

骨髓間葉系細胞に対する多血小板血漿の作用

秋田 大輔

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Effect of platelet-rich plasma on bone marrow mesenchymal cells

DAISUKE AKITA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【研究の背景と目的】

多血小板血漿 (Platelet rich-Plasma : PRP) は、自己血を遠心分離することで得られる血漿成分で、末梢血に比べ3.5~4.5倍の血小板が含まれている。皮膚科や形成外科領域では、創傷治癒促進を目的としてPRPが用いられているが、近年、歯科・口腔外科領域においてもインプラント治療の骨造成に際してPRP療法が適用されている。このPRP療法は再生医療において増殖因子の供給のほか、自家骨や人工骨を移植する際のキャリアーとしても利用されている。しかし、その調製法は医療施設によって異なるためPRPを再生療法に応用した有効性は明らかにされていない。そこで本研究では、ヒト培養骨髓間葉系細胞移植を併用した骨造成に適用するPRP療法の条件を確立する基礎的研究としてPRPの骨髓間葉系細胞への作用について検討した。

【実験方法】

全血9 mlに対しACD-A液1 mlを添加して混和後、3000×g・minで遠心分離した後、Buffy coat直上の血漿をPRPとして3 ml採取した。PRPは、-20℃で凍結し、実験時に融解させてPRPの濃度を0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 75, 100%に調整して使用した。

細胞は、不死化骨髓間葉系幹細胞株であるUE 7 T-13細胞を使用した。

培地は、①Minimum Essential α (α -MEM) 培地に1% Penicillin-Streptomycinを添加したものを基礎培地として使用し、②基礎培地に10%ウシ胎児血清を添加したものを10% FBS培地、③基礎培地に0.1 mM dexamethasone, 50 mg ascorbate-2 phosphate, 10 mM β -glycerophosphateを添加したものを骨分化誘導培地、④基礎培地に、0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 1 mM dexamethasone, 10 mM insulin, 200 mM indomethacinを添加したものを脂肪分化誘導培地、⑤基礎培地に6.25 mg/ml insulin, 10 ng/ml TGF- β , 50 nM ascorbate-2-phosphateを添加したものを軟骨分化誘導培地とし、5% CO₂, 37℃の条件下で培養を行った。

測定項目は、細胞数の経時変化、細胞形態の経時変化、骨分化マーカー・骨軟骨共通分化マーカー・軟骨分化マーカーの遺伝子発現量、細胞分化の進行と骨芽細胞の活性、PRP中のサイトカイン量とした。

細胞数の経時変化の測定と細胞形態の経時変化の観察は、定量したUE 7 T-13細胞を播種した基礎培地または、10% FBS培地に各濃度のPRPを添加して7日間培養し、細胞数はWater soluble Tetrazolium法で測定し、形態変化は位相差顕微鏡で観察した。

遺伝子発現量の測定は、骨芽細胞分化マーカー

として Type I collagen, Osteonectin (OPN), Osteocalcin (OCN), 骨軟骨共通マーカーとして Alkaline Phosphatase (ALP), Runx 2, Msx 2, 軟骨分化マーカーとして Type II collagen, Sox 9, Aggrecan のプライマーを使用し, 5 µg の総 RNA から cDNA を合成した後に, real-time PCR 法で評価した.

細胞分化の進行については Alizarin Red S 染色で石灰化, Oil Red O 染色で脂肪, Alcian Blue 染色で軟骨基質の発現の有無を確認した. また ALP 染色では骨芽細胞の活性を確認した.

PRP 中のサイトカインの検討は血小板由来増殖因子 (PDGF)-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, 骨形成タンパク質 (BMP)-2, BMP-7, BMP-9 の定量を ELISA 法でおこなった. 統計解析は t 検定を用いた.

【結果と考察】

(1) 細胞数の経時変化

基礎培地では PRP 濃度 0% に比べて, 10% まで細胞数が増加し, 20% では差はなく, 50% 以上では低下した.

10% FBS 培地では PRP 濃度 0% に比べて, 1% では細胞数に差はなく, 2.5% 以上では低下した.

基礎培地と 10% FBS 培地の比較では後者の方が PRP 濃度 2.5% まで細胞数が多く, 5~20% では差がなく, 50% 以上では少なかった.

(2) 細胞形態の経時変化

PRP 濃度 50% 以上では基礎培地と 10% FBS 培地の双方で突起を有する細胞に変化した.

(3) 遺伝子発現

PRP 濃度 50% での基礎培地と 10% FBS 培地の比較では, 基礎培地の方が骨芽細胞分化マーカー (Type I collagen, OPN, OCN), 骨軟骨共通マーカー (ALP, Runx 2, Msx 2), 軟骨分化マーカー (Type II collagen, Sox 9, Aggrecan) の遺伝子量が 4~7 日目に有意に増加した.

(4) 細胞分化の進行と骨芽細胞の活性

PRP 濃度 50% 基礎培地での培養では 14 日目に石灰化と軟骨基質の発現を確認した. 一方, 脂肪は認めなかった. ALP 染色では培養 4 日目から PRP 濃度 10%, 50% 基礎培地での培養細胞に, 培養 7 日目には PRP 濃度 0% の 10% FBS 培地での培養細胞で染色を確認した.

(5) PRP 中のサイトカイン

凍結前後の比較では凍結融解後の方が, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, BMP-2, BMP-7, BMP-9 のサイトカイン量が高かった.

以上から低濃度 (10% 以下) の PRP は培養骨髄間葉系幹細胞数の増加促進に働き, 高濃度 (50% 以上) の PRP は細胞数の抑制に働くとともに, 骨芽細胞や軟骨細胞形質の獲得を促進することが示唆された. 血清は細胞数増加に寄与しているが, PRP 濃度 50% 以上では細胞数の増加がみられなかった. その理由には, 細胞の形態変化と特殊染色の結果から骨芽細胞や軟骨細胞への分化が促進しているためと考えられる. また, 凍結融解後の PRP では PDGF と BMP 濃度が凍結前よりも高く, これらが関与している可能性も示唆された.