



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 光遺伝学を用いた心臓電気生理学に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                                     |
| Author(s)           | 中尾, 元基                                                                                                  |
| Description         | 配架番号 : 2706                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第14967号                                                                                                |
| Issue Date          | 2022-03-24                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/85839">https://hdl.handle.net/2115/85839</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | NAKAO_Motoki_review.pdf, 審査の要旨                                                                          |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名      中尾 元基

主査      教授   森本 裕二  
審査担当者   副査   教授   若狭 哲  
副査      教授   大場 雄介

### 学 位 論 文 題 名

光遺伝学を用いた心臓電気生理学に関する研究  
(Investigations of cardiac electrophysiology using optogenetics)

申請者は光遺伝学を用いた心臓電気生理学に関する研究について発表した。

審査にあたり、副査の若狭教授より研究2に対して、心房細動の光除細動効率（照射光のパルス幅に依存しているが、連続光刺激時の光除細動の有効性が短時間パルス光刺激時のそれより劣っているのは何故かという質問があった。申請者は短時間パルス光刺激時の光除細動のデータは複数回の実験を繰り返した平均データである一方、長時間連続刺激時のデータは単回の実験ごとのデータであるため、初回の光除細動の有効性が低く提示されていると回答した。次に、複数回光刺激を与えると除細動効率が上昇するのは何故かという質問があった。申請者は不整脈波面が通過する箇所（心臓）に光が当たることが重要であり、複数回の光刺激により光除細動効率が上昇したと考えられたと回答した。これを踏まえ、研究1に対して複数回光刺激を加えることで、心室細動停止効果が得られたのではないかと質問があった。申請者は心室細動発症時のマルチプルリエントリーは心室細動発症から数百ミリ秒以内に生じる現象であるため複数回の光刺激は困難であったと回答した。また、チャネル開口持続時間ごとの電流量のデータはあるか、光照射中は常に開口しているのかという質問があった。これに対して電流量のデータは無いが、光照射中は常に開口し、定常電流が流れるとされていると回答した。また、臨床応用にむけて光遺伝子の導入に関してどのような方法が考えられるかという質問があった。これに対してアデノ随伴ウィルスベクターを用いる方法が検討されていると回答した。この質疑を踏まえ、臨床応用にむけた課題を学位論文に盛り込むよう指摘があった。

次に副査の大場教授より、光遺伝学とはタンパク質の機能を光で制御する技術であり学位論文および発表における定義が誤っていると指摘があった。光遺伝学自体の背景を学位論文の緒言に加えるよう指摘があった。また Cre-loxP システムの説明において、エストロゲン類似体のタモキシフェンにより Cre が核内移行するのが正しい説明であるという指摘があった。また、本実験系で発現させた ChR2 の発現効率、細胞内での局在、光エネルギーに対する開口率、開口により流入する電流量についてどの程度調べているのか、蛍光蛋白質を付随させると目的蛋白質発現の局在が変化する場合があるが調べているかという質問があった。これに対し申請者は、組織学的評価において心房筋で ChR2 の発現が不十分な箇所があり、その原因は心房に存在する心臓線維芽細胞では ChR2 が発現しないこと、心房における Cx40 の発現レベルが均一ではないことが挙げられると回答した。また申請者は、現在発現率を測定する追加実験を行っていること、発現局在を確認する追加実験を行っていること

答した。また、tdTomato を付随した場合、tdTomato が光エネルギーを吸収し ChR2 に十分な光エネルギーが伝わらない可能性があるという助言があった。また、今回の光除細動におけるイオン濃度変化を正確に把握すると、ケージド化合物による細胞内イオン濃度変化で除細動を行う基盤知識になり得ると助言があった。

次に主査の森本教授より、心臓に遺伝学を用いた研究では培養心筋ではなくランゲンドルフ還流心を用いることが一般的であるのかという質問があった。これに対して申請者は、大まかに 2015 年以降は臨床応用を踏まえた実験が多く、ランゲンドルフ還流心を用いた実験が多いと回答した。また実験 1 で十分な結果が得られなかった理由として、ChR2 の発現量の問題と光量の問題のいずれが原因であったと考えるかという質問があった。これに対して申請者は両方の要素があったが、特にプルキンエ線維に対する照射系は光量の減衰が多く照射領域の不十分であったと回答した。心室細動発症時のマルチプルリエントリーを証明する他の手段は考え得るかという質問があった。これに対して申請者は、プルキンエ線維の伝導を選択的に即時的に修飾する手段は光遺伝学以外で実施することは困難であり、現時点で他の方法を用いてマルチプルリエントリーを証明することは困難であると回答した。次に APD と ERP は独立したパラメータであるかという質問があった。これに対して申請者は APD と ERP は並行したパラメータであると回答した。次に、実験 1 実験 2 の双方において、連続光刺激で伝導ブロックが確認できていないのは何故かという質問があった。これに対して申請者は、ChR2 の発現および ChR2 を通過する電流量が不十分だったために伝導ブロックを形成しなかったと考えられると回答した。

この論文は、光遺伝学という新しい手法を用い、心室細動や光除細動の機序の一部を解明しようとした試みにおいて高く評価され、特に無痛性の光除細動の臨床応用に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。