

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893219

研究課題名(和文)肥満者における皮膚障害の予防に向けた非侵襲的アセスメント技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of a non-invasive assessment technologies for the prevention of skin disorders in obese people

研究代表者

伊吹 愛 (IBUKI, Ai)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60738805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、形成外科手術時に回収される皮膚組織を解析サンプルとし、肥満者の皮膚に生じる皮内部変化の解析を目的とした。非肥満群(BMI25以下)40名と肥満群(BMI25以上)11名を対象とした。組織学的解析では、肥満群の皮膚では表皮の肥厚、Mib1陽性細胞の増加が認められた。遺伝子発現解析では、肥満群の皮膚ではコレステロール、脂肪酸の低下、これらの合成律速酵素であるhmgcr、acc-1の発現がBMI22以上でBMIと負の相関を示すことが明らかとなった。これらの結果から、肥満群の皮膚ではバリア機能が低下していることが明らかとなり、テープストリッピング等の非侵襲的評価方法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study, the skin tissue is collected at the time of plastic surgery and analyzed sample, for the purpose of analysis of the skin internal changes occurring in the skin of the obese person. Non-obese group (BMI25 or less) to 40 people and the obese group (BMI25 or more) was intended for 11 people. Histological analysis, the skin of the obese group thickening of the epidermis, increased Mib1 positive cells were observed. Gene expression analysis, in the skin of the obese group was cholesterol, lowering fatty acid, HMGCR is these synthetic rate-limiting enzyme, it demonstrated that the expression of acc-1 indicates a BMI negatively correlated with BMI22 above. These results, in the skin of the obese group was revealed that the barrier function is reduced.

研究分野：基礎看護学

キーワード：肥満 皮膚 バリア機能 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

肥満は内科疾患のリスク要因であることにとどまらず、皮膚の生理機能に影響を及ぼすことが明らかになってきている。しかしながら、肥満研究分野において、直接生死に関わる疾患と比較すると、その病態メカニズムや予防・治療・ケア方法に関する研究は極めて少ないのが現状であり、患者の生活支援、全人的ケアを専門とする看護分野において、重要な研究課題である。これまでに、肥満が皮膚の生理機能を脅かすメカニズムに関しては、肥満動物を用いた検討がなされてきたが、実際のヒトの皮膚を用いた検討は、皮膚生検を伴う侵襲度の高い処置が必要となることからほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本研究は、看護学と形成外科とのコラボレーションにより、形成外科手術時に採取されるヒトの皮膚検体を用いて、肥満度の上昇に伴う皮膚内部の変化を組織学的、分子生物学的に解析することを目的とする。これにより、皮膚内部の変化をいち早くとらえるアセスメント技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 研究デザイン

横断研究を実施した。

(2) 対象者

乳がん術後、自家組織を用いた乳房再建術を受ける20歳～64歳の女性を対象とした。手術前1年以内に化学療法を受けた者、慢性的な皮膚疾患を有する者、感染症を有する者は除外した。

(3) 基本属性

対象者の基本属性(体重、身長、年齢、現病歴、既往歴、喫煙歴の有無)は電子カルテから収集した。サンプル採取時の体重と身長からBMIを算出し、日本肥満学会の基準に基づき、BMI25以下を非肥満群、BMI25以上を肥満群とした。

(4) サンプル採取

乳房再建術時に残余皮膚として回収される腹部の皮膚組織を解析サンプルとし、肥満による皮膚内部の変化を①組織学的解析、②皮膚の脂質の定量測定、③遺伝子発現解析にて評価した。

① 組織学的解析：乳房再建術の際に採取した腹部の残余皮膚組織を組織学的解析用にトリミングした後、マイルドホルムで固定した。その後パラフィンブロックを作成し、5 μ mの厚さに薄切し、本解析用のプレパラートとした。プレパラートをキシレン、エタノールで脱パラフィンした後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色による皮膚組

織の形態観察およびMib-1(Ki-67)染色による増殖能を持つ細胞の同定を行い、非肥満群、肥満群の2群における変化を比較した。

画像は皮膚科学に関わる複数の研究者でその特徴を確認した後、病理医のスーパーバイズを受けて評価を行った。

② 皮膚組織より脂肪組織を除去し、-80度で凍結破碎をした。破碎後、クロロホルム：メタノール混合液を添加し、遠心分離を行い、下層の有機層の重量測定を行い、一晚乾燥させた。皮膚組織の総脂質量を算出した。その後、抽出した総脂質を解析サンプルとし、皮膚のコレステロール、トリグリセリド、脂肪酸を測定した。

③ 遺伝子発現解析：-80度で凍結保存した皮膚組織を1mlのtotal RNA抽出溶液投入後、Bio Mixerで破碎した。クロロホルムを添加し攪拌、室温で静置した後、遠心分離、上澄みを回収した。水層を除去し、沈殿を風乾させた後、total RNAを抽出した。その後、Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser(Takara, 滋賀, 日本)を用いて1 μ gのTotal RNAからcDNAを作成した。リアルタイムRT-PCRには、SYBR Premix Ex Taq II(Takara)を用いて、CFX96リアルタイム解析システム(Bio Rad, USA)により、脂質関連遺伝子(*hmgcr*, *lxra*, *scd-1*, *acc-1*, *ppara*)発現量を定量した。内部標準には β アクトチンを用いた。

(5) 統計解析

統計解析には、統計ソフトSPSS ver.22(IBM, USA)を用い、非肥満群、肥満群の群間比較では、t検定およびカイ二乗検定を行った。各遺伝子のmRNA発現量とBMIとの相関は、Spearmanの順位相関係数を求めた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

(6) 倫理的配慮

本研究は、横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子研究倫理審査委員会の承認(A140522018)を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 対象者の基本属性

表1に対象者の基本属性を示す。対象者51名(非肥満群40名、肥満群11名)が調査に参加した。BMIの平均値は、非肥満群で22.3 \pm 1.7、肥満群で27.2 \pm 2.2であった。平均年齢は非肥満群で50.2 \pm 7.4歳、肥満群で51.9 \pm 6.3歳であり、2群間に有意な差は認められなかった。現病歴、喫煙の有無にも有意な差は認められなかった。

表 1. 対象者の基本属性

		N=51		
	非肥満群 (n=40)	肥満群 (n=11)		p
BMI (kg/m ²) ^c	22.3±1.7	27.2±2.2	<0.01 ^a	
年齢 (歳) ^c	50.2±7.4	51.9±6.3	0.45 ^a	
病歴				
高血圧 ^d	7 (17.5)	1 (9.1)	0.45 ^b	
脂質異常症 ^d	1 (2.5)	1 (9.1)	0.50 ^b	
糖尿病 ^d	0 (0.0)	0 (0.0)		
皮膚疾患 ^d	0 (0.0)	0 (0.0)		
喫煙歴の有無 ^d	10 (25.0)	3 (27.3)	0.89 ^b	

^at検定, ^bχ²検定, ^c平均±標準偏差, ^d人数 (%)

(2) 皮膚の組織学的解析

図 1 に皮膚組織学的解析の結果を示す。HE 染色の結果、肥満群の皮膚組織は非肥満群と比較して、表皮の肥厚と不均一性、角化細胞の散在と増加が明らかとなった。また Mib-1 染色の結果、肥満群の皮膚組織では Mib-1 陽性細胞の増加していた。また、肥満群の皮膚では、Mib-1 陽性細胞が表皮の中層まで分布していた。これらの所見はバリア機能障害モデルの皮膚の組織と一致しており、肥満群の皮膚では、バリア機能低下の可能性が示唆された。

表皮のターンオーバーの亢進は、紫外線等の外的刺激によって誘発されると報告されているが、本研究では、これらの刺激が加わらない腹部の皮膚組織において類似の所見が認められた。肥満は皮下組織由来の炎症性サイトカインなど全身的な炎症状態にあるといわれており、これらの内的刺激が角化細胞のターンオーバーの亢進を引き起こしているのかもしれない。その詳細のメカニズムを明らかにすることが、今後の課題である。

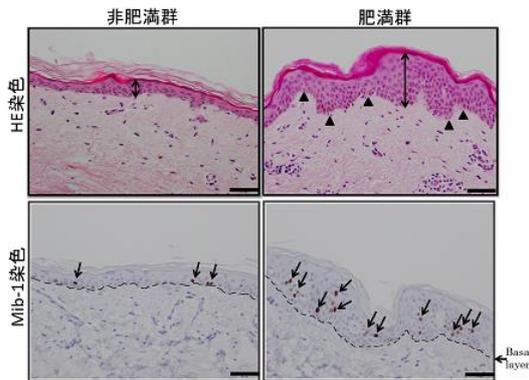


図 1. 皮膚の組織学的解析

(3) 皮膚の脂質量の定量

表皮バリア機能低下のメカニズムを明らかにするため、バリア機能の構成因子である角質細胞間脂質 (コレステロール、脂肪酸、トリグリセリド) の定量を行った。

図 2 に角質細胞間脂質の定量結果を示す。

非肥満群と比較して、肥満群では、バリア機能の重要な構成要素であるコレステロール、脂肪酸の量が有意に低下していた。

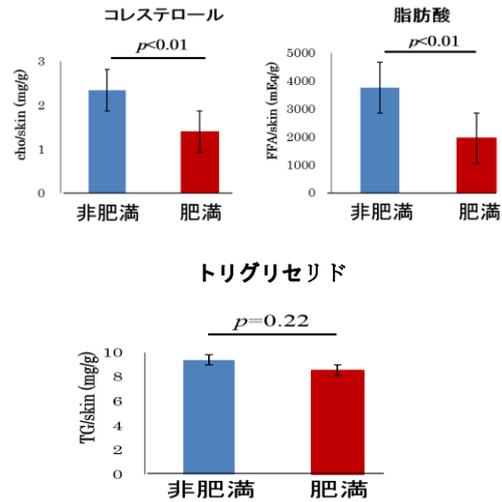


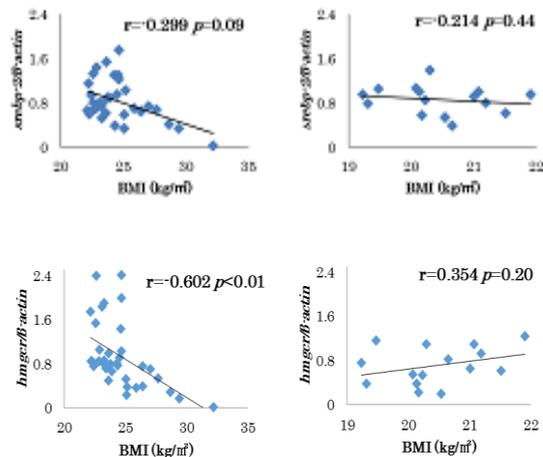
図 2. 角質細胞間脂質の定量

(4) 遺伝子発現解析

角質細胞間脂質減少のメカニズムを明らかにするため、脂質関連遺伝子 (*hmgcr*, *lxra*, *scd-1*, *acc-1*, *ppara*) の発現と BMI との関連を評価した。

図 3 に BMI と脂質関連遺伝子 (コレステロール合成律速酵素: *hmgcr*) の相関を示す。*Hmgcr* の発現および *hmgcr* の転写制御因子 *srebp-2* は、BMI22 以上で負の相関が認められた。また同様に、脂肪酸の合成酵素である *acc-1* は BMI と有意な正の相関が認められた。

先行研究では、*hmgcr* の特異的領域に *srebp-2* タンパクが結合することで、*hmgcr* の転写が促されると報告されている。本研究の結果、BMI22 以上をカットオフとした場合、BMI の増加に伴い *serbp-2* の発現が低下することが明らかとなった。このことは、BMI の増加により *serbp-2* の発現が低下することで、*hmgcr* の転写が減弱し、コレステロールの合成が低下することが示唆された。



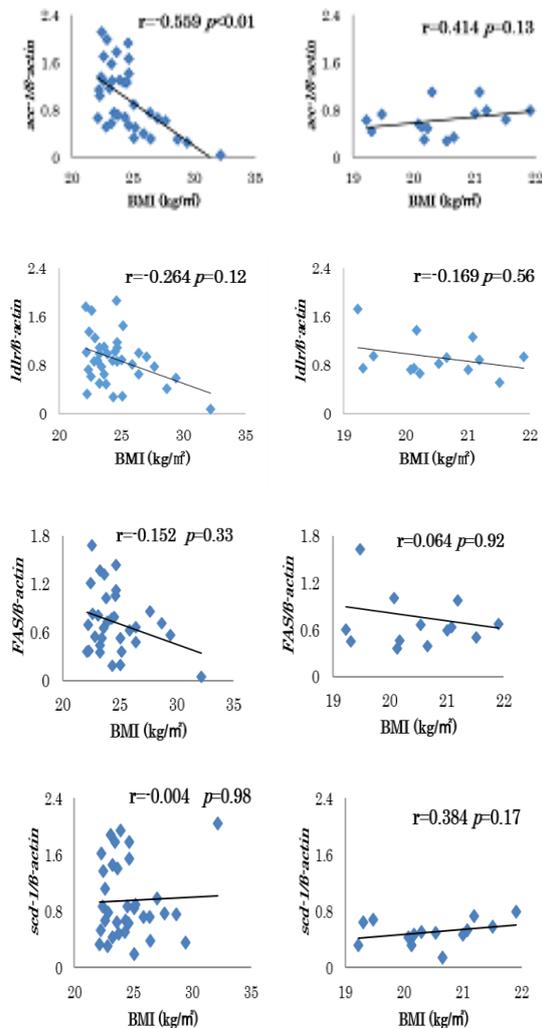


図 3. BMI と脂質関連遺伝子の発現

本研究は、ヒトの皮膚組織を用いて、BMIの増加に伴う表皮バリア機能の低下を明らかにした初めての研究である。本研究の結果、BMIの増加は表皮バリア機能の構成要素であるコレステロール、脂肪酸を減少させることが明らかとなった。また、そのメカニズムとして、BMIの増加に伴う脂質関連遺伝子の発現低下の関与が示唆された。肥満者に認められたこれらの内部変化はテープストリッピング法など非侵襲的な方法でアセスメントすることが可能である。今後、肥満者のバリア機能の低下および皮膚障害の予防に向けたスキンケア介入の必要性が示唆された。

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 2 件)

- ① Ai Ibuki, Satoshi Inoue, Yutaka Matsumoto, Yoshiko Horie, Tomoko

Akase. Evaluation of Epidermal Barrier function in the Skin of Japanese obese women: a pilot study. 横浜看護学雑誌 第 8 巻 1 号. 2015. 28-32 (査読有り).

[学会発表](計 4 件)

- ① 堀江良子、堀川和政、伊吹愛、松本裕、赤瀬智子. 肥満者における皮膚バリア機能に関連する因子の評価. 第 36 回日本肥満学会(2015年10月3日)、(名古屋国際会議場、愛知県)
- ② Ai Ibuki, Yoshiko Horie, Kazumasa Horikawa, Yutaka Matsumoto, Tomoko Akase. HOW OBESITY IMPAIRS HUMAN SKIN FUNCTIONS? International academic consortium for Sustainable Cities (2015 Sep 12), (Yokohama City Port Opening Memorial Hall, Kanagawa)
- ③ 堀江良子、伊吹愛、赤瀬智子. 肥満による表皮の組織学的変化. 第 24 回創傷・オストミー失禁管理学 (2015年5月30日)、(幕張メッセ、千葉県)
- ④ 赤瀬智子、伊吹愛、榎原弘子、井上聡. 肥満によるヒト皮膚組織の変化. 第 35 回日本肥満学会 (2014年、10月25日)、(シーガイアコンベンションセンター、宮崎県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊吹 愛 (IBUKI, Ai)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：60738805

(2) 研究協力者

赤瀬 智子 (AKASE, Tomoko)
横浜市立大学・医学部・教授
研究者番号： 50276630

(3) 佐竹武彦 (SATAKE, Toshihiko)

横浜市立大学市民総合医療センター・
准教授
研究者番号： 60271318