

論文内容要旨

Human platelet-rich plasma promotes axon growth in brain-spinal cord coculture

(脳脊髄器官共培養においてヒト多血小板血漿は軸索成長を促進する)

Neuroreport,23(12):712-716, 2012.

主指導教員：越智 光夫 教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：下瀬 省二 准教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹 教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

竹内 実知子

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

中枢神経系は再生能力に乏しく損傷されると修復が困難である。しかし近年、神経損傷部位に発現する軸索伸長阻害因子の報告や、神経幹細胞移植や神経栄養因子の補充による神経再生の可能性が示唆されている。多血小板血漿 Platelet-rich plasma (PRP) は、血液を抗凝固剤存在下で遠心分離して濃縮された血小板を多量に含む血漿である。血小板を活性化させると α 顆粒が放出され成長因子 platelet-derived growth factors (PDGF)、vascular endothelial growth factors (VEGF)、insulin-like growth factors (IGF)、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) なども放出される。PRP はヒト末梢血から作成可能で安全で容易に採取できる。また、骨芽細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、上皮細胞などを増殖させる作用があり、骨の再生や創傷治療、軟部組織再生などの分野ですでに臨床応用されており、成長因子の供給源として臨床応用の実現性が高いと考えられる。PRP は中枢神経の軸索伸長に関与すると報告のある VEGF を含んでおり、PRP 中の IGF-1 が坐骨神経を再生させるなど末梢神経の再生を促進するとの報告がある。しかし PRP の中枢神経再生への臨床応用の研究報告はない。本研究では、脳皮質から脊髄内へ軸索再生現象を定量的に観察できる脳・脊髄器官共存培養を用いて、ヒト末梢血由来の PRP が中枢神経の軸索再生に与える影響について明らかにすることを目的とした。

ヒト末梢血 200ml を遠心処理し PRP 約 10ml を作成しロビンリンを混和して PRP を活性化させた。活性化後 PRP 由来の PDGF-AB、VEGF、IGF-1、TGF- β 1 の濃度を ELISA 法で測定した。脳・脊髄器官共存培養は、出生後 3 日目の SD ラットから脳と胸髄を採取し、400 μ m 厚にスライスした知覚運動野の脳皮質と縦方向に半割した胸髄を 1ml の培養液が入った membrane 上で接触させ 14 日間共存培養した(対照群)。軸索伸長に適した PRP の投与量を決めるため共存培養組織の培地に PRP を 50 μ l まぜた群 (PRP5%群)、100 μ l まぜた群 (PRP10%群)、200 μ l まぜた群 (PRP20%群) を作成した。脳皮質から脊髄へ伸長する軸索を 14 日間培養後に Dil を用いた順行性トレースで標識し、蛍光顕微鏡下で観察した。軸索伸長の評価は脳皮質と脊髄との境界部から 500、1000、1500 μ m の距離の基準線を超える軸索の本数を数えた。統計的解析に Kruskal-Wallis テストを用いた。また、軸索伸長に関与する成長因子を同定するため PRP 50 μ l に各中和抗体を加えた VEGF 抗体群、PDGF-AB 抗体群、IGF-1 抗体群、TGF- β 1 抗体群を作成し、各軸索数を計測して PRP5%群と比較検討した。

PRP の血小板数は 267000 で全血の血小板数の 11.3 倍に濃縮され、含まれる成長因子の濃度は、PDGF-AB 138.7ng/ml、VEGF 2.82ng/ml、IGF-1 90.2ng/ml、TGF- β 1 202ng/ml で有効な PRP が作成できたことを確かめた。軸索伸長において、各基準線を越える軸索の本数は PRP5%群、PRP10%群とも対照群より有意に多く PRP が軸索伸長を促進したが、PRP5%群と PRP10%群に有意差は認めなかった。一方 PRP20%群は培養中に組織が死滅した。PRP に各中和抗体を加えた軸索計測では PRP5%群と比較して、500 μ m で VEGF 抗体群と IGF-1 抗体群は有意に少なく、TGF- β 1 抗体群は有意に多かった。1000 μ m で VEGF 抗体群は有意に少なく、TGF- β 1 抗体群は有意に多かった。1500 μ m で TGF- β 1 抗体群は有意に多かった。

PRP が皮質脊髄路の軸索再生を促進した。IGF-1 抗体群と VEGF 抗体群は軸索数が少なく、IGF-1 と VEGF が軸索伸長を促進すると考えた。一方 TGF- β 1 抗体群は軸索数が多く軸索伸長を阻害し、PDGF-AB 抗体群は軸索数に有意差を認めなかったので今回の実験では軸索伸長に関与しないと考えた。PRP は末梢血から容易に採取可能で中枢神経再生に対する臨床応用の可能性が示唆された。