

平成24年6月1日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2010

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・大学院工学研究院・教授

研究者番号：30139208

研究成果の概要(和文)：歯・骨の再生医療材料として要求される機能を付与した15種類の高機能化絹を分子設計、トランスジェニックカイコで大量に生産することに成功した。

また、生分解性を制御したスポンジ状ならびに不織布状絹多孔質体を開発するとともに骨芽細胞培養系での評価技術を開発した。さらに、動物移植評価実験ならびに歯科領域骨欠損への埋植評価実験を行い、それらの結果を総合して、歯・骨再生のための優れた材料を絹をベースに開発することができた。

研究成果の概要(英文)：15 silk-like materials for tooth and bone regeneration were designed and produced by transgenic silkworm. Then the porous silk samples with different biodegradable characters were developed. Through *in vitro* evaluation by the cell cultivation and *in vivo* evaluation with animal implantation, the excellent materials for tooth and bone regeneration were developed on the basis of silk.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	23,300,000	6,990,000	30,290,000
2007年度	19,900,000	5,970,000	25,870,000
2008年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2009年度	17,400,000	5,220,000	22,620,000
2010年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
総計	86,300,000	25,890,000	112,190,000

研究代表者の専門分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・繊維材料

キーワード：天然・生体高分子材料、トランスジェニック絹、歯・骨再生

1. 研究開始当初の背景

- (1) 高齢化社会を迎え、優れた歯・骨再生医療材料の開発は、焦眉の急を要する問題であった。
- (2) 絹は、長年、縫合糸として人体に埋め込まれて用いられてきた実績を有するので、歯・骨の再生医療材料の有力な

候補であった。

- (3) 朝倉グループは、27年にわたって絹の構造解析を行ってきており、構造・物性の多くの知見の集積があった。さらに、遺伝子組換え技術により、大腸菌またはトランスジェニック(TG)カイコで、一次構造を改変した新しい絹を作

製できる状況にあった。

2. 研究の目的

- (1) 歯・骨の再生医療材料として要求される機能を付与した高機能化絹を分子設計、トランスジェニックカイコで大量に生産すること。
- (2) 生分解性を制御したスポンジ状ならびに不織布状絹多孔質体を開発すること。
- (3) 骨芽細胞培養系での評価、動物移植評価実験ならびに歯科領域骨欠損への埋植評価実験を行い、歯・骨再生のための優れた材料を絹をベースに開発すること。

3. 研究の方法

- (1) 絹およびモデルペプチドの NMR 精密構造解析と機能評価を経て、用途に適した新しい高機能化絹を設計する。
- (2) 遺伝子組換え法を用いて、大腸菌ならびに TG カイコにより高機能化絹を生産する。
- (3) 高機能化絹をスポンジや不織布状に加工し、生分解性を制御する。
- (4) 骨芽細胞を用いて絹材料の細胞接着性の評価と遺伝子解析を行う。
- (5) マウスおよびラビットへの移植評価を行い、歯科領域における絹材料の評価を行う。
- (6) それらの結果を総合して、歯・骨再生のための優れた材料を絹をベースに開発する。

4. 研究成果

- (1) 歯・骨再生用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しく高機能化絹を設計、TG カイコで生産するまでの一連の開発技術を確認し、高いカルシウム結合能や細胞接着性を有する 15 種類以上の高機能化絹を繭として生産することに成功した (図 1、表 1)。

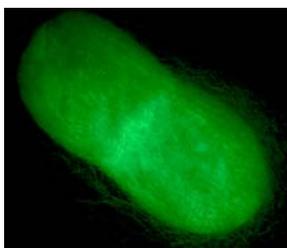


図 1 トランスジェニック繭。絹中への目的遺伝子導入を GFP 蛍光により緑色に光ることによって確認。

番号	導入配列	目的
1	[{(AGSGAG) ₂ EEEE}] ₄	カルシウム結合性の賦与
2	{(AGSGAG) ₂ EEEEEEE}	カルシウム結合性の賦与
3	[{(AGSGAG) ₂ AS}] ₂ (EYDYDDSDDDDEWD)AS] ₂	カルシウム結合性の賦与
4	(GE) ₈	カルシウム結合性の賦与
5	(GD) ₈	カルシウム結合性の賦与
6	FibH-(RGD) ₈	細胞接着性の向上
7	FibL-(RGD) ₈	細胞接着性の向上
8	FibH-Collagen	細胞接着性の向上
9	TS[(TGRGDSPAS) ₈ SHLVPLNQSDVRKRLQVQLSIRTAS] ₂	細胞接着性の向上
10	[(PGGSGPGGY) ₄ PGGAS] ₄	強度の向上
11	FibH-(YIGSR) ₈	細胞接着性の向上
12	FibL-(YIGSR) ₈	細胞接着性の向上
13	FibH-(YIGSR) ₈ (RGD) ₈	細胞接着性の向上
14	FibL-(YIGSR) ₈ (RGD) ₈	細胞接着性の向上
15	FibH-(AGG) ₈ (RGD) ₈	細胞接着性の向上

表 1 本研究において開発し、TG カイコで生産された高機能化絹の一覧

フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン等の細胞接着部位、各々、RGD, YIGSR 等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。また、ポリグルタミン酸、(E)_nを導入した高機能化絹を用いた場合の動物移植実験結果は、早期の新生骨形成を認めた。このような 15 種類に及ぶ高機能化絹の設計と生産は、世界で初めての研究成果であり、極めて独創的かつ歯・骨再生のために有用な成果である。

- (2) 生分解性を制御した絹スポンジおよび絹不織布加工技術の開発

絹の分解性や物性が、著しく異なる絹スポンジおよび絹不織布を作製する技術を開発した。前者は、絹の溶媒系と孔源を変えて絹スポンジを作製、プロテアーゼ I V による酵素分解実験によって生分解性を圧縮試験によって物性を評価することによって達成した (図 2)。一方、後者は、エレクトロスピニング法を用い、スピニング条件とその後の不溶化法を大きく変化させることによって達成することができた。

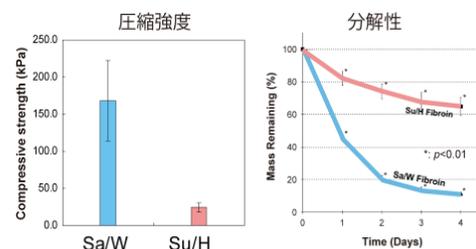


図 2 水系と HFIP 系で作製した絹スポンジの圧縮強度と酵素分解性評価

- (3) 骨・歯再生用足場材料としての絹の *In*

in vitro 評価技術の開発

絹は、骨芽細胞培養系を用いた培養実験から、高い細胞接着性・増殖性を示すことがわかった。また、足場材料による骨形成の誘導を評価するため、通常の絹で被覆した基材上で培養した骨芽様細胞について石灰化の様子を観測した所、絹上での培養が石灰化を強力に促進することが明らかになった (図3)。

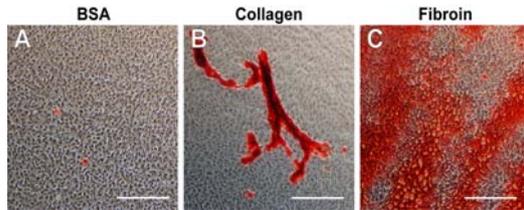


図3 アリザリンレッド染色法による石灰化評価。赤色が石灰化を示す。A: ウシ血清アルブミン上で培養した細胞; B: ブタI型コラーゲン上で培養した細胞; C: 絹上で培養した細胞。それぞれの基材上で14日間培養した後染色を行った。

さらに、この培養系における骨芽細胞の分化は、骨分化指標遺伝子の発現量と連関しており、この遺伝子がマーカーとなることがわかった。総合して、骨・歯再生用足場材料としての絹の評価を、骨芽細胞培養系を用いた培養実験によって行うことができることを示した。

(4) 動物実験 (マウスを用いた歯周治療モデル) を用いた In vivo 絹移植材評価系の開発

絹および高機能化絹を用いて、マウスおよびウサギを用いた in vivo 骨再生評価実験を実施した。絹スポンジ等の骨欠損移植材としての有効性を評価、かつ、その生体適合性を立証できる in vivo 評価系として確立した。本評価系を用いて、欠損のサイズに応じた移植材の選定を可能とした。この評価系を応用し、歯槽骨の欠損に絹スポンジ等の移植を適用することにより、



図4 マウス大腿骨に移植したスポンジ(矢印)の軟X線像

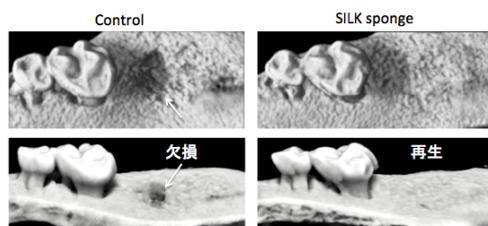


図5 マウス歯槽骨に移植したスポンジによる骨再生の3次元マイクロCT像

歯周病の治療への応用を視野に入れた絹移植材料の選定に有用な評価系として確立した。

大小からなる欠損を簡便かつ正確に評価できるシステムとして、大腿骨前面部欠損移植モデルを構築、軟X線の撮影による評価を行なった所、絹移植材は大腿骨皮質骨より海綿骨部に観察され、拒絶反応は見られなかった (図4)。さらに、マウス歯周治療への応用として、歯牙が欠損した上顎部への絹スポンジ移植を検討した。3次元マイクロCTを用いた解析の結果、歯槽骨の欠損に絹スポンジ等の移植を適用することにより、新たな骨形成を可能とし、欠損分が明らかに補填されていた (図5)。

これら結果より、動物移植評価実験ならびに歯科領域骨欠損への埋植評価実験の確立と評価を行い、絹をベースにした歯・骨再生のための優れた評価系と新規の絹材料の開発に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計84件)

①Nagano, A.; Sato, H.; Tanioka, Y.; Nakazawa, Y.; David Knight; Asakura, T., Characterization of a Ca binding-amphipathic silk-like protein and peptide with the sequence $(\text{Glu})_8(\text{Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly})_4$ with potential for bone repair, *Soft Matter*, 査読有, 8(3), 2012, 741-748

②Asakura, T.; Okonogi, M.; Horiguchi, K.; Aoki, A.; Saito, H.; D.P.Knight; M.P.Williamson, Two Different packing arrangements of antiparallel polyalanine, *Angewandte Chemie Int, Ed.*, 査読有, 51(5), 2012, 1212-1215

③Kobayashi, M.; Matsumoto, C.; Hirata, M.; Tominari, T.; Inada, M.; Miyaura, C., The Correlation between Postmenopausal Osteoporosis and Inflammatory Periodontitis Regarding Bone Loss in Experimental Models, *EXPERIMENTAL ANIMALS*, 査読有, 61(2), 2012, 183-187

④Asakura, T.; Nishi, H.; Nagano, A.; Yoshida, A.; Nakazawa, Y.; Kamiya, M.; Demura, M., NMR analysis of the fibronectin cell-adhesive sequence, Arg-Gly-Asp, in a redombinant silk-like protein and a model peptide,

- Biomacromolecules, 査読有, 12(11), 2011, 3910-3916
- ⑤Nagano, A.; Tanioka, Y.; Sakurai, N.; Sezutsu, H.; Kuboyama, N.; Kiba, H.; Tanimoto, Y.; Nishiyama, N.; Asakura, T.: Regeneration of the femoral epicondyle on calcium-binding silk scaffolds developed using transgenic silk fibroin produced by transgenic silkworm, ACTA BIOMATERIALIA, 査読有, 7(3), 2011, 1192-1201
- ⑥Asakura, T.; Koyanagi, R.; Nishiyama, N.; Kuboyama, N.; Kiba, H.; Abiko, Y., Bone regeneration on the epicondyle of the femur supported by silk fibroin-based scaffold: a model system for dental surgery, Journal of INSECT BIOTECHNOLOGY and SERICOLOGY, 査読有, 80, 2011, 25-30
- ⑦Asakura, T.; Nishi, H.; Nagano, A.; Yoshida, A.; Nakazawa, Y.; Kamiya, M.; Demura, M., NMR analysis of the fibronectin cell-adhesive sequence, Arg-Gly-Asp, in a recombinant silk-like protein and a model peptide, Biomacromolecules, 査読有, 12(11), 2011, 3910-3916
- ⑧Nakazawa, Y.; Sato, M.; Takahashi, R.; Aytemiz, D.; Takabayashi, C.; Tamura, T.; Enomoto, S.; Sata, M.; Asakura, T., Development of Small-Diameter Vascular Grafts Based on Silk Fibroin Fibers from Bombyx mori for Vascular Regeneration, J. Biomaterials Sci. Polym. Ed. 査読有, 22(1-3), 2011, 195-206
- ⑨Hirata, M.; Kobayashi, M.; Matsumoto, C.; Miyaura, C.; Asakura, T.; Inada, M. Cell Shape and Matrix Production of Fibroblasts Cultured on Fibroin-organized Silk Scaffold with Type-II β -turn Structured (Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly)_n Sequences, J. Health Sci., 査読有, 56(6), 2010, 738-744
- ⑩Enomoto, S.; Sumi, M.; Kajimoto, K.; Nakazawa, Y.; Takahashi, R.; Takabayashi, C.; Asakura, T.; Sata, M., Long-term Patency of Small-diameter Vascular Graft Made from Fibroin, a Silk-based Biodegradable Material. J Vasc Surg., 査読有, 51(1), 2010, 155-164
- ⑪Sato, M.; Nakazawa, Y.; Takahashi, R.; Tanaka, K.; Sata, M.; Aytemiz, D.; Asakura, T., Small-diameter vascular grafts of Bombyx mori silk fibroin prepared by a combination of electrospinning and sponge coating, Materials Letters, 査読有, 64, 2010, 1786-1788
- ⑫Zhu, Z.; Kikuchi, Y.; Kojima, K.; Tamura, T.; Kuwabara, N.; Nakamura, T.; Asakura, T., Mechanical Properties of Regenerated *Bombyx mori* Silk Fibers and Recombinant Silk Fibers produced by Transgenic Silkworms. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 査読有, 21, 2010, 395-411
- ⑬Koyanagi, R.; Zhenghua, Z.; Asakura, T.; Regenerated Bombyx mori silk fiber with enhanced biodegradability; Journal of INSECT BIOTECHNOLOGY and SERICOLOGY, 査読有, 79, 2010, 27-30
- ⑭Suzuki, Y.; J. T. Gerig; Asakura, T.: NMR Study of Interactions between Silk Model Peptide and Fluorinated Alcohols for Preparation of Regenerated Silk Fiber; Macromolecules, 査読有, 43, 2010, 2364-2370
- ⑮Suzuki, Y.; Aoki, A.; Nakazawa, Y.; David P. Knight; Asakura, T. Structural Analysis of the Synthetic Peptide (Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)₅, a Model for the Crystalline Domain of Bombyx mori Silk Fibroin, Studied with ¹³C CP/MAS NMR, REDOR, and Statistical Mechanical Calculations, Macromolecules, 査読有, 43, 2010, 9434-9440
- ⑯Makaya, K.; Terada, S.; Ohgo, K.; Asakura, T., Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage formation. J. Biosci. Bioengi, 査読有, 108(1), 2009, 68-75
- ⑰Nagano, A.; Kikuchi, Y.; Sato, H.; Nakazawa, Y.; Asakura, T., I Structural Characterization of Silk-Based Water-Soluble Peptides (Glu)_n(Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)₄ (n=4-8) as a Mimic of Bombyx mori Silk Fibroin by ¹³C Solid-State NMR.

Macromolecules, 査読有, 42(22), 2009, 8950-8958

⑱Hirata, 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, 2009, 218-222

⑲Tanaka, C.; Asakura, T., Synthesis and Characterization of Cell-Adhesive Silk-Like Proteins Constructed from the Sequences of Anaphe Silk Fibroin and Fibronectin. Biomacromolecules, 査読有, 10(4), 2009, 923-928

⑳Yang, M.; Kawamura, J.; Zhu, Z.; Yamauchi, K.; Asakura, T., Development of silk-like materials based on Bombyx Mori and Nephia Clavipes dragline silk fibroins. Polymer, 査読有, 50(1), 2009, 117-124

㉑Yang, 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(2), 2008, 353-363

㉒Inada, M.; Tsukamoto, K.; Hirata, M.; Takita, M.; Nagasawa, K.; Miyaura, C., Novel vitamin D-3 analogs, 1 alpha, 25(OH)(2)D-3-26, 23-lactam (DLAMs), antagonize bone resorption via suppressing RANKL expression in osteoblasts, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 査読有, 372(3), 2008, 434-439

㉓Ohgo, K.; Bagusat, F.; Asakura, T.; Scheler, U., Investigation of Structural Transition of Regenerated Silk Fibroin Aqueous Solution by Rheo-NMR Spectroscopy. J. Amer. Chem. Soc., 査読有, 130(12), 2008, 4182-4186

㉔Yang, M.; Muto, T.; Knight, D., Collins, A. M.; Asakura, T.; Synthesis and characterization of silk-like materials containing the calcium-binding sequence from Calbindin D9k or the shell nacreous matrix protein MSI60. Biomacromolecules, 査読有, 9(1), 2008,

416-420

㉕Yanagisawa, 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(11), 2007, 3487-3492

㉖Asakura, T.; Sato, H.; Moro, F.; Yang, M.; Nakazawa, Y., Collins, A. M.; Knight, D., 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(25), 2007, 8983-8990

㉗Yang, M.; Yamauchi, K.; Kurokawa, M.; Asakura, T., Design of Silk-like Biomaterials Inspired by Mussel Adhesive Protein. Tissue Engineering, 査読有, 13(12), 2007, 2941-2947

㉘Kino, R.; Ikoma, T.; Yunoki, S.; Nagai, N.; Tanaka, J.; Asakura, T.; Munekata, M., Preparation and Characterization of Multilayered Hydroxyapatite/Silk Fibroin Film. J. Biosci. Bioengi. 査読有, 103(6), 2007, 514-520

〔学会発表〕(計274件)

①長野あや、骨再生を目的としたカルシウム結合性を有する絹様タンパク質の作製ならびキャラクター化、第20回ポリマー材料フォーラム、2011年11月25日、タワーホール船堀(東京都)

②林寛之、遺伝子組換えカイコによる高機能化絹の生産と人工血管への応用、第60回高分子討論会、2011年9月29日、岡山大学津島キャンパス(岡山県)

③富成司、炎症性骨吸収因子によるRANKL誘導と骨芽細胞におけるNF-κBの役割、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日～24日、国立京都国際会館(京都府)

④松本千穂、Toll-like receptor 2ヘテロ受容体(TLR1/2, TLR2/6)シグナルによる炎症性骨吸収の亢進、第29回日本骨代謝学会学術集会、2011年7月30日、大阪国際会議場(大阪府)

⑤長野あや、Design and Production of

Bone Tissue Engineering Using Silk-Like Protein and Their Characterization、第60回高分子学会年次大会、2011年5月25日、大阪国際会議場(大阪府)

⑥Kenta Miyazawa、Production and NMR Analysis of Silk-like Proteins containing Cell-adhesive Sequences for Bone Scaffold、Pacifichem2010、2010年12月19日、ハワイコンベンションセンター(アメリカ)

⑦井上宏樹、破骨細胞分化に対するポリメトキシフラボノイドの効果、第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

⑧宮本早矢香、歯科再生医療材料としての家蚕絹フィブロイン足場材料の検討、平成22年度繊維学会年次大会、2010年6月16日、タワーホール船堀(東京都)

⑨鈴木悠、骨再生医療用細胞接着性新規絹様タンパク質の創製とNMR構造解析、第59回高分子学会年次大会、2010年5月27日、パシフィコ横浜(神奈川県)

[図書](計15件)

①朝倉哲郎、コロナ社、広がるNMRの世界40人の研究者からの熱いメッセージ、2011、26-29

②朝倉哲郎、工業材料、新しいシルクの生産と再生医療材料への応用、2009、20-23

③朝倉哲郎・中澤靖元、繊維学会誌、絹の精密構造解析と再生医療材料への応用、2007、261-265

④朝倉哲郎・大郷耕輔、シーエムシー出版、月刊ファインケミカル12「シルクの再生医療材料への応用」、2007、13-20

⑤朝倉哲郎、NTS社、「絹構造の改変と再生医療分野への応用」未来材料、2007、38-44

[産業財産権]

○出願状況(計4件)

①名称:細胞接着性配列および絹由来の疎水性配列を含むタンパク質またはペプチドを被覆した医療用材料

発明者:長野あや、朝倉哲郎

権利者:東京農工大学、日本メディカルマテリアル(株)

種類:特許

番号:特願2011-287650

出願年月日:平成22年12月28日

国内外の別:国内

②名称:再生絹材料及びその製造方法

発明者:朝倉哲郎

権利者:東京農工大学

種類:特許

番号:特願2008-69291

出願年月日:平成20年3月18日

国内外の別:国内

③名称:化合物の結合効率が向上した絹糸
発明者: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

権利者:東レ(株)、(独)農業生物資源研究所、群馬県

種類:特許

番号:特願2007-94771

出願年月日:平成19年10月16日

国内外の別:国内

④名称:多孔質骨再生医療用基材およびその製造方法

発明者:朝倉哲郎、寺田伸一

権利者:東京農工大学、東京女子医科大学

種類:特許

番号:特願2007-33811

出願年月日:平成19年2月14日

国内外の別:国内

○取得状況(計1件)

①名称:紡糸液組成物およびそれを用いた再生絹繊維の製造方法、並びに、該製造方法により得られた再生絹繊維

発明者:朝倉哲郎

権利者:東京農工大学

種類:特許

番号:特願2008-523610

出願年月日:平成18年7月4日

国内外の別:国内

[その他]

・ホームページ等

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

・報道関連情報

①TBS 夢の扉+、「いのちを紡ぐ絹の糸」、平成23年1月29日

②Highlighting JAPAN, Highlighting JAPAN Vol.5, No2 「The New Silk Road」平成23年6月1日

③BS ジャパン、「世の中進歩堂」#069、「シルク製再生医療材料研究」、平成22年1月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 哲郎 (ASAKURA TETSUO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号:30139208

(2) 研究分担者

宮浦 千里 (MIYaura CHISATO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号:20138382

(3) 連携研究者

なし