

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792059

研究課題名(和文) 脂肪誘導機能付加生体材料による組織欠損補填療法の開発

研究課題名(英文) Basic study of soft tissue augmentation by adipose-inductive biomaterial

研究代表者

矢澤 真樹 (Yazawa, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60327567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：再建手術は自家組織移植を中心としたボリューム付加手術が行われている。健常部がドナーとして傷つけられ、パッチワークとして移植されている。そこで、注射針で注入できる人工生体材料に、脂肪の誘導・生着促進を目的とした物質を付加して移植することで、移植部に脂肪組織を誘導・生着維持する、新しい組織移植について基礎検討を行った。効率的に脂肪誘導・生着促進を生じるためのPioglitazoneの至適濃度を脂肪前駆細胞を用いてPPAR- mRNA発現により検討した。さらに鮭コラーゲンにPioglitazoneを同濃度で付加し、マウス背部皮下に注入したところ、4週間で成熟脂肪細胞が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Reconstructive surgery involves volume augmentation with autologous tissue transfer. However, a healthy region is damaged as a donor site, and the autologous tissue is transferred like a patchwork. We have attempted to induce adipogenesis activity in artificial biomaterial that is injectable with an injection needle for tissue augmentation. First of all, the optimal dose of pioglitazone hydrochloride was examined with adipo-precursor cells in terms of the PPAR-g mRNA expression levels affected by reagent in vitro. Then, salmon collagen with pioglitazone was adjusted in terms of the dose and the salmon collagen was injected into mouse back using an injection needle in vivo. At 4 weeks after implantation, the pioglitazone collagen gel was substituted by mature adipocytes in comparison with the case for control collagen gel without pioglitazone. These results are indicative of the possibility of promoting adipogenesis using collagen with pioglitazone as an adipose-inductive substance.

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：再建外科学

1. 研究開始当初の背景

近年、医療技術の進歩により、腫瘍切除や外傷、あるいは先天異常に対する救命率は飛躍的に向上しているが、一方で、救命し得たものの、治療後の外見上の醜形により、十分なQOLを獲得できずにいる患者は少なくない。腫瘍切除、外傷、あるいは先天異常において、外見上の醜形に対する再建手術として自家組織移植を中心としたポリウム付加手術が行われている。しかし、移植材料採取の目的で、健常部がドナーとして傷つけられ、レシピエント部にはパッチワークとして移植しているため、患者のQOL(quality of life: 生活の質)は十分に改善されるに至っていない。そこで、注射針程度の切開で導入できる人工生体材料に脂肪の誘導・生着促進を目的とした物質を付加して移植することで、移植部に脂肪組織を誘導・生着維持させて、現在かかえているドナーとレシピエントの問題を解消できる、新しい組織移植について基礎検討を行った。

2. 研究の目的

注射針程度の切開で導入できる人工生体材料に脂肪の誘導・生着促進を目的とした物質を付加して移植することで、移植部に脂肪組織を誘導・生着維持させて、現在かかえているドナーとレシピエントの問題を解消できる、新しい組織移植による再建手術法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 人工生体材料のマウス脂肪組織内での経時的評価として、既に研究協力者により開発されている人工材料の内、

非吸収性のウレタンスポンジ、
生分解性のサケコラーゲンスポンジ
ゼラチンゲル粒子

の3種それぞれを16Gもしくは18Gの注射針で局所に導入可能なサイズとして生体の脂肪組織内に留置し経時的・段階的に生体内の安定性、為害性を病理組織学的に評価検討する。

(2) 脂肪誘導物質による脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化能のIn-vitro評価

成熟脂肪細胞を細片化後コラーゲナーゼによる酵素処理を行い、培養を行い線維芽細胞様の脂肪前駆細胞を分離する。

それら細胞に対して脂肪へ誘導可能である候補リガンドの脂肪への分化誘導能を評価する。具体的には成熟した脂肪細胞に発現する核内受容体である Peroxisome Proliferator Activated Receptor- (PPAR) を指標とし定量PCR, ウェスタンブロット法により mRNA, 蛋白レベルそれぞれでの評価を行う。脂肪誘導を促す候補因子として以下の3剤を想定している。

Insulin Growth Factor-I(IGF-I)
Insulin Growth Factor- (IGF-)
ピオグリタゾン誘導体 (Pioglitazone)

(3) 人工材料への脂肪誘導物質の添加、マウス組織内での経時的評価

(2)で行った検討のうち脂肪への誘導効果の見込まれるものについて人工材料に添加した後、それぞれを16Gもしくは18Gの注射針で局所に導入可能なサイズとして生体の脂肪組織内に留置し経時的・段階的に生体内の安定性、為害性を病理組織学的に評価検討する。

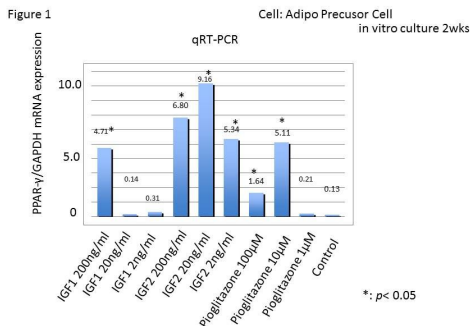
特に周囲宿主細胞への影響や脂肪組織への分化について詳細に評価する。

4. 研究成果

注射針で導入可能な人工生体材料として、生体応用が期待されている鮭コラーゲンを選択した。鮭コラーゲンを注射針で注入できる性状へ調整するために、0.3-0.5%溶液を使用した。

人工生体材料に付加する脂肪誘導・生着維持促進物質については、糖尿病治療薬として臨床応用されている Pioglitazone に着目した。Pioglitazone は、PPAR-g を介し、組織に脂肪化を生じることが報告(Aging Cell 2010)されている。そこで、効率的に脂肪誘導・生着促進を生じるための Pioglitazone の至適濃度を検討した。in vitro において、脂肪への分化誘導のマスター遺伝子である PPAR- mRNA 発現を定量PCRにより評価した。Pioglitazone の比較対象として、PPAR-

の発現誘導の報告がある成長因子 IGF1, IGF2 を用い比較検討した。Pioglitazone, IGF1, IGF2 のそれぞれの濃度は、これまで報告で示されている濃度を中心として各3段階の濃度を設定した。この結果、Pioglitazone のヒト脂肪前駆細胞に対する PPAR- mRNA 発現への影響は 10uM において統計学的に優位差を持って最も高いレベルであった(Ave.5.11, P<0.05)。100uM でもコントロールに比して優位差を持って最も高いレベルであったが、10uM に比して低い結果であった(Ave.1.64, P<0.05)(Fig. X)。一方、1uM では、コントロールとほぼ同様な発現レベルであった(Ave.0.21)。脂肪前駆細胞を脂肪化する Pioglitazone の至適濃度は、10uM と設定した。次に、IGF1, IGF2 との比較を検討した。興味深いことに、IGF2 の添加は、全ての濃度において非常に高いレベルの PPAR- mRNA 発現を呈した、それぞれの濃度において(2uM, 20uM, 200uM; Ave. 5.34, 9.16, 6.80)。IGF1 では、200uM においてのみ、優位差を持って PPAR- mRNA 発現の上昇を認めた(Ave.4.71, P<0.05)。これらの結果から、Pioglitazone においてもこれまで知られている PPAR- 誘導因子である IGF1, IGF2 とほぼ同様の PPAR- の発現誘導効果を認めた 10uM が妥当な濃度と考えられた。in vivo での臨床応用を目的とした本研究においては、10uM の濃度を至適濃度とし、in vitro においての検証をおこなった。



0.5% 溶液で調整した鮭コラーゲン W/O(water in oil)エマルジョンを span20 を用いて作成した。続いて EDC で架橋形成した鮭コラーゲンを微粒子としてエタノール 50% (v/v) 水相に沈降させ、乾燥したものに、吸引濾過によって、Pioglitazone を 10μM 含有するように調整した。

Pioglitazone 含有コラーゲングェル 0.1ml、反対側に Pioglitazone を含有しないコントロールとしてのコラーゲングェル 0.1ml をマウスの背部皮下、脂肪組織のないところへ注入し、経時的に観察したところ、移植後 1 週目からコラーゲン内に脂肪滴と思われる細胞が出現し、2 週目では、人工生体材料の吸収にともなって、生体材料周囲に脂肪組織を認めた。4 週目では、さらに生体材料が吸収され、置き換わるように脂肪組織の範囲が拡大していったことから、脂肪誘導物質として Pioglitazone を付加したコラーゲンにより、脂肪誘導ができた可能性が示唆される。

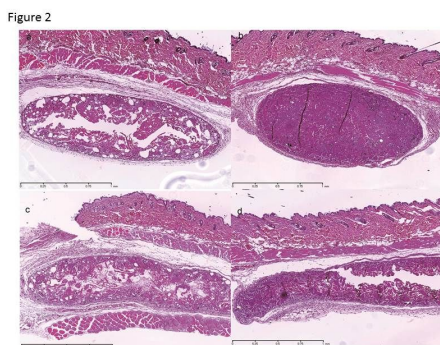
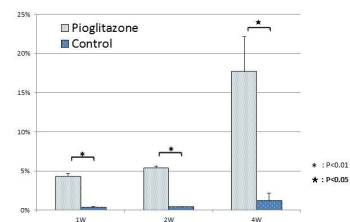


Figure 3

Area percentages of induced adipose tissue in vivo



今後、さらに大容量で脂肪組織誘導ができるとすれば、下記のような可能性を秘める結果であったと考えている。

1. 腫瘍切除後に生じる組織欠損に対する軟部組織の補充
2. 創傷による瘢痕拘縮部の引きつれ対策・治癒の促進
3. 消化管内視鏡による腸管粘膜損傷部の穿孔予防、瘢痕化・狭窄対策
4. 体表面の凹凸に起因する醜形の整容的改善

これまで、組織移植の技術は向上してきているが、未だ健常部を傷つけて採取した移植組織を、基本的にはパッチワークとして移植し、組織を補充する方法が主流であり、患者の満足度は十分とは言えない。骨などの硬性組織については注入可能な人工材料が開発され、既に臨床応用されているが、脂肪などの軟部組織について、これまで開発された方法では十分な長期成績を得られていない。

本研究では、生体適合性の高い人工材料を用いて、すでに臨床応用されている薬剤である Pioglitazone を至適濃度で付加することにより、脂肪などの軟部組織を誘導できる可能性を確認した。この結果は、組織移植を必要とする症例において、ドナーを必要とせず、レシピエントへの材料注入により、軟部組織のボリューム付加ができる可能性を示すことができた。

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 1 件)

Yazawa M, Mori T, Nakayama Y, Kishi K. Basic study of soft tissue augmentation by adipose-inductive biomaterial. J Biomed Mater Res B (査読有) 2014 in press. DOI:10.1002/jbm.b.33180 [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552-4981](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-4981)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤 真樹 (YAZAWA MASAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60327567