

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12648

研究課題名(和文)心外膜脂肪の質を評価する新たな画像診断による心房細動ハイリスク患者検出

研究課題名(英文)Detection of fibrotic remodeling of epicardial adipose tissue in patients with atrial fibrillation: Imaging approach based on histological observation

研究代表者

石井 悠海 (Ishii, Yumi)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20835607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：心外膜脂肪組織(EAT)が、心房細動(AF)の発症に関連する。私たちは、EATが高度の線維化をきたすことを発見し、このEATの線維化リモデリングの進行と、AFの重症化が一致することを報告した。今回、AFの一因であるこのEATの線維化リモデリングが、CT画像に反映されていると仮説を立てた。線維化リモデリングの強い部位では、線維化の増生と脂肪細胞の小型化が起こっており、組織密度が上昇していた。この組織密度の上昇は、心房筋の近位に沿って起こり、この変化をCT値で測定したところ、組織での変化とCT値での変化が相関した。この結果は、CT画像より心房細動のリスクを評価できる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は脳梗塞発症の原因となる。症状なく心房細動に罹患している患者も多く存在し、脳梗塞を発症し初めて気が付くこともしばしばある。また、発作時に心電図検査を行わなければ、診断もできない。今回の私たちの研究は、心外膜脂肪をCT検査で非侵襲的に評価し、心房細動のリスクを有する患者を特定できる可能性を示した。この技術が臨床現場で応用できれば、脳梗塞発症前に心房細動患者を同定し、早期治療、脳梗塞予防に活かすことができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that epicardial adipose tissue (EAT) is associated with the incident of atrial fibrillation (AF). We demonstrated that EAT contained the inflammatory cytokines/chemokines richly, resulting in severely fibrosis. We named them “the fibrotic remodeling of EAT” which was the risk factor of AF. As the mechanism, we demonstrated the paracrine effect of inflammatory cytokines from adipocytes to myocardium.

As the next phase, we hypothesized that the “fibrotic remodeling of EAT” could be detected using CT images. We found that much collagen and smaller adipocytes in severe fibrosis EAT, resulting in the high density. Especially, this high tissue density existed around the atrium. Assessed by CT images, %change in EAT attenuation was positively correlated with the ratio of central to marginal adipocyte diameter. It could be possible to evaluate the risk of AF using CT images in the future.

研究分野：循環器内科

キーワード：心房細動 心外膜脂肪 CT画像

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心外膜脂肪組織(epicardial adipose tissue: EAT)は、心臓周囲に存在する脂肪のうち最も内側に存在し、膜を介さず心筋組織に直接付着している。そのため、心外膜脂肪と心筋組織は相互に影響し、心外膜脂肪量の増加が、心房細動の発症、持続化のリスク因子であることが判明している。私たちは、心房細動患者の左心耳組織検体を使用し、心外膜脂肪のサイトカインおよびケモカインの増加と、心外膜脂肪の線維化が相関していることを発見し、心外膜組織の線維化リモデリングとして報告した。この線維化リモデリングは、心筋組織の線維化をきたす一因として考えられ、心外膜脂肪から放出されるサイトカインの心筋組織へのパラクラインエフェクトを実験的に証明した。さらに、近年、心外膜脂肪の CT 画像より冠動脈病変を検出する技術が報告された。冠動脈病変から放出される炎症性サイトカインによる心外膜脂肪の変性が CT 画像の CT 値の上昇として観察されている。

### 2. 研究の目的

心房細動の一因である心外膜脂肪組織の線維化リモデリングが、CT 画像に反映され、心房細動患者の検出に有用か検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

2015年1月より2020年4月に大分大学医学部附属病院で左心耳切除術を施行された76人の心房細動連続症例の左心耳検体を使用した(男性:40人、平均年齢71.9±8.2歳)。すべての患者は、術前にCT検査を施行した。

#### (2) 組織学的解析

左心耳検体はMasson's trichrome染色、免疫染色を行った。心外膜脂肪は心筋組織に直接接した部位と、心筋組織より離れた部位の差を調べるために、Central EAT(C-EAT)とMarginal EAT(M-EAT)に分類した。C-EATは心外膜および心筋組織に接していない脂肪細胞群と定義した。M-EATは心筋組織より150µm以内に存在する脂肪細胞群と定義した。線維化割合、脂肪細胞径は、BIOLEVO BZ-9000(Keyence, Osaka, Japan)を使用しMasson's trichrome染色標本より半自動的に算出した。

#### (3) 心外膜脂肪の遺伝子発現

PALM MicroBeam(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を使用し、レーザーマイクロダイセクションを行った。ダイセクション後の切片からRNAを抽出および増幅し、ハイブリダイズさせ、相対的なハイブリダイゼーション値をAffymetrix Expression Console™を使用して計算した。C-EATおよびM-EAT各々の遺伝子発現を測定し、C-EAT/M-EAT比として算出した。マイクロアレイのデータはGEO-NCBIに提出した(受託番号:GSE154436)。

#### (4) 心外膜脂肪の培養

心外膜脂肪組織を4群(各群:n=10)に分け、リン酸緩衝生理食塩水(コントロール)、interleukin(IL)-6(25 ng/ml)、transforming growth factor(TGF)-1(1 ng/ml)、tumor necrosis factor(TNF)-1(5 ng/ml)を負荷し、前駆脂肪細胞分化培地(PromoCell, Heidelberg, Germany)で24時間培養した。培養後、RNAを抽出し、遺伝子発現レベルを定量および比較した。

#### (5) 心外膜脂肪におけるCT値の変化率

CT画像を用いてCT値を評価するために、高速三次元画像解析システム(Synapse Vincent, Fuji Photo Film)を使用した。心外膜脂肪はCT値-195~-45 HUの範囲内で定義した。左冠動脈起始部の上方および肺動脈分岐部の下方の水平断面で測定を行った。左心房の辺縁から心外膜脂肪の遠位側まで9×9ピクセルを関心領域として定義した。関心領域内の左心房近位から遠位にかけてのCT値の変化率を次のように計算した。心外膜脂肪のCT値の変化率=(最大CT値-最小CT値)/最大CT値×100(%)

### 4. 研究成果

#### (1) 患者背景

76人の患者の平均年齢は71.9±8.2歳だった。36人の患者(47%)が女性だった。全患者の平均CHADS2およびCHA2DS2-VAScスコアは、それぞれ2.6±1.1および4.0±1.4であった。28人の患者(37%)が発作性心房細動であり(PAF群)、48人の患者(63%)が持続性心房細動だった(PeAF群)。CT画像で評価した心外膜脂肪量は、PAF群よりもPeAF群の方が大きかった(99±51 vs 71±28 mL, P<0.05)。

#### (2) C-EATおよびM-EATにおける脂肪細胞径と線維化リモデリング

左心耳検体周囲には心外膜脂肪が付着していた(図1A(a))。心外膜脂肪の線維化は辺縁(M-EAT)で多く観察されたが、中心領域(C-EAT)ではあまり認められなかった(図1A(b)(c))。Masson's trichrome染色標本より測定した心房筋線維化量は心外膜脂肪線維化量と相関し(r=0.51, P<0.01)、心外膜脂肪線維化量はPAF群よりもPeAF群で大きかった(11.0±3.6 vs 14.9±4.5%)、

P<0.01)。M-EAT では、 $\alpha$ -smooth muscle actin(SMA)陽性細胞、CD68 陽性細胞、CD3 陽性細胞が豊富に浸潤していた(図 1B(a))。 $\alpha$ -SMA 陽性細胞は透過電子顕微鏡により形態学的に筋線維芽細胞と同定された(図 1B(b))。定量評価では  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の数は C-EAT よりも M-EAT の方が多かった(9.8±6.2 vs 2.2±2.3 細胞/mm<sup>2</sup>, P<0.01)。同様に CD68 陽性細胞および CD3 陽性細胞数は、C-EAT よりも M-EAT の方が多かった(それぞれ、15.0±9.9 vs 7.0±6.7 細胞/mm<sup>2</sup>, 21.6±11.5 vs 9.5±8.1 細胞/mm<sup>2</sup>, P<0.01)。続いて、心外膜脂肪の線維化量と脂肪細胞径を測定した代表的な 2 例の Masson's trichrome 染色画像を図 1C に示す。この 2 例では、C-EAT では線維化は稀だったが、M-EAT では多く認められた。また、脂肪細胞径は M-EAT よりも C-EAT で大きかった。この特徴を 76 例すべてにおいて定量すると、C-EAT では M-EAT よりも線維化が少なく(1.1±0.8 vs 13.4±4.6 %, P<0.01)、脂肪細胞径は、C-EAT よりも M-EAT の方が小さかった(44±5.9 vs 57±8.4  $\mu$ m, P<0.01)。

(3) マイクロアレイ解析による C-EAT および M-EAT の遺伝子発現プロファイル M-EAT において特定のサイトカインが前脂肪細胞の正常な発達を阻害し、M-EAT の脂肪細胞が小型化するという仮説を検証するために、C-EAT および M-EAT における脂肪細胞組織のマイクロア

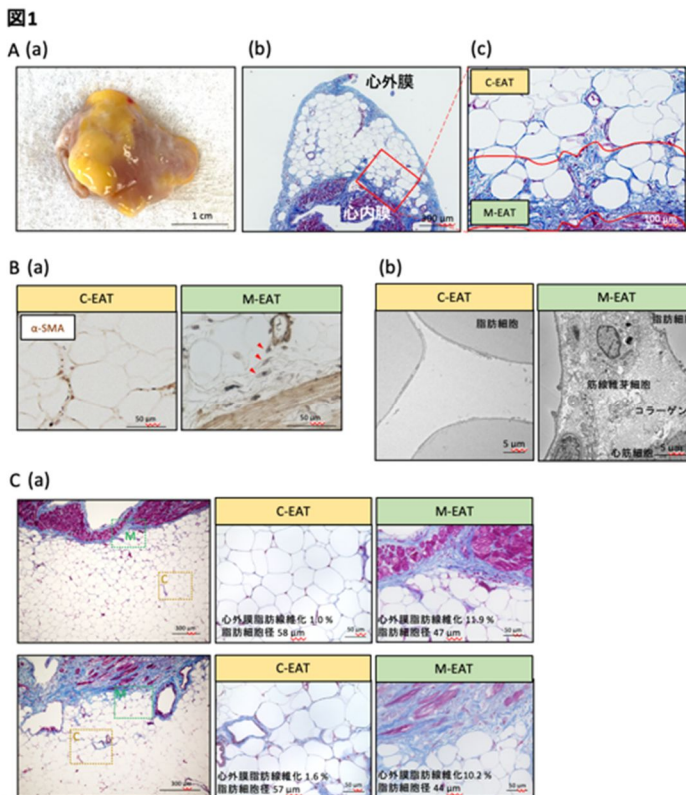
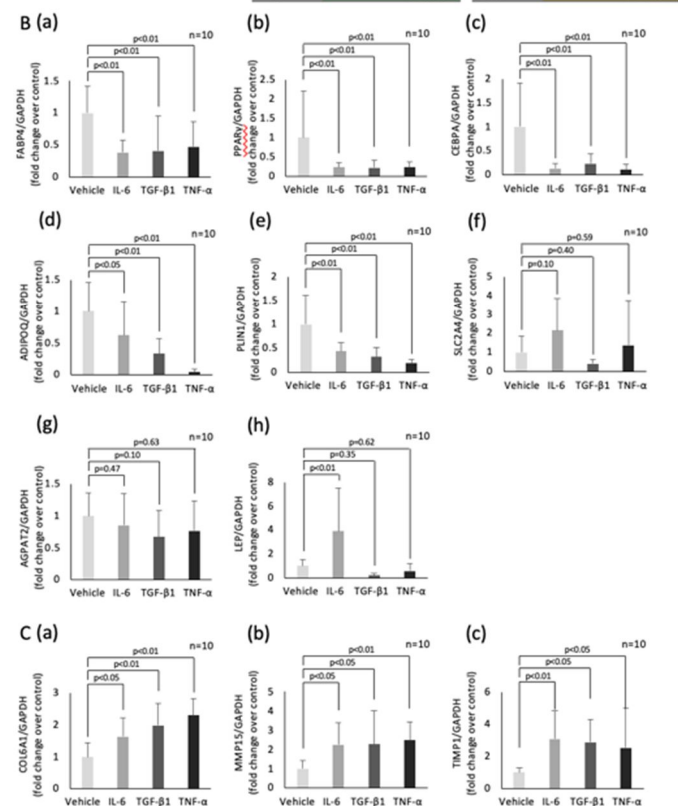


Figure 2: Gene expression profiles related to inflammation, fibrosis, and adipogenesis in C-EAT and M-EAT.

Gene expression related to inflammation		Gene expression related to fibrosis		Gene expression related to adipogenesis	
Variable	Gene expression C-EAT / M-EAT	Variable	Gene expression C-EAT / M-EAT	Variable	Gene expression C-EAT / M-EAT
IL-1 $\beta$	0.809391315	COL6A1	0.583753249	FABP4	1.715638792
IL-6	0.426982538	COL10A1	0.690066926	SLC2A4	1.115456418
TGF $\beta$ 1	0.747798533	COL12A1	0.616103294	ADIPOQ	1.254403267
TNF	0.884051336	COL14A1	0.26980112	AGPAT2	1.100889844
IFNG	0.790597511	COL24A1	0.732701081	PLIN1	1.130551286
ACTA2	0.664940276	MMP2	0.528765831	LEP	1.60452307
		MMP15	0.747866164	PPARG	1.16161356
		TIMP1	0.450319221	CEBPA	1.145108283



(4) 培養ヒト心外膜脂肪における脂肪成熟遺伝子発現に対する炎症性サイトカインの影響

M-EAT で遺伝子発現が上昇していた炎症性サイトカイン 6 例の心外膜脂肪に負荷培養した(図 2A(a))。24 時間後の脂肪成熟に関連する mRNA の発現レベルを図 2B に示す。コントロールと比較して IL-6、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  を負荷した心外膜脂肪では FABP4、PPAR、CEBPA の mRNA 発現レベルが低下していた(すべて P<0.01)(図 2B(a-c))。ADIPOQ および PLIN1 の mRNA 発現レベルは、IL-6、TGF- $\beta$ 1、および TNF- $\alpha$  によって抑制された(図 2B(d)、2B(e))。SLC2A4 および AGPAT2 の mRNA 発現レベルは、IL-6、TGF- $\beta$ 1、および TNF- $\alpha$  の負荷では有意な変化を認めなかった(図 2B(f)、2B(g))。LEP の mRNA 発現レベルは IL-6 により上昇していたが、TGF- $\beta$ 1 および TNF- $\alpha$  で

は変化なかった(図 2B(h))。COL6A1、MMP15、TIMP1 の mRNA 発現レベルは、IL-6、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  により上昇していた(図 2C(a-c))。

(5) C-EAT と M-EAT の脂肪細胞径の比と心外膜脂肪の線維化

図 3A(a)では、C-EAT の脂肪細胞径(51  $\mu$ m)は M-EAT の脂肪細胞径(47  $\mu$ m)とほぼ同じであり C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比は 109%となった。この心外膜脂肪の線維化率は 8.6%だった。図 3A(b)では、C-EAT の脂肪細胞径(55  $\mu$ m)は M-EAT の脂肪細胞径(42  $\mu$ m)より明らかに大きく、C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比は 131%だった。この心外膜脂肪の線維化率は 17.0%だった。76 例すべてを用いた定量分析では、線維化率が C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比と正の相関であることが示された( $r=0.73$ 、 $P<0.01$ ) (図 3B)。

(6) C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比と心房心筋線維化

心房心筋線維化量は C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比と正に相関することが示された( $r=0.46$ 、 $P<0.01$ ) (図 3C(a))。心房心筋の総コラーゲン量も、C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比と正の相関を示した( $r=0.64$ 、 $P<0.01$ ) (図 3C(b))。心房心筋線維化量および総コラーゲン量はいずれも、PAF 群よりも PeAF 群の方が多かった(14.9 $\pm$ 4.5 vs 11.0 $\pm$ 3.6 %、20.6 $\pm$ 7.1 vs 12.3 $\pm$ 3.8 mg/mL $\cdot$ mg、 $P<0.01$ ) (図 3C(c)、3C(d))。C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比は、PAF 群よりも PeAF 群の方が大きかった(136.4 $\pm$ 16.5 vs 120.8 $\pm$ 12.1 %、 $P<0.01$ ) (図 3D)。

(7) 心外膜脂肪の CT 値の変化率

代表的な心外膜脂肪の CT 値の変化率を図 4A(a)および 4A(b)に示す。心外膜脂肪に軽度の線維化リモデリングを有する患者(心外膜脂肪の線維化率=7.6%)では、CT 値の変化率は緩やかであり、24%だった(図 4A(a))。対照的に、高度の線維化リモデリングを有する患者(心外膜脂肪の線維化率=27.3%)では、CT 値の変化率は大きく、61%と計算された(図 4A(b))。76 人の患者全員における心外膜脂肪の CT 値の変化率は、心外膜脂肪の線維化率と正の相関があった( $r=0.47$ 、 $P<0.01$ ) (図 4B)。CT 値の変化率は、PAF 群よりも PeAF 群の方が大きかった(50.1 $\pm$ 9.8 vs 39.7% $\pm$ 10.4 %、 $P<0.01$ ) (図 4C)。CT 値の変化率は、組織学的に評価された C-EAT/M-EAT 脂肪細胞径比と正の相関があった( $r=0.70$ 、 $P<0.01$ ) (図 4D)。

(8) 結語

心外膜脂肪の組織学的な変化と CT 画像は相関しており、CT 値の変化率を使用することで、非侵襲的に EAT の線維化リモデリングを検出し心房細動の重症度を推定できる可能性が示唆された。

図 3

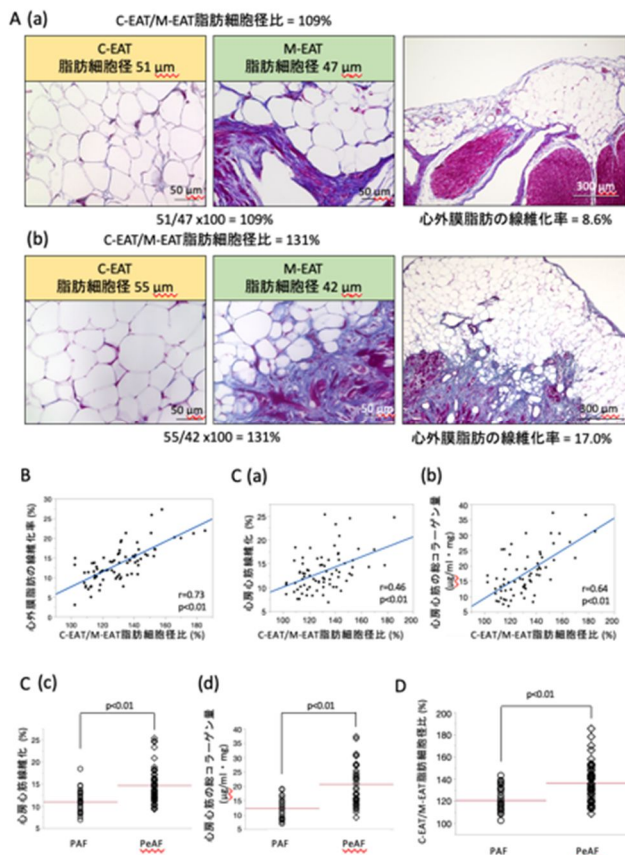
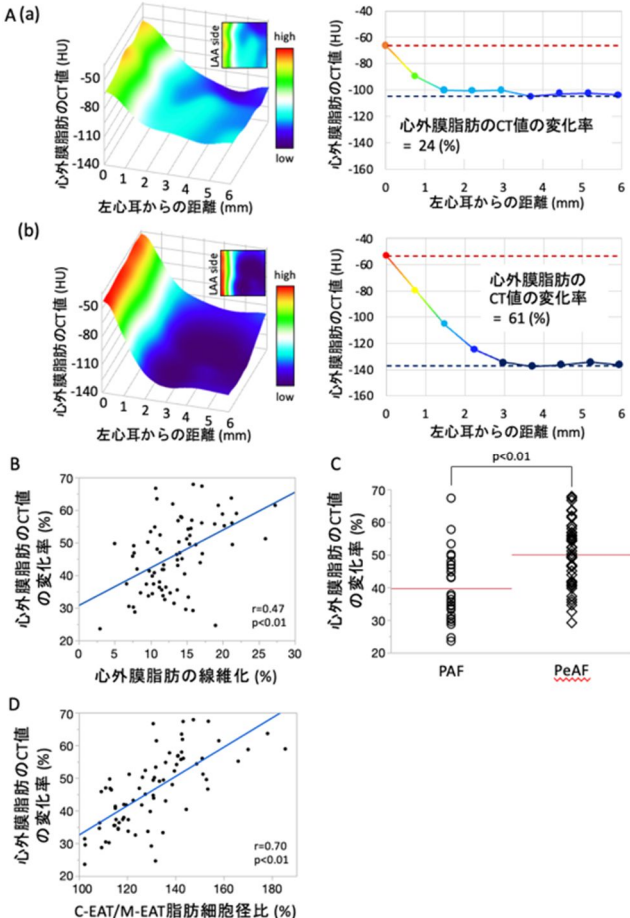


図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishii Yumi, Abe Ichitaro, Kira Shintaro, Harada Taisuke, Takano Masayuki, Oniki Takahiro, Kondo Hidekazu, Teshima Yasushi, Yufu Kunio, Shuto Takashi, Wada Tomoyuki, Nakagawa Mikiko, Shimada Tatsuo, Asayama Yoshiki, Miyamoto Shinji, Takahashi Naohiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Detection of fibrotic remodeling of epicardial adipose tissue in patients with atrial fibrillation: Imaging approach based on histological observation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart Rhythm 02	6. 最初と最後の頁 311 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrtho.2021.05.006	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 石井悠海、安部一太郎、高橋尚彦	4. 巻 -
2. 論文標題 心房細動患者における心外膜脂肪の線維化リモデリング	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 心電図	6. 最初と最後の頁 -
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 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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井悠海
2. 発表標題 心房細動患者における心外膜脂肪の線維化リモデリング：組織と画像
3. 学会等名 第68回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井 悠海
2. 発表標題 心房細動患者における心外膜脂肪の線維化リモデリング：組織と画像
3. 学会等名 循環器学会九州地方会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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