

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25620169

研究課題名(和文) 生体吸収性を制御した絹基盤医療用パッチの開発

研究課題名(英文) Development of Cardiac Patch of Silk Fibroin Controlled The Bioabsorbable Property

研究代表者

朝倉 哲郎 (Asakura, Tetsuo)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：30139208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：家蚕絹をベースとして、様々な再生医療の分野に応用することが可能と期待される、各種、高機能化絹をトランスジェニック蚕を用いて十分な量、生産する事が出来た。そして様々な絹とセグメント化ポリウレタンを共通溶媒に溶解させ、エレクトロスピニングの手法によって不織布状の複合材料を作製、心臓パッチや極めて細い人工血管の作製を行うことができた。その動物移植評価実験によって、その優れた操作性や性能を確認する事が出来た。

研究成果の概要(英文)：Several kinds of functional silk fibroins containing the amino acid sequences suitable for biomaterials were produced by transgenic silkworms. The composite materials with these silk fibroins and segmented polyurethane were prepared with electrospinning technique. The cardiac patch and artificial vascular grafts with very small diameter were developed. Animal implantation experiments using these composite materials showed these materials have excellent operability for implantation and excellent properties for the purpose.

研究分野：化学 材料化学 高分子・繊維材料

キーワード：高分子材料 医療用パッチ 絹 ポリウレタン エレクトロスピニング トランスジェニック高機能化絹

1. 研究開始当初の背景

医療用パッチ材は、フッ素系高分子の ePTFE 素材が大部分を占めているが、体内では全く分解しない。そのため、小児患者においては成長に伴い、再手術を余儀なくされる、経年的に繊維芽細胞とコラーゲンの層に覆われ肥厚をきたす、という問題があり、ePTFE 素材と同等の物性ならびに生体適合性を有し、かつ、生体吸収性の医療用パッチ材の開発が切望されてきた。

競合材料として、ポリ乳酸やポリグリコール酸があるが、分解後に pH の低下による周辺組織へのダメージが大きい、一方、コラーゲンやエラスチン等の生体材料は、強度が低い点に問題があり、架橋剤なくして基盤材料として用いることができない等の問題があった。

2. 研究の目的

絹が高強度な繊維であると同時に、外科用縫合糸として人体に埋め込まれて用いられてきた実績を有することに着目、絹ならびにトランスジェニック高機能化絹に生分解性ポリウレタンとの複合化により弾力性を付与、さらにエレクトロスピニングによる不織布化によって、生体吸収性を制御した次世代型の絹基盤医療用パッチを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 市販のポリウレタンの中で、その構造から生分解性が高いと予想されるポリウレタンを入手し、絹と複合化後、毒性試験や生分解性の実験、ならびに強度と弾力性の点からの物性試験を行い、絹とポリウレタンの複合化に関する基礎的知見を得る。

(2) さらに、再生医療に適した高機能化絹をトランスジェニック蚕を用いて生産する。そして、ポリウレタンと共通溶媒を用いて溶液とし、エレクトロスピニングの手法によって不織布状の複合材料を作製する。

(3) それによって、心臓パッチや小口径の

人工血管の作製を行うとともに、動物移植評価実験によって、その操作性や性能を評価する。

4. 研究成果

(1) 家蚕絹フィブロインと宇部興産(株)のセグメント化ポリウレタンならびに、日華化学(株)の水分散ポリカーボネート系ポリウレタン(商品名:ネオステッカー)を市販のポリウレタンから選び、共通溶媒として最終的に、ヘキサフロロイソプロパノール(HFIP)を用いることで、絹とポリウレタンを複合化できることがわかった。

(2) 乾燥状態で、絹と本ポリウレタンの複合化材料の表面観察や引っ張り試験、透水試験等を行うとともに、IR や NMR を用いてキャラクタリゼーションを行い、その基本物性や基本構造を評価した結果、絹単独の場合よりも、多くの利点を有し、再生医療材料として適する事がわかった。

(3) 本複合材料の再生医療材料としての、毒性や生体適合性、生分解性を動物実験によって評価した。絹とこれらのポリウレタンの 2:1 (重量比) 混合物から成るスポンジ(直径 3 mm、厚さ 1 mm) を作製し、ラットの皮下、4カ所に 200 日間移植した。その結果、毒性はなく、かつ、十分に、ラット体内で分解されることがわかった。

(4) 家蚕絹フィブロインとセグメント化ポリウレタンの HFIP 混合溶液から、筒状の絹-ポリウレタン複合材の小口径人工血管をエレクトロスピニング法を用いて作製した。人工血管の外表面ならびに内表面ともにマイクロファイバーが不織布状に良く絡まっていた。切断時のほつれもなく、ラットへの小口径絹人工血管を移植する際に行う吻合時の操作性においても優れた人工血管であった(図1)。

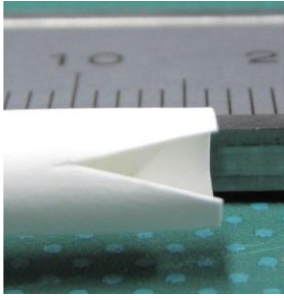


図1 絹とセグメント化ポリウレタンの HFIP 溶液から、エレクトロスピンニング法で作製した小口径人工血管

(5) ラットへの本人工血管の移植結果は、懸念された急性の血栓形成もなく、移植後4週での開存率が100%と極めて良好であった。従って、絹とセグメント化ポリウレタンの HFIP 溶液から、エレクトロスピンニング法で作製した小口径人工血管は、極めて優れた小口径人工血管であることが実証された。本研究成果を記載した論文は、プラスチック成型加工学会において高く評価され、平成24年度のプラスチック成型加工学会の学会賞である論文賞を受賞することができた。

(6) 絹とセグメント化ポリウレタンの複合材が再生医療材料として生体中で用いられる場合、一般に、周囲は水に囲まれている。そこで、実際に使用されることを想定し、含水状態でも、その物性や構造を十分にキャラクタライズする必要がある。そこで、含水状態で、高い運動性のみと低い運動性のみ、ならびに、それらの分率を決定できる各種 NMR を用いて、そのキャラクタリゼーションを十分に行い、その物性発現と構造や運動性に関する知見を集積した。

(7) 本材料で、エレクトロスピンニング法によって心臓パッチ用不織布を作製し、イヌによる移植評価実験を行った。その結果、移植時の針穴からの血漏れは少なく、既存のパッチ材と遜色のない、優れた操作性を有することを明らかにした。さらに、イヌに移植時の狭窄や拡張は認められず、最終的に10か月

後に摘出したパッチには、内膜が十分に形成されていた。

(8) さらに、絹自身の改質を試み、トランスジェニック蚕を用いて、再生医療材料に、より適した家蚕絹フィブロインの高機能化を図った。絹中に、ラミニン由来の YIGSR 配列(Y)単独ならびにフィブロネクチン由来の RGD 配列(R)との混合系を導入したトランスジェニック絹を生産した。そして、その高機能化絹基盤上でマウスの内皮細胞ならびに平滑筋細胞の培養を行い、その効果を検証した。絹のみの場合と比較して、人工血管素材として、より優れていることを明らかにした。

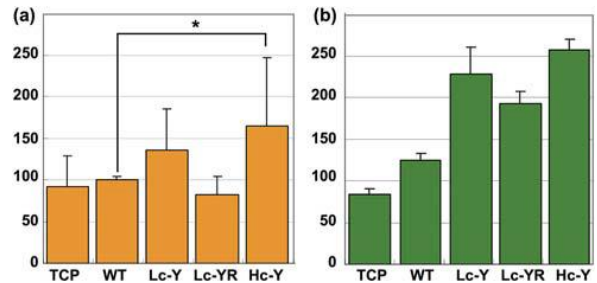


図2 各種トランスジェニック絹膜上でのマウスの内皮細胞ならびに平滑筋細胞の接着性試験。

(9) 一方、さらに、一層の高機能化絹の作製を試み、内皮細胞増殖因子(VEGF)に着目し、同様にトランスジェニック蚕を用いて、家蚕絹フィブロインの高機能化を図った。その結果、VEGF 導入絹は、通常の絹に比較して、内皮細胞が、より接着し易くなると同時に、血小板がより付きにくくなる事がわかった

(図3)。特に、この内皮細胞と血小板で全く異なる性質は、人工血管素材として適しており、動物に移植した時に高い開存性が期待される。このように、より高機能化した絹とポリウレタンとの複合材を、絹人工血管ならびに絹基盤医療用パッチ材として用いることによって、一層の性能向上が期待される。

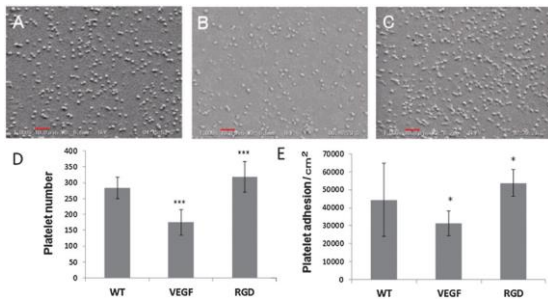


図3 VEGF 導入絹のイヌ血小板附着実験。絹のみ、ならびに RGD 導入絹と比較して、低い血小板附着が認められた。一方、同時に、内皮細胞の接着試験を、この3種の絹で行ったところ、VEGF 導入絹が、より内皮細胞を接着し易いことがわかった。

<引用文献>

①朝倉哲郎, 国立科学博物館, ミルシル Vol. 9 No. 1, 2016, 109(16-19)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

①Yamamoto, S.; Okamoto, H.; Haga, M.; Shigematsu, K.; Miyata, T.; Watanabe, T.; Ogawa, Y.; Takagi, Y.; Asakura, T., Rapid endothelialization and thin luminal layers in vascular grafts using silk fibroin, *Journal of Materials Chemistry B*, 4, 938-946, 2016, 査読有 DOI:10.1039/C5TB02528A

②Asakura, T., Ohata, T., Kametani, S., Okushita, K., Yazawa, K., Nishiyama, Y., Nishimura, K., Aoki, A., Suzuki, F., Kaji, H., Ulrich, A. S., Williamson, M. P., Intermolecular Packing in B. mori Silk Fibroin Multinuclear NMR Study of the Model Peptide (Ala-Gly)₁₅ Defines a Heterogeneous Antiparallel Antipolar Mode of Assembly in the Silk II Form, *Macromolecules*, 48(1)28-36, 2015, 査読有 DOI:10.1021/ma502191g

③Asakura, T., Isobe, K., Aoki, A., Kametani, S., Conformation of Crystalline and Noncrystalline Domains of [3-¹³C]Ala-, [3-¹³C]Ser-, and [3-¹³C]Tyr-Bombyx mori Silk Fibroin in a Hydrated State Studied with ¹³C DD/MAS NMR, *Macromolecules*, 48(22), 8062-8069, 2015, 査読有 DOI:10.1021/acs.macromol.5b02098

④Saotome T., Hayashi H., Tanaka R., Kinugasa A., Uesugi S., Tatematsu K., Sezutsu H., Kuwabara N., Asakura T., Introduction of VEGF or RGD sequences improves revascularization properties of

Bombyx mori silk fibroin produced by transgenic silkworm, *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 7109-7116, 2015, 査読有 DOI:10.1039/C5TB00939A

⑤Asakura, T., Okushita, K., Williamson, M. P., Analysis of the Structure of Bombyx mori Silk Fibroin by NMR, *Macromolecules*, 48, 2345-2357, 2015, 査読有 DOI:10.1021/acs.macromol.5b00160

⑥Fukayama, T., Takagi, K., Tanaka, R., Hatakeyama, Y., Aytemiz, D., Suzuki, Y., Asakura, T., Biological reaction to small-diameter vascular grafts made of silk fibroin implanted in the abdominal aortae of rats, *Annals of vascular surgery*, 29(2), 341-352, 2015, 査読有 DOI:10.1016/j.avsg.2014.10.008

⑦Aytemiz, D., Suzuki, Y., Shindo, T., Saotome, T., Tanaka, R., Asakura, T., In vitro and in vivo Evaluation of Hemocompatibility of Silk Fibroin Based Artificial Vascular Grafts, *International Journal of Chemistry*, 6, 1-14, 2014, 査読有 DOI:10.5539/ijc.v6n2p1

⑧Asakura, T., Isozaki, M., Saotome T., Tatematsu, K., Sezutsu, H., Kuwabara, N., Nakazawa, Y., Recombinant silk fibroin incorporated cell adhesive sequences produced by transgenic silkworm as a possible candidate for use in vascular graft, *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 7375-7383, 2014, 査読有 DOI:10.1039/C4TB01301H

⑨Aytemiz, D., Sakiyama, W., Suzuki, Y., Nakaizumi, N., Tanaka, R., Ogawa, Y., Takagi, Y., Nakazawa, Y., Asakura, T., Small-diameter knitted silk vascular grafts (3mm diameter) with a double-raschel knitted silk tube coated with silk fibroin sponge, *Advanced Healthcare Materials*, 2, 361-368, 2013, 査読有 DOI:10.1002/adhm.201200227

⑩鈴木悠, 中澤靖元, デルヤ・アイテミズ, 小松珠実, 宮崎京子, 山崎静夫, 朝倉哲郎, エレクトロスピンニング法による絹/ポリウレタン小口径人工血管の開発, 成形加工, 25, 181-187, 2013, 査読有 DOI:10.4325/seikeikakou.25.181

[学会発表] (計 94 件)

①早乙女俊樹, 林春樹, 衣笠純, 上杉昭二, 深山俊治, 小材祐介, 丹野耕作, 田中綾, 瀬

筒秀樹，桑原信夫，朝倉哲郎，トランスジェニック絹フィブロインを用いた組紐製小口径人工血管の開発，平成 27 年度繊維学会年次大会，2015 年 6 月 11 日，タワーホール船堀（東京都江戸川区）

②朝倉哲郎，シルクナノファイバーの再生医療材料への応用，日本繊維機械学会 ナノファイバー研究会公開講演会，2014 年 5 月 16 日，東京工業大学 キャンパスイノベーションセンター（東京都港区）

③早乙女俊樹，中澤靖元，杉本真理，佐倉康太，塚谷才英，根本慎太郎，朝倉哲郎，絹/ポリウレタン混合系による心臓修復用パッチの開発，第 62 回高分子討論会，2013 年 9 月 12 日，金沢大学 角間キャンパス（石川県金沢市）

④杉本真理，中澤靖元，朝倉哲郎，早乙女俊樹，上杉昭二，塚谷才英，根本慎太郎，エレクトロスピニング法による絹とポリウレタン混合系の再生医療材料の開発，平成 25 年度繊維学会年次大会，2013 年 6 月 12 日，タワーホール船堀（東京都江戸川区）

⑤早乙女俊樹，杉本真理，中澤靖元，朝倉哲郎，根本慎太郎，エレクトロスピニング法による絹とポリウレタン混合系の再生医療材料の開発，第 62 回高分子学会年次大会，2013 年 5 月 30 日，京都国際会館（京都府京都市）

〔図書〕（計 4 件）

①Asakura, T., Miller, T.Ed.,
Biotechnology of Silk, 272(pp49-86), 2014,
Springer.

②朝倉哲郎，他、シルクによる再生医療材料の開発、工業材料 63(2),
96(pp10-18, 25-28), 2015, 日刊工業

③朝倉哲郎，田中綾 他，高機能性繊維の最前線～医療、介護、ヘルスケアへの応用～，
240(pp148-155), 2014, シーエムシー出版

④朝倉哲郎，絹の構造・物性と再生医療材料への応用（上）家蚕絹の構造，加工技術，50,
56(pp25-31), 2015, 繊維社

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~asakura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 哲郎 (ASAKURA, Tetsuo)
東京農工大学・大学院工学研究院・
名誉教授

研究者番号：30139208