

Title	心筋細胞ネットワークのダイナミクスとその形態制御に関する研究
Author(s)	藤田, 晶子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47206">https://hdl.handle.net/11094/47206</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	藤 田 晶 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 2 1 3 4 3 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	心筋細胞ネットワークのダイナミクスとその形態制御に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 井上 康志  (副査) 教授 河田 聡 教授 山本 亘彦 教授 増原 宏 教授 八木 厚志 京都府立医科大学教授 高松 哲郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

組織や器官を構成している細胞は、独自の細胞ネットワークの形態を形成し、その生命機能を担っている。心臓の場合、筋肉の収縮を担う作業心筋、ペースメーカーとなる洞房結節や拍動リズムの遅延をもたらす房室結節など、部位によって異なる機能をもたらす特徴的な心筋細胞のネットワーク構造が見られる。これら作業心筋や結節が組織化することで心臓は形成され、心臓固有の機能を実現し、拍動のリズムを生み出している。また、生後直後のラットから単離して培養した心筋細胞は自律的な拍動を示し、他の心筋細胞との相互作用により、拍動のリズムの引き込み、同調を示すことが知られている。細胞ネットワークの形態の違いにより、細胞間での拍動のリズムの引き込みや同調がどのように生じるのか明らかにすることは、心筋組織の拍動や興奮伝播、ペースメーカーキング、筋の収縮といったダイナミクスの解析に必要である。また、細胞ネットワークの形態が機能発現に果たす役割を総合的に理解する上でも、このアプローチは重要であると考えられる。

本研究では、複数の培養心筋細胞からなる細胞ネットワークの形態とその拍動リズムとの関係を明らかにすることを目的とし、心筋細胞ネットワークの拍動の引き込み、同調を数理計算により求めた。Hodgkin-Huxley 方程式を基にした単一心筋細胞の膜電位を示す Noble モデルに細胞間電流を示す項を加え、細胞ネットワークの拍動を示すモデルを作製した。作製したモデルを用いて、細胞ネットワーク内の各細胞の膜電位とその時間変化を計算し、膜電位変化の周期を求めた。膜電位変化の周期は、拍動のリズムと一致するとして、それを拍動の周期とした。等しい拍動周期をもつ細胞から構成される細胞ネットワークにおいて、細胞数や細胞配列、細胞間抵抗値を変化させながら、細胞ネットワーク内の各細胞の拍動の位相が一致するために要する時間と各パラメーターとの関係を求めた。その結果、細胞ネットワークを構成する細胞数、または細胞間抵抗値が大きくなると、細胞ネットワーク内の各細胞の拍動の位相が一致するために要する時間は長くなり、その時間は細胞数または細胞間抵抗値に比例した。また、細胞ネットワーク内で細胞間結合の数が増えると、指数的に同期に要する時間が短くなった。さらに、拍動周期の異なる 2 個の心筋細胞において、各細胞の拍動の周期が一致するために要する時間、及び拍動の同期に至る拍動ダイナミクスの過程を求めた。細胞間抵抗値を変化させると、細胞間抵抗値が小さいときは各細胞の拍動周期の一致が見られたが、細胞間抵抗値が大きくなると、各細胞の拍動周期は互いに近づいたり離れたりと周期的に変動し、拍動周期の一致は見られなかった。この挙動の分岐となる細胞間抵抗値は、2 個の細胞の膜電位容量の差が大きいかほど小さくなった。加え

て実際に心筋細胞ネットワークを培養し観察するために、細胞培養用マイクロチャンバーを作製し、細胞ネットワークの形態と心筋細胞群の拍動ダイナミクスとの関係を解析する実験系を構築した。

また、同一の配向をもつ心筋細胞からなる2次元心筋細胞組織を作製し、一方向に拍動する心筋組織の作製に成功した。細胞の配向制御のために、縞状周期構造をもつ基板上で細胞を培養した。2光束のレーザー光の干渉により生じる明暗の縞を光硬化性材料に露光し、周期構造を作製した。光硬化性材料には、末端をアクリレート化したトリメチレンカーボネート系プレポリマーを用いた。光源には、Nd:YVO<sub>4</sub> レーザーの第3次高調波を用いて、1、2、4、8 μm の間隔の縞状周期構造を作製した。作製した構造上でラット単離心筋細胞の初代培養を行った結果、それぞれ約 75、65、50、40%の細胞が構造の長軸方向に伸展し、縞間隔が小さいほど、より多くの心筋細胞が構造の長軸方向に伸展することを確認した。アクチンフィラメントを蛍光染色した結果、構造の長軸方向に平行な細胞骨格が形成されていることを確認した。また、経時観察より、細胞と基板との初期接着が細胞形態の決定において重要な影響を及ぼすことが示唆された。平面基板上で培養した細胞の伸展方向はランダムになり、微細構造が細胞の形態制御に利用できることが分かった。

さらに2光子光造形技術を用いた3次元生体組織の構築についても検討した。光源にモードロックチタンサファイアレーザーを用いて、光重合性ゼラチンの縞状周期構造を作製した。縞の幅及びその間隔が5 μm から20 μm の周期構造上で心筋細胞を培養した結果、どの構造においても、60%以上の細胞で伸展と拍動の向きが構造の長軸方向と一致した。構造上ではそのエッジ部で心筋細胞が長く伸展を示したこと、及び細胞のサイズよりも小さな周期構造においても配向制御が可能であることから、表面形状の急激な変化が細胞形態に影響を与えることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、心筋細胞がネットワークを構成することで生じるダイナミクスとその機能を解明するために、ネットワーク形態とその拍動リズムとの関係を理論的アプローチ及び *in vitro* 手法を用いて解析した成果をまとめたものである。1) 膜電位モデルを用いた心筋細胞ネットワークの解析、2) マイクロチャンバーを用いた心筋細胞ネットワークの実験的解析、3) 生体内の細胞配列を再現するための培養手法の開発が述べられている。1) では、細胞間の連結の程度や細胞の配列によって拍動リズムの同調性や引き込みの様式が異なることをシミュレーションにより明らかにし、2) では、それを実験的に示すための基盤的な成果を示している。3) においては、心筋組織の3次元再構築を目指した培養手法を提案し、その有効性を示している。

以上のように、本論文では、数理学的手法及び光工学的手法を用いることで、心筋細胞ネットワークの形態がそのダイナミクスに与える影響・効果を明らかにしている。この研究成果は生命機能学、特にバイオフォトリクス学に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。