

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20483

研究課題名（和文）生体吸収性スキャフォールド応用を志向したシルクフィブロインの立体構造制御

研究課題名（英文）Relationship between molecular state and function in silk fibroin-based bioabsorbable scaffold

研究代表者

佐々木 誠（Sasaki, Makoto）

熊本大学・大学院先端科学研究部（工）・特任准教授

研究者番号：80768812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：アルカリ水溶液による精練は、繭からシルクフィブロイン（SF）水溶液を調製するための最初の工程である。種々の濃度のNa₂CO₃水溶液を用いることにより、分子状態の異なるSF水溶液を調製することができる。本研究では、種々のSF水溶液を用いてフィルムを作製し、特性を評価した。Na₂CO₃濃度の増加により、水溶液中のSFの分子量分布が広くなることが確認された。低分子量のSFを多く含むフィルムは、相対的に分解が早く、線維芽細胞の接着を抑制した。ラット腹部癒着モデルを用いた評価では、組織との接着を抑制する効果を発揮した。一方で、高分子量のSFで構成されたフィルムは、組織接着を促進する傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SFは優れた生体適合性を有していることが報告されているにも関わらず、国内において生体吸収性医療機器（スキャフォールド）へ応用された事例は皆無である。本研究では、SFフィルムにおける分子状態（分子鎖長や分子量分布）と機能（機械特性や分解性、細胞接着性）との重要な関係性を確認することができた。これは、成形加工工程における些細な条件の違いが、成果物の機能に多大なる影響をもたらすことを示唆する。これらの深い理解は、スキャフォールド開発における一助となり得る。

研究成果の概要（英文）：Degumming with an aqueous alkaline solution is the initial step to purify silk fibroin (SF) aqueous solution from silkworm cocoon. While the process is essential to remove sericin, it affects the molecular state of SF. In this study, we focused on the physical and biological properties of the films prepared using different SF aqueous solutions, which were obtained through the degumming with Na₂CO₃ aqueous solutions at various concentrations, followed by water solubilization and dialysis.

It was confirmed that increase in the concentration of Na₂CO₃ resulted in a wider distribution of molecular weight of SF in the purified aqueous solution. The prepared SF film with the high content of low molecular weight chains below 100kDa performed faster degradation rate and lower fibroblast adhesion than that with high molecular weight chains. In a rat abdominal adhesion model, the former tended to inhibited postoperative adhesion, and the latter promoted the adhesion on the wound site.

研究分野：Biomaterial

キーワード：シルクフィブロイン 精練 生体吸収性 医療機器応用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然シルク由来のシルクフィブロイン(以下、SF)は、生体内における免疫原性が極めて低く、分解過程における炎症反応が軽微であるため、次代の生体吸収性素材として期待されている。緻密に配置された側鎖の小さいアミノ酸(グリシン、アラニン、セリンで分子の約90%を構成)^[1]の分子間相互作用を応用することにより、多様な形態に成形加工することが可能である。しかし、国内においては、生体吸収性医療機器(スキャフォールド)へ応用された事例は皆無であり、実臨床における有効性は明白になっていない。スキャフォールドの機能に及ぼす分子状態(分子鎖長や分子量分布など)の影響を精査することは、実用化への一助となり得る。

2. 研究の目的

評価モデルとして当初想定していたバルク構造体は、形状を制御するのが困難であり、スキャフォールドとしての機能(各種特性)を評価するのに好適ではなかった。そこで、本研究では、形状制御が容易なフィルム構造体(以下、SFフィルム)をモデルに、機械特性や分解性、細胞接着性を評価し、それらに寄与する分子構造上の要素を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SF水溶液の調製

70 の炭酸ナトリウム(Na_2CO_3)水溶液を用いて、シルクからセリシンを除去することによりSFファイバーを抽出した(精練)^[2]。得られたSFファイバーを9.3 M 臭化リチウム水溶液に溶解した後、透析ならびに遠心分離を経てSF水溶液を得た。尚、様々な分子状態のSF水溶液を得るために、種々の濃度(0.2、1、2、4、8%)の Na_2CO_3 水溶液を用いた。

(2) SFフィルムの調製

SF水溶液10 mLをシリコン製の型(60 mm×60 mm)に流し込み、一晚乾燥してSFフィルムを作製した。以降、用いられた Na_2CO_3 水溶液の濃度に応じて、それぞれのSFフィルムをD0.2、D1.0、D2.0、D4.0、D8.0と略記する(表1)。

表1. SFフィルムの概要

略称	Na_2CO_3 水溶液濃度(wt%)
D0.2	0.2
D1.0	1.0
D2.0	2.0
D4.0	4.0
D8.0	8.0

(3) SF水溶液の分析

SF水溶液中の分子状態を評価するために、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)分析およびゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)分析を用いた。SDS-PAGE分析では、6 M 尿素を用いて0.1 wt%に調整したSF水溶液を、3:1の割合で緩衝液に溶解した。98 で5分間加熱した後、ポリアクリルアミドゲルに添加し、30 mA、500 Vで約1時間電気泳動した。電気泳動後、ゲルを取り出し、CBB染色液で一晩染色した。水で洗浄した後、SFの分子量分布を評価した。GPC分析では、高速液体クロマトグラフ(HPLC)システムにおける示差屈折率検出器を用いて、分子鎖長や分子量分布を同定した。評価サンプルは、SF水溶液を緩衝液(2 M 尿素含有PBS)で0.2 w/v%に希釈した後、PTFE膜で濾過することによって得られた。

(4) SFフィルムの機械特性

SFフィルムの機械特性を評価するために、引張試験機を使用した。評価サンプルは、SFフィルムを35 mm×6 mmのダンベル形状に加工することによって得られた。尚、ゲージ長ならびに引張速度をそれぞれ10 mmならびに毎分1 mmに設定した。

(5) SFフィルムの分解性

SFフィルムの分解性を評価するために、直径10 mmの円形に加工された評価サンプルを2 mLの細胞培養液(E-MEM)に3日間浸漬し、浸漬前後の重量を測定した。浸漬前後の評価サ

サンプルの重量をそれぞれ W_1 (mg) ならびに W_2 (mg) とし、重量残存率 ($W_2/W_1 \times 100$ (%)) を算出した。

(6) SF フィルムの細胞接着性

直径 10 mm の円形に加工された評価サンプルを 24 ウェル培養プレートに配置し、5 分間の UV 滅菌後に、 1.0×10^4 の V79 細胞を播種した。培養して 3 ならびに 24 時間後、評価サンプルを洗浄・固定し、接着した細胞を SEM で観察した。

4. 研究成果

(1) SF 水溶液の分子量分布

SF を構成する 3 つの異なるペプチド鎖 (L 鎖、H 鎖、糖タンパク質 P25) は、それぞれ 25 kDa、325 kDa、26 kDa の分子鎖を有する。SF 水溶液を調製する過程において、高分子鎖間の分子間相互作用 (主に水素結合) が切断される。この過程では、アミド結合の分解によって様々な分子量の分子鎖が生成される^[15]。図 1(A) に示す通り、SDS-PAGE 分析により、0.2 および 1.0 wt% のような低濃度 Na_2CO_3 水溶液による精練では、SF 水溶液中に 150 kDa 超の高分子量鎖の存在が認められた。対照的に、2.0、4.0、8.0 wt% のような高濃度 Na_2CO_3 水溶液による精練では、75 kDa から 150 kDa にかけて幅広い分子量分布が確認された。特に、8.0 wt% の場合では、100 kDa 未満の低分子量鎖の存在が明らかとなった。尚、すべての SF 水溶液において確認される 25 kDa 付近のバンドは、L 鎖ならびに p25 を示す。

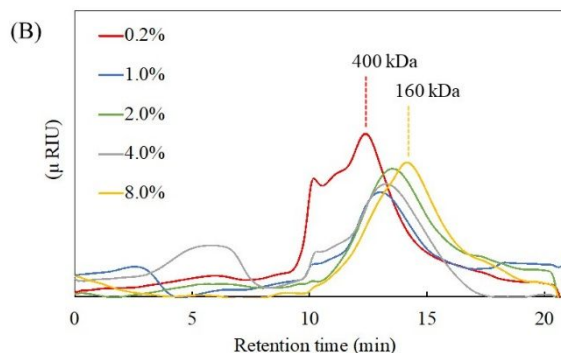
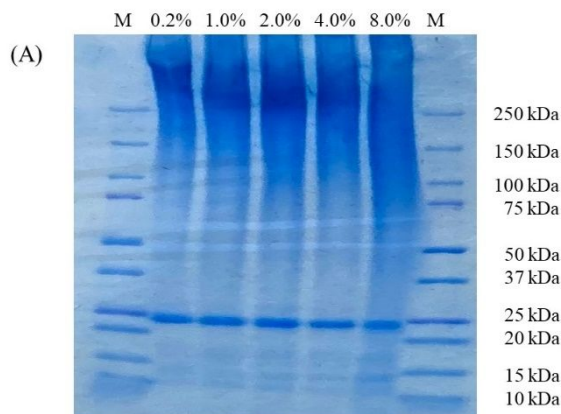


図 1. SF 水溶液の分子量分布

(2) SF フィルムの機械特性

図 2 に示す通り、D1.0 の引張強度は、すべての SF フィルムの中で有意に高いことが認められた。一方で、D8.0 は、最も低い値を呈した。ここには示さないが、破断ひずみについても同様の傾向が確認された。これらの結果は、分子量分布がフィルムの機械特性に影響を及ぼすことを示唆する。以降の実験では、D1.0 と D8.0 にフォーカスした。機械的安定性と SF 分子鎖間の物理的架橋の程度との間に相関性があることが報じられている^[4]。つまり、D8.0 の場合、100 kDa 未満の低分子量鎖の含有量が多いため、SF 鎖間の分子間相互作用が妨げられたと推察される。

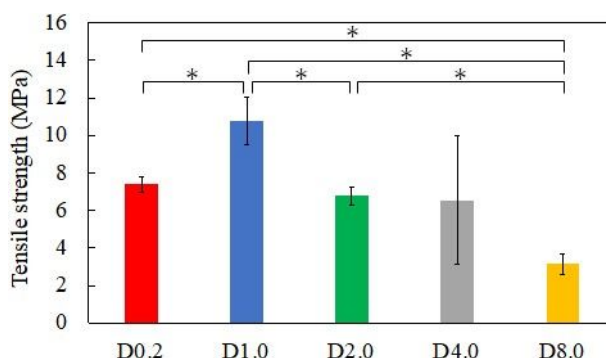


図 2. SF フィルムの引張強度

(3) SF フィルムの分解性

図 3 に示す通り、D1.0 は、E-MEM に浸漬して 72 時間後に浸漬前の約 73% の重量を保持していた。対照的に、D8.0 の場合、3 分以内に分解 (溶解) した。このように、100kDa 未満の低分子量鎖の含有量が多い SF フィルムは溶解速度が大きいことが立証された。つまり、SF 分子量分布の違いが、得られる構造体の結晶性に影響することを示唆する^[5]。尚、優れた結晶性を有する D1.0 は、72 時間後に完全に溶解することはなかったが、約 150% の大きさに膨潤することが明らかになった。

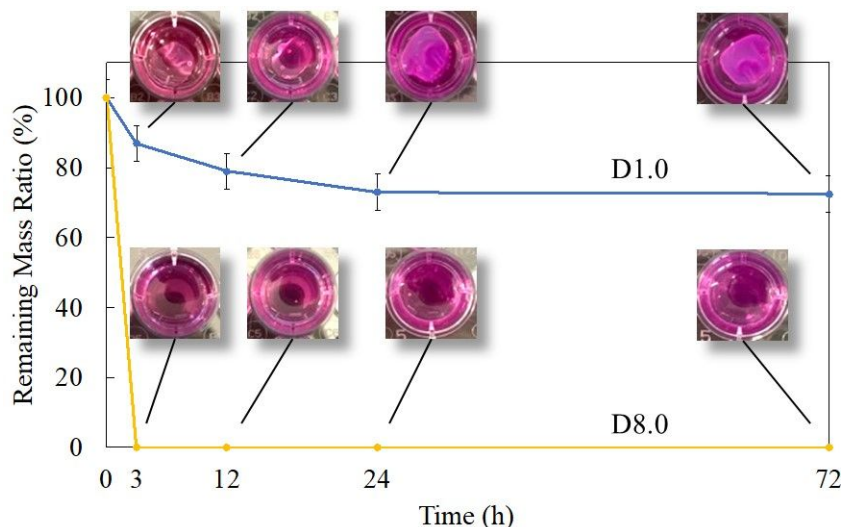


図 3. SF フィルムの分解性

(4) SF フィルムの細胞接着性

培養して 3 時間後に、D1.0 表面の V-79 細胞の密度は、TCPS (Control) と比較してはるかに低かった (図 4)。Control 表面では V-79 細胞が広がって接着しているのに対して、D1.0 表面の V-79 細胞は球形を呈した。D1.0 表面の V-79 細胞は、24 時間後には増殖を認めたが、依然としてその球形のままであった。この細胞応答は、膨潤性を有する D1.0 が足場として不安定であることを示唆する。対照的に、高い溶解性を有する D8.0 は、V-79 細胞を接着させるほど形態を維持することができなかった。つまり、D8.0 表面は、D1.0 表面と比較してはるかに不安定であった。尚、ここには示さないが、いずれの SF フィルムにも細胞毒性は確認されなかった。分子状態の制御は、スキャフォールドの要求仕様に応じた効果的な機能の付与を可能にするであろう。

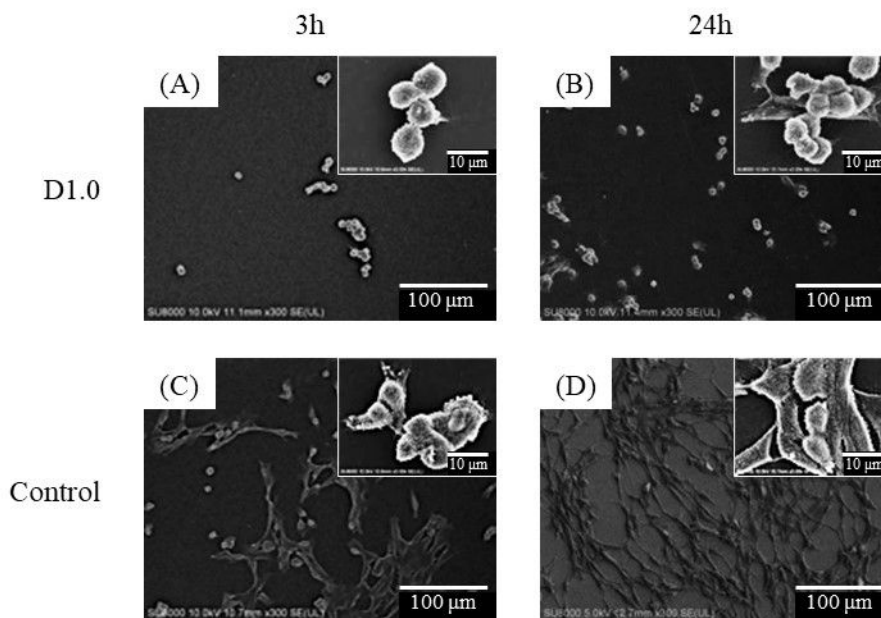


図 4. SF フィルムの細胞接着性

【参考文献】

- [1] Y. Tamada, *Sanshi-Konchu Biotec*, 2007, 76, 1-4.
- [2] T. Asakura, et al, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5, 5561-5577.
- [3] BOO. Boni, et al, *Macro Molecular Bioscience*, 2022, 22, 2100292.
- [4] K. Wei, et al, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2011, 97, 3273.
- [5] A. Sagnella, et al, *Royal Society of Chemistry*, 2016, 6, 9304-9314.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原田 昌弥, 佐々木 誠, 徐 薇, 神戸 裕介, 亀田 恒徳, 新留 琢郎
2. 発表標題 シルクフィブロインフィルムの機能に及ぼす精練条件の影響
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田 昌弥, 佐々木 誠, 徐 薇, 神戸 裕介, 亀田 恒徳, 新留 琢郎
2. 発表標題 精練によるシルクフィブロインフィルムの性状制御
3. 学会等名 2023年度繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaya Harada, Makoto Sasaki, Wei Xu, Yusuke Kambe, Tsunenori Kameda, Takuro Niidome
2. 発表標題 Effect of Silk Degumming Conditions on the Function of Silk Fibroin Film
3. 学会等名 The 18th International Student Conference on Advanced Science and Technology (ICAST) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------