

令和 4 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04490

研究課題名(和文)心外膜脂肪が心房線維化をきたす機序解明とこれを抑制する化合物スクリーニング系構築

研究課題名(英文)Mechanisms of epicardial adipose tissue to cause atrial myocardial fibrosis and screening of compounds to suppress them

研究代表者

高橋 尚彦(Takahashi, Naohiko)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：30263239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：【方法】病理解剖が行われた9症例の左心房周囲の心外膜脂肪(EAT)および腹部皮下脂肪(SAT)を採取し、conditioned medium(CM)を作成した。ラットから単離した左心房を器官ごと培養し、CMを1日1滴心外膜側から滴下した。【結果】EAT-CMは線維化を惹起しSAT-CMに比べ顕著であった。EAT-CM内のAngpt12濃度はSAT-CM内よりも高かった。心房細動を有する患者のEATは心房線維化惹起作用が顕著であった。リコンビナントAngpt12は線維化を惹起し、抗Angpt12抗体はこれを減弱させた。【結語】心外膜脂肪中のAngpt12は心房細動の新たな治療ターゲットに成る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は心房線維化によってもたらされる。本研究では、器官培養法という独創的な方法によって、ヒト心外膜脂肪が心房に線維化を惹起する様子を再現できた。また、Angpt12がこの経路に関与し、これを標的とした薬物を開発すれば、あらたな心房細動治療薬になり得ることを示すことができた。心房細動患者は本邦に数百万人いるとみられ少なからずの患者に脳梗塞を引き起こす。本研究の成果を心房細動阻止に結び付けたい。

研究成果の概要(英文)：Objective: This study aimed to examine whether Angpt12 contained in peri-left atrial EAT can induce atrial myocardial fibrosis. Methods: Human peri-left atrial EAT and abdominal subcutaneous adipose tissue (SAT) were collected from 9 autopsy cases. EAT- or SAT-conditioned medium was dropped onto the rat left atrial epicardial surface using an organo-culture system. Results: EAT-conditioned medium induced atrial fibrosis with a progressive increase in the number of myofibroblasts. The profibrotic effect of EAT was greater than that of SAT. EAT in patients with atrial fibrillation induced a more significant atrial fibrosis. Treatment with human recombinant Angpt12 induced fibrosis, which was suppressed by the concomitant treatment with Angpt12 antibody. Conclusion: The results suggested that antagonizing the expression of Angpt12 in EAT can be a novel therapeutic approach to prevent atrial fibrillation.

研究分野：循環器内科

キーワード：心外膜脂肪 心房線維化 心房細動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は 20 年ほど前から、「心房細動は動脈硬化に類似した心房の炎症性線維化が主な病態である」と考え、動物実験を行ってきた。そして臨床的に大きな問題となっているメタボリック症候群や肥満からの心房細動発症機序を解明したいと考えるようになった。肥満者に認められる高レプチン血症が炎症性心房線維化と関わっているのではないかと考え、レプチン欠損 ob マウスを用い、レプチンシグナルがアンジオテンシン によって惹起される炎症性心房細動発症に不可欠な分子であることを明らかにした。やがて、「心房細動をきたしている患者の実際の心房組織を観察したい」という思うに至った。2015 年、当院心臓血管外科の宮本教授に依頼し、同科で開胸手術を受ける際、左心耳切除を施行される心房細動患者の左心耳組織観察を開始した。左心耳には豊富に心外膜脂肪 (epicardial adipose tissue: EAT) が付着しており、その組織像および生化学的解析から、EAT がメタボリック症候群や肥満からの心房細動発症に関与するのは間違いないと確信するに至った。

2. 研究の目的

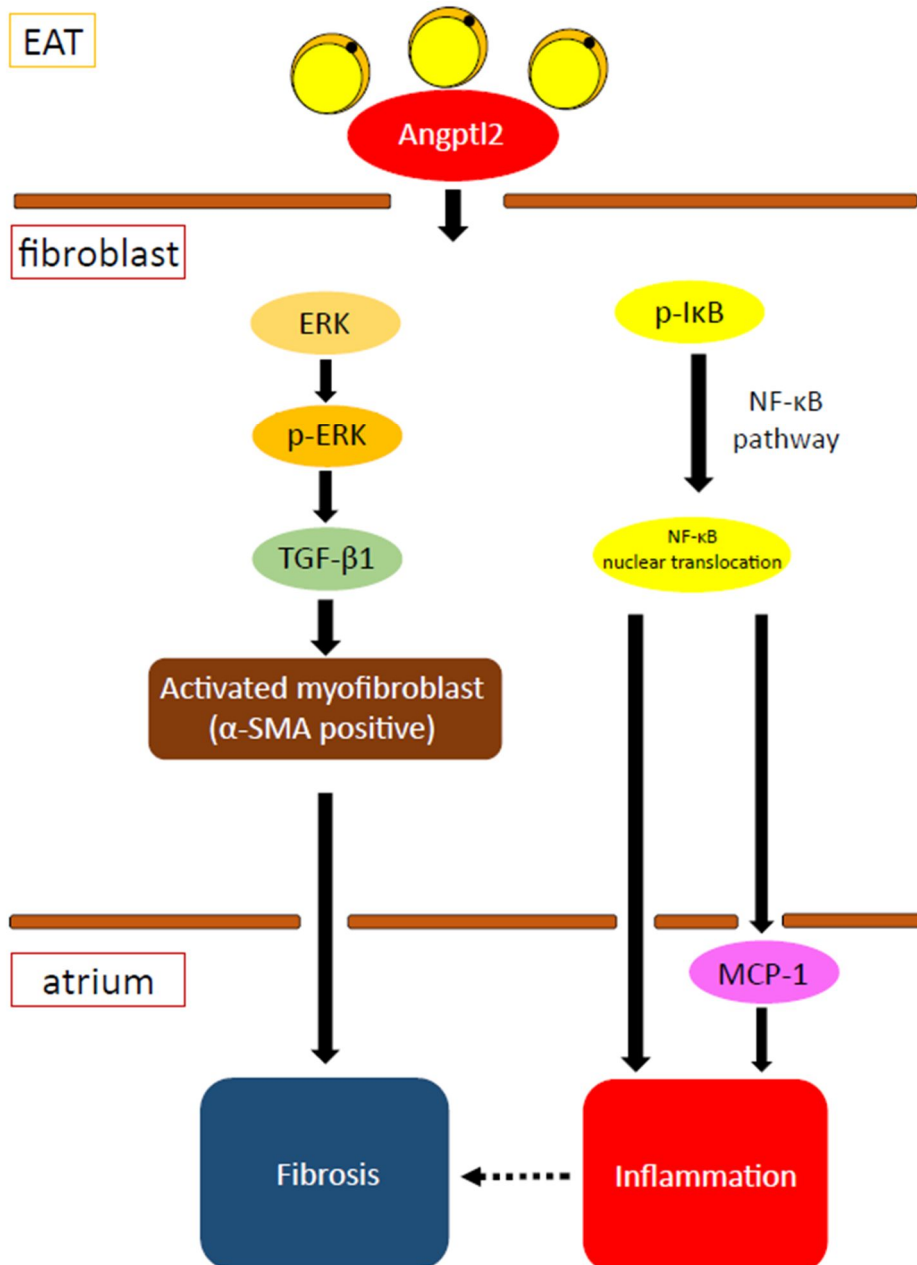
左心房の心外膜脂肪から分泌される Angpt12 が真に心房線維化を惹起するか、器官培養法を用いて検討した。

3. 研究の方法

大分大学医学部附属病院で病理解剖が行われた 9 症例の左心房周囲の心外膜脂肪 (EAT) および腹部皮下脂肪 (SAT) を速やかに採取し、conditioned medium を作成した。8 週齢のラットから単離した左心房を器官ごと 1 週間培養し、conditioned medium、ヒト recombinant Angpt12 を 1 日 1 滴、心外膜側から滴下負荷した。器官培養したラット左心房の線維化を経時的に評価した。またヒト recombinant Angpt12 の線維化惹起効果およびその中和抗体の効果を、免疫組織化学的染色、PT-PCR、Western blot 法で評価した。Conditioned medium 中の Angpt12 濃度を ELISA 法を用いて測定した。さらに、新生仔ラット fibroblast を培養し、Angpt12 1ng/ml を投与し、western blot 法でタンパク発現を評価した。

4. 研究成果

(1) EAT conditioned medium は 5~7 日目にかけてラット左心房心外膜側に myofibroblast の増加を伴いながら線維化を惹起した。この効果は SAT conditioned medium に比べ顕著であった ($40.6 \pm 3.3\%$ vs. $18.2 \pm 1.3\%$, $P < 0.01$)。2) EAT conditioned medium を負荷したラット心房の collagen 1a1、3a1、MCP-1 の遺伝子発現量は、SAT conditioned medium を負荷したラット心房よりも多かった (1.7 vs 4.4 $P < 0.05$, 1.4 vs 3.1 , $P < 0.01$, 2.0 vs 8.5 , $P < 0.01$)。3) Conditioned medium 内の Angpt12 濃度は EAT 群において SAT 群よりも有意に高かった (1.90 ± 0.27 vs. 0.78 ± 0.24 ng/mL, $P < 0.01$)。4) 心房細動を有する患者の EAT は、心房細動を有さない患者の EAT よりも心房線維化惹起作用が顕著であった ($52.5 \pm 3.8\%$ vs. $34.6 \pm 1.5\%$, $P < 0.01$)。4) Recombinant Angpt12 5ng/ml の負荷は Vehicle に比し、有意に心外膜側の線維化面積を増加させた ($35.4 \pm 3.9\%$ vs $20.7 \pm 2.4\%$, $P < 0.05$)。5) 抗 Angpt12 抗体は Angpt12 によって惹起される心房線維化を減弱させた (23.9 ± 2.0 vs. $34.6 \pm 2.3\%$, $P < 0.05$)。6) 新生仔ラット fibroblast において、Angpt12 は、 α -SMA、TGF- β 、MCP-1 の発現を増加させ、ERK、I B、p38 MAPK のリン酸化の増加および NF- κ B の核内移行を増加させた。本研究において、器官培養法を用い、ヒト心外膜脂肪から作成された conditioned medium がラット心房に炎症・線維化を引き起こすことを証明した。EAT conditioned medium 中の Angpt12 濃度は SAT conditioned medium よりも有意に高く、recombinant Angpt12 がラット心房に炎症・線維化を引き起こすことを考慮すると、Angpt12 は心外膜脂肪が引き起こす心房線維化の key factor の一つと考えられた。Angpt12 は新生仔ラット fibroblast において、 α -SMA、TGF- β 、MCP-1 の発現増加、ERK、I B、p38 MAPK のリン酸化、NF- κ B の核内移行を引き起こすことが確認されており、ヒト心外膜脂肪から分泌された Angpt12 は paracrine effect によって、心房中の fibroblast に作用して、ERK のリン酸化、TGF- β の発現増加を通じて、fibroblast を myofibroblast へと活性化させると考えられた。また、I B のリン酸化、NF- κ B の核内移行といった NF- κ B 経路の活性化を通じて、MCP-1 等のサイトカインを産生し、炎症・線維化を惹起していると考えられた (図)。以上のことから、器官培養法によって、ヒト EAT が心房に線維化を惹起する過程を再現できた。EAT 中の Angpt12 は線維化を顕著に惹起し、その中和抗体が線維化を抑制できたことから、心外膜脂肪中の Angpt12 は心房細動予防における新たな治療ターゲットに成り得ることが示唆された。



図：Angptl2 が心房線維化をきたすメカニズム（想定）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kira S, Abe I, Ishii Y, Miyoshi M, Oniki T, Arakane M, Daa T, Teshima Y, Yufu K, Shimada T, Takahashi N.	4. 巻 17
2. 論文標題 Role of angiotensin-like protein 2 in atrial fibrosis induced by human epicardial adipose tissue: Analysis using an organo-culture system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	6. 最初と最後の頁 1591-1601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrthm.2020.04.027.	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 Zhan Yinge, Abe Ichitaro, Nakagawa Mikiko, Ishii Yumi, Kira Shintaro, Miyoshi Miho, Oniki Takahiro, Kondo Hidekazu, Teshima Yasushi, Yufu Kunio, Arakane Motoki, Daa Tsutomu, Takahashi Naohiko	4. 巻 76
2. 論文標題 A traditional herbal medicine rikkunshito prevents angiotensin II-Induced atrial fibrosis and fibrillation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 626 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2020.07.001	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 Abe Ichitaro, Terabayashi Takeshi, Hanada Katsuhiko, Kondo Hidekazu, Teshima Yasushi, Ishii Yumi, Miyoshi Miho, Kira Shintaro, Saito Shotaro, Tsuchimochi Hirotsugu, Shirai Mikiyasu, Yufu Kunio, Arakane Motoki, Daa Tsutomu, Thumkeo Dean, Narumiya Shuh, Takahashi Naohiko, Ishizaki Toshimasa	4. 巻 117
2. 論文標題 Disruption of actin dynamics regulated by Rho effector mDia1 attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophic responses and exacerbates dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1103 ~ 1117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvaa206	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Abe I, Ishii Y, Miyoshi M, Kira S, Kondo H, Saito S, Teshima Y, Yufu K, Terabayashi T, Ishizaki T, Takahashi N.
2. 発表標題 Loss of Rho effector mDia1 attenuates pressure overload-induced hypertrophic responses and exacerbates dysfunction.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Abe I, Miyoshi M, Ishii Y, Kira S, Oniki T, Fukuda T, Fukui A, Shinohara T, Teshima Y, Nakagawa M, Takahashi N.
2. 発表標題 Role of the intramural adipose tissue of the interatrial septum on incidence of atrial fibrillation.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉良晋太郎 安部 一太郎, 石井 悠海, 三好 美帆, 鬼木 崇裕, 福井 暁, 篠原 徹二, 手嶋 泰之, 油布 邦夫, 島田 達夫, 中川 幹子, 高橋 尚彦
2. 発表標題 Role of angiotensin-like protein 2 in atrial fibrosis induced by human epicardial adipose tissue.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shintaro Kira, Ichitaro Abe, Yumi Ishii, Miho Miyoshi, Takahiro Oniki, Akira Fukui, Tetsuji Shinohara, Yasushi Teshima, Kunio Yufu, Tatsuo Shimada, Mikiko Nakagawa, Naohiko Takahashi
2. 発表標題 Human epicardial adipose tissue induces rat atrial myocardial fibrosis through paracrine effects: Results of organo-culture experiments
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会 3.29-31, 2019 横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Kira, Ichitaro Abe, Yumi Ishii, Miyoshi Miho, Takahiro Oniki, Akira Fukui, Tetsuji Shinohara, Yasushi Teshima, Kunio Yufu, Tatsuo Shimada, Mikiko Nakagawa, Motoki Arakane, Tsutomu Daa, Naohiko Takahashi
2. 発表標題 Angiotensin-like protein(Angptl) 2 secreted from epicardial adipose tissue induces atrial myocardial fibrosis
3. 学会等名 第66回日本不整脈心電学会学術大会 7.24-27, 2019. 横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Kira, Ichitaro Abe, Yasushi Teshima, Yumi Ishii, Miho Miyoshi, Takahiro Oniki, Akira Fukui, Tetsuji Shinohara, Kunio Yufu, Naohiko Takahashi
2. 発表標題 Angiopoietin-like protein (Angptl) 2 secreted from epicardial adipose tissue induces atrial myocardial fibrosis
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress 2019 8.31-9.4, 2019. パリ/フランス(国際学会)
4. 発表年 2019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	安部 一太郎 (Abe Ichitaro) (00747595)	大分大学・医学部・病院特任助教 (17501)	
研究分担者	手嶋 泰之 (Teshima Yasushi) (10457608)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究分担者	宮本 伸二 (Miyamoto Shinji) (70253797)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	福井 暁 (Fukui Akira) (70631381)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

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
---------	---------