

O-1-13-19

共培養系におけるヒト血小板からラット線維芽細胞へのミトコンドリア移動の検証： 新たな多血小板血漿の作用機構への考察

○藤石 晃大¹⁾, 川端 秀男¹⁾, 辻野 哲弘¹⁾, 渡辺 孝夫¹⁾, 日高 敏郎¹⁾, 渡辺 泰典¹⁾, 北村 豊¹⁾, 川瀬 知之²⁾
¹⁾ 一般社団法人東京形成歯科研究会, ²⁾ 新潟大学大学院

Verification of mitochondrial transfer from human platelets to rat fibroblasts: a complementary mechanism of PRP action

○FUJISHI A¹⁾, KAWABATA T¹⁾, TSUJINO T¹⁾, WATANABE T¹⁾, HIDAKA T¹⁾, WATANABE T¹⁾, KIAMURA Y¹⁾,
 KAWASE T²⁾
 Tokyo Plastic Dental Society, ²⁾ Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

I 目的： 昨年度の本学会学術大会および関東・甲信越支部学術大会において、我々は二次元培養系において、ヒト血小板からラット線維芽細胞へのミトコンドリア移動という現象を報告するとともに、PRP治療が期待したほどの効果を得られない場合に血小板ミトコンドリアの果たす役割が大きいという可能性を示唆した。しかし、その特異性と移動機構に関する知見が不十分であった。そこで、本研究では、血小板ミトコンドリアが線維芽細胞内に取り込まれていることを中心として、追加検討した結果を報告する。

II 材料および方法： 健康なボランティア (n = 12, 年齢 28 ~ 63 歳) の血液よりリン酸緩衝液にて血小板懸濁液を調製した。ラット歯髄由来線維芽細胞 (RPC-C2A) は dideoxycytidine (ddC) にてミトコンドリアの複製を阻害した状態にして共培養に用いた。24 時間共培養の後に、洗浄により血小板を取り除いた線維芽細胞の懸濁液を調製した。ミトコンドリアの局在は、ミトコンドリアの膜電位に依存して発色する蛍光色素を使用し、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーター (FACS) にて確認した。血小板と共培養した後の線維芽細胞表面の微細構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて可視化した。線維芽細胞に取り込まれたヒト mtDNA は同様にラットの Hprt1 にて正規化した。

III 結果： 先行研究において仮想水平面を移動させながらスライドガラス上の細胞内の蛍光シグナルを観察したデータでも示したように、FACS により trypsin/EDTA で分散した 1 個の線維芽細胞中にヒトのミトコンドリアが共局在していることが確認された。また、mtDNA についても、線維芽細胞中にラットとヒトの mtDNA の存在が確認された。

IV 考察および結論： 二次元共培養系は三次元の系よりも線維芽細胞の表面に非特異的に付着している細胞の除去が容易であるが、先行研究を発表して以来、少なからず疑義を受けてきた。本研究では、分散細胞や遺伝子レベルで共局在が確認されたことから、我々が提唱している二次元共培養系の妥当性が裏付けられた。血小板ミトコンドリアが組織再生に果たす役割を解明することで、効かない症例を減らすとともに、より予知性の高い PRP 治療に近づけることができるものと期待する。

(倫理審査委員会番号 15000140 承認 承認番号 2019-0423)