

QOLを向上させる機能性材料に関する研究

研究院生活環境科学系 衣環境学領域 橋本 朋子

1. これまでの研究内容

今日の医療現場において、天然由来、合成由来を問わず様々な高分子材料が広く用いられている。衣類・備品類では医療関係者の着衣、病室・術場のカーテンやシーツ、マスクや手袋などが挙げられる。診察・治療の中で、体外では注射器・チューブ・貯蔵バッグなどが使用され、体内、また体液や血液に触れる部位では分解性・非分解性高分子で作られた外科用縫合糸、高分子の中空糸が使われている人工腎臓用透析膜、ポリエチレンテレフタレート（PET）の織編物で作られた人工血管、薬物・遺伝子送達用担体、そしてより身近な高度管理医療機器であるコンタクトレンズ、その他にも多くの症状・疾患に対し、多くの部位・臓器において様々な形態で高分子材料が使用されている。近年注目されている人工多能性幹細胞（iPS細胞）の研究においても、皮膚などの体細胞からiPS細胞の作成時、また培養・増殖・分化誘導時、細胞の回収時など、各段階において様々な高分子材料が重要な役割を担っている。このように医療分野における高分子材料の寄与は大きく、人間がより健康で充実した生活を送るためには、病態の解明や医療技術の進歩と共に、目的に応じて求められる性能をもつ高分子材料の開発が不可欠である。

著者はこれまでに遺伝子治療や細胞の改変等を行うためのポリペプチド由来非ウイルス性遺伝子送達分子（キャリアー）に関する研究、ならびに合成高分子キャリアーの細胞内動態の解明などを行った。続いて再生医療用シルクフィブロイン材料に関する研究に従事した。いずれもポリペプチドや合成高分子、天然高分子を用いての生体材料研究であるが、本報告書では、現在進めている「QOLを向上させる機能性材料に関する研究」に関連する後者の再生医療用シルクフィブロインの研究内容について記述させていただく。

1-1. フィブロインスポンジの成形時におけるタンパク質二次構造変化の解明

シルクは優美な光沢や柔らかな風合い、ドレープ性、高い強度や弾性、吸湿性や保温性、多彩な染色性を示し、古来より高級衣服等に利用されてきた天然高分子である。またその高い生体適合性から、医療分野においても外科用縫合糸としての長い実績がある。シルクはフィブロインとセリシンという二種類のタンパク質から構成されており、蚕は一定の速度で首ふり運動を行いながら、セリシンに包まれたフィブロインを体外へ出し繭をつくる。このように紡糸時に延伸力がかかることでフィブロインのタンパク質二次構造はランダムコイル構造からβシート構造へと転移することが知られている。フィブロインは繰り返し配列から成る結晶領域（GAGAGS、アミノ酸配列 G:グリシン、A:アラニン、S:セリン）と、非晶領域から構成される天然のブロック共重合体であり、繭形成時のランダムコイル構造からβシート構造へ、などの構造間の転移は分子内・分子間相互作用に起因する。

繭糸からセリシンを除去し得られたフィブロインを高濃度の無機塩溶液にて溶解、その後透析し脱塩することでフィブロイン水溶液が得られる。このフィブロイン水溶液を用い

てフィルム、スポンジ、ゲル、樹脂様成形体、ナノファイバーなど多様な成形体を作成することができ[1, 2]、作成時に加温処理や有機溶媒を使用することにより、成形体の強度に影響する β シート構造の含有率を制御可能である[3]。

これまでにフィブロイン水溶液に少量の有機溶媒を添加し凍結融解する手法が確立されており[4]、得られた 100%フィブロインのスポンジ（図 1）は均一な多孔構造と適度な強度を有する。この凍結過程におけるフィブロインのタンパク質二次構造変化を *in situ* 固体 NMR 測定により評価した結果、経時的に分子の運動性が束縛され β シート構造が増加することが明らかになった[1]。

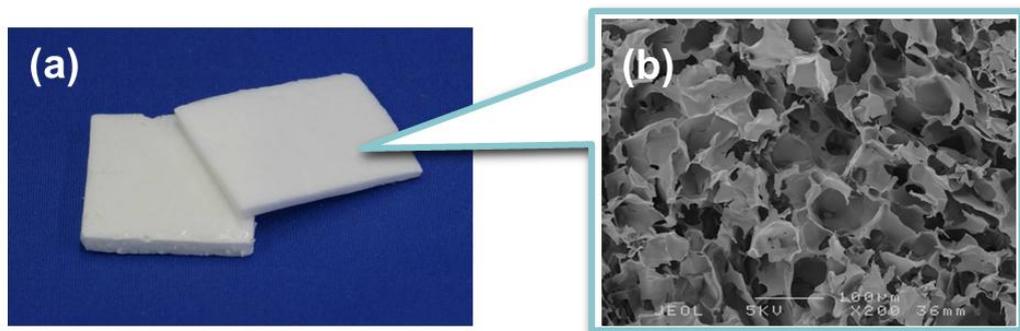


図 1. 凍結融解法により作成したフィブロインスポンジの外観 (a) と SEM 画像 (b)

1-2. フィブロインスポンジに対する加熱滅菌処理とタンパク質二次構造変化

フィブロインスポンジを医療用材料として使用するためには滅菌処理が必須となる。医療用高分子材料の滅菌方法として、 γ 線や紫外線の照射、エチレンオキサイドガス (EOG) 処理、加熱滅菌などが挙げられる。 γ 線・紫外線の照射では材料の分解が生じ、または EOG 処理では低分子残留物の毒性が懸念されている。これら物理的、また化学的な滅菌法に比べ、高温高圧水蒸気（オートクレーブ）処理や乾熱処理といった加熱による滅菌法は、より簡便であり残留物の問題も生じない。しかしながら多くの天然由来材料は、加熱により変性するため、コラーゲンなどには適応されない。一方、フィブロインはコラーゲン等とは異なり高い熱耐性を示すことから、我々はフィブロイン成形体の滅菌処理法として加熱滅菌処理を選択し、加熱処理がフィブロインのタンパク質二次構造に与える影響を調べた。スポンジの固体 NMR 測定を行いアラニンの C_{β} ピーク（18 ppm 付近：ランダムコイル、ヘリックス構造、21 ppm 付近： β シート構造）を比較した結果、湿潤状態での加熱であるオートクレーブ処理スポンジ（図 2. (b)）では、未処理スポンジ（図 2. (a)）に比べ、 β シート構造が増加した。一方、乾熱処理スポンジ（図 2. (c)）では、構造変化は見られなかった。よって加温時の水の存在が構造変化に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに両加熱処理後のフィブロイン上で培養細胞の増殖率や運動性を比較した結果、 β シート構造含有量に伴う差が見られた。以上より、増殖を目的とした場合、また分化や治療を目的とした場合、などの用途に応じて滅菌法を使い分けることで、培養基材が細胞機能に与える影響をさらに促進させる可能性を示した [5]。

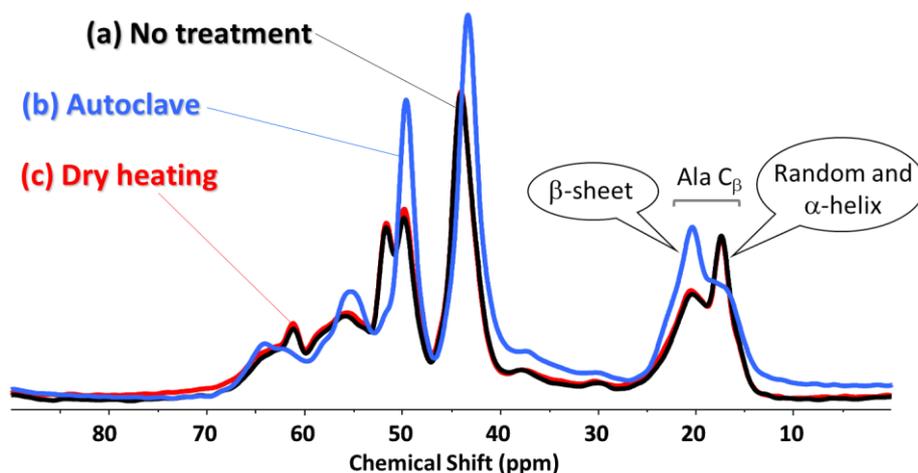


図 2. フィブロインスポンジの ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル
(a)未処理、(b)オートクレーブ、(c)乾熱処理スポンジ

1-3. フィブロインスポンジのバイオマテリアルとしての応用

皮膚組織に対する生体材料として応用展開することを目的とし、フィブロインスポンジ内でヒト表皮、またヒト真皮細胞を培養し遺伝子レベルでの機能変化・効能を調べた。スポンジ内で培養したヒト表皮細胞における治癒関連因子（上皮化マーカーや増殖因子）の遺伝子発現量は、コラーゲンスポンジ（市販テルダーミス真皮欠損用グラフト）に比べ、フィブロインスポンジ内で培養した細胞において有意に高くなった。ヒト真皮細胞の場合でもコラーゲン内培養に比べ、フィブロイン内で細胞外マトリックスや増殖因子の遺伝子発現が有意に高くなることが確認され、フィブロインスポンジが、創傷被覆材として非常に有用な基材であることが示された[6]。

1-4. フィブロイン成形体の表面構造と細胞機能の関連性解明

前述したフィブロインスポンジ内で培養した細胞が既に市販されているコラーゲンスポンジ上の細胞に比べ有意に高い組織再生能を示す理由を明らかにするため、細胞と基材の詳細な接着挙動を調べた。生体親和性の指標の一つである接着性は僅かにコラーゲンの方が高かった。表面電位や接触角に差は見られないため、コラーゲンが細胞接着性因子を有することが理由と考えられる。また、細胞増殖性は同じ傾向を示した。続いて細胞の運動性を評価するため単一細胞の移動距離を画像解析により定量的に調べた結果、フィブロイン上の細胞がコラーゲン上やガラス上の細胞に比べ、3倍以上の距離を移動していることが明らかとなった（図3）。さらに組織再生関連因子の遺伝子発現解析を行った結果、フィブロイン上で培養した細胞の組織再生関連因子の発現量は他の表面上の細胞よりも高く、また異なる発現プロファイルを示した。皮膚組織が損傷を受けると、周囲から表皮・真皮細胞が損傷部位まで遊走し、治癒を促進する。フィブロイン上で培養した皮膚細胞の高い治癒能力は、その高い運動性に起因している可能性が示唆された[7]。

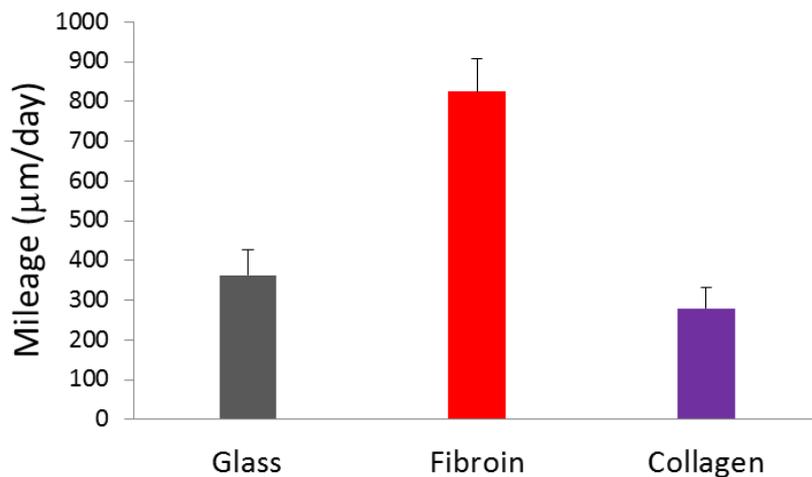


図 3. 各表面上の細胞移動距離（24 時間）

2. 今年度の実績・活動報告

2-1. 研究報告

本年度 4 月より、QOL を向上させる機能性材料の開発を目指し、高機能を付与したフィブロイン布帛開発を目指した構造変化メカニズムの解明、並びに高い生体機能を誘導するフィブロイン表面構造の解析を進めている。

天然高分子であり形状記憶繊維としても使われているセルロースでは、その結晶構造の変化($I_{\alpha} \rightarrow I_{\beta}$ 型、もしくは $I \rightarrow II$ 型)が形状記憶性に影響を与える可能性が報告されている。フィブロインにおいても、構造変化メカニズムの解明による構造の制御が、より安定したプリーツ性の付与や防しわ性など、絹製品の更なる高品質化をもたらす可能性がある。前述の通り先の研究において、ランダムコイル・ヘリックス構造をとっていたフィブロインスポンジが水が存在する状態で加熱すると、 β シート構造へと変化することを明らかにしてきた。このフィブロイン水溶液から成形したスポンジとは異なり、蚕が作った繭から得た「糸」としてのフィブロインは、高度に β シート構造をとっている。この β シート構造リッチなフィブロイン糸や布を水中で加熱することにより、更なる β シート化、またはランダムコイル・ヘリックス構造への逆の構造変化を誘導し、安定したプリーツ性などの機能付与へとつなげることができるのではないかと考え実験を進めている。一般的に布地へのプリーツ性などの機能付与には、樹脂加工やはっ水加工といった風合いを損なう手法が用いられており、またその形状安定性は芳しくない。水中での加熱という有機溶媒や薬剤を用いない手法で安定な機能付与が可能になれば、機能性絹製品の風合い維持などに加え、加工処理工程における環境への負荷軽減にもつながる可能性を秘めている。

これまでに市販絹布地にオートクレーブ処理（121 度または 132 度、20 分～99 分）を施すと、処理温度・処理時間に伴ってランダムコイル・ヘリックス構造と β シート構造間の可逆な構造変化（図 4）が確認できた。この構造変化に伴う防しわ性等の機能性発現を現在確認している。また走査型電子顕微鏡による観察を行った結果、現在行っている加温

条件ではフィブロインの光沢や染色性を著しく低下させるラウジネスは生じていないことが明らかとなっており、風合いを損なわずに水中での加温処理のみでフィブロイン布地に新たな機能を付与する可能性が示唆された。結果をまとめ次年度の学会にて研究発表を行う予定である。

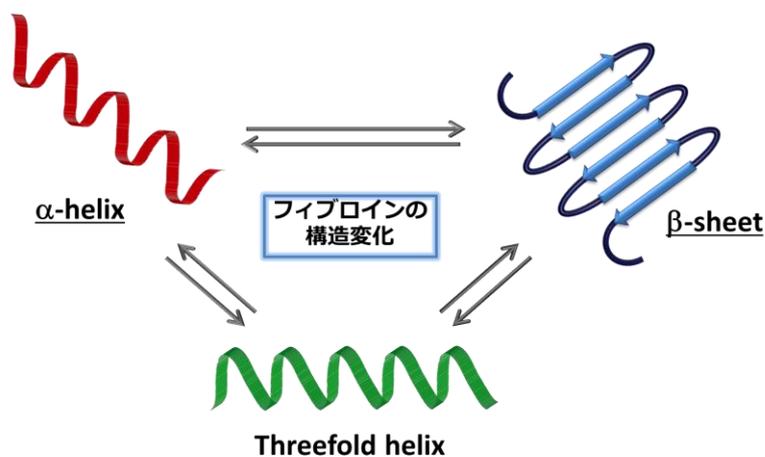


図 4. フィブロインの予想される構造転移

2-2. 学会等への参加

2-2-1. 国際会議への参加・発表

平成 24 年 6 月 1 日～5 日に中国 四川省成都市武侯区世纪城路で開催された「第 9 回 World Biomaterials Congress (WBC)」に参加させていただき、ポスター発表を行った[5]。現在も進めているシルクの加熱処理前後のタンパク質二次構造解析について様々な議論ができ、その中で得た指摘や考察は今後の研究展開に非常に有用なものであった。新規形状記憶高分子や分解性高分子、または抗菌効果を有する材料に関する発表が数多くあり、今後、自身の研究を進めるにあたって参考になる最新の知見を非常に多く得ることができた。その他にも、高分子のみならず、低分子、または無機物・金属といった様々な機能性材料についての研究発表を聞き、幅広い情報を取得できた。

2-2-2. 他大学女性研究者養成システム改革加速事業・スキルアップ支援活動への参加

北海道大学女性研究者支援室により平成 24 年 9 月 10 日～12 日に開催された「リーダーシップ研修“Break the glass ceiling with leadership skills”」に参加させていただいた。カリフォルニア大学バークレー校の 2 人の女性講師の下、女性研究者養成システム改革加速事業に参画している各大学から参加されていた多くの女性教員の方々と共に、Teaching and writing skills を学ぶ機会を得ることができた。

3. 今後の予定

現在行っているフィブロインの構造変化のメカニズムの解明を進め、また水中加熱による構造変化がフィブロイン布帛の様々な物性変化に与える影響を評価していく。さらにフ

ィブロインの構造変化を利用し、様々な機能性ペプチドのフィブロインへの安定的な固定化の確立を目指す。得られた成果を学会等で発表し、また学術論文へ投稿し議論を深めながら、QOLを向上させる機能性材料に関しての研究を進めていきたい。

[文献]

- 1) Tsunenori Kameda, Tomoko Hashimoto, and Yasushi Tamada, Effects of supercooling and organic solvent on the formation of a silk sponge with porous 3-D structure, and its dynamical and structural characterization using solid-state NMR. *Journal of Materials Science* 46, 7923-7930 (2011).
- 2) Atsushi Kaneko, Yasushi Tamada, Shinji Hirai, Toshihiro Kuzuya, and Tomoko Hashimoto, Characterization of a Silk Resinified Compact Fabricated using a Pulse Energizing Sintering Device, *Macromolecular Materials and Engineering* 297, 272–278 (2012).
- 3) Oleg N. Tretinnikov and Yasushi Tamada, Influence of casting temperature on the near-surface structure and wettability of cast silk fibroin films, *Langmuir* 17, 7406-7413 (2001).
- 4) Yasushi Tamada, New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure, *Biomacromolecules* 6, 3100-3106 (2005).
- 5) Tomoko Hashimoto, Tsunenori Kameda, and Yasushi Tamada, Sterilization of protein biomaterial based on silk fibroin, 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, P-SAT-A-040 (2012).
- 6) Tomoko Hashimoto, Katsura Kojima, and Yasushi Tamada, Gene expression profiles of human skin cells cultured on silk fibroin sponges, 22nd Congress of the International Sericultural Commission, Chiang Mai, Thailand, 2011.
- 7) Tomoko Hashimoto, Katsura Kojima, Akihisa Otaka, Yuji S. Takeda, Naohide Tomita, and Yasushi Tamada, Quantitative evaluation of fibroblast migration on silk fibroin surface and TGFBI gene expression, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, in press (2012).