

博士論文（要約）

三次元微小血管モデルを用いた内皮機能評価法の開発と応用

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。実験動物を用いる *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した実験系があれば、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。そのため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いる。さらに、このような技術を基礎血管生物学研究へ応用して血管内皮機能の解明に利用するにあたり、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、まず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た。そして、応用を考慮した薬剤評価の概念実証を行い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た。本論文は以下に記す4章から構成され、Fig. 1 に示す流れとなっている。

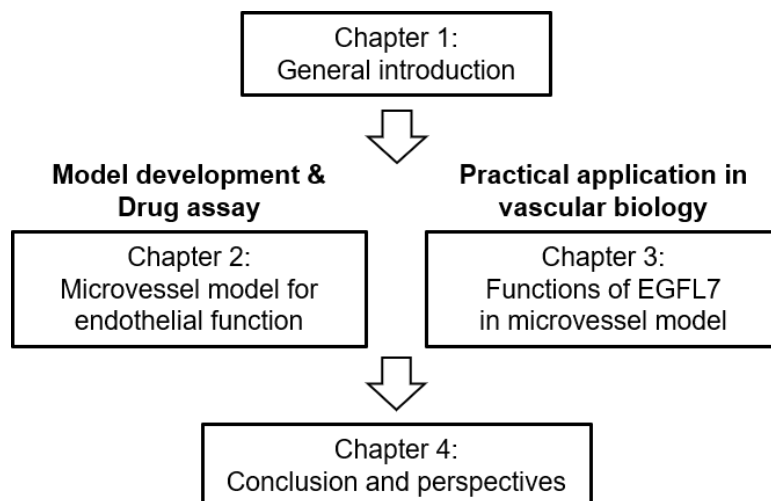


Figure 1. Overview of this thesis.

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た。本研究の対象としている血管内皮機能について概説し、疾患とどのような関連があるのかを説明した。血管内皮機能が創薬ターゲットとして重要であることに触れ、非臨床試験と臨床試験との間に存在する隔たりを埋めるために新たな評価系が必要だと述べた。そして、血管内皮評価の従来手法を述べ、*in vitro* および *in vivo* 手法の制限を挙げた。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た。

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内皮機能評価手法の開発と薬剤評価を行った。本研究で開発したチップと微小血管作製の模式図を Fig. 2 に示す。まず、ポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane: PDMS) のチップを作製し、チップ内でコラーゲンゲルのマイクロ流路を形成した。この流路内に HUVEC を導入して培養することで血管様構造を作製した。内皮機能評価手法として確立すべく、評価手法および培養微小環境について達成すべき項目を示した。まず、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た。次に、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た。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

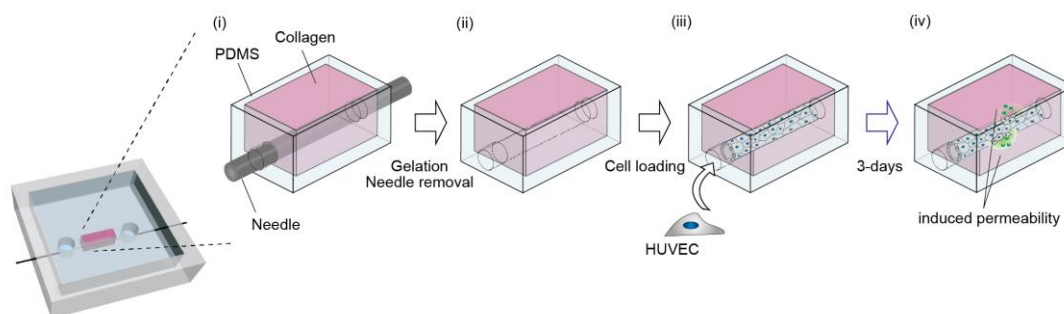


Figure 2. Schematic overview of microvessel fabrication. Fabrication process of microvessel using PDMS chip.

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（Sorafenib, Sunitinib）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た。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た。

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を行った。本章では、血管内皮細胞に発現し、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、第2章で開発した微小血管モデルを活用した。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た。Fig. 3にEGFL7ノックダウン微小血管モデルで観察した現象をまとめた。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た。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た。これらの結果より、EGFL7の発現抑制により血管内皮の恒常性が乱れることを見出し、EGFL7が接着

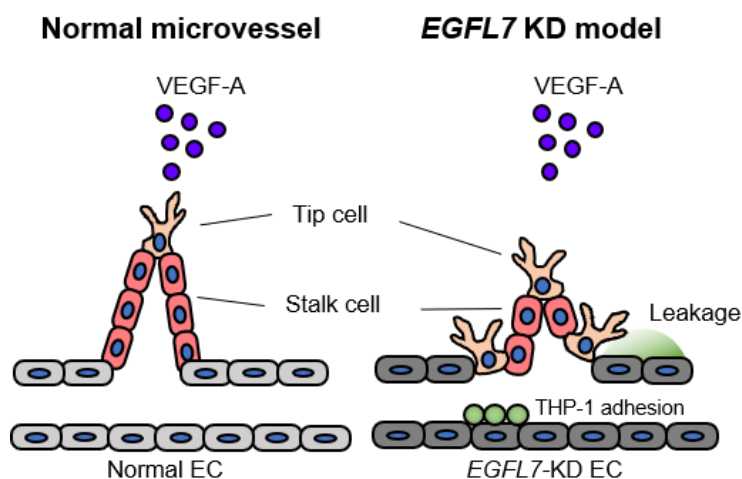


Figure 3. Schematic illustration of the phenomena observed in the microvessel model (EGFL7 KD: EGFL7 knockdown, EC: endothelial cell).

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することを明らかにした。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た。

第4章では、結論と今後の展望について述べた。結論として、本論文全体のまとめとその到達点を示した。今後の展望として、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、残された課題と研究分野の発展の方向性について記述した。

以上、本論文では、三次元構造を有する血管評価手法の開発し、薬剤評価と血管生物学研究への応用についてまとめた。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実際に示したものである。したがって、本論文の成果は、創薬研究等の実研究において微小血管モデルを活用するための知見となることが期待される。