

氏 名	りえん あい あい LIAN AI AI
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1 0 9 8 号
学位授与の日付	令和 5 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 バイオテクノロジー専攻
学 位 論 文 題 目	Development of Bioengineered Silkworm Sericin Cocoons for Mammalian Cell Cultivation (哺乳類細胞培養のための遺伝子組換えセリシン繭の開発)
審 査 委 員	(主査)教授 小谷 英治 教授 井上 喜博 准教授 高木 圭子

論文内容の要旨

カイコの繭糸タンパク質は、内層の絹糸フィブロインと、外層のセリシンから成る。セリシンは、繭を形成する上で重要な膠様の成分であり、絹糸どうしを繋ぐ役目がある。これまでは、通常の繭から絹糸をとりだすための高熱やアルカリによる処理でセリシンは分解され、廃棄されてきた。近年、セリシンの保湿性や、細胞の足場となる性質に注目が集まりつつある。先行研究において、フィブロイン産生器官の後部絹糸腺の機能不全化を人為的に誘発し、フィブロインを含まずセリシンだけでできた繭を作る遺伝子組換えカイコが得られていた。このセリシン繭からは未分解セリシンを簡単に調製することができる。本研究では、カイコ繭の新たなバイオテクノロジー利用を目指し、この未分解セリシンを二つの細胞培養系に導入した場合の効果を調べた。本学位論文では、第一章諸論において、カイコを用いた遺伝子組換え技術の現状と応用可能性、絹糸腺機能の改変技術の背景とその原理、さらに繭成分を用いた細胞培養系構築の有効性について導入として述べた。

第二章では、カイコセリシン繭からの未分解セリシンによるマウス胚性幹細胞 (mES) の効率的培養について言及した。先行研究ではセリシングル上の mES を培養できることがわかっていたが、本研究ではさらに簡易に用いることができるセリシンコート法の利用性を検討した。一般的に繭からセリシンを抽出できる方法としてのカオトロピックイオン溶解法と、尿素・還元剤法を比較し、前者において分解の少ないタンパク質間相互作用の性質を保持した構造を持つセリシンを有効に抽出できた。さらに、このコート上では mES が効率よく増殖することがわかった。セリシン上では、mES が未分化の状態を維持すると考えられるドーム状の細胞塊を形成しながら増殖することもわかった。このように、セリシン繭から未分解のセリシンがカオトロピックイオン溶解法で有効に抽出することができ、得られるセリシンコートの上で mES を効果的に培養できることを示した。

第三章では、サイトカインを内包したセリシンを培養素材として利用する試みに関して言及した。サイトカインとしてヒト FGF-7 を用い、FGF-7 内包セリシン繭を作るカイコを遺伝子組換え技術でつくり出した。セリシン繭は粉碎によって簡単に粉体化できること、また、セリシン粉

体から FGF-7 が長期間かけて培地に放出されることがわかった。放出された FGF-7 は活性を有し、ケラチノサイトの増殖を促進した。長期間高温に暴露したセリシン内の FGF-7 は、遊離の FGF-7 よりも高い活性を維持した。さらに、この FGF-7 内包セリシン粉末をケラチノサイト三次元培養のための土台となるゲル中に含ませたところ、遊離の FGF-7 の添加に比べて良好な上皮のモデルを構築できることがわかった。セリシン自体は網目状に集合したタンパク質構造物であり、その中でサイトカインが厳しい物理環境の中でも長期間活性を保ちつつ保持され、しかも構造物の外に有効に放出されることが示された。

第四章では、得られた知見を統合的に検証し、これらをもとにセリシン・サイトカイン内包セリシンの特性評価を進めた。本研究の結果から、セリシン繭を用いて特定の細胞培養技術に適した機能を持つ培養素材をつくり出すことが可能であることがわかった。セリシンタンパク質自体は、カイコ個体由来の物質の汚染を取り除いて用いれば免疫賦活性の低い素材になると考えられる。さらに、粉碎・加工が容易であることから、ナノ化粒子などもつくり出すことができ、サイトカイン放出性の微小マテリアルの開発にセリシンを応用できると期待される。こうしたセリシンの特性から、細胞培養にとどまらず生体で利用可能な医用材料開発にセリシンを活用できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、カイコ絹糸腺のタンパク質発現機能改変の新技术によって得られるセリシン繭の新たなバイオテクノロジー利用の方法を見出す応用研究について述べられている。カイコ繭のセリシンの持つ膠様の性質の活用法を探りつつ、さらにサイトカイン活性を付与したセリシン素材の細胞培養への適性を明らかにする試みに関して論じられている。

まず、フィブロインを含まないセリシンが特定の方法により未分解のまま調製できることを見出し、そのタンパク質としての性質を明らかにしている。普通の繭からの処理では得られない未分解セリシンの特性を見出した点に新規性がある。さらに、マウス胚性幹細胞の培養に適した新素材としての可能性も見出した。同細胞は iPS 細胞などと共に再生医療分野での貢献度が非常に高く、本研究結果が幅広く新しい医療技術開発の基礎をなすものと期待される。

さらに、セリシン繭の特性を活かし、サイトカイン内包セリシン素材の細胞培養への活用に挑戦している。セリシンの優れた性質として、内部のタンパク質を保持しつつ、外部への放出が可能である点に着目した。細胞培養に関連する検討を行い、セリシン内でヒト FGF-7 が長期間安定であることを明らかにした。また、放出された FGF-7 による立体培養系への導入法を見出した。これらの結果は、サイトカイン内包セリシン素材の細胞培養への有効性を示している。

本研究は、これまでに経済的重要性が失われてきた絹糸の代わりに、医療応用可能な新しい繭の機能性素材を生産できるカイコの有効性を示すものであり、その学術的価値を認めるところである。

なお、研究成果は以下の二報の主要な学術論文にまとめられている。このうち一報では筆頭著者として海外の学術雑誌にて公表した。このように、申請者は十分な業績を有している。

(主要な論文発表)

- 1 . Chihiro Umehara, Ai Ai Lian, Yuichiro Funahashi, Keiko Takaki, Rina Maruta, Yuto Ohmaru, Yoko Okahisa, Takashi Aoki, Hajime Mori, Eiji Kotani. Proliferation of mouse embryonic stem cells on substrate coated with intact silkworm sericin. *Journal of The Textile Institute*, 2022, *113*, 2342-2351.
- 2 . Ai Ai Lian, Yuka Yamaji, Kazuki Kajiwaru, Keiko Takaki, Hajime Mori, Mervyn Wing On Liew, Eiji Kotani, Rina Maruta. A bioengineering approach for the development of fibroblast growth factor-7-functionalized sericin biomaterial applicable for the cultivation of keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, *23*, 9953.