

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460408

研究課題名(和文)心房細動の遺伝子治療

研究課題名(英文)Gene Therapy for Atrial Fibrillation

研究代表者

五十嵐 友紀 (IGARASHI, Tomonori)

産業医科大学・産業生態科学研究所・講師

研究者番号：60469393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：10匹のラットを対照群およびConnexin(Cx)43遺伝子導入群へ分類し開胸術を行った。心臓電気生理学検査を行った後、遺伝子導入群にはCx43発現ウイルスを心房筋へ特異的に導入した。2カ月後に再度心臓電気生理学検査を行い、心臓を摘出しCx43の発現および局在を評価した。心房内伝達時間は対照群と比較し遺伝子導入群において有意に短縮していた。また心房細動誘発個体数も遺伝子導入群にて減少していた。遺伝子導入群でギャップ結合における有意なCx43の発現の上昇を認めた。選択的心房筋に対するCx43遺伝子導入は心房内刺激伝達時間を増加し、長期間に渡って心房細動抑制効果を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ten rats were randomized into 2 groups, control and Connexin (Cx) 43 gene delivered rats. Animals were underwent for electrophysiological study after open-chest surgery. In gene delivered group, we induced Cx43 expressing adeno-associated virus into rat atrial myocyte from epicardium surface. Transversus aortic constriction surgery was performed at the end of the surgery. Two months later, rats were underwent for terminal electrophysiological study. We found that intra-atrial conduction time was significantly shortened in Cx43 delivered rats. The number of AF-induced rats in Cx43 delivered rats was greater than control rats. However, there was no difference in atrial refractory periods and atrial action potential durations among the groups. We also observed that the expression of Cx43 in intercalated disk of atrial cardiomyocytes was significantly increased in gene delivered rats. Gene therapy of Cx43 preserved atrial conduction time and prevented AF for long-term periods.

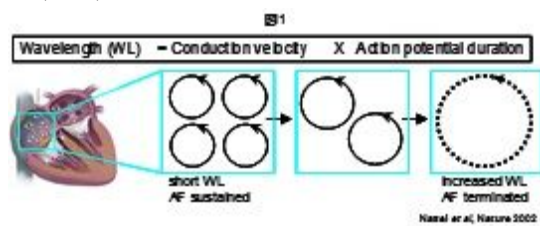
研究分野：循環器内科

キーワード：遺伝子治療 心房細動 ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

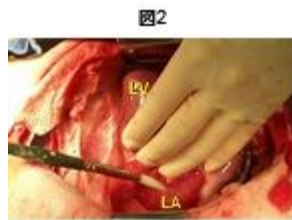
心房細動は日本で临床上最も見られる不整脈であり、人口の高齢化に伴い患者数は増加の一途を辿っている。洞調律維持を持続するのは困難で、新たな治療が望まれている。

持続性心房細動の発症メカニズムの有力なものとしてリエントリー説が唱えられている。リエントリー回路の周期(wavelength)は心房筋の不応期及び心房内伝達速度の積で表され、不応期を延長するか、もしくは伝達速度を増加することにより wavelength を増加させることとなる。この結果リエントリー数を減少させ、最終的には心房細動を停止することが期待される(図 1)。



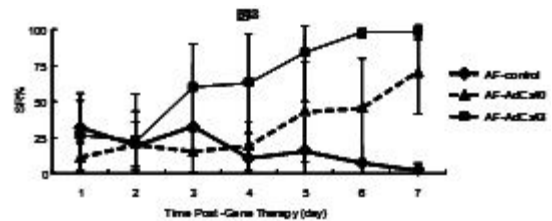
心房筋に対して選択的に不応期や伝達速度の修復を行うのはこれまで困難であったがアデノウイルスを発現ベクターとし、ブタの心房筋に対して心外膜側からウイルス溶液を塗ることで心内膜側まで完璧性にウイルスを導入することに成功した(Kikuchi et.al, Circ. 2005、図 2)。さらに KCNH2-G628S を心房筋に選択的に遺伝子導入することで心房筋の不応期を延長し、心房細動の発生を抑制することに成功した(Amit et.al, Circ. 2010)。これまでも心室筋の不応期を延長し心室性頻拍の発生を抑制する報告はあるが

(Sasano et.al, Nat. Med. 2006)、刺激伝達速度を増加させることで不整脈の発生を抑制するという報告は少ない。



心房筋はギャップ結合を通じて隣接している心筋細胞へ電気信号を伝達している。心房筋のギャップ結合には Connexin(Cx)40 及び Cx43 が発現しており、心房細動やうつ血性心不全ではこれらのタンパク質の発現が低下し、心房内伝達速度が低下している。したがって Cx40 もしくは Cx43 を心房筋に選択的に遺伝子導入することで心房内伝達速度を上昇させ、wavelength を増加させ、最終的には心房細動の抑制することが期待される。

これまで研究代表者はブタのペースングモデルを用いた実験において、Cx40, Cx43 による遺伝子治療が心房細動の抑制に有効であることを示してきた(Igarashi et.al, Circ. 2012)。この実験ではまず開胸術を行い Cx40, Cx43 を選択的に心房筋へ遺伝子導入し、さらに心房高頻度ペースングを行うことで心房細動誘発モデルを構築した。遺伝子導入を行わないコントロール群では洞調律発生率が経時的に減少し7日後にはほぼ全例心房細動へ移行したのに比べ、Cx 遺伝子導入を行った群ではコントロール群に比べ有意に(p<0.05)洞調律の発生率が増加した(図 3)。



Cx40 および Cx43 発現アデノウイルスベクターによる選択的心房筋遺伝子導入は、心房内伝達速度を維持することにより心房細動抑制効果を示すことが明らかとなった。

2. 研究の目的

持続性心房細動の発症メカニズムとしてリエントリー説から、心房内伝達速度を維持することでリエントリー持続を解除し洞調律へ復帰することが期待される。これまでの Cx40 および Cx43 遺伝子導入による心房細動抑制効果の実験ではベクターとしてアデノウイルスを用いたが、その発現は2-3週間と一時的であり、長期的な効果は不明であった。心房細動は長期に渡り適切なリズムコントロールを必要とされることから、本研究においては永続的に発現が期待できるアデノ随伴ウイルスベクターを用い、2か月間の長期間に渡る心房細動抑制効果を検証することとした。

3. 研究の方法

(1) Cx40 および Cx43 発現アデノ随伴ウイルスベクター溶液の作製

ラット心房筋より mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製した。Cx40 および Cx43 の coding sequence をターゲットとしたプライマーを用い、cDNA ライブラリーをテンプレートとして PCR を行い、発現プラスミドを作製した。得られたプラスミドはシークエンス法およびウエスタン・ブロット法にて塩基配列とタンパク質の発

現を確認した。アデノ随伴ウイルスベクターに対してパッケージングし、Cx40 および Cx43 発現ウイルスを構築した。ウイルスの Titer を確認後、ウイルス溶液を作製し遺伝子導入に最適な濃度を決定した。また溶液には 37 度の体温条件下でゲル状となるように poloxamer F127 を加え完成とした。

(2) 動物実験

ヒト Cx43 発現アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターをラットの心房筋へ遺伝子導入を行った。当初予定していたヒト Cx40 遺伝子導入は得られたウイルス・タイター値が低く、複数回ウイルス作製を試みたが至適タイター値を得ることが出来ず導入を断念した。

10 匹のラットを対照群 (シャム手術群、5 匹) および遺伝子導入群 (Cx43 導入群、5 匹) へ分類した。吸入麻酔導入後に気管内挿管を行い人工呼吸器に装着し、清潔条件下で開胸術を行った。まず心臓電気生理学検査を行い、心房筋有効不応期、心房筋脱分極時間、心房内伝達時間を測定した。その後遺伝子導入群には Cx43 発現ウイルスを心房筋へ特異的に導入し、上行大動脈を部分結紮した後負荷を作製した後に閉胸し手術は終了とした。

2 ヶ月後に再度開胸し、心房筋有効不応期、心房筋脱分極時間、心房内伝達時間、心房細動誘発時間などを測定した。大動脈を切断した後に心臓を摘出し、免疫組織染色法にて Cx43 がギャップ結合や細胞膜にどの様に発現しているのか、その局在を解析することで機能的 Cx43 と非機能的 Cx43 の発現割合を評価した。遺伝子導入効率の評価に関してはウエスタン・ブロット法によりタンパク質レベルでの発現を確認した。

4. 研究成果

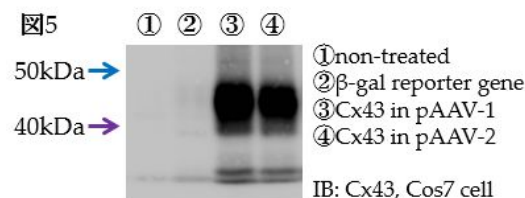
(1) Cx40 および Cx43 発現アデノ随伴ウイルスベクター構築

ラット心房筋より cDNA ライブラリーを作製し、Cx40 および Cx43 の coding sequence をターゲットとしたプライマーを用い、cDNA ライブラリーをテンプレートとして PCR を行い、PCR 産物を獲得した。図 4 に Cx43 の PCR 産物のアガロース電気泳動写真を示す。



得られた PCR 産物は発現プラスミドに挿入され、シークエンス法にて塩基配列を、

さらにウエスタン・ブロット法にてタンパク質発現を確認した。その後、アデノ随伴ウイルスシャトルベクターに再挿入され、Cos7 細胞を用いてタンパク質発現を評価した。図 5 に Cos7 にトランスフェクションさせた Cx43 発現アデノ随伴ウイルスシ



ャトルベクターのウエスタン・ブロット解析の結果を示す。

当初予定していた Cx40 発現アデノ随伴ウイルスベクターは得られたウイルス・タイター値が低く、複数回ウイルス作製を試みたが至適タイター値を得ることが出来ず今回の研究への導入を断念した。

(2) ラットを用いた心房細動モデルに対する遺伝子導入動物実験

電気生理学的検査

10 匹のラットを 5 匹ずつ対照群および Cx43 遺伝子導入群へ分類した。人工呼吸器に装着し、清潔条件下で開胸術を行い、心外膜側より電気生理学的検査を施行した。

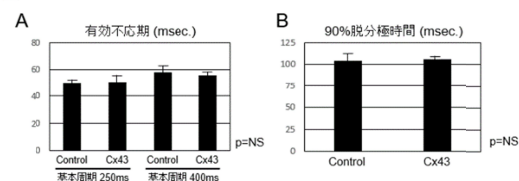
< 心房筋有効不応期 >

基本周期 250msec および 400msec とし、心外膜側より心房筋の有効不応期を測定した。基本周期 250msec における対照群の有効不応期は 50.3 ± 2.4 msec、Cx43 群は 50.6 ± 4.8 msec、基本周期 400msec における同値は対照群 58.0 ± 4.7 msec、Cx43 群は 56.0 ± 3.2 msec と、いずれの基本周期においても両群間で有意差は認めなかった(図 6A)。

< 心室筋脱分極時間 >

心外膜側より MAP(monophasic action potential duration)を測定し、その 90%脱分極時間を測定した。対照群は 104.4 ± 8.4 msec、Cx43 群は 106.0 ± 5.3 msec と両群間で有意差は認めなかった(図 6B)。

図6



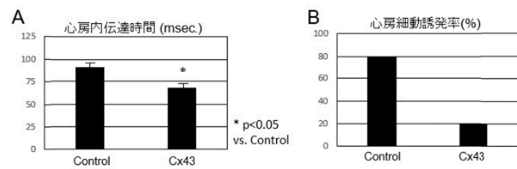
< 心房内伝達時間 >

洞結節から左心耳間の伝達時間を測定し、対照群は 91.4 ± 5.3 msec、Cx43 群は 68.2 ± 2.1 msec ($p < 0.05$)と、有意な伝達時間の短縮を認めた(図 7A)。

< 心房細動誘発率 >

心外膜側より高頻度ペーシングを行い30秒以上の心房細動の誘発を認めた個体は、対照群で4匹(80%)、Cx43群で1匹

図7



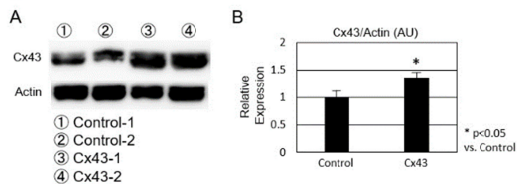
(20%)であった(図7B)。

Cx43 発現および局在の評価

< ウェスタン・ブロット解析による Cx43 発現量の評価 >

心房組織は摘出後直ちに-80℃保存とし、ウェスタン・ブロット解析直前に解凍およびホモジナイズした。Total Cx43 および Actin に対する抗体を用い、それぞれの発現量は NIH image で定量化した後に Actin の発現量で補正した(図8A)。対照群の Cx43/Actin 発現量に比し、Cx43 群において有意な Cx43/Actin の発現量の上昇を認め(1.36 ± 0.15AU, p < 0.05)、遺伝子導入効果を確認した(図8B)。

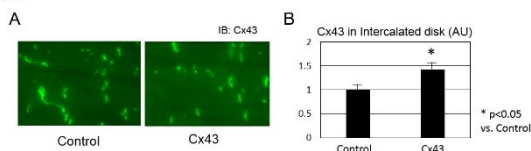
図8



< 免疫組織染色による Cx43 局在の評価 >

心房筋における Cx43 の局在を評価するために免疫組織染色を行った。代表的な染色像を図9Aに示す。全体の発現量に対するギャップ結合における Cx43 の発現量を定量化したところ、対照群に比して Cx43 群では有意にその発現量が増加していた(1.41 ± 0.23AU, p < 0.05、図9B)。選択的心房筋に対する Cx43 遺伝子導入は心房内刺激伝達時間を増加し、さらに心房細動抑制効果を示すことが示唆された。

図9



まとめ

ラット心房細動誘発モデルにおいて、Cx43 発現アデノ随伴ウイルスベクターによる選択的心房筋遺伝子導入は、ギャップ結合における Cx43 の発現を増加することにより

心房筋内伝達時間を上昇させ、長期間に渡る心房細動抑制効果を示した。

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

該当なし

〔学会発表〕

該当なし

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 友紀 (IGARASHI Tomonori)

産業医科大学・産業生態科学研究所・講師

研究者番号：60469393

(2)研究分担者

荻ノ沢 泰司 (OGINOSAWA Yasushi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：20596720

河野 律子 (KOHNO Ritsuko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20449945

(3)連携研究者

該当なし