



# Decreased Expression of Toll-like Receptor 2 and 4 on Macrophages in Experimental Severe Acute Pancreatitis

Matsumura, Naoki

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2012-04-24

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4043

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004043>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 4 9 】

氏 名・(本 籍) 松村 直樹 ( 兵庫県 )  
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)  
学 位 記 番 号 博い第1847号  
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Decreased Expression of Toll-like Receptor 2 and 4 on  
Macrophages in Experimental Severe Acute Pancreatitis  
(実験重症急性膵炎におけるマクロファージ上のToll様受容体2, 4  
の発現低下)

審 査 委 員

主 査 教 授 石 井 昇  
教 授 尾 原 秀 史  
教 授 南 康 博

## 【背景・目的】

重症急性膵炎は良性疾患でありながら死亡率が20%に達する重篤な疾患であり、厚生労働省の難病(特定疾患)指定をうけている。本疾患における最も重篤な合併症は発症後期の感染性合併症(感染性膵壊死および敗血症)であり、高死亡率の原因となっている。感染性合併症はその成立機序として全身の免疫能低下やエンドトキシン・腸内細菌の腸管外移行(endotoxin/bacterial translocation)が重要と考えられている。

自然免疫系は、無脊椎動物や植物などにおいては唯一の生体防御系であり、脊椎動物においても生体防御の最前線を担当し感染症に対抗している。Toll様受容体(toll-like receptor, TLR)は、病原微生物の構成成分(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)を特異的に認識し、宿主自然免疫反応を惹起する。TLRは、細胞内にIL-1受容体の細胞内領域と相同性が高いドメインを有しており、炎症性サイトカインを産生して炎症反応や免疫反応を惹起するとともに、抗原特異的な獲得免疫系をも制御することが明らかになり、免疫応答における重要性が注目されている。TLRは少なくとも10種類は同定されており、TLR2はグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポタイコ酸(LTA)、TLR4はグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド(LPS)をそれぞれ認識する。

近年、敗血症・炎症性腸疾患・外科手術後・閉塞性黄疸など様々な病態においてTLRの重要性が示されてきている。自然免疫系は主にマクロファージ上のTLRを介して作動しているため、マクロファージ上のTLRの発現やマクロファージの反応性は重症急性膵炎においても炎症反応や宿主の生体防御反応に深くかかわっていると推測されるが、これまで全く調べられていない。そこで本研究では、ラット重症急性膵炎におけるマクロファージ上のTLR2とTLR4の発現およびマクロファージのTLRを介したサイトカイン反応性(産生能)を検討した。

## 【方法】

Wistar系雄性ラット(体重300-350g)を実験に使用した。本動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験指針に基づき、同大学動物実験委員会の承認を得て行った。

重症急性膵炎モデルとして、ラットを麻酔下に開腹後、3%デオキシコール酸(0.1ml)を膵管に逆行性注入して出血性壊死性膵炎(3% DCA 膵炎)を作製した(重症急性膵炎群)。対照ラットには単開腹のみを行った(シャム群)。膵炎作製6時間後、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を採取し、付着法によってマクロファージを分離した。マクロファージの回収率は95%以上であった。TLR2とTLR4 mRNAの発現はリアルタイムRT-PCR法にて、TLR2とTLR4蛋白の発現はWestern blotting法にて解析した。サイトカイン産生能は、マクロファ

ージをLTAもしくはLPSで刺激して4時間培養後、培養上清のTNF- $\alpha$ 濃度をELISAで測定した。さらに、膵炎作製0, 6, 12, 18時間後に、血中エンドトキシン濃度を測定するとともに、腸間膜リンパ節の細菌培養を行いbacterial translocationを検討した。

統計学的解析は、二群間の平均値の差にはMann-Whitney U検定、頻度の差には $\chi^2$ 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

## 【結果】

TLR2 mRNAの発現は、膵炎作製3時間後から減少し始め、6時間後にはシャム群と比べて重症急性膵炎群において有意に低下していた。重症急性膵炎群におけるTLR2 mRNAの初期濃度比はシャム群を1とすると $0.77 \pm 0.12$ であった。一方、TLR2蛋白の発現は、膵炎作製3時間後には変化を認めなかったが、6時間後にはシャム群と比べて重症急性膵炎群において低下していた。

TLR2を介したTNF- $\alpha$ 産生能は、シャム群と比べて重症急性膵炎群において有意に低下していた( $10^2$ ,  $10^3$  ng/mlのLTA刺激下)。

TLR4 mRNAの発現は、膵炎作製3時間後から減少し始め、6時間後にはシャム群と比べて重症急性膵炎群において有意に低下していた。重症急性膵炎群におけるTLR4 mRNAの初期濃度比はシャム群を1とすると $0.42 \pm 0.18$ であった。一方、TLR4蛋白の発現は、膵炎作製3時間後には変化を認めなかったが、6時間後にはシャム群と比べて重症急性膵炎群において低下していた。

TLR4を介したTNF- $\alpha$ 産生能は、シャム群と比べて重症急性膵炎群において有意に低下していた( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  ng/mlのLPS刺激下)。

血中エンドトキシン濃度は、膵炎作製0, 6, 12時間後は測定感度以下であったが、膵炎作製18時間後には $90 \pm 20$  pg/mlと有意に上昇していた。腸間膜リンパ節の細菌培養の陽性率は、膵炎作製0, 6, 12時間後はそれぞれ0%(0/10)であったが、膵炎作製18時間後には50%(6/12)と有意に上昇していた。

## 【考察】

TLRは宿主の感染防御機構において重要な役割を果たしている。なかでもマクロファージ上のTLR2とTLR4は、自然免疫系として、それぞれグラム陽性菌とグラム陰性菌の構成成分を認識する主要なセンサーである。今回の実験では、マクロファージとして肺胞マクロファージを用いたが、その理由としては、腹腔マクロファージは重症急性膵炎モデルでは膵炎腹水の細胞傷害活性により死滅していること、血中単球は全実験を完遂するのに十分な細胞数が得られないことが挙げられる。本研究により、重症急性膵炎の早期からマクロファージ上のTLR2とTLR4の発現が低下し、TLRを介したサイトカイン反応も抑制されていることが初めて明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第1849号	氏名	松村 直樹
論文題目 Title of Dissertation	Decreased Expression of Toll-like Receptor 2 and 4 on Macrophages in Experimental Severe Acute Pancreatitis 実験重症急性膵炎におけるマクロファージ上の Toll 様受容体 2、4 の発現低下		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 石井 昇 副査 Vice-examiner 南 康博 副査 Vice-examiner 尾島 香史		
審査終了日	平成19年 3月12日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

これらの結果から、マクロファージの反応性の低下は TLR の発現低下に起因していると考えられた。また、重症急性膵炎早期からのこのような免疫反応の抑制が続発する感染性合併症の成立機序に関与している可能性が推察された。

急性膵炎に関しては、ラット軽症急性膵炎の早期に膵組織において TLR4 の発現が増加しているという報告や、ラット重症急性膵炎の肺組織や肝組織において TLR2 と TLR4 の mRNA の発現が増加し肺障害や肝障害と関連しているという報告がある。よって、重症急性膵炎早期に各組織で TLR の発現が増加し、その発現増加が炎症や臓器障害を促進している可能性が推測される。しかしながら、重症急性膵炎におけるマクロファージ上の TLR 発現やマクロファージの TLR を介した機能については全く不明であり、今回私共が初めて解析を行なった。

TLR が重症急性膵炎で発現抑制を受けるメカニズムは現在不明であるが、サイトカインの関与が最も考えられる。これまでに、MIF、IFN- $\gamma$ 、IL-2 は TLRs の発現を増強し、CSF や IL-4 は TLRs の発現を減弱すると報告されている。また、侵襲時には抗炎症性サイトカイン (IL-4, IL-10) が産生され、免疫反応を抑制して感染の危険を増やすことが知られている。侵襲時には、さらにカテコラミンやステロイドなどの免疫抑制因子が誘導され、TLRs の発現が抑制されている可能性もある。よって重症急性膵炎においても、これらの抗炎症性サイトカインや免疫抑制因子が TLRs の発現を抑制している可能性が推察される。

これまで一般的に、TLR の発現は炎症時には増強しており免疫抑制時には減弱していると報告されている。消化器外科の手術後に患者末梢血単核球上の TLR2 と TLR4 の発現が低下し、TLR を介した TNF- $\alpha$  産生能が低下していることが判明し、術後感染症との関連が示唆されている。よって重症急性膵炎においても、TLR の発現増加は炎症反応を促進し感染に対しては防衛的に作用する可能性、TLR の発現低下は炎症反応を抑制し感染を促進する可能性が推察される。本研究により、膵炎作製 6 時間後にマクロファージ上の TLR2 と TLR4 の発現は減少し、サイトカイン産生能の低下も伴っており、自然免疫系が早期から抑制されていることが判明した。さらに、本モデルにおいて TLR2 と TLR4 の発現低下が認められた後、膵炎作製 18 時間後に実際に endotoxin/bacterial translocation が起きていた。TLRs の発現抑制と endotoxin/bacterial translocation との関連を示唆する直接的な証拠は示していないが、文献的には TLR2 欠損マウスや TLR4 欠損マウスは感染に対する感受性が増強していると報告されている。私共も TLR4 欠損マウスにおける重症急性膵炎では野生型マウスと比してグラム陰性菌の bacterial translocation が有意に増加することを最近見だしている。以上、重症急性膵炎においてマクロファージ上の TLR2 と TLR4 の発現低下が endotoxin/bacterial translocation の成立機序に関与している可能性が考えられた。今後さらに重症急性膵炎の宿主感染防御機構における TLR および TLR シグナルの役割を解明していくことが必要である。

重症急性膵炎は良性疾患でありながら死亡率の高い重篤な疾患であり、厚生労働省の難病指定を受けている。本疾患における最も重篤な合併症は感染性合併症であり、その成立機序として全身の免疫能低下やエンドトキシン・腸内細菌の腸管外移行 (endotoxin/bacterial translocation, E/BT) が重要である。

Toll 様受容体 (toll-like receptor, TLR) は、病原微生物の構成成分を認識し、宿主自然免疫反応を惹起する。TLR は、炎症性サイトカインを産生して炎症反応や免疫反応を惹起するとともに、獲得免疫系をも制御している。TLR2 はグラム陽性菌のリポタイコ酸 (LTA)、TLR4 はグラム陰性菌のリポポリサッカライド (LPS) を認識する。自然免疫系は主にマクロファージ上の TLR を介して作動するので、マクロファージ上の TLR の発現やマクロファージの反応性は炎症反応や宿主の生体防御反応に深くかかわっていると推測される。本研究では、ラット重症急性膵炎におけるマクロファージ上の TLR の発現と TLR を介したサイトカイン反応性を検討した。

重症急性膵炎モデルとして 3%DCA 膵炎を用いた。膵炎作製 6 時間後、気管支肺胞洗浄液からマクロファージを分離し、TLR2・TLR4 の発現を解析した。さらにマクロファージを LTA もしくは LPS で刺激し培養上清の TNF- $\alpha$  濃度を ELISA で測定した。また本モデルにおける E/BT を検討した。

TLR2 (mRNA、蛋白) と TLR4 (mRNA、蛋白) の発現は重症急性膵炎群において低下していた。さらに、TLR2 と TLR4 を介した TNF- $\alpha$  産生能も重症急性膵炎群において有意に低下していた。膵炎作製 18 時間後には E/BT が起きていた。

本研究により、重症急性膵炎早期からマクロファージ上の TLR の発現が低下し、TLR を介したサイトカイン反応も抑制されていることが初めて判明した。この結果から、マクロファージの反応性低下は TLR の発現低下に起因していると考えられた。また、重症急性膵炎早期からの免疫反応の抑制が感染の成立に関与している可能性が推察された。TLR が重症急性膵炎で発現抑制を受けるメカニズムは不明であるが、抗炎症性サイトカインや免疫抑制因子が関与している可能性が考えられた。

一般的に、TLR の発現は炎症時には増強しており免疫抑制時には減弱していると報告されており、重症急性膵炎においても、TLR の発現増加は炎症反応を促進し感染を防御する可能性、TLR の発現低下は炎症反応を抑制し感染を促進する可能性が推察される。実際本モデルでも、TLR の発現低下後に E/BT が

起きており、TLR2 欠損マウスや TLR4 欠損マウスは感染に対する感受性が増強しているという報告を併せて考えると、マクロファージ上の TLR の発現低下が感染の成立に関与している可能性が推察された。

本研究は、重症急性膵炎での感染防御機構における TLR の役割を明らかにするため、マクロファージ上の TLR の発現とサイトカイン反応性を研究したものであるが、本疾患における感染成立機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。