

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 732 号	学位申請者	上之蘭知邑
審査委員	主査	大石 充	学位 博士 (医学)
	副査	奥野 浩行	副査 佐藤 達雄
	副査	下堂蘭 恵	副査 原 博満
<p>主査および副査の5名は、令和6年1月24日、学位申請者 上之蘭 知邑 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 先行論文(DOI: 10.1038/s41586-023-05748-8)との違いは何か。 (回答) ペーシング方式に関して、大きく3つの違いが挙げられる。まず、刺激用デバイスの適用方法が異なる。本研究では植込み型デバイスを用いており、先行論文では装着型のデバイスを用いている。また、使用しているオプシンが異なる。本研究では青色光感受性のChR2を用い、先行論文では赤色光感受性のChRmineを用いている。さらに、長期的なペーシングにおいては、本研究では生理的な照射強度で継続的にペーシングを行っているのに対し、先行論文では断続的に頻脈を起こすプロトコルでペーシングを行っている。</p> <p>質問2) 心拍数を上げると不安行動が見られるか。 (回答) BPM750(マウスが不安を感じている際のおおよその心拍数)となるようにペーシングをして行動観察した際、不安に関する文脈のない条件下でペーシングをした場合は、不安様行動は見られなかった。</p> <p>質問3) 右心房ペーシングは可能なか。プロモーターによって制御できるのか。 (回答) プロモーター(Cx40等)の制御によって、心房筋や刺激伝導系のみChR2を発現させ、局所的にペーシングすることが可能である。しかし、胸壁外から光照射し心房を刺激するためには、より透過性の高い波長の光を用いる必要があると思われる。</p> <p>質問4) 筋・心筋 specific に感染するAAVは存在するか。 (回答) MyoAAVのような、筋肉指向性の高いAAVが開発されている。</p> <p>質問5) AAVが肝臓に感染すると炎症が起こることが分かっているが、心筋炎は起こっていないか。慢性的な影響や血中トロポニン濃度等は調査しているか。 (回答) AAVを投与したマウスにおいて、目視する限りは、組織や行動の異常は見られない。しかしトロポニン濃度等の検証は行っていないため、慢性的な悪影響に関して否定はできない。</p> <p>質問6) 洞性拍動とは異なり、心室筋を刺激しているが、この方法で心拍数×心拍出量は増加しているのか。 (回答) 心拍出量の確認を行っていないため、正確な血流量の比較はしていない。しかし、心室刺激では心拍出量が低下することがあるという人間での知見や、本実験における血圧の検証結果を鑑みると、血流量の増大は起こっていないケースが多いと思われる。</p> <p>質問7) 心電図波形は人間とマウスで異なるか。刺激のアーチファクトは現れるか。 (回答) 心電図波形は、形状や間隔が多少異なるが、基本的には人間と同じである。光刺激によるアーチファクトが見られることもある。</p> <p>質問8) ペーシング中の心電図に下向き大きな波形が見えているのはなぜか。 (回答) 本実験では左心室をペーシングしているため、右心房から心室へと刺激が伝導する洞性拍動とは反対の向きに刺激が伝導する。そのため、R波が下向きの波形となって現れている。</p> <p>質問9) 動物のサンプルサイズはどのようにして決定したか。 (回答) 実験開始前にサンプルサイズを決定したわけではなく、最終的に使用した動物の数を記載している。</p> <p>質問10) ChR2発現量に個体差はあるか。 (回答) AAVを3日齢の小さいマウスに腹腔内投与しているため、投与時に液漏れが起こる場合がある。その場合は発現量が低下する。</p> <p>質問11) 心房と心室でChR2発現量に差はあるか。 (回答) 心房筋への発現量は測定していないが、目視する限り、心室筋と同程度の発現量であると思われる。</p> <p>質問12) 胸壁越しに左心室に光照射しているが、植込み部位を変えれば右心房に光照射できるか。 (回答) 理論的には可能である。ただし、右心房へ十分な光量を送達するためには、より長波長の光を用いる必要があると思われる。</p> <p>質問13) マウス頭部に装着する電線のねじれや断線は起こらないか。 (回答) 頭部から電源へ繋げる電線は、マウス動きに合わせて回転する機構(スリッピング)を経由させており、ねじれや断線が起こらないよう配慮している。</p> <p>質問14) 人間に応用する場合は、光源や電源供給用デバイスを植込み型にすることを想定しているか。</p>			

最終試験の結果の要旨

732

- (回答) 植込み型にするのが理想的である。光ペースング用の植込み型無線デバイスの開発も世界的に進んでいる。
- 質問 15) Chr2(H134R)を選択した理由は何か。
(回答) Chr2(H134R)は野生型のChr2と比較して光感受性が高いためである。
- 質問 16) 赤色光感受性のオプシンを選択しなかったのはなぜか。
(回答) 赤色光感受性オプシン(RcaChR)を組み込んだAAVを作製・投与したことはある。しかしペースングが上手くいかず、今回の実験に用いることができなかった。
- 質問 17) 人間の場合は、肋間筋上に植込みをすることで光が心臓に到達できるのか。
(回答) より長波長の光を用いた場合は、心臓へ光が到達すると推測される。
- 質問 18) 元の心拍数より低いレートでペースングした際に同期が見られないのはなぜか。
(回答) Chr2は興奮性のチャンネルであるため、心臓の電気的な活動の抑制ができない。そのため低いレートでペースングをすると、長いパルス間隔の合間に自発的な拍動が生じ、同期が起こらない。
- 質問 19) 高頻度の刺激で2回に1回しか同期が見られないのは、Chr2の性質によるものなのか。
(回答) 心筋細胞の長い不応期によるものである。
- 質問 20) 3日齢のマウスにAAVを投与するのはなぜか。
(回答) 3日齢では腹膜血液関門が未発達であり、腹腔内投与したAAVが心筋へ届くためである。より成長したマウスでAAVを腹腔内投与しても、心筋への十分な遺伝子発現は見られず、静脈投与等の手段を用いる必要がある。
- 質問 21) Chr2の発現にかかる期間はどれくらいか。
(回答) 約2週間ほどである。
- 質問 22) 植込みをしてから実験をするまでの期間はどれくらいか。また、植込み後は常に光刺激をしているのか。
(回答) 植込み後約1週間で実験を開始した。光刺激は実験中のみ与えた。
- 質問 23) LEDの発熱による炎症を確認する際、30分以上光照射するとどうなるか。
(回答) 発熱実験に用いた中で最も高い点滅頻度である900Hzは、マウスの生理的な心拍数を超えた値であるため、30分以上の照射は行っていない。900Hzで点滅させ続けた際のLED温度は約40℃であり、人間の皮膚の場合は、40℃で低温火傷を生じるには非常に長時間を要するとされている。
- 質問 24) 炎症マーカーを見る際も30分間光照射し、その直後に組織を摘出しているのか。
(回答) 特に低温火傷の場合、炎症マーカーは1、2日後に多く発現することが知られている。そのため本実験においても2日後に組織の摘出を行った。
- 質問 25) 光応答性のより高いチャンネルは存在するのか。
(回答) 多く存在する。
- 質問 26) 先行論文(DOI: 10.1038/s41586-023-05748-8)は自由行動下で実験しているか。血圧や呼吸は測定しているか。
(回答) 自由行動下で実験している。左心室筋に光照射をした際の血圧の測定をしている。呼吸測定は行っていない。
- 質問 27) 心房と心室を同時に光照射すると自然な収縮が見られないが、実験では光は一部にだけ照射しているのか。
(回答) 光は左心室に照射している。胸壁を経由するにあたり光の減衰が起こるため、心筋の収縮を起こすに足る光量が届いている範囲は、左心室のうち狭い範囲であると推測している。
- 質問 28) マウスでは左心室が胸壁側に位置するのか。
(回答) 左心室壁が胸壁に近く、光照射しやすい位置にある。
- 質問 29) 刺激頻度を上昇させるにつれて心拍との同期率が減少するが、点滅頻度1400~1700Hzにかけて再び心拍数が上昇するのはなぜか。
(回答) 1400~1700Hzにかけての同期率の低下は緩やかな場合が多く、それらの点滅頻度ではおよそ刺激の2回に1回心拍が同期する。そのため、それらの点滅頻度において心拍数の実測値が上昇する。
- 質問 30) 臨床応用や大動物の場合、光を局所に照射したり、AAVを局所投与する方がいいと思われる。
(回答) AAVの安全性等を考慮すると、局所投与が理想的である。
- 質問 31) 心室ペースングを長期間行うと心不全となるリスクがあるが、長期的な経過を報告したものはあるか。
(回答) 自由行動下の動物に光遺伝学的ペースングを適用した先行研究は1例しか存在せず、長期的なペースングによる経過の報告は未だ存在しない。
- 質問 32) 光刺激により不整脈が生じたことはあるか。
(回答) 光刺激後のマウスが不整脈を起こしたり、体調不良等を来したりしたことはない。しかし本実験では健康なマウスを用いているため、病態モデルマウスでの検証は必要かと思われる。
- 以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。