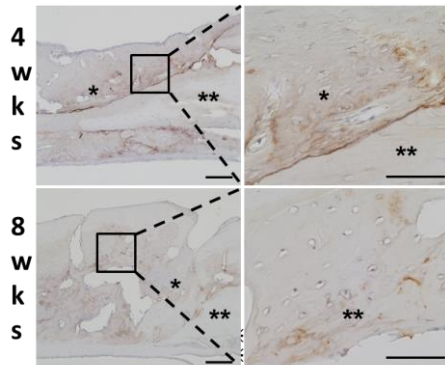
(図 8)

ASCs/PRP 群の移植 4、8 週後のアルシアンブルー染色所見ではその新生硬組織に陽性所見が観察された (図 9)。

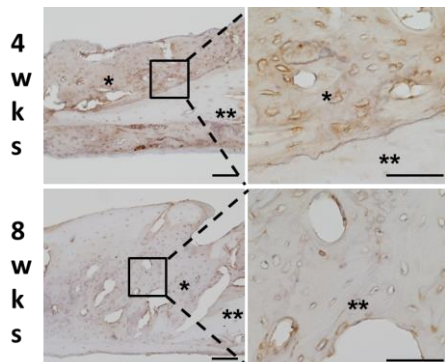


(図 9)

ASCs/PRP 群の移植 4 週後、8 週後の免疫組織学的観察では新生硬組織はオステオポンチン染色 (図 10)、オステオカルシン染色 (図 10) とともに陽性所見が得られた。

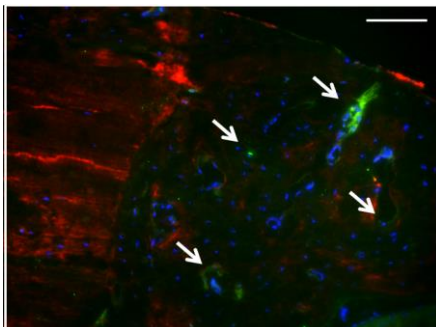


(図 10)



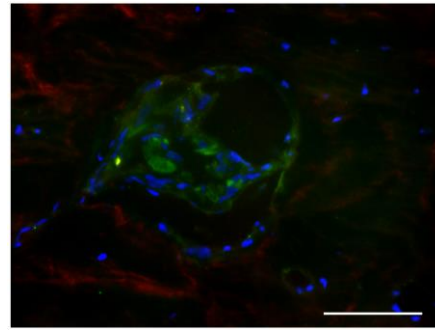
(図 11)

(3) ノードラットを用いて再生硬組織の由来を検証した結果、マウス-オステオカルシンとラット-オステオカルシン双方の陽性所見が得られた (図 12)。



(図 12)

また、強拡大像では、マウス-オステオカルシン由来の新生された骨小腔様構造も観察された (図 13)。



(図 13)

(4) 今回の研究結果より、ASCs と PRP の硬組織再生における相互作用、とりわけ成長因子の分泌に関してかなり明らかにすることが出来た。すなわち *in vitro* において、PRP の添加によって ASCs より分泌される各種成長因子が増加する結果、PRP は ASCs の効果をサポートし硬組織再生に有利に働くことが示唆された。

そして、それを裏付けるように *in vivo* においても ASCs と PRP との混合物移植により放出された成長因子がパラクリン効果により既存骨からの再生を促進させ、皮質骨および海面骨様構造を伴う迅速な硬組織再生が確認された。

さらには、移植した ASCs も直接的に骨芽細胞へ分化したことが示唆され、ASCs の直接および間接的な効果によって硬組織再生がもたらされたことを証明したと考えられる。

(5) ASCs/PRP 混合物は剤形がゲル状であるため、外傷や腫瘍切除後などの頭蓋顎顔面領域における小範囲の骨欠損症例では特に有用であると思われる。

今後更なる硬組織再生メカニズムの機序解明や大型動物を用いた前臨床研究を通じて一層の確証を積み上げる必要はあるが、将来の頭蓋顎顔面領域における硬組織再生治療の新たな手法の一つになり得るものと思われた。

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 2 件)

- ① Tajima S, Tobita M, Orbay H, Hyakusoku H and Mizuno H
Direct and indirect effects on bone regeneration of a combination of adipose derived stem cells and platelet rich plasma.
Tissue Engineering, Part A, Mar; 21(5-6): 895-905, 2015 (査読有)
- ② Tobita M, Tajima S and Mizuno H
Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: stem cell

transplantation methods that enhance stemness. Stem Cell Res Ther, Nov;5 215-222, 2015 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Tajima S, Tobita M and Mizuno H
The effect of bone regeneration using adipose derived stem cells and platelet rich plasma.
The 16th Congress of International Society of Craniofacial Surgery 2015 (Maihama, 2015)

[図書] (計 1 件)

- ① Tajima S, Tobita M and Mizuno H
(分担) Bone regeneration with a combination of adipose derived stem cells and platelet rich plasma
「Adipose Derived Stem Cells: Methods and Protocols, Second Edition」
Editors: Bunnell BA and Gimble JM
Springer, New York, NY. 2016 in press

6. 研究組織

(1)研究代表者

田島 聖士 (TAJIMA, Satoshi)
順天堂大学・医学部・非常勤助教
研究者番号：80724377

(2)研究協力者

飛田 護邦 (TOBITA, Morikuni)
順天堂大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10599038

水野 博司 (MIZUNO, Hiroshi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：80343606