

特集

自然免疫と心血管リモデリング： Toll-like receptor の役割

竹石 恭知*

はじめに

自然免疫は主にマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などによって担われている。この自然免疫に関わる免疫細胞は特異的な受容体によって微生物の侵入を認識している(図1)。Toll は当初ショウジョウバエの発生において背腹軸の決定に必要な分子として発見されたが、その後 Toll は真菌に対する感染防御に関与することが明らかとなった¹⁾。Toll の哺乳類ホモログである Toll-like receptor (TLR) が次々とクローニングされ、現在までに 11 種類の TLR が報告されている。TLR は 1 回膜貫通型の受容体で、細胞外領域にロイシ

ンリッチリポートを持ち、細胞質内にインターロイキン 1 受容体の細胞内領域と相同性を持つ Toll/IL-1 receptor homology domain (TIR ドメイン) を有するのを特徴とする。TLR はそれぞれ病原体に特異的な構成成分を認識し、特異的なシグナル伝達機構を活性化する。細胞内の TIR ドメインを介して、myeloid differentiation factor 88 (MyD88) をはじめとするアダプター分子と結合し細胞内ヘシグナルを伝達する(図2)²⁾。

心筋細胞には TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 が発現していると報告されている³⁾。TLR4 はグラム陰性細菌の細胞壁外膜成分であるリポポリサッカライド (LPS) を認識し、炎症性サイトカインや炎症性

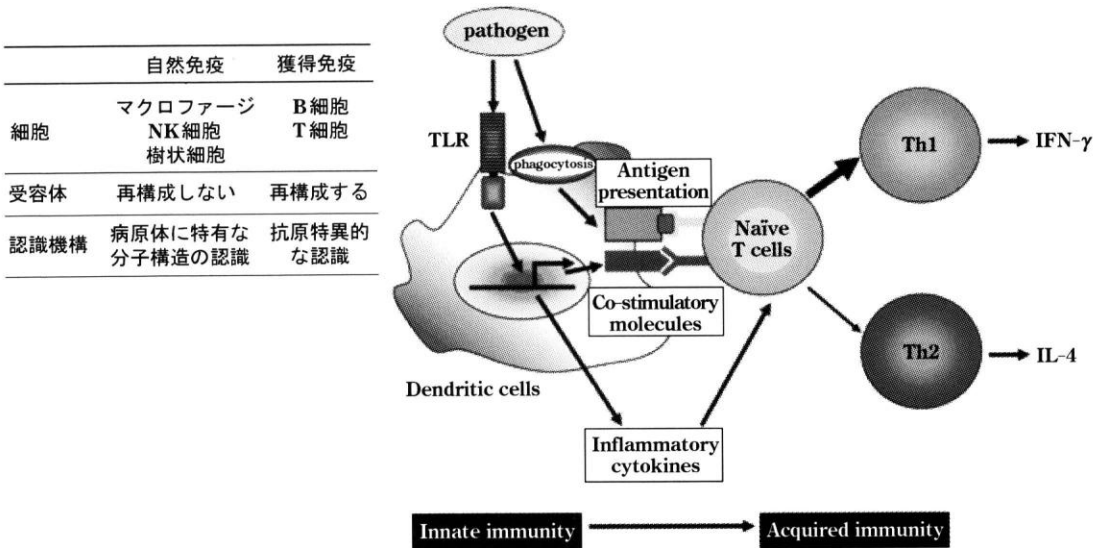


図1 自然免疫と獲得免疫について(文献 1, 2 より改変・引用)

*山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野

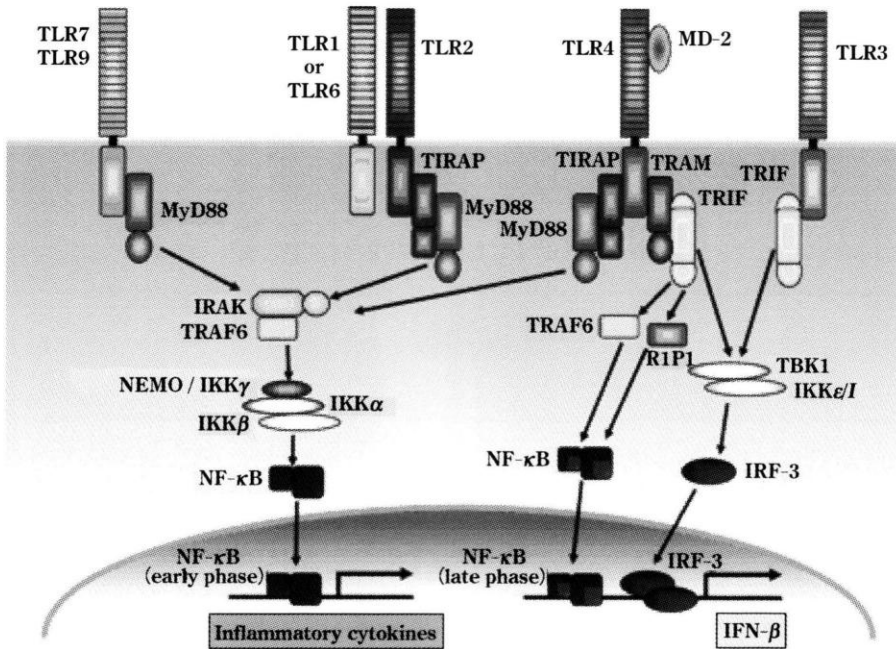


図2 TLR と細胞内シグナル伝達経路(文献1,2より改変・引用)

生理活性物質の産生を誘導する(図2). TLR2は様々な細菌のリポ蛋白やペプチドグリカンを認識する. TLR3はウイルスに特徴的な二本鎖RNAの認識に関わっている. TLR6はTLR2と高い相同性を持ち, TLR2とヘテロダイマーを形成し協調的に働く. TLRがリガンドを認識するとMyD88がTIRドメインを介して結合し, IL-1 receptor associated kinase(IRAK)を活性化する²⁾. そして転写因子NF-κBを核へ移行させ, 炎症性サイトカインなどの様々な遺伝子の発現を誘導する. また, 菌体成分のみならずheat shock proteinなどの内在性の蛋白, 酸化ストレスなどもTLRのリガンドになることが最近の研究から明らかになった.

本稿ではTLR2ノックアウト(KO)マウスを用いた, 心血管リモデリングにおけるTLRの役割について報告する.

方法および結果

A. 心筋梗塞後の左室リモデリング

TLR2 KOマウスと野生型(WT)マウスを人工呼吸管理下に開胸し, 冠動脈左前下行枝を結紮し心筋梗塞を作成した⁴⁾. TLR2 KOマウスとWTマウスで梗塞サイズには差異を認めなかったが, 梗塞4週後の心重量, 左室重量, 心重量/体重比, 左室

重量/体重比は, KOマウスでWTマウスよりも低値であった(図3). 術前, 心筋梗塞1週後, 4週後の心エコー左室Mモードを図4に示す. KOマウスではWTマウスに比較し, 心筋梗塞1週後, 4週後ともに左室拡大は抑制され, 左室収縮の低下は軽減された. 次に非梗塞部の心臓の線維化について検討した. 線維化はinterstitial fibrosis, perivascular fibrosisともにKOマウスで抑制されていた(図5). 非梗塞部でのtransforming growth factor(TGF)-β1やcollagen type-1といった線維化に関連する遺伝子の発現はKOマウスで抑制されていた(図6). また, 非梗塞部でのinterleukin(IL)-1β, IL-6といった炎症性サイトカインの産生は, KOマウスで有意に抑制されていた(図7). その結果, 心筋梗塞後の生存率はKOマウスで有意に高く(図8), 梗塞後の左室リモデリングの抑制は生命予後の改善を伴っていた.

B. ドキソルビシン投与モデル

次いでドキソルビシンをマウスの腹腔内に投与し, ドキソルビシン心筋障害モデルを作成した⁵⁾. ドキソルビシン投与1週後の心エコー左室Mモードを図9に示す. KOマウスではWTマウスに比較し, 左室拡大は抑制され, 左室収縮の低下は軽減された. 心筋でのNF-κBの活性上昇とIL-6, tumor

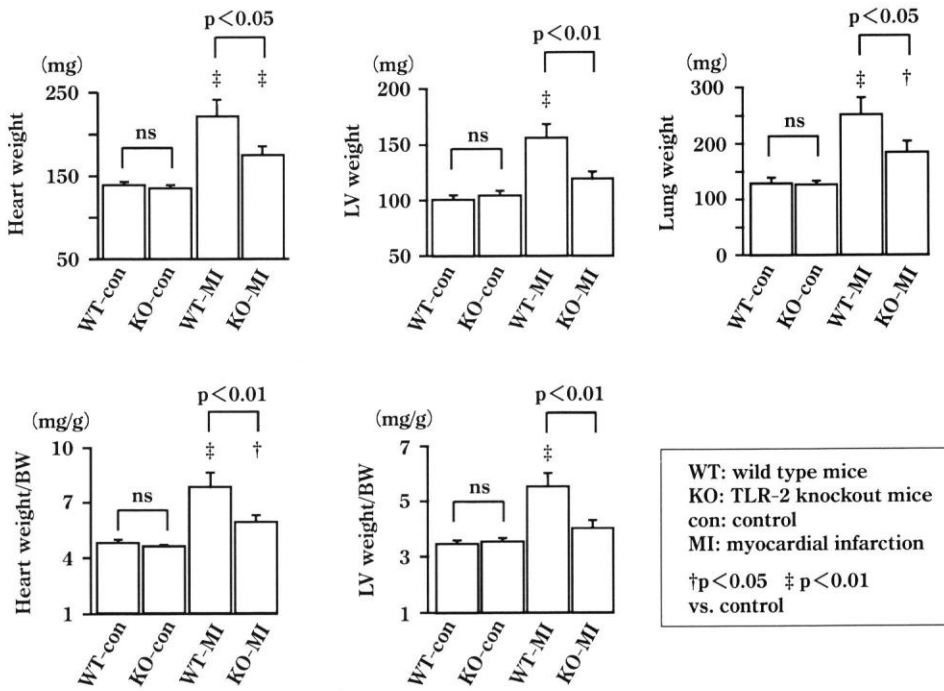


図3 心筋梗塞 4 週後の心重量, 左室重量, 心重量/体重比, 左室重量/体重比(文献 4 より引用)

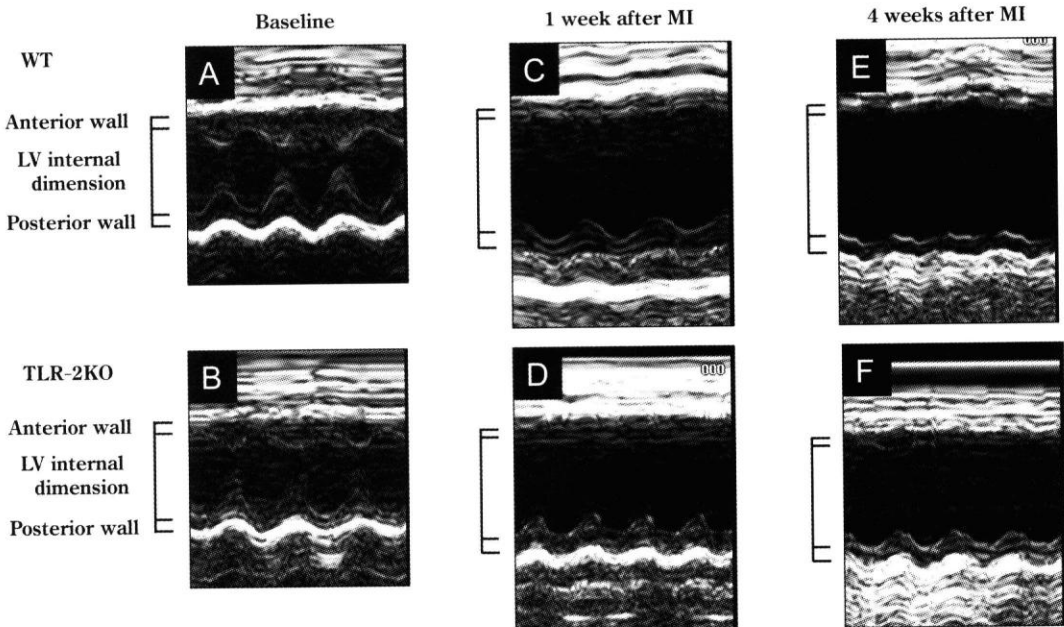


図4 術前, 心筋梗塞 1 週後, 4 週後の左室 M モード心エコー図(文献 4 より引用)

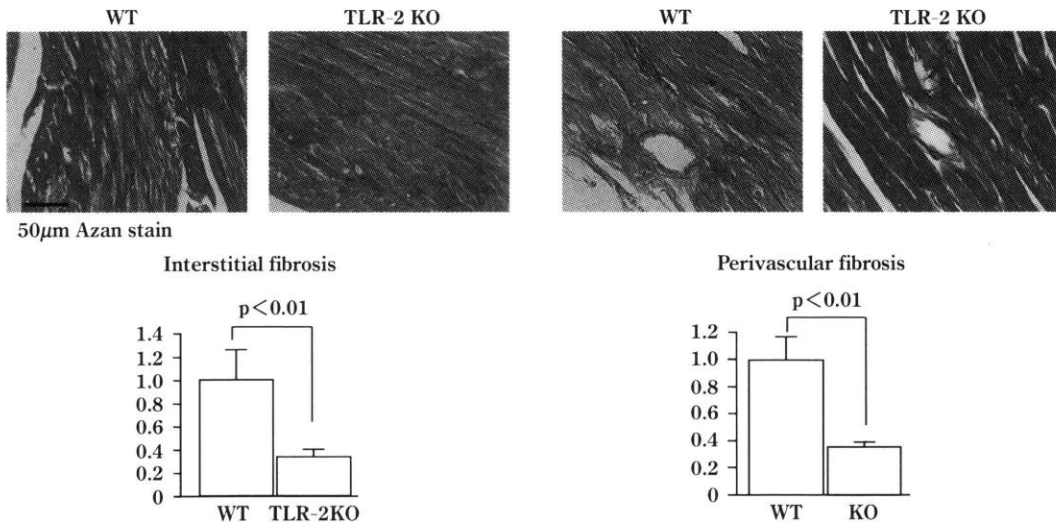


図5 非梗塞部の心臓の線維化
 上段は Azan 染色, 下段は線維化率を示す(文献 4 より引用).

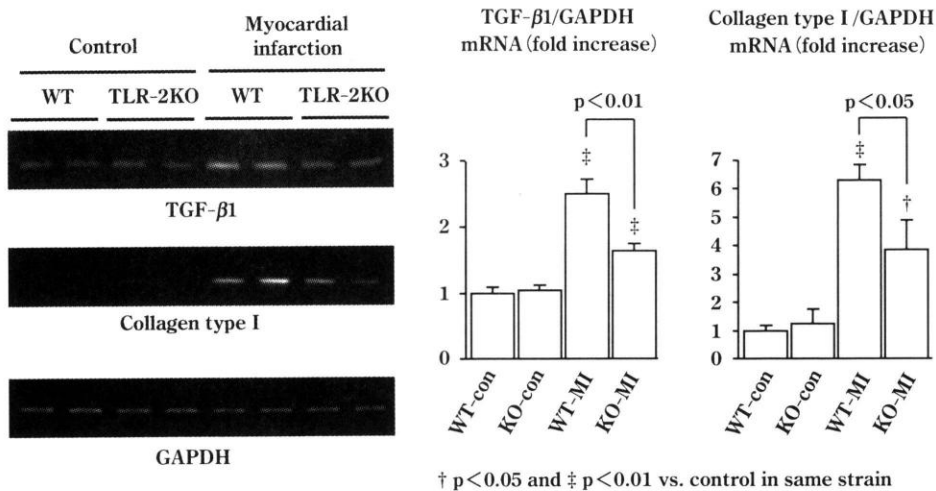


図6 非梗塞部での TGF-β1 と collagen type-1 の遺伝子発現(文献 4 より引用)

necrosis factor (TNF)-α といった炎症性サイトカインの産生は, KO マウスで有意に抑制されていた(図10). TLR2 KO マウスの心筋ではドキシソルピシン投与後の caspase-3 活性は低く, TUNEL 染色陽性細胞数は少なく, アポトーシスは抑制されていた(図11). ドキシソルピシン投与後の心機能低下は TLR2 KO マウスでは軽度であり, 生存率も高かった(図12).

C. 血管カフモデル

最後に, TLR-2 KO マウスと WT マウスの大腿動脈周囲にポリエチレン製のカフを巻き, 血管内膜増殖モデルを作成した⁶⁾. カフ装着 1 週後に大腿

動脈壁の炎症性サイトカイン, ケモカインの遺伝子発現を RT-PCR で比較検討した. TNF-α, IL-1β, IL-6, macrophage chemoattractant protein (MCP)-1 とともに KO マウスで遺伝子発現の抑制を認めた(図13). ついでカフ装着後の内膜増殖の程度を WT マウスと KO マウスで比較した. 図14 に示すようにカフ装着 2 週後, 4 週後において KO マウスでは血管内膜増殖が抑制されていた. 定量的に測定した内膜面積, また内膜/中膜比とともに KO マウスでは WT マウスに比較し有意に低値で, 内膜増殖は抑制された(図15).

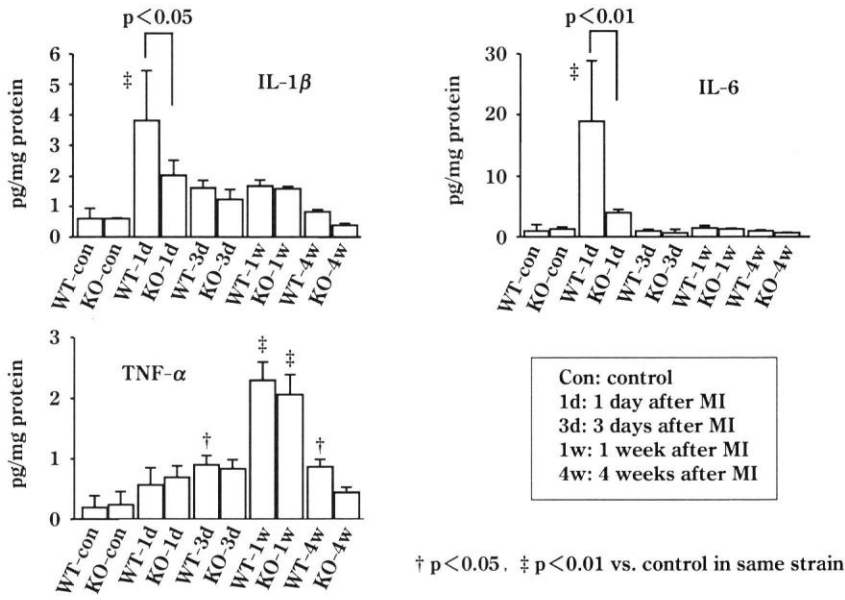


図7 非梗塞部での IL-1 β , IL-6, TNF- α の産生(文献 4 より引用)

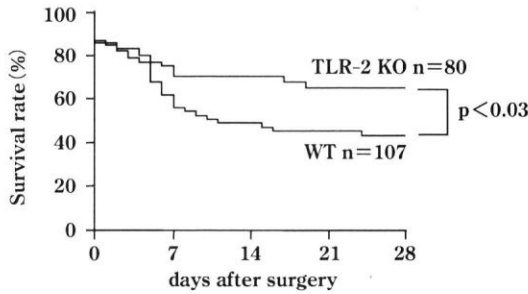


図8 心筋梗塞後の生存率の Kaplan-Meier 解析(文献 4 より引用)

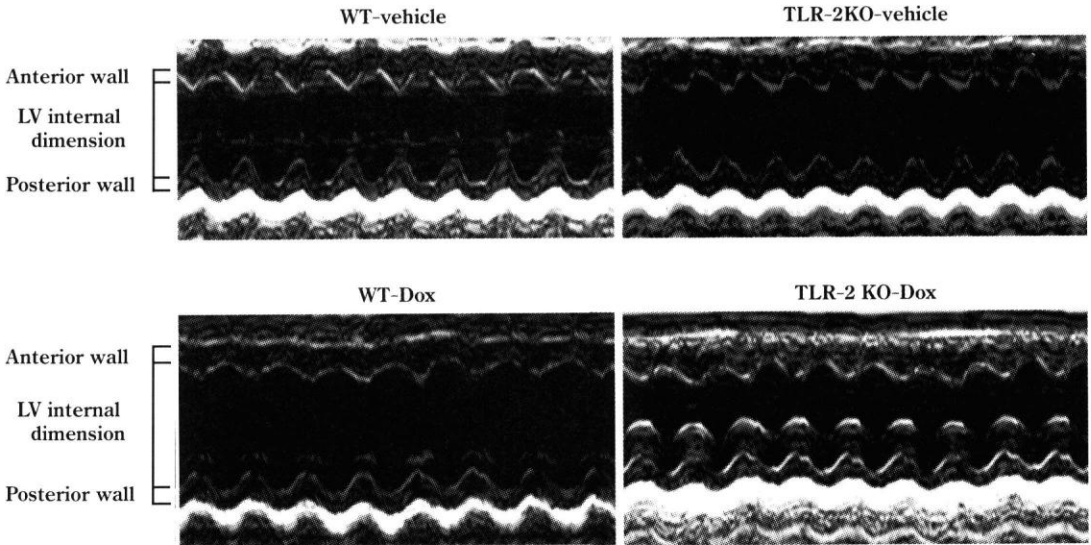


図9 ドキソリピンなし vehicle を腹腔内に投与した 1 週後の M モード心エコー図(文献 5 より引用)

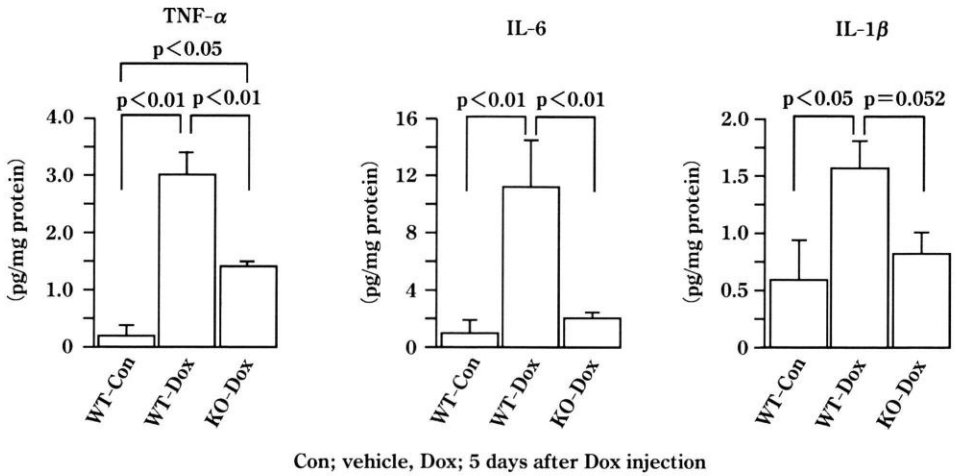


図10 ドキソルビシン投与後の心筋での TNF- α , IL-6, IL-1 β の産生 (文献 5 より引用)

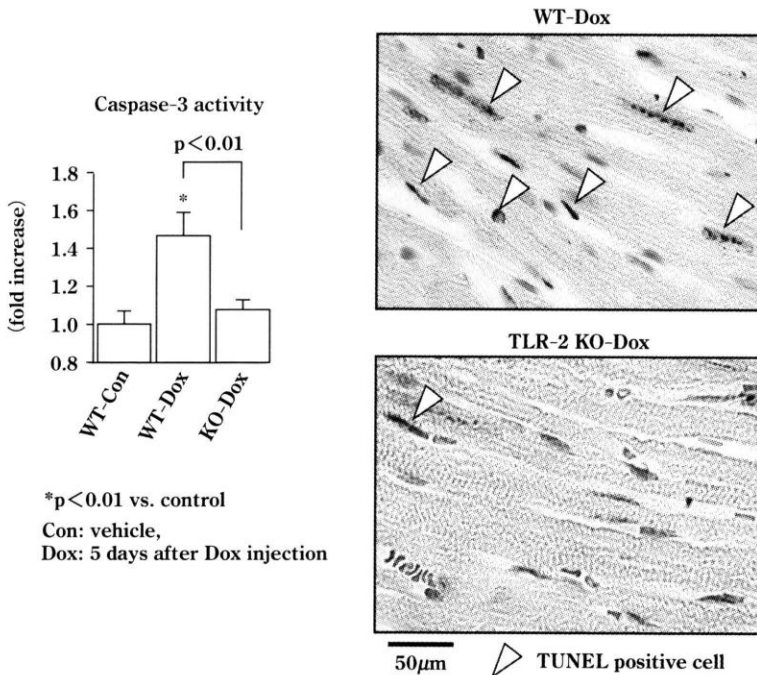


図11 ドキソルビシン投与後の心筋でのカスプー3 活性(左)と TUNEL 染色(右) (文献 5 より引用)

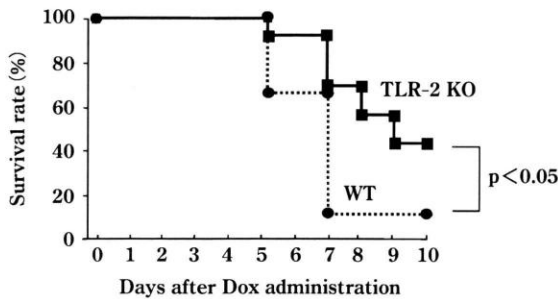


図12 ドキソルビシン投与後の生存率の Kaplan-Meier 解析 (文献 5 より引用)

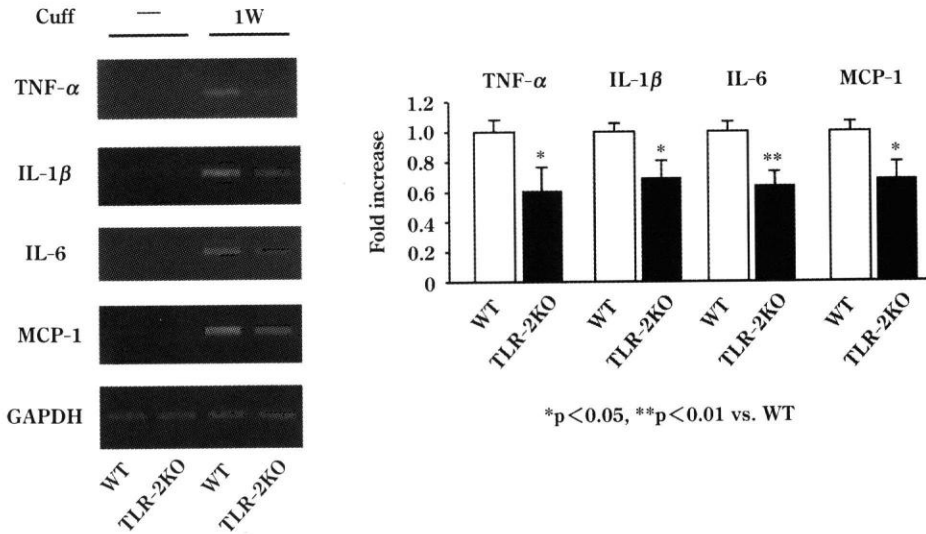


図13 カフ装着 1 週後の大腿動脈壁での炎症性サイトカイン，ケモカインの遺伝子発現(文献 6 より引用)

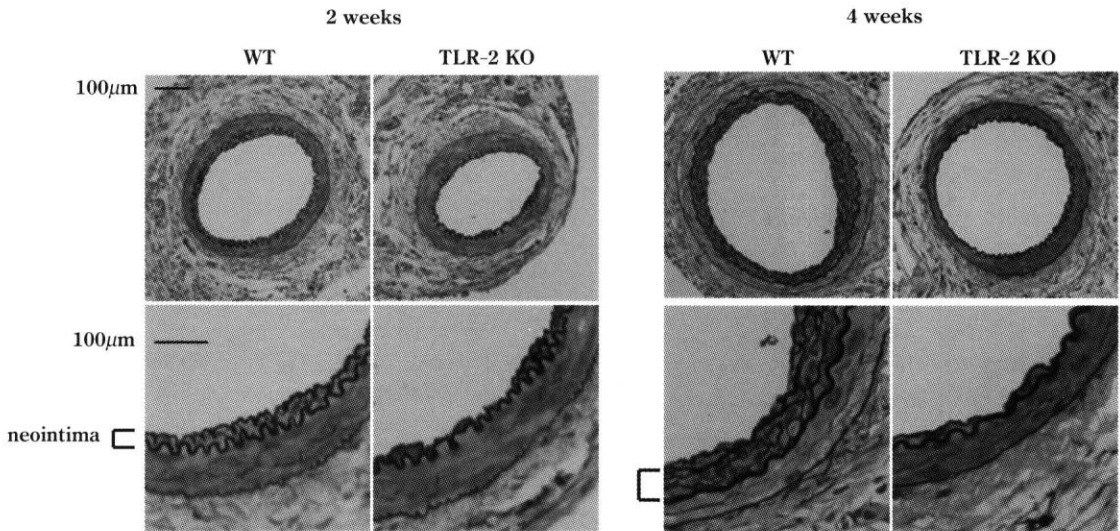


図14 カフ装着 2 週後，4 週後の大腿動脈 Elastica-Goldner 染色(文献 6 より引用)

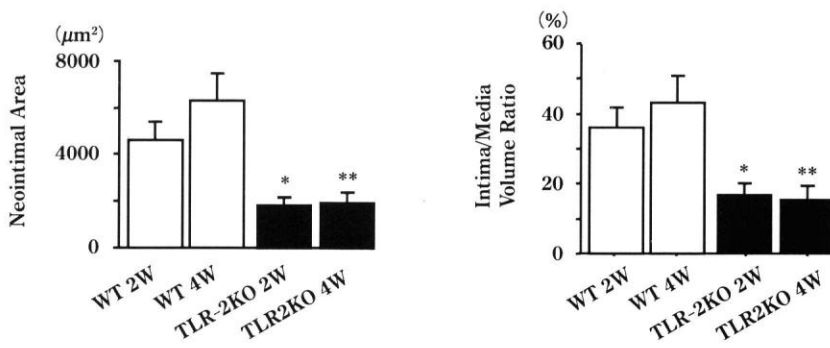


図15 カフ装着 2 週後，4 週後の内膜面積と内膜/中膜比(文献 6 より引用)

考 察

以上の実験結果から、TLR-2 は心血管リモデリングに重要な役割を演じていることが明らかになった。その機序として、NF- κ B 活性化、サイトカイン産生、アポトーシス、線維化の抑制が示唆された。

心臓における TLR の役割が解明されつつある。TLR4 に点変異が存在する C3H/HeJ マウスや TLR4 欠損マウスでは、LPS 投与による心機能低下が抑制されていたことから、エンドトキシンショックでの心機能低下に TLR4 が関与すると考えられている。また、TLR4 欠損マウスでは虚血・再灌流後の好中球の浸潤、酸化ストレスの増加、炎症反応が抑制され、心筋障害は軽減された⁷⁾。臨床的にも、TLR4 の発現は心筋梗塞症や拡張型心筋症、動脈硬化巣で増加しており、TLR が心血管病の発症に関与していることが示唆されている⁸⁾。また、TLR4 の遺伝子多形(Asp299Gly)を有すると、炎症作用により心筋梗塞発症のリスクが低いことが報告されている⁹⁾。

一方、TLR2 と心血管病の関連についてはこれまであまり検討されていない。最近、培養心筋細胞において TLR2 が酸化ストレスによる NF- κ B の活性化に関与することが報告された¹⁰⁾。我々は TLR2 KO マウスを用いて、心筋梗塞後の左室リモデリングが TLR2 を介することを *in vivo* で示した。非梗塞部心筋での炎症性サイトカイン産生の抑制、線維化の抑制がその機序として考えられた。ドキソルビシン心筋障害では、TLR2 を介する NF- κ B の活性化の抑制、アポトーシスの抑制がその機序として示唆された。血管内膜肥厚も TLR2 KO マウスでは抑制され、TLR2 を介した炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が関与していた。

細菌やウイルスだけでなく、酸化ストレスなどの endogenous な刺激が各種の細胞に存在する TLR

を介して細胞内シグナルを活性化し、様々な反応を惹き起こし、心血管リモデリングに関与している。自然免疫が感染症の制御だけでなく、心血管病の発症に深く関わっていることが明らかになった。今後、より詳細に TLR の機能が解明されることが期待される。

TLR2 KO マウスを提供していただいた大阪大学の 審良静男教授にこの場を借りて深謝いたします。

文 献

- 1) 植松 智, 審良静男: Toll-like receptor による生体防御機構. 日本内科学会雑誌 2005; 94: 169-361.
- 2) Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signaling. Nat Rev Immunol 2004; 4: 499-511.
- 3) de Kleijn D, Pasterkamp G: Toll-like receptors in cardiovascular diseases. Cardiovasc Res 2003; 60: 58-67.
- 4) Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, et al: Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. Circulation 2003; 108: 2905-10.
- 5) Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, et al: Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. Circulation 2004; 110: 2869-74.
- 6) Shishido T, Nozaki N, Takahashi H, et al: Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. Biochem Biophys Res Commun 2006; 345: 1446-53.
- 7) Oyama J, Blais C, Liu X, et al: Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. Circulation 2004; 109: 784-9.
- 8) Frantz S, Kobzik L, Kim YD, et al: Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. J Clin Invest 1999; 104: 271-80.
- 9) Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, et al: Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. JAMA 2004; 292: 2339-40.
- 10) Frantz S, Kelly RA, Bourcier T: Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor κ B by oxidative stress in cardiac myocytes. J Biol Chem 2001; 276: 5197-203.