

論文審査の結果の要旨

氏名 武内 彬正

本論文は4章構成である。

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、不整脈・心疾患の発生機構解明と新たな治療手法確立に向けて、特に自律神経系による心拍リズム制御機構に注目するのが本研究の立場であり、これを細胞レベルの現象として可視化するデバイスを設計・製作・評価することを目的として設定している。デバイス作製に工学技術、特にマイクロ加工技術を積極的に利用することが本研究の特徴である。具体的には、多点電極付き細胞培養皿上に複数のマイクロチャンバを構成し、チャンバ間をマイクロトンネルで結ぶ構造を設計・試作する。このデバイスの有用性検証の立場から、自律神経系の構成要素である交感神経細胞と心臓の主要構成要素である心筋細胞の共培養を試みる。(1) 実験動物から採取した心室筋細胞の初代培養系、(2) 多分化能を有する細胞株 (P19) から分化誘導操作により作成した心筋細胞、(3) iPS細胞から分化誘導操作により作成した心筋細胞の3者のいずれかと交感神経細胞群との共培養系を構成し、各細胞群の活動とその相互作用を観測することを検討課題とすることを述べている。

第2章では、不整脈・心疾患の発生機構解明を目指す立場から、交感神経-培養培養心筋系共培養デバイスの提案と試作・評価結果が提示される。

- (1) 交感神経細胞による神経支配を有する心筋細胞培養系を構築可能
- (2) 交感神経細胞と心筋細胞集団の電気活動を独立に評価可能
- (3) 交感神経細胞を細胞数個レベルで電気刺激、活動計測可能

という要求仕様に基づき、デバイスの設計、製作プロセス、評価結果が詳述される。1枚の基板上に複数の細胞培養マイクロチャンバを形成し、かつ両者の間は神経突起のみ侵入可能なマイクロトンネル構造 (高さ 5 μm) とすることで、上記要求仕様(1), (2)が満た

される。両者の間にシナプス結合が形成され機能するまでの長期間の活動をモニタし、交感神経細胞群からの伝達物質放出を誘起する電気刺激を行うため、基板底面にマイクロ電極群を集積化した。特に少数の細胞を刺激ターゲットとする立場から、特定の電極上にスポット状の細胞培養区画を設け、単一細胞マニピュレーション技術を利用して播種する方式を採用している。試作したマイクロデバイス上に上頸神経節細胞（交感神経系）と心室筋細胞の初代培養系を構成し、免疫化学染色による評価を適用した結果、2つの細胞集団の形態的な分離を維持した状態で、交感神経細胞からの突起伸長と心筋細胞へのシナプス形成が生じていることが確認された。交感神経細胞への電気刺激に対する応答としての神経スパイクの発生、心筋拍動の亢進が認められ、ノルアドレナリンに対するアンタゴニスト投与によりこの心拍変動が抑制されることから、シナプス伝達が機能していることが確かめられた。以上の結果から、提案デバイスの有効性が確認できた。

第3章では、新たな治療手法確立に向けたアプローチとして、交感神経系と分化誘導心筋細胞との共培養系を構成、評価するマイクロデバイスの設計・試作・評価につき述べている。細胞播種を容易にする技術という視点から、第2章で試作したデバイスにさらにマイクロ流路を集積化する構造を提案している。細胞懸濁液をマイクロ流路に注入することにより、自動的にマイクロ電極部位に数個の細胞集団が集積するという設計である。蛍光色素を付加した細胞を用いた実験により、想定された効果が得られることが確認された。分化誘導心筋細胞としては、株化した多能性細胞であるP19胚性腫瘍細胞、再生医療の実現に有望とされるiPS細胞の2種類を用いた。第2章と同様の免疫化学染色操作により、いずれの系についても想定どおり神経突起の伸長と機能的なシナプス形成が実現されることが確かめられた。基板電極を利用した交感神経電気刺激とこれに対応する分化誘導心筋細胞群の活動亢進も確認され、提案するデバイスが心疾患に対する新たな治療法、特に細胞移植の効果を長期的に評価するデバイスとして有効であることが確かめられた。

初代培養心筋細胞、P19胚性腫瘍細胞由来心筋細胞、iPS由来心筋細胞の3者に対する交感神経支配を誘発応答と拍動リズム変化、アンタゴニスト投与の効果から評価した結果、特性が異なることがわかった。電気刺激を印加する頻度に依存した心拍亢進の時間

経過、心筋細胞群における活動伝搬速度変化が細胞種により異なるとの結果が得られ、細胞移植治療の実現に向けて重要な検討課題であることが示唆された。また、iPS 由来心筋細胞群の活動においては活動亢進に加えて QT 間隔の変化も確認され、疾患評価モデルとしての有用性も示された。

以上、設定した研究目的、課題に対して得られた研究結果に基づき、第 4 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 章の一部は、神保泰彦、小谷潔、野城眞理、李鐘國、三輪佳子、森口裕之、高山祐三、小川肇、森雅英、谷博雅、仲二見信吾、榛葉健太との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験及び解析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。