

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策政策研究事業）
分担研究報告書

リポジストロフィーに対する治療法の検討

研究分担者 吉村 浩太郎
自治医科大学外科学講座形成外科学部門教授

研究要旨 内服治療の副作用としての顔面脂肪萎縮症に対する臨床研究をこれまでに6例に対して行った。内訳は、脂肪移植4例、ヒアルロン酸注入2例である。1年の経過をして、現在は最終的な評価を行っている。本年度は、①脂肪組織試料から遺伝子発現解析、②HE組織染色、免疫染色、③臨床所見の臨床写真、CT、およびMRI評価、などを行った。

A. 研究目的

HIV感染症とその合併症に対する新規治療法の開発を目的として、d4Tを含んだ治療の副作用としての顔面の脂肪萎縮症（Facial Lipoatrophy）に対する治療法の開発。

B. 研究方法

脂肪萎縮症に対する治療法の開発は、HIV関連顔面脂肪萎縮に対する形成外科的手法を用いた修復術の安全性と有効性を検索するための、非対照、探索的研究である。対象者から同意を取得したのち、腹部、腰背部、大腿部などの自家脂肪が利用できる症例（一般的にはBMI=20以上）においては、全身麻酔下に自家脂肪移植術を行う（A群）。それ以外の症例においては、局所麻酔下に架橋ヒアルロン酸注射剤（レスチレンリド®）注入術を行う（B群）。いずれの群においても、処置は日本形成外科学会専門医の資格を有する医師が行う。血友病症例が対象となる場合には、周術期に適切な凝固因子製剤投与を行う。予定登録数は10例で、治療後約48週間を観察期間とし、安全性と有効性を検討する。治療成績は、術前と術後で、写真、CT（もしくはMRI）を用いた3次元画像解析により、12か月後に最終評価する。同意があれば、手術時に組織生検を行い、

HIV 脂肪萎縮症患者の脂肪組織特性の分析を行う。患者から採取した吸引脂肪組織、生検組織を、健康患者のサンプルと比較し、分析する。包埋切片の組織染色（幹細胞数や炎症所見）、採取した間質血管細胞群に含まれる細胞組成分析、などを比較検討する。（倫理面への配慮）

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守した。なお、臨床研究の国立国際医療研究センターにおける倫理委員会の承認番号は、NCGM-G-1598である。サンプル、個人情報、および解析結果は、匿名化して厳重に保管している。結果や学術論文や学会の報告で、顔の写真を出す場合にも患者のプライバシー保護に十分注意する。

C. 研究結果

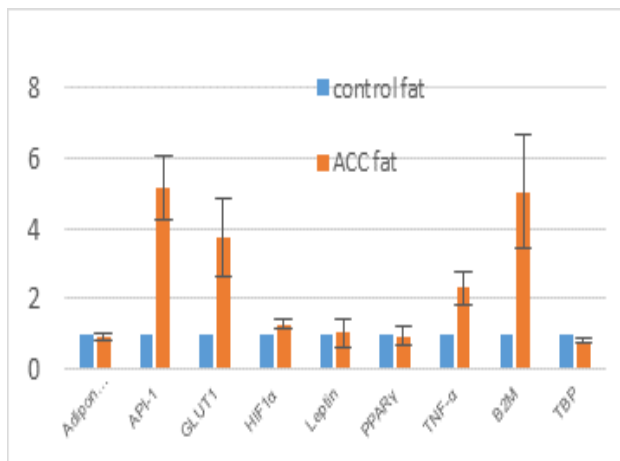
これまでに顔面脂肪萎縮症の計4例において脂肪移植術を、2例においてヒアルロン酸注入術を行った。現在までに、6例を、12か月まで経時的に観察した。

顔面脂肪萎縮症患者6名より、皮膚皮下組織、吸引脂肪のサンプルを採取した。および健常患者2名より、正常組織を採取した。それぞれの吸引脂肪組織から酵素処理により血管間質細胞群を採取し、フローサイトメトリ（FACS）にて細胞成分の組成に

ついて分析する（昨年度）とともに、包埋組織切片の組織学的分析、RNA の抽出を行い、分析を行った。さらに臨床所見についての分析も行った。マイクロアレイについては現在解析中である。

1) 遺伝子発現

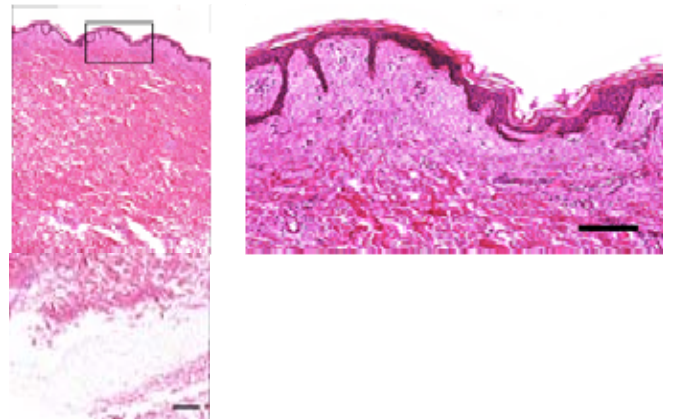
顔面萎縮症患者の脂肪組織の状態を調べるために、脂肪組織で主に発現することが知られている遺伝子を含め、炎症にかかわる遺伝子などいくつかの遺伝子について発現解析を行った。これまでに採取した計 3 例の脂肪組織から RNA を抽出し、PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)、Adiponectin、Leptin、HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)、GLUT1 (glucose transporter 1)、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)、TNF- α (tumor necrosis factor- α)、B2M (β -2 microglobulin)についてリアルタイム PCR による解析を行った。コントロールとして正常脂肪組織 1 例から同様に RNA 抽出とリアルタイム PCR を行い、GAPDH (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase)を内部スタンダードとして各遺伝子の相対発現量を調べた。その結果、PPAR γ 、Adiponectin、Leptin でコントロールに比べわずかに発現量の減少が認められ、HIF-1 α 、GLUT1、PAI-1、TNF- α 、B2M で増加が認められた。



PCR からは、脂肪細胞の機能に関する因子は正常に近く、炎症や感染の影響を示唆する所見が得られている。

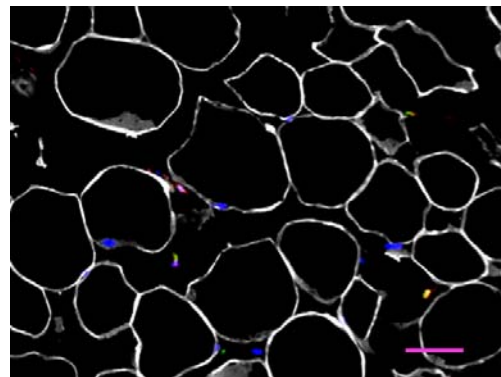
2) 組織学的評価

顔面脂肪萎縮症患者の鼠径部から皮膚および皮下組織を採取し、これまでに計 5 例の組織を IHC Zinc Fixative (BD Bioscience)にて固定後切片を作成し HE 染色を行った。そのうち 4 例について表皮および真皮の厚さを測定した。平均値は、表皮が $71 \pm 5 \mu\text{m}$ 、真皮が $2,937 \pm 410 \mu\text{m}$ であった。表皮と真皮厚さの比はおおよそ 1:41 であった。



HE 染色画像 (左 : Bar=300 μm 、右 : Bar=100 μm)

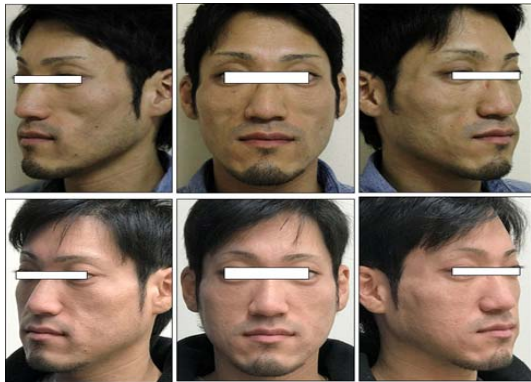
さらに昨年度につづき、組織切片を用いて、ペリリピン (白)、Mac2 (赤)、CD34 (緑)、核 (青) に対し蛍光抗体法による免疫染色を行った。



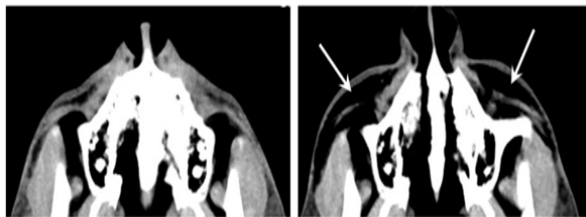
CD34 陽性マクロファージが散見されたが、CD34 陽性の ASC は数が少ないと思われた。脂肪細胞の形態の異常は認められない。

i) 脂肪移植

これまでに4例に行い、12か月の経過観察を行った。改善効果の個人差はあるものの、全4例において有効性が認められた。脂肪組織の採取部に瘢痕を認めるものの、採取部、治療部ともに、有害事象や後遺症は認められていない。代表的症例の臨床写真とCTの所見を下記に示す。



治療前(上)と治療1年後(下)



治療前(左)と治療1年後(右)のCT
白矢印は、組織の増量に寄与した移植脂肪
(低エコーで、脂肪組織であることが示唆される)。

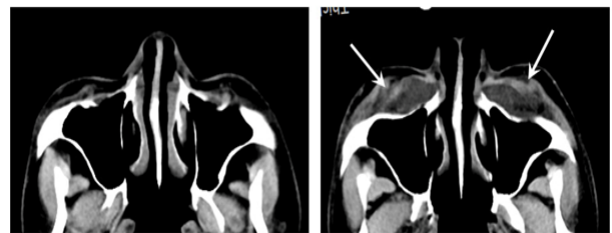
ii) ヒアルロン酸治療

これまでに2例に行い、12か月の経過観察を行った。改善効果の個人差はあるものの、全2例において有効性が認められた。治療部に有害事象や後遺症は認められていない。

代表的症例の臨床写真とCTの所見を下記に示す。



治療前(上)と治療1年後(下)



治療前(左)と治療1年後(右)のCT

白矢印は、組織の増量に寄与したHAによって誘導されたと考えられる組織である(中等度エコーであり、ヒアルロン酸のカプセル化とともに線維化が誘導されていることが示唆される)。

D. 考察

脂肪萎縮症に対する治療法の開発に関する臨床研究では、脂肪移植、HA注入ともに、12か月の評価で、個人差はあるものの、全般的には良好な改善が見られている。脂肪移植とヒアルロン酸注射では、CT上それぞれの特徴的な改善所見がみられるが、ともに長期的に有効性を維持している。また問題点としては、脂肪移植については患者が痩せているために期待するほど移植のための十分量の脂肪組織が得られないことがあること、HA注入の場合には頬部中心部の改善効果が得られないこと、があげられる。

組織の解析結果からは、HIV脂肪萎縮症の患者においては、脂肪細胞の形態や機能の異常を示唆する所見は認めないが、感染や慢性炎症に対する適応反応によると思われる萎縮、変性の結果と思われる変化が認められた。

E. 結論

脂肪萎縮症に対する治療法の開発に関する臨床研究では、脂肪移植、HA注入ともに、短期的には良好な改善が見られている。今後は、前年度までに得られていた知見に加え、保管してあるRNA、組織標本

の解析（マイクロアレイ、PCR など）を進める。また、これまでの治療患者で追加の治療を希望する患者について、ヒアルロン酸の治療を行い、同様の有効性の解析を行う予定である。今後、これまでの本題目についての臨床研究と基礎研究をまとめて、論文発表する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanayama K, Mineda K, Mashiko T, Wu S, Feng J, Kinoshita K, Sunaga A, Yoshimura K. Blood congestion can be rescued by hemodilution in a random-pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg* 139: 365-374, 2017.
- 2) Mashiko T, Wu S, Feng J, Kanayama K, Kinoshita K, Sunaga A, Narushima M, Yoshimura K. Mechanical micronization of lipoaspirates: squeeze and emulsification techniques. *Plast Reconstr Surg* 139: 79-90, 2017.
- 3) Kamochi H, Sarukawa S, Sunaga A, Uda H, Nishino H, Sugawara Y, Yoshimura K. Orbitomaxillary reconstruction using a combined latissimus dorsi musculocutaneous and scapularangle osseous flap. *Int J Oral Maxillofacial Surg* 75: 439.e1-439.e6, 2017.
- 4) Sunaga A, Kamochi H, Sarukawa S, Uda Hirokazu, Sugawara Y, Asahi R, Chi Daekwan, Nakagawa S, Kanayama K, Yoshimura K. Reconstitution of Human Keloids in Mouse Skin. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 5:e1304, 2017.
- 5) Feng J, Mineda K, Wu SH, Mashiko T, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Kanayama K, Asahi R, Sunaga A, Yoshimura K. An injectable non-cross-linked hyaluronic-acid gel containing therapeutic spheroids of human adipose-derived stem cells. *Sci Rep* 7: 1548, 2017.
- 6) Mashiko T, Wu SH, Feng J, Kanayama K, Yoshimura K. Reply: Mechanical Micronization of Lipoaspirates: Squeeze and Emulsification Techniques. *Plast Reconstr Surg* 139: 1370e-1372e, 2017.
- 7) Mori M, Nagashima H, Akazawa S, Saegusa N, Ichikawa Y, Nakagawa M, Yoshimura K. Takotsubo cardiomyopathy after head and neck reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 5: e1366, 2017.
- 8) Tashiro K, Feng J, Wu SH, Mashiko T, Kanayama K, Narushima M, Uda H, Miyamoto S, Koshima I, Yoshimura K. Pathological changes of adipose tissue in secondary lymphoedema. *Br J Dermatol* 177: 158-167, 2017.
- 9) Tomioka YK, Uda H, Yoshimura K, Sunaga A, Kamochi H, Sugawara Y. Studying the blood pressures of antegrade and retrograde internal mammary vessels: Do they really work as recipient vessels? *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 70, 1391-1396, 2017.
- 10) Sarukawa S, Kamochi H, Noguchi T, Sunaga A, Uda H, Mori Y, Nishino H, Yoshimura K. Free-flap surgical correction of facial deformity after anteromedial maxillectomy. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg*, 45, 1573-1577, 2017.
- 11) Mashiko T, Wu SH, Feng J, Kanayama K, Yoshimura K. Reply to a letter by Bertheuil regarding "Mechanically isolated stromal vascular fraction by nanofat emulsification techniques". *Plast Reconstr Surg*, In press.
- 12) Tomioka Y, Enomoto S, Gu J, Kaneko A, Saito I, Inoue Y, Woo T, Koshima I, Yoshimura K, Someya T, Sekino M. Multipoint Tissue Circulation Monitoring with a Flexible Optical Probe. *Sci Rep*,7, 9643, 2017.
- 13) Uda H, Kamochi H, Sarukawa S, Sunaga A, Sugawara Y, Yoshimura K. Clinical and quantitative isokinetic comparison of abdominal morbidity and dynamics following DIEP versus muscle-sparing free TRAM flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, 140, 1101-1109, 2017.
- 14) Mashiko T, Wu SH, Kanayama K, Asahi R, Shirado T, Mori M, Sunaga A, Sarukawa S, Uda H, Yoshimura K. Biological properties and therapeutic value of cryopreserved fat tissue. *Plast Reconstr Surg*, 141, 104-115, 2017.
- 15) Sunaga A, Sugawara Y, Kamochi H, Gomi A, Chi D, Asahi R, Mori M, Sarukawa S, Uda H, Yoshimura K. Multidirectional cranial distraction osteogenesis with simplified modifications for treating sagittal synostosis. *Plast Reconstr Surg Glob Open*,5, e1536, 2017.
- 16) Kamochi H, Sunaga A, Chi D, Asahi R, Nakagawa S, Mori M, Uda H, Sarukawa S, Sugawara Y,

Yoshimura K. Growth curves for intracranial volume in normal Asian children fortify management of craniosynostosis. J Cranio-Maxillo-Facial Surg,45, 1842-1845, 2017.

2. 学会発表

1) Advancements and new issues in Fat Grafting, MEVOS 美容形成外科学会(中国、武漢), June 3, 2017.

2) Fat grafting and stem cells: Therapeutic tools for problematic tissues, オンコプラスチック乳房再建外科研究会(彰化、台湾), July 1, 2017.

3) Fat grafting and stem cells: Therapeutic tools for problematic tissues, 上海美容形成学会(上海、中国), July 8, 2017.

4) Adipose stem cells (ASCs): Roles in remodeling after

fat graft and therapeutic potentials 米国形成外科学会(オランダ、米国), Oct 8, 2017.

5) How does radiation affect fat and stem cells?: How can we treat radiated tissue? 国際形成再生外科学会(ドバイ、UAE), Nov 18, 2017.

6) Adipose-derived products for volumization and revitalization, 国際脂肪治療研究学会(サンディエゴ), Dec 2, 2017.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし