

## きぼうの宇宙環境において“生活の知恵”「鶏卵殻膜」はなぜ良いか

### (1)細胞の若さを保つ?

東大 ○跡見順子<sup>1</sup>, 清水美穂<sup>1</sup>, 藤田恵理<sup>1</sup>, 跡見友章<sup>2</sup>, 廣瀬昇<sup>2</sup>, 石原一彦<sup>3</sup>, 金野智浩<sup>4</sup>, 桂田悠基<sup>5</sup>, 渡辺敏行<sup>5</sup>, 吉村浩太郎<sup>6</sup>

### Why chicken eggshell membrane is good in space environment of Kibo ?! (1) :

#### Does it keep cells young in space?

*Yoriko Atomi<sup>1</sup>, Miho Shimizu<sup>1</sup>, Eri Fujita<sup>1</sup>, Tomoaki Atomí<sup>2</sup>, Noboru Hirose<sup>2</sup>, Kazuhiko Ishihara<sup>3</sup>, Tomohiro Konno<sup>4</sup>, Yuuki Katsurada<sup>5</sup>, Toshiyuki Watanabe<sup>5</sup>, Kotaro Yoshimura<sup>6</sup>,*

<sup>1</sup>The Univ of Tokyo, Radioisotope Center 113-0332

<sup>2</sup>Teikyo University of Science, Uenohara, Yamanashi-ken

<sup>3</sup>The Univ of Tokyo (Grad School of Engineering)

<sup>4</sup>The Univ of Tokyo (School of Nanobio-engineering),

<sup>5</sup>Tokyo University of Agriculture and Technology

<sup>6</sup>The University of Tokyo, Department of Medicine,

Corresponding to: The University of Tokyo, Radioisotope Center, Cell to Body Dynamics Laboratory, Yayoi Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113-0332

E-mail: [atomi@bio.c.u-tokyo.ac.jp](mailto:atomi@bio.c.u-tokyo.ac.jp)

Abstract: Missing link connecting our life system evolved on the earth and physics-based science with computational simulation, should be discovered to recreate the human sustainability through space life science performed in ISS Kibo Japanese Experimental module. In March 11<sup>th</sup> 2011 Japan has suffered from great disaster of earthquake with Tsunami as well as accident at nuclear power generation plant at Fukushima Prefecture, the influence of which is too great for scientists to neglect this happening. The difficulty to extend preventive medicine for an individual person, especially older people is similar to nuclear accident. Despite that we human society has people with a lot of severe life-related (and also age-related) diseases or severe experience like Chernobyl, modern science and technology has been directed to after treatment in spite of having much experience as historical facts. The human being has to decide to change the direction of science at both levels of an individual and peoples; such that the human being should rightly evaluate ability as natural object, whose biological knowledge to be able to adapt the environment have evolved for forty billion years, also that historical and geological facts into man-made simulation analyses and sensing and measuring our biological human body and mind system. From both knowledge, eggshell membrane is considerable into both aged people and space biological problem. We found that water-soluble alkaline-digested form of eggshell membrane (ASESM) can be used as a material to provide extracellular matrix (ECM) environment for human dermal fibroblast cells (HDF) in vitro. Avian eggshell membrane (ESM) has fibrous-meshwork structure and has long been utilized as a Chinese medicine for recoveries from burns injuries and wound in Asian countries. Therefore ESM is expected to be providing an excellent natural material for biomedical use but those applications were hampered by the insolubility of ESM proteins. In this study a novel 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer (PMBN) biointerface selectively capture the ASESM proteins were used. The surface shows fibrous structure under atomic force microscope (AFM) and adhesion of HDF to ASESM was ASESM-dose dependent. Quantitative mRNA analysis showed expression of type III collagen, MMP2, and decorin mRNAs was high at more than two-fold when HDF was faced to lower dose ASESM-PMBN scaffold. This combination of gene expressions, which was also observed in mouse dermal tissue after 10 days application in our different experiment, is observed in stem-cell like environment in previous studies. From these studies, eggshell membrane is expected to be available for both cell culture study and also human application of astronaut in space and also aged people on the earth.

*Key words*; Space Utilization, knowledge of life, eggshell membrane, dermal fibroblast cell, stem cell biointerface.

## 1. “伝えられてきた生活の知恵”と“過酷な環境へ適応してきた生物の知恵”を、“極限環境である宇宙「きぼう」モジュールへ”

私達“Cell to Body Dynamics Science”グループが取り組む課題は、地球でうまれた知恵(地球生物の知恵と人間の生活の知恵)が宇宙でも適用できるかを検証することにある。重力場で進化し、ヒト・人間にまでつないできた「いのち」のシステムの本質を、国民や世界の人々が考える場としたい。本発表では、生活の知恵のひとつとして鶏類の卵殻膜(卵殻膜)に着目する。ISSでの長期滞在、火星への有人飛行など、今後ますます長期にわたる宇宙飛行士の健康管理が問題になってくる。身体の中かで最大の臓器では皮膚である。年のこのシンポジウムでJAXAの山崎<sup>1)</sup>が、宇宙では長期間入浴できないため、皮膚が脂性になりがちなことを報告している。皮膚の健康を保ちバリアー機能を維持することは、感染症やアレルギー反応防止などの観点から、また逆に皮膚で効果を見いだすことは、摂取すれば、類似の効果を体内の他の組織にも期待できる可能性をも期待できるかもしれない。

卵殻膜は、中国やアジアでは創傷治療に古くから使われてきている生物医学的に優れた天然素材である(Fig. 1)。陸生動物としての鶏を含む鳥類は、ほ乳類と異なり外部からの栄養補給なく卵から子どもを発生させる環境を「卵」として構築してきた。卵殻膜にはコラーゲンなどの細胞外基質タンパク質や糖タンパク質等が含まれているがリジロキシダーゼでクロスリンクされているため、効果成分を単一物質として精製することができず研究が遅れてきた。しかし近年加水分解卵殻膜や微粉碎卵殻膜が開発され、化粧品やサプリメント材料として用いられ、超高齢社会における健康寿命をサポートする天然由来の補完材料として期待が集まっているが、その効果のメカニズムはほとんど分かっていない。卵殻膜の利用は、G-コネクション<sup>2)</sup>に記述されているように、加齢で低下す



Fig. 1 Chicken eggshell membrane is a double thin layers mainly consisted of materials of extracellular matrix.

る様々な身体指標の減退と類似した宇宙における長期滞在で観察される生体现象の軽減に役立つ可能性が考えられる。今回は、可溶性卵殻膜を用いて、皮膚真皮の細胞への効果を検証する系を開発し、その効果の一端

を解明したので紹介する。これは、細胞の基本的な生存にとっての接着と細胞外基質(ECM)の基本的問題を提示しただけでなく、早く老ける宇宙での老化を予防することも期待できそうな結果が得られた。きぼうにおける卵殻膜利用研究への提案の第一歩としたい。

## 2. 日本とアジアの「生活の知恵・卵殻膜」：卵殻膜は、きわめてすぐれた天然素材

生活の知恵としての卵殻膜は、400年前(1956年)の中国・明の薬学書である「本草綱目」に、創傷治療に効果があることが記載されている。8年後の1604年には江戸幕府が開かれて間もない日本に伝来し普及)に、卵殻膜が切り傷の治療に効果ありとの記載されている。日本の相撲部屋では、現在でも創傷治療には使われている。また、我々は実際褥瘡ケアにゆで卵から採取した卵殻膜を使用している事例を、北海道旭川市の末期女性ガン患者に適用した看護師を取材してきた。卵殻膜は有効であり、在宅でもケアを継続し治療することができた。本患者からは「貼っていて気持ちがよい。」という感想が得られ、患者の闘病意欲を維持することに役立った。創傷治療では、止血・炎症・細胞増殖・再生という4つの過程が連続しておこる<sup>3)</sup>が、線維芽細胞を用いた本実験では、この過程の真皮の線維芽細胞の「細胞増殖」時のECMへの効果をあきらかにすることができた。

ニワトリの卵の発生中では細胞外マトリクスと同じ役割を持つ卵殻膜は、卵殻と卵白のあいだにある不溶性の二重膜であり、発生中の胚を保護するために抗菌活性を有する<sup>4,5)</sup>。卵殻膜はニワトリ胎内での卵形成途中、バイオミネラル化(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<sup>6)</sup>。卵殻膜は線維構造を有しているが、それは構成成分<sup>7-9)</sup>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ジロキシダーゼの働きにより互いに結合してできる<sup>10)</sup>。

## 3. 細胞の機械的刺激応答環境と細胞外基質

最近、Disher等により、細胞の機械的刺激への応答メカニズムを考える上できわめて重要な細胞の接着基盤の「やわらかさ」が、細胞の増殖・分化に影響を与えることが報告されている<sup>11)</sup>。今回開発した細胞接着基盤環境は、細胞の運命を決定する細胞外基質の役割を評価する系として宇宙研究への利用が可能である。宇宙での細胞培養の実験の多くは接着基盤についての考慮がされていない。

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<sup>12)</sup>。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<sup>13)</sup>。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、細胞内へシグナルを伝達し、組織再生への重要な要素となっている<sup>14)</sup>。細胞外マトリクスへかかる機械的な力はそのタンパク質の発現を制御しており、靭帯を繰り返しストレッチするとその前十字靭帯の細胞<sup>15)</sup>や骨髄由来間葉系細胞<sup>16)</sup>でのI型、III型コラーゲン合成が高まる。細胞外マトリクスは多数の成長因子やシグナル分子と作用して重要な機能を果たし、細胞内接着、分化、運動、生存などの細胞内事象を調節している。

#### 4. 卵殻膜の効果を調べるモデルの構築

近年、生体内を再現する培養表面の構築や改良により、細胞の接着や増殖、分化、運動、遺伝子発現等の組織特異的な細胞機能をサポートする素材の開発が盛んである<sup>17)</sup>。我々は、MPC-BMA-MEONP から構成される人工細胞膜表面素材としての特殊な MPC ポリマー (PMBN)<sup>18)</sup>を、含塩基性水有機溶剤加水分解卵殻膜 (alkaline water miscible organic solvent hydrolyzed soluble eggshell membrane:ASESM)成分を選択的に捕捉するために利用することにした。われわれの開発した系は卵殻膜と線維芽細胞との結合を分子レベルで解析するためのユニークな特色を有している。コラーゲン塗布したシャーレや細胞培養用シャーレとは異なり、我々の系では細胞は単なる MPC ポリマー上には全く結合しないため、ASESM タンパクの線維芽細胞接着に関する特異的かつ直接的な効果を調べることができる。

#### 5. 真皮と類似した卵殻膜がつくる細胞外環境における若い細胞の遺伝子発現環境

ASESM溶液を線維芽細胞の接着基質として用いて、若い真皮で発現の高い遺伝子の発現を高める細胞外環境 (III型コラーゲン、デコリン、MMP2の誘導)を構築できた<sup>19)</sup>。我々は、様々な特色を有するPMBNを採用することにより、ヒト真皮線維芽細胞に対する卵殻膜の機能を研究するための新しい *in vitro* システムを構築することに成功した。ASESMは、元の卵殻膜とは異なる線維構造をとることが原子間力顕微鏡解析により明らかになった。結論としてASESMをPMBN上に安定に結合させることができ、ヒト皮膚線維芽細胞に細胞外マトリクス環境を提供した。卵殻膜はまた、ニワトリ卵形成過程で卵殻が作られるための足場となる。膝関節の固定は、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が<sup>20)</sup>、最近卵殻膜を関節痛や筋肉痛療法に応用する治験が報告されている<sup>21,22)</sup>。今後、

ASESM-PMBN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)の治療などに応用することを検討すべきだろう。なぜならばPMBN自体が生体適合性の高い材料であり<sup>23)</sup>、に人工関節などへの医療応用がはじまりつつあるからである。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ゆくというように「相互応答的である」のだが、それを考慮した系を作り出すのはなかなか難しいので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になるだろう。

#### 6. 細胞培養実験条件の再考の必要性：身体の中の細胞と細胞環境を考慮することの重要性

線維芽細胞は生物学の分野で一般的に広く使われる培養細胞であるが、ほとんどすべての報告では体内の

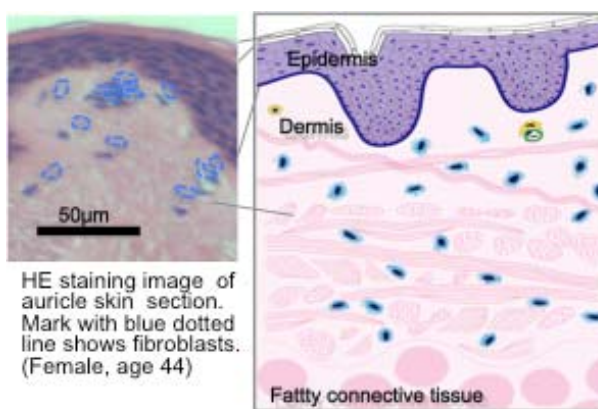


Fig. 2 Skin is constructed of epidermis, connected keratinocytes cell layers each other as a barrier, dermis sparsely distributed cells in extracellular matrices of collagen, proteoglycan and water-binding glycan like hyaluronan, and hypodermis.

状態を全く考慮にいれることなく、細胞をディッシュ面いっぱいの状態 (コンフルエント) にして実験を行っている。しかしながら、組織切片の組織学写真や我々の身体の皮膚や腱・関節の体内画像をみると、線維芽細胞はもっと1つ1つ分散しておりコンフルエント状態ではない (Fig. 2)。細胞外マトリクスの重要性にもかかわらず、組織毎に異なる *in vivo* での細胞どうしの関係、細胞-細胞外マトリクスの関係についての研究はそれほど多くない。そのような関係を可視化するために、一般に組織学的な研究手法が使用されているが、細胞が周囲と積極的に応答していることや、細胞骨格や細胞外基質などを自ら調節していることを明らかにすることはできない。最近のiPSの開発<sup>24)</sup>の場合、着実に徹底的な研究が世界中で実施され、基礎研究から応用研究までへの迅速な移行が行われているが、これは簡単に制御でき可視化できる *in vitro* 細胞培養技術のもとに成り立っている (Fig. 3)。In vitro の細胞培養システムを用いれば、異なる身体の部位 (組織) で生きている細胞に対して、栄養因子の違いだけでなく生存環境の柔らかさや硬さが与える影響も解析できる<sup>11)</sup>。身体内により近い状態を再現でき、細胞外マトリク



スの機械的特性や環境との相互作用条件の違いによる遺伝子発現変化を検出できることから、3次元培養が基本的に望ましいことは確かである<sup>17)</sup>。しかし、複雑な3次元培養システムは、本研究で示したような特異的な生体材料との細胞応答を解析する場合には必ずしも必要ではない。

III型コラーゲンとデコリン<sup>25)</sup>の遺伝子変異型マウスは致死ではない<sup>25,26)</sup>ので、これらの遺伝子は生存に必要な不可欠というわけではないが、組織内に柔らかい環境を与え、弾力のある若い肌や人間の健康、高齢者の身体維持のために細胞外マトリクスを調節する。

そのような自己重合した巨大分子(細胞外マトリクス関連線維)は動物の体の胚発生や創傷治癒プロセスに必要なである。天然(卵殻膜)と人工的な細胞膜インターフェース(PMBN)をあらたに組み合わせることによって、卵殻膜にある細胞外マトリクス成分がASESM濃度に応じて自己重合し、様々な細胞外マトリクスを提供し、細胞はそれぞれの環境に接着し異なる細胞外マトリクス成分を発現するのであろう(Fig. 4)。本研究のASESM-PMBNシステムは、創傷治癒や胚発生、組織特異性、進化、形態

形成などの生物学的なプロセスのメカニズムを分子レベルで研究するのに有用であろう。とくに宇宙実験においては、このような厳密な環境条件設定が必要である。

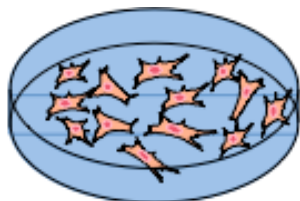


Fig. 3 Cells adhere onto cell culture dishes without coating.

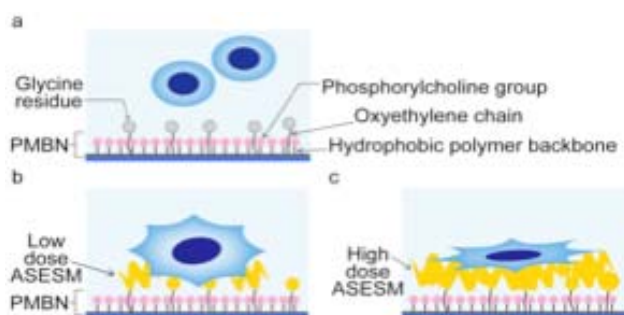


Fig. 4 PMBN-ASESM Cell Culture Model: ASESM concentration influences cell adhesion and shape of human dermal fibroblast.

#### 参考文献

- 1) 山崎丘 et al, 2010 年度宇宙微生物学研究チーム活動報告 *Space Utiliz Res* 27, 224-226 (2011).
- 2) Joan Vernikos, The G-connection: Harness Gravity And Reverse Aging, (2004) iUniverse.
- 3) Diegelmann, R.F. and Evans, M.C., Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 9, 283-289 (2004).
- 4) Ahlborn, G. and Sheldon, B.W., Enzymatic and microbiological inhibitory activity in eggshell membranes as influenced by layer strains and age and storage variables. *Poult Sci* 84, 1935-1941 (2005).

- 5) Burley, R.W. and Vadehra, D.V., *The egg shell and shell membranes: Properties and synthesis.* (John Wiley, New York, 1989).
- 6) Rose, M.L. and Hincke, M.T., Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins. *Cell Mol Life Sci* 66, 2707-2719 (2009).
- 7) Wong, M. et al Collagen in the egg shell membranes of the hen. *Dev Biol* 104, 28-36 (1984).
- 8) Ha, Y.W. et al Relationship between eggshell strength and keratan sulfate of eggshell membranes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147, 1109-1115 (2007).
- 9) Osuji, C.I., Acid glycosaminoglycan of eggshell membranes. *Biochim Biophys Acta* 244, 481-483 (1971).
- 10) Harris, E.D. et al., Localization of lysyl oxidase in hen oviduct: implications in egg shell membrane formation and composition. *Science* 208 (4439), 55-56 (1980).
- 11) Discher, D.E. et al, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310 (5751), 1139-1143 (2005).
- 12) Bruckner, P., Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res* 339, 7-18 (2010).
- 13) Tsang, K.Y., et al, The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res* 339, 93-110 (2010).
- 14) Grzesiak, J.J., et al. Enhancement of cell interactions with collagen/glycosaminoglycan matrices by RGD derivatization. *Biomaterials* 18, 1625-1632 (1997).
- 15) Kim, S.G., Akaike, T., Sasagaw, T., Atomi, Y. et al, Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct* 27, 139-144 (2002).
- 16) Zhang, L. et al., Time-related changes in expression of collagen types I and III and of tenascin-C in rat bone mesenchymal stem cells under co-culture with ligament fibroblasts or uniaxial stretching. *Cell Tissue Res* 332, 101-109 (2008).
- 17) von der Mark, K. et al Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 339, 131-153 (2010).
- 18) Konno, T., Watanabe, J., and Ishihara, K., Conjugation of enzymes on polymer nanoparticles covered with phosphorylcholine groups. *Biomacromolecules* 5, 342-347 (2004).
- 19) Ohto-Fujita E, Fujita Y, Atomi Y., Hydrolyzed eggshell membrane immobilized on phosphorylcholine polymer supplies extracellular matrix environment for human dermal fibroblasts. *Cell Tissue Res* 345, 177-190.
- 20) Lee S, Sakurai T, Ohsako M, Saura R, Hatta H and Atomi Y. (2010), Tissue stiffness induced by prolonged immobilization of the rat knee joint and relevance of AGEs (pentosidine). *Connect Tissue Res* (2010).
- 21) Ruff, K.J. et al, Eggshell membrane in the treatment of pain and stiffness from osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Clin Rheumatol* 28, 907-914 (2009).
- 22) Ruff, K.J. et al, Eggshell membrane: a possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies. *Clin Interv Aging* 4, 235-240 (2009).
- 23) Moro, T. et al., Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* 3, 829-836 (2004).
- 24) Takahashi, K. and Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676 (2006).
- 25) Jarvelainen, H. et al., A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen* 14, 443-452 (2006).
- 26) Liu, X. et al Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1852-1856 (1997).