

報道関係各位

2011年5月13日
国立大学法人東京大学
株式会社アルマード～ 東京大学及びアルマード 産学連携の研究成果論文が
アメリカの専門ジャーナル「*Cell & Tissue Research*」に掲載決定 ～**適度な量の卵殻膜が創傷治癒プロセスに必須の III 型コラーゲン遺伝子発現を
促進することを細胞レベルで初めて証明**

国立大学法人東京大学（本部：東京都文京区、総長：濱田純一、以下 東京大学）と、株式会社アルマード（本社：東京都中野区、代表取締役社長：鈴江 由美、以下 アルマード）では、2008年4月より、産学連携による「卵殻膜の細胞・身体ダイナミクス効果に関する研究」を行ってまいりましたが、このたび、本研究成果の論文が、アメリカの細胞及び組織に関する専門ジャーナル「*Cell & Tissue Research*」（出版元：Springer (U.S.A)）に認められ、同誌オンライン版に2011年5月13日（金）（予定）に掲載されることが決定しました（追って誌面版が2011年6月に発刊予定）。当該論文は、約400年以上前より“生活の智慧”として中国や日本などアジアにおいて創傷治癒等に用いられてきた「卵殻膜効果」のメカニズムの一端に関し、先端科学によって初めて明らかにした点が評価されました。

■研究概要

細胞は30%程度の割合で常に様々なエラーを起こしていますが、健康状態が保たれている間は、修復機能が働いて問題をキャンセルしてくれていますが、加齢に伴いこの修復機能が低下します。皮膚の細胞で考えると、紫外線、活性酸素、などによる様々なダメージの蓄積が加齢とともに増加し、傷の治りが遅く、傷痕も残り、悪い例としては癌化といった細胞の異常状態に至ります。

今回、東京大学-アルマード共同研究プロジェクト（※）では、中国や日本では人々の間では効果が認められ、“生活の智慧”として古くから使われていながらも、その実態が明らかにされていなかった卵殻膜（図1、注1参照、卵の薄皮部分）に着目し、先端科学を駆使してメカニズムの解明に取り組みました。その結果、適度な量の卵殻膜には、細胞自らが正常な状態へ修復するように働きかける効果があるということが証明されました。

なお、東京大学内の多くの研究者の協力によって得られた本研究の成果論文は、海外の専門ジャーナル「*Cell & Tissue Research*」オンライン版及び誌面版に掲載される予定です。

（※…国立大学法人東京大学（研究代表：中村仁彦 東京大学大学院情報理工学系研究科教授、研究総括：跡見順子 東京大学名誉教授・東京大学アイソトープ総合センター特任研究員）と株式会社アルマード（取締役会長・長谷部由紀夫、代表取締役社長・鈴江由美）間で締結された、産学共同研究契約課題「卵殻膜の細胞・身体ダイナミクス効果に関する研究」。本件は、東京大学が2004年から推進する産学連携システム「Proprius 21」において、中小企業向けとしては第1号案件として2007年に合意、2008年4月より本格的に開始されたものです。）

■研究内容

【背景】 卵殻膜に傷を治癒する効果があると書かれてある薬学書「本草綱目」（ほんぞうこうもく）が明（現在の中国）から初めて伝来したのは、江戸幕府が開かれた翌年1604年（慶長9年）頃だと伝えられています。“よきもの”は人々の間で永く使われるものであり、現代でも卵殻膜を使った“生活の智慧”は受け継がれ、すり傷・切り傷が日常茶飯事の相撲部屋でも活用されています。優れた天然素材である卵殻膜はまた工業製品にも応用され、化粧品やサプリメントの原料として利用されていますが、その健康効果については明らかにされていませんでした。

【研究成果】 古くからアジアで傷の治療に使われているニワトリの卵殻膜は、バクテリアなどの外敵から卵の中のひなを保護するためのバリアとして機能する他、卵が落下した場合などの物理的なダメージにも耐えられるような強固な線維状の構造であるため（図2）、水に溶けず、科学的検証への道は壁に阻まれていました。しかしながら、近年開発された水溶性加水分解卵殻膜（以下 卵殻膜）がその問題を克服、研究が進められるようになり、医療・化粧品等で広く利用可能な、体に優しい優れた天然素材となることが期待されています。

一方、このように体への効果がマイルドで副作用が少ない素材は、治療薬のように人間の体に劇的な変化をもたらすものではないため効果の検出が難しく、また従来行われている細胞培養法では、細胞が卵殻膜の有無に関わらず、直接細胞培養ディッシュに接着してしまうことから、効果の検証ができないという問題もありました（図3）。そこで本共同研究プロジェクトでは、卵殻膜がどのように傷を治したり（創傷治癒）、体を健康に保ったりするのかを研究するため、東京大学大学院工学系研究科（石原一彦教授・金野智浩准教授）で開発された、新しいナノバイオマテリアルである、細胞膜を真似た人工ポリマー（PMBN、注2）の利用を検討することにしました。この人工ポリマー中の活性エステル基と卵殻膜を反応させると細胞はその上に接着し、一方で卵殻膜がない状態では細胞が全く接着しないため、卵殻膜の効果のみを検出できる評価システム構築が可能となりました（図3）。こうして従来の細胞培養法の問題点を克服するとともに、効果がマイルドな天然素材・卵殻膜の細胞への働きかけを、本評価システムで高感度に検出できると期待しました。

研究ではまず、卵殻膜の量（濃度）を変えて人工ポリマー中の活性エステル基との反応を行い、その表面を原子間力顕微鏡（AFM）で観察しました。その結果、卵殻膜がないコントロールでは目立った構造物がない平らな面ですが、卵殻膜がある状態では、反応に使用した卵殻膜の量によって異なるナノスケールの線維状の構造をとり、その構造の違いに応じて接着する細胞の数や形が変化することが判明しました。

また、創傷治癒プロセスにおいては、コラーゲン線維を含む細胞外マトリクス（注3）の働きが鍵となり、止血・炎症・細胞増殖・再生という4つの過程が連続的に起こることが知られています（図4）。傷の治癒に効果があるとされている卵殻膜が、そのプロセスのどこに関与しているかを明らかにすることができれば、効果の検証につながると言えます。皮膚の損傷治癒のみならず、正常な皮膚組織の構造維持と水分保持に重要な役割を担うこれらの細胞外マトリクスは、真皮にある線維芽細胞（注4）によって遺伝子発現・分泌されます。そこで、卵殻膜が量に応じて人工ポリマー上で作る様々なナノスケール線維構造に線維芽細胞が接着した場合、それが細胞外マトリクス遺伝子をどの程度発現させるかについて、定量的な発現解析を行いました。その方法として、細胞を撒いてから24時間後に、皮膚組織に強度と弾力性を与えて細胞の足場を提供する線維構造形成に関わる遺伝子群と、組織内の水分保持に重要な役割を担う遺伝子群の両方について発現状況を調べました。結果として、前者からはIII型コラーゲン（注5）とMMP2（注6）が、後者からはデコリン（注7）の発現が、少量の卵殻膜断片が作る線維構造上において、コントロールに用いた従来の細胞培養ディッシュ上での発現と比べて2倍以上高いことが判明しました（図5）。これら3つの遺伝子セットは、いずれも創傷治癒プロセスの増殖期初期に発現が高くなることが知られている遺伝子であり、とくにIII型コラーゲンは皮膚の大部分を構成するI型コラーゲンに先行して発現することも報告されている（Betz et al., 1993）必須の遺伝子です。

一方、このときの細胞の状態に着目してみると、卵殻膜が多い状態と比べてまばらに存在していますが、この状態は実は生体皮膚組織中での様子をよく反映していると言えます（図6）。さらに興味深いことには、卵殻膜が多く密な線維構造上に、少数の細胞を撒いてまばらに接着させた場合は、III型コラーゲン、MMP2、デコリンの発現は高くなく、細胞の形も卵殻膜量が多いときと類似の平たい形をとっていました（図7）。このことから、加水分解された卵殻膜断片は、濃度により細胞への接着基盤となる構造を変えること、その環境が細胞の形を変え、細胞外マトリクス遺伝子発現セットを決めていると言えます。健康な皮膚真皮組織における線維芽細胞の状態を反映しているのは、適度な量の卵殻膜断片が作る環境でした。なお、卵殻膜-人工ポリマー上の線維芽細胞が、確かにコラーゲンを細胞の小胞体内で合成、細胞外に線維を分泌していることも、I型コラーゲンに対する間接抗体蛍光法により確認でき、同様に細胞が分泌する構造糖や糖タンパク質に結合した細胞周囲の水分についてもヒツジ赤血球

粒子排除アッセイ法で確かめました。

これらの結果、本研究で利用した卵殻膜-人工ポリマーシステムは、創傷治癒プロセスを解析する新たなモデルシステムとなることが期待できます。特に人工ポリマー中の活性エステル基に反応させる卵殻膜量を変え、細胞が接着する構造を変えるだけで、複雑で時間のかかる創傷治癒プロセスのうち細胞外マトリクスが寄与するステップ（数時間~ 数週間）を、24 時間あまりで解析することができるという利点を有している意義は大きいと言えます。

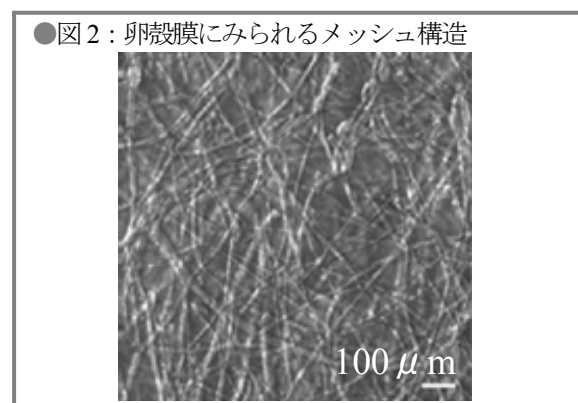
【今後の展望】 昨年、膝関節の固定が細胞外マトリクス配列の乱れやペントシジン（糖とタンパク質の非酵素的反応により産生される物質の 1 種）との結合によるコラーゲン糖化の増加、細胞数の減少などの構造的な変化を伴う関節拘縮を誘導することを報告しましたが（Lee, et al., 2010. 跡見研究室としての成果）、最近卵殻膜を関節痛や筋肉痛療法に応用する治験も報告されています（Ruff, et al., 2009）。今後、卵殻膜-人工ポリマーシステムを皮膚の創傷治癒のみならず、罹患率の高い膝関節痛（OA）の治療方法開発などへの利用や応用が期待されます。また、医学分野だけでなく、このたび開発した系を使用した研究結果は、適度な量の卵殻膜が線維芽細胞に働きかけ、Ⅲ型コラーゲン等の細胞外マトリクス成分の合成を促進する可能性を強く示唆している点が、卵殻膜を用いた化粧品開発等においても有用性があると言えます。さらに今回見出した卵殻膜-人工ポリマーシステムによる、わずかな構造変化を遺伝子発現という定量的な方法で評価できるシステムを用いれば、時間のかかる複雑なステップからなる創傷治癒メカニズムの解明にも、分子レベルで迫ることが可能です。

細胞は接着環境によって自らを変化させ、その変化が環境を変えていくというように両者は「相互応答的」ですが、細胞が自律的に行うその過程を考慮した系を作り出すのはとても困難です。今回の研究成果は、細胞外マトリクスと細胞の相互応答性の関係を分子レベルでサイエンスするための重要な系を提供したと言えます。

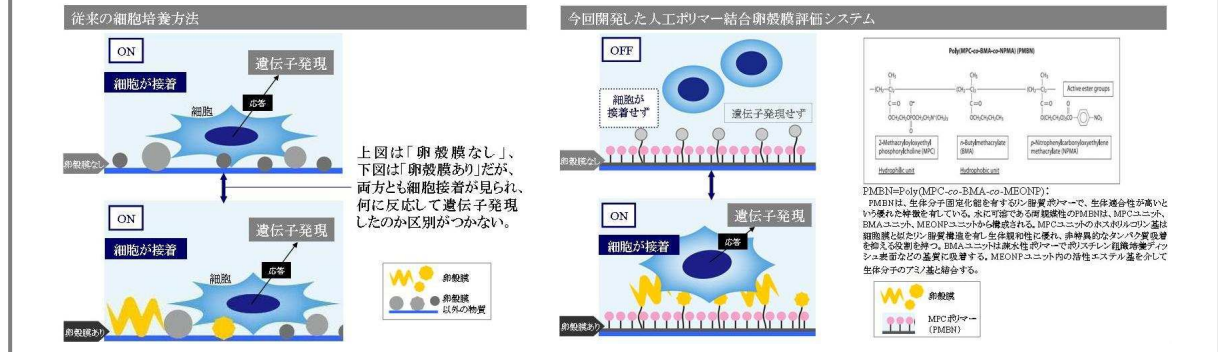
本研究プロジェクトでは現在、トレーサー（アイソトープを利用）実験等により、詳細なメカニズムの解明を目指しています。

卵殻膜は世界中のどこでも入手可能で医療・食品・化粧品の各分野に適用できるバイオマテリアルです。本研究及び今後展開される研究成果により、対処療法ではなく、細胞のメカニズムに働きかけて根本的な構造改善を誘導・修復促進する素材として、この中国・日本などアジアで受け継がれてきた“生活の智慧”が科学的に検証された新たな健康戦略として活用されることが期待されます。

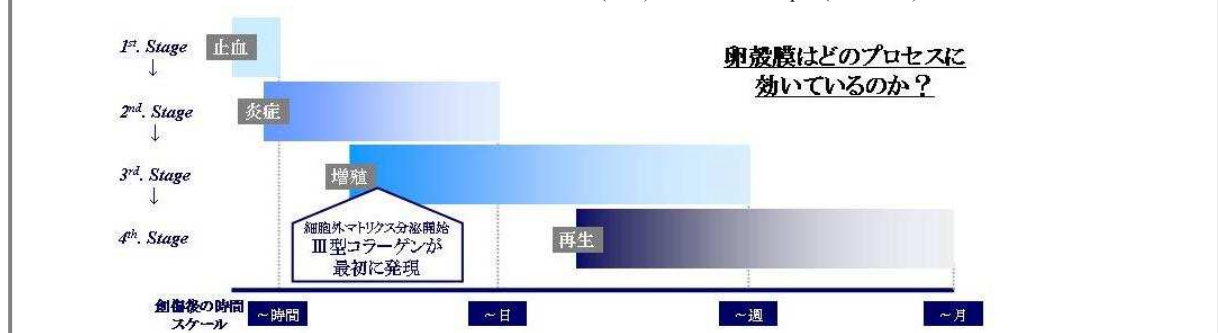
<本文に関する添付図>



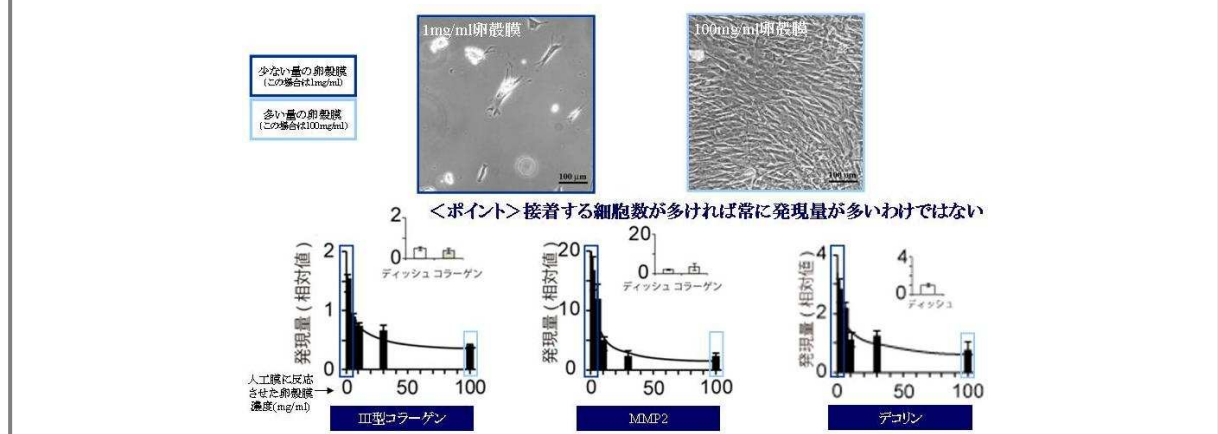
●図3：従来法（左）と異なり、人工ポリマーを利用した本システム（右）を使えば、卵殻膜の細胞への働きかけが特異的に検出可能。



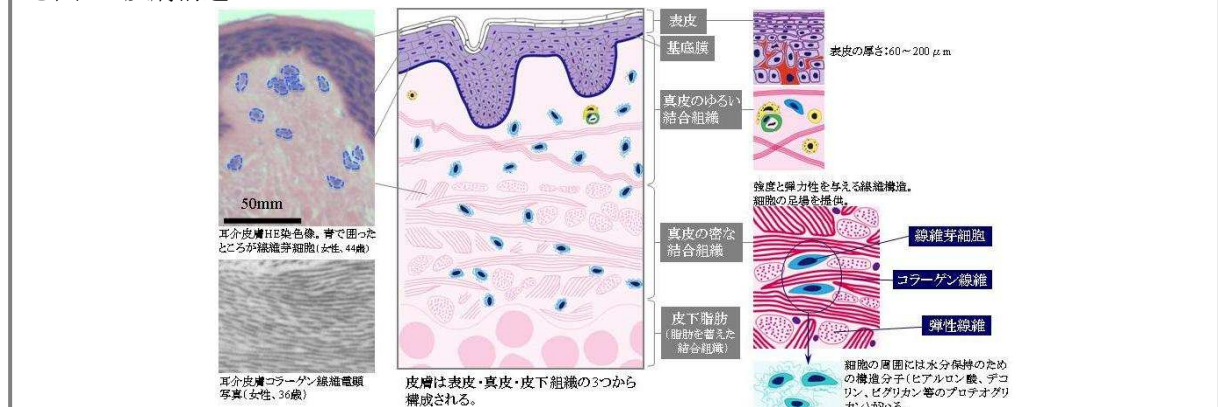
●図4：創傷治癒プロセス（参考文献：Stronck and Reichert (2008) による book chapter (CRC Press)の図を改変）



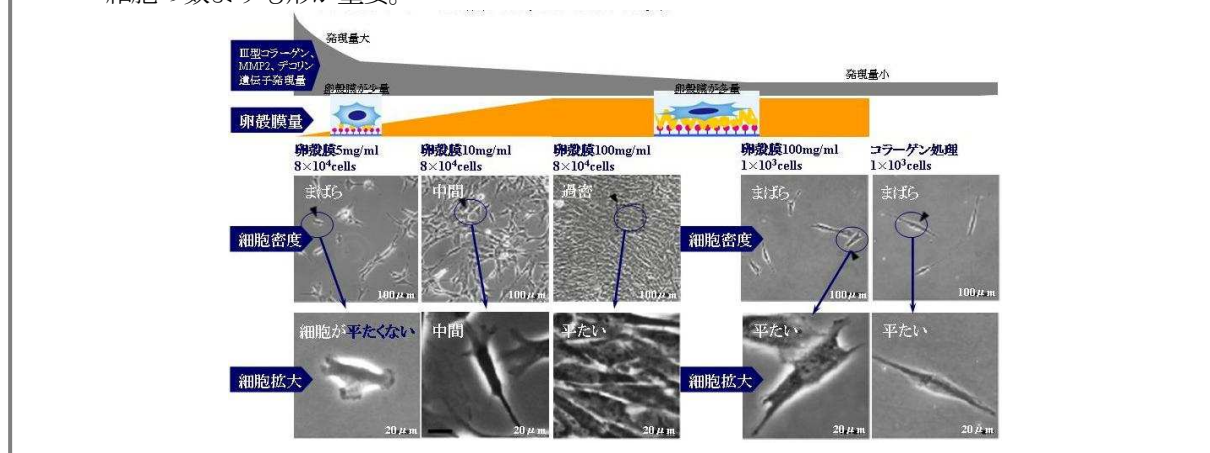
●図5：少ない量の卵殻膜が作る構造上では細胞がまばらに存在し、III型コラーゲン、MMP2、デコリンの遺伝子発現量が高い



●図6：皮膚構造



●図7：適度な量の卵殻膜が作る環境が細胞の形を変え、細胞外マトリクス遺伝子発現セットを決める細胞の数よりも形が重要。



<用語解説>

-注1...卵殻膜

卵殻と卵白の間にある不溶性の二重膜。内膜（厚さ約0.05-0.07 mm）と外膜（厚さ約0.02 mm）の2層から成る。どちらも線維が入り組んだメッシュのような構造だが、内膜の方が密。卵殻膜はニワトリ胎内での卵形成途中、バイオミネラリゼーション（生体内鉱質形成）によって殻が作られ、その後産卵される前に輸卵管で作られる。卵殻膜は線維構造を有しているが、それは構成成分であるI型、V型、X型コラーゲン、グルコサミン、デスマシン、ヒアルロン酸などがリシルオキシダーゼの働きにより互いに結合してできる。卵殻膜は発生中の胚を保護するために抗菌活性を有するとともに、卵殻形成のための足場としての役目を果たしている。

-注2...PMBN=Poly (MPC-co-BMA-co-MEONP)

生体分子固定化能を有するリン脂質ポリマーで、生体適合性が高いという優れた特徴を有している。水に可溶である両親媒性のPMBNは、MPCユニット、BMAユニット、MEONPユニットから構成される。MPCユニットのホスホリルコリン基は細胞膜と似たリン脂質構造を有し生体親和性に優れ、非特異的なタンパク質吸着を抑える役割を持つ。BMAユニットは疎水性ポリマーでポリスチレン組織培養ディッシュ表面などの基質に吸着する。MEONPユニット内の活性エステル基を介して生体分子のアミノ基と結合する。

-注3...細胞外マトリクス：

組織中の細胞外の空間を満たしている生体高分子の複雑な集合体。全ての組織にあり、結合組織には多量に存在する。細胞外マトリクスは組織内の細胞を支え強度を与える構造的な機能を持つだけでなく、細胞-マトリクス間の相互作用を介した重要な細胞機能を有している (Bruckner, 2010)。組織や器官に独特の構造や特徴は細胞外マトリクスにより決定され、細胞がその細胞外マトリクスを産生している。細胞外マトリクスタンパク質は一般的に、コラーゲン、構造糖タンパク質、プロテオグリカン、エラスチンの4つに分類される (Tsang, et al., 2010)。皮膚ではI型、III型コラーゲンを含む異なる種類の様々な線維が細胞外マトリクスの主要な構成成分で、皮膚に強度と弾力性を与えている。細胞外マトリクスと細胞の接着はインテグリン分子による物理的な結合を介して行われ、細胞内シグナルを伝達し、組織再生への重要な要素となっている。

-注4...真皮線維芽細胞

皮膚の真皮にある線維芽細胞。真皮は、皮膚を形成する結合組織で基底膜を隔てて表皮の下層にある。真皮には、膠原線維（コラーゲン線維）や弾性線維（エラスチン）、プロテオグリカンなど皮膚を物理的に支える構造物があるほか、細胞成分として線維芽細胞や肥満細胞などが存在する。線維芽細胞は楕円形の核を内部にもつ紡錘状の形態をしており、コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリクスを分泌する。

-注5...III型コラーゲン

III型コラーゲンは3つのアルファ1 (III) 鎖から成らせん構造を持った線維型タンパク質。胚発生の初期胚の頃から発現し、皮膚や心血管系の発生に重要である。成体では、III型コラーゲンは皮膚（真皮）、血管、肺、内臓器官の細胞外マトリクスの成分で、正常な生理機能を維持するために重要。例えば、III型コラーゲンの遺伝子の異常は、血管や皮膚がもろく、関節がぐらぐらするエーラスダンロス症候群を引き起こす。さらに、III型コラーゲンは皮膚やその他の組織で、治癒回復している場所に顕著に存在している。

-注5...マトリクスメタロプロテアーゼ2

細胞外マトリクスを分解する酵素の1種。マトリクスメタロプロテアーゼ2は線維芽細胞に発現し様々な細胞外マトリクス分子、I、IV、V、VII、X型コラーゲンやゼラチン、フィブロネクチン、テネイシン、フィブリリン、オステオネクチン、エンタクチン、アグリカン、ビトロネクチン、デコリンを分解し (Kerkela and Saarialho-Kere, 2003)、デルマトン硫酸により活性化される (Isnard, et al., 2003)。マトリクスメタロプロテアーゼ2は様々な皮膚の生物学や病態学に役割を果たし、例えば創傷治癒プロセスでは初期 (7日目) には発現している (Jansen, et al., 2007)。

-注6...デコリン

デコリンはプロテオグリカンの1種で、鎖状のコアタンパク質にグリコサミノグリカンと呼ばれる二糖の繰り返し構造をもつ糖鎖が多数結合した、試験管ブラシのような構造をしている。多数のマイナス電荷を持ち、水やイオンを多量に吸着する性質がある。デコリンは結合組織に存在し、組織を組み立てるのに重要な働きをしている。デコリンの量や質に異常があると、張りのない皮膚になってしまったり、傷の治りが遅くなったりする (標準細胞生物学 p59 医学書院)。

-注7...細胞外マトリクス:

組織中の細胞外の空間を満たしている生体高分子の複雑な集合体。全ての組織にあり、結合組織には多量に存在する。細胞外マトリクスは組織内の細胞を支え強度を与える構造的な機能を持つだけでなく、細胞-マトリクス間の相互作用を介した重要な細胞機能を有している (Bruckner, 2010)。組織や器官に独特の構造や特徴は細胞外マトリクスにより決定され、細胞がその細胞外マトリクスを産生している。細胞外マトリクスタンパク質は一般的に、コラーゲン、構造糖タンパク質、プロテオグリカン、エラスチンの4つに分類される (Tsang, et al., 2010)。皮膚ではI型、III型コラーゲンを含む異なる種類の様々な線維が細胞外マトリクスの主要な構成成分で、皮膚に強度と弾力性を与えている。細胞外マトリクスと細胞の接着はインテグリン分子による物理的な結合を介して行われ、細胞内ヘシグナルを伝達し、組織再生への重要な要素となっている。

■論文概要

-発表媒体: 「Cell & Tissue Research」(オンライン版及び誌面版)

オンライン版・DOI: 10.1007/s00441-011-1172-z

<http://dx.doi.org/10.1007/s00441-011-1172-z> で検索

-媒体プロフィール:

- 出版元・Springer (本社: ドイツ、同媒体出版編集部: U.S.A.)
- 媒体領域・分子・細胞生物学および組織に関する研究領域をカバー。遺伝子産物の統合的な挙動およびそれが組織構造形成と機能に与えるインパクトに関する解析データを示して討論する場を提供する。細胞と細胞外マトリクスとの関係について、発生や様々な病態におけるダイナミックな細胞動態に着目したフォーラム的要素の濃い特集号を最近組んだばかり。
- 主要エディトリアル・メンバー…
数々の雑誌のエディターを務め、神経の発生に関連した成長因子研究のエキスパートである K. Unsicker を長とする。過去には R.M. ZINKERNAGEL (1996年・ノーベル医学生理学賞受賞者) も名を連ねた。ECM 分野の責任エディターはコラーゲンの専門家である T. Pihlajaniemi。

-論文タイトル:

(英文) *Hydrolyzed eggshell membrane immobilized on phosphorylcholine polymer supplies extracellular matrix environment for human dermal fibroblasts*

(和訳) ホスホリルコリンポリマー上に固定化した加水分解卵殻膜は、ヒト皮膚線維芽細胞に細胞外マトリクス環境を与える

-著者: 藤田恵理 (§, 1), 金野智浩 (2, 3), 清水美穂 (1), 石原一彦 (2, 3,4), 杉立年弘 (2), 三宅淳 (2,6), 吉村浩太郎 (5), 谷脇香 (7), 桜井隆史 (8), 長谷部由紀夫 (7), 跡見順子 (§,9,*) (注: § 同寄与, *責任著者)

-所属: 東京大学 大学院情報理工学系研究科・知能機械情報学専攻 (1); 大学院工学系研究科・バイオエンジニアリング専攻 (2); ナノバイオ・インテグレーション研究拠点(CNBI) (3); 大学

院工学系研究科・マテリアル工学専攻 (4) ; 大学院医学研究科・形成外科学 (5) ; 大学院総合文化研究科・生命環境科学系 (8) ; アイソトープ総合センター (9)
大阪大学大学院・基礎工学研究科・機能創成専攻 (6)
株式会社アルマード (7) (注: 所属は共同研究参加時点のもの)

■研究プロジェクト概要

【研究責任者】

東京大学アイソトープ総合センター1階共通プロジェクト室
セルツォボディダイナミクスラボ
東京大学名誉教授・東京大学アイソトープ総合センター 特任研究員 跡見順子

【産学連携企業・株式会社アルマード 会社概要】

-商号	株式会社アルマード
-本店	東京都中野区本町 2-48-2
-代表者	代表取締役社長 鈴江 由美
-設立	2000年10月18日
-資本金	60百万円
-事業内容	卵殻膜を主要素材とした化粧品、サプリメント等の企画・開発・販売
-株主	株式会社セシール (フジ・メディア・ホールディングスグループ)

<本資料に関する報道機関からのお問い合わせ先>

●本論文及び本研究プロジェクト全般について

国立大学法人東京大学 セルツォボディダイナミクスラボ
清水美穂 (東京大学大学院情報理工学系研究科 特任研究員)
Tel : 03-5841-3055 / e-mail : mshimizu@ynl.t.u-tokyo.ac.jp

●その他産学連携企業について

株式会社アルマード 広報担当 (株式会社セシール 広報室)
Tel : 03-6743-1114 / e-mail : pr@cecile.co.jp