OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Controlling Blood Capillary Structures in Three-Dimensional Tissues by Regulating Elastic Moduli of Scaffolds
Author(s)	尚, 玉成
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92929
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (尚 玉成)	
Title	Controlling Blood Capillary Structures in Three-Dimensional Tissues by Regulating Elastic Moduli of Scaffolds （足場材料の弾性率制御による三次元組織内の血管網構造の制御）

Abstract of Thesis

In this thesis, it was demonstrated the possibility of controlling capillary network and hole formation by varying the factors such as cell density and scaffold mechanical properties.

First, the generation of 3D capillary tissue and how the adjustment of collagen microfibers (CMF) amount was studied, fibroblasts (NHDF) number and endothelial cells (HUVEC) number affect the blood capillary growth. In the case of a fixed cell number, since NHDF can secrete collagen as a cross-linking agent to enhance tissue strength, increasing the amount of CMF reduced the number of cells density of the tissue and decreased the mechanical strength of the 3D tissue. When the amount of CMF was fixed, for NHDF or HUVEC, too few or too many cells density was not conducive to the growth of capillaries in 3D tissues, and NHDF and HUVEC synergistically regulated the growth of capillaries.

Then, the hole and capillary network structure was regulated in a 3D blood-brain barrier (BBB) *in vitro* model with a special hole structure by adjusting the model elastic modulus. Specifically, it was found the hole depth on the bottom surface increased with an increasing elastic modulus of the fibrin gel scaffold, and the internal capillary network length increased with decreasing elastic modulus. Through a series of experiments, it was learned that when low numbers of brain microvascular endothelial cells (BMECs) are seeded on the model bottom surface, they will first perform proliferative behavior and not form holes. The process of hole formation in the 3D BBB model was clarified by time lapse experiments where was found that the BMECs first proliferate, leading to aggregation and invasion when many BMECs are seeded on the model bottom surface, eventually forming a hole. Besides, by adjusting the cell composition in the 3D BBB model, it was demonstrated that internal astrocytes (ACs) and pericytes (PCs) are important for inducing hole formation on the model surface. From gene expression analysis, it was found that the MMP1, MMP10 and ACE genes related to the process of ECM degradation and enzymatic systems, CLDN5 gene related to tight junctions, ANGPT1, ANGPTL1 gene related to angiogenesis, are up-regulated in models with a hole structure and are highly likely to influence the hole formation regulation process. Besides, it was demonstrated the possibility of establishing a regulated 3D BBB model and this may provide a new way to fabricate other complex capillary network models by modifying EC types such as human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), human lymphatic endothelial cells (HLECs), and human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs).

Finally, inspired by previous study, the hole structure on hydrogel surface was made by enzyme. This method may provide a new way to fabricate 3D vascular opening models.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（尚　玉成　）			
		(職)	氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	松﨑　典弥
	副 査	教授	平野　康次
	副 査	教授	木田　敏之
	副 査	教授	安田　誠
	副 査	教授	正岡　重行
	副 査	教授	生越　専介
	副 査	教授	鳶巣　守
	副 査	教授	菊地　和也
	副 査	教授	伊東　忍
	副 査	教授	芝田　育也
	副 査	教授	藤塚　守
	副 査	教授	家　裕隆

論文審査の結果の要旨

創薬プロセスの早期段階では、*in vivo*での脳浸透性を効果的に予測するため培養細胞を用いた*in vitro*の血液脳関門（BBB）モデルが用いられる。近年、microphysiological systemによるヒト脳血管内皮細胞（BMEC）とペリサイト（PC）、アストロサイト（AC）の共培養系やヒトiPS細胞由来脳血管内皮細胞を用いた研究が報告されているが、BBBとしての機能が低いことが課題である。これは、生体のようにBMEC, PC, ACの3種類の細胞の相互作用を形成できていないことが原因と考えられる。また、最近ではペプチドや核酸、抗体などの中・高分子などのニューモダリティが注目されている。一般的に薬物の受動的なBBB浸透は分子量450以下の低分子で起こるため、分子量5k~50kのニューモダリティを受動浸透で脳に送達することは困難である。そこで、注目されているのが受容体介在性細胞輸送（RMT）である。トランスフェリン受容体（TfR）やグルタチオン受容体、グルコーストランスポーターなどの受容体に結合した物質はエンドサイトーシスでBMEC内部に取り込まれ、エキソサイトーシスにより脳側へ輸送されると期待されている。特にTfRは分子量依存性が無いため、抗体薬などの大きな物質の輸送に有効と考えられている。しかし、*in vitro*モデルを用いてRMTを定量的に評価することは未だ困難である。Mimetas社が、自社製品のマイクロ流路デバイスを用いた抗TfR抗体の透過性を報告しているが、非透過性のIgG1抗体も透過するため、S/N比はわずか2倍しか得られていない。より高いS/N比でRMTを評価可能な*in vitro*モデルの作製が望まれている。

本研究では、研究室で独自に開発された開口型構造を有するBBBネットワークモデルの足場材料の弾性率や材料密度を制御することで開口血管構造を制御できることを見出した。足場材料の弾性率が高いほど開口血管構造は延伸した。また、このメカニズムを明らかにするため、細胞が産生する酵素の透過性と弾性率や材料密度の関係を解析した結果、酵素の透過性が律速となりBBBネットワーク構造が決まる可能性を明らかにした。

以上のように、本論文は創薬プロセスで重要となるBBBモデルの開口ネットワーク構造を足場材料の性質により制御できることを見出した独創的かつ新規性の高い研究内容である。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。