

# 論文の内容の要旨

論文題目 神経心筋活動の理解に向けた

細胞培養マイクロデバイス

氏名 武内 彬正

自律神経系の活動が関連する重篤な不整脈や心臓突然死の発生機序解明と、重篤心不全に対する細胞治療の確立へ向けた課題として、1) 自律神経系の活動が心臓活動に与える効果が依然として細胞集団レベルで理解が進んでいないこと、2) 再生心筋系を移植された体内において自律神経系がどのような様式で再生心筋を神経支配するかの議論が進んでいないこと、この2つが存在する。

本論文ではこれらの課題に着目し、1) 自律神経系と心筋細胞の活動関係の理解に向けた細胞培養デバイス技術を開発すること、2) 開発したデバイス技術を自律神経系と再生心筋系の活動関係の理解へ応用することの2つを目的に設定した。

これら2つの目的を達成するための手法として、*in vitro* 共培養系を構築する細胞培養技術を選択した。*in vitro* 実験系は、構成する細胞の種類を限定し、細胞集団規模を調整することが可能である。また、構成する細胞に関して単一細胞レベルから細胞集団レベルまでの活動を詳細に評価できるため、複雑な回路網から構成される脳神経系や心臓の複雑な活動を研究するための基礎的な生理学実験系として広く利用されている。このような特徴を持つ *in vitro* の細胞培養技術に対して、近年急激な技術的発展を見せる微細加工技術を融合させた。微細加工技術は、近年細胞培養技術へ積極的に取り入れられており、培養環境下の細胞集団の形態を人為的に調節し、細胞間の情報伝達の電気生理学的評価を行うための手法として有用性が示されている。

本論文では、はじめにマイクロメートルスケールの微細加工技術を利用し、交感神経細胞集団と心筋細胞集団を区画化した条件下で各集団の活動を個別観測可能な細胞培養マイクロデバイス技術を新たに開発した。そして、光学観察および電気生理学的手法を用いてラット交感神経細胞と心室筋細胞の間の機能関係を、細胞集団レベルの形態変化と電気活動を指標に評価した。デバイス内では、交感神経細胞集団は心室筋細胞集団へ向けて神経突起を伸ばし、心室筋細胞上で神経効果器接合部を形成した。そして交感神経細胞に対してMEA基板の電極から電気刺激を印加することで、拍動回数の変化を誘発することが可能であることを示した。また、交感神経細胞集団印加する電気刺激の1) 印加頻度と2) 印加頻度と印加回数の交互作用の2つが拍動回数の変化へ効果を持つことを新規に示した。これらの検証実験から得られた結果から、本論文で作製した細胞培養マイクロデバイスは、交感神経系と心臓活動のメカニズムを検証するための要素技術として有用であるという結論を得た。

次に、細胞培養技術と微細加工技術の融合による有用性を、生体由来の交感神経細胞と分化誘導により再生した心筋細胞の間の機能評価へ応用することを試みた。ここでは、心筋分化のモデルとなる P19.CL6 細胞と実際に医療応用が期待されている iPS 細胞からそれぞれ分化誘導して作製した心筋細胞を使用し、これらの細胞を各々共培養デバイス内でラットから採取した交感神経細胞と共培養することに成功した。交感神経細胞から伸長した神経突起は、P19.CL6 および iPS 細胞の各細胞由来の心筋細胞上へ到達して神経効果器接合部を形成することが免疫組織化学染色によって示された。そして、P19.CL6 細胞から分化誘導した心筋細胞に神経効果器接合部を形成している交感神経細胞集団を、MEA 基板を介して電気刺激することで心筋細胞の拍動リズムの変化を誘発させることに成功した。交感神経細胞と分化誘導した心筋細胞との間の機能関係を評価した結果から、本論文で検討した細胞培養マイクロデバイスは、生体由来の交感神経細胞と分化誘導した心筋細胞の間の機能評価に対しても有用であるという結論が得られた。

以上の検証によって得られた知見と結論から、本論文で開発した細胞培養マイクロデバイス技術は、交感神経-心筋活動の理解に向けた要素技術としての発展性を持つことが示唆された。そして、自律神経系活動が関与する致死性不整脈や心臓突然死の機序解明と重篤心不全に対する細胞治療の確立へ向けた基礎研究へ利用するための要素技術としての応用が期待できる。