

富血小板血漿が間葉系幹細胞の増殖速度と分化能に及ぼす影響

応用生物科学専攻 食資源科学講座 副生物科学 天野智弘

1. はじめに

間葉系幹細胞 (MSC) は骨髄や脂肪等に存在し、多分化能と自己複製能を持つ体性幹細胞である。MSC は多くの幹細胞が持つ倫理, 安全に関する問題を持たない。更に患者自身から採取可能で, 免疫拒絶反応を回避できることから, 臨床応用が進行している。しかし, 採取時の数が少ないことから, 多分化能を維持させながらも, 効率良く迅速に増殖させる必要がある。一方, 血小板は創傷治癒等に寄与する多様な成長因子を含む。近年再生医療において, 血小板を濃縮した富血小板血漿 (PRP) が注目されている。PRP は組織への局所注射等の方法で臨床応用が進行している。そこで, PRP が MSC の増殖速度と分化能に与える影響について検討した。

2. 方法

まず, ラットの大腿骨骨髄から採取した MSC を, 初代から 3 度の継代を経るまで, PRP を添加した増殖培地中で培養した。この際, コンフルエントに至るまでの時間と, 細胞数を測定し, 増殖速度を評価した。そして増殖培養を終えた後, PRP を添加した骨芽細胞, 脂肪細胞分化誘導培地中で 9 日間分化誘導培養を行った。その細胞層と培地を各種指標検定で分析し, 分化能を評価した。骨芽細胞分化の指標検定としては, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定, アリザリンレッド S 染色, 骨指標タンパク質の免疫染色および骨指標遺伝子の mRNA 相対発現量測定等を行った。脂肪細胞分化の指標検定としては, オイルレッド O 染色, 基底膜関連細胞外マトリックス (ECM) の免疫染色および指標遺伝子類の mRNA 相対発現量測定等を行った。増殖培養, 分化誘導培養の 2 段階で, それぞれ PRP 添加, 無添加 (PBS 添加) に分け, 4 区間で比較検討した。

3. 結果

増殖速度については, PRP 添加により各継代に要する時間が減少し, 継代時の細胞数が増加した。つまり, 少ない時間で多くの細胞数を得ることが出来た。分化能については, 多くの指標検定で増殖培地への PRP 添加により, 分化はより進行していた。しかし, 分化誘導培地への PRP 添加による効果は見られなかった。代表的な骨指標遺伝子である I 型コラーゲン遺伝子 (*COL1A1*) の mRNA 相対発現量は, 増殖培地のみへの PRP 添加で有意に増加していたが, PRP の分化誘導培地のみへの添加では有意な増加はみられなかった。他にも, 脂肪細胞周囲の基底膜の主要な構成要素であるラミニンについて免疫染色を行ったところ, 同様の傾向が確認された。

4. まとめ

骨髄由来 MSC の増殖培地に PRP を添加することで, 増殖速度が向上した。その結果, 分化能を維持したまま分化を開始でき, 分化がより進行することが示唆された。更なる臨床応用の進行の為に, 血小板に含まれる成長因子の種類や量について詳細に把握し, その作用機序を解析することや, 脂肪組織由来 MSC で同様の検討を行うことが有益と考える。