

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05232

研究課題名（和文）絹フィブロインの構造制御による安全かつ安価な細胞足場材の開発

研究課題名（英文）Development of cell scaffold material with low environmental impact by controlling the conformation of silk fibroin

研究代表者

鈴木 悠（Suzuki, Yu）

福井大学・学術研究院工学系部門・准教授

研究者番号：90600263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シルクフィブロイン（SF）は力学強度、生体親和性、成形加工性の高さから注目を集めるが、主に使用される溶剤は高価かつ健康や環境への影響が問題となる。そこで本研究では、SFの立体構造の制御によりSF水溶液から高強度ナノファイバーマットの作製を目指した。一般的に再生SFは天然SFに比べ分子量が低下しており、分子量を維持した再生SFの調製法を確立した。この未分解SF水溶液を用いてナノファイバーマットを作製し、二次構造、機械的特性、細胞親和性を評価した結果、未分解SFは分解SFに比べ機械的特性および生体適合性に優れていた。これらの結果から、未分解SFのバイオマテリアル分野における新たな可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、環境負荷の低いバイオマテリアルの開発への重要なステップである。シルクフィブロイン（SF）は、その力学強度、生体親和性、成形加工性の高さから注目されているが、その使用には高価な溶剤や健康、環境への影響が障壁となっていた。本研究ではこれらの問題を克服するため、未分解SF水溶液を用いて高強度のナノファイバーマットを作製した。この手法により、分子量が低下しやすい再生SFを未分解状態で保持し、バイオマテリアルの機械的特性と生体適合性を向上させることに成功した。これにより、SFのバイオマテリアル分野における新たな可能性が示され、これまでの課題を解決しながら持続可能な材料を提供することができる。

研究成果の概要（英文）：Silk fibroin (SF) has attracted attention for its mechanical strength, biocompatibility, and formability, but the solvents mainly used are expensive and have health and environmental impact issues. Therefore, this study aimed to fabricate high-strength nanofiber mats from SF aqueous solution by controlling the higher order structure of SF. In general, the molecular weight of regenerated SF is lower than that of natural SF, and we established a method for preparing regenerated SF that maintains its molecular weight. Nanofiber mats were prepared using the undegraded SF solution, and the secondary structure, mechanical properties, and biocompatibility were evaluated. The results showed that the undegraded SF had superior mechanical properties and biocompatibility compared to the degraded SF. These results indicate new possibilities of undegraded SF in the field of biomaterials.

研究分野：天然高分子

キーワード：シルク フィブロイン 水溶液 ナノファイバーマット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞・ES 細胞の研究が急速に進み、再生医療の臨床応用も進められている。再生医療においては細胞だけでなく、細胞が増殖・分化しやすい周辺環境の構築、すなわち細胞足場材の役割が重要である。細胞足場材には、生体親和性、強度保持、生体吸収性、再生の場の空間確保、といった特徴が求められる。これらすべての条件を満足する足場材はいまだ開発されていない。細胞外マトリックスの構成成分であるコラーゲンは、生体親和性には優れるが、力学強度が低く硬組織の足場材には不向きである。また、生体吸収性合成高分子のポリ乳酸は、形状を保つのに必要な力学強度を持つものの、生体親和性が低い。そこで、これらの条件を満足する材料として、フィブロインに着目した。

フィブロインは、蚕の作る絹の構成タンパク質である。縫合糸として使用されていた実績があり高い生体親和性を有する。さらに、コラーゲンやポリ乳酸に比べ高い力学強度を持ちながら、タンパク質であるため生分解性を有する。成形加工性にも優れており、フィルム、スポンジ、ナノファイバーマット等への加工が可能である。特に、エレクトロスピンニング法により作製したナノファイバーマットは、細胞外マトリックスと近似したサイズを有し、組織が再生しやすい環境を提供できるため、細胞足場材に最も適している。

現状では、フィブロインの溶剤としてフッ素系溶媒のヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)が主に用いられている。HFIP は高価であること(100ml あたり 27,000 円)、残余溶媒による健康被害が懸念されること、環境負荷の観点から、フィブロイン水溶液からナノファイバーマットの作製が求められる。しかし、エレクトロスピンニングに用いる高濃度フィブロイン水溶液は粘度が非常に高く、押出し時にシリンジが詰まり継続的なスピニングが困難である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、カイコの吐糸メカニズムを模倣し、溶液中のフィブロインの立体構造を制御することで、高濃度フィブロイン水溶液を調製し、それを用いて高強度ナノファイバーマットを作製することを目的として研究を行った。

カイコ体内のフィブロインの立体構造は、主に溶液および固体 NMR 法を用いてβターンの繰り返し構造であることが明らかとなっている。一方で、フィブロインを成形加工する際に用いられる再生フィブロイン水溶液は、ランダムコイル構造である。ランダムコイル構造では、高濃度になると分子鎖の絡み合いなどで粘度が高まり、細いノズルの通過中に凝集し詰まりやすい。再生フィブロイン水溶液において天然フィブロイン水溶液と同等の立体構造を形成させることで、粘度の低い高濃度フィブロイン水溶液の調製と、連続的なエレクトロスピンニングによるナノファイバーマット作製が可能になると考えた。

それでは、カイコ体内のフィブロイン水溶液はβターン繰り返し構造を形成しているのに対し、繭を溶かして調製した再生フィブロイン水溶液はランダムコイル構造であるのは、なぜだろうか。その要因のひとつに分子量の差がある。家蚕繭を構成する糸は、フィブロイン繊維がセリシンでコートされている。繭から糸取りをして生糸とし、精練処理を行ってセリシンを除去しフィブロイン繊維を得る。フィブロインとセリシンはともにタンパク質で、フィブロインは H 鎖(392 kDa)、L 鎖(25kDa)、P25(30kDa)から構成され、セリシンは分子量の異なる複数種が存在する。炭酸ナトリウム水溶液中で煮沸する方法が最も一般的な精練方法として知られているが、この方法により調製した再生フィブロインの電気泳動では、分子量約 10 kDa - 200 kDa の間にスミアなバンドが生じ、フィブロインの分解が起こっていることが明らかとなっている。このように分子量が低下した分解フィブロインでは、天然のフィブロインと同様の高次構造を形成するのは困難であると考えられる。そこで、本研究では、フィブロインが分解しない精練方法を検討し、未分解フィブロインを用いたナノファイバーマットの作製、および未分解フィブロインと分解フィブロインとの間の二次構造、機械的特性、細胞親和性等の比較評価を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 再生フィブロイン水溶液の調製

家蚕繭を糸取りして生糸を得、0.05%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液 700mL に生糸 4g を加え、精練温度と精練時間を変えて精練を行い、一晚室温で乾燥したものを精練糸とした。9M LiBr 水溶液 30ml に精練糸 3g を加え、37℃、200rpm で 90 分攪拌し溶解した。得られたフィブロイン溶液を再生セルロース透析チューブ(12,000-14,000MWC0, Fisherbrand)に入れ 4℃ で 3 日間透析した。その後、遠心分離(4℃, 8000rpm)により沈殿物を除去し、再生フィブロイン水溶液を調製した。

#### (2) NMR 測定

ECA600 (JEOL REANANCE)、3.2mm プローブ、試料回転速度 10kHz、積算回数 15,000、contact time : 3 ms の条件で、<sup>13</sup>C CP/MAS NMR 測定を実施した。解析ソフトは delta を用いた。

#### (3) 各種物性評価

SDS-PAGE 試料 50  $\mu$ l に同量の電気泳動用サンプルバッファーを加え、95  $^{\circ}$ C で 3 分間加熱し、電気泳動装置を用い 200V で 1 時間電気泳動した。その後、CBB 染色液を用いて染色し蒸留水により脱色した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 試料の一部を切り取り、両面カーボンテープを用いて試料台に固定した。スパッタリング装置を用いて試料表面を Pt 薄膜コーティングし、桌上走査電子顕微鏡にて形態観察を行った。

引張試験 厚紙上 (10  $\times$  30mm) に固定した糸、フィルム、ナノファイバーマットを引張試験機に装着し、室温で試験を行った。規定容量は 100N、引張速度は 1mm/min、サンプル数は n=5 とした。破断までの荷重の中で最も大きい点を初期サンプルの断面面積で割ったものを破断強度、その時のひずみを破断伸度とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 未分解フィブリン水溶液の調製法および未分解フィブリン繊維の物性評価

家蚕繭から未分解フィブリン水溶液の調製法を検討した。その結果、フィブリンの分子量低下は精練温度に大きく影響を受けることが明らかとなり、精練温度 80 度、精練時間 10 分という条件で、フィブリン分子の分子量低下を抑えかつセリシンが除去された水溶液が得られた。

80  $^{\circ}$ C 10 分で精練した糸を未分解繊維、90  $^{\circ}$ C 60 分で精練した糸を分解繊維として各種物性評価を行った。SEM による表面観察の結果、未分解フィブリン繊維は分解フィブリン繊維と同様に繊維表面にセリシンの付着はほぼ確認されなかった。また、引張り試験の結果、未分解繊維は分解繊維に比べ破断応力、破断歪み、靱性が大きく、弾性率は分解繊維の方が大きかった。これらの結果から、未分解繊維は分解繊維に比べ機械的特性に優れることが示された。

##### (2) フィブリンフィルムの作製と物性評価

ナノファイバーマットの作製と物性評価の前段階として、未分解および分解フィブリンフィルムの作製、および立体構造と機械的特性評価を行った。各フィブリンをシャーレに展開・乾燥してフィルムを作製し、ウォーターアニリング法 (WA) によりフィルムを不溶化した。各フィルムについて、固体  $^{13}$ C CPMAS NMR 測定および引張試験を行った。固体  $^{13}$ C CPMAS NMR 測定による二次構造評価の結果、未分解フィルム・分解フィルムとも、不溶化処理により  $\beta$ シート成分が増加し、不溶化処理後は約 35%の  $\beta$ シート成分、約 65%のランダムコイル成分と、 $\beta$ シート成分の割合はほぼ同じであった。引張り試験の結果、不溶化処理前フィルムは、未分解フィルムと分解フィルムで同程度の破断応力を示し、破断歪みは分解フィルムの方が未分解フィルムよりも 30%大きな値となった。WA による不溶化処理により、未分解フィルムは破断応力が 20%大きくなった一方、分解フィルムは破断応力が 50%に減少し、破断歪みが 200%に増加した。このように、不溶化処理前は未分解フィルムと分解フィルムで機械的特性に大きな差はなかったものの、不溶化処理により機械的特性に大きな差が生じることが明らかとなった。

##### (3) フィブリンナノファイバーマットの作製と物性評価

未分解および分解フィブリン水溶液を用い、エレクトロスピンニング法によるナノファイバーマットの作製と各種物性評価を行った。20%ポリエチレングリコール (PEG) 水溶液を外液として再生フィブリン水溶液を透析することで、最終的に約 10%w/w の濃縮 SF 水溶液を得た。粘性の高い水溶液はエレクトロスピンニング時にダマができやすく、細く均質な繊維径の不織布が形成されなかったため、低粘性のフィブリン水溶液の調製方法を pH 変化等により検討した。その結果、直径 500nm 程度のナノファイバーからなるマットが作製できた。

固体  $^{13}$ C CPMAS NMR 測定により二次構造を評価した結果、未分解マットは  $\beta$ シート構造 43%、ランダムコイル構造 57%、分解マットは  $\beta$ シート構造 50%、ランダムコイル構造 49%であり、未分解マットの方が、ランダムコイル構造が若干大きかった。引張試験による機械的特性評価の結果、未分解マットは分解マットに比べ、破断応力は 4.3 倍、弾性率は 1.7 倍、靱性は 3.7 倍であった。一方、破断歪みは未分解と分解でほぼ同じであった。これらの結果から、未分解マットは分解マットに比べ、高い機械的特性を有することが示された。

次に、未分解マットと分解マットの生体適合性を評価した。マットに hMSC 細胞を播種し、細胞培養実験を行った。蛍光顕微鏡と生細胞タイムラプスイメージング装置より培養 1, 3 日後の各マットを観察した結果、未分解マットでは細胞が均一に広がり、分解マットでは不均一な広がりであった。これより、未分解マットが細胞接着および細胞拡散に優れていることが示された。また、接触角測定より未分解マットは分解マットに比べ接触角が大きく、未分解マットの表面は分解マットに比べて親水性が高いことがわかった。未分解マットは分解マットに比べ弾性率が高いことから、未分解フィブリンの高い弾性率と親水性により、細胞接着および細胞拡散が促進されたと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 山口遥香・鈴木悠	4. 巻 15
2. 論文標題 家蚕フィブロインの精練方法の検討および未分解フィブロイン繊維の物性評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 福井大学繊維・マテリアル研究センター年報	6. 最初と最後の頁 8-11
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10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口遥香、山下義裕、鈴木悠
2. 発表標題 未分解フィブロイン溶液の調製と物性評価
3. 学会等名 2021年繊維学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木悠
2. 発表標題 シルク本来の特性を活かした機能性シルク材料開発を目指して
3. 学会等名 令和3年度 福井大学繊維・マテリアル研究センター研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口遥香、鈴木悠
2. 発表標題 未分解フィブロイン水溶液の調製と物性評価
3. 学会等名 令和2年度高分子学会北陸支部若手会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友松未織、森江将太、鈴木悠
2. 発表標題 フィブロインのゾル-ゲル転移における金属イオンの影響
3. 学会等名 令和2年度高分子学会北陸支部若手会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝下真菜、鈴木悠
2. 発表標題 再生絹フィブロイン水溶液の高濃度化
3. 学会等名 令和2年度高分子学会北陸支部若手会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口遥香、鈴木悠
2. 発表標題 未分解フィブロイン水溶液の調製と物性評価
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 四蔵沙也加、鈴木悠
2. 発表標題 フィブロインのゲル化挙動におけるイオンの影響に関するNMR研究
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 島崎天麻、鈴木悠
2. 発表標題 有機溶媒に溶解したシルクの構造評価のためのランダムコイル化学シフトの取得
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 佐藤生弥・鈴木悠
2. 発表標題 未分解再生絹フィブロイン水溶液の調製
3. 学会等名 高分子学会北陸支部若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木悠・佐藤生弥
2. 発表標題 フィブロイン医療材料創製を目指した未分解フィブロイン水溶液調製法の確立
3. 学会等名 福井大学繊維工業センター研究発表会
4. 発表年 2019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
---------	---------