



# The effect of platelet-rich plasma on degeneration change of rotator cuff muscles: in vitro and in vivo evaluations

Takase, Fumiaki

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6786号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006786>

※ 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。



(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### The effect of platelet-rich plasma on degeneration change of rotator cuff muscles: *in vitro* and *in vivo* evaluations

腱板筋の変性に対する PRP の投与効果の検討 : *in vitro* 及び *in vivo* 実験系において

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：黒田良祐教授

高瀬 史明

#### 【目的】

肩腱板断裂は日常診療で比較的良好に遭遇する疾患であり、広範囲腱板断裂に伴って腱板筋の萎縮や脂肪変性が引き起こされる。一度腱板筋の変性が生じるとたとえ修復術が行われたとしてもその回復は困難である。また、腱板筋の変性が進行すると術後再断裂のリスクが高まり、肩の機能予後を悪化させるとされている。従って、腱板筋の変性を予防する事が肩関節の機能を維持する上で非常に重要である。一方で、platelet-rich-plasma (PRP)はその中に含まれる様々な成長因子の作用によって筋や腱の治癒・再生を促す事が近年報告されてきた。しかし PRP が腱板筋の変性に及ぼす効果は未だ不明である。今回我々は、マウス筋芽細胞株 (C2C12)の脂肪分化および筋分化およびラット腱板断裂モデルにおける PRP 投与効果の検討を行った。

#### 【方法】

*in vitro* 実験として、C2C12 を 1.通常培地群、2.脂肪分化培地群、3.脂肪分化培地+10%PRP 群、4.筋分化培地群、5.筋分化培地+10%PRP 群の 5 群の条件下にそれぞれ培養した。筋分化の評価として、分化誘導 3 日後に筋分化関連調節転写因子である pax7 および myogenin の発現を測定し、7 日後に細胞形態を明視野および免疫染色法を用いて観察した。また cell viability の差異を分化誘導 24 時間後に WST 法を用いて検討した。脂肪分化の評価として、分化誘導 3 日後に real-time PCR により脂肪分化関連調節転写因子である proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  および CCAAT/enhancer binding protein (CEBP)  $\alpha$  の発現を測定し、7 日後に脂肪滴を同定するためにオイルレッド O 染色を施行した。

*in vivo* 実験として 12 週齢の SD ラット 5 匹を用いて、腱板筋の変性を誘発するために両肩ともに棘上筋と棘下筋の全層断裂モデルを作成した。術中、左肩峰下腔に生理食塩水(コントロール群)、右肩峰下腔には PRP (PRP 群)をそれぞれ投与した。術後 1 か月、棘上筋の湿性筋重量を比較した。また、real-time PCR を用いて棘上筋における PPAR $\gamma$ 、CEBP  $\alpha$ 、筋萎縮関連遺伝子とされる Muscle RING Finger Protein-1 (MuRF-1)および atrogen-1 の発現を測定した。組織学的な評価として、筋内の脂肪滴を同定するために棘下筋を用いてオイルレッド O 染色を行った。

#### 【結果】

*in vitro* 実験では、筋分化培地群における pax7 および myogenin の発現が PRP を投与する事で有意に抑制された。細胞形態は、筋分化培地群で認められた筋管形成が PRP を投与する事で抑制された。免疫染色を用いて半定量を行ったところ有意差を認めた。筋分化培地群における cell viability に関しては、PRP を投与する事で有意に増加した。脂肪分化培地群にて認めた PPAR $\gamma$  および CEBP  $\alpha$  の発現は PRP を投与する事で有意に抑制され、オイルレッド O 染色では脂肪分化培地群で観察された脂肪滴が PRP を投与する事で有意に減少した。

in vivo 実験では、両群間に湿性筋重量の差は認めず、MuRF-1 および atrogin-1 の発現にも差は認めなかった。PPAR $\gamma$  および CEBP $\alpha$  の発現は、PRP 群においてコントロール群よりも有意に抑制された。オイルレッド O 染色ではコントロール群において筋内腱周囲から筋線維間に広がって見られた脂肪滴が、PRP 群では筋内腱周囲にとどまっていた。

#### 【考察及び結論】

腱板断裂にともなう腱板筋の変性のメカニズムとして種々の報告がなされているが、その一つに筋肉内に含まれる筋芽細胞の分化の関与が報告されている。PRP は血小板の中に含まれる様々な成長因子によってその作用を発揮する。成長因子として、platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fibroblastic growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF), and epidermal growth factor (EGF)が挙げられる。IGF 以外のこれらの成長因子は、筋芽細胞の増殖を促し分化を抑制する事がこれまでに報告されている。今回の in vitro 実験では、PRP が筋芽細胞の増殖を促進し分化を抑制する事が示された。また in vivo 実験では、PRP が腱板筋の筋萎縮に与える影響は認めなかった。骨格筋の恒常性には筋芽細胞の増殖と分化のバランスが重要であるとされており、PRP は筋芽細胞の分化は妨げるものの増殖を促進させるため、腱板筋の萎縮に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。一方、脂肪分化については PRP の投与により前脂肪細胞である 3T3-L1 やマウスの骨髄細胞の脂肪分化を抑制するといった報告がある。これは PRP に含まれる TGF- $\beta$  による作用と考えられているが、PRP が骨格筋由来細胞に及ぼす影響はわかっていない。本研究では PRP の投与により筋芽細胞の脂肪分化が抑制されることが示された。またラット腱板断裂モデルにおいても、PRP の投与により腱板筋の脂肪変性が抑制された。これらの結果から PRP が腱板筋の脂肪変性を抑制するツールとなる可能性が考えられるが、実際の臨床応用には更なる研究が必要とされる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2647 号	氏 名	高瀬 史明
論文題目 Title of Dissertation	<p>The effect of platelet-rich plasma on degeneration change of rotator cuff muscles: in vitro and in vivo evaluations</p> <p>腱板筋の変性に対する PRP の投与効果の検討: in vitro 及び in vivo 実験系において</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 寺島 浩人 Chief Examiner</p> <p>副 査 大野 良治 Vice-examiner</p> <p>副 査 旬坂 敏朗 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

肩腱板断裂は日常診療でよく遭遇する疾患であり、断裂に伴って肩腱板筋の萎縮や脂肪変性が引き起こされる。一方で、platelet-rich plasma (PRP)はその中に含まれる様々な成長因子の作用によって筋や腱の治癒・再生を促す事が近年報告されてきた。しかし PRP が肩腱板筋の変性に及ぼす効果は未だ不明である。今回研究者らは、肩腱板筋の変性に対する PRP 投与効果の検討を行った。

#### 方法

*in vitro*実験として、マウス筋芽細胞株である C2C12 を 1.通常培地群、2.脂肪分化培地群、3.脂肪分化培地+PRP 群、4.筋分化培地群、5.筋分化培地+PRP 群の 5 群の条件下に培養した。筋分化の評価として細胞形態を観察し、real-time PCR により筋分化関連遺伝子である pax7 および myogenin の発現を測定した。また細胞増殖能の差異を WST 法を用いて検討した。脂肪分化の評価として、脂肪滴を同定するためにオイルレッド O 染色を行った。また、real-time PCR により脂肪分化関連遺伝子である PPAR $\gamma$  および CEBP $\alpha$  の発現を測定した。

*in vivo*実験として SD ラット 5 匹の両肩腱板断裂モデルを作成した。術中、左肩峰下腔に生理食塩水(コントロール群)、右肩峰下腔に PRP(PRП 群)をそれぞれ投与した。術後 1 か月、肩腱板筋の湿性筋重量を比較した。また、real-time PCR により PPAR $\gamma$  および CEBP $\alpha$ 、筋萎縮関連遺伝子である MuRF-1 および atrogen-1 の発現を測定した。組織学的な評価として、筋内の脂肪滴を同定するためにオイルレッド O 染色を行った。

#### 結果

*in vitro*実験において、細胞形態は筋分化培地群で認められた筋管形成が PRP を投与する事で抑制され、筋分化関連遺伝子の発現も PRP を投与する事で有意に抑制された。細胞増殖能は、PRP を投与する事で有意に増加した。また、オイルレッド O 染色では脂肪分化培地群で観察された脂肪滴が PRP を投与する事で有意に減少し、脂肪分化関連遺伝子の発現も PRP を投与する事で有意に抑制された。

*in vivo*実験では、両群間に湿性筋重量の有意差は認めず、筋萎縮関連遺伝子の発現にも有意差は認めなかった。脂肪分化関連遺伝子の発現は、PRP 群においてコントロール群よりも有意に抑制された。オイルレッド O 染色ではコントロール群において筋内腱周囲から筋線維間に広がって見られた脂肪滴が、PRP 群では筋内腱周囲にとどまっていた。

#### 考察および結論

骨格筋の恒常性には筋芽細胞の増殖と分化のバランスが重要であるとされている。今回の *in vitro* 実験では、PRP が筋芽細胞の増殖を促進し分化を抑制する事が示された。また *in vivo* 実験では、PRP が腱板筋の筋萎縮に与える影響は認めなかった。PRP は筋芽細胞の分化は妨げるものの増殖を促進させるため、腱板筋の萎縮に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。一方、脂肪分化について本研究では PRP の投与により筋芽細胞の脂肪分化が抑制されることが示され、ラット腱板断裂モデルにおいても PRP の投与により腱板筋の脂肪変性が抑制された。これらの結果から PRP が腱板筋の脂肪変性を抑制するツールとなる可能性が考えられるが、実際の臨床応用には更なる研究が必要とされる。

本研究は、骨格筋に対する PRP 投与効果の研究を行ったものであるが、従来ほとんど行われなかった肩腱板筋の変性に対する PRP 投与効果について証明した報告である。肩腱板筋の変性に対して PRP を用いることが、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。