

# 心血管代謝疾患における DNA センサーの役割

福田 大受

<b>Citation</b>	大阪市医学会雑誌. 71; 9-16
<b>Issue Date</b>	2022-12-25
<b>Type</b>	Journal Article
<b>Textversion</b>	Publisher
<b>Rights</b>	© 大阪市医学会. © Osaka City Medical Association. <a href="https://osakashi-igakukai.com/">https://osakashi-igakukai.com/</a> .

Placed on: Osaka City University

# 心血管代謝疾患における DNA センサーの役割

福田 大 受

大阪公立大学大学院医学研究科 循環器内科学

## The Role of DNA Sensors in Cardiometabolic Diseases

Daiju Fukuda

(Department of Cardiovascular Medicine, Osaka Metropolitan University Graduate School of Medicine)

### Abstract

Sterile chronic inflammation plays a causal role in the pathogenesis of cardiometabolic diseases such as insulin resistance and atherosclerosis. However, the underlying mechanisms of sterile chronic inflammation are not well elucidated. Lifestyle-related risk factors such as diabetes, dyslipidemia, and hypertension cause cell damage in metabolic organs and vascular tissue, releasing various endogenous ligands for the pattern recognition receptors (PRRs) including DNA sensors. Recent studies suggested that PRR activation by endogenous ligands promotes sterile chronic inflammation, contributing to the pathogenesis of various inflammatory diseases. Undamaged DNA is crucial for the sustenance of life, however, DNA fragments, particularly those from pathogens, are potent activators of DNA sensors and accelerate inflammatory response in the innate immune system. We and others have demonstrated that nucleic acids released by and accumulated in damaged tissues also function as endogenous ligands for DNA sensors, participating in the development of inflammatory diseases including cardiometabolic diseases. There are several types of DNA sensors. This review briefly describes the role of DNA sensors such as Toll-like receptor 9 and cyclic GMP-AMP synthase - stimulator of interferon genes system, in the pathogenesis of sterile chronic inflammation which contributes to the development of cardiometabolic diseases.

### 要 約

慢性炎症はインスリン抵抗性、動脈硬化症などの心血管代謝疾患の病態基盤となる。しかしながら、無菌性慢性炎症の基盤メカニズムの全体像は未解明である。糖尿病や脂質異常症、高血圧などの様々な生活習慣に関連したリスク因子は、代謝臓器や血管組織において、細胞や組織のダメージを誘発し、種々のパターン認識受容体に対する様々な内因性リガンドを放出させる。近年、ダメージを受けた細胞から放出される DNA 断片などの核酸は、組織内に蓄積し、内因性リガンドとして役割を果たすことが明らかになってきた。生体内には、核酸断片を認識する受容体 (DNA センサー) が存在している。DNA センサーは、本来、病原体由来の DNA 断片を認識し、強力な免疫反応を誘導することで、生体防御システムとして作用する。しかし、最近の研究によって、DNA センサーは、自己細胞由来のミトコンドリア DNA などの核酸断片をも認識することにより、無菌性炎症を惹起し、種々の炎症性疾患の病態に関与することが明らかになってきた。本稿では、複数ある DNA センサーのうち、エンドソームに局在する Toll 様受容体 9 と細胞質内に存在する cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes が、心血管代謝疾患の病態に与える影響を概説する。

**Key Word:** インスリン抵抗性、動脈硬化症、自己由来 DNA, TLR9, cGAS-STING

## 1. はじめに

動脈硬化やインスリン抵抗性などの生活習慣病は世界中で増加しており、社会的な問題となっている。これらの生活習慣病の基盤病態は、それぞれ血管や脂肪組織における無菌性の慢性炎症とされている。スタチンや糖尿病治療薬が、これらの疾患の管理状況を改善したが、残余リスクの問題など残された課題は多い。より有効な新しい治療方法の開発のためにも、心血管代謝疾患の基盤病態である無菌性慢性炎症の機序の解明が望まれている。

生活習慣病の原因となる不健康な生活習慣（過食、活動量の低下、喫煙など）、代謝に関連した危険因子（高血圧、糖尿病、脂質異常症など）や、他の因子（遺伝背景、性別、加齢など）は、生理的および病的プロセスにおいて代謝関連臓器や血管組織を障害する。その過程において核DNAやミトコンドリアDNA (mtDNA) に損傷が生じると、DNA断片は放出あるいは蓄積される。また、生活習慣病に関連するとされている酸化ストレスの上昇や低酸素環境もDNA損傷をひき起こすことが明らかになっている。DNAは、本来、生命維持に不可欠な物質であるが、同時に、種々のDNAセンサーを活性化することで、強力に炎症反応を惹起する。この反応は、主に、細菌などの外来性DNA断片に対して発動され、生体防御に不可欠であるが、近年の研究によって、様々な原因で遊離した自己由来のDNA断片によるDNAセンサーの活性化が、種々の炎症性疾患の病態に関与することが明らかになってきた。本稿では、複数あるDNAセンサーのうち、エンドソームに局在するToll様受容体 (TLR) 9と細胞質内に存在するcyclic GMP-AMP synthase (cGAS) -stimulator of interferon genes (STING) が、心血管代謝疾患の病態に与える影響を概説する。

## 2. DNA センサー

マクロファージなどの免疫担当細胞は、パターン認識受容体 (pattern-recognition receptors; PRRs) を介して病原体由来の分子構造を認識し、自然免疫系を活性化させる。自然免疫反応は、感染時に抗原提示細胞や白血球を遊走させるとともに、獲得免疫を誘導する重要な役割を果たす。DNAセンサーは、PRRsの一種である。細菌などの外来性DNA断片は病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) としてDNAセンサーを活性化させることで、生体防御に寄与している。代表的なPRRsであるTLRのうちTLR3, 7, 8, 9, 13はエンドソームに存在し、核酸断片を認識することが知られている。なかでもTLR9は、細菌やウイルス由来の非メチル化CpG-DNA配列がリガンドとして結合すると、myeloid differentiation factor 88 (MyD88) - interferon regulatory factor (IRF) 7や、MyD88-nuclear factor-κB

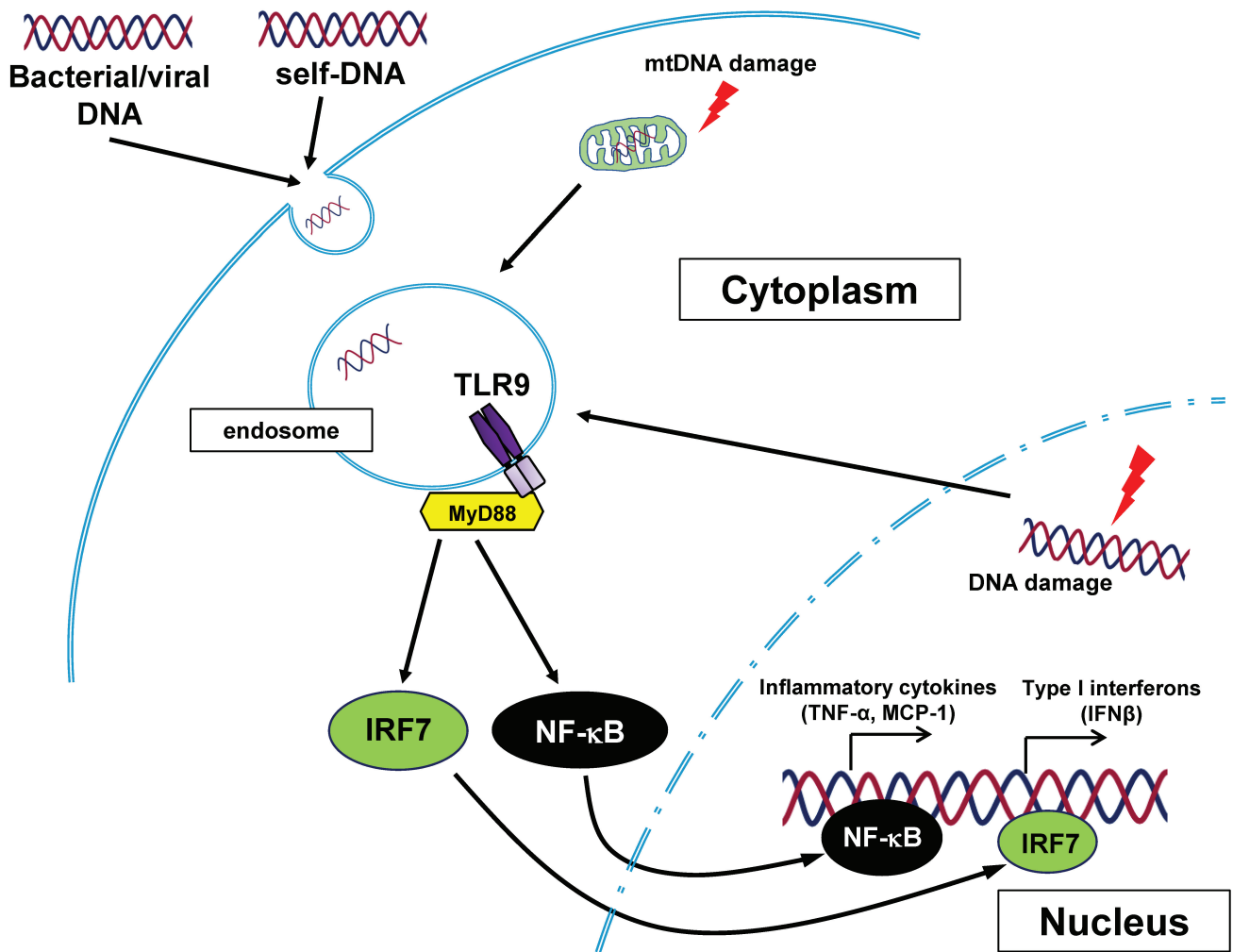
(NF-κB) などの経路を介して、I型インターフェロン (interferon; IFN) や炎症性サイトカインの産生を促進し、炎症反応を惹起する<sup>1)</sup> (Fig. 1)。一方、細胞質内にもDNAセンサーは発現している。そのひとつが、cGAS-STING経路である。細胞質内に生じたDNA断片は、cGASを活性化し、セカンドメッセンジャーであるcyclic GMP-AMP (cGAMP) を合成する。そして、cGAMPがSTINGに結合することで、NF-κBやIRF3経路が活性化され、炎症性サイトカインやIFNsの産生が促進される<sup>2,3)</sup> (Fig. 2)。

数多くのDNAセンサーが知られており、すべてが生体防御に重要な役割を果たしているが、近年の研究によって、DNAセンサーが自己由来のDNA断片をも認識することで、無菌性慢性炎症を惹起し、生活習慣病の原因となることが明らかになってきた。

## 3. 肥満・インスリン抵抗性におけるDNAセンサーの役割

生活習慣の変化により、世界規模で肥満の発症頻度が増加している。肥満は、インスリン抵抗性や脂質異常症、脂肪肝、高血圧症を含む複数の代謝異常と深く関係している。肥満とその合併症の病態には、代謝臓器、特に脂肪組織における無菌性慢性炎症が重要な役割を果たす。脂肪組織において慢性炎症が生じるメカニズムは十分に解明されていない。しかし、近年の研究により、脂肪組織はエネルギー貯蔵臓器であるが、その機能維持のために免疫系や血管新生等のバランスが高度に調整されており<sup>4,5)</sup>、肥満状態では、酸化ストレスの上昇<sup>6)</sup>、低酸素環境<sup>4)</sup>や過剰な炎症により、これらのバランスが乱れ、細胞の障害が誘発されることが明らかになってきた<sup>7,9)</sup>。局所および全身に放出された脂肪細胞由来の因子は、脂肪組織内の炎症を促進する複数のシグナルの活性化に関与している<sup>10)</sup>。肥満に関連して放出される飽和脂肪酸などがTLR2やTLR4の内因性リガンドとして脂肪組織の炎症増悪に寄与するが<sup>11)</sup>、自己由来のDNA断片も内因性リガンドとして放出される。

我々は、高脂肪食負荷により肥満を誘導してインスリン抵抗性が発現したマウスでは、通常食を与えたマウスよりも血液中のDNA断片濃度が上昇することや、ヒトにおいても、内臓脂肪型肥満と診断された患者では、非肥満者よりも血液中のDNA断片濃度が上昇することを見出した<sup>12)</sup>。さらに、血液中のDNA断片濃度はHOMA-IRと正の相関をすることを報告している。また、肥満マウスの脂肪組織内のマクロファージにはDNA断片が蓄積していることも明らかにしている。一方で、DNA断片の受容体であるTLR9の発現は、高脂肪食負荷によりマウス内臓脂肪組織で上昇する。そこで我々は、TLR9欠損マウスと野生型マウスに高脂肪食負荷を行うことで肥満を誘導し、TLR9とインスリン抵抗性や脂肪組織の炎症との関係を検

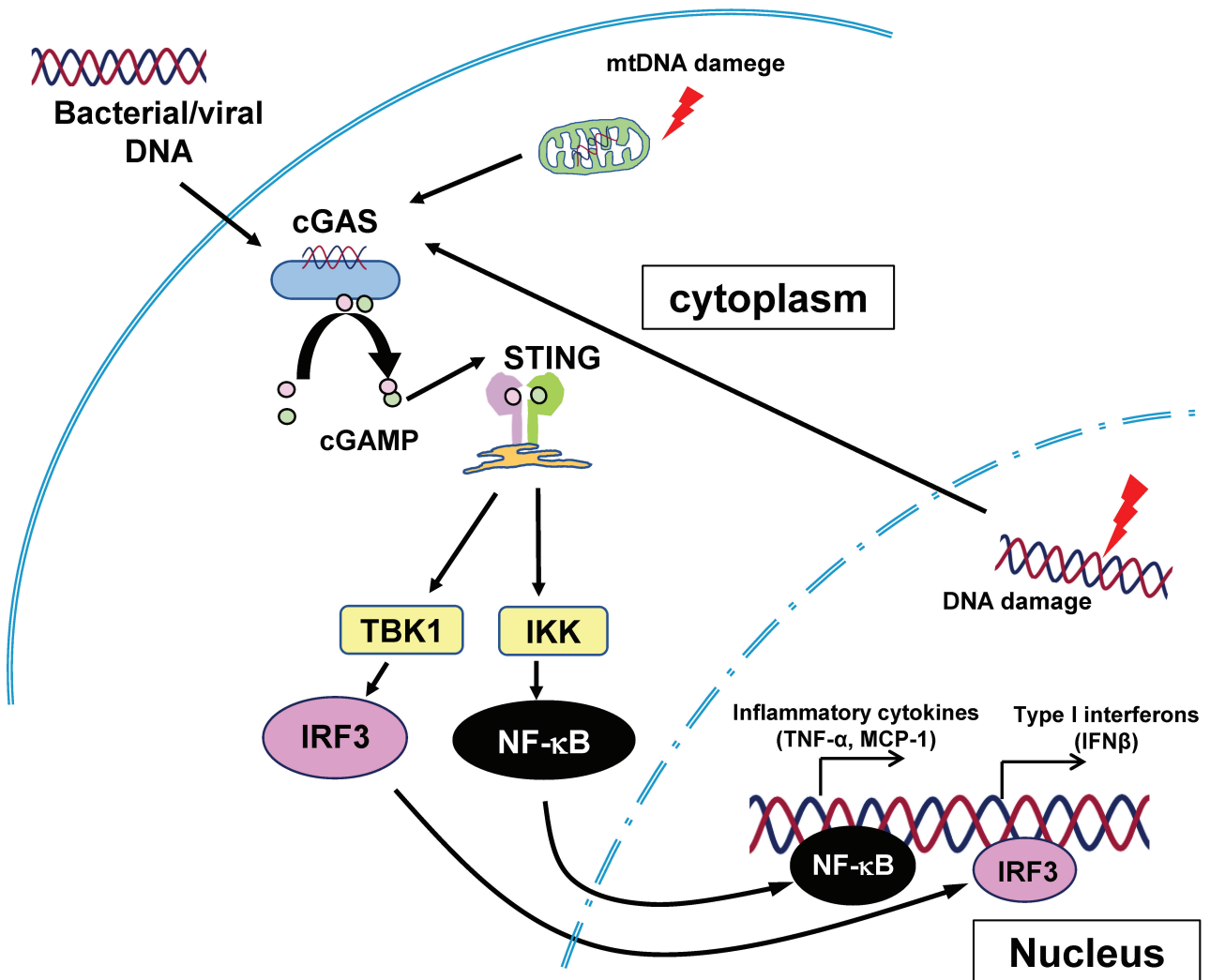


**Fig. 1** Activation of TLR9 pathway. After binding with ligands including pathogen- and self-derived DNA fragments, TLR9 activates inflammatory pathways such as MyD88-IRF7 pathway and MyD88-NF-κB pathway, resulted in the production of type I IFN and inflammatory cytokines. TLR9, Toll-like receptor 9; MyD88, myeloid differentiation factor 88; IRF, interferon-regulatory factor; NF-κB, nuclear factor-κB; and IFN, interferon.

討した。肥満の程度は TLR9 欠損マウスと野生型マウスと同等であったが、TLR9 欠損マウスは、野生型マウスと比較して脂肪組織における炎症の程度が減弱しており、インスリン抵抗性の程度が軽いことが明らかになった。また、TLR9 特異的阻害オリゴヌクレオチド (iODN2088) を投与した野生型マウスにおいても、脂肪組織の炎症、インスリン抵抗性の程度が抑制されていた。逆に、骨髄特異的に TLR9 を発現したマウスではインスリン抵抗性が悪化することが示された。さらに細胞レベルにおいて、TLR9 欠損マクロファージは野生型マクロファージに比べて、DNA 断片や脂肪細胞の培養上清中の遊離 DNA 断片に対する炎症応答が減弱していた。以上の結果より、肥大した脂肪細胞から放出された DNA 断片は、TLR9 を介してマクロファージの炎症を促進し、脂肪組織の炎症を惹起することで、インスリン抵抗性の発現に関与することが示唆され

た。しかしながら TLR9 欠損が高脂肪食負荷マウスにおいてインスリン抵抗性を悪化させるとの報告もあり、TLR9 活性化による抗炎症作用の可能性も示唆される<sup>13)</sup>。モデルマウスの差異による影響も考えられるが、これまでの検討により、リガンドの多寡によって TLR9 活性化で生じる炎症応答に差があることも報告されており<sup>14)</sup>、TLR9 の活性化と脂肪組織の炎症、インスリン抵抗性の発症に関しては、今後も検討の必要がある。

細胞質型 DNA 認識機構である cGAS-STING シグナルとインスリン抵抗性との関連も報告されている。cGAS-STING シグナルの上流・下流の遺伝子発現は、肥満モデルマウスで活性化している<sup>15,16)</sup>。また、高脂肪食負荷により引き起こされた脂肪組織からの mtDNA 放出は、cGAS-cGAMP-STING 経路を活性化し、無菌性慢性炎症を促進してインスリン抵抗性の悪化に寄与する<sup>16,17)</sup>。さらに糖尿

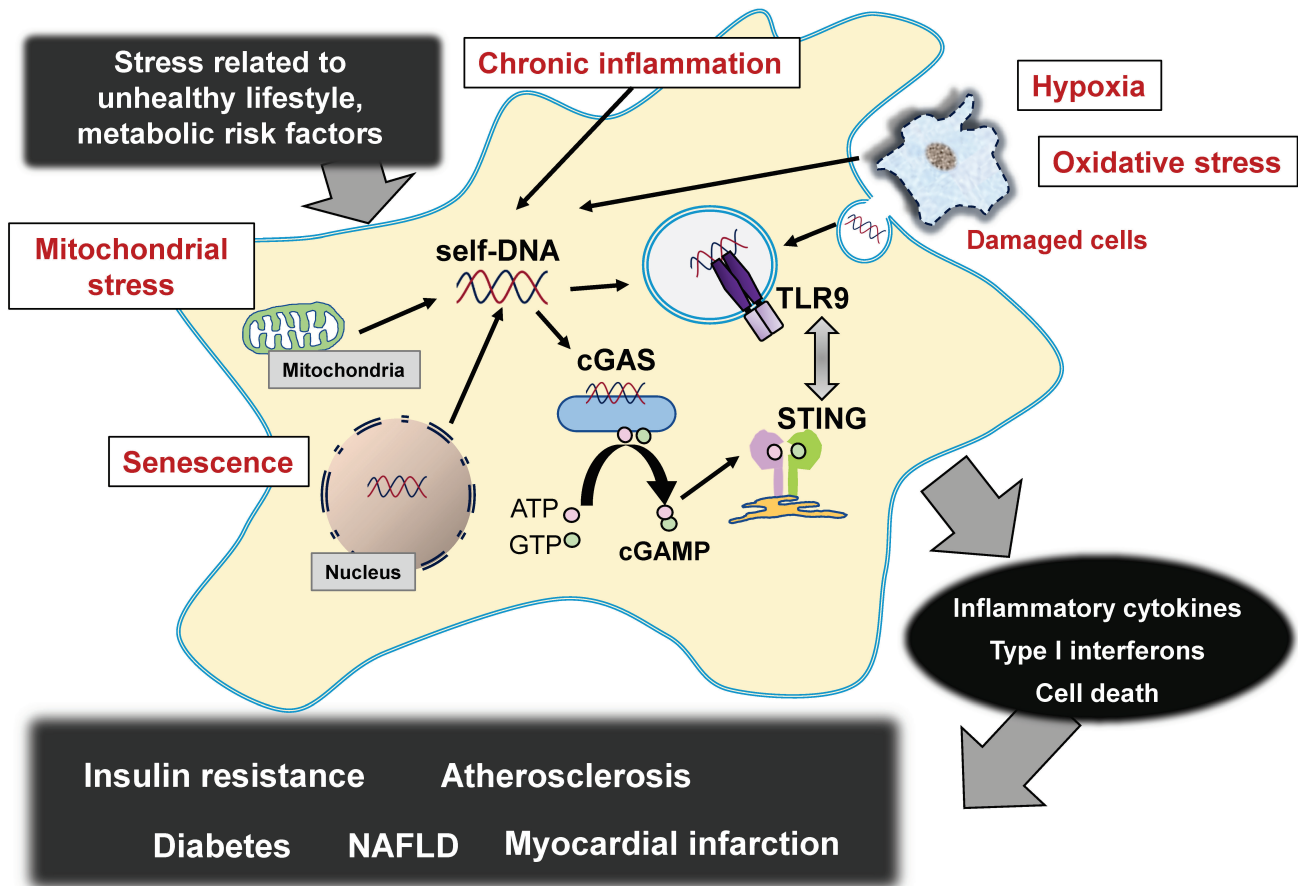


**Fig. 2** Activation of cGAS-STING pathway. STING ligates with cGAMP which is generated by cGAS activated with DNA fragments presented in the cytoplasm. Subsequently, STING activates NF- $\kappa$ B and IRF3, inducing IFNs and other inflammatory cytokines. cGAS, cyclic GMP-AMP synthase; STING, stimulator of interferon genes; cGAMP, cyclic GMP-AMP; IRF, interferon-regulatory factor; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; and IFN, interferon.

病モデル動物の db/db マウスの膵臓  $\beta$  細胞は、STING シグナルが活性化しており、2 型糖尿病の  $\beta$  細胞における脂肪毒性の病態への関与が示唆される<sup>18)</sup>。

非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) の病態における DNA 認識機構の関与も報告されている。肝臓への過剰な脂肪蓄積による肝障害は、mtDNA の損傷を生じさせ、マウスでは mtDNA の認識を介した TLR9-IFN $\beta$  シグナルの活性化が肝細胞死や肝線維化を促進し、逆に TLR7/9 の阻害剤である IRS954 投与は脂肪肝を効果的に改善することが明らかになっている<sup>19)</sup>。臨床研究では、健康な人に比べて非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) 患者は、血中の mtDNA コピー数が増加することが明らかになっている<sup>20,21)</sup>。TLR9 と同様に、NAFLD の病態における

STING の役割も報告されている。mtDNA 断片が生じることにより活性化された STING は、I 型 IFN 発現を誘導し、肝臓での炎症反応の進行に重要な役割を果たす<sup>22,23)</sup>。STING 欠損マウスは、NASH の程度やインスリン抵抗性発現が緩和されており、STING を介した NASH 増悪のメカニズムとして肝細胞から放出された mtDNA がクッパー細胞の TNF $\alpha$  や IL-6 の発現を促進することが示されている<sup>23)</sup>。肝臓での脂肪蓄積に関連した代謝ストレスは、組織障害につながると考えられ、自己由来 DNA 断片の放出や蓄積を引き起こし、ひいては TLR9 や cGAS-STING 活性化を介した炎症を惹起することで、NAFLD 増悪と全身の代謝状態悪化につながることが推測される (Fig. 3)。インスリン抵抗性や肝疾患などの代謝疾患の病態生理における DNA センサーの役割を明らかにするためにさらなる



**Fig. 3** Role of DNA-sensing mechanism in cardiometabolic diseases. TLR9 and cGAS-STING play important roles in the sterile chronic inflammation caused by endogenous DNA fragments, contributing to the pathogenesis of cardiometabolic diseases. cGAS, cyclic GMP-AMP synthase; and STING, stimulator of interferon genes.

研究が待たれる。

#### 4. 動脈硬化症における DNA センサーの役割

高血圧や糖尿病、脂質異常症などの危険因子の存在下では、血管の慢性炎症が生じ動脈硬化症が発症する<sup>24</sup>。血管の慢性炎症と動脈硬化症を引き起こすメカニズムの全容は、十分に明らかになっていない。近年、自然免疫系が血管の炎症進行に役割を果たしていることを示すエビデンスが蓄積しつつある<sup>25</sup>。多くの PRRs が、動脈壁に存在する内皮細胞、単球、マクロファージや樹状細胞などの複数の細胞種に発現する<sup>26-29</sup>。TLR は動脈硬化症のプロセスに深く関わっており、これまでによく研究されている TLR2 や TLR4 の関与に加えて、近年の研究では、マクロファージや樹状細胞に発現する TLR9 活性化の関与も示唆される<sup>30-32</sup>。

以前から動脈硬化症では、各種血管構成細胞の細胞死やアポトーシスが生じていることが明らかになってきたが、近年、冠動脈 CT 検査によって診断された重症の冠動脈硬化症を持つ患者では、動脈硬化のない患者と比較して、血

液中の遊離 DNA 断片濃度が高いことが示された<sup>33</sup>。我々は、急性心筋梗塞患者において、責任冠動脈から採取された血液中の遊離 DNA 断片濃度が、光干渉断層法を用いて観察した責任病変におけるマクロファージ浸潤や脂質沈着と相関することを報告している<sup>34</sup>。これらの結果は、少なくとも部分的にはプラーク由来の DNA 断片が血管の炎症や動脈硬化に関与することを示唆している。

一方で、DNA センサーのひとつである TLR9 活性化は、*in vitro* において NF- $\kappa$ B や IRF7 経路を介してマクロファージの泡沫細胞化を促進することが報告されている<sup>30</sup>。我々も、TLR9 アゴニストのひとつである ODN1826 は、p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) 経路を介して ApoE 欠損マクロファージの炎症反応の活性化を著しく促進することを報告した<sup>34</sup>。

そこで、我々は、TLR9 が動脈硬化に与える影響を検討するため、TLR9 と動脈硬化モデルマウスであるアポリポタンパク E (ApoE) 欠損マウスを交配し、TLR9/ApoE 2 重欠損マウスを作製した。アンジオテンシン II 投与下で、TLR9/ApoE 2 重欠損マウスでは、コントロール群に比べ

て血圧や脂質レベルに差を認めなかったが、動脈硬化病変の大きさが有意に抑制されていた。さらに、TLR9 特異的阻害オリゴヌクレオチドである iODN2088 投与により、ApoE 欠損マウスの動脈硬化の進行が抑制された。いずれの実験モデルにおいても、動脈硬化巣のマクロファージ浸潤や脂肪蓄積、炎症性分子の発現は抑制されていた。他の TLR9 阻害薬である IRS869 の投与によっても動脈硬化モデルマウスのプラーク形成の抑制や、マクロファージ極性の抗炎症型 M2 マクロファージへの変化が報告されている<sup>35)</sup>。逆に、骨髄移植によって作成した骨髄特異的 TLR9 発現 ApoE 欠損マウスでは大動脈における動脈硬化が促進されることから、TLR9 が動脈硬化症を促進する役割をもつことが示唆される。実際に TLR9 アゴニストである ODN1826 を静脈内投与した研究では、血管の再内皮化が障害され、動脈硬化の進展を促進する可能性が報告されている<sup>36)</sup>。以上の研究結果は、TLR9 の活性化が血管組織における炎症反応を増悪させ動脈硬化の進展を促進することを示唆する。一方で、TLR9 のインスリン抵抗性に対する影響と同様に、TLR9 が動脈硬化を抑制するという報告も散見される<sup>37,39)</sup>。これまでの研究において TLR9 のリガンド濃度の多寡により、TLR9 活性化は異なる作用を示すことも報告されている<sup>14)</sup>。また、TLR9/ApoE 2 重欠損マウスに長期間西洋食を与えると、通常の ApoE 欠損マウスと比べて血中脂質レベルが上昇し、プラークの炎症が増悪することも報告されており<sup>39)</sup>、自然免疫機構と脂質代謝の関係も注目される。

TLR9 だけでなく、STING も血管の炎症と動脈硬化を促進する。我々は、ApoE 欠損マウスに西洋食を与えて動脈硬化を誘導すると、血管における STING の発現が増加するだけでなく、DNA 断片の蓄積や STING リガンドである cGAMP が検出されることを見出した<sup>40)</sup>。そこで STING/ApoE 2 重欠損マウスを作製し、STING が動脈硬化に与える影響を検討した。STING の欠損は ApoE 欠損マウスの血圧や脂質レベルに影響しなかったが、有意に動脈硬化や血管組織における炎症性物質の発現を抑制した。また、STING 阻害剤 C-176 の投与も、ApoE 欠損マウスの動脈硬化の進行を抑制した。一方で、ApoE 欠損マウスに骨髄特異的に STING を発現させると動脈硬化巣の形成は促進された。これらの結果は、動脈硬化症の病態と STING に因果関係があることを示唆する。また、他のグループからは、IRF3 は STING シグナル下流の介在分子の一つであるが、IRF3/ApoE 2 重欠損マウスは、プラークの形成や不安定化が減弱していたことが報告されている<sup>41)</sup>。また STING シグナル下流分子である IFN $\beta$  投与は、動脈硬化増悪を促進させるとの報告も存在する<sup>42)</sup>。ヒトおよびマウスのマクロファージでは、cGAMP や mtDNA が、各種サイトカインや IFN $\beta$  などの炎症性物質の発現を

促進する。さらに、我々の臨床検体を用いた研究では、頸動脈内膜剥離術で採取された動脈硬化組織のプラークにおける STING の発現と cGAMP 濃度は、対照の組織よりも有意に高く、ヒト動脈硬化病変においても STING シグナルの関与が示唆されている (Fig. 3)。

STING シグナルは他の動脈・血管疾患の病態との因果関係も示されている。STING 欠損マウスは、大動脈解離と大動脈瘤の形成が抑制される<sup>43)</sup>。この報告では、平滑筋細胞由来の DNA 断片放出により STING を介してマクロファージが活性化することが、これらの動脈疾患の病態メカニズムであることが示唆されている。また STING の下流分子である TBK1 の阻害薬の投与実験によって、STING シグナルが大動脈瘤形成に関与することも確認されている。

また、ヒトの血管病変における STING の関与も報告されている。STING 遺伝子の機能獲得変異は、家族性の自己炎症性疾患である乳児発症 STING 関連血管炎 (STING-associated vasculopathy with onset in infancy; SAVI) の血管障害と密接な関係があることが複数報告されている<sup>44-46)</sup>。SAVI 患者の末梢血単球の IFN $\beta$  転写促進が生じていることが病態メカニズムのひとつであると考えられている<sup>45)</sup>。一方で、STING の R293Q の SNP は、肥満に関連した循環器疾患に対して保護的効果があると報告されている<sup>47,48)</sup>。cGAS-STING 経路の血管疾患への関与についてのエビデンス蓄積は限られている。しかしながら、近年の研究結果は cGAS-STING シグナルが様々な血管疾患の病態へ関与することを示唆しており、さらなる研究が期待される。

## 5. 心血管代謝性疾患の治療標的としての DNA センサーの可能性

慢性炎症が冠動脈疾患を含む多くの生活習慣病の基盤病態であることが知られるようになったが、慢性炎症を標的としたこれらの疾患の治療方法の開発は十分でない。CANTOS trial で示されたように IL-1 $\beta$  の阻害薬の投与は心血管イベントの発症を抑制したが、同時に感染症の危険性を増加させる危険性を示した<sup>49)</sup>。炎症治療は、諸刃の刃の性質を持っており慎重な対応が必要である。

外来性 DNA 認識は、自然免疫系の最も基本的なはたらきであり、生体における自己防御システムの最前線である。近年の研究で、このシステムは特定の状況下では内因性 DNA に対しても炎症反応を促進することが明らかになってきた。実際に、TLR9 や SITING に対する阻害剤を投与した動物実験では、インスリン抵抗性や脂肪肝、動脈硬化症などを抑制することが報告されている。しかし、自己由来の DNA に対する想定外の免疫反応を誘発させる詳細なメカニズムは、未だ十分には解明されていない。持

続的な細胞障害に起因して DNA 損傷が生じる場合や、遊離した DNA 断片の処理が十分行えない状況が、自己由来 DNA 断片による炎症を増幅させる機序であることが想定される。研究はますます増えつつあるが、それぞれのシグナル活性化による異なる結果や、DNA センサー同士、または他の炎症性シグナルとのクロストークも報告されており、このシステムを標的にした治療戦略を確立するためには、さらなる研究が必要である。特に、心血管代謝疾患は、生活習慣に基づき発症することが多いため、その進展には多くの細胞種が関与し、過程は長期間に及ぶ。これらの疾患における DNA センサーの時間的および空間的な発現と機能に関する研究は、DNA センサーの病態学的な役割を明らかにし、さらなる予防・治療方法のエビデンスを得る手助けになると考えられる。

## 6. おわりに

TLR9 や cGAS-STING などの DNA センサーは、肥満、インスリン抵抗性などの代謝疾患や動脈硬化症などを含む心血管代謝疾患の進行に関与していると考えられる。これらの新たな知見は、心血管代謝性疾患の基盤病態である無菌性慢性炎症の病態理解に重要であると同時に、生命の維持に必須である自然免疫系の重要性を強調するものである。心血管代謝疾患における DNA 認識システムを標的とした効果的な治療方法を確立するために、さらなる研究が期待される。

## Conflict of Interest

全ての著者について開示すべき利益相反 (COI) はない。

## 文 献

- 1) Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 2014;5:461.
- 2) Cai X, Chiu YH, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell* 2014;54:289-296.
- 3) Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol* 2016;17:1142-1149.
- 4) Sung HK, Doh KO, Son JE, et al. Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab* 2013;17:61-72.
- 5) Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 2010;88:33-39.
- 6) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-1761.
- 7) Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:923-934.
- 8) Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007;56:2910-2918.
- 9) Murano I, Barbatelli G, Parisani V, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008;49:1562-1568.
- 10) Rigamonti A, Brennand K, Lau F, et al. Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One* 2011;6:e17637.
- 11) Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients* 2013;5:3757-3778.
- 12) Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv* 2016;2:e1501332.
- 13) Hong CP, Yun CH, Lee GW, et al. TLR9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders. *Obesity (Silver Spring)* 2015;23:2199-2206.
- 14) Wu J, Cui H, Dick AD, et al. TLR9 agonist regulates angiogenesis and inhibits corneal neovascularization. *Am J Pathol* 2014;184:1900-1910.
- 15) Reilly SM, Chiang SH, Decker SJ, et al. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-ε improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat Med* 2013;19:313-321.
- 16) Bai J, Cervantes C, Liu J, et al. DsbA-L prevents obesity-induced inflammation and insulin resistance by suppressing the mtDNA release-activated cGAS-cGAMP-STING pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:12196-12201.
- 17) Mao Y, Luo W, Zhang L, et al. STING-IRF3 triggers endothelial inflammation in response to free fatty acid-induced mitochondrial damage in diet-induced obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:920-929.
- 18) Hu HQ, Qiao JT, Liu FQ, et al. The STING-IRF3 pathway is involved in lipotoxic injury of pancreatic β cells in type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2020;518:110890.
- 19) Saito Y, Hikita H, Nozaki Y, et al. DNase II activated by the mitochondrial apoptotic pathway regulates RIP1-dependent non-apoptotic hepatocyte death via the TLR9/IFN-β signaling pathway. *Cell Death Differ* 2019;26:470-486.
- 20) Garcia-Martinez I, Santoro N, Chen Y, et al. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *The J Clin Invest* 2016;126:859-864.
- 21) Kamfar S, Alavian SM, Houshmand M, et al. Liver mitochondrial DNA copy number and deletion levels may contribute to nonalcoholic fatty liver disease susceptibility. *Hepat Mon* 2016;16:e40774.



- 22) Luo X, Li H, Ma L, et al. Expression of STING is increased in liver tissues from patients with NAFLD and promotes macrophage-mediated hepatic inflammation and fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2018;155:1971-1984.e4.
- 23) Yu Y, Liu Y, An W, et al. STING-mediated inflammation in Kupffer cells contributes to progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2019;129:546-555.
- 24) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2045-2051.
- 25) Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91:281-291.
- 26) Roshan MH, Tambo A, Pace NP. The role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int J Inflam* 2016;2016:1532832.
- 27) Xu XH, Shah PK, Faure E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001;104:3103-3108.
- 28) Scholtes VP, Versteeg D, de Vries JP, et al. Toll-like receptor 2 and 4 stimulation elicits an enhanced inflammatory response in human obese patients with atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)* 2011;121:205-214.
- 29) Snodgrass RG, Huang S, Choi IW, et al. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 $\beta$  in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol* 2013;191:4337-4347.
- 30) Sorrentino R, Morello S, Chen S, et al. The activation of liver X receptors inhibits toll-like receptor-9-induced foam cell formation. *J Cell Physiol* 2010;223:158-167.
- 31) Lee JG, Lim EJ, Park DW, et al. A combination of Lox-1 and Nox1 regulates TLR9-mediated foam cell formation. *Cell Signal* 2008;20:2266-2275.
- 32) Niessner A, Sato K, Chaikof EL, et al. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation* 2006;114:2482-2489.
- 33) Borissoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2032-2040.
- 34) Fukuda D, Nishimoto S, Aini K, et al. Toll-like receptor 9 plays a pivotal role in angiotensin II-induced atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2019;8:e010860.
- 35) Ma C, Ouyang Q, Huang Z, et al. Toll-like receptor 9 inactivation alleviated atherosclerotic progression and inhibited macrophage polarized to M1 phenotype in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Dis Markers* 2015;2015:909572.
- 36) Kroghmann AO, Lüsebrink E, Steinmetz M, et al. Proinflammatory stimulation of Toll-like receptor 9 with high dose CpG ODN 1826 impairs endothelial regeneration and promotes atherosclerosis in mice. *PLoS One* 2016;11:e0146326.
- 37) Waibler Z, Anzaghe M, Konur A, et al. Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN-alpha responses by pDC. *Eur J Immunol* 2008;38:3127-3137.
- 38) Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol* 2010;40:2686-2691.
- 39) Koulis C, Chen YC, Hausding C, et al. Protective role for Toll-like receptor-9 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:516-525.
- 40) Pham PT, Fukuda D, Nishimoto S, et al. STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases. *Eur Heart J* 2021;42:4336-4348.
- 41) Liu H, Cheng WL, Jiang X, et al. Ablation of interferon regulatory factor 3 protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension* 2017;69:510-520.
- 42) Goossens P, Gijbels MJ, Zerneck A, et al. Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions. *Cell Metab* 2010;12:142-153.
- 43) Luo W, Wang Y, Zhang L, et al. Critical role of cytosolic DNA and its sensing adaptor STING in aortic degeneration, dissection, and rupture. *Circulation* 2020;141:42-66.
- 44) Jeremiah N, Neven B, Gentili M, et al. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest* 2014;124:5516-5520.
- 45) Liu Y, Jesus AA, Marrero B, et al. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med* 2014;371:507-518.
- 46) Munoz J, Rodière M, Jeremiah N, et al. Stimulator of interferon genes-associated vasculopathy with onset in infancy: a mimic of childhood granulomatosis with polyangiitis. *JAMA Dermatol* 2015;151:872-877.
- 47) Hamann L, Ruiz-Moreno JS, Szwed M, et al. STING SNP R293Q is associated with a decreased risk of aging-related diseases. *Gerontology* 2019;65:145-154.
- 48) Hamann L, Szwed M, Mossakowska M, et al. First evidence for STING SNP R293Q being protective regarding obesity-associated cardiovascular disease in age-advanced subjects - a cohort study. *Immun Ageing* 2020;17:7.
- 49) Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med* 2017;377:1119-1131.