

平成 30 年 11 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463065

研究課題名(和文) プロテオーム解析による自己完結型組織再生材の修復因子の解明

研究課題名(英文) Study on the restoration factor of the self-conclusion type organization reproduction material by proteomic analysis

研究代表者

関根 浄治 (Sekine, Joji)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20236095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：有茎頬脂肪体は局所再建材料で口腔内欠損部を被覆した頬脂肪体は確実に上皮化する。被膜には脂肪線維が豊富で小葉間結合組織を形成し皮下脂肪に比べ可塑性で、小葉内に顎動脈・顔面動脈由来の微細脈管が発達する。また、皮下脂肪組織から間葉系幹細胞に似たPLA細胞が抽出された。PLA細胞は、脂肪吸引手術で液状脂肪より分離精製した細胞で、特別な増殖因子なしに増殖する。またPLA細胞は脂肪、骨、骨格筋といった成熟細胞への分化に必須の転写因子をはじめとする多くの関連遺伝子発現が確認されている。頬脂肪体は脂肪細胞由来の幹細胞、細胞外マトリックス、さらに増殖因子とScaffoldを有する自立的上皮化機能を有する。

研究成果の概要(英文)：Pedicled buccal fat pad (BFP) fills an anatomical gap consisted of the buccinator muscle, the masseter muscle, and the ramus of the mandible. This study sought to evaluate the applicability of pedicled BFP grafting with a higher number of cases than our previous report in 2015. We evaluated them based on the following criteria: the epithelialisation, the graft infection, the fistula recurrence, the facial contour deficiency, the limitation of the mouth opening, and the facial nerve palsy. Besides, by means of gene expression microarray analysis, we have investigated genes which are potential targets for epithelialisation of BFP. Complete epithelialisation of the BFP occurred within 4 weeks in most of the grafting's. Four weeks postsurgery, no complications occurred in most of the grafting's. BFP grafting appears to be feasible for the reconstruction of surgical defects in the oral region.

研究分野：口腔外科学

キーワード：頬脂肪体 プロテオーム解析 マイクロアレイ 組織学的評価

1. 研究開始当初の背景

有茎類脂肪体は1977年にEgyediによって報告された局所再建材料である。研究代表者は、口腔内を主とした欠損の再建に積極的に応用し、その挙上法の工夫を行うことで適用範囲を拡大してきた。口腔内欠損部を被覆した類脂肪体は、術後裸のまま口腔内に曝されているが、1週間程度で確実に上皮化が進行する。これまで、類脂肪体の被膜にはFibro-adiposeが豊富で小葉間結合組織を形成していること、また通常の皮下脂肪に比較して可塑性に富むこと、さらに小葉内に顎動脈・顔面動脈由来の微細脈管ネットワークが発達していることなどが示されている。また発生については、胎生14~16週に発生し、脂肪組織の形成と血管形成は非常に密接に関与することが報告されている。

近年、ヒト皮下脂肪組織から間葉系幹細胞に極めて類似した細胞 (Processed Lipoaspirate Cells, PLA) が抽出された。PLA細胞は、脂肪吸引手術より得られた液状脂肪より分離精製した細胞で、特別な増殖因子なしで容易に増殖する性質を有する。さらにPLA細胞は脂肪、骨、骨格筋といった成熟細胞への分化に必須の転写因子をはじめとする多くの関連遺伝子の発現が確認されている。臨床的に、被膜で覆われた類脂肪体は完全に上皮化することから、類脂肪体においても脂肪細胞由来の幹細胞が存在すると考えられる。また、有茎類脂肪体挙上時にその被膜を損傷すると、上皮化の遅延あるいは部分壊死を惹起することから、類脂肪体は細胞外マトリックスあるいはScaffoldに包まれていることも示唆される。このことより類脂肪体は脂肪細胞由来の幹細胞、細胞外マトリックス、さらに増殖因子とScaffoldを有する自立的上皮化機能を有する>という仮説に至った。類脂肪体の上皮化過程で発現する組織修復因子について免疫組織科学的評価とプロテオーム解析を行うことで、類脂肪体が自立的上皮化機能を有する再建材料であることを証明すること。類脂肪体の上皮化メカニズムを解明し、これが自立的上皮化機能を有する再建材料であることを証明することで、今後の口腔領域の再建材料の発展と適応範囲の拡大が期待できる。臨床的に再建に用いられた有茎類

脂肪体が自然に上皮化することは広く知られているが、その詳しいメカニズムは未だ不明であるものの、類脂肪体の被膜にはFibro-adiposeが豊富で小葉間結合組織を形成していること、また通常の皮下脂肪に比較して可塑性に富むこと、さらに小葉内に顎動脈・顔面動脈由来の微細脈管ネットワークが発達していることなどが示されている。一方、近年ヒト皮下脂肪組織から間葉系幹細胞に極めて類似した細胞

(Processed Lipoaspirate Cells, PLA) が抽出された。PLA細胞は特別な増殖因子なしで容易に増殖する性質を有し、さらに脂肪、骨、骨格筋といった成熟細胞への分化に必須の転写因子をはじめとする多くの関連遺伝子を発現していることが確認されている。これらの報告より類脂肪体の上皮化過程で発現する組織修復因子をプロテオーム解析並びに抽出mRNAのマイクロアレイ解析・免疫組織化学による比較・解析を行うことで類脂肪体が自立的上皮化機能を有する再建材料であることを証明することを可能となり、それにともない局所再建材料である有茎類脂肪体の生物学的メカニズムがあきらかとなり、治療法のEBMが明確となると考える。

2. 研究の目的

有茎類脂肪体の移植は、口の周囲の手術により失われた組織を補填する方法のひとつであり、実際に世界でも広く行われている治療です。

類脂肪体は、術後自然に口腔粘膜のように治っていくことがわかっていますが、その詳しい修復メカニズムは未だ明らかにされていません。そこで、本研究では類脂肪体が治っていく過程で発現する組織修復因子や増殖因子について免疫組織科学的評価とプロテオーム解析を行うことにより、その修復メカニズムを明らかにすることを目的としています。

3. 研究の方法

1. 検体採取

島根大学医学部附属病院歯科口腔外科にて有茎類脂肪体により再建を行い、再建後2回目の手術 (歯科インプラント埋入術、顎堤形成術、口腔前庭拡張術など) を行う

患者さんから試料の提供を受ける。組織は、再建手術と再建後2回目の手術を行う際に、手術創から極少量の組織採取もしくは擦過採取する。また、再建手術後1週目では、手術部位の表面を綿棒で擦過して細胞を採取する。被検査者より同意の上で得た試料は、試料採取後に被検査者の氏名の特定を可能とする情報は削除し、連結可能匿名化する。試料は未固定のまま専用チューブに入れ、 -80°C で保存回収される。この試料はドライアイスを含めた宅急便(クール冷凍便・航空便)で本学・外部委託業者まで輸送する。また解析データにおいてはCDROMに記録し、媒体を同様に宅急便・書留等で輸送する。

2. プロテオーム解析 (業者委託)

2.1 Liquid Tissueの作製

試料より、Laser Microdissection法にてLiquid Tissue作製。

一部を未固定のまま専用チューブに入れ、 -80°C で保存回収。

RNA Laterの用法

1) 採取前にチューブを予め 4°C で冷やしておく。

2) チューブに試料を入れる。その後チューブを横倒しにして液中に完全に沈め、 4°C 24時間浸漬。

※脂肪組織なので浮力がある→試料が完全に液中に没していなければならぬ。

3) 24時間経過後、液を全てピペットで除去・蓋の周囲をパラフィルムで巻いて密閉 ※冷凍・解凍により試料内のRNAが液中に流出するため除去は必須。

4) -80°C のフリーザ(理想的)で冷凍保存 ※ (-20°C) - 30°C 程度でも長い期間でなければOKです。

2.2 質量分析

Liquid Tissueを用いて nanoLC/MS 測定を行う。解析ソフトGeneSpring GX (アジレント・テクノロジー社)にて組織に発現する増殖因子などのmRNAの網羅的解析を行う。それぞれの試料について、スペクトラル・カウント法により群間比較解析を行う。測定データより本学先端研現有のソフトウェア等を用い、それぞれの試料について比較解析するこ

とにより候補の抽出を行う。

・検体：ヒト標準RNA
 ・使用機器：ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.)

・PCR Reactions:
 FastStart Universal Probe Master
 $5\mu\text{l}$
 Primer (Forward) ($10\mu\text{M}$) $0.9\mu\text{l}$
 Primer (Reverse) ($10\mu\text{M}$) $0.9\mu\text{l}$
 Probe ($2\mu\text{M}$) $1.2\mu\text{l}$
 cDNA $2\mu\text{l}$

$10\mu\text{l}$

・Thermal Cycler Conditions:

95°C	10min	1cycle
95°C	15sec	} 40cycles
60°C	1min	

3 データ解析

測定データよりソフトウェア等を用い、それぞれの試料について比較解析することにより候補の抽出を行う。

※プロテオーム解析結果の照合確認として、同一試料から作製されたLiquid Tissueより抽出されたtotalRNAのマイクロアレイ解析も併せて行う。試料の処理・解析に関しては別途守秘義務契約を締結する。

A. 発現解析

1) Quality Control (QC) : サンプル Quality Control, Expression, Level, Flag, 分散を利用したプローブのフィルタリングを行う。

2) Fold解析 k-means, 階層型, 自己組織化マップを用いたクラスタリング。

3) 統計検定 ANOVA, t-testなどの統計解。

4) GSEA 解析目的の遺伝子リストが Broad Instituteでまとめられた Gene Setに重複するかを Fold Changeを持って検定し、生物学的解釈を行う。

B. miRNA解析 : 1) Quality Control (QC) まず、統計検定を行う。2) Pathway 解析既知の pathway を使用して

解析を行う。3) Target Scan miRNA と関連が予測される遺伝子を算出する。4) GO解析 発現解析の結果抽出された遺伝子群がどのような GO Termとの関連性が深いかを Fisher's Exact Testで検定を行う。解析ソフト Gene Spring GX (アジレント・テクノロジー社) にての組織に発現する増殖因子などの mRNAの網羅的解析を行う。

4. 統計検定

症例数は有茎頬脂肪体により再建を行い、再建後2回目の手術(歯科インプラント埋入術、顎堤形成術、口腔前庭拡張術など)を行った症例について行った。

4. 研究成果

口腔内に移植された有茎頬脂肪体が臨床的に自然に上皮化するという事実から、<頬脂肪体は ADSCs, ECM さらに増殖因子と Scaffold を有する自立的上皮化機能を有する>という仮説のもと、プロテーム解析による網羅的解析を行い、上皮化過程において頬脂肪体内に分子遺伝学的不均一性が存在し、ゲノム化あるいはゲノム進化を遂げることが示唆された。よって、頬脂肪体は口腔領域における再建材料の一つとして簡便で有用な方法であると考えられた。

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)

1. 頬脂肪体を用いた顎口腔再建術の有用性に関する検討. 吉野 綾、成相義樹、狩野正明、辰巳博人、恒松晃司、高村雄太郎、管野貴浩、柳井智恵、関根浄治: 頭頸部癌, 41(4): 406-410, 2015.

[学会発表] (計 4 件)

1. Applicability of Buccal Fat Pad Grafting for Oral Reconstruction. Aya Yoshino, Yoshiki Nariai, Masaaki Karino, Hiroto Tatsumi, Kohji Tsunematsu, Yutaro Takamura, Takahiro Kanno, Chie Yanai, Seiji Kondo, Joji Sekine. 第 39 回日本頭頸部癌学会・第 4 会アジア頭頸部癌学会. 2015, 頭頸部癌. 41(2). 139.
2. Applicability of buccal fat pad grafting for oral reconstruction. Aya

Yoshino. Yoshiki Nariai, Masaaki Karino, Hiroto Tatsumi, Koji Tsunematsu, Yutaro Takamura, Takahiro Kanno, Chie Yanai, Seiji Kondo, Joji Sekine. 40th World Congress of the International college of Surgeons, 62nd Annual Congress of the International College of Surgeons Japan Section. 2016.

3. Applicability of buccal fat pad for oral reconstruction, Aya Yoshino, Yoshiki Nariai, Takahiro Kanno, Chie Yanai, Joji Sekine, 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong Convention & Exhibition Centre, Hong Kong, 2017. 3. 31-4. 3.
4. Applicability of buccal fat pad grafting for oral reconstruction, Aya Yoshino, Yoshiki Nariai, Masaaki Karino, Takahiro Kanno, Joji Sekine, The 63rd Annual Congress of International College of Surgeons Japan Section, Asakusa View Hotel, 2017. 6. 17.

[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
<https://www.med.shimane-u.ac.jp/oral/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根浄治 (Sekine, Joji)
島根大学・医学部歯科口腔外科学講座
・教授

研究者番号: 20236095

(2) 研究分担者

秀島克巳 (Hideshima, Katsumi)
島根大学・医学部歯科口腔外科学講座
・助教
研究者番号： 80593673

(3) 研究協力者

(なし)