

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10935

研究課題名（和文）非ウイルス性遺伝子導入を用いた皮弁血流安定化と生着域拡大の実現に向けた研究

研究課題名（英文）Heat shock protein 32 (HSP32) gene expands skin survival area of the mouse dorsal skin flap

研究代表者

長谷川 正和（Hasegawa, Masakazu）

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：40375738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円

研究成果の概要（和文）：ストレスタンパク質の一群であるheat shock protein 32 (HSP 32)遺伝子を組み込んだMinicircle (MC)を作製し、皮弁生着域の拡大効果について検討した。NIH3T3細胞にMC (HSP 32 DNA)を導入したところ、細胞増殖が抑制され、致死に至らない程度の強いストレスが加わった影響と考えられた。また、皮弁挙上の3日前にマウス背部にMC (HSP 32 DNA)を局所投与して皮弁の生着域を比較したところ、HSP 32遺伝子導入群では、コントロール群と比較して、皮弁の生着域が有意に広いことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Minicircle (MC)は非ウイルス性のDNAで、免疫応答を引き起こす恐れがなく安全に使用できる。遺伝子導入のキャリアとして細胞を必要としないことから短期間で大量に増やすことも可能である。また、MCは目的遺伝子の発現が長期間持続するため皮弁の血流安定化と生着域の拡大に関する研究に最適な方法といえる。当研究で得られた新しい知見は、皮弁を用いた再建手術のみならず、重症虚血肢の治療に応用できる可能性を有するなど、創傷治癒全般に極めて大きな貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Minicircle (MC) incorporating heat shock protein 32 (HSP32) gene, which is a group of stress proteins, was constructed, and the effect of expanding skin survival was examined. When MC (HSP32 DNA) was introduced into NIH3T3 cells, cell growth was suppressed. Which was considered to be the response of stress that did not lead to lethality. In addition, MC (HSP 32 DNA) was locally injected to the back of the mice 3 days before the skin flap elevation to compare the survival area of the skin flap. In the HSP 32 gene transfected group, skin survival area was expanded.

研究分野：形成外科

キーワード：皮弁 虚血 遺伝子導入

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮弁とは、「血流のある皮膚・皮下組織や深部組織」を移植する手術方法で、再建外科において最も重要な手術法の一つであり、より安全に、確実に移植して皮弁が壊死とならない工夫が必要である。皮弁の血行動態や微小血管構築に関する解剖学的研究の結果、新しい概念に基づく皮弁が考案され、再建材料の選択肢は広がった。しかし、個々の皮弁には、その生着面積に制限があるため、広範囲の組織欠損あるいは再建部位の近くに recipient となる血管が存在しない場合、十分な再建が行えないこともしばしば経験する。そのため、挙上した皮弁の生着領域を拡大させるために多くの研究がなされてきた。

薬剤の全身投与は簡便な方法であるため、数多くの方法が報告されているが、動物実験では効果が認められても人体に使用すると効果が不確実な場合が多く、また、大量の薬剤使用による副作用や毒性の点で問題がある。

虚血耐性現象の分子メカニズムの検討は、当初ストレスタンパク質 (heat shock protein:HSP)を中心に行われた。その後、遺伝子発現の解析が進み、HSP 以外にも様々な遺伝子が発現することが明らかとなった。生着可能な領域を超えて挙上した拡大皮弁では、皮弁の辺縁が虚血状態となるため、皮弁内での虚血耐性因子の発現亢進は生着域拡大に有利に働くものと推測される。

近年、乳がん手術において、皮膚を温存する skin sparing mastectomy が一般的となってきたが、50%以上の症例で温存した皮膚に壊死を認めたとする報告があり、皮膚(皮弁)への血流を安定させる手技の確立は、患者負担の軽減、医療費削減のための極めて重要な課題である。皮弁の虚血予防として様々な方法が試みられてきたが、2013 年、Mehta S らは、skin sparing mastectomy の手術前日に患側の乳房を温めることで術後の皮膚壊死の発生率を半減できたと報告している。その機序として、加温による heat shock protein 32 (HSP32/HMOX1)の局所での発現増強が影響している可能性を指摘した。しかし、彼らの方法は低温熱傷のリスクを伴うため決して安全とはいえない。

2. 研究の目的

皮弁挙上の前に、虚血耐性に関与する因子を非ウイルス性遺伝子導入を用いて予め局所に投与することで、皮弁と移植床との間の血管網が再構築されるまでの期間、虚血に耐えることが可能となり、その結果、壊死を回避して皮弁生着域の拡大効果が得られるという仮説を立てた。Minicircle (MC)は、非ウイルス性の DNA で、C31 を介した分子内組み換えにより、元となる Plasmid DNA から作製される。通常の Plasmid DNA と異なりバクテリア由来の複製開始点や抗生物質耐性遺伝子を有さない。また、メチル化やサイレンシングなどの影響を受けないため、MC からの発現は最大で 14 日間持続するとされる。我々は、ストレスタンパク質の一群である heat shock protein に着目し、heat shock protein 32 (HSP32/HMOX1) 遺伝子を組み込んだ MC を局所投与することで、加温による HSP 32 の発現増強と同等以上の効果が安全で効率的に得られるか検討した。

3. 研究の方法

(1) Minicircle (MC)の作製

MC-Easy Minicircle DNA production kit (System Biosciences) を用いて目的遺伝子である ヒト HSP 32 を組み込んだ MC を作製した。Parental Plasmid は pMC.EF-1-MCS-IRES-GFP-SV40polyA (System Biosciences)を使用した。

(2) in vitro 実験

細胞増殖への影響

マウス線維芽細胞として NIH3T3 細胞を選択し、HSP32 を組み込んだ MC (HSP32 DNA)投与後の細胞増殖について検討した。35mm dish に 2×10^4 個の NIH3T3 細胞を播種し、24 時間後にコントロール群には DMEM 200 μ l + MC-Fection (System Biosciences) 5 μ l を投与した。HSP 32 DNA 導入群には DMEM 200 μ l + MC-Fection 5 μ l + MC (HSP 32 DNA) 2 μ l を投与した。MC 投与から 24 時間後と 48 時間後の細胞数を比較した。

シーケンス解析

35mm dish に 2×10^4 個の NIH3T3 細胞を播種し、24 時間後にコントロール群には DMEM 200 μ l + MC-Fection 5 μ l を投与した。HSP 32 DNA 導入群には DMEM 200 μ l + MC-Fection 5 μ l + MC (HSP 32 DNA) 2 μ l を投与した。MC 投与から 48 時間後に total RNA を採取した。シーケンス解析はタカラバイオ社に委託し、HiSeq システム (イルミナ社)を用いた解析を行った。

(3) in vivo 実験

虚血皮弁モデルの作製

8 週齢の C57BL/6J マウスを 5%イソフルランの吸入麻酔後、無痛下に塩酸メデトミジン 0.3mg/kg + ミタゾラム 4mg/kg + 酒石酸ブトファノール 5mg/kg の混合麻酔薬を腹腔内に投与して外科麻酔を得たのち、マウスの背部に、頭側を茎として幅 1.2cm で長さを変えた皮弁を作製した。皮弁作製から 7 日目に皮弁の壊死範囲を評価し、虚血皮弁の大きさを幅 1.2cm x 長さ 2.4cm と決定した。

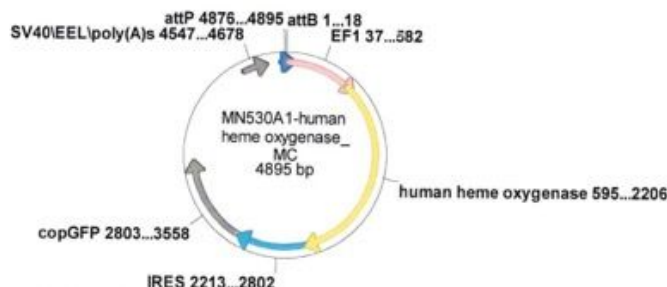
HSP 32 DNA 導入の効果

8週齢の C57BL/6J マウスをコントロール群、PBS 投与群、HSP 32 DNA 導入群の 3 群に分けた (各群 n=3)。5%イソフルランの吸入麻酔後、無痛下に塩酸メドミジン 0.3mg/kg + ミタゾラム 4mg/kg + 酒石酸ブトファノール 5mg/kg の混合麻酔薬を腹腔内に投与して外科麻酔を得たのち、皮弁挙上予定の背部皮内 (皮弁の中央) に PBS 投与群には PBS 200 μ l、HSP 32 DNA 導入群には PBS 180 μ l + MC (HSP 32 DNA) 20 μ l を投与し、3 日後に大きさ 1.2cm x 2.4cm の皮弁を挙上した。皮弁下には厚さ 0.1mm のシリコンシートを置き、6-0 ナイロン糸を用いて 5mm 間隔で縫合した。皮弁挙上から 7 日目に皮弁の生着域を評価した。

4. 研究成果

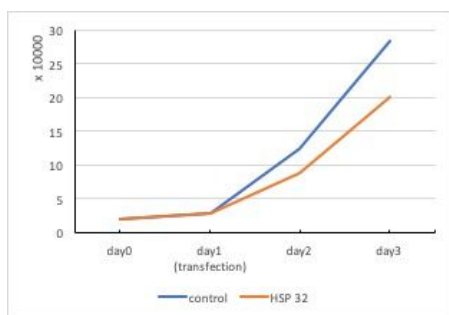
(1) Minicircle (MC)作製

Map of Minicircle Plasmid



ヒト HSP32(human heme oxygenase 1) を組み込んだ Minicircle (MC) の Map を示す。

(2) 細胞増殖に与える影響



MC 投与から 48 時間後の細胞数を比較すると、コントロール群と比較して、HSP 32DNA 投与群の細胞数は約 30%少なかった。これは、致死に至らない程度の強いストレスが加わった影響と考えられた。

(2) シーケンス解析

正規化処理には FPKM を採用した。変動遺伝子を倍率変化 (Fold Change) が 2 倍以上、0.5 倍以下で絞り込みを行ったところ、3896 の変動遺伝子が抽出された。DAVID を用いた GeneOntology 解析では、入力した 3896 遺伝子のうち「Metabolic pathways」と関連づいている 187 遺伝子 (4.9%) が優位に Enrichment していた。

(3) in vivo 実験

マウス虚血皮弁のモデル



挙上予定の皮弁 中央に局所投与 皮弁のデザイン 5mm 間隔で縫合

HSP 32 DNA 導入の効果



コントロール PBS 投与群 HSP32DNA 導入群

HSP 32 DNA 導入群では、コントロール群、PBS 群と比較して皮弁の生着面積が有意に拡大することが確認され、HSP 32 の発現上昇が、虚血による細胞障害を軽減することで、細胞の生存ひいては皮弁の生着域拡大に有利に働くことが示唆された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。