

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 保田 壮一郎

心不全や心機能低下症例の新たな治療法として心臓の収縮機能を改善する遺伝子治療が注目され様々な実験系で研究が進められている。単一心筋細胞標本は、個体レベルの実験や乳頭筋などの多細胞の集合標本とは異なり、生体の代償機転や遺伝子導入の不均一という問題を持たない上に高い遺伝子導入効率を実現できるという利点を持つ実験系であり、従って心筋収縮機能改善のための効果的遺伝子のスクリーニング系としては最適なものとなる可能性がある。しかし過去に報告された単一心筋細胞の発生張力測定法は技術的に難しく成功率が低いという問題があった。そこで本研究では、カーボンファイバーとフィードバック回路を組み合わせた新しい単一心筋細胞の収縮機能の測定法を開発し、以下の結果を得た。

1. 共同研究者と開発した新しいカーボンファイバーである Graphite Reinforced by Carbon (GRC) ファイバーは、従来の均質無構造なカーボンファイバーと異なり、表面に無数の小さな凹凸を有する。この表面の形状が細胞表面との付着に有利なように電荷を増加させていると考えられる。直径 30-40  $\mu\text{m}$  の固いものと、直径 5-7  $\mu\text{m}$  のある程度のコンプライアンスを持つものの 2 種類のカーボンファイバーを作り、ラット心臓から単離した単一心筋細胞の両端に付着させて保持した。
2. カーボンファイバーにより細胞の長軸方向に引っ張りを加えると、細いファイバーが細胞から外れるが、その時のファイバーの撓みとファイバーのコンプライアンスから、細胞とカーボンファイバーの付着力（ファイバーが細胞から離れる際の最大張力）を計算した。この付着力の値は心筋細胞が強心薬投与下での単収縮により発生する張力よりも大きく、つまり細胞が強く収縮しても外れないことが示された。
3. この新しいカーボンファイバーを用いて心筋細胞の単収縮における発生張力を測定するシステムを開発した。電氣的ペーシングによって細胞を単収縮させると太いカーボンファイバーは固いため動かないが、細い方は引っ張ら

れて数 $\mu\text{m}$  程度撓む。このカーボンファイバーの動きを2分割フォトダイオードに投影することによって検出し、この変位シグナルにファイバーのコンプライアンスを乗じることにより発生張力を得る。さらに細いカーボンファイバーをピエゾ素子に固定しそのドライバーに変位シグナルの変化を打ち消すようなフィードバックシグナルを加えることによって等尺性収縮に等しい条件をつくり出すことに成功した。

4. 薬物効果の一例として、イソプロテレノール 10  $\mu\text{M}$  を投与すると等尺性張力の最大値はコントロールに比較して有意に増加し、また収縮・弛緩の時間経過も速くなる傾向が認められた。他の実験系で観察される強心薬に対する生理的応答がこの系でも実現されることを確認した。
5. さらに漸増負荷に対する心筋細胞の応答を調べるために、フィードバック力を少しずつ増加させながら細胞の収縮を観察した。これらから得られた短縮距離と発生張力をプロットすると、1回の収縮弛緩に対応して1つのループが得られた。フィードバック力が変化すると、つまり細胞にかかる負荷が変化するとこのループも囲む面積を変えながら傾きを変えていった。さらに1つのループで囲まれる面積、つまり細胞が1回の単収縮でする仕事と、細胞にかかる負荷をプロットすると Fenn 効果（心筋は中程度の負荷に対して外的仕事が最大になる）に相当するカーブが得られた。この実験系によって心筋細胞の生理学的性質を多角的に検証できることが示された。

以上のように本研究においては、新たに開発したカーボンファイバーとフィードバック回路を組み合わせることで単離単一心筋細胞の単収縮における発生張力や仕事を測る新しい測定系を開発した。この実験系は過去に報告された心筋細胞の張力測定法には認められない以下の2つの優れた特徴を有している。すなわち、(1) 心筋細胞を傷害することなく再現性をもって容易に等尺性張力の最大値を測定できること。(2) 負荷を任意に変えながら心筋細胞の発生張力や仕事の量や効率を記録できることである。現在細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の同時測定を行うべくシステムを改良中である。

本研究は、薬物や遺伝子導入によって心臓のエネルギー効率を改善させるという心不全の新たな治療法の開発に貢献するのみでなく、様々な心不全の病態において上昇した負荷に対して心筋がいかに適応しているかを細胞レベルで評価することを可能にするものであり、学位の授与に値するものと考えられる。