

異なるキットで作製した多血小板血漿 (PRP) の作用機序の検討

内山綾香^{*1, 2)}, 豊田恵利子^{*1, 2)}, 濱橋恒介^{*1, 2)}, 和才志帆^{*1, 2)}
大村はるか^{*1, 2)}, 玉木美夕^{*1, 2)}, 小川 真^{*1, 2)}, 田中竜実^{*1, 2)}
岸 達也^{*1, 2)}, 渡辺雅彦^{*1, 2)}, 佐藤正人^{*1, 2)}

変形性膝関節症に対する保存療法の選択肢として、多血小板血漿 (PRP) 療法が注目されている。PRP は分離機器ごとに成分組成が異なることが知られている。セルエイド® Pタイプ (ジェイ・エム・エス社) では赤血球と白血球をほぼ含まず transforming growth factor β (TGF β) が豊富な PRP が作製され、軟骨組織保護に有効な可能性がある。自己タンパク質溶液分離キット (Zimmer Biomet 社) は白血球が多く interleukin 1 receptor antagonist (IL1RA) が豊富な PRP が作製され、高い抗炎症効果をもつ可能性がある。したがって、分離機器ごとに PRP の作用機序は異なることが予想され、症状に応じた選択を柔軟に考える必要がある。

Key Words 変形性膝関節症 (osteoarthritis of the knee : OAK), 多血小板血漿 (platelet rich plasma : PRP), 少白血球多血小板血漿 (leukocyte poor PRP : LP-PRP), 自己タンパク質溶液 (autologous protein solution : APS)

はじめに

変形性膝関節症 (osteoarthritis of the knee : OAK) を有する患者のほとんどが保存療法で加療されており、手術を受ける患者はごく一部である。近年新たな保存療法の選択肢として、多血小板血漿 (platelet rich plasma : PRP) 療法が注目されている。PRP 療法は再生医療等の安全性の

確保等に関する法律のもと保険外診療で実施されており、高額にもかかわらず、第2種再生医療等提供計画の届出数は飛躍的な増加を遂げている¹⁾。現在国内で入手可能な PRP 分離機器は 10 種類以上あるが、分離機器ごとに作製時に必要な血液量や遠心回数などがさまざまであり、作製される PRP の成分組成も異なることが知られている。そのため、白血球を多く含む PRP (leukocyte rich

*1) 東海大学医学部医学科外科学系整形外科学 [〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143] Department of Orthopaedics, Tokai University School of Medicine

*2) 東海大学大学院医学研究科運動器先端医療研究センター Center for Musculoskeletal innovative Research and Advancement (C-MiRA), Tokai University Graduate School

*利益相反 : なし

Title A Review of the Mechanisms of PRP Purified by Different Kits

Authors Ryoka UCHIYAMA^{*1, 2)}, Eriko TOYODA^{*1, 2)}, Kosuke HAMAHASHI^{*1, 2)}, Shiho WASAI^{*1, 2)}, Haruka OMURA^{*1, 2)}, Miyu TAMAKI^{*1, 2)}, Makoto OGAWA^{*1, 2)}, Tatsumi TANAKA^{*1, 2)}, Tatsuya KISHI^{*1, 2)}, Masahiko WATANABE^{*1, 2)}, Masato SATO^{*1, 2)}

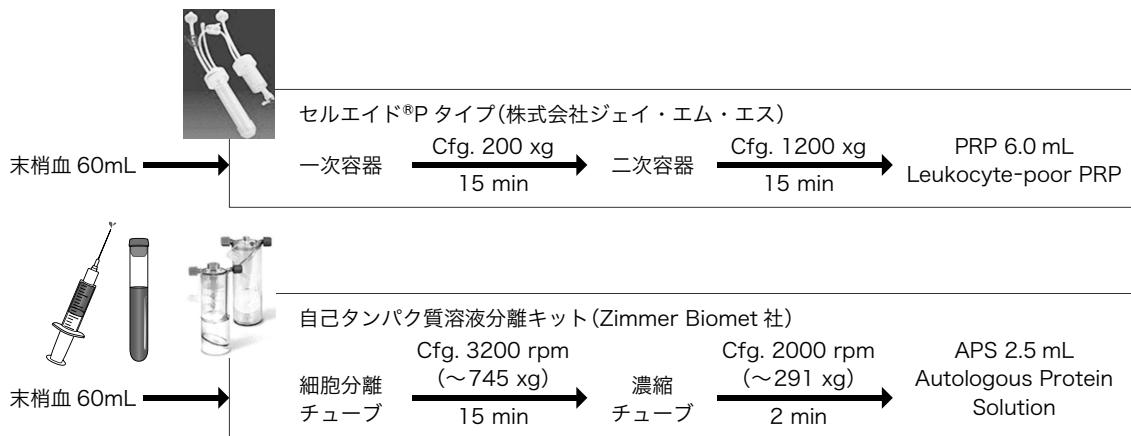


図1 それぞれの分離機器による PRP 作製方法

Cfg : centrifuge, PRP : platelet rich plasma
(各キットの取扱説明書より改変して転載)

PRP : LR-PRP)と白血球をあまり含まない PRP (leukocyte poor PRP : LP-PRP)などの分類がなされてきたが、血小板の濃縮程度もさまざまであり、分離機器の数だけ PRP の種類があると考えるのが妥当である。本稿では、当院の自由診療 [第2種再生医療等提供計画(治療)] にて使用している2種の PRP 分離機器により作製される PRP に着目し、これまで明らかになっている成分組成や作用機序について解説する。

PRP の成分組成

本稿で解説する PRP 分離機器は、セルエイド® P タイプ(ジェイ・エム・エス社)と自己タンパク質溶液分離キット (Zimmer Biomet 社)の2種である。それぞれの分離機器の PRP 作製方法を図1に示す。セルエイド® P タイプは1キット当たり約 20 mL の末梢血から、2回の遠心を経て約 2.0 mL の PRP (以下、J-PRP)が作製される。一方、自己タンパク質溶液分離キットは1キット当たり約 60 mL の末梢血から、2回の遠心を経て約 2.5 mL の PRP が作製される。この PRP は作製過程でポリアクリルアミドビーズによる脱水・活性化処理を行うことから、自己タンパク質溶液 (autologous protein solution : APS) とされ、通

常の PRP とは区別されることもある。当院では同量の血液から作製した PRP の効果を比較検討するため、セルエイド® P タイプは1膝当たり3セット用い、約 60 mL の血液から約 6.0 mL の PRP を作製し投与している(図1)。

それぞれの PRP は含まれる成分組成が大きく異なる。健常者末梢血から作製した PRP に含まれる血球細胞数を測定した結果、J-PRP は血小板を末梢血の約 5 倍含む一方、赤血球と白血球をほとんど含まなかった。APS は血小板数が末梢血の約 6 倍であり、赤血球が末梢血の約 0.5 倍、白血球が末梢血の約 9 倍含まれていた(図2)²⁾。さらに、OAK において作用機序や有効性について報告のある主要な液性因子の含有量について、それぞれ投与量換算して比較した(表1)^{2, 3)}。その結果、J-PRP, APS いずれも血管新生作用を有する vascular endothelial growth factor (VEGF)、軟骨の分解などに作用する matrix metalloproteinase 3(MMP3)など、OAK の進行への関与が報告されている因子が含まれる一方、軟骨細胞のアポトーシスの抑制とコラーゲンマトリックスの産生を誘導する platelet-derived growth factor (PDGF) や、プロテオグリカン分解を抑制する interleukin (IL)4 なども含まれることが明らかとなった⁴⁻⁷⁾。なかでも、J-PRP には特に軟骨の恒常性維持やマクロファージの誘導に関与する

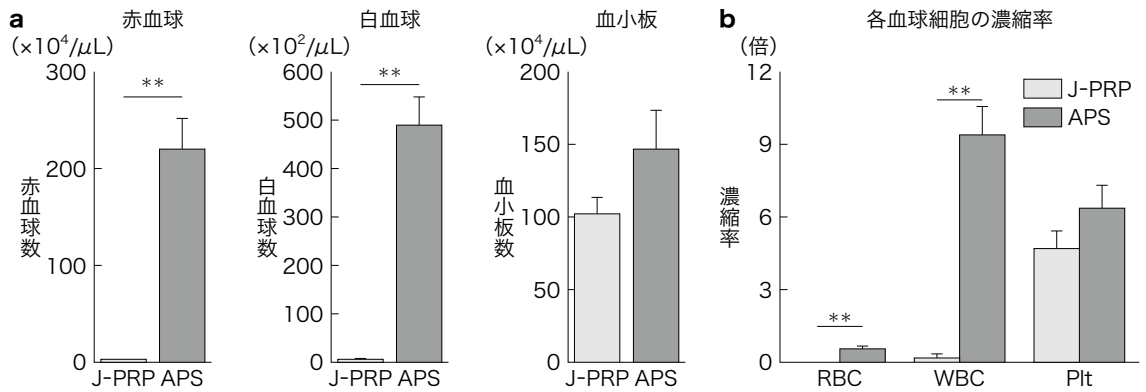


図2 それぞれの分離機器で作製した PRP の血球細胞数分析の結果

a : 血球細胞ごとの細胞数比較

b : 各血球細胞の濃縮率

健常者(n=6, 年齢=38.6±11.0)より末梢血を採取し PRP を作製, 平均±標準誤差, paired t-test, ** p<0.01, RBC : red blood cell, WBC : white blood cell, Plt : platelet (文献2より改変して転載)

表1 それぞれの分離機器で作製した PRP における主要液性因子の投与量の比較(pg)

因子	J-PRP	APS	p-value
TNF α	99.5±8.54	65.1±6.74	0.009
IFN γ	80.7±18.01	38.4±7.63	0.009
MMP3	99,877.8±18,857.03	70,962.9±14,235.45	0.005
VEGF	492.4±186.01	632±163.07	0.022
PDGF	6,296.7±772.29	3,996±619.51	0.037
TGF β	1,043,238±207,584.61	366,047.5±77,947.37	0.009
IL4	97.4±20.9	48.5±7.79	0.007
IL1R2	10,477.3±1,081.66	6,530.9±778.5	0.005
IL1RA	2,462.3±1,707.14	129,813.3±23,738.61	0.005

平均±標準誤差, paired t-test.

TNF α : tumor necrosis factor α , IFN γ : interferon γ , MMP3 : matrix metalloproteinase 3, VEGF : vascular endothelial growth factor, PDGF : platelet-derived growth factor, TGF β : transforming growth factor β , IL4 : interleukin 4, IL1R2 : interleukin 1 receptor type, IL1RA : IL1 receptor antagonist

(文献2, 3より改変して転載)

transforming growth factor β (TGF β) が APS の約3倍多く含まれていた⁸⁾。一方, APS は特に IL1 β を拮抗阻害し炎症抑制作用をもつ IL1 receptor antagonist (IL1RA) が J-PRP と比較して約50倍多く含まれていた(表1)⁹⁾。

PRP の作用機序

PRP の作用機序については, これまでさまざまな報告がある。

分離機器は異なるが J-PRP と類似する LP-PRP を用いた検証について, Simental-Mendia ら¹⁰⁾ は2回の遠心操作で作製した LP-PRP を,

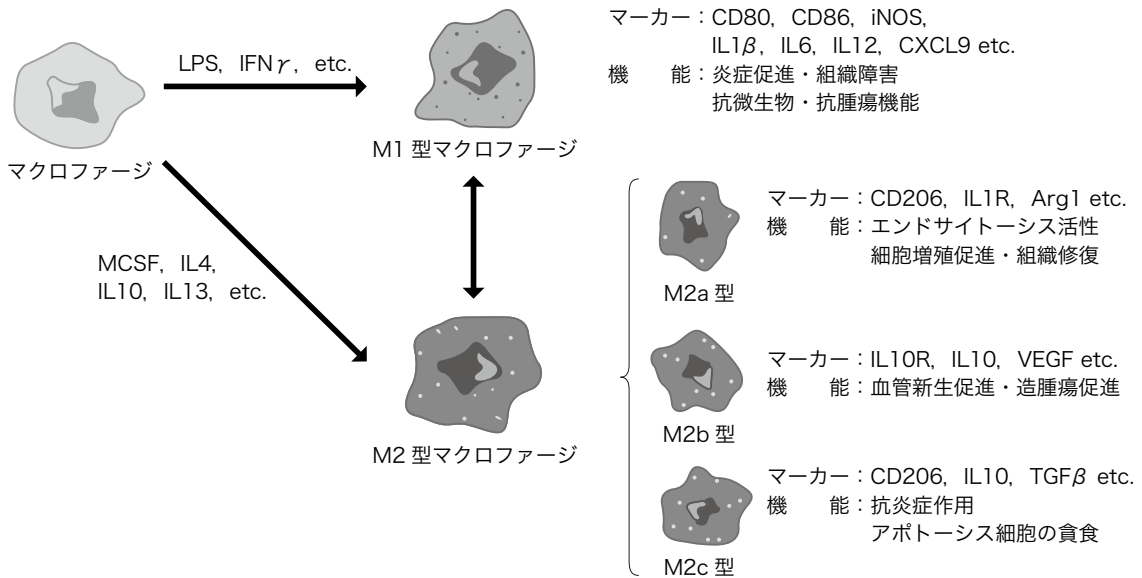


図3 マクロファージの極性化概略

Arg1 : arginase 1, CXCL9 : C-X-C Motif ligand 9, IL : interleukin, IL10R : IL10 receptor, iNOS : inducible nitric oxide synthase, IFN γ : interferon γ , LPS : lipopolysaccharide, MCSF : macrophage colony stimulating factor, VEGF : vascular endothelial growth factor
(文献 13~16 より改変して転載)

IL1 β を添加した培養軟骨細胞または軟骨組織に加えて培養した。軟骨細胞における軟骨関連遺伝子と炎症関連遺伝子発現解析の結果、II型コラーゲン α 1やaggrecanの発現上昇とMMP13やIL1 β の発現低下を認めた。また、軟骨組織においてもII型コラーゲンの高い染色性が認められた。Zhangら¹¹⁾はウサギOAKモデルを用いてLP-PRPの有効性を検証し、LP-PRPを膝関節腔内に投与した群において組織評価スコアであるPelletier score, Mankin's score, さらにII型コラーゲンの染色性すべてにおいて改善を認めた。APSでは、Woodell-Mayら¹²⁾が、*in vitro*においてヒト関節軟骨にAPSを添加し2時間培養した後、APSを除いてIL1 β もしくはtumor necrosis factor α (TNF α)を添加してさらに培養し、軟骨細胞のMMP13産生を測定した。結果、APSは軟骨細胞のMMP13産生を約80%抑制し、7日間培養でも同等の効果を認め、APSはIL1 β もしくはTNF α により誘導されるMMP13産生を阻害する効果があることを示した。

また近年、OAKの進行に対し、滑膜などに存

在するマクロファージの関与が示唆されている²⁾。マクロファージは周囲の微小環境に応答してM1とM2の表現型に極性化することが明らかとなっている。M1型(classically activated macrophage)はinterferon γ (IFN γ)やlipopolysaccharide (LPS)により誘導され、TNF α やIL1などの炎症性サイトカインを高発現することで組織の分解や炎症を促進する。一方、M2型(alternatively activated macrophage)はIL4などにより誘導され、IL10などの抗炎症性サイトカインを高発現することで炎症の抑制や組織修復に働くとされ、さらにその特徴ごとにM2a, M2b, M2cの3つに細分化される。またマクロファージは、一度極性化した後もその表現型を変化させ、極性転換することが可能である(図3)¹³⁻¹⁶⁾。

ヒト末梢血由来単球を分化させたマクロファージにそれぞれのPRPを添加してその表現型を評価した結果、PRPはマクロファージのM1型への極性化を抑制した一方、M2型への極性化を促進した(図4a)。またマクロファージの極性転換の性質を考慮し、M1型でも同様の実験を行った

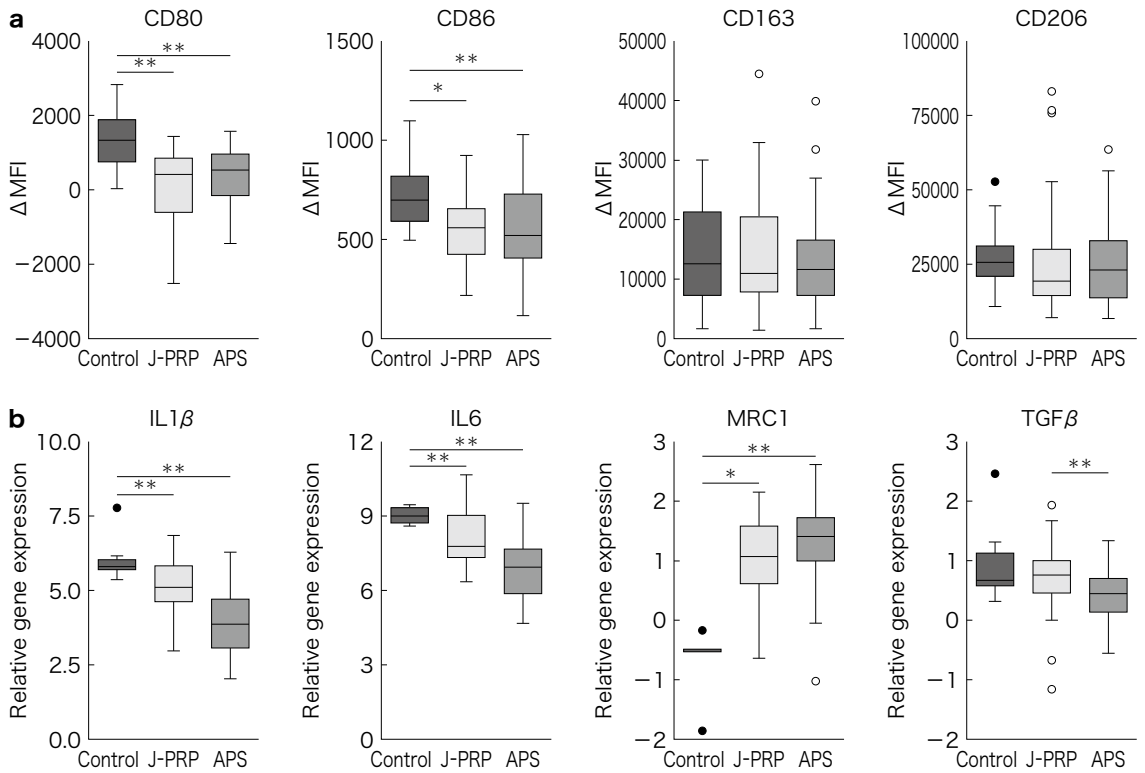


図4 それぞれのPRPのマクロファージ極性化作用検討の結果

a : マクロファージに PRP を添加したときの M1/M2 細胞表面マーカーの変動。フローサイトメトリーにて測定、 Δ mean fluorescence intensity (MFI) = (sample MFI) - (isotype control MFI), CD80, CD86 : M1 型マーカー, CD163, CD206 : M2 型マーカー。Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。
b : M1 型マクロファージに PRP を添加したときの M1/M2 マーカー遺伝子発現の変動。qRT-PCR にて測定, IL1 β , IL6=M1 型マーカー, MRC1, TGF β =M2 型マーカー。Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。
MRC1 : mannose receptor C-type 1, qRT-PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

結果, PRP は M1 型から M2 型への極性転換を促すことが明らかとなった(図4b)²⁾。さらに, 各 M1/M2 マーカーを精査すると, われわれが示した結果は, J-PRP は特に組織修復に関与する M2c 型へ, APS は特に抗炎症効果をもつ M2a 型への極性化を促す可能性を示唆している。したがって, OAK に対する J-PRP と APS の膝関節内の M1/M2 マクロファージを介した作用機序は異なる可能性が示唆された。

おわりに

分離機器により作製される PRP の成分組成は大きく異なり, OAK の疼痛緩和などに対する作

用機序が異なる可能性が示唆されている。そのため OAK の重症度や関節内の状態により, 治療に適した PRP も異なることが容易に予想される。現在, 国内において区別なく高額な保険外診療で実施されていることは患者負担の面からも何らかの対策が必要である。今後分離機器ごとの PRP の成分組成や作用機序などのプロファイリングを明示するなど, 医師にも患者にも情報を開示し, 患者の症状改善に最も有効と考えられる PRP とその分離機器を選択できるようになることが望ましいと考える。

●まとめ

●PRP は分離機器ごとに, 作製方法や作製され

る PRP の量, 含まれる血球細胞種, 液性因子量などが異なる。

- 膝関節内に投与される液性因子について J-PRP と APS を比較すると, J-PRP は特に TGF β が, APS は特に IL1RA が多く含まれていた。
- J-PRP と APS の作用機序を比較すると, J-PRP は軟骨組織における組織保護により, APS は高い抗炎症効果により, それぞれ OAK に対し疼痛軽減などの治療効果を発揮している可能性がある。

- OAK の重症度や関節の状態などにより, 最も有効な PRP が異なる可能性がある。そのため今後, 分離機器ごとの PRP の成分組成や作用機序の解明を進め, 適切な PRP が選択可能となることが望ましいと考える。

本研究における利益相反はない。また臨床検体の使用については, 東海大学臨床研究審査委員会の審査を経て, 被験者からの文書同意をもって実施した。

文献

- 1) 佐藤正人. 日本における再生医療の真実. 東京: 幻冬舎; 2018.
- 2) Uchiyama R, Toyoda E, Maehara M, et al. Effect of platelet-rich plasma on M1/M2 macrophage polarization. *Int J Mol Sci* 2021 ; **22**(5) : 2336. doi : 10.3390/ijms22052336.
- 3) Wasai S, Sato M, Maehara M, et al. Characteristics of autologous protein solution and leucocyte-poor platelet-rich plasma for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Sci Rep* 2020 ; **10**(1) : 10572. doi : 10.1038/s41598-020-67099-y.
- 4) Everts P, Onishi K, Jayaram P, et al. Platelet-rich plasma : new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *Int J Mol Sci* 2020 ; **21**(20) : 7794. doi : 10.3390/ijms21207794.
- 5) Yao Q, Wu X, Tao C, et al. Osteoarthritis : pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 2023 ; **8**(1) : 56. doi : 10.1038/s41392-023-01330-w.
- 6) Zhu P, Wang Z, Sun Z, et al. Recombinant platelet-derived growth factor-BB alleviates osteoarthritis in a rat model by decreasing chondrocyte apoptosis in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2021 ; **25**(15) : 7472-84.
- 7) Molnar V, Matišić V, Kodvanj I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2021 ; **22**(17) : 9208. doi : 10.3390/ijms22179208.
- 8) Shen J, Li S, Chen D. TGF- β signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Res* 2014 ; **2** : 14002. doi : 10.1038/boneres.2014.2.
- 9) Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, et al. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm* 2006 ; **74** : 371-403.
- 10) Simental-Mendía M, Vilchez-Cavazos F, García-Garza R, et al. The matrix synthesis and anti-inflammatory effect of autologous leukocyte-poor platelet rich plasma in human cartilage explants. *Histol Histopathol* 2018 ; **33**(6) : 609-18.
- 11) Zhang K, Zhang C, Ren Q, et al. Effects of leukocyte-rich platelet-rich plasma and leukocyte-poor platelet-rich plasma on cartilage in a rabbit osteoarthritis model. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2024 ; **70**(2) : 217-26.
- 12) Woodell-May J, Matuska A, Oyster M, et al. Autologous protein solution inhibits MMP-13 production by IL-1 β and TNF α -stimulated human articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2011 ; **29**(9) : 1320-6.
- 13) Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* 2019 ; **106**(2) : 345-58.
- 14) Bassiouni M, Arens P, Zabaneh SI, et al. The relationship between the M1/M2 macrophage polarization and the degree of ossicular erosion in human acquired cholesteatoma : an immunohistochemical study. *J Clin Med* 2022 ; **11**(16) : 4826. doi : 10.3390/jcm11164826.
- 15) Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. *Front Immunol* 2019 ; **10** : 792. doi : 10.3389/fimmu.2019.00792.
- 16) Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, et al. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* 2012 ; **189**(7) : 3508-20.