

光遺伝学を用いた心室細動誘発におけるプルキンエ線維網-心筋接合部の役割の解明

渡邊昌也

北海道大学病院 循環器内科

【研究の背景】

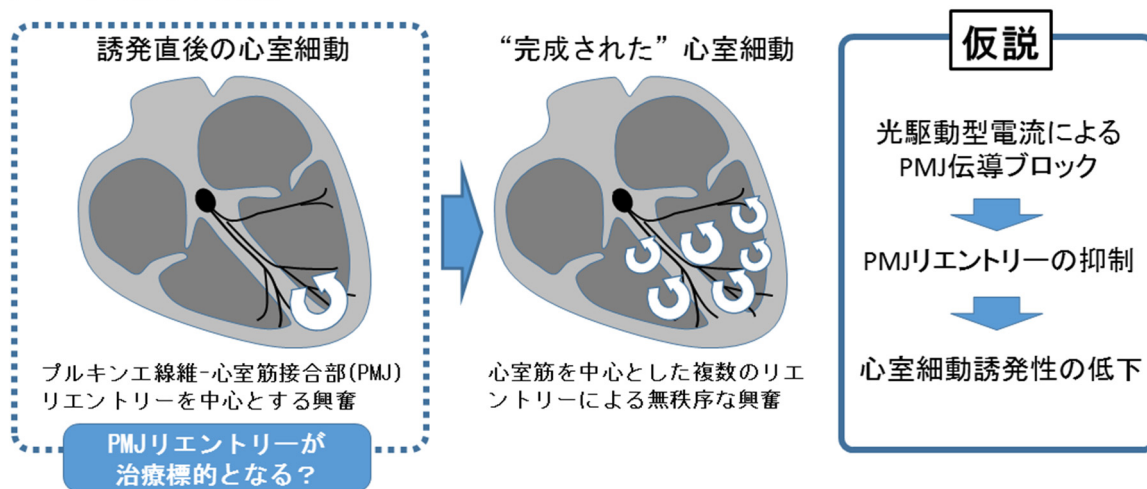
プルキンエ線維は刺激伝導系の末梢にあり、多数に分枝した後、心室筋へと連続する。電気生理学的特性が異なるプルキンエ線維と心室筋との接合部では、伝導性の変化による局所的な伝導遅延が生じうるため、リエントリーを機序とする不整脈の基質となる。

我々は、肥大型心筋症における心室細動の発生時、トリガーとなる期外収縮から心室細動へ移行する心内電位を初めて記録し、プルキンエ線維-心筋接合部(Purkinje-myocardial junction; PMJ)での伝導遅延とリエントリー様の興奮を認め、プルキンエ線維末梢を標的とした心筋焼灼によって心室細動ストームを抑制した¹⁾。虚血性心筋症を背景とした心室細動や特発性心室細動に対しても、プルキンエ線維網への心筋焼灼の有効性が報告されており^{2, 3)}、心室細動の誘発直後にはPMJでの伝導遅延に依存したリエントリーが興奮全体の中心であると推察され、PMJの電氣的修飾により心室細動を治療できる可能性がある(図1)。

電極を用いた従来の方法では、複雑なプルキンエ線維網を選択的に修飾することは困難であった。光遺伝学はベクターによる遺伝子導入やトランスジェニック動物を用いて目的細胞に光駆動型チャネルであるチャネルロドプシンを発現させ、光を当てることでイオンの流入・流出による細胞膜電位の変化を起こし、目的細胞の生理現象を制御する新しい技術である⁴⁾。特異的なプロモータを用いることで細胞選択的に生理現象を修飾することが可能であり、光遺伝学の応用によりプルキンエ線維網の電気生理現象を選択的に制御することができる(図2)。

我々はラットの心筋スライスモデルにおいて、光駆動性チャネルの刺激によるリエントリー不整脈の停止を観察しており⁵⁾、本研究では、光遺伝学の手法により「末梢プルキンエ線維網での伝導ブロックがPMJリエントリーを抑制し、心室細動の誘発を抑制できる」という仮説の検証を行うこととした(図1)。

図1. 本研究の仮説



【目 的】

本研究の目的は、チャネルロドプシン 2 (ChR2) をプルキンエ線維に発現するトランスジェニック (Tg) マウスの還流心を用い、光駆動型電流による伝導ブロックが PMJ リエントリーを抑制し、心室細動の誘発性を低下させることを明らかにすることである。

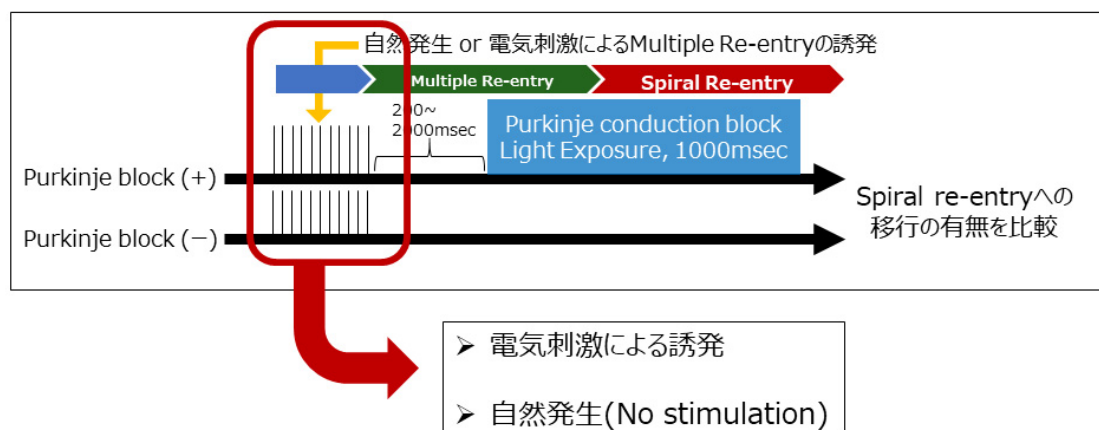
【方 法】

モデル動物: Cre-loxP 部位特異的組換えシステムを利用し、プルキンエ線維選択的にチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現する Tg マウスを作製する。具体的には、CAG プロモータと ChR2 遺伝子の間に loxP-stop-loxP 配列が挿入されたトランスジーンを有するマウスと、プルキンエ線維特異的なコネキシン 40 プロモータの制御下で Cre を発現するマウスの交配により目的のマウスを得る。

光照射装置、光学マッピング装置: マウス摘出心をランゲンドルフ装置にて逆行性還流する。光照射には ChR2 の刺激波長 (470nm) を持つマイクロ LED チップが組み込まれたプローブを使用する。出力装置により照射範囲、照射時間、照度を制御する。膜電位感受性色素には励起波長 620nm の di-4-ANBDQPQ を用い、光学マッピングを行う。単一コンピュータでの制御により、光照射と光学マッピング記録は同期して行うことができる。撮像後、解析ソフトを用い、活動電位持続時間、伝導速度、頻拍周期の変化などの電気生理パラメータ、および、興奮伝播様式の変化を評価する。

下記の具体的な実験により、PMJ リエントリーと心室細動との関連について検討する。

- I. 光ペーシング効果の検討
10ms の短時間、光を照射し、光駆動型陽イオン電流によるペーシング効果について、①刺激閾値 (光の強さ)、②洞調律時との興奮伝播様式、心室の興奮伝播時間 (心電図での QRS 持続時間に相当) の違いを検討する。
- II. 光駆動型陽イオン電流による伝導遅延、伝導ブロックの確認
洞調律下に、長時間の光照射を行い、光学マッピングにより照射中の興奮伝播の変化を確認する。照射光の強さを徐々に強め、膜電位の上昇によって起こる電位依存性ナトリウムチャネルの不活性化により、照射領域に伝導遅延、伝導ブロックが生じることを確認する。
- III. 光照射がプログラム刺激による心室細動誘発性へ与える影響の検討
プログラム刺激によって心室細動が誘発し、左房経由で左室内に挿入した LED プローブを用い、長時間照射を行い、PMJ に伝導ブロックを創出する。光学マッピングを行い、光照射を行わない撮像との比較により、照射による心室細動の持続時間、誘発性への影響を検証する。



【結 果】

CAG プロモータと ChR2 遺伝子の間に loxP-stop-loxP 配列が挿入されたトランスジーンを有するマウスと、プルキンエ線維特異的なコネキシン 40 プロモータの制御下で Cre を発現するマウスの交配によって得られたマウスにて、心房筋、心室中隔の刺激伝導系における ChR2-td-Tomato の発現を確認した(図 3)。

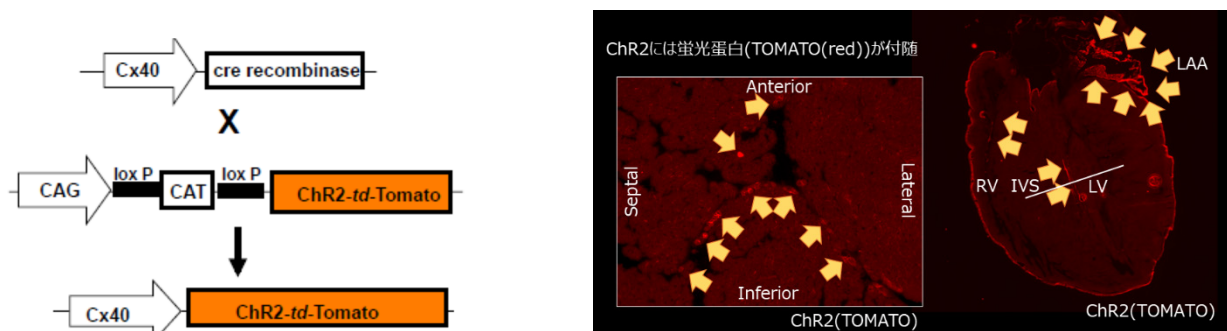


図3.(左) Cre-lox 発現制御系を活用し、Cx40発現細胞特異的なChannel rhodopsinの発現制御。(右) ChR2-td-Tomatoの発現。心房組織、および、右室、左室内膜側に分布する Purkinje繊維での発現が認められる(青矢印)。

マウスの摘出還流心において心腔内に挿入した LED 光源から刺激を行い、ペーシング効果を検討した。図 4 に示すように、自己心拍とは異なる心電図波形が記録され、光ペーシングが確認された。また、ペーシング中の心室興奮伝搬様式は、右室ペーシングに比較して心室全体への伝搬時間は短縮し、かつ、洞調律とも伝搬様式が異なることから、刺激伝導系を補足した伝搬に矛盾しないと思われた。

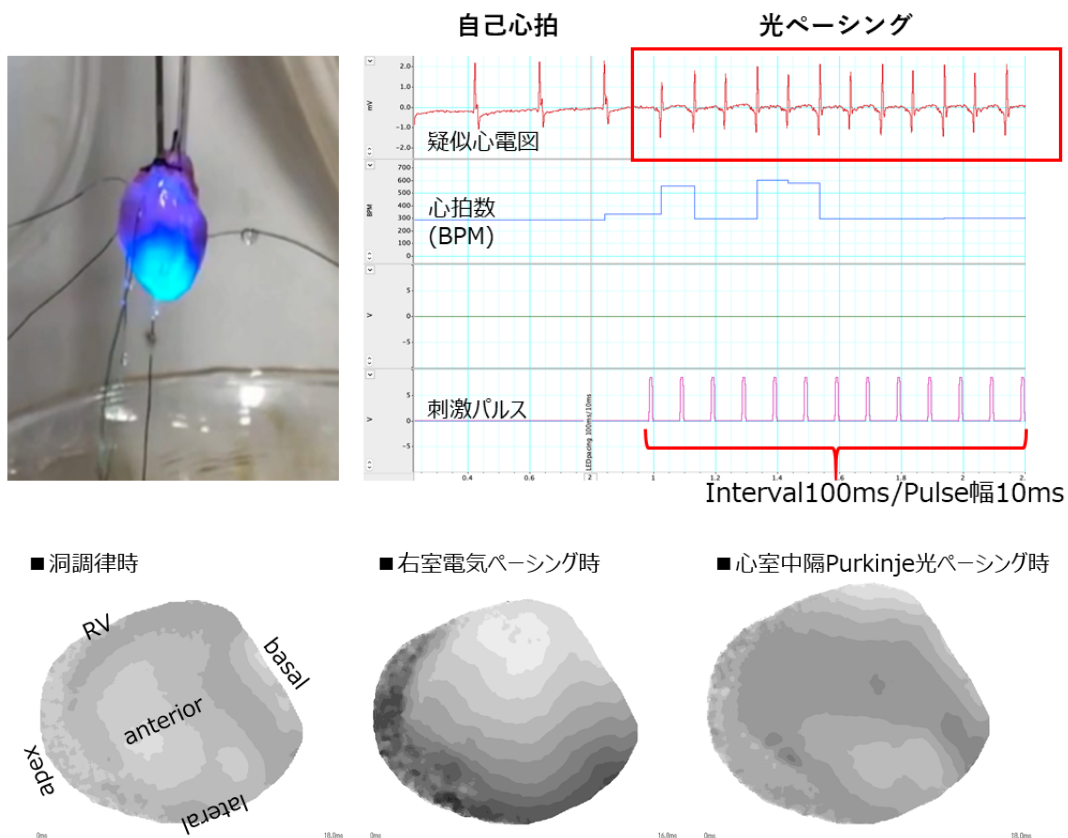


図 4. (上) 光刺激によるペーシング効果。左室内腔に挿入した青色 LED 光源からの刺激(刺激間隔 100ms)が心室を補足している。(下) 光ペーシング中の興奮伝搬様式の評価。右の Purkinje 光ペーシング中の興奮伝搬は、右室電気ペーシングと比べて速やかに興奮伝搬しているが、洞調律とは異なる興奮様式を示す。

次に、心内腔から LED 光刺激を行い、Purkinje 繊維の伝導ブロックを試みた(図 5)。ペーシング効果は得られるものの、伝導ブロックは確認できなかった。

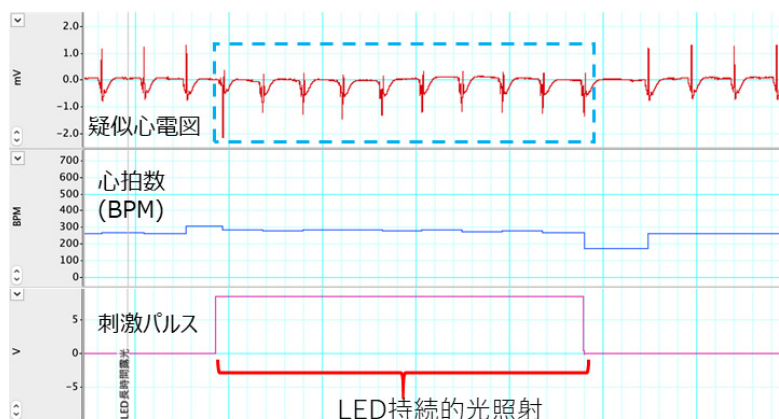


図 5. 自己心拍中に持続的光照射を行い、伝導ブロックの誘発を試みた。ペーシング効果によって波形の異なる興奮が確認されたが、伝導ブロックは確認されなかった。

【考 察】

Channel rhodopsin の刺激によって内向き電流を持続的に生じさせ、電位依存性ナトリウム電流の不活性化による伝導ブロックが誘発されることを期待していたが、予想に反する結果であった。

現在、光刺激によって水素イオンを細胞外に放出し、細胞膜の過分極を生じさせるチャネルロドプシンである Archaelhodopsin⁶⁾を発現させるトランスジェニックマウスの作成を行っている(図 6)。マウスにおいて、伝導ブロックが誘発されることを確認した後、心室細動中の不整脈停止効果の検討(実験 III)を行う予定でいる。

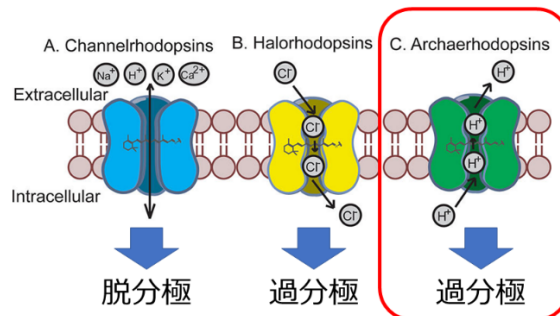


図 6.光遺伝学で使用可能な種々のチャネルロドプシン。水素イオンを排出し、細胞を過分極させる Archaelhodopsin を発現させるマウスの作成を行っている。Han X. et al. *ACS Chem Neurosci* 2012;3(8):577-584 から引用改変。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

光遺伝学は細胞選択的に電気生理現象を制御できる新しい技術であり、脳神経分野での研究ツールとして広く使われるようになってきた。心臓電気生理への応用は、ペーシング効果の検証から始まり、その後に不整脈の停止効果を検証されるに至っている。心室細動の発生機序は未だ十分に解明されていないが、その発症にプルキンエ線維が関与することを示す報告は散見される。光遺伝学の利点である、細胞選択的な電気生理現象の修飾を可能とすることにより、心室細動におけるプルキンエ線維の役割を解明することで、心室細動に対する有効な治療戦略に新たな展開が生まれることが期待される。

【謝 辞】

本研究に対し、公益財団法人 先進医薬研究振興財団よりご支援を賜りましたことを、深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Yokoshiki H, Mitsuyama H, Watanabe M, Mizukami K, Tsutsui H. Suppression of ventricular fibrillation by electrical modification of the Purkinje system in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Vessels*. 2014;29(5):709-17.
2. Haissaguerre M, Shah DC, Jais P, Shoda M, Kautzner J, Arentz T, et al. Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation. *Lancet*. 2002;359(9307):677-8.
3. Marrouche NF, Verma A, Wazni O, Schweikert R, Martin DO, Saliba W, et al. Mode of initiation and ablation of ventricular fibrillation storms in patients with ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(9):1715-20.
4. Miller G. Optogenetics. Shining new light on neural circuits. *Science*. 2006;314(5806):1674-6.
5. Watanabe M, Feola I, Majumder R, Jangsangthong W, Teplenin AS, Ypey DL, et al. Optogenetic manipulation of anatomical re-entry by light-guided generation of a reversible local conduction block. *Cardiovasc Res*. 2017;113(3):354-66.
6. Han X. In vivo application of optogenetics for neural circuit analysis. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(8):577-84.