

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23968

研究課題名（和文）心筋虚血再灌流障害における自然免疫応答のメカニズムの解明と治療法の検討

研究課題名（英文）The role of Toll-like receptor 9 in myocardial ischemia/reperfusion injury

研究代表者

種池 里佳 (Kitazume-Taneike, Rika)

大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：50849015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞は、国内外で主要な死亡原因である。再灌流療法は最も有効な治療法だが、心筋虚血再灌流障害を誘発する。本研究では、マウスから採取した心臓を用いた心筋虚血再灌流障害モデルにおいて、Toll様受容体9欠損が、心筋虚血再灌流障害を改善し、炎症性シグナル伝達を抑制することを明らかにした。また、ミトコンドリアDNAは、Toll様受容体9の主要な活性化因子であり、心筋障害時に心筋細胞から細胞外に放出される。本研究では、心筋虚血再灌流時にDNA分解酵素投与により、細胞外ミトコンドリアDNAが分解され、炎症性シグナル伝達の抑制を介さず、心筋虚血再灌流障害が部分的に改善することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Toll様受容体9が、心筋梗塞に対する再灌流療法後の最終的な心筋梗塞サイズを増悪させ、予後を増悪させることを明らかにした。心筋梗塞時に破壊された心筋細胞由来のミトコンドリアDNAは、心筋細胞内に取り込まれ、Toll様受容体9を活性化し、細胞死を誘発するため、DNA分解酵素投与により心筋虚血再灌流障害の抑制効果を検討したが、効果は部分的であり、炎症反応の抑制は認めなかった。心筋虚血再灌流障害の治療としては、Toll様受容体9自体の抑制が有効な治療標的となりうることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Myocardial infarction is the leading cause of death worldwide. Myocardial reperfusion is the most effective therapy to improve the clinical outcome, while it also induces myocardial ischemia/reperfusion injury. TLR9 is the crucial receptor of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA are released from damaged cardiomyocytes. This study revealed that ablation of Toll-like receptor 9 (TLR9) attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury and inflammatory responses in myocardial ischemia/reperfusion model with isolated hearts from TLR9-deficient and control wild-type mice. This study also revealed that digestion of extracellular mitochondrial DNA released from the infarct heart partially improved myocardial ischemia/reperfusion injury with no effect on inflammatory responses in the model using DNase I.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋虚血再灌流障害 自然免疫応答 Toll様受容体9 炎症性サイトカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は早期再灌流技術の進歩にもかかわらず、いまだ世界的な主要死因である。心筋虚血再灌流障害は、虚血性心疾患への冠動脈再灌流術後、心臓血管開心術、心移植術で起こり、生命予後に多大な影響を与える病態で、内因性自己免疫反応とそれに続く炎症反応が心筋障害をおこすといわれているが、メカニズムや有効な治療法は確立されていない。

内因性自己免疫反応誘導因子として、Toll 様受容体は、細菌やウイルスなどの外因的病原体を認識し、自己免疫反応を誘導する受容体である。そのうち、Toll 様受容体 9 は、他の Toll 様受容体と異なり、外因性、内因性の DNA の非メチル化 CpG を認識する受容体で、細胞内に存在し、活性化されると炎症性サイトカインの産生をひきおこす。内因性の DNA として、ミトコンドリア DNA は、非メチル化 CpG を含有する。私たちはこれまでに、血行動態的負荷による心筋障害で、心筋細胞においてオートファジーをのがれたミトコンドリア DNA が Toll 様受容体 9 を介して、内因性自己免疫反応を起こし、心不全を誘発することを報告してきた (Nature 2012)。このことから、心筋障害が短時間で劇的な心筋虚血再灌流においても、障害心筋から放出されたミトコンドリア DNA が、Toll 様受容体 9 を活性化し、内因性の自己免疫反応とそれに続く炎症性サイトカインの産生をひきおこし、心筋障害を増悪させると仮説を立てた。内因性自己免疫反応を誘発する Toll 様受容体 9、または Toll 様受容体 9 を活性化させるミトコンドリア DNA を阻害することで、心筋虚血再灌流障害が抑制されると考えた。

心筋虚血再灌流における Toll 様受容体 9 の役割は、生体内 *in vivo* モデルでは検討されてきた。非メチル化オリゴヌクレオチドを用いた、心筋虚血再灌流前の Toll 様受容体 9 の活性化は心機能を改善し、梗塞サイズを減少させるとの報告がある。一方、心筋虚血開始時の Toll 様受容体 9 の活性は心筋の炎症を誘発するが、心筋梗塞サイズには影響がないという報告もあり、心筋虚血再灌流における Toll 様受容体 9 の役割は確立されていない。また、生体内モデルでは、血液中にある炎症細胞の影響があると考えられる。このため、生体外 *ex vivo* モデルを用いて、心筋虚血再灌流障害における炎症反応が心筋細胞内で誘発されるかを検討し、心臓特異的免疫抑制による治療法の可能性を模索する必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

心筋虚血再灌流障害において、障害心筋で産生されたミトコンドリア DNA、Toll 様受容体 9 を介して、内因性自己免疫反応、炎症を誘発し、心不全を引き起こしていることを明らかにすることを通じて、Toll 様受容体 9 阻害やミトコンドリア DNA 阻害が、内因性自己免疫反応を抑制し、心不全を改善しうるかの解明を行うことを目的としている。とくに、自己免疫反応は、炎症細胞が主体で起こり、自己免疫抑制目的の免疫抑制剤の全身投与は、感染を引き起こし、生命予後に影響を及ぼすといわれている。本研究では、炎症細胞を除外した状態で、心筋での内因性自己免疫反応の抑制が心不全に影響するかを解明し、心臓特異的に作用する新規創薬につながる分子標的の解明と治療への応用、世界的な主要死因改善を目指している。

### 3. 研究の方法

Toll 様受容体 9 を起点とした、心筋虚血再灌流障害における内因性自己免疫反応機構を基礎医学的手法により検討し、内因性自己免疫反応による炎症反応制御を行うための、分子治療標的を同定することが目的であり、以下の点を順に解析した。

#### (1) 心筋虚血再灌流障害における Toll 様受容体 9 の機能解析

野生型マウスや Toll 様受容体 9 欠損マウスから採取した心臓を用いて、Toll 様受容体 9 が、*Ex vivo* 心筋虚血再灌流障害において、心機能や心筋細胞壊死に及ぼす影響を生理学的に解析した。

#### (2) 心筋虚血再灌流障害での炎症反応の解析

上記心筋虚血再灌流障害モデルでの、炎症反応誘発の有無やその時間的経過、Toll 様受容体 9 欠損の影響を解析し、心筋虚血再灌流障害にかかわる炎症性シグナル伝達因子を生化学的、病理学的評価により探索した。また、心筋内炎症にかかわる細胞を、免疫病理学的に検討した。

#### (3) 心筋虚血再灌流障害での細胞外ミトコンドリア DNA 分解の影響の検討

上記心筋虚血再灌流障害モデルで、野生型マウス心臓に対し、心筋虚血再灌流時にデオキシリボヌクレアーゼ投与を行い、細胞外ミトコンドリア DNA の分解が、心筋虚血再灌流障害における心機能、心筋細胞への影響を生理学的、生化学的、免疫病理学的に解析した。また、心筋虚血再灌流障害での炎症反応に対する影響を解析した。さらに、Toll 様受容体 9 欠損マウス心臓に対し、心筋虚血再灌流時にデオキシリボヌクレアーゼ投与を行い、Toll 様受容体 9 以外の受容体の関与を検討した。

また、野生型マウス心臓に、心筋虚血再灌流障害中、不活性化デオキシリボヌクレアーゼ投与を行い、不活性化デオキシリボヌクレアーゼの影響を検討した。

さらに、野生型マウス心臓に、心筋虚血再灌流直後から、デオキシリボヌクレアーゼ投与を行い、再灌流時からのミトコンドリア分解効果を検討した。

#### (4) ミトコンドリア DNA による Toll 様受容体 9 の活性化の解析

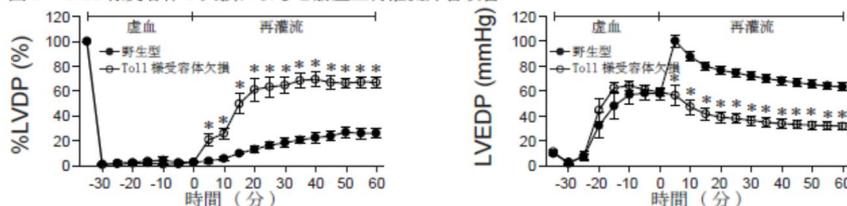
野生型マウス、Toll 様受容体 9 欠損マウスから採取した初代培養心筋細胞に、心臓由来の精製ミトコンドリア DNA の投与を行い、ミトコンドリア DNA による Toll 様受容体 9 の活性化の有無、炎症反応誘発の有無、炎症性シグナル伝達因子を解析予定であったが、実験に必要な十分量の心臓由来精製ミトコンドリア DNA の取得に難渋したため、上記初代培養心筋細胞に虚血再灌流障害を誘発し、解析することとした。

### 4. 研究成果

#### (1) 心筋虚血再灌流障害における Toll 様受容体 9 の機能解析

野生型マウス心臓と比較し、Toll 様受容体 9 欠損マウス心臓では、心筋虚血再灌流後、心機能障害はすみやかに改善し、その改善が持続することが確認され(図1) また、心筋梗塞サイズや心筋逸脱酵素上昇も、心筋虚血再灌流後改善することが確認された。

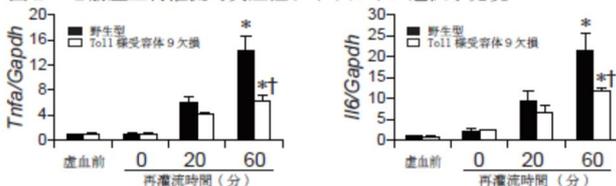
図1 Toll 様受容体 9 欠損による心筋虚血再灌流障害改善



#### (2) 心筋虚血再灌流障害での炎症反応の解析

心筋虚血前、虚血直後では、野生型マウス心臓と Toll 様受容体 9 欠損マウス心臓で、炎症性サイトカイン遺伝子の発現に差は認めなかったが、虚血再灌流中、再灌流後、野生型マウス心臓と比較し、Toll 様受容体欠損マウス心臓では、炎症性サイトカイン遺伝子の発現は抑制された(図2)。また、再灌流中、心臓から流出した冠流出液中の炎症性サイトカインタンパク質 IL-6 量も減少していた。しかし、Toll 様受容体 9 炎症性シグナル伝達機構での転写因子活性は、野生型マウス心臓と Toll 様受容体 9 欠損マウス心臓では、虚血再灌流中、発現の差は認めなかった。

図2 心筋虚血再灌流時炎症性サイトカイン遺伝子発現



心筋虚血再灌流前後、野生型マウス心臓、Toll 様受容体 9 欠損マウス心臓では、心筋内炎症細胞の増加を認めず、血液中の炎症細胞由来の炎症性シグナル伝達の影響がないことが確認できた。

#### (3) 心筋虚血再灌流障害での細胞外ミトコンドリア DNA 分解の影響の検討

野生型マウス心臓では、デオキシリボヌクレアーゼ非投与群と比較し、投与群では、冠流出液中の細胞外ミトコンドリア DNA が分解されていることが確認された。心筋虚血再灌流後、心機能障害は改善し、その改善が持続することが確認され(図3) 心筋梗塞サイズや心筋逸脱酵素上昇も、虚血再灌流後改善することが確認された。しかし、炎症性サイトカイン遺伝子の発現は、虚血再灌流後にデオキシリボヌクレアーゼ投与群、非投与群とも増加したが、両群間に差は認めず、DNA 分解では炎症性サイトカイン産生の抑制効果は認めないことが確認された(図4) 虚血再灌流直後の、心筋内での DNA 量は、両群間に差は認めず、DNA 分解は細胞外ミトコンドリア DNA のみで、細胞内ミトコンドリア DNA の分解は確認できなかった。

図3 DNase I 投与による心筋虚血再灌流障害改善

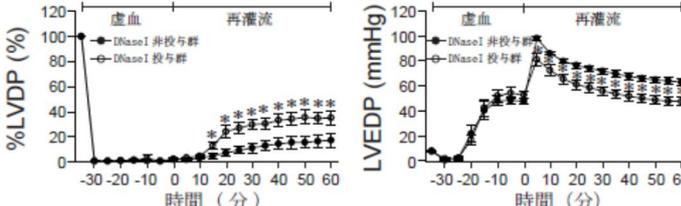
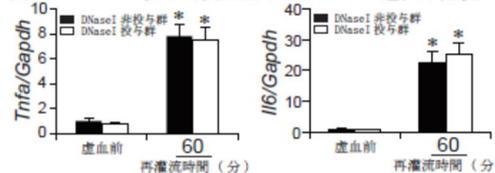


図4 DNase I 投与時炎症性サイトカイン遺伝子発現



Toll 様受容体 9 欠損マウス心臓では、デオキシリボヌクレアーゼ投与群と非投与群とで、心筋虚血再灌流障害に差はなく、Toll 様受容体 9 以外の受容体が、ミトコンドリア DNA を介して心筋虚血再灌流障害を引き起こしている可能性はないことが確認できた。

また、野生型マウス心臓に、心筋虚血再灌流障害中、不活性化デオキシリボヌクレアーゼ投与

を行ったところ、投与群、非投与群両群で、心筋虚血再灌流障害の改善は認めず、不活性化デオキシリボヌクレアーゼによる心筋虚血再灌流障害に関与は否定された。

さらに、野生型マウス心臓に、心筋虚血再灌流直後から、デオキシリボヌクレアーゼ投与を行い、再灌流時からのミトコンドリア分解効果を検討したが、心筋虚血再灌流障害の改善は認めず、虚血再灌流直後からのデオキシリボヌクレアーゼ投与の有効性は認めないことが判明した。

#### (4) ミトコンドリアDNAによるToll様受容体9の活性化の解析

ミトコンドリアDNAによるToll様受容体9の活性化の有無、炎症反応誘発の有無、炎症性シグナル伝達因子を解析するため、野生型マウス、Toll様受容体9欠損マウスから採取した初代培養心筋細胞に、心臓由来の精製ミトコンドリアDNAの投与を行う予定であったが、実験に十分な心臓由来の精製ミトコンドリア量を安定して得ることに難渋した。このため、当初の実験計画を変更し、野生型マウス、Toll様受容体9欠損マウスから採取した初代培養心筋細胞に対し、心筋虚血再灌流障害を誘発することとした。今後、心臓由来のミトコンドリアDNAによる心筋細胞内のToll様受容体9活性化を多角的に解析する予定である。

本研究結果より、Toll様受容体9が、心筋梗塞に対する再灌流療法後の最終的な心筋梗塞サイズを増悪させることを明らかにした。心筋梗塞時に破壊された心筋細胞由来のミトコンドリアDNAは、心筋細胞内に取り込まれ、Toll様受容体9を活性化し、細胞死を誘発するため、DNA分解酵素投与により心筋虚血再灌流障害の抑制効果を検討したが、効果は部分的であり、炎症反応の抑制は認めなかった。心筋虚血再灌流障害の治療としては、Toll様受容体9自体の抑制が有効な治療標的となりうることが明らかになった。これまで、心筋虚血再灌流障害においてToll様受容体9、細胞外ミトコンドリアDNAの役割は明らかになっておらず、その一端を明らかにした本研究は、今後の心不全治療開発に重要な意味を持つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
英国	King's College London			