

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04466

研究課題名（和文）組織再生を誘導するシルク製高性能スキャホールドの開発

研究課題名（英文）Development of silk high performance scaffold inducing tissue regeneration

研究代表者

玉田 靖（Tamada, Yasushi）

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：70370666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,300,000円

研究成果の概要（和文）：シルクフィブロイン（SF）基材の組織再生誘導性のメカニズムを解明するため、走査型プローブ顕微鏡による液中での表面分析を行い、組織再生に關与すると思われるSF基材上の高い細胞移動性は、SF基材表面の液中における散漫層形成が要因であることを明らかにした。SF基材への細胞増殖機能の付加を目的に、細胞増殖因子のアンタゴニスト（拮抗物質）をSF分子に融合した機能性SFを遺伝子組換えカイコ技術により作出し、得られたSF基材が細胞増殖性を持つことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織や器官の再生において細胞の足場となるスキャホールドの開発は再生医療において重要な課題となっている。生体安全性に優れたシルクから作製したスキャホールドが組織再生を誘導する可能性が見いだされているが、本研究成果により不明であったそのメカニズムの一端が明らかになり、さらに細胞増殖性機能を付加した機能性シルクスキャホールドの創出に成功したことから、再生医療の実現に向けての新しいスキャホールドの提案が可能となった。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanism of tissue regeneration inducibility of silk fibroin (SF) substrate, surface analysis in liquid with a scanning probe microscope was performed, and it was clarified that the formation of a diffuse layer on the surface of the SF substrate in liquid is a factor for high cell mobility on SF substrate, which is thought to be related with tissue regeneration. For the purpose of adding cell proliferation function to SF substrate, functional SF fused an antagonist peptide sequence of cell growth factor with SF molecule was produced by transgenic silk moth technology, and it was confirmed that the obtained functional SF substrate has cell proliferation activity.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：シルク 再生医療 スキャホールド 表面分析 遺伝子組換えカイコ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞、液性因子、そして足場を使って損失した組織や器官を再生して治療する再生医療は次世代の医療として重要な技術となっている。細胞については iPS 細胞の発明により種々の組織や器官の再生研究が活発に行われ、細胞増殖因子等の液性因子の研究も進んでいる。一方、iPS 細胞を生育するための基材や組織再生のための細胞の足場となる材料研究も生体分解吸収性材料を中心に進められているが、まだ満足いく足場材料(スキャホールド)の開発には至っていない。

シルクは外科用縫合糸として 2500 年以上の使用実績がある生体安全性に優れた材料である。組織再生用スキャホールドとしての研究も今世紀に入り飛躍的に増加している。われわれもシルクフィブロインタパク質 (以下 SF) から作製した SF スポンジが関節軟骨再生用のスキャホールドとして検討を行い、SF スポンジが軟骨再生を促す特性があることを見いだしたり。また、SF 基材で培養した皮膚角化細胞や線維芽細胞の遺伝子発現を DNA チップや定量 PCR 法により検討した結果、皮膚組織の代謝や創傷治癒に関わる遺伝子発現がコラーゲン基材と比較して向上していることを見だし、SF 基材が組織再生や組織修復に有効に働くスキャホールドになり得る可能性を示唆した²⁾。また、SF フィルム上で培養した細胞は播種初期に他の基材と比較して顕著に移動性が高い事も見だし、SF 基材の組織再生に対する特異性発現の要因の 1 つである可能性が考えられた。

2000 年にカイコの遺伝子組換え技術が開発され。カイコが産生する SF についても遺伝子レベルでの設計により、合目的に設計した SF を遺伝子組換えカイコにより産生することが可能となっている。われわれも再生医療用スキャホールドとしての機能付加を目的に、細胞接着配列や細胞増殖因子を融合した遺伝子組換え SF の作製に成功した³⁾。

2. 研究の目的

(1) SF 基材をスキャホールドに使用することで組織再生や創傷治癒が促される可能性が見いだし、その要因の 1 つとして SF 基材上での活発な細胞移動性にあることが推察されている。しかし、その細胞移動性が SF 基材のどのような物性により惹起されるのかというメカニズムは不明である。このメカニズムが理解できれば、SF が組織再生スキャホールドとして組織再生を促す要因を明確にすることができる。そこで、本研究では SF 基材の表面物性に着目し、SF 基材の調製方法を変化させることによる表面構造や表面物性の変化、およびその変化に伴う細胞移動性の変化を調査し、そのメカニズムの解明を目的とした。

(2) 細胞接着因子や細胞増殖因子を SF に融合した遺伝子組換え SF は、細胞接着や細胞増殖を向上させることが確認され組織再生スキャホールドとしての SF 基材の機能化が可能であることが分かったが、繭糸から SF を抽出しフィルムやスポンジに加工することで、細胞増殖因子の活性が失われることが確認された。抽出時の熱アルカリ処理により融合した細胞増殖因子の失活が避けられないためと思われた。そこで、細胞増殖因子を融合するのではなく細胞増殖因子と結合するアンタゴニストを SF に融合することで、加工後の SF 基材への細胞増殖因子の結合を促すことができる機能を付加した再生医療用 SF スキャホールドの作出を目指し、遺伝子組換えカイコ技術を活用して細胞増殖性付加 SF を作出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 常法に従い調製した SF 水溶液をガラスボトム培養シャーレあるいはマイカ上にディップコーティングあるいはスピンコーティングし、乾燥後 70~90%メタノール水溶液により後処理を行い SF 基材を作製した。SF の分子量の影響の検討では、SF 水溶液から硫酸分画により分子量分布範囲の異なる SF 水溶液から SF 基材を作製した。ガラスボトム培養シャーレ SF 基材上で細胞の移動性の評価を行い、マイカ上 SF 基材の表面物性について走査型プローブ顕微鏡 (SPM) により大気中と液中にて表面ラフネスと表面弾性率を測定した。また、水に対する接触角測定と表面電位 (ゼータ電位) の表面のマクロな物性も確認した。細胞移動性が大きく異なる SF 基材上で培養した細胞の遺伝子発現調査のために RNAseq 試料の調製を行った。

(2) 遺伝子組換えカイコは、*piggyBac* システムにより作製した。細胞増殖因子である bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) のアンタゴニストである P7 ペプチドの配列を SF 分子の L 鎖タンパク質の C 末端に融合したプラズミドにより遺伝子組換えカイコを作出し、得られた遺伝子組換え繭から遺伝子組換え SF (p7-SF) 水溶液を調製した。P7-SF の bFGF 結合性を水晶発振器微量天秤 (QCM) や表面プラズモン共鳴法 (BIAcore) を用いて確認し、さらに細胞増殖性を評価した。

4. 研究成果

(1) SF 基材表面の細胞移動性発現メカニズムの解明

①SF 水溶液の添加

SF 基材上での細胞の活発な動きが、SF 基材から溶出した SF 分子が影響するかどうかについて調査するために、培地に種々の濃度の SF 水溶液を添加し、添加による細胞移動性の変化について検討した。結果を図 1 に示したが、広範な濃度範囲で SF 水溶液を添加しても細胞移動性の顕著な変化は観察されなかった。すなわち、SF 基材上での高い細胞移動性は、SF 基材から溶出した SF 分子によるものではなく SF 基材の表面物性に依るものと考えられた。

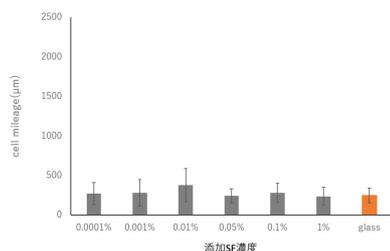


図 1 SF 水溶液添加による細胞移動性の影響

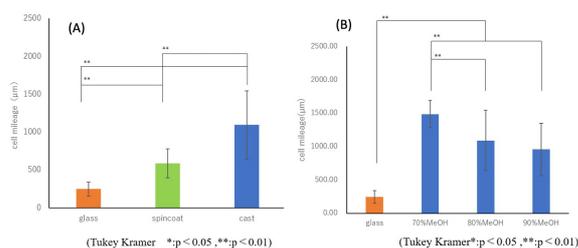


図 2 SF 基材調製法の違いによる SF 基材上での細胞移動性の変化

② 基材調製法の影響

SF 水溶液のコーティング手法による細胞移動性の影響を調べるために、スピンコーティングとディップコーティングにより SF 基材を作製し細胞移動性を評価した。図 2(A) に示すように、興味あることにスピンコーティングではディップコーティングよりも細胞移動性が低いことが分かった。両者により SF コーティングフィルムの厚みが異なると考えられるが、細胞移動性に与える要因については後述する。細胞移動性が高いディップコーティングフィルムを用いて、SF 基材の不溶化処理で使用されるメタノール処理を行う場合のメタノール濃度の変化による細胞移動性の影響を検討した。結果を図 2(B) に示したが、メタノール処理濃度により細胞移動性が変化し、メタノール処理濃度が低いほど細胞移動性が高いことが示された。メタノール濃度が 70% より低い濃度も試みたが、不溶化が十分に行われずにフィルムが溶解したため評価ができなかった。

③ 表面ラフネス

前項までの結果から、同じ SF 基材でありながら作製手法やエタノールによる後処理条件により細胞移動性が大きく異なることが判明した。そこで、細胞移動性が大きく異なるスピンコーティング+80%メタノール処理、ディップコーティング+80%メタノール処理、ディップコーティング+70%メタノール処理の各試料の表面ラフネスを大気中と液中で観察した。液中での観察結果を図 3 に示した。また、画像より表面の平均ラフネスを算出し、それぞれの SF 基材表面の大気中と液中での平均ラフネスを比較 (図 4) したところ、SF 基材作製法やメタノール処理濃度により表面ラフネスが異なることが分かった。特に液中においては、各試料間での平均ラフネスが大きく異なり、スピンコート < ディップコート << 70%メタノール処理となった。これは図 2(A) に示したように細胞移動性の大きさと同じ傾向を示しており、SF 基材上での細胞移動性は表面ラフネスに影響されることが分かった。また、大気中観察と液中観察ではその平均ラフネスが液中では大きくなり、SF 基材表面は液中において散漫的な表面層を形成していることが推察できる。

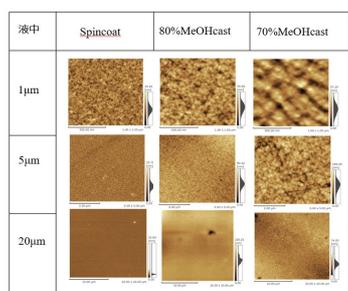


図 3 調製方法が異なる SF 基材の SPM による液中での表面観察像

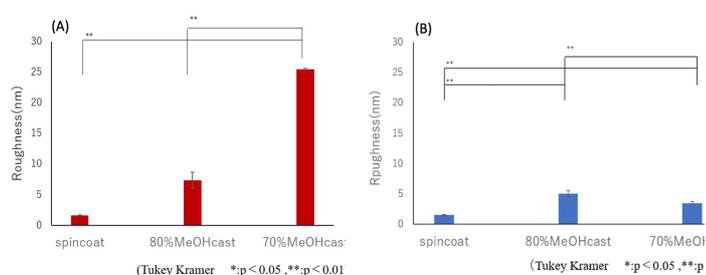


図 4 調製方法が異なる SF 基材上の SPM の表面観察から算出した平均ラフネス。(A)液中観察、(B)大気中観察

④表面弾性率

基材の表面弾性率が、間葉系幹細胞の分化方向を決定することがみだされている⁴⁾ように、細胞の状態や動態に基材の表面弾性率が大きく関わっていると考えられる。そこで前述した細胞移動性が大きく異なる3種のSF基材の表面弾性率を大気中と液中でSPMのフォースカーブから算出した。液中および大気中での結果を図5(A)と(B)にそれぞれ示した。大気中においては、各SF基材の表面弾性率に

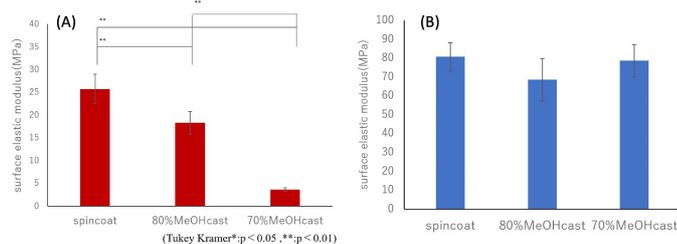


図5 調製方法が異なるSF基材上のSPMのフォースカーブ測定から算出された表面弾性率。(A)液中観察、(B)大気中観察

優位な差は観察されなかったが、液中においては各試料間で違いがありスピコート>ディップコート>70%メタノール処理の順で小さくなった。液中においてはSF基材の作製方法により表面の柔らかさが異なり、それに応じて基材上での細胞移動性が変化することを示唆している。すなわち、表面弾性率が低い基材上では細胞移動性が高いと考えられる。

以上の結果より、液中において大きい表面ラフネスと低い表面弾性率を持つSF基材上で高い細胞移動性を発現することが分かり、SF基材上での細胞移動性発現のメカニズムの一端が解明できた。スピコート基材では、液中においても小さい表面ラフネスと高い表面弾性率のために細胞移動性が比較的低いと考えられるが、スピコーティングによりなぜこのような表面が形成されるのかは今後の検討課題となる。

⑤遺伝子発現

細胞移動性の異なる前述3種のSF基材上で培養した細胞の遺伝子発現について組織再生に強く関与すると考えられているbFGFおよびトランスフォーミング増殖因子(TGFβ)について評価した結果を図6に示した。細胞移動性が高い表面で培養した細胞ほど、これらの遺伝子発現が亢進していることが分かった。すなわち、細胞移動性が高いSF基材は組織再生用スキャホールドとして有望であることが示唆された。網羅的遺伝子発現の解析を目指してRNAseq解析を試みたが、十分に解析に耐えうるRNA試料の調製が出来なかったため今後の検討課題となった。

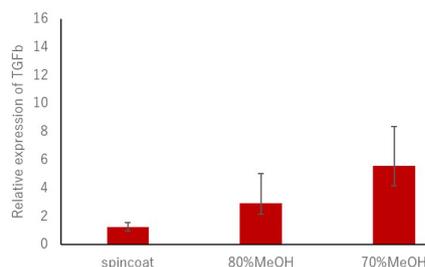


図6 調製方法の異なるSF基材上で培養した線維芽細胞のTGFβの遺伝子発現強度の比較

⑥ポリエチレングリコール(PEG)表面等での検討

前述のように表面に散漫層を形成するSF基材において高い細胞移動性が発現されることが分かったので、同様の表面を形成すると考えられるPEG固定化表面上での細胞移動性を評価したが、SF基材で見られる高い細胞移動性は観察されなかった。SF基材に特異な表面物性が存在することが示唆される。SFの分子量の影響を検討するために、SF水溶液の硫酸分画を実施し、分子量範囲の異なるSF水溶液の調製に成功した。この水溶液を用いてSF基材を作製し表面物性や細胞増殖性を評価したが、分子量範囲により顕著な差は観察されなかった。すなわち、SF分子が作る表面構造や物性がSF基材の特質を発現する主要な要因であることを示している。

(2) 遺伝子組換えSFによる機能付加

①遺伝子組換えカイコの作出

SF基材への再生医療用スキャホールドとしての機能付加を目的に、bFGFのアンタゴニストとして報告されたP7ペプチドをSF分子に融合(図7)した遺伝子組換えシルクを産生する3系統(2-23, 2-26, 2-35)の遺伝子組換えカイコの作出に成功した。それぞれの遺伝子組換えカイコの繭から抽出したSF水溶液中のP7ペプチドを融合したP7-SF分子の量をELISA法で定量したところ、SF分子全量に対して23.4(2-23系)、20.8(2-26系)、13.2(2-35系)%であった。

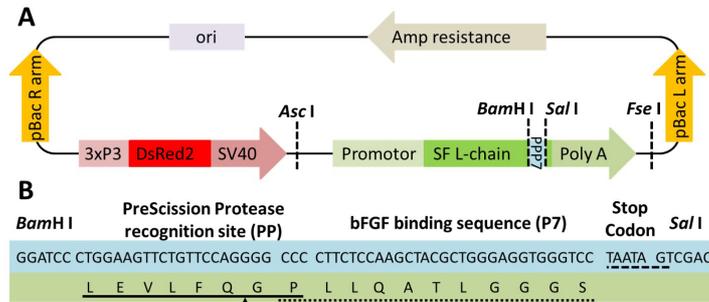


図7 遺伝子組換えカイコにより P7-SF を産生するために設計したプラズミド。
A; プラズミドの設計、B; 融合した P7 ペプチド部分の配列

②bFGF の結合評価

作出した P7-SF を QCM あるいは BIAcore の金蒸着センサーに PEG を介して化学的に固定化し、bFGF と P7-SF との間の結合評価を行った。QCM 測定から求めた解離定数を図 8 に示したが、野生型 (WT) と比較して P7-SF は解離定数が低く、bFGF に対する結合性が高いことが確認できた。BIAcore 測定結果からも同様の結果が得られた。これらの結果から、作出した P7-SF は bFGF を結合できることが分かった。

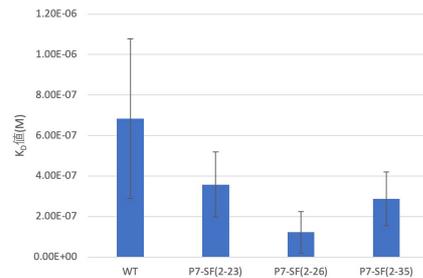


図8 P7-SF への bFGF の結合

③P7-SF 基材の細胞増殖評価

P7-SF 基材の細胞増殖効果の評価するために、P7-SF を細胞培養容器にコーティングし種々の濃度の bFGF を添加して線維芽細胞を培養し、その増殖挙動を調べた。結果を図 9 に示したが、対象とした野生型 SF 基材 (WT) に比較して細胞が多く増殖していることが分かる (吸光度が細胞数に比例する)。特に bFGF が未添加 (0 ng/ml) の場合においても P7-SF 基材では WT 基材よりも細胞増殖性が高いことも観察されたことで、P7-SF 基材は培養培地中に存在する bFGF を有効に活用できる基材であることが推察された。

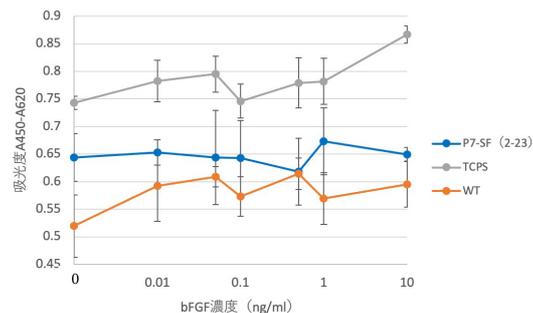


図9 bFGF の添加による P7-SF 基材上で培養した線維芽細胞の増殖 (TCPS;細胞培養用容器)

以上の結果より、P7-SF 基材は bFGF を有効に誘引結合することが可能であり、結合した bFGF が細胞増殖に効果を発現できることが確認できた。組織再生誘導効果が期待できる SF 基材に細胞増殖機能を付加した新たな再生医療用スキャホールドとして活用できると思われる。

④結晶性低下 SF 基材の試み

SF 基材の特異性の解明のために遺伝子組換えシルクを用いて結晶性を低下させた SF の創出を試みた。SF 分子の配列の一部を欠損させた遺伝子組換え SF を産生する遺伝子組換えカイコをゲノム編集技術の利用で数系統の遺伝子組換えカイコが作出できた。しかし、十分量の繭生産が困難であったために評価までには至らなかった。今後の検討課題となった。

<参考文献>

- 1) Hirakata E., Tomita N., Tamada Y., Suguro T., Nakajima M., Kambe Y., Yamada K., Yamamoto K., Kawakami M., Otaka A., Okumura H., Suzuki S., *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **104**, 1474 (2016).
- 2) (a) Hashimoto T., Kojima K., Otaka A., Takeda Y. S., Tomita N., Tamada Y., *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, **24**, 158 (2013). ; (b) Hashimoto Tomoko, Kojima Katsura, Tamada Yasushi, *Materialia*, **9** (2020).
- 3) (a) Kambe Y., Yamamoto K., Kojima K., Tamada Y., Tomita N., *Biomaterials*, **31**, 7503 (2010). ; (b) Kambe Y., Kojima K., Tamada Y., Tomita N., Kameda T., *J Biomed Mater Res A*, **104**, 82 (2016).
- 4) Engler A. J., Sen S., Sweeney H. L., Discher D. E., *Cell*, **126**, 677 (2006).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 D. Burger, N. Yamada, K. Uchino, K. Shiomi and Y. Tamada | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Production of recombinant silk fibroin with basic fibroblast growth factor binding affinity | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J. Silk Sci. Tech. Jpn | 6. 最初と最後の頁 67-77 |
| 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 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 M. Aoki and Y. Tamada | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Gelation mechanism of regenerated silk fibroin aqueous solution during storage | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J. Silk Sci. Tech. Jpn | 6. 最初と最後の頁 - |
| 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 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Masaaki Aoki, Yu Masuda, Kota Ishikawa, Yasushi Tamada | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Fabrication of Regenerated Silk Fibroin and Characterization of the Fractions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecules | 6. 最初と最後の頁 6317-6331 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26206317 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 千原緋菜乃、関禎子、永野聖子、山崎智彦、玉田靖 |
| 2. 発表標題 処理条件によるシルクフィブロイン基材方面での細胞移動性の変化 |
| 3. 学会等名 2021年度繊維学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤陽、Dennis Burger, 塩見邦博、内野恵郎、山田信人、玉田靖 |
| 2. 発表標題 P7ペプチドを融合した遺伝子組換えシルクbFGF結合性と細胞増殖評価 |
| 3. 学会等名 2021年度繊維学会年次大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 馬淵春奈、加藤陽、Dennis Burger、玉田靖 |
| 2. 発表標題 P7ペプチド導入シルクフィブロインスポンジの細胞培養評価 |
| 3. 学会等名 第68回日本シルク学会研究発表会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 千原緋菜乃、川久保彩夏、橋本朋子、玉田靖 |
| 2. 発表標題 シルクフィブロン基材上での細胞移動挙動の要因検討 |
| 3. 学会等名 2020年度繊維学会年次大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 川久保彩夏・小橋尚教・山岡哲二・小林尚俊・玉田靖 |
| 2. 発表標題 調製法が異なるシルクフィブロン基材上でのP19CL6細胞の自発拍動挙動 |
| 3. 学会等名 2019年度繊維学会年次大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 白川美徳・山岡哲二・小林尚俊・玉田靖 |
| 2. 発表標題 シルク上でのiPS細胞の長期培養挙動 |
| 3. 学会等名 2019年度繊維学会年次大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤陽・Burger Dennis Eugen・塩見邦博・内野恵郎・玉田靖 |
| 2. 発表標題 P7ペプチド導入シルクフィブロインの評価 |
| 3. 学会等名 第68回高分子討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 玉田靖 |
| 2. 発表標題 Perspective of Silk Materials Medical Applications |
| 3. 学会等名 3rd Japan-China Textile & Composite Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川久保彩夏・小橋尚教・山岡哲二・小林尚俊・橋本朋子・寺田堂彦・玉田靖 |
| 2. 発表標題 調製法が異なるシルクフィブロイン基材の表面物性と細胞培養 |
| 3. 学会等名 繊維学会秋季研究発表会2019 |
| 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 |
|-----------|--|--|----|
| 研究 分担者 | 塩見 邦博 (Shiomi Kuinihiro) (70324241) | 信州大学・学術研究院繊維学系・准教授 (13601) | |
| 研究 分担者 | 小林 尚俊 (Kobayashi Hisatoshi) (90354266) | 国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク トニクス研究拠点・上席研究員 (82108) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|