The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure |
| Author(s) | 岡, 崇史 |
| Citation | 大阪大学, 2012, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/59789 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

【8】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 岡　　崇　史（おか　たかふみ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２５５６５　号 |
| 学位授与年月日 | 平成 24 年 5 月 16 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>医学系研究科内科系臨床医学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure<br>（不全心炎症反応におけるミトコンドリア DNA 分解異常の意義） |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　小室　一成<br>（副査）<br>教　授　岩井　一宏　　教　授　吉森　　保 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

心不全は高血圧、心筋梗塞、弁膜症等、全ての心疾患の終末像であり、我が国における主要な死亡原因の１つである。炎症との関連性は示唆されているが、不全心において病原微生物が検出される例は少なく、炎症惹起分子機構は不明である。ミトコンドリアは細菌由来である故、その DNA は Toll-like receptor 9 (TLR9) 依存性に炎症を惹起する非メチル化 CpG 配列を多く有する。また心臓においてミトコンドリアは血行力学的ストレスにより変性し、オートファジーを介してリソソーム酵素により分解される。Deoxyribonculease 2 (DNase II) はリソソーム酸性 DNA 分解酵素である。本研究は不全心の炎症反応における DNase II によるミトコンドリア DNA 分解異常の関与を検討することを目的とした。

【方法ならびに成績】

野生型マウスに横行大動脈縮窄 (transverse aortic constriction; TAC) による圧負荷手術を施行し、術後１週の心肥大期及び 10 週の心不全期において、その心表現型を解析した。免疫組織染色法では、不全心のみに CD45、CD68 陽性細胞浸潤を認めた。心組織において DNA 染色剤の PicoGreen とリソソームマーカーである LAMP2a あるいはオートファゴソームマーカーである LC3 に対する抗体を用いた蛍光免疫染色法を施行したところ、不全心にのみ PicoGreen と LAMP2a 並びに PicoGreen と LC3 の共局在を認めた。これは心不全期におけるオートリソソーム内 DNA 蓄積を示唆する。肥大期では DNase II 活性は対照群に比し上昇していたが不全期では差を認めなかった。

DNA 蓄積と心不全、炎症の関連性を検討するため、floxed *Dnase2a* マウスとα-ミオシン重鎖プロモーター依存性に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを交配することにより心筋細胞特異的 DNase II 欠損マウス（*Dnase2a*$^{flox/flox}$; *Cre* (+)）を作製した。定常状態において対照群（*Dnase2a*$^{flox/flox}$; *Cre* (-)）と比し有意な心表現型の差を認めなかった。しかし、圧負荷 DNase II 欠損マウスは有意に高い死亡率を呈し、術後 10 日目では心臓超音波法上、拡張末期ならびに収縮末期左室内腔径の増加、左室内径短縮率の低下、心重量・肺重量の増加を認め、心不全を呈していた。また心組織内細胞浸潤、線維化も認めた。

圧負荷 DNase II 欠損マウスにおける心不全発症の分子機構解明の為、術後早期２日目において解析したところ、CD45、CD68、Ly6G 陽性炎症細胞浸潤、IL-6, IL-1β mRNA 発現の有意な増加を認めた。電子顕微鏡上、オートリソソーム内に存在するミトコンドリア様構造物を認め、さらに免疫電子顕微鏡法では同構造物内に抗 DNA 抗体陽性シグナルが観察された。蓄積 DNA の起源を検討するため、チミジンアナログである 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を術前に腹腔内投与することによりミトコンドリア DNA を特異的に標識した。圧負荷 DNase II 欠損マウスにおいて EdU と LAMP2a、EdU と LC3 の共局在を認め、蓄積 DNA がミトコンドリア由来であることが示唆された。

オートファジーの関与を検討する為、成獣単離心筋細胞においてミトコンドリア脱共役剤 carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone を用いてオートファジーを誘導し、IL-6 mRNA 発現量を測定した。DNase II 欠損心筋細胞においてのみ IL-6 mRNA 発現は増強していた。オートファジー阻害剤 3-methyladenine 負荷によりその発現は抑制され、刺激剤 rapamycin により増強した。従って DNase II 欠損心筋細胞において炎症細胞の関与無しにオートファジー依存性に炎症が惹起されることが明らかとなった。

さらに TLR9 の関与を検討するため、DNase II 欠損マウスと TLR9 欠損マウスを交配した。TAC 術後 10 日目においてダブルノックアウトマウスでは、DNase II 欠損マウスに比して心機能の改善、炎症細胞浸潤の抑制が観察され、炎症反応発症に TLR9 経路が関与していることが明らかとなった。

野生型マウスの圧負荷術後心不全における TLR9 経路の関与を検討する為、TAC10 週後に TLR9 欠損マウスを解析したところ、対照群に比して心機能が維持され、一般的圧負荷後心不全においても TLR9 経路が関与していることが示された。

【総括】

オートファジー性分解を免れたミトコンドリア DNA の蓄積および TLR9 経路が不全心における炎症反応に関与していることが明らかとなった。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

慢性心不全の病態生理における炎症の関与は多く報告されているが、病原体が検出されないにも関わらず炎症が生じる機序は不明である。非メチル化CpG配列は細菌やウイルスDNAまたミトコンドリアDNAに多く含有され、炎症原性が強い。野生型マウスの圧負荷後不全心では炎症細胞浸潤、オートリソソーム内DNA蓄積が観察された。リソソームDNA分解酵素 (DNase II) の心筋細胞特異的欠損マウス圧負荷心においてミトコンドリアDNAのオートライソソーム内蓄積、心筋炎、心不全が認められ、それらはToll-like receptor 9 (TLR9) の阻害により抑制された。さらに野生型マウス圧負荷後心不全においてもTLR9経路の関与が示唆された。不全心において見られる無菌性炎症はオートファージー分解から免れたミトコンドリアDNA―TLR9経路が関与していることを明らかにした研究であり、学位に値するものと認める。