



Platelet-Rich Plasma Protects Rotator Cuff-Derived Cells from the deleterious Effects of Triamcinolone Acetonide

Muto, Tomoyuki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6237号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006237>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Platelet-Rich Plasma Protects Rotator Cuff-Derived Cells
from the Deleterious Effects of Triamcinolone Acetonide

多血小板血漿はトリアムシノロンアセトニドによる腱板由来細胞への弊害を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
(指導教員: 黒坂昌弘教授)

無藤 智之

はじめに

肩腱板炎などの肩関節障害は疼痛、肩関節機能低下を起こすが、その治療法は安静、理学療法、非ステロイド性抗炎症薬内服、ステロイド注射などの保存療法が第一選択となることが多い。中でも腱板炎に対する肩峰下滑液包や肩甲上腕関節内へのステロイド注射は有効である。しかし、ステロイド注射は除痛や炎症進行の抑制などの利点もある反面、腱脆弱化、腱断裂を起こすということが報告されており、その使用に際しては合併症に対する注意が不可欠である。近年、末梢血を遠心分離して得られる血小板を多く含んだ血漿分画である多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma: PRP) が腱や韌帯の治癒・再生を促すことが報告されている。PRP はトロンビンなどアクチベーターを添加することによって血小板が活性化し、血小板の α 顆粒から、VEGF (血管内皮増殖因子)、EGF (上皮増殖因子)、PDGF (血小板由来増殖因子)、TGF- β (形質転換成長因子)、FGF (線維芽細胞増殖因子) などの多くの成長因子が放出される。そこで、今回我々は、ステロイドに PRP を併用することで、ステロイドにより起こる腱脆弱化が PRP により抑制可能かを検討した。

対象と方法

ヒト腱板組織は、肩腱板断裂に対する鏡視下腱板修復術を施行し、術前に組織採取に対して同意の得られた患者 4 名より採取した。方法は、鏡視下腱板修復術時、腱板断端を新鮮化する際に切除した腱板組織の断端部を一部採取し、周囲の脂肪、滑膜などの結合組織を可及的に除去し、細断後に培養液を用いて単層培養を行い腱板由来細胞を分離した。PRP の作成は double spinning 法により行った。健常ボランティアより採血を行い、全血 80ml を 2400rpm、10 分間で遠心分離し、血漿層のみを回収した。次に血漿層を 3600rpm、15 分間遠心分離し、血小板層のみを回収し、約 5ml の PRP を作成した。アクチベーターとして、別に採取したトロンビンを用いた。PRP 内血小板数は静脈血内血小板数の約 5-7 倍の濃縮率であった。

ヒト腱板由来細胞は以下の 4 種類の培養液で培養を行った。標準細胞培養液のみで培養したものを control 群、標準細胞培養液と 0.1mg/ml トリアムシノロンアセトニド(TA)で培養したものを TA 群、標準培養液に 0.1mg/ml TA と 10%PRP を加えて培養したものを TA+PRP 群、標準細胞培養液と 10% PRP で培養したものを PRP 群とし、群別に細胞形態、cell viability、アポトーシス陽性細胞発現率、cleaved caspase-3 発現率を評価した。

細胞形態は、 5×10^4 個の腱板由来細胞を 6-well plate でそれぞれ培養を行い、顕微鏡で培養 7、21 日目に観察した。cell viability は Cell Counting Kit-8 を用い、Water Soluble Tetrazolium salt (WST) 試験にて評価を行った。 5×10^3 個の腱板由来細胞を

96-well plate でそれぞれ培養を行い、培養 1、7、14、21 日目に吸光度計を用いて評価した。アポトーシス陽性細胞の検出には、アポトーシスにより起こる DNA の断片化を検出する APO-DIRECT Kit を用い、蛍光免疫染色及び、フローサイトメトリーで培養 7 日目に評価を行った。蛍光免疫染色では、 5×10^4 個の腱板由来細胞を 6-well plate でそれぞれ培養を行い、細胞核を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色し、アポトーシス細胞を APO-DIRECT にて染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。フローサイトメトリーでは、各群それぞれ 1×10^6 個の細胞を Cell Quest Software を用いて評価した。cleaved caspase 3 発現率は、蛍光免疫染色を培養 7 日目に評価し、cell count 法で半定量を行った。

結果

細胞形態は、培養 7 日目に control 群では腱細胞に特有の紡錘形を呈していたが、TA 群では細胞の平坦化、多角化が認められた。一方、TA+PRP 群では TA 群のような細胞形態の変化は認めず、control 群とほぼ同様の形態を示していた。PRP 群では細胞の増殖傾向を認めた。培養 21 日目では、それぞれ細胞形態に差は認めなかった。WST 染色による cell viability 評価は、control 群の値を 1 として各群での比率を算出すると、TA 群は投与後 7 日目で 0.68 ± 0.02 と control 群と比較し有意に低下したが、TA+PRP 群では 1.29 ± 0.03 と有意に高値であった。TA 群と TA+PRP 群間でも有意差を認めた。PRP 群では 1.67 ± 0.02 と control 群と比較すると有意に高値であった。培養 21 日での TA 群は control 群と有意な差がない状態まで改善を認めた。蛍光免疫染色でのアポトーシス陽性細胞発現の評価は、control 群、PRP 群ではわずかに緑色に染色されたアポトーシス陽性細胞の発現を認めたが、TA 群ではアポトーシス陽性細胞の出現を多数認めた。しかし、TA+PRP 群では TA 群と比較しアポトーシス陽性細胞の減少を認めた。フローサイトメトリーによるアポトーシス陽性細胞発現率では TA 群のアポトース陽性細胞発現率は培養 7 日目で 32.28 ± 1.97 % であったが、TA+PRP 群では 15.94 ± 1.47 % と有意に低い値を示した。また、control 群では 1.73 ± 0.40 %、PRP 群で 1.64 ± 0.42 % であった。cleaved caspase 3 発現率は、control 群で 1.50 ± 0.63 %、TA 群で 27.48 ± 1.83 %、TA+PRP 群で 11.76 ± 1.36 %、PRP 群で 1.25 ± 0.51 % であり、アポトーシス陽性細胞発現率と同様の傾向が見られた。

考察

臨床において、ステロイド注射は腱炎、関節炎に対して炎症を抑制し疼痛を改善する効果があるとされているが、ステロイド注射による腱脆弱化、腱断裂の報告も散見され、頻回のステロイド注射は避けるべきであると言われる。これらの影響を起こすメカニズムに関しては種々の報告がある。In vitro 実験の報告でステロイドは cell viability 低下、コラーゲン同化抑制を起こすことを報告がある。また、In vivo 実験

では、ステロイド注射によりラット腱板が組織の変性、脂肪化を起こし、力学的強度の低下も起こしたという報告がある。本実験では、TA 投与後に cell viability 低下、アポトーシス陽性細胞発現、細胞形態変化を認めた。

PRP は、自己血を遠心分離することで得られる血小板および血小板由来の成長因子を多量に含んだ血漿であり、数々の成長因子の作用により、腱、靭帯の治癒、再生を促すと考えられている。また、自己由来であるため無毒性かつ非免疫性であり感染症の恐れが少なく、短時間で作成可能であり、近年さまざまな分野で臨床応用されてきている。PRP の分離、精製方法に関しては、種々の条件での研究がなされているが、その作成方法に一定の見解は得られていない。ヒト腱細胞を用いた研究において遠心回転数 2400rpm・遠心時間 10 分で遠心分離後、血球成分を除去した後に再度遠心回転数 3600rpm・遠心時間 15 分で遠心分離することにより得られた PRP の血小板数は末梢血と比べ高濃度で、得られた PRP をヒト腱細胞に投与し、良好な細胞増殖が得られたと報告している。本研究においても同様の遠心条件を用いて PRP を作成した。本実験では、PRP を TA 投与の際に併用することにより、cell viability の低下を改善し、さらにアポトーシス陽性細胞発現の低下を改善した。

PRP がこれらの影響を起こすメカニズムについてはどの成長因子がどのようなメカニズムで関与しているか未だ不明な点が多いが、PRP は老化を抑制する事で cell viability を上げることができるとの報告や、PRP は Death-associated protein kinase 1 (DAPK1) と B-cell lymphoma-2 (BCL-2)-interacting mediator of cell death (BIM) を抑制することで、アポトーシスを改善したとの報告がある。つまり、PRP は、アポトーシスを生じるミトコンドリア経路およびデスレセプター経路をブロックすることにより、アポトーシス発現を改善することが示唆される。

本実験で、ステロイドは腱板由来細胞に細胞形態変化、cell viability 低下、アポトーシスの発現という悪影響を起こすが、PRP の併用によりそれらが抑制可能であり、臨床で、ステロイド注射時に PRP を併用することで、ステロイドによる腱脆弱化を軽減できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2449号	氏名	無藤 智之
論文題目 Title of Dissertation	<p>Platelet-Rich Plasma Protects Rotator Cuff-Derived Cells from the Deleterious Effects of Triamcinolone Acetonide</p> <p>多血小板血漿はトリアムシノロンアセトニドによる腱板由来細胞への弊害を抑制する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 伊藤 洋人</p> <p>副査 Vice-examiner 真庭 謙昌</p> <p>副査 Vice-examiner 佐々木 伸</p>		
(要旨は1,000字~2,000字程度)			

はじめに

腱障害に対するステロイド注射は有効であるが、ステロイド注射は腱脆弱化、腱断裂を起こすということが報告されている。近年、末梢血を遠心分離して得られる血小板を多く含んだ血漿分画である多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma : PRP) が腱や韌帯の治癒・再生を促すことが報告されている。そこで、今回研究者らは、ステロイドにPRPを併用することで、ステロイドにより起こる腱脆弱化がPRPにより抑制可能かヒト腱板由来細胞を使用し検討した。

方法

ヒト腱板由来細胞は以下の4種類の培養液で培養を行った。標準細胞培養液のみで培養したものとcontrol群、標準細胞培養液と0.1mg/mlトリアムシノロンアセトニド(TA)で培養したものをTA群、標準培養液に0.1mg/ml TAと10%PRPを加えて培養したものをTA+PRP群、標準細胞培養液と10%PRPで培養したものをPRP群とし、群別に細胞形態、cell viability、アポトーシス陽性細胞発現率、cleaved caspase-3発現率を評価した。

細胞形態は、顕微鏡で培養7、21日目に観察した。cell viabilityはWater Soluble Tetrazolium salt(WST)試験にて、培養1、7、14、21日目に吸光度計を用いて評価した。アポトーシス陽性細胞の検出には、蛍光免疫染色及び、フローサイトメトリーで培養7日目に評価を行った。cleaved caspase-3発現率は、蛍光免疫染色を培養7日目に評価し、cell count法で半定量を行った。

結果

細胞形態は培養7日目にcontrol群では腱細胞に特有の紡錘形を呈していたが、TA群では細胞の平坦化、多角化が認められた。一方、TA+PRP群ではTA群のような細胞形態の変化は認めず、control群とほぼ同様の形態を示していた。PRP群では細胞の増殖傾向を認めた。cell viabilityは、TA群は投与後7日目で 0.68 ± 0.02 とcontrol群と比較し有意に低下したが、TA+PRP群では 1.29 ± 0.03 と有意に高値であった。TA群とTA+PRP群間でも有意差を認めた。培養21日でのTA群はcontrol群と有意な差がない状態まで改善を認めた。蛍光免疫染色でのアポトーシス陽性細胞発現の評価は、control群、PRP群ではわずかに緑色に染色されたアポトーシス陽性細胞の発現を認めたが、TA群ではアポトーシス陽性細胞の出現を多数認めた。しかし、TA+PRP群ではTA群と比較しアポトーシス陽性細胞の減少を認めた。フローサイトメトリーによるアポトーシス陽性細胞発現率ではTA群のアポトーシス陽性細胞発現率は培養7日目で $32.28\pm1.97\%$ であったが、TA+PRP群では $15.94\pm1.47\%$ と有意に低い値を示した。また、control群では $1.73\pm0.40\%$ 、PRP群では $1.64\pm0.42\%$ であった。cleaved caspase-3発現率は、control群で $1.50\pm0.63\%$ 、TA群で $27.48\pm1.83\%$ 、TA+PRP群で $11.76\pm1.36\%$ 、PRP群で $1.25\pm0.51\%$ であり、アポトーシス陽性細胞発現率と同様の傾向が見られた。

考察及び結論

ステロイド注射は腱炎に対して炎症を抑制し疼痛を改善する効果があるとされているが、

ステロイド注射による腱脆弱化、腱断裂の報告も散見され、頻回のステロイド注射は避けるべきであると言われる。PRP は、自己血を遠心分離することで得られる血小板および血小板由来の成長因子を多量に含んだ血漿であり、数々の成長因子の作用により、腱、韌帯の治癒、再生を促すと報告されている。また、自己由来であるため無毒性かつ非免疫性であり感染症の恐れが少なく、短時間で作成可能であり、近年さまざまな分野で臨床応用されてきている。今回研究者らは、ヒト腱板由来細胞へ PRP をステロイド投与の際に併用する効果について初めて報告した。

本実験では、ステロイドは腱板由来細胞に細胞形態変化、cell viability 低下、アポトーシスの発現という悪影響を起こすが、PRP の併用によりそれらが抑制可能であり、ステロイド注射時に PRP を併用することで、ステロイドによる腱脆弱化を軽減できる可能性が示された。

本研究は、ステロイドと PRP のヒト腱板由来細胞に対する影響について研究したものであるが、従来行われていなかった、ステロイドのヒト腱板由来細胞に対する弊害が、PRP により予防が可能ということを初めて証明した報告である。腱炎などへのステロイド注射時に PRP を併用することが、新たな治療アプローチと成り得るとした点で価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。