

2008 30035A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 関連 Lipodystrophy の克服に向けて

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋田 定伯

平成 21 年 (2009 年) 3 月

## 目次

ページ

I.	総括研究報告書	
	HIV 関連 Lipodystrophy の克服に向けて	1
	秋田定伯 (長崎大学医学部・歯学部附属病院 形成外科)	
II.	分担研究報告書	
	臨床評価：薬剤量と臨床症状の評価	8
	白阪琢磨 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)	
	吉野宗宏 (国立病院機構大阪医療センター 薬剤科)	
	脂肪移植評価のための動物実験モデルの作成	11
	山本有平 (北海道大学大学院医学研究科 形成外科)	
	古川洋志 (北海道大学大学院医学研究科 形成外科)	
	大芦孝平 (北海道大学大学院医学研究科 形成外科)	
	脂肪肝細胞の分離と細胞活性の検討	14
	山下俊一 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 放射線医療科学)	
	鈴木啓司 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 放射線医療科学)	
	HIV 関連リポディストロフィーにおける顔面および体幹部皮下脂肪の CT 解析に関する研究	20
	上谷雅彦 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 放射線診断治療学)	
	血管茎付組織移植臨床例の検討	23
	藤岡正樹 (国立長崎医療センター 形成外科)	
	HIV 関連 Lipodystrophy に対する 外科的治療後の創部管理について	27
	吉本 浩 (長崎大学医学部・歯学部附属病院 形成外科)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV.	研究成果の刊行物・印刷物	36

総 括 研 究 報 告 書

## HIV 関連 Lipodystrophy の克服に向けて

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者： 秋田定伯  
長崎大学医学部・歯学部附属病院 形成外科・助教

### 研究要旨

HAART療法などの長期間治療しているエイズ・HIV感染者に合併する Lipodystrophy[リポディストロフィー、脂肪蓄積異常（過剰または萎縮）]のわが国における実態を、HIV感染者およびHIV非感染者（正常ボランティア）の四肢・顔面・躯幹皮下脂肪の全身分布を三次元容量ヘリカルCTを用いて収集し、皮下脂肪の全身性の分析を解析した。同時に、臨床外観上の評価を顔面については、準規格統一化した撮影条件（露出、背景、体位 など）で撮影し、更に臨床診察した。HIV感染者の場合ほぼ全員（日本人男性）に三次元容量ヘリカルCTでの皮下脂肪分布において顔面に特徴的な萎縮を来していた。すなわち、側頭三角部、鼻上嘴唇三角部、頬上嘴唇三角部、耳下腺三角部などで著明な脂肪の萎縮と周囲皮膚の陥凹を認めた。また多くの場合躯幹では正常ボランティアと比較して四肢の臨床上の“るいそう”を来しており特に、肘関節、膝関節の末梢側で皮下脂肪が高度に萎縮した症例を多く認めた。HIV患者では臨床上の視診では“るいそう”の程度は明確でない場合も三次元容量ヘリカルCTでは描出された。また躯幹の坐骨突出部に皮下脂肪の萎縮した例もあり、座位姿勢の際の問題となることが危惧され、本研究の目標の一つである自家脂肪組織由来幹細胞移植による“萎縮”の再生医療は単に、顔面・四肢と露出部位の整容的な改善目的のみならず、荷重部へ身体機能再生の重要性も確認された。抗HIV薬の種類・投与期間と臨床症状の概観的検討も開始し、長期間d4T薬またはプロテアーゼ阻害薬を投与された患者さんに高頻度の Lipoatrophyを中心とするLipodystrophy（脂肪萎縮）が主観的に観察されている。

脂肪組織再生の可能性として、ヒト脂肪由来幹細胞は、培養にて継代可能であり脂肪誘導培地において脂肪分化することを確認した。よって、脂肪由来幹細胞の脂肪萎縮部への移植は期待できる方法であり、今後さらに、臨床実施へ向けて詳細な基礎研究、動物実験を重ねていくことの重要性が示唆された。現行臨床における再建に頻用する血管茎付組織移植の検討を開始し、更に脂肪移植の方法の違いによる術後吸収状態の相違を確認するために、ラットモデルを用いて、血管茎付脂肪組織移植と血管茎を付加しない場合の脂肪移植モデルを確立し来年度以降検討予定である。術後、管理中のウインド ケアについても至適方法について検討開始した。

## 分担研究者

- 白阪琢磨 国立病院機構 大阪医療センター HIV/AIDS先端医療開発センター・センター長
- 吉野宗宏 国立病院機構 大阪医療センター 薬剤科・調剤主任
- 菊池 嘉 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター・臨床研究開発部長
- 山本有平 北海道大学大学院医学研究科・医学部機能再生医学講座  
形成外科学分野・教授
- 山下俊一 長崎大学医歯薬学総合研究科 放射線医療科学専攻・教授
- 上谷雅孝 長崎大学医歯薬学総合研究科・展開医療科学講座 放射線診断治療学・教授
- 藤岡正樹 国立長崎医療センター形成外科・医長
- 吉本 浩 長崎大学医学部・歯学部附属病院 形成外科・助教

## 研究協力者

- 古川洋志 北海道大学大学院医学研究科・医学部機能再生医学講座  
形成外科学分野・講師
- 大芦孝平 北海道大学大学院医学研究科・医学部機能再生医学講座  
形成外科学分野・博士課程
- 鈴木啓司 長崎大学医歯薬学総合研究科 放射線医療科学専攻・准教授



## A. 研究目的

HAART 療法などで長期化・慢性化した HIV 患者に続発する Lipodystrophy に対して、わが国に行ける実態をと調査し、非侵襲性客観的指標を探索し、脂肪移植または脂肪組織由来幹細胞を用いた再生医療に向けた準備を行う。

## B. 研究方法

### 患者さんの臨床実態調査

分担研究者 白阪琢磨・吉野宗宏らの分担成果報告に詳述しているが、国立大阪医療センターにおける HIV 薬剤治療中の外来患者さんの臨床評価を主に主観評価した。

### 脂肪移植法の違いによる術後吸収量の評価

分担研究者 山本有平、協力者 古川洋志、大芦孝平らのラット ソケイ部周囲結合織・脂肪組織を①血管茎付加したもの、②血管茎を遮断したものの、の2群間比較した。

### ヒト脂肪由来幹細胞の培養条件と脂肪分化能の検討

主任研究者 秋田定伯、分担研究者 吉本 浩らの手術から得られた患者脂肪組織由来幹細胞の培養条件を分担研究者 山下俊一、研究協力者 鈴木啓司らにより決定し、更に培養中における脂肪分化誘導検討した。尚、幹細胞移植に関しては臨床研究倫理委員会承認番号 08070296「自家脂肪より抽出した幹細胞を用いた組織再生臨床研究の一環で実施した。

### 三次元容量ヘリカルCTを用いたHIV患者及び正常ボランティアにおける顔面、躯幹、

### 四肢における脂肪分布の検討

主任研究者 秋田定伯を中心とした HIV 患者と性・年齢のマッチした患者のリクルート及び臨床写真撮影、診察の後、三次元容量ヘリカル CT を用いた皮下組織分布の検討を開始し。尚、倫理委員会承認課題名「volumetric analysis 3D CTを用いた皮下組織測定」承認番号 08070297 の下に実施している。

### 血管茎付組織移植の臨床評価

分担研究者 藤岡正樹を中心に、臨床治験例 83 例の血管茎付遊離皮弁移植術における術後組織壊死などの問題点を検討した。

### HIV 患者外科手術後の創管理に用いる被覆材の検討

分担研究者 吉本 浩を中心として、外科手術後の至適創管理目的に創傷被覆材の検討を実施した。

## C. 研究結果

### 患者さんの臨床実態調査

詳細は白阪・吉野の分担成果報告に記述するが、Lipodystrophy が観察された患者は、42名（男性：38名、女性：4名）であり、多くは顔面の Lipodystrophy（脂肪萎縮）を認めた。

### 脂肪移植法の違いによる術後吸収量の評価

ラットの両側に一方で浅腹壁血管を茎とした脂肪組織移植、他方はその血管茎を結紮遮断して術後組織量の変化を検討した。血管茎付脂肪移植の確認に ICG を注入するなどにより、手技の確立できた。更に、検討数の増加が必要と考えられる。

### ヒト脂肪由来幹細胞の培養条件と脂肪分化能の検討

手術検体からの幹細胞は通常培地において培養 5 日間の増殖を認め、9 日目には失活するが、ES 細胞培養溶液を用いると長期間の培養維持が可能となった。また、ピオチン、パントテン酸、インシュリン、デキサメタゾン、IBMX を添加した脂肪細胞分化培地にて脂肪に分化誘導可能であった。

### 三次元容量ヘリカル CT を用いた HIV 患者及び正常ボランティアにおける顔面、軀幹、四肢における脂肪分布の検討

全ての症例において、閾値となる CT を設定することにより皮下脂肪をカラー表示することが可能であった。さらにその画像を立体表示することで、皮下脂肪の分布を視覚的に表示することができた。さらに脂肪以外の組織（皮膚、骨など）の透過度を変化させることで、これらを重ね合わせた画像を作成することが可能で、皮下脂肪と周囲組織との関連を評価することができた。顔面においては、側頭三角部、鼻上口唇三角部、頬上口唇三角部、耳下腺三角部などで著明な脂肪の萎縮と周囲皮膚の陥凹を認め、四肢末梢では、肘関節、膝関節末梢に高度の脂肪萎縮を認め、一部では坐骨周囲の脂肪萎縮を認め、機能的問題も示唆された。臨床評価においては下肢では浮腫のために余り目立たない例もあり定量的な評価の重要性が再確認された。詳細は「事例によるリポディストロフィー診断マニュアル」に詳述している。

### 血管茎付組織移植の臨床評価

頭頸部再建における遊離組織移植（従来法）による軟部組織再建の臨床症例 83 例を検討したところ、7 例（8.4%）に皮弁壊死（部分壊死を含む）を、11 例（13.3）に術後の瘻孔形成をきたし、いずれも追加手術を必要としていた。またこれらの合併症を生じた症例群は全例放射線療法を受けていた。

### HIV 患者外科手術後の創管理に用いる被覆材の検討

現在、さまざまな素材および構造のドレッシング材および薬剤が開発され、臨床で使用されている。その際、創部の状態を的確に観察し、滲出液の量、感染の有無、創部の部位などにより、ドレッシング材や薬剤を適切に選択しないといけない。適切に選択すると創部の治癒過程は良好であるが、誤った選択すると、創部が悪化することがある。実際足部血管奇形に対して経皮的エコーガイド下硬化療法を実施した HIV 患者への使用例でも創部の異常なく治癒することが可能であった。

### D. 考察

5 例の HIV 患者さん及び健常ボランティアの三次元容量ヘリカル CT による客観的評価方法が確立しつつあり、更に症例の増加が必要であり、特に女性患者も検討の必要があると考えられる。薬剤量・種類とリポディストロフィー臨床症状の検討も主観評価に加えて客観評価が必要と考えられる。脂肪移植法について、脂肪組織由来幹細胞の臨床応用に向けての基盤的基礎検討を培養実験と共に生体実験も必要となる。従来からの脂肪移植方法の血管茎



法は有用な方法であるため、更なる手技改善と簡便法（幹細胞移植 など）も必要となる。細胞・組織の移植は重要な治療方法であるものの、原因の追及、再発予防などにも細かく対応する必要があると思われる。今後の国際化の対応と実際の問題点を浮き出す目的で平成21年2月9日 国際フォーラム 「HIV と共に生きる-慢性化しつつある HIV/AIDS の Quality of Life からの視点-」を IV. 研究成果の刊行物に添付した。

#### E. 結論

HIV 関連リポディストロフィーは四肢、顔面などの露出部に認められる抗 HIV 薬の長期使用による重篤な副作用であり、今後更に原因解明、安定かつ侵襲の少ない治療方法の開発が望まれ、自家脂肪組織由来幹細胞移植術の基盤的研究成果が生まれつつある。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表（総括では主任のみ）

##### 1. 論文発表

1. Akita S, Akino K, Tanaka K, Anraku K, Hirano A. A basic fibroblast growth factor improves lower extremity wound healing with a porcine-derived skin substitute. *J Trauma*, 64: 809-815, 2008.
2. Akino K, Akita S, Yakabe A, Mineda T, Hayashi T, Hirano A. Human mesenchymal stem cells may involve in keloid pathogenesis. *Int J*

*Dermatol*, 47: 1112-1117, 2008.

3. Akita S, Akino K, Imaizumi T, Hirano A. A basic fibroblast growth factor accelerates and improves 2<sup>nd</sup> degree burn wound healing. *Wound Repair regen.*, 16: 635-641, 2008.
4. 秋田定伯、平野明喜  
創傷外科総論 創傷治療に関する細胞増殖因子  
形成外科 51 : S25-S31、2008
5. 吉本浩、秋田定伯、平野明喜  
創傷ケアに必要なドレッシング材と薬剤の知識  
*EMERGENCY CARE* 21: 997-1003, 2008
6. 秋田定伯、秋野公造、RenSong-Guang、MelmedShlomo、今泉敏史、平野明喜  
広範囲熱傷患者における血中白血球抑制因子の上昇  
熱傷 34、32-39、2008
7. 秋田定伯  
創傷治療における癒痕期の柔軟性、硬度、カラーマッチ、角質機能改善に貢献する bFGF 製剤  
癒痕・ケロイド治療ジャーナル 2:53-54、2008
8. 秋田定伯  
ケロイドの分類 ケロイドの国際分類比較  
癒痕・ケロイド治療ジャーナル 2:24-26、



2008

June 12, Seoul, Korea, 2008.

## 2. 学会発表

### 1. Akita S

Fibroblast growth factor-2 (basic fibroblast growth factor, bFGF) improves scar quality as well as accelerates wound healing in burns, traumas, and chronic wounds.

Korean Wound Management Society, March 28, 2008.

### 2. 村上千佳子、秋田定伯、平野明喜

術後電子線照射療法を併用したケロイド治療の評価について

第51回日本形成外科学会 (口演)  
(名古屋)、4月、2008年

### 3. 秋田定伯、田中克己、平野明喜

当科における血管奇形治療例の検討

第51回日本形成外科学会 (シンポジウム) (名古屋)、4月、2008年

### 4. 秋田定伯、平野明喜

再移植を必要とした二次性顎裂骨移植例の検討

第51回日本形成外科学会 (口演)  
(名古屋)、4月、2008年

### 5. Akita S.

Fibroblast growth factor-2 (basic fibroblast growth factor, bFGF, Fiblast spray®) improves scar quality as well as accelerates wound healing in 2<sup>nd</sup> degree burns and burn ulcer surgeries.

Korean Burn Society, Invited Lecture,

### 6. 秋田定伯、安楽邦明、津田雅宜、平野明喜

非ヒト霊長類における塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた創傷治癒の評価

第34回日本熱傷学会総会 (名古屋)、6月、2008年

### 7. 秋田定伯

II度熱傷受傷早期からのbFGF製剤使用は創傷治癒を促進し、瘢痕のしつ改善につながる

第34回日本熱傷学会総会 シンポジウム (名古屋)、6月、2008年

### 8. Akita S.

Novel technology on surgical wound care using a basic fibroblast growth factor in Japan

3rd European Academy of Wound Technology, Faculty Lecturer, Elancourt, France, July 7-9, 2008.

### 9. Akita S.

Fibroblast growth factor-2 (basic fibroblast growth factor, bFGF) improves scar quality as well as accelerates wound healing in burns

14<sup>th</sup> Congress of International Society for Burn Injuries, September 7-11, Montreal, Canada, 2008

### 10. Akita S.

Fibroblast growth factor-2 (basic fibroblast growth factor, bFGF) improves

scar quality as well as accelerates wound healing in burns, traumas and chronic wounds.

17<sup>th</sup> European Academy of Dermatology and Venereology, September 18-20, Paris, France, Invited Lecture, 2008

1 1. 秋田定伯、秋野公造、平野明喜

創傷治癒過程の molecular modulation  
第17回日本形成外科学会・基礎学術集会 パネルディスカッション (東京)、10月、2008年

1 2. 秋田定伯

サンタモニカの風はいつも西から  
第17回日本形成外科学会・基礎学術集会 パネルディスカッション (東京)、10月、2008年

1 3. Akita S.

Mesenchymal stem cell therapy for local radiation injury

12<sup>th</sup> World Health Organization-Radiation Emergency Medical Preparedness and Assistance Network (WHO-REMPAN)会議, Invitational Lecture, October 15-17, 2008, Buenos Aires, Argentina

1 4. Akita S.

New Strategic management for local radiation injury

12<sup>th</sup> International Radiation Protection Association, Oral Presentation, Buenos Aires, Argentina, October 19-24, 2008.

(予定も含む。)

1.特許取得

無し

2.実用新案登録

無し

3..その他

無し

5.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1.特許取得

無し

2.実用新案登録

無し

3..その他

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

分 担 研 究 報 告 書

## 臨床評価：薬剤量と臨床症状の評価

分担研究者： 白阪琢磨

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター

臨床研究センター エイズ先端医療研究部長

吉野宗宏

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 薬剤科

### 研究要旨

抗 HIV 療法の進歩によって HIV 感染症は慢性疾患となったが、抗 HIV 薬の短期、長期の副作用の出現は服薬者を苦しめている。患者自身の生命予後に関与しないと考えられる副作用の場合、それらの副作用について医療者はともすれば軽視しがちである。しかし、副作用を患者の QOL の視点から評価する事も重要である。Lipodystrophy はプロテアーゼ阻害薬を代表とする抗 HIV 薬の長期服用で出現するとされている副作用である。Lipodystrophy は抗 HIV 薬の脂肪代謝異常の現れとされており、Lipodystrophy の背景にある脂肪代謝異常の医学的対応は重要視されてきた。一方、Lipodystrophy 自体は生命予後への影響が少なく、医学的問題とあまりされて来なかったが、患者 QOL の視点からは軽視できない。これまでわが国における Lipodystrophy の実態や臨床評価に関する調査もされていないので、今回、わが国における臨床評価のための調査を行う。

### A. 研究目的

抗 HIV 薬の進歩によって HIV 感染者の生命予後は大きく改善したが、抗 HIV 薬の副作用が患者を苦しめている。患者の QOL に大きく関与すると考えられる Lipodystrophy の実態については十分な調査は行われていない。今回、わが国における Lipodystrophy の発症状況等を調査するために、今年度は、当院受診患者での状況につき予備調査を実施した。

### B. 研究方法

当院に継続して通院している HIV 陽性患者の中で、平成20年9月から11月までに受診した患者を対象に、外来担当看護師の主観により広義の Lipodystrophy

(lipoatrophy を含む) の有無を評価し、薬歴等を診療録から調査した。

Lipodystrophy の脂肪萎縮は顔面の頬部と四肢を、脂肪沈着は腹部、背部に着目し外見から評価を行った。

(倫理面への配慮)

研究の実施にあたっては疫学研究に関する



る倫理指針を遵守し、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除に留意した。

### C. 研究結果

1. Lipodystrophyが観察された患者は、42名（男性：38名、女性：4名）であった。

多くは顔面のLipoatrophyを認めた。

2. 感染経路別では、血液製剤由来が10名、性感染が32名であった。平均年齢は48歳（24歳—84歳、中央値：46歳）であった。

3. HAART服薬期間：平均3074日（前医での服薬期間は含めていない）で、多くの患者が長期間HAARTを服薬していた。

#### 4. 服薬内容

①d4Tの処方歴：当院通院中にd4Tの処方を受けた者が32例（76%）であった。

②プロテアーゼ阻害薬：プロテアーゼ阻害薬（IDV、SQV、RTV、NFV、LPVなど）の処方を受けた者39例（93%）を占めた。

### D. 考察

1. 当院の通院患者1281名（平成20年3月末日現在）中、血液製剤由来感染者が80名であるので、Lipodystrophyは血液製剤由来感染者に高頻度に合併している事が示唆された。血液製剤由来感染者に頻度が高い理由として、感染時期から約20年を経過し、服薬期間が長い事と、Lipodystrophyに関与するd4Tなどを服薬した機会が多かったためと推察される。

2. 服薬内容から既報告の様にd4Tやプロテアーゼ阻害薬服用患者にLipodystrophyが多い印象があった。

3. 今後は、対象範囲を拡げ、詳細な薬歴等とLipodystrophyの相関を検討する必要があると考えた。

4. Lipodystrophyの簡便で客観的な評価方法の開発が望まれる。

### E. 結論

当院通院患者で外来担当看護師の主観的評価により、42例の患者にLipodystrophyが観察された。その多くは顔面の

Lipoatrophyであった。服用抗HIV薬については、服用期間が長期である者が大半であり、服用内容にd4Tあるいはプロテアーゼ阻害薬が含まれている者が多かった。

今後は、観察症例を増やし、客観性の高い評価方法を用いて、詳細な解析を行って行きたい。

### F. 健康危機情報

無し

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

HIDAKA Y, OPERARIO D, TAKENAKA M, OMORI S, ICHIKAWA S, SHIRASAKA T. Attempted suicide and associated risk factors among youth in urban Japan, Soc Psychiatr Psychiatr Epidemiol 43(9):751-757,2008

KUWAHARA T, MAKIE T, YAMAMOTO Y, YOSHINO M, YAGURA H, SANO T, KOJIMA K, HIGASA S, SHIRASAKA T. Burden on AIDS-specialist Hospitals in Japan, Based on the Number of Patients Taking

Anti-HIV Drugs, Pharmaceutical  
Regulatory Science 39(7):421-426, 2008

年 11 月

白阪琢磨: HIV 感染症治療の最前線と課題、  
日本医事新報 4401: 56-62、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む。)

白阪琢磨: 米国における HIV 新規感染率の  
推定と治療ガイドラインの改定、**The  
Mainichi Medical Journal** 5(2): 78-81、  
2009 年 2 月

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

## 2. 学会発表

白阪琢磨: Drug Resistance in the world  
and Japan. 第 22 回日本エイズ学会学術集  
会・総会、大阪、2008 年 11 月

白阪琢磨: 患者と医療者 その関係性 (パ  
ートナーシップ) について。第 22 回日本エ  
イズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年  
11 月

矢倉裕輝、吉野宗宏、栞原健、坂東裕基、  
小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成  
人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪  
琢磨: ロピナビル・リトナビル配合剤の初  
回治療における有効性及び安全性に関する  
剤型間の比較検討。第 22 回日本エイズ学  
会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月

矢倉裕輝、吉野宗宏、坂東裕基、小川吉彦、  
矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸  
次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、栞原  
健: ロピナビル・リトナビル配合剤のトラ  
フ値と脂質系への影響及びテノホビル血中  
濃度との相関に関する検討。第 22 回日本  
エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008

## 脂肪移植評価のための動物実験モデルの作成

分担研究者： 分担者氏名：山本 有平 分担者 所属・職名：北海道大学大学院  
医学研究科・医学部機能再生医学講座 形成外科学分野 主任教授

研究協力者： 協力者氏名：古川 洋志 協力者 所属・職名：北海道大学大学院  
医学研究科・医学部機能再生医学講座 形成外科学分野 講師

研究協力者： 協力者氏名：大芦 孝平 協力者所属・職名：北海道大学大学院医  
学研究科・医学部機能再生医学講座 形成外科学分野 博士課程

### 研究要旨

HIV感染者における多剤併用療法（HAART）の開発を初めとする薬物療法は、感染者の臨床経過および予後を大きく改善してきた。しかし長期間の薬剤療法はインスリン抵抗性、脂質代謝異常、体内脂肪分布異常など新たな問題を生じてきている。体型・顔貌に関わる脂肪の蓄積異常によって引き起こるとされるLipodystrophyは、患者の生活の質(quality of life, QOL)にも大きな影響があると考えられることから、治療法の開発に関しての基盤的研究を実施する。その中でも各種の形成外科的な手法によるLipodystrophyの治療を 比較・検討するための動物実験モデルの確立を目指す。

### A. 研究目的

本研究は、プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor, PI)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) 等の長期的投与によって引き起こされると考えられる HIV 関連 Lipodystrophy の治療を最終的な目標とする。HIV 関連Lipodystrophyはアメリカでの報告でHIV感染者の内2-60%の有病率との報告があり、重要な副作用であると考えられる。

近年HAART（療法）などの多剤併用

薬物療法による、延命、予後改善、臨床症状の改善を認めつつも、HIV 関連 Lipodystrophyの中でも特に高頻度に発生するとされる顔面皮下脂肪萎縮は顔貌の悲壮感を増強するのみならず、二次的な抑うつ状態を引き起こすとの報告もあり、長期的な副作用として、克服すべき大きな課題と考えられる。

そこで、形成外科領域の診療の特徴を生かし、過剰皮下脂肪の切除、吸引法などによる減量と脂肪細胞・組織移植による皮下組織の増量といった手法を用いて生活の質



を高めるボディイメージの確立のための臨床応用研究を提案するものである。

## B. 研究方法

移植方法の違いによる術後脂肪の吸収程度の確認を動物実験で検討する。脂肪移植は実際の臨床治療において、低侵襲で有効な方法と思われるものの、細胞化した脂肪は通常移植後の吸収程度が高度である。血管茎付脂肪組織移植における移植後脂肪生着効率を対照法として、血管を付けない脂肪組織移植を実施し、血流保持、血管茎付組織の定着性と再増殖性につき基礎的知見を収集する。

具体的にはラットを用いて血管茎付き脂肪組織と、血管茎を付けない脂肪組織の移植を行い、一定期間後の生着率および移植した脂肪組織の組織学的・分子生物学的変化を検討する。

### (倫理面への配慮)

実験動物使用数の削減及び苦痛を軽減し、適正に実験を行うため、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程に基づいて実験を実施した。

## C. 研究結果

今年度は手術手技の確立および評価法の検討を目指した。手術手技そのものはほぼ確立できたが、術後に安静が得られないことから、創部のトラブルが頻発した。そのトラブル対策のために相当な時間と労力を要したため、評価法の検討については十分に行うことができなかった。

## D. 考察

脂肪移植は実際の臨床治療において、低侵襲で有効な方法と思われるものの、細胞化した脂肪は通常移植後の吸収程度が高度である。それと比較してマイクロサージェリーを用いて行う、血管茎を付けた皮下脂肪組織・真皮・筋肉などの軟部組織移植術は術後吸収の少ない有用な臨床成績を修めてきたものの、手術手技が煩雑であり患者への侵襲が大きいという欠点もある。本研究では血管茎付脂肪組織移植における移植後脂肪生着効率を対照法として、血管を付けない脂肪組織移植を実施し、血流保持、血管茎付組織の定着性と再増殖性につき基礎的知見を収集することを目的としている。

今年度はその目的を達するための実験系の確立を目指したが、手術手技の煩雑さと術後管理の難しさのために実験系の確立には至らなかった。しかし、その基礎となる手術手技の確立に関しては十分な成果を上げることができたと考えられる。今後は移植脂肪組織の定着性と再増殖性に関する基礎的知見収集のための評価法の確立をめざす。

## E. 結論

手術手技はほぼ確立できたが、評価法の検討については十分に行うことができなかった。来年度は評価法の確立を目指していく。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況



(予定も含む。)

1.特許取得

無し

2.実用新案登録

無し

3..その他

無し

## 脂肪幹細胞の分離と細胞活性の検討

分担研究者：山下俊一

分担者 所属・職名：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻・教授

研究協力者：鈴木啓司

協力者 所属・職名：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻・准教授

### 研究要旨

顔貌や体幹などの身体の形態構成の劇的な変貌をもたらす Lipodystrophy の効率よい安全な治療法の確立を目的に施行される自家脂肪細胞移植に向けての基盤的研究として、脂肪幹（前駆）細胞の身体部位の相違による細胞活性の差異の検討を目的として研究を行った。まず、手術検体から得られた脂肪幹細胞を *in vitro* で培養した結果、細胞の増殖分裂能を確認した。また、脂肪細胞分化培地中で維持することにより、脂肪細胞へと分化することも確認した。さらに、単離した脂肪幹細胞を高活性の状態で長期間増殖維持できる培養環境の確立に成功した。以上の結果により、今後の HIV 感染患者由来細胞における検討に必要な基盤的技術が確立された。

### A. 研究目的

顔貌や体幹などの身体の形態構成の劇的な変貌をもたらす Lipodystrophy の効率よい安全な治療法の確立を目的に施行される自家脂肪細胞移植に向けての基盤的研究として、脂肪幹（前駆）細胞の身体部位の相違による細胞活性の差異の検討を目的として研究を行った。平成 20 年度は、手術標本から得られる脂肪幹細胞の培養系の確立を目的とした。

### B. 研究方法

手術検体から得られた脂肪幹細胞懸濁液を、脂肪前駆細胞培地 (DMEM/Ham's F-12 (1:1, v/v)、HEPES (pH7.4)、10% FBS) 中

に混和し、培養フラスコの中で、37°C、5% CO<sub>2</sub>を含む CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養した。継代培養は、フラスコ底面に付着している脂肪幹細胞を、0.2%トリプシン溶液にさらすことで底面から剥離させ、培養液でけん濁することにより回収し、細胞数を計測した後、一定の細胞数をフラスコに戻すことにより行った。

脂肪細胞への分化には、脂肪前駆細胞培地にビオチン、パントテン酸、インシュリン、デキサメタゾン、IBMX を添加した脂肪細胞分化培地を使用した。まず、脂肪前駆細胞培地で、対数増殖期にある細胞を、90%コンフルエントの状態まで培養した。

その後、ほとんどの細胞が分裂を停止している時期を見計らって、培地を脂肪細胞分化培地に変更した。そのまま7日間培養した後に、一度新しい脂肪細胞分化培地に培地交換し、さらに7日間培養した。

細胞質中に脂肪滴が蓄積しているのを確認してから、培地を除き、PBS 緩衝液で2回細胞を洗浄した後に、10%フォルマリン中で細胞を固定した。その後、PBS 緩衝液でフォルマリンを除去した後に、60%イソプロパノールを添加し1分間細胞を静置した。最後に、60%イソプロパノール中に溶解した Oil Red O を細胞に加え、脂肪滴の生体染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

研究の遂行にあたり、手術から得られる検体採取に際して、インフォームド・コンセントのもと、非賢者の不利益にならないように万全の対策を立て、必要があれば第三者機関を設置して、おのおのの手法の妥当性を評価し、また、匿名性を保持し、データ管理に関しても秘匿性を保持した。

### C. 研究結果

手術検体から無菌的に採取した脂肪幹細胞は、脂肪前駆細胞培地中で一晚の培養中にプラスチック底面に接着し、増殖を開始した。採取した細胞の大半を占める細胞は線維芽細胞様の形態を示し、中胚葉系の幹細胞であることが予想された。その後培養を続けると、5日間程度は増殖細胞が観察されたが、9日目にもなると全体的に扁平な細胞が多くなり、ここの細胞も寄り集まるようになって、増殖性を失っていきのが明らかであった。

脂肪幹細胞の分化能を検討する目的で、培養を開始した一部の細胞を別に22mmx22mm サイズのカバーグラス上に培養し、脂肪前駆細胞培地中で90%コンフルエントになるまで培養を続けた。約5日目にほぼ細胞の増殖が停止したのを確認した後に、脂肪細胞分化培地に培養液を置換してさらに7日間培養を継続した。7日目には細胞室中に微細な脂肪滴を持つ細胞が出現して、脂肪細胞への分化が確認された。そこで、培養7日目に再度新しい脂肪分化培地で培養液を交換してさらに7日間培養を行うと、初期にみられた微細な脂肪滴が徐々に拡大して大きなサイズの脂肪滴に変化していき、脂肪細胞として成熟していくのが観察された。そこで、脂肪細胞分化培地中で培養を開始してから14日目に細胞を固定し、脂肪滴を染色する Oil Red-O 染色を施した。その結果、全ての脂肪滴が赤色に染色され、脂肪細胞の分化が完遂していることが確認された。

手術検体から採取した脂肪幹細胞は、短期的には脂肪前駆細胞培地中で増殖しながらも長期的にはその増殖を維持できないことがわかった。そこで、脂肪幹細胞を長期間維持できる培養条件について、その方法を模索した。通常脂肪前駆細胞培地中には牛胎児血清 (FBS) が含まれるが、FBS 中には細胞の増殖に負に働く成分も含まれていることから、無血清培地を用いた脂肪幹細胞の維持を試みた。その結果、胎児性幹細胞 (ES 細胞の) 増殖に用いられている培養液が、脂肪幹細胞の増殖を高度に維持できることを見いだした。じじつ、この培地を用いると、通常培養開始9日目には増殖性を失っていた脂肪幹細胞が、活発な



細胞増殖活性を保ったまま維持できた。

#### D. 考察

平成 20 年度は、手術標本から得られる脂肪幹細胞の培養系の確立を目的とした。その結果、得られた脂肪幹細胞はその形態からも中胚葉系の細胞であることが予想され、脂肪前駆細胞用培養液中で増殖可能であることが確認された。また、培養された細胞は、脂肪細胞分化培地中で脂肪滴を蓄積することが確認され、脂肪幹細胞であることが証明された。以上の結果から、手術検体から無菌的に脂肪幹細胞を入手する手法が確立できたといえる。しかしながら、培養系に移された脂肪幹細胞は限定的な増殖能を持つことが明らかになり、培養開始 9 日目にはその増殖能が低減し、多くの細胞は形態的にも増殖を停止した細胞の特徴を示していた。このようなことから、単離された細胞は、脂肪幹細胞の系統にはありながらも、細胞系譜上の位置は幹細胞よりも下位であることが予想された。そこで、手術検体から単離された細胞を、高度にその活性を維持したまま培養できる環境を模索した。とくに、脂肪前駆細胞培地中には牛胎児血清 (FBS) が含まれることに着目し、FBS 中に含まれる細胞増殖に負に働く成分のことを鑑み、無血清培地を用いた脂肪幹細胞の維持を試みた。その結果、胎児性幹細胞培養に用いられている培養液が、脂肪幹細胞の増殖を高度に維持できることを見いだした。培養された細胞は、より脂肪幹細胞に近い位置の細胞である可能性が高く、場合によっては、リプログラミングにより、体性幹細胞に近い細胞にまで初期化されている可能性まである。もしそうだと

とすると、単に Lipodystrophe の基本原理の理解に貢献するだけでなく、HIV 治療薬による他の臓器の障害に対する再生医療への応用も視野に入ってくることから今後の展開が期待される。

#### E. 結論

手術検体から得られた脂肪幹細胞を *in vitro* で培養した結果、細胞の増殖分裂能を確認した。また、脂肪細胞分化培地中で維持することにより、脂肪細胞へと分化することも確認した。さらに、単離した脂肪幹細胞を高活性の状態で長期間増殖維持できる培養環境の確立に成功した。以上の結果により、今後の HIV 感染患者由来細胞における検討に必要な基盤的技術が確立された。

#### F. 健康危機情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Akilzhanova A, Takamura N, Kusano Y, Karazhanova L, Yamashita S, Saito H, Aoyagi K: Association between C677T/MTHFR genotype and homocysteine concentration in a Kazakh population. *Asia Pac J Clin Nutr* 17(2): 325-329, 2008
2. Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Tanaka M, Tauchi H: Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 49(2): 93-103, 2008