

論文内容の要旨

論文題目 心臓自律神経調節システムの *in vitro* 再構成

氏名 大岩 孝輔

心臓は、全身に血液を循環させるポンプの役割を果たし、不整脈は心臓ポンプ機能の不調とされる。不整脈の中でも、日常においてよく見受けられる心房細動は、器質的な原因が認められないにもかかわらず発症する例は少なくない。従来から心房細動の発症と日常生活のストレスや不規則な生活との相関が指摘されており、生体恒常性の維持において重要な役割を果たす自律神経の活動異常の関与が示唆されている。しかし、自律神経系の活動異常が心房細動の発症に繋がるメカニズムは十分には解明されていない。今後、高齢化社会が進むにつれて、心房細動の患者数が増加することが予想され、心房細動の治療や診断は予防医学の観点から重要な課題である。そのため、日常生活のストレスや不規則な生活による自律神経系の活動異常が心房細動の発症に繋がるメカニズムが明確になれば、心房細動の治療や診断に繋がると考えられる。

従来の心房細動の治療技術として、レートコントロールやリズムコントロールが挙げられ、 β 拮抗薬やCa拮抗薬などによる薬物療法や、カテーテルアブレーションや迷走神経刺激などによる非薬物療法に大別できる。しかし、従来の治療技術には、薬剤による副作用や耐性や体内への埋め込み電極による神経損傷や熱傷などの問題点が挙げられる。そのため、患者の生活の質の向上を図るための非侵襲的な治療技術の確立が望まれている。近年、生体外から時間変動する磁界を印加させることで生体内部に誘導される電流により刺激する磁気刺激が開発され、電極の埋め込みなどを要せずに生体組織の刺激を行うことができる点で広く応用されている。しかし、磁気刺激による刺激の空間分解能は電気刺激に比べ劣るという問題点がある。さらに、磁気刺激は主に脳神経系を刺激対象としており、自律神経線維束に対する磁気刺激を考慮した場合、刺激の空間分解能をさらに向上させる必要がある。しかし、磁気刺激による刺激の空間分解能に関する検討は十分に行われていない。

自律神経系の活動異常が起因する心房細動の発症メカニズムの解明や、心房細動に対する非侵襲的な治療技術の確立を目指すには、自律神経活動と心臓活動間の関係性を明確にする必要があり、以上の関係性を解明することを目指した研究が行われている。自律神経活動と心臓活動間の関係性を解明することを目指した研究は、動物個体を使用した *in vivo* 実験系を用いた研究が主流となっている。*In vivo* 実験系の例として、埋め込み電極による自律神経系への電気刺激による心拍変動の評価などが挙げられる。しかし *in vivo* 実験系では、自律神経系や心臓以外の臓器の活動による影響を無視することができず、自律神経系と心臓のみに着目した評価を行うことが

困難であることや、動物個体に対して電極を埋め込むこと必要があり、長期的な評価を行うことが困難であるという問題点が挙げられる。一方、*in vivo* 実験系に対し細胞培養技術を使用した *in vitro* 実験系による研究も行われている。*In vitro* 実験系では、自律神経細胞及び心筋細胞のみを採取し培養させることで、自律神経系と心臓のみに着目した検討を行うことができ、さらに近年では、細胞培養技術と微細加工技術を融合した検討も行われている。微細加工技術により作製した構造物や微小電極アレイ(MEA) 基板を使用することで、細胞をパターン化して培養することや培養細胞の電気活動を長期的に培養することができる。

本論文では、自律神経活動と心臓活動間の関係性の評価及び、自律神経系の活動異常による心房細動に対する新たな治療技術の開発を目指し、細胞培養技術及び微細加工技術を融合させた *in vitro* 実験系による検討が有用であると考え、以下に示す目標を設定した。

- (1) 自律神経系による心臓機能調節機構を細胞集団単位で評価することができる自律神経細胞-心筋細胞共培養システムを構築する
- (2) 自律神経系に対する磁気刺激で実現しうる刺激の空間分解能と刺激条件を理解することを可能にするマイクロ磁気刺激システムを構築する

(1)に関しては、交感神経系及び副交感神経系の両者からの心臓機能調節機構を可視化することができる細胞培養デバイスを構築することを目的とした。微細加工技術により作製した細胞培養デバイス上に交感神経細胞、副交感神経細胞及び心筋細胞を共培養させることで、自律神経細胞-心筋細胞共培養システムの構築を行った。以上の共培養システムを使用して、各自律神経細胞と心筋細胞の形態的評価や活動評価、そして神経細胞と心筋細胞間の機能的評価を行うことで、細胞培養デバイスの妥当性及び有用性について議論した。

(2)に関しては、自律神経系に対する磁気刺激の空間分解能を検討することができるシステムを構築することを目的とした。自律神経線維束を模擬するために、微細加工技術により、神経軸索を一方向に伸長することができる環境を構築し、一方向に伸長させた神経軸索に対して局所的に磁気刺激を行うためのシステムを構築した。システムを構築するに当たり、システムの寸法や磁気刺激パラメータは数値計算により設定を行った。構築したシステム内に交感神経細胞を培養させた上で、伸長した交感神経軸索に対する磁気刺激を行い、自律神経系に対する磁気刺激の条件と刺激の空間分解能の評価を行うことで、システムの有用性について議論した。

自律神経細胞-心筋細胞共培養システムの構築に関しては、微細加工技術によって作製された MEA 基板と培養チャンバを組み合わせることで本システムを構築した。MEA 基板と培養チャンバを組み合わせることで、交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の活動を細胞種毎に観察することと、交感神経細胞及び副交感神経細胞に対する電気刺激の効果を心筋細胞の活動変化の観点から評価を行った。本研究の結果を以下に示す。

第一に、これまで培養が困難であった副交感神経細胞の培養に成功した。交感神経細胞は交感神経幹を構成する交感神経節を採取することで高純度の神経細胞を得ることができ

る一方、副交感神経細胞を含む副交感神経節は臓器の表面上に点在し、副交感神経節を採取する際に副交感神経節を含む周辺組織を採取するために、結果として得られる副交感神経細胞の純度が低くなる。本論文では、ICG の分布密度が高い肺静脈付近の組織をなるべく心筋組織を含まないように顕微鏡下で採取を行った。細胞種毎の培養底面への接着時間の違いに着目して、副交感神経細胞以外の非神経細胞を除去するための pre 培養を行った。pre 培養を行った結果、副交感神経細胞の純度が向上した。さらに、培養液の組成などを工夫することで、副交感神経細胞の長期的な培養にも成功した。

第二に、交感神経細胞及び副交感神経細胞の細胞集団単位での活動を本システムにより観察することができた。特に副交感神経細胞の活動計測に関しては、先行研究ではパッチクランプ法による細胞単体の活動計測しか行われておらず、神経細胞の細胞集団単位での活動計測は行われていなかった。本システムでは、MEA 基板により細胞集団単位での電気活動計測を細胞外から低侵襲的に計測するために、長期的な電気活動計測を行うことが期待できる。

第三に、各自律神経細胞に対する電気刺激による心筋細胞の拍動間隔の変動を観察できた。交感神経細胞に対する電気刺激により心筋細胞の拍動間隔が短くなり、副交感神経細胞に対する電気刺激により心筋細胞の拍動間隔が長くなる結果が得られ、生体内における自律神経系と心臓のシステムを本システムにて再構成することができたとと言える。

以上の結果より、本システムは交感神経細胞及び副交感神経細胞に対する電気刺激の効果を心筋細胞の活動変化の観点から評価するシステムとして有用であることが示された。

マイクロ磁気刺激システムの構築に関しては、微細加工技術によって作製された MEA 基板と培養チャンバ及び微小コイルを組み合わせることで本システムを構築した。培養チャンバは、システム内にて自律神経線維束を模擬するために、神経軸索を一方向に伸長させる用途に使用した。さらに、培養チャンバと MEA 基板を組み合わせることで、神経軸索の電気活動計測を行うことができるようにした。さらに、神経軸索に対して局所的な磁気刺激を行うために、微小コイルを神経軸索近傍に配置させた。磁気刺激における刺激の空間分解能は、刺激コイルの形状や配置に大きく依存し、さらにコイルに電流を流すことにより発生する熱の影響を考慮しなければならないため、微小コイルの寸法や配置、電流パラメータは、数値計算により設定した。本研究の結果を以下に示す。

第一に、微小コイルによる神経軸索に対する磁気刺激により、神経細胞内の Ca 濃度及び、神経軸索の電気活動の変動を確認することができた。磁気刺激の頻度が高くなるにつれて、刺激終了後における神経活動を表すスパイク数が増加する傾向が確認された。

第二に、本システムにより磁気刺激における刺激の空間分解能を推定することができる可能性が示された。刺激終了後における神経軸索の電気活動変化を、コイルの交点からの距離が異なる神経軸索間で比較を行った結果、最も誘導電流が強いとされるコイルの交点に近い神経軸索では刺激終了後のスパイク数の増加が見られた一方、コイルの交点から離

れた神経軸索では刺激終了後のスパイク数の増加は確認できなかった。以上の結果から、コイル交点－神経軸索間の距離及び神経軸索の電気活動の変化の 2 つの要素から磁気刺激における刺激の空間分解能を推定することができると考えられる。

本論文にて構築を行った自律神経細胞－心筋細胞共培養システム及びマイクロ磁気刺激システムは、自律神経系の活動異常が心房細動の発症に繋がるメカニズムの解明及び、自律神経系の活動異常が心房細動に対する新たな治療技術の開発における知見獲得に貢献できると考えている。