

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

# 目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦 ……	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆宇 ……	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 ……	979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 ……	1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 ……	1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 ……	1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 ……	1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤雄一 ……	1115

## ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究

所属 国立成育医療センター研究所

生殖医療研究部

研究者

阿久津 英憲

**研究要旨：**本研究では、再生医療の供給組織として期待されている羊膜組織の幅広い汎用性を獲得するために、これまで開発してきた保存性にすぐれた乾燥羊膜を臨床効果の機序の解明を図るとともに実用化し臨床応用することを目指す。

### 分担研究者

(1) 富山大学医学部 二階堂敏雄、清水忠道、齋藤滋、遠藤俊郎、北側清隆

(2) (有) セラジックス 後藤光昭

(3) (株) サクラ精機 荒川雅彦

### A. 研究目的

近年再生医療の現場では、生体材料として、免疫抑制因子を発現し共移植された他組織をも拒絶反応から回避させる羊膜の使用が試みられている。しかしながら、その使用は生組織ゆえ保存限界があり、かつ保存環境に大きく制限される。そこで本研究は、移植に適した羊膜本来の性格を維持しつつ室温での長期保存ができ、扱い易く広く応用されうる機能再生医療材料として乾燥羊膜を開発し臨床応用することを目的とする。我々は既に、独自の乾燥方法を開発し、室温にて年単位で保存可能な乾燥羊膜を作製した（特許申請中）。本件ではまず、生物材料としての構造解析（物性）、張力、保水性などの機能解析（数値化）を行い膜の特性を明確にする（平成18年度前半）。羊膜移植は眼科領域で既に行われているがその効果を説明する機序は未知な部分が多い。本研究においては専門性の高い各科と共同研究し乾燥羊膜の臨床応用範囲を広げかつその治療効果をもたらす機序を解析する。

### B. 研究方法

#### 1) 乾燥羊膜作成

適切なインフォームド・コンセント手続きのもと帝王切開で摘出された胎盤から

羊膜を得る。採取羊膜組織を両面シリコン樹脂加工耐油紙上に広げ、マイクロ波、遠赤外線、空気圧を操作する装置により乾燥羊膜（Hyper-Dry 乾燥羊膜）を作製し本研究に供する。

#### 2) 乾燥羊膜特性解析

光学顕微鏡にて羊膜生組織と他の加工羊膜組織とを詳細な形態的解析を行う。

#### 3) 乾燥羊膜タンパク質解析

乾燥羊膜よりタンパク質を抽出し、ウエスタン・ブロッティング法にて $\alpha$ 1-antitrypsinとOCT3/4の発現解析を行う。生物材料としての構造解析（物性）、張力、保水性解析を行う。

#### 4) 糖鎖高分子の開発と糖鎖ポリマーゼイッシュでの細胞培養

これまで、糖鎖として用いてきたラクトビオン酸は、ポリマーに誘導された際、肝臓の実質細胞上のアジアロ糖タンパク質レセプターとのみ相互作用し、肝細胞を特異的に相互作用させる。より純度の高いラクトビオン酸作成法を検討しポリスチレン誘導体型糖鎖ポリマーを合成する。ヒト株化細胞であるCHO細胞、B16細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞を用いてマトリックスのキーマテリアルとなる新たに合成した糖鎖ポリマーによる細胞培養を行う。血清は添加せず、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて所定の時間培養し、細胞の形態と増殖程度を位相差顕微鏡にて観察した。これら細胞の70%コンフルエント培養系に、各ポリマーの0.1W/V%溶液を添加し、細胞に対する毒性評価を行う。

#### 倫理面への配慮

ヒト乾燥羊膜作成にあたり、ヒト検体を使用するため、その採取とその後の検体管理にあたり以下の点に留意する。

インフォームドコンセント：研究用の検体提供に際し、十分な説明を行い、本人からの文書による同意をうける。この同意は検体が被験者本人と連結できる限り、撤回することができ、非同意や同意撤回により、不利益をうけることのないようにする。

・個人情報の保護：患者の個人情報を最大限に保護するために、患者の個人識別情報を検体より取り除いて符号化・番号化を行う匿名化を、患者検体採集時に行い、患者個人識別情報と検体との対応表を、「個人識別情報管理者」が厳重に管理する。

富山大学医学部・承認番号 44、平成 17 年 6 月 24 日

国立成育医療センター・受付番号 55、平成 16 年 11 月 15 日

### C. 研究結果

安定的に Hyper-Dry 乾燥羊膜を提供・保存できるシステムが構築できた。実体顕微鏡下では生羊膜には不透明な白色を呈し、HYPER-DRY 乾燥羊膜には透明感があったが、凍結乾燥は生羊膜羊膜よりもさらに不透明な白色となり、HYPER-DRY 乾燥羊膜と顕著な差が観られた。生羊膜では敷石状に見える上皮が観察でき、HYPER-DRY 乾燥羊膜でも生羊膜と同様に、敷石状の上皮が観察できた。凍結乾燥には小さな穴が観られ、細胞の区別が難しいものとなった。生羊膜には上皮・間葉系細胞と結合組織がよく保存されていた。HYPER-DRY 乾燥も同様によく保存されていた。凍結乾燥では上皮細胞は濃縮し、結合組織に細胞を認めず、膠原繊維が堅く結びついていて、HYPER-DRY 乾燥の方が、凍結乾燥よりも形態をよく保持した。

ウエスタン・ブロッティング法によりタンパク質の変性を生羊膜と比較したところ、乾燥羊膜で、 $\alpha$  antitrypsin と Oct3/4 の抗原性が保持されていた。HYPER-DRY 乾燥羊膜と凍結乾燥には顕著な差が観られたが、細胞の保存状態によるものと考えられた。HYPER-DRY 乾燥羊膜内の蛋白質の変性は抗体による認識に耐えうる程度には保持されていた。

細胞選択増殖活性を持ち、ミネラルの吸収促進効果が認められる乳糖の酸化生成物であるラクトビオン酸を HPLC シングルピークで作製することができた。他の糖鎖に関しても同様の操作で精製が可能

であった。合成ポリマー糖鎖はポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、SUS、ポリプロピレンなどの医療素材にコーティングが可能である。これらの医療素材は、ゲル、不織布、ファイバー、シート、フィルムなどの形状に加工し、細胞培養に使用することが可能である。従って、このような医療素材からできた培養デバイスに糖鎖ポリマーをコーティングすることでより効率の良い培養基材を作成することが可能になる。他に、0.01W/V%の水溶液にフラーレン、CoQ10、アスタキサンチンなどの疎水性薬物を添加すると、ポリマー内に疎水性薬物を包接し、超音波処理などによりクリアな水溶液を与えることがわかった。

細胞認識性に重点をおいた糖鎖ポリマーを多数、改良開発することができ、B16メラノーマ細胞、CHO 細胞、HepG2 細胞、NIH3T3 細胞などの様々な性質の細胞が培養できること、さらに、糖鎖や共重合した化合物の性質に応じて細胞の接着・増殖がコントロールされることができた。

糖鎖ポリマーは、糖鎖や共重合した化合物により細胞に対する認識性が異なることが明らかになり、疎水性薬物を水中にナノレベルで分散できる可能性があることが示唆された。

これらのことから、HYPER-DRY 乾燥羊膜は上皮細胞の保存が良いのに対し、凍結乾燥では悪いことがわかった。

### D. 考察

HYPER-DRY 乾燥羊膜がいずれの凍結乾燥羊膜よりも生羊膜に近い形態学的構造を示したことから、1) 必要時に利用できる 2) 管理保管に手間とコストのかからない乾燥羊膜が作製できたと考えた。将来の人工器官に向けた基盤研究では、糖鎖ポリマーはナノレベルで分散でき、乾燥羊膜にこれらポリマーを塗布することで、細胞のよりよい培養環境を提供できると共に、疎水性の細胞活性化因子を包接し、細胞培養時に徐放させることで、人工器官へのより確実なアプローチが可能になると考えられた。この糖鎖ポリマーによる細胞の認識性と反応の違いがどのようなメカニズムで引き起こされているのかを詳細に検討していくことで、より高度な細胞培養システムの構築が可能になる。

### E. 結論

将来の安全的な再生医療マテリアルを供給するために、我々が開発してきた HYPER-DRY 乾燥羊膜はヒト由来生羊膜に非常に近似した形質を保持し、長期保存が可能な組織を作成できた。新規に開発した糖鎖ポリマーは細胞と共培養する中で、細胞を特異的に認識し反応性の違いをみせ、機能性マトリックス構築することができた。ヒト由来の長期保存で安定的な人工羊膜の足場を応用すれば、より安全で高度な細胞培養システムの構築が可能になり人工器官開発の重要な基盤づくりができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev.* 2007; Epub ahead of print.
2. Sullivan S, Egli D, Akutsu H, Melton D, Eggan K, Cowan CA, . Derivation of human ES cells. *Human Embryonic Stem Cells: A Practical Handbook* (in press). Editors, Stephen Sullivan, Kevin Eggan and Chad Cowan, John Wiley & Sons.
3. Akutsu H, Cowan CA, Melton D. Human Embryonic Stem Cells. *Methods Enzymol.* 2006; 418: 78-92.
4. Tanaka TS, Lopez de Silanes I, Sharova LV, Akutsu H, Yoshikawa T, Amano H, Yamanaka S, Gorospe M, Ko MS. Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos, germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets. *Dev Growth Differ.* 2006;48:381-90.
5. Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, Nikaido T, Konishi I, Nishizawa O., Transplantation of Preserved Human Amniotic Membrane for Bladder Augmentation in Rats. *Tissue Engineering*, in press.
6. Takahara Y, Yogosawa S, Maruyama S, Watanabe N, Yokoyama H, Fukasawa K,

Sukenaga Y, Kamiyama J, Izumi M, Wakada M, Zhang H, Yoshizawa K, Kawa S, Nikaido T, Sakai T. Lysocellin, a metabolite of the novel drug 'alopestatin', induces G1 arrest and prevents cytotoxicity induced by etoposide. *Int J Oncol.* 28:823-9, 2006.

7. Yasuo M, Fujimoto K, Tanabe T, Yaegashi H, Tsushima K, Takasuna K, Koike T, Yamaya M, Nikaido T. Relationship between calcium-activated chloride channel 1 and MUC5AC in goblet cell hyperplasia induced by interleukin-13 in human bronchial epithelial cells. *Respiration.* 73:347-59, 2006.
  8. Zhang H, Iwama M, Akaike T, Urry DW, Pattanaik A, Parker TM, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic cell sheet harvest utilizing a novel temperature-responsive culture surface coated with protein-based polymer. *Tissue Engineering* 12:391-401, 2006.
  9. Miyamoto T, Shiozawa T, Kashima H, Feng YZ, Suzuki A, Kurai M, Nikaido T, Konishi I. Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells. *Endocrinology.* 147:4863-70, 2006.
- ### 2. 学会発表
1. Akutsu H, Hall I, Eggan K, Umezawa A: The nuclear equivalence and reprogramming of pancreatic beta-cells. 5th JBS Symposium, 2006. Nagano, Japan.
  2. Akutsu H, Umezawa A: Infertility and Oocyte Biology. Canada-Japan collaborative workshop in reproductive and child health. 2006. Tokyo, Japan.
  3. 乾燥羊膜によるマウス創傷の治癒効果  
岡部素典、乗杉 理、吉田淑子、戸田文香、Teng Zan、米田徳子、野上真紀子、樋口 収、木村友厚、宮脇利男、齋藤 滋、

清水忠道、二階堂敏雄（再生医療学会 2007.3）

4. 角膜穿孔に対する新規ヒト乾燥羊膜の治療効果 戸田文香、北川清隆、山田哲也、柳沢秀一郎、渡辺一彦、柚木達也、岡部素典、吉田淑子、齋藤 滋、二階堂敏雄（再生医療学会 2007.3）
5. 再発性翼状片に対する新規ヒト乾燥羊膜移植の有効性の検討 北川清隆、岡部素典、山田哲也、柳沢秀一郎、渡辺一彦、柚木達也、戸田文香、吉田淑子、齋藤 滋、二階堂敏雄（再生医療学会 2007.3）
7. マウス羊膜細胞の特性および組織形態学的検討 吉田淑子、Teng Zan、岡部素典、戸田文香、米田徳子、野上真紀子、樋口収、二階堂敏雄（再生医療学会 2007.3）
8. マウス羊膜から幹細胞の分離 Teng Zan、吉田淑子、岡部素典、戸田文香、樋口収、野上真紀子、米田徳子、二階堂敏雄（再生医療学会 2007.3）
9. ヒト臍帯 Wharton 膠の間葉系細胞の分離および特性の解析 樋口収、野上真紀子、泉徳子、Teng Zan、戸田文香、岡部素典、吉田淑子、二階堂敏雄（再生医療学会 2007.3）
10. Spheroid 培養による羊膜細胞の Stem cell の単離 米田徳子、樋口収、野上真紀子、Teng Zan、戸田文香、岡部素典、吉田淑子、齋藤 滋、二階堂敏雄（再生医療学会 2007.3）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

PCT/JP2006/316269 乾燥羊膜及び羊膜の乾燥処理方法；出願人：富山医科薬科大学、発明者：二階堂敏雄、吉田淑子、岡部素典、戸田文香

特願 2006-218297 乾燥羊膜からなる眼表面の再建用医療材料；出願人：国立大学法人富山大学、発明者：二階堂敏雄、北川清隆、岡部素典、

### 2. 実用新案登録 なし



---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団  
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル(小伝馬町駅前)4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社