

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006 年度～2010 年度

課題番号：18105007

研究課題名(和文) 絹構造の改変・構造制御・大量生産技術の確立と歯・骨再生医療材料の開発

研究課題名(英文) Development of Techniques for Improvement of Silk Structure, Establishment of Mass Production, and Application to New Silk-based Materials for Bone and Teeth Regeneration

研究代表者

朝倉 哲郎 (ASAKURA TETSUO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授

研究者番号：30139208

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料科学・繊維材料

キーワード：天然・生体高分子材料、絹

1. 研究計画の概要

高機能化絹を開発する技術を基盤とし、生分解性を制御した加工法を開発、細胞培養ならびにマウスによる動物移植実験での評価を経て、歯・骨の再生医療の基盤となる高機能化絹材料を開発することを目的とする。

そのために、以下の内容で開発研究を進めた。

- (1) 各種絹の精密構造解析の結果を基盤とする、歯・骨の再生医療材料に適した新しい高機能化絹の一次構造の分子設計。
- (2) 遺伝子組換え法を用いた大腸菌ならびにトランスジェニックカイコによる高機能化絹の生産。
- (3) 歯・骨素材として用いるための高機能化絹のスポンジおよび不織布状へのプロセッシング加工。
- (4) スポンジ状や不織布状の高機能化絹の構造と物性ならびに生分解性の評価。
- (5) 骨芽細胞等を用いた *In vitro* での高機能化絹の細胞接着性、石灰化の評価と遺伝子解析。
- (6) マウス皮下移植によるスポンジ状ならびに不織布状絹の生体適合性と安全性評価。
- (7) マウス筋膜下移植による絹スポンジの異所性石灰化評価。
- (8) マウス歯周病モデルを用いた歯科領域骨欠損への埋植。

2. 研究の進捗状況

- (1) 新しい高機能化絹の分子設計と大腸菌ならびに TG カイコによる生産

新たな高機能化絹の設計から TG カイコで生産するまでの一連の材料開発技術を確立、さ

らにプロセッシング技術によって分解性を制御した 10 種類の高機能化絹(カルシウム結合能や細胞接着性を付与)を作製することに成功した。例えば、RGD 配列やコラーゲン細胞接着部位配列を導入した高機能化絹の細胞接着活性は、通常の絹に比べて極めて高い結果を示した。

- (2) 絹スポンジおよび絹不織布の加工技術の開発

絹の分解性を制御するために、スポンジおよび不織布状(エレクトロスピンニング法を使用)に成型する技術を開発した。水系と有機溶媒系で作製法を変えたスポンジは、物性や分解性が著しく異なり、分解性のより高い絹不織布とあわせて、広く分解性が異なる絹多孔質体が作製できた。

- (3) 骨芽細胞培養系を用いた絹足場材料の *In vitro* 評価技術の開発

骨芽細胞の培養実験から、高機能化絹は高い細胞接着性と増殖性を示すことがわかった。さらに、通常の絹盤上での骨芽細胞の石灰化は、ポジティブコントロールのコラーゲン基板上と比較して、極めて早く、絹が石灰化を強力に促進し高い骨形成誘導能を有することが明らかになった。極めてインパクトの高い成果である。この骨芽細胞の分化を、さらに、骨形成の亢進に関する遺伝子群の発現量でモニターした所、骨芽細胞への分化を決定する遺伝子である転写調節因子 Runx2 や骨形成指標遺伝子である I 型コラーゲン α 鎖の大幅な発現上昇が認められた。

- (4) *In vivo* 絹移植材評価系の開発

絹移植材の *in vivo* 評価系の開発を目的とし、特に、大小のサイズの異なる骨欠損を簡便か

つ正確に評価できるシステムとして、マウスを用いて大腿骨前面部欠損移植モデルを開発した。軟X線撮影による評価において、絹移植材は大腿骨皮質骨および海綿骨部への定置が観察され、生体に拒絶反応は認められなかった。

また、骨リモデリングの骨吸収評価ならびに全身への作用評価を目的とするマウス血液サンプルを用いた生化学的マーカーの比較も実施し、絹移植材の骨評価系を構築した。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。さらに、今後、高機能化絹の動物による評価実験と平行して、骨芽細胞の培養による、骨分化指標遺伝子をマーカーとした高機能化絹の創製と評価が可能となった。

4. 今後の研究の推進方策

- (1) TG カイコでの繭生産において、絹中の機能部位の含量の増加を図る。
- (2) 骨欠損の大きさによって分解性の制御された、より優れた高機能化絹を作製する。
- (3) 絹上での培養による骨芽細胞分化の促進が分子生物学的な指標と遺伝子解析によって明確に確認されたので、新たな高機能化絹創製の技術を開発する。
- (4) 骨欠損のサイズを大小異なる *in vivo* 評価系を作成し、高機能化絹移植材の適用の効果を欠損サイズにより比較する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者には下線)

① [雑誌論文] (計 46 件)

- (1) Makaya, K., Terada, S., Ohgo, K., Asakura, T., Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt / water and sucrose / hexafluoroisopropanol in cartilage regeneration, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有 in press, 2009
- (2) Hirata, M, Inada, M, Matsumoto, C, Takita, M, Ogawa, T., Endo, Y., Miyaura, C., A novel carborane analog, BE360, with a carbon-containing polyhedral boron- cluster is a new selective estrogen receptor modulator for bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 **380**: 218-22, 2009
- (3) Yang, M., Tanaka, C., Yamauchi, K., Ohgo, K., Kurokawa, M., Asakura, T., Silklike materials constructed from sequences of *Bombyx mori* silk fibroin, fibronectin, and elastin., *J. Biomed. Mater. Res A.*, 査読有 **84**, 353-363, 2008
- (4) Yanagisawa, S., Zhu, Z., Kobayashi, I.,

Uchino, K., Tamada, Y., Tamura, T., Asakura, T., Improving Cell-Adhesive Properties of Recombinant *Bombyx mori* Silks by Incorporation of Collagen or Fibronectin Derived Peptides Produced by Transgenic Silkworms., *Biomacromolecules*, 査読有 **8**, 3487-3492, 2007

- (5) Asakura, T., Sato, H., Moro, F., Yang, M., Nakazawa, Y., Collins, A. M., Knight, D. P., Solid-state NMR Analysis of (GA)₃S(AG)₃D(GA)₃S(GA)₃D(GA)₃S(GA)₃, A Peptide with a Lamellar Structure and a Ca Binding Site, and Production of TS[(AG)₃D(GA)₃S]₁₆ in *E. coli.*, *Macromolecules*, 査読有 **40**, 8983-8990, 2007

② [学会発表] (計 107 件)

- (1) Yamauchi, K., Asakura, T., Structures of Silks and Silk-like Materials studied with Solid-state NMR and Application to Biomaterials., ENC, 2009年3月, USA
- (2) 高機能化絹スポンジの作製と骨再生材料への応用, 真茅久美子, 宮本早矢香, 小柳亮, 朝倉哲郎, 高分子討論会, 2008年9月, 名古屋
- (3) Asakura, T., Nakazawa Y., Sato H., Moro F., Silk structure studied using solid state NMR., ACS, 2008年4月, USA
- (4) 吉田愛, 平田美智子, 宮浦千里, 稲田全規, 朝倉哲郎, 家蚕絹ならび大腸菌で生産した高機能化絹の骨・歯用再生医療材料への応用, 高分子学会年次大会, 2008年5月, 横浜

③ [図書] (計 5 件)

朝倉哲郎, シェフラー・ジャパン(株)、工業材料, 新しいシルクの生産と再生医療材料への応用, in press, 2009

④ [産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- 特開 2008-194301, 多孔質骨再生医療用基材およびその製造方法, 発明者 (2 名 : 朝倉哲郎, 寺田伸一)
- 特開 2008-245626, 化合物の結合効率が向上した絹糸, 発明者 (9 名 : 栗原宏征, 山田勝成, 田村俊樹, 瀬筒秀樹, 朝倉哲郎, 桑原伸夫, 白石比呂志, 中村敬, 吉井圭)

⑤ [その他]

- (1) 日刊工業新聞「再生医療向け新素材・カイコの絹に着目」2009年4月27日
- (2) 日経産業新聞「2003年への挑戦・ヒト臓器に動物工場」2009年4月7日
- (3) 東京新聞、中日新聞「絹で再生医療」2009年3月31日
- (4) 化学工業日報「TG カイコのシルク利用 再生医療材料開発プロ」2008年12月22日

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~asakura/>