甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入による心臓電気特性の制御

李 鍾国*

CASTやSWORDなどの大規模臨床試験の結果、致死的心室性不整脈の治療においては、除細動器の植込みを除き、現時点で有効な治療法がなく、新たな治療法の開発が望まれている。抗不整脈薬の中で、唯一生命予後改善効果を示したアミオダロンは、その心臓選択的な甲状腺ホルモン作用の抑制により、抗不整脈作用をもたらしている可能性がある。筆者らは、甲状腺ホルモン受容体のドミナントネガティブ変異体遺伝子をアデノウイルスにより心筋に導入し、心臓電気特性の制御を試みた。その結果、甲状腺ホルモン受容体遺伝子の心筋への導入は、抗不整脈リモデリングをもたらすための新しいアプローチとなりうることが示唆された。

(心電図, 2002 ; 22 : 578 ~ 583)

I. 背景

不整脈の薬物治療はCAST, SWORDをはじめとする大規模臨床試験の結果、Naチャンネル抑制を主作用とする薬物や純粋なKチャンネル抑制薬が必ずしも心筋梗塞や心不全に伴う不整脈患者の生命予後を改善しないことが明らかにされ、不整脈臨床の場に大きな混乱を招いた^{1), 2)}。その結果、現時点ではアミオダロンのみが器質的心疾患を有する不整脈患者

の生命予後を改善しうる薬物とされ大きな関心を集めているが³⁾、その重篤な副作用や催不整脈作用などが問題となっている。その結果、致死的心室性不整脈の治療は、今のところ除細動器の植込みを除き、有効な治療法がなく、新たな治療法の開発が求められている。

アミオダロンは抗不整脈薬のVaughan Williamsの分類上Ⅲ群薬、すなわちKチャンネルブロックを主体とする薬剤に分類されている。しかしながら、アミオダロンにはそれぞれ1分子に2つのヨードが含まれており、その化学構造は甲状腺ホルモン(トリヨードサイロニン: T₃)に類似していること(図1)、また、アミオダロン長期投与時に生ずる心筋電気特性の変化は、甲状腺機能低下の際に起きる変化と似ていることなどから、アミオダロン長期投与時の心

Keywords

- 甲状腺ホルモン受容体
- アデノウイルス
- 致死的心室性不整脈
- 遺伝子治療

*名古屋大学環境医学研究所循環器分野
(〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

Modulation of electrical properties by gene transfer of thyroid hormone receptors

Jong-Kook LEE

臓作用の一部が甲状腺ホルモンを介する作用であるとする仮説が提唱されている⁴⁾。アミオダロンが T_3 の作用を妨げる仕組みについては、① T_4 から T_3 への転換の阻害、② T_3 または T_4 の細胞内取りこみ抑制、③核内 T_3 受容体(TR)への T_3 結合阻害、などが考えられている⁴⁾。

本研究において、筆者らは上記③のTRレベルで甲状腺ホルモン作用を抑制することにより、アミオダロンと類似の効果が得られると仮定し、動物実験による検討を行った。この目的のために、甲状腺ホ

ルモン不応症(RTH: Resistance to thyroid hormone)患者で同定された、 T_3 への感受性が著しく低下したTR(β 1サブタイプ)のドミナントネガティブ突然変異体(TRG345R)遺伝子⁵⁾(図2参照)を、アデノウイルスをベクターとして心筋細胞内に導入し、甲状腺ホルモン作用を介した甲状腺ホルモン応答遺伝子の転写—すなわち甲状腺ホルモンの“genomic action”—を心臓選択的に抑制することを試み、その心臓電気特性に対する効果を調べた。

II. 方 法

1. *In vitro* 実験

野生型TRおよびTRG345Rを組み込んだアデノウイルス(AdTRwt, AdTRG345R)を作成し⁶⁾、新生ラット培養心室筋細胞にTR遺伝子(野生型およびG345R)を導入して(以下各々W群・G群)、96～120時間後にパッチクランプ法を用いて、活動電位および一過性外向き K^+ 電流(I_{to})を記録し、アデノウイルスベクターのみ(empty adenovirus)を添加したグループ(C群)と比較した。C・W・G群には甲状腺ホルモン(T_3 : 100nM)を培養液中に加えた。また、アデノウイルスベクターのみを添加した後、 T_3 を添加せずに培養し、hypothyroid状態で培養した群を

Tri-iodothyronine (T_3)

Amiodarone

図1 甲状腺とアミオダロンの構造

図2 甲状腺ホルモン受容体を介する遺伝子転写調節

図3 実験プロトコール

H群とした。

2. *In vivo* 実験

Methimazole を4週間投与して甲状腺機能低下状態としたラットに *in vivo* 遺伝子導入を行い、TR 遺伝子導入の効果を調べた(図3)。 *In vivo* 遺伝子導入は、麻酔・開胸後、左室心尖部経路で大動脈にカテーテルを挿入、大動脈・肺動脈をクランプした状態でアデノウイルス含有液を注入して行った⁷⁾。野生型TR、TRG345Rを注入したグループ(W群およびG群)、アデノウイルスベクターのみを投与した対照群(C群)と比較した。G群、C群には遺伝子導入後毎日T4を腹腔内投与し、血中甲状腺ホルモン値を増加させた。また、アデノウイルスベクターのみを投与した後、T4を投与しなかった甲状腺機能低下群(H群)とも比較した。10日目に体表面心電図を記録し、RR、QRS、QTをアデノウイルスベクターのみを投与した対照群と比較した。さらに、心室性頻脈性不整脈に対する効果を調べるために、心室頻拍誘発試験を行った。心室頻拍は、右室流出路に白金双極電極を装着し、100msec 間隔の基礎刺激(S1)20拍を与えた後、1拍(S1-S2)または2拍(S1-S2-S3)の期外刺激を与えて誘発を行った。5拍以上の non-driven beats を心室頻拍とし、5拍以上15拍未満を非持続性心室頻拍、15拍以上を持続性心室頻拍と定義した。遺伝子導入10日目にC群およびG群のラットの心臓にプログラム刺激を与え、心室頻拍誘発試

験を行った(図3)。

Ⅲ. 結 果

1. *In vitro* 実験

細胞電気生理実験に先立ち、GFP 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを培養心室筋細胞に添加したところ、ほとんどの細胞で緑色蛍光が観察され、アデノウイルスを用いて高効率に遺伝子導入しうることが示された。TR 遺伝子導入後96～120時間後に施行したパッチクランプ実験では、野生型TR 遺伝子を導入したW群では対照群(C群)と比較し活動電位が20%短縮し(APD_{90} at 1Hz, $n=5$, $p<0.05$), I_{to} 密度は35%増加した(at +60mV, $n=8$, $p<0.05$) (図4, 5)。一方、TRG345R 導入群(G群)ではC群に比べ、活動電位持続時間(APD)が38%延長し(APD_{90} at 1Hz, $n=6$, $p<0.05$)、G群の I_{to} 密度はC群に比し59%減少していた(at +60mV, $n=10$, $p<0.05$) (図4, 5)。また、H群はG群と同様の傾向を示した。

2. *In vivo* 実験

In vivo における、遺伝子導入効果を調べるために、 β -galactosidase のcDNAを組み込んだAdLacZを用い、遺伝子導入10日目にX-galにより組織染色を行ったところ、心筋細胞の約40%で比較的均一な発現がみられた。次にTR 遺伝子導入後10日目に、全身麻酔下に体表面心電図(Ⅱ誘導)を記録し、RR 間隔、

図4 甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入の活動電位波形に対する効果

図5 甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入の一過性外向き電流 (I_{to}) 密度に対する効果

図6 甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入による心電図パラメータの変化

QT時間の各心電図パラメータをアデノウイルスベクターのみを投与したC群と比較した。W群においてはRR, QTがC群に比し、それぞれ18%, 14%短縮していた($n = 8$, $p < 0.05$) (図6)。一方, G群においてはRR, QTの各パラメータはC群に比し、それぞれ18%, 22%延長していた($n = 8$, $p < 0.05$) (図6)。H群のパラメータも, RR, QT時間がそれぞれ67%, 48%延長していた($n = 8$, $p < 0.05$) (図6)。次に, これらの心筋電気特性の変化が心室頻拍誘発に対する効果を調べた。C群においては8例中全例で持続性心室頻拍が誘発された。一方, G群のラットでは持続性心室頻拍は8例中2例, 非持続性心室頻拍は8例中3例で誘発されたのみであった。心室頻拍のパラメータでは, 心室頻拍持続時間がC群で13.9secであったのに対し, G群は1.5secと著明に短縮していた($n = 8$, $p < 0.05$)。また, 心室頻拍中の

興奮周期はG群で有意に延長していた。

IV. 考 察

本研究においては, アデノウイルスを用いた心筋への甲状腺ホルモン受容体のドミナントネガティブ変異体遺伝子(TRG345R)の導入は, 心臓に抗不整脈リモデリングをもたらすことが示された。甲状腺ホルモンは心筋のイオントランスポーター, β アドレナリン受容体, 収縮蛋白などの発現に関わっていることが報告されており, TRG345R 遺伝子導入によりもたらされた心筋における甲状腺ホルモン作用の抑制が, これら蛋白の遺伝子発現に影響を与えたことも主要なメカニズムのひとつと考えられる。

不整脈治療の分野においては, 遺伝子導入の試みは今のところ極めて限られている。その理由としては, 1) 不整脈の発生には複雑なメカニズムが関わっ

ており、イオンチャネルなどの単一の遺伝子導入での治療が困難であると考えられること、2)心臓に均一に遺伝子導入を行うことが現在臨床で応用可能な技術では困難であること、などがあげられる。今後さらなる、不整脈の病態メカニズムの解明を行うとともに、ウイルスベクターの改良などによる遺伝子導入効果の飛躍的な改善や遺伝子導入効果が長期間安定して得られるようになれば、遺伝子治療も致死的心室性不整脈に対する治療法のひとつとなりうると筆者らは考える。

V. 結 論

甲状腺ホルモン受容体遺伝子を心臓に導入することにより、心臓電気特性の修飾が可能であり、そのドミナントネガティブ変異体遺伝子導入による“cardio-selective hypothyroidism”は、心臓に抗不整脈リモデリングをもたらす新しいアプローチとなりうることが示された。

〔文 献〕

- 1) The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators : Preliminary report : Effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1989 ; 321 : 406 ~ 412
- 2) Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP : Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. *Survival With Oral d-Sotalol*. *Lancet*, 1996 ; 348 : 7 ~ 12
- 3) Julian DG, Camm AJ, Frangin G, Janse MJ, Munoz A, Schwartz PJ, Simon P : Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction : EMIAT. *European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators*. *Lancet*, 1997 ; 349 : 667 ~ 674
- 4) Kodama I, Kamiya K, Toyama J : Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res*, 1997 ; 35 : 13 ~ 29
- 5) Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ : The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev*, 1993 ; 14 : 348 ~ 399
- 6) Hayashi Y, Mangoura D, Refetoff S : A mouse model of resistance to thyroid hormone produced by somatic gene transfer of a mutant thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*, 1996 ; 10 : 100 ~ 106
- 7) Hajjar RJ, Schmidt U, Matsui T, Guerrero JL, Lee KH, Gwathmey JK, Dec GW, Semigran MJ, Rosenzweig A : Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 ; 95 : 5251 ~ 5256