

論文内容要旨

論文題目

ラット大腿骨部分欠損モデルを用いた多血小板血漿併用骨髄幹細胞移植による骨形成能に関する研究

責任講座：整形外科科学講座

氏 名：山 川 淳 一

【内容要旨】(1,200字以内)

【諸言】近年、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell:MSC) を用いて適切な担体と成長因子を組み合わせることで効果的に骨の再生が試みられている。多血小板血漿

(platelet rich plasma:PRP) は血液を遠心分離することで血小板を抽出・濃縮して作製され、多数の成長因子を含んでいる。本研究では MSC に PRP を組み合わせて安定した骨再生を得ることを目的に PRP の適切な使用法、および骨形成における役割を検討した。

【材料と方法】MSC は雄ラットから分離・培養した。PRP は雌ラットから採取した血液を2回遠心分離し作製した。In vitro における実験では MSC に異なる濃度の PRP

($500 \times 10^4 / \mu\text{l}$, $250 \times 10^4 / \mu\text{l}$, $125 \times 10^4 / \mu\text{l}$, $62.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$, $31.25 \times 10^4 / \mu\text{l}$, $15.63 \times 10^4 / \mu\text{l}$) を添加し MSC の細胞増殖能と骨分化能について検討した。In vivo による実験では雌ラットを用いて大腿骨骨欠損モデルを作製し、MSC に異なる濃度の PRP ($500 \times 10^4 / \mu\text{l}$, $100 \times 10^4 / \mu\text{l}$, $20 \times 10^4 / \mu\text{l}$) を加えた MSC+PRP (500) 群、MSC+PRP (100) 群、MSC+PRP (20) 群と MSC 群、PRP 群、骨欠損のみの6群について移植実験を行った。移植後2, 4, 6, 8週で軟X線撮像を行い骨形成率を測定し、さらに組織学的に骨形態を評価した。新生骨における移植細胞の占有率について蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて測定した。また、免疫染色を行い切片上での血管腔数を測定した。

【結果】in vitro における実験の結果は添加された PRP 量に比例して MSC の細胞増殖能が増加した。骨分化能は培養8日目以降、添加した PRP が $125 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群、 $62.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 群において高値であった。In vivo における実験の結果では8週の軟X線評価において MSC+PRP (100) 群で骨形成率が46.9%であり他群に比べて有意な骨形成を認めた。新生骨骨基質内における移植細胞の占有率は移植後8週では MSC+PRP (100) 群で19.7%、MSC 群で17.4%であり2群間に有意差は認めなかった。血管腔数は PRP 添加で増加したが MSC 移植により増加しなかった。

【結語】1) in vitro における実験の結果 MSC の増殖能は添加する PRP 量に比例して増加すること、および骨分化能は PRP が高濃度でも低濃度でも低下し、適切な添加量が存在することが明らかになった。2) in vivo のラットを用いた実験では、MSC 8×10^6 個に対し血小板 2×10^8 個を移植することで良好な骨形成が得られた。3) ラットに移植した MSC の占有率と血管形成を調べた結果、PRP は移植した MSC を介して周辺組織の骨形成を促している可能性が考えられた。

平成23年 1月 18日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学 位 論 文 審 査 結 果 報 告 書

申請者氏名：山川淳一

論文題目：ラット大腿骨部分欠損モデルを用いた多血小板血漿併用骨髓幹細胞による骨形成能に関する研究

審査委員：主審査委員

飯野 亮 吾

副審査委員

山崎 健太郎

副審査委員

後藤 薫

審査終了日：平成23年 1月13日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) は自己血を遠心分離することで作成される濃縮血小板製剤で多数の成長因子を含むことから、近年、特に骨再生医療の領域で注目されている血液製剤である。これまで PRP の骨再生における有効性に関しては基礎・臨床の両面から研究されているが、その有効性についてはいまだ統一した見解は得られていない。本研究は、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に PRP を併用して安定した骨形成を得ることを目的に、PRP の適正な使用法および骨形成における PRP の役割を検討したものである。

In vitro 実験は MSC に6種類の異なる濃度の PRP ($500 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $250 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $125 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $62.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $31.25 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $15.63 \times 10^4/\mu\text{L}$) を添加し MSC の細胞増殖能と骨分化能について検討した。結果、MSC の細胞増殖能は PRP 濃度に比例して増加したが、骨分化能は PRP 濃度 $125 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $62.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ で高値であった。このことより In vitro における MSC の骨分化能では添加する PRP に適切な濃度が存在することが判明した。In vivo 実験では In vitro 実験の結果をふまえ、ラット大腿骨欠損モデルを用いて MSC に3つの異なる濃度の PRP ($500 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $100 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $10 \times 10^4/\mu\text{L}$) を添加し骨形成能について検討した。結果、PRP 濃度 $500 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $100 \times 10^4/\mu\text{L}$ で高値であった。このことより In vivo における MSC の骨分化能では添加する PRP に適切な濃度が存在することが判明した。

$\mu\ell$ 、 $20 \times 10^4 / \mu\ell$) を加えた MSC+PRP (500) 群、MSC+PRP (100) 群、MSC+PRP (20) 群と MSC 単独群、PRP 単独群、骨欠損のみの 6 群を設定し移植実験を行った。結果、移植後 8 週の所見では MSC+PRP (100) 群の骨形成が有意に優れておりこの群のみ充分な新骨形成が認められ、他の群はいずれも新生骨形成はわずかで骨の連続性は得られなかった。また、新生骨基質内における MSC の数は経時的に減少すること、PRP は血管新生を促進することも明らかとなった。

これらの結果より、MSC と PRP の混合移植による骨形成は *in vitro*、*in vivo* ともに PRP が高濃度でも低濃度でも低下し、MSC に対する PRP の適切な濃度や量があることが判明した。また、PRP と MSC の混合移植では、PRP は移植した MSC を介して周囲組織の骨形成を促進することが示唆された。

本研究から導き出された以上の結論は従来からさまざまに議論されてきた PRP の骨形成能とその機序について非常に重要な新知見を明らかにしており、学位授与に充分値すると判定した。