



Title	Administration of a TLR9 inhibitor attenuates the development and progression of heart failure in mice
Author(s)	上田, 宏達
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72490
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)			上田 宏達
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授	樂 木 宏 実
	副 査	大阪大学教授	高 島 大 二
論文審査の結果の要旨			
心筋細胞においてトル様受容体9 (TLR9) は炎症を惹起することにより心不全発症に重要な働きをしていることが報告されている。本研究では、圧負荷心不全モデルマウスにおけるTLR9阻害剤 (E6446) の効果を検討した。E6446はマウス単離心筋細胞においてTLR9を介する炎症反応を選択的に阻害し、マウス心においてTLR9リガンド誘導性炎症性サイトカインmRNA産生を時間・用量依存性に抑制した。横行大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷心不全モデルマウスにおいて術前からE6446を投与したところ、TAC4週後においてサイトカインmRNA産生や炎症細胞浸潤といった炎症反応および心不全発症を抑制した。さらに、圧負荷2週後に心機能低下を示したマウスに対するE6446投与は心不全進展を抑制した。従って圧負荷心不全モデルマウスにおいてTLR9阻害剤は炎症反応抑制を介した心保護的效果を有することが明らかとなった。以上の研究結果は学位論文に値する。			

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	上田 宏達
論文題名 Title	Administration of a TLR9 inhibitor attenuates the development and progression of heart failure in mice (TLR9阻害剤は圧負荷心不全モデルマウスにおいて心不全の発症・進展を抑制する)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 心不全に関するこれまでの研究において、その病因に炎症性サイトカインが重要な役割を担っていることが示されている。心不全においては、インターロイキン-1およびインターロイキン-6 (IL6)、腫瘍壊死因子-α (TNFα)などの炎症性サイトカインの発現が増加し、血中TNFαは疾患の重症度および予後に関係していることが報告されている。しかしながら、TNFαを標的としたアプローチは臨床試験において心不全の改善効果をもたらさなかった。ミトコンドリアはオートファジー/リソソーム系によって分解される。ミトコンドリアの内膜にはミトコンドリアDNAが含まれており、これにはToll様受容体9 (TLR9)を刺激し炎症を誘発させる非メチル化CpG配列が多く含まれる。マウスの圧負荷心不全モデルを用いた研究により、心筋細胞においてオートファジーを介して分解されるミトコンドリアDNAは、その不十分な分解の結果、TLR9を介した炎症を引き起こし、心不全を誘導することが明らかとなっている。本研究では圧負荷により誘導されるミトコンドリアDNA蓄積を伴う心不全に対する、TLR9阻害剤であるE6446によるTLR9シグナル抑制の効果を検討することを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 成獣マウス単離心筋細胞にTLR9 ligand (ODN1668)、TLR4 ligand (LPS)、TLR7 ligand (Ioxoribine)を投与すると炎症関連遺伝子の発現量の増加を認めたが、E6446を加えると、ODN1668によって増加する炎症反応のみが有意に抑制され、同薬剤のTLR9に対する選択性を確認した。単離心筋細胞は、脱共役剤であるCCCPの投与により、そのミトコンドリア膜電位を低下させた。さらに細胞内におけるPicoGreenを用いて標識されるDNA蓄積がリソソームマーカー (LAMP2)と一致する所見が有意に多く認められ、炎症関連遺伝子発現の増加が認められた。CCCPと同時にE6446を反応させたところ、DNA蓄積に変化を伴わず、炎症遺伝子発現の抑制が認められた。これらにより、リソソームに蓄積するDNAの増加がTLR9シグナルを介して心筋細胞の炎症反応を惹起することが示唆された。 次にE6446の生体におけるTLR9阻害作用を評価した。マウスへのODN1668の腹腔内投与により、血中サイトカイン濃度および心臓における炎症関連遺伝子発現の増加が認められた。条件検討の結果、ODN1668の投与2日前にE6446 (1.5mg/匹)を経口投与すると、血中サイトカイン濃度、心臓での炎症反応の抑制が最も効率的に認められた。 マウスの圧負荷心不全モデルにおいて、心不全期では、ミトコンドリアDNA分解不全からTLR9が活性化し、心臓での炎症、心不全を誘発することが報告されている。10-12週齢雄性C57BL/6Jマウスに横行大動脈縮窄 (TAC)を施すことで圧負荷による心不全マウスを作成し、E6446の効果を評価した。E6446を手術前より2日毎に投与した群はTAC4週後において対照群に比し心臓超音波法による心機能評価において左心室内径の有意な縮小、左室径短縮率 (FS)の有意な上昇を認め、脛骨長で補正した心重量、肺重量が有意に低下しており、E6446の心不全予防効果が示された。またE6446投与群では対照群に比して、TAC後の炎症性サイトカイン産生が抑制され、組織学的検討においてマクロファージの集積ならびに線維化が抑制された。E6446投与群と対照群の間には、EdUによって標識されたミトコンドリアDNAのリソソーム内での蓄積数に有意差は認められず、心臓組織においてもE6446はオートリソソーム内のミトコンドリア蓄積には影響を及ぼさないことが示唆された。また、TACによる圧負荷後2週において左室収縮能の低下 (FS<50%)が認められた個体に対しE6446を2日毎に内服させた群はその後4週間にわたり左室収縮能の増悪が対照群に比べて抑制され、E6446は心不全進展を抑制する効果も有することが示された。 〔総括(Conclusion)〕 本研究によりE6446はマウスにおける心不全の発症および進展を抑制することが明らかとなった。この成果は特定のサイトカインを標的としたアプローチよりも広範囲の炎症メディエーターを調節するTLR9シグナル抑制がヒトの心不全に対する新しい治療戦略となり得ることを示唆している。	