

The Effect of Platelet-Rich Fibrin (PRF), Plasma Rich in Growth Factors (PRGF), and Enamel Matrix Proteins (Emdogain) on Migration of Human Gingival Fibroblasts

ヒト歯肉線維芽細胞の移行におけるエナメルマトリックスタンパク質 (Emdogain)、多増殖因子血漿 (PRGF)、多血小板フィブリン (PRF) の効果

Mohammad Reza Talebi Ardakani, DMD, MScD ; Mansour Meimandi, DMD, MScD ;
Reza Shaker, DMD, MScD ; Shima Golmohammadi, DMD, MScD

J Dent Shiraz Univ Med Sci. December 2019; 20 (4) : 232-239.

緒 言

歯周治療の最終目標は健康な歯周組織を獲得することと、もし可能であれば、失った形態と機能を再修復することである。歯周組織治療は歯肉結合組織、歯周組織靭帯、セメント質、骨がバランスよく関与していくことが必要である。組織の最終的な機能と審美性は治療過程に作用している様々な要因によって影響を受けるかもしれない。一方で、最終的な組織は非機能性の線維状(瘢痕)組織、部分的な最終修復組織、完全に再生された機能性組織であるかもしれない。

理想的な治療過程において、付着組織の全ての構成要素は通常 of 成長過程と同じように回復される。しかしながら、従来の歯周病治療後の創部の治療は、最も一般的に、歯肉結合組織と根面との間に線維組織の形成と歯肉上皮の根尖側への移動をもたらすことが示されてきた。この治療過程は再生をもたらすことはない。

歯肉線維芽細胞は、健康な歯肉結合組織において重要な細胞であり、細胞外マトリックスの組成と構造統合性を維持することにより、その成長に重要な役割を果たしている。また、線維芽細胞は結合組織治療の間のコラーゲンをリモデリングしてきた。組織損傷後、創傷治療は治療部位での再生能力を持つ細胞の存在を必要とする。この現象では、線維芽細胞は安定化してマトリックス形成を開始することが可能なはずである。一方で、細胞外マトリックスへの線維芽細胞の付着は適切な細胞形態、細胞機能、そして組織統合性を維持することにおいて特に重要である。したがって、細胞活性における生物因子の影響に関して、歯肉線維芽細胞株が主に重要である。それらの相対的な利点を考慮すると、歯肉線維芽細胞株は患者から容易に得ることができ、通常の培地で高速に成長させることができる。

Slavkin と Boyde によって最初に考案されたように、エナメルマトリックスタンパク質はエナメル質のミネラル化を調節する特性を持っており、それらは歯根の形成時に上皮細胞によって放出され、セメント質形成と支持歯周組織の形成に影響を与えることが可能である。

エムドゲインは豚エナメルマトリックス誘導体 (EMD) の製品名であり、歯周病に苦しむ患者の歯周組織再生に頻繁に使用されてきた。エムドゲインは骨内欠損、分岐部病変、歯肉退縮の再生に対して臨床的に使用されてきた。in vivo 研究では EMD がどういうわけか口腔上皮の根尖側へ

の侵入を防ぐことで歯周組織欠損を再生することを示した。しかし、それは培養された歯根膜 (PDL) 細胞の分化と増殖を促進する。エムドゲインの *in vitro* での効果は、様々な細胞系で研究されており、エムドゲインは骨形成前駆体の分化を促進し、PDL 細胞の増殖とマトリックス産生を促進するが、上皮細胞の増殖を抑制することが示されている。Zeldich らによる研究はヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) における EMD の増殖因子効果の細胞経路を説明した。

濃縮血小板は主に遠心分離によって全血液を処理した後には得られる生成物である。広く知られている多増殖因子血漿 (PRGF) の中で血小板濃縮物の製品として市販されているカスタムメイドシステムや多くの技術が存在する。PRGF は組織再生や創傷治癒の過程を促進する生物活性タンパク質と様々な成長因子を含んでいる。様々な研究者は PRGF の使用後、新生骨形成とより良好な治癒回復を示してきた。しかしながら、そのような結果は他のいくつかの結果で報告されていない。

純多血小板フィブリン (PPRF) は定義上、高濃度のフィブリンマトリックスを持つ白血球を含まない製剤である。フィブリンマトリックスは一定期間後に放出されるサイトカインと血小板を捕捉することから、それ自体は骨芽細胞の分化に重要な影響を与える。

白血球含有多血小板フィブリン (LPRF) は口腔顎顔面外科手術と組織修復に使用するために導入された第二世代血小板濃縮物である。それは抗凝固剤を使用せず、全血を直ちに遠心分離して得られる。遠心分離中の血栓形成と凝固カスケードの迅速な活性化はフィブリン形成と血小板活性を誘導する。遠心分離中の重合の機械的プロセスの使用により、LPRF 血餅における成長因子の組成と量は安定したままである。LPRF メンブレンは形質転換因子 $\beta-1$ (TGF $\beta-1$)、血小板由来成長因子 AB (PDGF-AB)、血管内皮成長因子 (VEGF)、他のマトリックス糖タンパク質といった成長因子を少なくとも7日間、大量にゆっくりと放出する。

自然治癒の過程では、血小板が凝集し、成長因子を放出する。組織治癒におけるフィブリンの役割に関する Tuan らの研究結果は、線維芽細胞がフィブリンマトリックスを再構築し、コラーゲン産生を開始する能力を持っていることを示した。この点で、多血小板フィブリン (PRF) コムパクトフィブリンマトリックスが創傷治癒プロセスの促進に役割を果たしているように思われる。加えて、PRF は PRF 中の TGF-1 および PDGF-AB のレベルが 14 日目まで増加し、その後減少するように、時間の経過とともに成長因子の放出制限の原因となりうる。LPRF は、成長因子の長期的な放出を提供することができ、最大放出値の遅延を引き起こす可能性を維持する。

これらの生物学的製剤の観察された *in vivo* 効果の根底にあるメカニズムをさらに明らかにするために、本研究では、歯肉線維芽細胞に対する PPRF、LPRF、PRGF、およびエムドゲインの効果を検討し、比較することを目的とした。

材料と方法

PRF と PRGF の準備

書面によるインフォームドコンセントを得た後、30 歳の非喫煙の健康なボランティアから、血液サンプルを採取した。LPRF の準備のため、27ml の静脈血を抗凝固剤を含まない3本の乾式採血管 ((Blood collecting tubes , Process, Nice, France) に注いだ。Choukroun のプロトコールに従い、チューブを直ちに2700rpmで12分間遠心分離し(約400g)、下部の赤血球 (RBC) 層と上部の乏血小板血漿 (PPP) の間でチューブ中央にコンパクトなフィブリン塊を形成した。無菌環境下での PRF ボックスが採用され、標準的な PRF メンブレンが得られた。Fibrinet® (Cascade Medical Enterprises; LLC, Wayne, NJ, USA) を使用することで PPRF を準備するために、RBCs と白血球

を含まない血漿と血小板を単離するためのチキソロトピック分離ゲルを含むチューブに未凝固血は採取された。最初のスピンを10分間で1100g行った後、CaCl₂を含むチューブに15分で1500gで第二段階の遠心分離が行われた。

PRGF では、まず、抗凝固剤(3.8%クエン酸ナトリウム)0.5ml を含む 9ml の滅菌採血管(BTI)に27ml の静脈血を注いだ。標準的な方法(BTI PRGF® System III; Biotechnology Institute, S.L., Álava, Spain)により、血液サンプルをまず 1800rpm で 8 分間遠心分離し、その結果、血液を、チューブの表面にある乏血漿成長因子(PPGF) (1ml)、成長因子を含む血漿(0.5ml)、赤血球のすぐ上にある PRGF(0.5ml)、および赤血球の 4 つの層に分離した。本研究ではそのPRGF層を用いた。PRGFは0.5ml のピペットにより取り出され、他のチューブに移された。その後、PRGF1ml に対して 10%塩化カルシウム 0.05ml を添加して活性化させた。10分後、得られたゲルは線維芽細胞を含む血漿に添加された。エムドゲインは製造元から入手された(Straumann, Mehrarabon Co. Iran)。

細胞培養と治療

ヒト歯肉線維芽細胞 HGF-1 株はイランの National Cell Bank から得られた(NCBI code: C165, Pasteur Institute, Tehran, Iran)。線維芽細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)と 1%抗生物質-抗真菌剤(2mg/ml グルタミン、100U/ml ペニシリン、100g/ml ストレプトマイシン、12.5U/ml ニスタチン、0.11mg/ml ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸)を添加した Dulbecco's 改良型イーグル培地で培養され、CO₂ 培養器中で 37°C、2 時間培養された。その後、サブコンフルエント(培養器で細胞が成長できる余地がある状態)成長細胞を 60mm ペトリ皿に乗せられ、コード化された。試験材料を補充した培地を含む皿の総数は18個であった。

10%および 1%の FBS を含むペトリ皿をそれぞれ陽性対照群および陰性対照群とした。

単層細胞がほぼ100%のコンフルエント(接着細胞が培養容器の接着面を覆いつくした状態)に達した後、セルスクレーパーを用いて、一連の細胞はマークされた経路で剥離された。そうすることで、ほぼ同程度の大きさの人工潰瘍を形成した。次の段階では、剥離した細胞を洗い流すために、細胞を培地で数回洗浄した。ペトリ皿上の細胞は毎日顕微鏡下で評価された。特定の時点で、細胞は固定され、クリスタルバイオレット染色がなされた。画像化の間に同じ領域を得るために、擦過傷部の両側に位置する皿の外底面に極細チップマーカーでマーキングを行った。基準点を作った後、染色した細胞を同じ露光条件でデジタル撮影し、エムドゲイン、PRGF、LPRF、PPRF の存在下で創傷治癒(wound filling) 率を48時間後と1週間後に決定し、イメージソフトウェアを用いて測定した。

統計分析

分析は各グループで 3 回に分けて実施した。各群における創傷治癒の平均率を計算し、一方 ANOVA を用いてグループ間比較を行った。0.05 未満の P 値は、統計的に有意であると考えられた。

結 果

図1で1週間での染色された細胞の画像を示す。PRGF、LPRF、PPRF、エムドゲイン、10% FBS(陽性対照群)、1%FBS(陰性対照群)の48hおよび1週間後の創傷治癒率を図2に示す。創傷治癒率は 48 時間から1週間までのすべてのテスト群で有意に改善された(p<0.05)。

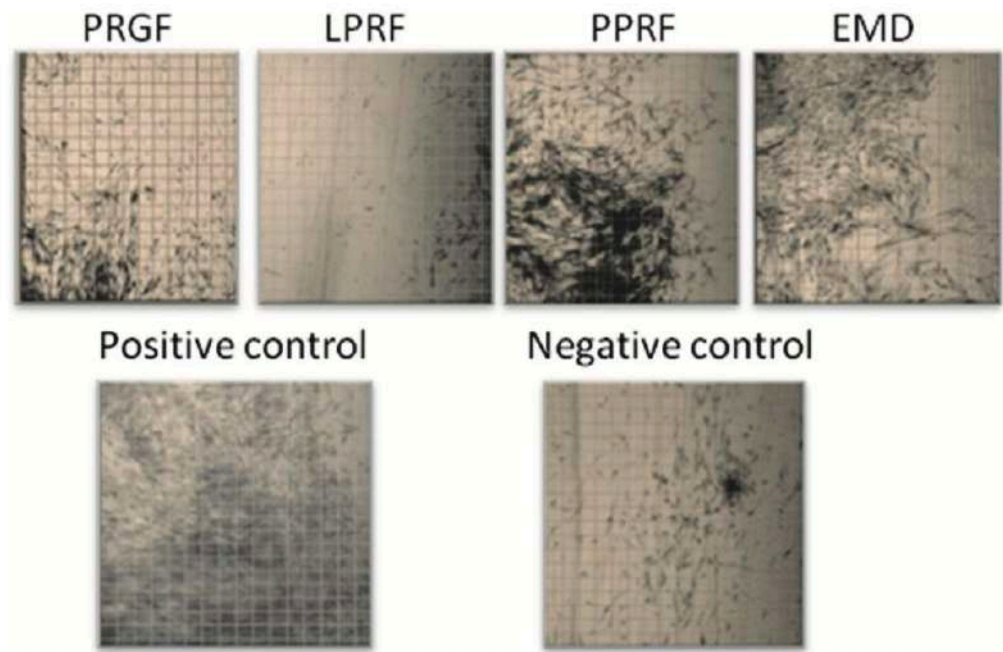


Figure 1: Microscopic analysis of HGFs in four tests and two control groups at one week

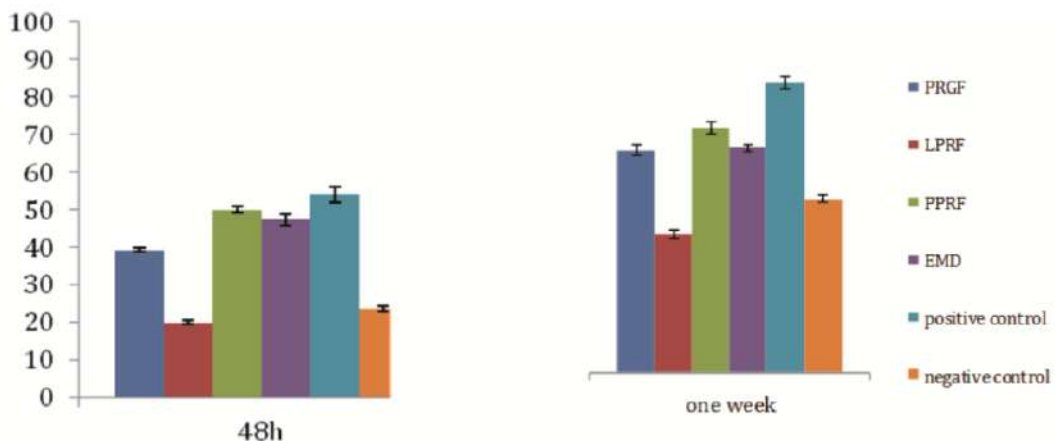


Figure 2: Percentage of wound filling in tests and control groups at 48h and one week

48 時間後の創傷治癒率は、PPRF 群、エムドゲイン群、陽性対照群でほぼ同程度であった ($p > 0.05$)。人工潰瘍が作られた1週間後では、PPRF群の線維芽細胞は、他の試験群に比べてより多くの割合で広がっていた。しかし、これには有意差はなく、PRGF、PPRF、およびエムドゲインは、ほぼ同程度の割合で創傷治癒であった ($p > 0.05$)。創傷治癒率が最も低かったのは、両時間間隔で LPRF であった。

考 察

細胞の増殖と遊走は創傷治癒に不可欠な要素であり、創傷治癒分析/スクラッチアッセイで簡単に評価することができる。本研究では人工潰瘍の治癒においてヒト線維芽細胞の増殖について PRGF、PRF、エムドゲインを評価した。得られた結果から、創傷治癒率が最も高い陽性対照群として 10%FBS と、比較的小さい値を持つ陰性対照群として 1%FBS と LPRF を除いた残りのグループは創傷治癒率の点でほぼ同じ範囲であった。さらに、治癒率はすべてのグループで時間の経過とともに増加した。

PRGFは生体適合性があり、効果的で安全であり、局所再生後、数日以内に体内に吸収される。自己因子としてのPRGFの適用は、いくつかの成長因子の活性化の機会を提供し、組織の血管新生の可能性の増加と関連している。PRGFに含まれる血小板や血漿ベースの生理活性分子を使用するもう一つの利点は、術後の組織の炎症を軽減する性質と能力である。血小板は、単球サイトカインの放出を抑制し、炎症を減少させることができることが特定されている。さらに、血小板は主に活性化されたマクロファージからのIL-1の放出を阻害することができる。炎症反応のこの第一次阻害は、多血小板製剤が抗炎症剤として作用するメカニズムを説明することができるかもしれない。Creepersらはin vitro条件下でのPDL細胞とヒト骨芽細胞の遊走、増殖、分化に対する多血小板血漿の効果を評価し、多血小板血漿が創傷治癒に関連した細胞機能を増強する能力を有することを実証した。

Vahabiらは、PRGFの適用により、1% FBS および 10% FBS と比較して、24時間、48時間、72時間での細胞増殖が有意に増加したことを報告した。一方、PRFは対照群と比較して24時間後でのみ試験群で細胞増殖が有意に増加した。それは、48時間と72時間での細胞増殖における逆の効果を示した。このことは対照群と比較して、3、7、14、21日でのHGFの増殖におけるPRFメンブレンの促進作用を明らかにしたDohanらによる研究の結果とは対照的であった。同様に、本研究で、統計的には有意ではなかったが、PPRFは48時間後と1週間後の両時点でのPRGFよりも創傷治癒率が高く、多くの増殖を誘導した。しかしながら、我々の研究方法では異なっていた。本研究では、我々はin vitroのスクラッチアッセイを用いた。これは、in vitroの細胞遊走を研究するための簡便で、経済的な方法であり、人工潰瘍のスペースに沿って細胞の遊走と増殖の両方を評価をする。研究結果は血小板数の違い、血液サンプルとPRF調製の遠心分離の間のインターバル時間、培養液への曝露に起因しているかもしれない。Liuらの報告によると、細胞増殖速度はpHに依存しており、血小板濃度が高いとpHが変化し、線維芽細胞の増殖に負の影響を与える。PRGF中の血小板濃度は正常値の2~3倍以上であり、細胞増殖には理想的なレベルである。血小板は小型のLPRFメッシュに入れられたため、LPRF中の血小板数を数えることは不可能である。本研究では、PRFとPRGFは個体差によって生じる交絡効果を評価するために同じドナーから得られた。血小板数に加えて、フィブリンゲル形成能は生物学的メカニズムを促進する上で重要である。培養プレートの最小直径は60mmであり、それは培養細胞の圧迫をさけ、一方で、フィブリン塊を添加すると60mmとなる。

我々の研究では、培地にLPRFを添加した場合、治癒率が最も低く、さらに陰性対照群よりも低かった。この所見は、好中球が産生するマトリックスメタロプロテアーゼ8および9の有害な生物学的効果によって説明できるかもしれない。加えて、好中球は組織傷害の炎症段階で活性酸素を放出することで組織損傷を誘発する可能性がある。しかしながら、白血球の増殖、分化、耐性の潜在的な能力を強調する著者もいる。今まで、血小板製剤内に白血球を含有させることについてはコンセンサスがなく、完全な白血球の効果を決定するためにさらなる研究を必要とする。したがって、将来の研究においてこの問題が確認されるまで、白血球を含有しない血小板製剤の使用が賢明である。

血小板上清の細胞分裂活性はその成長因子含有量に限定されるものではなく、一方で、微小粒子や血小板膜断片がin vitro条件下で重要な役割を果たしていることが明らかになった。少数の研究を除いて、他の研究室での研究はPRPとPRF上清の効果を評価しており、この問題は我々の研究の重要な限界である。我々は上述の条件下でこれらの2つの材料の滲出液中に存在する成長因子とタンパク質のみを評価したため、生成物全体の実際の効果は考慮されなかった。PRFは、独自のマトリックス構造と細胞含有量を有する濃縮フィブリンであり、その滲出液は、この生成物の唯一の誘導體ではない。さらに、PRPは均質な液体生成物であるが、その滲出物は唯一の存在する活性成分ではなく、フィブリンゲル形成のための血小板の凝集は多くの生物学的メ

カニズムを促進する。

HGF に対するエムドゲインの細胞分裂効果は、多くの研究で報告されてきた。Zedlich らは、 $100 \mu\text{g/ml}$ のエムドゲインの適応は歯肉線維芽細胞によるコラーゲン産生の増加を実証した。EMD によるこれらの細胞への刺激は細胞外マトリクスの産生と増殖を向上させることとまた、関係していた。Sander らは、ヒト線維芽細胞の細胞性創傷治癒に対する周期的な変形の有無による EMD の様々な濃度の影響を評価し、 $0 \sim 120 \mu\text{g/ml}$ のエムドゲイン濃度では創傷治癒の割合が $34.1 \sim 55.7\%$ であったことを明らかにした。

血液製剤の生物学的有効性を評価するために *in vitro* 実験が有用であることは明らかであるが、これらの研究では臨床状態を再現することに限界がある。したがって、*in vitro* で得られた知見を *in vivo* の状況に一般化することは現実的ではないかもしれない。実験室と実際の創傷治癒過程の間の環境の違いが、細胞間相互作用に影響を与える可能性がある。唾液には、迅速な治癒のための重要な因子である多数のサイトカイン、成長因子、およびプロテアーゼ阻害剤が含まれている。しかし、これらは口腔粘膜の迅速な治癒に関与するだけの要因ではない。広い口蓋創のみが唾液の欠如によって影響を受ける可能性があり、より小さな創は正常に治癒する。唾液は治癒の過程で役立つが、口腔粘膜の傷跡のない治癒に完全に参与しているとは考えにくい。そして、口腔粘膜の固有の特性が口腔組織の治癒に重要な役割を果たしている可能性がある。

結 論

PRGF、PPRF、エムドゲインは人工潰瘍の閉鎖と線維芽細胞の増殖を促進する点で比較的同程度の効果を示した。

報告者:南川 彰・船登 彰芳