

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19658

研究課題名（和文）心外膜脂肪の線維化を検出し心房細動ハイリスク患者を同定するCT画像診断法

研究課題名（英文）CT imaging to detect fibrosis in epicardial fat and identify patients at high risk for atrial fibrillation

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：SGLT2分子が脂肪組織の間質に存在する間葉系幹細胞（＝脂肪前駆細胞）で発現しており、脂肪細胞への分化に伴ってその発現量が減少することを見出した。EAT検体から抽出した脂肪前駆細胞をSGLT2阻害薬投与下に分化させ、実験を行った（n=92）。Empagliflozinを投与しながら脂肪前駆細胞に分化誘導を行うと、脂肪分化に関わるPPAR $\alpha$ やCABPAの発現に影響は無かったが、脂肪成熟マーカーであるFABP4は発現が低下し、形成される脂肪滴の量も減少した。また、いくつかの炎症性サイトカイン遺伝子についても抑制が見受けられ、共培養実験では傍分泌効果を介して与える心筋細胞の酸化ストレスが軽減された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はSGLT2阻害薬が脂肪前駆細胞に作用して脂肪成熟を抑制することを示した。これまでに臨床所見として報告されているEAT量の減少効果は、脂肪組織のターンオーバーを遅延させることで生じている可能性がある。また、本研究によってSGLT2阻害薬は脂肪細胞における炎症性を改善し、隣接する心筋の酸化ストレスを軽減させることも明らかとなった。臨床で認められているSGLT2阻害薬のEAT減少効果を解明した点で学術的意義がある。SGLT2阻害薬は既に市販されており、今後EATの量を減らし質を改善する薬剤として有効である可能性を示した点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We found that SGLT2 molecules are expressed in mesenchymal stem cells in the stroma of adipose tissue (= preadipocytes) and that their expression decreases as they differentiate into adipocytes. When adipogenic progenitor cells were induced to differentiate while treated with empagliflozin, the expression of PPAR $\alpha$  and CABPA, which are involved in adipogenesis, was not affected, but the expression of FABP4, a marker of adipogenesis, was decreased, and the amount of fat droplets formed was also reduced. In addition, several inflammatory cytokine genes were also suppressed, and oxidative stress in cardiomyocytes given via paracrine effects was reduced in the co-culture experiments.

研究分野：循環器内科

キーワード：心外膜脂肪

## 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)は心臓に直接付着する内臓脂肪の一種であり、内分泌機能として炎症性サイトカインを放出し、隣接する心筋の収縮能低下や線維化を惹起する可能性が報告されている。近年、大規模臨床試験によって SGLT2 阻害薬の心不全に対する有効性が認められるようになったが、その理由の一つに EAT の抑制が推測されており、実際に同薬投与患者では EAT の量が有意に減少することも知られている。しかし、この EAT に関連する心保護効果の詳細な機序は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

我々は脂肪細胞の分化/成熟メカニズムに焦点を当て、今回、SGLT2 阻害薬が EAT に与える影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

大分大学医学部循環器内科・臨床検査診断学講座では大分大学医学部附属病院心臓血管外科と共同で開胸手術患者の余剰な EAT を保存するバイオバンク計画に取り組んでいる。我々はまず最初に SGLT2 分子が脂肪組織の間質に存在する間葉系幹細胞(=脂肪前駆細胞)で発現しており、脂肪細胞への分化に伴ってその発現量が減少することを見出した。この点に着目し、EAT 検体から抽出した脂肪前駆細胞を SGLT2 阻害薬投与下に分化させ、実験を行った(n=92)。評価として脂肪滴形成と脂肪関連遺伝子、および炎症性サイトカインの発現変動をそれぞれ定量的に測定した。また、iPS 細胞由来心筋細胞との共培養システムを用いることで、心筋側へ与える酸化ストレスを観察した。さらに SGLT2 阻害薬内服患者とそれ以外の糖尿病治療薬(主に DPP4 阻害薬)内服患者で EAT 中の炎症性サイトカイン発現量を比較し、その高低によって心不全マーカーである血中 NT-proBNP に差が生じているのかを検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト EAT における SGLT2 の発現

SGLT2 の発現は、25 人の患者から採取したヒト EAT サンプルを用いて、SGLT2 の免疫蛍光染色により評価した。SGLT2 はヒト EAT に豊富に発現していた。EAT における SGLT2 遺伝子発現レベルとグリコシル化ヘモグロビンレベルとの間には有意な関連は認められず( $rP = 0.041$ ,  $P = 0.84$ )。SGLT2 発現は糖尿病の状態に影響されない可能性が示された。間葉系間質細胞のマーカーである CD105 と SGLT2 の二重免疫蛍光染色により、我々の研究で前脂肪細胞と定義された CD105 陽性細胞がヒト EAT で主に SGLT2 を発現していることが明らかになった。さらに、EAT から単離したヒト初代培養前脂肪細胞における SGLT2 遺伝子発現の変化を調べた。興味深いことに、前駆脂肪細胞における SGLT2 の発現は、前駆脂肪細胞が分化するにつれて減少した。SGLT2 および CD105 の蛍光強度は、補正された全細胞蛍光として計算され、分化した脂肪細胞において減少した。分化脂肪細胞における SGLT2 の遺伝子発現レベルの低下は、qPCR を用いて確認された。一方、分化誘導のない前駆脂肪細胞では、SGLT2 の時間経過に依存した発現低下は観察されなかった。次に、脂肪細胞が EAT 脂肪細胞の特徴を有するかどうかを確認するために、PLIN2 と UCP1 の発現レベルを評価した。PLIN2 および UCP1 のメッセンジャーRNA (mRNA) 発現レベルは、前脂肪細胞と比較して分化脂肪細胞で上昇した。前駆脂肪細胞および分化脂肪細胞における SGLT1、SGLT4、SGLT5 および SGLT6 の発現レベルを調べた。その結果、分化脂肪細胞では、SGLT1、SGLT4、SGLT5、SGLT6 の発現レベルは有意に低下していなかった。

#### (2) ヒト EAT 由来脂肪前駆細胞の分化/成熟に対する Empagliflozin の直接効果

まず、前駆脂肪細胞の増殖に対するエンパグリフロジンの影響を評価し、エンパグリフロジンの細胞に対する無毒性を確認したところ、用量依存的な細胞毒性は認められなかった。また、前駆脂肪細胞における CD105 の発現はエンパグリフロジンの影響を受けなかった。次に、ヒト前駆脂肪細胞の分化および成熟に対するエンパグリフロジンの影響をオイルレッド O 染色を用いて検討した。エンパグリフロジン(10  $\mu\text{mol/L}$  および 100  $\mu\text{mol/L}$ )とインキュベートした前駆脂肪細胞は、十分な分化誘導にもかかわらず、用量依存的に分化不良を示した; 0  $\mu\text{mol/L}$  をコントロールとして用いた。100  $\mu\text{mol/L}$  エンパグリフロジンとインキュベートした場合、脂質滴数は有意に減少せず、脂質滴の大きさはコントロールと比較して有意に小さかった。脂肪分化関連遺伝子(PPAR、CEBPA、FABP4)の発現を qPCR で評価した。PPAR および CEBPA の発現量は、エンパグリフロジンとのインキュベーションにより有意な影響を受けなかった。しかし、最終分化/成熟マーカーである FABP4 は、エンパグリフロジンとのインキュベーションにより有意に抑制された。FABP4 mRNA 発現は、SGLT2 阻害薬投与中のヒト EAT では、他の抗糖尿病薬投与中よりも有意に低値であった。

(3) ヒト EAT 由来脂肪前駆細胞のアディポカイン遺伝子発現に対する Empagliflozin の直接効果

エンパグリフロジンとインキュベートしたヒト EAT 由来分化脂肪細胞における数種のアディポサイトカインの遺伝子発現量を qPCR により検討した。分化前にエンパグリフロジン( 10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ ) とインキュベートした脂肪細胞は、IL1、IL1、IL6、TGF-1、MCP1 の用量依存的なダウンレギュレーションを示した。しかし、TNF、IL10、LEP および ADIPOQ は影響を受けなかった。一方、分化後の脂肪細胞にエンパグリフロジン( 10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ ) をインキュベートした場合、IL1、IL1、IL6、TGF-1、MCP1 の有意な遺伝子発現低下は認められず、エンパグリフロジンは前駆脂肪細胞に発現する SGLT2 を介して効果を発揮することが示された。さらに、FABP4 発現はエンパグリフロジンとのインキュベーション後分化後も低下しなかった。IL-1、IL-1、IL-6、TGF-1 および MCP-1 の実際の分泌タンパク質レベルを測定するために、上清を酵素結合免疫吸着法を用いて評価した。このうち、IL-6 と MCP-1 のタンパク質レベルは、用量依存的に有意に低下した。より低濃度のエンパグリフロジンとのインキュベーションが、未熟/成熟脂肪細胞に対して効果を発揮するか否かを確認するため、1  $\mu\text{mol/L}$  および 5  $\mu\text{mol/L}$  のエンパグリフロジンを用いた試験を行った。5  $\mu\text{mol/L}$  のエンパグリフロジンとのインキュベーションは、IL-6、MCP-1 および FABP4 の mRNA 発現を有意に減少させた。

#### (4) ヒト EAT 由来脂肪前駆細胞とヒト iPS 心筋細胞との共培養

エンパグリフロジンで処理したヒト心外膜脂肪細胞とヒト iPS-ACM を 48 時間共培養した。酸化的蛍光マイクロトポグラフィーの結果、100  $\mu\text{mol/L}$  エンパグリフロジン処理脂肪細胞との共培養は、CellROX キットを用いて評価した蛍光強度を有意に減少させ、ヒト iPS-ACM における全ての活性酸素種が抑制されていることが明らかとなった。Lucigenin-enhanced chemiluminescence は、エンパグリフロジン処理脂肪細胞との共培養が、用量依存的に基礎活性酸素および NADPH 刺激活性酸素の発生を抑制することも示した。さらに、心筋細胞ストレスの一般的なマーカーであるナトリウム利尿ペプチド A(NPPA) とナトリウム利尿ペプチド B(NPPB) の mRNA レベルが変化したかどうかを調べた。NPPA および NPPB 遺伝子発現レベルは、用量依存的に抑制された。さらに、iPS-ACM との共培養が脂肪細胞のセクレトームプロファイルに影響を与えるかどうかを、iPS-ACM との共培養処理の有無にかかわらず、脂肪細胞の上清中の IL6 タンパク質レベルを測定することによって調べた。2 群間に有意差はなかった。心筋細胞との共培養後の成熟脂肪細胞の形態と脂質含量も評価したが、これらに変化はなかった。

#### (5) IL-6 および MCP-1 の効果の臨床での検証

最後に、研究 1 で得られた知見の妥当性を臨床的観点から検証した。まず、EAT における IL6 の遺伝子発現レベルは、SGLT2 阻害薬を投与した糖尿病患者では、投与していない糖尿病患者に比べて有意に低下していたが、MCP1 の発現は有意に低下していなかった。これらの所見と一致して、EAT の IL6 mRNA レベルのみが、心房細動のない患者と比較して、心房細動患者で有意に増加した。EAT における IL6 発現は、MCP1 発現ではなく、壁伸展マーカーおよび N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチドとも強く相関していた。ヒト iPS-ACM を組換え IL-6 とインキュベートすると、ルミノメトリーを用いて測定した O2- がコントロールと比較して増加することが検証された。

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 2件）

1. 著者名 Takahashi Naohiko, Abe Ichitaro, Kira Shintaro, Ishii Yumi	4. 巻 39
2. 論文標題 Role of epicardial adipose tissue in human atrial fibrillation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Arrhythmia	6. 最初と最後の頁 93 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/joa3.12825	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 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.hroo.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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahashi N
2. 発表標題 Qualitative alteration of Epicardial adipose tissue and Atrial myocardial fibrosis as a substrate of Atrial fibrillation
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ishii Y, Abe I, harada T, Takano M, Kira S, Kondo H, Teshima Y, yufu K, Nakagawa M, Shimada T, Miyamoto S, Takahashi N.
2. 発表標題 Detecting Fibrotic Remodeling of Epicardial Adipose Tissue in Patients with Atrial Fibrillation
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会 3.26-28, 2021. 横浜web (国際学会)
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
---------	---------