

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

宮野 竜太郎

専攻分野：形成外科学

コース：

指導教授：梶川 明義

主論文の題目：

多血小板血漿（PRP）のヒト培養毛乳頭細胞に及ぼす影響と育毛への効果

共著者：

住江 玲奈、菅谷 文人、林 京子、武内 嵩幸、  
福岡 友梨江、脇坂 長興、井上 肇、梶川 明義

緒言

末梢血から血小板を高濃度に分離した末梢血、すなわち多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma : PRP) という概念は古く、1954年の Kingsley らの報告に遡る。当初この技術は血液凝固関連の研究用途に用いられたが、腱や靭帯、関節等の非観血的治療に広く応用され、難治性皮膚潰瘍への効果も報告されている。美容医療領域では再生医療技術としてシワ取り治療から始まり、頭髪に対する育毛治療として用いられるようになった。しかし、育毛に対しての有効性については客観的評価が難しいこともあり、経験的な評価に終始している。そこで今回、育毛への効果を検討するために、PRP がヒト培養毛乳頭細胞に及ぼす影響を分子生物学的に検討するとともに、血小板由来エクソソームの毛乳頭細胞に及ぼす影響を併せて検討した。

方法・対象

ヒト培養毛乳頭細胞に PRP を添加し、一定時間培養後に毛包機能に関わるとされる線維芽細胞成長因子 (Fibroblast Growth Factor ; FGF) -2、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGF)、骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein ; BMP) -2、Wnt5a、Ephrin (EFN) A3 の遺伝子発現を定量 PCR で測定した。また、血小板由来エクソソームを除去した PRP を同様に添加して、前記遺伝子群の発現を指標として測定した。統計は Student の t 検定を用いた。主要評価項目は BMP-2 と Wnt5a であり、副次評価項目は FGF-2、VEGF、EFNA3 とした。研究全体の有意水準を危険率 0.05 以下とした。主要評価項目が 2 遺伝子あり、各遺伝子で対照に対する 2 時間後と 24 時間後の比較を行うため、主たる解析として合計 4 回の検定を行うことになるので、検定の多重性を Bonferroni の方法で考慮した。比較当たりの有意水準を危険率 0.0125 以下とした。統計解析は JMP 統計解析ソフトウェア (SAS Institute Japan 株式会社) で行った。PRP の調整に際して、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (臨床試験部会) における承認 (承認番号第 1548 号) の下、書面同意を得た上で血液を採取した。

## 結果

Wnt5a 遺伝子は PRP 無添加対照と比較して、PRP 添加 2 時間後で 1.33 倍の増加を認めたが有意ではなかった ( $p=0.0280$ )。しかしこの遺伝子の発現は継続し、24 時間後には 1.41 倍と、無添加対照と比較して有意に増加した ( $p=0.0096$ )。BMP-2 遺伝子は PRP 無添加対照と比較して PRP 添加 2 時間後で有意に増加し、その増加率は 1.775 倍であった ( $p<0.0001$ )。一方 24 時間後では無添加対照と比較して逆に有意に抑制され、約 60%程度 (0.57 倍) に低下した ( $p=0.0001$ )。FGF-2 遺伝子は PRP 無添加対照と比較して PRP 添加 2 時間後には 1.75 倍にまで有意に増加した ( $p=0.0020$ )。またこの遺伝子の発現は 24 時間後も 1.72 倍と、継続して有意に増加した ( $p=0.0025$ )。VEGF 遺伝子は PRP 無添加対照と

比較して PRP 添加 2 時間後で 1.60 倍に有意に増加した ( $p=0.0041$ )。しかし 24 時間後には PRP 無添加対照と比較して 35%程度 (1.35 倍) の増加を維持していたが有意ではなかった ( $p=0.0556$ )。EFNA3 遺伝子は PRP 無添加対照に比較して差を認めず、PRP 添加 2 時間後においても 24 時間後においても有意な変化を認めなかった (2 時間後 0.99 倍 :  $p=0.9927$ 、24 時間後 0.99 倍 :  $p=0.9855$ )。血小板由来エクソソーム除去 PRP においては、これら遺伝子群に変化を認めなかった。

## 考察

PRP を 0.2%相当添加することで毛乳頭細胞から毛包機能に関わるとされる 5 種の遺伝子群を指標とした増殖因子、および発毛シグナル遺伝子群の発現に変化が認められた。またこの変化は Wnt5a、FGF-2 を除いて添加 2 時間程度で発現が上昇し 24 時間後には無添加対照と同程度に低下した。このことから毛乳頭細胞への発毛関連遺伝子群の発現増強が退行期の毛包の活性化を促しているものと推察された。特に Wnt5a の持続的な発現と、BMP-2 の短期的強発現とその後の消退は、毛乳頭の分化誘導と萎縮を抑制している可能性が示唆された。今回の結果では、エクソソーム除去 PRP においてこれら遺伝子群の発現には有意差がなかった。これより、血小板由来エクソソームは少なくとも今回検討した遺伝子群の発現に影響しないと考えられた。エクソソーム除去に伴う増殖因子の希釈の問題、エクソソームを単離して添加する検討も含めて総合的に結論する必要があるが、現状では  $\alpha$  顆粒中に含有された増殖因子が直接的に毛乳頭細胞に影響するものと考えられた。一方で、単離した血小板由来エクソソームが糖尿病マウスの慢性創傷の上皮化を促したという報告があることから、血小板エクソソーム内に含有される微量因子の同定を含めて今後検討する必要がある。

## 結論

PRPは毛乳頭に於ける発毛に関わる増殖因子の発現を促進するという結果が得られた。また、血小板由来エクソソームを除去したPRPも、毛乳頭細胞からの発毛関連遺伝子に影響が見られなかった。PRPは萎縮毛包を再生するのではなく、遺残する毛包に作用し毛包のヘアサイクル関連物質の発現調節を行うことで活動期を維持し毛髪の成長に関与していることが考察され、毛包の活性化の可能性が結論された。