

論 文 要 旨

The physiological response during optogenetic-based cardiac pacing in
awake freely moving mice

自由行動下マウスにおける光遺伝学的心臓ペーシング中の生理反応

上之菌知邑

【序論及び目的】

不整脈治療に用いる心臓ペースメーカーは一般的に、電気刺激を生み出す本体と、その刺激を心筋細胞に伝えるリードからなる。リードの先端は心臓内に留置される。しかしリードの存在は、ペースメーカー適応患者におけるトラブルの主な要因となっている。そこで私は、心臓内にリードを挿入する必要がなく、かつ心臓に接触する必要のないペースメーカーが実現できれば、適応患者の QOL が向上すると考えた。先行研究において、リードを使用しない非接触ペーシング方法として、光遺伝学技術を心筋に適用する方法が考案されている。これは、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた遺伝子導入により心筋細胞に光受容体を発現させ、その心筋細胞に光照射をすると細胞内にイオンが即座に流入し心筋が収縮するという方法である。この方法を用いれば、心臓外からの光照射により人為的に心臓の拍動を引き起こすことができ、時間および空間分解能の高い心拍操作ができる。この技術は心臓の *ex vivo* 標本や麻酔下の動物において応用されている報告があるが、自由行動下の動物に適用された研究は数少ない。そのため、光遺伝学による人為的な心拍操作が、生理学的な心拍数変化と比較し動物個体としてどのような影響を与えるか言及した研究は行われていない。そこで本研究では、自由行動下の動物において光遺伝学技術を用いた心臓ペーシングを試み、その際の動物の生理反応(心拍数、呼吸数、血圧)を計測した。

【材料及び方法】

実験には野生型(C57BL/6)マウスを用いた。心筋に光感受性のタンパク質(青色光感受性カチオンチャンネル: ChR2) を発現させるため、3 日齢のマウスに AAV (AAV-cTnT-Cre, AAV-Flex-ChR2) を腹腔内へ注入し遺伝子導入を行った。マウスが8週齢以上に成長した後、心筋に青色光を照射するために自作した小型 LED 光照射デバイスと心電図測定用電極の植込み手術を行った。光照射デバイスの留置部位は左心室付近の肋間筋上とした。植込みをした光照射デバイスによる心臓ペーシングに成功した個体において、心拍と青色光との同期率や、呼吸数、血液の拍出効率等を評価した。

【結 果】

AAV を注入し遺伝子導入したマウスにおいて、心臓全体の 53.7%に ChR2 の発現を示す蛍光 (mCherry 蛍光) が認められた。作製した光照射デバイスは、高照度で長時間の光照射をしても著

しい高温にはならず、植込み部位の組織に火傷などの炎症所見は認められなかった。心筋に ChR2 が発現したマウスに光照射デバイスを植え込み青色光をパルス照射した結果、マウス安静時 (心拍数約 400-600 拍/分) により速い点滅速度 (約 700-1200 回/分)での光照射時において、光の点滅と心拍を同期させることに成功した。ムスカリン投与により人工的に徐脈状態を誘導した後に、安静時の心拍数と同程度の点滅頻度で光照射をして心拍数を上昇させることを試みたところ、心拍を光照射と同期させる、すなわち徐脈状態のマウスの心拍数を回復させることに成功した。なお、光の点滅頻度を 950 回/分まで上げた場合は約 100% の同期が得られたが、それ以上点滅速度を上げた場合は完全な同期をせず、点滅頻度を上げるほど同期率は減少した。光照射による心臓ペーシングはマウスの呼吸数にも影響を与えた。ペーシングによりマウスの心拍数を増加させている間、呼吸数の緩やかな増加がみられた。光照射による心臓ペーシングが正常な血液の拍出ができていないか否かを確認するために、ペーシング中に血圧測定を行った。その結果、ペーシング中はわずかに血圧の低下が見られたものの、光の点滅と同期して血液が拍出できていることが確認できた。さらに、光を照射する部位による血液拍出の違いを検討する目的で、ChR2 を発現したマウスを麻酔下・人工呼吸下にて開胸し、右心房、右心室、左心室上部・下部の 4 ヶ所に光照射した際の血圧を比較した。その結果、右心房への光照射が最もペーシング中の血圧を減少させにくい傾向にあった。

すべての実験において、光照射を止めると即座に心拍数、呼吸数、血圧ともにペーシング前の状態へ戻ることが確認できた。また、これらの生理反応の変化は、ChR2 遺伝子導入をしていないマウスに光照射をした際には認められなかった。

【結論及び考察】

本研究の結果より、光遺伝学を用いた低侵襲的でリードを必要としない心臓ペーシングを自由行動下のマウスへ実装することに成功した。このマウスを用いて光照射による心臓ペーシングに伴うマウス個体の生理学的な変化を検証したところ、心臓からの血液の拍出は生じるが、呼吸数の漸増と血圧のわずかな減少が生じることが明らかとなった。本研究においては左心室をペーシングしているため、拍動の起点である右心房をペーシングする場合と比較して血液の拍出効率が劣っていた。血圧低下および急激な心拍数増加が、圧受容器を介して呼吸数の増加に繋がったと考えられる。

また、本システムによるペーシングは可逆的であり、マウス個体の行動への影響は確認できなかった。