

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,桑 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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第 号			学位申請者氏名		水口 佳紀	
論文審査 審 査 員		氏 名	職 名		氏 名	職 名	
	主査	小畠 英理	教授	審査員	三重 正和	准教授	
	審査員	糸 昭苑	教授				
		山口 雄輝	教授				
		三原 久和	教授				

論文審査の要旨（2000 字程度）

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 章より構成されている。
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述べている。

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の構築を行い、その機能評価を行っている。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ている。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ている。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ている。

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 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ている。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ている。また、A549 細胞を (AVGVP)₄₂-D₈₈-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し、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ている。

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 に骨シヤロタンパク質 (BSP) 由来の RGD 配列 (bRGD) を導入した (AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL (bRGD-CUBE) を遺伝子工学的に構築し、その機能評価を行っている。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ている。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 の三次元的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ている。さらに、ヘパリン結合性の成長因子である bFGF や VEGF₁₆₅ は、静電相互作用を介して O-CUBE の D₈₈ 部位へ特異的に結合したことを示し、bFGF、VEGF₁₆₅ 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、ECM 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ている。

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述べている。
これを要するに、本論文は、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を構築し、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ものであり、工学上および工業上貢献するところが大い。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」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。