

氏名	まるた りな <b>丸田 莉奈</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第982号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	<b>The utility of active growth factors encapsulated in microcrystals produced in insect cell lines and individual silkworms</b> (カイコまたは昆虫細胞内で生産した細胞増殖因子内包化多角体結晶の有用性に関する研究)
審査委員	(主査)教授 小谷英治 教授 伊藤雅信 教授 井上喜博

## 論文内容の要旨

カイコサイポウイルスの多角体は、ウイルス粒子を多角体の中に包埋し、紫外線や温度変化、乾燥などの刺激からウイルス粒子を保護する。現在、ウイルス粒子ではなく任意のタンパク質に多角体内包化シグナル配列を付加したものを多角体遺伝子とともに細胞内で発現させることで、タンパク質内包化多角体を作ることができる。本研究は、2つの方法で作製した多角体の特性を明らかにした。1つ目は、バキュロウイルス発現系を利用し、昆虫培養細胞に感染させ、多角体を生産する方法である。2つ目は、遺伝子組換えカイコを作出し、カイコの体内で多角体を形成させる方法である。

第1章の緒論では、組織再生に有用な細胞増殖因子が活性を短期間で失うという問題点を指摘した。一方、多角体に包埋された細胞増殖因子は、その活性を維持することが先行研究から明らかになっている。さらに、多角体が培養系に導入された場合、培養培地中にわずかつ細胞増殖因子が放出されることもわかっている。細胞増殖因子の活性に対する多角体の効果について言及した。

第2章では、バキュロウイルス発現系で作製した神経成長因子(NGF)内包化多角体を用いたラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞の分化誘導と、神経の再生を促すシステムの開発について報告した。NGFは神経細胞の突起伸長と生存を制御する神経栄養因子であるが、可溶性のNGFを培養系に拡散させた場合に、PC12細胞はランダムな方向に神経突起を伸ばした。一方、NGFの局所的な徐放が可能なNGF多角体を用いてPC12細胞の分化の制御を検討したところ、PC12細胞は多角体スポット周縁部に沿って突起を伸ばして一列に整列し、神経細胞様に分化した。また、PC12細胞の突起間での連結による神経様細胞のネットワーク形成も示された。こうした結果から、NGF内包化多角体は、神経再生における軸索伸長の方向性をコントロールする上で有効であることがわかった。

第3章では、遺伝子組換えカイコを利用して作製したケラチノサイト増殖因子(FGF-7)の有用性について報告した。表皮の形成に関わるFGF-7の内包化多角体を繭タンパク質に含ませて加

工することで、表皮細胞の増殖・分化を促す絹素材に成り得ると考えられる。そこで、FGF-7 多角体を後部絹糸腺で発現する遺伝子組換えカイコを作出したところ、このカイコの後部絹糸腺の加工粉末は少なくとも 14 日間 FGF-7 を放出し続け、量依存的にケラチノサイトの増殖を促すことが示された。この粉末を真皮層に見立てたコラーゲンゲルに混合し、その上でケラチノサイトを層状に培養した結果、ケラチノサイトは表皮様に分化した。こうした結果から、FGF-7 内包化多角体を含有する後部絹糸線粉末は、動物実験の代替物となる三次元表皮モデル構築に有効であることがわかった。

第 4 章の総合考察では、得られた知見をもとに、細胞増殖因子を内包化した多角体の細胞増殖・分化制御における利用性を述べた。また、ウイルスや血清を用いることなく多角体を作製できる遺伝子組換えカイコ技術の重要性も示した。多角体を活性のある細胞増殖因子を局所的に放出する担体としてだけでなく、多角体を発現するカイコの絹糸腺組織を加工した絹素材の組織工学分野における利活用性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、バキュロウイルス発現系またはカイコ遺伝子組換え技術を利用して作製されたそれぞれの多角体の特性が検討された。活性のある細胞増殖因子を局所的に細胞に供給できるという多角体の特徴を活かし、神経の再生制御システム構築に資するため、神経増殖因子 (NGF) を内包化した多角体をバキュロウイルス発現系により作製し、その神経分化誘導能について調べた。また、表皮の細胞増殖・分化を促すタンパク質素材の開発を目指し、カイコを用いてケラチノサイト増殖因子 (FGF-7) を内包化する多角体を含む絹タンパク質素材を作り、その特性を検討した。このようにして得られる多角体は、細胞増殖因子を放出する担体としてだけでなく、組織再生を促すバイオマテリアルに応用できる可能性を示した点で、本研究成果には新規性および独創性が認められた。

はじめに、NGF 内包化多角体のスポット周辺に PC12 細胞が整列する現象に着目し、神経分化マーカーの発現と突起連結部位の詳細な形態を調べた。整列し突起を伸ばした PC12 細胞は、神経細胞様に分化していた。また、PC12 細胞の突起間ネットワーク形成も観察された。このような NGF 内包化多角体の技術を利用して、より長い軸索伸長を誘導し、生体内での神経断裂部の再生誘導や、幹細胞による神経移植への応用が期待される。

次に、FGF-7 内包化多角体を後部絹糸腺で発現する遺伝子組換えカイコを作出し、得られる後部絹糸腺粉末の有用性を検討した。この後部絹糸腺粉末は、少なくとも FGF-7 を長期間放出しつづけ、さらに、細胞増殖促進活性もあり、表皮モデルの作製に利用可能であった。絹糸腺粉末は、細胞の増殖と分化の制御や、組織モデルの構築に役立つと考えられる。細胞増殖因子は活性を短期間で失うため、組織工学的利用面での問題も多い。本研究の知見は、多角体を用いてこれらの問題点を解決に導く技術につながるものと評価した。

なお、本論文の内容は、申請者が筆頭であるものを含む、以下の査読を経て雑誌に掲載された基礎論文と参考論文を基に構成されている。

[基礎論文]

1. Rina Maruta, Keiko Takaki, Yuka Yamaji, Hideki Sezutsu, Hajime Mori, and Eiji Kotani.

Effects of transgenic silk materials that incorporate FGF-7 protein microcrystals on the proliferation and differentiation of human keratinocytes. *FASEB BioAdvances* vol. 2, 734-744, 2020.

2. Yuka Matsuzaki\*, Rina Maruta\*, Keiko Takaki, Eiji Kotani, Yasuko Kato, Ryoichi Yoshimura, Yasuhisa Endo, Ciara Whitty, Christian Pernstich, Raj Gandhi, Michael Jones, and Hajime Mori (\*は equal contribution) Sustained neurotrophin release from protein nanoparticles mediated by matrix metalloproteinases induces the alignment and differentiation of nerve cells. *Biomolecules* vol. 9, 510, 2019.

[参考論文]

3. Erica Matsumoto, Keiko Takaki, Rina Maruta, Hajime Mori, and Eiji Kotani. Inhibitory effects of intact silkworm sericin on bacterial proliferation. *Journal of the Textile Institute* vol. 111, DOI:10.1080/00405000.2020.1787302, 2020.
4. 本田千晴\*・丸田莉奈\*・高木圭子・森 肇・小谷英治 (\*は equal contribution) . カイコ絹糸腺で産生した機能性多角体の調製と生理活性. *日本シルク学会誌* 28 巻, 135-139, 2020.