

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：81603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10022

研究課題名(和文)遊離脂肪注入術における移植床の至適組織内圧と移植床組織環境の準備方法に関する探求

研究課題名(英文)Exploration of the optimal tissue internal pressure and the preparation methods of the environment in transplant bed tissue in free fat injection.

研究代表者

栗山 元根 (KURIYAMA, MOTONE)

一般財団法人脳神経疾患研究所・形成外科・科長

研究者番号：40457388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織の細胞は少なくともアクチンに関連した遺伝子の発現ポテンシャルが高いエピジェネティクス状態にあった。脂肪組織の細胞はメカノトランスダクションのポテンシャルが高いと考えられ、陰圧閉鎖療法の初期においてそれが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また、一細胞レベルで見るとメカノトランスダクションに関連した遺伝子発現は一部で不均一性がみられたが、その意義は今のところ不明である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陰圧閉鎖療法が創傷治癒を促進する機序は不明な点が多く、臨床的な有効性が先行して示されているのに比較して、細胞生物学的なメカニズム解明は遅れていると言わざるを得ず、陰圧閉鎖療法の発展を阻んでいる。なかでも、陰圧閉鎖療法との関連から脂肪組織におけるメカノトランスダクションを調べた研究は殆ど見当たらない。

我々は脂肪組織に存在する細胞のメカノトランスダクションに関連した特性を明らかにすることが今後の陰圧閉鎖療法の発展に大きく寄与すると考え解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue cells were at least in an epigenetic state with high expression potential for actin-related genes. Adipose tissue cells are thought to have high mechanotransduction potential, which may play an important role in the early stages of negative pressure wound therapy. At the single-cell level, some gene expression related to mechanotransduction was heterogeneous, but its significance is currently unknown.

研究分野：形成外科

キーワード：脂肪移植 陰圧閉鎖療法 メカノトランスダクション エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚軟部組織潰瘍のなかには通常の治療を続けていても治癒に至ることが困難なものが存在し皮膚軟部組織難治性潰瘍と呼ばれる。皮膚軟部組織潰瘍が難治性となる理由は血流低下、癬痕化、放射線照射など様々である。これまで、軟部組織難治性潰瘍に対する治療としては皮弁と呼ばれる組織移植術などの大がかりな手法が必要とされてきた。また、それらの手法をもってしても治癒が難しい、侵襲が大きいことから患者の状態によっては適応できない、などの問題があった。

近年登場した陰圧閉鎖療法(negative pressure wound therapy, NPWT)は皮膚軟部組織難治性潰瘍の治療に画期的な breakthrough をもたらす治療法として期待されている。陰圧閉鎖療法は潰瘍組織に持続的に陰圧をかけることで過剰な浸出液の除去、毛細血管新生、コラーゲン繊維の増生、創傷治癒に有用なサイトカインの放出、幹細胞の増殖と分化の促進、などの作用を通して肉芽増生と創縮小を図るものである。陰圧閉鎖療法が有効に働くケースにおいては従来の治療法では肉芽新生が望めなかったような組織においても肉芽新生が可能となり、結果、植皮術などの比較的低侵襲な手術で創閉鎖に至れることがある。一方、陰圧閉鎖療法をもってしても良好な肉芽化が得られない、肉芽化が遅々として進まないケースも数多く存在し陰圧閉鎖療法の手法をさらに改良する必要があるのもまた事実である。

しかし、陰圧閉鎖療法が創傷治癒を促進する機序は不明な点が多く、臨床的な有効性が先行して示されているのに比較して、細胞生物学的なメカニズム解明は遅れていると言わざるを得ず、陰圧閉鎖療法の発展を阻んでいる。陰圧閉鎖療法に関連した多様な分子生物学的メカニズムの一つとしてメカトランスダクションが挙げられる。メカトランスダクションは細胞に対する物理的な刺激を細胞内シグナルに変換する機構である。陰圧閉鎖療法は特に開始当初はまだ肉芽組織が出来ていない脂肪組織面にフォームをアプライして開始されることが多い。よって、陰圧閉鎖療法の脂肪組織に対する作用の解明は陰圧閉鎖療法開始初期の迅速な肉芽化を図るうえで重要である。

しかし、脂肪組織の機械的刺激に対する反応の解明は殆ど進んでいない。脂肪組織は余剰エネルギーの貯蔵庫、あるいはレプチン等の代謝関連サイトカインを放出する内分泌組織として研究されることが多く、創傷治癒が開始される組織としての研究は極めて稀である。なかでも、陰圧閉鎖療法との関連から脂肪組織におけるメカトランスダクションを調べた研究は殆ど見当たらない。

我々は脂肪組織に存在する細胞のメカトランスダクションに関連した特性を明らかにすることが今後の陰圧閉鎖療法の発展に大きく寄与すると考え解明を試みた。

## 2. 研究の目的

脂肪組織に由来する細胞のメカトランスダクションに関連した遺伝子発現とそのポテンシャルを明らかにする。

## 3. 研究の方法

ヒト皮下脂肪組織の手術時余剰として廃棄される部分を回収し研究に用いた。倫理委員会の承認のもとに適切に行った。皮下脂肪組織を鉗を用いて細切しコラゲナーゼ処理の後、遠心分離した…。沈殿分画を DMEM 培地を用いて 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ で 7 日間インキュベートした。底面に接着した細胞群を回収し脂肪組織由来幹細胞としてこの後の実験に用いた。一方、遠心分離して出来上がったの最上層に浮遊している分画を DMEM 培地を用いて天井培養法を行った。天井培養法とはフラスコに培地を満たした状態で 7 日間インキュベートして天井面に接着した細胞群を回収する方法である。こうして回収された細胞をこの後、天井培養由来前駆脂肪細胞として実験に用いた。

細胞遺伝子発現ポテンシャルを決定づけるものとしてエピジェネティクス、なかでもヒストン修飾と DNA メチル化に注目した。ヒストン修飾のうち、代表的な発現促進に働く修飾であるヒストン H3 の第 4 リシンのトリメチル化(H3K4me3)をクロマチン免疫沈降シーケンシング(Chromatin Immunoprecipitation assay and sequencing, ChIP-seq)で測定した。また、代表的な発現抑制に働くエピジェネティクス修飾である DNA の 5'末端から 3'末端方向にシトシン(cytosine, C)にグアニン(guanine, G)が連なるサイトにおけるシトシンがメチル化される CpG メチル化を測定した。測定法として 450K ビーズチップに次世代シーケンサーを組み合わせた高解像度測定法を用いた。

また、細胞一つ一つのメカトランスダクション関連遺伝子発現の違いを明らかにするため一細胞 RNA シーケンス(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)を行った。

## 4. 研究成果

### (1). 転写促進エピジェネティクス修飾 H3K4me3 とエピジェネティクス修飾 CpG メチル化との相関関係

互いに相反する作用を持つエピジェネティクス修飾である H3K4me3 と CpG メチル化の関係をゲノムワイドでプラットフォームを用いて解析した。ヒストグラムを作成した結果、H3K4me3 のピーク領域では CpG アイランドのメチル化は、脂肪組織由来幹細胞、天井培養由来前駆脂肪細胞において共にほぼ 0 だった。これは脂肪組織由来の細胞群において、H3K4me3 による発現促進が働き

DNA から RNA への転写ポテンシャルが高い DNA 領域においては DNA メチル化による転写抑制はかかっていない、ということを示す。すなわち、脂肪組織由来細胞群の DNA における遺伝子発現ポテンシャルを調べる際、

H3K4me3 ピークにより発現促進がかかっていれば DNA メチル化による抑制はかかっていない

DNA メチル化により発現抑制がかかっていれば H3K4me3 による促進はかかっていないと考えられる。よって、H3K4me3 ピークによる促進と DNA メチル化による抑制の相反する作用が同時加わっていて解釈に悩む DNA 領域は殆ど存在しないと考えて良いことが明らかになった。

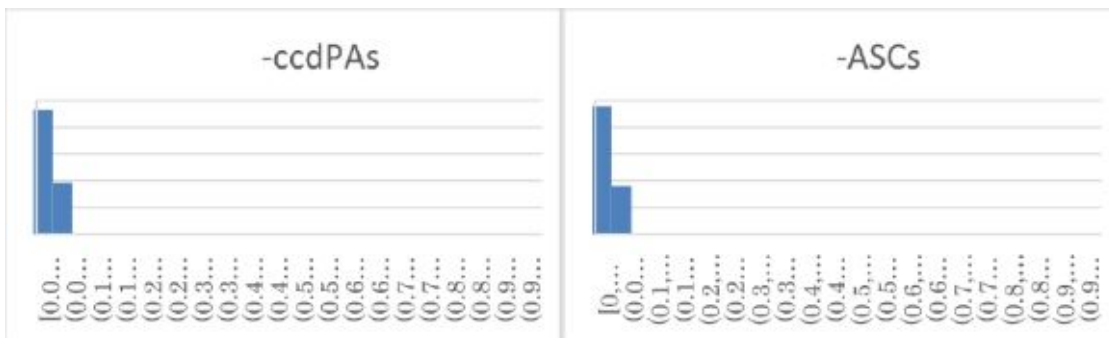


Fig. 1. H3K4me3 のピークと重なる CpG アイランドの beta value.

ゲノムワイドレベルにおいて H3K4me3 ピークにおける CpG アイランドの beta value はほぼ 0 である。

(ccdPAs: ceiling culture derived preadipocytes, 天井培養由来前駆脂肪細胞; ASCs: adipose derived stem cells, 脂肪組織由来幹細胞)

(2). メカトランスダクション関連遺伝子の脂肪組織細胞における発現ポテンシャル

A) ACTA2

ACTA2 は平滑筋 alpha actin をコードする遺伝子あり、これに異常があるとメカトランスダクションに支障を来す。具体的には細胞外マトリックスとの相互作用による細胞収縮というメカトランスダクションが出来なくなる。創傷治癒において細胞収縮は創を縮小させる重要な要素である。

脂肪組織由来細胞における ACTA2 の発現ポテンシャルを H3K4me3 から調べたところ、脂肪組織由来幹細胞、天井培養由来前駆脂肪細胞の両方において DNA の転写開始地点の近くにピークがみられた。この結果は脂肪組織由来幹細胞、天井培養由来前駆脂肪細胞共に ACTA2 の発現ポテンシャルが高いことを示している。また、天井培養由来前駆脂肪細胞の方が脂肪組織由来幹細胞よりも H3K4me3 ピークが高く、天井培養由来前駆脂肪細胞の方が ACTA2 を発現しやすい状態にあった。脂肪組織由来幹細胞群はもともと血管平滑筋や線維芽細胞が多く含まれており ACTA2 発現能が高くても不思議ではない。一方、天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪細胞が多いにも関わらず ACTA2 発現ポテンシャルが脂肪組織由来幹細胞よりも高かったことは驚くべき事であった。

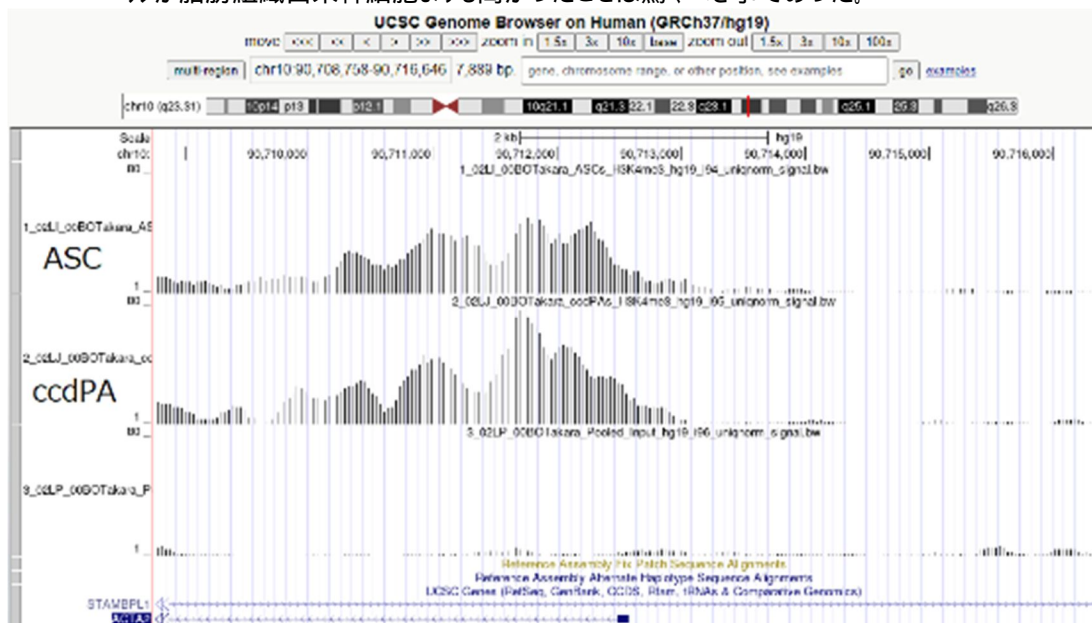


Fig.2. ACTA2 遺伝子の H3K4me3

脂肪組織由来幹細胞、天井培養由来前駆脂肪細胞ともにピークがみられ高い発現ポテンシャルがある。また、発現ポテンシャルは天井培養由来前駆脂肪細胞においてより高度であった。(ASC: 脂肪組織由来幹細胞; ccdPA: 天井培養由来前駆脂肪細胞)

#### B) *TAGLN*

*TAGLN* はトランスジェリンをコードする遺伝子である。トランスジェリンはアクチンの複雑な高次構造の形成に必要であり、アクチンと共働してメカトランスダクションの中核を担っている。

脂肪組織幹細胞、天井培養由来前駆脂肪細胞ともに *TAGLN* 遺伝子の転写開始地点付近に H3K4me3 ピークがあり発現ポテンシャルが高い状態だった。また、脂肪組織由来幹細胞よりも天井培養由来前駆脂肪細胞の方がピークが高く転写されやすい状態だった。

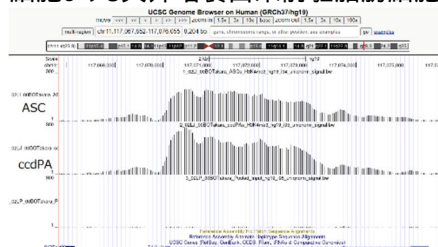


Fig. 3 *TAGLN* 遺伝子の H3K4me3

脂肪組織由来幹細胞、天井培養由来前駆脂肪細胞ともにピークがあり、天井培養由来前駆脂肪細胞の方がピークが高い

#### (3). 天井培養由来前駆脂肪細胞のシングルセル解析

天井培養由来前駆脂肪細胞の RNA 発現によるシングルセル解析を行った。天井培養由来前駆脂肪細胞は比較的均一性が高い細胞集団と考えられている。しかし、シングルセル解析を行ってみると意外なほど多様性が高いことがわかった。概ね *ACTA2*, *TAGLN* の発現は一致する傾向がみられた。一方で、*ACTA2* が低いにも関わらず *TAGLN* 発現が高い細胞群もみられた。これらの不均一性が何を意味するかは現時点では不明である。

#### (4). まとめ

脂肪組織の細胞は少なくともアクチンに関連した遺伝子の発現ポテンシャルが高いエピジェネティクス状態にあった。脂肪組織の細胞はメカトランスダクションのポテンシャルが高いと考えられ、陰圧閉鎖療法の初期においてそれが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また、一細胞レベルでみるとメカトランスダクションに関連した遺伝子発現は一部で不均一性がみられたが、その意義は今のところ不明である。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	窪田 吉孝  (KUBOTA YOSHITAKA)  (10375735)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授   (12501)	
研究分担者	新井 美波  (ARAI MINAMI)  (70790260)	千葉大学・医学部附属病院・医員   (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関