A Thesis for the Degree of Ph.D. in Engineering

Development of an in vitro neurovascular unit model by on-chip tissue engineering

February 2019

Graduate School of Science and Technology Keio University

Hiroyuki Uwamori

報告番号 甲 第 号 氏 名 上森 寛元

主論 文題名:

Development of an in vitro neurovascular unit model by on-chip tissue engineering (オンチップ組織工学による生体外 Neurovascular Unit モデルの開発)

(内容の要旨)

Neurovascular Unit (NVU) とは、主にニューロン、アストロサイトなどのグリア細胞、ペリサイトを伴う微小血管、細胞外マトリクスから成る概念的な構成単位である。このことは、神経変性疾患に対する治療戦略としてニューロンのみに着目するのではなく、周辺の細胞との相互作用の調査を行うことの重要性を示唆している. NVU における微小血管には血液脳関門という脳血管特有のバリア機能があり、ニューロンに対する薬剤の供給を制限する。これまで血液脳関門の機能について多くの研究が行われてきたが、生体外の脳血管モデルは生体内の環境との乖離があり、いまだに NVU の 3 次元生体外モデルは実現していない。そこで本研究では、マイクロ流体デバイスという細胞の 3 次元培養が可能なチップを用いて、神経幹細胞と脳の血管内皮細胞を培養し、生体外 NVUモデルを構築することを目的とした。

- 第1章に、本研究に関する基礎事項、従来の研究、本研究の目的を概説した。
- 第2章に、本研究で用いた試薬類や実験手法などについてまとめて述べた.

第3章では、まず NVU の中の微小血管のみに着目し、生体外血管新生モデルの確立のために行った実験について述べた。特に血管内皮細胞の臓器特異性について着目し、脳血管内皮細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞を用いてそれぞれ微小血管網の構築を行い、その構築プロセス、血管バリア機能の評価、血管内皮細胞のジャンクションタンパク群の発現評価などを行った。その結果、生体外脳血管新生モデルを確立するとともに、脳血管において血管バリア機能が優れていることを見出した。

第4章では、生体外 NVU 構造の構築を目指し、血管新生モデルと神経新生モデルの 統合を試みた、まず、脳血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養によって血管新生を誘導 できるような細胞培養条件を検討した、次に、その培養条件下で神経幹細胞を培養し、3 次元的な神経網形成を誘導することに成功した、さらに、血管新生と組み合わせること で、神経網および微小血管からなる神経・血管組織の構築に成功した。

第5章では、第4章で述べた培養系を長期培養にすることにより、神経網と微小血管に加えアストロサイトを含んだ NVU 様組織の構築に必要な培養条件を検討した. 長期培養によって神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導が確認され、神経・血管・アストロサイトを含む組織の構築に成功したが、生体内の模擬のため、さらなる検討が必要であることが示唆された.

第6章に、結論として各章の内容をまとめて研究成果を要約し、今後の展望について述べた.

Thesis Abstract

| Registration | ■ "KOU" | □ "OTSU" | Name | UWAMORI, Hiroyuki | |
|--------------|---------|------------------|------|-------------------|--|
| Number | No. | *Office use only | | | |

Thesis Title

Development of an in vitro neurovascular unit model by on-chip tissue engineering

Thesis Summary

Neurovascular unit (NVU) is a conceptual unit in the brain, composed of neurons, glial cells such as astrocytes, microvasculatures covered by pericytes and extracellular matrix. This warns against focusing on only neurons and indicates the importance of investigating interactions between neurons and other brain cells for therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. Microvasculatures in NVU have brain-specific functions called blood-brain barrier (BBB) and limit the transport of drugs to neurons. Although many studies have been performed for investigating BBB functions, an *in vitro* three-dimensional (3D) NVU model has not been established because of the gap between *in vitro* cell culture microenvironments and *in vivo* cellular conditions. Therefore, the aim of this study is to establish an *in vitro* 3D NVU model using a microfluidic device.

Chapter 1 summarizes the background, previous studies and objectives of this study.

Chapter 2 summarizes materials and methods of this study.

Chapter 3 describes the establishment of an *in vitro* brain angiogenesis model focusing on microvasculatures in NVU. In particular, organ-specificity of endothelial cells (ECs) is focused on, and brain ECs and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) are cultured to construct microvasculatures. These organ-specific microvasculatures are compared in terms of microvascular formation processes, endothelial barrier functions and endothelial junction protein expressions. Consequently, an *in vitro* brain angiogenesis model is successfully established. In addition, it is found that endothelial barrier functions are greater in brain microvasculatures compared to microvasculatures formed by HUVECs.

Chapter 4 describes the integration of brain angiogenesis and neurogenesis models toward the construction of an *in vitro* NVU structure. First, brain ECs and mesenchymal stem cells are cocultured to investigate cell culture conditions for inducing angiogenesis. Next, the optimized culture condition for angiogenesis is applied to the culture of neural stem cells (NSCs), which succeeds in inducing 3D neurite extension. Finally, these angiogenesis and neurogenesis models are combined, which results in the construction of neurovascular tissues.

Chapter 5 describes investigation of long-term culture to construct NVU tissues including astrocytes. NSCs differentiate into astrocytes in long-term culture, which allows to construct a tissue composed of neurons, astrocytes and microvasculatures. However, further investigation is needed to construct more physiological NVU structures.

Chapter 6 summarizes the results of this study and future perspectives.

No.