

## 論文の内容の要旨

論文題目 灌流可能な血管を有する皮膚モデルの構築

氏名 森 宣仁

### 1. 序論

本研究の目的は、灌流可能な血管構造を有する皮膚モデルを構築することである。本皮膚モデルは、従来の皮膚モデルと同等の真皮・表皮の二層に加え、新たに真皮層の内部に血管内皮細胞によって被覆された灌流可能な血管構造(以下、血管流路)を有することを特徴とする。

これまで皮膚モデルは、皮膚科学の研究ツール、創傷部位の被覆、化粧品開発や創薬での動物実験の代替として利用されてきた。また、実際の皮膚を模倣するため、皮膚モデルは種々の細胞、構成要素で拡張されてきた。中でも、血管の再構築は、血管新生に関する基礎研究、移植における生着率向上、薬物の血管への影響測定といった応用先があるため注目されている。加えて、血管は栄養・酸素の供給経路として働くため、高次構造・機能を皮膚モデルに構築するための基盤となると期待できる。しかしながら、これまでに構築された血管は、血管内皮細胞がランダムに形成した毛細血管様の構造であったため、血管を通じた皮膚モデルへの酸素・栄養供給や、血管からの溶液サンプリングが難しく、前述のアプリケーションに制限を生じていた。

そこで本研究では、従来の表皮及び真皮層からなる皮膚モデルに対して、内皮細胞に覆われた血管流路を統合し、さらにこの血管流路の両端を培養デバイスの接続部に固定することで、外部ポンプによる培養液の灌流を可能とする(図1)。血管流路の培養デバイスへの固定においては、皮膚モデルの培養中の収縮や作製プロセス中の力学的な負荷による、皮膚モデルの培養デバイスからの脱離が技術的課題となる。本研究では、培養デバイスに皮膚モデルの脱離を防止するための構造付加や表面処理を実施することでこの課題を解決する。さらに本研究では、作製した血管流路付き皮膚モデルの化粧品・医薬品開発における応用可能性を実証するため、経皮吸収試験を実施する。また、別の応用展開として、皮膚モデルに対して周期的な伸長・圧縮を付加できるよ

うに改良することで、メカノバイオロジーのツールとしての利用可能性を検討する。

## 2. 培養デバイス及び血管流路付き皮膚モデルの作製

皮膚モデルを培養デバイスに固定するため、接続部に皮膚モデルを機械的に把持するためのアンカ構造を設け、さらに細胞及びコラーゲンの接着性を向上する表面処理としてO<sub>2</sub>プラズマ処理を行った上で、皮膚モデル中に血管流路を構築した(図2, 3)。さらに、アンカ構造の把持効果(図4)、O<sub>2</sub>プラズマ処理の接着性向上効果及びシール効果(図5, 6)を評価し、アンカ構造及びO<sub>2</sub>プラズマ処理が皮膚モデルの培養デバイスへの固定に実際に有効であることを示した。

## 3. 血管流路付き皮膚モデルの評価

血管流路付き皮膚モデルを形態及び機能の観点から評価した。形態の観点では、血管流路付き皮膚モデルの表皮層の厚み(約50 µm)、分化の状態が確認された(図7a-d)。さらに血管流路が血管内皮細胞によって被覆されていることが確認された(図7e, f)。機能の観点では、表皮がバリア機能を有することを電気計測により確認し、また血管流路については分子サイズ選択的な透過性及び酸素・栄養供給能が確認された(図8, 9, 10)。これらの結果から、本研究の血管流路付き皮膚モデルが、皮膚モデル及び血管のモデルとしての基本的な性質を備えていることが示された。

## 4. 血管流路付き皮膚モデルを用いた応用展開の検証

血管流路付き皮膚モデルの表皮に、経皮吸収型製剤のモデル物質としてカフェイン及び二硝酸イソソルビド(ISDN)を塗布し、皮膚モデル下の培地及び血管流路内の培地をそれぞれ一定時間ごとにサンプリングした(図11a, b)。この結果、両薬剤がいずれのサンプルからも検出され、時間とともに累積透過量が増加した(図11c-f)。また、ISDNの透過量はカフェインの透過量より大きかったが、この結果はヒト皮膚における両薬剤の透過性の違いと一致した傾向である。さらに、血管内皮細胞成長因子VEGFを培地中に添加したところ、血管流路内の培地への透過量が増加した。生体においてもVEGFを添加することで血管の透過性が上昇することが知られており、従って本研究の血管流路が生体に類似した内皮機能を有していることが示唆された。また、メカノバイオロジー分野への応用の概念実証を実施するため、培養デバイスの材料をシリコーンゴムに変更し、伸展装置に取り付けることで皮膚モデルに伸長・圧縮を与えた。この結果、皮膚モデルの表皮層の厚み及び分化の状態が改善され、さらに微小なシワ様の構造が観察された。

## 5. 結論

本研究では、灌流可能な血管流路を皮膚モデル内部に構築する方法を確立した。さらに、作製したモデルが、皮膚及び血管流路として必要な形態及び機能を備えていることを明らかにしたうえで、経皮吸収試験への応用可能性を示した。また、メカノバイオロジー分野への応用展開の概念実証を行った。これらの結果から、本研究の皮膚モデルは化粧品・医薬品の開発や皮膚の基礎研究分野に貢献すると期待できる。

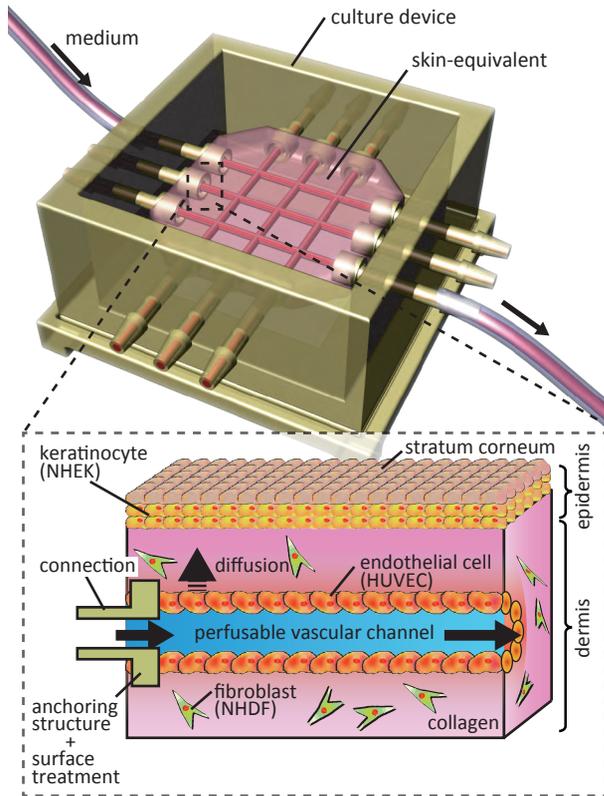


図1 本研究のコンセプト。

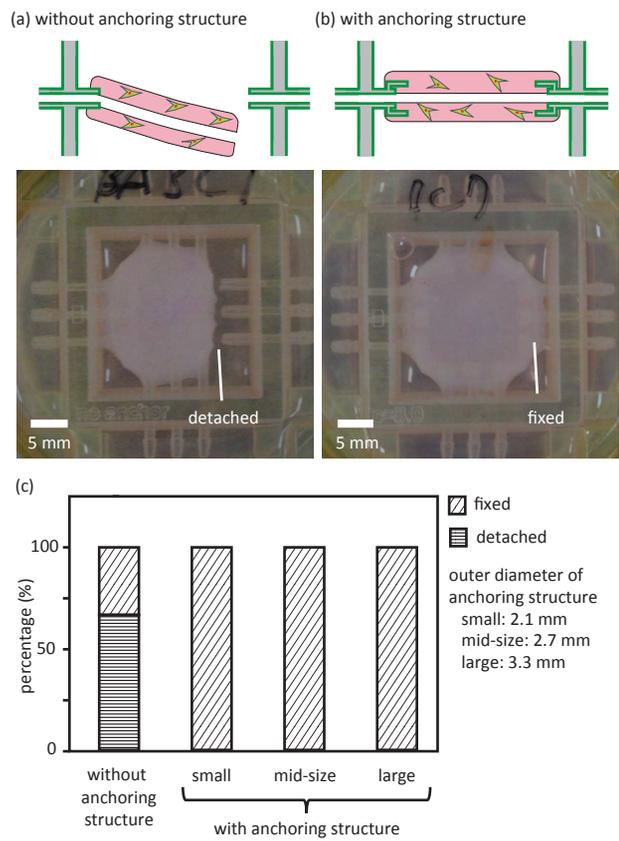


図4 アンカ構造の把持効果。

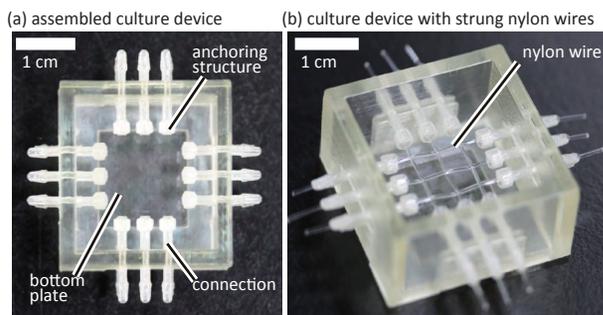


図2 培養デバイス。

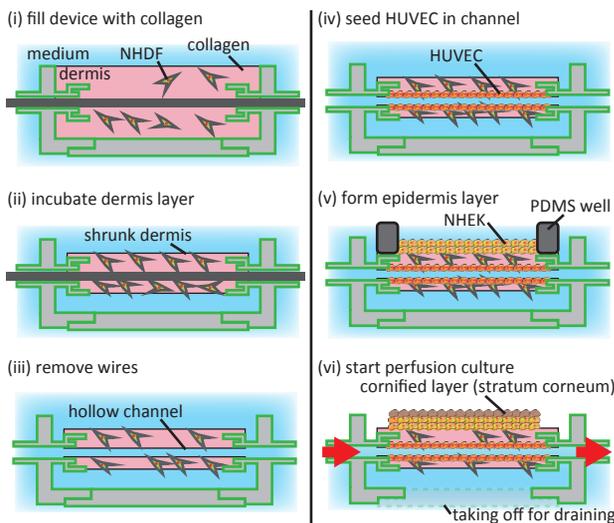


図3 血管流路付き皮膚モデル構築プロセス。

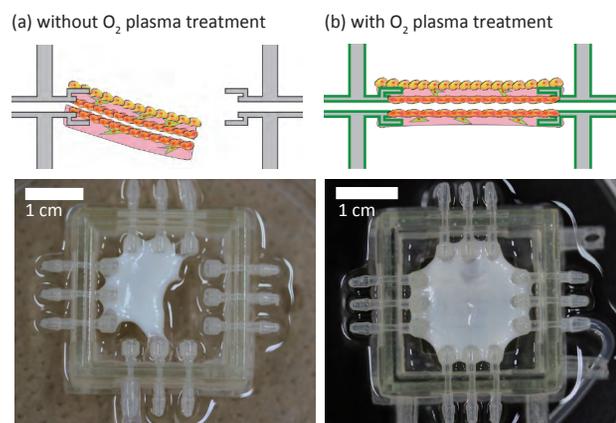


図5 O<sub>2</sub> プラズマ処理の接着性向上効果。

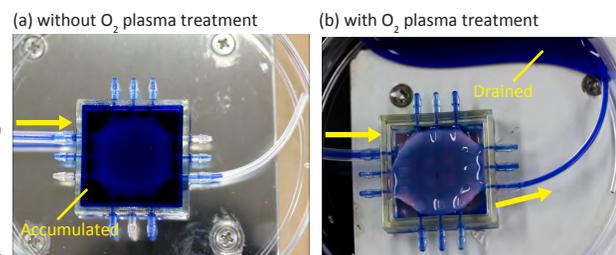


図6 O<sub>2</sub> プラズマ処理のシール効果。

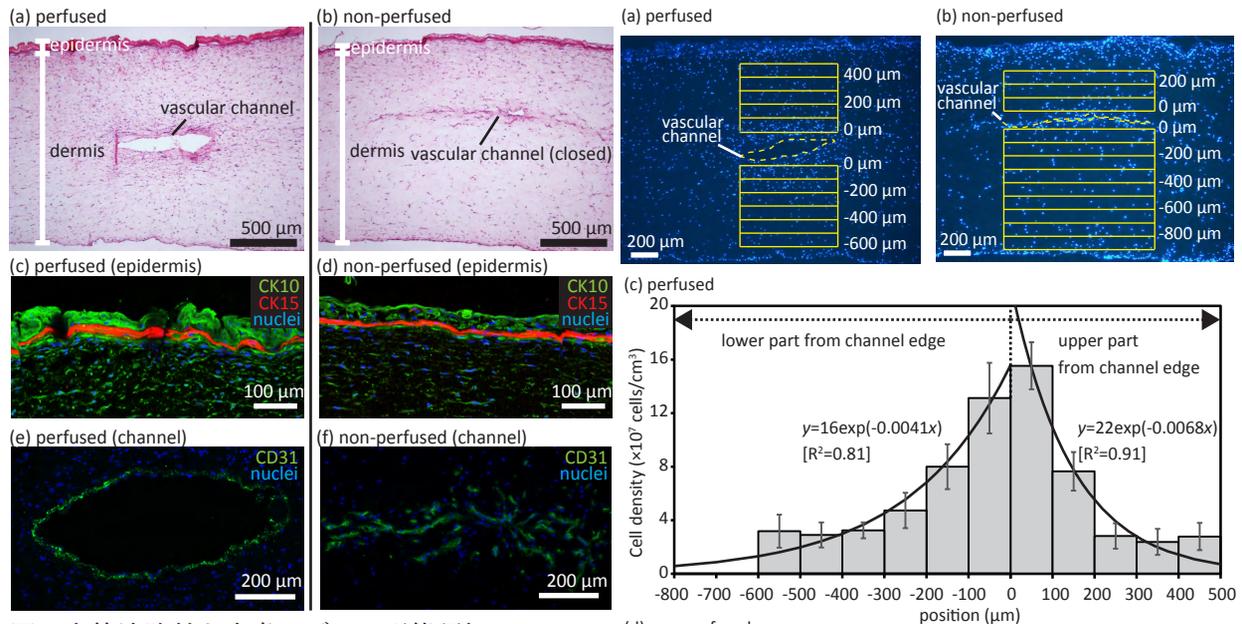


図 7 血管流路付き皮膚モデルの形態評価。

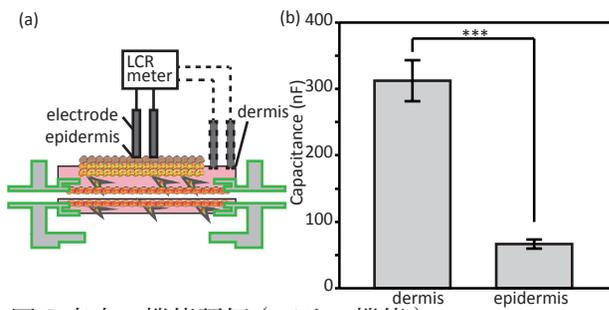


図 8 表皮の機能評価 (バリア機能)。

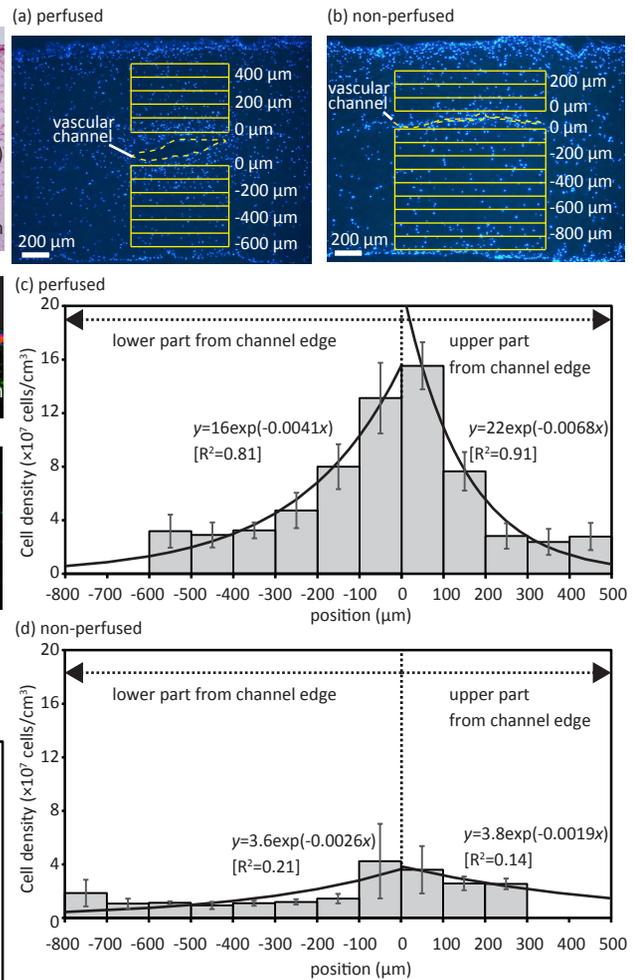


図 10 血管流路の機能評価 (細胞の密度分布)。

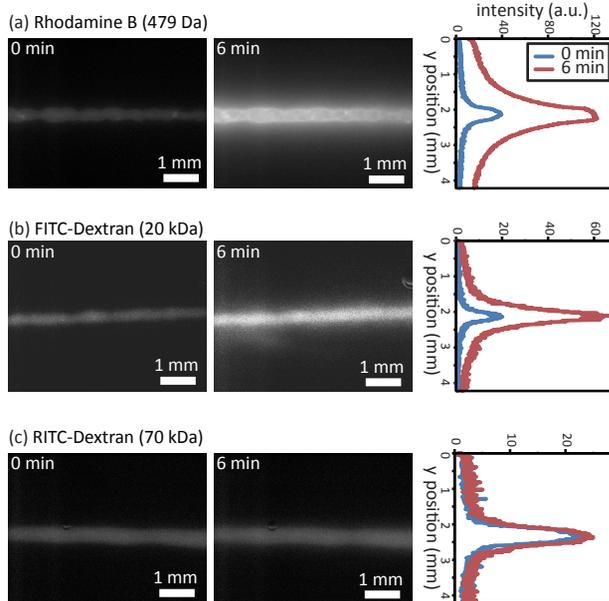


図 9 血管流路の機能評価 (分子量選択的透過性)。

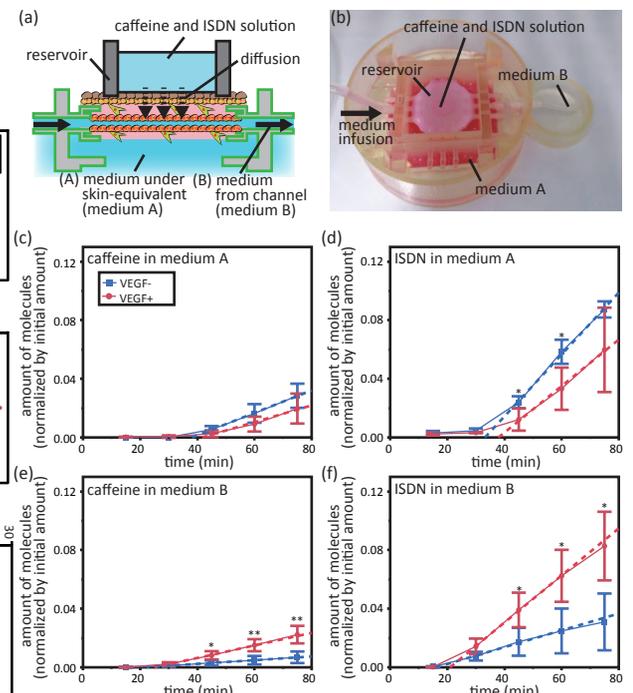


図 11 経皮吸収試験の模式図と結果。