



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59789">https://hdl.handle.net/11094/59789</a>
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	おか たか みみ 岡 崇 史
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）
学 位 記 番 号	第 2 5 5 6 5 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 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 （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） 教 授 小室 一成 （副査） 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。Deoxyribonuclease 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、不全心へのみ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 $\alpha$ -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<sup>flox/flox</sup>; Cre* (+))を作製した。定常状態において対照群(*Dnase2a<sup>flox/flox</sup>; 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-1 $\beta$  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。