

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659832

研究課題名（和文） 巨指症発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular biological analysis of Macroductyly

研究代表者

石河 利広 (ISHIKO TOSHIHIRO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10402869

研究成果の概要（和文）：巨趾症より採取した脂肪には、コロニー形成能の旺盛な幹細胞が多く含まれており、四肢の発生、先天異常に関係する遺伝子、脂肪組織の増加に関わる遺伝子の発現亢進が認められた。これらの遺伝子が巨趾症の病態形成に関わっている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Adipose tissue of macroductyly includes a lot of stem cells that formed colony .In the adipose tissue, genes concerns about formation of limb and adipose tissue expressed highly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：巨指症 巨趾症

1. 研究開始当初の背景

巨指症とは、出生時あるいは幼小児期に不釣合に大きな指（足趾）を認め、罹患部の骨、腱、神経、血管、脂肪組織、爪、皮膚すべてが病的過成長を呈する先天異常である

(Barsky, A. J. J Bone Joint Surg.

49A:1255-1266, 1967)。巨指症とは言うものの、病変部は指（足趾）のみに限らず手部（足部）、前腕（下腿）、また、1肢全てにおよ

ぶ場合もある。比較的稀な先天異常で上肢先天異常症例の0.9% (Ishida O et al. Plast. Reconstr. Surg. 102:1586-1590, 1988) から1% (Flatt A: The Care of Congenital Hand Anomalies. St. Louis, Quality Medical Publishing, 1994) を占める。ほとんどの症例が片側性で、遺伝性を認めない。罹患指の成長速度が、健常指より早いものの頻度が高い。罹患率は低いが、巨大な指は、機能的に

も整容的にも患者、家族に大きな負担となり治療の必要性が高い。

現在のところ、根治的治療法は存在せず軟部組織、骨に対する減量手術が唯一の治療法である。しかし、確立された手術法はなく、複数回の手術が必要であり、過成長の制御が困難で罹患指の切断が必要になることもある。

その一方で、巨指症の病態、病因解明は進んでいない。罹患指においては、多量の皮下脂肪が存在しており、指を構成するすべての組織が過成長するというものの、腱、血管が過成長していることは少ない。罹患指では、支配神経が肥大し蛇行していることがあり (Wood V. J Iowa Med Soc. 59:922-928, 1969)、そのような神経においては、組織学的に肥大神経の軸索のサイズは正常なものの、軸索周囲に多量の脂肪浸潤を認めるという所見を示す (Thorne F et al. Plast Reconstr Surg. 41:232-239, 1968)。また、骨組織は多数の破骨細胞、骨芽細胞を含み、骨膜レベルでのリモデリングが亢進しているという報告もある (Minkowitz et al. J Pathol Bacteriol 90:323-328, 1965)。病因については、何らかの成長抑制因子の局所的欠損 (Barsky A. J. J Bone Joint Surg. 49A:1255-1266, 1967)、局所的な神経線維腫症 (McCarroll H. J Bone Joint Surg. 38A:717-731, 1956)、末梢神経の障害 (Moore B. J Bone Joint Surg. 26A:282-288, 1944)、局所的な増殖因子の存在 (Hueston J. Aust NZ J Sur. 37:394-397, 1968) などが示唆されているがいずれも確証があるものではない。また、これらの報告はすべて 40 年前以上のもので、新しい研究は全く報告されていない。

2. 研究の目的

、その速度について様々な症例が存在するが、ほとんどの巨指症症例に共通するものは、多量の皮下脂肪を伴い骨格が過成長することである。病因については、分子生物学的な手法をもちいた研究報告が存在せず、い

ずれの報告についても推測の範疇をでないものである。そこで、申請者らは、巨指症患者より得られる脂肪組織を分子生物学的な手法をもちいて探索することにより巨指症発症のメカニズムを解明することとした。

3. 研究の方法

巨指症患者に対する手術療法のうち、主なものは減量手術である。指長の短縮、指幅の縮小のために皮下脂肪や骨を切除することが多い。この手術を受ける患者で、インフォームドコンセントを十分に得た方から、脂肪組織、骨膜を採取した。病変部および正常対象の脂肪組織より脂肪幹細胞を単離、培養した (Zuk PA et al. Tissue Eng 7:211-228, 2001)。脂肪組織を PBS にて洗浄後、0.075% collagenase で 37°C、30 分インキュベートした。その後、10%FCS 入 DMEM にて collagenase を中和した。1500rpm で 10 分間遠心分離し、得られた細胞ペレットを 75cm² の培養フラスコに移して培養した。24 時間後に接着していない細胞を取り除いた。細胞を抗真菌剤入りの培養液で 7 日間培養した。その間、2, 3 日おきに培養液を交換した。その後は、抗真菌剤なしの培養液で培養し、3 日おきに培養液を交換した。細胞は、confluent に達する前に継代した。得られた脂肪肝細胞をもちいて colony assay を行った。脂肪肝細胞を 10cm dish 1 枚あたり、1000 個、5000 個、10000 個播種する群にわけ 3 週間培養を行った。3 週間後にギムザ染色を行い 10cm dish 1 枚あたりの colony の数、大きさを測定した。また、十分インフォームドコンセントを得られた巨指症患者患者と対照として合趾症患者から脂肪組織を採取した。得られた脂肪組織よりそれぞれ total RNA を採取した。それぞれの RNA サンプルについて Affymetrix[®]社製 GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array による発現解析を行った。AGCC (Affymetrix[®]; GeneChip[®]; Command Console[®]; Software) によりデータを解析し、出力した CHP ファイルをア

レイ解析ソフト GeneSpring[®] に持ち込み、データマイニングを行った。

4. 研究成果

コロニーアッセイの結果、形成されたコロニーを直径 6mm 未満、6mm から 12mm、12mm より大きい、の 3 種類に分けて比較した。巨趾症病変部では、12mm 以上の大きなサイズのコロニーが多数であった。

マイクロレイ解析の結果、合趾症脂肪組織に対して巨趾症脂肪組織で発現が 10 倍以上発現亢進しており、機能が既知の遺伝子を 17 個認めた。そのうち、Epidermal growth factor-like domain multiple-6 (EGFL6) については 52 倍の発現亢進を認めた。EGFL6 は、肥満患者の皮下脂肪組織で発現亢進しており、その発現レベルは脂肪細胞の大きさが肥満により多くなると増加し痩せて小さくなると低下し脂肪幹細胞の増殖を促進すると報告されている (Oberauer R et al. Mol Cell Biochem. 2010)。また、四肢の発生、形態に関わる遺伝子 TBX5 が 7.7 倍の亢進を認めた。心臓と四肢の発生に関わる転写因子で、Holt-Oram 症候群 (心臓奇形+手先天異常) の原因遺伝子である (Chapman et al. Dev Dyn. 1996)。

巨趾症より採取した脂肪には、コロニー形成能の旺盛な幹細胞が多く含まれており、四肢の発生、先天異常に関係する遺伝子、脂肪組織の増加に関わる遺伝子の発現亢進が認められた。これらの遺伝子が巨趾症の病態形成に関わっている可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

2012 年 10 月 5 日 日本形成外科学会基礎学術

集会、猪苗代

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石河 利広 (ISHIKO TOSHIHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10402869

(2) 研究分担者

鈴木 茂彦 (SUZUKI SHIGEHICO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30187728

内藤 素子 (NAITOH MOTOKO)

京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 30378723

吉川 勝宇 (YOSHIKAZA KATSUHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10583156

(3) 連携研究者

()

研究者番号：