

氏名	しまぶくろ じゅんじ <b>島袋 順二</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博乙第191号
学位授与の日付	平成26年9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 生命物質科学専攻
学位論文題目	<b>Studies on the application of <i>Bombyx mori</i> cyovirus polyhedra</b> (カイコサイポウイルス多角体へのタンパク質の固定化の応用研究)
審査委員	(主査)教授 伊藤雅信 教授 遠藤泰久 教授 森 肇

### 論文内容の要旨

申請論文は、カイコサイポウイルス (*Bombyx mori* cyovirus, BmCPV) 由来の多角体に外来タンパク質として骨再生を誘導する bone morphogenetic protein-2(BMP-2)、血管新生を促進する vascular endothelial growth factor (VEGF) と血管新生を抑制するエンドスタチン、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor) である FGF-2 と FGF-7 を固定化し、これらの多角体を用いた骨再生、血管形成の制御、皮膚モデル 3 次元 (3D) 培養などを行った。本研究によって、細胞増殖因子などを固定化した多角体を in vitro および in vivo における組織工学へ応用するための知見を得ることができた。申請論文は以下の 4 つの章から構成される。

第 1 章では、特に BmCPV が作る多角体と呼ばれるタンパク質微結晶の性質や外来タンパク質を固定化するためにこれまでに開発された手法について概説した。

第 2 章では、多角体に固定化した BMP-2 によって自然治癒不可能な大きさの骨欠損を完全に治癒できることを示した。吸収性のコラーゲンスポンジにリコンビナント BMP-2(rhBMP-2) を含浸させるだけでは、最初の rhBMP-2 の放出が急激で徐放性に劣るため、骨欠損の完全な治癒が見られなかった。それは、コラーゲンスポンジに大用量の rhBMP-2 を含浸させた場合も同様であった。これに対して BMP-2 を多角体に固定化後、コラーゲンスポンジに含浸させた場合は、完全な骨欠損の修復が見られた。これらのことから、BMP-2 固定化多角体を用いることで、同多角体からの BMP-2 の長期間に渡る徐放効果によって従来では再生できないような骨欠損に対しても骨再生が可能になることがわかった。

第 3 章では、血管形成に関わる血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と血管新生抑制作用を示すエンドスタチンを多角体に固定化し、これらを用いて血管形成の制御を試みた。VEGF はプロテインジスルフィドイソメラーゼを強制的に発現させながら多角体に固定化した。VEGF を固定化した多角体は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の p42/p44 MAP kinase のリン酸化、同細胞の増殖及び遊走を活性化した。また、HUVEC の管腔形成やネットワーク形成を促進した。一方、エンドスタチン固定化多角体は、HUVEC の増殖、遊走を阻害し、さらに管腔形成やネットワーク形成を阻害した。さらに、あらかじめマウスに上皮細胞由来の腫瘍細胞を移植し、その後周囲

にエンドスタチン多角体を局所投与することで、その腫瘍の肥大と血管形成が抑制されることを示した。ただし、エンドスタチン多角体によるリンパ管形成の抑制効果は観察されなかった。腫瘍治療のための血管新生抑制分子の放出は持続した治療に効果があり、エンドスタチン多角体を使用した局所的な治療方法は有効な手段であるものと考えられた。

第4章では、線維芽細胞増殖因子である FGF-2 と FGF-7 を別々に固定化した多角体を用いて、ヒト皮膚の 3D 培養系の構築を試みた。FGF-2 多角体と FGF-7 多角体を含んだコラーゲンゲル上で、角化細胞であるケラチノサイトとメラニン形成細胞であるメラノサイトの 3D 共培養を行ったところ、上層でのケラチノサイトの分化（角化・脱核）が観察され、メラノサイトはヒトの正常な皮膚の場合と同様に、この 3D 細胞培養の基部に存在し、メラニン形成は下層で確認された。しかし、リコンビナントの FGF-2 と FGF-7 を用いてヒト皮膚の 3D 細胞培養を行ったところ、ケラチノサイトの分化は確認されたもののメラノサイトは上層に移動している様子が観察され、これは正常なヒトの皮膚モデルとは異なることが判明した。つまり、FGF-2 多角体と FGF-7 多角体を用いた 3D 細胞培養モデルは、メラニン形成のための表皮の生体外モデルとして役立ち、同時にケラチノサイトの増殖と分化も誘導できることがわかった。一方、ケラチノサイトに対して活性酸素種の産生を誘導するメナジオンで処理した場合、FGF-7 多角体はケラチノサイトに対して強い細胞保護効果を誘導することがわかった。この細胞保護効果は、スーパーオキシドディスムターゼと peroxiredoxin 6 の誘導によってもたらされていることが示され、これは inositol triphosphate kinase/Akt pathway の活性化によるものであることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

サイポウイルスは、分節した 10 本から 12 本の二本鎖 RNA セグメントを有する球状ウイルスで、レオウイルス科のサイポウイルス属に分類される。サイポウイルスは昆虫に感染し増殖するウイルスで、感染細胞の細胞質に多角体と呼ばれるウイルス封入体を多数形成する。この多角体はポリヘドリンと呼ばれる多角体タンパク質が結晶化した構造物である。最近、サイポウイルスの一種であるカイコサイポウイルスの多角体に細胞増殖因子や酵素などの外来タンパク質を固定化することができるようになった。

本申請者は、血管新生を促進する VEGF と血管新生を抑制するエンドスタチンを固定化した多角体を作成し、これを用いてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の増殖、遊走、ネットワーク形成、管腔形成の効果を調べた。その結果、予想通り、VEGF 多角体は HUVEC に対して促進効果を、またエンドスタチン多角体は抑制効果を示した。さらに、エンドスタチン多角体の *in vivo* での効果を見るために、上皮細胞由来の腫瘍細胞を移植したマウスにエンドスタチン多角体を投与し、2 週間後には腫瘍の肥大、および腫瘍周辺における血管形成が、いずれも抑制されていることを示した。

次に、申請者は、自然治癒不可能な大きさの骨欠損をもつマウスに対し、多角体に固定化した BMP-2 を用いることで、骨の欠損を完全に治癒できることを示した。これは、投与した多角体から BMP-2 が徐放されることに由来するものと考えられた。

さらに申請者は、線維芽細胞増殖因子である FGF-2 と FGF-7 を固定化した多角体を用いることでヒトの角化細胞と色素細胞の 3 次元 (3D) 培養が可能であることを示した。その 3D 細胞培養によって、角化細胞は重層し、上層の細胞では脱核が確認され、一方、メラニン形成細胞であ

る色素細胞は 3D 細胞培養の基部に存在し、メラニンは主として下層で確認された。つまり、この FGF-2 多角体と FGF-7 多角体による 3D 細胞培養モデルは、ヒトの皮膚モデル 3D 培養系として非常に有効と考えられた。FGF-7 多角体は、ケラチノサイトに対して活性酸素種の産生を誘導するメナジオンで処理した場合、強い細胞保護効果を示した。この細胞保護効果は、スーパーオキシドディスムターゼと peroxiredoxin 6 の誘導と inositol triphosphate kinase/Akt pathway の活性化によるものであることを明らかにした。

一連の研究により、カイコサイポウイルス多角体に包埋した細胞増殖因子の外来タンパク質が、哺乳類の血管、皮膚、及び骨組織の再生に有効に作用する可能性を実験的に示すことに成功した。

本論文の内容は、以下の学術雑誌等に発表されている。

学術雑誌

1. **Junji Shimabukuro**, Ayako Yamaoka, Ken-ichi Murata, Eiji Kotani, Tomoko Hirano, Yumiko Nakajima, Goichi Matsumoto, Hajime Mori  
3D co-cultures of keratinocytes and melanocytes and cytoprotective effects on keratinocytes against reactive oxygen species by insect virus-derived protein microcrystals  
Materials Science and Engineering C 42 (2014) 64–69
2. Goichi Matsumoto, Rie Hirohata, Kousuke Hayashi, Yoko Sugimoto, Eiji Kotani, **Junji Shimabukuro**, Tomoko Hirano, Yumiko Nakajima, Shin Kawamata, Hajime Mori  
Control of angiogenesis by VEGF and endostatin-encapsulated protein microcrystals and inhibition of tumor angiogenesis  
Biomaterials 35 (2014) 1326-1333
3. Goichi Matsumoto, Takayo Ueda, Junko Shimoyama, Hiroshi Ijiri, Yasushi Omi, Hisato Yube, Yoshihiko Sugita, Katsutoshi Kubo, Hatsuhiko Maeda, Yukihiro Kinoshita, Duverney Gaviria Arias, **Junji Shimabukuro**, Eiji Kotani, Shin Kawamata & Hajime Mori  
Bone regeneration by polyhedral microcrystals from silkworm virus  
Sci. Rep. 2, 935 DOI: 10.1038/srep00935 (2012)

参考文献

1. **島袋順二**・藤野竜大  
京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センターにおける実習用のカイコ幼虫の無菌飼育  
J.germfree life gnotobiol.Vol.39, No.2, 61-64, 2009
2. 西村明紘・**島袋順二**・古澤壽治・杉村順夫  
3段階培養によるケナフ胚軸組織からの個体再生  
衣笠織研報 No.11,1-7,2007
3. **島袋順二**・平田真弓・古澤壽治  
人工飼料育した熱帯性原蚕種、Nang-Lai と Nan-Noi,の織度  
衣笠織研報 No.11,17-22,2007
4. **島袋順二**・平田真弓・大槻良樹・古澤壽治  
ケナフ・玄米含有人工飼料によるタイ原蚕の飼育と繭糸特性  
衣笠織研報 No.10, 1-8, 2006
5. 平田真弓・中川里紗・有松祐治・**島袋順二**・古澤壽治  
凍結桑葉による絹の緑色染めと型染めへの応用

衣笠織研報 No.10, 59-66, 2006

6. 島袋順二・中川里紗・大槻良樹・古澤壽治

人工飼料育したタイ原蚕種 Nang-Lai の繭糸の性質

衣笠織研報 No.9, 25-30, 2005

7. 大柿麻衣・道満光生・島袋順二・古澤壽治・杉村順夫

ケナフ繊維の品種間比較

衣笠織研報 No.9, 71-72, 2005

8. MOTOYUKI SUMIDA, KATSUHIKO HAGA, YUKIO TANAKA, JUNJI SHIMABUKURO, MASATOSHI ICHIDA and FUJIYOSHI MATSUBARA

DEVELOPMENTAL CHANGES IN UREA IN THE HAEMOLYMPH (DETERMINED BY A UREASE-INDOPHENOL METHOD) IN HYBRID STRAINS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* AND THE EFFECT OF STARVATION IN THE FIFTH INSTAR LARVAE, FED AN ARTIFICIAL DIET, ON UREA LEVEL IN SUBSEQUENT DEVELOPMENT

Comp.Biochem.physiol.Vol. 105A, No. 3, pp. 563-570, 1993

9. 一田昌利・島袋順二・大西盛夫・森 肇・角田素行・松原藤好

稚蚕期の人工飼料が壮蚕期桑葉育中の成長並びに繭質に及ぼす影響

日蚕雑 Vol. 61, No.2, 101-104, 1992

10. MOTOYUKI SUMIDA, YUICHI YAMADA, YUKIO TANAKA, JUNJI SHIMABUKURO, MORIO OHNISHI, HAJIME MORI AND FUJIYOSHI MATSUBARA  
CHANGES IN UREA IN THE HAEMOLYMPH OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* IN THE FOURTH AND THE FIFTH LARVAL INSTARS AND EFFECT OF STARVATION IN THE FIFTH INSTAR ON THE LEVEL OF UREA IN THE PHARATE ADULTS

Comp.Biochem.Physiol.Vol. 97A, No. 3, pp. 373-379, 1990