

Title	Ablation of Toll-like receptor 9 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice
Author(s)	種池, 里佳
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/76203
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 種池 里佳

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 大阪大学教授	坂田 泰史
	副査 大阪大学教授	高島 成二
	副査 大阪大学教授	竹田 潔

論文審査の結果の要旨

心筋梗塞に対する再灌流療法において心筋虚血再灌流障害と呼ばれる現象があり、この病態には自然免疫応答とそれに続く炎症反応が関与している。トル様受容体9は自然免疫応答において、非メチル化CpG配列を含むDNAを認識し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。本研究では、トル様受容体9欠損マウスや野生型マウス摘出心を用いて虚血再灌流障害実験を行い、心臓のトル様受容体9が炎症反応を惹起し、梗塞領域の拡大や心機能の低下といった心筋虚血再灌流障害を誘導することを明らかにした。また、これらの実験においてDNA分解酵素を投与することにより、非メチル化CpG配列を含むミトコンドリアDNAがトル様受容体9の活性化を介して心筋虚血再灌流障害を誘導することを確認した。本研究は、心筋虚血再灌流障害を対象とした新規創薬につながる分子標的の解明と治療への応用の基礎となるものであり、学位の授与に値すると考えられる。

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	種池 里佳
論文題名 Title	Ablation of Toll-like receptor 9 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice (心筋虚血再灌流障害におけるTLR9の機能解析)
論文内容の要旨(Abstract of Thesis)	
<p>[目的(Purpose)]</p> <p>心筋梗塞に対する再灌流療法は、心筋梗塞領域を縮小し、生命予後を改善する最も効果的な治療法である。その一方で、再灌流により心筋障害が進行し、再灌流療法の効果が減弱する心筋虚血再灌流障害と呼ばれる現象が存在する。心筋虚血再灌流障害の病態には、自然免疫応答とそれに続く炎症反応が関与している。トル様受容体 (Toll-like receptor:TLR) は自然免疫応答において中心的な役割を果たすが、TLR9は細胞内のエンドソームや小胞体に存在し、細菌やウイルスの非メチル化CpG配列を含むDNAを認識し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、ミトコンドリアDNA (mtDNA) は非メチル化CpG配列を含み、高い炎症惹起性を有する。圧負荷マウス心では、オートファジーによる分解を受けずにオートリソソーム内に蓄積したmtDNAが、TLR9活性化を介して炎症及び心不全を惹起することが明らかになっている。しかしながら、TLR9阻害剤である非メチル化CpGオリゴヌクレオチド再灌流前投与が心筋虚血再灌流障害や炎症反応に及ぼす影響については、マウスを用いた既報研究では統一した見解が得られていない。また、心臓の炎症に関与しうる循環血液中の炎症細胞の影響を排除した研究報告はない。そこで、本研究ではマウス摘出心を用い、心筋虚血再灌流障害におけるTLR9の役割を検討することを目的とした。</p> <p>[方法ならびに成績(Methods/Results)]</p> <p>雄性野生型 (C57BL/6) もしくはTLR9欠損マウスの摘出心を用い、ランゲンドルフ灌流実験法により、35分的心筋虚血に引き続き60分の再灌流を行った。左室内圧の測定により評価される心筋虚血再灌流後の心機能障害は、野生型マウス心臓と比較し、TLR9欠損マウスではすみやかに改善し、その改善は持続した。また、2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色を用いて、TLR9欠損マウス虚血再灌流後の心筋壊死範囲が縮小することも確認した。qRT-PCR法を用いて測定した虚血再灌流中の心臓組織における炎症性サイトカイン遺伝子の発現量は、両群ともに再灌流後に増加したが、TLR9欠損マウスでは野生型マウス心臓と比較し発現量は低値であった。また、ELISA法を用いて測定した冠流出液中炎症性サイトカインタンパク質量も抑制された。これらの結果により、TLR9欠損は心筋虚血再灌流障害を改善、心筋梗塞領域を縮小し、炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。</p> <p>次に、心筋虚血再灌流障害における細胞外mtDNAの影響を検討するために、野生型マウス摘出心を用いた心筋虚血再灌流障害モデルで、心筋虚血再灌流時にデオキシリボヌクレアーゼ (DNase I) 投与を行った。まず、再灌流後に冠流出液中mtDNAが分解されることを確認した。この条件では、DNase I非投与群と比較し、投与群では心筋虚血再灌流後心機能障害は改善し、その改善は持続した。また、虚血再灌流後の心筋壊死範囲も縮小したが、虚血再灌流中の炎症性サイトカイン遺伝子の発現量はDNase I投与による抑制を認めなかった。これらの結果より、細胞外mtDNA分解は、虚血再灌流障害を改善、心筋梗塞領域を縮小するが、炎症性サイトカイン産生は抑制しないことが示唆された。</p> <p>さらに、TLR9欠損心を用いた虚血再灌流実験でDNase Iを灌流したが、虚血再灌流中の心機能障害に有意な変化は認めなかった。これにより、mtDNAによる虚血再灌流障害がTLR9受容体の活性化を介していることが確認された。</p> <p>[総括(Conclusion)]</p> <p>TLR9はミトコンドリアDNAによる活性化を介して、摘出心における心筋虚血再灌流障害を誘導することが明らかになった。この成果は、広範囲の炎症メディエーターを調節するTLR9シグナルを心臓で抑制することが、ヒトの心筋虚血再灌流障害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。</p>	