様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １８ 日現在

機関番号：１０１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０８１９７

研究課題名（和文）心房細動の病態進行における心臓周囲脂肪ミトコンドリア機能の役割

研究課題名（英文）Role of mitochondrial respiratory function of the epicardial addipose tissue for atrial fibrillation

研究代表者
渡邉　昌也（Watanabe, Masaya）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：４０６３２０４７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：53例の患者から心外膜脂肪組織の採取と臨床情報収集を行った。研究当初の仮説通り、ミトコンドリア酸素消費量を中央値で分けた２群間での心房リモデリング指標、術後の房細動発生率に有意な差を見いだせなかった。 心外膜脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインの分泌量を免疫抗体法で測定し、脂肪組織重量あたりのミトコンドリア呼吸能との相関について評価した。ミトコンドリア呼吸能とMCP1、アディポネクチンの発現量に正の相関を認めた。一方、ミトコンドリア呼吸能と組織学評価による脂肪細胞の断面積には強い負の相関を認めたことから、組織あたりの脂肪細胞数とミトコンドリア呼吸能が相関することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
心臓周囲脂肪におけるミトコンドリア呼吸能が脂肪組織の形態変化や分泌機能にどのように影響するかについて、新たな知見を得ることができた。研究成果により、心房細動基質と心外膜脂肪組織との関連についての知見を加えることができた。
また、術後心房細動の発生率やその発生に関わる患者因子についても知見を加えることができた。

研究成果の概要（英文）：Epicardial adipose tissue samples and clinical data were collected from 53 patients. As initially hypothesized, no significant differences were observed in atrial remodeling markers or postoperative atrial fibrillation incidence between groups divided by the median of mitochondrial oxygen consumption. Adipocytokine secretion from epicardial adipose tissue was measured using immunoassays, and correlations with mitochondrial respiration per tissue weight were evaluated. Mitochondrial respiration showed a positive correlation with MCP1 and adiponectin levels. Conversely, a strong negative correlation was observed between mitochondrial respiration and adipocyte cross-sectional area, suggesting an association between mitochondrial function and adipocyte density within the tissue.

研究分野：循環器病学

キーワード：心外膜脂肪　心房細動　ミトコンドリア呼吸能

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

(1) 心房細動は最も頻度の多い不整脈であり，脳卒中，心不全および死亡のリスクとなる。カテーテルアブレーションは病初期の発作性心房細動に有効である一方、持続した心房細動への適切な治療法は未だ確率されておらず、心房細動の発症機序の解明と予防治療は重要な研究課題である。

(2) 心房細動の発生につながる電気的リモデリングとして、不応期の短縮や伝導遅延が知られている。我々も、糖尿病心において線維化の亢進が伝導遅延を促し、線維化領域の周辺ではリエントリーと呼ばれる興奮の旋回が起こり易いことを明らかにした。しかし、疫学的に分かっている様々な心房細動のリスクが、どのような分子生物的機序によって電気生理的変化をもたらすかは十分解明されていない。

(3) 近年、心臓周囲脂肪（EAT; epicardial adipose tissue）と循環器疾患との関連性が示唆されており、EATの過剰な蓄積と心房細動との関連についても報告が散見される。内臓、筋内、心血管周囲などに蓄積する異所性脂肪の過剰な蓄積は、酸化ストレスや炎症を惹起し、周辺臓器を直接、間接的に傷害する。これまでに、EATの過剰な蓄積が心房への脂肪浸潤や炎症による線維化を惹起し、心房細動の発症に関与することが報告されているが(*J Am Coll Cardiol 2020*)、EATの量的変化のみでリモデリングが惹起されるとは考えにくく、脂肪細胞の質的変化も関与していると推測される。

(4) ミトコンドリアはエネルギー産生を担う細胞小器官であり、動物実験では脂肪組織のミトコンドリア機能低下が脂肪細胞の分泌プロファイルを変化させることも報告されている(*FEBS J 2013*)。冠動脈疾患においてEATミトコンドリア機能が低下しており、EATミトコンドリア機能の低下が動脈硬化の進展に関わることを示唆している。心房細動においても、EATミトコンドリア機能の低下は、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインや活性酸素種(ROS）の産生を変化させ、心筋細胞、繊維芽細胞の変性や炎症細胞の遊走を促し、心房細動の発症に繋がる電気的、構造的リモデリングを惹起する可能性がある。このような背景から、申請者は「EATミトコンドリア機能低下は、EATのアディポサイトカインの分泌異常やROSの産生増加によって、心房細動基質を進展させる」という仮説を立てた。

２．研究の目的

本研究の目的は、心房細動基質の進展におけるEATの質的変化に着目し、EATミトコンドリア機能の低下がアディポサイトカインの分泌やROSの産生、更には心房細動器質の進展に影響するのか明らかにすることである。

３．研究の方法

(1) 対象患者：北海道大学病院において開胸心臓術が予定されている洞調律の患者。

(2) 研究スケジュール：術前に患者同意を取得し、術前検査を施行する。開心術にてEATを採取した後、各種検査項目の測定を実施する。EATミトコンドリア機能低下は、

最大酸化的リン酸化能（maximal OXPHOS capacity）の中央値以下の患者と定義し、2群比較を行う。EATミトコンドリア機能と解析項目の相関性も解析する。

(3) 検査および観察項目

① 患者情報と臨床的な心房リモデリング指標の取得

病歴（高血圧・糖尿病などの罹患歴および服薬状況など）、身体所見（身長・体重・BMIなど）、血液検査所見、心電図（P波高値、P波持続時間、PQ時間など）、心エコー図（左房径、左房容積、左房容積係数、左房収縮率など）などの診療情報を手術前に取得する。

② EAT蓄積量、分布の計測

手術前のCTを用いて、専用の解析ソフトでEAT蓄積量と分布（右房、左房、心房中隔）について計測する。

③ EATの組織学的評価

脂肪滴のサイズ、電子顕微鏡での脂肪ミトコンドリアの形態、サイズなどを評価する。脂肪組織の線維化（マッソン・トリクローム染色）、マクロファージの浸潤（CD11、CD68の免疫染色）についても評価する。

④ EATミトコンドリア機能解析と酸化ストレス測定

ミトコンドリア酸化リン酸化能（OXPHOS）：ジギトニン処理により脂肪組織（約50 mg）の細胞膜を透過化した後、高感度ミトコンドリア呼吸能解析装置 （Oxygraph-2k, OROBOROS社）を用いて、詳細なミトコンドリアOXPHOSを測定する。

ミトコンドリア酵素活性測定：ミトコンドリアマトリックスに存在するクエン酸合成酵素 （CS）活性および脂肪酸 β 酸化に関わるHAD酵素活性を測定する。

ミトコンドリア生合成に関わる遺伝子発現量の測定：ミトコンドリア生合成に関わるPGC-1・NRF・TFAMなどの遺伝子発現量を測定する。脱共役蛋白UCP1は、褐色脂肪細胞でエネルギーをATPに合成することなく熱として放散させる分子として知られる。UCP1蛋白の発現低下と心血管病との関連が報告されており（*Circulation 2012*）、UCP1の遺伝子発現についても測定する。

EATにおける酸化ストレス測定：Oxygraph-2kに付属する蛍光吸光度計を用いて、脂肪組織ミトコンドリア酸化リン酸化能とともに各条件でのミトコンドリア由来の ROS 産生量を蛍光色素Amplex Ultraredを使ってリアルタイムに測定する。さらに、酸化ダメージの指標として、脂肪組織の過酸化脂質 （TBARS）の量を測定する。

⑤ EATにおけるアディポサイトカインの遺伝子発現、蛋白発現量の測定

脂肪細胞の分泌プロファイルを評価するため、TNFα、IL-1β、IL6、MCP-1などの炎症性サイトカイン、増殖因子、アディポネクチンの遺伝子発現量、および、蛋白発現量を測定する。

４．研究成果

53例の患者から心外膜脂肪組織の検体採取と臨床情報（心電図指標、CTでの心外膜脂肪組織容積、心エコーでの心房径、心房収縮能、組織ドップラー）収集を行った。脂肪組織のミトコンドリア呼吸能は全例で行うことができ、O2 consumption、呼吸調節率に対象患者集団内の分散を確認した。研究当初の仮説通り、O2 consumption を中央値で２分した二群間での心房リモデリングの指標として左房径、左房収縮指標、心電図における心房伝導遅延指標、開心術後の心房細動発生率について比較したが、有意な差を

見いだせなかった。

心外膜脂肪組織から分泌される炎症性サイトカイン、アディポカインなどの蛋白分泌量を免疫抗体法で測定し、脂肪組織重量あたりのミトコンドリア呼吸能との相関について評価した。ミトコンドリア呼吸能と MCP1、アディポネクチンの発現量に正の相関を認めた。研究開始時の予想としては、炎症を惹起する MCP1 はミトコンドリア呼吸能と負の相関を示すことを予想しており、予想に反する結果であった。一方、ミトコンドリア呼吸能と組織学評価による脂肪細胞の断面積には強い負の相関を認めたことから、組織あたりの脂肪細胞数とミトコンドリア呼吸能が相関することが示唆された。

多重回帰分析を行い、術後心房細動の予測因子を検討したところ、脂肪細胞のサイズ、心外膜組織中の TNFa 遺伝子発現が術後心房細動の発生に関連することが分かった。この結果をもとに、脂肪細胞サイズの大小、TNFa 発現の多少で分類したところ、特徴的な患者背景を明らかにすることができた。また、ミトコンドリア呼吸能と脂肪サイズ、アディポネクチンの分泌量と相関することを明らかにした。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4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 Koizumi Takuya、Watanabe Masaya、Yokota Takashi、Tsuda Masumi、Handa Haruka、Koya Jiro、Nishino Kotaro、Tatsuta Daishiro、Natsui Hiroyuki、Kadosaka Takahide、Koya Taro、Nakao Motoki、Hagiwara Hikaru、Kamada Rui、Temma Taro、Tanaka Shinya、Anzai Toshihisa	４．巻 10
２．論文標題 Empagliflozin suppresses mitochondrial reactive oxygen species generation and mitigates the inducibility of atrial fibrillation in diabetic rats	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	６．最初と最後の頁 10:1005408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2023.1005408	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 Nakao Motoki、Watanabe Masaya、Miquerol Lucile、Natsui Hiroyuki、Koizumi Takuya、Kadosaka Takahide、Koya Taro、Hagiwara Hikaru、Kamada Rui、Temma Taro、de Vries Antoine A.F.、Anzai Toshihisa	４．巻 178
２．論文標題 Optogenetic termination of atrial tachyarrhythmias by brief pulsed light stimulation	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	６．最初と最後の頁 9～21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2023.03.006	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 －

１．著者名 Natsui Hiroyuki、Watanabe Masaya、Yokota Takashi、et al.	４．巻 12
２．論文標題 Influence of epicardial adipose tissue inflammation and adipocyte size on postoperative atrial fibrillation in patients after cardiovascular surgery	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Physiological Reports	６．最初と最後の頁 e15957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15957	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 Kadosaka Takahide、Watanabe Masaya、Natsui Hiroyuki、Koizumi Takuya、Nakao Motoki、Koya Taro、Hagiwara Hikaru、Kamada Rui、Temma Taro、Karube Fuyuki、Fujiyama Fumino、Anzai Toshihisa	４．巻 324
２．論文標題 Empagliflozin attenuates arrhythmogenesis in diabetic cardiomyopathy by normalizing intracellular Ca2+ handling in ventricular cardiomyocytes	５．発行年 2023年
３．雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	６．最初と最後の頁 H341～H354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00391.2022	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0件

〔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
研究分担者	畑中　豊 (Hatanaka Yutaka) (30589924)	北海道大学・大学病院・特任准教授 (10101)	
研究分担者	新宮　康栄 (Shingu Yasushige) (30617064)	北海道大学・医学研究院・講師 (10101)	
研究分担者	横田　卓 (Yokota Takashi) (90374321)	北海道大学・大学病院・特任講師 (10101)	

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