

論 文 要 旨

The Role of Infection in the Development of non-Valvular Atrial Fibrillation: Up-regulation of Toll-like Receptor 2 Expression Levels on Monocytes

心房細動における感染性炎症の役割

—単球膜上 Toll-like Receptor2 発現量増加—

市來 仁志

【序論および目的】

Many studies have suggested that an inflammation may participate in the pathogenesis of non-valvular atrial fibrillation (AF). However, it has been unknown by exposure to what the inflammation is caused. Recently, we reported that Toll-like receptor 2 (TLR2) level on monocyte was significantly up-regulated in viral and bacterial infections, but not in non-infectious inflammatory states. Our purpose was to test the hypothesis that expression of TLR2 level may be up-regulated in patients with non-valvular AF.

【材料および方法】

The consecutive patients with non-valvular AF (“Non-valvular AF” group, $n = 48$) who were hospitalized for catheter ablation were enrolled in this study. TLR2 levels were assayed by using flow-cytometric analysis and compared with volunteers in sinus rhythm (“Control” group, $n = 24$). Additionally, C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) levels were assayed, and the left atrial volume indexes (LAVI) in “Non-valvular AF” group were measured.

【結 果】

The results demonstrated that TLR2 levels in the “Non-valvular AF” group were significantly higher than in the “Control” group (median, 4682 vs. 3866 sites/cell; $p < 0.01$). Moreover, non-valvular AF patients had significantly higher IL-6 levels than controls. However, there was no significant difference in CRP levels between the two groups. It was observed in 44 AF patients, in whom PV isolation was confirmed to be successful, that the LAVI significantly diminished one month after ablation (median, 33.6 vs. 29.5 ml/m²; $p < 0.001$), but not the TLR2 and IL-6 levels.

【結論及び考察】

In the present study, we examined the differences in serological/biological markers between “Non-valvular AF” and “Control” groups. The result showed that TLR2 expression levels and

IL-6 levels were significantly higher in non-valvular AF patients than in control patients. Subsequently, it was demonstrated that TLR2 levels were moderately correlated with IL-6 levels, but not with CRP levels. Furthermore, although the TLR2 expression levels and IL-6 levels in “Non-valvular AF” remained elevated one month after successful ablation, it was demonstrated that the LAVI significantly diminished. In conclusion, our results suggested that an infectious inflammation, characterized by TLR2 up-regulation on monocytes, may participate in the pathogenesis of non-valvular AF.

(Journal of Cardiology Vol., No. 2009年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 56 号		学位申請者	市来 仁志
審査委員	主査	松山 隆美	学位	博士 (医学)
	副査	有馬 直道	副査	小宮 節郎
	副査	竹中 俊宏	副査	新村 英士

The Role of Infection in the Development of non-Valvular Atrial Fibrillation: Up-regulation of Toll-like Receptor 2 Expression Levels on Monocytes

(心房細動における感染性炎症の役割：単球膜上 Toll-like Receptor2 発現量増加)

これまで、心房細動の病因に炎症が関与している可能性があることが数多く報告されてきているが、どのような炎症が起こっているかについては良く分かっていない。一方、学位申請者らのグループは、単球上 Toll-like receptor 2 (TLR2) 発現量が、ウイルス感染症や細菌感染症では有意に増加するが、非感染性炎症疾患では増加しないことを報告している。そこで、学位申請者らは、非弁膜症性心房細動患者において、TLR2 発現量を測定し、心房細動患者の病態に炎症、特に感染性炎症が関与しているかどうかを検討した。心房細動に対するカテーテルアブレーション目的にて入院となった非弁膜症性心房細動患者 48 名を対象とした。TLR2 発現量はフローサイトメーターを用いて測定し、洞調律の健常者 24 名の TLR2 発現量と比較した。さらに、C-reactive protein (CRP) とインターロイキン-6 (IL-6) も測定し、非弁膜症性心房細動患者群の左房容量係数 (LAVI) も計測した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 非弁膜症性心房細動患者群の TLR2 発現量は、健常者群と比較して有意に高値を示した (中央値, 4682 vs. 3866 sites/cell; $P < 0.01$)。
- 2) 非弁膜症性心房細動患者群の IL-6 は、健常者群より有意に高値を示した (中央値, 1.58 vs. 0.99 pg/ml; $P < 0.05$) が、CRP は両群で有意差を認めなかった。
- 4) 非弁膜症性心房細動患者群で肺静脈隔離術後に心房細動再発を認めなかった 44 名では、アブレーション1ヵ月後の LAVI は有意に縮小していた (中央値, 33.6 vs. 29.5 ml/m²; $P < 0.01$) が、TLR2 発現量と IL-6 は有意な変化は認めなかった。

本研究は、非弁膜症性心房細動患者で TLR2 発現量を測定することで、心房細動と炎症との関与を検討したものである。アブレーション前後で TLR2 発現量は変化せず、心房細動の原因として上昇している可能性が示唆された。さらに末梢静脈血よりも左房血で TLR2 が有意に高値を示したことから、炎症が心房細動の病因に関与している可能性が示され、臨床的意義の高い研究である。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 56 号	学位申請者	市来 仁志
審査委員	主査	松山 隆美	学位 博士 (医学)
	副査	有馬 直道	副査 小宮 節郎
	副査	竹中 俊宏	副査 新村 英士
<p>主査および副査の5名は、平成21年2月16日、学位申請者 市来 仁志君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) コントロール群の中でも、高血圧、高脂血症、糖尿病等がない healthy 群とこれらリスクファクターを持つ群とに分けて比較した場合、TLR2 値の違いが認められないか？</p> <p>(回答) そのような群に分けても TLR2 値に差は認めなかった。さらに CRP、IL-6 等でも有意な差は認めなかった。</p> <p>質問2) 今回の研究で、非弁膜症性心房細動群とコントロール群で、CRP や PIIINP で有意差を認めなかった理由をどのように解釈するのか？</p> <p>(回答) 心室に比べ心房では変性し置き換わる線維量が少ないこと、また、アブレーションの適応となる発作性あるいは持続性心房細動患者が対象であり、高度な心房筋の線維化を来たしている症例が少なかったことなどが、本結果に影響していると考えられる。CRP は、ウイルス感染 (Th1 優位) をとらえる指標としては、その感度において劣る。Th1 優位の炎症疾患において単球膜上 TLR2 の発現量増加が認められ、逆に Th2 優位の炎症疾患では TLR2 発現量に変化を認めないことを確かめた。In vitro 実験においては、Th1 サイトカインで単球刺激した場合、TLR2 の発現量増加が認められ、Th2 サイトカインの一種 IL-4 で刺激すれば、TLR2 発現量は半減することを確認している。このように CRP と TLR2 は、それぞれ異なった性質をもつ炎症マーカーである。CRP で有意差が認められなかったことは、CRP でとらえ難い炎症の存在の可能性を暗示し、一方、TLR2 発現量では有意差が認められたことにより、Th1 有意の炎症 (CRP マーカーではとらえ難い) が心房細動患者で持続している可能性を示唆したものであると考えられた。</p> <p>質問3) 心房細動に対するアブレーション1ヵ月後、TLR2 は変化せず高値が持続している事実は、炎症が残っていると考える良いのか？ 今後、心房細動に対する抗炎症薬という治療がスタンダードになる可能性はあるか？</p> <p>(回答) 治療として施行した肺静脈隔離術は、心房細動の基質に対する治療でなく、トリガーに対する治療であって、決して基質炎症を抑えるものではない。したがって、心房での炎症が持続していてもなんら矛盾はない。現在、抗炎症薬としても位置づけられた ACE 阻害薬、ARB、スタチンが心房細動に対する治療として期待できると考え、今後の検討課題としたい。もっと強力な抗炎症作用をもつステロイドについて、いくつかの論文で心房細動に対して有効であったとする報告もあるが、その副作用を考えると、スタンダードな治療にはし難い。</p> <p>質問4) 対象患者の内服薬について、ACE 阻害薬、ARB、スタチン以外の例えば、アスピリンやステロイド、NSAIDs などは両群で差はなかったのか？</p> <p>(回答) ステロイド、アスピリン、NSAIDs いずれにおいても有意差はなかった。</p> <p>質問5) IL-6 と TLR2 の相関のグラフについて、はずれ値の検体の一例を除いても有意な相関が認められるか？</p> <p>(回答) その場合も、同様に IL-6 と TLR2 の相関は認められた。</p> <p>質問6) TLR2 がアブレーション1ヵ月後も高値が持続していたということであるが、TLR2 がアブレーションに反応して上昇したというようなことは考えられないか？術直後に TLR2 を測定してみたいのか？また、持続性の何</p>			

らかの炎症が続いていると判断するとすれば、具体的にはどのようなものが原因と考えられるか？

(回答) 数少ないが、熱傷患者(非感染性炎症)ではTLR2が上昇しないという事実をみると、アブレーションによってTLR2発現量が修飾される可能性はないとみている。残念ながら、術直後の評価は行なっていないが、1、3、6ヵ月後での経過観察をしており、その結果では、6ヵ月後の時点でも心房細動が再発していない群でも、TLR2は高値を持続していた。この結果からもアブレーションによる修飾の可能性は低いと考えられる。炎症の具体的な原因については、あくまでも推測になってしまうが、心筋炎、場合によっては心房のみに限局した心房心筋炎のようなものを想定している。原因として、コクサッキーウイルスのようなcardiotropic virusesなどを推測している(ただし、本質は病原体の存在ではなく、それに対する炎症免疫応答の遷延化)。

質問7) 心房細動患者の心房筋組織において、慢性心房細動では、発作性心房細動に比較して、心内膜側のみにマクロファージが発現しているのではなく心筋内に浸潤しているということであったが、それだけではなくマクロファージの数自体も多く認められるようであるが、それに対する考察はどうか？

(回答) 心筋組織に浸潤したマクロファージは増殖分裂を繰り返し、また心房よりたくさんの単球が遊走・内膜接着を促進するという炎症担当細胞増加の悪循環を作り出していると推測、慢性化に至ると考えている。

質問8) 感染症疾患におけるTLR2発現レベルの論文で示したコントロール群のTLR2値が4567であり、本研究のコントロール群のTLR値3866に比べて高値である。本研究の非弁膜症性心房細動患者群と比較すると有意差がなくなるように思われるが、この点についての考察は？

(回答) 健常者でも、TLR2は年齢が高くなるほど高値を示すこと、また、女性では男性よりも高値を示すことを確認している。本研究では、心房細動群と年齢・性をマッチングさせたコントロール群であり、以前の論文でのコントロール群とは異なる。年齢が若く男性が80%程度を占め、本コントロール群では低いTLR2レベルとなった。

質問9) 心房細動患者群において、ACE阻害薬、ARB、スタチンの内服の有無によりTLR2値に差がみられたか？

(回答) 症例数は少ないため、これに関しては統計処理が出来る段階ではない。

質問10) なぜ、左房血の方が、末梢静脈血よりTLR2発現量が高値であったと考えているか？また、左房血でIL-6やCRPも合わせて測定してみたか？

(回答) 心房内採血の箇所は、炎症箇所に近く、活性(遊走能)の高い単球が心房内に遊走していること、あるいは、心内膜に接着していた単球は接着・剥離を繰り返していると考えられる。その部分での採血であるために、TLR2高発現の単球がとらえられた可能性を考えている。残念ながら、IL-6やCRPの左房血での測定は行なっていない。

質問11) アブレーション後も心房の炎症が持続しているということだが、アブレーション後の心房細動再発を阻止する治療としてどのようなものが有効と考えているか？

(回答) 現在のところは、炎症作用のある薬物として、ACE阻害薬、ARB、スタチンに期待したいと考えている。

質問12) 先生方が2007年と2008年に報告した論文の中、TLR2測定系で、CV<6.5、CV<6.8と記載があったが、このように誤差が考えられる中、本論文のような微妙な有意差を議論できるのか？

(回答) CV<6.5、CV<6.8という誤差は、検体を凍結保存、フローサイトメトリーの電子増倍管の感度を故意に変化させた場合における揺らぎの数値を試した結果である。今回の測定では、検体の凍結保存もせず(凍結保存で著しくTLR2発現量に変化が出ることが判明したため)、光電子増倍管の感度も変えずに測定した。したがって、このような誤差が出るとは考え難く、本論文の結果の微妙な有意差にも耐えられると考えている。

質問13) 単球TLR2の発現上昇は、単球の活性化と関連していることなのか？

(回答) 我々の行なったin vitro実験でも、TLR2の発現が高まっている単球は、そのリガンドPam3による刺激によるサイトカイン分泌能が上昇していることを確認している。サイトカイン分泌能の上昇をもって単球の活性化とはできないが、他の研究施設から報告された論文を参考にしても、そのほとんどの結果で、単球TLR2の発現増強が、このようなサイトカイン分泌能を含め、食食能、遊走能、マクロファージへの分化を促進することを暗示している。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。