

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790513

研究課題名（和文）肺動脈性肺高血圧症における Toll like receptor の役割について

研究課題名（英文）Innate immunity in pathophysiology of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

二藤部 丈司 (NITOBE JOJI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30400542

研究成果の概要：

肺動脈性肺高血圧症の病態に炎症および免疫反応が関連していると予測し、Toll like receptor-2 ノックアウトマウスに対してモノクロタリンを投与して肺高血圧モデルを作成し、肺高血圧の程度、炎症性サイトカインの変化について組織学的検討および分子機序を検討した。Toll like receptor がその病態に関与していることが判明すれば、肺高血圧症の新たな治療のターゲットになると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：肺高血圧症、自然免疫、Toll like receptor

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺動脈性肺高血圧 (PAH) は極めて予後不良の疾患である。その病因、病態の詳細はいまだ不明な点が多く、治療法は数種の血管拡張剤があるだけで、根治治療は現時点では存在しない。これまでの報告では、PAH 患者の血中の IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインが上昇していること、PAH の組織学的特徴である肺小動脈における plexiform lesion には炎症細胞の浸潤が観察されること、PAH 患者の肺動脈組織において、アポトーシス抑制因子の発現の低下による血管内皮の細胞増殖が plexiform lesion を形成しているという報告などから、膠原病性肺高血圧や一部の原発性肺高血圧症の発症・進展機序には、免疫異常が関与している可能性が推察できる。実際、日常診療においても明らかな感染症所見がない状態で、血液中 CRP 値が上昇している症例や、ステロイド剤や免疫抑制剤の投与によって血行動態の改善や心不全の軽快する症例を経験することがある。

一方、Toll like receptor (TLR) は病原体の菌体成分を特異的に認識し、炎症性サイトカインなどの自然免疫系の活性化し、感染防御に関与している。これまで、PAH 患者の単球における TLR-4 発現が上昇しているという報告がある。また、TLR は単球のみならず、マクロファージや血管内皮細胞にも多く発現している。

以上のことから、TLR は PAH の病態に深く関わっている重要な因子である可能性が高い。しかし、これまで TLR と肺動脈性肺高血圧との検討はほとんどなされていない。TLR

が PAH の病態に関与していることが判明すれば、TLR を介する新たな治療薬の開発を期待できると考えられる。

## 2. 研究の目的

TLR-2 ノックアウトマウスに対してモノクロタリンを投与して肺高血圧モデルを作成する。肺高血圧の程度などの血行動態の評価、および、肺組織中の単球、マクロファージの浸潤程度、TNF などの炎症性サイトカインの発現について蛋白レベルでの観察し、その分子機序について検討を行なうこと。

## 3. 研究の方法

(1) 生後 4 週目の TLR-2 ノックアウトマウス、wild type の雄マウスに、週 1 回モノクロタリン (600mg/kg/week) を皮下注する。8 週後に肺高血圧の程度を検討するために、ペントバルビタールを腹腔内投与にて麻酔、人口呼吸管理をおこなったうえで開胸し、Micro-Tip カテーテルを用いて右室内圧を測定する。その他大動脈圧、心拍数を測定したのち、心臓、肺を摘出し、右室、左室重量を測定し、wild type と TLR-2 ノックアウトマウス間の肺高血圧の程度の差異、および右室肥大の相違の有無を検討する。

(2) 1,2,3 週間後の状態において、ペントバルビタール腹腔内投与と下で気管内挿管を行い、まず、肺胞洗浄液から肺胞マク

ロファージを回収する。心室より血液を回収した後、肺をパラホルムアルデヒドにて固定し肺組織において、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、PAH に特徴的である肺小動脈における plexiform lesion の出現の差異について検討する。それ以外に、血管内皮の増殖程度、単球やマクロファージの浸潤程度、TLR-4 の発現や発現部位について経時的変化を検討する。

- (3) このモデルにおいて、炎症反応が生体で生じているのかを検討するために、炎症性サイトカインとして、tumor necrosis factor- $\alpha$  , interleukin-1 $\beta$  , interleukin-6、ケモカインとして monocyte chemoattractant protein-1 の血中濃度を ELISA 法にて測定する。また、上記で変化のみられた因子について、肺組織での蛋白発現を免疫染色にて検討する。

#### 4 . 研究成果

今回、TLR-2 ノックアウトマウスを用いて、肺高血圧モデルを作成することを試みた。モノクロータリンを腹腔内へ投与したのち、8 週後に右室へ Micro-Tip カテーテルを穿刺し右室内圧を測定した。しかし、右室圧は wild type においても有意な肺高血圧の上昇の所見が認められなかった。一方、TLR-2 ノックアウトマウスにおいても、肺動脈圧の変化が得られなかった。

モデル作成については、モノクロータリンの投与量の検討も必要であると考えられるが、今後は肺高血圧の異なるモデルとして、低酸素（10%酸素）による肺高血圧モデルの作成も試みることにし、作成された肺高血圧モデルにおける肺動脈の組織学的な検討、炎症マーカーなどの生化学的な検討を加えていく予定である。

炎症性サイトカインは、自然免疫系を活性化し、感染防御に参与している。一方、PAH 患者の単球における TLR-4 発現が上昇していることが報告され、また、TLR は酸化ストレスに対しても応答し、組織の炎症やアポトーシスに参与しているという報告もある。TLR は単球のみならず、マクロファージや血管内皮細胞にも多く発現しているため、血管病としての PAH の病態に TLR が関与している可能性は高い。TLR を介した炎症反応がその病態に参与していることが、判明すれば、従来の血管拡張剤に加えて、新たな治療ターゲットとして新薬の開発が期待できる。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Ishino M, Takeishi Y, Nitobe J, Kubota I et al: Risk stratification of chronic heart failure patients by multiple biomarkers: implications of BNP, H-FABP, and PTX3. *Circ J.* 2008 Nov; 72(11): 1800-1805 (査読有り)

Niizeki T, Takeishi Y, Nitobe J, Kubota I et al: Relation of serum heart shock

protein 60 level to severity and prognosis in chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol. 2008 Sep; 102 (5): 606-610 (査読有り)  
Niizeki T, Takeishi Y, Nitobe J, Kubota I et al: Persistently increased serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein predicts adverse clinical outcomes in patients with chronic heart failure. Circ J. 2008 Jan; 72 (1): 109-114(査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

Iwayama T, Nitobe J, Kubota I et al: Epicardial fat assessed by multi-detector computed tomography (mdct) is a new risk factor of coronary artery disease in non-obese patients. American Heart Association Scientific Sessions 2008, Nov9-12 2008, New Orleans, USA

Ishino M, Takeishi Y, Shishido T, Watanabe T, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Nishiyama S, Kubota I: Multiple biomarkers approach for risk stratification in heart failure patients. American Heart Association Scientific Sessions 2008, New Orleans; Nov9-12 2008

Sasaki T, Takeishi Y, Nitobe J, Kubota I et al: High serum level of neopterin

is a risk factor of patients with heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2008, Nov9-12 2008, New Orleans, USA

〔図書〕(計1件)

二藤部丈司、久保田功、メディカルビュー社、Brugada 症候群、2009年、p144-147

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二藤部 丈司 (NITOBE JOJI)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号: 30400542

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし