HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光遺伝学を用いた心臓電気生理学に関する研究［全文の要約］
Author(s)	中尾, 元基
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2706 他
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	https://hdl.handle.net/2115/86053
Type	doctoral thesis
File Information	NAKAO_Motoki_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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）

2022 年 3 月

北海道大学

中尾　元基

学位論文（要約）

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）

2022 年 3 月

北海道大学

中尾　元基

要約

光遺伝学とは対象となる細胞や組織に光感受性タンパクや蛍光タンパク質を遺伝的に発現させることで、生体機能を非接触で高精度に制御もしくはモニタリングする技術の総称である。現在、光駆動形チャネルまたはポンプを心筋細胞に発現させることで、心臓電気生理学特性の解明や、心筋ペーシングや除細動などの心臓電気生理制御法の開発が進められている。本研究では最も代表的な光駆動型チャネルであるチャネルロドプシン 2 (channelrhodopsin-2: ChR2)をプルキンエ線維および心房筋に特異的に発現させたトランスジェニックマウスを用い、以下２つの実験を行った。

第 1 章　光遺伝学を用いた心室細動発症とプルキンエ線維の関係に関する研究

【背景と目的】心室細動は心臓突然死の主要な原因の一つである。心室細動の発症にはプルキンエ線維における Triggered Activity の関与が知られており、心室細動の維持には心室筋内における Spiral Re-entry の関与が知られている。しかしながら、その移行過程については十分に明らかにされていない。コンピューターシミュレーションを用いた研究ではこの移行過程にプルキンエ線維−心室筋間で生じる複雑な Multiple Re-entry が関与していると報告している。しかし、これを生体内または還流心のレベルで実証した報告はこれまでにない。ChR2 は波長 470 nm の青色光照射により開口し、濃度勾配に従って陽イオンが通過する。ChR2 が発現した心筋において、リエントリー性の不整脈が発症した際に連続光刺激を与えることで、照射領域に伝導ブロックが形成され不整脈が停止する「光除細動」が可能である事が知られている。今回我々は、心室細動の発症直後のプルキンエ線維−心室筋間 Multiple Re-entry の時相でプルキンエ線維に光遺伝学を用い、伝導ブロックを形成することで、心室細動の維持を抑制しうると考えた。本研究の目的は「光遺伝学を用いて形成されるプルキンエ線維伝導ブロックが心室細動の形成に与える影響を明らかにすること」とした。

【材料と方法】Cre-loxP システムを用い、プルキンエ線維および心房筋に特異的に ChR2-tdTomato を発現させたマウスを用いた。凍結切片を用いプルキンエ線維に ChR2-tdTomato の発現を確認した。ランゲンドルフ灌流心に対して、左心房から僧帽弁経由で先端に 45 度ミラー加工がされている光ファイバーカニューレを左室内に挿入することで、心室中隔を青色光(470 nm)で刺激するプルキンエ線維光照射系を確立した。gap junction uncoupler である 2-Aminoethoxydiphenylborane (2-APB)を溶解し、さらに低カリウム状態にした溶液(2-APB + 低カリウム溶液)を灌流することで、自然発生する心室細動を誘発した。心室細動発症直後にプルキンエ線維に光照射を行い心室細動の維持抑制効果を検証した。また、活動電位伝播形態を、光学マッピング法を用い実施した。

【結果】凍結切片で心室の心内膜側に tdTomato を確認し、プルキンエ線維における ChR2 の発現を確認した。プルキンエ線維光照射系を用いたパルス光刺激でプルキンエ線維光ペーシングが確認されたが、連続光刺激で心表心電図上明らかなプルキンエ線維内の伝導ブロックは確認されなかった。左室心外膜面における活動電位伝播形態を、光学マッピング法を用いて観察したが、連続光刺激による明らかなプルキンエ線維内伝導ブロックは確認されなかった。2-APB + 低カリウム溶液灌流により誘発された心室性不整脈を、光学マッピング法を用いて観察したところ、Spiral Re-entry 様の伝播形態を示しており、心室細動が発生したものと判断した。心室細動自然誘発の直後にプルキンエ線維に連続光照射を行ったが、心室細動の維持抑制効果を認めなかった。

【考察】本研究では連続光刺激によるプルキンエ線維伝導ブロック形成が得られず、本研究の目的達成に至らなかった。原因として ChR2 の発現効率およびプルキンエ線維光照射系が伝導ブロック形成に不十分だった可能性が考えられた。

第 2 章　短時間パルス光刺激による心房細動光除細動機序の解明

【背景と目的】心房細動は日常診療で遭遇する最も一般的な不整脈である。薬物療法やアブレーション手術にも関わらず心房細動発作を再発する患者が存在し、血行動態破綻や症候性頻拍を有する場合、電気的除細動を要する。しかしながら、電気的除細動は疼痛を伴うため、十分な鎮静管理を要する。光遺伝学を用いた「光除細動」は無痛的な除細動方法として臨床応用が期待されている。ChR2 発現心筋において、リエントリー性不整脈発症時に光刺激を与えることで光除細動が可能であることが複数の文献で報告されている。しかしながら、光除細動の機序は十分に明らかになっていない。最も有力な説は「伝導ブロック説」である。これは光刺激により静止膜電位が上昇し、細胞膜に存在する電位依存性 Na^+チャネルが不活化することで心筋の興奮性が低下し、伝導ブロックを形成するというものである。その一方で、伝導ブロック説では説明し得ない、局所的な短時間パルス光刺激による光除細動が報告されており、光除細動には伝導ブロック説に依らない追加の機序が存在すると考えられる。我々は「活動電位持続中に実施される光刺激による活動電位持続時間(action potential duration: APD)および有効不応期(effective refractory period: ERP)の延長が光除細動に関与している」と仮説を立て、「還流心の心筋において、短時間パルス光刺激が APD および ERP に与える影響を明らかにすること、APD および ERP 延長効果と短時間パルス光刺激による光除細動の関連を明らかにすること」を目的とした。

【材料と方法】第 1 章と同系列のマウスを使用し、凍結切片で ChR2-tdTomato の発現を確認した。ランゲンドルフ灌流心に対して、右心房を心外膜側から青色光(470nm)で刺激する心房光照射系を確立した。K_{ACh}-channel activator である Carbachol を溶解

し、さらに低カリウム状態にした溶液（Carbachol＋ 低カリウム溶液）を灌流し、右心房に電気的連続刺激を行うことで心房細動を誘発した。心房細動誘発後に右心房にパルス光刺激を行い、心房細動抑制効果を検証した。活動電位持続中に実施されるパルス光刺激による APD 延長効果および ERP 延長効果を、光学マッピング法を用いて観察した。パルス光刺激による光除細動時の活動電位波形を、光学マッピング法を用いて観察した。

【結果】凍結切片で心房に tdTomato を確認し ChR2 の発現を確認した。心房光照射系を用いたパルス光刺激で心房光ペーシングが確認された。連続光刺激では心房期外収縮が確認され、明らかな心房内伝導ブロックは確認されなかった。Carbachol＋ 低カリウム溶液灌流および心房連続電気刺激により誘発された心房細動はパルス光刺激により光除細動された。光除細動率はパルス光刺激の光強度およびパルス幅に依存した。絶対不応期を含む活動電位持続中に実施されるパルス光刺激により APD は有意に延長し、ERP も同様に有意に延長した。APD および ERP は活動電位再分極相でパルス光刺激を受けた場合に最も延長した。また、ERP 延長効果は光刺激のパルス幅に依存した。一方で一定値以上の光強度は ERP 延長に追加効果を与えなかった。パルス光刺激による光除細動は APD の延長を伴って実施された。

【考察】本研究では第一に心房 ChR2 発現心筋の灌流心において、パルス光刺激が APD および ERP に与える影響を評価した。活動電位持続中のパルス光刺激により APD および ERP は延長し、その延長効果は再分極相で光刺激を行った場合に特に顕著であった。これは ChR2 が光刺激により非電位依存性に開口する一方で通過電流量は開口直前の膜電位に依存しているためであると考えられた。本研究では、第二にパルス光刺激心房細動除細動効果と APD/ERP 延長効果の関連を評価した。リエントリー性不整脈は ERP が延長すると、不整脈の波長が延長しリエントリーが破綻することで停止する。本研究は還流心において活動電位持続中に施される光刺激が APD および ERP を延長させること、光除細動が APD 延長を伴って生じることを示しており、光除細動の機序のひとつに光刺激による APD/ERP 延長効果が関与していることが示唆された。

【結論】光遺伝学を用いた光除細動の機序の一つとして活動電位持続中に施される光刺激による APD の延長および ERP の延長が関与している。