

Title	心臓血管手術後の心房細動(POAF)における心外膜脂肪組織の質的変化が及ぼす影響の検討
Author(s)	夏井, 宏征
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15910号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15910
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92163
Туре	theses (doctoral)
File Information	NATSUI_Hiroyuki.pdf



学位論文

心臓血管手術後の心房細動(POAF)における 心外膜脂肪組織の質的変化が及ぼす影響の検討 (Influence of qualitative alteration of epicardial adipose tissue on postoperative atrial fibrillation in patients after cardiovascular surgery)

> 2024 年 3 月 北海道大学

> > 夏井 宏征

学位論文

心臓血管手術後の心房細動(POAF)における 心外膜脂肪組織の質的変化が及ぼす影響の検討 (Influence of qualitative alteration of epicardial adipose tissue on postoperative atrial fibrillation in patients after cardiovascular surgery)

> 2024 年 3 月 北海道大学

> > 夏井 宏征

	発表論	i文目録および学会発表目録	1頁
1.	要旨		2頁
2.	略語表	i 	5 頁
3.	緒言		7頁
4.	研究方	法	
	4.1 🕏	対象患者	10 頁
	4.2	心房リモデリングの評価	
		4.2.1 経胸壁心エコー図検査	10 頁
		4.2.2 12 誘導心電図検査	11 頁
	4.3 I	POAF の定義	12 頁
	4.4 I	EAT 体積測定	12 頁
	4.5 H	EAT の採取および処理	13 頁
	4.6 I	EAT ミトコンドリア呼吸能測定	14 頁
	4.7 I	EAT 由来分泌タンパク量測定	
		4.7.1 Conditioned medium の作成	17 頁
		4.7.2 タンパク質濃度測定	18 頁
	4.8 H	EAT の組織学的評価	20 頁
	4.9 ±	拡散抽出	21 頁
	4.10 r	real time PCR 法による mtDNA コピー数測定	22 頁
	4.11 F	RNA 発現解析	23 頁
	4.12 <i>*</i>	統計学的検討	25 頁
5.	研究結	课	
	5.1 患	急者背景と臨床的特徴	
		5.1.1 患者背景	26 頁
		5.1.2 経胸壁心エコー図検査	29 頁
		5.1.3 12 誘導心電図検査	30 頁
	5.2 E	AT と POAF との関連性についての検討	
		5.2.1 EAT 体積	31 頁
		5.2.2 EAT ミトコンドリア呼吸能	32 頁
		5.2.3 脂肪細胞面積	33 頁

		5.2.4	EAT secretome 中のタンパク量	34 頁
		5.2.5	mRNA 発現	35 頁
	5.3	多変量	ロジスティック回帰分析	36 頁
	5.4	POAF -	予測因子に基づく群分け	37 頁
	5.5	新規サス	ブグループ間の比較	
		5.5.1	患者背景および臨床的特徴	38 頁
		5.5.2	EAT ミトコンドリア呼吸能	43 頁
		5.5.3	EAT secretome 中のタンパク量	43 頁
		5.5.4	mRNA 発現	44 頁
	5.6	脂肪細胞	泡面積とミトコンドリア呼吸能の関係	48 頁
6.	考察			49 頁
7.	総括	夜び結論	合	55 頁
8.	謝辞	£		57 頁
9.	利益	相反		58 頁
10.	引用	文献		59 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Hiroyuki Natsui, Masaya Watanabe, Takashi Yokota, Satonori Tsuneta, Yoshizuki Fumoto, Haruka Handa, Shouji Matsushima, Jiro Koya, Kotaro Nishino, Daishiro Tatsuta, Takuya Koizumi, Takahide Kadosaka, Motoki Nakao, Taro Koya, Taro Temma, Yoichi M Ito, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Yasushige Shingu, Satoru Wakasa, Shuhei Miura, Takahiko Masuda, Naritomo Nishioka, Shuichi Naraoka, Kayoko Ochi, Tomoko Kudo, Tsugumine Ishikawa and Toshihisa Anzai. Influence of epicardial adipose tissue inflammation and adipocyte size on postoperative atrial fibrillation in patients after cardiovascular surgery.

1.要旨

【背景と目的】

心房細動 (atrial fibrillation, AF) は最もありふれた不整脈の一つであり、人口の高 齢化に伴いその有病率は世界的に増加傾向である。しかしながら心房細動の発症機 序は依然として不明であり、その発症を抑制するためにも、心房細動の発症機序を 解明することは世界的な急務であると言える。近年、心房細動の発症に心外膜脂肪 組織 (epicardial adipose tissue, EAT) が関与している事が明らかになってきた。EAT は心筋や冠動脈と直接接し、様々な生理活性物質の分泌を介して周囲組織に影響を 与える内分泌組織と考えられている。肥満や糖尿病などの代謝性疾患では EAT 体 積が増加することが知られており、EAT の蓄積は心房の電気的および構造的リモ デリングを引き起こすことで心房の不整脈基質形成の要因になるほか、不整脈発症 の契機となる交感神経活性を亢進させることが報告されており、注目されている研 究領域の一つである。

一方で、術後心房細動 (postoperative AF, POAF) は外科手術後に初めて発症する AF として知られており、術後入院期間の延長や脳梗塞発症リスクを増加させる事 が報告されている。EAT と POAF との関係性については、EAT の蓄積により POAF 発症率が増加したという報告がある一方で否定的な報告も散見され、一定の 見解は得られていない。また、EAT 中の炎症に関わる遺伝子の発現増加が POAF 発症と関係していたという報告もあり、EAT の量的変化に限らず、遺伝子、蛋白 発現、組織変化などの EAT の質的変化が POAF の発生に関与する事が示唆されて いるが、その機序は未だ十分に解明されていない。本研究では EAT の量的変化に 加えて、その組織学的特徴、分泌タンパク質、遺伝子発現、ミトコンドリア呼吸能 などの質的変化に着目し、POAF と EAT の関係性について包括的に調べることを 目的とした。

【材料と方法】

待機的に初回心臓血管手術を受ける非心房細動患者を対象とした。POAF を発症 した群 (POAF 群) と洞調律群 (SR 群) に分け、患者背景、経胸壁心エコー、12 誘 導心電図、EAT 体積、脂肪細胞面積、ミトコンドリア呼吸能、分泌タンパク質群 (secretome) 中のタンパク濃度および EAT の mRNA 発現を両群間で比較した。ミト コンドリア呼吸能 (Mito-OXPHOS) は O2k 高分解能呼吸測定装置を用いて測定し た。分泌タンパクについては抗体をマイクロビーズに固定したサスペンションアレ イを用いたマルチプレックス解析により定量測定した。mRNA はアディポカイ ン、炎症性および抗炎症性サイトカイン、ミトコンドリア生合成、熱産生に関わる

遺伝子と脂肪細胞のフェノタイプ毎に特異的な遺伝子についてダイレクトデジタル カウントによる遺伝子発現解析を行なった。

次に、多変量ロジスティック回帰分析を行い、POAF 発症の予測因子として EAT の TNF- α 遺伝子発現と平均脂肪細胞面積が関連することを同定した。更に、この 2 因子の分布において TNF- α 遺伝子発現が 100 count 以上かつ平均脂肪細胞面積が 3000 μ m² となる患者が存在しないことから、これらの値をカットオフ値として全 体を新たに 3 群 (グループ 1: TNF- α 100 count 未満かつ平均脂肪細胞面積 3000 μ m² 未満; グループ 2: TNF- α 100 count 以上かつ平均脂肪細胞面積 3000 μ m² 未満; グル ープ 3: TNF- α 100 count 未満かつ平均脂肪細胞面積 3000 μ m² 以上) に分類し、3 群 間での比較、検討を行なった。

【結果】

対象患者は 53 例で、POAF は 18 例 (34%) に発症した。年齢、性別、BMI (body mass index)、および高血圧、糖尿病などの既往症について両群間に有意差は認め なかった。POAF 群では左房径が有意に大きく、また P 波持続時間、P 波面積など の心房リモデリングを表す心電図指標についても SR 群と比較して有意に高値であ った。EAT ミトコンドリア呼吸能、脂肪細胞面積、EAT secretome 中のタンパク濃 度および mRNA 発現に関しては、両群間に有意差は認められなかった。次に、 TNF-α 遺伝子発現と平均脂肪細胞面積の分布を参考に3つのサブグループに分類 した (グループ1 28 例、グループ2 12 症例、グループ3 7 症例)。新規サブグ ループ間の比較では、グループ2において POAF 発症率が最も高く、グループ3 で最も低かった (グループ1 29%、グループ2 58%、グループ3 0%)。EAT ミ トコンドリア呼吸能やレジスチンを除く EAT secretome 中のタンパク質濃度に関し ては、3 群間において有意な差は認められなかった。一方で、mRNA の発現に関し ては、グループ2ではグループ1と比較して炎症に関わる多数の遺伝子 (CCL2, GDF-15, IL-1β, IL-6, TNF-α, TNFRSF9) 発現が亢進し、抗炎症性サイトカインであ る IL-10の発現も亢進していた。一方、グループ3ではグループ1と比較して炎症 性サイトカインの数個 (CCL2, GDF-15, IL-6) の発現が亢進し、同時に IL-10 の発現 亢進も認められた。

【考察】

本研究において、POAF 群と SR 群で比較した場合には患者背景、心電図および 心エコー図検査の一部を除く多くの臨床データ、EAT ミトコンドリア呼吸能、分 泌タンパク質、mRNA 遺伝子発現、mtDNA コピー数について両群間に有意差は認 められなかった。また EAT 体積と POAF の発症については、本研究でも有意な相 関関係は認められなかった。これらの違いは報告によって対象疾患や患者背景が多様であり、EAT 体積の測定方法や POAF の定義が異なる事が原因として考えられた。逆に言えば、これらの研究結果は EAT 体積のみでは POAF 発症との関係性を説明できず、むしろ EAT の質的な側面が重要である可能性を示唆している。

次に、EAT の質的側面として組織の炎症と組織を構成する脂肪細胞面積によって 分けた3群においては、POAF 発症率と炎症関連遺伝子および抗炎症性遺伝子の発 現に差が認められた。3 群のうち最も多くの炎症関連遺伝子の発現亢進が見られた グループ2は、POAF発症率が最も高かった。一方で、グループ3は、グループ1 と比較して炎症性遺伝子の発現が亢進しているにも関わらず、最も POAF 発症率 が低かった。グループ3において IL-10の遺伝子発現が亢進していた事を考慮する と、脂肪細胞やリンパ球などの EAT に含まれる細胞群における炎症に関する反応 に対して、IL-10による炎症抑制的な作用が、結果的に EAT 全体の炎症の程度に寄 与した可能性が示唆された。また、脂肪細胞面積が小さかった理由として、EAT の慢性炎症による脂肪細胞の分化成熟および脂肪滴形成が障害されている可能性が 考えられた。本研究や既報の結果を踏まえると、EAT における炎症の程度が POAF に関与していると推察されるが、発症機序の解明にはさらなる研究が必要である。 本研究ではEAT ミトコンドリア呼吸能と平均脂肪細胞面積が逆相関し、アディポ ネクチン分泌と正相関することも明らかにした。脂肪細胞のミトコンドリア機能は 脂肪酸代謝およびタンパク質の分泌などの細胞機能と深く関わっている事が知られ ている。本研究においては、ミトコンドリア呼吸能の低下と POAF の直接的な関 連は示す事が出来なかったが、非肥満患者において EAT の TNF-α 遺伝子発現量の 増加や脂肪細胞の大きさが POAF を予測できる因子となる事を示した点におい て、新規性がある。今後、EAT の質的変化が起こる機序を解明することにより、 新たな治療介入が開発され、POAF の予防につながる事が期待される。

【結論】

AF を発症していない心臓大血管手術を受ける患者において、EAT 体積および EAT ミトコンドリア呼吸能は POAF の発症と直接的な関係は見られなかった。さ らに、EAT 体積の増加は EAT における炎症性遺伝子の発現亢進、ミトコンドリア 呼吸能低下および EAT を構成する脂肪細胞の小型化などの質的側面の悪化とは相 関しなかった。多変量ロジスティック回帰分析では、EAT における TNF-α 遺伝子 の発現量が POAF の予測因子であった。EAT における TNF-α 遺伝子発現量の変化 と同様に、IL-10 などの抗炎症性遺伝子の発現量の変化や脂肪細胞の大きさなど、 EAT の質的変化は術後心房細動の発症に関与している可能性が示唆された。

2. 略語表

ACEi: angiotensin converting enzyme inhibitor

ADP: adenosin diphosphate

AF: atrial fibrillation

ANOVA: analysis of variance

ARB: angiotensin receptor blocker

AVR: aortic valve replacement

BMI: body mass index

BSA: bovine serum albumin

BUN: blood urea nitrogen

C: mitochondrial complex

CABG: coronary artery bypass graft

CAD: coronary artery disease

CM: conditioned medium

CRP: C-reactive protein

Ct: cycle threshold

CT: computed tomography

Cyt *c*: cytochrome *c*

DNA: deoxyribonucleic acid

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

EAT: epicardial adipose tissue

ECG: electrocardiogram

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

FBS: fetal bovine serum

GP: ganglionated plexus

HbA1c: hemoglobin A1c

HDL: high-density lipoprotein

HU: Hounsfield Units

IL: interleukin

IVST: interventricular septum thickness

LA: left atrium

LAD: left atrial diameter

LAVI: left atrial volume index LDL: low-density lipoprotein LV: left ventricle LVEF: left ventricular ejection fraction LVDd: left ventricular endo-diastolic diameter LVSd: left ventricular endo-systolic diameter LVPWT: left ventricular posterior wall thickness MCP-1: monocyte chemotactic protein-1 mRNA: messenger ribonucleic acid mtDNA: mitochondrial deoxyribonucleic acid MVR: mitral valve replacement/repair nDNA: nuclear deoxyribonucleic acid OXPHOS: oxidative phosphorylation PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1 PBS: phosphate buffered solution PCR: polymerase chain reaction POAF: postoperative atrial fibrillation PTFV1: P wave terminal force in lead V1 RA: right atrium ROI: region of interest SR: sinus rhythm TG: triglyceride TNF-α: tumor necrosis factor-alpha TFAM: mitochondrial transcription factor A UCG: ultrasound cardiogram

3. 緒言

心外膜脂肪組織 (epicardial adipose tissue, EAT) は心嚢内に存在し、組織学的には 臓側心外膜の内側に存在している。心筋や冠動脈などの周囲組織と膜構造で隔てら れる事なく直接接しており、壁側心外膜の外側に存在する心周囲脂肪 (pericardial adipose tissue, PAT) とは解剖学的に明確に区別されている (図1)。EAT は様々な 生理活性物質のオートクリン・パラクリン分泌を介して周囲組織に影響を与える内 分泌組織と考えられており、PAT や皮下脂肪組織とは機能的にも全く異なる特徴を 有する。また EAT は主に白色脂肪細胞で構成される皮下脂肪組織と比較して、ミ トコンドリアに富み、非ふるえ熱産生に関わる脱共益蛋白 (uncoupling protein-1, UCP-1) 遺伝子を多く発現する褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞が多く分布してい る事がわかっている。この脂肪細胞のフェノタイプの違いが、EAT が PAT や皮下 脂肪組織と異なる性質を持っている一因である可能性があり、EAT を構成する脂 肪細胞の特徴については広く関心を集めている研究領域の一つである。



EAT が周囲組織に与える影響については、動脈硬化性疾患である冠動脈疾患 (coronary artery disease, CAD) との関連について盛んに研究が行われてきた。 Mazurek らは冠動脈バイパス術を受けた患者の EAT は、同一患者の皮下脂肪組織 と比較してマクロファージやリンパ球などの炎症性細胞浸潤が著明に見られ、IL-1β、IL-6 や TNF-α などの炎症性遺伝子の発現が亢進していることを報告し、EAT は炎症性メディエーターの局所的な供給源となると提唱した(Mazurek et al., 2003)。

一方で、近年では心房細動 (atrial fibrillation, AF)の発症に EAT が関与している事 が明らかとなってきた。Chekakie らは洞調律患者と比較して AF 患者において、 CT で計測した EAT 体積が増加している事を報告した (Al Chekakie et al., 2010)。 EAT はその蓄積により心房筋に直接浸潤し、心房筋に炎症や線維化を波及させる (Nalliah et al., 2020)。さらに、心房細動の発生および維持に関わっていると考えら れている心臓神経節 (ganglionated plexus, GP) は EAT に広く分布している事がわか っており、 (Armour et al., 1997; Hou et al., 2007; Schauerte et al., 2000)、EAT はこの GP に対する何らかの作用を介して心房の電気生理学的特性に影響を与えていると 考えられている。Nalliah らは非 AF 患者において、EAT 体積と右心房の電気的お よび構造的リモデリングに正の相関関係があること報告しており、AF を発症する 前段階から、EAT が心房の電気的および構造的リモデリングに関与している可能 性が強く示唆される。逆に、高頻度心房ペーシングによる動物 AF モデルにおい て、脂肪細胞の分化や蓄積に関わる転写因子の発現が亢進し (Chilukoti et al., 2015)、心房筋間へ線維化を伴う脂肪細胞の浸潤が高度になる事が報告されている (Haemers et al., 2017)。従って、心房細動発症の過程における心房の電気的および構 造的リモデリングの形成には、EAT と心房筋間のクロストークが関与していると 考えられている。

術後心房細動 (postoperative AF, POAF) は外科手術後に初めて発症する AF とし て古くから知られており、術後入院期間の延長や脳梗塞発症リスクを増加させる。 POAF の発症予測因子は、術前因子、手術に関わる因子および術後の患者の状態や 環境などの様々な要因が報告されている (図 2, (Qureshi et al., 2021))。しかしなが ら、EAT と POAF との関係性については解明されていない点が多い。EAT 中の activin A の遺伝子発現や EAT から分泌される炎症性メディエーターの増加が POAF 発症と関連している事が報告され、AF 同様に EAT における炎症が POAF の 発症に関わっている可能性が示唆されている (Petraglia et al., 2022; Wang et al., 2019)。また、EAT の量と POAF の関係についてもいくつか報告されているが、 EAT を測定するモダリティの違いや患者背景の違いなどから、一定の見解は得ら れていない。そこで本研究では EAT の量的変化のみならず、その組織学的特徴、 分泌タンパク質、遺伝子発現、ミトコンドリア呼吸能などの EAT の質的変化に着 目して、POAF と EAT の関係性について包括的に調べる事を目的とした。特に、 BMI が 30 前後である欧米人を対象とした多くの既報と異なり、一般的に肥満患者 に比べて EAT 体積が増加していないとされる非肥満患者における EAT が POAF 発 症に与える影響や EAT プロファイルを明らかにする。



4. 研究方法

本研究は北海道大学病院生命・医学研究倫理審査委員会の定める「人を対象とする 生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に基づき、同委員会の承認を受け(研究 番号 020-0097)、UMIN 臨床試験登録システムに登録した(登録番号

000044765)。全研究参加者より心臓血管手術前に文書によるインフォームドコンセントを取得した。

4.1 対象患者

対象は 2021 年 8 月から 2022 年 12 月の間に北海道大学病院および手稲渓仁会病 院において、胸骨正中切開による待機的心臓血管手術をうけた、洞調律患者 58 名とした。持続性心房細動、20 歳未満、左室駆出率が 35%以下、開胸もしくは 開心術の既往、緊急手術のいずれかに当てはまる症例については除外対象とし た。対象患者のうち、検体採取困難であった 1 例、検体採取から適切に保存さ れるまでに時間を要した 3 例と実験試薬濃度が不適切であったためミトコンド リア呼吸能測定結果が得られなかった 1 例の計 5 例を除外し、最終的に 53 症例 を解析対象とした。53 症例のうち POAF を発症した 18 症例 (34%) を POAF 群、POAF を発症しなかった群を SR 群とした。

4.2 心房リモデリングの評価

4.2.1 経胸壁心エコー図検査

心臓血管手術前の心機能評価のため全例で経胸壁心エコー図検査が施行され た。検査は全て術前6ヶ月以内に施行され、市販されている心エコー図検査装 置である Vivid E9TM (GE Healthcare, Horton, Norway)、Vivid S70TM (GE Healthcare, Horton, Norway)、Aplio i600 (Canon Medical, Otawara, Japan)、Aplio i800 (Canon Medical, Otawara, Japan)、Aplio 400 (Canon Medical, Otawara, Japan) を用いて十分な経験のある臨床検査技師が施行した。測定項目は一般的に測定 される項目に加え、心房リモデリングの指標として左房機能に着目し、左房容 積 (left atrial volume, LAV) や左房容積係数 (left atrial volume index, LAVI) など の左房容積指標に加え、新規 AF 発症の予測因子としても報告されている LA emptying fraction (LAEF) などの左房機能指標も同時に計測した(Hirose et al., 2012;Park et al., 2020)。LAV は心尖部四腔像より左房心内膜心電図の R 波開始 (LAV_{min})、T 波終末 (LAV_{max}) および左房収縮直前 (LAVpreA) の各時相におい て、左房心内膜境界面を手動でトレースして測定した。各時相における LAV か ら算出される LAEF は代表的な左房機能指標の一つであり、左房のリザーバー 機能を反映する LA expansion index、導管機能を反映する LA passive EF および ブースター機能を反映する LA active EF に分けて算出した (表 1)。

表1 左房機能指標

左房機能指標	計算式	Reservoir	Conduit	Contraction
LAEF, %	(LAV _{max} -LAV _{min}) / LAV _{max}	0	0	0
LA expansion index, %	(LAV _{max} -LAV _{min}) / LAV _{min}	0		
LA passive EF, %	(LAV _{max} -LAV _{preA}) / LAV _{max}		0	
LA active EF, %	(LAV _{preA} -LAV _{min}) / LAV _{preA}			0

LAV, left atriual volume; LAEF, left atrial emptying fraction

4.2.2 12 誘導心電図検査

全例で術前に 12 誘導心電図検査を施行した。心電図は安静時のものとし、背 臥位で測定された。記録は感度 10 mm/mV、速度は 25 mm/秒とした。心電図検 査はフクダ電子製の心電計を用いて施行された。12 誘導心電図において一般的 に計測される項目である PR 時間、QRS 幅、QT 時間などに加え、特に P 波に ついて、波高値、持続時間など詳細に解析を行った。具体的には、全誘導にお ける P 波持続時間の最大値 (maximal P wave duration) および最小値 (minimum P wave duration) とその差 (P wave dispersion) を測定した。また、V1 誘導におけ る P 波陽性成分の持続時間 (P wave duration) と波高値 (P wave amplitude) およ び陰性成分の持続時間 (P' wave duration) と波高値 (P wave amplitude) い1 誘 導における P 波陰性成分の持続時間と波高値の積 (P wave terminal force in lead V1, PTFV1)、V1 誘導における P 波陽性成分の持続時間と波高値の積と PTFV1 の和 (P wave area) を測定した (図 4)。



図4 P波指標の計測

代表的な P 波形。左図は陰性成分を伴わない場合、右図は前胸部誘導でよく 見られる陰性成分を伴う P 波の形。陰性成分がある場合は陽性成分、陰性成 分のそれぞれにおいて P 波および P'波の波高値 (mV) と持続時間 (ms) を測 定した。

4.3 POAF の定義

POAF は外科手術の周術期に新たに発症した心房細動と広く認知されているが、 その定義は報告により様々である。日本循環器学会の 2022 年改訂版心臓手術に おける合併心疾患の評価と管理に関するガイドラインによると、「術中、ないし 術後入院中に新たに発症した 30 秒以上持続するか、記録時間が 30 秒以下の場 合は記録中持続する心房細動とするもの」や「術中、ないし術後 30 日以内に新 たに発生する心房細動」と記載されている。本研究では当院で行われた先行研 究 (Shingu et al., 2018)を参考に「術後 7 日以内に記録された、少なくとも 5 分 以上持続する心房細動」と定義した。心電図はテレメトリー式心電送信機 (FUKUDA DENSHI, Tokyo, Japan)とモニタリングシステム (DS-8400, FUKUDA DENSHI, Tokyo, Japan)を用いて 24 時間記録された。POAF 発症の有無は検者 1 (H. Natsui)もしくは共同研究機関の心臓血管外科医 1 名以上がモニター心電図の 記録を目視にて確認し、判断した。

4.4 EAT 体積測定

EAT 体積は心臓手術前に行われた非造影胸部コンピュータ断層撮影 (computed tomography; CT) から得られる画像を市販の画像解析ソフト (XTREK view, J-MAC System, Sapporo, Japan) を用いて解析した。解析方法は同様の手法を用いた 先行研究を参考にした (Nakajima et al., 2019)。主肺動脈が左右に分岐するレベル を上端、肝静脈が下大静脈に流入するレベルを下端として心外膜内側を手動で トレースした範囲内を関心領域 (region of interest, ROI) として設定した。脂肪組 織の CT 値は Yoshizumi らの研究を参考とし、-190 Hounsfield Unit (HU) から-30 HU を脂肪組織の CT 値とした (Yoshizumi et al., 1999)。各スライスにおける ROI 内の脂肪組織の CT 値を示すピクセル数を算出し、全てのスライスにおける脂肪 組織のピクセル数の和とスライス幅の積を EAT 体積とした。ROI は心臓全体、 右房および左房に分けて設定し、それぞれの EAT 体積を総 EAT 量、右房周囲 EAT 量、左房周囲 EAT 量とした(図4)。



図4 CT による心臓周囲の脂肪組織の分布と EAT 体積の計測 胸部単純 CT 画像の冠状断(左図)および矢状断(右図)。心外膜脂肪は黄色で 強調して示した。心外膜脂肪は心外膜を境界として心嚢内に分布し、心嚢外に ある心臓周囲脂肪と区別される。赤丸は EAT の生検部位を示し、右心耳辺縁か つ大動脈基部の前面より採取された。点線は EAT 体積を計測する際に手動でト レースされた心外膜を表し、囲まれた領域を ROI として-190 HU から -30 HU の CT 値をとるピクセル数を算出した。

4.5 EAT の採取および処理

EAT は心臓血管手術の際に、心嚢内の大動脈基部前面および右心耳周囲に囲ま れた領域から採取した。同部位からの心外膜脂肪組織は解剖学的に右冠動脈と 右房に近接しているが、安全に EAT 検体を採取できる部位とされている (Parisi et al., 2020)。手術侵襲による組織への影響を極力避けるため、人工心肺装置を用 いる場合は対外循環を開始する前に、用いない場合は心膜切開直後に電気メス を使用せずに採取した。採取した EAT は速やかに4片に分割し、それぞれ適切 な方法で保存した。具体的には、1 片目はミトコンドリアの酸化的リン酸化能 (oxidative phosphorylation, OXPHOS)の測定のため BIOPS 溶液 (2.77 mmol/L CaK2EGTA, 7.23 mmol/L EGTA, 20 mmol/L taurine, 6.56 mmol/L MgCl2, 5.77 mmol/L ATP, 15 mmol/L phosphocreatine, 0.5 mmol/L dithiothreitol, 50 mmol/L 4morpholineethanesulfonic acid, pH 7.1) に入れ、4℃で保存した。2 片目は組織学的 評価のために PAX gene 溶液 (Qiagen, Hilden, Germany) または 10 %中性緩衝ホル マリン液 (Kanto chemical, Tokyo, Japan) に入れ、室温で保存した。3 片目は核酸 抽出のために液体窒素で瞬間凍結後、-80 ℃にて保存した。4 片目は培養上清の 作成のために4 ℃のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で保 存した。

4.6 EAT ミトコンドリア呼吸能測定

EAT ミトコンドリア呼吸能は先行研究を参考に (Nakajima et al., 2019)、高感度呼 吸能測定装置 (Oxygraph-2k; O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) を用い て測定した。共同研究機関で採取された検体は、採取からミトコンドリア呼吸 能測定開始まで2時間程度を要したが、適切に保存された検体では測定される ミトコンドリア呼吸能の結果に影響は殆どない事が過去に報告されている (Sahl et al., 2021)。BIOPS 溶液にて保存された EAT 検体は、氷冷しながら血液、血管 および結合組織を丁寧に除去した後、呼吸能測定用溶液である Mir05 溶液 (110 mmol/L sucrose, 60 mmol/L K-lactobionate, 0.5 mmol/L EGTA, 0.1% BSA, 3 mmol/L MgCl2, 20 mmol/L taurine, 10 mmol/L KH2PO4, 20 mmol/L HEPES, pH 7.1) に入れ、 ロータリー式振とう器を用いて 10 分間インキュベートした。次に、EAT 検体の 重量を測定し、25~50 mgの EAT 検体を O2k 装置の測定チャンバー内に入れ た。チャンバー内は2mLのMir05 溶液で満たされており、測定は37℃を維持 して行った。解析は Datlab software (Oroboros Instruments) を用いた。ミトコンド リア呼吸を促進させる呼吸器質、アデノシン二リン酸 (adenosine 5'-diphosphate, ADP) および脱共役剤などを効率的に脂肪細胞に作用させるため、2 µmol/L の digitonin をチャンバー内に2 µL 加え、細胞膜透過処理を行った。約20分間イン キュベートし、チャンバー内の酸素濃度および酸素消費速度が一定となった 後、下記の手順に従いミトコンドリア呼吸能を測定した。

- 1) 2 mmol/L Malate 10 μ L, 10 mmol/L Glutamate 10 μ L
- 2) 5 mmol/L ADP 20 μ L, 5 mmol/L MgCl2 20 μ L
- 3) 0.15 mmol/L Octanoyl-l-carnitine $3 \mu L$
- 4) 10 mmol/L succinate $20 \ \mu L$
- 5) 10 μ mol/L cytochrome c 5 μ L
- 6) Carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) $5 \mu L$

O2k 装置の各チャンバー内における単位組織重量あたりの酸素消費速度 (pmol/s/mg)をO2 fluxと呼ぶ。呼吸能測定は各操作において、呼吸基質を添加し た後に O₂ flux が一定となった時点で、次の基質を加える操作を繰り返した (図 5)。操作1から4ではそれぞれミトコンドリア電子伝達系複合体I関連基質であ る Malete および Glutamate、酸化的リン酸化による ATP 合成の基質となる ADP とミトコンドリアの様々な代謝に必要とされる Mg、脂肪酸基質である Octanovl-1-carnitine およびミトコンドリア電子伝達系複合体II関連基質である succinate を 添加した。操作5においてはミトコンドリア外膜の損傷を評価するために、 cytochrome c を添加した。cytocrome c はミトコンドリア電子伝達系複合体IV (cytcrome c oxidase)の基質であり、ミトコンドリア外膜に損傷がある場合、外因 性 cytochrome c が複合体IVにおける呼吸を促進させる。従って cytochrome c を添 加する前後でO2 flux が上昇する場合は、ミトコンドリア外膜の損傷が疑われ る。cytochrome c 添加前後において 10%以上の O₂ flux の増加を認める場合は EAT 検体の品質が保たれていないと判断し、解析から除外した。操作6では脱 共役剤 FCCP を 5µL をチャンバー内に添加し、O2 flux が最大となるまで滴定操 作を繰り返した。



図5 O2k 装置を用いた EAT ミトコンドリア呼吸能の代表的なグラフ 縦軸 (左) は O2k 装置のチャンバー内の酸素濃度 (μ M)、縦軸 (右) は酸素消費 速度 (pmol/s/mL)、横軸は時間経過を表す。酸素消費速度の単位はチャンバー内 を満たす Mir05 溶液の単位容量あたりの酸素消費速度であり、解析時にはチャン バー内に入れた EAT 検体の重量で補正する。State 2 は ATP 合成酵素を介さずマ トリックスへのプロトンリークを補償する、ADP 非存在下における複合体Iの呼 吸を表す。State 3 (CI)、State 3 (CI with FAO)、State 3 (CI+II with FAO) はそれぞれ ADP 存在下における複合体Iの呼吸、State 3 (CI) と脂肪酸酸化 (fatty acid oxidation, FAO) を介した呼吸および State 3 (CI with FAO) と複合体IIによる呼吸を表す。 ETS は FCCP 滴定により得られた最大酸素消費速度である。図では cytochrome *c* 添加前後で O₂ flux の上昇はみられない。M, malete; G, glutamate; ADP, adenosine diphosphate; Oct, octanoyl-l-carnitine; Suc, succinate; Cyt c, cytochrome *c*; ETS, electron transfer system

4.7 EAT 由来分泌タンパク量測定

4.7.1 Conditioned medium の作成

4 ℃の PBS で保存しておいた EAT サンプルから分泌されるタンパク質を測定す るため、先行研究 (Kira et al., 2020) を参考にして下記の手順にて培養上清を作 成した。操作は全て無菌的にクリーンベンチ内で行った (図 6)。

- PBS に保存した EAT サンプルのうち約 50 mg を培養に用い、それぞれ 10 mg 以下となるようにサンプルを数個に分割した。滅菌済み PBS を入れた 5mL のポリスチレン製丸底チューブ (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) にサンプルをいれ、遠心分離機を用いて1分間遠心 (400×g,24 ℃) した。これを3 回繰り返し、血液などの余分な成分を取り除いた。
- 洗浄後のサンプルは非働化した 5%ウシ胎児血清 (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (ペニシリン 10,000 U/mL、ストレプトマイシン 10,000 µg/mL) を含むダルベッコ改変 イーグル培地 (DMEM F12, Gibco, Gland Island, NY, USA) を用いて、一晩 培養した (37 ℃, 5% CO₂)。調整済み培地は EAT サンプル 10 mg あたり 0.4 mL となるように容量を調整した。
- 3) 操作1の手順同様に EAT サンプルを洗浄し、FBS を含まない DMEM F12 培地を用いて、操作2と同様の条件で一晩培養した。



4) 得られた培養上清を集め、-80℃にて保存した。

4.7.2 タンパク質濃度測定

Conditioned medium 中に含まれる EAT 由来分泌タンパク質濃度の測定は、 Milliplex map Human Adipocyte Magnetic Bead Panel (Cat #HADCYMAG-61K, Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて定量評価を行った。測定項目は主要なア ディポサイトカインであるアディポネクチンに加え、インターロイキン1ベー タ (IL-1β)、IL-6、IL-8、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1 (total plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、単球遊走因子 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、レジスチン、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor-alpha, TNFa) とした。測定はマルチプレックスアッセイ装置 Luminex100/200TM (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)、解析は xPONENT3.1 software (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) および Q-analyzer software (RayBiotech, Peachtree corners, Georgia, USA)を用いた。以下にその手順を示す。

- 抗体ビーズの調整:各抗体ビーズバイアルを、超音波洗浄装置を用いて 30秒間超音波処理を行った。各抗体ビーズバイアルから150 µL を Mixing bottle に入れ、Bead diluent を使用して最終的に3 mL に調整した。
- Quality Control (QC) の調整: QC1 および QC2 を 250 µL の超純水で希釈 し、ボルテックスミキサーを用いて十分撹拌させた後、10 分間静置させ た。
- 3) Wash buffer の調整:室温に戻した Wash buffer 60 mL を 540 mL の超純水で 希釈した。
- 4) Standard の調整: Human Adipocyte Panel Standard のバイアルを 250 µL の超 純水で希釈し、手順(2)と同様に撹拌、静置させた。この希釈液を Standard 7 とした。エッペンドルフチューブ 6 本に Standard 1 から Standard 6 までラベリングし、各チューブに Assay buffer を 200 µL ずつ分注した。 50 µL の Standard 7 溶液を Standard 6 のチューブに添加し、ピペッターを 用いてよく混和した。次に、50 µL の Standard 6 溶液を Standard 5 のチュ ーブに添加し、ピペッターを用いてよく混和した。同様の手順を Standard 4 から Standard 1 まで繰り返し、スタンダード溶液の希釈系列を作成し た。Standard 0 は Assay buffer のみとした。
- 付属の96 ウェルプレートの各ウェルに、室温に戻した Assay buffer を 200 µL ずつ分注し、プレートシェーカー (Digital Shaker Orbit P2, Labnet International Inc., Edison, NJ, USA) を用いて 24 ℃で 10 分間撹拌した。撹拌 終了後、ウェル内の Assay buffer を捨て、水分を十分取り除いた。

- 6) Standard 0 から Standard 7、QC1 および QC2 を各 25 μL ずつ適当なウェル に入れ、それぞれのウェルに DMEM F12 培地を 25 μL ずつ分注した。サ ンプルウェルには Assay buffer を 25 μL を分注し、各 EAT 検体から作成さ れた培 conditined medium を 25 μL ずつ注入した。各 Standard 溶液、QC、 conditined medium はすべて複製を作成した。
- 7) 測定するすべてのウェルに、ボルテックスミキサーでよく撹拌した調整済 み抗体ビーズ溶液を 25 μL ずつ素早く分注した。
- アレートシーラーで保護し、アルミホイルで遮光した後、4℃の冷蔵庫内で16から18時間のインキュベートを行った。
- 9) プレート洗浄:プレートにマグネットセパレーターを装着し、1分間静置した。プレートをマグネットセパレーターごと倒立させ、ウェル内の液体を捨てた。マグネットセパレーターをプレートから外し、希釈済み Wash buffuer を 200 µL ずつ各ウェルに分注し、30 秒間振とうした。再びマグネットセパレーターをプレートに装着して1分間静置させた後、上記と同様にウェル内の液体を捨てた。この操作を3回繰り返した。プレートを倒立させる際は抗体ビーズが落下しないよう注意しながら水分を取り除いた。
- 10) 各ウェルに検出抗体を 50 µL ずつ注入し、プレートシーラーで保護した。 プレートをアルミホイルで遮光し、プレートシェーカーを用いて 24 ℃で 1 時間インキュベーションした。
- 操作 (9) 同様にプレート洗浄を3回行った。各ウェルに100 μLのAssay
 buffer を分注し、プレートシェーカーを用いて5分間振とうさせた。
- 12) Luminex 100/200 を用いて各抗原に対応した抗体ビーズの蛍光強度を測定 した。



4.8 EAT の組織学的評価

EAT サンプルは採取直後に PAX gene tissue system (Qiagen, Hilden, Germany)、も しくは 10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。パラフィンによる包埋 後、4 μ m に薄切して組織切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行っ た。EAT 組織標本はデジタル顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE, Osaka, Japan)を用い て倍率×200 で拡大観察し、1 標本あたり3 視野をランダムに選択し写真撮影を行っ た。1 視野あたりの脂肪細胞の面積を BZ-X analyzer software (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて測定し、3 視野の平均値を算出した (図8)。



図8 BZ-X analyzer software を用いた脂肪面積の測定

脂肪細胞は BZ-X analyzer software により自動で認識される。認識された部位 のうち脂肪細胞以外のトレース部位や細胞形態が損傷している部位を手動で 指定し、解析から除外した。複数の細胞を1個と認識した場合や、1個の細胞 を複数個と認識した場合については手動で再度トレースを行った。

4.9 核酸抽出

EAT サンプルからの DNA および RNA 抽出はシリカメンブレン法を利用した核酸抽出キット NucleoSpin RNA kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany) および NucleoSpin RNA/DNA buffer set (Macherey–Nagel, Düren, Germany) を用いた。同キットは少量の検体から DNA と RNA を同時に抽出が可能であり、抽出は以下の手順で行った。なお、操作 (5) で使用する Buffer DNA Wash は同溶液 12 mL に対して 50% エタノール 48 mL を用いて希釈した。操作 (10) および操作 (11) で 用いる Wash Buffer RA3 についても、同溶液 12 mL に対して 96% エタノール 48 mL を用いて希釈して使用した。

- ホモジネート作成:-80 ℃にて保存された EAT サンプルをβメルカプト エタノール 3.5 μL を添加した Lysis Buffer RA1 350 μL に入れ、ダウンス 型ホモジナイザー (BioMasher II, nippi, Tokyo, Japan) を用いて破砕した。
- ホモジネートの粘性除去:18Gの注射針を5回程度通した後、Nucleo Spin Filter (violet ring)をエッペンドルフチューブに乗せ、フィルター上にホモ ジネートを注入後、遠心分離した (11,000×g, 1 min, 24 °C)。
- エタノール結合:エッペンドルフチューブに溜まったホモジネートに350 µLの70%エタノールを加え、5回程度ピペッティングし、よく混和した。

- 4) 核酸とカラム膜の結合:70%エタノール添加後のホモジネートを数回ピペッティングし、NucleoSpin RNA Column (light blue ring)のカラム上に注入し、新しいエッペンドルフチューブの上に乗せて、遠心分離した (11,000×g,30 sec,24 °C)。この操作でカラム上に DNA および RNA 結合させた。
- 5) 洗浄: DNA wash 希釈液 500 µL をカラム上に注入し、新しいエッペンドル フチューブに乗せ、遠心分離した (11,000 ×g, 1 min, 24 ℃)。遠心後、チ ューブ内の液体を捨て、もう一度同じ操作を繰り返した。
- 6) カラム膜の乾燥:カラムに付属した蓋を開けたまま3分間静置させた。
- 7) DNA 溶出: DNA Elute 100 µL を直接膜上に注入し、1 分間インキュベーションさせた後、遠心分離した (11,000 ×g, 1 min, 24 ℃)。十分溶出させるため、遠心分離終了後 5 分間待った後、得られた DNA 溶液を-20 ℃で保存した。
- 8) DNA 除去: RNase free H₂O で溶解した rDNase 10 µL と Reaction Buffer for rDNase 90 µL を混ぜた溶液のうち 95 µL をカラム膜上の注入、15 分間膜 上でインキュベーションした。
- 9) rDNaseの不活化: Buffer RAW2 200 µL をカラム膜上に注入し、エッペンドルフチューブに乗せ、遠心分離した (11,000 ×g, 30 sec, 24 °C)。
- 10) 洗浄:新たなエッペンドルフチューブにカラム膜を移し、Buffer RA3 600 µLをカラム膜上に注入して遠心分離した (11,000×g, 30 sec, 24 °C)。
- カラム膜の乾燥: チューブ内の液体を捨て、再び Buffer RA3 250 µL をカ ラム膜上に注入して遠心分離した (11,000 ×g, 2 min, 24 °C)。
- 12) 新たなエッペンドルフチューブにカラム膜を乗せ、RNase free H₂O 60 µL
 をカラム膜上に直接注入し、遠心分離した (11,000 ×g, 30 sec, 24 °C) 。 収
 率を高めるため、チューブ内の RNA 抽出液を再びカラム膜上に注入し、
 同様の条件で遠心分離を行い、得られた RNA 溶液を-80 ℃で保存した。

4.10 real time PCR 法による mtDNA コピー数測定

EAT サンプルに含まれるミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) を測 定するため、SYBRTM green アッセイによる real time polymerase chaion reaction (real time PCR) 法を用いて目的 mtDNA を増幅させた。PCR には Power SYBR green Master Mix (Applied Biosystems) 、Human Mitochondrial DNA (mtDNA) Monitoring Primer Set (Takara Bio, Otsu, Japan) を使用し、リアルタイム PCR 装置 として StepOnePlusTM Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて DNA を増幅させた。以下にその手順を記す。

- 1) -20 ℃で保存された DNA 溶液は氷上でゆっくりと解凍した。
- 解凍した DNA 溶液の濃度および純度を NanoDrop Lite 分光光度計 (Thermo Scientific) を用いて測定し、DNA が含まれている事と純度を確認 した。
- 96 well PCR プレートの各ウェルに Master Mix 10 µL、Primer 1 µL を入れ、 サンプル溶液は 10 ng を超えるようにサンプル溶液と蒸留水の量を調整した。1 well あたり合計 20 µL となるよう調整した。
- 4) 1 サンプルあたり4種類のプライマー (ND1, SLCO2B1, ND5, SERPINA1)
 を用いて測定を行い、全て複製を作成して測定した。
- 5) PCR 反応は以下の条件で行った。PCR サイクルは 40 サイクル繰り返した。

Step	Time, Temperature
Enzyme activation	10 min, 95 °C
PCR (Denature, Anneal / Extend)	$15~{\rm sec},95~{\rm ^\circ C}$ / $60~{\rm sec},60~{\rm ^\circ C}$

6) 解離曲線を作成するため、再び95 ℃で15 秒間加温した。次に60 ℃で60
 秒間維持した後、15 秒毎に0.3 ℃ずつ加温し、再び95 ℃まで加温した。
 この手順の際に継続的に蛍光強度を測定し、解離曲線を作成した。

PCR 産物の増幅曲線上の閾値線を元にサイクル数 (Ct 値) を求めた。1 検体につ き核 DNA (nuclear DNA)として代表的な2 種類 (SLCO2B1, SERPINA1) と mtDNA として代表的な2 種類 (ND1, ND5) を増幅させた。nDNA と mtDNA そ れぞれの Ct 値 (Ct_{nDNA}, Ct_{mtDNA})の差を求め、 $2^{(Ct_nDNA-Ct_mtDNA)}$ を mtDNA コピー 数の推定値として相対的に定量化した。なお、nDNA と mtDNA の組み合わせに ついては、測定キットの手順に従って SLCO2B1 と ND1、SERPINA1 と ND5 と した。1 検体につき 2 つの mtDNA コピー数を測定し、それぞれの平均値を各症 例における mtDNA コピー数として解析に用いた。

4.11 RNA 発現解析

EAT 中の RNA 発現は NanoString Technologies が開発した nCounter Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, USA)の技術を利用して測定および解析 を行った。nCounter は RNA 分子に標的分子特異的なプローブと解析用プローブ をハイブリダイズさせることで、標的分子を1分子単位で測定可能なダイレク トデジタルカウントの技術を採用している (Geiss et al., 2008)。標的遺伝子につい ては下の表の通りである (表 2)。解析は nSolver Analysis Software 4.0 (NanoString Technologies, Seattle, USA) を使用した。

遺伝子記号	正式名称	Designation
ADIPOQ	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Endogenous
ADIPOR1	adiponectin receptor 1	Endogenous
ADIPOR2	adiponectin receptor 2	Endogenous
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	Endogenous
CIDEA	cell death-inducing DFFA-like effector a	Endogenous
GDF-15	growth differentiation factor 15	Endogenous
HOXC9	homeobox C9	Endogenous
IL-10	interleukin 10	Endogenous
IL-1β	interleukin 1 beta	Endogenous
IL-6	interleukin 6	Endogenous
ITLN1	intelectin 1	Endogenous
LEP	leptin	Endogenous
NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	Endogenous
NRF1	nuclear respiratory factor 1	Endogenous
PPARGC1A	PPARG coactivator 1 alpha	Endogenous
PRKAA1	protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	Endogenous
RETN	resistin	Endogenous
SIRT1	sirtuin 1	Endogenous
TBX1	T-box transcription factor 1	Endogenous
TFAM	transcription factor A, mitochondrial	Endogenous
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	Endogenous
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member9	Endogenous
UCP-1	uncoupling protein 1	Endogenous
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Housekeeping
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	Housekeeping
PPIA	peptidylprolyl isomerase A	Housekeeping

表 2 nCounter 解析システムで測定した標的遺伝子

4.13 統計学的検討

全ての統計解析は、JMP Proversion 17 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) および GraphPad Prism ver. 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。 連続変数については、正規分布する場合は平均値±標準偏差もしくは平均値±標 準誤差で表し、非正規分布の場合は四分位範囲付き中央値で表した。2 群間の連 続変数の比較には、正規分布の場合は対応のないt検定、正規分布以外のデータ に対しては Mann-Whitney U検定を用いた。カテゴリー変数の比較には、カイニ 乗検定またはフィッシャーの正確検定を用いた。連続変数間の線形関係を決定 するためにピアソンの相関分析を行った。POAF の潜在的危険因子として知られ ている年齢、性別、併存疾患、心電図または心エコーパラメータ、CT スキャン を用いて評価した EAT 体積を含む変数に加え、EAT の分子・形態学的パラメー タ、ミトコンドリア呼吸能を説明変数に加え、ロジスティック回帰分析を行な った。3 群間の比較には一元配置分散分析または Kruskal-Wallis 検定を行い、多 重検定の post hoc 分析には Tukey-Kramer 検定または Wilcoxon 順位和検定を用い た。統計的有意性は p<0.05 とした。

5. 実験結果

5.1 患者背景と臨床的特徴

5.1.1 患者背景

表3に患者背景を示す。全体の平均年齢は68.3±9.7歳で、31人(58%)が男性であった。手術後7日以内にPOAFが同定されたのは、全症例中18例(34%)であった。ほとんどの患者に高血圧(72%)、脂質異常症(68%)が見られた。 冠動脈疾患と糖尿病はそれぞれ26例(49%)と17例(32%)であった。POAF 群とSR群(術後も洞調律を維持した患者群)の比較において、血液検査所見 および内服薬に両群間で有意差は認められなかった。また、手術術式の種類、 手術時間、人工心肺時間、大動脈遮断時間および術後のカテコラミン使用の有 無についても両群間に有意差は認められなかった(表4)。

	全体	POAF 群	SR 群	п店
	(n = 53)	(n = 18)	(n = 35)	Υ阻
年齢,(歳)	68.3 ± 9.7	70.8 ± 7.4	67.1 ± 10.6	0.193
男性,n(%)	31 (58)	11 (61)	20 (57)	0.781
体重, kg	61.6 ± 12.4	60.0 ± 11.8	62.4 ± 12.8	0.506
BMI, kg/cm ²	23.7 ± 3.9	23.0 ± 3.6	24.1 ± 4.0	0.371
既往歴				
高血圧	38 (72)	15 (83)	23 (66)	0.215
糖尿病	17 (32)	4 (22)	13 (37)	0.358
脂質異常症	36 (68)	18 (72)	23 (66)	0.760
冠動脈疾患	26 (49)	9 (50)	17 (48)	0.922
慢性腎臓病	25 (47)	10 (56)	15 (43)	0.381
心不全入院歴	8 (15)	4 (22)	4 (11)	0.421
血液検査初見				
BUN, mg/dL	18.7 (13.7-21.9)	20.0 (15.3-22.2)	17.0 (13.7-21.6)	0.322
Cre, mg/dL	0.88 (0.71-1.10)	1.01 (0.74-1.15)	0.86 (0.71-1.07)	0.970
TG, mg/dL	115 (69-172)	110 (66-174)	115 (77-172)	0.504
TC, mg/dL	173 (142-207)	172 (142-195)	173 (142-208)	0.937
HDL-C, mg/dL	52 (45-64)	53 (41-68)	51 (45-61)	0.682
LDL-C, mg/dL	93 (70-119)	90 (53-120)	93 (77-116)	0.625
HbA1c, %	5.8 (5.6-6.6)	5.7 (5.5-6.5)	5.9 (5.6-6.7)	0.414
CRP, mg/dL	0.08 (0.04-0.18)	0.07 (0.05-0.25)	0.08 (0.03-0.14)	0.527
内服薬				
β 遮断薬	21 (40)	8 (44)	13 (37)	0.607
ACEi / ARB	29 (55)	9 (50)	20 (57)	0.621
スタチン	34 (64)	10 (56)	24 (69)	0.380
抗糖尿病薬	17 (32)	4 (22)	13 (37)	0.358
利尿薬	15 (28)	7 (39)	8 (23)	0.220

表3 患者背景

連続変数は平均 ± 標準偏差もしくは, 中央値 (IQR) で表記した。カテゴリー変 数は患者数 (%)で表記した。BMI, body mass index; BUN, blood urea nitrogen; Cre, creatinine; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HbA1c, hemoglobin A1c; CRP, Creactive protein; ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker

表4 手術の種類と手術時間

	合計	POAF 群	SR 群	п荷
	(n = 53)	(n = 18)	(n = 35)	Υ阻
CABG	16 (30)	6 (33)	10 (29)	0.759
AVR	11 (20)	3 (17)	8 (23)	0.730
MVR	12 (23)	5 (28)	7 (20)	0.411
Aorta replacement	1 (2)	0 (0)	1 (3)	>0.999
CABG + AVR	3 (5)	1 (6)	2 (6)	>0.999
CABG + Aorta replacement	1 (2)	0 (0)	1 (3)	>0.999
AVR + MVR	3 (5)	2 (11)	1 (3)	0.263
AVR + Aorta replacement	5 (9)	1 (6)	4 (11)	0.651
手術時間,分	356 (319-439)	373 (304-490)	365 (320-429)	0.370
人工心肺時間,分	211 (154-258)	234 (153-256)	191 (151-261)	0.840
大動脈遮断時間, 分	120 (92-167)	149 (103-179)	116 (89-171)	0.452
術後カテコラミン投与	31 (58)	12 (67)	19 (54)	0.386

データは中央値 (IQR) もしくは患者数 (%) で表記した。

CABG, coronary artery bypass graft; AVR, aortic valve replacement; MVR, mitral valve replacement / repair

5.1.2 経胸壁心エコー図検査

表5に経胸壁心エコー図検査の結果を示す。左室拡張末期径 (LVDd)、左室収縮末期径 (LVDs)、左室駆出率 (LVEF) は両群間に差は認められなかったが、 左房径 (LAD) は POAF 群で有意に高値であり (45.1±6.5 mm vs 39.6±6.5 mm; p=0.006)、LAVI は POAF 群で大きい傾向にあった (58.0 vs 38.2 mL/m²; p=0.071)。また、左房リモデリングの進行を示唆する左房の容積指標はすべて POAF 群で低い傾向がみられたが、いずれも有意差は見られなかった。

	合計	POAF 群	SR 群	п荷
	(n = 53)	(n = 18)	(n = 35)	P但
IVST, mm	10.7 ± 2.0	10.7 ± 1.9	10.7 ± 2.0	0.956
LVPWT, mm	9.6 ± 1.8	9.8 ± 2.0	9.5 ± 1.7	0.612
LVDd, mm	49.8 ± 7.9	50.0 ± 9.1	49.6 ± 7.4	0.863
LVDs, mm	35.0 ± 7.9	35.1 ± 9.3	34.9 ± 7.2	0.962
LVEF, %	57 (47-65)	61 (47-66)	55 (47-64)	0.626
E, cm/s	66.5 (56.5-95.2)	74.1 (55.0-112.0)	66.1 (56.6-88.5)	0.181
A, cm/s	81.2 (64.2-93.9)	82.3 (67.1-93.0)	80.3 (60.7-94.9)	0.307
E/A	0.8 (0.7-1.2)	0.95 (0.65-1.29)	0.80 (0.70-1.20)	0.936
E/e'	11.0 (8.2-13.4)	12.5 (9.3-18.6)	9.2 (7.6-12.5)	0.046
LAD, mm	41.5 ± 7.0	45.1 ± 6.5	39.6 ± 6.5	0.006
LAVI, mL/m ²	46.4 (33.5-62.6)	58.0 (45.9-69.4)	38.2 (28.2-57.3)	0.071
LAEF, %	47.6 ± 12.0	44.2 ± 12.1	49.5 ± 11.8	0.176
LA expansion index, %	92.0 (67.0-128.0)	77.0 (56.0-127.0)	100.0 (68.0-141.0)	0.181
LA passive EF, %	27.0 (12.0-31.0)	26.0 (19.0-31.0)	32.0 (20.0-38.0)	0.618
LA active EF, %	28.5 ± 12.2	25.1 ± 10.0	30.5 ± 13.0	0.170

表5	経胸壁心エコー検査
1X J	

データは平均 ± 標準偏差もしくは、中央値 (IQR) で表記した。

IVST, interventricular septum thickness; LVPWT, left ventricular post wall thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVDs, left ventricular end-systolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; LAD, left atrial dimeter; LAVI, left atrial volume index; LAEF, left atrial emptying fraction

5.1.3 12 誘導心電図検査

表6に12誘導心電図検査の解析結果を示す。PR時間、P波のばらつきを表す Pwave dispersion、V1誘導のP波持続時間、P波持続時間、P波高値および QRS 幅は両群間で有意な差は認められなかった。II 誘導の最大および最小P波 持続時間、V1誘導のP波振幅、V1誘導のPwave terminal force (PTFV1)、V1 誘導のPwave area は SR 群と比較して POAF 群で有意に高値であった。

	合計	POAF 群	SR 群	р 荷
	(n = 53)	(n = 18)	(n = 35)	Г 但
PR 時間, msec	174 (159-192)	175 (163-192)	172 (156-194)	0.607
最小P波持続時間, msec	102 (92-117)	110 (99-120)	101 (90-110)	0.015
最大 P 波持続時間, msec	130 (120-140)	138 (120-146)	127 (117-136)	0.019
P wave dispersion, msec	24 (19-36)	24.5 (20-35.5)	22 (16-36)	0.730
P波持続時間 (V1), msec	53 (44-66)	52 (46-71)	53 (43-65)	0.618
P波高值 (V1), 10 ⁻² mV	5.4 (3.6-6.4)	6.3 (5.1-8.0)	4.3 (3.2-5.8)	0.013
P'波持続時間 (V1), msec	64 (55-75)	73 (61-83)	59 (51-71)	0.090
P'波高值 (V1), 10 ⁻² mV	5.0 (3.8-7.2)	6.3 (4.8-7.9)	4.7 (3.2-7.2)	0.213
PTFV1, msec*mV	3.5 (2.0-5.3)	4.3 (3.5-6.2)	2.9 (1.9-4.2)	0.044
P wave area, msec*mV	6.5 (4.7-8.4)	7.5 (6.5-13.0)	5.8 (4.3-7.5)	0.007
QRS 幅, msec	98 (88-116)	94 (87-117)	103 (89-116)	0.397

表 6 12 誘導心電図検査

データは中央値 (IQR) で表記した。

PTFV1, P wave terminal force in lead V1

5.2 POAF との関連性についての検討

5.2.1 EAT 体積

CT で評価した術前の EAT 体積を表7に示す。心臓全体、右房および左房周囲 に分けて測定した EAT 体積は、いずれも両群間で有意な差は認められなかっ た。さらに、EAT 体積は 12 誘導心電図検査や経胸壁心エコー図検査のいずれ の指標とも相関関係は認められなかった。

表7 CTで測定した術前の EAT 体積

EAT 体積	合計 (n=53)	POAF 群 (n = 18)	SR 群 (n=35)	P 値
全体, cm ³	171 (131-253)	150 (119-193)	183 (132-284)	0.144
右房周囲, cm ³	15.7 (11.6-20.0)	15.0 (12.2-16.6)	16.0 (11.2-23.1)	0.364
左房周囲, cm ³	20.0 (11.2-30.1)	18.1 (13.1-22.5)	21.1 (11.1-33.8)	0.257

データは中央値 (IQR) で表記した。

EAT, epicardial adipose tissue

5.2.2 EAT ミトコンドリア呼吸能

図9に両群間におけるEAT ミトコンドリア呼吸能の比較を示す。EAT 湿重量で 補正した酸素消費速度はいずれの呼吸状態においても両群間で有意な差は見ら れなかった(図9A)。また、単位重量あたりに含まれるミトコンドリア量の影 響を鑑み、mtDNA コピー数で補正した酸素消費速度についても比較したが、 両群間で有意差は見られなかった(図9B)。



ADP 非存在トにおける定常状態および非脂肪酸もしくは脂肪酸基質を用いてミ トコンドリア呼吸を促進させた各呼吸状態における酸素消費速度を示す。縦軸 は O2k 装置の測定チャンバー内における酸素消費速度であり、左図は EAT の湿 重量のみで補正した酸素消費量 (pmol/s/mg EAT) 、右図はさらに mtDNA コピー 数で補正した酸素消費速度 (pmol/s/mg EAT/mtDNA/nDNA × 10⁴) を表す。POAF 群 (n=18) は橙、SR 群 (n=35) 群は黒で表した。バーは平均 ± 標準偏差を示 す。CI, complex I-linked substrate; CI + II, complex I + II-linked substrate; ETS, maximal electron transfer system capacity; FAO, fatty acid oxidation; LEAK, leak-state respiration; OXPHOS, oxidative phosphorylation capacity (ADP-stimulated respiration)

5.2.3 脂肪細胞面積

図 10 は採取した EAT の代表的な組織標本画像である。採取された EAT は直接心筋とは接していない心外膜側の脂肪組織であり、殆どが脂肪細胞で構成されていた。一部に少数のリンパ球浸潤が認められたが、その他の炎症細胞浸潤や線維化は殆ど認められなかった。従って、本研究においては炎症性細胞浸潤や線維化の程度については評価を行わなかった。平均脂肪細胞面積はPOAF 群および SR 群において有意差は認められなかった(平均 ± 標準偏差: 2,145 ± 559 µm² vs. 2,442 ± 798 µm²)。



バーは平均 ± 標準偏差を示す。

5.2.4 EAT secretome 中のタンパク量

採取された EAT 検体の量が少ない症例において、Conditioned medium 中のタン パク質濃度が低下している可能性が考えられたため、測定する症例の選択には Conditioned medium 作成に用いた EAT 検体の量を考慮した。また、POAF 群と SR 群の症例数にも配慮し、合計で 36 症例において EAT secretome 中のタンパ ク質濃度を測定した。図 11 に Conditioned medium 中に含まれる代表的なアディ ポカインと炎症および線維化に関わるサイトカインのタンパク質濃度を示す。 測定したサイトカインのうち、IL-1β、Leptin および TNF-α についてはほとんど の症例で測定キットの検出感度下限を下回っていたため、解析から除外した。 また各サイトカインにおいて、蛍光の検出が困難な症例、測定キットの測定可 能範囲を逸脱した症例は解析から除外した。その結果、アディポネクチン、IL-1β、IL-6、IL-8、PAI-1、MCP-1 およびレジスチンは POAF 群と SR 群において 有意な差は見られなかった。





EAT secretome に含まれる代表的なアディポカインおよびサイトカインのタンパ ク質濃度を示す。アディポネクチン、IL-8、MCP-1 のサンプル数は POAF 群で 8、SR 群で 21 であった。IL-6 とレジスチンは POAF 群および SR 群のサンプル 数がそれぞれ 7 および 16、PAI-1 のサンプル数は 8 および 20 であった。グラフ のバーは平均値 ± 標準偏差を示し、統計解析は対応のない t 検定を行った。

5.2.5 mRNA 発現

表8にEATにおけるmRNA遺伝子発現レベルを示す。ミトコンドリアの生合成に関連するミトコンドリア転写因子A(TFAM)の遺伝子発現は、POAF群ではSR群よりも低い傾向にあった(p=0.059)。しかし、他のmRNA発現レベルについては、両群間に有意な差は認められなかった。

表8 EAT における mRNA 遺伝子発現

	POAF 群 (n = 15)	SR 群 (n=32)	P 値
ADIPOQ	17,086 (12,766-27,004)	17,406 (13,558-24,330)	0.991
ADIPOR1	120.1 (104.0-146.9)	112.1 (98.3-123.6)	0.114
ADIPOR2	1,215 (995-1,504)	1,165 (983-1,406)	0.627
CCL2	1,102 (716-3,344)	1,564 (956-3,566)	0.303
CIDEA	5,226 (3,756-9,221)	4,782 (3,814-6,979)	0.866
GDF-15	30.91 (23.26-79.28)	33.53 (26.16-55.20)	0.761
HOXC9	13.11(9.57-30.22)	16.45 (10.60-25.63)	0.901
IL-10	73.89 (45.56-98.14)	64.60 (42.25-91.58)	0.778
IL-1β	38.6 (23.86-51.57)	53.42 (35.65-90.41)	0.103
IL-6	121.7 (71.6-261.0)	142.08 (78.94-1248.19)	0.553
ITLN1	24,475 (7,999-75,131)	68,053 (12,863-164,832)	0.252
LEP	2,149 (1,623-3,519)	2,848 (2,108-4,245)	0.108
NFE2L2	2,278 (2,035-2,499)	2,405 (2,097-2,896)	0.130
NRF1	173.2 (145.8-197.4)	169.1 (155.7-196.9)	0.955
PPARGC1A	80.66 (70.84-146.84)	89.08 (62.55-105.66)	0.371
PRKAA1	1,060 (993-1,088)	1,032 (972-1,146)	0.991
RETN	17.70 (12.25-39.44)	14.54 (12.22-20.84)	0.357
SIRT1	545.5 (501.0-576.2)	571.1 (523.8-623.4)	0.136
TBX1	162.7 (65.6-369.2)	106.6 (53.2-245.5)	0.225
TFAM	582.5 (521.9-683.5)	547.4 (488.5-587.4)	0.059
TNF-α	58.25 (34.87-190.5)	60.26 (34.52-83.17)	0.422
TNFRSF9	33.06 (24.12-42.38)	27.93 (20.79-39.72)	0.491
UCP-1	60.15 (43.29-100.85)	47.87 (24.46-84.65)	0.155

データは中央値 (IQR) で表記した。

5.3 多変量ロジスティック回帰分析

POAF 発生に関わる因子を同定するために、多変量ロジスティック回帰分析を行った。これまで POAF 発症との関連が示唆されている、年齢、性別、左房径、 LAVI などの項目に加え、総 EAT 体積、平均脂肪細胞面積、EAT における炎症性 遺伝子の発現レベル、EAT ミトコンドリア呼吸能を説明変数とした。本研究に おける POAF 発症率を考慮し、回帰解析に用いる説明変数の個数は2 個が妥当 と判断した。説明変数の選択方法として、上記の説明変数のうち最も POAF 発 症を説明しうる2 つの因子の組み合わせを総当たり法で検討したところ (Zhang, 2016)、TNF-α と平均脂肪細胞面積が最もよく POAF を予測する因子の組み合わ せであった (**表 9**)。

表9 多変量ロジスティック回帰分析

説明変数	オッズ比	95% 信頼区間	P 値
TNF-α, 100 Normalized count	2.89	1.010-8.520	0.024
平均脂肪細胞面積, nm²	0.85	0.729-0.983	0.009

また、図12にロジスティック回帰分析に用いた説明因子の相関行列を示す。最 終的に説明因子として残った TNF-α と平均脂肪細胞面積に相関関係は認められ なかった。



5.4 POAF 予測因子に基づく群分け

ロジスティック回帰分析の結果に基づき、最も良い POAF 予測因子の組み合わ せとして同定した、TNF-α と平均脂肪細胞面積の散布図を図 13 に示す。TNFα、平均脂肪細胞面積のカットオフ値をそれぞれ 100 カウント、3000 μ m² とし た場合、いずれもカットオフ値を上回る症例は存在しなかった。この散布図を 参照して、研究対象患者を TNF-α < 100 count かつ平均脂肪細胞面積 < 3000 μ m² のグループ 1、TNF-α ≥ 100 count かつ平均脂肪細胞面積 < 3000 μ m² のグループ 2、および TNF-α < 100 count かつ平均脂肪細胞面積 ≥ 3000 μ m² のグループ 3 の 3 群に分けた。



5.5 新規サブグループ間の比較

した新規サブグループに リア呼吸能、脂肪細胞面 見について比較した。

5.5.1 患者背景と臨床的特徴

表10に新規サブグループにおける患者背景と臨床的特徴の比較を示す。年 齢、性別、体重、BMI、既往歴、TGを除く血液検査所見および内服薬などの 患者背景は3群間で有意な差は認められなかった。TGは平均脂肪細胞面積が 大きいグループ3において高い傾向が見られた。CTで測定したEAT体積につ いては、心臓全体、右房周囲および左房周囲のいずれも3群間に有意差は認め られなかった。POAFはグループ1およびグループ2において、それぞれ8例 (29%)、7例(58%)に発症し、グループ2における発症率が最も高かった。興 味深いことに、グループ3においてPOAFを発症した患者は認められなかっ た。また、図13の散布図から分かるように、グループ2では、TNF-α遺伝子 発現が亢進している症例で、POAFの発症が多い傾向が見られた。

	グループ1	グループ2	グループ3	ъ 🖽	
	(n = 28)	(n = 12)	(n = 7)	Υ值	
年齢, (歳)	67.0 ± 11.8	71.4 ± 5.1	70.8 ± 7.2	0.361	
男性,n(%)	16 (57)	7 (58)	6 (86)	0.366	
体重, kg	62.8 ± 11.7	57.1 ± 11.2	67.3 ± 15.8	0.195	
BMI, kg/cm ²	24.3 ± 3.5	22.4 ± 3.6	25.0 ± 5.5	0.271	
既往歴					
高血圧	20 (71)	11 (92)	5 (71)	0.435	
糖尿病	8 (29)	6 (50)	3 (43)	0.363	
脂質異常症	17 (61)	10 (83)	4 (57)	0.354	
冠動脈疾患	9 (32)	9 (75)	5 (71)	0.025	
慢性腎臓病	13 (46)	7 (58)	4 (57)	0.776	
POAF, n (%)	8 (29)	7 (58)	0 (0)	0.026	
血液検査初見					
BUN, mg/dL	15.9 (13.0-20.7)	21.9 (20.2-27.4)	19.0 (15.9-23.4)	0.110	
Cre, mg/dL	0.91 (0.70-1.10)	0.93 (0.72-1.36)	0.93 (0.74-1.30)	0.964	
TG, mg/dL	116 (83-174)	79 (64-134)	158 (93-407)	0.022	
TC, mg/dL	174 (150-208)	143 (135-182)	198 (173-230)	0.051	
HDL-C, mg/dL	50 (45-63)	49 (40-63)	55 (44-61)	0.944	
LDL-C, mg/dL	100 (76-123)	77 (54-97)	103 (79-122)	0.174	
HbA1c, %	5.8 (5.6-6.6)	6.1 (5.7-7.1)	6.1 (5.9-7.3)	0.561	
CRP, mg/dL	0.08 (0.04-0.23)	0.06 (0.04-0.10)	0.06 (0.04-0.14)	0.664	
内服薬					
β 遮断薬	9 (32)	8 (68)	3 (43)	0.123	
ACEi / ARB	16 (57)	8 (67)	4 (57)	0.915	
スタチン	15 (54)	10 (83)	5 (71)	0.218	
抗糖尿病薬	8 (29)	6 (50)	3 (43)	0.363	
利尿薬	7 (25)	5 (42)	1 (14)	0.474	
EAT 体積					
全体, cm ³	150 (130-278)	161 (94-213)	199 (171-276)	0.422	
右房周囲, cm ³	14.8 (11.7-26.1)	15.6 (10.1-17.4)	19.4 (13.7-22.5)	0.529	
左房周囲, cm ³	19.8 (11.0-33.8)	15.9 (12.3-28.5)	27.6 (16.7-31.2)	0.914	

表 10 新規サブグループにおける患者背景

平均脂肪細胞面 2,257 2,291 3,487 積, µm² (1,632-2,601)[†] (1,919-2,442)[†] (3,056-3,771) <0.001

連続変数は平均 ± 標準偏差もしくは、中央値 (IQR) で表記した。カテゴリー変数は患者数 (%)で表記した。

[†]p < 0.001 vs. グループ3

BMI, body mass index; BUN, blood urea nitrogen; Cre, creatinine; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HbA1c, hemoglobin A1c; CRP, C-reactive protein; ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; EAT, epicardial adipose tissue

次に、新規サブグループにおける 12 誘導心電図検査および経胸壁心エコー図 検査所見の比較を表 11 に示す。3 群間では POAF 発症率に有意差が認められた にも関わらず、心房リモデリングを示唆する心電図、心エコー所見について、 3 群間に有意な差は認められなかった。

	グループ1	グループ2	グループ3	70 体	
	(n = 28)	(n = 12)	(n = 7)	P 徂	
12 誘導心電図検査					
PR 時間, msec	176 (165-193)	178 (158-194)	160 (144-198)	0.577	
最小P波持続時間, msec	103 (96-118)	101 (92-113)	90 (85-103)	0.343	
最大 P 波持続時間, msec	129 (122-136)	140 (113-143)	123 (111-130)	0.654	
P-wave dispersion, msec	22 (17-34)	28 (20-40)	25 (20-42)	0.859	
P波持続時間 (V1), msec	54 (47-64)	46 (36-50)	47 (35-53)	0.603	
P波高值 (V1), 10 ⁻² mV	5.2 (3.6-6.3)	4.9 (3.1-7.8)	4.5 (4.0-7.5)	0.936	
P'波持続時間 (V1), msec	64 (55-73)	75 (65-81)	57 (47-58)	0.536	
P'波高值 (V1), 10 ⁻² mV	5.7 (4.0-7.2)	5.5 (3.8-6.8)	5.0 (4.3-9.7)	0.343	
PTFV1, msec*mV	3.5 (2.2-5.0)	3.3 (2.7-5.0)	2.9 (1.9-5.9)	0.909	
P wave area, msec*mV	6.4 (4.8-8.2)	6.3 (4.1-7.6)	4.8 (3.9-10.7)	0.984	
QRS 幅, msec	97 (89-114)	94 (86-122)	114 (88-166)	0.196	
経胸壁心エコー図検査					
IVST, mm	10.8 ± 2.0	10.8 ± 1.7	10.6 ± 1.5	0.970	
LVPWT, mm	9.8 ± 1.6	9.2 ± 1.7	9.2 ± 1.5	0.463	
LVDd, mm	50.2 ± 7.4	46.9 ± 6.6	$49.3{\pm}~5.6$	0.390	
LVDs, mm	35.0 ± 7.2	33.2 ± 7.8	35.9 ± 6.3	0.691	
LVEF, %	58	55	50	0.420	
	(49-66)	(40-66)	(43-56)	0.420	
E, cm/s	69.5	65.7	86.9 (52.2-	0.070	
	(53.0-89.4)	(59.3-104.0)	104.0)	0.979	
A, cm/s	72.6	85.3	86.3 (77.3-	0 221	
	(61.8-91.9)	(69.1-97.7)	106.2)	0.221	
E/A	0.95	0.78	0.70 (0.70-	0.570	
	(0.63-1.28)	(0.67-1.20)	1.20)	0.570	
E/e'	9.3	13.3	11.9	0 465	
	(8.0-12.3)	(7.6-20.2)	(8.3-13.2)	0.403	
LAD, mm	42.4 ± 5.2	40.3 ± 5.7	40.3 ± 5.7	0.433	
LAVI, mL/m ²	47.0	51.9	35.2	0.224	
	(40.0-64.4)	(28.0-63.7)	(33.2-48.9)	0.334	

表 11 新規サブグループにおける 12 誘導心電図および経胸壁心エコー図検査

連続変数は平均 ± 標準偏差もしくは 中央値 (IQR) で表記した。

PTFV1, p-wave terminal force in lead V1; IVST, interventricular septum thickness; LVPWT, left ventricular post wall thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVDs, left ventricular end-systolic diameter; FS, fractional shortening; LVEF, left ventricular ejection fraction; LAD, left atrial diameter; LAVI, left atrial volume index

5.5.2 EAT ミトコンドリア呼吸能

新規サブグループで比較した EAT ミトコンドリア呼吸能を図 14 に示す。EAT 湿重量で補正した酸素消費速度は、いずれの呼吸状態においても、グループ1 と比較してグループ2 およびグループ3 の患者群おいて低い傾向がみられたものの、3 群間の検討では有意差は認められなかった。また mtDNA コピー数で 補正した酸素消費速度は、補正前と同様の傾向が認められ、CI_OXPHOS with FAO および CI_OXPHOS with FAO の呼吸状態において3 群間に有意差が認められた。CI_OXPHOS with FAO の post hoc 解析ではグループ1 と比較してグル ープ2 が有意に低値であった (p=0.0357)。



stimulated respiration)

5.5.3 EAT secretome 中のタンパク量

図 15 に新規サブグループ間で比較した EAT secretome 中のタンパク質濃度を示 す。最も発現量の多いアディポカインの一つであるアディポネクチンについて は3 群間で有意な差は見られなかった。また、組織の炎症・線維化・炎症細胞 の遊走を促進させるサイトカインである IL-6、IL-8、MCP-1 および PAI-1 につ いても、3 群間で有意差は認められなかった。一方で、代表的なアディポカイ ンの一つであるレジスチンは、グループ1と比較して、グループ2 において発 現が亢進していた (p=0.0147)。



5.5.4 mRNA 発現

図 16 に nCounter Analysis System で測定した EAT の mRNA 発現レベルを示す。 炎症性ケモカインである CCL2 (MCP-1)、IL-6、GDF-15 (免疫反応に関連する サイトカイン様タンパク質)の mRNA 発現量は、グループ1と比較してグルー プ2およびグループ3において高値であった。また炎症性サイトカインである IL-1β、TNF-αおよび TNFRSF9 (TNF 受容体スーパーファミリーメンバー) はグ ループ1と比較してグループ2において高値であったが、グループ1とグルー プ3の比較においては有意差を認められなかった。一方、抗炎症性サイトカイ ンである IL-10 は、グループ1と比較してグループ2 およびグループ3 におい て高値を示した。アディポカインに関連する遺伝子については、ADIPOQ、 ADIPOR1は3群間で有意差は認められなかったが、ADIPOR2の発現はグルー プ1と比較してグループ2において低値であった。ミトコンドリア生合成に関 連するTFAMはグループ1およびグループ2と比較してグループ3で低値であ った。さらに、脂肪細胞のフェノタイプを特徴づける遺伝子発現については、 自色脂肪細胞で発現が多いHOXC9や褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞に 高発現しているUCP-1のいずれも3群間で有意な差は認められなかった。しか しながらグループ2およびグループ3では、グループ1と比較してHOXC9の 発現が亢進し、逆にUCP-1の発現が低下している傾向が見られた。





0.05 vs. グループ 3,^{††}p < 0.01 vs. グループ 3.

5.6 脂肪細胞面積とミトコンドリア呼吸能の関係

次に、全研究対象患者における平均脂肪細胞面積とEAT ミトコンドリア呼吸能 との相関分析を図 17 に示す。平均脂肪細胞面積と湿重量で補正したEAT ミトコ ンドリア呼吸能には有意な逆相関が観察された。それぞれの呼吸状態における 相関係数は CI_LEAK で-0.410、CI_OXPHOS で-0.501、CI_OXPHOS with FAO で-0.520、CI+II_OXPHOS with FAO で-0.530 であった。これらの相関関係につ いては、EAT ミトコンドリア酸素消費速度を mtDNA コピー数で補正しても同様 の傾向がみられた。



6. 考察

本研究では、心臓または胸部大動脈の手術を受けた患者において、EATの体積、 遺伝子発現、分泌産物、EATを構成する脂肪細胞の形態およびミトコンドリア呼 吸能などを調べることにより、EATと POAFの関係を多角的視点から検討した。 本研究で得られた主な知見は以下の通りである。

- 1) EAT のミトコンドリア呼吸能またはミトコンドリア DNA/ゲノム DNA 量は POAF 発症と関連しなかった。
- 2) EAT 体積は POAF 発症と関連しなかった。
- 3) EAT 体積は EAT における炎症性遺伝子の発現亢進、ミトコンドリア呼吸能の低下および EAT を構成する脂肪細胞の小型化など、EAT の質的側面の悪化とは相関しなかった。
- 4) EAT における TNF-α の遺伝子発現は POAF 発症と関連した。
- 5) EAT における IL-10 の mRNA 発現レベルの増加、炎症性サイトカイン遺伝 子の緩やかな増加を示す脂肪細胞サイズが大きい患者は POAF 発症率が最も 低かった。

EAT と心房細動の関係

これまでの多くの報告から、EAT の蓄積は、心房細動を発症する以前の段階か ら心房の電気的および構造的リモデリングの進行に関わっており (Kira et al., 2020:Nalliah et al., 2020)、心房の不整脈基質の形成の要因の1つと考えられてい る。EAT は心房細動発症の危険因子として知られている肥満や体重増加により 増加することも報告されており、EAT が肥満や体重増加による心房細動発症の リスクが上昇させる一因である可能性がある (Tedrow et al., 2010)。 POAF におい ても、古くからその発症を予測する多くの因子が報告されている (図2)。しか しながら、EAT と POAF との関連性については一定の見解が得られていないの が現状である。経胸壁心エコーで測定した EAT の厚さ (Gunturk et al., 2020; Wang et al., 2019) やCT で測定した EAT 体積 (Drossos et al., 2014; Opolski et al., 2015) が POAF と関連するという報告がある一方、CT で測定した左房周囲 EAT 体積 は POAF と関連しないという報告もある (Van Der Heijden et al., 2022)。これらの 相違は EAT の定量方法や対象患者の背景の違いに起因すると考えられる。例え ばEAT 体積とPOAF に関連があるとした多くの研究はBMI が 30 前後の欧米人 を対象としている。一方で、本研究や Wang Q らの報告は BMI が 23 前後のアジ ア人を対象とし、いずれも POAF の発症と EAT 体積についての関連性を見出す ことはできなかった。一方、EAT における炎症性遺伝子の発現亢進と POAF 発

症は BMI に関わらず、関係があったとする報告が多い。これらの研究結果は、 POAF の発生が EAT の量的側面よりも質的側面に依存する可能性を示唆している。

EAT の炎症と POAF 発症の関係について

EAT における炎症と心血管疾患、とくに冠動脈疾患に関連があることを示す研 究が相次いでいる (Cherian et al., 2012)。しかしながら、POAF の発症と EAT と の関係についての報告は限られている。Wang らは EAT 中の activin A の遺伝子 発現が POAF の独立した因子であると報告した。また Petraglia らは最近、EAT secretome 中の IL-6 および MCP-1 が POAF 発症と関連していた事を報告した。 さらに Mancio らは、大動脈弁置換術後に POAF を発症した患者において EAT の プロテオミクス解析を行ったところ、炎症性や血栓形成に関わるタンパク質の 発現亢進と脂肪細胞の分化障害・脂肪滴形成障害に関わるタンパク質の発現亢 進が見られたと報告した。今回の研究結果はこれらの研究結果と多くの部分で 一致していた。本研究において、POAF 発症率が最も高かったグループ2の患者 では、炎症性メディエーターとその受容体の mRNA 発現が増加していた。また グループ2の患者では、MCP-1として知られる CCL2の mRNA 発現が他の群と 比較して最も高値であった。他の炎症関連遺伝子である TNF-α、IL-1β、IL-6、 GDF-15、TNFRSF9 についてもグループ1と比較してグループ2において発現が 亢進していた。しかし、グループ3ではグループ1と比較して CCL2、IL-6、 GDF-15の発現が増加していたが、他の炎症性メディエーターの発現レベルは2 群間で同等であった。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 の mRNA 発現 量は、グループ1と比較してグループ2および3で発現が亢進していた。さら に興味深いことに、グループ3はPOAFを発症した患者が存在しなかった。発 現が亢進している炎症関連遺伝子の個数により組織全体の炎症程度を評価する ことは困難だが、炎症を伴う組織における抗炎症性遺伝子の発現亢進は、組織 における炎症をより軽減させる方向に変化させる可能性がある。これらの結果 は、EAT における炎症性メディエーターのバランスが、結果として POAF 発症 に影響する可能性を示唆すると考えられる。

EAT ミトコンドリア呼吸能

ミトコンドリアは脂肪細胞の分化成熟やアディポカインの分泌において重要な役 割を果たしている細胞内小器官である (Koh et al., 2007;Wang et al., 2013;Yu and Zhu, 2004)。単一の細胞としてではなく組織全体の機能という点において、EAT ミトコ ンドリア機能が様々な疾患の発症に関して重要な役割を果たしている可能性があ る。脂肪細胞におけるミトコンドリア生合成の増加は、脂肪前駆細胞の褐色脂肪細 胞への分化や非ふるえ熱産生と関連していると報告されている (Wilson-Fritch et al., 2003)。

近年の報告によると、肥満や2型糖尿病などの病的状態において、EAT のミトコ ンドリア機能、ミトコンドリア生合成および熱産生に関わる遺伝子発現や EAT か らの分泌物の内容が変化している事が明らかにされつつある (Greulich et al., 2012:Li et al., 2019; Vvas et al., 2021)。ミトコンドリア呼吸能はミトコンドリア機能の 指標の一つであり、細胞もしくは組織中に含まれる総ミトコンドリア量とミトコン ドリア個々の呼吸効率によって規定される。本研究においては、EAT の湿重量で 補正した EAT ミトコンドリア呼吸能と POAF の発症との関連性を調べたが、直接 的な関係を見出すことは出来なかった。湿重量のみの補正では単位重量あたりに含 まれるミトコンドリア量に結果が左右されるため、EAT 検体の mtDNA コピー数で 補正した EAT ミトコンドリア呼吸能と POAF の発症との関連性についても検討し たが、有意な相関関係は見られなかった。しかしながら、グループ2やグループ3 においては、グループ1と比較して EAT ミトコンドリア呼吸能が低下している傾 向が観察された。さらに、EAT ミトコンドリア呼吸能は脂肪細胞面積と逆相関し (図17)、アディポネクチンの分泌量と正相関していた。アディポネクチンは脂肪 細胞から分泌される代表的な抗炎症性アディポカインの一つであり、心血管疾患に 対して保護的作用を示す事が知られている (Shibata et al., 2007)。さらに肥大化した 脂肪細胞では炎症性サイトカインの遺伝子発現が亢進し、酸化的リン酸化に関わる 遺伝子発現が低下するという報告もある (Honecker et al., 2022)。これらの報告を考 慮すると、EAT ミトコンドリア呼吸能は EAT を構成する脂肪細胞の形態変化や secretome 中の特定のタンパク質濃度に影響を与え、EAT の質的側面を特徴づける 上で極めて重要な役割を果たしている可能性がある。

EAT における脂肪細胞の大きさの意義について

本研究は、非肥満患者において EAT の脂肪細胞の大きさと TNF-a の発現が POAF の予測因子であることを報告した初めての報告である。脂肪細胞は一般に肥大化に 伴って炎症性遺伝子の発現が亢進すると考えられている。しかしながら、内臓脂肪 組織の一つと考えられている卵巣脂肪組織において、組織の線維化が脂肪細胞の肥 大化を制限しているという報告もあり (Divoux et al., 2010) 、脂肪組織における脂 肪細胞の大きさと組織の炎症との関係性については未だ不明な点が多い。また、腸 管膜脂肪組織や EAT などの内臓脂肪組織における炎症と特定の疾患との関連性に ついて解明されていない点も多い。

Antonopoulus らは冠動脈疾患患者の血管周囲脂肪において血管壁からの距離と脂 肪細胞の大きさの変化について調査している (Antonopoulos et al., 2017) が、AFや POAF と EAT を構成する脂肪細胞の大きさとの関連については少数の報告に限ら れている。Ishii らは EAT の中心部と辺縁部の脂肪細胞の大きさの比が EAT と心房 の線維化と関連があり、この関係が持続性心房細動においてより顕著に見られるこ とを報告した (Ishii et al., 2021)。また、Mocanu らは CABG 術後に POAF を発症し た患者において、炎症細胞浸潤が強く見られた組織中の脂肪細胞が大きい事を報告 した (Mocanu et al., 2020)。さらに Mancio らは大動脈弁置換術後に POAF を発症し た患者において EAT のプロテオミクス解析を行い、炎症性および血栓性メディエ ーターの不均衡化を示し、脂肪細胞の分化と脂肪滴形成が障害されている事を示し た (Mancio et al., 2022)。これらの既報や本研究結果は、脂肪細胞の大きさと心房細 動の病因に何らかの関係性があることを示唆しているが、詳細なメカニズムについ てはほとんど未解明である。先述した Antonopoulos らは、冠動脈プラークから周 囲の脂肪組織に放出される炎症性メディエーターが脂肪前駆細胞の分化成熟を阻害 し、脂肪細胞が小型化させたと報告した (Antonopoulos et al., 2017)。この報告を踏 まえると、慢性炎症を伴う EAT では脂肪細胞の分化が障害され、脂肪細胞が小径 化する可能性がある。本研究では、最も脂肪細胞の面積が大きかったグループ3に おいて、POAFの発症率が最も低かった(表10)。逆に、最も炎症性遺伝子の発現 が亢進していたグループ1では大型の脂肪細胞が見られず、さらに高度の炎症性遺 伝子の発現亢進を伴う大型の脂肪細胞を有する患者群は見られなかった (図 13) 。この結果から、組織における高度炎症状態では脂肪細胞の分化成熟障害と

脂肪滴形成障害がおこり、脂肪細胞が小型化する可能性が示唆される。同時に、グ ループ3のEATにおいては、脂肪細胞の分化や脂肪滴の形成を障害するほどの高 度の慢性炎症は生じていなかったことも示唆する結果である。分化成熟障害を伴う 小型の脂肪細胞で構成されるEATは、手術侵襲により炎症性メディエーターを放 出する。これによりEATや直接接している心房筋に強い炎症状態が引き起こされ る事が、POAF発症の誘因となっている可能性がある(図18)。



図18 EAT における炎症と POAF 発症の関係の概念図

2型糖尿病や肥満などの全身性代謝性疾患により脂肪細胞に中性脂肪が蓄積され肥大化する。大型化した脂肪細胞は低悪性度の炎症を伴うが、炎症が高度になると脂肪細胞の分化障害および脂肪滴形成障害を引き起こし、脂肪細胞はむしろ小型化する。高度炎症を伴う脂肪組織では、外科手術などの侵襲により脂肪細胞からの炎症性メディエーターの放出を契機としてマクロファージ、リンパ球などの遊走・活性化を促進させる。この結果、心房へ直接的な炎症の波及や、交感神経活性化を介してPOAFを発症しやすい状態を作り出す。

本研究の限界

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究の症例数が少ない事が挙げら れる。本研究のサンプルサイズを考慮すると CM 中のタンパク質濃度や EAT にお ける遺伝子発現の比較において、サンプルサイズが小さいために検出力不足であっ た可能性が否定できない。また、新規サブグループ分類においては、TNF-αの発 現量と脂肪細胞面積の散布図を参考に分類を行なっているため、症例数次第ではそ の分布が変化する可能性がある。さらに、散布図による分類においては、縦軸およ び横軸の変数と同様の分布を示す変数の散布図を用いても同様の結果が得られる可 能性がある。第二に、本研究の対象患者群は POAF の発症率が比較的低かった可 能性がある。POAF の発症率は文献により様々であるが、一般的に CABG 後の POAF 発症率は 20%から 40%程度と報告されている(Mathew et al., 2004)。また、弁 膜症手術は CABG と比較してより高率に POAF を発症し、弁膜症手術と CABG を 同時に行う場合は、さらに高率に POAF を発症すると報告されている(Almassi et al., 1997)。本研究においては対象患者の70%が弁膜症もしくは同時に2カ所以上の 手術を受けており、CABG 後の POAF 発症率と比較した場合より高率に POAF を 発症する可能性が考えられた。POAFの発症率に影響した要因としては、高度の低 左心機能の症例を対象に含んでいないことや、術前にβ遮断薬を内服していた患者 が 40%含まれていたことなどが考えられる。第三に、本研究は POAF の発症と EAT における TNF-α 遺伝子発現および脂肪細胞面積との関連について、因果関係 を検討していない。第四に、CM 中のタンパク質濃度や EAT における RNA 発現量 の測定においては、検体中のタンパク質および核酸濃度を考慮して、一部の症例を 除外して測定したため、選択バイアスが結果に影響した可能性が否定できない。最 後に、遺伝子やタンパク質発現の評価は炎症や線維化に関わる主要な項目のみを評 価していない。従って、炎症や線維化に関わる遺伝子やタンパク質の発現をより広 範に調べる事で、POAF 群と SR 群に何らかの有意な差を見出す事ができた可能性 がある。

7. 総括及び結論

本研究の結果から明らかになった事項の要約を以下に述べる。

- 1. AFを発症していない心臓および大血管手術を受ける患者において、EAT ミトコ ンドリア呼吸能は POAF の発症とは直接的な関係はなかった。
- 2. CT で計測した EAT 体積は POAF の発症に関連しなかった。
- 3. CT で計測した EAT 体積の増加は EAT における炎症性遺伝子の発現亢進、ミト コンドリア呼吸能の低下および EAT を構成する脂肪細胞の小型化など、EAT の 質的側面の悪化とは相関しなかった。
- 4. EAT を構成する脂肪細胞の大きさや EAT における TNF-α、IL-10 などの炎症お よび抗炎症性遺伝子の発現量変化など、EAT の質的変化が POAF の発症に影響 を与えている可能性が示唆された。

本研究の意義

本研究はAFを発症する前段階において、EAT の量的側面に加え質的側面につい ても検討し、EAT の特徴を包括的に調べた点において新規性があると言える。近 年の研究により、EAT が心房の不整脈基質の形成に与える影響について、その機 序の一端が明らかにされつつある一方で、POAF に与える影響については一定の見 解が得られていない。さらに、これまでの EAT と AF に関する研究では、既に AF を発症している症例を対象とした報告が多く、EAT の質的側面を検討した報告は 限られている。特に EAT のミトコンドリア機能と不整脈との関連性については言 及している報告は殆どない。

本研究は、EAT はその量的側面だけではなく質的側面の変化が EAT の機能を評価 する上で重要であり、EAT の質的リモデリングが POAF 発症のリスクにつながる 可能性があることを示した。また、EAT の炎症の程度が POAF の発症に関わって いる可能性があるものの、EAT 体積やミトコンドリア機能については、EAT の炎 症の程度と直接的な関係がない事も明らかとなった。さらに抗炎症性遺伝子 IL-10 の発現の増加が、組織全体の炎症を緩和させる方向に働きかけている可能性も示唆 された。

今後の展開と課題について

EAT はその解剖学的特徴から、治療介入できる余地は限られている。しかしなが ら、肥満や糖尿病などの全身性代謝性疾患に対する介入や SGLT2 阻害薬などの EAT 量を減少させる可能性がある薬剤による治療介入が、心房の不整脈基質形成 を抑制できる可能性があり、早期治療介入による不整脈発症の予防効果が期待され る。また脂肪組織に炎症が発生するメカニズムや、脂肪細胞の炎症と脂肪細胞面積 およびミトコンドリア機能との関係についても未だ不明な点が多く、今後の課題で ある。今後、EAT の質的変化に対する治療介入の方法が明らかになり (Willar et al., 2023) 、AF のリスク低減という観点から EAT の質的変化を評価する非侵襲的アプ ローチが検討されることが期待される (Ishii et al., 2021;Mocanu et al., 2020)。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究院 内科学講座循環病態内科学教室 安斉俊久教授に感謝申し上げます。

社会医療法人社団カレスサッポロ北光記念病院不整脈部門、北海道大学大学院医 学研究院内科学講座循環病内科学教室客員研究員 渡邉昌也先生には博士課程での 研究全般・学位論文作成に、御多忙の中、多くの御指導をして頂き大変感謝申し上 げます。

重ねて、親身なご助言を頂きました北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環 病態内科学教室 天満太郎助教、並びに北海道大学大学院医学研究院心不全遠隔医 療開発学分野 中尾元基特任助教、北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病 態内科学教室 甲谷太郎先生、北海道大学大学院医学研究院内科学分野循環病態内 科学教室 門坂崇秀特任助教に深く感謝の意を表します。

本研究において、御協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分 野循環病態内科学教室 甲谷次郎医員、西野広太郎医員、立田大志郎医員、齋藤翔 太医員、並びに循環病態内科学教室の先生方に深く感謝申し上げます。

本研究において、ミトコンドリア呼吸能の測定で、貴重な御指導・御助言を頂 き、データ解析と論文の作成において多大に御助力頂きました北海道大学病院医 療・ヘルスサイエンス研究開発機構 横田卓特任講師、並びに北海道大学病院医 療・ヘルスサイエンス研究開発機構 プロモーションユニットデータサイエンスセ ンターセンター長 伊藤陽一教授に深く感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者として心臓周囲脂肪の採取に御助力頂きました北海 道大学大学院医学研究院外科系部門外科学分野心臓血管外科学教室 若狭哲教授、 新宮 康栄講師、並びに手稲渓仁会病院循環器外科 奈良岡秀一先生、西岡成知先 生、増田貴彦先生、三浦修平先生、越智香代子様に深く感謝申し上げます。

また本研究の実験遂行にあたり多大なご助力をいただきました実験助手の木村 友紀様、また医局秘書室の皆様に厚く御礼を申し上げます。

> 2024年3月 夏井 宏征

9. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

- Al Chekakie, M. O., Welles, C. C., Metoyer, R., Ibrahim, A., Shapira, A. R., Cytron, J., Santucci, P., Wilber, D. J. & Akar, J. G. 2010. Pericardial fat is independently associated with human atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*, 56, 784-8.
- Almassi, G. H., Schowalter, T., Nicolosi, A. C., Aggarwal, A., Moritz, T. E., Henderson, W. G., Tarazi, R., Shroyer, A. L., Sethi, G. K., Grover, F. L. & Hammermeister, K. E. 1997. Atrial fibrillation after cardiac surgery: a major morbid event? *Ann Surg*, 226, 501-11; discussion 511-3.
- Antonopoulos, A. S., Sanna, F., Sabharwal, N., Thomas, S., Oikonomou, E. K., Herdman, L., Margaritis, M., Shirodaria, C., Kampoli, A. M., Akoumianakis, I., Petrou, M., Sayeed, R., Krasopoulos, G., Psarros, C., Ciccone, P., Brophy, C. M., Digby, J., Kelion, A., Uberoi, R., Anthony, S., Alexopoulos, N., Tousoulis, D., Achenbach, S., Neubauer, S., Channon, K. M. & Antoniades, C. 2017. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. *Sci Transl Med*, 9.
- Armour, J. A., Murphy, D. A., Yuan, B. X., Macdonald, S. & Hopkins, D. A. 1997. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec*, 247, 289-98.
- Cherian, S., Lopaschuk, G. D. & Carvalho, E. 2012. Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303, E937-49.
- Chilukoti, R. K., Giese, A., Malenke, W., Homuth, G., Bukowska, A., Goette, A., Felix, S.
 B., Kanaan, J., Wollert, H. G., Evert, K., Verheule, S., Jais, P., Hatem, S. N.,
 Lendeckel, U. & Wolke, C. 2015. Atrial fibrillation and rapid acute pacing regulate adipocyte/adipositas-related gene expression in the atria. *Int J Cardiol*, 187, 604-13.
- Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J. D., Bedossa, P. & Clement, K. 2010. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*, 59, 2817-25.
- Drossos, G., Koutsogiannidis, C.-P., Ananiadou, O., Kapsas, G., Ampatzidou, F., Madesis, A., Bismpa, K., Palladas, P. & Karagounis, L. 2014. Pericardial fat is strongly associated with atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery[†]. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 46, 1014-1020.
- Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., Fell, H. P., Ferree, S., George, R. D., Grogan, T., James, J. J., Maysuria, M., Mitton, J. D.,

Oliveri, P., Osborn, J. L., Peng, T., Ratcliffe, A. L., Webster, P. J., Davidson, E. H., Hood, L. & Dimitrov, K. 2008. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology*, 26, 317-325.

- Greulich, S., Maxhera, B., Vandenplas, G., De Wiza, D. H., Smiris, K., Mueller, H.,
 Heinrichs, J., Blumensatt, M., Cuvelier, C., Akhyari, P., Ruige, J. B., Ouwens, D. M. &
 Eckel, J. 2012. Secretory products from epicardial adipose tissue of patients with type
 2 diabetes mellitus induce cardiomyocyte dysfunction. *Circulation*, 126, 2324-34.
- Gunturk, E. E., Topuz, M., Serhatlioğlu, F. & Akkaya, H. 2020. Echocardiographically Measured Epicardial Fat Predicts New-onset Atrial Fibrillation after Cardiac Surgery. *Braz J Cardiovasc Surg*, 35, 339-345.
- Haemers, P., Hamdi, H., Guedj, K., Suffee, N., Farahmand, P., Popovic, N., Claus, P.,
 Leprince, P., Nicoletti, A., Jalife, J., Wolke, C., Lendeckel, U., Jais, P., Willems, R. &
 Hatem, S. N. 2017. Atrial fibrillation is associated with the fibrotic remodelling of
 adipose tissue in the subepicardium of human and sheep atria. *Eur Heart J*, 38, 53-61.
- Hirose, T., Kawasaki, M., Tanaka, R., Ono, K., Watanabe, T., Iwama, M., Noda, T., Watanabe, S., Takemura, G. & Minatoguchi, S. 2012. Left atrial function assessed by speckle tracking echocardiography as a predictor of new-onset non-valvular atrial fibrillation: results from a prospective study in 580 adults. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 13, 243-50.
- Honecker, J., Ruschke, S., Seeliger, C., Laber, S., Strobel, S., Pröll, P., Nellaker, C.,
 Lindgren, C. M., Kulozik, U., Ecker, J., Karampinos, D. C., Claussnitzer, M. &
 Hauner, H. 2022. Transcriptome and fatty-acid signatures of adipocyte hypertrophy and its non-invasive MR-based characterization in human adipose tissue. *EBioMedicine*, 79, 104020.
- Hou, Y., Scherlag, B. J., Lin, J., Zhang, Y., Lu, Z., Truong, K., Patterson, E., Lazzara, R., Jackman, W. M. & Po, S. S. 2007. Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input: effects on sinus rate, atrioventricular conduction, refractoriness, and inducibility of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*, 50, 61-8.
- Ishii, Y., Abe, I., Kira, S., Harada, T., Takano, M., Oniki, T., Kondo, H., Teshima, Y., Yufu, K., Shuto, T., Wada, T., Nakagawa, M., Shimada, T., Asayama, Y., Miyamoto, S. & Takahashi, N. 2021. Detection of fibrotic remodeling of epicardial adipose tissue in patients with atrial fibrillation: Imaging approach based on histological observation. *Heart Rhythm O2*, 2, 311-323.
- Kira, S., Abe, I., Ishii, Y., Miyoshi, M., Oniki, T., Arakane, M., Daa, T., Teshima, Y., Yufu,K., Shimada, T. & Takahashi, N. 2020. Role of angiopoietin-like protein 2 in atrial

fibrosis induced by human epicardial adipose tissue: Analysis using an organo-culture system. *Heart Rhythm*, 17, 1591-1601.

- Koh, E. H., Park, J. Y., Park, H. S., Jeon, M. J., Ryu, J. W., Kim, M., Kim, S. Y., Kim, M. S., Kim, S. W., Park, I. S., Youn, J. H. & Lee, K. U. 2007. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes*, 56, 2973-81.
- Li, S. J., Wu, T. W., Chien, M. J., Mersmann, H. J. & Chen, C. Y. 2019. Involvement of pericardial adipose tissue in cardiac fibrosis of dietary-induced obese minipigs- Role of mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1864, 957-965.
- Mancio, J., Sousa-Nunes, F., Martins, R., Fragao-Marques, M., Conceicao, G., Pessoa-Amorim, G., Barros, A. S., Santa, C., Ferreira, W., Carvalho, M., Miranda, I. M., Vitorino, R., Falcao-Pires, I., Manadas, B., Ribeiro, V. G., Leite-Moreira, A., Bettencourt, N. & Fontes-Carvalho, R. 2022. Decoding the radiomic and proteomic phenotype of epicardial adipose tissue associated with adverse left atrial remodelling and post-operative atrial fibrillation in aortic stenosis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 23, 1248-1259.
- Mathew, J. P., Fontes, M. L., Tudor, I. C., Ramsay, J., Duke, P., Mazer, C. D., Barash, P. G.,
 Hsu, P. H., Mangano, D. T., Investigators of the Ischemia, R., Education, F. &
 Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research, G. 2004. A multicenter risk
 index for atrial fibrillation after cardiac surgery. *JAMA*, 291, 1720-9.
- Mazurek, T., Zhang, L., Zalewski, A., Mannion, J. D., Diehl, J. T., Arafat, H., Sarov-Blat, L.,
 O'brien, S., Keiper, E. A., Johnson, A. G., Martin, J., Goldstein, B. J. & Shi, Y. 2003.
 Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*, 108, 2460-6.
- Mocanu, V., Timofte, D., Oboroceanu, T., Cretu-Silivestru, I. S., Pricope-Veselin, A., Moraru,
 M. & Butcovan, D. 2020. Association of Ghrelin Receptor and Inflammation in Peri-Atrial Adipose Tissue from Obese Patients with Postoperative Atrial Fibrillation. *Acta Endocrinol (Buchar)*, 16, 298-302.
- Nakajima, T., Yokota, T., Shingu, Y., Yamada, A., Iba, Y., Ujihira, K., Wakasa, S., Ooka, T., Takada, S., Shirakawa, R., Katayama, T., Furihata, T., Fukushima, A., Matsuoka, R., Nishihara, H., Dela, F., Nakanishi, K., Matsui, Y. & Kinugawa, S. 2019. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in epicardial adipose tissue is associated with decreased concentration of adiponectin and severity of coronary atherosclerosis. *Sci Rep*, 9, 3535.
- Nalliah, C. J., Bell, J. R., Raaijmakers, A. J. A., Waddell, H. M., Wells, S. P., Bernasochi, G.B., Montgomery, M. K., Binny, S., Watts, T., Joshi, S. B., Lui, E., Sim, C. B., Larobina,

M., O'keefe, M., Goldblatt, J., Royse, A., Lee, G., Porrello, E. R., Watt, M. J., Kistler, P. M., Sanders, P., Delbridge, L. M. D. & Kalman, J. M. 2020. Epicardial Adipose Tissue Accumulation Confers Atrial Conduction Abnormality. *J Am Coll Cardiol*, 76, 1197-1211.

- Opolski, M. P., Staruch, A. D., Kusmierczyk, M., Witkowski, A., Kwiecinska, S., Kosek, M., Jastrzebski, J., Pregowski, J., Kruk, M., Rozanski, J., Demkow, M., Ruzyllo, W. & Kepka, C. 2015. Computed tomography angiography for prediction of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting: Proof of concept. *Journal of Cardiology*, 65, 285-292.
- Parisi, V., Petraglia, L., Formisano, R., Caruso, A., Grimaldi, M. G., Bruzzese, D., Grieco, F. V., Conte, M., Paolillo, S., Scatteia, A., Dellegrottaglie, S., Iavazzo, A., Campana, P., Pilato, E., Lancellotti, P., Russo, V., Attena, E., Filardi, P. P. & Leosco, D. 2020.
 Validation of the echocardiographic assessment of epicardial adipose tissue thickness at the Rindfleisch fold for the prediction of coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 30, 99-105.
- Park, J. J., Park, J. H., Hwang, I. C., Park, J. B., Cho, G. Y. & Marwick, T. H. 2020. Left Atrial Strain as a Predictor of New-Onset Atrial Fibrillation in Patients With Heart Failure. *JACC Cardiovasc Imaging*, 13, 2071-2081.
- Petraglia, L., Conte, M., Comentale, G., Cabaro, S., Campana, P., Russo, C., Amaranto, I., Bruzzese, D., Formisano, P., Pilato, E., Ferrara, N., Leosco, D. & Parisi, V. 2022.
 Epicardial Adipose Tissue and Postoperative Atrial Fibrillation. *Front Cardiovasc Med*, 9, 810334.
- Qureshi, M., Ahmed, A., Massie, V., Marshall, E. & Harky, A. 2021. Determinants of atrial fibrillation after cardiac surgery. *Rev Cardiovasc Med*, 22, 329-341.
- Sahl, R. E., Hoy Helms, E. F., Schmucker, M., Flensted-Jensen, M., Ingersen, A., Morville, T., Dela, F., Helge, J. W. & Larsen, S. 2021. Reliability and variation in mitochondrial respiration in human adipose tissue. *Adipocyte*, 10, 605-611.
- Schauerte, P., Scherlag, B. J., Pitha, J., Scherlag, M. A., Reynolds, D., Lazzara, R. & Jackman, W. M. 2000. Catheter ablation of cardiac autonomic nerves for prevention of vagal atrial fibrillation. *Circulation*, 102, 2774-80.
- Shibata, R., Izumiya, Y., Sato, K., Papanicolaou, K., Kihara, S., Colucci, W. S., Sam, F., Ouchi, N. & Walsh, K. 2007. Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 1065-74.
- Shingu, Y., Yokota, T., Takada, S., Niwano, H., Ooka, T., Katoh, H., Tachibana, T., Kubota,S. & Matsui, Y. 2018. Decreased gene expression of fatty acid binding protein 3 in the

atrium of patients with new onset of atrial fibrillation in cardiac perioperative phase. *J Cardiol*, 71, 65-70.

- Tedrow, U. B., Conen, D., Ridker, P. M., Cook, N. R., Koplan, B. A., Manson, J. E., Buring, J. E. & Albert, C. M. 2010. The long- and short-term impact of elevated body mass index on the risk of new atrial fibrillation the WHS (women's health study). *J Am Coll Cardiol*, 55, 2319-27.
- Van Der Heijden, C. a. J., Verheule, S., Olsthoorn, J. R., Mihl, C., Poulina, L., Van Kuijk, S. M. J., Heuts, S., Maessen, J. G., Bidar, E. & Maesen, B. 2022. Postoperative atrial fibrillation and atrial epicardial fat: Is there a link? *Int J Cardiol Heart Vasc*, 39, 100976.
- Vyas, V., Blythe, H., Wood, E. G., Sandhar, B., Sarker, S. J., Balmforth, D., Ambekar, S. G., Yap, J., Edmondson, S. J., Di Salvo, C., Wong, K., Roberts, N., Uppal, R., Adams, B., Shipolini, A., Oo, A. Y., Lawrence, D., Kolvekar, S., Lall, K. S., Finlay, M. C. & Longhi, M. P. 2021. Obesity and diabetes are major risk factors for epicardial adipose tissue inflammation. *JCI Insight*, 6.
- Wang, C. H., Wang, C. C., Huang, H. C. & Wei, Y. H. 2013. Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. *FEBS J*, 280, 1039-50.
- Wang, Q., Min, J., Jia, L., Xi, W., Gao, Y., Diao, Z., Zhang, P., Wang, S., Yang, J., Wang, L., Zhang, Y. & Wang, Z. 2019. Human Epicardial Adipose Tissue Activin A Expression Predicts Occurrence of Postoperative Atrial Fibrillation in Patients Receiving Cardiac Surgery. *Heart Lung Circ*, 28, 1697-1705.
- Willar, B., Tran, K. V. & Fitzgibbons, T. P. 2023. Epicardial adipocytes in the pathogenesis of atrial fibrillation: An update on basic and translational studies. *Front Endocrinol* (*Lausanne*), 14, 1154824.
- Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloro, S., Czech, M.
 & Corvera, S. 2003. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, 23, 1085-94.
- Yoshizumi, T., Nakamura, T., Yamane, M., Islam, A. H., Menju, M., Yamasaki, K., Arai, T., Kotani, K., Funahashi, T., Yamashita, S. & Matsuzawa, Y. 1999. Abdominal fat: standardized technique for measurement at CT. *Radiology*, 211, 283-6.
- Yu, Y. H. & Zhu, H. 2004. Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E402-10.

Zhang, Z. 2016. Variable selection with stepwise and best subset approaches. *Ann Transl Med*, 4, 136.