

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590831

研究課題名（和文）動脈硬化疾患における単球膜上トールライクレセプター発現量の検討

研究課題名（英文）Toll-like receptor expression level on circulating monocyte in atherosclerotic disease

研究代表者

折原 弘治 (ORIHARA KOJI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：90457664

研究成果の概要（和文）：TLR2（トール様レセプター2）高値が、周知の危険因子（喫煙習慣、糖尿病、高血圧、高脂血症）とは独立して、動脈硬化形成の一つのリスクファクターとみなすことができるか否かの検討を行った。結果、動脈硬化性疾患群では、単球膜上TLR2レベルは、そのコントロール群に比べて、有意に高かった。更なる解析の結果、TLR2レベルはその他の危険因子とは独立しており、新たな動脈硬化危険因子の一つであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Toll-like receptors (TLRs) recognize pathogen-associated molecular patterns to initiate an innate immune response. We previously reported upregulation of TLR2 expression level on monocytes of stable angina pectoris patients with significant coronary artery disease (CAD) relative to control patients without significant CAD. In this study we aimed to determine whether high level of Toll-like receptor 2 (TLR2) is a risk factor for atherogenesis, independent of established risk factors including smoking, diabetes mellitus (DM), hypertension (HT), and hyperlipidemia (HL). TLR2 expression level on circulating monocyte surfaces was measured by using our developed flow cytometry assay. Patients were classified into two groups: "Arteriosclerotic disease" group (n=108) and "Control" group (n=70). Patients of the first group had arteriosclerotic disease such as CAD, aortic aneurysm, or peripheral arterial disease (PAD). The "Control" group was sex- and age-matched to the "Arteriosclerotic disease" group. The results demonstrated that TLR2 expression was significantly higher in the "Arteriosclerotic disease" group than in the "Control" group ( $p<0.001$ ). Multivariate ordinal logistic regression analysis was performed; other known risk factors, which were represented to two nominal score points, 0 or 1, for patients with and without it, respectively, and TLR2 level, which was treated as a metric variable. DM ( $p=0.002$ ), HT ( $p=0.001$ ), HL ( $p<0.001$ ), and TLR2 level ( $p<0.001$ ) were identified as significant contributors for arteriosclerotic disease. In conclusion, high TLR2 expression level on monocytes may be an independent risk factor for atherogenesis

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：循環器疾患分野

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：① 臨床、② 内科、③ 循環器・高血圧 ④ 感染症

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患に、感染症の関与が 1990 年代初めより示唆されてきたが (Valtonen VV Ann Med 1991; 23:539-534)、現在も、なお議論が続いている問題である。われわれの着目した点は、従来から行われている動脈プラーク巣における病原微生物の証明ではなく、それに対する生体の応答である。病原体は、もはや排除されたとしてもそれに類似する炎症 (免疫異常遷延化) が続いている患者が存在しているのではないかとの仮説に基づく。この病原体が排除されていても免疫異常応答が持続しているとする仮説においては、病原体あるいはその構成成分を見出そうとするアプローチは不可能である。動脈硬化性疾患患者で、病原体認識レセプターの一つである TLR2 が上昇していることを、われわれは、動脈硬化疾患において単球膜上 TLR2 発現量が高値にあることを明らかにしていた (Mizoguchi E et al. Coron Artery Dis 2007; 18:31-38) が、この TLR2 高値が動脈硬化疾患の独立した危険因子になっているか否か、不明であった。

### 2. 研究の目的

TLR2 高値が動脈硬化疾患の周知の危険因子 (糖尿病、高脂血症、高血圧症、喫煙習慣) とは独立したかたちで危険因子になっているかの否か、動脈硬化疾患患者の検体数を増やし、検討すること。

### 3. 研究の方法

従来、TLR2 に限らず、細胞 1 個あたりの細胞膜上レセプター量は、フローサイトメトリー機器を用いて、レセプター抗原特異的に結合する蛍光標識抗体で目的とする細胞の染色処理を施して後に、蛍光標識抗体が放つ光量を光電子増倍管による電流に変換することで、細胞一個あたりのレセプター量を数値化してきた。しかしながら、この場合、二つの原因に基づく数値結果の「ばらつき」は避けられない。(1) 蛍光標識抗体が抗原レセプターを認識する上で、抗体製品番号差間、抗体 Lot 差間における抗原-抗体結合能力の差。(2) 測定時毎の光電子増倍管の感度を含むフローサイトメトリー機器設定のばらつき。上記の問題を解決するために、フローサイトメーター機器を用いての測定系において、普遍的基準となる尺度を設け、細胞膜上の TLR2 の発現量を定量化する方法論を考案し、ばらつきの要因を排除できない前提の下、得られる測定数値にばらつきをみない測定系を確立していた。本研究は、上記フローサイトメトリー測定系を用いて、末梢血液中の単球 TLR2 の発現量の測定を行った。

### 4. 研究成果

動脈硬化性疾患群では、単球膜上に発現している TLR2 レベルは、そのコントロール群に比べて、有意に高かった (図 1、中央値 [25-75%]、5154 [4513-6109] vs. 4650 [3930-5129] sites/cell、 $p < 0.001$ )。また、過去に報告されている通り、われわれの研究においても、動脈硬化疾患群はコントロール群に比べて有意に高い CRP 値を有していることが示された (図 2、中央値 [25-75%]、0.12 [0.05-0.35] vs. 0.06 [0.02-0.11] mg/dl、 $p < 0.001$ )。しかし、図 3 で示されたように、TLR2 値と CRP 値の間に相関性は認められなかった ( $r = 0.054$ 、 $p = 0.57$ )。

更なる解析にて、TLR2 レベルはその他の危険因子 (糖尿病、高血圧症、高脂血症、喫煙習慣) とは独立していることが示された (動脈硬化群とコントロール群の二群から、それぞれの危険因子を有した患者を除外して TLR2 値を比較しても、二群間において TLR2 値の有意差を認めたことから、TLR2 値の独立性を証明した)。続いて、順序ロジスティック回帰分析を行った結果、TLR2 値は動脈硬化性疾患に対して有意に寄与している因子であることが示された。ロジスティック回帰式に従えば、仮に、糖尿病、高脂血症、高血圧症、喫煙習慣をもたない人がいたとして、この人の末梢単球膜上の TLR2 値が 8,000 site/cell を示せば、 $P$  は 0.72 と計算され、動脈硬化疾患を患う可能性が高いことが示される。結論として、単球膜上での TLR2 高値は、新たな動脈硬化危険因子の一つであることが示唆された。将来的には、動脈硬化進展の予防策として TLR2 発現量に介入する方向での新たな治療戦略も期待されるところとなる。

次に、末梢の単球膜上の TLR2 値はいかなる因子によって、その発現量が調節されているかの検討を目的として、*ex vivo* でのサイトカインによる末梢単球刺激実験を行った (表 1)。結果、Th1 サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  (生理的濃度範囲にて) が、TLR2 発現レベルを上昇させる作用をもち、Th2 サイトカインの IL-4、IL-5 がその発現量を半減させる能力を有することが示された。しかし、以前よりの報告で示されてきた INF- $\gamma$  によって、TLR2 発現量が変化することはなかった。この結果の違いは、従来の単球膜上の TLR2 抗原をとらえる方法が、抗 TLR2 抗体 (IgG2a) を使用していたために、単球膜上に存在する Fc $\gamma$  リセプターに抗体の Fc 部分を介して結合し、TLR2 分子に加えて CD64 などの Fc $\gamma$  リセプターを同時にカウントしていたためと推測される。この抗 TLR2 抗体が Fc $\gamma$  リセ

ターにトラップされてしまう欠点の解消を目的として、抗 TLR2 抗体 (IgG2a) に代わり、Fc 部分を取り除いた Fab 部分 (抗 TLR2 F(ab)2 抗体) を作成し、蛍光標識抗 TLR2 F(ab)2 抗体を使用して測定を行った。われわれのデータは、このように改良した測定系に基づいたものである。

図 1

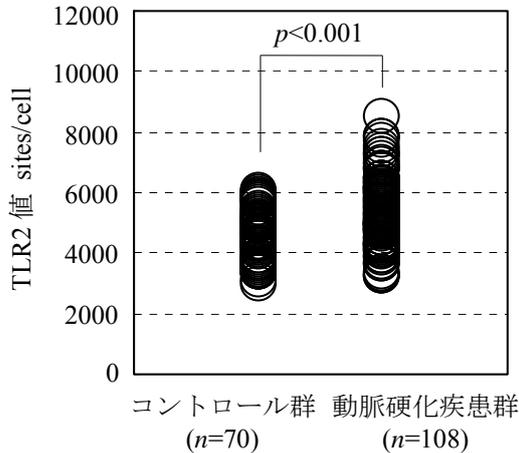


図 2

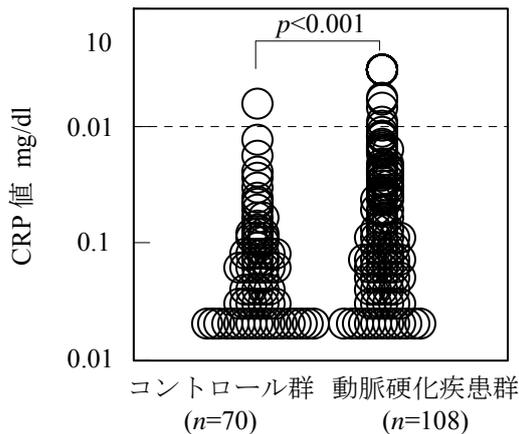


図 3

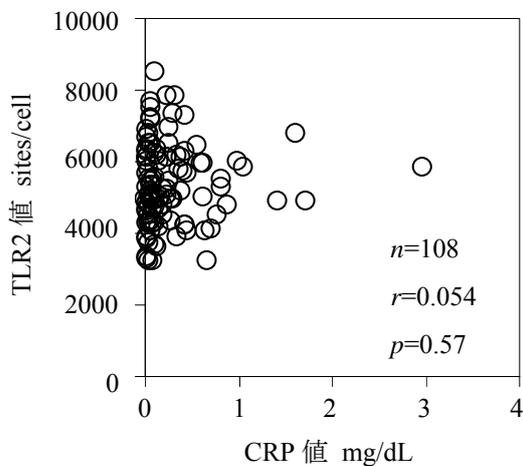


図 4

説明因子	オッズ比 (95%信頼区間)	ワルド	P値
TLR2値	1.001 (1.0004-1.0013)	12.32	<0.001
糖尿病	5.491 (1.862-16.19)	9.527	= 0.002
高血圧症	4.144 (1.770-9.706)	10.72	= 0.001
高脂血症	7.782 (3.139-19.30)	19.61	<0.001

計算式 (Logit)

$$\text{Log} \{P/(1-P)\}$$

$$= -5.645 + 1.703 \times \text{DM}(1/0) + 1.422 \times \text{HT}(1/0) + 2.052 \times \text{HL}(1/0) + 8.209 \times 10^{-4} \times \text{TLR2値}$$

DM(1/0): 糖尿病 (有/無)

HT(1/0): 高血圧症 (有/無)

HL(1/0): 高脂血症 (有/無)

$P$ : probability of arteriosclerotic diseases (動脈硬化疾患を有する確率)

$0 < P < 0.5$ : arteriosclerotic diseases (-) (動脈硬化疾患無し)

$0.5 < P < 1$ : arteriosclerotic diseases (+) (動脈硬化疾患有り)

ロジスティック回帰式

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(-5.645 + 1.703 \times \text{DM}(1/0) + 1.422 \times \text{HT}(1/0) + 2.052 \times \text{HL}(1/0) + 8.209 \times 10^{-4} \times \text{TLR2 level})}}$$

表 1

サイトカイン種	TNF- $\alpha$	INF- $\gamma$	IL-4	IL-5
TLR2	↑	→	↓	↓

↑: 発現量上昇

→: 発現量不変

↓: 発現量低下

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Reevaluation of quantitative flow cytometric analysis for TLR2 on monocytes using F(ab')<sub>2</sub> fragments of monoclonal antibodies. Oba R, Orihara K, Kumagai T, Hirai H,

Nagata K, Hamasaki S, Tei C, Masataka N. *Cytometry A*. 2011 Apr;79(4):247-55.  
(査読有り)

- (2) High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes is an important risk factor for arteriosclerotic disease. Kuwahata S, Fujita S, Orihara K, Hamasaki S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Ishida S, Kataoka T, Oketani N, Ichiki H, Iriki Y, Saihara K, Okui H, Ninomiya Y, Tei C. *Atherosclerosis*. 2010 Mar;209(1):248-54. Epub 2009 Aug 31.  
(査読有り)

- (3) The role of infection in the development of non-valvular atrial fibrillation: up-regulation of Toll-like receptor 2 expression levels on monocytes. Ichiki H, Orihara K, Hamasaki S, Ishida S, Oketani N, Iriki Y, Ninomiya Y, Okui H, Kuwahata S, Fujita S, Matsushita T, Yoshifuku S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Tei C. *J Cardiol*. 2009 Feb;53(1):127-35.  
(査読有り)

[学会発表] (計2件)

- (1) 日本循環器学会 2009年3月20日(大阪)  
Role of Infectious Inflammation for Atherogenesis: Toll-like Receptor 2 vs. C-reactive Protein. So Kuwahata, Shoji Fujita, Koji Orihara, Shuichi Hamasaki, Tetsuro Kataoka, Keishi Saihara, Sanemasa Ishida, Hitoshi Ichiki, Naoya Oketani, Yuichi Ninomiya, Hideki Okui, Ryutaro Oba, Hiroyuki Hirai, Kinya Nagata, and Chuwa Tei
- (2) 日本循環器学会 2009年3月20日(大阪)  
Biomarker to predict the AF recurrence after catheter ablation for non-valvular atrial fibrillation. Ichiki H, Orihara K, Ishida S, Oketani N, Iriki Y, Ninomiya Y, Okui H, Matsushita T, Fujita S, Kuwahata S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Hamasaki S, Tei C.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

折原 弘治 (ORIHARA KOJI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教  
研究者番号：90457664

### (2) 研究分担者

濱崎 秀一 (HAMASAKI SYUICHI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：10315434

石田 実雅 (ISHIDA SANEMASA)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
講師  
研究者番号：30444889

鄭 忠和 (TEI CYUWA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：10163891