

学 校 名	大 阪 成 蹊 短 期 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	動物繊維由来の機能性ナノファイバーを利用した骨格筋組織の再生		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①動物繊維 ②ケラチン ③ナノファイバー ④骨格筋再生			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澤 田 和 也	大 阪 成 蹊 短 期 大 学 生 活 デ ザ イ ン 学 科	教 授	研究代表 研究全般と総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 里 俊 哉	大 阪 工 業 大 学 大 学 院 工 学 研 究 科	教 授	組織工学領域の実験
中 村 友 浩	大 阪 工 業 大 学 工 学 部	教 授	組織工学領域の実験
藤 原 智 洋	岡 山 大 学 大 学 院 医 歯 薬 学 総 合 研 究 科 整 形 外 科	講 師	動物実験領域の実施と評価
福 岡 史 朗	香 川 県 立 中 央 病 院 整 形 外 科	医 員	動物実験領域の実施と評価
長 谷 川 翼	岡 山 大 学 大 学 院 医 歯 薬 学 総 合 研 究 科 整 形 外 科	医 員	動物実験領域の実施と評価

動物繊維由来の機能性ナノファイバーを利用した骨格筋組織の再生

1. 研究の目的

本研究は、「毛髪の再生利用」と「骨格筋組織の再生」という性質の異なる2つの課題を同時に解決することを目的とする。以下に、それぞれの観点から背景と目的を整理する。

＜毛髪の再生利用について＞

これまで毛髪に関する研究は、育毛やウィッグ開発を主目的とした構造解析が中心であり、毛髪を構成するタンパク質を再生医療やバイオマテリアルとして応用した例はほとんどない。一方で、毛髪は大量に廃棄される未利用バイオマス資源であり、その有効活用には環境的にも大きな意義がある。

そこで本研究では、毛髪由来ケラチンを再生医療用のスキャフォールド材料として活用し、廃棄資源の高機能化と、再生医療をはじめとした多分野への応用展開を目指す。

＜骨格筋組織の再生について＞

骨格筋欠損に対しては、組織工学的アプローチによるスキャフォールドの応用が有望とされているが、筋組織に特化した材料は未だ確立されていない。現行の主材料であるコラーゲンは、生体適合性には優れるものの、成形加工性や機械的強度に課題があり、さらに異種動物由来による病原性リスクも無視できない。したがって、これらの課題を克服する新たなスキャフォールド材料の開発が必要とされている。

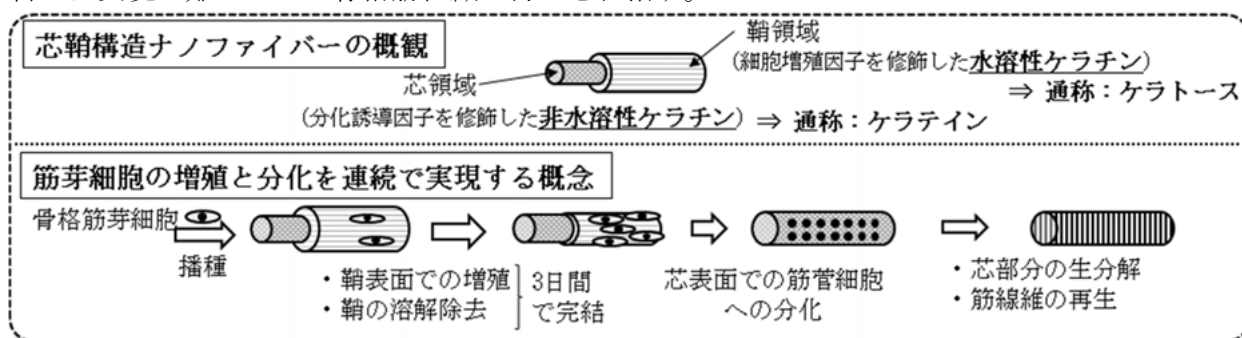
本研究では、毛髪由来ケラチンを用いたスキャフォールドの作製とその再生医療材料としての有効性の検証を通じて、骨格筋組織の再生を目指す。ケラチンは高い剛性と生体親和性を有しており、従来のコラーゲン材料が抱える物性上の課題を克服しうる素材である。

特に本研究では、以下の3点を技術的特徴とする：

1. 筋芽細胞の配向性を誘導する一軸配向ナノファイバー構造の採用
2. 異なる抽出法で得られた特性の異なる2種のケラチンの併用と機能分担化（下図）
3. 芯鞘構造ナノファイバーの導入による、細胞増殖から分化への一段階工程制御（下図上段・下段）

具体的には、増殖促進用のケラチンを外層（鞘）に、分化誘導用のケラチンを内層（芯）に配置した芯鞘構造ナノファイバーを作製する（下図上段）。外層で筋芽細胞を増殖させた後、鞘領域が約3日で溶解し、その空隙により栄養素や老廃物の移動を促進、深部での細胞活性を維持する（下図下段）。その後、細胞は芯領域へ移行して分化し、筋線維の形成へと至る。

このように、毛髪由来ケラチンの物性と機能性を活かし、構造設計を工夫することで、従来材料では実現が難しかった骨格筋組織の再生を目指す。



2. 研究の計画

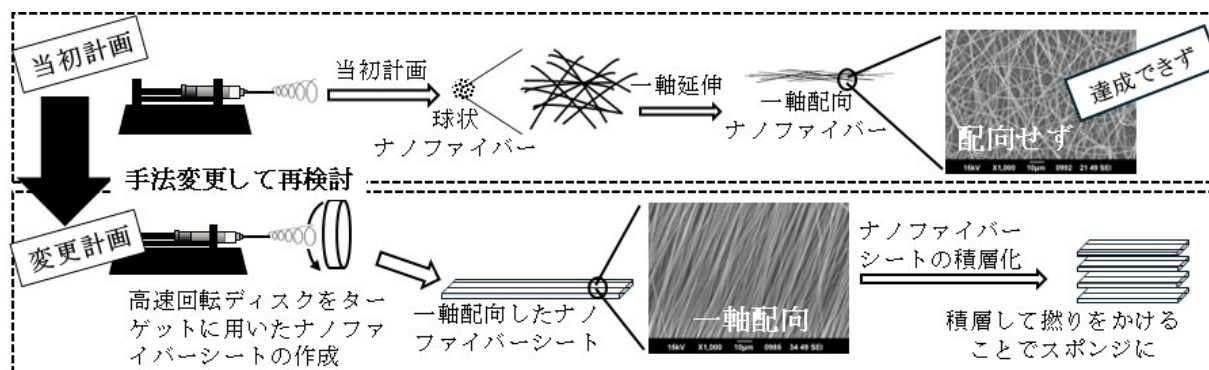
2024年度は、以下の4項目の検討を共同研究者と共に実施した

- ①-1 ケラトースを用いた延伸ナノファイバースポンジの作製
- ①-2 ナノファイバースポンジの架橋処理
- ①-3 成長因子 (b-FGF) のスポンジへの固着化とその定量評価
- ①-4 成長因子固着スポンジ上での筋芽細胞の培養評価

3. 研究の成果

①-1 延伸ナノファイバースポンジの作製

筋芽細胞の分化と筋線維形成を誘導するため、一軸配向ナノファイバー構造の構築を目指した。当初は、エレクトロスピンニングで作製したナノファイバーに一軸延伸を加える手法を検討したが、各種条件を最適化しても十分な配向性は得られなかった（図：上段）。そこで、ファイバー収集部を高速回転させる方法に切り替え、溶液濃度・回転速度・供給量を最適化することで、厚さ約1mmの一軸配向ナノファイバーシートの作製に成功した（図：下段）。さらに、複数枚を積層・燃糸することでナノファイバースポンジの成形を達成した。この手法変更に伴い、一軸延伸装置の更新は中止し、高速回転ディスク装置の導入に予算を充当した。



①-2 ナノファイバースポンジの架橋処理

鞘材料として用いるケラトースは本来水溶性を有するため、生体内環境での形状保持性が課題となる。本研究では、37℃の疑似体液中において3日間かけて徐々に溶解させることを目標に、カルボジイミド系架橋剤であるEDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）を用いたケラトースの架橋処理条件の最適化を試みた。具体的には、処理温度およびEDC濃度を段階的に変化させたスクリーニング実験を行い、目標とする溶解性を実現可能な条件の確立に成功した。得られたスポンジの水溶性は、BCA法（ビシンコニン酸アッセイ）を用いたタンパク質溶出量の定量的評価と、フィルムの残存形状を顕微鏡観察することにより、定性的・定量的に検証した。

①-3 成長因子の固着と定量評価

（※本手法については特許出願を予定しているため、以下には概要のみを記載する）

ナノファイバースポンジに生物活性を付与する目的で、線維芽細胞増殖因子（b-FGF）をケラトースに静電的に固着させる手法を新たに開発した。具体的には、酢酸緩衝液中にb-FGFを溶解し、これにEDC架橋処理を施したケラトーススポンジを浸漬することで、タンパク質の吸着を試みた。固着の定量評価にはELISA法を用い、吸着前後の溶液中のb-FGF濃度変化を追跡することで、吸着効率を算出した。その結果、ケラトースの架橋条件がb-FGFの吸着量に大きく影響を与えることが明らかとなり、最適な条件設定が成長因子の有効利用において重要であることが示唆された。

①-4 筋芽細胞培養評価

（※本手法については特許出願を予定しているため、以下には概要のみを記載する）

b-FGFを固着させたナノファイバースポンジの生物活性を評価するため、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株C2C12を用いて静置培養を実施した。培養期間は3日間とし、細胞密度がサブコンフルエントに到達することを目標とした。また比較対象として、b-FGFを固着していないナノファイバーフィルムをコントロール群とした。その結果、b-FGFを固着した群では細胞増殖が促進される傾向が確認されたが、十分な増殖には至らなかった。これを受けて、EDC架橋条件の再検討を行い、b-FGFの吸着量を増加させる方向で条件をフィードバック的に最適化した。その結果、一定の改善が見られたものの、依然として細胞増殖促進効果の最大化には至っておらず、さらなる改良の余地があると判断された。

4. 研究の反省・考察

本研究の遂行にあたり、各段階でさまざまな技術的課題に直面したが、それらを克服する過程で多くの知見を得ることができた。以下に、各ステップにおける主な反省点および考察を述べる。

①-1 では、ケラチン素材に配向性を誘導する物理的手法の確立を試みたが、力学的加圧によって安定的な配向を得ることは困難であるという現実と直面した。当初はこの方法の実現を目指して多くの時間を費やしたものの、最終的には本手法の採用を断念せざるを得なかった。代替手段として、高速回転による巻き取り法が既報であることを確認し、その応用を検討した。ところが、この手法に必要な回転巻き取り装置の開発には高度な技術が要求されることが判明したため、装置メーカーと連携し、試行錯誤を重ねながら独自の巻き取り機を開発した。その結果、当初の目的であった配向性の付与に成功し、最終的には目標を十分に達成するに至った。想定を超える時間と労力を要したものの、結果として有用な技術的基盤を確立できたと考えている。

①-2 では、ケラトースの架橋反応に関する制御性に課題があった。ケラトース自体が水分を含むことで大きく膨潤する性質を有するため、その挙動を抑えながら適切な分解性を持たせる架橋条件の設定は容易ではなかった。特に、架橋剤の濃度と反応時間の最適化においては、細かな条件調整と繰り返しの検討が必要であった。試行を重ねることで、目的としていた「3 日程度で分解可能な架橋ケラトース」の調製条件を確立するに至り、一定の技術的到達点を得ることができた。

①-3 では、b-FGF をケラトースと静電的相互作用で結合させる検討を行ったが、溶液中の pH やケラトースの架橋状態が相互作用に大きく影響を与えることが明らかとなった。これにより、安定した b-FGF の吸着や保持が難しく、再現性のある成果を得るにはさらなる系統的な条件検討が必要であることを認識した。

①-4 においては、b-FGF が筋芽細胞 C2C12 の増殖を促進する傾向が見られたものの、十分な増殖効果を引き出すためには、b-FGF の吸着量そのものを改善する必要があると判断された。そのため、再び①-2 で検討した架橋条件に立ち戻り、b-FGF との相互作用を最適化する必要があった。また、フィルム自体の分解性についても、3 日以内の溶解を達成しつつ、b-FGF の機能を保持するバランスを見出すことが困難であったが、条件設定を丁寧にスクリーニングすることで、一定の方向性を見いだすことができた。

以上のように、各課題において技術的困難を伴いながらも、粘り強く取り組むことで多くの成果と知見を得ることができた。これらの経験は、今後の応用研究および展開研究において、技術的な基盤として大いに活用されると考える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Shiro Fukuoka, Kazuya Sawada, Tomohiro Fujiwara, Tsubasa Hasegawa, Maki Iwata, Takenori Uehara, Masanori Yorimitsu, Toshifumi Ozaki, Toshiya Fujisato, "Functional limb reconstruction using the decellularized skeletal muscles" which you submitted to Bone & Joint Research, submitted
- ② Kazuya Sawada, Toshiya Fujisato, "Surface Functionalization of Keratin Proteins to Promote Cell Proliferation", J. chem. Tech. Biotech., submitted

(2) 口頭発表

- ① 藤原智洋, 福岡史朗, 長谷川翼, 澤田和也, 藤里俊哉, 望月雄介, 依光正則, 尾崎敏文, 脱細胞化骨格筋を用いた軟部組織欠損に対する機能的四肢再建法の開発, 第43回日本運動器移植・再生医学研究会, 2024. 11. 30, 岡山
- ② Kazuya Sawada, Hoshinori Fujii, Toshiya Fujisato, "Modification of Keratin Protein for Biomaterial Applications", International Symposium on Fiber Science and Technology, 2024/11/25 ~ 2024/11/28, Kyoto, Japan

(3) 出版物

なし