

論文審査の結果の要旨

氏名 高山 祐三

本論文は 5 章からなり、第 1 章では研究背景並びに関連分野の動向に関する考察に基づき、目的と具体的な課題が提示されている。すなわち、神経系の再生医療実現に向けて鍵となる要素技術について、特にマイクロ加工技術を積極的に利用する立場から基礎的検討を行うことが本研究の立場であり、(1) 分化誘導細胞により形成される神経回路の機能評価、(2) 分化誘導細胞群と生体系の結合、(3) 細胞分化誘導制御、の 3 課題について新たな手法を提案、その有効性を検証することを目的として設定している。

第 2 章、第 3 章、第 4 章は、設定した 3 つの課題に対応する研究結果である。

第 2 章では、多分化能を有する細胞株である P19 胚性腫瘍細胞から神経細胞への分化誘導操作を行った細胞群が形成する神経回路について、集積化電極アレイを用いた自発電気活動時空間計測を試みた結果につき記述している。集積化電極アレイはマイクロ加工技術を利用して製作する電極付細胞培養皿であり、神経細胞が発生する活動電位を細胞外電位として計測するため、多数の細胞の活動を同時に、かつ長時間にわたり計測できる点が特徴である。培養開始から 1 ヶ月間の自発電気活動を観測した結果、大脳皮質初代培養系に典型的に見られる電気活動—同期バースト—に類似した活動が、特に培養開始後 2-3 週目に顕著に発生することがわかり、分化誘導細胞群が形成するネットワークにおいて、神経回路としての信号伝達機能が発現していることが確認できた。さらに、薬理操作を適用した実験により、この同期現象に NMDA 受容体、GABA-A 受容体が主要な役割を果たすことを明らかにした。

第 3 章では、分化誘導神経細胞と初代培養神経細胞の結合を試みた結果が述べられている。マイクロ加工技術、特にソフトリソグラフィの手法を積極的に導入し、集積化電極基板上に 2 つのマイクロチャンバと両者を結ぶマイクロトンネル構造（神経突起は進入するが細胞体の移動は起こらない）を有する特殊な細胞培養皿を作製した。それぞれのチャンバに分化誘導神経細胞群と初代神経細胞群を播種し、両者を異なる蛍光色素で染色した状態で培養した。蛍光画像による形態観察から、両組織の細胞体群は分離したままの状態でも神経突起が伸長、コンタクトしていることが確認された。シナプス小胞を特異的に標識する免疫染色実験によるシナプス結合形成の確認、自発電気活動計測における同期活動の観測により、両組織間の機能的な結合形成が証明された。同時にこの機能的結合の形成が発達のある時期に限定したものであるとの知見が得られ、分化誘導細胞で形成した組織と生体内組織の結合を長期間安定に保持する観点からは新たな検討課題が存在することが明らかになった。

第 4 章は、細胞分化制御の可能性に関する基礎的検討結果である。多分化能を有する細胞に対する分化誘導は、現状、薬理操作が一般的な手法であるが、これに対して本研究では物理的な操作の可能性につき検討した。物理操作として、制御パラメータが多く、精密な条件設定が可能な電気刺激を想定し、マイクロ加工技術を利用して多数の試料に一定条件の電気刺激を同時に印加するデバイスを試作した。電極付き基板上に PDMS を用いてマイクロキャビティを 18X18 のアレイ状に配置した構造を作製し、このキャビティ内で自己組織的にサイズのそろった胚様体が形成されるプロセスを考案した。開発したデバイスによる電気刺激実験を行い、多数の細胞群が同様に応答することを細胞内 Ca イオン濃度計測により確認した。電気刺激により誘起される細胞内代謝過程の結果として発現する遺伝子、合成されるタンパク質等、物質レベルでの変化を検出する検証プロセスを提案、有望な結果を得た。

以上、設定した 3 つの課題に対して得られた研究結果に基づき、第 5 章で結論と今後の展望について総括している。なお、本論文第 2 章、第 3 章、第 4 章は、神保泰彦、小谷潔、森口裕之、齋藤惇との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（科学）の学位を授与できると認める。