

絹構造の改変・構造制御・大量生産技術の確立と歯・骨再生医療材料の開発

Development of Techniques for Improvement of Silk Structure,
Establishment of Mass Production, and Application to
New Silk-based Materials for Bone and Teeth Regeneration

朝倉 哲郎 (ASAKURA TETSUO)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授



研究の概要

歯・骨の再生医療材料として要求される機能—高いカルシウム結合性や高い細胞接着性—を絹に付与した高機能化絹をトランスジェニックカイコで生産、さらに生分解性を制御した加工法を開発してスポンジ状ならびに不織布状とし、細胞培養ならびにマウス等での動物移植実験を経て、歯・骨再生のための優れた材料を絹をベースに開発する。

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料科学・繊維材料

キーワード：天然・生体高分子材料、絹

1. 研究開始当初の背景

- (1) 高齢化社会を迎え、優れた歯・骨再生医療材料の開発は、焦眉の急を要する。
- (2) 絹は優れた衣料素材であるが、同時に、長年、縫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。
- (3) 遺伝子組換え技術を用い、大腸菌またはトランスジェニック(TG)カイコで、一次構造を改変した新しい絹を作製できる。

2. 研究の目的

高機能化絹を開発する技術—新しい絹の分子設計・構造制御、大腸菌ならびにTGカイコによる生産—を基盤とし、生分解性を制御した加工法を開発し、細胞培養ならびにマウスによる動物移植実験での評価を経て、歯・骨の再生医療の基盤となる高機能化絹材料を開発する。

3. 研究の方法

- (1) 絹およびモデルペプチドのNMR精密構造解析と機能評価を経て、用途に適した新しい高機能化絹を設計する。
- (2) 遺伝子組換え法を用いて、設計された高機能化絹を大腸菌ならびにTGカイコによって生産する。
- (3) その高機能化絹をスポンジや不織布状に加工し、生分解性等を制御する。
- (4) 培養細胞を用いて高機能化絹材料の細胞接着性の評価と遺伝子解析を行う。
- (5) 実験動物を用いて歯科領域における高機能化絹材料の評価を行う。

4. これまでの成果

- (1) 新しい高機能化絹の分子設計と大腸菌ならびにTGカイコによる生産

新たな高機能化絹の設計からTGカイコで生産するまでの一連の材料開発技術を確認、さらにプロセッシング技術によって分解性を制御した10種類の高機能化絹(カルシウム結合能や細胞接着性を付与)を作製することに成功、これは国際的成果である(図1, 表1)。

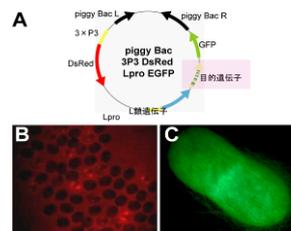


図1 トランスジェニックカイコによる高機能化絹の作出過程。A: 組換え遺伝子を含むプラスミド。B: DsRed 蛍光による組換え体の選抜(赤く光る卵で確認)。C: GFP 蛍光による目的遺伝子の確認。

表1 本研究において開発し、TGカイコで生産された高機能化絹の一覧

番号	導入配列	目的
1	[[[AGSGAG] ₂ EEEE] ₂] _n	カルシウム結合性の賦与
2	[[AGSGAG] ₂ EEEEEE] _n	カルシウム結合性の賦与
3	[[[AGSGAG] ₂ AS] ₂ (EYDYDDDDDDDEWD)AS] ₂	カルシウム結合性の賦与
4	(GE) _n	カルシウム結合性の賦与
5	(GD) _n	カルシウム結合性の賦与
6	FibH-(RGD) _n	細胞接着性の向上
7	FibL-(RGD) _n	細胞接着性の向上
8	FibH-Collagen	細胞接着性の向上
9	TS[[TGRGDSPAS] ₂ SHLVLPINQSDVVRKRLQVQLSIRTAS] ₂	細胞接着性の向上
10	[[GPGGSGPGGY] ₂ GPGGAS] _n	強度の向上

例えば、RGD配列やコラーゲン細胞接着部位配列を導入した高機能化絹の細胞接着活性は、通常の絹に比べて極めて高い結果を示した。

(2) 絹スポンジおよび絹不織布の加工技術の開発

絹の分解性を制御するために、スポンジおよび不織布状（エレクトロスピンニング法を使用）に成型する技術を開発した。水系と有機溶媒系で作製法を変えたスポンジは、物性や分解性が著しく異なり、分解性のより高い絹不織布とあわせて、広く分解性が異なる絹多孔質体が作製できた。

(3) 骨芽細胞培養系を用いた絹足場材料の *In vitro* 評価技術の開発

骨芽細胞の培養実験から、高機能化絹は高い細胞接着性と増殖性を示すことがわかった。さらに、通常の絹盤上での骨芽様細胞の石灰化は、ポジティブコントロールのコラーゲン基板上と比較して、極めて早く、絹が石灰化を強力に促進し高い骨形成誘導能を有することが明らかになった（図2）。

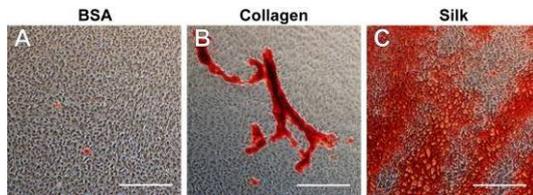


図2 アリザリンレッド染色法による石灰化評価。赤色が石灰化を示す。A: ウシ血清アルブミン上で培養した細胞; B: ブタI型コラーゲン上で培養した細胞; C: 絹上で培養した細胞。それぞれの基材上で14日間培養した後染色を行った。

極めてインパクトの高い成果である。この骨芽細胞の分化を、さらに、骨形成の亢進に関する遺伝子群の発現量でモニターした所、転写調節因子 Runx2 や骨形成指標遺伝子 I 型コラーゲン α 鎖の大幅な発現上昇が認められた。

(4) *In vivo* 絹移植材評価系の開発

マウスを用いて大小からなる骨欠損を簡便かつ正確に評価できるシステムとして、大腿骨前面部欠損移植モデルを構築、軟X線撮影による評価を行なった所、絹移植材は大腿骨皮質骨より海綿骨部に観察され、拒絶反応は見られなかった（図3）。



図3 マウス大腿骨に移植したスポンジ(矢印)の軟X線像

また、移植材の *In vivo* 骨形成評価に必須である蛍光二重ラベル法を用いた骨形成の評価法と血液サンプルを用いて絹移植材による全身作用を評価する生化学的マーカー法を確立した。

5. 今後の計画

- (1) TG カイコでの繭生産において、絹中の機能部位の含量の増加を図る。
- (2) 骨欠損の大きさによって分解性の制御された、より優れた高機能化絹を作製する。
- (3) 絹上での培養による骨芽細胞分化の促進が分子生物学的な指標と遺伝子解析によって明確に確認されたので、新たな高機能化絹創製の技術を開発する。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線) 46報の原著論文、5報の著書、3件の特許を出願するとともに、招待講演を含む107件の学会発表を行った。

(1) Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage regeneration, Makaya, K., Terada, S., Ohgo, K., **Asakura, T.**, *J. Biosci. Bioeng.*, in press, 2009

(2) Silklike materials constructed from sequences of *Bombyx mori* silk fibroin, fibronectin, and elastin., Yang, M., Tanaka, C., Yamauchi, K., Ohgo, K., Kurokawa, M., **Asakura, T.**, *J. Biomed. Mater. Res A.*, **84**, 353-363, 2008

(3) Improving Cell-Adhesive Properties of Recombinant *Bombyx mori* Silks by Incorporation of Collagen or Fibronectin Derived Peptides Produced by Transgenic Silkworms., Yanagisawa, S., Zhu, Z., Kobayashi, I., Uchino, K., Tamada, Y., Tamura, T., **Asakura, T.**, *Biomacromolecules*, **8**, 3487-3492, 2007

(4) Solid-state NMR Analysis of $(GA)_3S(AG)_3D(GA)_3S(GA)_3D(GA)_3S(GA)_3$, A Peptide with a Lamellar Structure and a Ca Binding Site, and Production of $TS[(AG)_3D(GA)_3S]_{16}$ in *E. coli.*, **Asakura, T.**, Sato, H., Moro, F., Yang, M., Nakazawa, Y., Collins, A. M., Knight, D. P., *Macromolecules*, **40**, 8983-8990, 2007

(5) A novel carborane analog, BE360, with a carbon-containing polyhedral boron-cluster is a new selective estrogen receptor modulator for bone. Hirata, M., Inada, M., Matsumoto, C., Takita, M., Ogawa, T., Endo, Y., Miyaura, C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**: 218-22, 2009

(6) 東京新聞、中日新聞「絹で再生医療」2009年3月31日

(7) 化学工業日報「TG カイコのシルク利用再生医療材料開発プロ」2008年12月22日

ホームページ等

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