

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820304

研究課題名(和文)成長因子の安定的担持機能をもつバイオシールマテリアルの創製

研究課題名(英文)Development of bio-patch materials encapsulating growth factors

研究代表者

小幡 亜希子(Oyata, Akiko)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40402656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織を再生するための材料としての応用を見据え、生体内で分解する機能と細胞との親和性を兼ね揃えた、有機無機ハイブリッド不織布を開発した。この不織布は、水を用いて合成することができるため、優れた安全性を示し、タンパク質などを変性や失活させることなく内部に保持できた。例えば、酵素タンパク質を不織布に導入しても酵素活性は維持でき、さらに、不織布を構成するハイブリッドの網目構造が、酵素タンパク質を材料周囲に存在する阻害物質から保護するといった特異的な機能も示した。

研究成果の概要(英文)：Organic/inorganic hybrid fibre mats which have biodegradability and cell compatibility were developed for the use in tissue regeneration. The fibre mats were synthesized using water as a solvent, which can contribute to their eco-friendly synthesis, excellent safety for application to biomaterials, and original ability of encapsulating proteins and drugs without their denaturation. For example, the enzymic proteins which are encapsulated in the fibres could exhibit their enzymic activity and are protected from denaturation or degradation by protease in surroundings since they exist inside of the fibres and hybrid structures of the fibres keep such protease away from them. This is because molecule penetration into the hybrid structures possesses molecular-size dependence; no big molecules, such as proteases, can migrate into inside of the fibres.

研究分野：生体材料

キーワード：バイオマテリアル 有機無機ハイブリッド 不織布 生分解性 タンパク質担持

### 1. 研究開始当初の背景

病気や怪我によって損傷した生体組織を再生すべく、組織工学を中心とした様々な技術が開発、応用されている。とくに、身体が本来保持する組織の再生機能が、病気や加齢により衰えている場合、再生を促進するために成長因子や薬剤などが利用される。

生体組織の再生を促す成長因子・タンパク質は生物学的活性が非常に短く不安定であり、単に生理食塩水などに溶解して生体の任意の部位に注入するだけでは、投与部位からの拡散や酵素分解により速やかにその活性を失ってしまう。そのため、ポリカプロラクトンなどの生分解性ポリエステルやコラーゲンなどと複合化する技術が数多く報告されている。

しかし、各材料へ成長因子を導入し固定させる際の化学架橋を形成させるための化学的処理や、ポリエステルを溶解するのに使用した有機溶剤の使用により成長因子の失活を招く。さらに、担持させた成長因子が徐々に溶出せず、初期のバースト現象を起こすことが問題となっている。つまり、成長因子や薬剤を単に担持させる機能を有するだけでなく、それらの失活やバーストを抑制し、かつ生体組織との親和性に優れたマテリアルの開発が求められる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ポリγ-グルタミン酸 (PGA) とシリカのハイブリッド体不織布を母材とし、安全性と安定性の高い成長因子の担持機能を付与した粘着性のあるフィルム (バイオシール) を開発することを目的とする。シールとして設計することで、将来的には『生体の任意の部位にペタリと貼り付け可能』という優れた利便性を実現する。また、既存のバイオマテリアルと組み合わせることも容易となる。

PGA は生分解性と生体親和性、さらには粘着性と非常に優れた吸水性 (自重の 5,000 倍を吸収) を示すことから生体用糊として活用される。しかし生理環境下での安定性が乏しく、またバルク体は脆性を示すため操作性は良くない。一方でカチオン配位型 PGA は水溶性であり、シランカップリング剤とのハイブリッド化によりシリカ相がポリマーチェーン同士をクロスリンクさせたハイブリッド構造を構築できることが報告されている。

我々の研究グループではこれまでに、生分解性ポリエステルとセラミックス粒子の複合体を用いて、エレクトロスピンニング法 (電界紡糸法) により不織布や綿状構造体を作製することに成功している。作製した不織布は細胞親和性に優れ、骨形成を促すことを見出している。不織布は比表面積が非常に大きいため、ドラッグデリバリーシステム用材料として有用と期待されている。また、ファイバー内にてポリマーチェーンが一軸方向に配

向した構造をもち柔軟性に優れる。よって、PGA ハイブリッド材料を不織布化することが有効と考えた。

### 3. 研究の方法

PGA-シリカハイブリッド不織布は、以下の手順で作製した。所定量のプロトネートタイプの PGA (和光純薬工業)、Ca(OH)<sub>2</sub> または Mg(OH)<sub>2</sub> (キシダ化学) および超純水をテフロンビーカー内にてスターラーで 30 分間混合し、その溶液に glycidoxypropyl trimethoxysilane (GPTMS) (シグマアルドリッチ) を添加し、さらに 3 時間混合した。得られた溶液を用いて、エレクトロスピンニング法により不織布化した。不織布サンプルについて、諸分光法により化学構造を解析し、緩衝溶液中への浸漬実験により化学的耐久性を調査した。

上記のように作製された不織布サンプルについて、タンパク質担持機能を調査した。スピニングの 30 分前に担持させる物質を溶液に混合し、これを不織布化させることで、タンパク質担持不織布サンプルを作製した。得られた不織布サンプルについて、担持した物質の放出挙動、担持したタンパク質の活性評価を行った。

不織布サンプルの細胞との親和性を評価すべく、マウス由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 cells) を用いた培養試験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ハイブリッド不織布の化学構造解析および機械物性評価

エレクトロスピンニング時の条件を最適化することで、直径が約 200 nm 径に揃った繊維からなる不織布を作製することに成功した。フーリエ変換赤外分光法と核磁気共鳴分光法によって解析したところ、PGA のポリマ

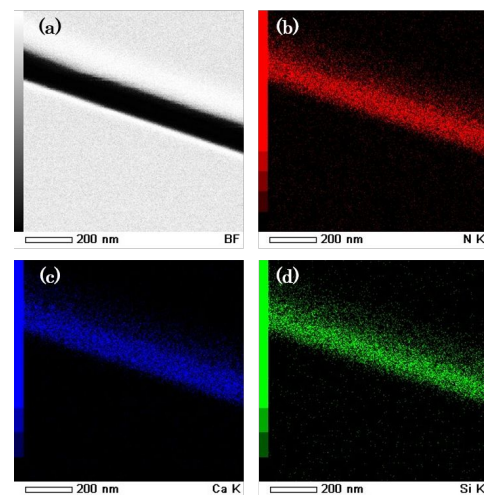


図 1. 作製した不織布の単繊維の電子顕微鏡画像(a)および元素マッピングイメージ (b-d). 窒素(a), カルシウム(c)およびケイ素 (d).

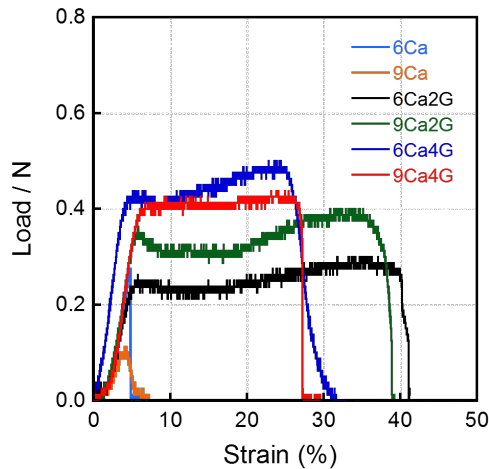


図 2. 作製した不織布の引張強度試験結果。ハイブリッド体のサンプル(6Ca2G, 9Ca2G, 6Ca4G, 9Ca4G)は、ハイブリッド構造を持たないサンプル(6Ca, 9Ca)よりも高い引張強度と塑性変形を示した。

一鎖が GPTMS 由来のシリカ相を介してクロスリンクされたハイブリッド構造を有していることがわかった。透過型電子顕微鏡による観察および元素マッピングを行ったところ、単繊維中にてポリマーとシリカ相が均一に分散しており、さらにポリマー鎖が繊維の長鎖方向へ配向していることがわかった(図 1 参照)。このような均一なハイブリッド構造を得た結果、繊維は新たに塑性変形を示し、かつ引張強度は上昇した(図 2 参照)。よって、操作性に優れた不織布を得ることに成功した。

## (2) 不織布のタンパク質担持機能および担持されたタンパク質の活性評価

不織布サンプルにおけるタンパク質担持機能を評価すべく、まずは、緑色蛍光タンパク質( green fluorescent protein: GFP )を用いて、繊維内部におけるタンパク質の構造変化の有無について調査した。タンパク質の構造変化は、そのタンパク質がもつ活性機能の損失(失活)に繋がる。この構造変化を観察するためのモデルタンパク質として GFP を用いた。GFP の構造が変化した場合、GFP が示す蛍光の波長ピーク位置に変化が現れることがわかっていて、よって、不織布サンプル内部に担持された GFP と、対照群として緩衝溶液中へ分散させた GFP の蛍光ピークを比較することで、担持された GFP の構造変化の有無がわかる。その結果、ピーク位置にほぼ変化がないことを見出した(図 3 参照)。つまり、不織布サンプルに担持されたタンパク質は、ほぼ構造上の変化が起きておらず、その活性を維持していることが示唆された。よって、本不織布サンプルは、タンパク質担持体として有用であると判断した。

次に、酵素タンパク質である  $\alpha$ -キモトリプシンの加水分解機能が、不織布内部に担持された状態でも発揮できるかどうかを評価し

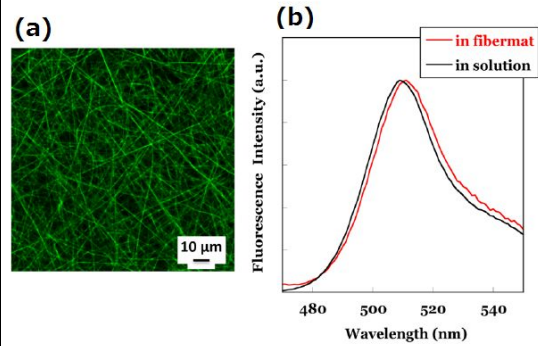


図 3. GFP を内包した不織布サンプルの共焦点レーザー顕微鏡観察像(405nm 励起)(a), 蛍光スペクトルの比較(b)。

た。 $\alpha$ -キモトリプシンを担持した不織布サンプルを、指示薬である p-nitrophenyl acetate (p-NAc)溶液に浸漬し、加水分解反応による生成物の量を測定した。その結果、 $\alpha$ -キモトリプシンは不織布内部においても、加水分解機能を発揮した。さらに興味深いことに、この溶液に分子量の大きい阻害物質と小さい阻害物質を混合させた際、小さい阻害物質が共存した場合のみ、加水分解機能が低下した。つまり、小さい阻害物質のみ、不織布内部に担持された  $\alpha$ -キモトリプシンの機能を阻害した。

この結果より、以下の重要な 2 点が判明した。1 つ目は、担持された  $\alpha$ -キモトリプシンの多くは、単繊維の内部に存在しており、ほとんど繊維表面には露出していないということ。2 つ目は、単繊維の内外の物質移動においては、分子サイズ依存性があり、小さい分子のみ繊維内部まで進入し、 $\alpha$ -キモトリプシンと反応ができたということである。

上述したような、繊維内外の物質移動における分子サイズ依存性を、より詳細に検討すべく、サイズの異なる 4 種類の蛍光分子を用いてさらに検討した。各蛍光分子を担持した不織布サンプルを作製し、緩衝溶液へ浸漬した際の蛍光分子の溶出量を測定した。その結果、分子サイズが小さいほど溶出量は大きかった。例えば、分子量が 229 の蛍光分子の溶出割合は約 80%であるのに対し、分子量が 2388 のもので約 10%であった。以上の結果より、やはり繊維内外の物質移動には分子サイズ依存性があることが確認された。

このサイズ依存性は、不織布を構成するハイブリッド構造に由来すると推測する。PGA と GPTMS 由来のシリカ相は、あたかも網目のような構造を形成していると予想される。よって PGA が本来持つ水を取り込む膨潤機能は、ハイブリッド組成によって制御される。膨潤過程において繊維内外の物質移動が起こることから、つまり、ハイブリッド組成を変化させると、組成由来の水和性変化などを介して、このサイズ依存性のサイズ範囲も変化が生じる。実際に、組成を変化させることで、担持物質の徐放挙動を制御可能であることも見出している。

以上のことから、本不織布サンプルは、体内に存在するタンパク質分解酵素や阻害物質による攻撃から、繊維内に担持したタンパク質を保護し、その活性機能を維持させるといった優れた機能を付与することがわかった。つまり、本不織布サンプルは、単にタンパク質を内包して担持できるだけでなく、周辺の物質からタンパク質の機能を保護するといった、独創的な担持システムをもったマテリアルであると言える。

上述したようなタンパク質の他に、機能性核酸の担持にも成功している。DNA や RNA からなる核酸アプタマーは、ポリメラーゼ連鎖反応などの分子生物学的手法と組み合わせた高速スクリーニング法により、様々な生体分子に選択的に結合し、ホルモン様の生理活性を示すものも取得可能である。そのため、細胞機能操作を可能とする生体分子として興味深い。しかし、生体内には DNA や RNA を加水分解する酵素が普遍的に存在するため、体内にて核酸アプタマーを利用するのは非常に難しかった。そこで、本研究課題にて開発された不織布サンプルへの担持を検討した。

検討するにあたり、モデル物質として酵素活性を保持する一本鎖核酸である DNzyme を使用するのが有効と考え、本研究では DNA/ヘミン/ストレプトアビジン複合体 (DNA 複合体) を用いた。担持させた DNA 複合体は、水溶液中に浸漬しても 5 時間以上は溶出せず、不織布の繊維内部に保持されていることがわかった。繊維内部においても DNA 複合体の本来持つ機能が維持されているかどうかを確認すべく、酵素活性を評価したところ、酵素活性を維持していることがわかった。

さらに、核酸加水分解酵素から、繊維内部に担持された DNA 複合体が保護されるかどうか確認すべく反応試験を行った。比較として、単純に水溶性中に DNA 複合体を分散させた系を作製し、これに活性機能を測定したところ、核酸加水分解酵素が添加されることで 42% の減少が見られた。これに対し不織布の繊維に担持された DNA 複合体においては、ほぼ減少しないことを見出した。前述したように、繊維内外における物質移動において、分子サイズ依存性が存在するためと考える。核酸加水分解酵素はサイズが大きすぎたため、繊維内へ浸透せず、繊維内の DNA 複合体が保護された結果と考える (図 4 参照)。

### (3) 不織布サンプルの細胞親和性

これまでの実験においては、カチオン種はカルシウムのみを用いてきたが、生分解性および細胞親和性を制御すべく、カルシウムイオンに加えマグネシウムイオンにも着目し検討を行った。

マグネシウムイオンはカルシウムイオンよりも置換不活性であり、そのためハイブリッド構造の化学的安定性を高めると予想し

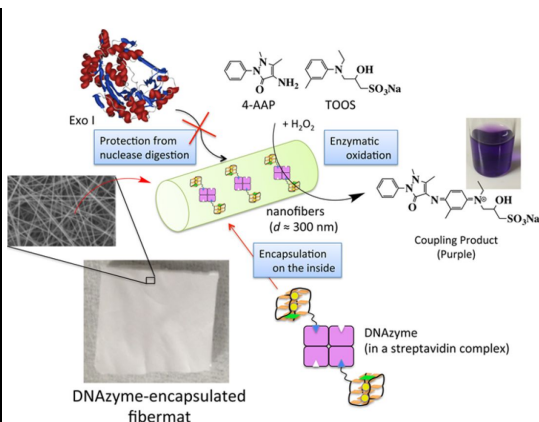


図 4. DNA/ヘミン/ストレプトアビジン複合体担持不織布における活性反応の予想図。

た。また、材料から溶出するカチオン種によって細胞の生物機能が変化することが、申請者らのグループを含め数多く報告されている。よって、この二種のカチオン種を用いて比較を行った。さらに、骨芽細胞の生物機能に作用すると報告のあるデキサメタゾンをハイブリッド不織布に担持させ、細胞応答性を評価した。

Ca-不織布および Mg-不織布を作製し、緩衝溶液等の中での化学的安定性を評価した。その結果、Mg-不織布は分解速度が小さく、繊維構造をより長期間維持できることがわかった。よって、想定していた通り、カチオン種を Ca から Mg に置換することで、ハイブリッド体の水溶液中における耐久性を、向上させることに成功した。

MC3T3-E1 細胞を用いた培養試験結果より、両不織布上にて細胞は良好な接着と増殖性を示した (図 5 参照)。両者を比較すると、Mg-不織布上において細胞がより高い接着率を示した。さらに、デキサメタゾンを導入した各不織布上にて、骨芽細胞様細胞の増殖性が促進されることも見出した。また、デキサメタゾンの有無に関係なく、Ca-不織布よりも Mg-不織布が高い増殖性を示した。上記 (2) での検討結果より、デキサメタゾンはその分子量から、各不織布から溶出していることが想定される。よって、この溶出したデキサメタゾンが細胞に有効に作用したと予想する。

以上より、本不織布サンプルは細胞を活性化させる物質を担持可能であり、かつ生分解性の制御性や操作性を兼ね揃えているとわかった。様々なタンパク質や薬剤を担持でき

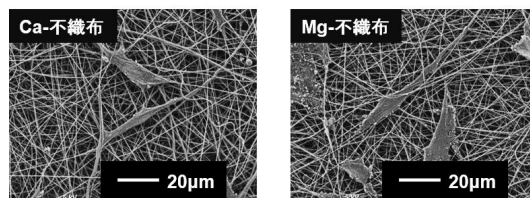


図 5. 各不織布上で培養した細胞の走査型電子顕微鏡画像。

るバイオシールとしての応用が期待できる。

#### 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22件)

Electrospun Poly( $\gamma$ -glutamate)/Silica Hybrids for Tissue Regeneration: Influences of Silane Coupling Agents on Chemistry, Degradation and Florescent Dye Release, Akiko Obata\*, Makoto Shimada, Makito Iguchi, Norihiko Iwanaga, Toshihisa Mizuno, Toshihiro Kasuga, International Journal of Metallurgical & Materials Engineering, In press, <https://doi.org/10.15344/2455-2372/2017/134>

Osteoblast-like cell responses to silicate ions released from 45S5-type bioactive glass and siloxane-doped vaterite, Akiko Obata\*, Norihiko Iwanaga, Arisa Terada, Gavin Jell, Toshihiro Kasuga, Journal of Materials Science, Online published 2017.4.6, DOI 10.1007/s10853-017-1057-y.

Construction of DNAzyme-encapsulated fibermats using the precursor network polymer of poly( $\gamma$ -glutamate) and 4-glycidyoxypropyl trimethoxysilane, Koji Mizuno, Shuhei Koeda, Akiko Obata, Jun Sumaoka, Toshihiro Kasuga, Julian R. Jones, Toshihisa Mizuno\*, Langmuir, **33**, 4028-4035 (2017) DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00308.

Fabrication and in vitro characterization of electrospun poly( $\gamma$ -glutamic acid)-silica hybrid scaffolds for bone regeneration, Chunxia Gao, Shingo Ito, Akiko Obata\*, Toshihisa Mizuno, Julian R Jones, Toshihiro Kasuga, Polymer, **91**, 106-117 (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2016.03.056>.

Construction and characterization of protein-encapsulated electrospun fibermats prepared from a silica/poly( $\gamma$ -glutamate) hybrid, Shuhei Koeda, Kentaro Ichiki, Norihiko Iwanaga, Koji Mizuno, Masahide Shibata, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Toshihisa Mizuno\*, Langmuir, **32**, 221-229 (2016) DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02862.

Poly( $\gamma$ -glutamic acid) - silica hybrids with fibrous structure: effect of cation and silica concentration on molecular structure, degradation rate and tensile properties, Akiko Obata\*, Shingo Ito, Norihiko Iwanaga, Toshihisa Mizuno, Julian R Jones,

Toshihiro Kasuga, RSC Advances, **4**, 52491-52499 (2014) DOI: 10.1039/c4ra08777a.

##### [学会発表](計60件)

Akiko Obata, Toshihisa Mizuno, Shuhei Koeda, Makoto Shimada, Koji Mizuno, Makito Iguchi, Julian Jones, Toshihiro Kasuga, Electrospun silica/poly( $\gamma$ -glutamate) hybrid fibermats for bone regeneration, 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress (WBC2016), 2016.05.17-22, Montreal (Canada).

Toshihisa Mizuno, Akiko Obata, Shuhei Koeda, Makoto Shimada, Koji Mizuno, Makito Iguchi, Julian Jones, Toshihiro Kasuga, Construction and Characterization of Protein-Encapsulated Electrospun Fibermats Prepared from a Silica/Poly( $\gamma$ -glutamate) Hybrid, 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress (WBC2016), 2016.05.17-22, Montreal (Canada).

水野光二、小枝周平、井口真樹人、小幡亜希子、春日敏宏、水野稔久、核酸固定化不織布の作成と機能評価、第65回高分子年次大会、2016、5、26、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)。

小幡亜希子、岩永憲彦、市来健太郎、水野稔久、春日敏宏、有機無機ハイブリッド繊維のタンパク質担持機能、日本金属学会2015年(第156回)春期講演大会、2015.3.18-20、東京大学駒場地区キャンパス(東京都・目黒区)。

小幡亜希子、岩永憲彦、前田浩孝、市来健太郎、水野稔久、春日敏宏、タンパク質担持有機無機ハイブリッド不織布の作製、日本セラミックス協会第27回秋季シンポジウム、2014.09.09-11、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島市)。

##### [図書](計5件)

Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, World Scientific, Silica-based Nanoceramics (Chapter 2), Nanobioceramics for Healthcare Applications, 2017, pp. 23-48.

Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Cytotoxicity of Metallic Biomaterials (Chapter 14), Advances in Metallic Biomaterials, Springer Series in Biomaterials Science and Engineering 3, 2015, pp. 323-348.

##### [産業財産権]

出願状況(計2件)

名称：核酸内包繊維状物質を含む構造体の製造方法  
発明者：水野稔久、小幡亜希子、市来健太郎、岩永憲彦  
権利者：名古屋工業大学  
種類：特許権  
番号：2015-6431  
出願年月日：2015年1月16日  
国内外の別：国内

名称：タンパク質内包不織布の製造方法  
発明者：水野稔久、小幡亜希子、市来健太郎、小枝周平、柴田将英、岩永憲彦  
権利者：名古屋工業大学  
種類：特許権  
番号：2014-143141  
出願年月日：2014年7月11日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小幡 亜希子 (OBATA Akiko)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：40402656

### (4) 研究協力者

水野 稔久 (MIZUNO Toshihisa)  
岩永 憲彦 (IWANAGA Norihiko)  
井口 真樹人 (IGUCHI Makito)  
尾関 佑斗 (OZEKI Yuto)