

論文審査の結果の要旨

氏名 榛葉 健太

本論文は 6 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、研究目的と具体的な検討課題が提示されている。中枢神経系に対する再生医療の実現を目指し、工学技術の積極的な利用により新たな計測・評価手法を開発、その有用性を示すことが本研究の目的であり、具体的な検討課題として:(1) 幹細胞の精密な分化誘導手法に関する基礎的検討, (2) 分化誘導細胞が形成する神経回路の発達過程観測, (3) 分化誘導細胞-ホスト組織間の機能的な結合形成の可視化, を設定している。

第 2 章は電気刺激による分化誘導制御に関する基礎的検討である。未分化状態および分化初期のヒト iPS 細胞について細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を計測、分化の様々な段階で特有の変化が見られることを示し、同様の Ca^{2+} 変動を人為的に誘導する試みにつき報告している。未分化の段階では G2/M 期の細胞の割合が高い細胞集団では Ca^{2+} 変動を示す細胞の割合が低く、 Ca^{2+} 変動の発生頻度は IP3 の阻害により低下する、分化誘導後 3 日目までは細胞毎に独立な Ca^{2+} 変動が見られるが、6 日目になると細胞間を伝播する Ca^{2+} wave が発生し、これも IP3 受容体の阻害により消失するという結果を得た。さらに、培養基版底面に配置した電極を利用して電気刺激を行い、刺激印加のタイミングに同期して細胞内への Ca^{2+} 流入が起こることを確認した。細胞周期や分化の段階を考慮して適切なタイミングで電気刺激を行なうことにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を介して分化誘導を精密制御する可能性を示したものである。

第 3 章では、ヒト iPS 細胞由来神経細胞により形成される神経回路につき、その活動パターン変化を約 1 年間追跡した結果を記述している。微小電極アレイ(MicroElectrode Array; MEA)上に細胞を播種して培養することにより、時空間的に広がる電気活動を可視化した。通常の MEAに加えて、平行マイクロトンネル構造を設けてその底面に電極を配置した axon MEA を新たに開発、計測を行なった。培養開始から 70 日目にバーストと呼ばれる特徴的な神経活動が観測され、その発生間隔や持続時間、時間的な構造が変化していく様子を 330 日まで記録した。マウ

スやラットの初代培養神経系を用いた実験でこれまでに報告されている発達過程と類似の活動遷移が、およそ 10 倍の時間をかけて起こることが明らかになった。分化誘導細胞により神経回路が形成される過程の評価手法として、その有効性が示された。さらに、新設計の axon MEA が従来手法より高い確率で、かつ S/N 比の良い信号を記録できることが確かめられた。

第 4 章では神経軸索を伝導する活動電位の MEA 計測から細胞の分化・成熟過程を評価する試みについて報告している。前述の axon MEA の利用により、特定の軸索から複数の点でスパイク信号を記録、その時間差から伝導速度を算出することができる。この方法で大脳皮質ニューロンの信号を評価した結果、伝導速度が発達段階やバーストなどの活動時系列パターンに依存して変化することがわかり、同様の現象を誘発応答でも観測することができた。膜電位の過分極により賦活される HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated) チャネルが伝導速度の調節に関係するという仮説を立て、阻害薬を投与した実験を行なった結果、阻害薬の有無により活動依存性の速度変化が異なることが明らかになり、その発現を指標とする細胞の特性評価が可能であることが示された。活動制御に関与する様々な分子の発現を指標とする神経分化、成熟過程評価の可能性を示したものと言える。

第 5 章では、分化誘導により作成した神経細胞を生体組織に移植することを想定し、その過程を評価するマイクロデバイスを試作した。MEA 基板上に 2 つの細胞培養区画を集積化して両者の間をトンネルで結ぶ構造とし、多能性幹細胞由来の神経モデルである P19 やマウス iPS 細胞から分化誘導した神経細胞がマウス初代培養大脳皮質神経回路に結合する過程を観測した。蛍光色素による結合形成の形態的観察、電気活動の発生と伝播を指標とする機能評価が可能であることを示し、開発したマイクロデバイスの有効性を確認した。

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 6 章で結論と今後の展望について総括し、学術的意義と医療応用の可能性を記述した。なお、本論文第 2 章、第 3 章、第 4 章、第 5 章の一部は、酒井洸児、磯村拓哉、高山祐三、小谷潔、神保泰彦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。