

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590905

研究課題名（和文）：心筋症における単球膜上トールライクレセプター発現量の検討

研究課題名（英文）：Toll-like receptor expression level on circulating monocyte in cardiomyopathy

研究代表者：

濱崎 秀一 (HAMASAKI SYUICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10315434

研究成果の概要（和文）：慢性心筋炎から拡張型心筋症に移行する inflammatory cardiomyopathy という新たな心筋症概念の炎症活動性は TLR2 値の高低でとらえられるという仮説を検証しようとしたが、明らかな相関関係は見いだせなかった。TLR2 が拡張型心筋症の診断の際のマーカーとしての有用である可能性も検証しようとしたが、明らかな関連性はみとめられていない。しかしながら、心サルコイドーシスにおいては、TLR2 は極めて高値を示し、診断のためのマーカーとしての有用である可能性が確認された。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that Toll-like receptor 2 (TLR2) expression level on monocytes can be useful as a marker of inflammatory activity in inflammatory cardiomyopathy as a new concept which chronic myocarditis evolves to dilated cardiomyopathy. Thus, we tried to validate our hypothesis by comparing pathological findings of species derived from myocardium with TLR2 expression level on monocytes, but our trial ended up in failure. We could not either verify the usefulness of Toll-like receptor 2 expression level on monocytes for establishing the diagnostic criteria of dilated cardiomyopathy as an inflammatory cardiomyopathy. Although the patients who were diagnosed as cardiac sarcoidosis showed extremely higher level of TLR2, which may suggest that TLR2 expression level on monocytes is identified as a significant contributor for cardiac sarcoidosis. Therefore, high TLR2 expression level on monocytes may be an independent risk factor for cardiac sarcoidosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

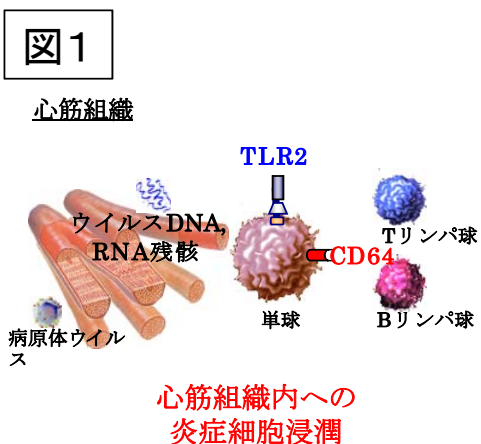
研究分野：循環器疾患分野

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：①臨床 ②内科 ③循環器 ④心筋症 ⑤感染症

### 1. 研究開始当初の背景

左室機能不全症の成因に関して、遺伝性疾患が 30-40%を占め最も多いとされているが、急性心筋炎から拡張型心筋症への移行は 21%に認められたと報告され、慢性心筋炎から拡張型心筋症に至る **inflammatory cardiomyopathy** という新たな心筋症概念が導入された。現在、原因ウイルス感染の有無、原因ウイルスの DNA, RNA の永続的存在の有無、心筋組織炎症の有無などを用いて診断基準を作成する努力が進行中である。しかし拡張型心筋症への移行をモニタリングする指標として心筋生検所見以外に感度・特異度ともに高い血液・血清学的指標の開発が望まれている。Toll-like receptors (TLRs: TLR 1-12) は、自然免疫担当細胞において、各々異なる種類の病原体の構成成分を特異的に認識する **receptor** として発見され、自然免疫から獲得免疫を誘導する重要な **receptor** 群であることが明らかにされた。我々は独自の方法を用いて単球一細胞膜上あたりの TLR2 の発現量をフローサイトメトリーを用いて普遍的基準をもって定量化する方法を確立した (特願 2006-332671)。そして細菌感染症における単球膜上 TLR2 発現量変化に重要な意味を見出し(Orihara K et al. Clin Exp Immunol. 2007;148:260-270.)、さらに、ウイルス感染症において細菌感染症にも増して有意に高値を示し、感染経過のモニタリングが可能になることを発見した(Kajiya T et al. J Infect. 2008;57:249-259.)。以上のことより TLR2 定量系を用いることで心筋炎の原因ウイルスに対する免疫炎症反応をモニタリングできる可能性は高く、拡張型心筋症への移行のモニタリング指標として有用である可能性があると思われる (図 1)。

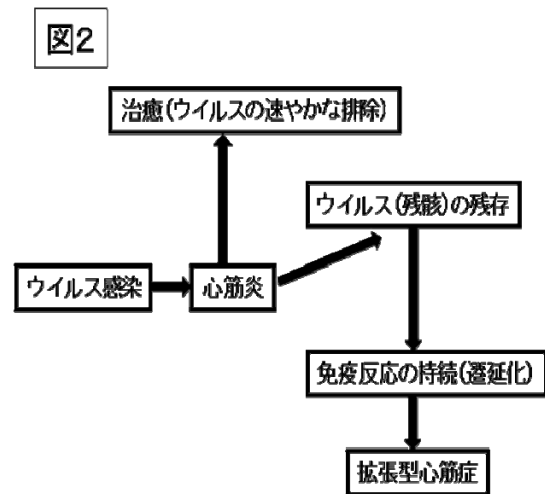


拡張型心筋症(DCM)の有力な  
病因のひとつである心筋炎

### Inflammatory Cardiomyopathy

感染を基礎とした遷延する心筋障害。この機序にはウイルスの持続的感染だけではなく、免疫的異常・遷延化の関与が想定されている (図 2)。

**Cardiotropic viruses** : エンテロウイルス (コクサッキーウイルス B 群、エコーウイルス)、EB ウイルス、C 型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス。



### 2. 研究の目的

拡張型心筋症の一部は慢性心筋炎から移行したものであるとする **inflammatory cardiomyopathy** の概念に基づき、TLR2 がその病態を高い特異性をもってとらえ、さらにはその病状の進行をモニタリングできる可能性を検証すること。

### 3. 研究の方法

(1)従来、TLR2 に限らず、細胞 1 個あたりの細胞膜上レセプター量は、フローサイトメトリー機器を用いて、レセプター抗原特異的に結合する蛍光標識抗体で目的とする細胞の染色処理を施して後に、蛍光標識抗体が放つ光量を光電子増倍管による電流に変換することで、細胞一個あたりのレセプター量を数値化してきた。しかしながら、この場合、二つの原因に基づく数値結果の「ばらつき」は避けられない。

(a) 蛍光標識抗体が抗原レセプターを認識する上で、抗体製品番号差間、抗体 Lot 差間における抗原-抗体結合能力の差。

(b) 測定時毎の光電子増倍管の感度を含むフローサイトメトリー機器設定のばらつき。上記の問題を解決するために、フローサイトメーター機器を用いての測定系において、普

遍的基準となる尺度を設け、細胞膜上の TLR2 の発現量を定量化する方法論を考案し、ばらつきの要因を排除できない前提の下、得られる測定数値にばらつきをみない測定系を確立した。本研究は、上記フローサイトメトリー測定系を用いて、末梢血液中の単球 TLR2 の発現量の測定を行った。

(2)心エコー検査と ANP, ANP, TNF- $\alpha$  などの血液学的マーカーにより心不全の有無を検討し、さらに拡張型心筋症を特定していく。

(3)心筋生検を行い、炎症細胞の浸潤の有無と繊維化の程度を検討する。

(4)末梢循環血を採取し、我々が独自に開発した TLR 測定系 (特願 2006-332671) により単球上 TLR2 発現量変化の測定を行い、健康者との比較を行う。単球上レセプターとして CD64 発現量 (ウイルス感染症で高発現することを確認済み) も検討する。

(5)心筋組織で認められた炎症の程度と末梢循環血中 TLR2 発現量に相関がみとめられるか否か、心筋症への移行経過および心不全の臨床経過と TLR2 発現量との関連について検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1)心エコー検査と血液学的マーカーによる拡張型心筋症の特定に関しては、LVd, LVd, LVEF, E/E', LV Tei-index, LVIVSth, LVPWth などの心エコー指標と ANP, BNP の心不全マーカーならびに炎症マーカーである TNF- $\alpha$  との相関性を検討したが有意な関連性はみとめられなかった。

(2)心筋生検による炎症細胞の浸潤の有無と繊維化の程度の検討については1例のみでしか心筋生検の承諾を得ることができずなかったために、統計的な解析は行えなかった。

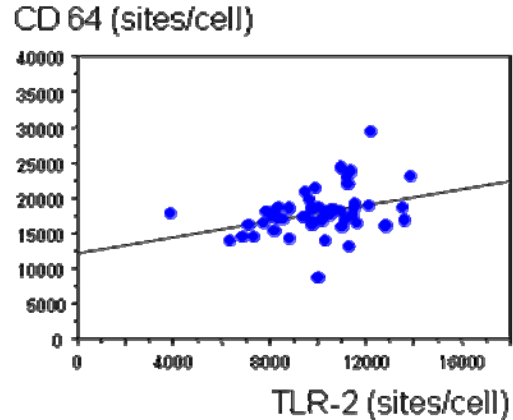
(3)末梢循環血の TLR2 発現量変化と単球上レセプターとしての CD64 発現量の関連に関しては、左室機能低下症例では有意の関連性は同定できなかったが、心房細動症例 50 例で測定し、解析した結果、下図のように TLR2 発現量と CD64 には有意な正の相関がみとめられた ( $R=0.35$ ,  $P=0.014$ ) (図3)。

このことは心房細動症例群の中にウイルス等の感染の既往があり、それに対し、相応の免疫応答が行われたことを示唆する所見ではないかと思われる。心房筋における感染と免疫応答の関連が心房細動をひきおこしている機序も想定される結果であると思われる。

このことより、心筋炎症例においても今後、症例が増加することにより、感染と免疫応答の関連性を示唆するデータが得られ、かつ左室の壁運動の低下ないし心筋の繊維化が進行し拡張型心筋症へと移行していく病像の

推移とリンクできるデータが蓄積されていく可能性があると思われる。

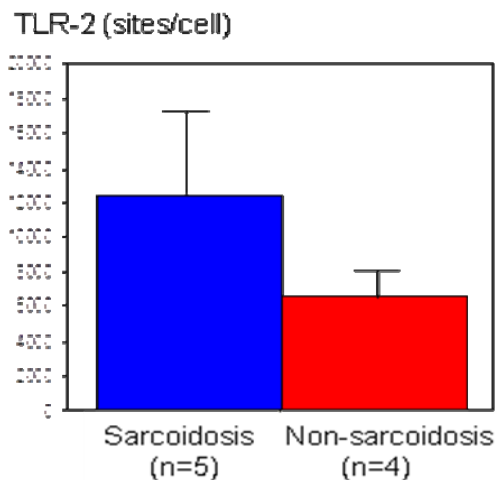
図3



(4)心筋組織で認められた炎症の程度と末梢循環血中 TLR2 発現量の相関については1例のみでしか心筋生検の承諾を得ることができなかつたために、統計的な解析は行えなかつた。

(5)心サルコイドーシスにおける TLR2 発現量の検討に関しては、まず心サルコイドーシスを疑われ、精査を行った患者 9 症例のうち、1)主徴候 4 項目中 2 項目以上が陽性の場合 2)主徴候 4 項目中 1 項目が陽性で、副徴候 5 項目中 2 項目以上が陽性の場合を満たす症例を心サルコイドーシスと診断した。心サルコイドーシスと診断した 5 症例と確定診断に至らなかつた 4 症例を比較検討した (図4)。

図4



心サルコイドーシス群と非心サルコイドーシス群では、TLR2の平均値は、症例数が少ないため統計的な有意差は算出できないが、心サルコイドーシス群のTLR2値が明らかに非心サルコイドーシス群に比し高い傾向を示した(12387.2 ± 5197.2 vs. 6546.3 ± 1231.6 cites/cell)。症例を積み重ねることで統計的にも有意な結論が得られる可能性が期待される。その場合、心サルコイドーシスの病態として感染が原因論として浮上する可能性があり、感染を契機として生じた免疫応答が過剰に発現ないし、遷延化していることが心サルコイドーシスの発生機序として推測される。今後の研究で明らかにしていきたい。

#### 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3件)

- (1) Reevaluation of quantitative flow cytometric analysis for TLR2 on monocytes using F(ab')<sub>2</sub> fragments of monoclonal antibodies. Oba R, Orihara K, Kumagai T, Hirai H, Nagata K, Hamasaki S, Tei C, Masataka N. Cytometry A. 2011;79:247-255. (査読有)
- (2) High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes is an important risk factor for arteriosclerotic disease. Kuwahata S, Fujita S, Orihara K, Hamasaki S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Ishida S, Kataoka T, Oketani N, Ichiki H, Iriki Y, Saihara K, Okui H, Ninomiya Y, Tei C. Atherosclerosis. 2010 ;209:248-254. (査読有)
- (3) The role of infection in the development of non-valvular atrial fibrillation: up-regulation of Toll-like receptor 2 expression levels on monocytes. Ichiki H, Orihara K, Hamasaki S, Ishida S, Oketani N, Iriki Y, Ninomiya Y, Okui H, Kuwahata S, Fujita S, Matsushita T, Yoshifuku S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Tei C. J Cardiol. 2009;53:127-135. (査読有)

[学会発表] (計6件)

- (1) 第76回日本循環器学会 2012年3月16日 (福岡)  
Symposium, Modulation of Toll-like receptor 2 on chronic inflammation in patients with atherosclerosis and atrial fibrillation. Orihara K, Kuwahata S, Fujita S, Hamasaki S, Ishida S, Kataoka T, Oketani N, Ichiki H, Iriki Y, Okui H, Ninomiya Y, Tei C.
- (2) 第15回日本心不全学会 2011年10月13日 (鹿児島)  
Symposium, The up-regulation of Toll-like receptor 2 in patients with atrial fibrillation and atherosclerosis. Ichiki H, Orihara K,

Hamasaki S, Ishida S, Oketani N, Iriki Y, Okui H, Kuwahata S, Fujita S, Tei C.

- (3) 第75回日本循環器学会 2011年8月3日 (横浜)

The comparison of biomarkers, left atrial volume, and the extent of CFAE areas in paroxysmal and persistent AF patients who underwent AF ablation solely guided by CFAE. Ichiki H, Orihara K, Oketani N, Ishida S, Okui H, Iriki Y, Ninomiya Y, Maenosono R, Matsushita T, Hamasaki S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Tei C.

- (4) 第75回日本循環器学会 2011年8月3日 (横浜)

Key note lecture, High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes as a new risk factor for arteriosclerotic disease. Hamasaki S, Orihara K, Kuwahata S, Fujita S, Tei C.

- (5) 第73回日本循環器学会 2009年3月21日 (大阪)

Biomarker to predict the AF recurrence after catheter ablation for non-valvular atrial fibrillation. Ichiki H, Orihara K, Ishida S, Oketani N, Iriki Y, Ninomiya Y, Okui H, Matsushita T, Fujita S, Kuwahata S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Hamasaki S, Tei C.

- (6) 第73回日本循環器学会 2009年3月21日 (大阪)

Role of Infectious Inflammation for Atherogenesis: Toll-like Receptor 2 vs. C-reactive Protein. So Kuwahata S, Fujita S, Orihara K, Hamasaki S, Kataoka T, Saihara K, Ishida S, Ichiki H, Oketani N, Ninomiya Y, Okui H, Oba R, Hirai H, Nagata K, Tei C.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

濱崎 秀一 (HAMASAKI SYUICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10315434

##### (2) 研究分担者

鄭 忠和 (TEI CYUWA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10163891

片岡 哲郎 (KATAOKA TETSURO)

鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・助教

研究者番号：70457662

石田 実雅 (ISHIDA SANEMASA)

鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・講師

研究者番号：30444889

折原 弘治 (ORIHARA KOJI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：90457664