

## 審査の結果の要旨

氏名 レ ヒュイン ティエン ドウック

細胞外マトリクス (Extracellular Matrix; ECM) は細胞外の空間を充填する物質であり、組織特異的な組成や三次元構造をとって、細胞が生育するための足場を提供する。細胞を組み上げることにより臓器や組織が持つ高次な機能を発現させる組織工学において、細胞の生育に適した人工 ECM (artificial ECM; aECM) を開発することは、再生医療の発展に向けて重要な課題である。エラスチンは ECM に含まれるタンパク質のひとつであり、弾性線維を形成して組織に伸縮性を与える。その特異な力学特性と生体適合性から aECM への利用が期待されているが、生物由来のエラスチンは加工性や生体内動態に課題があった。そこで近年、化学合成や遺伝子工学により人工的に作製されるエラスチン類似ポリペプチド (Elastin-Like Polypeptide; ELP) の利用が注目されている。

本博士論文は「Development of Novel Elastin-Like Block Polypeptides and Their Use in Construction of Biomimetic Extracellular Matrices (新規なエラスチン類似ブロックポリペプチドの開発とそれを利用した生体模倣細胞外マトリクスの構築)」と題し、Chapters 1-6 から構成されている。

Chapter 1 では ECM の役割と aECM が満たすべき要件、天然エラスチンおよび ELP の特色など、本研究の背景を述べている。特に、ELP の自己集合性に関して詳しく述べ、これまでに数多く報告されている valine-proline-glycine-X-glycine (VPGXG; XはP以外のアミノ酸) の繰り返し配列からなる ELP では、生体組織に見られるようなファイバー構造を形成できないことを課題として挙げている。本論文の目的は、ナノファイバーを形成しうる新規な自己集合性 ELP の開発と、aECM としての応用を見据えた機能配列の付加、さらには本論文にて開発する ELP 類を利用した aECM の作製であると述べている。

Chapter 2 では、計 4 種類の新規な ELP を遺伝子工学的に作製した結果について述べている。過去の ELP 研究で頻繁に使用されてきた (VPGXG)<sub>n</sub> 配列の片末端あるいは両末端に、アミロイド線維を形成しうる (VGGVG)<sub>n</sub> 配列を付加した新規な二重疎水性のブロックポリペプチドが作製され、それぞれ **PG** あるいは **GPG** と命名されている。**GPG** の C 末端に架橋可能配列を付加した **X-GPG**、および **GPG** に複数の架橋可能配列を導入した上、その C 末端に細胞接着性配列を付加した **F-GPG** も作製されている。それぞれの ELP についてのゲル電気泳動や

質量分析の結果から、これらのポリペプチドの作製に成功したと結論づけている。

Chapter 3 では、Chapter 2 で作製された **PG** と **GPG** の、水中あるいは水／トリフルオロエタノール (TFE) 混合液中における自己集合について述べている。水中において、いずれのブロックポリペプチドも温度刺激により数珠状のナノファイバーへと自己集合することが示されている。円二色性分光法と原子間力顕微鏡により自己集合の過程が詳細に調べられ、ブロックポリペプチドがまず疎水的に凝集してナノ粒子を形成した後、分子間で  $\beta$ -シート構造を形成しながらナノ粒子の連結が起こる機構が提案されている。TFE を添加した場合にはファイバーの形成速度が大幅に上昇するが、TFE がある濃度以上となった場合にはファイバー形成が起こらないことが示されている。TFE の濃度に依存した水素結合パターンの違いから TFE の効果について考察されている。

Chapter 4 では、Chapter 2 で作製された **X-GPG** と **F-GPG** の自己集合について述べている。**X-GPG** は水中での温度刺激によって、前章で述べた **GPG** と同様の自己集合挙動を示す一方で、**F-GPG** はファイバーを形成せず、粒子の凝集体のみを生じたことが示されている。適量の TFE の添加により、低い割合ではあるが **F-GPG** がナノファイバーを生じる条件が見出されている。ELP のアミノ酸配列の違いによって自己集合性に相違が生じた理由として、各 ELP の電荷量とその分布の違いを挙げ、分子間の静電反発力が大きくなると自己集合性が低下すると考察されている。

Chapter 5 では、Chapter 3 あるいは 4 で作製された ELP ナノファイバーを利用して人工 ECM を作製した結果について述べられている。**X-GPG** のナノファイバーを架橋することにより、低温域における **X-GPG** ファイバーの分解が抑制され、広い温度範囲で利用可能なナノファイバーが調製されたことが示されている。さらに、ヒト真皮の ECM 構造に倣った aECM が、ゼラチンと **GPG** ナノファイバーを用いた電界紡糸法により作製されている。作製した aECM の引張試験により、**GPG** ナノファイバーの添加が aECM の弾性率を低下させることが示され、**GPG** ナノファイバーが aECM の力学特性を制御しうる可能性が示唆されている。弾性率が低下した理由について、ゼラチンと **GPG** ナノファイバーのナノ複合構造の観点から考察されている。

Chapter 6 では本研究で得られた結果を総括している。

以上、本論文は新規なエラスチン類似ブロックポリペプチドの開発とそれを利用した aECM の作製に関する成果をまとめたものである。本成果は基礎、応用両面で有用なものであり、工学的に高い価値を有し化学システム工学の発展に寄与するところが多い。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。