

日本産業科学財団研究助成

2019 年度報告

京都工芸繊維大学

小谷英治

研究テーマ： カイコの機能性セリシンを用いた新幹細胞培養システムの構築

(事業の概要) これまでに、遺伝子導入操作により、繭糸成分のセリシンのみでできた繭を作るカイコの作出に成功した。このセリシン繭からとれる未変性の高分子セリシンは容易に加工ができ、細胞増殖の足場となるため、再生医療などで役立つ細胞培養素材としての利用に期待がもたれる。本研究では、未変性セリシンの細胞培養素材としての利用性を調べるとともに、セリシン繭内に細胞増殖因子を作るカイコを作出した。これらの研究成果を統合し、カイコ繭糸による有効な細胞培養素材の開発に活かす。

(事業の成果, 課題や今後の方向性等) まず、セリシン繭から調製される未変性の高分子セリシンのコート上での幹細胞培養に関する研究を行った。未変性セリシンは、2-3週間で自動的に変性してゲル化する性質を持つが、水溶液中に適量のアルギニンを追加することでゲル化を制御できた。すでに、セリシゲル上で細胞を培養できることはわかっていたが、今年度の取り組みから、セリシンコート上で胚性幹細胞は増殖すること、さらに、未分化状態を保つために必要な遺伝子の発現も維持することが明らかとなった。セリシンコート上の胚性幹細胞から、胚様体を形成させることができ、心筋へと分化させることができた。このセリシンのコートに対し、インテグリン結合性ペプチドを混合して用いた場合、細胞の張り付きと初期の細胞増殖の促進が見られた。

さらに、繭セリシン層で細胞増殖因子 (FGF-7) の発現に成功した。個体から吐き出された繭糸のセリシン層に FGF-7 が作られていることが示され、また、この FGF-7 には、ケラチノサイトの細胞増殖に関連する細胞内シグナル伝達を促進することも明らかとなった。現在、セリシン繭の中に FGF-7 を作り出すカイコを得たところ、セリシンの中で、FGF-7 は長期にわたり活性を安定に保ち、さらに培養液中に FGF-2 を徐放することも明らかとなった。

(課題) セリシンには、細胞を吸着させる足場としての性質が見られるが、さらに、有効に細胞を接着させるために、細胞種に合わせた細胞接着タンパク質やペプチドなどをセリシン液に添加していくことも、さらなる細胞増殖の促進のためには必要と考えられ、この点について今後注力して検討する。

(今後の方向性) 遺伝子組換えの応用により、細胞増殖因子や、細胞接着ペプチドを同時にセリシン内部に分泌するカイコを作り、さらに有効な細胞培養素材となりうる繭糸を生み出していく。このような研究成果をもとに、京都府内のバイオ・医学関連企業とのタイアッ

プすることにより、再生医療分野での素材提供に貢献したい。このために、さらに繭の成分変化をきたすカイコについての特許（小谷ら、特願 2019- 19658、高フィブロイン 繭作成法）の申請も行った。

セリシンには、サイトカインを長期に安定に保つ効果があることが分かり、今後は、セリシンに包まれたサイトカインを新しいバイオマテリアルとして用いるための研究に発展させたい。具体的には、皮膚創傷部位の保護剤の中に含ませた FGF-7 セリシンを用いて創傷治癒促進効果を明らかにしていく計画である。

（関連研究による発表論文）

1. Honda, C., Maruta, R., Takaki, K. Kotani, E. (2020): The partial purification and biological activity of FGF-2 encapsulating Cypovirus 1 polyhedra formed in the silkworm middle silk gland. *J. Silk Sci. Tech. JPN.* Vol27., in press.
2. Matsuzaki, Y., Kotani, E., Mori, H. et al. (2019). Sustained neutrophin release from protein nanoparticles mediated by matrix metalloproteases induce the alignment and differentiation of nerve cells. *Biomolecules* vol.2019, doi: 10.3390/biom9100510.
3. Yuasa, H, Kotani, E, Mori, H, Takaki, K. (2019): New method for immobilising diverse proteins onto cubic micro-protein polyhedrin crystals. *Protein Expression and Purification* vol. 167, 105531(DOI: 10.1016/j.pep.2019.105531)
4. Lye, P. Y., Kotani, E., Liew, M. W. O et al. (2019): Process development for quantification and vaccine efficacy assessment of recombinant hemagglutinin-neuraminidase. *Process Biochemistry* vol.2019, in press.
5. 亀田 侑希、高木 圭子、丸田 莉奈、小谷 英治. (2019): カイコゲノム編集のための簡易操作法. *東北蚕糸・昆虫利用研究報告* vol. 44, 22-26.

（特許）

小谷英治、山野真菜、森肇、北丸豊。特願 2019- 19658、高フィブロイン 繭作成法

（出願中）