

京都大学	博士 (工 学)	氏名	神戸 裕介
論文題目	<b>Molecular Design of Silk Fibroin for Functional Scaffolds</b> (機能的足場材料のためのシルクフィブロイン分子設計とその応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、再生医療の見地から軟骨再生に着目し、遺伝子組換えカイコ技術によるシルクフィブロインの分子設計を利用して細胞足場材料の機能付加・機能改変を行い、その影響を生化学的および力学的に評価した結果をまとめたものであって、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論であり、関節軟骨の特徴や日本における関節軟骨疾患の現状、再生医療を利用した関節軟骨治療法の課題、シルクフィブロインの特徴等、本論文のキーワードや考え方について概説している。</p> <p>第2章では、遺伝子組換えカイコ技術を利用して塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を融合したシルクフィブロインを作製し、その細胞増殖活性と軟骨再生用足場材料としての有用性を評価している。bFGF 融合フィブロイン分子では、ドラッグデリバリーシステムの観点から、bFGF がコラゲナーゼ切断アミノ酸配列を介してフィブロイン L 鎖に融合するよう設計がなされており、実際にコラゲナーゼ処理により bFGF が L 鎖から徐放されることを確認している。また、bFGF 融合フィブロインをスポンジ形状に加工する過程での細胞増殖活性を評価しており、組換えカイコの後部絹糸腺から抽出した bFGF 融合フィブロインは活性を有しているものの、組換えカイコの繭に関しては臭化リチウムに溶解することで活性が失われることが示されている。本章ではまた、bFGF 融合フィブロインの細胞増殖活性の回復にも取り組んでおり、尿素の段階希釈とグルタチオン酸化還元システムによる bFGF のリフォールディングの結果、炭酸ナトリウム精錬と臭化リチウムへの溶解を経た bFGF 融合フィブロインの細胞増殖活性の回復に成功している。一方、オートクレーブ滅菌後の bFGF 融合フィブロインスポンジについては、リフォールディングによる細胞増殖活性のわずかな回復が見込まれたものの、有意な活性回復は示されていない。軟骨細胞を培養した結果についても同様であるため、生物活性を有した高分子タンパク質が融合したフィブロイン足場材料を実用的に用いるには、組換え効率を上げる等のさらなる技術の開発が必要であると考察している。</p> <p>第3章では、生物活性を有した高分子タンパク質に代わる、足場材料の機能改変にかかる設計指標の探索を目指し、細胞の足場依存性に着目して単一細胞レベルでの細胞接着力測定装置を用い、細胞の軟骨分化過程における力学特性 (接着力, 剛性) の変化を評価している。軟骨分化モデル細胞である ATDC5 細胞の、間葉系未分化細胞、軟骨細胞、肥大化・石灰化軟骨細胞への分化状態を、組織染色や遺伝子発現量解析等の生化学的手法で評価・確認すると同時に、細胞の足場材料に対する接着力を定量している。その結果、バルク (平均値) としての細胞の力学特性は分化過程における細胞の生化学的変化を明瞭に反映しないものの、力学特性の分布変化に着目すると、未分化状態から軟骨分化が進むに従って分布が狭くなり、また肥大化・石灰化が進むに従って分布が広がる等、分化状態特異的に細胞の力学特性が変化することが示されている。さらに、細胞の力学特性と軟骨分化マーカー遺伝子発現とは、アクチン細胞骨格の仲介によって相互に関係している可能性を示唆している。これらの結果より、</p>			

京都大学	博士 (工 学)	氏名	神戸 裕介
<p>細胞—足場材料間の力学的な接着状態と軟骨分化形質との関連性が示され、それを考慮した関節軟骨再生用の足場材料の設計、開発、評価を行うことが重要であると考察している。</p> <p>第4章では、遺伝子組換えカイコ技術を利用して細胞接着性ペプチドである Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) を融合したシルクフィブロインを作製し、軟骨細胞と RGDS 融合フィブロインとの接着性や RGDS 融合フィブロインの足場材料としての有用性を評価している。また、これらの評価の中で、フィブロイン L 鎖に RGDS が融合するように設計された RGDS 融合フィブロインと、フィブロイン H 鎖の繰返し領域に RGDS を含む配列が融合しているタンパク質 (プロネクチン) との効果の比較を行っている。RGDS 融合フィブロインを加工して得られたフィルム、スポンジ材料の構造、表面物性および細胞接着性を評価した結果、スポンジ加工後においても融合した RGDS に起因する細胞接着活性が維持されていることを報告している。プロネクチンのような細胞接着性の高い足場材料上では軟骨細胞は伸展し、脱分化するとされているが、L 鎖に融合した RGDS は軟骨組織形成を促進することが示されている。一方で、融合した RGDS はプロネクチンと同様に軟骨細胞の接着力を増加させるものの、フィブロインを足場とした場合に特異的な接着力の経時変化は失われていないことを示している。さらに、軟骨基質や接着分子の遺伝子発現と特異的な接着力の経時変化との関連性を示唆している。これらの結果より、RGDS 融合フィブロインの軟骨再生促進効果が、分子自由度が高いと考えられるフィブロイン L 鎖に RGDS が融合されたことに起因することを考察している。</p> <p>第5章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。すなわち、シルクフィブロイン足場材料に bFGF 由来の細胞増殖機能を付加することは困難であること、細胞の足場材料への力学的な接着性が足場材料の設計・開発において重要であること、シルクフィブロイン足場材料に RGDS 由来の細胞接着機能が付加され、軟骨再生が促進されたことを述べている。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、再生医療の見地から軟骨再生に着目し、遺伝子組換えカイコ技術によるシルクフィブロインの分子設計を利用して細胞足場材料の機能付加・機能改変を行い、その影響を生化学的および力学的に評価した結果をまとめたものであって、得られた主な成果は次の通りである。

1. 遺伝子組換えカイコ技術を用いた分子設計により、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放が可能な bFGF 融合フィブロインを作製し、その細胞増殖活性を計測した。bFGF 融合フィブロインをスポンジ形状へ加工する過程で細胞増殖活性が失われるが、尿素の段階希釈とグルタチオン酸化還元システムによるリフォールド操作により回復する可能性を示唆している。
2. 細胞一足場材料間の接着力測定装置を用い、軟骨分化モデル細胞 ATDC5 の分化過程における力学特性 (接着力, 剛性) を評価した。その結果、未分化状態から軟骨分化が進むに従って細胞の力学特性の分布範囲が狭くなり、続いて軟骨細胞の肥大化・石灰化が進むに従って力学特性の分布範囲が広がる等、軟骨分化状態に起因する細胞の力学特性変化を示している。
3. 遺伝子組換えカイコ技術を用いた分子設計により、細胞接着性を有する Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ペプチドがフィブロイン L 鎖に融合した RGDS 融合フィブロインを作製し、その特性を測定した。融合した RGDS は軟骨細胞の脱分化に作用するプロネクチンと同様に細胞接着力を増加させるものの、軟骨組織形成を促進することを示した。また、RGDS 融合フィブロイン上の軟骨細胞の接着力にはフィブロイン特異的な経時変化が観察され、さらにこの挙動と遺伝子発現との関連性が示唆されており、L 鎖への RGDS の導入が軟骨再生を促進する可能性を考察している。

以上のごとく、本論文は、遺伝子組換えカイコ技術を用いた分子設計によって再生用足場材料の機能付加を行う新たな試みを報告しており、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学術論文として価値あるものと認める。また、平成 25 年 2 月 27 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

要旨公開可能日：2014 年 1 月 21 日以降