

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01402

研究課題名(和文)強度と分解速度を独立して広範囲に制御可能なシルクゲルの創出と心筋梗塞治療への応用

研究課題名(英文) Development of silk fibroin hydrogels with tunable elasticity and biodegradability for the treatment of myocardial infarction

研究代表者

神戸 裕介 (Kambe, Yusuke)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：30747671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：シルクフィブロイン(以下、シルク)ゲルの強度と生分解性の制御、また、心筋梗塞ゲル注入療法におけるゲルの生分解性の影響の解明に成功した。

シルクゲル作製条件検討により、強度(圧縮弾性率)40～290 kPa、生分解性(相対重量半減時間)1.0～1.6の範囲において両性質を独立制御できた。また、ペプチド修飾法により、ゲルの生分解性を一定に保ちつつ強度を13～170 kPaに制御できた。さらに、強度は一定ながらも生体内での分解期間が1.5倍異なるシルクゲルを開発し、心筋梗塞モデルラットに移植した。ゲルの生分解性が炎症反応と再生線維組織の構造に関与し、心拡大抑制に寄与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織再生の足場となる移植用ゲルには、安全性はもちろんのこと「移植部周辺の組織からの力学的負荷に耐えるための強度」や「組織再生に応じて分解する生分解性」等の性質も重要である。軟組織の強度と生分解性を広範囲にカバーし得るシルクゲルを組織工学に応用することで、目的の組織の再生に適する足場材料の強度、生分解性の解明や組織再生の効率化の達成が期待できる。実際に、心筋梗塞治療においては、移植後2週以内にゲルが生分解してしまうと高い治療効果は得られないことが分かった。また、シルクゲルの強度には大きく影響しないものの生分解性を変化し得る因子の発見は、今後、バイオマテリアルの物性の自在制御に役立つ知見となる。

研究成果の概要(英文)：We successfully developed silk fibroin (SF) hydrogels with tunable elasticity and biodegradability for specific targets in soft tissue engineering. In addition, we clarified effects of biodegradability of an SF hydrogel on the prevention of negative left ventricular (LV) remodeling after myocardial infarction (MI).

We independently tuned the compressive modulus (40-290 kPa) and relative biodegradation time (1.0-1.6) of SF hydrogels. We also prepared SF hydrogels with similar biodegradability but different compressive moduli (13-170 kPa). Furthermore, we developed SF hydrogels with the same compressive modulus but different biodegradation rates in vivo via a peptide modification, which were injected into the LV wall of MI model rats. We found that LV enlargement was attenuated to a greater extent by injection of a slowly degrading unmodified SF hydrogel as compared to a rapidly degrading peptide-modified SF hydrogel for up to 12 weeks post-injection.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：シルクフィブロイン ハイドロゲル 弾性率 生分解性 物性制御 ペプチド修飾 心筋梗塞 再生線維構造

1. 研究開始当初の背景

心疾患は心臓移植を根治療法としてきたがドナー不足の問題がある。国内では細胞シート移植による再生医療の臨床例¹⁾が報じられたが、そのリスク管理は容易ではない。2004年、心筋梗塞(MI)部にハイドロゲルを注入することで心筋リモデリングが抑制される、という現象が報告され²⁾、新たな心筋梗塞治療法(ゲル注入療法)として着目されてきた。米国や欧州では、LoneStar Heart社(米国)等により、アルギネートゲルや脱細胞組織由来ゲル注入の治療が進められている。また、論文数も急増しており、天然および合成高分子由来の多種多様なゲル化材料が用いられている。しかし、ゲルの注入から心筋リモデリング抑制に至るメカニズムを探る研究はほとんど行われておらず、最適なゲル化材料の性質は未解明である。

ゲル注入による心筋リモデリング抑制には「左心室の壁厚を厚くし、それを維持し得るゲルの強度(圧縮弾性率)³⁾」と「慢性炎症ではなく、血管新生を伴う適度な炎症を誘導するゲルの生分解性⁴⁾」が重要とされている。しかし、どれくらいの強度のゲルが、どれくらいの期間、心筋内に存在すべきか定かではない。これらの最適値の解明およびゲル注入による心筋リモデリング抑制メカニズムの探索には、化学組成が同一であって、広範囲にかつ独立して強度と生分解性を変化させられるゲルが有用である。心筋の強度は約50kPa⁵⁾であり、ゲルの強度は10~250kPaで制御できるのが望ましい。一方、非生分解性ゲルのMI部への注入後4週で心機能が改善するも、注入後13週では心機能が悪化すると報告⁶⁾があることから、生分解性は1~12週で制御できるのが望ましい。しかし、既報の多くは組成の全く異なるゲルを用いて両性質を変化させている。また、同一・類似組成のゲルを用いた場合には制御範囲の上限が低すぎる(強度0.02~40kPa³⁾、生分解性1~6週⁴⁾)。

カイコが産生するシルクフィブロイン(以下、シルク)の水溶液は、力学刺激やpH等に応答して不可逆的にゲル化する。シルクゲルの強度は、濃度を変えるだけで、1~6,000kPaもの広範囲に渡り制御可能である^{7,8)}。一方、シルクゲルの生分解性に関する詳細な報告はないが、スポンジ形態の場合、成形プロセスを変えるだけで生分解性を2~48週にまで制御できる⁹⁾。このように、シルクゲルは広範囲に強度と生分解性を制御できる可能性がある。しかし、両性質は独立ではないため、目的のゲルを得るにはシルクゲルの機能改変を要する。

2. 研究の目的

本研究では、強度と生分解性を独立して広範囲に制御可能なゲルを開発し、MIに対するゲル注入療法による心筋リモデリングの抑制に適するゲルの性質とリモデリング抑制メカニズムの解明を目指した。具体的には、シルクゲルの機能改変を行い、強度10~250kPa、生分解性1~12週で互いに独立して制御可能なゲルのシリーズを得る。これをMIモデル動物に適用し、心機能計測、組織学および力学的評価を通じて心筋リモデリング抑制に適するゲルの性質と治療効果の決定因子の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

3.1. シルクゲルの作製

家蚕の繭を炭酸精練し、9M臭化リチウム水溶液中に溶かし、透析することでシルク水溶液を得た。シルク水溶液にオートクレープ処理(121℃, 15分)を1, 2回施した後、濃度調整(2~8%)を行った。得られたシルク水溶液に1/3量のエタノールを添加すること、もしくは、超音波(750W, 20kHz)を照射することにより、シルクをゲル化させた。なお、超音波照射時間は4~36秒の範囲で変化させた。

3.2. 細胞誘導性ペプチドの合成とペプチド修飾シルクゲルの作製

融合タンパク技術を用いて、シルク重鎖繰返し領域由来ペプチド、細胞接着性ペプチド、酵素分解基質ペプチド、細胞成長因子模倣ペプチドが融合した細胞誘導性ペプチドを合成した。合成したペプチドはNiキレートカラムを用いて精製した。ペプチド修飾シルクゲル作製の際には、細胞誘導性ペプチドをシルク水溶液に添加後、3.1と同様の操作によりシルクと共にゲル化させた。

3.3. シルクゲルの物性評価

ゲル化操作を行った直後のシルク水溶液をチューブに取り、傾斜法により、ゲル化時間を測定した。なお、ゲル化時間はシルク水溶液が流れなくなった時間とした。

全反射式フーリエ変換赤外分光光度計(FTR-ATR)を用いて、シルクゲル中のシルクのIRスペクトルを得た。アミドI領域のピーク分離を行い、βシート含有率を求めた。

シルクゲルの一軸圧縮試験を行った。得られた応力-ひずみ曲線の初期の傾きより、シルクゲルの強度(圧縮弾性率)を得た。

シルクゲルをタンパク分解酵素(パパイン)溶液に浸し、シルクゲルの経時的な重量変化を求

めた。重量が浸漬前のその半分となった時間を **WL50** と表し、基準サンプルの **WL50** との相対値 (**rWL50**) をシルクゲルの **in vitro** での生分解性の指標とした。また、一部のシルクゲルを **SD** ラット (**8-9** 週齢, 雄) の背部皮下に移植し、ヘマトキシリン・エオシン (**H&E**) 染色により、**in vivo** での生分解性を評価した。

3.4. **MI** モデルラットへのシルクゲル注入と心機能・組織学的評価

SD ラット (7 週齢, 雄) の心臓の冠動脈の左前下行枝を永久結紮した。一週間後に心エコー評価を行い、左室内径短縮率が **25%** 以下のラットを **MI** モデルとして採用した。細胞誘導性ペプチド未修飾・修飾シルクゲルを **MI** 部に **100-150** μL 注入し、その **1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12** 週後に心エコー評価を行った。

ゲル注入後 **12** 週には、心臓を摘出して短軸方向に薄切後、**H&E** 染色、**CD68** (マクロファージマーカー) 免疫染色を行った。左室壁の **H&E** 染色像より、左室壁の厚さと左室内腔円周方向へのコラーゲン線維の配向度を求めた。なお、線維の配向度の評価には **FiberOri8s03**¹⁰¹ ソフトを用いた。

4. 研究成果

4.1. 強度と生分解性の独立制御が可能なシルクゲルの開発

シルク水溶液の濃度、オートクレーブ処理回数および超音波照射時間を変化させることで様々な物性を示すシルクゲルを得た。これらの内、ゲル化時間が **1~45** 分を示すシルクゲル **15** 種類を選抜し、それらの強度と **in vitro** での生分解性 (**rWL50**) を評価した結果、強度が **40~290 kPa**, **rWL50** が **1.0~1.6** の範囲では、シルクゲルの両性質の独立制御が可能であることが分かった。また、濃度、オートクレーブ処理および超音波照射時間を変化させるだけでは、低い強度 (**10 kPa** 程度) を示すも長い **rWL50** (**~1.0**) を示すシルクゲルは得られないことが分かった。

15 種類のシルクゲルの強度と **rWL50** の相関を調べた結果、両者の間に有意な相関性は無かったため、いずれか一方の性質のみに作用する因子の存在が示唆された。そこで、 β シート含有率を評価し、両性質との相関を調べた結果、 β シート含有率と強度とは有意に相関しないものの β シート含有率と **rWL50** とは有意に正に相関することが分かった。これより、低い強度を示すシルクゲルの β シート含有率を増加させれば、生分解性のみを遅延させることが可能であると考えられる。

4.2. 同一の生分解性と広範囲に異なる強度を示すシルクゲルの開発

シルクゲルの β シート含有率の変化による生分解性のみの制御の可能性が示唆されたため、別の研究助成で取り組んでいたペプチド修飾手法を採用した。 β シート構造を形成するシルク重鎖繰返し領域由来ペプチドを化学合成し、これで低い強度 (約 **15 kPa**) を示すシルクゲルを修飾した。その結果、シルクゲルの強度に有意な変化は認められなかったものの、**rWL50** は有意に遅延し、約 **0.8** を示した。このペプチド修飾シルクゲル、強度・約 **50 kPa** で **rWL50**・約 **0.9** のシルクゲル、強度・約 **170 kPa** で **rWL50**・約 **0.9** のシルクゲルの **3** 種類の物性を解析した結果、強度には有意差が認められるものの、**rWL50** に有意差は認められないことが分かった。これより、化学組成や生分解性はほぼ一定ながらも、強度を **13~170 kPa** に制御可能なシルクゲルを得ることに成功した。この強度の範囲は、心筋のその **0.23~3.4** 倍をカバーし得る。今後、これらのシルクゲルを **MI** モデル動物に移植することで、**MI** ゲル注入療法の治療効果に対するゲルの強度の影響を、ゲルの生分解性の影響を排除しつつ、解明できると考えられる。

4.3. **MI** ゲル注入療法の治療効果に対するゲルの生分解性影響の解明

細胞誘導性ペプチドでシルクゲルを修飾した結果、未修飾、修飾ゲルの強度は共に約 **8 kPa** であり、有意差は認められなかった。一方、ラット背部皮下移植による **in vivo** での生分解性評価の結果、ペプチド修飾によってゲルへの細胞浸潤が促進され、生分解性が有意に早くなること分かった。**MI** モデルラットの **MI** 部に注入されたシルクゲルの厚さは約 **1 mm** であったため、ペプチド未修飾、修飾シルクゲルの残存期間をそれぞれ約 **3, 1.6** 週と見積もった。以上より、細胞誘導性ペプチド修飾により、強度を一定に保ちつつ、生分解性を早められることが分かった。

ペプチド未修飾、修飾シルクゲルをそれぞれ低、高生分解性ゲルとして、**MI** モデルラットの **MI** 部に注入し、心機能を経時的に評価した。その結果、ゲル注入による心機能の改善は認められず、経時的な悪化傾向を認めた。しかしながら、低生分解性ゲル注入群は、高生分解性ゲル注入群に比べて、有意に小さい左室拡張末期径 (**LVDd**)、左室収縮末期径 (**LVDs**) を示すことが分かった。これより、低生分解性ゲル注入により、左室の拡大が抑制され易くなる (心筋リモデリングが抑制され易くなる) ことが示唆された。

ゲル注入後 **12** 週での左室壁の **H&E** 染色により、両群ともにゲルは残存しておらず、左室壁はコラーゲン線維性組織で置換されることが分かった。左室壁厚に両群間の有意差は認められなかった。一方、左室壁内のコラーゲン線維の配向性を調べると、高生分解性ゲル注入群の方が、左室内腔円周方向への線維の配向度が有意に高いことが分かった。また、ゲル注入後 **12** 週での **LVDd**, **LVDs** と左室壁厚とに有意な相関性は認められなかったが、**LVDd**, **LVDs** と配向度とに

は有意な正の相関が認められた。すなわち、左室壁内のコラーゲン線維の向きが左室内腔円周方向に直交する場合には心拡大が抑制されることが示唆された。このメカニズムの詳細は不明であるが、左室内圧に対する線維群の抵抗性が関与するのかもしれない。左室壁の **CD68** 免疫染色により、高生分解性ゲル注入群の方が凝集したマクロファージが多いこと、また、左室内腔円周方向に沿ったコラーゲン線維の近傍にマクロファージが散在することが認められた。以上より、**MI** 部に注入されたゲルは炎症反応を惹起し、生分解される。そして、その生分解中・後に形成された線維組織の構造的な質が心拡大に影響すると考えられる。**MI** 部にリクルートされるマクロファージの種類によって心筋リモデリングの抑制効果が異なるとの報告^[11]もあることから、注入されるゲルに対する炎症反応の理解と制御が、高い治療効果を発揮する **MI** 治療用ゲルの創出に繋がると考えられる。**MI** ゲル注入療法の治療効果に対するゲルの強度、生分解性の最適値の発見には至らなかったが、ゲル注入による治療効果発揮のメカニズムの一端を解明できた。

<参考文献>

- [1] *Surg Today* , 42 , 181-4 (2012)
- [2] *J Am Coll Cardiol* , 44 , 644-60 (2004)
- [3] *Proc Natl Acad Sci USA* , 107 , 11504-12 (2010)
- [4] *Circulation* , 117 , 1388-96 (2008)
- [5] *Acta Biomater* , 10 , 3235-42 (2014)
- [6] *J Card Fail* , 15 , 629-36 (2009)
- [7] *Biomacromolecules* , 5 , 786-92 (2004)
- [8] *Biomacromolecules* , 12 , 2137-44 (2011)
- [9] *Biomaterials* , 29 , 3415-28 (2008)
- [10] <http://www.enomae.com/FiberOri/index.htm>
- [11] *Nature* , 557 , 405-9 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kambe Y, Yamaoka T	4. 巻 7
2. 論文標題 Biodegradation of injectable silk fibroin hydrogel prevents negative left ventricular remodeling after myocardial infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 4153 ~ 4165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9BM00556K	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kambe Y, Tamada Y, Kameda T	4. 巻 26
2. 論文標題 Effects of phosphate, Tris, HEPES, or MOPS buffers on the formation of silk fibroin sponges	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Silk Science and Technology of Japan	6. 最初と最後の頁 21 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11417/silk.26.21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kambe Y, Tokushige T, Mahara A, Iwasaki Y, Yamaoka T	4. 巻 51
2. 論文標題 Cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells on elastin-like protein-based hydrogels presenting a single-cell adhesion sequence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 97 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-018-0110-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kambe Y, Murakoshi A, Urakawa H, Kimura Y, Yamaoka T	4. 巻 5
2. 論文標題 Vascular induction and cell infiltration into peptide-modified bioactive silk fibroin hydrogels	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7557 ~ 7571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7tb02109g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神戸裕介	4. 巻 1
2. 論文標題 生物活性ペプチド/タンパクを融合・修飾したシルクフィブロインの細胞足場材料としての利用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 697 ~ 701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 神戸裕介, 溝口裕二, 桑原健, 中沖隆彦, 平野義明, 山岡哲二
2. 発表標題 弾性率と生分解性を独立して広範囲に制御可能なシルクゲルの開発
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口裕二, 神戸裕介, 平野義明, 山岡哲二
2. 発表標題 同程度の生分解性を示すも圧縮剛性が異なるシルクゲルの開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第14回若手研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 シルクゲルの生分解性が心筋梗塞ゲル注入治療効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 絹フィブロインゲルの生分解性が心筋梗塞ゲル注入療法の治療効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第66回日本シルク学会研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kambe Y, Yamaoka T
2. 発表標題 Effects of biodegradation of silk fibroin hydrogels on the prevention of negative left ventricular remodeling after myocardial infarction
3. 学会等名 TERMIS-AP 2019 & ABMC7 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kambe Y, Yamaoka T
2. 発表標題 Effects of the biodegradation rate of a silk fibroin hydrogel on the prevention of negative left ventricular remodeling after myocardial infarction
3. 学会等名 Signal Transduction by Engineered Extracellular Matrices, Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kambe Y, Yamaoka T
2. 発表標題 Silk fibroin hydrogels with different biodegradation rates to improve cardiac function after myocardial infarction
3. 学会等名 2018 TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 絹フィブロインゲルを利用した心筋梗塞治療システムの開発
3. 学会等名 平成30年度繊維学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 溝口裕二, 神戸裕介, 平野義明, 山岡哲二
2. 発表標題 圧縮弾性率と生分解速度を独立して制御可能なシルクゲルの創出
3. 学会等名 第62回高分子研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 シルクゲルの生分解速度が心筋梗塞ゲル注入療法の治療効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第47回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸裕介, 溝口裕二, 平野義明, 山岡哲二
2. 発表標題 弾性率と生分解速度を独立して広範囲に制御可能なシルクゲルの開発
3. 学会等名 第47回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 溝口裕二, 神戸裕介, 平野義明, 山岡哲二
2. 発表標題 シルクゲルの弾性率と生分解性の自在制御
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第13回若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 生分解性の異なるシルクゲル注入による心筋ネガティブリモデリングの抑制
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 溝口裕二, 神戸裕介, 平野義明, 山岡哲二
2. 発表標題 弾性率と生分解性を独立して制御可能なシルクゲルの開発
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸裕介, 溝口裕二, 桑原健, 中沖隆彦, 平野義明, 山岡哲二
2. 発表標題 シルクフィブリンゲルの弾性率と生分解性の独立, 広範囲制御
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岡哲二, 村越明恵, 神戸裕介
2. 発表標題 多機能生理活性シルクフィブロイン物理架橋ゲルのin vivo血管誘導
3. 学会等名 平成29年度繊維学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 心筋梗塞治療を目指した血管誘導性シルクゲルの開発
3. 学会等名 第46回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 心筋梗塞ゲル注入療法への利用を目指した血管誘導性シルクゲルの開発
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神戸裕介, 山岡哲二
2. 発表標題 ペプチド修飾によるシルクゲルの生分解速度の改変が心筋梗塞ゲル注入治療効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ハイドロゲル注入による心筋梗塞治療法の開発
http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biomedical_engineering/13-theme03.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山岡 哲二 (Yamaoka Tetsuji) (50243126)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	