

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461067

研究課題名(和文) 脂肪の炎症が近接臓器および脂肪由来幹細胞の質に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of inflammation of human cardiac adipose tissue on cardiomyocytes or on adipose-derived stem cells

研究代表者

天野 篤 (AMANO, Atsushi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70338440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：局所脂肪は隣接臓器の状態を反映するとともにその臓器にも影響を及ぼすことが示唆されている。本研究では動脈硬化性疾患の代表である虚血性心疾患に対する手術の際に皮下脂肪、冠動脈周囲および内胸動脈周囲の3か所の脂肪を採取し解析、脂肪の質にどのような差があるのか検討を行った。一部の炎症性サイトカインや炎症性マクロファージの発現は冠動脈周囲で最も高く、皮下で最も低かった。一方で血管新生関連因子は内胸動脈周囲で最も高かった。線維化マーカーは冠動脈周囲の発現が最も高く、コラーゲンは皮下脂肪で最多であった。このように皮下脂肪と血管周囲脂肪、さらにはその血管の状態により異なる脂肪のプロファイルを示していた。

研究成果の概要(英文)：It has been proved that there is interaction between vessel and peripheral adipose tissue. In this study, we investigated the differences in quality of adipose tissue among subdermal (SD), around internal mammalian artery (IMA), and coronary artery (CA) in the patient with ischemic heart disease which is deeply associated with artery sclerotic disease. The adipose tissues were obtained during coronary artery grafting surgery. Expression of inflammation-related cytokines was the highest in CA, and the lowest in SD. Expression of angiogenesis-related cytokines was the highest in IMA. Expression of fibrosis-related cytokines was the highest in SD. These results indicated that adipose tissue may have different role depend on its location.

研究分野：心臓血管外科

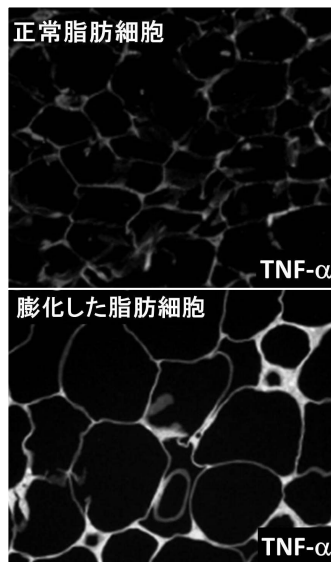
キーワード：臓器周囲脂肪 炎症 アディポサイトカイン

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は間質を埋めるための余剰組織であり、過剰摂取したカロリーを脂肪分として貯蓄するのみのものと考えられてきた。しかしながら近年の研究から、脂肪はサイトカインやホルモンを放出する内分泌臓器であること、さらにその質は均一ではなく、部位や病態によって異なることなどが明らかになってきた。また最近では、臓器とそれに近接する脂肪との関係、特に脂肪の炎症が臓器へ大きな影響を与えることがわかってきた。例えば非アルコール性脂肪性肝障害 (NASH/NAFLD) においては、その病態や進展には、BMI で表わされる全身の肥満度よりも肝臓周囲に存在する内臓脂肪がより深く関与している可能性が示されており、また膨化した脂肪細胞が TNF- α など多くの炎症

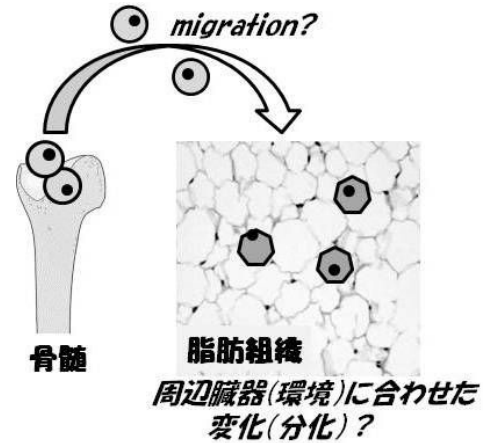
サイトカインを放出し(右図)、

それが NASH の進展因子とな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ており、これらのことから、脂肪はその部位や隣接臓器とお互いに影響し合っており、脂肪の質を調べることによりその標的臓器の病態が把握できる可能性を示唆している。しかしながら臓器への影響は直接臓器に接している脂肪のみなのか、それともやや離れた部位の脂肪も影響を及ぼしているのか、もしそうであればどの程度寄与しているのかなど、炎症と距離との相関等はあまり明らかになっていない。

近年、脂肪組織内にも幹細胞が存在することが明らかになった。これは脂肪幹細胞 (ASCs) と呼ばれ、心筋を含む様々な組織に分化することが報告され注目されている。脂肪幹細胞を用いた細胞治療は採取することによる侵襲が少なく、脂肪組織に比較的



く含まれていること、かつ脂肪自体が豊富に存在するなどの利点があり、新たな細胞治療のソースとして注目されている。

この ASCs は骨髄由来幹細胞 (BMSCs) と同じ間葉系幹細胞であるがその表面マーカーが BMSC とは一部異なることがわかっている。この理由の1つとして、骨髄由来の幹細胞がそれぞれの組織に移動した後に周辺臓器の影響を受けて変化する可能性が考えられている。

これらのことは脂肪に含まれる幹細胞においても全身的に均一ではなく、周辺組織の状態によって修飾されている可能性を強く示唆している。とくに心臓においては、心筋細胞そのものが利尿ホルモンの分泌機構を持つものの、その他の周辺臓器の影響はあまり受けにくいことから、近接する脂肪の影響がより強いことが予想される。

2. 研究の目的

今回の研究の1つ目の目的として、心臓近辺の最も大きな内分泌組織である心外膜周囲脂肪が、心臓に及ぼす影響を検討することにある。近年になり脂肪が炎症と深く関与しており、脂肪の部位やその組織学的状態によ

ても炎症におよぼす影響に差異があることが明らかになってきているが、現在までの検討の多くは主に脂肪「細胞」の炎症に焦点が当てられていた。これは、局所の炎症の研究においては妥当であるものの、脂肪組織全体の合算としての炎症が臓器（心臓）におよぼす影響についての検討は不十分であった。今回我々は、脂肪に加えて、適合症例では心筋組織を採取、心筋細胞の炎症にどの程度寄与しているかを検討する。さらに心臓が炎症の影響を受ける病態の1つに不整脈があるが、術後不整脈の発生に、心外膜脂肪からの炎症がどの程度関与しているかなどの検討はこれまでまったくなされておらず、非常に独創的であると考えている。

2つ目の目的として冠動脈バイパス手術時において内胸動脈を剥離する際に採取される内胸動脈周囲脂肪の検討も行う予定である。これまでの経験や報告から動脈硬化性変化がたとえ全身性に及んでいても、内胸動脈にはその影響がほとんど波及しないことが知られている。今回の検討で特に注目しているのはこの内胸動脈周囲脂肪と、冠動脈疾患を持っている患者のその周辺脂肪から培養される脂肪幹細胞の質に違いが生じるかどうかという点である。

3. 研究の方法

開心術症例のうち、脂肪採取の同意が得られた症例を対象とした。また再手術および過去に放射線療法の既往がある症例は除外した。皮切を行い、胸骨切除後に皮下脂肪を採取。次いで心膜切開時に心外膜脂肪を採取。さらに心膜切開後に左冠動脈主幹部周囲の心臓表面脂肪を採取した。また内胸動脈をグラフトとして使用する冠動脈バイパス症例であれば、内胸動脈周囲の脂肪を採取した。採取した脂肪組織をまず約50mgを切り出しRNA保存液内に入れた。次いで組織を約1cm切り出し、4%パラホルムアルデヒドに入れ固

定、組織切片用とするとともに、残りは冷生食内に浸し保存した。

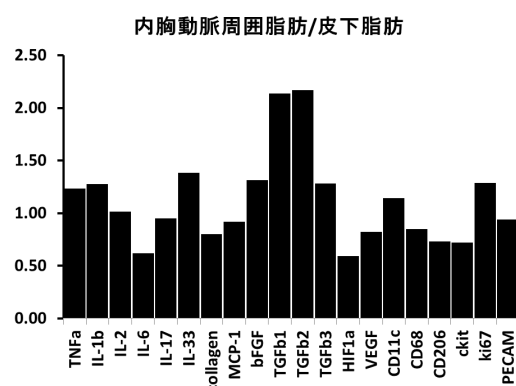
RNA保存液のサンプルよりキットを用いてmRNAを抽出、次いでcDNAを作成、2ステップのRT-PCRを行った。RNA抽出は皮下脂肪、心嚢周囲脂肪および心臓周囲脂肪の3か所がすべて揃っているもので行い、内胸動脈周囲脂肪があるものはそれも合わせてRNAの抽出を行った。標的遺伝子は炎症性サイトカインであるIL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10、IL-17、IL-33、線維化関連遺伝子であるType 1-Collagen、bFGF、TGF β 1、 β 2、 β 3、マクロファージ関連遺伝子であるMCP-1、MCP-2、CD68、CD11c、CD206、またHIF1 α 、Ki67、PECAMおよびVEGF α とした。これらの遺伝子を患者疾患別および部位別に分類した。

4. 研究成果

脂肪採取を行った313症例のうち、皮下・心嚢・心臓周囲の3か所すべて揃って採取されたものは164例であった。まずはこれらの症例において検討を行った。平均年齢は69.0歳、女性は54例(32.9%)、平均体重61.1kgでBMIは23.5であった。術前合併症として高血圧が107例(65.2%)、高脂血症76例(46.3%)、糖尿病59例(36.0%)、腎機能障害35例(21.3%)、うち血液透析8例(4.9%)であった。また99例(60.4%)に喫煙歴を認めた。行った手術別の分類では重複手術も含めて、虚血性心疾患176(46.3%)、弁膜症97例(59.1%)、胸部大動脈瘤1(0.6%)、心臓腫瘍4例(2.4%)であった。また18例(11.0%)で術前の心房細動を認めた。術前の心機能は平均左室駆出率=60.5%、平均左室拡張末期径=49.2mm、平均左室収縮末期径34.9mm、心室中隔厚=10.7mm、左室後壁厚=10.7mmだった。術前の平均NYHAは1.73で、NYHA度が10例、度が1例であった。術前の採血検査では総コレステロール170

mg/dL、HDL コレステロール 49 mg/dL、LDL コレステロール 98 mg/dL、中性脂肪 120 mg/dL であった。平均BNPは186 pg/dL であった。まずは虚血性心疾患に伴う冠動脈バイパス術における検討を行った。組織解析全体の比較において、炎症性サイトカインであるTNF α およびIL-1 β およびIL-33はそれぞれ皮下脂肪での発現に比べて冠動脈周囲脂肪で有意に高く (TNF α : 1.24 倍, IL-1 β : 1.28 倍, IL-33: 1.38 倍) 一方でIL-2 (1.01 倍) とその発現に有意差は認めず、IL-6 は0.62 倍と逆に有意に発現が低下していた。マクロファージのマーカーではそれぞれM1、M2 マクロファージのマーカーであるCD68/CD206 の比は冠動脈周囲で最も高く (0.48 倍) 皮下で最も低かった (0.35 倍) が有意差は認めなかった。血管新生マーカーであるVEGFは内胸動脈周囲で最も多く発現していた (皮下: 7.7 倍、心臓周囲: 9.4 倍、内胸動脈周囲: 10.2 倍, vs. GAPDH) 。線維化マーカーのうちbFGF, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3はそれぞれ1.31 倍、2.14 倍、2.17 倍および1.28 倍と冠動脈周囲の発現が最も高かったが、コラーゲンそのものは皮下脂肪で最も発現が上昇していた。次いで、同一患者内で比較検討を行った。TNF α およびIL-17 およびIL-33は冠動脈周囲で発現が高かったが (TNF α : 1.33 倍, IL-17: 1.05 倍, IL-33: 1.42 倍) IL-1 β は1.25 倍と高い傾向は認められたものの有意差はなかった。またbFGF, TGF β 1, TGF β 2はそれぞれ1.41 倍、2.26 倍、2.45 倍と同様に冠動脈周囲で発現が高かったが、TGF β 3の発現には1.31 倍と高い傾向は認められたものの有意差はなかった。さらに同一患者内での比較ではコラーゲンも1.01 と併せて上昇しており線維化の進行が認められた。これらのことから皮下脂肪と血管周囲脂肪とでは脂肪から放出されるサイトカインは異なり、さらに同じ血管周囲の脂肪であっても内胸動脈と冠動脈周囲脂肪で

異なる脂肪のプロファイルであることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Yokoyama Y, Matsushita S, Iesaki T, Yamamoto T, Inaba H, Okada T, Amano A: Denervation of gastroepiploic artery graft can reduce vasospasm. J Thorac Cardiovasc Surg. 47(3):951-5, 2014 (査読あり)
2. 桑木賢次, 松下訓, 佐藤充, 天野篤. 脂肪細胞から放出される炎症性サイトカインの性差. 順天堂大学ハイテク・リサーチ・センター環境医学研究所紀要. 2014, 32 (査読なし)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(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

山本 平 (YAMAMOTO, Taira)
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号: 70401504

稲葉 博隆 (INABA, Hiroataka)
 順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10511454

桑木 賢次 (KUWAKI, Kenji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90398313