

論文内容の要旨

論文題目

マイクロ加工技術を利用した細胞分化過程の評価・制御に関する基礎的研究

氏名 高山 祐三

疾患、虚血、外傷等によって損傷を受けた中枢神経系（Central Nervous System; CNS）の機能回復には、損傷を受けていない組織による機能代行の促進（リハビリテーション）が現時点で有望な手段であると考えられており、その先には脱落した神経細胞を外部から新しく移植して神経回路網を再構築させる「神経再生医療」の実現が期待されている。神経再生実現に向けて鍵となるのは幹細胞から神経細胞を新生させるハンドリング技術、及びそれを生体へと移植する技術の開発である。しかし、現状、幹細胞の神経再生への臨床応用は、i) 幹細胞より誘導された神経細胞が生体 CNS と同様に神経回路網を構築し、機能的なネットワーク・ダイナミクスを示すかは不明である、ii) 幹細胞由来神経細胞と生体 CNS 神経細胞との間の結合様式、相互作用についての知見が少ない、iii) 幹細胞から人為的に分化誘導を行った際の目的細胞の最終効率が低い、といった大きな 3 つの問題点から発展していない。この問題点を解決するために、幹細胞より人為的に誘導された神経細胞及びそれが構成する神経回路網が示すネットワーク・ダイナミクスをシステムの捉えるための計測・評価技術、及び幹細胞の分化誘導過程における内因性・外因性シグナルの細胞への働きを精密に制御するための技術の提案・開発が求められている。

そこで、本論文では、幹細胞から神経細胞への分化過程、及び誘導された神経細胞が神経回路網を形成する過程における現象を、マイクロ加工技術をベースにした工学的アプローチにより計測・制御する技術を提案することを目的とした。本研究では実験対象となる幹細胞として P19EC 細胞を選択し実験・解析を行った。これは、P19 細胞の継代培養法（未分化状態の細胞を増殖させる作業を指す）及び神経分化誘導法が既に確立されており、ES 細胞系と比較してもよりシンプルかつ高い分化効率を持つという優位性を考慮したことによる。

まず第 1 章では、研究背景と先行研究についてまとめ、本研究の目的と論文全体の構成についてまとめた。

第 2 章では、幹細胞由来神経細胞による回路網構築とその発達過程における自発電気活動計測について実験を行った。最初に神経細胞が発生する電気信号とその計測手法につき概説を行い、次にネットワーク・ダイナミクスに焦点を当てる立場からマイクロ加工技術を応用した計測デバイス (MEA) による細胞外信号計測手法についての背景と実験方法について説明を行った。マウス胚性腫瘍細胞株 P19 を用い、これを MEA 上で培養して分化誘導後 1 ヶ月間にわたって自発電気活動を観測した。大脳皮質初代培養系の発達段階に特徴的な活動とされている周期的同期バーストに類似した活動が観測されることから、幹細胞由来神経細胞がネットワーク・ダイナミクスの視点からも機能を発現していることが示された。薬理操作実験により、この系で機能する主要な化学伝達物質が、初代培養系と同様グルタミン酸 (興奮性) とガンマアミノ酪酸 (γ -amino butyric acid; GABA, 抑制性) であることを明らかにした (図 1)。

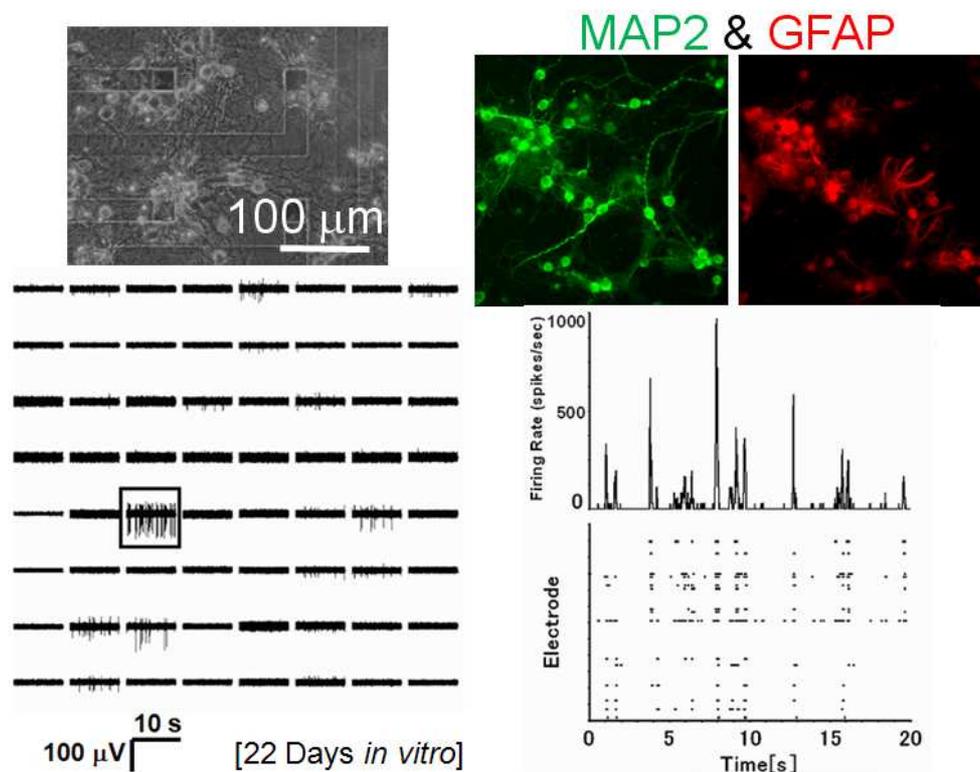


図 1 P19 由来培養神経回路網の活動計測

MEA 基板の上に P19 細胞より誘導した神経細胞とグリア細胞(MAP2,GFAP にそれぞれ陽性)を培養し活動計測を行った結果、初代培養神経回路網の特徴的活動である同期バースト現象の発生を確認した。左下図は 64 点電極を通じて得られた電位波形を、右下図はそれをラスタプロット表示したものである。

第 3 章では、幹細胞由来培養神経回路とマウス大脳皮質初代培養神経回路の共培養法について検討した。2つの神経回路間におけるネットワーク・ダイナミクスの相互作用に焦点を当てる立場から、マイクロ加工技術を応用し作製した培養チャンバーを用いた神経回路の共培養法の提案した。2つの細胞培養部を高さ 5 μm のマイクロトンネルで接続した構造を有する PDMS ベースの培養チャンバーの作製を行った。作製した共培養チャンバーにおける共培養試料における Ca イメージング結果・自発電気活動計測結果から、マイクロトンネル構造を有する培養チャンバーを適用することで幹細胞由来神経回路と生体由来神経回路の機能的な結合を *in vitro* 系において再現・構築可能であることを明らかにした (図 2)。

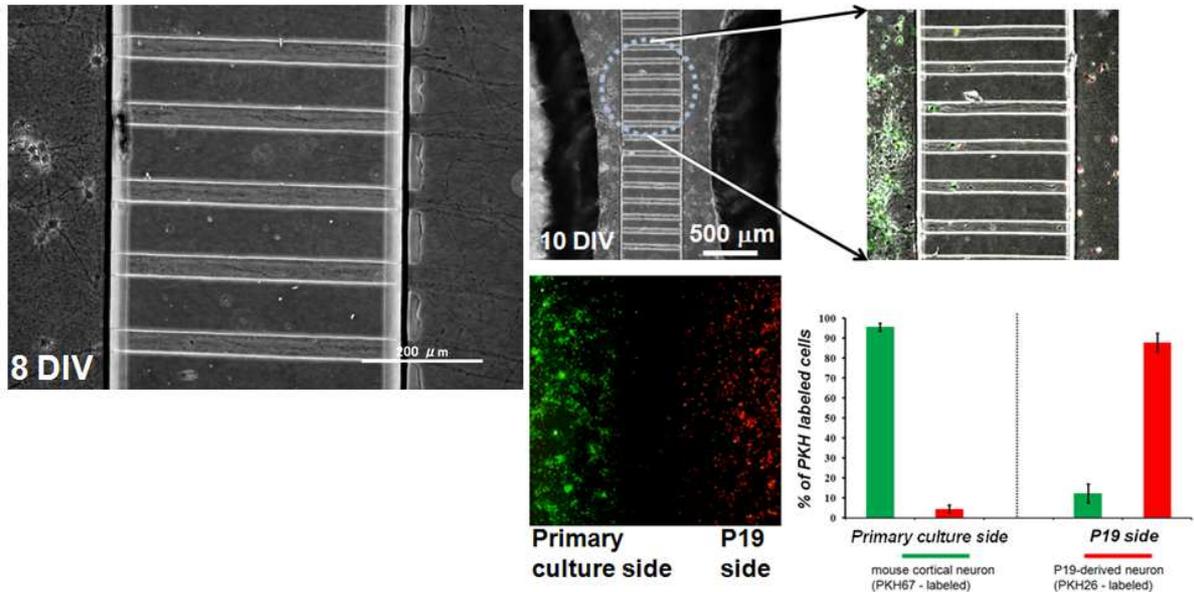


図2 マイクロ構造チャンバーを用いた幹細胞由来神経細胞と初代培養神経細胞の共培養
神経線維のみを通過する微小トンネル構造により、2種の神経回路の共培養が可能となった。

第4章では、マイクロ加工技術、物理刺激印加技術を応用した幹細胞分化過程の人為的制御の可能性について検討した。細胞分化に影響する要因とされている細胞内因性のシグナル伝達及び細胞外因性因子による細胞活性化の2つを人為的に制御する立場から、マイクロ加工技術を適用して特定サイズ・形態の幹細胞胚様体に対して多数同時に電気刺激を印加可能な刺激デバイスの作製を行った。透明導電性基板上に作製したマイクロキャビティアレイ構造を用いることで、多数のP19細胞胚様体に対して一括して電気刺激を印加し、細胞内Ca濃度変化応答を誘導することに成功した(図3)。

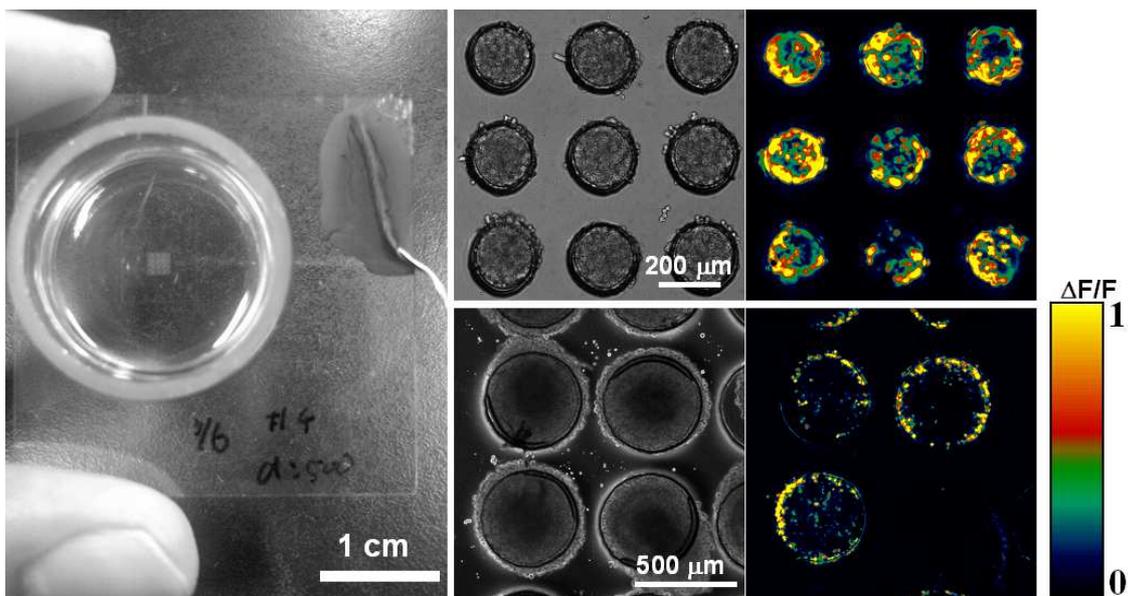


図3 胚様体電気刺激基板の作製

多数の胚様体を同時にかつ均一的に電気刺激が可能な刺激デバイスを、マイクロ加工技術を用いて作製した。右図は胚様体を刺激した際の細胞内Ca濃度変化を規格化し表示したものである。

以上、本研究では、神経系の再生医療実現に必要な要素技術に関して、工学技術、特にマイクロ加工技術を積極的に利用する立場から問題解決のための基礎的な検討を行った。その結果、本論文で設定した3つの課題についてそれぞれ、

i) MEA システムを用いた多点同時計測により、幹細胞由来培養神経回路におけるネットワーク・ダイナミクスを観測した。

ii) マイクロ構造付チャンバーの利用により、幹細胞由来神経回と初代培養神経回路の共培養系を確立し、ネットワーク・ダイナミクスを観測した。

iii) マイクロキャビティアレイ構造を用いた胚様体多数同時電気刺激系を開発し、分化誘導に対する効果につき検討した。

という結果を得た。これらの結果は、工学技術を応用した神経再生医療実現に向けて大きな礎となることが期待できる。