

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870395

研究課題名(和文)心外膜下脂肪組織の多面的病的意義の解明 -画像診断と組織学的解析による検討-

研究課題名(英文)Pathologic significance of epicardial adipose tissue -evaluation by clinical imaging and histology

研究代表者

北川 知郎 (Kitagawa, Toshiro)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：70633709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心臓周囲に存在する内臓脂肪である心外膜下脂肪組織が有する病的意義を、臨床画像診断と手術時に採取した検体の組織学的評価との対比を通して検証した。CT検査で検出された冠動脈硬化症と心外膜下脂肪組織における炎症や微小血管新生との関連性を見出し、新たな悪玉内臓脂肪としての心外膜下脂肪組織の特性を示す結果と考えられた。さらに詳細な病的機序に迫るため、臨床的分子イメージングや心外膜下脂肪組織における液性因子(炎症性サイトカイン)を含めた解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the pathologic significance of epicardial adipose tissue (EAT), surrounding the heart, through the comparison of clinical imaging and histology of EAT samples obtained during cardiac surgery. We found the correlation between coronary atherosclerosis on computed tomography and biologic activities of EAT, represented by inflammation and neoangiogenesis on histology. Our results suggest that EAT has the 'diseased' property as a new bad fat tissue in clinical practice. To further investigate the pathologic impact of EAT, the analyses using molecular imaging and those of inflammatory cytokines are under the process.

研究分野：循環器

キーワード：心外膜下脂肪 冠動脈硬化症 画像診断

## 1. 研究開始当初の背景

### 【心外膜下脂肪組織の病的意義】

肥満患者の脂肪組織においてはマクロファージ浸潤などの炎症が惹起されており (*J Clin Invest* 2003;112:1796-1808)、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンが冠動脈粥状硬化の進展と深い関わりを有することが報告されている (*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003)。また、肥満が血圧とは独立した左室肥大に対する危険因子であることも示されている (*Hypertension* 2007)。心臓に密着する内臓脂肪である心外膜下脂肪組織 (epicardial adipose tissue: EAT) も、炎症やケミカルメディエーター放出を通して血管外膜側から冠動脈、心筋へ影響を及ぼし、生活習慣病、メタボリック症候群の主因として冠動脈、心筋疾患の病態形成に重要な役割を果たしている可能性があり、新たな悪玉内臓脂肪としてその病的役割を明らかにしていくべき組織と考えられる。Hirata らは、EAT における組織学的なマクロファージ浸潤および炎症性サイトカイン発現と冠動脈硬化症との関連性を報告している (*J Am Coll Cardiol* 2011)。また、我々を含む研究グループにより、臨床的見地から CT 画像上の EAT volume と冠動脈硬化症との関連性が示されている (*Atherosclerosis* 2012)。しかしながら、EAT の病理組織学的評価と臨床画像評価を詳細に対比した研究報告はなく、EAT の実臨床での解釈や評価方法は確立されていない。

### 【心血管病における非侵襲的臨床画像テクノロジーの進歩】

Multidetector-row CT は‘動く臓器’心臓を詳細に 3 次元的静止画像として描出し、冠動脈壁病変(プラーク)の非侵襲的検出と性状評価を可能とした。研究代表者らは冠動脈 CT 造影(CCTA)を用いた病態把握に取り組み、冠動脈プラーク破綻に繋がる脆弱性因子(豊富な脂質成分[ソフトプラーク]、血管断面積増大[陽性リモデリング]、近接する血管壁点状石灰化)の包括的評価法を世界に先駆けて提唱した (*Am Heart J* 2007)。さらに急性冠症候群責任病変の特徴として、より進行した血管陽性リモデリングが最も重要な指標であることを示した (*JACC Cardiovasc Imaging* 2009)。さらに、CCTA 画像による検討から、積極的脂質低下療法の冠動脈プラーク安定化作用 (*Int J Cardiol* 2011)、アディポネクチンと冠動脈プラーク脆弱性との関連性 (*Circ J* 2012) を報告した。内臓脂肪に関する検討としては、腹部内臓脂肪量、EAT 量の増加が CCTA 画像上の冠動脈粥状硬化進展やプラーク脆弱性と関連していることを報告した (*Int J Cardiol* 2012, *JACC Cardiovasc Imaging* 2010)。

フルオロデオキシグルコース(FDG)-PET 検査は、虚血性心疾患による心不全患者にお

ける心筋 viability 診断、または心サルコイドーシスにおける炎症部位の臨床診断に利用される。近年、FDG-PET 画像による血管壁炎症評価の試みが報告されており、その対象は大血管のみならず、冠動脈にも及んでいる (*JACC Cardiovasc Imaging* 2010)。研究代表者は米国スタンフォード大学の研究プログラム (Molecular Imaging Program at Stanford, MIPS) に参画し、PET を用いた血管分子イメージング研究に取り組み、血管病における炎症細胞浸潤、新生血管発現の画像化に関する研究成果を挙げた (*Circ Cardiovasc Imaging* 2013)。血管分子イメージング研究の次の段階として、PET による冠動脈分子イメージングと EAT の病理組織学的性状との比較検討に着目した。

## 2. 研究の目的

- 心臓に密着する内臓脂肪である EAT は、炎症やケミカルメディエーター放出を通して冠動脈疾患や心筋変性に直接関与する可能性が示唆されている。
- 本研究では、非侵襲的画像診断法を用いた冠動脈・心筋疾患の器質的、機能的、生物学的病態評価と、開心術時に採取された心外膜下脂肪の病理組織学的解析所見を対比させ、新たな悪玉内臓脂肪としての心外膜下脂肪組織の多面的病的意義に迫る。

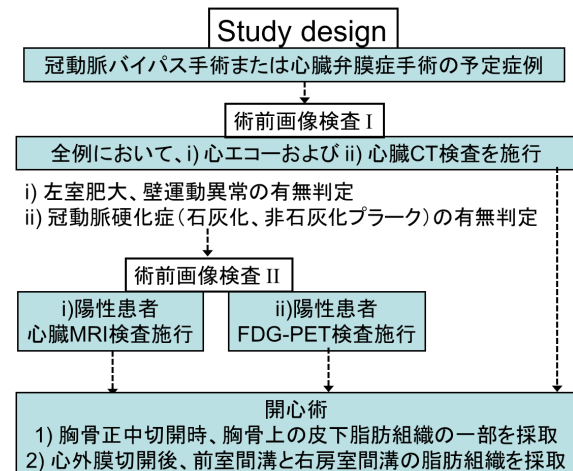
## 3. 研究の方法

### 1. 症例登録

「心膜脂肪沈着と心血管系合併症との関係の解明」研究に 100 例の登録を予定する。対象症例は、冠動脈バイパス術または心臓弁膜症手術予定であり、年齢 30 歳以上、術前に心エコー検査、心臓 CT 検査を施行されており、重篤な心不全、ショック状態を呈していない、意思疎通が可能である症例とする。

### 2. 術前画像検査 I

図に示す study design のもと、全例において下記画像検査を行う。



(i) **心エコー検査**: 左室肥大(心室中隔、左室後壁厚 $\geq 12\text{mm}$ 、または  $2 \times$ 左室後壁厚/左室拡張末期径  $> 0.42$  として定義) 左室壁運動異常の評価、左室駆出率、拡張能( $E/e'$ )の測定を行う。

(ii) **心臓CT検査**: 全体的な冠動脈硬化定量として、Agatston 法による石灰化スコアを算出する。次いで、心臓血管 CT 学会(SCCT)分類に基づく 18 segments における狭窄率、プラーク(石灰化、非石灰化、混合プラーク)の有無と性状を評価する。冠動脈プラーク性状に関しては、

1)最小 CT 値、2)Remodeling index (病変部血管断面積/正常部血管断面積) 3)近接する点状石灰化病変、4)プラーク内輪状造影(napkin-ring sign)の各項目について評価する。EAT 定量と性状評価については、

1)Aze 社製 Virtual Place 腹部内臓脂肪計測用解析ソフトを用い、左心耳の 1cm 上から心尖部まで 1cm 間隔の各断面にて EAT 面積を求め、全スライスの合計より心膜脂肪量(ml)を算出する。

2)前室間溝(左前下行枝近位部) 前房室間溝(右冠動脈近位部) 後房室間溝(左回旋枝中部) 大動脈前面の EAT の CT 値を計測する。

### 3. 術前画像検査 II

(i) **心エコー検査の左室肥大、壁運動異常症例**においては、**心臓MRI** 各撮像シーケンスによる心筋性状精査(左室駆出率測定、心筋重量定量、心筋浮腫(炎症)・虚血・線維化の有無と拡がりの判定)を行う。

(ii) **心臓 CT 検査の冠動脈硬化症例**においては **FDG-PET** による大動脈壁と頸動脈壁(動脈壁炎症の全身的指標) および CT にて石灰化、プラークが検出された左冠動脈主幹部、冠動脈 3 枝近位部の tracer 集積定量評価(standard uptake value 測定)を行う。

### 4. EAT 採取と病理組織学的検討

(i) 開心術時の脂肪組織採取: 心膜切開後、前室間溝(左前下行枝近傍)と右房室間溝(右冠動脈近傍)から EAT を採取する。採取する切片は、いずれも最大径 5mm 以下とする。対照組織として、胸骨正中切開時に胸骨上皮下脂肪組織の一部も採取する。

(ii) 採取組織の試験方法: 採取した脂肪組織は、速やかにホルマリン固定を施す。追加の病理組織学的検証を行う場合に備え、それぞれの一部切片を液体窒素による凍結後、広島大学大学院循環器内科学教室内の -80 $^{\circ}\text{C}$  フリーザーにて凍凍保存する。心膜脂肪組織を扱った Hirata らの報告に従い(J Am Coll Cardiol 2011, Arterioscler Thromb Vasc 2013)、ホルマリン固定した脂肪組織をパラフィンに包埋後、厚さ 5 $\mu\text{m}$  にスライスした切片をスライドガラス上に固着し、以下の抗体を用いた免疫染色を行う。

・抗 IgG4 抗体・CD68(マクロファージ)・CD11c (炎症促進マクロファージ[type M1])・CD206 (抗炎症マクロファージ[type M2])・CD31(新生血管内皮細胞)・VEGF-R (血管内皮細胞成長因子)・抗アディポネクチン抗体(動脈硬化抑制因子)

免疫染色組織像の定量は、顕微鏡下での細胞数カウントもしくは解析ソフト(Image J)を用いた染色領域比率の計測を行う。疾患背景(冠動脈疾患の有無)や術前画像診断による冠動脈硬化性状、心筋変性との関連性を検討する。尚、免疫染色性が不良である場合、ELISA 法の追加施行を考慮する。

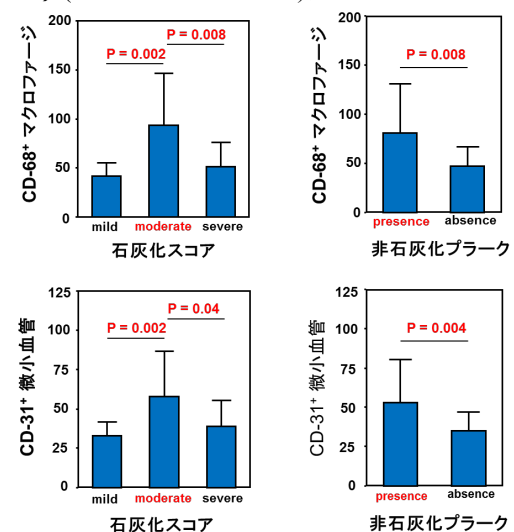
## 4. 研究成果

### 【臨床画像データに関する報告】

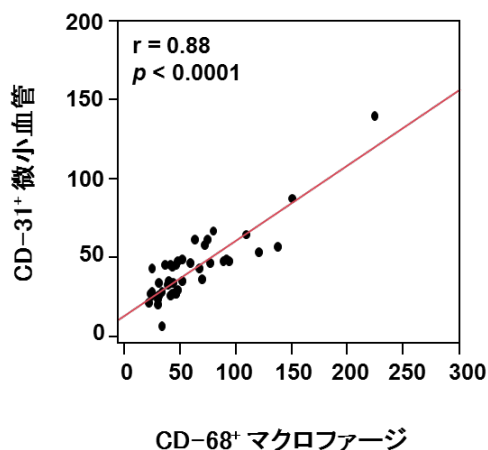
心臓 CT を施行された症例のうち、冠動脈石灰化スコアゼロのサブグループを抽出した検討において、EAT 容量の興味深い臨床的意義を見出した。すなわち、冠動脈石灰化スコアゼロである 352 症例において、CT 画像上で測定された EAT volume の中間値を基準に high EAT volume と low EAT volume のグループに層別化すると、high EAT volume のグループが高頻度に冠動脈造影 CT 上の非石灰化プラークを有していた。腹部内臓脂肪が低い群に絞っても同様に high EAT volume が冠動脈非石灰化プラーク形成の有意な予測因子であり、(オッズ比 3.02,  $p=0.008$ )、EAT が冠動脈硬化症の初期段階で重要な因子として作用している可能性が示唆された(Circ J 2015)。

### 【組織学的解析を含めた報告】

45 例の心臓手術施行症例において、術前の冠動脈硬化と内臓脂肪の画像評価と術中の EAT 採取および病理組織学的解析を行った。心臓 CT における中等度石灰化(moderate, 石灰化スコア 101-400)および非石灰化プラーク検出と EAT 免疫染色によるマクロファージ浸潤・微小血管新生との有意な相関を確認した(下図)(Atherosclerosis 2015)。



一方で、臨床評価指標である CT 画像上の EAT volume と EAT 免疫染色によるマクロファージ浸潤・微小血管新生の間には相関性を認めないことも確認した。これらの結果より、EAT の病理組織学的活性は臨床的な脂肪量に関わりなく、冠動脈硬化症の進展期（冠動脈の中等度石灰化、非石灰化プラーク形成期）において重要な意義を有する可能性が示唆された。また、EAT の炎症（マクロファージ浸潤）と微小血管新生は対照組織としての皮下脂肪のそれらより遥かに亢進しており、炎症と微小血管新生同士が強い相関性を呈していた（下図）(Data Brief 2015)。



以上の結果はEATの病的脂肪組織としての性状を示していると考えられ、EATの炎症、微小血管新生などの病理学的変性が相乗的に冠動脈硬化症の進展に寄与していること示唆する新たな知見と考えられた。

#### 【今後の展開に向けた研究】

冠動脈 CT 画像において検出されるハイリスクプラーク（低 CT 値、血管リモデリング進行）が EAT の炎症、微小血管新生の亢進レベルを予測する独立した因子であることを見出した(マクロファージ浸潤:  $\beta = 0.61$ ,  $P = 0.043$ 、微小血管新生:  $\beta = 0.69$ ,  $P = 0.023$ )。EAT の病理組織学的活性と冠動脈硬化症進展の密接な関係を支持する新知見と考えられた（英文学術誌に投稿中）。

さらに、リアルタイム PCR による EAT の炎症性サイトカイン定量を施行し、冠動脈 CT によるプラーク解析との対比検討を行っている。ここまで TNF- $\alpha$  および IL-6 の mRNA 発現レベルと冠動脈石灰化および非石灰化プラークの関連性を検討しており、特に TNF- $\alpha$  が冠動脈硬化症進展に関わるキーサイトカインであることを示唆する結果を得ている（論文投稿準備中）。

当初、心臓画像診断として心臓 MRI と FDG PET の活用を予定していたが、異常信号を呈する症例が少数に留まることや冠動脈信号の

特異的評価が困難であることから、研究項目から除外した。新たに冠動脈病変に特異性の高いトレーサー（フッ化ナトリウム）を用いた検討を開始しており、冠動脈プラークへの集積に関するデータの収集を進めている。

#### 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 4 件)

1. Kitagawa T, Yamamoto H, Sentani K, Takahashi S, Tsushima H, Senoo A, Yasui W, Sueda T, Kihara Y. Data set for volumetric and pathological findings of epicardial adipose tissue. Data Brief. 2015; 5: 337-41. 査読有
2. Kitagawa T, Yamamoto H, Sentani K, Takahashi S, Tsushima H, Senoo A, Yasui W, Sueda T, Kihara Y. The relationship between inflammation and neoangiogenesis of epicardial adipose tissue and coronary atherosclerosis based on computed tomography analysis. Atherosclerosis. 2015; 15: 293-9. 査読有
3. Yamamoto H, Kitagawa T, Kunita E, Tsushima H, Tatsugami F, Awai K, Kihara Y. Accumulation of epicardial adipose tissue increases coronary morbidity in non-obese patients with suspected coronary artery disease. IJC Metabolic and Endocrine. 2015; 8: 7-12. 査読有
4. Tsushima H, Yamamoto H, Kitagawa T, Urabe Y, Tatsugami F, Awai K, Kihara Y. Association of epicardial and abdominal visceral adipose tissue with coronary atherosclerosis in patients with a coronary artery calcium score of zero. Circ J. 2015; 79: 1084-91. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Kitagawa T, Yamamoto H, Senoo A, Kihara Y. Significance of Focally Increased  $^{18}\text{F}$ -Sodium Fluoride Activity in Identifying High-Risk Coronary Plaques in Combination with Computed Tomography Angiography. The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2017年3月17 - 19日, 石川県立音楽堂(石川県、金沢)
2. Kitagawa T, Senoo A, Takahashi S, Yamamoto H, Sueda T, Kihara Y. Contribution of Inflammatory Cytokines in Epicardial Adipose Tissue to Coronary Atherosclerosis Progression Based on Computed Tomography Analysis. The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2017年3月17 - 19日, 石川県立音楽堂(石川県、金沢)

3. Senoo A, Kitagawa T, Yamamoto H, Takahashi S, Kubo Y, Sueda T, Kihara Y. Impact of Pathological Features of Epicardial Adipose Tissue on Coronary Plaque Characteristics Verified on Computed Tomography Angiography. The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2017年3月17 - 19日, 石川県立音楽堂(石川県、金沢)
4. Kitagawa T, Yamamoto H, Toshimitsu S, Sasaki Ko, Senoo A, Hirokawa Y, Kihara Y. <sup>18</sup>F-Sodium Fluoride Positron Emission Tomography for Molecular Imaging of Coronary Atherosclerosis Based on Computed Tomography Analysis. American Heart Association Scientific Sessions 2016. 2016 Nov 12-16, Ernest N, Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana, USA
5. Kitagawa T, Yamamoto H, Senoo A, Kihara Y. <sup>18</sup>F-Sodium Fluoride Positron Emission Tomography for Molecular Imaging of Coronary Atherosclerosis Detected by Computed Tomography. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2016年3月18 - 20日, 仙台国際センター(宮城県、仙台)
6. Kitagawa T, Yamamoto H, Tsushima H, Senoo A, Sentani K, Yasui W, Kihara Y. Significance of Inflammation and Neovascularization of Epicardial Adipose Tissue on Coronary Atherosclerosis Based on Computed Tomography Analysis. American Heart Association Scientific Sessions 2015. 2015 Nov 7-11, Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA
7. 北川知郎、對馬浩、山本秀也、木原康樹、仙谷和弘、安井弥、'心外膜下脂肪組織の病理学的性状とCT画像における冠動脈硬化症との関連性'第112回日本内科学会講演会、2015年4月10日-12日、みやこめっせ(京都府、京都)
8. Kitagawa T, Tsushima H, Yamamoto H, Kihara Y. Relation of inflammation and neovascularization of epicardial adipose tissue to coronary atherosclerosis based on computed tomography analysis. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2015年4月24 - 26日, リーガロイヤルホテル大阪(大阪府、大阪)

〔図書〕(計2件)

1. 北川知郎、宇都宮裕人、山本秀也、木原康樹、(株)メジカルビュー社、Heart View、Vol. 18 No. 9、(特集)長寿社会に求められる弁膜症治療、Expertise 一步踏み込んだ画像モダリティの活用方法、2014、38(922)-44(928)

2. 北川知郎、(株)メジカルビュー社、Heart View、Vol. 21 No. 3、(特集)CT、MRIを上手に循環器診療で使いこなせ!、CTによる急性冠症候群の診断と予測は可能か?、2017、34(258)-40(264)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 知郎(KITAGAWA TOSHIRO)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号: 70633709

(2)研究分担者 なし

( )

(3)連携研究者 なし

( )