

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02909

研究課題名（和文）心房細動の高齢者での発症増加・慢性化を説明する自律的・自己増幅的機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of an autonomous and self-amplifying mechanism to explain the increased incidence and chronicity of atrial fibrillation in the elderly

研究代表者

古川 哲史（Furukawa, Tetsushi）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80251552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000 円

研究成果の概要（和文）：心房細動はもっと頻度の多い不整脈であり、高頻度に脳梗塞（心原性脳塞栓）を合併し、本邦における寝たきりの約20%の原因となっている喫緊の社会課題となっている。今回、臨床試験で、循環ミトコンドリアDNAが健常者に比べて心房細動患者、発作性心房細動患者に比べて慢性心房細動患者で高いことを見出した。培養細胞及びマウス実験で、高頻度刺激によりミトコンドリアDNAがDAMPとして放出されることが、ミトコンドリアDNAはTLR9を介して炎症反応を惹起することを明らかにした。以上から、ミトコンドリアDNAがメタボリックストレスと炎症を結び付けることで、心房細動の発症・重症化に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動はもっと頻度の多い不整脈であり、高頻度に脳梗塞（心原性脳塞栓）を合併し、本邦における寝たきりの約20%の原因となっている喫緊の社会課題となっている。今回、循環ミトコンドリアフリーDNAが心房細動発症、及び慢性化のバイオマーカーとなること、そのメカニズムを明らかにしたことが学術的に高く評価できる。

研究成果の概要（英文）：Atrial fibrillation (AF) is the most common type of arrhythmia and is a major social issue in Japan as it frequently leads to cardioembolic stroke and accounts for approximately 20% of bedridden patients. In this clinical trial, we found that circulating mitochondrial DNA (mtDNA) levels were higher in patients with chronic AF than in healthy controls and patients with paroxysmal AF. In vitro and in vivo experiments using cultured cells and mice, we demonstrated that high-frequency stimulation induces the release of mitochondrial DNA (mtDNA) as a DAMP and that mtDNA triggers an inflammatory response via TLR9. These findings suggest that mtDNA links metabolic stress and inflammation, contributing to the development and progression of atrial fibrillation (AF).

研究分野：循環器内科

キーワード：心房細動 ミトコンドリア セルフリーDNA バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

高齢患者が多く高い **mortality・morbidity** を示す心房細動は、超高齢化社会を迎えた我が国では喫緊の解決課題である。心房細動の非侵襲的治療としては抗凝固薬などの合併症予防薬があるだけで、根本的な心房細動治療薬はない。そこで、創薬シーズ発掘につながる分子レベルでの基礎研究の展開が強く求められる。心房細動は糖尿病や肥満などの合併が多いこと、高齢者に多いこと、などの臨床データから、メタボリック症候群関連疾患に分類されその基盤となる「慢性炎症(自然免疫)」との関連が古くから示唆されている。実際、炎症マーカーである高感度 **CRP・IL-6** 高値が心房細動発症リスクであることから、炎症は心房細動の原因であることはすでに確信に至っている。一方、心房細動自身が炎症を惹起することも明らかとなり、炎症は心房細動の結果ともいえる。すなわち、炎症は心房細動の原因および結果であり、心房細動の発症と重症化(慢性化)の両方に関与すると考えられる。しかし、この心房細動と慢性炎症の双方向性の関係の分子機構はほとんど分かっていない。申請者は、**missing piece** の鍵は、「高齢者における発症の指数関数的増加」・「心房細動が心房細動を起こす (**AF beget AF**) が関与する慢性化・重症化」を説明できる『自律的・自己増幅的機構』にある、との仮説をたてた。そこで、自己増幅的 **vicious cycle** 「循環ミトコンドリアDNA→自然炎症→心房細動→循環ミトコンドリアDNA」という新規経路に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、本経路「循環ミトコンドリアDNA→自然炎症→心房細動→循環ミトコンドリアDNA」の解析を通して、自律的・自己増幅的機構という視点から、心房細動の発症・重症化機構にブレークスルーをもたらすことを目的とする。

## 3. 研究の方法

心房細動患者、非心房細動患者および健常ボランティアの末梢血中の **cfDNA** 測定  
若年健常ボランティアと心房細動患者、および心房細動患者と年齢をマッチさせた非心房細動患者の血漿サンプルから **cfDNA** を抽出し、**Qubit dsDNA HS Assay** を用いて **cfDNA** 総量を定量した。また検量サンプルと合わせて **GAPDH** および **NADH** に対する定量的 **PCR(qPCR)** を行い、核由来 **cfDNA** とミトコンドリア由来 **cfDNA** のコピー数の絶対定量を行った。

**in vivo/in vitro** 心房高頻度ペーシングモデルにおける **cfDNA** 測定  
野生型マウスにおいて血管内カテーテル電極を用いて2時間心房高頻度ペーシングを行い、疑似的心房細動状態を作り出し、ペーシング後血漿サンプルを取得後、と同様に **cfDNA** 総量および核由来 **cfDNA** とミトコンドリア由来 **cfDNA** のコピー数の定量を行った。培養マウス心房筋細胞(**HL-1** 細胞)においても24時間高頻度ペーシングを行った後に、培地中より **cfDNA** を抽出し、同様の評価を行った。

ミトコンドリア由来 **cfDNA** による炎症惹起メカニズムの検討  
マウス肝臓より核 **DNA** とミトコンドリア **DNA** を抽出し、超音波発生機を用いて **DNA** を破断し疑似的な核由来 **cfDNA** およびミトコンドリア由来 **cfDNA** を作成した。それら疑似的 **cfDNA** を培養マウスマクロファージ細胞(**J774.1** 細胞)に暴露し、その炎症性サイトカイ

ン産生を **qPCR** を用いて評価した。またマウス心臓及び肝臓から抽出したミトコンドリア **DNA** のメチル化を検討するために次世代シーケンサーを用いてパイサルファイトシーケンスを行った。

#### 4. 研究成果

合計 **158** 人の患者および健常ボランティアから血漿サンプルを取得し、若年健常コントロール **28** 例、高齢非心房細動患者 **76** 例、発作医性心房細動患者 **26** 例、持続性心房細動患者 **28** 例で血中 **cfDNA** に関して比較検討を行ったところ、**cfDNA** 総量は心房細動患者群で非

心房細動患者群と比較して有意に高値であり、年齢の増加、心房細動病勢の進行に伴って **cfDNA** は増加することが示された (図 1)。核由来 **cfDNA**、ミトコンドリア由来 **cfDNA** のコピー数に関しても同様に非心房細動患者群より心房細動患者群で高値であり、やはり年齢の増加、心房細動病勢の進行に伴ってコピー数が増加する傾向が見られ、特にミトコンドリア由来 **cfDNA** でその増加は有意であった (図 2)。このヒトにおける検証の結果より **AF** により **cfDNA** が血中に放出

されていることが示唆され、**in vivo** および **in vitro** にて検証を行った。**HL-1** 細胞に高頻度ペーシングを行うと、時間依存的に **cfDNA** の放出の増加が生じ、核由来・ミトコンドリア由来 **cfDNA** どちらも同様に増加した (図 3)。また野生型マウスにおいて心房高頻度ペーシングを行うと、血中 **cfDNA** は増加したが、核由

来 **cfDNA** では増加は見られず、ミトコンドリア由来 **cfDNA** の増加が見られた (図 4)。これら結果より、**AF** により **cfDNA** が血中に放出されると考えられたが、この放出された **cfDNA** が **AF** の病態にどのように寄与しているかが不明であった。

**AF** における **cfDNA** の病的意義を検討するために、前述した高頻度ペーシングを施した心房筋細胞の培地から抽出し

た **cfDNA** を **in vitro** において、マクロファージ細胞に暴露したところ、用量依存的に **IL-1 $\beta$** 、**IL-6** の発現量が増加することを見出した (図 5 左)。そこで核由来、ミトコンドリア由来 **cfDNA** に関して個々に検証するた

図 1. 心房細動患者における血中 **cfDNA**

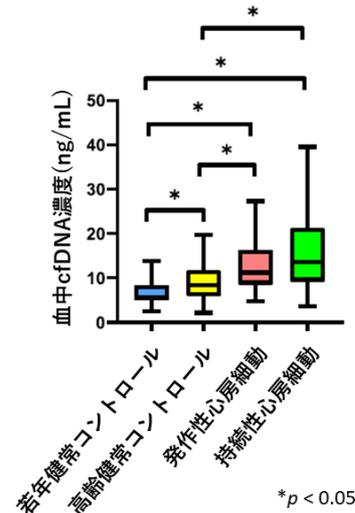


図 2. 心房細動患者における血中 **cfDNA** の起源

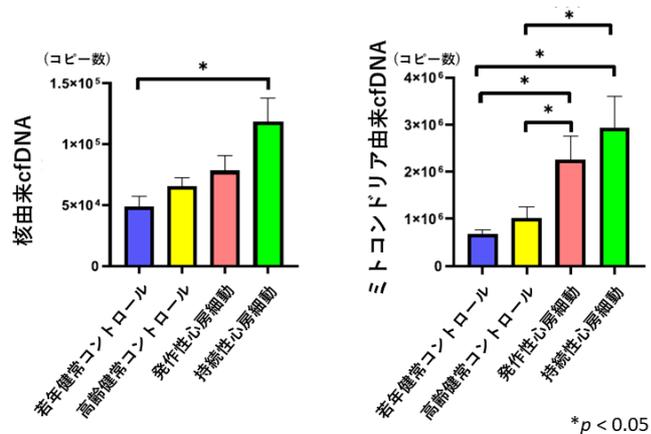
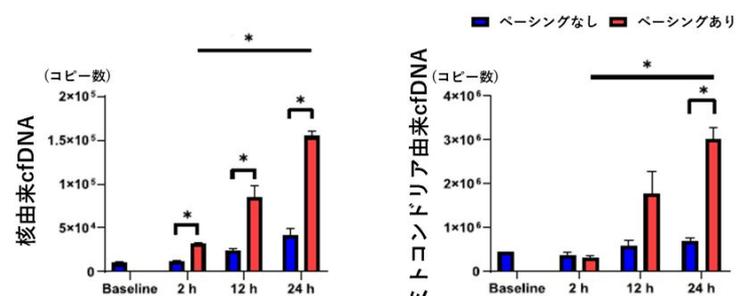
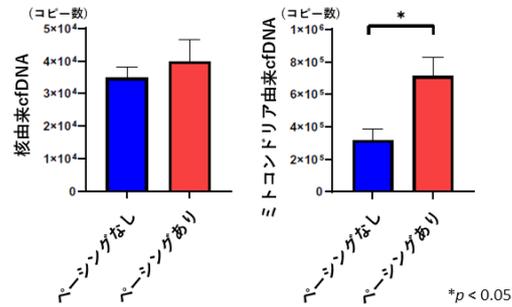


図 3. ペーシング刺激による培養心筋細胞からの **cfDNA** の放出



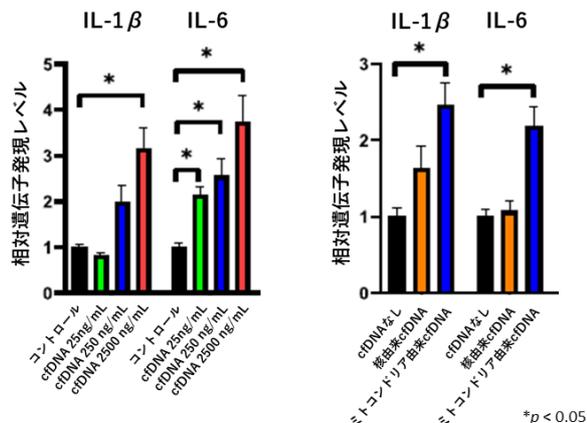
め、肝臓から抽出した核およびミトコンドリア DNA から作成した疑似的 cfDNA をマクロファージ細胞に暴露したところ、ミトコンドリア由来疑似的 cfDNA が有意に炎症性サイトカインの産生を促した（図5右）。ミトコンドリア由来 cfDNA が炎症を惹起するメカニズムとして TLR-9 を介した機序を想定し、ミトコンドリア由

図4.マウスにおける心房ペースティング刺激による血中cfDNAの変動



来疑似的 cfDNA をマクロファージ細胞に TLR-9 阻害薬(ODN2088)と共に暴露したところ、ミトコンドリア由来疑似的 cfDNA による炎症性サイトカイン産生効果は TLR-9 阻害によりキャンセルされた（図6左）。TLR-9 は非メチル化 CpG を認識することが知られており、マウス心臓および肝臓におけるミトコンドリア DNA のメチル化の程度をパイサルファイトシーケンスで評価したところ、それぞれ 99.6%および 99.7%のシトシンが非メチル化シトシンであった。そこで、ミトコンドリア由来疑似的 cfDNA をキットを用いて人工的にメチル化を行った後にマクロファージ細胞に暴露したところ、炎症性サイトカイン産生は有意に抑制された（図6右）。これらの結果をまとめると、心房細動は血中 cfDNA の増加をもたらす、放出された cfDNA の中でもミトコンドリア由来 cfDNA はメチル化されていないため TLR-9 を介してマク

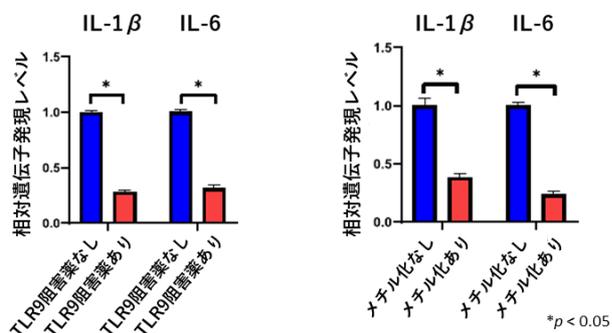
図5.ミトコンドリア由来cfDNAによる炎症反応惹起



ロファージにおける炎症性サイトカイン産生を促し、全身性炎症および心房における慢性炎症を惹起し、AF begets AF の悪循環を形成し AF における「自律的・事故増幅的機構」を担っていると考えられた。

本研究結果により、循環 cfDNA、特に循環ミトコンドリア由来 cfDNA は AF における「自律的・事故増幅的機構」をもたらす重要分子と考えられ、循環 cfDNA が治療標的分子となりうる事が示唆された。

図6.非メチル化ミトコンドリアcfDNAはTLR9を介して炎症反応を惹起する



cfDNA の血中放出阻害や、本研究でも用いた TLR-9 阻害が心房細動の悪循環を根本的に断ち切る治療手段となりうる可能性が示唆され、同作用点に着目し

た心房細動治療薬の開発が望まれる。

また本研究により **cfDNA** は臨床において心房細動の有用なバイオマーカーとなりうることを示唆された。特に心房細動は無症状症例も多く、脳梗塞や心不全などの重篤な合併症を発症する前に診断し抗凝固療法などの合併症予防を早期に開始することが重要である。発作性心房細動では普段（非発作時）は心房細動を呈していないことから診断が難しいとされており、その点において **cfDNA** は発作性心房細動診断に有効である可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Tomofumi, Aiba Takeshi, Shimizu Wataru, Furukawa Tetsushi, Sasano Tetsuo	4. 巻 CJ-22
2. 論文標題 Prediction of the Presence of Ventricular Fibrillation From a Brugada Electrocardiogram Using Artificial Intelligence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-22-0496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ono Katsushige, Sasano Tetsuo, Furukawa Tetsushi, et al. the Japanese Circulation Society and Japanese Heart Rhythm Society Joint Working Group	4. 巻 38
2. 論文標題 <scp>JCS</scp> / <scp>JHRS</scp> 2020 Guideline on Pharmacotherapy of Cardiac Arrhythmias	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Arrhythmia	6. 最初と最後の頁 833 ~ 973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/joa3.12714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Junji, Chiba Risako, Komuro Hiroaki, Ihara Kensuke, Nozaki Kosuke, Nagai Akiko, Furukawa Tetsushi, Sasano Tetsuo	4. 巻 4
2. 論文標題 Local Injection of Hydroxyapatite Electret Ameliorated Infarct Size After Myocardial Infarction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 38 ~ 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circrep.CR-21-0100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ihara Kensuke, Sasano Tetsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atrial Fibrillation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 862164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.862164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ihara Kensuke, Sasano Tetsuo	4. 巻 86
2. 論文標題 Seeking a Better Experimental Model of Atrial Fibrillation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 330 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-21-0770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagata Tetsuya, Dwyer Chrissa A., Yoshida-Tanaka Kie, Ihara Kensuke, Ohyagi Masaki, Kaburagi Hidetoshi, Miyata Haruka, Ebihara Satoe, Yoshioka Kotaro, Ishii Takashi, Miyata Kanjiro, Miyata Kenichi, Powers Berit, et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 Cholesterol-functionalized DNA/RNA heteroduplexes cross the blood?brain barrier and knock down genes in the rodent CNS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1529 ~ 1536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41587-021-00972-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohyagi Masaki, Nagata Tetsuya, Ihara Kensuke, Yoshida-Tanaka Kie, Nishi Rieko, Miyata Haruka, Abe Aya, Mabuchi Yo, Akazawa Chihiro, Yokota Takanori	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide technology for regulating lymphocytes in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26902-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井原健介、古川哲史	4. 巻 109
2. 論文標題 12誘導心電図	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 診断と治療	6. 最初と最後の頁 147-151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井原健介、古川哲史	4. 巻 91
2. 論文標題 遺伝性不整脈・心筋疾患の遺伝子診断の現状と未来	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 循環器内科	6. 最初と最後の頁 260-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井原健介、笹野哲郎	4. 巻 31
2. 論文標題 Exosomeを心不全の診断に生かす	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cardiac practice	6. 最初と最後の頁 125-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井原健介、中釜瞬	4. 巻 34
2. 論文標題 秒で見抜くヤバい心電図	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EmerLog	6. 最初と最後の頁 6-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ihara K, Kuroyanagi H, Hiraoka Y, Sasano T, Furukawa T
2. 発表標題 Atrial Fibrillation in Cardiomyopathy Mice with Rbm20 Mutation
3. 学会等名 The 86th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iwamiya S, Ihara K, Furukawa T, Sasano T
2. 発表標題 The effects of Sacubitril/Valsartan on murine atria with pressure overload
3. 学会等名 The 86th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩宮寛、井原健介、古川哲史、笹野哲郎
2. 発表標題 心不全モデルのマウス心房に対するSacubitril/Valsartanの電気生理学的効果
3. 学会等名 第262回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井原健介、黒柳秀人、平岡優一、笹野哲郎、古川哲史
2. 発表標題 不整脈原性拡張型心筋症の新規発症機序
3. 学会等名 第25回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iwamiya S, Ihara K, Furukawa T, Sasano T
2. 発表標題 The effects of Sacubitril/Valsartan on electrophysiological properties of atria in murine hearts with pressure overload
3. 学会等名 The 5th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩宮賢、井原健介、富井直輝、山崎正俊、黒柳秀人、佐久間一郎、古川哲史、笹野哲郎
2. 発表標題 心房細動モデルマウスのoptical mapping による評価
3. 学会等名 心電学関連春季大会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩宮賢、井原健介、古川哲史、笹野哲郎
2. 発表標題 心不全モデルマウスにおけるSacubitril/Valsartanの心房への電気生理学的効果
3. 学会等名 心電学関連春季大会2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井原 健介  (Ihara Kensuke)  (50770210)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教   (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------