

を駆使して大量産生することに成功した。培養系の特徴は、①血液細胞の分化誘導に至適とされる培養条件（15%牛胎児血清と6種類のサイトカイン・増殖因子（VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6））であること、②前半の sphere 形成浮遊培養と後半の平面接着培養からなる「2段階」培養であること、である。我々の系においては、VE-cadherin と PECAM-1 がどちらも陽性の「典型的な」血管内皮細胞の他に、どちらも陰性の「非典型的」血管内皮細胞も産生され、その詳細な解析と生理的な位置づけ・意義の確立が必要と考えられた。また、継代を経ることにより細胞老化が避けられないことも明らかにされたが、老化防止薬のアッセイ系としての利点も期待される。このような品質の高い培養系は、創薬などのアッセイ系として極めて有用と考えられる。また、一部の実験系においては、ヒトES細胞から、血管内皮細胞のみではなく、血管平滑筋細胞（壁細胞）も誘導され、血管内皮細胞と壁細胞の双方向性分化能を有する血管前駆細胞（Vascular Progenitor Cells: VPC）の同定に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Michibata H, Okuno T, Konishi N, Wakimoto K, Kyono K, Aoki K, Kondo Y, Takata K, Kitamura Y, Taniguchi T: Inhibition of mouse GPM6A expression leads to decreased differentiation of neurons derived from mouse embryonic stem cells, *Stem Cell Dev* 4:641-651, 2008.
2. Saeki K, Yogiashi Y, Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from primate embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 217:261-280, 2008.
3. Nakahara M, Matsuyama S, Saeki K, Nakamura N, Saeki K, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free hematopoietic differentiation system with generation of functional neutrophils from feeder and cytokine-free primate embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 10:341-354, 2008.
4. Saeki K, Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:59-67, 2009.
5. Nakahara M, Saeki K, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A: Human embryonic stem cells with maintenance under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition. *Cloning Stem Cells* 11:5-18, 2009.
6. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S: Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood*, in press, 2009.

2. 学会発表

1. Saeki K, Nakahara M, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from monkey and human embryonic stem cells. 6th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2008, Philadelphia, PA, USA.
2. Saeki K, Nakahara M, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from monkey and human embryonic stem cells. The 23rd Naito Conference: Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [III], November 2008, Kanagawa, Japan.
3. 中村直子、佐伯久美子、佐伯晃一、安田和基、湯尾 明：高ブドウ糖によるヒト血管内皮細胞における活性酸素産生の機序—臓器特異的メカニズムの同定。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会、2008年12月、神戸。
4. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、中村直子、松山さと子、近藤 靖、山中伸弥、高橋和利、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類胚性幹細胞およびヒト i P S 細胞に由来する血管内皮細胞でのストレス依存性老化の機序。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会、2008年12月、

神戸。

5. 中村直子、佐伯久美子、松山さと子、高橋和利、山中伸弥、湯尾 明：カニクイザルES細胞およびヒトiPS細胞からの無血清・無フィーダー培養による肝細胞分化。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。
6. 佐藤千香子、五香麻衣子、過足芳子、松山さと子、小柳 真、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類胚性幹細胞由来血管内皮細胞による血管平滑筋細胞の増殖制御機構。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。
7. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、松山さと子、小柳 真、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類（ヒト、サル）胚性幹細胞およびヒトiPS細胞に由来する血管内皮細胞の老化機序。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：血管平滑筋細胞増殖を抑制する血管狭窄部挿入用基材

発明者：佐伯久美子、湯尾 明、安田和基、佐藤千香子、五香麻衣子

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願番号：特願2008-280148

出願日：平成20年10月31日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト脂肪由来幹細胞を用いた医薬品開発研究

所属 国立成育医療センター研究所

研究者 田上昭人

研究要旨 美容形成目的に脂肪吸引されたヒト脂肪組織より、脂肪由来幹細胞（間葉系細胞）の分離・樹立を行った。樹立したヒト脂肪由来幹細胞は、保存・バンキングを行い、さらに薬物毒性試験に応用を図った。脂肪由来幹細胞から種々の細胞（神経細胞や脂肪細胞等）への分化誘導法の確立を行い、その分化増殖過程における薬物の影響を分子生物学的・組織学的手法を用いて解析を行った。

分担研究者

- (1) 京都大学再生医科学研究所 田畑泰彦
- (2) 株式会社バイオマスター 村瀬祥子

A. 研究目的

これまで薬物毒性・薬物代謝の評価試験には、種々の細胞や動物が用いられてきたが、種差の問題等が残されヒト組織を用いた試験法の開発が必要とされている。手術などで得られるヒト組織（主に肝臓、腎臓）を用いた薬物評価も試みられているが、充分量の検体を得ることは非常に困難であり、組織の均一性などの問題も残され、新たな試験法の開発が必要とされている。この問題点を解決する方法の一つとして、ヒト組織由来幹細胞の利用が注目されている。これまでに、血球系幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞など種々の組織に由来する幹細胞が同定されているが、最近、ヒト皮下脂肪組織のなかにも間葉系幹細胞（脂肪幹細胞）が存在することが報告され、より簡便な細胞治療の供給源として期待されている。ヒトの皮下脂肪は体重の10%以上を占める人体最大の組織である。美容形成目

的に脂肪吸引された皮下脂肪より分離される脂肪由来幹細胞は、細胞治療の供給源としてのみならず、ヒト組織・細胞を用いた毒性評価にも応用することが可能である。脂肪由来幹細胞は間葉系の多能性を有するだけでなく、CD34陽性で血管新生などの治療にも有効性が示唆されており、採取も簡単で細胞培養による増殖能も高いことから最近注目されている。脂肪由来幹細胞の特徴は、間質細胞でありながらCD34陽性細胞が非常に多いこと、培養すればCD105（間葉系の多分化能に関連）陽性であること、さらに特殊培養技術によって血管前駆細胞に特徴であるFlk-1陽性細胞、CD117（c-kit）陽性細胞を大量に得ることができることなど、他の組織幹細胞にはないユニークな面を持っていることが知られている。このような背景のもと、ヒト皮下脂肪組織から得られた脂肪由来幹細胞を用いて骨格筋細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨・軟骨細胞などに分化誘導を行うことにより、安定して均一なヒト細胞が入手することが可能となる。この脂肪由来幹細胞および脂肪由来幹細胞から分化させた細胞を用いて薬物毒性試験方法の開発を行い、薬物の評価を行う。

B. 研究方法

1) 患者皮下脂肪より脂肪組織の吸引手術・吸引された脂肪組織の保存・脂肪由来幹細胞(間葉系幹細胞)の分離・保存・バンキング
湘南美容外科クリニックにおいて吸引された脂肪組織から脂肪由来幹細胞を分離し解析に用いる。

(1) 脂肪由来幹細胞の分離

ヒト吸引脂肪を遠心し脂肪部分と廃液部分に分け、脂肪部分はコラゲナーゼ処理を行なった。フィコール処理または溶血処理により赤血球を除去し脂肪由来幹細胞を含む細胞群を分離した。

(2) 細胞培養と分化誘導

PLA 細胞と LAF 細胞の増殖培養用培地は M199(10%FBS)を用いた。

(3) 分化誘導培養

分離した PLA 細胞と LAF 細胞を 1 週間培養し、その後分化誘導培地に置換して分化誘導を行なった。脂肪への分化誘導は、分化培地で 4 週間培養後にオイルレッド O 染色で確認した。骨への誘導も同様に実施し、von Kossa 染色を行なった。軟骨への誘導は 3 週間マイクロマス培養を行い軟骨様細胞塊の形成で確認した。

(4) 表面抗原解析

分離した脂肪由来幹細胞を、各標識抗体(BD Bioscience)と 30 分間反応させ、1%パラホルムアルデヒド固定後にフローサイトメーターで解析した。装置は FACS Vantage(BD)を用いた。

(5) 凍結保存

脂肪由来幹細胞はセルバンカー(日本全薬工業)に懸濁し-80℃で凍結保存した。

2) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立

(1) 培養方法の開発

患者の同意の下、乳がん切除手術時において、正常皮下脂肪組織を採取した。このヒト脂肪組織をはさみで細片化、コラゲナーゼ消化により、細胞を遊離させた。この細胞を 10% 仔牛血清を含む MEM 培地(通常培地)中で培養、接着細胞をヒト脂肪由来幹細胞として用いた。継代数 2 回目の細胞を以下の細胞接着、増殖、分化などの実験に供した。用いた基材は、ガラスおよび表面の水漏れ性(水に対する接触角)の異なる種々なプラスチック、市販の細胞培養シャーレ、およびその表面にコラーゲン(type I)、フィブロネクチン、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)をコーティングした培養シャーレなどである。これらの異なる培養基材上にヒト脂肪由来幹細胞を播種、6 時間後の接着細胞数、および 1, 3, 7 日後の増殖挙動を調べた。次に、脂肪由来幹細胞を骨分化および脂肪分化培地中で培養し、それぞれの細胞への分化を検討した。骨分化は、分化特異マーカーであるアルカリホスホターゼ活性(ALP)とカルシウム沈着から、脂肪分化は分化マーカーである Glyceral-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)活性と細胞内での脂肪滴蓄積の程度から評価した。また、基材表面の電荷的および親水-疎水性質を変化させるために、アルカンチオールからなる自己凝集型単分子膜(self assembled monolayer, SAM)技術を利用した。チオール基を片末端に、も

う片末端にカルボキシル基（負電荷）、アミノ基（正電荷）、水酸基（非電荷親水性）、あるいはメチル基（疎水性）をもつアルカンチオールを用いた。まず、ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム表面に金薄膜を蒸着した。これらの金蒸着 PET フィルムを異なるアルカンチオールを含むエタノール中に所定時間浸漬することで、PET 表面に種々の化学官能基を導入した。また、2 種類のアルカンチオールを異なる濃度比で反応させることで、2 種類の化学官能基が異なる比率で混合した基材表面を作ることを行った（混合 SAM 技術）。SAM 技術により基材表面に導入したカルボキシル基を利用して、細胞培着ペプチド（RGDS）を固定化した。カルボキシル基を水溶性カルボジイミドで活性化した後、異なる濃度の RGDS を添加、カルボキシル基と RGDS を化学結合した。RGDS の表面導入率は、放射標識した RGDS を化学結合させた後、その放射活性を測定することによって求めた。これらの表面化学組成の異なる基材上でヒト由来幹細胞を培養し、それらの性質が細胞の接着、増殖、分化におよぼす効果について検討した。なお、基材表面のキャラクタリゼーションは表面接触角および Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) による分析を行った。

3) 脂肪細胞への分化誘導法の開発及び脂肪

(1) 脂肪幹細胞の分化実験

美容形成外科目的に皮下脂肪吸引されたヒト脂肪組織から、脂肪由来幹細胞(間葉系幹細胞)の分離・樹立は、株式会社バイオマスター

によって確立された。この脂肪由来幹細胞(脂肪幹細胞)は、各々の分化誘導を行うと肝細胞や神経細胞などの細胞に分化させることができる多分化能を有し、自発的に脂肪細胞に分化しない細胞である。

(2) 褐色脂肪細胞分化条件の検討

褐色脂肪細胞の分化条件を以下のように検討した。

条件①: 脂肪幹細胞に、DMEM 培地に 1 mM デキサメサゾン (Dex)、0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)、10 mg/ml インスリンを加えた白色脂肪分化誘導培地で 2 日間培養し、30 mM 9-cis retinoic acid をさらに加えた培地で 2 日間培養する。その後 5 mg/ml インスリンのみ加えた分化促進培地で 4-7 日間培養する。

条件②: 脂肪幹細胞に、DMEM 培地に 1 mM デキサメサゾン (Dex)、0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)、30 mM 9-cis retinoic acid、10 mg/ml インスリンを加えた白色脂肪分化誘導培地で 2 日間培養し、その後 5 mg/ml インスリンのみ加えた分化促進培地で 4-7 日間培養する。

いずれの条件においても最終的に、RT-PCR 法で褐色脂肪細胞のマーカーである UCP1 の発現を確認することによって、褐色脂肪細胞への分化効率を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究実施において、対象患者個人個人のプライバシーをはじめと人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）を徹底する。

採取された脂肪組織を本研究に用いることは、湘南美容外科クリニック、株式会社バイオマスター並びに国立成育医療センターの倫理審査委員会にて承認が得られている（国立成育医療センター倫理審査委員会：平成18年7月31日承認、株式会社バイオマスター倫理審査委員会：平成18年5月9日承認）。湘南美容外科クリニックにおいて主治医からインフォームドコンセントを受け同意を得た後に提供された脂肪組織を用いる。提供して頂く組織は、美容形成目的に皮下脂肪吸引を行った方から提供されるものであり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。脂肪組織は湘南美容外科クリニックにて匿名化された後に株式会社バイオマスターへ運搬され、脂肪由来幹細胞（間葉系幹細胞）分離の処理を行う。株式会社バイオマスターと国立成育医療センターにおいては、連結不可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れる。本研究は、平成10年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」に従い研究を遂行する。

レンチウイルスの使用にあたっては、遺伝子組み換え実験の規制に関する関連法を遵守する。

C. 研究成果

1) 患者皮下脂肪より脂肪組織の吸引手術・吸引された脂肪組織の保存・脂肪由来幹細胞（間葉系幹細胞）の分離・保存・バンキング

ヒト吸引脂肪は脂肪部分と廃液部分に分け

ることができる（図1）。これまでは脂肪部分からのみ接着細胞が分離されていたが、廃液部分からも細胞が分離された。脂肪部分から分離される細胞（PLA細胞）と廃液部分から分離される細胞（LAF細胞）をM199(10%FBS)で培養すると、共に高い増殖能を示した。

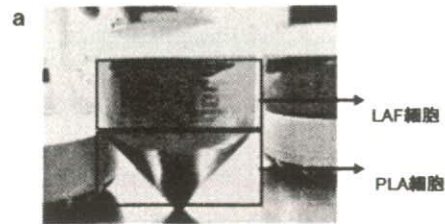


図1：ヒト吸引脂肪

PLA細胞とLAF細胞は形態的に非常に似ており、また共に強い増殖能と多分化能を持つことが分かった。吸引脂肪から分離される細胞には血液由来の細胞や血管由来の細胞が混在しているが、その中で脂肪由来幹細胞はCD34を発現している。さらにCD34陽性細胞はCD45陽性と陰性に2分され、CD34+/CD45-細胞のみが接着増殖することが分かった。このCD34+/CD45-細胞を脂肪由来幹細胞と仮定し、脂肪部分と廃液部分から分離される細胞数を比較した（図2）。それぞれから分離される有核細胞数はPLAがLAFよりも2~8倍多いが、含まれる脂肪由来幹細胞の比率は有意差が無いことが明らかになった。また接

着培養 7 日後の脂肪由来幹細胞数の割合は、両者が同等または個人によっては LAF の方が上回る結果となった。これは廃液中に多く含まれる血液由来細胞が培養中に除去されるためと考えられる。

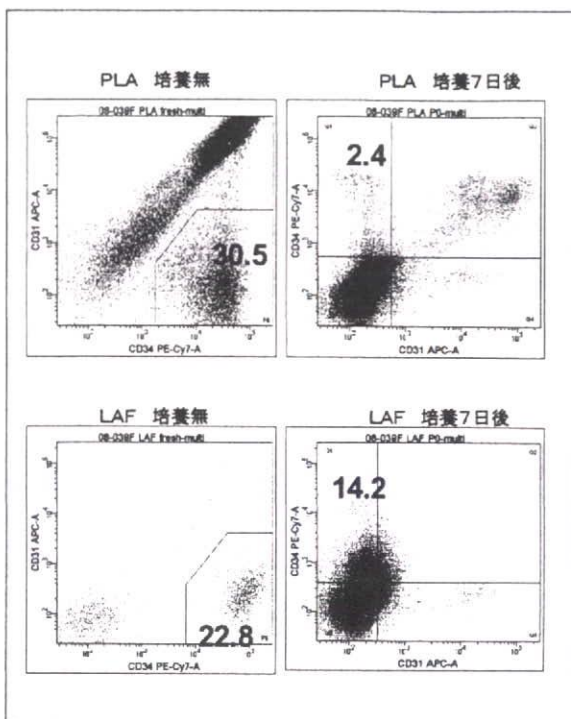


図 2 : PLA と LAF に含まれる脂肪由来幹細胞の比率

ヒト組織由来の細胞は、増殖や分化などに個人差があることが想定される。これまでの報告で、一般的な細胞の特徴に対して詳細に解析された例は無いが、薬剤耐性などについてはいくつかの報告がある。本研究で解析した細胞においても、分離直後の細胞増殖や分化誘導効率は、必ずしも一定ではなかった。検体間の違いを解析し、標準的な細胞を選別

するためには複数の細胞を確保することが必要であるためバンキングを行なった。16 検体の吸引脂肪組織から 17 種類の細胞を保存した (表)。

Sample ID	PLA/LAF	passage	本数
070927	PLA	0	12
	LAF	0	2
071017	LAF	0	4
071112	PLA	0	14
071115	PLA	0	20
071119	PLA	0	20
071120	PLA	0	20
071130	PLA	0	20
080221	PLA	0	3
080509	PLA	0	10
080527	PLA	0	1
080529	PLA	0	4
080704	PLA	0	2
080801	PLA	0	1
080806	PLA	0	1
081010	PLA	0	3
081021	PLA	0	4

表 凍結保存細胞一覧

2) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立 (骨・軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞、骨格筋細胞、内胚葉系細胞など) および細胞の分子生物学的特性の解析

(1) 培養方法の開発

¹²⁵I 標識したタンパク質を利用して、培養シャーレ上へのタンパク質のコート後の吸着量を調べたところ、その吸着量から算出して、それぞれのタンパク質が基材上を十分に均一にコートできていることを確認した。作製された PET フィルム表面の接触角と ESCA 測定結果から、アルカンチオール SAM 技術により、表面が予想通り、負電荷、正電荷、

親水性、疎水性へと変化していることがわかった。また、仕込みアルカンチオール量と表面導入アルカンチオール量とはよい相関が見られ、SAM 技術により基材表面の改質が可能であることがわかった。

表面の接触角が 60-80° の基材上でのヒト脂肪由来幹細胞の接着と増殖が、それ以外の接触角をもつ基材に比べて、高くなっていた。また、コラーゲン、フィブロネクチン 1bFGF 固定化により細胞の初期接着数と増殖数は増加した。骨分化について調べた結果、細胞の増殖が高まるとともに、ALP 活性とカルシウム沈着量は増加した。しかしながら、細胞の 1 つ当りの分化マーカーは、培養基材の種類によらず、ほぼ一定であった。これに対して、脂肪分化は、基材の種類に依存しなかった。アルカンチオール SAM 技術により作製した電荷および親水疎水性の異なる表面をもつ基材上で、ヒト脂肪由来幹細胞を培養したところ、メチル基や水酸基に比較して、カルボキシル基およびアミノ基をもつ表面で細胞の増殖性が高まった。脂肪分化については、水酸基とカルボキシル基、および水酸基とメチル基との混合によって分化が促進されることがわかった。次に、表面に固定化された COOH 基を介して細胞接着活性をもつ RGDS を表面に化学固定した。RGDS 固定化により、細胞の初期接着と増殖は高まった。アルカンチオールの置換反応を利用して、COOH 基濃度のグラジエントを利用して PET 表面に固定化 RGDS の濃度グラジエントを形成した。その結果、表面固定化 RGDS 濃度に対応した細胞の増殖が認められた。このように、基材表面の性質がヒト

脂肪由来幹細胞の接着、増殖、分化挙動に影響を与えることがわかった。

3) 脂肪細胞への分化誘導法の開発及び脂肪由来幹細胞及び幹細胞から分化する細胞における培養系を用いた薬物毒性評価系の確立・薬物の評価

(1) 褐色細胞分化の検討

2つの条件で褐色脂肪細胞に分化させた。条件①は、白色脂肪細胞分化誘導培地で2日間培養後に、9-cis retinoic acidを含さらに加えた培地で2日間培養する他の研究グループで分化を成功させている方法である。しかし、条件①では白色脂肪細胞分化誘導培地のみで培養する期間があるために、白色脂肪細胞への分化が進んでしまうことが考えられた。そこで条件②では、分化誘導開始から培地に9-cis retinoic acidを加えて分化誘導させた。分化後各々の細胞におけるUCP-1遺伝子の発現を確認した結果、条件②で分化させた細胞で、コントロール(未分化細胞)、白色脂肪細胞、条件①で分化させた細胞より明らかな遺伝子発現の上昇が確認できた(図3)。また、Oil redによる脂肪滴を有する細胞数を検討した結果、9-cis retinoic acid添加によって白色脂肪細胞への分化が抑えられた。これらの結果から、現段階では条件②が褐色脂肪細胞へ最も効率よく分化していることが示唆された。

(2) 分化誘導前後において発現変動する分子群

脂肪細胞分化前後(誘導14日目)における細胞から全mRNAを回収し、RT-PCR法で種々の遺伝子群の発現を検討した。

Galectin-12、Leptin、adiponectinの白色脂肪細胞分化マーカーは、未分化および褐色脂肪細胞へ分化させた細胞ではほとんど発現していないが、白色脂肪分化後では非常に高い発現を確認できた。PPAR γ とLPLは、白色脂肪細胞だけでなく褐色脂肪細胞でも発現を確認した。これらの遺伝子発現解析と先述したOil red染色の結果より白色脂肪細胞への分化が抑制されていることが示唆された。近年、BMP7による褐色脂肪細胞の分化誘導においてミトコンドリア数が増えているという報告がある。白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞様の細胞を生産することで、ミトコンドリア代謝機構を調整してメタボリックシンドロームの治療法あるいは糖尿病の症状の軽減などへの応用できることが期待される。

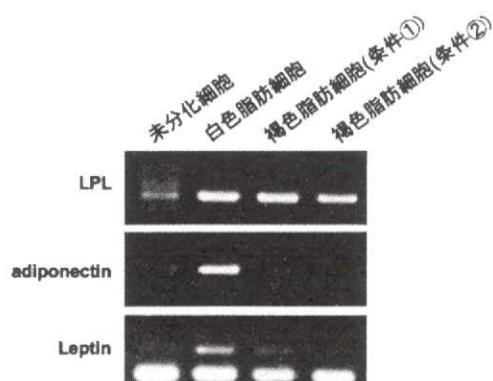


図3 分化した細胞における分子マーカーの発現

D. 考察

吸引脂肪から分離した接着細胞中には、多分化能を有する幹細胞が含まれてい

る。それらの細胞は繊維芽細胞様の形態で強い増殖能があり、比較的長期間継代することが可能である。PLAは脂肪組織の結合組織間に存在している細胞で酵素処理により分離される。一方のLAFは吸引脂肪においては液体中に遊離している細胞である。両者は細胞群としては含まれる細胞の由来に違いが認められるが、幹細胞としての明確な違いは認められない。共に間葉系細胞への分化能を示し、表面マーカーの変化も同等である。

組織から分離したばかりの細胞は、幹細胞以外にも血液由来細胞や血管由来細胞を含んでいる。今回の解析から、分離直後の細胞数はPLAの方がLAFよりも2倍から8倍多いが、含まれる脂肪由来幹細胞の割合はおおよそ同等であることがわかった。

上記の細胞数や脂肪由来幹細胞の割合、増殖培養時の成長曲線は個人によって大きな差が認められた。今後、薬剤評価に用いる細胞を選別する場合、そのような個人差の標準化が課題と思われた。

アルカンチオールSAM技術により簡単に基材表面の化学修飾することができた。さらに、2種類のアルカンチオールの仕込み量を変えて反応することで、基材表面の化学組成を変化させることも可能であった。表面分析により、化学組成が変化できることも確認でき、アルカンチオールSAM技術が材料設計方法として優れていることがわかった。基材表面の物理化学的性質が、細胞の接着と増殖に影響を与えることはこれまでも報告されている。しかしながら、成体幹細胞を用いて研究された例はほとんどない。今回の結果

から、基材表面の物理化学的性質の細胞の接着と増殖に与える影響に関して、幹細胞も通常の正常細胞と同様の挙動をとることがわかった。細胞の挙動は、細胞の栄養液と細胞の基材との両方から影響をうけることが予想される。今回の結果でも、骨分化、脂肪分化挙動が基材の性質により影響されることが示された。通常、細胞の増殖と分化は、細胞の表面レセプターにリガントが結合、その刺激が細胞内に伝わり、細胞内シグナルが動くことで開始されるといわれている。そこで、まず、その初期ステップであるリガントタンパク質の基材表面への吸着挙動について調べた。フィブロネクチン、ビトロネクチンなどの吸着を評価したところ、予想に反して、基材による吸着量の違いは認められなかった。吸着量が同じであっても、吸着したリガンドタンパク分子の変性度合いが違えば、細胞表面レセプターとの相互作用と、それに引き続く細胞内シグナル伝導パターンの違いがもたらされるであろう。その結果として、分化挙動の違いが現われたと考えられる。

ヒト脂肪由来幹細胞を用いて、分化の過程における遺伝子の発現を解析し多くの遺伝子の量的変化を観察することが出来た。また、4種類の薬物の脂肪蓄積に対する影響を見ることにより、4種類全ての薬剤が濃度依存的に脂肪蓄積を阻害することが明らかになった。今後、それらの薬剤の遺伝子発現に対する影響を調べることにより、その薬剤の脂肪細胞分化に対する作用を評価する必要がある。今回、われわれはヒト細胞を用いることにより、ヒト特異的かつ感受性の高い試験

を行なうことが出来た。この方法をさらに進めて行くことにより、種差の問題を克服し、動物実験を補完する薬物毒性試験の新たな代替法となることが期待される。

E. 結論

脂肪由来幹細胞はその増殖能と多分化能から、薬剤評価に用いることができる有効な細胞であることが明らかとなった。今後、安定した評価系を構築するため、目的に合わせて培養期間や細胞を最適化する必要がある。同時にそれらの条件が個人差によってどの程度影響を受けるかを慎重に検討しなければならない。

アルカンチオール SAM 技術を用いることで表面の物理化学的性質の異なる基材を作製できた。基材表面の性質がヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、および骨分化、脂肪分化に影響を与えることがわかった。今後は、神経細胞への分化についても検討を加えていく。また、表面性質が細胞の増殖と分化に与える影響について、細胞内シグナルレベルでの解析を加え、細胞挙動の違いについて解析を行う予定である。また、分化に影響すると考えられる生物由来リガント、例えば、細胞接着シグナルペプチドなどを用いて、その基材表面への固定化密度などが細胞増殖、分化に与える効果について調べていく。

脂肪幹細胞から褐色脂肪細胞への分化・増殖機構が明らかになったことにより今後この系を用いた薬物のスクリーニングが可能となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsunematsu T, Fu LY, Yamanaka A, Ichiki K, Tanoue A, Sakurai T, van den Pol A. Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in the orexin/hypocretin neurons- implication for water homeostasis. *J Neurosci*. 2008; 28(1): 228-38.
- 2) Egami T, Egami K, Tanoue A. Study of antibody titers after measles vaccination: Fever within seven days of vaccination and efficacy of booster doses. *Arch Dis Child*. 2008; 93(4): 319-20.
- 3) Yamauchi J, Miyamoto Y, Chan JR, Tanoue A. Phosphorylation of the exchange factor Dock7 by the neuregulin receptor ErbB2 regulates Schwann cell migration. *J Cell Biol*. 2008; 181(2): 351-65.
- 4) Sanbe A, Takagi N, Fujiwara Y, Yamauchi J, Endo T, Mizutani R, Takeo S, Tsujimoto G, Tanoue A. Alcohol preference in mice lacking the Avpr1a vasopressin receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 294(5): R1482-90.
- 5) Fujita Y, Hiroyama M, Sanbe A, Yamauchi J, Murase S, Tanoue A. ETOH inhibits embryonic neural stem/precursor cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 370(1): 169-73.
- 6) Yamauchi J, Miyamoto Y, Kusakawa S, Torii T, Mizutani R, Sanbe A, Nakajima H, Kiyokawa N, Tanoue A. Neurofibromatosis 2 tumor suppressor, the gene induced by valproic acid, mediates neurite outgrowth through interaction with paxillin. *Exp Cell Res*. 2008; 314: 2279-88.
- 7) Bexis S, Cleary L, McGrath JC, Tanoue A, Tsujimoto G, Docherty JR. Alpha1D-adrenoceptors mediate nerve-evoked contractions in mouse vas deferens: evidence obtained from knockout technology. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2008; 28: 81-85.
- 8) Aoyagi T, Izumi Y, Hiroyama M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, Miyazaki H, Fujiwara Y, Nakayama Y, Kohda Y, Yamauchi J, Inoue T, Kawahara K, Saito H, Tomita K, Nonoguchi N, Tanoue A. Vasopressin Regulates the Renin-Angiotensin-Aldosterone System via V1a Receptors in the Macula Densa Cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295(1): F100-7.
- 9) Nakamura K, Fujiwara Y, Mizutani R, Sanbe A, Miyauchi N, Hiroyama M, Yamauchi Y, Yamashita T, Nakamura S, Mori T, Tsujimoto G, Tanoue A. Effects of vasopressin V1b receptor deficiency on ACTH release from anterior pituitary cells in response to oxytocin stimulation. *Endocrinology*. 2008; 149: 4883-91.
- 10) Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A.

- Cdk5 phosphorylation of WAVE2 regulates oligodendrocyte precursor cell migration through nonreceptor tyrosine kinase Fyn. *J Neurosci.* 2008; 28: 8326-37.
- 1 1) Kusakawa S, Yamauchi J, Miyamoto Y, Sanbe A, Tanoue A. Estimation of embryotoxic effect of fluoxetine using embryonic stem cell differentiation system. *Life Sci.* 2008;83:871-877.
- 1 2) Imai K, Kusakawa S, Tanoue A, Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima H. In Vitro Embryotoxicity Testing of Mercury Vapour by Differentiation of ES-D3 Cells. *AATEX 2008*; 13(3): 118-122.
- 1 3) Hiroyama M, Fujiwara Y, Nakamura K, Aoyagi T, Mizutani R, Sanbe A, Tasaki R, Tanoue A. Altered lipid metabolism in vasopressin V_{1B} receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 2009; 602: 455-461.
- 1 4) Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Endo T, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Glabe C, Tanoue A. Protective effect of geranylgeranylacetone via enhancement of HSPB8 induction in desmin-related cardiomyopathy. *Circulation.* 2008; in press.
- 1 5) Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Miyauchi N, Mizutani R, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Enhanced Vascular Contractility in Alpha1-Adrenergic Receptor-Deficient Mice. *Life Sci.* 2008; in press.
- 1 6) Tanoue A. New Topics in Vasopressin Receptors and Approach to Novel Drugs: Effects of Vasopressin Receptor on Regulations of Hormone Secretion and Metabolisms of Glucose, Fat, and Protein. *J Pharmacol Sci.* 2009;109(1):50-52.
2. 学会発表
- 1) 国際学会
- 1) Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Endo T, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Glabe C, Tanoue A. Induction of small heat shock protein by geranylgeranylacetone is protective against CryAB R120G cardiomyopathy. International Society for Heart Research 2008 Annual Meeting. June 17-20, Cincinnati, Ohio, (U.S.A.), 2008.
- 2) Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Endo T, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Glabe C, Tanoue A. Enhancement of HSP22 induction by geranylgeranylacetone (GGA) in desmin-related cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2008, November 8-12, New Orleans, Louisiana, (U.S.A.), 2008.
- 3) Yamauchi J, Miyamoto Y, Torii T, Kusakawa S, Sanbe A, Chan J.R., Tanoue A. The critical role of Dock7 GEF in NRG1 receptor ErbB2/ErbB3-induced Schwann cell migration. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. Nov. 15-19,

- Washington D. C., (U. S. A.), 2008.
- 4) Miyamoto Y, Yamauchi J, Torii T, Hisanaga S, Tanoue A. The critical role of Cdk5 phosphorylation of paxillin in oligodendrocyte differentiation. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. Nov. 15-19, Washington D. C., (U. S. A.), 2008.
 - 5) Ozawa F, Shimomura M, Miyagawa Y, Hiroyama M, Kiyokawa N, Umezawa A, Tanoue A, Nakatsura T, Tanaka S. A new approach for drug discovery and differentiation study using cutting-edge 3D cell culture system. The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Nov. 24-27, Fukuoka Event Convention Center, Nov. 24-27, Fukuoka, Japan. 2008.
 - 6) Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Tanoue A. Protective effects of HSP22 on desmin related cardiomyopathy. The 25th Annual Meeting of International Society for Heart Research Japanese Section, Dec. 5-6. Yokohama City Port Opening Memorial Hall, Yokohama, Japan, 2008.
- 2) 国内学会
- 1) 田上昭人 (特別講演) V1aバソプレッシン受容体を介するAVPによる循環血液量及び耐糖能の調節機構 関東腎研究会、1月19日、2008、東京
 - 2) 青柳利紀、田上昭人. Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. 第80回日本薬理学会年会、3月14日-16日、2007、名古屋
 - 3) 田上昭人 (シンポジスト) 内分泌・代謝調節機構におけるバソプレッシン受容体の関与 第81回日本薬理学会、3月17日-19日、2008、横浜
 - 4) 常松友美、山中章弘、市来加奈子、田上昭人、桜井武. バソプレッシンによるオレキシン神経の活性化は、自発行動量調節に重要な役割を担っている 第81回日本薬理学会、3月17日-19日、2008、横浜
 - 5) 奈佐吉久、及川令、岡本かおり、竹内章子、竹尾聰、田上昭人、辻本豪三. $\alpha 1D$ 受容体は恒常的活性型受容体として腸間膜動脈血管床に存在している 第81回日本薬理学会、3月17日-19日、2008、横浜
 - 6) 水谷玲子、三部篤、藤原葉子、山内淳司、田上昭人. Aryl Hydrocarbon Receptorを介したタバコ主流煙抽出物の神経堤細胞遊走抑制作用 第81回日本薬理学会、3月17日-19日、2008、横浜
 - 7) 田上昭人 (シンポジスト) V1aバソプレッシン受容体を介するレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の調節機構 第85回日本生理学会大会、3月25日-27日、2008、東京
 - 8) 三部篤、水谷玲子、藤原葉子、山内淳司、田上昭人. タバコ主流煙抽出物のアリルハイドロカーボン (AhR) を介した神経堤細胞遊走抑制作用 第118回日本薬理学会関東部会、6月7日-8日、2008、東京
 - 9) Yamauchi J, Miyamoto Y, Shooter E. M.,

- Tanoue A. The novel exchange factor Dock6: the downstream JNK-paxillin cascade (ワークショップ「神経ネットワークを司る新規交換因子」企画/座長 山内淳司) 第31回日本神経科学学会大会、7月9日～11日、2008、東京
- 10) Miyamoto Y, Torii T, Yamauchi J, Tanoue A. The novel exchange factor Dock6 activates Rac1 and Cdc42 to promote neurite outgrowth (ワークショップ「神経ネットワークを司る新規交換因子」企画/座長 山内淳司) 第31回日本神経科学大会、7月9日～11日、2008、東京
- 11) 今井弘一、田上昭人、草川森士. 細胞分化障害の回復度から評価する *in vitro* 発生毒性試験法の開発について 平成20年度秋期(第52回)日本歯科理工学会学術講演会、9月20日～21日、2008、大阪
- 12) 中村和昭、田上昭人. 脳下垂体前葉におけるオキシトシン(OT)刺激による副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)分泌調整機構 第42回日本小児内分泌学会学術集会、10月2日～4日、2008、米子
- 13) 奥水崇鏡, 奈佐吉久, 田上昭人, 及川玲, 土屋裕義, 竹尾聰, 辻本豪三. V1bバゾプレッシン受容体ノックアウトによる血圧上昇機構の解明 第18回日本循環薬理学会 11月21日, 2008, 千葉
- 14) 宮本幸、鳥居知宏、中村和昭、水谷玲子、草川森士、三部篤、山内淳司、田上昭人. パルプロ酸により誘導される神経線維腫症II型原因蛋白Merlinによる神経分化過程の解析 第35回日本小児臨床薬理学会学術集会、12月5日～6日、2008、東京
- 15) 一丁田(江尻)洋子、鶴田仁志、中村和昭、水谷玲子、田上昭人. マイクロ空間を有する細胞培養チップの開発 第35回日本小児臨床薬理学会学術集会、12月5日～6日、2008、東京(新宿NSビル)
- 16) 山内淳司. (平成20年度日本生化学会奨励賞・授賞講演; 座長 上代淑人、喜多村直実) 末梢神経ミエリン形成を司るシグナル伝達経路 第31回日本分子生物学会年会・第81期日本生化学会大会 合同学会、12月11日、2008、神戸
- 17) 宮本幸、鳥居知宏、山内淳司、田上昭人. オリゴデンドロサイトの分化におけるCdk5の新しい役割 第31回日本分子生物学会年会・第81期日本生化学会大会 合同学会、12月9日～12日、2008、神戸
- 18) 鳥居知宏、宮本幸、三部篤、山内淳司、田上昭人. 前駆脂肪細胞におけるCytohesin-2とArf6/Arf1経路による細胞遊走制御 第31回日本分子生物学会年会・第81期日本生化学会大会 合同学会、12月9日～12日、2008、神戸
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

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

生殖医療研究部生殖技術研究室

研究者 阿久津 英憲

研究期間 平成 18 年 4 月～平成 21 年 3 月

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、斎藤 滋、遠藤 俊郎、林 篤志
- (2) 東亜薬品(株) 平本 文隆
- (3) 日東メディック(株) 野村 出
- (4) 日本ミリポア(株) 大久保 昌孝
- (5) 日本バイオコン(株) 中舎 孝史
- (6) ネオシルク(株) 富田 正浩

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、その使用は保存器（-80 度）がある場所に制限され、約 3 ヶ月の短い使用期限を過ぎると破棄されるという問題を伴う。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）。本研究ではまず、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。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。

まず、乾燥羊膜の創傷被覆剤としての適材性を示し、上皮化促進、癒痕形成抑制に関わる因子を明かとした。これは現在有効な治療法のないケロイド性癒痕の予防に繋がると期待される。また広範な創傷にも対応できる為、急速な高齢化に伴い増加している褥瘡や糖尿病による慢性瘡傷にも有効に利用されうる。現在創傷被覆剤の市場は少なくとも 100 億円以上ありニーズは極めて高い。眼科では角結膜上皮の土台として羊膜が用いられてきた。我々は、更に乾燥羊膜に薬剤を浸透させ、ドラッグデリバリー基材としての利用を確立する。また、日本では年間 2 万件の硬膜移植が行われているが完璧な人工硬膜材がない。乾燥羊膜の硬膜補填材としての可能性を検討する。羊膜の組織親和性、癒着予防効果を利用しつつ高分子マトリクスにて強度、収縮性を補填する。と同時に癒着予防の責任因子を明らかとする。更に、細胞外基質成分にも着目し、本研究では、再生医療へ対応した幹細胞培養システムの構築に向け組替えヒト蛋白質を新規に作成し、その幹細胞特に、霊長類 ES 細胞、ヒト iPS 細胞の長期にわたる特性保持について解析を行う。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

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した。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した。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、患者検体採集時に患者の個人識別情報を検体より取り除いて符号化・番号化する（連結可能匿名化）。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」が厳重に管理した。

倫理委員会の承諾

各研究計画に対する富山大学医倫理委員会の承認を得るにあたり、『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する倫理指針』および『生物由来原料基準（人由来製品原料総則）』に従うよう指導を受け、次の1) 2) についても整備した。

GMP 準拠の Cell Processing Center (CPC) と手順書を整備

生物由来原料基準（人由来製品原料総則）にある下記の a) ~h) に関する内容を記載・保存した

- a) 当該細胞又は組織を採取した施設
- b) 当該細胞又は組織を採取した年月日
- c) ドナースクリーニングのための問診、検診、検査等による診断の結果及び状況
- d) 当該細胞又は組織を採取する作業経過
- e) 倫理委員会等の審議結果
- f) 同意説明文書及び同意文書
- g) ドナーに関する識別番号
- h) a) ~h) までに掲げるもののほか、人細胞組織製品の品質及び安全性の確保に関し必要な事項

具体的には、種々の適応で予定帝王切開の分娩となった症例から無菌的に羊膜組織を採取し、組織のハンドリングは、再生医学研究室内に設置されている GMP 準拠の CPC にて行った。乾燥過程のみ CPC より出て操作されるため、乾燥後は 25K グレイの γ 線による滅菌を追加した。

研究対象者に対する危険性を排除するため、ドナーの選択基準を下記①~④を全て満たしたものとした。

HBs (B 型肝炎) 抗原、HCV (C 型肝炎) 抗体、HIV (エイズ) 抗体、HTLV-I 抗体、梅毒、Parvovirus B19 DNA 定量検査、が陰性である場合を適性とした。

その他の感染症が伝搬する可能性がある場合は使用しなかった。

研究対象者に対する不利益を既存の治療法と比較した文章でインフォームドコンセントを得た。

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 α 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ゲル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シ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%CO₂ 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。

5) ヒト乾燥羊膜による創傷治癒効果

作成した乾燥羊膜をマウスの創傷部位へ移植を行った。マウスをペントバルビタールで麻酔後、皮下に達する直径 5mm の傷をデルマパンチで作成した。あらかじめシリコンカルチャーに乾燥羊膜を接着剤で添付したものを接着剤と絹糸による縫合で創傷部位に固定し、4 日目及び 7 日目の組織を組織学的に観察する。採取した組織をパラフィン包埋後、薄切切片をアザン染色し、光学顕微鏡による観察を行う。更に、画像解析システム (MataMorph) により上皮長を測定し、定量・生物検定を行った。

6) 新規組替えヒトヒト I 型コラーゲン a1 鎖の作成法開発

組替えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の産生 (株) ネオシルクでは組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を中部絹糸腺で合成し、その組換え a1 鎖を含む絹糸を吐くトランスジェニックカイコ COL1A1 を作成システムを開発してきた。バキュロウィルス由来転写

活性因子の COL1A1 カイコへの導入、およびトランスジェニックカイコのコモ接合体化によって、組換え a1 鎖合成量を増加させ、得られた繭から、効率性の高い組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を抽出・精製法を検討し、精製した組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を市販の天然コラーゲンおよびゼラチンと比較を行う。

7) 組換えヒトヒト I 型コラーゲン a1 鎖の iPS 細胞特性保持に関する解析

上記工程により精製・凍結乾燥した組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の 0.1% 溶液を作成する。通常の iPS 細胞培養工程では、フィーダー細胞を播種する前段階としてブタ由来のゼラチンが使用されているが、その代替として 0.1% 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を用いて iPS 細胞の培養を行う。培養継代を行い、iPS 細胞の特性解析を行う。すなわち、形態学的観察、未分化特異的マーカー解析、多分化能解析、細胞核型解析を行う。

倫理面への配慮

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

＜ヒト HYPER-DRY 乾燥羊膜の作製と形態解析＞

電子顕微鏡での観察により、HYPER-DRY 乾燥羊膜(以下、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。一方、凍結乾燥には小さな穴が観察され、細胞の区別が難しいものとなった。乾燥羊膜は上皮細胞の保存が良好であることが判明した。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。

＜乾燥羊膜特性解析＞

ウエスタン・ブロッティング法により乾燥羊膜では、 α antitrypsin と Oct3/4 の抗原性が保持されていた。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。

＜ヒト乾燥羊膜によるマウス創傷治癒効果＞

創傷作製後 4 日目で創傷面を上皮組織が覆い始め、その長さ・厚さは乾燥羊膜で処置した方が顕著であった。上皮が形成された長さを測定し、生物検定した。創傷作製から 4 日目で羊膜を用いたマウス群は有為にその長さが増加した。表皮上皮の形成促進効果は、4 日目の羊膜作用群で $296.51(\pm 44.71) \mu\text{m}$ 、コントロール群で $150.20(\pm 23.17) \mu\text{m}$ となり有意差があった。

＜乾燥羊膜を使用した創傷治癒過程検討＞

乾燥羊膜を貼付した創傷の開口面は他の創傷面と比較し、著しく小さかった。無処置創に比し、乾燥羊膜処置では、組織学的に線維芽細胞の遊出や膠原線維の形成がみられ、新生上皮成長端から真皮層に向かって膠原線維が放射状に伸展していた。乾燥羊膜は創傷治癒に対し、創傷部位の組織収縮は観察されなかった。膠原線維の形成は網目状で広範にわたるため、瘢痕形成が抑制された。

＜乾燥羊膜の臨床応用＞

・ヒト皮膚潰瘍に対する乾燥羊膜効果

皮膚潰瘍の根治手術(腫瘍全摘術)を行い再建のため、分層植皮術を施行した。瘍面に乾燥羊膜を被覆しフィルムドレッシングを行った。乾燥羊膜使用後、特に問題なく経過し、術後 15 日で上皮化し乾燥羊膜を除去した。同時期に痒みを自覚したが、ステロイド軟膏外用で軽快している。羊膜除去後 14 日では特に問題はなかった。従来の創傷被覆剤に比べ、患者の痛みが少なく、術後の出血・浸出液が少ない印象であった。

・再発性翼状片に対するヒト乾燥羊膜移植の有効性の検討

再発した翼状片及びその下の繊維性増殖組織を切除後、強膜を露出し、マイトマイシン C 塗布を行った。乾燥羊膜を適度な大きさに切除し、羊膜移植術を施行した。術後 6ヶ月間経過観察を行ったが再発はみられていない。再発性翼状片に対する乾燥羊膜の移植は有効であると考えられた。

・角膜穿孔に対し新規ヒト乾燥羊膜治療効果
新規乾燥羊膜と生体接着剤を用い角膜穿孔部にパッチを行い、その上から治療用ソフトコンタクトレンズでカバーした。1) ヒト乾燥羊膜貼付により、角膜潰瘍は治癒した。2) 穿孔部の羊膜は穿孔の治癒とともに脱落した。すなわち、角膜穿孔部への生体接着剤による新規ヒト乾燥羊膜のパッチは角膜潰瘍の治癒効果も得られ、さらに手技が簡便であることから角膜穿孔に対する有用な治療法であると考えられた。

＜組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の霊長類 ES 細胞とヒト iPS 細胞特性保持に関する解析＞

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖は種々の検定より、生理的条件下でゲル化(繊維化)は起こらないことが判明し、幹細胞培養に応用可能であることが判明した。0.1% 溶液を作成しカニクイサル ES 細胞、ヒト iPS 細胞培養へ用い結果、ES/iPS 細胞の形態的特徴を保ったまま 20 継代数以上良好に培養維持可能であり、未分化特異的マーカーである OCT3/4、SOX2、SSEA4、TRA1-60、TRA-1-81 の発現が認められ、免疫不全マウスの皮下及び腎皮膜下へ移植による多分化能解析を行った結果、外胚葉・中胚葉・内胚葉マーカーである TuJ1、

MF-20、AFP が陽性であり多分化能も問題なく保持されていることが確認できた。

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。

Hyper-Dry ヒト乾燥羊膜は高い組織親和性等から人工器官（部分補填型）として非常に有用性が高いことが示された。更に、膜への修飾が可能でドラッグデリバリーシステム（DDS）の基材となりうる可能性を示し、ステロイド剤、コラゲナーゼ抑制因子等の膜への含浸と薬品の徐放を行えることが判明し、DDS としたの基材として開発を行う。

移植結果：創傷作成後4日目で上皮組織により覆われ、その状態は、対象群に比し乾燥羊膜群で上皮反応が顕著であった。上皮形成された長さを測定し生物検定を行った結果、4日目の乾燥羊膜移植部位では有意に増長していた。表皮上皮の促進効果は4日目の羊膜移植群で $296.51 (\pm 44.71) \mu\text{m}$ 、コントロール群で $150.20 (\pm 23.17) \mu\text{m}$ であった ($p < 0.05$)。

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。

本研究課題における新規の乾燥羊膜はマ

ウス創傷治癒モデルにおいて、有意に上皮形成促進作用が認められたことから、創傷を早期に治癒する効果があると考えられた。1) 達成度について

我々が開発してきた新規乾燥羊膜の特性は、従来市販及び報告されている羊膜より非常に生体適応に優れていることが判明した。創傷被覆剤としての基礎実験では、新規乾燥羊膜により上皮再生を促進し、瘢痕形成の抑制を示唆する結果が得られている。臨床実施例においても良好な結果も得られてきたことから、80%以上の達成が得られていると確信している。眼科領域では、臨床において、新規乾燥羊膜の利用が高度先進医療（難治性眼表面疾患への羊膜移植）の一部の治療において同等の効果を示し、新たな開発シーズが得られている。新規乾燥羊膜に DDS 効果を持たせた薬剤開発も眼科領域で進めており、その際には目標の9割以上を期待できる。本研究からの展開として、生体内の膜・粘膜・間質組織（人工器官）へと利用可能な結果が得られてきており、更なる臨床他科への応用が示され、本研究成果より派生した結果が近い将来にも期待できる。2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

学術的には、本乾燥羊膜の使用における創傷治癒や角膜損傷などへの効果は、乾燥羊膜に残存するリガンドと併せて検討することにより、創傷治癒やケロイド形成機序の解明に有効であった。これを基盤に必要な分子を乾燥羊膜に添加することで、種々の反応に対応する特殊な羊膜の開発が期待される。ヒト乾燥羊膜について米国の企業より問い合わせがあり、国際的にも関心のある材料であることが実証されている。さらに本材料が示す種々の効果は、再生医療のみならず、創傷治療など医療全般に対する貢献度が高く、他方、経済的には医薬品業界のマーケットの拡大という点でもその貢献度が大きい。3) 今後の展望について

本研究において乾燥羊膜の意義が実証されたことは、脳硬膜代用品という面からのみ考えても新たな市場開発が期待される。今回開発した乾燥羊膜は脳外科の領域だけでなく、眼科、皮膚科など多くの科での利用が可能であり、患者のQOLの向上はもとより、経済的な価値も十分に期待出来る。

本研究において、細胞の足場接着タンパク質の1つであるヒトI型コラーゲンの合成を試み、純度の高いヒトI型コラーゲンa1鎖を生産するシステムを確立できた。

その良質に精製できたヒトI型コラーゲンa1鎖を用いたiPS細胞培養においては、その特性が長期にわたって保持されていることが確認でき、今後再生医療対応の培

養システムを構成する重要な要素となりうることが判明した。

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

Chen AE, Egli D, Niakan K, Deng J, **Akutsu H**, Yamaki M, Cowan C, Fitz-Gerald C, Zhang K, Melton DA, Eggan K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell*. 4(2):103-6. 2009

Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T, Toda A, **Nikaido T**. Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue Cell*. 40(2); 75-81. 2008.

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, **Nikaido T**, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Tissue Cell*. 26(2); 300-311. 2008.

Toda A, Okabe M, Yoshida T, , **Nikaido T**. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues.. *J Pharmacol Sci*. 105(3); 215-228. 2007.

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 Eng*. 13(3):513-524. 2007.

Honda A, Abe R, Makino T, Norisugi O, Fujita Y, Watanabe H, Nishihira J, Iwakura Y, Yamagishi S, Shimizu H, **Shimizu T**.

Interleukin-1beta and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci*. 49(1):63-72. 2008.

Asano Y, Makino T, Norisugi O, Watanabe H, Abe R, Shimizu H, **Shimizu T**. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 49(1):95-7. 2008.

Makino T, Nagasaki A, Furuichi M, Matsui K, Watanabe H, Sawamura D, Shimizu H, **Shimizu T**. Novel mutation in a fumalate hydratase gene of a Japanese patient with multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis. *J Dermatol Sci*. 48(2):151-3. 2007.

Nemoto I, **Shimizu T**, Fujita Y, Tateishi Y, Tsuji-Abe Y, Shimizu H. Tumour-like muscular sarcoidosis. *Clin Exp Dermatol*. 32(3):298-300. 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
① 乾燥羊膜及び羊膜の乾燥処理方法：PCT/JP2006/316269、2006年8月18日
① 乾燥羊膜からなる眼表面の再建用医療材料：特願 2006-218297、2006年8月10日
② 培養重層上皮シートの作成方法：特願 2007-40378、2007年2月21日
③ 乾燥羊膜からなる医用代用膜：特願 2007-40378、2007年2月23日
④ 乾燥羊膜からなる医用代用膜：PCT/JP2008/052973、2008年2月21日
⑤ 培養上皮シートの改良作成方法：特願 2008-106448、2008年4月16日
⑥ ヒト羊膜由来間葉系細胞及びこれを用いた糖尿病治療薬：特願 2008-213301、2008年8月21日

2. 実用新案登録
なし

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
生殖医療研究部生殖技術研究室
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、林 篤志
(2) 東亜薬品(株) 平本 文隆
(3) 日東メディック(株) 野村 出
(4) 日本ミリポア(株) 大久保 昌孝
(5) 日本バイオコン(株) 中舎 孝史
(6) ネオシルク(株) 富田 正浩

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、その使用は保存器(-80度)がある場所に制限され、約3ヶ月の短い使用期限を過ぎると破棄されるという問題を伴う。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)。本研究ではまず、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。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。

まず、乾燥羊膜の創傷被覆剤としての適材性を示し、上皮化促進、癒痕形成抑制に関わる因子を明かした。これは現在有効な治療法のないケロイド性癒痕の予防に繋がると期待される。また広範な創傷にも対応できる為、急速な高齢化に伴い増加している褥瘡や糖尿病による慢性癒傷にも有効に利用されうる。現在創傷被覆剤の市場は少なくとも100億円以上ありニーズは極めて高い。眼科では角結膜上皮の土台として羊膜が用いられてきた。我々は、更に乾燥羊膜に薬剤を浸透させ、ドラッグデリバリー基材としての利用を確立する。また、日本では年間2万件の硬膜移植が行われているが完璧な人工硬膜材がない。乾燥羊膜の硬膜補填材としての可能性を検討する。羊膜の組織親和性、癒着予防効果を利用しつつ高分子マトリクスにて強度、収縮性を補填する。と同時に癒着予防の責任因子を明らかにする。更に、細胞外基質成分にも着目し、本研究では、再生医療へ対応した幹細胞培養システムの構築に向け組替えヒト蛋白質を新規に作成し、その幹細胞特に、霊長類ES細胞、ヒトiPS細胞の長期にわたる特性保持について解析を行う。

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。