

本論文は、1細胞単位での細胞集団ネットワークを構築する新しいオンチップ細胞培養計測手法を用い、心筋細胞をモデルとして、1細胞からの心筋細胞ネットワークの再構成によって、心筋集団の拍動の安定性、揺らぎの大きさについての集団化効果、空間での細胞のネットワークパターン依存性、薬剤に対する応答の違いから、「組織モデル」となるのオンチップ細胞ネットワークの構築を目指した一連の研究を報告したものである。

第1章では、本研究の背景と目的を述べている。まず、本研究の背景として、生命における基本的構成単位である細胞は、細胞集団を形成することによって1細胞状態では起こり得ない集団依存的な機能を有するようになり、より複雑な組織、器官としての機能を発揮して行くことが説明されている。具体的には、心臓が主に心筋細胞と繊維芽細胞から成るが、心臓の安定した拍動リズムを産み出すペースメーカー領域である洞房結節では解剖学的特徴として心筋細胞のみから形成される細胞集団を持っていることが知られており、細胞が集団化することによる効果が単なる細胞レベルから組織レベルへの機能的移行を実現させていると考えられることから、心筋細胞をモデルとして集団の理解を進めることは、実際の臓器モデルを理解する上でも有意義であることが説明されている。次に、本研究の目的について、細胞集団化効果の理解を目指して1細胞レベルで構成的に細胞ネットワークを構築することが可能な培養法を新たに開発し、これを用いて1細胞を基本単位として構成的に細胞集団を再構築し、その細胞集団の特性評価を行ったことを述べている。

第2章では、オンチップでの空間配置を制御して心筋細胞ネットワークを培養する細胞培養技術を説明している。従来のパターニング技術では、大雑把な制御しかできなく、構成的に細胞集団を作製することは困難であったものを、1細胞レベルで細胞の種類、数、空間配置を制御して、構成的に任意の細胞集団を構築することが可能な新しい培養法を開発したことが述べられている。具体的には、アガロースをガラス基盤上に塗布して薄層を作り、それをレーザーによる局所加熱で溶かしてチャンバを作成する手順、このチャンバ内にマイクロピペットを用いて心筋細胞を1細胞ずつ配置し、培養を行う手順を述べ、結果として、構成的に任意のサイズ、パターンを持った心筋細胞集団を構築することができた。この培養法の開発によって、細胞集団化効果を構成的に理解して行くことが可能となったことを報告している。

第3章では、第2章で開発した装置システム、オンチップ細胞培養システムを用いて、細胞集団化の効果について行った一連の研究成果について報告している。まず、集団化の効果について、細胞集団化による拍動の安定化についての研究成果を報告している。最初に、集団化効果の理解として、まず、独自のリズムで拍動している2個の心筋細胞が相互作用し、2細胞の拍動が同期した時の変化を調べた。その結果、同期後の拍動リズムが、2

細胞の内、早い拍動周期を持っていた細胞のリズムにそろう場合と、遅い拍動周期を持っていた細胞にそろう場合、1細胞状態に依存せず新しいリズムになる場合の3パターンを観察し、拍動リズムゆらぎ(CV%)の変化について、同期後のゆらぎは、2細胞の内、小さいゆらぎを持っていた細胞に等しくなるか、更に小さい値になることが判明した。この結果より、2細胞における拍動同期現象は、単なる引き込み現象ではない事、1細胞状態よりも2細胞状態の方が、拍動リズムゆらぎが安定する傾向にあることが報告されている。

次に、心筋細胞が更に集団化した際の、拍動リズムゆらぎの変化を調べるため、9個の孤立状態の心筋細胞が段階的に相互作用して拍動同期して行き、すべての細胞が同期するまでの過程を連続計測した。その結果、細胞数に依存して、拍動リズムゆらぎが段階的に減少し、最終的に10%程度のゆらぎになって安定化した。この事から、心筋細胞は、集団化効果によって、拍動リズムゆらぎが減少し、安定状態になることが分かったことが奉公されている。同様に、ネットワークパターンを変えて、細胞数に関するゆらぎ変化を解析した所、ゆらぎの細胞数増加に対する減少の程度は、何れのパターンでもほぼ変わらなかった。よって、心筋細胞はネットワークの空間パターンには依存せず、細胞数を増やすことで拍動状態を安定化させることがわかったと報告されている。

さらに、細胞集団と1細胞の相互作用による拍動数と拍動ゆらぎ変化の解析を行い、1細胞が相互作用し、次に、3細胞集団と1細胞、4細胞集団と1細胞、8細胞集団と1細胞というように、集団と1細胞の同期現象を調べた結果、細胞集団サイズが大きくなるに従って、集団と相互作用する1細胞の同期後の拍動数、拍動ゆらぎが共に、細胞集団に追従する傾向が強くなることが観察された。次に、細胞集団と繊維芽細胞を用いた制御を行い、その結果、拍動数、拍動ゆらぎが不安定な1細胞が安定状態の9細胞集団に同調し、同期後の状態は同期前の細胞集団が持っていた状態に等しくなることがわかった。これらの結果より、心筋細胞は、繊維芽細胞の有無に関わらず集団化効果によって、引き込み現象を起こす安定性を獲得することが報告されている。

最後に、細胞集団化効果による安定性を更に評価するために、心筋細胞集団に薬剤を投与して刺激を与え、これを培地交換によって除去する過程における、拍動状態の回復程度の細胞集団サイズ依存性を調べた。まず、4細胞集団で薬剤刺激-除去過程での拍動状態の変化を調べた所、刺激前の状態には戻り難く、刺激前と除去後では拍動状態が大きく異なることがわかった。次に、9細胞集団で調べた所、薬剤除去後の拍動状態が、刺激前に近い状態まで回復する傾向が観察された。そこで、再度、刺激-除去を繰り返した所、同様に、除去後の拍動状態は1回目の刺激を与える前の状態に近い傾向を示した。以上の4細胞集団、9細胞集団の薬剤応答における比較から、集団サイズの増加、すなわち集団化効果によって、外部から与えられた摂動に対しても元の状態に回復できる安定性を獲得したと考えられることが報告されている。

第4章では、本研究の成果を総括し、本研究のまとめと結論を述べている。本研究の主題である、心筋細胞をモデルとした構成的ネットワーク構築技術を用いて、細胞集団化効

果の実験的検証が可能な新しい培養法を開発することに成功したこと、この方法を用いて心筋細胞に対する集団化効果の解析を行った所、以下の 3 つの結果を得ることができたこと、すなわち

(1) 心筋 2 細胞の拍動同期過程を解析した所、同期後の拍動状態は、拍動ゆらぎの小さい細胞に揃うか、更にゆらぎが小さくなる傾向が見られた。更に細胞集団サイズを増加させた所、段階的にゆらぎが小さくなり、9 細胞から成る細胞集団で、およそ 10%程度のゆらぎに成り拍動状態が安定化する傾向を示した。すなわち、集団化効果による安定化として、拍動ゆらぎの減少が示唆された。

(2) 心筋細胞集団と心筋 1 細胞を相互作用させ、その同期過程を解析した所、細胞集団の拍動状態は変化することなく、1 細胞の方が集団の状態に揃う傾向が見られ、細胞集団サイズの増加によってこの傾向は更に強くなることがわかった。すなわち、集団化効果による安定化として、引き込み現象が示唆された。

(3) 4 細胞、9 細胞から成る心筋細胞集団に対して、薬剤投与による摂動状態からの回復過程を解析した所、4 細胞集団に比べると 9 細胞集団の方が刺激後、薬剤投与前の拍動状態に近い状態にまで回復する傾向が大きいことがわかった。すなわち、集団化効果による安定化として、摂動状態から元の状態への回復傾向が示唆された。

以上のように、心臓組織が示す、安定拍動状態、引き込み現象、交感、副交感神経刺激での心拍数増加、減少における、刺激停止後の元の心拍数への回復といった、3 つの安定化作用が、9 細胞程度から成る細胞集団でも集団化効果によって獲得されることがわかった。これより、この細胞集団が、培養チップ上に再構築可能な最小サイズの心臓モデルと成り得る可能性が示唆された。

この成果は、「細胞集団の集団化による安定化」という課題を、心筋拍動細胞の拍動状態の光学顕微鏡解析によって解明することを初めて実現したものであり、特に、より安定した細胞に不安定な細胞が同期化することは、従来考えられていた、拍動の早い細胞に同期するという解釈に反するものであるが、今までの多くの矛盾する研究報告成果を包括して説明可能にするものであり、このような細胞集団が持つ特性を発見したことは、特記に値するものと考えられる。また、このような基礎研究の成果を薬物効果の検証に用いる応用研究も独創的であり、将来の動物実験に代わるモデル臓器、組織の構築の可能性を示唆するものであり、大きな意義があるものと理解される。

いずれの研究内容も従来の細胞培養技術では実現できないソフトマテリアルを用いたりアルタイム微細加工技術と、その応用に関して世界で初めて成功したものであり、オリジナルである。また、この空間配置の制御技術を用いて行った細胞の空間パターンと細胞集団との関係に関する研究は、新たな生物学の研究手法を提案するものであり、このこと自体が、その研究水準の高さを示すものと考えられる。

したがって本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。