



生物学的ペースメーカーの展望

¹ 鳥取大学医学部附属病院次世代高度医療推進センター再生医療部門

² 鳥取大学大学院医学系研究科再生医療学分野

森川久未¹ 白吉安昭² 久留一郎^{1, 2}

I. 生物学的ペースメーカーとは

徐脈性不整脈は加齢に伴い増加し、心不全や突然死の原因ともなる疾患である。この疾患に対する根治的治療法は確立されておらず、機械式ペースメーカーの恒久的植込み術がほぼ唯一の治療法となる。現在、年間5万人以上の患者に機械式ペースメーカーの植込みが行われているが、機械式ペースメーカーには、バッテリー寿命による再手術や、自律神経系への応答性の欠如など、種々の問題がある。そこで、機械式ペースメーカーに代わり、自動能、ペーシング・センシング機能をもった細胞を作製し、徐脈性不整脈の治療に使用するという考え方が生まれた。これが『生物学的ペースメーカー』の概念である。生物学的ペースメーカーの最大の利点は、交感神経系・副交感神経への生理的応答能を有することである。加えて、生体の洞結節に近い部位からペーシングを行えることや、恒久的な治療法となる可能性を有することも特徴である。

生物学的ペースメーカー作製方法は、大きく2種類に大別される^{1), 2)}。遺伝子操作法と細胞移植法である。遺伝子操作法では、遺伝子操作によって(主にイオンチャネルの発現を変化させることによる)、自動能をはじめとした各種ペースメーカー機能を心臓内の心筋細胞に付加する方策がとられている。近年の進展では、この遺伝子操作法にリプログラミングの概念を取り入れた、心筋細胞の分化転換による洞結節ペースメーカー細胞の作製が特筆すべき点である。細胞治療法では、生体や多能性幹細胞(ES細胞やiPS細胞)の分化誘導系から、ペースメーカー機能をもった心筋細胞を分離、あるいは分化誘導する方法と、間葉系幹細胞にペースメーカー機能に重要な遺伝子を強制発現させ、ペースメーカー機能をもたせて移植する方法が代表的である。以降の項目で各方法について解説する。

II. 遺伝子操作法による作製(図1)³⁾

生物学的ペースメーカー作製の可能性について最初に示唆した論文は、Edelbergらによるものである⁴⁾。彼らは、 β アドレナリン受容体の遺伝子をモルモットあるいはブタの心筋で過剰発現させ、心拍数が40～50%増加することを示した。続いて、イオンチャネルを生物学的ペースメーカー作製の標的として最初に用いたのが、Miakeらの報告である⁵⁾。彼らは、内向き整流 K^+ 電流(I_{K1})チャネルをコードする*Kir2.1*遺伝子のドミナントネガティブ変異体を、モルモット左心室内に注入した。40%のモルモットで心室固有調律が観察され、心室筋で自動能が生じることがわかり、遺伝子操作によって生物学

的ペースメーカーを作製できることが初めて示された。

Rosenらの研究グループは、洞結節ペースメーカー細胞における自動能の生成に最も重要である過分極誘発内向き電流(I_f)に注目し、 I_f 電流をコードする HCN ファミリー遺伝子を用いた生物学的ペースメーカーの作製を数多く行っている⁶⁾。Quらは、アデノウイルスを用いて *HCN2* 遺伝子をイヌの左心房、左心室に注入したモデルを作製した⁷⁾。このモデル動物では、移植部位を起源とする異所性の心房、心室調律が出現し、自律神経作動薬に応答して興奮頻度が上昇することが明らかとなった。また、Miakeらの報告に示されるように、通常、心室筋では、 I_{K1} コンダクタンスが高いため、自動能は生じない。そこで、変異型の HCN チャンネルを過剰発現させることによって、自動能発生に十分な内向き電流を心室筋で発生させ、自動能を誘導する試みを数多く行っている。E324A 変異をもつ *HCN2* 遺伝子⁸⁾、部分欠失型 *HCN1* (*HCN1*- $\Delta\Delta\Delta$) 遺伝子⁹⁾、*HCN1* と *HCN2* のキメラ複合体(*HCN212*)¹⁰⁾ などの過剰発現が行われており、より強力なペースメーカー活性が生ずることが示されている。さらに、これらの成果を基に、2種の遺伝子を組み合わせ、生物学的ペースメーカーを作製する研究が試みられている。Cingolaniらは *HCN2* と *Kir2.1* ドミナントネガティブ変異体の組み合わせ¹¹⁾、Boinkらは *HCN2* とナトリウムチャンネル(骨格筋特異的ナトリウムチャンネル: *SkM1*)との組み合わせ¹²⁾を試しており、いずれも単一遺伝子の強制発現よりも効果が増強されている。

Yamanakaらによる iPS 細胞の作製¹³⁾は、遺伝子操作による細胞の分化転換の先駆けとなり、生物学的ペースメーカー作製においても、このリプログラミングの概念を用いた作製法が、最新の研究成果として注目されている。これは、洞結節ペースメーカー細胞の発生・分化にかかわる転写因子によって、心室筋細胞などをペースメーカー細胞へと分化転換し、生物学的ペースメーカー作製する試みである。Kapoorらはモルモット心室筋細胞において、*Tbx18* の過剰発現を行った¹⁴⁾。その結果、過剰発現細胞は、ペースメーカー細胞様の紡錘形の細胞形態を示し、Cx43 の発現減少、 I_{K1} 電流の減少と *HCN4* の発現増加、細胞内 cAMP の上昇、自発的 Ca^{2+} サイクリングの増加など、ペースメーカー細胞様の性質を示すことを見出した。このように、*Tbx18* によるリプログラミングによって、心室筋細胞をペースメーカー細胞へと分化転換することができる。さらに、Huらは、ブタの AV-ブロックモデルにおいて、His 束への *TBX18* 過剰発現ベクターの導入を行い、心拍数の増加とバックアップペーシングからの完全な離脱に成功している¹⁵⁾。

Ⅲ. 細胞移植による作製¹⁶⁾

生体での心臓の拍動は、洞結節にあるペースメーカー細胞によって制御されていることから、この細胞あるいは同等の細胞が、生物学的ペースメーカーとして最も適していると考えられる。このため、生体あるいは各種幹細胞からペースメーカー細胞を調整し、生物学的ペースメーカーとして移植する研究が行われている。Ruhparwarらは、胎児の心房筋やペースメーカー細胞をイヌの AV-ブロックモデルに移植し、心室筋からの異所性の調律を観察した¹⁷⁾。この研究は、移植した細胞が生物学的ペースメーカーとして機能することを明確に示している。続いて、Kehatらは、ヒト ES 細胞の胚様体から拍動部位を切り出し、ブタの AV-ブロックモデルへ移植実験を行っている¹⁸⁾。移植後1週間は異所性の調律が保たれ、ヒト ES 細胞由来の分化誘導心筋にペースメーカー機能があることが示された。近年、ヒト iPS 細胞を用いた心筋細胞の誘導が多数報告されている¹⁹⁾。これは、iPS 細胞を経由することによって、各々の患者に対応した個別の生物学的ペースメーカーを作製できることを意味している。しかし、これらの分化誘導

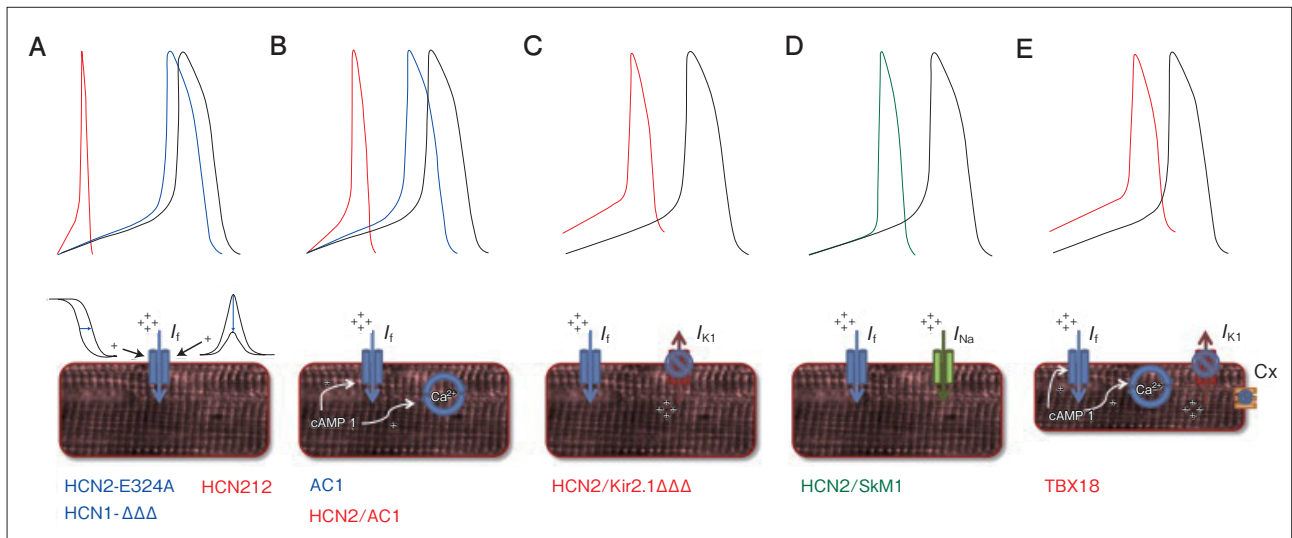


図1 遺伝子操作法による生物学的ペースメーカーの作製と作用機序

図上部の黒色の活動電位は、HCN2過剰発現細胞における活動電位を、他の活動電位は各図の遺伝子の過剰発現細胞における活動電位を示す。図下部は各図における遺伝子の過剰発現状態を模式的に表す。作製法が異なるため、一概に比較はできないが、(D)のHCN2/SkM1で、静止膜電位が深く、早い自動能がみられる。

AC : adenylyl cyclase

[文献3)より引用改変]

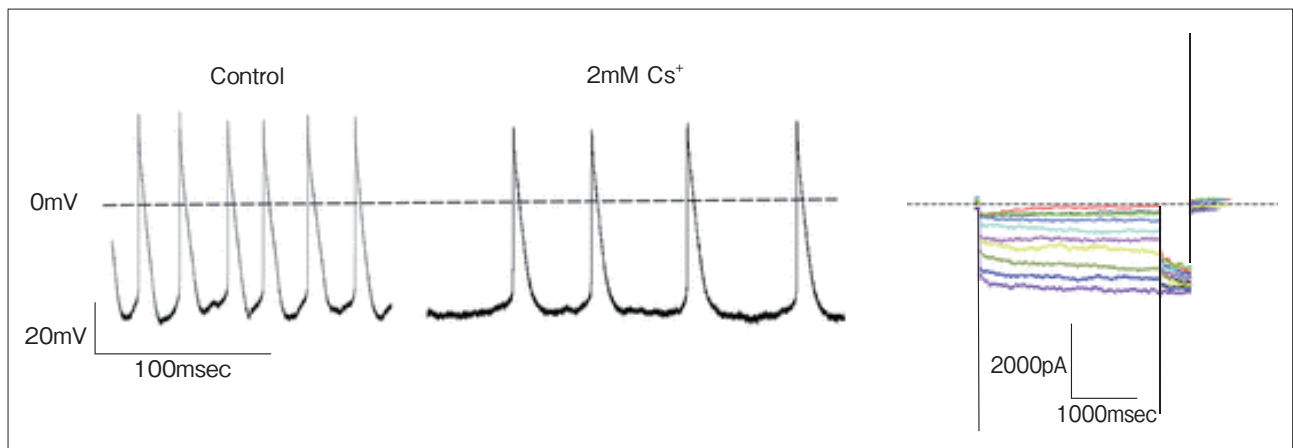


図2 マウスES細胞由来ペースメーカー細胞

マウスES細胞由来HCN4陽性細胞は、セシウムによって阻害される自動能を有し(左・中央)、 I_f 電流を呈する(右)。

[文献20)より引用改変]

心筋には、心室筋、心房筋、ペースメーカー細胞が混在している。このため、ペースメーカー細胞に特化した分化誘導系の開発、もしくはヘテロな細胞集団からペースメーカー細胞の純化精製法の開発が必要である。筆者らは、洞結節ペースメーカーのマーカであるHCN4に着目し、HCN4チャネルを指標としたペースメーカー細胞の純化精製法の開発を行っている(図2)²⁰⁾。ヒトES細胞の心筋分化誘導系から純化したペースメーカー(HCN4陽性)細胞は、自動能をもち、 I_f 電流などのペースメーカー細胞特異的遺伝子発

現を示す。最後に、Plotnikovらは、HCN2を強制発現したヒト間葉系幹細胞をイヌ左心室へ移植したところ、移植部位からの異所性のペースメーカ活性が生じることを報告している²¹⁾。この研究は、間葉系幹細胞の有用性を示すのみならず、前項で述べた遺伝子操作法と細胞移植法とを組み合わせることにより、機能を増強あるいは新機能を付加した生物学的ペースメーカ作製の可能性を示唆している。

IV. 将来展望

これらの研究を臨床応用へ進めるためには、治療効果の持続性や、他の心筋細胞との結合と電気信号の伝導性、自律神経系との協調や不整脈の危険性の排除など、解決すべき課題は多い。しかしながら、近い将来、生物学的ペースメーカによる徐脈性不整脈治療が現実の医療となるよう、研究を進めていきたい。

【文 献】

- 1) 本莊晴朗, 李鍾国, 神谷香一郎, 児玉逸雄: 徐脈性不整脈に対する遺伝子・細胞治療の展望. Medical Topics Series不整脈 2007: (杉本恒明, 井上 博), 1版. メディカルレビュー社, 大阪, 2007: 43 ~ 54
- 2) 白吉安昭, 久留一郎: 生物学的心臓ペースメーカー. 不整脈学: (井上 博, 村川裕二), 南江堂, 東京, 2012: 302 ~ 306
- 3) Boink GJ, Christoffels VM, Robinson RB, Tan HL: The past, present, and future of pacemaker therapies. Trends Cardiovasc Med, 2015; 25: 661 ~ 673
- 4) Edelberg JM, Huang DT, Josephson ME, Rosenberg RD: Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. Heart, 2001; 86: 559 ~ 562
- 5) Miale J, Marbán E, Nuss HB: Biological pacemaker created by gene transfer. Nature, 2002; 419: 132 ~ 133
- 6) Rosen MR, Robinson RB, Brink PR, Cohen IS: The road to biological pacing. Nat Rev Cardiol, 2011; 8: 656 ~ 666
- 7) Qu J, Plotnikov AN, Danilo P Jr, Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB, Rosen MR: Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. Circulation, 2003; 107: 1106 ~ 1109
- 8) Bucchi A, Plotnikov AN, Shlapakova I, Danilo P Jr, Kryukova Y, Qu J, Lu Z, Liu H, Pan Z, Potapova I, KenKnight B, Girouard S, Cohen IS, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR: Wild-type and mutant HCN channels in a tandem biological-electronic cardiac pacemaker. Circulation, 2006; 114: 992 ~ 999
- 9) Tse HF, Xue T, Lau CP, Siu CW, Wang K, Zhang QY, Tomaselli GF, Akar FG, Li RA: Bioartificial sinus node constructed via in vivo gene transfer of an engineered pacemaker HCN Channel reduces the dependence on electronic pacemaker in a sick-sinus syndrome model. Circulation, 2006; 114: 1000 ~ 1011
- 10) Plotnikov AN, Bucchi A, Shlapakova I, Danilo P Jr, Brink PR, Robinson RB, Cohen IS, Rosen MR: HCN212-channel biological pacemakers manifesting ventricular tachyarrhythmias are responsive to treatment with I (f) blockade. Heart Rhythm, 2008; 5: 282 ~ 288
- 11) Cingolani E, Yee K, Shehata M, Chugh SS, Marban E, Cho HC: Biological pacemaker created by percutaneous gene delivery via venous catheters in a porcine model of complete heart block. Heart Rhythm, 2012; 9: 1310 ~ 1318
- 12) Boink GJ, Duan L, Nearing BD, Shlapakova IN, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Bobkov E, Kryukova Y, Ozgen N, Danilo P Jr, Cohen IS, Verrier RL, Robinson RB, Rosen MR: HCN2/SkM1 gene transfer into canine left bundle branch induces stable, autonomically responsive biological pacing at physiological heart rates. J Am Coll Cardiol, 2013; 61: 1192 ~ 1201
- 13) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 2006; 126: 663 ~ 676
- 14) Kapoor N, Liang W, Marbán E, Cho HC: Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. Nat Biotechnol, 2013; 31: 54 ~ 62
- 15) Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, Marban E, Cingolani E: Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block. Sci Transl Med, 2014; 6: 245 ~ 294
- 16) Chauveau S, Brink PR, Cohen IS: Stem cell-based biological pacemakers from proof of principle to therapy: a review. Cytotherapy, 2014; 16: 873 ~ 880

- 17) Ruhparwar A, Tebbenjohanns J, Niehaus M, Mengel M, Irtel T, Kofidis T, Pichlmaier AM, Haverich A : Transplanted fetal cardiomyocytes as cardiac pacemaker. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002 ; 21 : 853 ~ 857
- 18) Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L : Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004 ; 22 : 1282 ~ 1289
- 19) Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL : Induced pluripotent stem cells : the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012 ; 13 : 713 ~ 726.
- 20) Morikawa K, Bahrudin U, Miake J, Igawa O, Kurata Y, Nakayama Y, Shirayoshi Y, Hisatome I : Identification, isolation and characterization of HCN4-positive pacemaking cells derived from murine embryonic stem cells during cardiac differentiation. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2010 ; 33 : 290 ~ 303
- 21) Plotnikov AN, Shlapakova I, Szabolcs MJ, Danilo P Jr, Lorell BH, Potapova IA, Lu Z, Rosen AB, Mathias RT, Brink PR, Robinson RB, Cohen IS, Rosen MR : Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart. *Circulation*, 2007 ; 116 : 706 ~ 713