

セルフリーミトコンドリア DNA を介した、心房細動が全身炎症を惹起する機序の解明

笹野哲郎

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 循環生理解析学分野

【研究の背景】

心房細動は心房の炎症や線維化などを基盤として発症する慢性進行性疾患である。また一方、心房細動自体も、心房での局所的炎症反応に加えて血中 CRP の上昇などの全身性の炎症を合併し、多くの全身性合併症を引き起こすことが知られている。この全身性炎症反応機転は、不整脈疾患の中でも心房細動に特異的なものであるが、心房細動が全身性炎症を惹起するメカニズムは解明されていない。セルフリー DNA は循環血液中で認められる遊離した DNA であり、がん領域における liquid biopsy や、胎児 DNA の検出による出生前診断として利用されている。本研究では、心房細動が全身炎症を惹起するメカニズムとしてセルフリー DNA に着目した。セルフリー DNA は、その由来から核 DNA とミトコンドリア DNA に分けられるが、特にミトコンドリア由来のセルフリー DNA の関与について検討することとした。

【目 的】

心房細動が全身の炎症を惹起するメカニズムの解明、特にセルフリーミトコンドリア DNA を介した炎症機転を解明すること。

【方 法】

細胞培養およびペーシング刺激: マウス心房筋細胞として HL-1 細胞、およびマウスの単球・マクロファージ細胞として J774 細胞を使用した。HL-1 細胞に対しては 10Hz の高頻度ペーシング刺激を行った。

セルフリー DNA の定量: HL-1 細胞の培地よりセルフリー DNA を抽出した。抽出した DNA は、蛍光光度計により定量し、さらにおよび核ゲノム DNA 配列・ミトコンドリア DNA 配列特異的なプライマーを用いて定量的 PCR を行い、各々のコピー数を絶対定量した。

核内ゲノム DNA・ミトコンドリア DNA の抽出: マウス肝臓より核分画・ミトコンドリア分画を分離して、それぞれから DNA の抽出を行い、ソニケーションによる断片化を行ってセルフリー DNA の状態に近似させた。

定量的 RT-PCR: J774 細胞における炎症性サイトカインの発現は、定量的 RT-PCR により行った。

【結 果】

1. HL-1 細胞からのセルフリー DNA の放出: HL-1 細胞に 10Hz のペーシング刺激を行い、2, 6, 12, 24 時間後に培地からセルフリー DNA の抽出と定量を行った。セルフリー DNA 量はペーシング刺激後経時的に増加し、ペーシング刺激を行わない対照群に比し有意に高値であった。定量的 PCR により核 DNA、ミトコンドリア DNA 個別に定量すると、ミトコンドリア DNA コピー数が有意に高く、HL-1 細胞から放出されるセルフリー DNA はミトコンドリア DNA が主体であった。
2. セルフリー DNA による炎症性サイトカイン産生誘導: HL-1 細胞から放出されたセルフリー DNA を J774 細胞に添加すると、添加量依存的に IL-6 および IL-1 β の発現量が増加した。TNF α 、MCP-1 の発現には変化は見られなかった。

さらに、核・ミトコンドリア DNA をそれぞれ抽出し、断片化した上で J774 細胞に添加すると、ミトコンドリア DNA のみが IL-6 および IL-1 β の発現を誘導し、核 DNA によるサイトカイン誘導は軽度であった。

3. セルフリー DNA が炎症反応を惹起する機序: J774 細胞に対する断片化ミトコンドリア DNA 添加実験において、Toll like receptor 9 (TLR9) の antagonist を加えると、サイトカイン発現誘導は有意に抑制された。

【考 察】

心房細動を模した高頻度ペーシング刺激により、HL-1 細胞は細胞外にセルフリー DNA を放出していた。放出されたセルフリー DNA の多くはミトコンドリア DNA であった。心房筋細胞の高頻度興奮がミトコンドリア負荷を来し、障害されたミトコンドリアから DNA が細胞外に放出されたものと考えられた。ミトコンドリア DNA は約 16.5 万塩基と核ゲノム DNA に比較すると非常に小さいが、ミトコンドリア 1 個あたりの DNA 数は 2~10 と報告され、さらにミトコンドリアは細胞内に数千個存在すると報告されていることから、セルフリー DNA においてミトコンドリア DNA の比率が高いことは説明可能と考えられるが、細胞外への DNA 放出経路については現在検討中である。ミトコンドリアセルフリー DNA は単球・マクロファージに貪食され、TLR9 を介した自然免疫系のメカニズムにより IL-6 等の炎症性サイトカイン発現を誘導していた。IL-6 発現誘導は肝臓における CRP 産生を促すことが知られており、心房細動において血中 CRP が高値になるのはセルフリーミトコンドリア DNA が中心的な役割を果たしていると考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

心房細動による全身性合併症として、認知症・腎機能低下・血管内皮機能低下などが知られている。これらの合併症のメカニズムの一部には炎症機転が関与していると考えられるが、炎症を惹起するメカニズムは明らかではなかった。本研究により、全身性合併症の key molecule としてミトコンドリアセルフリー DNA の寄与が示された。臨床的には、セルフリーミトコンドリア DNA の定量による全身性合併症リスクの評価、およびセルフリーミトコンドリア DNA をターゲットとした治療への応用が期待される。

【参考・引用文献】

1. Dawson S-J, et al. N Engl J Med 2013; **368**: 1199.
2. Bianchi DW, et al. N Engl J Med 2014; **370**: 799.