

# Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation

(多血小板血漿/骨芽細胞複合体は皮下移植によって

骨芽細胞分化を経て骨形成を誘導する)

鹿児島大学大学院歯学研究科

(指導教員 和泉 雄一 教授)

申請者氏名 後藤 寿徳

## (背景・目的)

多血小板血漿(Platelet-rich plasma: PRP)は血小板を濃縮した血漿であり、血小板に由来する PDGF、TGF- $\beta$ 、IGF、EGF 等の多種多量の細胞増殖因子を含み、骨・軟組織の治癒の促進が期待されている。PRP は、歯周領域を含む顎顔面口腔領域において、骨再生治療のため臨床応用されているが、PRP 単独の効果は充分でないため、骨移植材と併用されている。しかし、自家骨移植は供給側の侵襲、供給量の制限を伴い、他家骨・異種骨・人工骨移植は炎症・感染の危険性を否定できず、これらの問題を解決するため PRP を用いた新たな手法が必要と思われた。

自然治癒の期待できない大きな骨欠損の再生治療のため細胞、細胞増殖因子、matrix を併用した組織工学的な細胞移植の有効性が示唆されている。PRP は thrombin 添加によってゲル化し、delivery matrix として細胞移植に応用できることから、自家 PRP ゲルと *in vitro* で増殖・分化させた自家細胞を併用すれば完全な自家移植の実現も可能となる。そこで我々は PRP ゲルと細胞の併用による骨再生療法の有効性を調べることを目的として、*in vitro* において、PRP ゲルが骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1 細胞)の形態、分化に及ぼす効果を調べ、*in vivo* において、PRP ゲルと細胞の複合体を SCID マウスの背皮下に移植し、異所性骨形成能を評価した。

## (材料・方法)

ジエチルエーテル麻酔下で、ddY マウスの腹大動脈から全血を採取し、EDTA・2K あるいはクエン酸ナトリウム含有採血管に集めた。1,100rpm、10 分間遠心し分離した buffy coat を含む血漿を、さらに 2,500rpm、5 分間遠心した。その上層 1/2 を platelet-poor plasma (PPP)、下層 1/2 を PRP とした。PRP、PPP、全血の血小板数、赤血球数、白血球数を計測した。

MC3T3-E1 subclone 4 細胞を 10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM で培養し以下の実験に供した。

## *In vitro* 研究

- 1) 細胞を 0.5% PRP ゲル上清添加、非添加の 0.5% FBS 含有  $\alpha$ -MEM で 21 日培養後、alkaline phosphatase (ALP) 染色、フォン・コッサ染色を行った。
- 2) 細胞を PRP ゲルに包埋し、2 日培養後、通法に従って走査型電子顕微鏡下で観察した。
- 3) 細胞を PRP、PPP ゲルに包埋し、10% FBS 含有  $\alpha$ -MEM で 7 日培養後、Runx2、Osterix

(Osx)、ALP、bone sialoprotein (BSP)、osteocalcin (OCN)の mRNA 発現を RT-PCR 法によって解析した。

#### *In vivo* 研究

- 4) ペントバルビタール腹腔内注射による全麻下で、SCID マウスの背皮下に、あらかじめ蛍光標識した細胞を用いて、PRP/細胞複合体、PPP/細胞複合体、PBS/細胞、PRP 単独、PPP 単独、PBS 単独をツベルクリン・シリンジにて皮下注射した。移植 4 週後、ジエチルエーテルにより安楽死させ、軟 X 線写真を撮影して確認した石灰化物を切除後、10%パラホルムアルデヒドで固定し 0.5 M EDTA で脱灰して作製したパラフィン切片を光学顕微鏡下、蛍光顕微鏡下で観察した。また、OCN と type I collagen の免疫組織化学的観察を行った。

#### (結果・考察)

PRP、PPP、全血の血小板数はそれぞれ  $1,844 \pm 206 \times 10^3$  個/ $\mu$ l、 $92 \pm 33 \times 10^3$  個/ $\mu$ l、 $635 \pm 141 \times 10^3$  個/ $\mu$ l であり、PRP の血小板数は PPP の 20 倍であった。

- 1) PRP ゲル上清添加は、培養 21 日後、MC3T3-E1 細胞の ALP 活性を促進し、nodule 形成をわずかに促進したことから、PRP ゲル上清が、*in vitro* において、直接、骨芽細胞分化を促進することが示唆された。
- 2) PRP ゲルに包埋培養された細胞は、超微細構造的に、ゲル表層において紡錘型を呈していた。
- 3) 移植前に PRP/細胞複合体による骨関連マーカーの mRNA 発現を RT-PCR 法によって確認した。PRP ゲルは PPP ゲルと比較して Osx、BSP の mRNA 発現を促進したが、OCN の mRNA 発現は促進しなかった。したがって PRP ゲルは MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を促進したが最終分化は誘導しなかったと思われる。
- 4) 移植後に移植細胞を検出するため、細胞はあらかじめ蛍光標識された。移植 4 週後、軟 X 線写真にて PRP/細胞複合体の移植部位のみに不透過像を認め、光学顕微鏡下で同部位の皮下脂肪組織中に石灰化組織を認めた。さらに、蛍光顕微鏡下で石灰化組織中に標識細胞を認めたことから、移植細胞が皮下組織中で石灰化組織を形成したことが示唆された。さらに、移植後の移植細胞の分化段階を免疫組織化学的に調べた。標識された移植細胞は OCN を発現しており、細胞が皮下組織中で成熟骨芽細胞に分化したことが示唆された。また、石灰化組織は主要な骨基質タンパクである type I collagen を含んでいた。

本研究の結果より、PRP ゲルが MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化を促進し骨形成能を向上させることが示唆された。PRP ゲルは、delivery matrix として細胞移植を容易にし、移植後における細胞分化の促進・維持、さらには、骨形成能の向上に有効であることが明らかになった。PRP/骨芽細胞複合体の移植は、様々な骨欠損の治療に適用されることが期待できる。

(Journal of Periodontal Research, 2006, in press)

様式 7

報 告 番 号	歯 研 第132号		氏 名	後藤 寿徳	
論文審査担当者	主 査	和泉 雄一			
	副 査	松口 徹也	梶山 加綱		徳田 雅行

## Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation

(多血小板血漿/骨芽細胞複合体は皮下移植によって骨芽細胞分化を経て骨形成を誘導する)

多血小板血漿 (PRP) は血小板を濃縮した血漿であり、血小板に由来する PDGF、TGF- $\beta$ 、IGF、EGF 等の多種多量の細胞増殖因子を含み、骨・軟組織の治癒の促進が期待される。PRP は、歯周領域を含む顎顔面口腔領域において、骨再生治療のため臨床応用されているが、PRP 単独の効果は充分でないため、骨移植材と併用されている。しかし、自家骨移植は供給側の侵襲、供給量の制限を伴い、他家骨・異種骨・人工骨移植は炎症・感染の危険性を否定できず、これらの問題を解決するため PRP を用いた新たな手法が必要である。自然治癒の期待できない大きな骨欠損の再生治療のため細胞、細胞増殖因子、matrix を併用した組織工学的な細胞移植の有効性が示唆されている。PRP は thrombin 添加によってゲル化し、delivery matrix として細胞移植に応用できることから、自家 PRP ゲルと *in vitro* で増殖・分化させた自家細胞を併用すれば完全な自家移植の実現も可能となる。本論文は、PRP ゲルと細胞の併用による骨再生療法の有効性を調べることを目的として、*in vitro* において、PRP ゲルが骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) の形態、分化に及ぼす効果を調べ、*in vivo* において、PRP ゲルと細胞の複合体を SCID マウスの背皮下に移植し、異所性骨形成能を評価した。

その結果、PRP、PPP、全血の血小板数はそれぞれ  $1,844 \pm 206 \times 10^3$  個/ $\mu$ l、 $92 \pm 33 \times 10^3$  個/ $\mu$ l、 $635 \pm 141 \times 10^3$  個/ $\mu$ l であり、PRP の血小板数は PPP の 20 倍であった。1) PRP ゲル上清添加は、培養 21 日後、MC3T3-E1 細胞の ALP 活性を促進し、nodule 形成をわずかに促進したことから、PRP ゲル上清が、*in vitro* において、直接、骨芽細胞分化を促進することが示唆された。2) PRP ゲルに包埋培養された細胞は、超微細構造的に、ゲル表層において紡錘型を呈していた。3) 移植前に PRP/細胞複合体による骨関連マーカーの mRNA 発現を RT-PCR 法によって確認した。PRP ゲルは PPP ゲルと比較して Osx、BSP の mRNA 発現を促進したが、OCN の mRNA 発現は促進しなかった。従って PRP ゲルは MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を促進したが最終分化は誘導しなかったと思われる。4) 移植後に移植細胞を検出するため、予め細胞を蛍光標識した。移植 4 週後、軟 X 線写真にて PRP/細胞複合体の移植部位のみに不透過像を認め、光学顕微鏡下で同部位の皮下脂肪組織中に石灰化組織を認めた。さらに、蛍光顕微鏡下で石灰化組織中に標識細胞を認めたことから、移植細胞が皮下組織中で石灰化組織を形成したことが示唆された。移植後の移植細胞の分化段階を免疫組織化学的に調べたところ、標識された移植細胞は OCN を発現しており、細胞が皮下組織中で成熟骨芽細胞に分化したことが示された。また、石灰化組織は主要な骨基質タンパクである type I collagen を含んでいた。

本論文は、PRP ゲルが MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化を促進し骨形成能を向上させることを明らかにしたものである。PRP ゲルは、delivery matrix として細胞移植を容易にし、移植後に及ぼせる細胞分化の促進・維持、さらには、骨形成能の向上に有効であることが明らかになった。PRP/骨芽細胞複合体の移植は、様々な骨欠損の治療に適用されることが期待できる。

よって、本審査委員会は、本論文が学位論文として十分に価値があるものと判断した。

最終試験の結果の要旨および担当者

様式 8

報 告 番 号	歯 研 第 132 号	氏 名	後藤 寿徳	
論文審査担当者	主 査	和泉 雄一		
	副 査	松口 徹也	梶山 加綱	徳田 雅行
<p>審査委員会は平成 18 年 3 月 3 日（金）、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めるとともに、これと関連した Tissue Engineering の概念に基づいた生体材料および細胞生物学的諸問題、手技や研究結果の解釈および骨再生誘導法との関連に関する事項について試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。</p> <p>以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格をもつと判断した。</p>				