

## 再生ホーネットシルクフィルムの生体適合性・ 皮膚再生誘導能評価

(農工大院・工<sup>1</sup>、JSPS 特別研究員<sup>2</sup>、NCH<sup>3</sup>、農研機構<sup>4</sup>)

○濱理佳子<sup>1,2,3</sup>、神戸裕介<sup>4</sup>、吉岡太陽<sup>4</sup>、秋岡翔太<sup>1</sup>、亀田恒徳<sup>4</sup>、新岡俊治<sup>3</sup>、中澤靖元<sup>1</sup>

### 【緒言】

シルクとは、カイコやクモ、ハチなどによって産生される繊維状タンパク質全般を指し、高次構造を反映した多様な特性を示す。家蚕由来シルクフィブロインは、 $\beta$ -sheet 構造を主体とする結晶構造をとり、生体適合性、加工性に優れるため組織工学材料として広く研究されている。一方、スズメバチが産生するシルク（ホーネットシルク、HS）は、 $\alpha$ -helix 分子鎖どうしが絡み合った coiled-coil 構造を有し、硬化した皮膚表皮である爪への修復効果を示すことから、新たな組織工学材料としての利用が期待される。これまでに、HS を濃塩溶液に溶解・透析し、キャストして得られる再生フィルムにおいて、coiled-coil 構造が再形成されることが報告されている[1,2]。また透析条件に応じて、透析過程でのゲル化挙動、得られる再生フィルムの高次構造が異なることを報告している[3]。材料表面への細胞接着は、高次構造を反映した物性（親水性、粗さなど）に影響される。そこで本研究では、再生 HS フィルムの高次構造の違いが与える影響を、*in vitro* では細胞接着・増殖挙動、*in vivo* では炎症反応の誘起、皮膚組織の再生誘導能について包括的に評価したので報告する。

### 【実験方法】

既報に基づき[2,4]、キイロスズメバチ (*Vespa simillima xanthoptera*) の巣から採取した HS を 9 M LiBr 水溶液に 37°C で 1 時間振盪して溶解し、遠心分離後に 4 日間の透析を実施した。透析は①超純水のみ、②0.01 N アンモニア水のみ、③アンモニア水 3 日と超純水 1 日で行った。②③条件では、回収した水溶液をキャストして再生フィルム（②：Naq、③：NMaq）を作製した。①条件で得られたゲル化した沈殿物は、凍結乾燥によりスポンジとし、1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) に溶解、キャストした (M-HFIP)。キャスト溶媒の比較のため、同様の手順で③条件の水溶液からスポンジを作製、HFIP に溶解して再生フィルムを得た (NM-HFIP)。不溶化・滅菌処理としてアルコールへ浸漬し、風乾後に各種試験へ使用した。構造・物性解析は、小角 X 線散乱 (SAXS) 測定、ATR-FTIR 測定、水接触角試験を実施した。また、生体適合性の評価として HS 再生フィルム上でのヒト由来ケラチノサイト (NHEK)、皮膚線維芽細胞 (NHDF) 増殖試験、マウス背部皮下への埋植を実施し、組織再生誘導能についてラット全層皮膚欠損モデルを用いて評価した。

### 【結果・考察】

全 4 種類の透明で均一な再生 HS フィルムについて、SAXS 測定より、NMaq、Naq でのみ未処理・アルコール処理後共に coiled-coil 構造の存在を確認した。また、ATR-FTIR 測定からアルコール処理後の全てのフィルムに対し  $\beta$ -sheet 構造の形成が観測され、フィルム表面の濡れ性は同程度（約 80 度）であった。同じヒト皮膚由来細胞であっても、NHDF が coiled-coil 構造を持つ 2 条件でのみ顕著に増殖した一方、NHEK はいずれも同程度に増殖し、細胞選択的な傾向を確認した（図 1）。

【謝辞】本研究は、本学文部科学省「卓越大学院プログラム」、JST「FLOuRISH 次世代研究者挑戦的研究プログラム」、JSPS KAKENHI Grant Number JP 23KJ0857 の助成により実施した。

【参考文献】[1] Yoshioka, *et. al.*, *Biomacromolecules* (2017) [2] Kameda, *Biopolymers*, (2015) [3] 濱, 2023 繊維学会年次大会 1D 07 [4] Kambe, *et. al.*, *Acta Biomater.*, (2014)

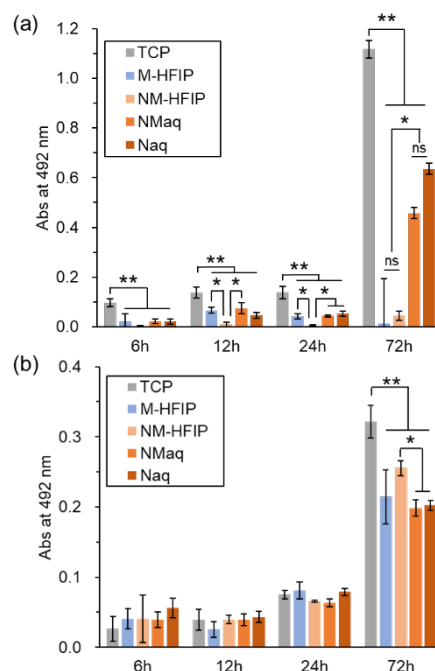


図 1. HS フィルム上での細胞増殖試験結果 (a)NHDF, (b)NHEK (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ )

Evaluation of the Biocompatibility and Ability Inducing Skin Regeneration of Regenerated Hornet Silk Films, Rikako HAMA<sup>1,2,3\*</sup>, Yusuke KAMBE<sup>4</sup>, Taiyo YOSHIOKA<sup>4</sup>, Shota AKIOKA<sup>1</sup>, Tsunenori KAMEDA<sup>4</sup>, Toshiharu SHINOKA<sup>3</sup>, Yasumoto NAKAZAWA<sup>1</sup>: <sup>1</sup>Graduate School of Eng., Tokyo Uni. of Agr. and Tech., Tokyo, Japan, Tel: +81-42-388-7612, \*E-mail: y-nakazawa@go.tuat.ac.jp, <sup>2</sup>JSPS Fellow, <sup>3</sup>Center for Regenerative Medicine, Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, USA <sup>4</sup>Silk Materials Research Group, Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan