

審査の結果の要旨

氏名 薄葉亮

血管の最内層を構成する血管内皮細胞層の機能は、生体の恒常性の維持に不可欠である一方で、疾患状態においては異常な透過性亢進や病的血管新生が誘導される。よって、血管内皮機能は創薬分野において高い関心の対象であり、これまでに血管内皮を評価するための手法が数多く報告されている。しかし *in vivo* 手法では、細胞レベルでの挙動を知ることが困難であり、ヒトとの種差が問題となる。一方、*in vitro* 手法では細胞レベルで解析できるが、実際の内皮機能を観察するには不十分であった。もしヒト血管を模倣できれば、標的となる分子への薬理活性を評価するだけでなく、構造・形態等の生理的性質というフェノタイプに基づく活性評価が可能となる。そのアプローチとして *organ-on-a-chip* 技術が発展しているが、実際の薬剤評価への応用には課題が残されており、基礎血管生物学研究へ応用して、これらの技術がどのように有用なのか十分には示せていなかった。そこで本論文では、ヒト細胞から三次元構造としての血管組織を作製し、血管内皮機能を直接評価可能な血管モデルを提案している。そして、応用を考慮した薬剤評価の概念実証と本モデルの利点を示し、特定分子の新たな機能を解明することに成功している。本論文は以下の4章から構成されている。

第1章は序論であり、本論文の背景および目的について述べている。血管内皮機能と疾患との関連を述べ、血管機能評価系の従来手法および最新動向をまとめている。現在広く用いられている *in vitro* および *in vivo* 手法の制限を挙げ、血管の機能を模倣した評価系の必要性を示している。その必要性に応えるために *organ-on-a-chip* 技術が有望である理由を述べ、現状の課題を挙げている。そして、その解決に向けた血管の *in vitro* モデルを達成するための本論文のアプローチを示している。

第2章では、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) を用いた微小血管構造作製およびそれを用いた血管透過性評価手法の開発と薬剤評価について述べている。ポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane: PDMS) の型にコラーゲンゲルのマイクロ流路を形成し、流路内で HUVEC を培養することで血管様構造を作製している。そして、内皮のバリア機能を有するモデルとするために、達成すべき項目を示し、微小血管モデルの構築および培養微小環境の設計を行っている。そして、短時間で炎症性因子の一つであるトロンビンが引き起こす透過性亢進を測定する系へとすべく、エチレンジアミン四酢酸を内腔に流して細胞間結合の強度を調節する手法を開発している。また、トロンビンによる血管透過性を抑える化合物のモデルとして、細胞間結合を強めるシグナル経路を活性化させる環状アデノシン一リン酸のアナログ分子やアンジオポエチンを用いて透過性抑制効果を確認している。さらに、免疫染色観察

により透過性変化と細胞形態変化を関連付けている。薬剤評価の概念実証として、微小血管モデルを利用して抗がん治療に用いられている血管新生阻害剤の評価を行い、血管新生と血管透過性の両面で評価可能な実験系であることを実証している。以上の結果より、人工微小血管モデルが血管内皮機能という実際のフェノタイプを基準とした薬剤評価系に応用可能であると示している。

第3章では、微小血管モデルを利用した特定遺伝子を対象とした内皮機能評価と分子生物学的検討について述べている。本章では、血管内皮細胞において発現し、血管炎症や血管新生に関与すると報告されている **Epidermal Growth Factor-Like domain 7 (EGFL7)** を対象として、微小血管モデルを活用している。病的血管新生時には EGFL7 の発現が変化し、無秩序な血管形成をもたらすと考えられている。そこで、EGFL7 の発現をノックダウンした HUVEC を用いて血管を作製し、血管内皮成長因子 (**Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF**) 添加により血管新生を誘導することで、EGFL7 が病的血管新生に与える影響を評価している。VEGF 添加後 6 日間微小血管を培養すると、EGFL7 ノックダウン群においては血管新生が抑制されることを観察している。さらに、EGFL7 ノックダウン群では、血管透過性が亢進し、免疫細胞接着が増加することを観察し、接着結合分子の発現パターンが乱れることを発見している。これらの結果より、血管内皮の恒常性が乱れていることを見出し、EGFL7 が接着分子の機能発現に重要なチロシン残基のリン酸化に関与していることを明らかにしている。これらの結果より、三次元微小血管モデルは、血管内皮における機能未知の分子探索に有用な手法であると示している。

第4章では、結論として本論文全体のまとめとその到達点を述べている。血管機能を模倣した *in vitro* モデルの有用性と血管生物学研究に与える効果を述べるとともに、残された課題と今後の研究分野の展望について記述している。

以上、本論文は、三次元構造を有する血管評価手法を開発し、薬剤評価と血管生物学研究への応用についてまとめたものである。本論文は、血管モデルの技術開発だけでなく、血管機能に関わる因子である EGFL7 の検証を行い、三次元モデルの恩恵により新規な現象を検証可能であると示した。本論文の成果は、創薬過程における薬理研究等の実研究に微小血管モデルを応用するための知見になり得ると期待される。

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。