T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	三次元組織構築を目的とした多機能タンパク質足場材料の開発
Title(English)	
著者(和文)	水口佳紀
Author(English)	Yoshinori Mizuguchi
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10816号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小畠 英理,粂 昭苑,山口 雄輝,三原 久和,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10816号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生命情報　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（工学） Doctor of
学生氏名： Student's Name	水口　佳紀	指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	小畠　英理　教授
		指導教員（副）： Academic Supervisor (sub)	

要旨（和文 2000 字程度）
Thesis Summary（approx.2000 Japanese Characters ）

本論文は「三次元組織構築を目的とした多機能タンパク質足場材料の開発」と題し、５章より構成される。

第１章「序論」では、本研究で課題としている三次元生体組織構築の重要性、従来のアプローチについて概説した後、細胞機能制御における生体微小環境を模倣した足場材料の重要性について述べ、三次元生体組織構築に向けた多機能タンパク質足場材料の開発に必要な要素を明らかにし、本研究の目的と意義を示した。

第２章「Triple helix を利用した高機能性足場材料の構築」では、ヘテロ三量体 coiled-coil 構造を形成する 3 種類のペプチド（helix A/B/C: hA, hB, hC）を利用することにより、成長因子を一体化した自己組織化マトリックスタンパク質を構築し、その機能評価を行った。マトリックスタンパク質の骨格となるエラスチン由来のペプチドの繰り返し配列（E）に細胞接着ペプチドである RGD 配列（R）を組み合わせた ERE タンパク質の両末端に hA または hC を融合した hA-ERE-hA（ARA）、hC-ERE-hC（CRC）を遺伝子工学的に構築し、それらを混合すると、ファイバー状の構造体が形成したことを示した。また、hB を融合した塩基性繊維芽細胞増殖因子（hB-bFGF）を遺伝子工学的に構築し、hB-bFGF が ARA-CRC に triple helix の形成を介して部位特異的に結合していることを示した。さらに ARA、CRC、hB-bFGF から成るシグナル因子一体化自己組織化足場材料における細胞増殖能をヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）により評価したところ、天然型の bFGF を用いた場合と比較して、顕著な細胞増殖活性を有していることを示し、hB-bFGF の細胞増殖活性が長期的に維持されることを明らかにした。

第３章「ELP を利用した温度応答性タンパク質ハイドロゲルの構築」では、エラスチン由来の感温性ポリペプチド配列 $(AVGVP)_{42}$ に静電的反発により凝集を制御するポリアスパラギン酸（D_n）、架橋点となる Coil-LL ペプチド（CL）を連結した融合タンパク質 $(AVGVP)_{42}$-D_n-CL {coiled-coil unit bound elastin-like polypeptide (ELP): CUBE} を遺伝子工学的に構築し、ハイドロゲルの形成およびその機能評価を行った。D_n の鎖長が異なる 3 種類（n = 0, 44, 88）の CUBE を作製し、各 CUBE が 30℃付近でハイドロゲルを形成、低温でゾル状態へと可逆的に相転移を示すこと、D_n の鎖長が長くなるに伴いゲルの透明性が向上することを示した。また、ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞（A549 細胞）を $(AVGVP)_{42}$-D_{88}-CL（O-CUBE）ゲル内に内包し三次元培養を行うと、A549 細胞はゲル内でスフェロイドを形成させ、長期的に培養可能であることを示し、CUBE ゲルが三次元足場材料として利用可能であることを明らかにした。

第４章「多機能タンパク質ハイドロゲルによる三次元血管組織の構築」では、第３章で構築した O-CUBE に骨シアロタンパク質（BSP）由来の RGD 配列（bRGD）を導入した $(AVGVP)_{42}$-D_{88}-bRGD-CL（bRGD-CUBE）を遺伝子工学的に構築し、その機能評価を行った。bRGD-CUBE は O-CUBE と同様に温度応答性ゾル-ゲル転移を示すと共に透明性の高いハイドロゲルを形成したことを示した。また、bRGD-CUBE ゲル内で HUVEC の三次元培養を行ったところ、bRGD 濃度依存的に HUVEC の三次元な血管新生が促進されたことを示し、生理活性ペプチドの導入により、容易に CUBE を機能化可能であることを明らかにした。さらに、ヘパリン結合性の成長因子である bFGF や血管内皮細胞増殖因子（$VEGF_{165}$）は、静電相互作用を介して O-CUBE の D_{88} 部位へ特異的に結合したことを示し、bFGF、$VEGF_{165}$ を静電的に保持させた bRGD-CUBE ゲル内で HUVEC の三次元培養を行ったところ、同量の成長因子を培地に添加した条件と比較して有意に脈管形成が促進され、細胞外マトリックスと成長因子からの相乗的なシグナル伝達の誘導が可能であることを明らかにした。

第５章「結論」では、各章で得られた結果を総括すると共に、今後の展望について示した。

以上、本論文では、helix ペプチドの coiled-coil 構造形成、及び ELP の温度応答性会合による特異的分子間相互作用を用いて、新規な細胞外マトリックスの構築を行い、三次元足場材料としての有用性を明らかにし、今後の組織工学の発展に資する多くの知見を得た。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生命情報　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（工学） Doctor of
学生氏名： Student's Name	水口　佳紀	指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	小畠　英理　教授
		指導教員（副）： Academic Supervisor (sub)	

要旨（英文 300 語程度）
Thesis Summary（approx.300 English Words ）

This thesis consists of five chapters titled "Development of multi-functional protein scaffolds for three-dimensional tissue construction".

In chapter 1 "General introduction", importance of three-dimensional (3D) scaffolds which mimicked microenvironment for controlling cellular functions was mentioned and the construction strategies were indicated with the purpose and the significance of this study.

In chapter 2 "Construction of high-functional scaffolds using triple helix", an artificial self-assembling ECM protein tethering basic fibroblast growth factor (bFGF) was developed by using three kinds of helix peptide (helix A/B/C) that form heterotrimer coiled-coil structure. The designed bFGF-tethered self-assembling ECM protein exhibited superior cell proliferation activity. The results demonstrate that the approach of using triple-helix formation can be applied to develop high-functional ECM proteins for tissue engineering applications.

In chapter 3 "Construction of temperature-responsive protein hydrogels using ELP", genetically engineered thermosensitive protein hydrogels were developed. The designed hydrogel was realized by combining the following three peptide blocks: thermosensitive elastin-like polypeptides (ELPs), a polyaspartic acid (polyD) chain to control aggregation, and a *de novo* designed helix peptide that forms antiparallel homotetrameric coiled-coils. The resultant coiled-coil unit bound ELPs (CUBEs) exhibited a controllable sol-gel transition with tunable mechanical properties and showed the applicability as 3D scaffolds.

In chapter 4 "Construction of three-dimensional vascular tissue using multi-functional protein hydrogel", CUBEs were functionalized with bone sialoprotein derived RGD (bRGD), and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were three-dimensionally cultured in bRGD-modified CUBE (bRGD-CUBE) hydrogels. Proangiogenic activity of HUVECs was promoted by bRGD, and dependent on the bRGD concentration. Moreover, heparin-binding angiogenic GFs, including bFGF and vascular endothelial growth factor (VEGF), were immobilized to bRGD-CUBEs via electrostatic interactions. HUVECs cultured in GF-tethered bRGD-CUBE hydrogels formed 3D tubule-like structures. The designed CUBE hydrogels may demonstrate utility as advanced smart biomaterials for biomedical applications.

In chapter 5 "General conclusion", results provided in each chapter were generalized and future perspectives were showed.

In this thesis, novel ECM proteins were constructed using the specific molecular interactions including formation of coiled-coil structure and temperature-responsive association of ELPs and the utilities as 3D scaffolds were demonstrated. The thesis provides many finding to contribute to advance of the tissue engineering.

備考 ： 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).