

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03020

研究課題名(和文)次世代型心臓弁の創出を指向したシルクフィブロイン構造-機能相関の解明

研究課題名(英文)Clarification of structure-function correlation of silk fibroin for Next Generation Heart Valve

研究代表者

中澤 靖元 (NAKAZAWA, Yasumoto)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20456255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、緩やかな分解性を有するシルクフィブロイン(SF)と、熱可塑性ポリウレタン(PU)、または吸収性カーボネート系合成高分子(PU)を混合し、組織再生と生体吸収性を併せ持った組織工学材料の作製を試みた。検討の結果、それぞれのナノファイバーを主体とするシート材料の作製に成功した。得られたシート材料は、物性の向上、炎症製や石灰化抑制、さらに組織再生について良好な結果を示すことができた。しかしながら、動物埋植実験により、シート内部への細胞や組織の浸潤は軽度であることがわかった。今後本研究の継続的な実施により、吸収型心臓弁に適用可能な新規材料の提案を目指す。

研究成果の概要(英文)：Silk fibroin (SF) is a biodegradable material, however, it lacks the elasticity required for a artificial heart valves. Polyurethane (PU) and polycarbonate(PC) are well-known for elastomer so this study focused on a SF-PU or SF-PC composite materials for tissue engineering materials, especially regeneration heart valves. As a result, we succeeded in nano-fiber sheets material. And each materials were able to exhibit good results in terms of improvement in physical properties, inhibition of inflammation and calcification, and tissue regeneration. However, it was found that infiltration of cells and tissues into the interior of the sheet was slight by animal implantation experiments. Continuing this research, we aim to propose new materials applicable to absorbable heart valves in the future.

研究分野：組織工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：組織工学 心臓弁 シルクフィブロイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 人工心臓弁の現状

人工心臓弁は、心臓弁の機能不全等において外科的に使用する医療機器であり、我が国では、年間約1万人の患者が手術を受けている。近年の弁膜症治療の動向として、自己弁温存型、あるいは、自己修復能や成長性を期待した弁形成術の適応拡大も行われているが、著しい変性を帰した場合においては、人工心臓弁を用いた弁置換術が行われている。現在主に用いられている人工心臓弁は、無機材料で作製された機械弁、および、ウシ心膜由来の生体弁である。我が国では、耐久性のある機械弁の使用が主流である。

(2) 人工心臓弁の課題

機械弁は移植後血栓化による脳梗塞などの重症合併症があるため、ワーファリン等の抗凝固剤を生涯にわたり服用する必要がある。一方の生体弁についても耐久年数が患者によって大きく異なる上、石灰化等の問題も挙げられる。また、小児心臓外科分野では、成長に伴う人工弁サイズミスマッチが起こり、成長につれて人工弁の再置換術を要し、精神的・肉体的負担が大きい。

さらに、現在使用されている心臓弁は、すべて「非吸収性」であり、組織再生を目的とした設計を行っていない。再生型人工心臓弁が完成すれば、生物学的な成長、修復機能が働き、より長い耐久性が見込まれる。さらに、完全な生体適合性を有するため、感染や抗血栓性をきたしにくいと考えられ、上述の課題は解消する。

(3) 再生型人工心臓弁を目指して

このような状況の中、組織工学的に弁再生創出を目指した、次世代型人工心臓弁の研究が行われている。ポリグリコール酸繊維とポリ乳酸繊維を混合した不織布状のシートを心臓弁に成形し、間葉系幹細胞を培養後、ヒツジの右室流出路に移植を行った研究では、移植後の弁内の狭窄は認められず、弁構造については、弁組織のリモデリングが生じていることを報告している [*J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **139**, 723-731 (2010)]。また、心臓弁の鋳型となるシリコン等の人工物を体内に留置することで、結合組織によるカプセル化反応を促して作成された生体弁は、拒絶反応がない上、高圧系においても自己弁に近い機能が確認されている [*J. Artif. Organs*, **16**, 176-184 (2013)]。他にも、腸粘膜下組織や心臓弁を脱細胞化した同種組織や異種組織の利用も研究されている。

2. 研究の目的

以上より、求められる新規な人工心臓弁の材料としては下記の2項目であると考えられる。心臓弁に適した耐久性および力学的特性を有する材料。
移植後に適切な組織が導入され、心臓弁としての強度および生体適合性が増強する材料。

現状では、材料の強度が心臓弁に対応できていない点や半年ほどで機能不全に陥る点等、多くの課題が残されており、新たな素材開発を含めた研究が必要不可欠である。

そこで本研究では、下記要件を満たす新規材料の創出を目指す。

- (1) 弁膜に必要な力学的性質・分解性の付与
- (2) 組織再生する人工心臓弁の創出

3. 研究の方法

(1) 弁膜に必要な力学的性質・分解性の付与

SF 基盤心臓弁の網羅的な作製条件の検討を実施する。人工心臓弁としての物性-構造相関を得るための知見を取得する。特に、NMR法による劣化解析法の確立を目指す。

また、前年に作製した心臓弁に対し、拍動下による種々の物性-構造解析を行う。

(2) 組織再生する人工心臓弁の創出

(1)において作製した心臓弁表面に対し、血管内皮細胞増殖因子、多糖類、細胞外マトリックス様素材の固定化を検討する。また、動物実験による機能解析を行う。

4. 研究成果

本研究では、SFを基盤とする再生弁材料に適切な物性を付与すべく、SFに他の生体材料、高分子材料の複合化を検討した。すなわち、SFに対し、「弾性素材」それぞれの組合せ、組成比、プロセッシング法（結晶化度制御）の網羅的条件検討により、上述した心臓弁の物性を引き出すことが可能な材料の探索を行った。複合化には、混合のみならず、SFへの効率的架橋反応の検討も行い、最適な作製法について検討した。具体的な弾性素材としては、ウレタン系高分子化合物、カーボネート系高分子化合物、エラスチン、コラーゲンなどについて検討を行った。以下、ポリウレタン(PU)およびポリポリカーボネートとSFの混合シートについて、詳細に述べる。

(1) SF/PU混合シートによる検討

SFはタンパク質でありながら、ウレタン系高分子との混和性が高く、SF-PUブレンド材料がSFを基盤とした軟組織へ応用可能な材料創出に有効である可能性が示唆されている。本研究では、混合比の異なる熱可塑性ポリウレタンとSFのブレンドによるナノファイバーシートを作製し、微細構造、混和性、力学特性の測定およびラット腹部動脈への埋植試験により、心臓弁をはじめとした、としての有用性を考察した。

作製したSF/PU混合シートのSEM観察の結果より、SF/PU混合シートは、繊維径約1 μ mの長繊維から構成される不織布を形成していた。

固体¹³C CP/MAS NMRによる解析から、SF結晶は、 β -sheet構造のみならず、一部が β -turnの反復構造も形成していることが示された。また、含水状態の試料は、乾燥状態より、 β -turn反復構造の形成が顕著であることも明確に見出された。このような構造の変

化は他種のポリウレタンとの混合においても確認されている。また、含水状態におけるSF/PU 混合シートの動的粘弾性測定の結果からは、乾燥状態と比較して貯蔵弾性率の有意な減少と損失正接($\tan \delta$)の上昇が認められており、 β -turnの反復構造が形成するドメインと物性の相関が示唆される。次に、SF分子とPU分子の相溶性を検討するため、NMR法による T_1^H 緩和時間測定を行った。SF/PU混合シート(混合比5:5)の T_1^H 緩和時間は、SF Ala C β ピークが0.739sec、PU CH₂ピークが0.673secであり、単独試料のピークから得られる緩和時間(それぞれ1.013secと0.549sec)と比較して、互いに近似する傾向にあり、SFとPUが相溶状態にあることを示唆する結果が得られた。

得られたSF/PU混合シートについてラット腹部大動脈へ埋植試験を実施した。その結果、埋植1~2週目において中程度の炎症反応が観察されたが、埋植4週目では、SF/PU混合シートに対する過度な炎症は認められず、血管様構造が血管内腔壁に形成されていることが確認された。

Masson trichrome (MTC)染色の結果、膠原線維の一部がシート内へ浸潤しており、組織置換の初期の状態を表しているものと結論づけた。埋植6ヶ月後においては、SF70PU30のSF/PU混合シートの有意な炎症性、内皮化、組織浸潤、エラスチン堆積が認められ、石灰化についても抑制傾向にあった。

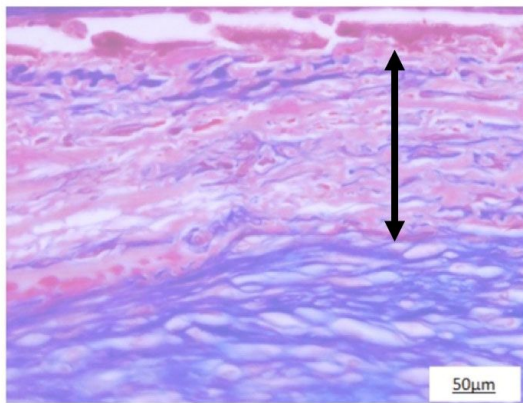


Fig.1 ラット腹部大動脈へ移植後6ヶ月のSF/PU混合シート(混合比70:30)のMTC染色結果。矢印は混合シート層を表す。

(2) SF-PTMC混合シートによる検討

市販されている吸収系に用いられている吸収性材料であるポリトリメチレンカーボネート(PTMC)とSFによる混合材料の検討を実施した。

Fig.2には、エレクトロスピンニング(ESP)法によるSF-PTMC混合シートのSEM像を示す。SF/PTMC混合シートは、PTMC依存的な繊維径の減少を示した。なお、SF/PTMC=30/70については繊維構造を作製することはできなかった。

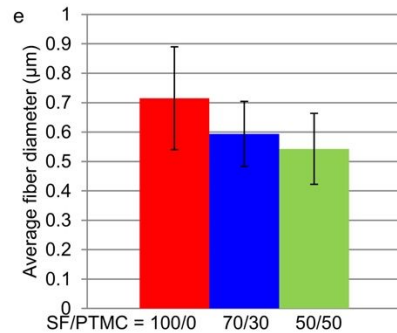
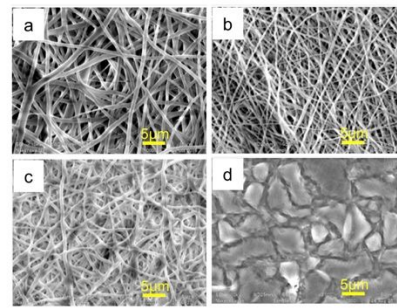


Fig.2 各シートのSEM像および平均繊維径 (a) SF/PTMC=100/0、(b) SF/PTMC=70/30、(c) SF/PTMC=50/50、(d) SF/PTMC=30/70、(e) 各シートの平均繊維径。

Fig.3に作製したSF/PTMC混合シートのSEM-EDSによる元素分析の結果を示した。その結果、酸素、炭素、窒素とともに、SF/PTMC=100/0、70/30、50/50のシート材表面に一様に分布していた。窒素割合は、SF/PTMC=100/0は20.2%、70/30は14.9%、50/50は11.1%となっており、SFの含有量の減少に比例して窒素の割合も減少していた。このことから、作製されたシート材の中でSFとPTMCは均一に分散していることが示された。

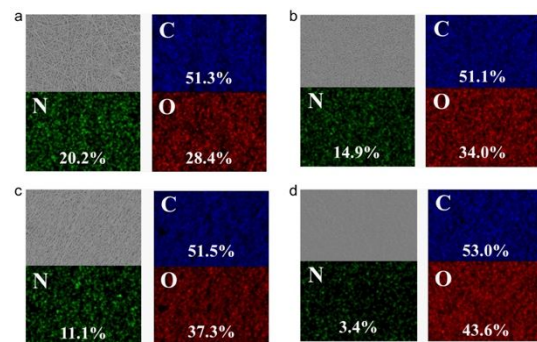


Fig.3 SEM-EDSによる元素分析結果 (a) SF/PTMC=100/0、(b) SF/PTMC=70/30、(c) SF/PTMC=50/50、(d) SF/PTMC=30/70

また繊維形状を維持しているシートにおいて、SFとPTMCの混合による顕著な破断強度の変化なく、破断伸度については、PTMC依存的に増加傾向にあった。一方、弾性率については、PTMC濃度依存的な低下を示しており、PTMCの添加による物性の変化を確認した。

SF/PTMC混合シート(50/50)をn=5でマウ

ス腹腔内に埋植した。HE 染色像を Fig.4 に示す。SF/PTMC 混合シートの周囲においては、埋植後 2 週目に軽度の炎症がみられたが、4 週目には減少傾向にあることが明らかとなった。

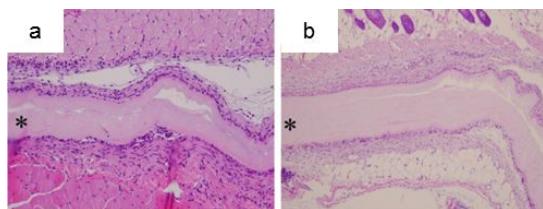


Fig.4 SF/PTMC 混合シート (50/50) の HE 染色像。(a) 2 週間埋植、(b) 4 週間埋植 * は、SF/PTMC 混合シートを示す。

そこで、ピクロシリウスレッド染色により、SF/PTMC 混合シートに積層するコラーゲン線維の厚さから炎症性について考察を行った。結果を Fig. 5 に示す。

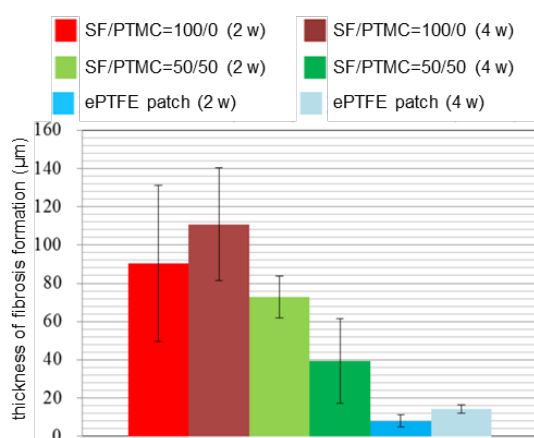


Fig. 5 ピクロシリウスレッド染色から算出したマウス腹腔内に埋植した SF/PTMC 混合シート周囲のコラーゲン線維化厚の比較

市販品である ePTFE 製シート (0.1mm 厚) については、埋植 2 週目、4 週目ともにコラーゲン線維化厚が非常に低い。一方、SF/PTMC 混合シート (50/50) については、ePTFE 製シートと比較して高い線維化厚を示したものの、SF のみで作製したシートと比較して優位に低く、埋植後 4 週目において減少傾向を示している。

以上の結果より、SF/PTMC 混合シートは、生体内において炎症性を示すものの、比較的温和であり、コラーゲン線維層も経時的に減少することが明らかとなった。

さらに本研究では、SF/PTMC 混合シート (50/50) を用いて、ヒツジ肺動脈に弁構造を形成した埋植実験を実施した。

3 ヶ月の埋植期間において、埋植した SF/PTMC 混合シート (50/50) 周囲には、層状のエラスチン堆積層をはじめとした組織再生が生じており、弁再生材料としての有用性を見出した。

以上、本研究では、SF にポリウレタンやポ

リカーボネート等の高分子化合物を混合させることにより、ナノファイバーを主体とするシート材料の作成に成功した。得られたシート材料は、物性の向上、炎症製や石灰化抑制、さらに組織再生について良好な結果を示すことができた。しかしながら、シート内部への細胞や組織の浸潤は軽度であり、組織完全置換を目的とした組織工学材料とするためには、得られた相溶性、構造的知見を活用し新たな加工に関する設計を進める必要がある。よって本研究の継続的な実施により、弁再生可能な新規材料の提案を目指す。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

田中咲里; Derya Aytemiz; 太良修平; 中澤靖元 「組織工学材料を指向したゲニピン架橋型シルクフィブロイン-エラスチン複合体の作製とキャラクターゼーション」高分子論文集, 75, 80-83 (2017). 査読あり DOI: 10.1295/koron.2017-0068
田尻弘和; 久保穂菜美; 村上智亮; 吉岡太陽; 秦珠子; 亀田恒徳; 中澤千香子; 太良修平; 中澤靖元 「精練法の異なる家蚕シルクフィブロインの組織工学材料としての評価」高分子論文集, 75, 54-60 (2017). 査読あり

DOI: 10.1295/koron.2017-0069

Fukuda, Y.; Aytemiz, D.; Higuchi, A.; Ichida, Y.; Asakura, T.; Kameda, T.; Nakazawa, Y. Relationship Between Structure and Physical Strength of Silk Fibroin Nanofiber Sheet Depending on Insolubilization Treatment. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, 134, 45560 (2017). 査読あり

DOI: 10.1002/app.45560

Shimada, K.; Higuchi, A.; Kubo, R.; Murakami, T.; Nakazawa, Y.; Tanaka, R. The Effect of a Silk Fibroin/Polyurethane Blend Patch on Rat Vessels. *Organogenesis*, 13, 115-124 (2017). 査読あり

DOI: 10.1080/15476278.2017.1344376

Chantawong, P.; Tanaka, T.; Umemura, A.; Shimada, K.; Higuchi, A.; Tajiri, H.; Sakura, K.; Murakami T.; Nakazawa, Y.; Tanaka, R. Silk fibroin-Pellethane® cardiovascular patches: Effect of silk fibroin concentration on vascular remodeling in rat model. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 28, 191 (2017). 査読あり DOI: 10.1007/s10856-017-5999-z

Nakazawa, C. T.; Higuchi, A.; Asano, A.; Kameda, T.; Aytemiz, D.; Nakazawa, Y. Solid-state NMR studies for the development of non-woven biomaterials based on silk fibroin and polyurethane. *Polym. J.*, 49, 583-586 (2017). 査読あり

DOI: 10.1038/pj.2017.16

Tsukawaki, S.; Murakami, T.; Suzuki, K.; Nakazawa, Y. Studies on the potential risk

of amyloidosis from exposure to silk fibroin. *Biomad. Mater.*, 11, 065010 (2016).
査読あり
DOI: 10.1088/1748-6041/11/6/065010
Numata, K.; Kurokawa, H.; Kawaguchi, S.; Sekine, S.; Nakazawa, Y.; Asano, A.
Evaluation of sealability for aged rubber seals by spin-spin relaxation time. *Polym. Test*, 49, 147-155 (2016). 査読あり
DOI: 10.1016/j.polymertesting.2015.11.005

〔学会発表〕(計 20 件)

市田雄也・中澤千香子・浅野敦志・中澤靖元、「Try 架橋シルクフィブロインによる新規軟組織工学材料の開発」、繊維学会関東支部平成 29 年度研究交流会 2017 年 12 月
田尻弘和・沼田香織・中澤靖元、「織工学材料への応用を目指したシルクフィブロイン/ポリウレタン複合化不織布の作製と評価」、繊維学会関東支部平成 29 年度研究交流会 2017 年 12 月
中澤靖元・久保穂菜美・坂田智恵美・根本慎太郎・村上智亮・CHANTAWONG Pinkarn・田中綾・中澤千香子・浅野敦志・亀田恒徳、「心血管系組織工学材料を指向した新規シルクフィブロインシートの創製」、第 66 回高分子討論会 2017 年 9 月
Yasumoto Nakazawa, "Development of Tissue-Engineered Cardiac Patch based on Silk Fibroin", 44th ESAO and 7th IFAO Congress 2017 年 9 月
市田雄也・中澤靖元、「軟組織再生を指向したシルクフィブロイン分子架橋による新規組織工学材料の創製」、第 55 回日本人工臓器学会大会 2017 年 9 月
市田雄也・浅野敦志・中澤千香子・中澤靖元、「軟組織再生を指向した Tyr 架橋シルクフィブロイン材料の物性・構造解析」、第 46 回医用高分子シンポジウム 2017 年 7 月
久保穂菜美・村上智亮・秦珠子・亀田恒徳・太良修平・中澤靖元、「組織工学材料を指向した B.mori シルクフィブロインの生体適合性研究」、第 38 回日本炎症・再生医学会 2017 年 7 月
市田雄也・中澤靖元・中澤千香子・浅野敦志、「Tyr を介した化学修飾によるシルクフィブロイン軟組織工学材料の開発」、平成 29 年度繊維学会年次大会 2017 年 6 月
福田泰弘・Derya Aytemiz・樋口朗・市田雄也・朝倉哲郎・中澤靖元・亀田恒徳、「医用材料を指向したシルクフィブロイン静電紡糸シートの作製と物性および構造解析」、第 64 回日本シルク学会研究発表会 2017 年 5 月
中澤靖元、「組織工学材料を指向したシルクフィブロイン/ポリウレタン複合化

材料の創製」、第 16 回日本再生医療学会総会 2017 年 3 月
遠藤達也・中澤靖元、「柔軟性を付与したシルクフィブロイン基盤材料の作製」、つくば医工連携フォーラム 2017 年 1 月
田中咲里・岩本脩成・太良修平・村上智亮・中澤靖元、「組織再生型人工弁を指向したエラスチン架橋型シルクフィブロインの作製と評価」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 年 11 月
高濱晃大・島田香寿美・田中綾・村上智亮・中澤靖元、「表面修飾によるシルクフィブロイン基盤デバイスの作製と冠血管新生シートへの応用」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 年 11 月
高濱晃大・久保亮太・田中綾・島田香寿美・亀田恒徳・中澤靖元、「機能性分子を固定化したシルクフィブロインの作製と冠血管新生シートへの応用」、第 63 回日本シルク学会研究発表会 2016 年 7 月
中澤靖元・富永洋一・浅野敦志・中澤千香子・田中綾・村上智亮・根本慎太郎・亀田恒徳・吉岡太陽、「心臓修復パッチを指向したシルクフィブロイン/ポリウレタン複合化材料の開発」、平成 28 年度繊維学会年次大会 2016 年 6 月
中澤靖元・亀田恒徳・富永洋一・田中綾・根本慎太郎、「循環器系組織工学材料を指向したシルクフィブロインスキャフォールドの開発」、つくば医工連携フォーラム 2016 年 1 月
久保亮太・島田香寿美・田中綾・中澤靖元、「心臓修復パッチ材料への応用を目指したヘパリン修飾シルクフィブロインの作製」、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月
樋口朗・久保亮太・中澤千香子・浅野敦志・島田香寿美・田中綾・吉岡太陽・亀田恒徳・中澤靖元、「心臓修復パッチを指向したシルクフィブロイン/医療用ポリウレタン複合材料の構造解析」、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月
沼田香織・黒川英人・関根素馨・中澤靖元・浅野敦志、「ゴム材料の劣化挙動と分子運動の温度依存性の経時変化の関係」、第 64 回高分子討論会 2015 年 9 月
Kaori Numata, Hidehito Kurokawa, Sokei Sekine, Yasumoto Nakazawa and Atsushi Asano, "Correlation between the degradation of sealability and spin-spin relaxation time of rubber seals", The 31st Polymer Degradation Discussion Group Conference 2015 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 靖元 (NAKAZAWA, Yasumoto)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：20456255

(2) 連携研究者

黒部 裕嗣 (KUROBE, Hirotugu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任講師
研究者番号：30380083

浅野 敦志 (ASANO, Atsushi)
防衛大学校・応用化学科・教授
研究者番号：90545972

(3) 研究協力者

村上 智亮 (MURAKAMI, Tomoaki)
東京農工大学・大学院農学研究院・助教
太良 修平 (TARA, Shuhei)
日本医科大学・附属病院・講師