

平成22年5月17日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790987  
 研究課題名(和文) 心筋虚血再灌流障害の発症機序の研究—TLR4のシグナル細胞内伝達経路の解明—  
 研究課題名(英文) Role of Toll-like receptor 4 in myocardial ischemic-reperfusion injury

研究代表者  
 庄村 心 (SHIN SHOMURA)  
 三重大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：70452224

## 研究成果の概要(和文)：

Toll-like receptor 4 (TLR4)を介した細胞内シグナル伝達において MyD88 依存経路が心筋虚血再灌流障害を、MyD88 非依存経路が ischemic preconditioning (IPC)を誘導することが示された。したがって、TLR4 から NF- $\kappa$ B に至るシグナル伝達経路の相違が NF- $\kappa$ B の相反する作用の振り分けに関与していることが示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

Ischemic preconditioning is mediated a MyD88-independent pathway, leading to NF- $\kappa$ B activation and protection against myocardial ischemic-reperfusion injury. We conclude that an activation of MyD88 or TRIF, which are associate proteins of Toll-like receptor 4, would regulate a role of NF- $\kappa$ B to injure or protect myocardium.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：心臓血管外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：外科、移植・再生医療、シグナル伝達、循環器・高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

(1)虚血再灌流障害の発症機序に関して未だ不明な点が多い。心臓血管外科領域において虚血再灌流障害(myocardial ischemia reperfusion injury [MI/R])は先天性複雑心奇形手術や胸腹部大動脈瘤手術などより安全な長時間体外循環が要求される手術において、術後臓器障害や心筋保護の観点からもその機序解明は重要である。また、心・肺のみならずその他の臓器における移植領域に

においても、さらに循環器内科領域における冠動脈形成術においても重要で、広領域にわたる研究課題であることは言うまでもない。

(2)長時間心虚血に先行して短時間虚血が存在すると心筋壊死収縮効果が獲得されることが明らかになってきた(ischemic preconditioning [IPC])が、その機序を解明することで短時間虚血を要することなく心筋保護作用を獲得し虚血再灌流障害を軽減しうる可能性がある。

(3)我々はこれまでマウス心筋虚血再灌流モデルにて虚血再灌流障害の発症機序における Toll-like receptor 4 (TLR4)の関与を明らかにしてきた。TLR4 遺伝子変異マウス (C3H/HeJ)を用いた検討では、リン酸化 JNK、NF- $\kappa$ B、AP-1 活性の抑制の結果、有意な梗塞範囲の縮小を認めた(J Thorac Cardiovasc Surg 128(2):170-9,2004)。TLR4 antagonistを用いた検討でも同様に、リン酸化 JNK、NF- $\kappa$ B、AP-1 活性の抑制の結果、有意な梗塞範囲の縮小を認めた(Circulation 114(1 Suppl):I210-4,2006)。

一方、TLR4/TLR2/MyD88 knockout(KO)マウスを用いた検討において「30 分間虚血+120 分間再灌流」ではいずれの KO マウスでも wild type(WT)マウス(C57BL/6)と比較して有意な梗塞範囲の縮小を認める一方で、「60 分間虚血+120 分間再灌流」では MyD88 KO マウスのみ WT マウスと比較して有意な梗塞範囲の縮小を認めたが、この結果について具体的考察を行うことが出来なかった。

最新の知見にて TLR4/TLR2 からのシグナル伝達経路として既知の MyD88 を経由し NF- $\kappa$ B に到る経路に加え、MyD88 を経由せずに NF- $\kappa$ B に到る経路が示唆されている(図 1、2; Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Semin Immunol;16:3-9,2004)。多分にこのシグナル伝達経路の相違が NF- $\kappa$ B の cytoprotective/cytodestructive 作用の振り分けに関与しているのではないかと仮定される。

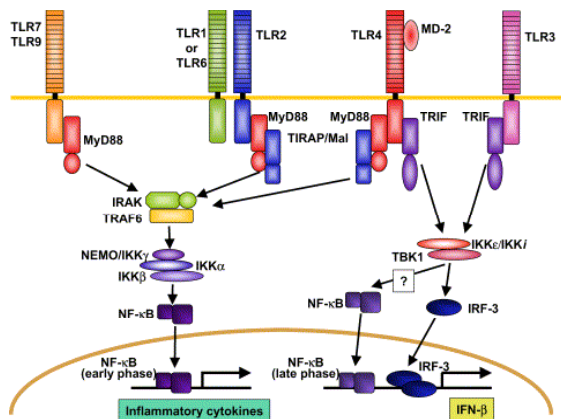


Fig 1. TLR-mediated MyD88-dependent signaling

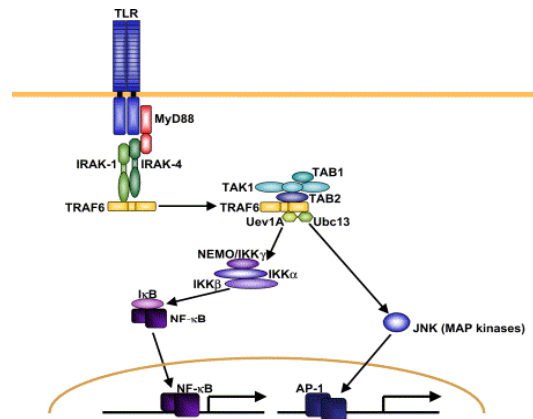


Fig 2. TLR-mediated MyD88-independent signaling

(4)TLR を介したシグナルが虚血再灌流障害で、どのように惹起されるかは未だ明らかにされておらず、虚血再灌流というストレスによって産生・誘導される MAPK、転写因子、炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着分子等の経路を明らかにすることで MI/R を抑制し、心肺移植時の臓器保存法の brake through として臨床に応用される可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

虚血再灌流という酸化ストレスが情報として心筋組織を構成する各細胞内でどのように伝達され、最終的にどの遺伝子を介し、通常虚血再灌流の場合は cytodestructive 機構が、また IPC の場合は cytoprotective 機構がどのように作動するのかわかり、レセプター、細胞内シグナル伝達機構、転写因子、及び mRNA 発現と系統的に解明することで、虚血再灌流障害及び IPC の発症機序を明らかにする。

- ① 虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 の役割を明らかにする(具体的に虚血再灌流という酸化ストレスが心筋を構成するどの細胞においてどのように TLR4 から細胞内シグナル伝達機構に作用するかを明らかにする)。
- ② 虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 以下の細胞内シグナル伝達機構、転写因子、及び mRNA 発現を系統的に明らかにする(具体的にどの伝達経路が関与しているかを明らかにする)。特に本研究では、審良静夫教授(大阪大学微生物研究所)より供与された MyD88/TRIF KO マウスを用いて虚血・再灌流時間による酸化ストレスの相違による細胞内シグナル伝達経路の相違を明らかにする。

## 3. 研究の方法

MyD88 KO マウス及び TRIF KO マウスにて「30 分間虚血+120 分間再灌流」の MI/R モデル、及び「5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+30 分間再灌流」の MI/R モデルを用いて、虚血再灌流時間による酸化ストレスの相違による細胞内シグナル伝達経路の相違を明らかにする。

間再灌流+30分間虚血+120分間再灌流」のIPC+MI/Rモデルを作製し、①梗塞範囲の測定(Evan's Blue/TTC染色法)、②MAPKs(p38、JNK、ERK)活性の測定(Western-blot法)、③転写因子(NF-κB、AP-1)活性の測定(EMSA法)、④炎症性メディエーター(cytokine、chemokine、接着分子等)発現の測定(RPA法及び免疫染色法)、⑤アポトーシス及び関連タンパク質/遺伝子(caspase3、Akt/PI3K等)発現の測定(TUNEL染色法、Western-blot法、酵素活性法、及びRT-PCR法)を行い、酸化ストレスの相違によるMyD88 dependent/MyD88 independent 経路の関与、ひいてはNF-κBのcytoprotective/cytodestructive作用の振り分けへの関与について検討を行った。

#### 4. 研究成果

MI/Rにおいて、TLR4 KO及びMyD88 KOではWTと比べ、梗塞範囲は有意に抑制され、同時にNF-κB活性も有意に抑制された(図3、4)。

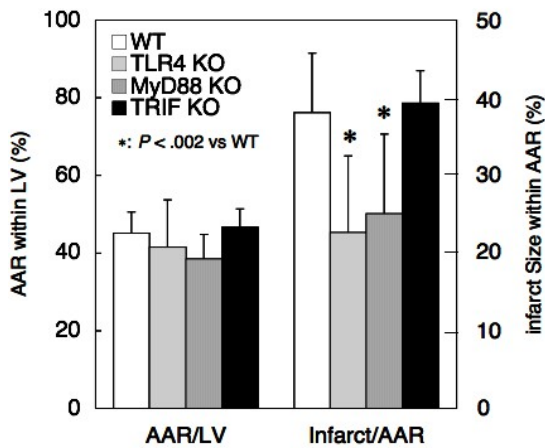


Fig 3. Infarct size after MI/R

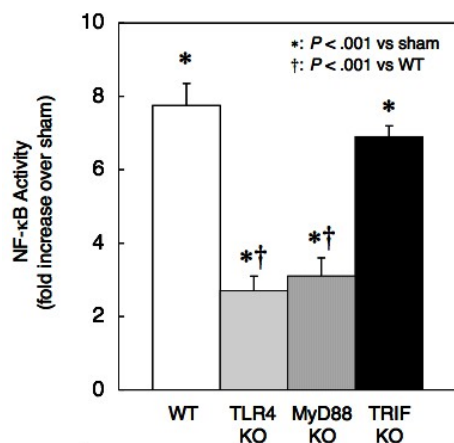


Fig 4. NF-κB activation after MI/R

一方、IPC+MI/RにおいてWT及びMyD88 KOでは、IPC直後にNF-κB活性の有意な上昇を認め、梗塞範囲は有意に抑制されるも、TLR4 KO及びTRIF KOではIPC直後の

NF-κB活性の有意な上昇を認めず、梗塞範囲の抑制を認めなかった(図5、6)。

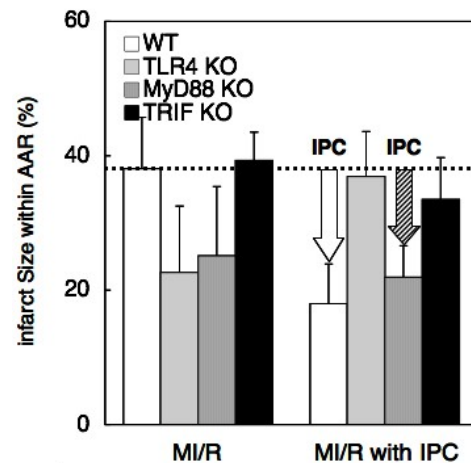


Fig 5. Infarct size after MI/R with IPC

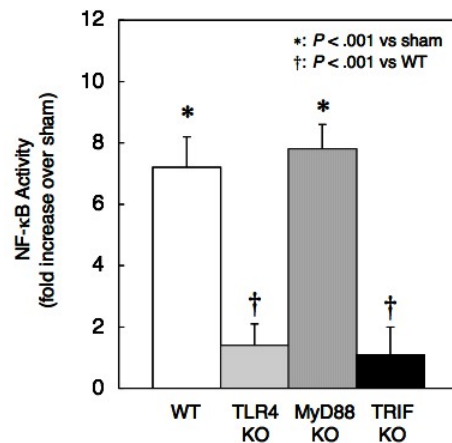


Fig 6. NF-κB activation after MI/R with IPC

以上より、TLR4を介した細胞内シグナル伝達においてMyD88依存経路がMI/Rを、MyD88非依存経路がIPCを誘導することが示された。したがって、TLR4からNF-κBに至るシグナル伝達経路の相違がNF-κBの相反する作用の振り分けに関与していることが示唆された。

#### 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0件)

[学会発表] (計1件)

MyD88-Independent signaling pathway is involved with myocardial ischemic preconditioning.

Shimamoto A, Shomura S, Agnew ML, Rothnie CL, Spring DJ, Shimpo H, Verrier ED.

19<sup>th</sup> World Society of Cardio-Thoracic Surgeons (平成21年11月6日、プエノスアイレス・アルゼンチン)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄村 心 (SHIN SHOMURA)

三重大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70452224