

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03846

研究課題名（和文）エピジェネティクス編集技術を用いた革新的脂肪移植治療法開発に資する基盤的研究

研究課題名（英文）Fundamental Research for the Development of Innovative Fat Transplantation Therapies Using Epigenetic Editing Techniques

研究代表者

三川 信之（Mitsukawa, Nobuyuki）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40595196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 15,180,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は形成外科学の一環として、皮下脂肪組織を再建材料として使用する脂肪移植法の効果と問題点について解析しました。脂肪移植は組織増量だけでなく、血管新生や細胞外基質の改善など多面的な効果を持つことが明らかとなりました。しかし、移植脂肪の効果発揮には制御が難しく、移植床の状態によっては脂肪の生着が困難な場合もあります。これらの問題を解決するため、皮下脂肪組織の細胞群の性質をエピジェネティクスの観点から解析し、その特性を明らかにしました。この知見は、より効果的な脂肪移植法の開発に寄与すると考えられます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の社会的意義は、先天異常や癌、外傷による組織欠損、疾患や治療による組織変性に対する患者の治療結果の改善の可能性があります。脂肪移植は組織量の増加だけでなく、豊富な分泌機能により組織状態の改善効果を持ちます。皮下脂肪は侵襲性が低く、豊富に存在するため、移植ドナーとして以前から有力とされてきました。しかし、皮下脂肪の移植ドナーとしての機能解析はこれまで十分に行われていませんでした。学術的には、本研究は皮下脂肪を移植材料として細胞機能の根幹であるエピジェネティクスについて詳細に解析したことに意義があります。これは様々な臨床状況での脂肪移植の最適化に道を開くこととなります。

研究成果の概要（英文）：Our study, as a part of plastic surgery research, analyzed the effects and challenges of fat grafting, which uses subcutaneous adipose tissue as a reconstructive material. It has been revealed that fat grafting not only increases tissue volume, but also exerts multifaceted effects such as promoting angiogenesis and improving the extracellular matrix. However, controlling the multiple effects of grafted fat can be difficult, and in certain conditions of the graft bed, fat attachment can be challenging. To solve these issues, we analyzed the characteristics of cell groups in subcutaneous adipose tissue from an epigenetic perspective, elucidating their distinct properties. We believe this knowledge will contribute to the development of more effective fat grafting methods.

研究分野：脂肪移植

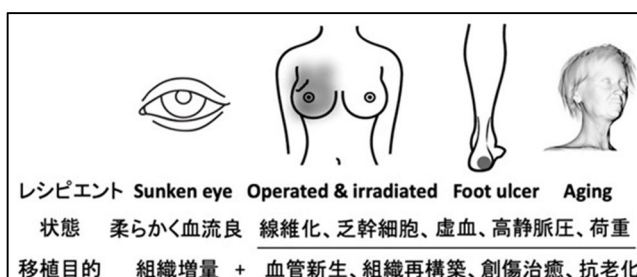
キーワード：脂肪移植 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

形成外科学は体表のあらゆる部位を手術対象として発展してきた外科学の一分野である。形成外科学が対象とするのは外傷、先天異常、悪性腫瘍切除後欠損、変性疾患など多岐にわたる。そして、すべての形成外科手術においてその根底を貫く基本原理は、美しい形態の再建が良好な機能の再建につながる、という考え方である。

皮下脂肪組織は全身にわたって広範囲に存在し、採取も容易であるため再建材料として有力な候補のひとつである。近年、皮下脂肪組織が再建材料として組織増量効果の他に多面的作用を発揮することが注目されるようになってきた。

脂肪移植法は近年こうした多面的作用に期待して、その応用が積極的に図られている。しかし、問題点として移植脂肪の多面的作用を制御して発揮させることが難しく期待した効果が必ずしも得られない場合も多い。



これらの問題の解決のためには移植脂肪に使われる皮下脂肪組織に含まれる各細胞群の性質を根源的なレベルで把握する必要がある。エピジェネティクスは DNA 配列を変えずに細胞機能を調節するメカニズムであり、細胞機能を形作るものとして決定的な役割を担っている。脂肪組織に存在する細胞群のエピジェネティクス状態を全 DNA 領域に渡って解析しその違いを明らかにしたい。これらの結果を美しい再建のための脂肪移植に役立てたい。

2. 研究の目的

脂肪移植レシピエント状態と移植目的に適した最適な細胞調製法を確立するために、以下の細胞、遺伝子技術、測定系により脂肪組織由来細胞のエピジェネティクスと脂肪移植との関係を明らかにする。

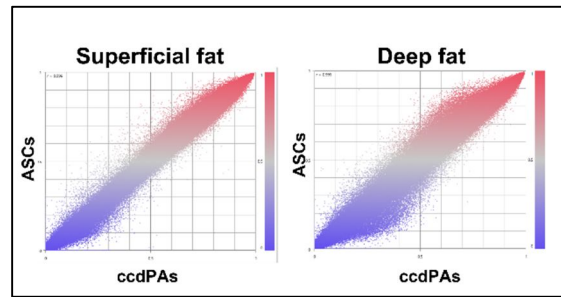
3. 研究の方法

ヒト皮下脂肪組織からコラゲナーゼ処理の後、遠心分離を行い比重の違いを利用して 2 種類の細胞群、1 つは天井培養由来前駆脂肪細胞 (ceiling culture derived proliferative adipocyte, ccdPAs)、もう 1 つは脂肪組織由来幹細胞 (adipose derived stem cells, ASCs) を分離培養した。採取は皮下脂肪組織の浅筋膜で隔てられた、浅筋膜より浅い脂肪層 (浅層)、浅筋膜より深い脂肪層 (深層)、それぞれから行った。7 週間の培養の後、DNA 45 万 CpG サイトのメチル化測定、H3K4me3 の ChiP-Seq アッセイ、データの Subio platform による解析、KEGG pathway 解析を行った。

4. 研究成果

- (1) DNA 全体にわたるメチル化状態の違い ~ 浅層脂肪組織より深層脂肪組織の方が ccdPAs と ASCs のメチル化の差が大きい~

我々はこれまで、ccdPAs の ASCs の機能差の解析を行ってきた。それらの研究により、ccdPAs の方が ASCs と比べて脂肪分化能が高いこと、骨分化能が高いことを明らかにしてきた。また、その理由の一つとしてエピジェネティクス状態の違いがあることを明らかにしてきた。



これまでの解析は特定の遺伝子に関するエピジェネティクス状態に注目したものであった。今回行った DNA 全体にわたる定量解析により ccdPAs と ASCs のエピジェネティクス CpG メチル化状態の違いが皮下脂肪組織浅層よりも皮下脂肪組織深層において大きいことが明らかになった。このことは脂肪移植ドナーとしての脂肪採取部位の判断に影響を及ぼす可能性がある。

- (2) エピジェネティクスに注目したオントロジー解析 ~ ccdPAs は ASCs より脂肪分化、骨分化しやすい状態にある~

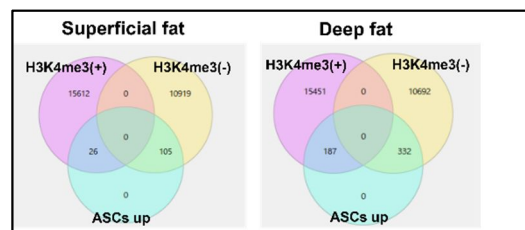
| Term | Odds Ratio | P-value |
|-----------------------------------|------------|---------|
| PPAR signaling pathway | 2.45 | 0.00 |
| Graft-versus-host disease | 2.85 | 0.00 |
| Allograft rejection | 2.73 | 0.01 |
| Osteoclast differentiation | 1.84 | 0.01 |
| T cell receptor signaling pathway | 1.93 | 0.01 |
| Adipocytokine signaling pathway | 2.07 | 0.02 |
| Rheumatoid arthritis | 1.85 | 0.02 |
| ECM-receptor interaction | 1.90 | 0.02 |
| Renin-angiotensin system | 2.82 | 0.03 |
| Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) | 1.83 | 0.03 |

エピジェネティクスは遺伝子発現ポテンシャルを規定する。これまで、我々は脂肪分化、骨分化関連遺伝子に注目したエピジェネティクス解析により分化のしやすさを評価してきた。今回、全 DNA にわたる CpG メチル化状態を KEGG を用いた遺伝子オントロジーによるパスウェイ解析を行った。

結果、上位に脂肪分化、骨分化の重要なパスウェイが位置づけられることを確認した。また、これまで ccdPAs と ASCs の機能差を考える上で全く注目していたなかった予想外のパスウェイが上位にくることが発見された。このことは今後の研究や臨床応用の方向性に大きく影響する可能性がある。

- (3) 複数のエピジェネティクス機構による皮下脂肪組織由来細胞の解析 ~ H3K4me3 と一致した CpG サイトの方が部位的な差が大きい~

エピジェネティクス機構は複数存在し、それらが複雑に影響を及ぼし合って作用している。よって、細胞間の比較を行う際に一つのエピジェネティクス機構だけではなく複数のエピジェネティクス機構をみることは重要と考えた。



特に H3K4me3 と重なって存在している CpG は ASCs と ccdPAs の違いが浅層と比べて深層で大きかった。このことは浅層脂肪と深層脂肪が異なった性質を示すことに寄与している可能性があると考えられた。

- (4) 本研究では細胞機能の根幹であるエピジェネティクスについて全 DNA レベルで解析を行った。これは形成外科学の知識体系を拡大するとともに、様々な臨床状況での脂肪移植の最適化に向けたさらなる研究の道を開くものとなる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kubota Yoshitaka, Nagano Hidekazu, Kosaka Kentaro, Ogata Hideyuki, Nakayama Akitoshi, Yokoyama Masataka, Murata Kazutaka, Akita Shinsuke, Kuriyama Motone, Furuyama Nobutaka, Kuroda Masayuki, Tanaka Tomoaki, Mitsukawa Nobuyuki | 4. 巻 321 |
| 2. 論文標題 Epigenetic modifications underlie the differential adipogenic potential of preadipocytes derived from human subcutaneous fat tissue | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 C596 ~ C606 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00387.2020 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔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 | 田中 知明 (Tanaka Tomoaki) (50447299) | 千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501) | |
| 研究分担者 | 黒田 正幸 (Kuroda Masayuki) (00253005) | 千葉大学・医学部附属病院・特任准教授 (12501) | |
| 研究分担者 | 窪田 吉孝 (Kubota Yoshtiaka) (10375735) | 千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (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 |
|---------|---------|
|---------|---------|