

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790516  
 研究課題名(和文) 徐脈性不整脈に対するHCN4遺伝子導入によるバイオペースメーカーの開発  
 研究課題名(英文) Development of biopacemaker for bradyarrhythmia by HCN4 gene transfer

研究代表者  
 村越 伸行 (MURAKOSHI NOBUYUKI)  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
 研究者番号：80447218

## 研究成果の概要：

徐脈性不整脈に対する治療法は現在のところペースメーカー機器の植込み術しかない。アデノ随伴ウイルスを用いたHCN4遺伝子による遺伝子治療は、他の不整脈を悪化させたり、遺伝子導入による副作用を生じることなく、心拍数を増加し徐脈を改善させた。今後、遺伝子導入法の改良や他の因子とのコンビネーション治療など、さらに改善を重ねることによって臨床応用が可能となり、徐脈性不整脈に対する新たな治療戦略になり得る可能性が考えられた。研究成果は学会発表によって公表され、現在、原著論文を投稿準備中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：心臓病態学

## 1. 研究開始当初の背景

徐脈性不整脈は心拍出量の低下によって脳虚血症状を来したり、心不全を引き起こしたりする疾患であり、代表的なものとして洞不全症候群や完全房室ブロックなどが挙げられる。その発症における分子メカニズムは不明な点が多く、治療法としてもペースメーカー機器の植え込みしかない。

Hyperpolarization-activated channel, cyclic nucleotide-gated cation (HCN)チャンネル遺伝子はペースメーカー電流 (I<sub>f</sub>) の

発現頻度に重要な役割を担っている心臓、脳に発現する遺伝子であり、4つのサブタイプがあることが報告されている。過去に報告されたジーンターゲットマウスの実験結果などから、HCN4遺伝子が心臓のペースメーカー電流の形成に重要な役割を担っているkey moleculeであると考えられ、さらに実際の臨床の場において、洞不全症候群の患者にHCN4遺伝子の変異が見出されたという報告がある。

## 2. 研究の目的

我々は If 電流(“funny current”)を司り心臓のペースメーカー電流の発生頻度に重要な役割を果たしている過分極誘発陽イオンチャネル(Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide gated channel(HCN)-4)に着目し、徐脈性不整脈の病態への関与を検討するとともに、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた臨床応用の可能性の高い新たな遺伝子治療、いわゆる“バイオペースメーカー”を確立することを目的として動物実験を行った。

## 3. 研究の方法

治療用として完全長 HCN4 cDNA を、対照用として EGFP cDNA をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに連結し、遺伝子治療用および対照用ベクターを作成した。組換え AAV ベクターを、増殖に必要な 2 種類のベクターとともに HEK293 細胞に導入した。ベクターを共発現させた HEK293 細胞を培養し、コンフルエントになった細胞を回収、凍結融解法によって各ウイルスを得、密度勾配超遠心法、および透析により精製を行い、対照用・治療用の 2 種類の AAV ウイルス (AAV-EGFP、AAV-HCN4) を完成させた。

ラット心筋細胞を採取し、AAV-EGFP、AAV-HCN4 それぞれを添加し、遺伝子導入効率を蛍光顕微鏡、RT-PCR 法にて確認した。またパッチクランプ法で If 電流の変化を観察し、遺伝子導入の機能的評価を行った。

ビーグル犬に全身麻酔下で房室結節カテーテルアブレーションを行い、完全房室ブロックを作成し、同時にペースメーカー機器を植え込み、40bpm でバックアップ心室ペーシングを行った。心臓刺激伝導系(右脚)に経カテーテル的に AAV-EGFP(対照群)または AAV-HCN4(治療群)を透視下に導入した。遺伝子導入後、経時的に心拍数の変化と不整脈の発生頻度を記録した。また遺伝子導入 4・8 週後に電気生理検査を行い、 $\beta$  刺激薬に対する心拍数の反応および右室における活動電位興奮様式を CALTO システムで評価した。

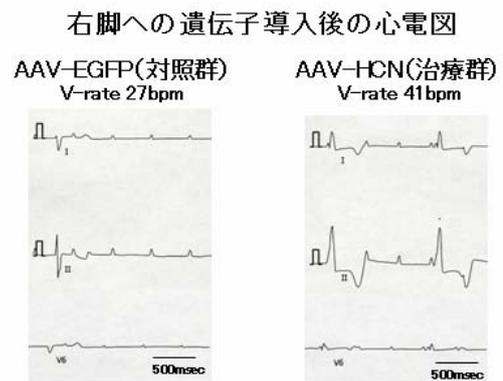
遺伝子導入 8 週後、心臓を摘出し、心臓各部位での導入遺伝子の発現を RT-PCR 法、免疫染色法で解析した。

## 4. 研究成果

培養心筋細胞に、作成された AAV-EGFP を遺伝子導入したところ、高効率で細胞に遺伝子導入されることが蛍光顕微鏡および RT-PCR 法にて確認された。パッチクランプ法では、AAV-HCN4 群で If 電流の増加が認められた。

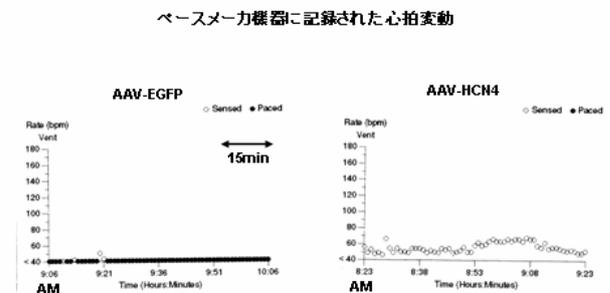
完全房室ブロックモデルイヌに対し、カテーテルを用いて右脚周囲に遺伝子導入を行ったところ、観察した全期間を通じて AAV-EGFP 群では心拍数がペースメーカー機器に完全に依存していた(図 1・2)が、AAV-HCN4 群では、遺伝子導入 2 週間後から有意な心拍数の増加が認められ、8 週後も維持していた(図 3)。

(図 1)

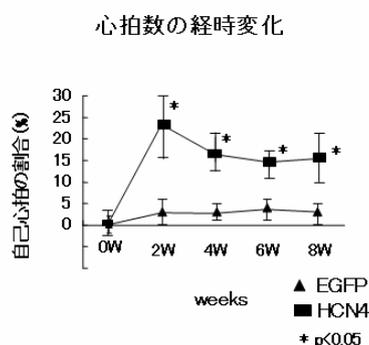


治療群:左脚ブロック+下方軸パターン → 右脚起源の心室調律

(図 2)



(図 3)



電気生理検査では、AAV-EGFP 群では $\beta$  刺激薬に対する心拍数増加反応が不良だったのに対し、AAV-HCN4 群では $\beta$  刺激薬に対する反応性が良好であり、また心室補充調律が遺伝子を導入した右脚から発生していることが確認された。また CALTO システムによる右室活動電位興奮様式の解析で、AAV-HCN4 群では、心室補充調律が遺伝子を導入した部位から発生していることが確認された。実験期間中、心室性不整脈の発生頻度には有意差が認められず、明らかな副作用の出現も認めなかった。AAV を用いた HCN4 遺伝子導入は徐脈性不整脈に対する治療法の一つになり得ることが示された。ただし徐脈の改善効果は、ペースメーカー機器と同程度までは改善できなかったため、今後、遺伝子導入法の改良や他の因子とのコンビネーション治療など、さらに改善を重ねる必要があると考えられた。

不整脈疾患に対する遺伝子治療の方法としてアデノ随伴ウイルスベクターを用いた報告はなく、本研究の成果として、アデノ随伴ウイルスベクターが、心臓刺激伝導系に対する遺伝子導入法として、さまざまな実験系や病態に応用が可能である可能性が示唆された。また HCN4 遺伝子導入により、徐脈がある程度まで改善することが示され、徐脈性不整脈に対する治療法への応用が可能であることが示唆された。

しかしながら、徐脈の改善効果は十分でなく、生理的に許容できる心拍数までの改善は得られず、現時点ですぐに徐脈性不整脈に対するペースメーカー機器による治療の代替治療になるのは困難と考えられる。一つには遺伝子導入効率、すなわち遺伝子導入法の問題、もう一つには、導入する遺伝子が単独では生理的な心拍数まで増加させられない可能性が考えられる。今後の課題として、遺伝子導入法の改良に加え、調律発生に関わるさらに詳細な分子メカニズムの解析が必要と考えられる。

不整脈疾患の中には、イオンチャネルの変異が原因となって発症する、いわゆる“チャンネル病 (channelopathy)” と呼ばれる疾患群が存在し、代表的なものとして QT 延長症候群、ブルガダ症候群などがある。これらは心室細動などによる突然死を引き起こす疾患として、非常に重要なものであるが、現在、これらの疾患に対しては、植込み型除細動器の植込みによる突然死予防しか治療法が確立していない。これらのチャンネル病に対する治療法としても、本研究のコンセプトや方法は応用できる可能性があり、さらに研究を進展させていく必要があると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 村越伸行、吉田健太郎、上村亮三、瀬戸山健太郎、田上和幸、関口幸夫、山口巖、青沼和隆. 徐脈性不整脈に対するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療. 第 30 回心筋生検研究会 (2008 年 11 月 29 日・三重)
- ② 村越伸行、吉田健太郎、上村亮三、瀬戸山健太郎、田上和幸、今中恭子、吉田利通、廣江道昭、関口幸夫、山口巖、青沼和隆. AAV-mediated HCN4 gene transfer to cardiac conduction system is a therapeutic potential as a biological pacemaker. 第 72 回日本循環器学会総会・学術集会 (2008 年 3 月 29 日・福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村越 伸行 (Nobuyuki Murakoshi)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・  
講師

研究者番号：80447218

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし