

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870138

研究課題名(和文)皮下浅層脂肪組織と深層脂肪組織の脂肪細胞機能の違いからみた移植応用性の比較解析

研究課題名(英文) Difference of adipocyte function between superficial and deep subcutaneous fat tissue

研究代表者

窪田 吉孝 (KUBOTA, Yoshitaka)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10375735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪移植法のドナーのひとつである腹部皮下組織には、浅筋膜により隔てられた浅層皮下脂肪組織と深層皮下脂肪組織が存在する。両者の細胞レベルでの機能的差異は明らかではなかった。ヒト腹部皮下脂肪を浅層と深層に分離し、それぞれから脂肪細胞を分離したところ回収数は浅層で有意に多く、浅層と深層の細胞機能に差があることを示唆していた。両者の脂肪分化能を比較したところ、浅層の脂肪細胞の方が深層と比べ有意に脂肪分化能が高かった。この傾向は継代後のccdpAでも同様で、細胞機能の差がエピジェネティックメモリーとして受け継がれている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous fat tissue is frequently used as a donor site of fat or adipocyte grafting. Subcutaneous fat tissue is anatomically separated into two layers by superficial fascia. Superficial fat tissue and deep fat tissue have different function basing on different anatomical structure. The difference in adipocyte function, however, between two layers is still unclear. Our result showed that cell survivability of adipocyte of superficial layer is superior to that of deep layer. Adipocyte differentiation potential is superior in superficial adipocyte compared to deep adipocyte. The difference in epigenetic modification can be one of the causes creating different cell function between two layers.

研究分野：脂肪移植学

キーワード：脂肪移植 皮下脂肪 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

脂肪移植法は形成外科領域において組織増量による形態改善のみならず、創傷治癒の促進・癬痕成熟の促進・遺伝子治療の vehicle・再生医療、など幅広い適応を持ち、ドナーの豊富さ・安全性から、今後ますます応用領域が広がることが確実である。しかし、移植の問題点として、生着率が 20-40%程度(Tremolada, *Cell Transplant*, 2010)と低く、成績が不安定な点がある。このことは、臨床上、適応を拡大する上で重大な障害であり、この問題を克服するために世界中で様々な基礎研究が行われている。この問題点にアプローチするため申請者は、脂肪細胞の部位特異的機能の分析が新たな移植技術を発展させると考えた。

脂肪移植法のドナーのひとつである腹部皮下組織には、浅筋膜により隔てられた浅層皮下脂肪組織と深層皮下脂肪組織が存在することが知られている。脂肪細胞機能は解剖学的部位と密接に関連しており、細胞ごとに多彩で変化するダイナミックなものである。

皮下組織の2層構造は哺乳類で一般的にみられものである。部位により明瞭な部位と不明瞭な部位があるがヒト腹部皮下組織では明瞭である。浅層と深層の間は浅筋膜と呼ばれる線維性組織で隔てられている。これらの構造は肉眼的にも明瞭である。また、超音波、Computed Tomography (CT), Magnetic Resonance Imaging (MRI)といった各種画像検査でも容易に確認できる。

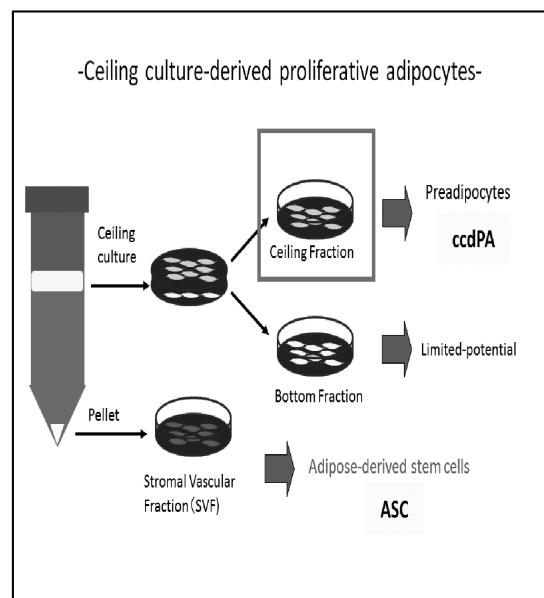
肉眼的には浅層脂肪組織は脂肪小葉が



立方体で小葉間隔壁が厚い線維組織で構成されている。一方、深層脂肪組織は脂肪小葉が扁平で小葉間隔壁の線維組織は薄く伸展性に富む。このことから Nakajima(1999)らは浅層脂肪組織は圧力から身体を守るためのもので、深層脂肪組織は伸展やずれに皮膚が応じるためのものであると報告した。しかし、これ以外の脂肪組織浅層・深層の機能差に関する報告は殆どみられなかった。

近年、皮下深層脂肪組織の蓄積が全身的な代謝異常と関連しているとの報告が出され、浅層と深層との機能差が注目されるようになった。この関連性は、これまで精力的に研究されてきた内臓脂肪の蓄積とインスリン抵抗性などとの関連に類似している。組織レベルでは、肥満に伴い深層脂肪組織の蓄積が浅層のそれよりも大きいこと、脂肪分化関連遺伝子発現が浅層の方が高いことなどが近年漸く明らかになってきた。しかし、脂肪細胞そのものの機能差が研究されたことはなく、皮下深層脂肪組織の蓄積と代謝異常との分子生物学的繋がりとは不明であった。

我々がこれまで分離してきた天井培養由来増殖性脂肪細胞を用いて脂肪細胞機能解析を行うことにより、新たな部位特異的機能差を明らかにしたい。



2. 研究の目的

脂肪移植法のドナーのひとつである腹部皮下組織には、浅筋膜により隔てられた浅層皮下脂肪組織と深層皮下脂肪組織が存在することが知られている。両者は、解剖学的構築の違いから異なる物理的身体保護作用を持つが、細胞レベルでの機能的差異は明らかではない。本研究の目的は、皮下組織浅層と深層それぞれの脂肪細胞・脂肪組織由来幹細胞の細胞機能の違いを明らかにし、再生医療の目的別に適した細胞調製法を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 各種哺乳類における皮下脂肪組織構造

各種哺乳類において皮下組織の2層構造を組織学的に確認した。

哺乳類として、

1. もっとも普及した実験動物であるマウス。通常のマウスは皮下組織に乏しいため ob/ob マウス背部を用いた。
2. 生理学的にヒトに近いといわれている実験動物であるブタの背部皮下組織。
3. ヒト腹部外側皮下組織。

これらの組織を採取しホルマリン固定ののち hematoxylin-eosin 染色を行った。

(2) ヒト腹部皮下組織の脂肪細胞の大きさ

倫理委員会の承認の下、ヒト腹部皮下組織で手術時廃棄されるものを回収し、分析の対象とした。ホルマリン固定の後 hematoxylin-eosin 染色を行い、脂肪細胞の大きさを計測した。脂肪細胞の大きさとして平均面積を用いた。

平均面積は以下のように算出した。
平均脂肪細胞面積 (μm^2) = 単位面積 / 単位面積あたりの脂肪細胞数

(3) ヒト腹部皮下組織浅層・深層の天井培養由来脂肪細胞の回収効率の比較
倫理委員会の承認の下、ヒト腹部皮下組織で手術時廃棄されるものを回収し、分析の対象とした。浅層・深層を別個にコラゲナーゼ処理の後、遠心し、浮遊分画から天井培養脂肪細胞を採取し、7日後に細胞数を測定した。

(4) ヒト腹部皮下組織浅層・深層の天井培養由来脂肪細胞の脂肪分化能の比較

天井培養ではコラゲナーゼ処理の後の遠心分離にて浮遊分画を培養の後、天井培養由来増殖性脂肪細胞 (ccdpA) として回収した。天井培養の際の沈殿分画を stromal vascular fraction (SVF) として通常培養した。それぞれ1週間の培養の後、脂肪分化誘導14日間行った。Oil-red-O 脂肪染色で脂肪蓄積を比較した。また、脂肪分化関連マーカーを測定した。

(5) ヒト腹部皮下組織浅層・深層の天井培養由来脂肪細胞のエピジェネティクス修飾の比較

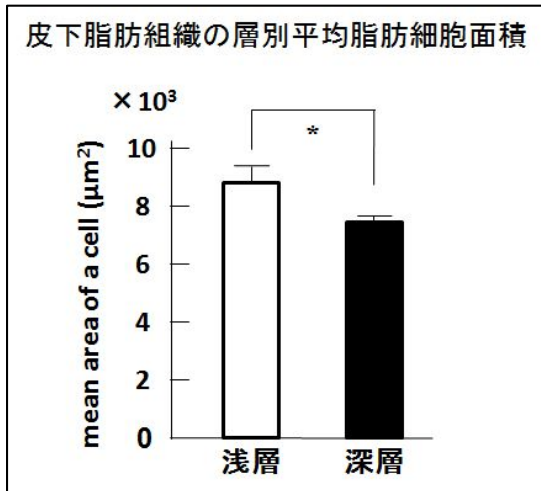
浅層・深層それぞれに由来する天井培養脂肪細胞のDNAを回収し、脂肪分化関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化を測定した。

4. 研究成果

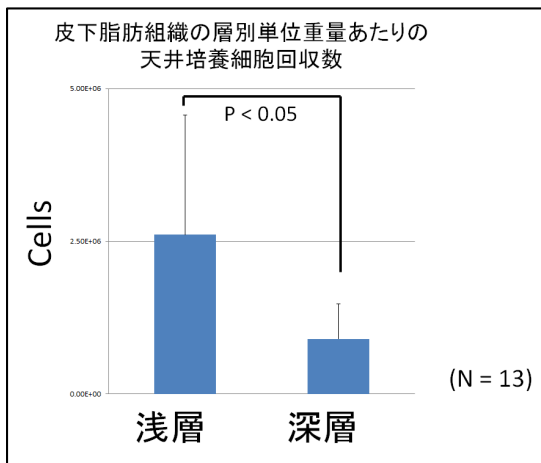
(1) 各種哺乳類における皮下脂肪組織
マウス、ブタ、ヒトにおいて皮下組織の2層構造は明瞭に観察された。浅筋膜はマウス、ブタではエオジンに好染する明瞭な一層の構造としてみられた。一方、ヒトでは同じくエオジンに好染するが多層の構造としてみられた。



(2) 浅層の脂肪細胞は深層の脂肪細胞より大きかった



浅層脂肪細胞の平均面積は深層脂肪組織より有意に大きかった。このことは脂肪細胞の分化が浅層と深層間でことなることを示していた。ただし、これが浅層と深層との間の脂肪組織の環境の違いによ

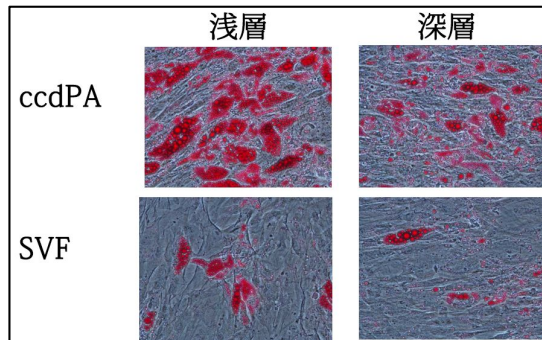


るものかともとの脂肪細胞の内在性の性質の違いによるものかは不明であった。

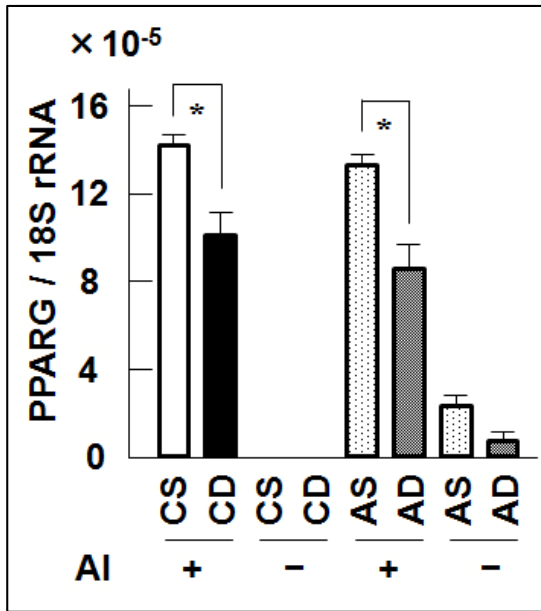
(3) 採取脂肪組織 1 g あたりの天井培養由来増殖性脂肪細胞の回収数は浅層皮下脂肪由来のものが深層皮下脂肪由来のもの比べて有意に高値だった。

浅層の脂肪細胞の方が深層のそれよりも大きいため、単位重量あたりの脂肪細胞数は深層の方が多い。にもかかわらず同じ 1 g から 1 週間の天井培養の後に回収できた脂肪細胞数は浅層の方が有意に多かった。このことは、浅層の脂肪細胞と深層の脂肪細胞との間で生存性に関連した機能差があることを示していた。

(4) 浅層皮下脂肪由来の天井培養由来増殖性脂肪細胞は深層皮下脂肪由来のそれと比較し、高い脂肪分化能を示した。また、天井培養由来増殖性脂肪細胞と Stromal vascular fraction (SVF) の脂肪分化能の比較では浅層、深層ともに天井培養由来増殖性脂肪細胞が SVF と比べて高い脂肪分化能を示した。



脂肪分化のマスターレギュレーターである PPAR-gamma の遺伝子発現は脂肪分化誘導を行っていない群では極めて低く、脂肪分化誘導により上昇した。浅層の PPAR-gamma 発現は深層よりも高く、Oil-red-O 染色における脂肪滴の高度蓄積と一致していた。



(5) 浅層皮下脂肪由来の天井培養由来脂肪細胞の PPAR gamma 遺伝子プロモーター領域のメチル化は深層のものと比較して低値だった。

このことは浅層脂肪細胞と深層脂肪細胞との間に環境の違い以外に内在性の機能差がもともと存在することを示していた。

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 2 件)

1. Kubota Y, Mitsukawa N, Uchida M, Uchida Y, Akita S, Hasegawa M, Satoh K. Low-level mesodermal somatic mutation mosaicism: late-onset craniofacial and cervical spinal hyperostoses. *Am J Med Genet A*. 2014 Mar;164A(3):741-7. doi:10.1002/ajmg.a.36310. Epub 2013 Dec 19. PubMed PMID: 24357582.
2. Kubota Y, Mitsukawa N, Akita S, Hasegawa M, Satoh K. Postoperative patency of the retrograde internal mammary vein anastomosis in free flap transfer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014 Feb;67(2):205-11. doi: 10.1016/j.bjps.2013.10.013.

Epub 2013 Oct 26. PubMed PMID: 24211113.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 窪田吉孝, 三川信之, 小坂健太郎, 安達直樹, 笹原資太郎, 小泉智恵, 長谷川正和, 黒田正幸, 佐藤兼重
皮下脂肪組織由来細胞の部位特異的機能差とエピジェネティクス解析
第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会
2014 年 10 月 9 日-10 日
キッセイ文化ホール(長野県松本市)
2. 窪田吉孝, 安達直樹, 笹原資太郎, 小泉智恵, 長谷川正和, 黒田正幸, 三川信之, 武城英明, 佐藤兼重
Ex vivo 遺伝子導入した脂肪細胞移植による難治性・希少疾患治療の展望
第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会
2013 年 11 月 7 日-8 日
朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

窪田 吉孝 (KUBOTA, Yoshitaka)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10375735