

# 論 文 要 旨

## Platelet-rich Plasma Enhances the Proliferation of Human Adipose Stem Cells Through Multiple Signaling Pathways

(ヒト脂肪幹細胞における多血小板血漿 (Platelet-rich plasma : PRP) の増殖効果とシグナル伝達経路の検討)

関西医科大学形成外科学講座  
(指導：楠本 健司 教授)

来 方 远

## 【はじめに】

ヒト脂肪幹細胞 (Human adipose-derived stem cells; hASCs) は、ヒト脂肪組織から分離することができる体性幹細胞のうちの一つで、多分化能を有する自己由来の間葉系幹細胞である。骨髄間葉系幹細胞に比較し全身に豊富に存在し、分離が簡便であるという利点があるために、hASCs は形成外科、泌尿器科や循環器内科等の再生医療分野で使用されつつある。再生医療で使用するために分離した幹細胞を、細胞培養で増殖させて治療に役立たせるには十分量の細胞を得ることが必要である。一方、多血小板血漿 (Platelet-rich plasma: PRP) は血小板を多量に含んだ血漿で、血小板中の $\alpha$ 顆粒由来の組織再生に必要な細胞増殖因子を含んでいる。これらの細胞増殖因子は血小板を活性化することにより $\alpha$ 顆粒から多種多量に放出することができる。PRP中に含有される血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor: PDGF) BB は、ヒト脂肪細胞の有糸分裂促進物質のうちの一つであることが知られている。我々は、活性化されたPRPはhASCsの増殖を促進させることを既に報告したが、PRPによって活性化されるシグナル伝達経路機構および増殖促進の鍵となるPRP中の細胞増殖因子については、これまで解明されていなかった。

今回、脂肪幹細胞のPRPによる細胞増殖の検討とその細胞内情報伝達経路の解明を目的とする研究を行った。

## 【研究方法】

PRPを全血よりdouble-spin法によって調製し、トロンビンと塩化カルシウムで活性化を行い、血小板数と細胞増殖因子の含有量をELISA法により測定した。hASCsをPRPまたはPDGF-BBと共に培養し、増殖を評価した。PRPまたはPDGF添加時におけるPDGF受容体阻害剤(imatinib、sorafenib)による細胞増殖阻害効果と細胞周期を解析した。また、PRP存在下のシグナル伝達酵素群の阻害剤(PD98059、LY29402、SP600125およびSB203580)添加による効果を検討した。PRP添加時のERK1/2、PI3K/Akt、およびJNKのリン酸化をWestern blotting (ERK1/2、PI3K/Akt)とJNK activity assay (JNK)により検討した。細胞周期は、Muse™ Cell Analyzer (Millipore)を用いてDNAのフローサイトメトリー定量によって分析した。

## 【結果】

PRPは全血血漿と比較して、血小板は10.1倍濃縮、PDGF-BBは25.9倍濃縮された。1%PRPまたは10ng/ml PDGF-BBで処理するとヒト脂肪幹細胞の増殖が促進され、imatinibとsorafenibの両者ともこの増殖効果を阻害した。抗PDGF受容体抗体、imatinibやsorafenibはPRPまたはPDGF-BBによるhASCsの増殖を有意に低下させた。PRP添加時のhASCsの増殖は、PD98059、LY29402、SP600125およびSB203580でも阻害され、Western blottingによりERK1/2、PI3K/Akt、およびJNKのリン酸化の増加を確認した。PRP添加時の細胞周期は、S期の細胞が無添加群に比較して12%増加し、G2/M期の細胞が無添加群に比

較して 19%増加した。

**【結論】**

本研究により、PRP は、ERK1/2、PI3K/Akt および JNK シグナル伝達経路を介して hASCs の増殖を促進することが明らかになった。また、PRP による脂肪幹細胞の増殖促進において、PRP 中の PDGF-BB が hASCs の増殖を誘導する主要な細胞増殖因子であることが確認できた。本研究によって、PRP を用いた hASCs の増殖促進機構が明らかになり、脂肪幹細胞の新たな大量培養法の開発につながる可能性があると考えている。