

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08425

研究課題名(和文)ミトコンドリア分解を起点とした肺高血圧症の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) A novel therapy of pulmonary hypertension targeting degradation of altered mitochondria

研究代表者

阿部 弘太郎 (Abe, Kohtaro)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20588107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：背景：ミトコンドリアDNA(mtDNA)をリガンドとするToll様受容体9番(toll-like receptor 9: TLR9)の活性化による炎症と肺高血圧症の進展について検証することを目的とした。
方法と結果：モノクロタリン暴露ラットは14日目に、血漿ミトコンドリアDNAマーカーが上昇し、肺におけるTLR9の活性化とIL-6 mRNAの上昇を来した。TLR9阻害薬により、右室収縮期圧・総肺血管抵抗・肺血管リモデリング・マクロファージ集簇の上昇が軽減された。
結論：TLR9はNF- κ B-IL-6経路を介した肺高血圧症の進展に寄与しており、TLR9阻害は肺高血圧症の新たな治療戦略となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症に対する治療薬は、可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬、ホスホジエステラーゼ5型阻害薬、エンドセリン受容体拮抗薬、プロスタノイド製剤といった肺血管拡張薬が使用されているが、重症化した患者の予後は未だ不良である。本研究では、mtDNA-TLR9という新たな肺高血圧症進展における炎症経路を標的とした研究である。難治性疾患の肺高血圧症の閉塞性血管病変進展における新たな炎症制御の分子機構を解明することは、従来の肺血管拡張薬と独立した新たな機序に基づく治療法を提案する可能性があり、極めて独自性の高い研究であるといえる。

研究成果の概要(英文)：Background: We hypothesized that toll-like receptor 9 (TLR9) is involved in the development of pulmonary hypertension (PH).

Methods and Results: A rat model of monocrotaline (MCT)-exposed rats significantly showed increases in plasma levels of mitochondrial DNA markers, TLR9 activation in the lung, and interleukin-6 mRNA level in the lung on day 14 after MCT injection. TLR9 inhibitors significantly ameliorated the elevations of right ventricular systolic pressure (RVSP), total pulmonary vascular resistance index (TPRI) and vascular remodelling, together with macrophage accumulation on day 21. These inhibitors also significantly reduced NF- κ B activation and interleukin-6 mRNA levels to similar extent.

Conclusions: TLR9 is involved in the development of PH concomitant via activation of NF- κ B-IL-6 pathway. Inhibition of TLR9 may be a novel therapeutic strategy for PH.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧症 ミトコンドリア 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肺動脈性肺高血圧症（以下、肺高血圧症）は希少疾患で予後不良：40歳代の若者を中心に100万人あたり1~2名に発症し、未治療では5年生存率が40%未満予後不良の希少疾患である。本邦では、積極的な肺血管拡張薬の導入により生命予後は改善傾向にあるが、進行した肺高血圧症の予後は未だ不良であり、新たな分子機序解明と有効な治療戦略の開発が急務である。
- (2) 血行動態ストレスによる炎症誘導：肺高血圧の進行に従って血管周囲に多くの炎症細胞浸潤を認め、閉塞性病変を増悪させることが知られているが、炎症誘導の機序は不明である。申請者らは、圧負荷右心不全モデルにおいて、心筋細胞では血行動態ストレスによる細胞内の変性したmtDNA増加し、リガンドとしてtool-like receptor 9(TLR9)が活性化し、感染を伴わない炎症（無菌性炎症）が誘導され、右心不全が増悪することを報告した (*Cardiovasc Res* 2018)。
- (3) 以上の背景を踏まえ、血行動態ストレスにさらされた肺血管内細胞から放出されたmtDNA増加を介したオートファジー機能の低下により、TLR9活性化と無菌性炎症を惹起され、閉塞性病変を進展させるという仮説に至った。

2. 研究の目的

ミトコンドリアDNA(mtDNA)をリガンドとするTLR9の活性化により炎症が惹起され、肺内血管周囲の炎症と肺高血圧症の進展に寄与していると仮説を検証することを目的とする。

- (1) ミトコンドリアDNA(mtDNA)を介した炎症誘導機構：肺高血圧症モデル動物は肺動脈圧上昇と閉塞性病変の経時的な変化とmtDNAの発現解析を行う。
- (2) TLR9の活性化解析：mtDNAをリガンドとして発現するTLR9の発現解析と活性化を証明し、TLR9活性化とその下流シグナルについて検証する。
- (3) TLR9抑制による炎症抑制および肺高血圧症の病態抑制：モノクローリンラットモデルに対して、選択的TLR9阻害薬（E6446）もしくは非選択的TLR9阻害薬（クロロキン:CLQ）の慢性投与を行い、閉塞性肺血管周囲の炎症抑制ならびに肺高血圧症の治療効果を検討する。

3. 研究の方法

- (1) ミトコンドリアDNA(mtDNA)関連マーカーの証明：経時的なミトコンドリアDNA(mtDNA)およびDNaseIIの解析：疾患モデル動物の損傷した肺組織から血漿に遊離したmtDNAマーカー（ATP3, COX4, ND17）を経時的に解析する。
- (2) TLR9および炎症関連マーカーの解析：TLR9発現の分布および活性化、TLR9の下流シグナルのサイトカイン(IL-6, TNF, IL-1)、NF- κ B発現、病理組織の炎症細胞浸潤を解析する。
- (3) 肺高血圧の病態進展におけるTLR9活性化機構の解明：肺高血圧症疾患モデル動物における選択的TLR9阻害の治療効果(長期投与)：進行した肺高血圧症を示す疾患モデル動物に対して、TLR9阻害薬（E6446, 30mg/kg/日、経口）の短期投与（3日間）による無菌性炎症抑制、慢性投与(3-5週間)による閉塞性肺血管病変と肺高血圧抑制効果を検討する。E6446は初の選択的なTLR9阻害薬としてマラリアの新規治療薬として開発されており、試薬の提供をすでに受けている。

4. 研究成果

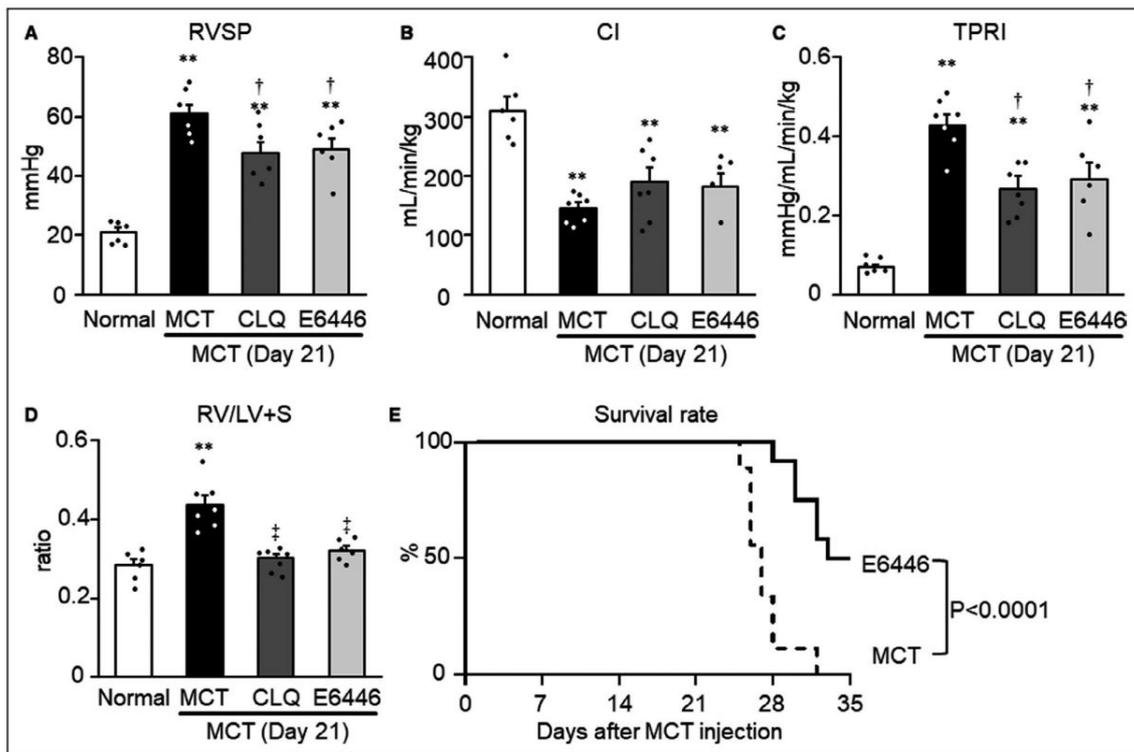
- (1) モノクローリン暴露ラットにおける炎症性反応
血漿中ミトコンドリアDNAは、PBSを投与された正常ラットと比べて、モノクローリン暴露ラ

ットにおいてND4は7日目と14日目で、ATP6とCOX2は14日目において有意に上昇していた。ミトコンドリアDNAを認識する受容体であるTLR9はモノクロタリンモノクロタリン暴露後3週のラットの肺において内皮細胞に発現しており、それらの細胞はNF- κ Bも陽性となっていた。重症PAH患者の剖検肺においても類似した発現分布を認めた。モノクロタリン暴露ラットにおいて、開裂されたTLR9のC末端(活性型TLR9の指標)が7日目、14日目で対照ラットに比べて増加していた。IL-6のmRNA発現量はモノクロタリン投与後14日目で有意に上昇していた。それと同時に免疫染色の結果から、CD68陽性マクロファージがモノクロタリン暴露ラットにおいて14日目の小肺動脈周辺に有意に増加していた。

(2) TLR9阻害薬による長期治療がモノクロタリン暴露ラットにおいて血行動態と生存率に与える予防的効果

正常ラットと比較してモノクロタリン群において、RVSP(図A)とTPRI(図C)が有意に上昇し、心係数(図B)は有意に低下していた。右室重量比(図D)もまた正常ラットと比較してモノクロタリン群で有意に上昇していた。平均体動脈圧と心拍数についてはモノクロタリン群と正常群とで有意差はなかった(結果は非提示)。クロロキンとE6446はモノクロタリン投与3日前から始め、クロロキンとE6446はいずれもRVSP、TPRI、RV/LV+Sのモノクロタリン暴露ラットにおける上昇を有意に軽減した(図A、C、D)。クロロキンとE6446は心係数には影響しなかった(図B)。

すべてのモノクロタリン群のラットは32日までに死亡した(図E)。死亡後解剖を行ったところすべてのラットは重度の右心肥大を認め、著明な胸水・腹水・肺うっ血を認めた。これらの所見により死亡した際に右心不全の存在が示唆された。すなわち重症PHがこれらラットの主たる死因であると考えられた。生存率は未治療のモノクロタリン暴露ラットと比較してE6446の投与により著明に改善した(図E)。



(3) TLR9阻害薬がモノクロタリン誘発PHラットの肺動脈リモデリングに与える予防的効果

筋性動脈における中膜肥厚、PHにおける特徴的血管リモデリングのひとつ、は外径50-100 μ m

の小血管で評価した。中膜肥厚は21日目に正常ラットと比較してモノタリン暴露ラットで有意に進行していた。クロロキンとE6446の投与により未治療モノクロタリン暴露ラットと比較して有意に中膜肥厚を軽減した。

肺高血圧における血管リモデリングのもう一つの特徴的变化である小動脈の筋性化は外径50 μ m未満の小動脈で評価した。平滑筋アクチンの免疫組織学的検出と、円周長に対する陽性染色の程度による定量的評価を行ったところ、正常ラットに比較してモノクロタリン投与後21日目のモノクロタリン群における部分的筋性化および完全筋性化の小動脈の割合が有意に増加していた。クロロキンとE6446いずれの治療も、モノクロタリン曝露ラットにおける小肺動脈筋性化を軽減した。筋性動脈において増殖性細胞を示すKi67陽性細胞の数が正常ラットと比較してモノクロタリン群で上昇していた。クロロキンやE6446のいずれの治療もKi67陽性細胞の増加を軽減した。

(4) TLR9 阻害薬がモノクロタリン誘発 PH ラットの炎症性反応に与える予防的効果

CD68 陽性マクロファージと NF- κ B 陽性細胞の浸潤は正常ラットと比較してモノクロタリン群の小肺動脈周囲において増加していた。クロロキンとE6446いずれの治療によっても、モノクロタリン曝露ラットにおけるCD68陽性マクロファージとNF- κ B陽性細胞の集簇を減少させた。IL-6のmRNA発現量はモノクロタリン群で有意に上昇しており、その上昇はクロロキン・E6446の治療によりほぼ完全に阻害された。リン酸化STAT3、IL-6の主たる下流分子は正常ラットに比べてモノクロタリン曝露ラットで上昇していた。E6446によりモノクロタリン群と比較してSTAT3活性化を有意に軽減した。

(5) TLR9 阻害薬による短期治療（3日間）がモノクロタリン誘発 PH ラットモデルに与える治療的効果

モノクロタリン曝露ラットは14日目に有意なPHを発症することが報告されている(29)(30)。CD68陽性マクロファージやNF- κ B陽性細胞が、正常ラットよりもモノクロタリン群において増加していた。E6446短期治療(3日治療プロトコル)によりCD68陽性マクロファージとNF- κ B陽性細胞の集簇を減少させ、しかしE6446による短期治療は中膜肥厚やRVSPには影響しなかった。IL-6 mRNA発現量は正常ラットに比べてモノクロタリン群で有意に上昇した。E6446による短期治療でIL-6 mRNA発現量はほぼ正常化させた。E6446はまた肺におけるSTAT3の活性化も有意に抑制した。

(6) TLR9 阻害薬による長期治療がモノクロタリン誘発 PH ラットにおいて、PH、肺動脈リモデリングや生存率に与える治療的効果

モノクロタリン投与後14日目から24日目までE6446における治療(10日間治療プロトコル)によりモノクロタリン群と比較してTPRIの上昇、中膜肥厚、完全筋性化血管の割合が24日目において減量した。一方、E6446治療はRVSP、CI、RV/LV+Sには有意な影響を与えなかった。加えて、E6446治療はモノタリン曝露ラットの生存率を有意に改善した。

以上の結果から、ミトコンドリアDNA(mtDNA)をリガンドとするTLR9の活性化により肺血管周囲の炎症が惹起され、肺高血圧症の進展が起こることが示された。TLR9が肺高血圧症の新たな治療標的になる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa T, Abe K, Takana-Ishikawa M, Yoshida K, Watanabe T, Imakiire S, Hosokawa K, Hirano M, Hirano K, Tsutsui H.	4. 巻 10(7)
2. 論文標題 Chronic Inhibition of Toll-Like Receptor 9 Ameliorates Pulmonary Hypertension in Rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e019247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.019247.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe T, Ishikawa M, Abe K, Ishikawa T, Imakiire S, Masaki K, Hosokawa K, Fukuuchi T, Kaneko K, Ohtsubo T, Hirano M, Hirano K, Tsutsui H.	4. 巻 10(23)
2. 論文標題 Increased Lung Uric Acid Deteriorates Pulmonary Arterial Hypertension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e022712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.121.022712.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kohtaro Abe
2. 発表標題 Toll-like Receptor 9 is a Novel Therapeutic Target for Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Dysfunction
3. 学会等名 第85回日本循環器学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田賢明、阿部弘太郎、朔啓太、石川智一、渡邊高徳、細川和也、筒井裕之
2. 発表標題 TLR9-NF- B-Mediated Sterile Inflammation is a Novel Therapeutic Target for Right Ventricular Dysfunction
3. 学会等名 第84 日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 阿部弘太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 循環器内科	5. 総ページ数 6
3. 書名 肺高血圧症モデル動物を用いた基礎研究の知見	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	筒井 裕之 (Tsutsui Hiroyuki) (70264017)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------