

徐脈性不整脈に対する遺伝子・細胞治療の現在

吉田 聡^{1*} 李 鍾國²

徐脈性不整脈の治療は人工ペースメーカ植込みがゴールドスタンダードであるが、感染症や非生理的ペーシングによる心不全増悪などの合併症を引き起こすことがあるため、新規治療法開発が期待されている。徐脈性不整脈に対する遺伝子治療や細胞治療の研究は現在も進められており、イオンチャネルを制御することで作業心筋の自動能を上昇させ、ペースメーカ機能をもつ細胞へと変化させる方法や、幹細胞由来拍動細胞を左心室に移植することで接合部調律と同程度の異所性興奮を生じさせる方法が報告されている。このように、バイオペースメーカ開発が進む一方で、房室ブロックで生じた房室伝導障害の修復に関してはいまだ報告が少なく、その電気生理特性解析に関しても確立したものがない。そこでわれわれは、生体由来心筋細胞と同じ動物種由来の、iPS細胞由来心筋細胞による *in vitro* 細胞移植評価プラットフォームを構築し、心臓伝導障害に対する再生治療法の可能性を探求した。これまでに報告された徐脈性不整脈に対する遺伝子治療・細胞治療法と併せて報告する。

(心電図, 2023 ; 43 : 19-25)

I. はじめに

徐脈性不整脈は洞結節や房室結節などの刺激伝導系機能が破綻することによって引き起こされる疾患である。薬物治療では効果は不確実であり、心拍数維持あるいは房室伝導の補完治療としての人工ペー

スメーカ治療が標準治療であるが、デバイス関連感染症や電池寿命の問題、非生理的ペーシングによる心不全増悪など、解決すべき問題も残っている¹⁾。そのため、新規治療法の開発に期待が寄せられており、とりわけ新しいバイオ技術を応用したペースメーカ機能あるいは房室伝導の修復に関心が集まっている。本稿では、徐脈性不整脈に対する遺伝子治療あるいは細胞治療の現状を概説し、著者らが構築した房室伝導障害プラットフォームおよびその伝導修復の基礎的検討につき報告する。

Keywords

- 幹細胞治療
- 房室ブロック
- iPS細胞
- 同種移植

1 市立東大阪医療センター循環器内科
(〒578-8588 大阪府東大阪市西岩田三丁目4番5号)

2 大阪大学大学院医学系研究科心血管再生医学共同研究講座

*は責任者を示す

表 徐脈性不整脈に対する遺伝子治療・細胞治療まとめ

研究	動物 / 疾患モデル	移植部位	移植片	バイオペースメーカー調律	デリバリー方法	免疫抑制薬の使用
遺伝子治療						
Edelberg et al. (1998)	マウス	右心房	$\beta 2$ 受容体 (cDNA)	—	開胸	なし
Miyake et al. (2002)	モルモット	左心室	Ad- <i>Kir2.1AAA</i> * ¹	+ / —	開胸	なし
Qu et al. (2003)	イヌ	心耳	Ad- <i>HCN2</i>	++	開胸	なし
Kapoor et al. (2013)	ブタ / 房室ブロック	左心室	Ad- <i>Tbx18</i>	+ / —	開胸	あり
Dawkins et al. (2019)	ブタ / 房室ブロック	ヒス束部位	Ad- <i>Tbx18</i>	++	経カテーテル	なし
細胞治療						
Ruhparwar et al. (2002)	イヌ	左心室	イヌ胎児心房筋 (洞結節含む)	+	開胸	あり
Kehat et al. (2004)	ブタ / 房室ブロック	左室	ヒト胚性幹細胞	+ / —	開胸	あり
Beeres et al. (2005)	ラット新生仔心室筋細胞 / 房室ブロック	房室ブロックモデル	ヒト間葉系幹細胞	—	<i>in vitro</i>	なし
Cingolani et al. (2014)	ラット	右心耳 / 右室側壁	ヒトカルディオスフェア由来細胞 + ラット新生仔心室筋細胞	+ / —	開胸	なし
Takahashi et al. (2015)	マウス / 房室ブロック	房室結節	マウス褐色脂肪由来細胞	++	開胸	なし
Yoshida et al. (2018)	ラット新生仔心室筋細胞 / 房室ブロック	<i>in vitro</i> / 房室ブロックモデル	ラット iPS 細胞由来心筋細胞	++	<i>in vitro</i>	なし

*¹ *Kir2.1AAA* ; dominant-negative form of *Kir2.1*

II. 徐脈性不整脈に対する遺伝子治療・細胞治療 (表)

徐脈性不整脈に対する遺伝子治療の端緒を開いたのは、1998年のEdelbergらによる、マウスの右心房にヒト $\beta 2$ アドレナリン受容体を過剰発現させ、心拍数を最大40%増加させたという報告である²⁾。その後、バイオペースメーカーとしてのコンセプトを確立したのはMiakeらによる、内向き整流カリウム電流(I_{K1})において中心的役割を果たす*Kir2.1*チャネルタンパクをコードする*Kir2.1(KCNJ2)*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筋内に注入し過剰発現させることで、心室筋内で自動能を生じさせたとする報告である³⁾。Miakeらの報告の翌年には、Quらによって、過分極誘発内向き電流(I_f)チャネルを構成する*HCN2*をコードする*HCN2*遺伝子をイヌ左心耳基部に注入し過剰発現させ、左房からの興奮伝播が示された⁴⁾。同時期に、

別々のグループが別々の方法でバイオペースメーカー開発を進めており、非常に興味深い。また、最近では転写因子の*TBX18*遺伝子を導入すると、心室筋細胞を洞結節細胞様の細胞(iSAN)に形質転換しうる方法が示され⁵⁾、さらに完全房室ブロックブタのヒス束部に*TBX18*を注入すると、同部位で生成された自動能が順行性に興奮伝播し、ペーシング誘発心筋症を予防あるいは改善するとの報告がなされている^{5)・6)}。しかしながら、これらの治療法では*TBX18*などを細胞内へ導入する際にウイルスベクターを用いる必要があり、また、その発現も比較的短期間であるため、長期的な効果・安全性に関しては不明な点が多い。

細胞治療も遺伝子治療とほぼ同時期に進められており、2002年のRuhparwarらの報告では、洞結節を含むイヌ胎児心房筋を成体イヌ左心室に移植し、房室ブロックを作成したところ、移植片からの心室補充調律が確認された⁷⁾。Kehatらは、ヒト胚性幹

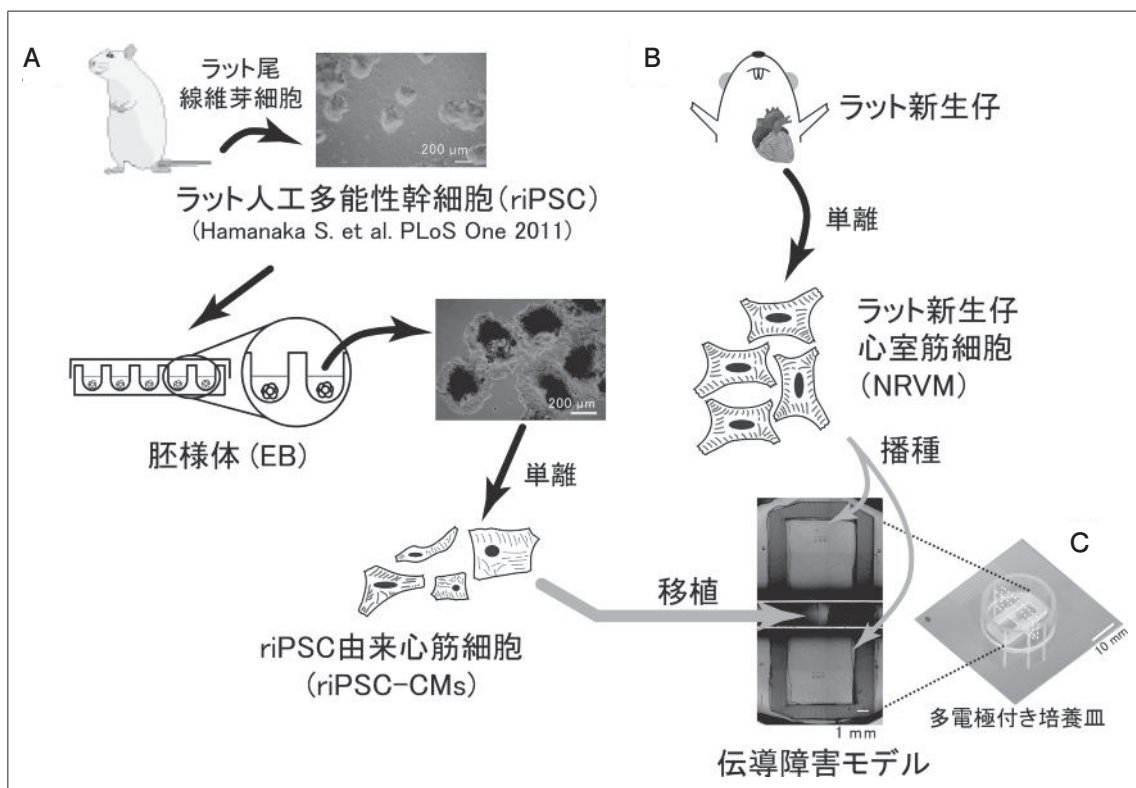


図1 ラット iPS細胞から心筋細胞への分化誘導と房室伝導障害モデル構築のスキーム図

- A: ラット iPS細胞から心筋細胞 (riPSC-CM)への分化誘導と移植。
- B: ラット新生仔心室筋細胞を単離し、房室伝導障害モデルへの播種。
- C: 多電極付き培養皿を用いた房室伝導障害プラットフォームの作成。

細胞 (ES細胞) から拍動細胞へと分化誘導し、ブタ房室ブロックモデル左心室へと移植した⁸⁾。13頭中11頭で異所性興奮が見られ、うち6頭で移植部位から接合部調律と同程度の補充調律が得られたものの、5頭は期外収縮やその連発程度であったとの結果であり、移植片の生着やホストの拒絶反応など、異種移植に伴う問題も指摘されている。また、ES細胞に関しては倫理的な問題も指摘されており、臨床応用へのハードルは高い。

体細胞からのリプログラミングにより得られた多能性幹細胞 (iPS細胞) はこの倫理的なハードルを下げ、iPS細胞から心筋細胞、特に心室筋をはじめとする作業心筋への分化誘導が可能となり、創薬や重症心不全治療への臨床応用が始まっている^{9)・10)}。一方、iPS細胞から、心室筋のみならず、心房筋や洞

結節細胞などのサブタイプへの分化誘導に関しても、例えばレチノイン酸や骨形成因子 (BMP) などの作用による方法¹¹⁾ など様々な報告が見られるようになり、多くの研究者による検証が行われている。

これまでのバイオペースメーカーの実験系の多くは、左心室自由壁への移植により異所性興奮を発生させる手法を取っており、非生理的な興奮伝播を惹起すると言わざるを得ない。房室ブロックに対しては、房室伝導障害の修復という手法も考えられるが、これまでにそのような報告は少なく、実験系も確立していない。ラット新生仔心室筋細胞で作成した伝導障害モデルに未分化なヒト間葉系幹細胞を移植した実験においては、伝導修復は見られたものの、その伝導速度は著しく遅かったと報告されている¹²⁾。Cingolaniらはラット新生仔心室筋細胞を用いて作

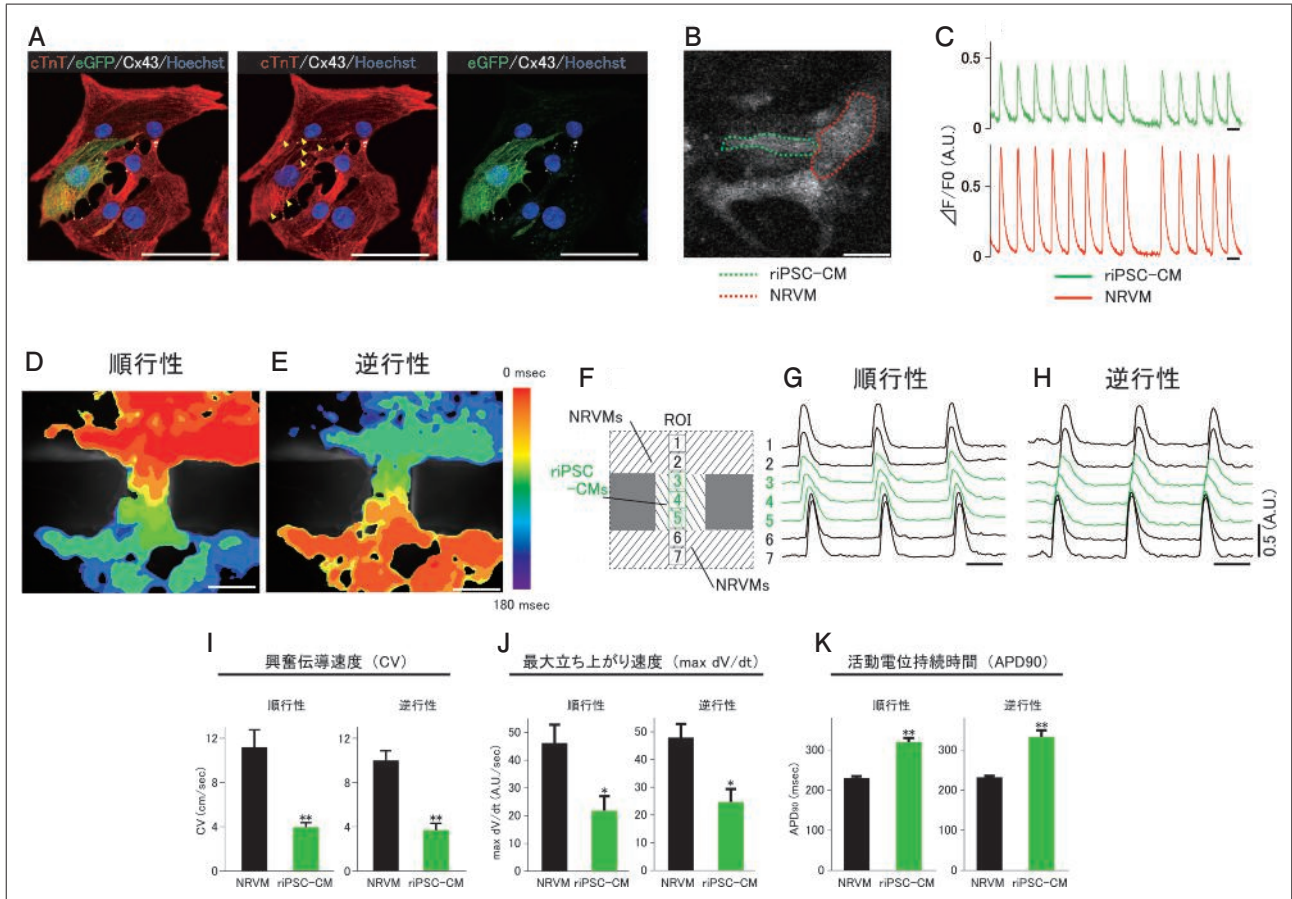


図2 ラット iPS 由来心筋細胞の形態的特徴とライブセルイメージング

A: 免疫染色: 心筋トロポニン T (赤), コネキシン 43 (黄矢頭), eGFP, ヘキスト 33342 (核). スケールバー: 50 μm .
 B: ライブセルイメージング. 緑点線: ラット iPS 由来心筋細胞 (riPSC-CM). 赤点線: ラット新生仔心室筋細胞 (NRVM).
 C: B で ROI を取った部位での riPSC-CM (上段, 緑) と NRVM (下段, 赤) のカルシウムトランジェント波形. 同期拍動していることがわかる. スケールバー: 1 秒.
 D, E: 房室ブロックモデルに細胞を播種し, 膜電位感受性色素 di-8-ANEPPS を用いて記録した興奮伝播様式. riPSC-CM 領域では等時線が密となっており, 緩徐伝導を示している. スケールバー: 1000 μm .
 F ~ H: 各 ROI における活動電位波形. ROI 1 ~ 2 および 6 ~ 7 (黒四角) は NRVM 領域. ROI 3 ~ 5 (緑四角) は riPSC-CM 領域. G は順行性伝導時. H は逆行性伝導時.
 I ~ K: 伝導障害モデルの間隙にそれぞれ NRVM あるいは riPSC-CM を移植し, 興奮伝導特性を測定. 左パネル: 順行性伝導時. 右パネル: 逆行性伝導時. I は ROI 1 ~ 7 間の伝導速度の比較. それぞれ $n = 3$. $**p < 0.01$ vs. NRVM. J は移植した部位での最大立ち上がり速度の比較. それぞれ $n = 3$. $*p < 0.05$ vs. NRVM. K は移植した部位での活動電位持続時間の比較. それぞれ $n = 3$. $**p < 0.01$ vs. NRVM.

[文献 15 より引用改変]

成した房室ブロックモデルにヒトカルディオスフェア由来細胞 (cardiosphere-derived cells: CDCs) とラット新生仔心室筋細胞を混ぜた伝導体を移植することで離れた 2 ヲ所の興奮を架橋することが可能であり, また, 成体ラットの右心耳と右室側壁をその

CDC 伝導体を用いて心外膜側からつなげることで房室伝導の架橋が可能であったと報告している¹³⁾. この報告でも見られるように, 実験系として異種移植となっているものが多く, 同種での実験系は少ない. Takahashi らはマウスの褐色脂肪由来細胞を,

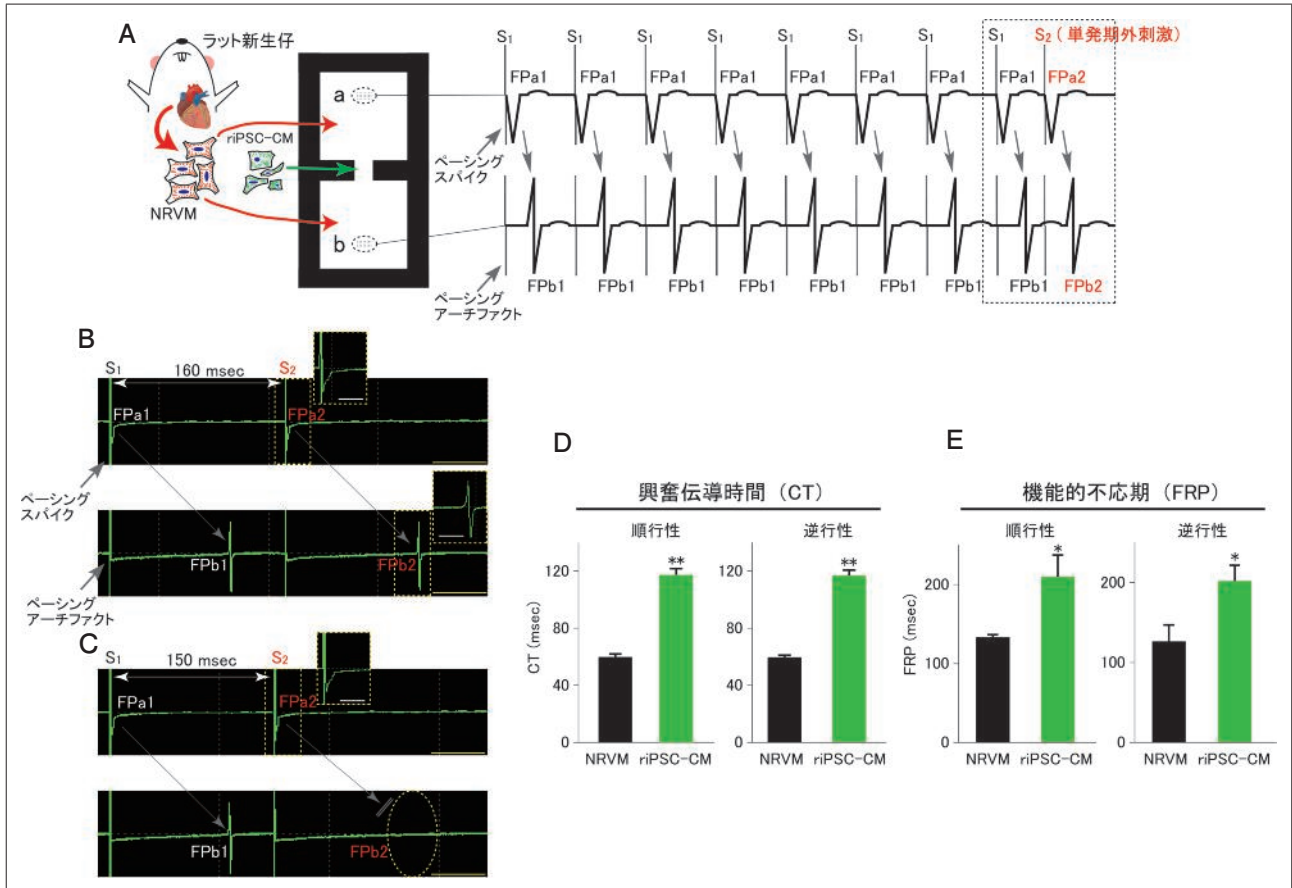


図3 ラット iPSC 由来心筋細胞伝導路の電気生理学的特性

- A: MED64システムを用いた伝導障害・修復モデルに対する電気生理学的検査のシェーマとプロトコール。白金電極領域(a)からの8連発刺激(S1)の後に刺激間隔を短くした単発早期刺激(S2)を加え、対側の電極(b)での電位(FPb1およびFPb2)を観察し、興奮伝導時間および機能的不应期を計測。
- B, C: 電気生理学的検査の例。S1S2が160 msecでは対側の心筋を捕捉している(B)が、S1S2を10 msec短縮したところ、対側の心筋を捕捉できていない(C)。すなわち、この時の機能的不应期は160 msecとなる。スケールバー(白): 10 msec. スケールバー(黄): 50 msec.
- D: 興奮伝導時間の比較。それぞれ n = 5. **p < 0.01 vs. NRVM.
- E: 機能的不应期の比較。それぞれ n = 5. *p < 0.05 vs. NRVM.

[文献15より引用改変]

自動能をもつ細胞へと分化させ、房室ブロックモデルマウスの房室結節領域へ移植したところ、房室ブロックが部分的にあるいは完全に回復するが、その成功率は50%程度と報告されており、また、詳細な電気生理学的特性まで解析されていない¹⁴⁾。そこで筆者らは、ラット新生仔心室筋細胞を用いて作成した房室ブロックを模した *in vitro* プラットフォームにおいて、ラット iPSC 由来心筋細胞を移植したのち、そ

の電気生理学的特性を詳細に検討した(図1~3)¹⁵⁾。ラット iPSC 細胞由来心筋細胞(riPSC-CM)がラット新生仔心室筋細胞(NRVM)とコネキシン43を介して結合しており(図2A)¹⁵⁾、ライブセルイメージングにより同期拍動が可能であることを示した(図2B, C)¹⁵⁾。さらに、離れた2カ所に培養されたNRVM領域をつなぐようにriPSC-CMを培養すると、数日後には2つのNRVM領域がriPSC-CM

領域を介して同期拍動するようになり(図 2D, E)¹⁵⁾, riPSC-CM 領域の興奮伝播様式は緩徐伝導および活動電位持続時間の延長を示した(図 2F~K)¹⁵⁾. さらに, 多電極培養アレイを用いて riPSC-CM 領域の電気生理学的特性を詳細に検討したところ, NRVM 領域に比して興奮伝導時間の延長および不応期の延長を示した(図 3A~E)¹⁵⁾.

これらの細胞治療が臨床応用される際に問題となる点もいくつか存在する. 1つは移植片の生着率や, 拒絶反応の問題である. 拒絶反応に関しては, HLA 型を合わせることで生じにくくすることが可能であり, iPS 細胞では京都大学を中心に iPS バンクプロジェクトが進行中である. もう一つの問題点は, デリバリーの問題である. 房室伝導の修復を考える際に, 開胸して心房心室を架橋するための移植等を行うのはあまりにも侵襲が大きい. そこで, NOGA カテーテルなど, 局所電位を記録しながらその先端から移植片を注入することができるカテーテルを使用し, 可能な限り低侵襲でのデリバリーを検討する必要がある. さらに, 伝導障害領域の正確なマッピング方法や注入領域の選定, 伝導修復に必要な細胞量についての検討も必要となり, 今後の検討が待たれる.

Ⅲ. おわりに

幹細胞由来心筋細胞を用いた徐脈性不整脈に対する再生治療は, いまだ発展途上である. 今回われわれは, 房室伝導障害プラットフォームを構築し, 同種幹細胞由来心筋細胞を用いてその伝導修復の可能性を提示し, またその基礎的検討を行った. 今後, 大型動物を用いた *in vivo* 移植やヒト iPS を用いた検証などが望まれる.

謝辞

本研究に協力してくださったすべての共同研究者および関係者の皆様に心から感謝申し上げます.

利益相反

本研究には, アルファメッドサイエンティフィック株式会社が共同研究企業として参画しました.

付記

本稿は第 23 回日本不整脈心電学会学術奨励賞最優秀賞を受賞した論文をもとに総説としてまとめたものである. 図 2 および図 3 については, 受賞論文より引用改変させていただいた.

受賞論文

Yoshida A, Lee J-K, Tomoyama S, Miwa K, Shirakawa K, Hamanaka S, Yamaguchi T, Nakauchi H, Miyagawa S, Sawa Y, Komuro I, Sakata Y : *In vitro* platform of allogeneic stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for cardiac conduction defects. *Europace*, 20 : 2018 ; 1553-1560

【文 献】

- 1) Wilkoff BL, Cook JR, Epstein AE, et al. : Dual-chamber pacing or ventricular backup pacing in patients with an implantable defibrillator : the Dual Chamber and VVI Implantable Defibrillator (DAVID) Trial. *JAMA*, 2002 ; 288 : 3115-3123
- 2) Edelberg JM, Aird WC, Rosenberg RD : Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest*, 1998 ; 101 : 337-343(<https://doi.org/10.1172/JCI1330>)
- 3) Miake J, Marbán E, Nuss HB : Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature*, 2002 ; 419 : 132-133. (<https://doi.org/10.1038/419132b>)
- 4) Qu J, Plotnikov AN, Danilo P, et al. : Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation*, 2003 ; 107 : 1106-1109(<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000059939.97249.2c>)
- 5) Kapoor N, Liang W, Marbán E, et al. : Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nat Biotechnol*, 2013 ; 31 : 54-62 (<https://doi.org/10.1038/nbt.2465>)
- 6) Dawkins JF, Hu Y-F, Valle J, et al. : Antegrade Conduction Rescues Right Ventricular Pacing-Induced Cardiomyopathy in Complete Heart Block. *J Am Coll*

- Cardiol, 2019 ; 73 : 1673-1687(<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.086>)
- 7) Ruhparwar A, Tebbenjohanns J, Niehaus M, et al. : Transplanted fetal cardiomyocytes as cardiac pacemaker. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002 ; 21 : 853-857 ([https://doi.org/10.1016/s1010-7940\(02\)00066-0](https://doi.org/10.1016/s1010-7940(02)00066-0))
 - 8) Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. : Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004 ; 22 : 1282-1289 (<https://doi.org/10.1038/nbt1014>)
 - 9) Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, et al. : Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes : Insights Into Molecular, Cellular, and Functional Phenotypes. *Circ Res*, 2015 ; 117 : 80-88 (<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365>)
 - 10) Burridge PW, Keller G, Gold JD, et al. : Production of de novo cardiomyocytes : human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2012 ; 10 : 16-28 (<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.013>)
 - 11) Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, et al. : Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat Biotechnol*, 2017 ; 35 : 56-68 (<https://doi.org/10.1038/nbt.3745>)
 - 12) Beeres SLMA, Atsma DE, van der Laarse A, et al. : Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol*, 2005 ; 46 : 1943-1952 (<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.07.055>)
 - 13) Cingolani E, Ionta V, Cheng K, et al. : Engineered electrical conduction tract restores conduction in complete heart block : from in vitro to in vivo proof of concept. *J Am Coll Cardiol*, 2014 ; 64 : 2575-2585 (<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.09.056>)
 - 14) Takahashi T, Nagai T, Kanda M, et al. : Regeneration of the Cardiac Conduction System by Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Circ J*, 2015 ; 79 : 2703-2712 (<https://doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0400>)
 - 15) Yoshida A, Lee J-K, Tomoyama S, et al. : In vitro platform of allogeneic stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for cardiac conduction defects. *Europace*, 2018 ; 20 : 1553-1560 (<https://doi.org/10.1093/europace/eux379>)

Current Gene and Cell Therapy for Bradyarrhythmias

¹Akira Yoshida, ²Jong-Kook LEE

¹Department of Cardiovascular Medicine, Higashiosaka City Medical Center,

²Department of Cardiovascular Regenerative Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine

The gold standard treatment for bradyarrhythmia is the implantation of an artificial permanent pacemaker. However, complications such as infection and exacerbation of heart failure due to unphysiological pacing can occur, so the development of novel therapeutic strategies for bradyarrhythmias has been warranted. Research on gene therapy and cell therapy for bradyarrhythmia is ongoing. The methods to increase the automaticity of the working myocardium by regulating ion channels and transforming cells into those with pacemaker function, and to produce ectopic excitation comparable to junctional rhythm by transplanting stem cell-derived beating cells into the left ventricle have been reported. While the development of biopacemakers is advancing, there are few reports to date on the repair of atrioventricular conduction defects caused by atrioventricular block, and there is no established electrophysiological characterization of such defects. We therefore established an *in vitro* cell transplantation evaluation platform using iPS cell-derived cardiomyocytes derived from the same animal species as the living myocytes and explored the possibility of regenerative therapy for cardiac conduction defects. Here we report the results of our study and a review of the literature regarding previously reported gene and cell therapies for bradyarrhythmias.

Keywords : Stem cell therapy, Atrioventricular block, Induced pluripotent stem cell, Allogeneic transplantation