

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	上田 桂太郎
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
Role of mitochondrial DNA damage in cigarette smoke extract-induced innate immunity and its clinical application to atherosclerosis screening (タバコ煙抽出物によるミトコンドリア DNA 損傷と動脈硬化症スクリーニングへの臨床応用)			
論文審査担当者			
主 査	教授 浅野 知一郎	印	
審査委員	教授 東 幸仁		
審査委員	准教授 福田 幸弘		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>喫煙は、動脈硬化の独立した危険因子であるが、喫煙が動脈硬化を引き起こすメカニズムはいまだ不明な点がある。当研究室では以前、動脈硬化巣に DNA 損傷が認められること、若年健常男性を対象とした研究で喫煙者の単核球には非喫煙者に比べ DNA 損傷が多いことを報告している。本研究の目的は、喫煙が動脈硬化の主な病態である炎症を誘発するメカニズムを、DNA 損傷とその後の細胞応答に着目して解明することである。</p> <p>タバコ 8 本分の煙を 15ml のリン酸緩衝液に溶解して cigarette smoke extracts (CSE) を作成し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に投与した。CSE は、時間依存性に DNA 二本鎖切断を増加させ、投与後 72 時間で有意に増加した。この結果は、過酸化水素など他の遺伝毒性物質と比較し増加にかかる時間が遅い。DNA の酸化的損傷を示す 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン抗体を用いた蛍光免疫染色、および、MitoTracker™ を加えた共染色により、酸化的損傷は、核 DNA (nDNA) およびミトコンドリア DNA (mtDNA) に生じていることが明らかとなった。CSE は、ミトコンドリアの膜電位を変化させ、活性型 BAX の細胞質への集積、caspase-3 の活性化、caspase-activated-DNase (CAD) の核内移行を誘導し、ミトコンドリア外膜透過性 (mitochondrial outer membrane permeability; MOMP) の変化が生じたことが示された。これらの変化は、一部のミトコンドリアに限られていたことから、いわゆる minority MOMP が生じ、CAD により一部の DNA に二本鎖切断が生じたと考えられた。</p> <p>損傷した DNA は、細胞質に移行するとの報告があるが、今回の検討でも、CSE は細胞質に DNA 断片の蓄積を生じさせた。この DNA 断片が核由来かミトコンドリア由来かを明らかにするため、nDNA または mtDNA に対する特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR 法を行なったところ、細胞質内 DNA は、両方に由来していた。細胞質 DNA は、細胞質内の DNA センサーを介して炎症を誘発することが知られている。CSE は、細胞質 DNA を感知する cGAS のセカンドメッセンジャーである cGAMP の産生を増加させ、cGAS-STING 経路の下流にある TBK1 のリン酸化および NF-κB の核内移行を誘導した。CSE は、IL-6、IL-1α、IFN-β、MCP-1 の mRNA 発現を 3 日以内に増加させたが、IL-6 のみ持続的な増加を示した。この慢性的な炎症が、cGAS に依存するかどうかを検討するため、cGAS に対する siRNA を HUVEC に導入したところ、CSE による IL-6 mRNA の持続的な発現が消失した。以上から、CSE による IL-6 の持続的発現は、cGAS-STING 経路を介することが示唆された。</p> <p>HUVEC 培養液中にも nDNA および mtDNA が存在していたことから、細胞質 DNA は、細胞外へと放出されることが明らかとなった。これらは、cell-free DNA (cfDNA) と呼ばれ、いくつかの疾患と関連して変化していることが報告されてい</p>			

る。細胞を用いて明らかとなった現象が、生体内でも同様に生じているかを明らかにするため、喫煙者の血漿中の cfDNA を測定した。喫煙者の血漿中の核 cfDNA (n-cfDNA) 及びミトコンドリア cfDNA (mt-cfDNA) は、年齢をマッチさせた非喫煙者と比較して増加していることが明らかとなった。

さらに、血漿中の cfDNA が、動脈硬化の存在を予測する新しいバイオマーカーになりうるかを検討するために、83 名の正常及び動脈硬化患者を対象とし、血漿中の cfDNA を測定した。動脈硬化患者 (A) においては、正常者 (N) に比べ、n-cfDNA (A, 37.2 ± 37.9 vs. N, 24.7 ± 26.8)、mt-cfDNA (A, 201 ± 205 vs. N, 64.5 ± 37.7) のいずれも増加していることが明らかとなった。ROC 曲線から算出された AUC は、mt-cfDNA が n-cfDNA より高かったことから、動脈硬化の有無を予測できるバイオマーカーとしては、mt-cfDNA の方が有用である可能性が示唆された。

以上の結果から、CSE は、DNA 損傷、ミトコンドリア外膜透過性亢進、細胞質 DNA の蓄積による cGAS 活性化を介した持続的炎症を誘導することが示された。さらに、細胞質から細胞外へと移行した cfDNA は、実際に生体内で血漿中に存在していること、n-cfDNA、mt-cfDNA が喫煙者や動脈硬化患者で増加していることが明らかとなった。本論文は、喫煙が動脈硬化の病態の主体である炎症を惹起するメカニズムの一つを明らかにしたと同時に、本研究によって見いだされた現象を、動脈硬化のマーカーとして用いることができる可能性を示しており、基礎的、臨床的意義のある研究であると考えられる。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が、上田桂太郎に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。