

## 論 文 要 旨

### Association between Toll-Like Receptors and the Extent and Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina

安定狭心症患者における toll-like receptor (TLR) 発現量と冠動脈疾患の罹患範囲と重症度との関連についての検討

溝口 悦子

【序論】哺乳動物における自然免疫は、獲得免疫の成立までの一時しのぎと考えられていたが、TLR を介して感染初期に病原体を迅速に認識してその排除を行い、獲得免疫の誘導に必須であることが明らかとなってきた。

TLRs は、各種病原体の構成成分を認識するレセプターとして発見され、これらが、病原体 (非自己) 認識の役割を担い、その後の炎症、免疫システムを誘導する重要なレセプターであることが理解されるようになった。

一方、動脈硬化病変は、慢性的な炎症性疾患としての性格も帯び、単球/マクロファージ系の炎症細胞の動脈壁への浸潤は、病態進展の重要なステップとなる。

これらの免疫研究分野での Toll-like receptor に関する新知見が、なお一層の動脈硬化病態の解明につながる可能性をもつと考えられる。

【目的】本研究の目的は、冠動脈疾患 (安定狭心症) 群 (n=62) から末梢血液サンプルを採取し、各群での単球上の TLR 1, TLR 2, TLR 4 量を比較し、冠動脈疾患患者群において発現量の上昇を検討し、TLRs 発現量と冠動脈疾患 (CAD) の罹患範囲と重症度との関連を決定することである。ただし、感染症例および不安定狭心症・急性心筋梗塞患者は除外した。

【方法】冠動脈硬化症の重症度を評価するために、冠動脈造影所見に基づく罹患枝数と Gensini スコアを用いた全ての患者で末梢血をヘパリン入り注射器で 30 ml 採血し、リンフォプレプを用いて、マクロファージ、単球、樹状細胞などの単核球細胞を分離し、凍結保存し、CD14+単球の TLR1、2 と 4 の発現量は、フローサイトメトリーを用いて分析した。

【結果】TLR2 は、罹患枝数と Gensini スコアに対し、それぞれで正の相関を示した。(r=0.46, p<0.001; r=0.32, p<0.02) TLR4 も、罹患枝数と Gensini スコアに対し、それぞれで正の相関を示した。(r=0.47, p<0.001; r=0.29, p<0.05) TLR1 では、罹患枝数と Gensini スコ

アのいずれに対しても有意な相関は認めなかった。さらに、高感度 CRP でも罹患枝数と Gensini スコアのいずれに対しても有意の相関は認めなかった。

**【結語】** TLR2 と TLR4 の発現量は、安定狭心症患者における冠動脈病変の範囲と重症度に相関することが示唆された。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 15 号	学位申請者	溝口 悦子
審査委員	主査	馬場 昌範	学位 博士 (医学)
	副査	坂田 隆造	副査 有馬 直道
	副査	竹中 俊宏	副査 新村 英士

### Association between Toll-Like Receptors and the Extent and Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina

(安定狭心症患者における toll-like receptor (TLR) 発現量と冠動脈疾患の罹患範囲と重症度との関連についての検討)

哺乳動物における自然免疫は、獲得免疫の成立までの一時しのぎと考えられていたが、TLR を介して感染初期に病原体を迅速に認識してその排除を行うとともに、獲得免疫の誘導に必須であることが明らかとなってきた。TLR は、各種病原体の構成成分を認識するレセプターとして発見され、これらが病原体 (非自己) 認識の役割を担うとともに、その後の炎症・免疫システムを誘導するために、重要な役割を果たしていると理解されるようになった。一方、動脈硬化病変は、慢性的な炎症性疾患としての性格も帯び、単球/マクロファージ系の炎症細胞の動脈壁への浸潤は、病態進展の重要なステップとなっている。これらのことから、免疫研究分野での TLR に関する新知見が、動脈硬化病態に関するなお一層の解明につながる可能性をもつと考えられる。

そこで学位申請者らは、冠動脈疾患 (安定狭心症) 患者 (n=62) において、単球上の TLR1, TLR2, および TLR4 発現量を冠動脈疾患の罹患範囲および重症度と比較検討した。冠状動脈疾患の罹患範囲および重症度評価は、冠動脈造影所見に基づく罹患枝数と Gensini スコアを用い、TLR の発現量は、患者から採取した CD14 陽性単球をフローサイトメーターで分析した。同様にして、安定狭心症患者における高感度 CRP レベルと冠動脈疾患の罹患範囲および重症度についても比較検討した。その結果、TLR 発現量と冠動脈疾患の罹患範囲と重症度との関連について、以下に述べるような、きわめて重要な知見を得るに至った。なお、感染症例および不安定狭心症・急性心筋梗塞患者は本研究の対象から除外されている。

- 1) TLR2 は、罹患枝数と Gensini スコアに対し、それぞれで正の相関 ( $r=0.46, p<0.001$ ;  $r=0.32, p<0.02$ ) を示した。
- 2) TLR4 も、罹患枝数と Gensini スコアに対し、それぞれで正の相関 ( $r=0.47, p<0.001$ ;  $r=0.29, p<0.05$ ) を示した。
- 3) TLR1 では、罹患枝数と Gensini スコアのいずれに対しても有意な相関は認めなかった。
- 4) 高感度 CRP では、罹患枝数と Gensini スコアのいずれに対しても有意の相関は認めなかった。

本研究は、TLR2 と TLR4 の発現量が、安定狭心症患者における冠動脈病変の範囲と重症度に相関することを、初めて示唆した点において非常に興味深い。また、本研究がきっかけになって、今後の循環器学領域における TLR の研究が加速されると思われる。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 15 号	学位申請者	溝口 悦子
審査委員	主査	馬場 昌範	学位
	副査	坂田 隆造	副査
	副査	竹中 俊宏	副査
			博士 (医学)
			有馬 直道
			新村 英士

主査および副査の5名は、平成19年2月19日、学位申請者 溝口 悦子 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。

質問1) 罹患枝数と TLR の発現量上昇との相関関係での統計解析について、X 軸を罹患枝数で区分した場合、連続変数ではないにもかかわらずピアソンの検定法を用いた統計解析は適切なものなのか？

(回答) 統計学的には、不連続変数で分類された独立多群間での比較検討を行う場合、各群の TLR2 数値の分布がすべての群において正規性を保ち等分散であれば Steel-Dwass の多重比較を用いるべきであったと思います。続いて、独立多群間で有意差が出れば Fisher's (extended) 解析を用いて、TLR2 の群間での変化が不連続変数に従属しているものかどうかを検定すべきものであります。あくまでピアソン検定は、二者の連続変数間の相関関係をみるためのものであり、本来なら、ここで用いるべきものではありません。ただし、今回の様に不連続な罹患枝数で区分された群間での数値分布をピアソンの検定を用いて解析を行っている論文もあり、また、次の Gensini スコアと TLR2 との相関関係の相関係数と比べる意味もあって、われわれはピアソンの検定法を用いて罹患枝数と TLR の発現量との相関を検討しました。

質問2) 全身性動脈硬化疾患9症例だけをあえて抽出し、統計処理を加えた場合、TLR 発現量と罹患枝数あるいは Gensini スコアの相関は、より強く出てきたか？

(回答) この場合の相関関係はないという結果がでています。

質問3) 全身性動脈硬化疾患と TLR 発現量との相関、例えば baPWV (脈波伝播速度) や CAVI との相関の検討は？

(回答) 本研究では行っていないが、今後検討していくべきと考えます。

質問4) 全身性動脈硬化疾患9症例に関する TLR 発現量は、冠動脈疾患患者のみの症例と比較し、高値に出たか？

(回答) TLR 発現量に有意差は認められません。

質問5) 冠動脈疾患に比べて、全身性動脈硬化疾患の方が血管の面積や長さから考えると、動脈硬化巣やプラークの量もはるかに大きいと考えられ、TLR 発現量も高いと考えるのが自然ではないか？

(回答) 全身性動脈硬化疾患では、TLR2 発現が影響している部分は少なく他の要因が強く関与している可能性も考えています。しかしながら、質問は、動脈硬化を原因として TLR2 の up-regulation を結果とみた場合で、その逆の仮説が立てられます。その場合、冠動脈と大血管での内弾性板の構造の違いにより、動脈硬化性病変をきたしやすく、今回の全身動脈硬化疾患を除いても、除かなくても、ほとんど同様の結果が得られたものと推測しています。

質問6) 組織標本でプラーク内の TLR1 発現増強が認められるが、血中単球上で TLR1 が発現上昇しなかった理由は？

(回答) 血中単球膜上への TLR2 と TLR4 の発現上昇は、いくつかのサイトカインによって調節されていると考えており、TLR1 に関しては、発現上昇させるサイトカインが弱かった可能性が考えられます。

質問7) TLR の発現を調節しているサイトカインは具体的に同定されているのか？

(回答) ex vivo の実験において、いくつかのサイトカインで、TLR2 が up-regulation あるいは down-regulation する事実を確認しています。

質問8) 質問4) においての、全身性動脈硬化疾患での TLR 発現量に差が出なかったことに対する説明は？

(回答) TLR の up-regulation は、動脈硬化の結果ではなく、原因であると仮定する必要があります。TLR の up-regulation により、動脈血管において動脈硬化を生じやすい部分に、結果的に冠動脈 (内弾性板の構造的特徴の違いあり) に動脈硬化プラークを生じたのではないかと推測です。

質問9) 今回、対象者を安定狭心症に限定した理由は？

(回答) 心筋梗塞や不安定狭心症に関しては、TLR4 が上昇するといったような報告がありますが、この場合には、心筋壊死や心筋虚血による心筋障害が TLR 発現に対して影響を与えたという可能性も考えられます。この影響を取り除き、真に動脈硬化のみと TLR の関連性をみるために安定狭心症患者のみに研究対象を絞りました。

## 最終試験の結果の要旨

質問10) 同じ程度の冠動脈狭窄があっても、acute coronary syndrome の場合、そのプラークの性状は、不安定プラークであり、安定プラークとは異なる。造影上の冠動脈狭窄度はプラーク性状の如何に問わず、形態的に狭窄が高ければ重症であると表現されるので、TLR の発現と動脈硬化プラークの性状を検討したものではないと考えるが、先生のご意見は？例えば、TLR 発現が強い患者の場合に、不安定化プラーク形成がされ易いとか、その存在の可能性が言えれば、より興味深い。

(回答) TLR 発現量上昇は単に動脈硬化の結果を反映しているのではなく、それ自体が動脈硬化を促進している危険因子である可能性も考えています。また、プラークの性状と TLR の発現量の関係に関しては、今後の検討課題です。現在、IB-IVUS (Integrated Backscatter intravascular ultrasound imaging) を用いた研究に着手し、動脈硬化プラークの性状をより詳細に検討を加え、不安定プラークと TLR の発現量との関連性についての有無検討は、この結果を待たなければなりません。

質問11) Gensini スコアというのは、臨床的な重症度を予測する目的で使用し、病変部が中枢であるほど高値を示す方法です。今回の冠動脈の動脈硬化の範囲や重症度と必ずしも直接的に結びつかないのでは？

(回答) Gensini スコアは虚血の程度・強さ・予後のあくまで臨床的な評価であって、動脈硬化の発症や進展に関しての適切な評価基準ではありません。冠動脈における動脈硬化の重症度と拡がりを議論した論文は多いのですが、その定義が存在しません。そこで、われわれは、罹患枝数と Gensini スコアをもって、重症度と拡がりの仮の定義として採用し、検討を加えました。

質問12) 論文の discussion のところで、endothelium のずり応力と TLR 発現に関して言及しているが、endothelium での TLR 発現の意義をどのように考えるか？

(回答) 単球上での TLR 発現上昇は、動脈硬化の原因でもあり結果でもあるという意味で重要であると考えています。内皮細胞膜上での TLR 発現に関する報告を Discussion において引用しましたが、われわれは、その現象に関する研究を行っておらず、まして、その意義(動脈硬化進展との間に関連性あるかどうか)については全く不明で、検討の余地を残す部分と考えています。

質問13) スタチン製剤が、単球上の TLR4 発現やシグナル伝達を減少させるという動物実験での報告があります。今回の患者背景からは、スタチン製剤を内服している患者も含まれていますが、TLR 発現に影響は認められたか？

(回答) 今回、スタチン製剤内服の有無での発現量に有意差は出ませんでした。しかし、そのことに関しては、症例数が少ないこともあり、最終的な結論を出せるものではないと考えています。今後の検討課題となっています。

質問14) 高感度 CRP に関連して、炎症性サイトカイン (IL-6 など) は現在、臨床現場でも簡単に測定できるが、TLR 発現調節に関わるサイトカインについては検討しているか？

(回答) 現在 ex vivo の実験において、INF- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-4, G-CSF などを検討しており、TLR2 が up-regulation あるいは down-regulation する事実を確認しています。同時に、生体内血液液中において上昇しているサイトカイン種の検討も行っており、これら ex vivo で TLR2 発現を modulation できるサイトカインと一致するかどうか、個々の症例で検討中です。

質問15) 高感度 CRP で動脈硬化の範囲と重症度に有意差が出なかったのはなぜか？

(回答) 大規模臨床検査において、高感度 CRP は冠動脈の石灰化や、心筋梗塞や突然死などの心血管イベント発症に関係しているけれども、動脈硬化の重症度を反映しないという報告されています。われわれの結果も同様なものであったと考えています。

質問16) 採血の時期について、心臓カテーテル検査の前と後で、いつ採血しているのか？

(回答) すべて心カテ施行前に統一しました。

質問17) 心臓カテーテルで使用する造影剤の単球への影響の報告は過去にあるか？

(回答) われわれの知る限り、そのことに言及した報告はないと思います。冠動脈造影検査の前後で測定した数十例で検討し、有意差は認められませんでした。

質問18) Flow Cytometry で TLR の発現を測定した場合、Figure 1C において、単球の自家蛍光とあるが、アイソタイプ蛍光抗体で染めた上での単球自家蛍光 MFI の値になっているのか？

(回答) アイソタイプ (IgG1, Ig2a) での染色を行ない、単球の自家蛍光としました。しかし、このアイソタイプ抗体 (マウス由来) は、ヒトの単球にはほとんど結合しない事実を確認しています。

質問19) TLR2 の発現と TLR4 の発現に相関はあるのか？

(回答) 非常に強い相関を示し、TLR2 の上昇している患者では、同時に TLR4 の発現も上昇ある傾向をみとめています。御指摘のように、動脈硬化の病態を考える上で、非常に興味深い点であると認識しています。

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。