

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20312

研究課題名(和文)遊離脂肪組織移植におけるHGF遺伝子プラスミドを用いた遺伝子治療の基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on gene therapy using HGF gene plasmid in free adipose tissue transplantation

研究代表者

峯田 一秀(MINEDA, Kazuhide)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：70747815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遊離脂肪組織移植におけるHGF遺伝子プラスミドを用いた遺伝子治療の基礎研究として、動物モデルで実験を行った。結果として、移植後3か月で移植遊離脂肪の萎縮率に有意差はなかった。しかしながら、免疫染色による質的評価を行ったところ、HGF遺伝子プラスミド導入群で脂肪細胞の壊死を抑制することが分かってきた。今後、遺伝子解析やタンパク質解析などのさらなる検証が必要であるが、臨床的に移植脂肪の壊死が抑制できれば、遅発性合併症として知られる嚢胞形成や石灰化の予防に繋がる可能性があり、特に乳房における脂肪注入術において、臨床応用が期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：As a basic research on gene therapy using HGF gene plasmid in free adipose tissue transplantation, an experiment was conducted in an animal model. As a result, there was no significant difference in atrophy rate of transplanted free fat at 3 months after transplantation. However, qualitative evaluation by immunostaining revealed that it inhibited the necrosis of adipocytes in the HGF gene plasmid introduced group. Further verification such as genetic analysis and protein analysis is necessary in the future, but suppression of necrosis of transplanted fat clinically can lead to the prevention of cyst formation and calcification known as late complications, I believe that clinical application can be expected especially in fat injection technique in breast.

研究分野：形成外科

キーワード：遊離脂肪移植 HGF遺伝子プラスミド

1. 研究開始当初の背景

(1) 自家遊離脂肪移植術のひとつである吸引脂肪移植は、世界各国で主に乳房増大を目的として行われている。しかしながら、虚血に弱い脂肪組織を1カ所に多量に移植することによって、脂肪壊死が強く起こり、晩期合併症として嚢胞形成と石灰化が発症しうる。微小石灰化像は、乳がんとの鑑別が問題となることが多い。

(2) 移植脂肪の萎縮と上記の合併症に対して、様々な臨床研究や基礎研究が行われている。自己多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma; PRP) などの各種成長因子や、ASCs を含む間質血管細胞群 (stromal vascular fraction; SVF) の付加などが行われおり、移植脂肪の生着率が 40~50% からおおむね 10~20% 上昇するという報告が散見される。しかしながら、移植脂肪の生着率向上と合併症に対する決定的な治療法は、未だ存在していないのが現状である。

(3) 我々が、動物モデルで移植脂肪のリモデリングを長期に観察したところ、脂肪新生は移植後 12 週で完了することがわかった。脂肪壊死によって生じた油滴は、早期では M1 マクロファージによって積極的に貪食されるが、次第に M2 マクロファージの割合が増加し、移植後 12 週でも、油滴周囲に M2 マクロファージ主体の細胞浸潤が観察された(引用文献①)。また、脂肪移植後に嚢胞形成と石灰化を生じたヒト検体において、術後数年の嚢胞壁に M2 マクロファージ主体の細胞浸潤を認めたため、嚢胞形成と石灰化に M2 マクロファージが大きく関与しているのではないかと結論づけた(引用文献②)。そこで、特に移植後早期・中期での血管新生促進と抗炎症効果が得られれば、移植脂肪の生着率向上と合併症予防に繋がるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、血管新生作用と抗炎症効果を持った Hepatocyte growth factor (HGF) 蛋白に着目し、すでにリンパ浮腫やバージャー病などに対する治療で用いられ、安全面で優れた HGF 遺伝子プラスミドによる遺伝子治療を自家遊離脂肪移植術に応用する。マウス遊離脂肪移植モデルを用いて、移植床に遺伝子導入を行い、移植床からの血管新生が促進し得るかを精査し、移植脂肪の生着率と移植片に対する抗炎症効果について検証することが目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒト脂肪組織の確保

保険診療で行われる外科的手術において、通常は廃棄物処理をしている皮膚・皮下組織を患者の同意を得て、採取同日に動物モデルに移植した。

(2) HGF 遺伝子プラスミドの投与方法

投与部位に関しては、ウイルスベクターを用いない遺伝子プラスミドは導入効率が悪いいため、導入効率の良い筋肉組織へ投与することにした。投与量・投与回数については、文献的な調査を参考にして、パイロットスタディを行った(引用文献③)。

(3) コントロールプラスミドの作成

インビトロジェン製のカナマイシン耐性プラスミド骨格を購入し、大腸菌を用いて増幅させて、 $1\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ で調整した。

(4) 遊離脂肪移植モデル

免疫不全マウス (scid/scid) の左右脊柱起立筋にそれぞれ遺伝子プラスミドを $100\mu\text{l}$ ずつ投与した。HGF 遺伝子プラスミド、コントロールプラスミドともに $1\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ で調整した。投与時期は、移植前 1 週、移植時 0 週の計 2 回とした。移植脂肪組織量は 1.0g として、脊柱起立筋上に移植した。

(5) 移植脂肪の量的評価

各時点において、移植脂肪組織をサンプリングし、移植脂肪の重量比率(移植脂肪重量/マウス体重)の計測を行った。

(6) 移植脂肪の質的評価

抗ペリリピン抗体と抗 MAC-2 抗体を用いて、免疫染色を行い、脂肪細胞の壊死を起因とする油滴の評価を行った。

(7) 血管新生・抗炎症効果

CD31 と Isolectin で血管を染色して、血管数をカウントした。HGF、VEGF、PDGF-BB、FGF などの血管新生促進因子、IL-4、IL-10、TGF- β などの抗炎症性サイトカインについて、遺伝子・蛋白質解析を行う。

4. 研究成果

(1) 遺伝子プラスミドの投与時期

当初の計画では、移植時 0 週と移植後 2、4 週の計 3 回の投与を予定していたが、HGF 蛋白発現のピークが投与後 1 週であり、4 週間かけて漸減していくことがわかったため、投与時期を移植前 1 週と移植時 0 週の計 2 回の投与に変更した。

(2) 移植脂肪の重量比率

移植後 4、8、12 週の時点で、移植脂肪の重量とマウスの体重を測定した結果、重量比率に関しては、HGF 遺伝子プラスミド群とコントロールプラスミド群の間に、いずれの時点においても有意差を認めなかった。つまり、マクロでみた場合、移植脂肪の生着率向上には繋がらないという結果になった。今後、HGF 遺伝子プラスミドの投与方法を再検討するとともに、筋肉に接しているのが移植脂肪の下面のみであるため、移植モデルについても

再検討が必要かもしれない(図1)。

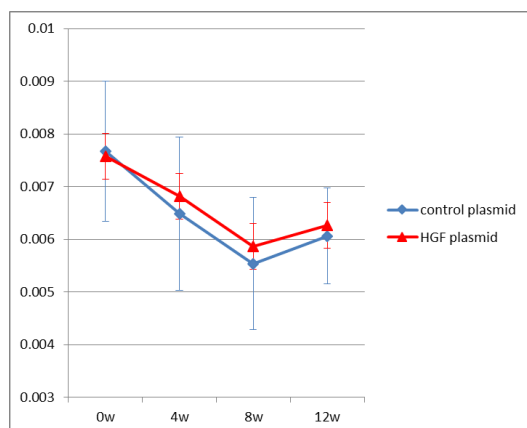


図1. 移植脂肪の重量比率

(3) 脂肪壊死(油滴)の評価

ペリリピン染色で生きた脂肪組織と、MAC-2染色で脂肪壊死の範囲を計測した。移植後12週時点で、移植脂肪内の油滴量が有意に減少していた。つまり、ミクロでみた場合、HGFの血管新生作用や抗炎症効果によって、脂肪壊死が抑制され、質的改善が得られたと考えられる。臨床応用できれば、嚢胞形成や石灰化の予防になり得るかもしれない(図2)。

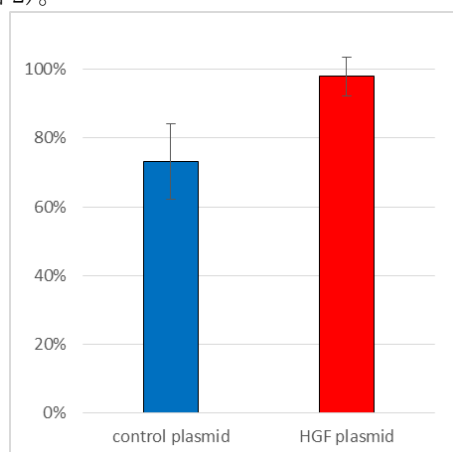


図2. 移植12週での移植脂肪内の油滴の割合

(4) 血管新生作用、抗炎症効果

免疫染色による移植脂肪内の毛細血管数に有意差はなかった。しかしながら、移植後4週のHGF遺伝子プラスミド群において、血管数に増加傾向があったため、N数を増やして、さらに検証したい。移植脂肪における血管新生促進因子、抗炎症サイトカインの遺伝子・蛋白質解析については、データの不確実性から、まだ正確な結果が出ておらず、引き続き検証を重ねていく予定である。

〈引用文献〉

①Kato H, Mineda K, Eto H, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Kanayama K, Yoshimura K. Degeneration, reeeneration, and cicatrization after fat grafting: dynamic total tissue remodeling during the first 3months. 133:303e-313e, 2014.

②Mineda K, Kuno S, Kato H, Kinoshita K, Doi K, Hashimoto I, Nahanishi H, Yoshimura K. Chronic inflammation and progressive calcification as a result of fat necrosis: the worst end in fat grafting. Plastic and Reconstructive Surgery. 133:1064-1072, 2014.

③森下竜一: 下肢慢性閉塞性動脈硬化症に対する血管新生療法の進展, Angiol Front 5:11-18, 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

①Feng J, Mineda K, Wu SH, Mashiko T, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Kanayama K, Asahi R, Sunaga A, Yoshimura K. An injectable non-cross-linked hyaluronic-acid gel containing therapeutic spheroids of human adipose-derived stem cells. Sci Rep. May 8:7(1):1548, 2017. 査読有
DOI:10.1038/s41598-017-01528-3

②Kanayama K, Mineda K, Mashiko T, Wu SH, Feng J, Kinoshita K, Sunaga A, Yoshimura K. Blood Congestion Can Be Rescued by Hemodilution in a Random-Pattern Skin Flap. Plastic and Reconstructive Surgery. Feb;139(2):365-374, 2017. 査読有
DOI:10.1097/PRS.0000000000002935

③Mineda K, Feng J, Ishimine H, Takada H, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Kanayama K, Kato H, Mashiko T, Hashimoto I, Nakanishi H, Kurisaki A, Yoshimura K. Therapeutic Potential of Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cell Microspheroids Prepared by Three-Dimensional Culture in Non-Cross-Linked Hyaluronic Acid Gel. Stem Cells Trans Med. Dec;4(12):1511-1522, 2015. 査読有
DOI: 10.5966/sctm.2015-0037

〔学会発表〕(計2件)

①Mineda K, Kashiwagi K, Ishida S, Abe Y, Hashimoto I. A case of Berbar-Say syndrome with multiple facial deformities. The 13th Japan Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (13JKPRS), 2016/5/15-17, ANA Crowne Plaza Hotel Kanazawa, Ishikawa.

②Mineda K, Matsuo S, Seike T, Ishida S, Takaku M, Abe Y, Toda A, Yamasaki H, Hashimoto I. Efficacy and complication of resorbable plate for reconstruction of orbital wall fractures. International Society of Craniofacial Surgery (ISCFS), 2015/9/17-18, Hilton Tokyo Bay Hotel Maihama, Chiba.

[その他]
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯田 一秀 (MINEDA, Kazuhide)
徳島大学・病院・特任助教
研究者番号：70747815

(2) 研究協力者

堀川 秀昌 (HORIKAWA, Hidemasa)
三澤 茂雄 (MISAWA, Shigeo)
津田 達也 (TSUDA, Tatsuya)

