

令和元年6月27日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11381

研究課題名(和文)血管誘導と虚血耐性獲得を用いた新しい脂肪移植方法の確立とその臨床応用

研究課題名(英文)New method of fat grafting with collagen matrix

研究代表者

松村 一 (Matsumura, Hajime)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：80256263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪移植の問題点は、1回の移植量が限られること、移植脂肪の生着が不安定なことである。その改善方法として、移植部位の血管新生・血行の早期安定化が最も重要と考え、脂肪注入の際にコラーゲンマトリックスを添加する方法を行った。SDラット26匹の背部にコントロール群、コラーゲン添加群の移植脂肪検体を作成し、脂肪生着の評価を行ったところ、遺伝子発現量には有意差を検出できなかったが、生着の半定量的評価ではコラーゲン注入群で生着増加を認め、病理組織染色ではコラーゲン注入群で血管増生を認めた。脂肪移植時の血管新生や脂肪生着状況より、コラーゲンを添加し1回の脂肪移植量と生着率を向上させる、という研究結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪移植は比較的侵襲の少ない手術であり近年様々な領域で行われている。本法の問題点は、1回の移植量が限られること、移植脂肪の生着が不安定であることである。それゆえ、術後の生着量の予想は難しく、多数回の移植が必要となる。移植脂肪細胞を安定的に生着させることが出来れば、手術回数および身体への負担は軽減し、手術手技として更に有用な方法となる。コラーゲンを添加し1回の脂肪移植量と生着率を向上させる、という我々の研究結果は臨床に有用であり社会的に意義のあるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Fat grafting is very useful method with a little damage. It has coming to be frequently used recently. Therefore, the problem of this method is limitation of one time injection volume and instability of the grafted fat. To solve these problems, early stabilization of angiogenesis and blood circulation are most important. In this study, collagen matrix is add in the fat grafting to improve an angiogenesis as our previous report. Autologous fat was injected subcutaneously into the back of Sprague-Dawley rats. Collagen matrix with (collagen group) and without (control group) group were assigned for 26 rats. Survival rate of grafted fat was evaluated. Gene expression level of adiponectin, VEGF, CD31 was not possible to detect a significant difference. Semi-quantitative evaluation of the clinical findings and pathological findings indicated fat biosynthesis in collagen group. This study showed addition of collagen to fat increase the grafting volume and survival rate of fat.

研究分野：形成外科 創傷治癒

キーワード：脂肪注入 コラーゲンマトリックス 血管新生 ラット

1. 研究開始当初の背景

脂肪移植の解決すべき問題点は①1回の移植量が限られる点 ②移植脂肪の生着が不安定な点である。そこで移植脂肪細胞の生着を安定させるために移植床の微小環境、特に血管新生・血行の早期安定化が重要な因子と考えた。我々は人工真皮に脂肪組織から得られた lipid fraction を添加することで人工真皮内への早期の血管新生が起こることをすでに報告している。このことより細切化した人工真皮のコラーゲンマトリックス片を脂肪細胞に添加する方法で、移植脂肪への早期の毛細血管侵入を得られるかを検討すべく、コラーゲンマトリックス片を添加する方法を考案した。

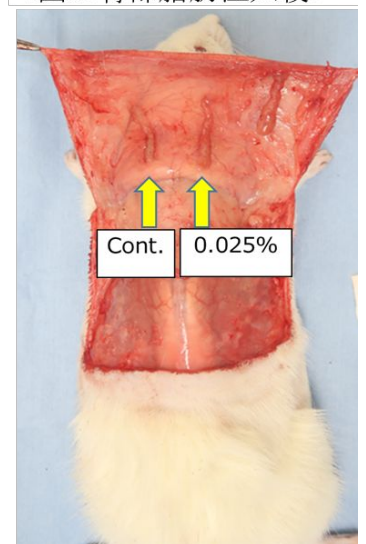
2. 研究の目的

(1) コラーゲンマトリックス片の添加による血管新生と移植脂肪生着促進の検討をすること。適切なコラーゲン濃度を検討すること。(2) 注入脂肪の経時的変化の確認ツールとしての動物用CTの有用性を検討すること。

3. 研究の方法

(1) 生後15-20週のSprague-Dawley(SD)系雌ラット350-400g 26匹を用いて実験を行った。イソフルレン吸入、メドトミジン0.375mg/kg・ミタゾラム2.0mg/kg・ブトルファール2.5mg/kgの3種混合麻酔の腹腔内投与による麻酔を行った。鼠径から脂肪採取し、剪刀にて細断、生理食塩水で洗浄し、血液やオイルを除去した。遠心分離(1800rpm 3' 12)後、2種類の移植脂肪検体(コントロール群、コラーゲン添加群)を作成した。コラーゲンは、オリンパスバイオマテリアルコラーゲン混濁液(動物実験サンプル)を用い、0.025、0.125、0.25%に調整し、モデルを作成した。その結果0.25%群の生着が最も安定していたため、これをコラーゲン添加群とした。18Gカニューレにて2群の背部にコールドマン法で注入した(図1)。注入1週・4週後の移植脂肪を採取し、臨床的脂肪生着の半定量的評価、脂肪生着をadiponectin、血管新生をVEGF・CD31遺伝子発現量及び病理学的評価にて評価した。統計解析ソフトSPSSを用いてMann-WhitneyのU検定を行い、両群の脂肪生着の比較検討を行った。

<図1: 背部脂肪注入後>



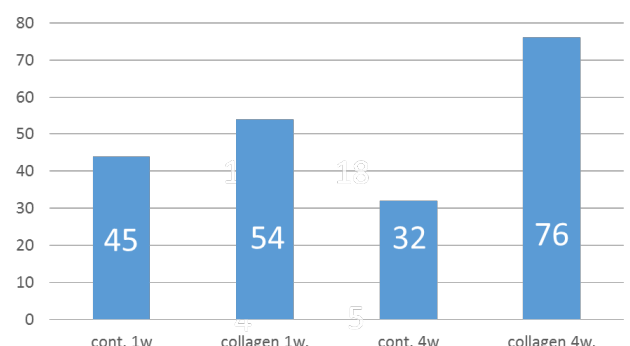
(2) 生後8週のC57BL/6J系雄マウス4匹を用いて実験を行った。イソフルレン吸入、メドトミジン0.75mg/kg・ミタゾラム4.0mg/kg・ブトルファール5.0mg/kgの3種混合麻酔の腹腔内投与による麻酔を行った。鼠径から脂肪採取し、剪刀にて細断、生理食塩水で洗浄し、血液やオイルを除去した。遠心分離(1800rpm 3' 12)後、2種類の移植脂肪検体(コントロール群、コラーゲン添加群)を作成した。コラーゲンは、オリンパスバイオマテリアルコラーゲン混濁液(動物実験サンプル)を用い、0.025、0.25、0.75%に調整し、モデルを作成した。2群の背部にマイクロピペットチップを接続したシリンジを使用して注入した。注入1週・2週・3週・4週後の移植脂肪を小型実験動物用X線CT装置(Latheta laboratory CT-200 HITACHI)を用いて、経時的な脂肪体積変化を計測した。

4. 研究成果

(1)

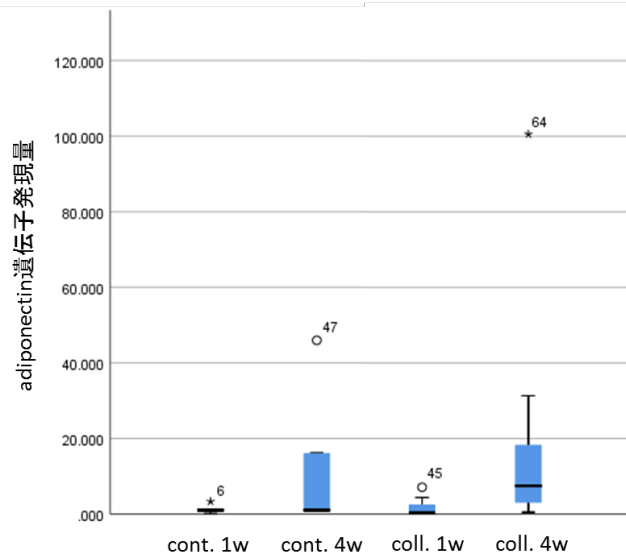
脂肪生着の半定量的評価による生着率は、コントロール群1週45%、4週32%、コラーゲン添加群1週54%、4週76%であった(表1)。

<表1: 半定量的評価 脂肪生着率>

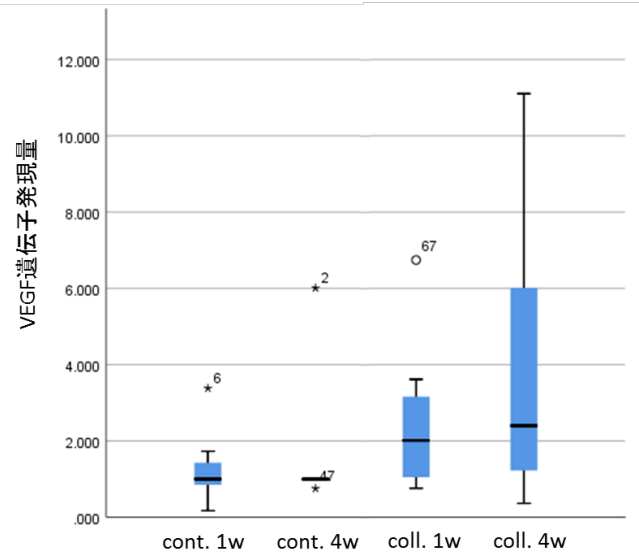


両群の1週及び4週後のadiponectin/VEGF/CD31遺伝子発現量の平均値は、コントロール群(1週:1.10/1.30/1.73、4週:4.78/2.25/1.26)、コラーゲン添加群(1週:1.63/2.49/2.82、4週:9.95/4.22/3.04)であった(表2)。

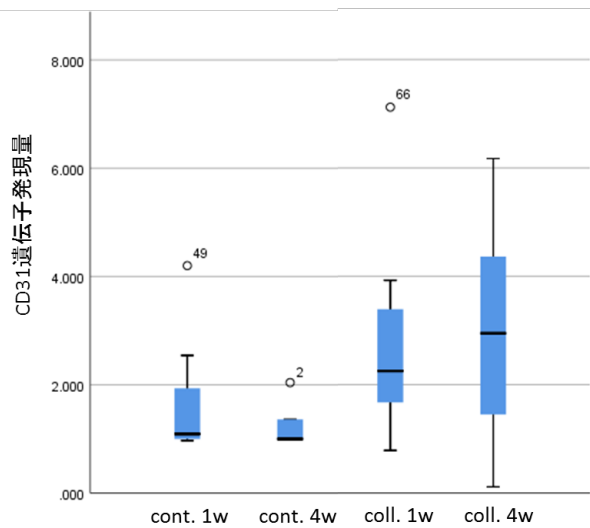
<表2: Adiponectin遺伝子発現量>



<表2: VEGF遺伝子発現量>



<表2: CD31遺伝子発現量>



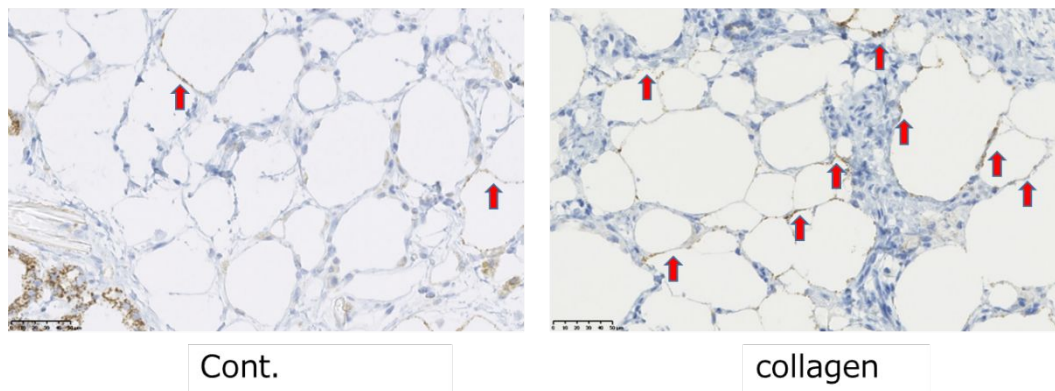
両群のHE染色における血管発現の評価は、40倍3視野あたりの平均値で、コントロール群(1週:3.0本、4週:3.3)、コラーゲン添加群(1週:14.3、4週:22.8)であった。(表3)

<表3: 血管発現の評価 HE染色(×40 3視野)>

	cont.	collagen
1W 血管数 平均値 (本)	 3.0	 14.3
4W 血管数 平均値	 3.3	 22.8

脂肪生着の指標としての perillipin 染色においても、perillipin 陽性細胞はコラーゲン添加群の方が多く認められた。
(表4)

<表4:脂肪の評価 Perilipin染色 (×40 3視野)>



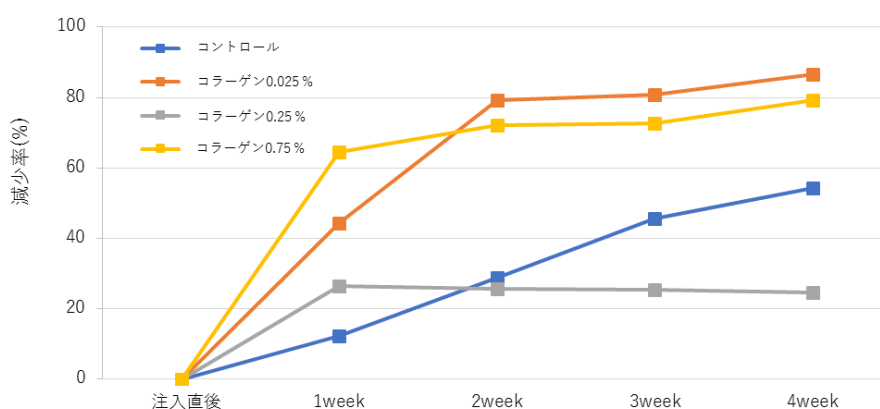
統計解析の結果、半定量的評価にてコラーゲン群4週に有意差を認め、遺伝子発現量ではコラーゲン群 CD31 4週において有意な傾向は認めしたが、いずれも統計学的有意差は認めなかった (p値=0.055)。

(2)

周囲脂肪組織と移植脂肪組織を識別する条件設定として、各 SN 比の設定を行い、最適な SN 比を設定した。その最適な設定な条件下、4群の経時的体積減少率は、コントロール群(1週:12.2%、2週:28.7、3週:45.7、4週:54.3)、コラーゲン 0.025%群(1週:44.2%、2週:79.1、3週:80.1、4週:86.5)、コラーゲン 0.25%群(1週:26.5%、2週:25.7、3週:25.3、4週:24.6)、コラーゲン 0.075%群(1週:64.5%、2週:72.2、3週:72.7、4週:79.2)であった。(表5)

本方法は今後の動物脂肪注入モデルの経時的变化を解析する一手段として有用であることが示唆された。

<表5:移植脂肪体積 減少率(%)>



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

コラーゲン添加による血管誘導を応用した新しい脂肪移植方法の開発、生川知佳 小宮貴子 松村一、形成外科学会基礎学術集会、2018年

基盤研究(C)コラーゲン添加による血管誘導を応用した新しい脂肪移植方法の開発、小宮貴子 生川知佳 松村一、西新宿フォーラム、2018年

基盤研究(C)血管誘導と虚血耐性獲得を用いた新しい脂肪移植方法の確立とその臨床応用 続報、小宮貴子 生川知佳 自見庄太郎 松村一、西新宿フォーラム、2017年

基盤研究(C)血管誘導と虚血耐性獲得を用いた新しい脂肪移植方法の確立とその臨床応用、小宮貴子 柴田大 自見庄太郎 松村一、西新宿フォーラム、2016年

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小宮 貴子

ローマ字氏名：KOMIYA, takako

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 00385105

研究分担者氏名：柴田 大

ローマ字氏名：SHIBATA, dai

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 00421008

研究分担者氏名：井上 華

ローマ字氏名：INOUE, hana

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 20390700

研究分担者氏名：自見 庄太郎

ローマ字氏名：JIMI, shoutaro

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 30773543

研究分担者氏名：渡辺 泰雄

ローマ字氏名：WATANABE, yasuo

所属研究機関名：横浜薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60096279

研究分担者氏名：出雲 信夫

ローマ字氏名：IZUMO, nobuo

所属研究機関名：横浜薬科大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70368976

研究分担者氏名：鈴木 知佳(生川知佳)

ローマ字氏名：SUZUKI, chika

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 40809597

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。