

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461090

研究課題名(和文) 心臓周囲脂肪の炎症が心筋ミトコンドリア機能に与える影響

研究課題名(英文) The effect of adipose-inflammation on mitochondria expression of cardiomyocytes in the patients with diabetes

研究代表者

山本 平 (Yamamoto, Taira)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：70301504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から臓器と臓器周囲脂肪とは連関があることが明らかになった。糖尿病では血管障害のみではなく高血糖そのもので臓器障害を引き起こすことが示唆されているがその詳細な機序についてはまだ不明なことも多い。今回我々は動脈硬化性疾患の代表的なものである虚血心疾患の手術症例において手術中に得られた組織を用いてそれらの関連性を検討した。その結果、心筋(左房心筋)とその周囲脂肪には炎症やそれに引き続き分泌されるサイトカインなどに関連性が認められること、同じ組織においてもその部位によって炎症などの程度が大きく異なっていた。このことから脂肪の質の改善によって臓器疾患の治療に結び付く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been known that there is cross-talk mechanism between organ and neighbor adipose tissue. As diabetes mellitus is widely known to be associated with arteriosclerotic change, other study suggested that the hyperglycemia itself also causes damage of cardiomyocytes, however the detail mechanism has not been clear. In this study, the cardiac tissue and adipose tissue were obtained from the patients who underwent cardiac surgery due to ischemic heart diseases to assess the relationship between cardiomyocyte and adipose. Our results indicated that there are cross-talk between cardiac tissue (left atrium appendage) and adipose tissue in inflammation related cytokines and fibrosis-related cytokines. In addition, the expressions of the cytokines were varied depend on the area of the adipose.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：糖尿病

1. 研究開始当初の背景

炎症のソースとしての脂肪組織

心臓周囲の脂肪組織は新生児期にはほとんど存在しないが、幼児期から認められる。成人ではその量に個人差はあるものの、分布はさらに心臓全体にびまん性に広がり、肥満者において高度の沈着を認めることが多い。以前までは脂肪組織は間質を埋めるための余剰組織にすぎず、過剰摂取したカロリーを中性脂肪として貯蓄するのみのものと考えられており、心臓周囲に付着した脂肪の役割などについてはほとんど研究されてこなかった。しかしながら最近の研究から脂肪組織は炎症物質を放出する内分泌組織であり、その部位や疾患背景によっても性質が異なること、臓器周囲の脂肪組織の炎症が臓器へ大きな影響を与えることなどがわかってきた。たとえば肝細胞などに沈着した膨化した脂肪細胞は TNF- α など多くの炎症サイトカインを放出することが報告されている。心臓においても冠動脈疾患を持っている患者の冠動脈周囲脂肪は、そうでない患者に比べてマクロファージの炎症マーカーが有意に高いことが示された。一方で脂肪が血管内皮を保護する効果が示唆されるなど、脂肪はその質や部位によりや隣接臓器とお互いに影響し合っていることが明らかになってきた。

糖尿病と脂肪組織

前述のように膨化した脂肪組織は炎症性サイトカインを放出し、インスリン分泌異常、耐糖能異常を引き起こし、これが糖尿病の起因・増悪因子となることが明らかにされている。一方で糖尿病患者においては脂肪に含まれる T 細胞やマクロファージの分画が非糖尿病患者とは異なることが知られており、このことは糖尿病患者においては非糖尿病患者と比べて、脂肪が組織に与える影響に違いがあることを示唆している。

糖尿病患者における心筋細胞傷害

我々の施設で施行した冠動脈バイパス術の遠隔成績調査では、糖尿病例は非糖尿病症例に比べて死亡率や心事故再発率が有意に高かった。興味深いことに糖尿病症例では、血行再建したバイパスや冠動脈は開存しているにもかかわらず心機能が著しく低下する症例が認められる。つまり糖尿病そのものが心機能障害を引き起こすと考えられ、これは 2006 年に糖尿病性心筋症という概念が示されたことから、糖尿病が心筋細胞傷害に関与することが強く示唆される。ある報告では心筋細胞の収縮力障害はミトコンドリアの機能障害に起因することが示されている。また糖尿病マウスを用いた研究では、心筋拡張障害には初期においては心筋細胞の線維化ではなく、心筋内への脂肪組織の沈着による組織障害が関与するという。周術期・術後における血糖管理 これまでも外科手術の周術期において厳密

な血糖コントロールが、創部感染や敗血症のリスクを低減させることが数多く報告されていたが、心臓手術後においても高血糖のまま管理されていた群では血糖コントロールされた群と比較し、遊離脂肪酸が高く、乳酸値が高く、さらに心係数が低いことが示され、周術期における血糖管理が心筋細胞や心機能にも及ぶことが示され、高血糖の心筋細胞への直接的な影響が臨床的にも裏付けられた。しかしながらこの心筋障害が炎症サイトカインなどに惹起される一過性のものなのか、それとも継続的なものであり、血糖コントロールによって改善するものなのかについてもこれまで一切報告は見られない。

近年のメタボリックシンドロームの有病率の増加から、心筋梗塞や動脈硬化を起因とする大動脈弁疾患など動脈硬化病変を持つ患者数は今後ますます増加し、それに伴い手術適応症例も増加するものと考えられる。これらの疾患群においては周術期の管理のみではなく、二次予防のための術後長期にわたる管理も非常に重要となる。現在の日本循環器学会のガイドラインにおいては、様々な薬物療法、理学療法そして食事療法などが推奨されているが、糖尿病コントロールの指標である HbA1c や血糖値の厳格なコントロールにより心機能障害が改善したとの報告は認められず、二次予防効果の数値目標なども定まっていない。今回の我々の検討により、脂肪組織が心筋に直接作用し心機能障害を引き起こすことが明らかになれば、術後の心機能早期回復のため、例えば手術中に心臓周囲の脂肪を可及的に除去する、脂肪の炎症を抑制するような薬剤を使用することなどが、新たな周術期管理の治療戦略になるかもしれない。さらに術後長期においても血糖コントロールにより心機能が改善することを示せば、動脈硬化を起因とする心臓疾患に対する新たな治療指針が示せるとともに、さらに低左心機能・重度心不全に対する左室補助デバイスや心移植の適応時期を遅らせる、もしくは回避させることが可能となるかもしれない。

2. 研究の目的

今回我々は、心筋細胞の周囲に存在もしくは細胞内に沈着する脂肪が心筋細胞内のミトコンドリア機能にどの程度影響を与えているのか、糖尿病においてこの機能障害がそうでない患者に比べて亢進しているのか、また心機能障害はより高度であるのかを検証することとした。

3. 研究の方法

手術前より文書による同意が得られた患者を対象とした。開心術の際に左心耳および左房周囲脂肪を採取した。左心耳周囲にある脂肪を剥離し、筋肉組織と脂肪組織を分離、これらを PCR 法にて比較検討した。

4. 研究成果

登録症例のうち人工心肺非使用の単独 CABG 症例のみを対象とした。これらを非糖尿病 (DM-) および糖尿病 (DM+) 群に分けた。それぞれ 43 例ずつであった。

平均年齢はそれぞれ DM- : 70.3 ± 10.3 歳、DM+ : 67.6 ± 9.6 歳と DM+ で若年傾向であったが有意差は認めなかった ($p=0.210$)。女性の割合は DM- : 5 人 (11.6%)、DM+ : 9 人 (20.9%)、 $p=0.243$) と有意差はなかった。BMI は DM- : 23.1、DM+ : 24.3 と有意差はなく ($p=0.108$)。平均体重にも差を認めなかった (DM- : 61.9 kg vs DM+ : 63.9 kg, $p=0.443$)。平均心拍数は 67.8 bpm vs 69.8 bpm で有意差はなく ($p=0.401$)、血圧 121.5/65.5 mmHg vs. 116.3/61.8 mmHg ($p=0.142/0.146$) といずれも有意差を認めなかった。

術前の合併症として、高血圧は DM- : 24 人 (55.8%)、DM+ : 36 人 (83.7%) と有意に DM+ 群で高かったが ($p<0.01$)、脂質異常症、慢性腎不全には差はなかった。(脂質異常 : DM- vs. DM+ = 28 (65.1%) vs. 34 人 (79.1%)、慢性腎不全 : DM- vs. DM+ = 1 (2.3%) vs. 4 人 (9.3%) $p=0.149$, $p=0.166$)

術前採血データではヘモグロビンが DM- : 13.2 g/dL に対し、DM+ : 12.4 g/dL ($p<0.05$) と DM+ 群が有意に低く、貧血傾向であった。

腎機能の指標として血清クレアチンは DM- : 0.9 mg/dL、DM+ : 1.4 mg/dL と DM+ 群で悪く ($p<0.05$) 尿素窒素 DM- : 15.7 mg/dL、DM+ : 20.0 mg/dL も DM+ で有意に高かった ($p<0.05$)

肝機能は AST : DM- vs. DM+ = 23.4 U/L vs 20.5 U/L ($p=0.212$)、ALT : DM- vs. DM+ = 24.2 U/L vs 18.7 U/L ($p=0.103$)、 γ -GTP : DM- vs. DM+ = 46.7 mg/dL vs 42.7 mg/dL ($p=0.163$) と差を認めなかった。

脂質プロファイルでは HDL コレステロール : DM- vs. DM+ = 46.7 mg/dL vs 42.7 mg/dL ($p=0.163$)、LDL コレステロール : DM- vs. DM+ = 95.6 mg/dL vs 88.8 mg/dL ($p=0.311$)、LH 比 : 2.2 vs 2.3 ($p=0.792$)、中性脂肪 : DM- vs. DM+ = 105.2 mg/dL vs 122.3 mg/dL ($p=0.099$) といずれも有意差を認めなかった。

総タンパク : DM- vs. DM+ = 6.8 g/dL vs 6.7 g/dL ($p=0.504$)、血清アルブミン : DM- vs. DM+ = 4.0 g/dL vs 3.9 g/dL ($p=0.114$)、コリンエステラーゼ : DM- vs. DM+ = 295.0 mg/dL vs. 288.6 mg/dL ($p=0.673$) と差はなく、クレアチンキナーゼ : DM- vs. DM+ = 99.9 mg/dL vs. 84.9 mg/dL ($p=0.377$)、LDH : DM- vs. DM+ = 184.3 mg/dL vs. 185.1 mg/dL ($p=0.934$)、尿酸値 : DM- vs. DM+ = 6.1 mg/dL vs. 6.3 mg/dL ($p=0.562$) といずれも差を認めなかった。

血清電解質ではナトリウム : DM- vs. DM+ = 140.7 mmol/L vs. 139.8 mmol/L ($p=0.176$)、カリウム : DM- vs. DM+ = 4.1 mmol/L vs. 4.7 mmol/L ($p<0.01$)、クロール : DM- vs. DM+ = 104.7 mmol/L vs. 103.2 mmol/L ($p<0.05$)

とカリウムは DM+ で有意に高く、クロールは有意に低かった。

白血球数は DM- vs. DM+ = $5604.8 \times 10^9 / L$ vs. $6173.8 \times 10^9 / L$ ($p=0.087$) であり CRP は DM- vs. DM+ = 0.3 mg/dL vs 0.7 mg/dL ($p=0.140$) と DM+ 群で炎症反応が高い傾向があったが、いずれも有意差はなく、BNP は 92.5 pg/dL vs 152.7 pg/dL ($p=0.219$) とこちらも DM+ で高い傾向を認めたが有意差はなかった。

甲状腺ホルモンである FT3、FT4 はそれぞれ DM- vs. DM+ = 2.7 pg/dL vs 2.6 pg/dL ($p=0.354$)、FT4 : 1.1 ng/dL vs 1.2 ng/dL ($p=0.112$) と有意差はなく、TSH : DM- vs. DM+ = 3.1 μ IU/mL vs 2.3 μ IU/mL ($p=0.181$) といずれも有意差を認めなかった

なお HbA1c は DM- vs. DM+ = 5.7% vs 6.7% ($p<0.01$) であった。

術前の心エコー所見では LVDd / LVDs、LVEDV / LVESV に差はなく (LVDd / LVDs : DM- vs. DM+ = 47.9 / 33.0 mm vs. 50.0 / 35.0 mm, $p=0.088 / 0.237$ 、LVEDV / LVESV : DM- vs. DM+ = 109.5 / 50.1 mL vs. 118.6 / 60.1 mL, $p=0.316 / 0.183$)、左室心筋壁厚は中隔側が 9.9 mm vs. 10.1 mm ($p=0.608$)、後壁側は 10.1 mm vs. 10.0 mm ($p=0.128$) と差はなかった。左室駆出率も DM- vs. DM+ = 59.0% vs. 54.9% と DM+ でやや低い傾向があったが有意差はなかった ($p=0.145$)

平均手術時間は DM- : 135.1 分、DM+ : 126.3 分と差はなく ($p=0.679$)、挿管時間、(DM- vs. DM+ = 6.7h. vs 8.0 h, $p=0.245$)、ICU 入室日数 (DM- vs. DM+ = 1.4h. vs 1.6h, $p=0.385$) と DM+ 群でやや遷延する傾向が見られたものの有意差は認めなかった。

術後合併症の評価として、術後心房細動、血液透析、脳血管障害 (すべて一過性のものを含む) の発生率を評価した。心房細動は DM- vs. DM+ = 18 人 (41.9%) vs. 10 人 (23.3%)、 $p=0.056$ 、血液透析 : DM- vs. DM+ = 3 人 (7.0%) vs. 3 人 (7.0%)、 $p=1.000$ 、脳血管障害 : DM- vs. DM+ = 0 人 (0.0%) vs. 4 人 (9.3%)、 $p=0.041$ 、と脳血管障害のみ DM+ 群で有意に高かった。

なお術前の NYHA 分類は DM- : 1.6 に対し、DM+ : 1.8 と DM+ で高い傾向が見られたが、両群に有意差はなかった ($p=0.287$)

左房筋 (左心耳) の遺伝子発現の評価をおこなったところ、炎症性サイトカインである TNF、IL-2、IL-6 とともに差は認めなかった (TNF : DM- vs. DM+ = 1.7 vs 1.5 -fold ($p=0.735$)、IL-2 : DM- vs. DM+ = 1.7 vs 0.8 -fold ($p=0.260$)、IL-6 : DM- vs. DM+ = 2.5 vs. 1.3 -fold ($p=0.229$)。また左心耳周囲脂肪においても同様に差を認めなかった (TNF : DM- vs. DM+ = 1.0 vs 1.4 -fold ($p=0.201$)、IL-2 : DM- vs. DM+ = 0.8 vs 2.1 -fold ($p=0.171$)、IL-6 : DM- vs. DM+ = 0.9 vs. 0.9 -fold ($p=0.878$)。一方で

肺静脈周囲脂肪では DM+群で TNF および IL-2 が高い傾向があり、特に TNF は有意に高値であった。(TNF : DM - vs. DM+ = 0.8 vs 1.6 -fold (p = 0.048) IL-2 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 1.9 -fold (p = 0.198) IL-6 : DM - vs. DM+ = 2.5 vs. 1.3 -fold (p = 0.346))

その他の炎症関連サイトカインとして、抗炎症サイトカインとされる IL-10 および IL-17、IL-33 を測定した。左心耳心筋の IL-10 は DM+群でやや発現が低い傾向が見られたが有意差はなかった (DM - vs. DM+ = 1.1 vs 0.4 -fold, p = 0.155) IL-17、IL-33 の発現にも差は認めなかった (IL17: DM - vs. DM+ = 1.2 vs 0.6 -fold, p = 0.255、IL-33 : DM - vs. DM+ = 10.2 vs 7.2 -fold, p = 0.275) これらの発現は左心耳周囲脂肪においても同様の傾向であった (IL-10: DM - vs. DM+ = 1.1 vs 1.5 -fold, p = 0.249、IL-17: DM - vs. DM+ = 1.1 vs 1.6 -fold, p = 0.230、IL-33 : DM - vs. DM+ = 1.1 vs 1.2 -fold, p = 0.950) 一方で肺静脈周囲脂肪においてはこれらの発現はすべて有意差を持って DM+群で高くなっていた (IL-10: DM - vs. DM+ = 0.7 vs 1.5 -fold, p < 0.01、IL-17: DM - vs. DM+ = 0.7 vs 1.4 -fold, p < 0.05、IL-33 : DM - vs. DM+ = 0.8 vs 1.2 -fold, p < 0.05))

ミトコンドリア発現の指標として Tfam1、NRF1、PGC1、NDUFB8、ND6 を測定した。左心耳心筋、左心耳周囲脂肪においてこれらの発現に両群間で差は見られなかった。左心耳心筋 [Tfam1 : DM - vs. DM+ = 0.4 vs 0.4 -fold (p = 0.481) NRF1 : DM - vs. DM+ = 4.0 vs 3.1 -fold (p = 0.387) PGC1 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 0.7 -fold (p = 0.309) NDUFB8 : DM - vs. DM+ = 4.0 vs 5.0 -fold (p = 0.136) ND6 : DM - vs. DM+ = 11. vs 11.0 -fold (p = 0.885)]、左心耳周囲脂肪 [Tfam1 : DM - vs. DM+ = 0.4 vs 0.4 -fold (p = 0.481) NRF1 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 1.5 -fold (p = 0.054) PGC1 : DM - vs. DM+ = 1.2 vs 1.0 -fold (p = 0.358) NDUFB8 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 0.9 -fold (p = 0.778) ND6 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 1.0 -fold (p = 0.532)]。これらの発現は肺静脈周囲脂肪においては NRF1 のみ DM+で高い傾向が見られたが、肺静脈周囲脂肪 [Tfam1 : DM - vs. DM+ = 0.4 vs 0.4 -fold (p = 0.481) NRF1 : DM - vs. DM+ = 0.8 vs 1.3 -fold (p < 0.05) PGC1 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 0.9 -fold (p = 0.491) NDUFB8 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 0.9 -fold (p = 0.717) ND6 : DM - vs. DM+ = 1.0 vs 0.8 -fold (p = 0.390)]。

心臓から分泌されるホルモンのうち ANP および BNP の RNA 発現に差はなかった。これらのホルモンの遺伝子発現は脂肪組織においてもわずかながら認められたがその発現は心筋と比べてそれぞれ 2500 分の 1、200 分の 1 程度であった [左心耳心筋 ANP : DM - vs. DM+ = 2333.6 vs 2609.2 -fold (p = 0.219) BNP : DM - vs. DM+ = 109.6 vs 100.0 -fold

(p = 0.656)] [左心耳周囲脂肪 ANP:DM - vs. DM+ = 0.8 vs 0.8 -fold (p = 0.903) BNP : DM - vs. DM+ = 0.7 vs 0.5 -fold (p = 0.535)]。また左心耳周囲、肺静脈周囲においてもこれらの発現量にほとんど差は見られなかった。

線維化関連因子の発現では 1 型コラーゲン RNA は DM - vs. DM+ = 5.8 vs 2.8 -fold と DM 群で低い傾向だったが有意差はなかった (p = 0.062) bFGF は DM - vs. DM+ = 0.4 vs 0.6 -fold (p = 0.080) TGF- 1 : DM - vs. DM+ = 48.4 vs 47.9 -fold (p = 0.899) TGF- 2 : DM - vs. DM+ = 1.1 vs 1.1 -fold (p = 0.827) TGF- 3 : DM - vs. DM+ = 1.2 vs 1.2 -fold (p = 0.828) といずれも差を認めなかった。左心耳周囲脂肪も同様の傾向であり [bFGF : DM - vs. DM+ = 1.0 vs 0.9 -fold (p = 0.525) TGF- 1 : DM - vs. DM+ = 1.1 vs 1.0 -fold (p = 0.611) TGF- 2 : DM - vs. DM+ = 1.0 vs 1.4 -fold (p = 0.189) TGF- 3 : DM - vs. DM+ = 0.8 vs 1.3 -fold (p = 0.056)]、DM の有無での発言に差は認めなかった。一方で肺静脈周囲脂肪においては bFGF : DM - vs. DM+ = 1.1 vs 1.1 -fold (p = 0.884) TGF- 1 : DM - vs. DM+ = 0.9 vs 1.3 -fold (p < 0.05) TGF- 2 : DM - vs. DM+ = 0.7 vs 1.4 -fold (p < 0.01) TGF- 3 : DM - vs. DM+ = 0.8 vs 1.3 -fold (p < 0.05) と bFGF 以外は DM 群で高く線維化の進行に関与している可能性が示唆された。

その他の成長因子の発現を左心耳周囲脂肪と肺静脈周囲脂肪と比較検討するとそれぞれ VEGF-R2 遺伝子、アンジオポイエチン(1)、HGF、IGF-1 の発現が肺静脈周囲で高かった。これらのことから、心筋組織とその周囲脂肪は炎症性サイトカインを含む多くの遺伝子発現に相同性が見られたことから、お互いに何らかのクロストークがある可能性が示唆され、同じ左房周囲脂肪においても左心耳周囲と肺静脈周囲脂肪においておおくの遺伝子発現に差が見られたことから、同じ組織においても部位によって役割が異なる可能性が示唆され、肺静脈周囲は心房細動のトリガーに深く関与しているとされているが、これらの部位において DM 群で炎症がより多く惹起されていることから、糖尿病の慢性炎症を評価するうえでよい指標となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yamamoto T, Matsushita S, Amano A: Effect on mitochondria expression of atrial fibrillation. Juntendo Medical Journal 62(6): 500, 2017 (査読なし)

[学会発表](計 1 件)

松下 訓, 山本 平, 桑木賢次, 嶋田晶江,

天野 篤：心房細動患者における組織リモ
デリングと心筋幹細胞発現の関係性．日本
再生医療学会 2018-3-22 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 平(YAMATOMO, Taira)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：70301504

(2)研究分担者

松下 訓(MATSUSHITA, Satoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：20407315

(3)連携研究者

天野 篤(AMANO, Atsushi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：70338440

桑木賢次(KUWAKI, Kenji)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：90398313

(4)研究協力者

嶋田晶江(SHIMADA, Akie)
順天堂大学・医学部・助教

篠原大介(SHINOHARA, Daisuke)

順天堂大学・医学部・助教

李 川(LI, Chuan)
順天堂大学・医学部・大学院生

李 智栄(LEE, Jiyoung)
順天堂大学・医学部・大学院生

横山典彦(YOKOYAMA, Norihiko)
順天堂大学・医学部・研究補助員