

博士論文（要約）

神経系再生医療に向けたマイクロデバイスの開発

酒井 洗児

細胞移植による再生治療は、生体を構成する様々な臓器や組織に対して展開されている。神経系は他組織を支配し情報を伝達するネットワークとして生体内に存在するため、神経系疾患に対する治療に加えて、他組織の再生治療の場面においてもその支配を再建することが求められる。神経系を構成する素子である神経細胞が適切に機能し、他の組織を適切に支配する状態に回復させるためには、個々の神経細胞が正常な電気的特性を獲得し、細胞集団として電気活動を媒介して他の組織へ正常に作用する状態を再建する必要がある。また、グリア細胞からの作用に代表されるように、他細胞の影響により神経細胞が正常な電気的特性を獲得することも知られている。したがって、神経支配を含む移植後の機能再建を評価するためには、神経細胞から他組織への作用、および他細胞から神経細胞への作用の両方を評価する必要がある。しかし、移植した生体内において個々の細胞の電気的特性や他組織への伝達を評価することは技術的に困難である。そこで、細胞の制御性や観測性に優れたin vitro系における評価により移植後の挙動を予測することが必要となる。特に、神経細胞が正常な電気的特性を獲得するために必要なグリア細胞の作用や、他の組織への伝達過程といった細胞間の複雑な作用の観測や制御が必要な場合には、工学的なアプローチにより異種細胞間の関係を制御する共培養技術が重要となる。すなわち、電気生理的計測手法と共培養手法を組み合わせた工学技術の開発が、神経系の再建方法を模索するためのin vitro評価系を構築する上では重要となる。

電気生理的な計測手法として、長期的かつ多点の計測が可能な微小電極アレイ (Microelectrode array; MEA) 計測法は、移植に用いる未成熟な細胞の成熟や細胞間作用の評価には有効である。さらに近年、MEAの電極にシリコン製のマイクロトンネルを配置することで軸索から活動を計測する手法が開発された。本手法は、軸索の電気伝播特性に加えて、細胞集団間の信号伝達を効率的に評価することが出来ることから、個々の細胞における電気的特性および他の組織への伝達過程を評価する上で有用な技術である。しかし、共培養手法と組み合わせた報告はほとんどなく、神経系再生に向けた技術として十分に成熟していない。以上から、グリア細胞が神経細胞の機能獲得に担う役割や、神経細胞による他組織への支配の形成を評価するためには、マイクロデバイスを用いた共培養手法およびMEAを用いた電気生理的計測手法が技術として十分に成熟する必要がある。前者は、脱髄を伴う神経系疾患における再生移植治療におけるグリア細胞の作用を予測するためのin vitro評価系としての利用が期待される。後者の神経細胞による他組織への支配形成の評価には、生体にとって欠かせない臓器である点、自律神経支配によって調節される点、および自律神経支配の異常が致死性の疾患につながる点を考慮し、心臓を対象とする。後者は、心筋再生治療において再生した心筋組織に再建される自律神経支配の様式を予測するためのツールとしての利用が期待される。以上より、本研究では、マイクロトンネルとMEAによる活動計測技術を、神経細胞-グリア細胞共培養系および神経細胞-心筋細胞共培養系に適用することで、上述した技術として開発することを目指した。以下にそれぞれの課題、実験結果および得られた結論を述べる。

生体内における一部の軸索は、グリア細胞に被覆されることでミエリン鞘が形成されている。ミエリン鞘は、軸索における活動伝播速度を上昇させる。脊髄損傷や脱髄性神経疾患においては、ミエリン鞘が脱落する症状である脱髄が問題となっており、細胞の移植によるミエリン鞘の再生治療が近年注目されている。軸索伝播の回復に伴う個体の機能回復は、ミエリン鞘を形成したグリア細胞による作用と、ミエリン鞘を形成していないグリア細胞による作用の両方に起因する。しかし、*in vivo*の実験系ではミエリン鞘形成に依存した作用および依存しない作用がそれぞれどのように寄与しているかを評価することが技術的に難しい。そこで、グリア細胞の成熟を制御できる培養実験系を利用して、グリア細胞の成熟による軸索伝播への影響を評価する方法が解決策として有効であると考えた。従来のマイクロデバイスを用いた軸索伝播計測の手法を拡張し、グリア細胞の成熟による影響を評価する技術として開発することを目指した。

軸索伝播へのグリア細胞の作用を評価するために、マイクロトンネル内部でグリア細胞を共培養する方法を採用した。遊走性の高いグリア細胞としてシュワン細胞を選定し、従来よりも幅の広いマイクロトンネルを用いて神経細胞とシュワン細胞の共培養した。結果として、シュワン細胞がマイクロトンネル内部へと遊走することを明らかにした。加えて、アスコルビン酸の添加によりシュワン細胞のミエリン鞘形成を誘導できることを確認し、マイクロトンネル内部で共培養する手法を確立した。

シュワン細胞による作用がミエリン鞘に依存する場合としない場合で影響する軸索の本数が異なることに着目して、2種類のデバイスを作製した。1つ目のデバイスとして、幅の広いマイクロトンネルをMEAに設置したデバイス(*um*-MEA)を作製したところ、電気刺激の印加に対して複数の軸索における総和した応答波形が計測できた。さらに、シュワン細胞を除去した条件、およびミエリン鞘形成を誘導した条件と比較することで、ミエリン鞘形成以前のシュワン細胞による軸索伝播速度への影響を検出することに成功した。ミエリン鞘形成以前のシュワン細胞による作用が液性因子を介していることから複数の軸索に作用しやすく、本手法はミエリン鞘形成以前のシュワン細胞による作用評価に適していた。一方で、2つ目のデバイスとして、細胞接着物質によるパターンニングをマイクロトンネルと組み合わせた培養デバイス(*m*-MEA)を作製したところ、少数かつ伸長距離の長い軸索における計測を可能にし、個々の軸索における応答波形が観測しやすくなった。ミエリン鞘形成を誘導した条件で伝播速度を評価した結果、*um*-MEAを用いて無髄軸索の軸索束から計測された値および先行研究から推定される値と比較して、部分的に有髄化した軸索として妥当な値となり、有髄軸索から活動伝播を計測できることが示唆された。以上の結果から、マイクロトンネルを用いた軸索伝播計測手法を神経細胞-グリア細胞共培養系に適用することで、ミエリン鞘形成以前および以後における軸索伝播速度への影響を検出するための新たな技術を開発できた。

重篤な心不全に対する治療方法として、ヒト人工多能性幹細胞(*human induced*

pluripotent stem cell; hiPSC)由来の心筋細胞の移植治療が注目されている。モデル動物を用いた研究においては、移植した心筋細胞と周囲の心筋組織との電気的な結合形成が示されている。心筋組織においては、心筋細胞間の電気的な結合に加えて、正常に自律神経支配を受けることが求められる。自律神経系は、交感神経と副交感神経により心筋組織の活動を調節しており、主に心筋組織の拍動律・活動伝播・収縮力に影響する。また、交感神経活動と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がよく知られており、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系による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。交感神経細胞と心筋細胞の共培養系は、機能的な支配様式を評価する有用なツールとなることが期待されるが、従来方法では心筋細胞へ入力される交感神経細胞の活動を計測することが難しかった。また、hiPSC心筋細胞への神経支配は培養系においてはほとんど報告がなかった。そこで、マイクロトンネルを用いた計測手法による交感神経活動の可観測性の向上およびhiPSC心筋細胞の拍動への交感神経活動の影響評価を目指した。

交感神経活動の可観測性を評価するために、培養区画およびマイクロトンネルに電極を配置した培養デバイスに交感神経細胞のみを培養した。片側の培養区画のみに細胞を培養することで、マイクロトンネル内を一方方向に軸索を伸長させた条件を設けて、自発活動および電気刺激応答を評価した。結果、活動波形の振幅、および計測可能な電極数の割合が、培養区画に設置した電極よりもマイクロトンネルの方が大きいことを示した。さらに、マイクロトンネルに配置した2点の電極を用いて、軸索を伸長させた方向への活動伝播の割合が9割程度であることを明らかにし、交感神経活動の可観測性が向上したことを示した。

交感神経活動によるhiPSC心筋細胞の拍動への影響を評価するために、マイクロトンネルおよびhiPSC心筋細胞の培養区画に電極を設置した培養デバイスを作製して、刺激印加実験を行った。交感神経細胞への電気刺激の印加により α アドレナリン受容体を介してhiPSC心筋細胞の拍動間隔が短縮することを示した。さらに、電気刺激頻度に依存して交感神経細胞の活動頻度が上昇することに加えて、hiPSC心筋細胞の拍動間隔も刺激頻度と回数に依存するという結果から、交感神経活動に応じてhiPSC心筋細胞の拍動間隔が短縮することが示唆された。以上の結果から、マイクロトンネルを用いた計測手法を交感神経細胞-hiPSC心筋細胞共培養系の機能的な支配形成様式を評価するための技術として拡張することができた。

以上より、細胞移植治療において適切な神経系を再建する治療方法を模索するためのin vitro評価系として、個々の軸索へのグリア細胞の作用評価および神経系による心筋組織への作用評価の2点について、マイクロトンネルを利用した新たな共培養マイクロデバイスの技術を開発できたと結論付ける。