

## 審査の結果の要旨

氏名 酒井 洸児

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調査、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。神経系による生体制御システム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) 感覚神経細胞軸索に対する髄鞘形成過程、(2) 心筋細胞に対する自律神経支配形成過程を観察、評価するマイクロデバイスの開発を設定している。

第2章は髄鞘形成評価デバイスの開発である。神経信号を伝える軸索の多くは、グリア細胞の被覆により構成されるミエリン鞘により高速な活動伝播を可能にしている。脊髄損傷や脱髄性神経疾患においては、ミエリン鞘の脱落による機能低下が見られ、細胞移植によるミエリン鞘の再生治療実現が求められている。神経軸索に対するミエリン形成過程を可視化し、機能回復過程の定量評価を可能にするマイクロデバイスを開発することが本章における課題である。微小電極アレイ(Microelectrode array; MEA)は電極付細胞培養皿であり、多点計測を利用した活動の空間伝搬パターンの可視化が可能、非侵襲性による長期的な特性変化の観測に適するという特徴がある。今回、

MEA上に神経軸索の成長方向を制御するマイクロトンネル構造を設置、トンネル底面に配置した複数の電極を利用して電気刺激と誘発応答記録が可能なデバイスを製作した。この基板上で脊髄後根神経節細胞(Dorsal Root Ganglion; DRG)とシュワン細胞を共培養、ミエリン形成過程の可視化とそれに伴う活動電位伝搬速度変化の観測を試みた。単純なDRG-シュワン細胞共培養系に加えて、細胞分裂阻害剤の添加によるシュワン細胞除去、アスコルビン酸添加によるミエリン形成誘導操作を施した試料を調整、それぞれについて誘発応答における信号伝搬速度を計測した。培養開始後約2週間で髄鞘形成の影響と考えられる伝搬速度の変化が認められ、1ヶ月で明確になることが明らかになった。信号波形の振幅、時間経過、刺激強度依存性を調べた結果、記録された信号は電場電位(field potential; 複数の軸索のスパイク信号の重ね合わせ)であることがわかった。多数の神経軸索に対するミエリン形成割合の定量評価のためには個々の軸索の信号を分離して観測する必要があることが明らかになり、これに対応したマイクロデバイスの設計・製作を行なった。少数の軸索について長い距離を伝搬する信号を記録することにより、単一軸索由来の信号分離が確実なものとなる。この場合、グリア細胞のトンネル内長距離遊走が困難という問題があり、新たに複数部分に分かれたトンネル構造を作製してそれぞれの開口部からの細胞遊走を可能とし、開放部分は基板表面に細胞接着性のガイディング構造を設けることにより軸索の成長方向制御を維持するデバイスを作製した。このデバイスにより、単一スパイク信号が観測可能であることが確認できた。

第3章は心筋細胞に対する自律神経支配形成評価デバイス開発の試みである。心臓の拍動リズムは自律神経活動による調節を受けており、交感/副交感神経活動のインバランスや過剰な心筋支配構造は不整脈をはじめとする心疾患と関連することから、再生心筋組織への適切な神経支配の再建は重要な課題である。しかし、再生した心筋組織に対してどのように自律神経支配が再構築されるかはほとんど明らかになっ

ていない。本研究では人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell; iPSC) 由来の心筋細胞に対してラット上頸神経節から採取した交感神経初代培養細胞が神経支配を形成する過程を観測するデバイスを設計、製作した。MEA基板上にPDMS製の細胞培養区画を2ヶ所設置し、区画間をマイクロトンネルで連絡する構造とした。それぞれの区画にiPS細胞から分化誘導して作成した心筋細胞と交感神経細胞を播種、共培養した。交感神経細胞軸索のトンネル内への伸長と心筋細胞表面へのシナプス形成が免疫組織化学染色により確認された。さらに交感神経細胞群への電気刺激に伴う心筋拍動の亢進と $\beta$ アドレナリン受容体に対する拮抗薬であるpropranolol投与によるその阻害が観測され、機能的な神経支配形成が確かめられた。マイクロトンネル内に設置した複数の電極により交感神経活動の定量化、心筋拍動リズムへの影響評価が可能であることが明らかになり、開発したマイクロデバイスの有効性が示された。

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た。なお、本論文第2章、第3章の一部は、Zhuonan Yang, 有松和之, 武内彬正, 大岩孝輔, 石塚一真, 榛葉健太, 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。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。