

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19905

研究課題名（和文）移植材料の生分解性の決定因子は何か？

研究課題名（英文）What is a crucial factor for material biodegradation in vivo?

研究代表者

神戸 裕介（Kambe, Yusuke）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：30747671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、移植された材料の生分解挙動を決定する生体・材料側の主要因子を解明することを目指した。カイコが産生するシルクフィブロインタンパク質から成るゲル（以下、シルクゲル）をモデル材料として研究を行った結果、シルクゲルが移植直後からタンパク質分解酵素などによる分子レベルの生分解を受け、その後、日・週の時間スケールで、炎症細胞によるバルクレベル（シルクゲルの分断や崩壊を伴う）の生分解を受けることが分かった。また、シルクゲルのin vivoでの生分解挙動を決定する主な材料側因子として、シート結晶が挙げられ、これを調整するためにはシルクフィブロインタンパク質の分子量を変化させれば良いことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、in vivoでの材料の生分解性の解明に取り組んだものであり、得られた知見は、移植された材料の生分解性を知り、制御する上で有用である。また、材料のin vivoでの生分解性を蛍光観察により、非侵襲的に評価する手法は、超音波診断装置やCTなどのモダリティに比べて安価な手法であるため、従来避けられてきた移植材料でのin vivo評価の普及に貢献し得る。

研究成果の概要（英文）：In this study, we clarified a mechanism of in vivo degradation of Bombyx mori silk fibroin hydrogels. Immediately upon implantation, active matrix metalloproteinases reached the implanted silk fibroin hydrogel and began cleaving silk fibroin networks, which might result in the loosening of the networks and then enabled immune cells, such as macrophages, to start the bulk-level hydrogel degradation. We also found that the beta-sheet crystalline in silk fibroin hydrogels is a determinant for in vivo hydrogel degradation.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：生分解性 シルク ゲル in vivo マクロファージ MMP 低分子量 シート

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織と同様の保水率を示すハイドロゲルは、再生医療用の細胞足場材料や手術後の癒着防止材など、移植材料として実用化・研究されている。ゲルの重要な特性として、移植部周囲からのストレスに耐える力学特性や、細胞・組織との接着/非接着性などが挙げられる。加えて、組織再生に合わせて徐々に/役目を終えたら速やかに無くなるための生分解性は、移植による治療効果や有害事象を決定し得る特性である。しかし、ゲルの生分解性に関する知識の多くは *in vitro* 実験結果に基づいており、*in vivo* での生分解性については不明な部分が多い。*in vivo* でのゲルの経時的生分解挙動はどのようなか、移植されたゲルの生分解を主に担うのは分解酵素あるいは貪食細胞なのか、そして、生分解性を決定するゲルの材料物性は何なのか、分かっていない。これらを解明し、移植材料の *in vivo* での生分解性に関する知見を深めることは、使用目的に合致した生分解性を示す移植材料の設計開発に繋がる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、移植された材料(ゲル)の生分解挙動を決定する生体・材料側の主要因子を解明し、その結果として、移植材料の *in vivo* での生分解性に関する体系的知識の獲得や生分解性の自在制御が可能な移植材料の創出に貢献することである。カイコが産生するシルクフィブロインタンパク質から成るハイドロゲル(以下、シルクゲル)をモデル材料とし、実験動物に移植されたシルクゲルの生分解挙動を決定する生体側因子と材料側因子の解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

### 3.1. マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)作用検出蛍光センサー固定シルクゲルの作製

フォルスター/蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理に基づき、タンパク質分解酵素の一種である MMP の基質切断作用を可視化する蛍光センサーを合成した。本センサーでは、FRET のドナー蛍光物質とアクセプター蛍光物質とが、MMP 基質ペプチドにより繋がれている。超音波照射によってゲル化を開始させたシルク水溶液に、蛍光センサー溶液を添加し、センサー固定シルクゲルを得た。本シルクゲルを MMP 溶液に浸漬してインキュベートした後、蛍光観察を行うことで、MMP の作用を検出可能か検証した。

### 3.2. 蛍光センサー固定シルクゲルの皮下移植実験

シルクゲルをマウスもしくはラットの皮下に移植し、移植直後から 14 日目までの蛍光観察を行った。また、移植したシルクゲルを採取し、マクロファージ免疫染色などの組織学的評価を行った。これらの評価により、*in vivo* での材料(シルクゲル)の生分解を主に担うのが、分解酵素なのか、もしくは、貪食を行う炎症細胞なのかを評価した。

### 3.3. 低分子量シルクゲルの作製

先行研究により、*in vitro*(生体外)でのタンパク質分解酵素によるシルクゲルの分解時間とシルクゲルの シート/ヘリックス・ランダムコイル比率とが正に相関することが示されている<sup>[1]</sup>。そこで、シート含有量を調節するため、シルクの分子量を変化させた。アルカリ処理によって低分子量化したシルクからゲル(低分子量シルクゲル)を作製し、アルカリ処理を施さない、通常の分子量のシルクから成るゲル(高分子量シルクゲル)と、物性の比較を行った。

### 3.4. 低分子量シルクゲルの皮下移植実験

低・高分子量シルクゲルをラットの皮下に移植した。移植後、2、4、8 週でシルクゲルを採取し、マクロファージ免疫染色などの組織学的評価を行った。

## 4. 研究成果

### 4.1. 蛍光センサー固定シルクゲル

蛍光センサー固定シルクゲルを緩衝液中でインキュベートしても、蛍光特性はほとんど変化しなかった。一方、MMP 溶液中でインキュベートした場合、ドナー、アクセプター由来の蛍光ピークが、それぞれ減少、増加した。これは、MMP 基質ペプチドが切断され、FRET 効率が減少したためであると考えられる。これより、作製した蛍光センサー固定シルクゲルの蛍光観察により、ゲル内部や周囲での MMP の作用を検出できることが分かった。

### 4.2. *in vivo* でのシルクゲルの生分解性を主として担う生体側因子

皮下移植した蛍光センサー固定シルクゲルの蛍光観察の結果、経時的に FRET シグナルが減少すること、特に、移植後 1 日以内に急減することが分かった。しかし、回収したゲルの組織学的

評価では、移植後1日でのゲルの分断や崩壊は認められなかった。一方、移植後7日以降では、マクロファージや異物巨細胞が浸潤している部分でのゲルの分断や崩壊が認められた(図1)。

以上より、シルクゲルの *in vivo* での生分解の機序は、次のようだと考えらる。シルクゲルは移植直後からタンパク質分解酵素などによる分子レベルの生分解を受け、ゲル内のシルクフィブロインタンパク質分子ネットワークが緩む。すると、マクロファージなどの炎症細胞がシルクゲルに浸潤し易くなり、それらによる貪食や産生酵素によって、シルクゲルの分断や崩壊を伴うバルクレベルの生分解が起こる。

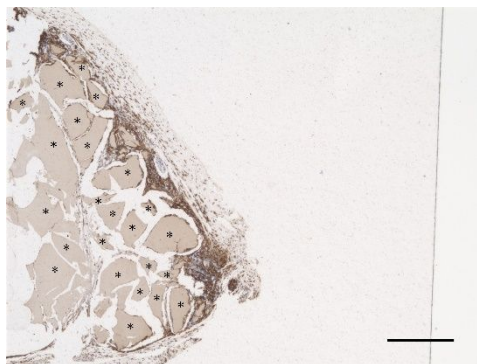


図1：皮下移植したシルクゲルのF480(マクロファージマーカー)免疫染色像(茶色部やF480陽性部、アスタリスク部がシルクゲル残存部)。スケールバー、500 μm。

#### 4.3. 低分子量シルクゲルの物性

低・高分子量シルクゲルの物性評価を行い、両者の比較を行った。その結果、凍結乾燥したシルクゲルのマイクロ構造には大きな違いは認められなかったものの、低分子量シルクゲルの方が、シート/ヘリックス・ランダムコイル比率が小さく、また、結晶性の指標となる熱分解温度も低かった。

*in vitro* でのタンパク質酵素によるシルクゲルの生分解を評価するため、両シルクゲルをタンパク質分解酵素溶液に浸漬し、重量変化を評価した。その結果、低分子量シルクゲルの方が、約3倍早い重量減少を示した。これは、低分子量シルクゲルでは、シルクフィブロインタンパク質分子どうしが疎水性相互作用により凝集することで形成されるシート結晶の割合やサイズが小さいために、タンパク質分解酵素がシルクフィブロインタンパク質分子の切断部位にアクセスし易いためであると考えられる。

#### 4.4. *in vivo* でのシルクゲルの生分解性を主として担う材料側因子

皮下移植した低・高分子量シルクゲルの組織学的評価の結果、低分子量シルクゲルの方が約2倍早く分解した。また、マクロファージなどの炎症細胞の浸潤に伴い、シルクゲルの分断や崩壊が認められた。これは、4.2節の結果と一致するものである。

以上より、シルクゲルの *in vivo* での生分解挙動を決定する主な材料側因子としてシート結晶が挙げられ、これを調整するためにはシルクフィブロインタンパク質の分子量を変化させれば良いことが分かった。

#### 参考文献

[1] Kambe Y et al., Beta-sheet content significantly correlates with the biodegradation time of silk fibroin hydrogels showing a wide range of compressive modulus, Polymer Degradation and Stability, 2020, Vol. 179, pp. 109240.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 神戸裕介	4. 巻 41
2. 論文標題 体内におけるシルクゲルの分解性の解明、改変および応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオマテリアル-生体材料-	6. 最初と最後の頁 126 ~ 128
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 -

1. 著者名 神戸裕介	4. 巻 76
2. 論文標題 医療用材料としてのシルク	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊せんい	6. 最初と最後の頁 304 ~ 308
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 -

1. 著者名 神戸裕介	4. 巻 42
2. 論文標題 シルクゲルの吸収性制御と医療用材料としての応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオマテリアル-生体材料-	6. 最初と最後の頁 18 ~ 19
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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 神戸裕介
2. 発表標題 非繊維形態に成形加工したシルクの医療応用を目指した研究
3. 学会等名 シルクサミット2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1．発表者名 神戸裕介
2．発表標題 移植されたシルクゲルの生分解性の解明・改変とその応用
3．学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第93回大会）（招待講演）
4．発表年 2023年

1．発表者名 Kambe Y, Kawano Y, Sasaki M, Watanabe H, Fujita N, Kameda T
2．発表標題 Low-molecular-weight silk fibroin hydrogel for the prevention of postoperative tendon adhesion
3．学会等名 Silk Proteins and the Transition to Biotechnologies, Gordon Research Conference（国際学会）
4．発表年 2023年

1．発表者名 神戸裕介，河野友祐，佐々木誠，渡辺裕貴，藤田順之，亀田恒徳
2．発表標題 シルクフィブロイン製癒着防止材の開発
3．学会等名 第52回医用高分子シンポジウム
4．発表年 2023年

1．発表者名 神戸裕介
2．発表標題 シルクゲルの吸収性制御と医療用材料としての応用
3．学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会（招待講演）
4．発表年 2023年

1．発表者名 渡邊裕貴，河野友祐，神戸裕介，亀田恒徳，佐々木誠，浦屋有紀，谷口巧，船橋拓哉，黒岩宇，藤田順之
2．発表標題 シルク由来の新規癒着防止材の開発
3．学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 河野友祐，神戸裕介，佐々木誠，洲上博貴，渡邊裕貴，亀田恒徳，浦屋有紀，黒岩宇，藤田順之
2．発表標題 シルクフィブロインゲルを用いた新規癒着防止材の開発
3．学会等名 第42回整形外科バイオマテリアル研究会
4．発表年 2023年

1．発表者名 Kambe Y, Kawano Y, Sasaki M, Watanabe H, Arai T, Fujita N, Kameda T
2．発表標題 Development of an absorbable silk fibroin hydrogel for the prevention of postoperative tendon adhesion
3．学会等名 12th World Biomaterials Congress (国際学会)
4．発表年 2024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
---------	---------