

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 医 学 ）	氏名	竹内実知子
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論 文 題 目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	橋本 浩一	
審査委員	教 授	栗栖 薫	
審査委員	教 授	一戸 辰夫	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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 (PDGFs)、vascular endothelial growth factors (VEGFs)、insulin-like growth factors (IGFs)、transforming growth factor-β 1 (TGF-β 1) 等も放出される。PRP はヒト末梢血から作成できる。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、軟部組織再生等の分野ですでに臨床応用され、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 や IGF-1 がラット坐骨神経を再生させる等末梢神経の再生を促進するとの報告もある。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 を作成しトロンビンで活性化した。活性化 PRP の PDGF-AB、VEGF、IGF-1、TGF-β 1 の濃度を ELISA 法で測定した。</p>			

脳・脊髄器官共培養は、出生後 3 日目の SD ラットから脳と胸髄を採取し、400 μm 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 $n=12$)。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 μl まぜた群 (PRP5%群 $n=12$)、100 μl まぜた群 (PRP10%群 $n=12$)、200 μl まぜた群 (PRP20%群 $n=12$) 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 DiI 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 μm の距離の基準線をこ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。軸索伸長に関与する成長因子を同定するため、PRP 50 μl に各中和抗体を加えた VEGF 中和抗体群、PDGF 中和抗体群、IGF-1 中和抗体群、TGF- β 1 中和抗体群 (各 $n=12$) を作成し、各々の軸索数を計測して抗体投与のない PRP5%群との比較を行った。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、成長因子の濃度は PDGF-AB 138.7ng/ml、VEGF 2.8ng/ml、IGF-1 90.2ng/ml、TGF- β 1 202.0ng/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、各基準線をこえる軸索の本数は PRP5%群 (500 μm ; 13.2 \pm 3.9 本, 1000 μm ; 6.6 \pm 3.4 本, 1500 μm ; 2.1 \pm 1.6 本 (平均値 \pm SD))、PRP10%群 (500 μm ; 15.7 \pm 3.3 本, 1000 μm ; 8.2 \pm 2.8 本, 1500 μm ; 2.7 \pm 1.7 本) と対照群 (500 μm ; 9.0 \pm 3.1 本, 1000 μm ; 1.8 \pm 2.3 本, 1500 μm ; 0.1 \pm 0.3 本) より有意に多く ($p<0.05$) PRP が軸索伸長を促進した。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。機能阻害抗体の効果を確かめるため、500 μm 地点における軸索本数を比較したところ、PDGF 中和抗体群 (13.2 \pm 3.9 本) は影響されなかったが、VEGF 中和抗体群 (4.1 \pm 1.6 本) と IGF-1 中和抗体群 (5.5 \pm 2.9 本) は抑制された ($p<0.05$)。一方、TGF- β 1 の中和抗体群 (24.9 \pm 13.7 本) は逆に軸索伸長が有意に亢進することが分かった ($p<0.05$)。以上の結果より、PRP に皮質脊髄路の軸索再生を促進する効果があることが明らかとなった。PRP による軸索伸張は、IGF-1 中和抗体群と VEGF 中和抗体群で抑制されたため、IGF-1 と VEGF には軸索伸長を促進する効果があることが示唆された。一方 TGF- β 1 中和抗体群では軸索数が多く、TGF- β 1 は PRP による軸索伸長を阻害する効果があることが示唆された。

以上の結果から、本論文はヒト多血小板血漿は中枢神経の軸索伸長促進作用を示すことが明らかとなった。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を秘めている。本研究の成果は中枢神経損傷に対する治療の発展に大いに貢献すると期待される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。