

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860586

研究課題名(和文)心肥大の病態生理における自然炎症の役割及びその分子機構の解明

研究課題名(英文)The Role and the Molecular Mechanisms of Homeostatic Inflammation in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy

研究代表者

東邦 康智 (HIGASHIKUNI, YASUTOMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10586481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自然免疫受容体に着目して心肥大における自然炎症の役割を検討した。まず、Toll様受容体2(TLR2)に着目して検討を行った結果、心臓に圧負荷が加わると、心組織より分泌される熱ショック蛋白質70がTLR2シグナルを活性化し、その結果誘導されるインターロイキン1(IL-1)が代償性心肥大の誘導に重要な役割を果たすことが分かった。さらに、NOD様受容体の形成するNLRP3インフラマソームが、圧負荷後の心組織における活性型IL-1の産生及び代償性心肥大の誘導に深く関与することが分かった。以上より、圧負荷心肥大の病態生理における自然炎症の重要性及びそのメカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of homeostatic inflammation in cardiac hypertrophy, we assessed the role of pattern recognition receptors in the pathophysiology of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. We clarified that Toll-like receptor 2-mediated interleukin 1 production, induced by extracellularly released heat shock protein 70, is essential for adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload. In addition, we found that the NLRP3 inflammasome, a multiprotein complex involved in the innate immune response, regulates active IL-1 production in the heart during pressure overload and contribute to adaptive cardiac hypertrophy. These results revealed the essential role and the underlying mechanisms of homeostatic inflammation in the pathophysiology of pressure overload-induced cardiac hypertrophy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自然炎症 心肥大 心不全 TLR2 熱ショック蛋白質 IL-1 NLRP3 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

高血圧は本邦において有病率の高い疾患であり、高齢化に伴い今後も増加することが懸念されている。その高血圧により引き起こされる心肥大は心不全に至る予後不良の病態であり、その病態生理の解明が重要である (N Engl J Med. 2003;348:2007-2018.)。

近年、生活習慣病や癌などの各種疾患に共通する基盤病態として「自然炎症」という新しい概念が提唱され、注目されている。自然炎症とは自己由来内因性リガンドと病原体センサーとの相互作用により誘導される恒常的な非感染性炎症反応と定義される。健常時には内因性リガンドと病原体センサーとの平衡状態が存在し、実質細胞及び間質細胞を含む組織全体の恒常性維持に貢献していると考えられているが、長期にわたるストレス応答によるこの平衡状態の破綻が様々な臓器障害をもたらすものと考えられている。心肥大の病態生理においても自然炎症が深く関与していると考えられるが、心疾患における自然炎症の役割やその詳細な分子機構は十分に解明されていない。

現在、自己由来内因性リガンドを認識し非感染性炎症反応を惹起する病原体センサーとして、Toll 様受容体 (TLR) や Nod 様受容体が報告されている。我々は、心肥大の病態生理における酸化ストレスの重要性を示してきたが (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32:654-661.)、その酸化ストレス応答への関与が示唆されている TLR2 (Nature. 2010;467:972-6) に着目して研究を開始し、以下の予備的結果を得ていた。

① TLR2 ノックアウトマウスに大動脈縮窄術による圧負荷心肥大を誘導すると、野生型マウスと比較して圧負荷後の心組織における炎症性サイトカインの発現が抑制されており、心筋細胞肥大や心線維化が軽減している。

② 骨髄移植実験を行うと、移植した骨髄の種類 (野生型マウス由来もしくは TLR2 ノックアウトマウス由来) は圧負荷後の表現型に影響を与えない。

以上から、心組織に発現する TLR2 が圧負荷後の心組織における非感染性炎症反応の誘導及び心肥大の病態形成に非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。

よって、心肥大の病態生理における自然炎症の役割及びその分子メカニズムの解明は、心肥大の新たな治療標的の同定及び新規治療法の開発につながる可能性が高く、非常に重要な研究となると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自己由来内因性リガンドを認識する自然免疫受容体である Toll 様受容体及び Nod 様受容体に着目して、心肥大の病態生理における自然炎症の役割及びその分子機構を解明し、新規内因性リガンドを含む新たな治療標的の同定を行うことであり、

心肥大の新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス及び TLR2 ノックアウトマウスに、大動脈縮窄術による圧負荷を誘導し、その表現型や炎症性サイトカインの発現などを評価する。

(2) 心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を用いて、TLR2 の特異的リガンドである Pam3CSK4 刺激に対する各細胞の反応や炎症性サイトカイン発現を評価する。さらに、NF- κ B 阻害薬や炎症性サイトカインに対する中和抗体を用いて、各細胞における Pam3CSK4 の効果が炎症反応誘導経路を介したものであるかどうかを評価する。

(3) 大動脈縮窄術により圧負荷を誘導した野生型マウスに NF- κ B 阻害薬及び炎症性サイトカインに対する中和抗体を投与してその表現型を評価することで、TLR2 シグナルによる炎症反応誘導経路そのものが生体内における心肥大の病態生理に実際に関与しているかどうかを検証する。

(4) 物理的伸展、酸化ストレス、低酸素などのストレスを心筋細胞、線維芽細胞及び血管内皮細胞に加えて、各ストレスの TLR2 シグナル活性化に対する影響を検討し、自己由来内因性リガンドを分泌する細胞とそれに必要な刺激を同定する。

(5) TLR2 の内因性リガンドに関する過去の文献による報告をもとに、(3) の検討により同定した内因性リガンドを分泌する細胞の培地や、マウスの肥大心組織及び血液を解析し、心肥大において重要な役割を果たすことが予想される TLR2 の内因性リガンドの同定を試みる。

(6) 同定した内因性リガンドの生体内における役割を検討するため、同定した内因性リガンドを野生型マウス及び TLR2 ノックアウトマウスに投与して、実際に心組織における炎症性サイトカイン発現を誘導するかどうかを評価する。さらに、同定した内因性リガンドに対する中和抗体を作成し、圧負荷心肥大を誘導した野生型マウスに投与して、その表現型を比較する。以上により、同定した新規内因性リガンドの心肥大の病態生理における重要性を検証する。

(7) 非感染性炎症反応の誘導においては、様々な病原体センサーが相互に関係していることが示唆されており、特に Nod 様受容体 NLRP3 が構成する蛋白複合体である NLRP3 inflammasome は炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 β の活性化に重要な役割を果たしていることが示唆されていることから、NLRP3 ノックアウトマウスを使用し、

圧負荷心肥大における NLRP3 inflammasome の役割を検討する。

4. 研究成果

(1) 野生型及び TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウスに大動脈縮窄術による圧負荷心肥大を誘導すると、術後 14 日目の TLR2KO マウスでは野生型マウスと比較して心肥大及び心線維化が抑制されていたが、心拡大及び左室収縮能の低下を認め、圧負荷に対する適応応答が障害されていることが分かった。TLR2KO マウスでは、心組織における NF- κ B 活性やインターロイキン 1 β (IL-1 β) の発現が低下していた。骨髓移植実験では、骨髓由来細胞ではなく、心組織に発現する TLR2 が圧負荷に対する適応応答に重要であることが分かった。

(2) 細胞実験では、TLR2 特異的アゴニスト Pam3CSK4 の投与により、NF- κ B 及び IL-1 β 依存性に心筋細胞肥大、線維芽細胞・血管内皮細胞増殖が誘導された。

(3) 野生型マウスに NF- κ B 阻害薬及び IL-1 β に対する中和抗体を投与すると、圧負荷に対する代償反応が障害された。以上より、圧負荷心肥大の病態生理においては、TLR2/NF- κ B/IL-1 β 系が重要な役割と果たすことが分かった。

(4) 細胞実験により、酸化ストレスが心筋細胞、線維芽細胞及び血管内皮細胞の TLR2 シグナルを活性化しうることを明らかにした。

(5) TLR2 の内因性活性化物質の探索を行った結果、熱ショック蛋白質 (HSP) 70 が TLR2 を介して心筋細胞肥大、線維芽細胞・血管内皮細胞増殖を誘導することが分かった。実際、圧負荷後の野生型及び TLR2KO マウスでは、血漿中の HSP70 濃度が増加していた。

(6) HSP70 の投与により、野生型マウスでは心組織における NF- κ B 活性、IL-1 β 発現の増加を認めたが、TLR2KO マウスではこれらの増加を認めなかった。HSP70 に対する中和抗体を投与すると、野生型マウスの圧負荷に対する適応応答が障害された。

以上から、心臓に圧負荷が加わると、心組織から HSP70 が放出され、その HSP70 が TLR2 を介して炎症反応を誘導し、代償性心肥大が誘導されることが分かった。

(7) 野生型マウスに大動脈縮窄術による圧負荷心肥大を誘導すると、心組織において NLRP3 の発現が誘導された。NLRP3 ノックアウトマウスに圧負荷を加えると、術後 14 日目では野生型マウスと比較して、心組織における野生型 IL-1 β の産生が抑制され、代償反応が障害されていることが分かった。以上よ

り、代償性心肥大の誘導に重要である IL-1 β の産生には、TLR2 シグナルに加えて NLRP3 インフラマソームの活性化が必要であることが分かった。今後、NLRP3 インフラマソームの活性化メカニズムの解明を進めていく必要がある。

(8) 本研究では、心肥大の病態生理における自然炎症の役割とその分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。今後、本研究成果の臨床応用に向けて、さらなる詳細なメカニズムの解明とヒトでの評価を行っていく必要がある。

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 2 件)

(1) Higashikuni Y, Tanaka K, Kato M, Nureki O, Hirata Y, Nagai R, Komuro I, Sata M. Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1 β upregulation via nuclear factor κ B activation. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000267.

(2) 東邦康智、小室一成、高血圧性心疾患の病態生理における自然炎症の役割を識る、*Heart View*, 17 巻、2013、87-92

[学会発表] (計 16 件)

① Higashikuni Y, Nagai R, Sata M, Komuro I. Pathogen receptor-mediated inflammation contributes to adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload. 第 20 回国際心臓研究会日本部会総会, San Diego, USA, 2013.

② 東邦康智、佐田政隆、小室一成. 高血圧による炎症誘導メカニズムの解明とその心肥大における役割の検討, 第 19 回 TMFC 研究発表会, 大阪, 2013.

③ Higashikuni Y, Sata M, Komuro I. Role of pathogen receptor-mediated non-infectious inflammation in cardiac adaptive response to pressure overload. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会, 大阪, 2013.

④ Higashikuni Y, Nagai R, Sata M, Komuro I. Toll-Like Receptor 2-Mediated Inflammation Induces Adaptive Cardiac Hypertrophy in Response to Pressure Overload. AHA Scientific Sessions 2013, Dalla, USA, 2013.

⑤ 東邦康智、佐田政隆、小室一成. 自然免

疫受容体を介した炎症反応が心臓の圧負荷に対する適応応答を誘導する, 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会, 大阪, 2013.

⑥ 東邦康智、佐田政隆、小室一成. 高血圧性心疾患における自然免疫系の役割. 第 8 回高血圧と冠動脈疾患研究会, 東京, 2013.

⑦ Higashikuni Y, Sata M, Komuro I. Pathogen Recognition Receptors-Mediated Inflammation Induces Adaptive Cardiac Hypertrophy. Keystone Symposia, Keystone, USA, 2013.

⑧ 東邦康智、小室一成、佐田政隆. 心肥大の病態生理における NLRP3 インフラマソームを介した心脳連関の役割. 第 10 回宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎, 2014.

⑨ Higashikuni Y, Sata M, Komuro I. NLRP3 inflammasome activation through the heart-brain interaction contributes to adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会, 東京, 2014.

⑩ 東邦康智、佐田政隆、小室一成. 圧負荷心肥大の病態生理における NLRP3 インフラマソームを介した心脳連関の役割. 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会, 東京, 2014.

⑪ Higashikuni Y, Sata M, Komuro I. NLRP3 inflammasome activation through the heart-brain interaction is important for adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload. The 18th International Vascular Biology Meeting, 京都, 2014.

⑫ 東邦康智、佐田政隆、小室一成. 圧負荷心肥大における NLRP3 インフラマソームを介した心脳連関の役割. 第 35 回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014.

⑬ 東邦康智、佐田政隆、小室一成. 圧負荷心肥大における心脳連関を介した炎症制御メカニズムとその役割. 第 37 回日本高血圧学会総会, 横浜, 2014.

⑭ Higashikuni Y, Sata M, Komuro I. The central nervous system regulates inflammation and cardiac remodeling during pressure overload through NLRP3 inflammasome activation. AHA Scientific Sessions 2014, Chicago, USA, 2014.

⑮ 東邦康智、佐田政隆、小室一成. 心疾患における自然炎症の役割とその制御機構. 第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 横浜, 2014.

⑯ Higashikuni Y. The Role and the Regulatory Mechanisms of Homeostatic Inflammation in Heart Disease. The 3rd Homeostatic Inflammation International Symposium, 東京, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://plaza.umin.ac.jp/~utok-card/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東邦 康智 (HIGASHIKUNI YASUTOMI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10586481

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: