

細胞外核酸と生体恒常性

額 惠理香・寺 尾 純 二

Extracellular Nucleic Acids and Physiological Homeostasis

NUKA Erika and TERAJO Junji

Abstract : Nucleic acids are intracellular molecules that play important roles in genetic information storage and the expression and also that act as energy currency. In addition, nucleic acids are found in extracellular media such as blood and urine. With the development of analysis technologies such as next-generation sequencing, various types of extracellular nucleic acids, their release mechanisms and the correlations with diseases are found in recent years. The types, amounts and sequences of extracellular nucleic acids are being studied as potential biomarkers as they are changed, reflecting physiological states and progression of diseases. Therefore, many researchers investigate them as potential analysis targets for Liquid biopsy, non-invasive or minimally invasive diagnostic approach. Besides, extracellular nucleic acids are implicated in physiological homeostasis by triggering immune responses and in cell-to-cell communication by transferring the genetic information. In this review paper, we describe endogenous and exogenous extracellular nucleic acids focusing on the various types, the origins, the involvement in immune responses, and the effects on physiological homeostasis.

Key Words : extracellular nucleic acids, damage-associated molecular patterns, immune responses

抄録 : 核酸は、遺伝情報の保持や遺伝子発現に関わるほか、エネルギー分子としてはたらく細胞内成分であるが、血液や尿などの細胞外においてもその存在が認められている。近年、次世代シーケンス等の解析技術の向上に伴い、様々な種類の細胞外核酸の存在やその放出経路、疾患との関連性が報告されている。細胞外核酸の量や種類、配列は、生体状態や疾患の進行状況によって変動することから、生体由来のバイオマーカーとしても研究が進められており、低侵襲性の新たな検査方法であるリキッドバイオプシーの解析対象として期待されている。また、細胞外核酸は、周辺組織の免疫応答を調整し、生体恒常性の維持や破綻に関わるほか、近年、細胞外核酸を取り込んだ細胞において、取り込んだ核酸由来のタンパク質発現が報告されるなど、細胞間のコミュニケーション因子としても注目されている。本稿では、自己由来および外因性の細胞外核酸について、その多様な種類と産生経路、免疫応答への関わり、および生体恒常性への影響について記述する。

キーワード : 細胞外核酸, ダメージ関連分子パターン, 免疫応答

は じ め に

現在日本は超高齢社会を迎えており、平均寿

命と健康寿命の差は、男性 8.84 年、女性 12.35 年である¹⁾。健康寿命の延伸のために、国や地域で様々な取り組みが行われているが、2018 年のデータによると、日本人の 2 人に 1 人は一

生のうちにがんと診断されることや²⁾、がん・心疾患・脳血管疾患・糖尿病などの生活習慣病が原因で死亡する割合が約半数を占めることが報告されている³⁾。健康維持や疾病予防、さらに、最適な治療の選択には、生体状態の把握や、生体恒常性の維持・調整が重要である。

核酸は、遺伝子の発現や保持に関わるほか、エネルギー分子として機能する細胞内成分であるが、血液や尿などの細胞外においてもその存在が認められている。近年の検出方法および解析技術の向上に伴い、様々な種類の細胞外核酸の存在やその放出経路、生体に与える影響、疾患との関連性などが報告されており、生体恒常性を測る指標として期待されている。

本稿では、血中を循環する自己由来の細胞外核酸について、その多様な種類と産生経路を紹介するとともに、細胞外核酸による免疫応答について、これまでの主な知見を紹介する。また、食事摂取や治療により取り込まれた外因性の細胞外核酸が生体に与える影響についても、最近の知見を述べる。

血中を循環する自己由来核酸

血中に DNA が存在することは、1948 年に Mandel と Metais によって最初に報告され⁴⁾、現在までに、ゲノム DNA やミトコンドリア DNA (mtDNA)、RNA、ヌクレオチドなど様々な種類の核酸が血中を循環することが報告されている(表1)。細胞死などに伴い、体細胞から放出される DNA は、Cell-free DNA (cfDNA) や Extracellular DNA などと呼ばれ¹⁵⁾、健康人で約 1~50 ng/mL 存在する¹⁶⁻²⁰⁾。Moss らは、健康人の cfDNA の由来について、白血球が 55% を占め、赤血球前駆細胞が 30%、血管内皮細

胞が 10%、肝細胞が 1% であることを報告している²¹⁾。cfDNA には、腫瘍細胞由来の DNA (circulating tumor DNA (ctDNA)) も含まれるため、がんの診断や予後予測マーカーとなりうることを報告されており^{4, 16, 22, 23)}、臨床応用をめざした臨床試験が実施されている。また、血中の cfDNA 量と死亡率が正の相関を持つことが報告され、cfDNA が全死因死亡率の予測因子になりうることも示されている²⁴⁾。細胞核に由来するゲノム DNA に加えて、2000 年には mtDNA も血中に存在することが報告され²⁵⁾、がん患者では mtDNA のサイズが変化することや²⁶⁾、農薬暴露により血中 mtDNA 量が増加することが報告されるなど²⁷⁾、血中 mtDNA が、がんの進行状況や環境中の化学物質の有害性を予測するバイオマーカーとなる可能性が示されている。

血中を循環する RNA は、Cell-free RNA (cfRNA) と呼ばれ、メッセンジャー RNA (mRNA) やリボソーム RNA (rRNA)、トランスファー RNA (tRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、環状 RNA など様々な種類がある²⁸⁻³¹⁾。健康人の血中 RNA のうち、miRNA が 70-80% と大部分を占め、mRNA や rRNA、tRNA はそれぞれ数パーセント程度であることが報告されている^{30, 32)}。RNA は、血中のリボヌクレアーゼによって分解されやすいが、細胞外膜小胞内、ペプチドとの複合体内、および高比重リポタンパク内³³⁾などに存在して安定に血中を循環する。近年の核酸検出および解析技術の向上により、血中 mRNA のような微量かつ断片化しやすい核酸についても研究が進められており、がんの種類に特異的なマーカーとして期待されている^{6, 8, 9)}。

He らの報告によると、ヒト血中から 55 種類

表1 血中の細胞外核酸

種類		文献
DNA	ゲノム DNA, ミトコンドリア DNA	5)
Protein coding RNA	messenger RNA	5, 6, 7, 8, 9)
Non-coding RNA	micro RNA, piwi-interacting RNA, transfer RNA, small nucleolar RNA, small nuclear RNA, miscellaneous RNA, ribosomal RNA, small interfering RNA, circular RNA	5, 10, 11)
ヌクレオシド	アデノシン, シチジン, グアノシン, イノシン, ウリジン, シュードウリジン, メチル化ヌクレオシド, アセチル化ヌクレオシド	12)
ヌクレオチド	ATP, ADP, AMP, UTP, UDP, GDP, GMP, IMP	12, 13, 14)

のヌクレオチドおよびヌクレオシドが検出されており、RNA 修飾によって生成するシュードウリジン (Pseudouridine) が $8.54 \mu\text{mol/L}$ と最も多く、次いでウリジン (Uridine; $4.32 \mu\text{mol/L}$)、アデノシン (Adenosine; $1.59 \mu\text{mol/L}$) が検出されている。そのほか、アセチル化やメチル化ヌクレオシド、モノ・ジヌクレオチドも検出されている¹²⁾。

自己由来核酸の放出経路

体細胞の核酸が血中に放出される経路には、細胞死などに伴い放出される経路と、生きた細胞から放出される経路がある。細胞死は、アポトーシスと呼ばれる制御された細胞死 (タイプ I) と、オートファジー依存的な細胞死 (タイプ II) と、ネクローシスと呼ばれる偶発的な細胞死 (タイプ III) の 3 種類に大きく分けられていたが^{34, 35)}、近年、細胞死に関する研究が進み、表 2 に示すような様々な様相の制御された細胞死が報告されている^{36, 37)}。

ネクローシスは、化学的・物理的な環境刺激により引き起こされる細胞死であり、細胞膨張・細胞膜破壊に伴い、DNA や RNA などの細胞内容物が細胞外へと放出される。制御された細胞死であるアポトーシスでは、内因的および外因的刺激によってカスパーゼ依存的に細胞死が誘導され、クロマチン凝集や核の断片化、

アポトーシス小体の形成を経たのち、貪食細胞に処理される。アポトーシスの進行に伴い、細胞膜チャネルを介してヌクレオチドが放出されることや^{38, 39)}、DNA を含む膜小胞体が放出されることが報告されている⁴⁰⁾。

非アポトーシス性の制御された細胞死として報告された Pyroptosis は、病原体などによる炎症誘導刺激によって誘導され、細胞膜が崩壊し⁴¹⁾、アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) などの細胞内容物を放出することが示されている⁴²⁾。また、NETosis は、ネクローシスやアポトーシスとは異なる細胞死であり、好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps; NETs) の放出を伴う能動的な細胞死であると報告されている⁴³⁾。好中球が放出する NETs は、DNA や抗菌タンパク質などからなる繊維状の構造物であり、病原体を捕獲・除去するための防御機構として知られているが⁴⁴⁾、敗血症患者の血中 cfDNA 量増加の要因としても報告されている⁴⁵⁾。血中 cfDNA 量は、NETosis のマーカーとしても使用されており、最近では、COVID-19 感染者の cfDNA 量が非感染者に比べて 34 倍と顕著に増加していることから、COVID-19 感染症の重症化と NETosis の関連性が報告されている⁴⁶⁾。

死細胞は、健常人でも絶えず発生するが、貪食細胞によって除去されるため、恒常性が維持される。しかし、貪食能力が低下したり、がん

表 2 細胞死のタイプと主な形態学的特徴

	タイプ	主な形態学的特徴
偶発的な細胞死	ネクローシス (Necrosis)	細胞膨張・細胞膜崩壊
	アポトーシス (Apoptosis)	細胞収縮・膜 Bleb 形成・DNA 断片化
	フェロトーシス (Ferroptosis)	ミトコンドリア膜密度の増加と崩壊
	パイロトーシス (Pyroptosis)	細胞膜崩壊・DNA 断片化
	エントーシス (Entosis)	細胞内に同種または異種の細胞を含む
細胞内シグナル伝達による制御された細胞死	パータナトス (Parthanatos)	細胞膜崩壊・DNA 断片化・ミトコンドリア外膜透過
	ネクロプトーシス (Necroptosis)	細胞膨張・細胞膜崩壊・ミトコンドリア膨張
	ミトトーシス (Mitoptosis)	ミトコンドリア消失
	ネトーシス (NETosis)	細胞膜と核膜崩壊
	リソソーム依存的細胞死 (lysosome-dependent cell death)	細胞膜とリソソーム膜崩壊
	オートファジー依存的細胞死 (Autophagy-dependent cell death)	オートファゴソーム形成・オルガネラ消失

の化学治療などによって過度に細胞死が引き起こされたりすると、多量の核酸が放出され、生体に様々な影響を及ぼすことになる^{47, 48)}。

生きた細胞から核酸が放出される経路には、膜小胞体であるエクソソームやマイクロベジクルの分泌、赤芽球の脱核、好中球細胞外トラップ (NETs) の放出などがある。エクソソームは直径 30~100 nm の膜小胞であり、エンドソーム膜が内側に陥入することによって形成する多小胞エンドソームが、細胞膜と融合することによって細胞外へ放出される⁴⁹⁾。一方、マイクロベジクルは、細胞膜が出芽することによって形成し、直径 100~1000 nm の大きさの膜小胞である。エクソソームやマイクロベジクルには、DNA や mRNA, miRNA などの核酸のほか、タンパク質や脂質も含まれている。膜小胞体に含まれる成分が登録されている、ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) や Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>) とよばれるデータベースによると、数万種類の RNA が登録されており、多様な種類の mRNA や miRNA が膜小胞体に含まれていることがわかる⁵⁰⁻⁵²⁾。また、Fernando らの研究では、血中 cfDNA の約 90% はエクソソームに含まれることを報告している⁵³⁾。近年、エクソソームに内包された mRNA や miRNA が、周辺細胞に取り込まれた後に機能性を発揮することが報告され⁵⁴⁻⁵⁶⁾、細胞間のコミュニケーションに重要な役割を果たすことが示されている。

細胞外核酸による免疫応答

自然免疫応答は、病原体感染時に最初に誘導される生体防御機構として知られており、免疫担当細胞が病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を認識することによって開始される。免疫担当細胞

は、パターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) によって PAMPs を認識し、細胞内シグナル伝達を介してサイトカインなどを産生する。この炎症反応は、白血球の遊走や貪食作用を促進することによって病原体を除去するとともに、組織修復や獲得免疫系の活性化にも重要な役割を果たすことが示されている^{57, 58)}。

一方で、細胞死や組織傷害によって細胞外に放出された細胞内分子や、生きた細胞から能動的に放出された細胞内分子もまた、危険信号として PRRs に認識され、炎症応答や免疫応答に関わることが知られており、ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns; DAMPs) と呼ばれている (表 3)⁵⁹⁻⁶¹⁾。生体恒常性が維持された状態では、死細胞や DAMPs は適切に分解、除去されるが、薬剤投与や疾患などにより恒常性が破綻した状況では、死細胞や DAMPs の除去が遅延し、過剰あるいは持続的な免疫応答が引き起こされる。

細胞外に放出された cfDNA は、血中に存在するヌクレアーゼである DNase I や DNaseⅢ (DNaseⅢL3) によって分解されるが⁶²⁾、DNase I 欠損により自己免疫疾患の症状が現れることや⁶³⁾、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者において DNase I の酵素活性低下⁶³⁾や DNase γ の遺伝子変異が報告されており⁶⁴⁾、cfDNA が DAMPs として認識され、免疫応答を制御し、自己免疫疾患に関わることが示されている。

細胞外に放出された ATP は、細胞表面に存在するイオンチャネル型の P2X 受容体や G タンパク質共役型の P2Y 受容体を介して炎症応答を制御し、大腸炎⁶⁵⁾や SLE、関節リウマチ⁶⁶⁾など様々な免疫疾患に関与することが示されている。また、核酸の代謝物である尿酸は、細胞死に伴い細胞外へ放出されたり、細胞外へ放出された核酸が代謝されることによって生じたり

表 3 核酸関連の DAMPs と受容体

DAMPs	受容体	受容体の局在
ATP	P2X7receptor	細胞膜
尿酸	NLRP3	細胞質
ミトコンドリア DNA	TLR9	エンドリソソーム
DNA/RNA	TLR7/TLR9	エンドリソソーム
DNA/RNA-免疫複合体	Fc receptor	細胞膜
DNA/RNA-HMGB1 複合体	RAGE	細胞膜

するが、PRRsの1つであるNOD様受容体を活性化し、免疫応答を引き起こすことが知られている^{67, 68)}。一方、ATPの分解物であるアデノシンは、P1受容体を介して抗炎症作用を発揮することが報告されており^{69, 70)}、炎症応答の収束および生体恒常性維持にはたらくことが知られている。

近年、DAMPsによるシグナル伝達を抑制するアゴニストを用いた臨床試験において、COVID-19感染者の重症化や感染による組織損傷が抑制され、かつ、副作用が少ないことが報告されている⁷¹⁾。

このように細胞外の核酸は、DAMPsとして認識されることによって免疫応答に関わることから、様々な免疫疾患への関与が示されるとともに、治療の標的としても研究が進められている。

外因性の細胞外核酸

これまで、自己由来の細胞外核酸について述べてきたが、食事などにより経口摂取する核酸や免疫栄養剤として使用される核酸など、外因性の細胞外核酸が生体に与える影響についても研究が進められている^{72, 73)}。核酸は生体内で合成されるため、必須栄養素ではないが、細胞分裂や代謝回転が速い血球細胞、腸管上皮細胞、脳細胞などは、外因性核酸を取り込み利用することが知られている。外因性核酸の有用性については、ヌクレオチド添加の人工乳による乳児の発育促進や⁷⁴⁾、ヌクレオチドによる抗酸化・抗炎症作用を介した細胞老化抑制効果⁷⁵⁾、尿酸の抗酸化作用を介した腸疾患改善効果⁷⁶⁾などが報告されている。近年では、植物由来のmiRNAを摂取した動物において、吸収されたmiRNAが種を超えて機能性を発揮する可能性が示された^{77, 78)}。このように、食品や栄養剤として核酸を摂取する有用性を示す報告はあるものの、吸収された核酸の機能性やその構造的特徴、体内動態など、不明な点も残されている。今後、核酸摂取の意義や重要性について、さらなる研究が必要である。

おわりに

本稿では、自己由来細胞外核酸の種類や産生経路、免疫応答への関わりについて概説するとともに、食事などに由来する外因性核酸の機能性に関する最近の研究を紹介した。検出方法や解析技術の向上に伴い、細胞外核酸の種類や配列に着目した研究は今後さらに増加することが予想される。細胞外核酸が、生体状態を評価するバイオマーカーとして、疾病予防や治療に利用されるとともに、栄養学的な視点からの研究がさらに進むことを期待する。

参考文献

- 1) 第11回健康日本21(第二次)推進専門委員会 資料(厚生労働省)(<https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000196943.html>)
- 2) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(全国がん登録)
- 3) 人口動態調査(厚生労働省)(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1-a.html>)
- 4) de Miranda FS, Barauna VG, Dos Santos L, Costa G, Vassallo PF, Campos LCG. Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 24; 22(17): 9110.
- 5) Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keszérű J, Penyige A, Szemes T, Nagy B. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 17; 21(18): 6827.
- 6) Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug; 5(8): 1961-5.
- 7) Shen J, Wei J, Guan W, Wang H, Ding Y, Qian X, Yu L, Zou Z, Xie L, Costa C, Bivona T, Rosell R, Liu B. Plasma mRNA expression levels of BRCA 1 and TS as potential predictive biomarkers for chemotherapy in gastric cancer. *J Transl Med.* 2014 Dec 14; 12: 355.
- 8) Larson MH, Pan W, Kim HJ, Mauntz RE, Stuart SM, Pimentel M, Zhou Y, Knudsgaard P, Demas V, Aravanis AM, Jamshidi A. A comprehensive characterization of the cell-free transcriptome reveals tissue- and subtype-specific biomarkers for cancer detection. *Nat Commun.* 2021 Apr 21; 12(1): 2357.
- 9) Salinas-Sánchez AS, García-Olmo DC, Martínez-Sánchez C, Picazo-Martínez MG, Giménez-Bachs JM, Flores-Bautista AB, Díaz-Piqueras Á. Clinical value of perioperative levels of DNA and mRNA in plasma of patients with renal cell carcinoma. *Transl Oncol.* 2021 Feb; 14(2): 100999.

- 10) Umu SU, Langseth H, Bucher-Johannessen C, Fromm B, Keller A, Meese E, Lauritzen M, Leithaug M, Lyle R, Rounge TB. A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biol.* 2018 Feb 1 ; 15(2) : 242-250.
- 11) Savelyeva AV, Kuligina EV, Bariakin DN, Kozlov VV, Ryabchikova EI, Richter VA, Semenov DV. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions. *Biomed Res Int.* 2017 ; 2017 : 7404912.
- 12) He L, Wei X, Ma X, Yin X, Song M, Donniger H, Yaddanapudi K, McClain CJ, Zhang X. Simultaneous Quantification of Nucleosides and Nucleotides from Biological Samples. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2019 Jun ; 30(6) : 987-1000.
- 13) Gorman MW, Feigl EO, Buffington CW. Human plasma ATP concentration. *Clin Chem.* 2007 Feb ; 53(2) : 318-25.
- 14) Wihlborg AK, Balogh J, Wang L, Borna C, Dou Y, Joshi BV, Lazarowski E, Jacobson KA, Arner A, Erlinge D. Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2 Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ Res.* 2006 Apr 14 ; 98(7) : 970-6.
- 15) Bronkhorst AJ, Ungerer V, Diehl F, Anker P, Dor Y, Fleischhacker M, Gahan PB, Hui L, Holdenrieder S, Thierry AR. Towards systematic nomenclature for cell-free DNA. *Hum Genet.* 2021 Apr ; 140(4) : 565-578.
- 16) Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug ; 1137 : 190-6.
- 17) Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, Del Rio M, Molina F. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res.* 2010 Oct ; 38(18) : 6159-75.
- 18) Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016 Sep ; 35(3) : 347-76.
- 19) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar ; 37(3) : 646-50.
- 20) Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest.* 1975 Aug ; 56(2) : 512-5.
- 21) Moss J, Magenheimer J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, Samet Y, Maoz M, Druid H, Arner P, Fu KY, Kiss E, Spalding KL, Landesberg G, Zick A, Grinshpun A, Shapiro AMJ, Grompe M, Wittenberg AD, Glaser B, Shemer R, Kaplan T, Dor Y. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun.* 2018 Nov 29 ; 9(1) : 5068.
- 22) Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 Feb 19 ; 6(224) : 224ra24.
- 23) Luo H, Zhao Q, Wei W, Zheng L, Yi S, Li G, Wang W, Sheng H, Pu H, Mo H, Zuo Z, Liu Z, Li C, Xie C, Zeng Z, Li W, Hao X, Liu Y, Cao S, Liu W, Gibson S, Zhang K, Xu G, Xu RH. Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer. *Sci Transl Med.* 2020 Jan 1 ; 12(524) : eaax7533.
- 24) Kananen L, Hurme M, Jylhä M, Härkänen T, Koskinen S, Stenholm S, Kähönen M, Lehtimäki T, Ukkola O, Jylhävä J. Circulating cell-free DNA level predicts all-cause mortality independent of other predictors in the Health 2000 survey. *Sci Rep.* 2020 Aug 14 ; 10(1) : 13809.
- 25) Zhong S, Ng MC, Lo YM, Chan JC, Johnson PJ. Presence of mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) A to G 3243 mutation in DNA extracted from serum and plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Pathol.* 2000 Jun ; 53(6) : 466-9.
- 26) An Q, Hu Y, Li Q, Chen X, Huang J, Pellegrini M, Zhou XJ, Rettig M, Fan G. The size of cell-free mitochondrial DNA in blood is inversely correlated with tumor burden in cancer patients. *Precis Clin Med.* 2019 Sep ; 2(3) : 131-139.
- 27) Budnik LT, Kloth S, Baur X, Preisser AM, Schwarzenbach H. Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic halo-alkane-based pesticides. *PLoS One.* 2013 May 31 ; 8(5) : e64413.
- 28) Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008 ; 3(11) : e3694.
- 29) Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids : characteristics and applications. *Eur J Hum Genet.* 2018 Jul ; 26(7) : 937-945.
- 30) Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thi-

- bodeau SN, Boardman L, Wang L. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 2013 May 10 ; 14 : 319.
- 31) Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, Rajewsky N. Identification and Characterization of Circular RNAs As a New Class of Putative Biomarkers in Human Blood. *PLoS One*. 2015 Oct 20 ; 10(10) : e0141214.
 - 32) Max KEA, Bertram K, Akat KM, Bogardus KA, Li J, Morozov P, Ben-Dov IZ, Li X, Weiss ZR, Azizian A, Sopeyin A, Diacovo TG, Adamidi C, Williams Z, Tuschl T. Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5 ; 115(23) : E5334-E5343.
 - 33) Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011 Apr ; 13(4) : 423-33.
 - 34) Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G ; Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005 Nov ; 12 Suppl 2 : 1463-7.
 - 35) Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Dec 1 ; 7(12) : a 006080.
 - 36) Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernasola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018 Mar ; 25(3) : 486-541.
 - 37) Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 2019 May ; 29(5) : 347-364.
 - 38) Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009 Sep 10 ; 461(7261) : 282-6.
 - 39) Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE, Bayliss DA, Ravichandran KS. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. 2010 Oct 14 ; 467(7317) : 863-7.
 - 40) Pisetsky DS, Gauley J, Ullal AJ. Microparticles as a source of extracellular DNA. *Immunol Res*. 2011 Apr ; 49(1-3) : 227-34.
 - 41) Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis : host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Feb ; 7(2) : 99-109.
 - 42) Yang D, He Y, Muñoz-Planillo R, Liu Q, Núñez G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity*. 2015 Nov 17 ; 43(5) : 923-32.
 - 43) Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15 ; 176(2) : 231-41.
 - 44) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5 ; 303(5663) : 1532-5.
 - 45) Jackson Chornenki NL, Coke R, Kwong AC, Dwivedi DJ, Xu MK, McDonald E, Marshall JC, Fox-Robichaud AE, Charbonney E, Liaw PC. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2019 May 22 ; 7(1) : 29.
 - 46) Huckriede J, Anderberg SB, Morales A, de Vries F, Hultström M, Bergqvist A, Ortiz-Pérez JT, Sels JW, Wichapong K, Lipcsey M, van de Poll M, Larsson A, Lu-

- ther T, Reutelingsperger C, de Frutos PG, Frithiof R, Nicolaes GAF. Evolution of NETosis markers and DAMPs have prognostic value in critically ill COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021 Aug 3 ; 11(1) : 15701.
- 47) Cohen PR, Prieto VG, Kurzrock R. Tumor Lysis Syndrome : Introduction of a Cutaneous Variant and a New Classification System. *Cureus*. 2021 Mar 11 ; 13(3) : e13816.
- 48) Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med*. 2011 May 12 ; 364(19) : 1844-54.
- 49) Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles : exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 Feb 18 ; 200(4) : 373-83.
- 50) Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S. ExoCarta : A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016 Feb 22 ; 428(4) : 688-692.
- 51) Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, Hendrix A, Mathivanan S. Vesiclepedia 2019 : a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8 ; 47(D1) : D516-D519.
- 52) Soares Martins T, Marçalo R, Ferreira M, Vaz M, Silva RM, Martins Rosa I, Vogelgsang J, Wiltfang J, da Cruz E Silva OAB, Henriques AG. Exosomal Abeta-Binding Proteins Identified by "In Silico" Analysis Represent Putative Blood-Derived Biomarker Candidates for Alzheimers Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 11 ; 22(8) : 3933.
- 53) Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One*. 2017 Aug 29 ; 12(8) : e0183915.
- 54) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun ; 9(6) : 654-9.
- 55) Lotvall J, Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr*. 2007 Jul-Sep ; 1(3) : 156-8.
- 56) Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*. 2010 Jul 9 ; 39(1) : 133-44.
- 57) Medzhitov R. Inflammation 2010 : new adventures of an old flame. *Cell*. 2010 Mar 19 ; 140(6) : 771-6.
- 58) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19 ; 140(6) : 805-20.
- 59) McCarthy CG, Gouloupoulou S, Wenceslau CF, Spitler K, Matsumoto T, Webb RC. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns : novel links between inflammation and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 Jan 15 ; 306(2) : H184-96.
- 60) Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Jan 8 ; 2 : 168.
- 61) Schaefer L. Complexity of danger : the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. 2014 Dec 19 ; 289(51) : 35237-45.
- 62) Han DSC, Ni M, Chan RWY, Chan VWH, Lui KO, Chiu RWK, Lo YMD. The Biology of Cell-free DNA Fragmentation and the Roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB. *Am J Hum Genet*. 2020 Feb 6 ; 106(2) : 202-214.
- 63) Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Mörry T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet*. 2000 Jun ; 25(2) : 177-81.
- 64) Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, Abrawi SA, Al-murshedi F, Alhashmi N, Al Sonbul A, Sewairi W, Qari A, Abdallah E, Al-Owain M, Al Motywee S, Al-Rayes H, Hashem M, Khalak H, Al-Jebali L, Alkuraya FS. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2011 Oct 23 ; 43(12) : 1186-8.
- 65) Wan P, Liu X, Xiong Y, Ren Y, Chen J, Lu N, Guo Y, Bai A. Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 7 receptor signaling. *Sci Rep*. 2016 Jan 7 ; 6 : 19108.
- 66) Portales-Cervantes L, Niño-Moreno P, Doníz-Padilla L, Baranda-Candido L, García-Hernández M, Salgado-Bustamante M, González-Amaro R, Portales-Pérez D. Expression and function of the P2X (7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2010 Aug ; 71(8) : 818-25.
- 67) Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar 9 ; 440(7081) : 237-41.
- 68) Kono H, Chen CJ, Ontiveros F, Rock KL. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest*. 2010 Jun ; 120(6) : 1939-49.
- 69) Hamidzadeh K, Mosser DM. Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. *Front Immunol*. 2016 Mar 2 ; 7 : 74.
- 70) Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol*. 2005 Jan ; 35(1) : 31-41.
- 71) Silva-Lagos LA, Pillay J, van Meurs M, Smink A, van der Voort PHJ, de Vos P. DAMPening COVID-19 Severity by Attenuating Danger Signals. *Front Immunol*. 2021 Aug 12 ; 12 : 720192.

- 72) Ding T, Song G, Liu X, Xu M, Yong Li. Nucleotides as optimal candidates for essential nutrients in living organisms : A review. *J Funct Foods*. 2021 Jul ; 82 : 104498
- 73) Fukatsu K. Role of nutrition in gastroenterological surgery. *Ann Gastroenterol Surg*. 2019 Feb 25 ; 3(2) : 160-168.
- 74) Singhal A, Kennedy K, Lanigan J, Clough H, Jenkins W, Elias-Jones A, Stephenson T, Dudek P, Lucas A. Dietary nucleotides and early growth in formula-fed infants : a randomized controlled trial. *Pediatrics*. 2010 Oct ; 126(4) : e 946-53.
- 75) Zhu N, Liu X, Xu M, Li Y. Dietary Nucleotides Retard Oxidative Stress-Induced Senescence of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Nutrients*. 2021 Sep 20 ; 13(9) : 3279.
- 76) Yasutake Y, Tomita K, Higashiyama M, Furuhashi H, Shirakabe K, Takajo T, Maruta K, Sato H, Narimatsu K, Yoshikawa K, Okada Y, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Nagao S, Matsuo H, Miura S, Hokari R. Uric acid ameliorates indomethacin-induced enteropathy in mice through its antioxidant activity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Nov ; 32(11) : 1839-1845.
- 77) Chen Q, Zhang F, Dong L, Wu H, Xu J, Li H, Wang J, Zhou Z, Liu C, Wang Y, Liu Y, Lu L, Wang C, Liu M, Chen X, Wang C, Zhang C, Li D, Zen K, Wang F, Zhang Q, Zhang CY. SIDT1-dependent absorption in the stomach mediates host uptake of dietary and orally administered microRNAs. *Cell Res*. 2021 Mar ; 31(3) : 247-258.
- 78) Chen X, Liu L, Chu Q, Sun S, Wu Y, Tong Z, Fang W, Timko MP, Fan L. Large-scale identification of extracellular plant miRNAs in mammals implicates their dietary intake. *PLoS One*. 2021 Sep 29 ; 16(9) : e0257878.