

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08077

研究課題名(和文) TLR9シグナルによる心臓リモデリングと不整脈発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cardiac remodeling and arrhythmogenesis via toll-like receptor (TLR) 9

研究代表者

添木 武 (SOEKI, Takeshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任教授

研究者番号：60393211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：病原体を認識するセンサーであるToll-like受容体(TLR)9が自己のDNA断片を認識して心房内での炎症、心房細動の発症に関与しているという仮説を立て検証した。TLR9欠損マウスおよび野生型マウスにアンジオテンシンIIを投与し炎症を惹起したところ、TLR9欠損マウスは野生型マウスに比べ線維化率が有意に抑制され、心房細動の誘発率が抑制されていた。心房内の炎症並びに線維化関連遺伝子の発現もTLR9欠損マウスでは減少していた。また、TLR9のリガンドであるcell-free DNAの血液中の濃度を測定したところ、心房細動患者が対象患者よりもcell-free DNAが高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症の要因として注目されている肥満が心房細動の独立した危険因子として最近注目されているが、それらを結びつけるものは不明であった。今回の研究で、肥満などにおいて増加するDNA断片が心房におけるTLR9を介してサイトカイン産生や炎症細胞浸潤に寄与し心房細動の発症に関与するという可能性が示唆された。今回の結果は、新しいアプローチでの心房細動の診断・治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Several evidences suggest that toll-like receptor (TLR) 9 recognizes bacterial DNA, activating innate immunity, whereas it also provokes inflammation in response to fragmented DNA released from mammalian cells. This study aimed to assess whether TLR9 contributes to the atrial inflammation and AF arrhythmogenesis. TLR9 deficient (TLR9<sup>-/-</sup>) and wild-type mice were infused with angiotensin II (Ang II) or vehicle for 4 weeks. Ang II-treated TLR9<sup>-/-</sup> mice showed lower incidence of AF compared with wild-type mice treated with Ang II. Genetic deletion of TLR9 significantly reduced the interstitial fibrosis in atrium of Ang II-treated mice. TLR9<sup>-/-</sup> mice also showed less mRNA expressions of inflammatory and fibrosis-related biomarkers in atrium compared with wild-type mice. In addition, plasma concentration of cell-free DNA was significantly higher in AF patients than control subjects. In conclusion, TLR9 might contribute to the AF arrhythmogenesis associated with atrial inflammation.

研究分野：循環器

キーワード：循環器 Toll-like 受容体 心房細動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心房は肺に次いで炎症反応が起こりやすい組織であり、心房細動では病態発現の共通基盤として慢性炎症が存在すると考えられている。実際、研究代表者らも心房細動患者では局所の炎症を反映するバイオマーカーである Pentraxin 3 の左心耳内での濃度が末梢よりも高いことを報告したが (Heart Vessels. 2014;29:653-8)、炎症と心房細動の発症・維持を直接結び付ける因子は長い間不明であった。そのようななかで、慢性炎症の要因として注目されている肥満が心房細動の独立した危険因子として最近注目されている。実際、Women's health 研究に登録された 34,309 名の前向き研究 (平均追跡期間 12.9 年) では、Body Mass Index (BMI) が 1 増えるごとに心房細動は 4.7%増加し、肥満の人 (BMI30 以上) は通常の人 (BMI25 未満) に比べて 1.65 倍心房細動になりやすいという結果が示されている (J Am Coll Cardiol, 2010;55:2319-2327)。しかしながら、肥満がどのようなメカニズムで心房細動を引き起こすかは不明である。

近年、糖尿病、動脈硬化や肥満をはじめとする生活習慣病、あるいは癌や神経変性疾患などの様々な病態の基盤に慢性炎症が深くかかわっているとの知見が蓄積しつつある。慢性炎症の多くは、外因性リガンド (細菌、ウイルスなど) とは異なる内因性リガンドが関与しており自然炎症と呼ばれている。内因性、外因性リガンドともに Toll-like 受容体 (TLR) などの病原体センサーと結合し、炎症反応を引き起こすことが知られている。そのなかで、TLR9 は小胞体エンドソーム膜上で細菌やウイルス由来の非メチル化 CpG-DNA を認識することが知られているが、自己由来の cell free DNA などでも認識することが報告されている。研究代表者らは、最近、変性脂肪細胞から遊離する DNA 断片が、本来は細菌由来の DNA 断片を認識する TLR9 によって認識され、マクロファージを活性化することで脂肪組織の慢性炎症を引き起こすことを見出し報告した (Sci Adv. 2016;2:e1501332)。さらに、TLR は心房や心室にも発現しており、炎症性サイトカインの遺伝子発現を亢進させ心不全増悪を引き起こす可能性が示唆されている。実際、オートファジー性分解を免れた異常ミトコンドリア DNA が TLR9 によって認識され炎症反応が惹起され心不全が誘導されるということが報告されている (Nature. 2012;485:251-5)。しかしながら、心臓 (心房、心室、あるいは浸潤炎症細胞) における TLR9 シグナルを介した炎症反応と (心房細動、心室細動などの) 不整脈発症・維持との関係は全く分かっておらず、心房細動や心不全における血栓形成との関連も不明である。

また、血漿中に見出される cell-free DNA (抗凝固処理血液のセルフフリー画分) は、新たなバイオマーカー開発や診断への応用が期待されており、近年注目されている。実際、cell-free DNA は癌のバイオマーカー探索や治療中の悪性腫瘍の変異検出、非侵襲的な出生前診断への応用が期待されている。研究代表者らは、ヒトとマウスの両方で、肥満個体は痩せた個体に比べて、脂肪細胞の変性に関連した血液中の cell-free DNA の濃度が高いこと、そして血液中の cell-free DNA の量がインスリン抵抗性の指標と相関する事を見出し世界で初めて報告した (Sci Adv. 2016;2:e1501332)。しかしながら、cell-free DNA を介した炎症が実際に心房・心室の電氣的・構造的リモデリングを引き起こし不整脈につながるかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、肥満などにおいて増加する cell free DNA が心房における TLR9 を介してサイトカイン産生や炎症細胞浸潤に寄与し心房細動発症や心内血栓形成に関与するという仮説を立て検証することを最大の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) TLR9 KO マウスを用いた心房リモデリング・心房細動誘発率の検証

10 週齢の TLR9KO マウス及び C57BL/6 マウス (野生型) をそれぞれアンジオテンシン II (AngII) 投与群と非投与群に分けた (計 4 群)。それぞれの群において、浸透圧ミニポンプ (model2004, Alzet) を用いて AngII (2mg/kg/日) または生理食塩水を経皮的に 4 週間持続投与した (図 1)。投与期間中は継時的に体重と血圧を測定した。血圧測定については tail-cuff 法 (BP-98A-L, Softron) により非観血的血圧測定を行った。また、心臓超音波検査にて心房・心室のリモデリングを評価した。

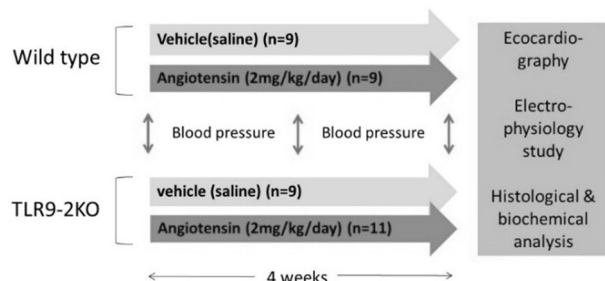


図 1 アンジオテンシン II 投与マウスモデル

### 心房細動の誘発

4週間後、麻酔下でマウスの右頸静脈から電極カテーテルを挿入して右心房に留置させ、30ms/回、10Vで30秒間刺激して、心房細動の誘発を行った。体表面心電図および心内電位の両方を用いて心房細動の診断を行い、2秒間以上持続した場合、心房細動出現と定義した。

### 心房の線維化の組織学的評価

電気刺激終了後、マウスの胸郭を開いて心臓を摘出し、心房、心室に分けて標本を作製した。そして心房の標本についてSirius Red染色を行い、心房の線維化を測定した。

### 心房の炎症関連遺伝子の発現の評価

心房の標本を用いて、定量PCR法によりTNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-6などの炎症関連マーカーやtransforming growth factor(TGF)- $\beta$ 、collagen1、collagen3などの線維化マーカーについてmRNA発現量を調べた。

## (2) ヒト心房細動患者における血漿中 cell-free DNA の検討

ヒト心房細動患者において血漿中の cell-free DNA を測定し、背景因子、心房細動の発現様式との関係を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) TLR9KO マウスを用いた心房リモデリング・心房細動誘発率の検証

#### アンジオテンシン II 投与マウスモデルの基本特性

4群間において、体重、心拍数には明らかな差は認められなかった。心臓重量体重比はAngII投与により増加していたが、TLR9 KO マウスと野生型マウスで有意差は認められなかった(図2)。

	WT control	TLR9KO control	WT Ang II	TLR9KO Ang II
Number	9	9	9	11
Body weight(g)	25.0 $\pm$ 0.6	26.1 $\pm$ 0.5	22.8 $\pm$ 0.4	24.1 $\pm$ 0.4
Heart/Body weight ratio(g/g)	0.53 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.02	0.60 $\pm$ 0.02
Heart rate (bpm)	662 $\pm$ 25	692 $\pm$ 22	669 $\pm$ 30	666 $\pm$ 31

図2 基本特性

### 血圧の推移

AngII投与群は非投与群に比し有意に血圧上昇がみられたが、TLR9 KO マウスと野生型マウスで有意差は認められなかった(図3)。心エコーによる左室駆出率、左室拡張末期径に関しても、TLR9 KO マウスと野生型マウスで有意差はみられなかった。

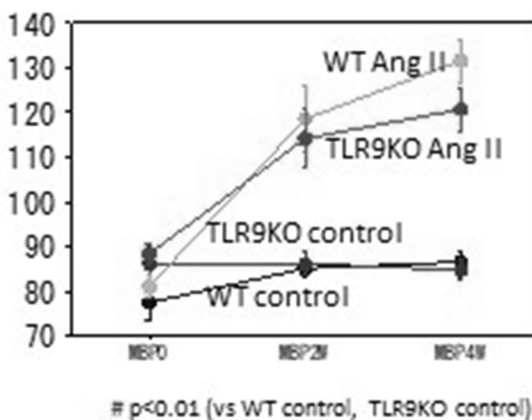


図3 平均血圧の推移

### 病理組織学的検討

AngII投与群は非投与群に比べSirius Redによる左房の線維化率が増加していたが、TLR9 KO マウスは野生型マウスに比べ線維化率が有意に抑制されていた(図4)。摘出心房内での血栓形成は、今回のモデルでは明らかなものは認められなかった。

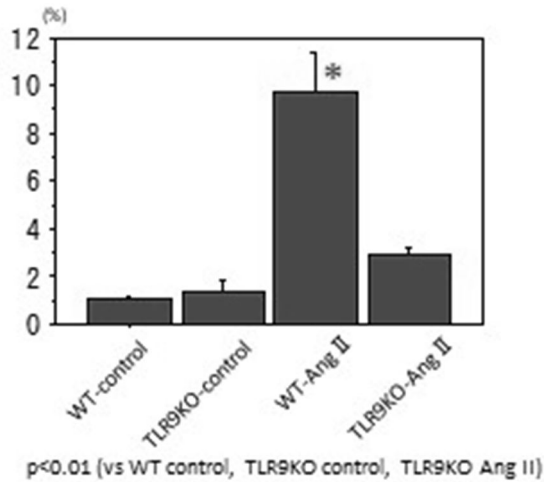


図4 心房内線維化率

#### 心臓電気生理学的検討

特殊電極カテーテルを頸静脈から挿入し右心房に留置し、電気刺激装置による高頻度ペーシングにて心房細動の誘発を行ったところ、Ang II 投与群では高頻度に心房細動が誘発されることが確認された。TLR9 KO マウスは野生型マウスに比べ誘発率が抑制されていた (図5)。

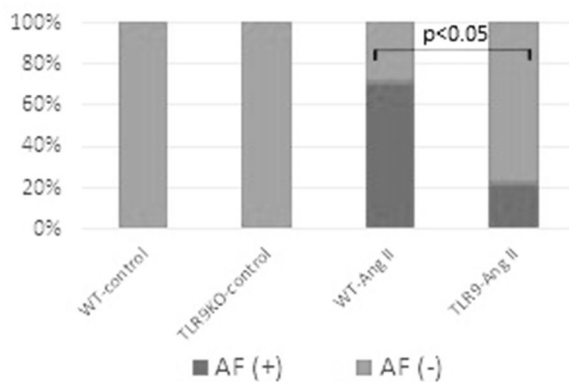


図5 心房細動誘発率

#### 遺伝子発現の検討

摘出心房の遺伝子発現を定量 PCR 法により検討したところ、炎症並びに線維化関連遺伝子 (TNF- $\alpha$ , interleukin-6, TGF- $\beta$ , collagen-1, collagen-3) の発現は TLR9 KO マウスは野生型マウスに比べ減少していた (図6)。

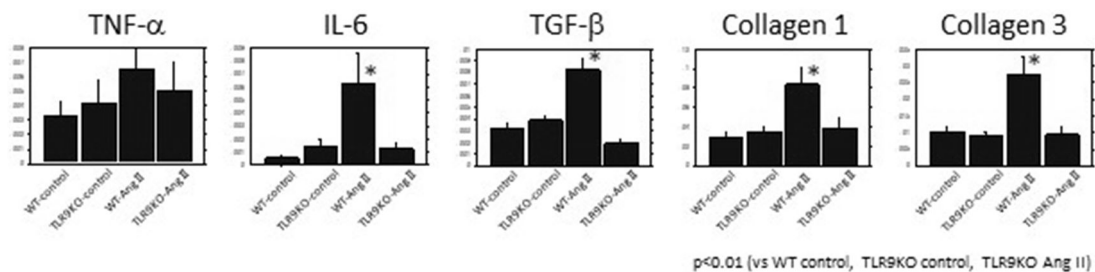


図6 心房内遺伝子発現

#### (2) ヒト心房細動患者における血漿中 cell-free DNA の検討

ヒト心房細動患者および対照患者において、TLR9 のリガンドである cell-free DNA の血液中の濃度を測定したところ、心房細動患者が対象患者よりも cell-free DNA が高値であった。また、持続性心房細動患者の方が発作性心房細動患者よりも cell-free DNA が高い傾向も示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuura T, Soeki T, Fukuda D, Uematsu E, Tobiume T, Hara T, Kusunose K, Ise T, Yamaguchi K, Yagi S, Yamada H, Wakatsuki T, Sata M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Activated Factor X Signaling Pathway via Protease-Activated Receptor 2 Is a Novel Therapeutic Target for Preventing Atrial Fibrillation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-20-1006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Soeki T, Matsumoto K, Fukuda D, Uematsu E, Matsuura T, Tobiume T, Kusunose K, Ise T, Yamaguchi K, Yagi S, Yamada H, Wakatsuki T, Sata M.
2. 発表標題 Toll-like receptor 9 is a novel therapeutic target to prevent atrial fibrillation
3. 学会等名 European Society of Cardiology 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学医歯薬学研究部循環器内科学ホームページ <a href="http://square.umin.ac.jp/TOKUSHIM/">http://square.umin.ac.jp/TOKUSHIM/</a>
--

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	佐田 政隆  (SATA Masataka)  (80345214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教授    (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	植松 悦子  (UEMATSU Etsuko)  (10352080)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教務補佐員    (16101)	

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