



| | |
|---------------------|---|
| Title | 冠動脈硬化は心臓周囲脂肪ミトコンドリア機能障害と関連する |
| Author(s) | 中島, 孝之 |
| Description | 配架番号 : 2396 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第13017号 |
| Issue Date | 2018-03-22 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k13017 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/88838 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Takayuki_Nakajima.pdf |



学位論文

冠動脈硬化は心臓周囲脂肪

ミトコンドリア機能障害と関連する

(Coronary atherosclerosis is associated with
mitochondrial dysfunction in epicardial adipose tissue)

2018年3月

北海道大学

中島 孝之

学位論文

冠動脈硬化は心臓周囲脂肪

ミトコンドリア機能障害と関連する

(Coronary atherosclerosis is associated with
mitochondrial dysfunction in epicardial adipose tissue)

2018年3月

北海道大学

中島 孝之

目次

| | |
|--|----|
| 発表論文目録および学会発表目録..... | 1 |
| 1. 緒言..... | 3 |
| 2. 略語表..... | 8 |
| 3. 研究方法..... | 10 |
| 3.1. 対象患者..... | 10 |
| 3.2. EAT の処理..... | 10 |
| 3.3. ミトコンドリア呼吸能測定..... | 11 |
| 3.4. ミトコンドリア由来の ROS 産生量測定..... | 13 |
| 3.5. アディポネクチンの免疫組織学的評価..... | 14 |
| 3.6. EAT におけるアディポネクチンタンパク量測定..... | 15 |
| 3.6.1 タンパク抽出..... | 15 |
| 3.6.2 タンパク濃度測定..... | 15 |
| 3.6.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)..... | 16 |
| 3.7. EAT 体積測定..... | 18 |
| 3.8. 腹部内臓脂肪面積評価..... | 18 |
| 3.9. 冠動脈硬化重症度評価..... | 19 |
| 3.10. 統計学的解析..... | 20 |
| 4. 研究結果..... | 21 |
| 4.1. 患者背景および臨床的特徴..... | 21 |
| 4.2. EAT ミトコンドリア呼吸能..... | 23 |
| 4.3. EAT ミトコンドリア呼吸能と冠動脈硬化重症度との関連..... | 25 |
| 4.4. EAT ミトコンドリア由来の ROS 産生量..... | 26 |
| 4.5. EAT 体積..... | 27 |
| 4.6. EAT におけるアディポネクチン発現量..... | 29 |
| 5. 考察..... | 31 |
| 6. 総括および結論..... | 35 |
| 謝辞..... | 37 |
| 引用文献..... | 38 |

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。

- 1) Takayuki Nakajima, Takashi Yokota, Yasushige Shingu, Akira Yamada, Yutaka Iba, Kosuke Ujihira, Satoru Wakasa, Tomonori Ooka, Shingo Takada, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Arata Fukushima, Akimichi Saito, Ryosuke Matsuoka, Hiroshi Nishihara, Yoshiro Matsui, Shintaro Kinugawa: Coronary atherosclerosis is associated with mitochondrial dysfunction in epicardial adipose tissue. *International Journal of Cardiology*.

本研究の一部は以下の学会・研究会において発表・受賞した。

- 1) Takayuki Nakajima, Takashi Yokota, Yasushige Shingu, Akira Yamada, Yutaka Iba, Kosuke Ujihira, Satoru Wakasa, Tomonori Ooka, Shingo Takada, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Arata Fukushima, Yoshiro Matsui, Shintaro Kinugawa. The role of mitochondria in epicardial adipose tissue in coronary artery disease. 第8回 Young Diabetologist & Cardiologist Forum, 2017年6月15日, 札幌.
- 2) Takayuki Nakajima, Takashi Yokota, Yasushige Shingu, Akira Yamada, Yutaka Iba, Kosuke Ujihira, Satoru Wakasa, Tomonori Ooka, Shingo Takada, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Arata Fukushima, Yoshiro Matsui, Shintaro Kinugawa. Mitochondrial dysfunction in epicardial adipose tissue is associated with coronary artery stenosis. 第81回日本循環器学会学術

集会, 2017 年 3 月 17 日, 金沢.

- 3) Takayuki Nakajima, Takashi Yokota, Yasushige Shingu, Akira Yamada, Yutaka Iba, Kosuke Ujihira, Satoru Wakasa, Tomonori Ooka, Shingo Takada, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Arata Fukushima, Yoshiro Matsui, Shintaro Kinugawa. Mitochondrial dysfunction in epicardial adipose tissue; possible role in progression of coronary artery disease. 39th Annual Congress of the European Society of Cardiology, Aug 27, 2017, Barcelona, Spain.
- 4) Takayuki Nakajima, Takashi Yokota, Yasushige Shingu, Akira Yamada, Yutaka Iba, Kosuke Ujihira, Satoru Wakasa, Tomonori Ooka, Shingo Takada, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Arata Fukushima, Yoshiro Matsui, Shintaro Kinugawa. Coronary Artery Stenosis is Associated with Mitochondrial Dysfunction in Epicardial Adipose Tissue. 90th Scientific Sessions of the American Heart Association, Nov 12, 2017, Anaheim, California, USA.
- 5) Takayuki Nakajima, Takashi Yokota, Yasushige Shingu, Akira Yamada, Yutaka Iba, Kosuke Ujihira, Satoru Wakasa, Tomonori Ooka, Shingo Takada, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Arata Fukushima, Yoshiro Matsui, Shintaro Kinugawa. Mitochondrial dysfunction in epicardial adipose tissue is associated with coronary artery stenosis. 第 82 回日本循環器学会学術集会 第 35 回 YIA Clinical research 部門優秀賞最終候補, 2018 年 3 月 23 日, 大阪

1. 緒言

日本人は脳卒中の死亡率が高く、虚血性心疾患のリスクが低いことが疫学的な特徴とされており、WHOの死亡統計からも虚血性疾患死亡率は欧米と比較して1/5～1/10程度である。久山町で行われた疫学研究からは、日本人の冠動脈硬化の危険因子として認められたのは年齢、血圧、脂質異常症、糖尿病、肥満であり、これらは欧米での報告とほぼ同様である。¹戦後、我が国では生活水準の向上とともに生活習慣の欧米化が進み、肥満、脂質異常、耐糖能異常などの代謝性疾患有病率が増加傾向となっている。急速な人口の高齢化も伴い、2000年台に入り本邦の疫学研究では虚血性心疾患の発症はついに増加傾向と報告されるようにもなった。^{2,3}代謝性疾患に対する治療は急速な進歩を遂げてはいるものの有病率は増加傾向であり、今後虚血性心疾患死亡率が上昇に転じる可能性が懸念されている。冠動脈硬化の危険因子のコントロールのみならず、冠動脈硬化の発症・進展メカニズムの解明とともに新たな治療戦略の構築が喫緊な課題となっている。

代謝性疾患と深い関係を持つ臓器として脂肪がある。本来、脂肪がもつ役割として知られているのは、アディポサイトカインなどの内分泌機能、エネルギーの貯蓄という代謝機能、そして臓器の保温、クッションなどの機械的保護作用である。しかしながら、近年、加齢や肥満、高血圧、脂質異常症、糖尿病で代表される生活習慣病などに起因する過剰な脂肪、特に腹部内臓脂肪や骨格筋内脂肪などの異所性脂肪の蓄積がインスリン抵抗性や動脈硬化の進展に関与することが報告されている⁴。心臓周囲に蓄積する心臓周囲脂肪も異所性脂肪の一つであり、心外膜を境界にして心外膜内心臓周囲脂肪（epicardial adipose tissue; EAT）と心外膜外心臓周囲脂肪（pericardial adipose tissue; PAT）とに分けることができる。PATは心外膜の外側に存在するため心筋、冠動脈と直接接しているわけではない。一方、EATは心外膜の中に存在しており、線維性被膜のような境界なく心筋、冠動脈と接して存在している（図1-1）⁵。また、EAT

は健康成人の心臓重量の 20%程度を占め、心臓表面の 80%を覆っている組織である⁶。EAT は解剖学的に冠動脈と近接する位置関係にあるため、冠動脈疾患の進展における EAT の役割について注目が集まっている^{5,7-9}。

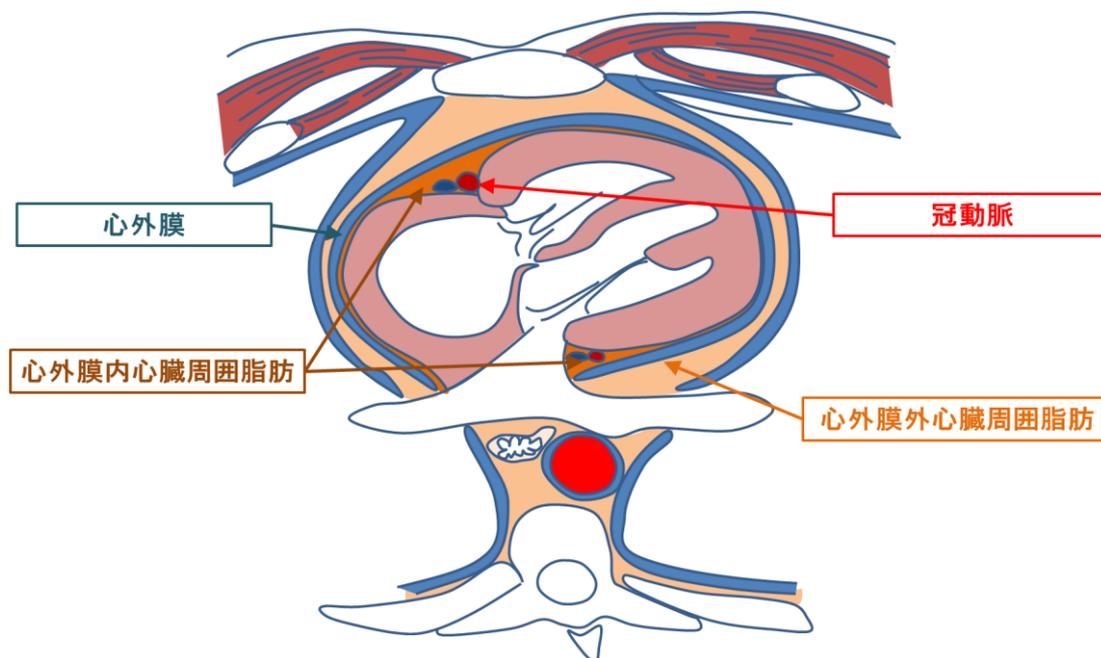


図 1-1. 心臓周囲脂肪と冠動脈との解剖学的位置関係

いくつかの先行研究では EAT 量が冠動脈疾患 (CAD; coronary artery disease) 患者で増加しており、疾患重症度とも相関していると報告されているが¹⁰⁻¹²、EAT 量と冠動脈硬化の重症度と相関を認めないとの報告もある^{13,14}。このため、EAT の蓄積が冠動脈疾患の独立した危険因子となり得るかについてまだ議論の余地がある。さらに、EAT の蓄積が冠動脈硬化の進展に寄与する機序は明らかになっていない。

EAT はエネルギー代謝や炎症に関連する様々な生理活性物質を分泌することがわかっており、代謝活動が活発な組織と考えられている¹⁵。EAT と冠動脈の間には物質の拡散を妨げるような線維性被膜が存在しておらず、EAT の機能的変化がサイトカインなどの傍分泌経路を介して直接的に冠動脈硬化に影響している可能性は十分考えられる⁵。

アディポサイトカインの一つであるアディポネクチンは、レプチンやレジスチンなどのアディポサイトカインと比べてはるかに分泌される量が多く、痩せ形の健康者の脂肪での発現量は高く、肥満患者では低下することがわかっている。^{16,17} また、アディポネクチンはインスリン抵抗性と関連することが広く知られている。¹⁸ さらには、肥満患者の脂肪では炎症性サイトカインの発現量の増加とともにアディポネクチンが低下していることがわかっており、アディポネクチン自体にも T 細胞の増殖抑制やマクロファージによる炎症細胞のアポトーシス誘導などを介して抗炎症作用を示す。^{19,20} このようなインスリン抵抗性の改善、抗炎症作用などを背景に、血管に対して抗動脈硬化作用を有することが知られている。²¹ しかしながら、アディポネクチンの生理的作用が明らかにされている一方で、脂肪細胞からアディポネクチンが分泌されるメカニズムに関しては、未だ明らかになっていない部分が多い。

ミトコンドリアは細胞機能の維持において主要なエネルギー産生源であると同時に活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) の産生源でもあり、ミトコンドリア機能障害は心血管病の発症・進展に寄与すると考えられている²²。さらに *in vitro* の研究では、培養脂肪細胞のミトコンドリア電子伝達系複合体の活性阻害や、ミトコンドリア生合成阻害の介入で、アディポネクチンの mRNA 発現量、培養液中への分泌量の低下を認めており、脂肪細胞においてミトコンドリア機能が抗炎症作用および抗動脈硬化作用を有するアディポネクチンの分泌を制御している可能性について報告されている²³。

ところが、脂肪細胞では細胞質のほとんどを脂肪滴が占めており、単位体積あたりのミトコンドリア量は心筋細胞などの代謝活性の高い細胞と比べて少ない (図 1-2)。このため、脂肪組織におけるミトコンドリア機能解析はこれまで技術的に困難であった。しかし、近年の測定技術の進歩により、脂肪組織でも少ないサンプルでミトコンドリア機能を解析することが可能となった²⁴。

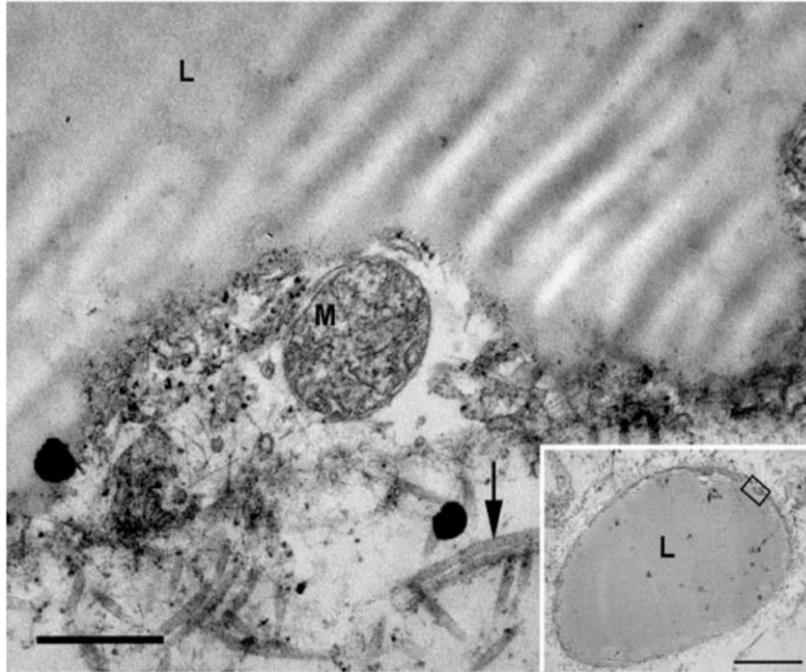


図 1-2. 脂肪細胞のミトコンドリア電子顕微鏡像（文献 15 より引用・改変）
L は脂肪滴，M はミトコンドリア，矢印は弾性線維を示す．拡大像のスケールバー：
500 nm，右下挿入（脂肪細胞全体像）のスケールバー：10 μm

そこで我々は、『EATにおけるミトコンドリア機能障害がEATの質を低下させ、EATの機能異常が冠動脈硬化の進展に貢献する』という仮説 (図 1-3) を立て、心血管病における EAT の潜在的役割を検証することにした。

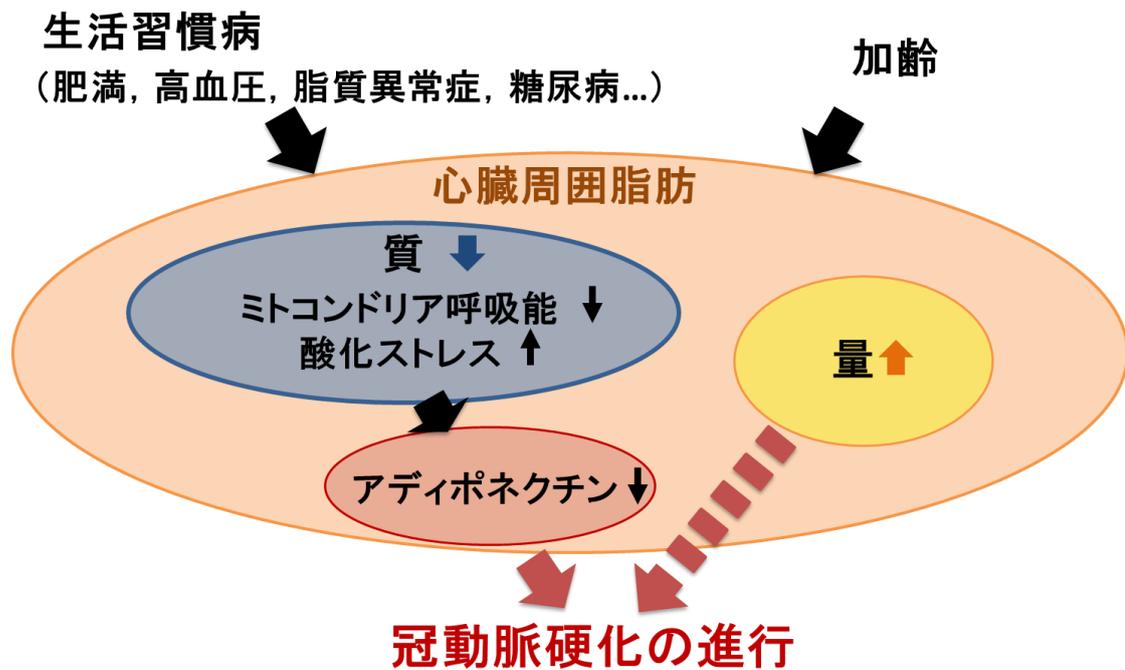


図 1-3. 本研究の仮説

2. 略語表

ACE : angiotensin converting enzyme ; アンジオテンシン変換酵素

AHA : American Heart Association ; アメリカ心臓協会

ARB : angiotensin receptor blocker ; アンジオテンシン受容体阻害薬

BMI : body mass index ; 肥満度指数

BSA : bovine serum albumin ; ウシ血清アルブミン

CAD : coronary artery disease ; 冠動脈疾患

Complex I : Mitochondrial respiratory chain complex 1 ; ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I

Complex II : Mitochondrial respiratory chain complex 2 ; ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 II

COXIV : Cytochrome c oxidase IV ; シトクロム c オキシダーゼ複合体 IV

CT : computed tomography ; コンピュータ断層撮影

EAT : epicardial adipose tissue ; 心外膜内心臓周囲脂肪

EGTA : Ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid ; グリコールエーテルジアミン四酢酸

ETS : electron transfer system ; 電子伝達系

FAO : fatty acid oxidation ; 脂肪酸酸化

FCCP :

HbA1c : hemoglobin A1c ; 糖化ヘモグロビン

HDL : high-density lipoprotein ; 高比重リポ蛋白質

H₂O₂ : hydrogen peroxide ; 過酸化水素

HRP : Horseradish peroxidase ; 西洋ワサビペルオキシダーゼ

IL : interleukin ; インターロイキン

LDL : low-density lipoprotein ; 低比重リポ蛋白質

LEAK : leak-state (respiration) ; 電子漏出状態

MCP : monocyte chemoattractant protein ; 単球走化性因子-1

OXPHOS : oxidative phosphorylation ; 酸化的リン酸化

PAT : pericardial adipose tissue ; 心外膜内心臓周囲脂肪

ROS : reactive oxygen species ; 活性酸素種

O_2^- : superoxide ; スーパーオキシドアニオン

SOD : superoxide dismutase ; スーパーオキシドディスムターゼ

TNF : tumor necrosis factor ; 腫瘍壊死因子

3. 研究方法

3.1. 対象患者

対象は2015年7月から2016年8月の間に北海道大学病院および手稲溪仁会病院において、待機的な心臓手術を受ける25名の患者で、胸骨正中切開による開胸および人工心肺を用いた心停止下手術が行われる患者とした。除外基準は、過去に開胸術の既往がある、慢性炎症性疾患を合併している、癌を合併している、あるいは維持透析を要する慢性腎不全を合併していることとした。

25名のうち12名で冠動脈バイパス術が施行され、残りの13名に非動脈硬化性疾患（僧帽弁閉鎖不全、心房中隔欠損など）に対する心臓手術が施行されている。12名の冠動脈バイパス術が施行された患者と2名の心筋梗塞既往があり虚血性僧帽弁閉鎖不全症に対する手術が施行されている患者を合わせた14名をCAD群とした。冠動脈に有意狭窄（アメリカ心臓協会 [AHA] 分類における75%以上の狭窄）を認めず、なおかつ心筋梗塞既往や冠動脈血行再建術の既往がない11名の患者を非冠動脈疾患（non-CAD）群とした。

研究プロトコールは北海道大学病院の倫理審査委員会の承認を受け（承認番号014-0461）、UMIN臨床試験登録システムに登録した（登録番号000018137）。全研究参加者より心臓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。

3.2. EAT の処理

EATは、心臓手術の際に心筋保護液注入用カニューラを大動脈基部に挿入するまたは冠動脈バイパス術でグラフト血管を大動脈基部に吻合する際に採取する心膜内にある大動脈基部周囲の脂肪組織を使用した。EATを採取後、速やかに3片に分割し、それぞれを別々に保存した。1片目は採取当日に行われるミトコンドリア酸化リン酸化能（OXPHOS; oxidative phosphorylation）測定およびROS産生量測定のための検体保存液であるBIOPS（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 4-morpholineethanesulfonic acid, pH 7.1) に 4°C 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) に保存した。3 片目はアディポネクチン測定のために液体窒素で瞬間凍結後 -80°C にて保存した。

3.3. ミトコンドリア呼吸能測定

ミトコンドリア呼吸能は、先行研究を参照し、高感度呼吸能測定装置 (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) を用いて測定した²⁴。4°C の BIOPS 下で拡大鏡を用いながら血液、毛細血管および結合組織を丁寧に除去し細分化した後、2 mL の呼吸能測定用溶液である Mir05 (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) で満たしたチャンバーに約 50 mg の量を測定してセットした。2 μmol/L digitonin を加えて 20 分インキュベートし、細胞膜透過性を上げる処理 (permeabilization) を行った (図 2)。この処理によりミトコンドリアを含む細胞小器官の構造や相互関係を保持したまま、外因性投与した物質を細胞内まで到達させることが可能となる。

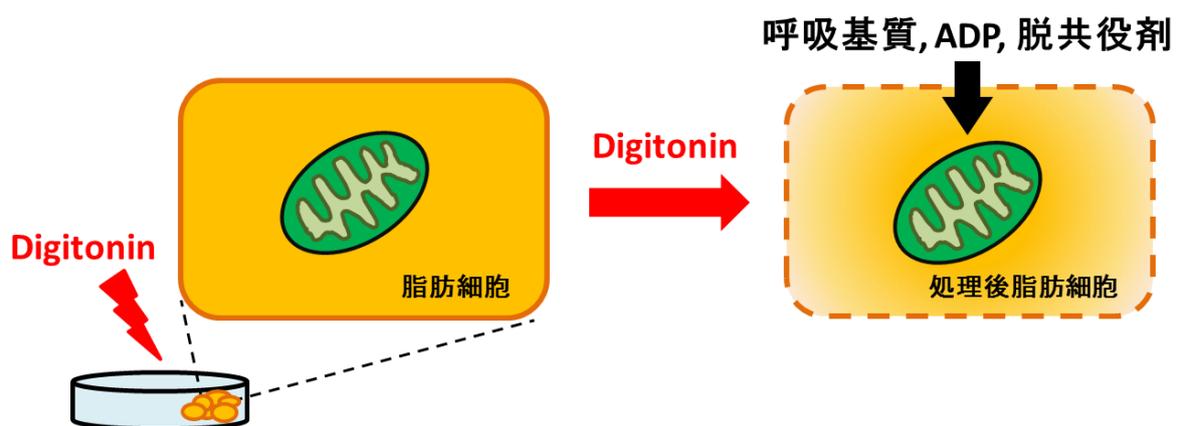


図 2. 細胞膜透過処理 (permeabilization) の概念図

ベースラインの酸素消費量が安定した後に、以下に示すプロトコールで呼吸基質、アデノシン二リン酸 (Adenosine 5'-diphosphate; ADP) および脱共役剤を加えた.

- 1) 2 mmol/L Malate + 10 mmol/L Glutamate (ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 関連基質) の添加
- 2) 5 mmol/L ADP + 5 mmol/L MgCl₂ の添加
- 3) 0.15 mmol/L Octanoyl-l-carnitine (脂肪酸基質) の添加
- 4) 10 mmol/L succinate (ミトコンドリア電子伝達系複合体 II 関連基質) の添加
- 5) 10 μmol/L cytochrome *c* の添加
- 6) Carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) を最大呼吸能が得られるまで 0.5 μmol/L 毎の滴定

検体採取から呼吸能測定までのミトコンドリア外膜の損傷の有無は、cytochrome *c* を添加し外因性 cytochrome *c* に反応して酸素消費量の変化を認めるか否かで評価した. 酸素消費量が 10%以上増加する場合をミトコンドリア外膜の損傷があるものと判断し、データは除外とした. ミトコンドリア呼吸能 (酸素消費量) は測定に用いた心臓周囲脂肪組織重量によって補正することにより算出した.

3.4. ミトコンドリア由来の ROS 産生量測定

ミトコンドリアは ROS の主要な産生源と知られており，先行研究を参照・一部修正し，Oxygraph-2k に装着した蛍光分光測定器（Fluorescence LED2-Module; Oroboros Instruments）を用いてミトコンドリア呼吸能と同時測定した²⁵．Digitonin を添加する前に 5 U/mL スーパーオキシドディスムターゼ（SOD; superoxide dismutase），1 U/mL 西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP; horseradish peroxidase），10 μmol/L Amplex[®] UltraRed 試薬（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を添加する．SOD でミトコンドリアから発生するスーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）は過酸化水素（ H_2O_2 ; hydrogen peroxide）に変換され，HRP を触媒として Amplex[®] UltraRed と化学物質質量比 1 : 1 で反応することで，蛍光物質である resorufin が産生される．励起波長は 525nm を使用し，検出蛍光波長は 587 nm とした（図 3）．

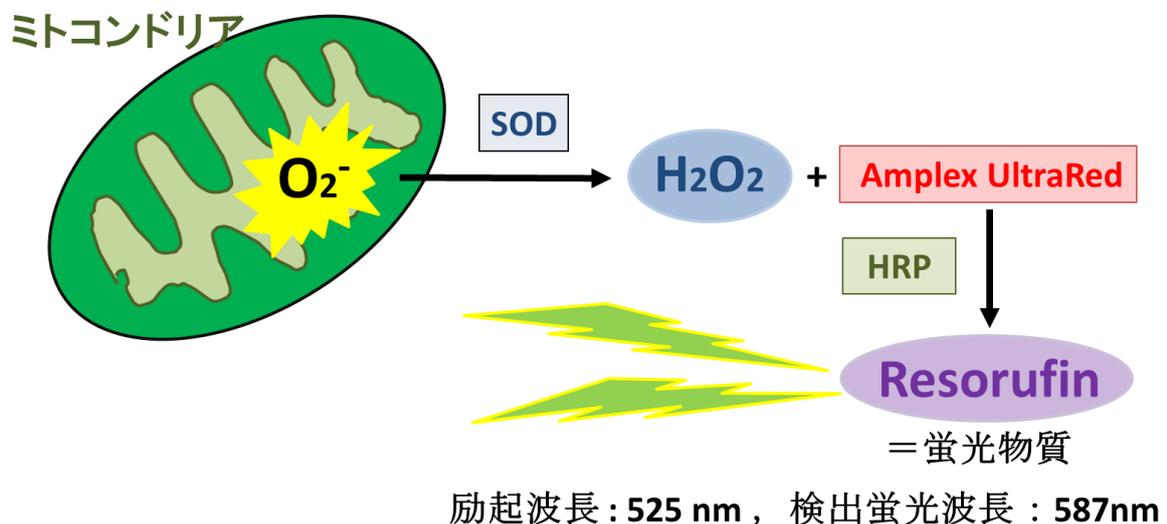


図 3. ROS 産生量測定のプロセスを示す概念図

O_2^- ，スーパーオキシドアニオン；SOD，スーパーオキシドディスムターゼ； H_2O_2 ，過酸化水素；HRP，西洋ワサビペルオキシダーゼ。

Resorufin による蛍光量はミトコンドリア呼吸能の測定中連続して計測した。ミトコンドリアの各呼吸基質を添加することによる蛍光量の干渉の可能性を排除するために、基質を加える前後で H_2O_2 を $0.1 \mu\text{mol/L}$ 毎 3 回添加し感度補正を行った。 H_2O_2 産生能は測定に用いた心臓周囲脂肪組織重量によって補正することにより算出した。プロトコールの途中で加える cytochrome *c* は抗酸化作用を有し、cytochrome *c* 添加後の ROS 産生能の正確な評価は不可能となるため、データから除外している。測定時の Fluorescence LED2-Module の一時的な不調があり、non-CAD 群の 1 名は ROS 産生能のデータが得られず、冠動脈疾患群の 1 名は ADP を加える前の状態での ROS 産生能のデータが得られなかった。

3.5. アディポネクチンの免疫組織学的評価

EAT サンプルを PAX gene tissue system (Qiagen, Hilden, Germany) で固定後、パラフィン包埋して PAXgene 固定パラフィン包埋 (PAXgene-fixed paraffinembedded, PFPE) 組織を作製した。PEPE 組織を $5\mu\text{m}$ に薄切して切片を作製後、hematoxylin & eosin (H&E) 染色およびアディポネクチンの免疫組織化学染色を施行した。免疫組織化学はキシレンで脱パラフィン化し、エタノールで再水和し、pH 6.0, 95°C のクエン酸緩衝液中で抗原を賦活化した。内因性ペルオキダーゼをブロッキングするために $0.3\% \text{H}_2\text{O}_2$ で 10 分間インキュベートした後に、一次抗体としてマウス抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体 (800 倍) (19F1, ab22554, Abcam, Cambridge, UK) を用いて 60 分インキュベートした。二次抗体として EnVison (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて 30 分間インキュベートを行った。最後に 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 染色を行い、ブラウンカラー染色された標本作製した。すべてのインキュベートは室温で行った。

3.6. EAT におけるアディポネクチンタンパク量測定

3.6.1 タンパク抽出

脂肪組織からのタンパク抽出は total protein extraction kit for adipose tissues (101Bio, Palo Alto, CA) を用いて以下の様に行った。

- 1) 20~80 mg の凍結脂肪組織を、重ねたペーパータオルにはさみ、親指と中指で押すようにして組織の油の一部を取り除き、キットに付属する 1.5 mL チューブに組織を入れた。
- 2) 100 mg のタンパク質抽出粉末を組織に加え、50 μ L のバッファーA を添加する。
- 3) 乳棒で 1~2 分間程度かけて氷上で組織を破碎し、200~300 μ L のバッファーA を加え、さらに 30 秒間すり潰した。(サンプルが 20~40 mg 程度で少量の場合、100~150 μ L のバッファーA を加えた)
- 4) チューブに蓋をして、2,000 rpm で 1 分間遠心し、コレクションチューブにセットしたフィルターカートリッジに上清を移した。
- 5) 蓋を開けた状態にして、フィルターカートリッジを-20°Cで 20 分間インキュベートした。
- 6) インキュベート後、蓋を開けたまま 2,000 rpm で 2 分間遠心する。脂肪組織由来のトータルタンパク質が回収されたフロースルーを氷上で保存した。長期保存する場合は、-80°Cで冷凍保存した。

3.6.2 タンパク濃度測定

抽出したサンプルタンパクの濃度測定は BCATM Protein Assay (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を用いて以下の様に行った。

- 1) 6,000 μ L BCATM Protein Assay Reagent A と 120 μ L BCATM Protein Assay Reagent B の混合液を GREINER 96-Well CELLSTAR[®] Cell Culture Plates sterile, F-bottom (greiner bio-one, USA) の各ウェルに 200 μ L ずつ分注した。

- 2) ブランクとして 1 ウェル空白を置き, 2 mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA) Standards (Thermo Scientific) をスタンダードとして 2, 4, 8, 16, 32 μL ずつウェル注入し, 次のウェルから 2 μL ずつ測定サンプルを注入した.
- 3) 37°Cで 30 分間のインキュベーションを行った.
- 4) MultiscanTM GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) およびソフト (SkanIt Software) を用いて, 単波長, フィルター 540 nm の設定で測定した.
- 5) スタンダードタンパクの平均値の一次直線を算出した.
- 6) スタンダードタンパク濃度から得た検量線を基にサンプルタンパク濃度を算出した.

3.6.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

抽出したサンプルのアディポネクチン濃度測定は Quantikine ELISA kit (R&D System, Boston, MA) を用いて以下の様に行った.

- 1) 捕捉用抗アディポネクチン抗体がコートされたプレートの各ウェルに測定用バッファー (Assay diluent RD1W) を 100 μL ずつ注入した.
- 2) ブランクとして 1 ウェル空白を置き, 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 ng/mL に調整した Human Adiponectin Standard を各ウェルに 50 μL ずつ注入し, 次のウェルからサンプル希釈バッファー (Calibrator Diluent RD6-39) で希釈したサンプルを 50 μL ずつ注入した.
- 3) プレートシーラーで保護し室温で 2 時間のインキュベーションを行った.
- 4) Wash buffer concentrate 20 mL を最終容量が 500 mL になるように蒸留水で希釈した洗浄用バッファーを用いてプレートの洗浄を 3 回行った.
- 5) 各ウェルに HRP 標識検出用抗アディポネクチン抗体 (Human Adiponectin Conjugate) を 200 μL ずつ添加した.

- 6) プレートシーラーで保護し室温で2時間のインキュベーションを行った。
- 7) 洗浄用バッファーを用いてプレートの洗浄を3回行った。
- 8) H_2O_2 溶液 (Color reagent A) および 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine 溶液 (TMB; Color reagent B) を等量ずつ混合して直前に調整した基質溶液を各ウェルに 200 μL ずつ添加した。
- 9) プレートを遮光し室温で25分のインキュベーションを行った。
- 10) 各ウェルに反応停止液を 50 μL ずつ添加した。
- 11) MultiscanTM GO Microplate Spectrophotometer で 450 nm の吸光度を測定した。
- 12) スタンダードアディポネクチンの平均値の一次直線を算出した。
- 13) スタンダードアディポネクチン濃度から得た検量線を基にサンプルタンパク濃度を算出した。

それぞれのサンプルのアディポネクチン濃度は総タンパク量で補正した。CAD 群の1名では、EAT サンプルの不足のためタンパク解析ができず、データが欠損した。

3.7. EAT 体積測定

EAT 体積は、先行研究を参照し、心臓手術直前に行われた非造影胸部コンピュータ断層撮影像 (computed tomography; CT) から専用の画像診断装置ワークステーション (Vox-Base; J-MAC System, Sapporo, Japan) を用いて解析した²⁶。画像の各ピクセルから EAT を抽出する CT 値のウィンドウ条件はレベル -130 HU, 幅 -230 から -30 HU と設定した。水平断の各スライスの EAT 面積は心外膜をマニュアルトレースした範囲内を上記の設定で半自動解析される (図 4)。主肺動脈から右肺動脈が分岐するレベルを上端, 冠静脈が下大静脈に流入するレベルを下端とし, 各スライスの EAT 面積とスライス厚の積より EAT 体積を算出した。

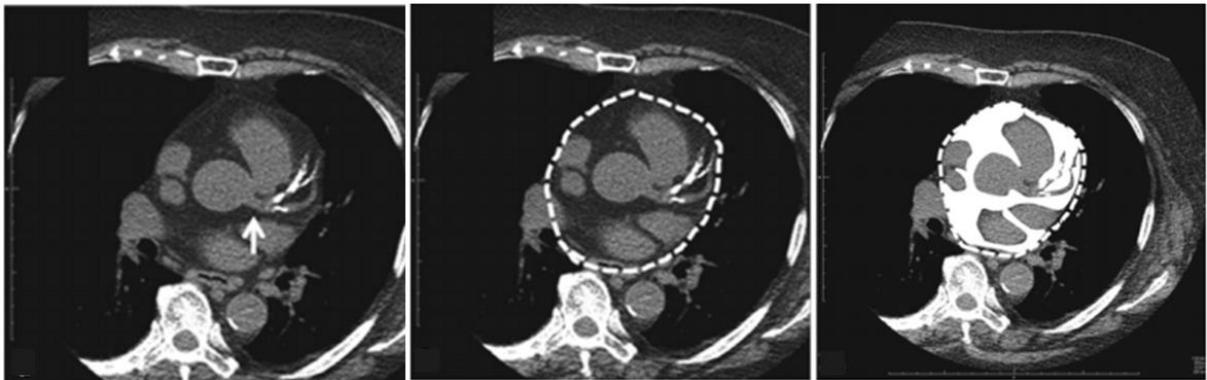


図 4. CT による EAT 体積の計測 (文献 17 より引用・改変)

左冠動脈主幹部 (矢印) レベルの水平断の代表的な解析例。点線はトレースされた心外膜, 白塗りは計測される EAT を示す。

3.8. 腹部内臓脂肪面積評価

腹部内臓脂肪面積は、心臓手術直前に撮影された非造影腹部 CT から上述の Vox-Base を用いて解析した。壁側腹膜をマニュアルトレースした範囲内で内臓脂肪を抽出して半自動解析される。測定部位は臍レベルの水平断 1 スライスとした。

3.9. 冠動脈硬化重症度評価

冠動脈硬化の重症度評価は、先行研究を参照し、Gensini scoring system を使用した²⁷。Gensini スコアは心臓手術を受ける一か月以内に行われた冠動脈造影検査の所見を基に以下のように算出した。

- 1) 冠動脈狭窄度に対してスコアを付け、AHA 分類 25%, 50%, 75%, 90%, 99%, 100% の狭窄をそれぞれ 1, 2, 4, 8, 16, 32 点とした。
- 2) すべての冠動脈の AHA 分類セグメントにあらかじめ図 5 に示すような比重をかけ、狭窄度に応じたスコアに積算した。
- 3) 各セグメントにおいて狭窄度スコアと比重を積算したスコアをすべて加算して得られた最終スコアを症例の重症度スコアとした。

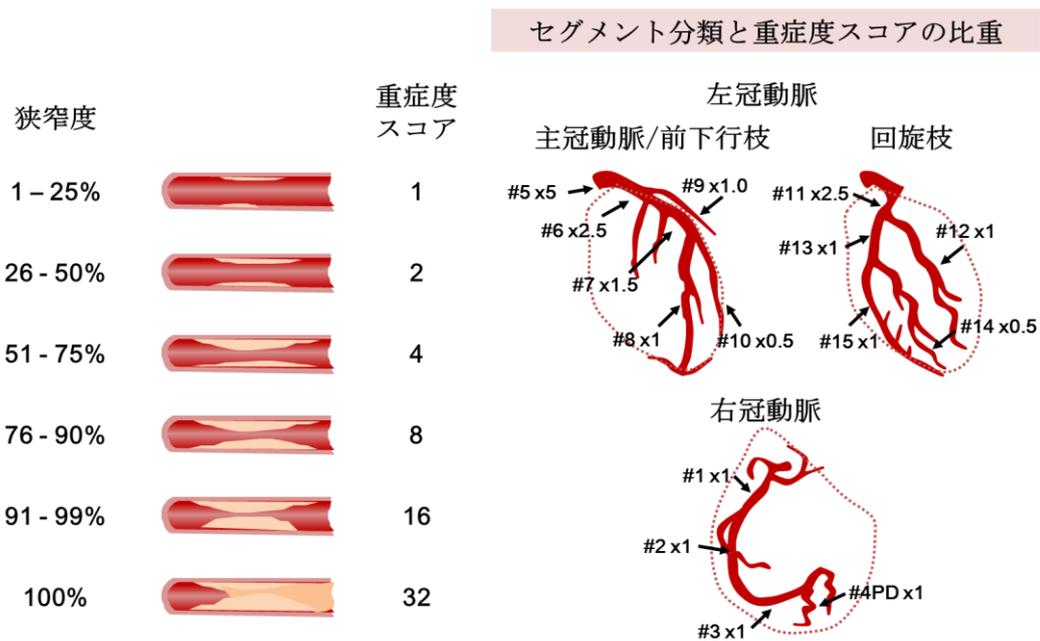


図 5. 冠動脈硬化の重症度評価 (Gensini scoring system)

3.10. 統計学的解析

全ての統計解析は、統計解析ソフトウェア GraphPad Prism v7.0a (GraphPad Software, San Diego, CA) で行った。各計測値は、平均値±標準偏差で表した。冠動脈群と非冠動脈群の平均値の差の検定には対応のない Student t 検定を行った。カテゴリー変数は割合で表記し、カイ二乗検定により比較した。2つの連続変数間の相関は、ピアソンの積率相関係数の有意性検定により評価した。P<0.05 を統計学的に有意とした。

4. 研究結果

4.1. 患者背景および臨床的特徴

本研究における患者背景および臨床的特徴を表 1 に示す。Non-CAD 群と CAD 群の間で、性別、年齢、BMI、腹部内臓脂肪面積において有意な差は認めなかった。心機能に関しては、心臓手術前に心エコー図法により評価した左室駆出率に両群間で有意差を認めなかった。併存疾患に関しては、CAD 群では non-CAD 群と比較して糖尿病、脂質異常症の有病率が有意に高かった。また CAD 群の大半の患者（86%）は冠動脈に多枝病変を有する症例であった。CAD 群では HbA1c の値が有意に高値であった一方で、空腹時の中性脂肪、LDL および HDL コレステロールの値に関しては、スタチン内服率が non-CAD 群より高かったにも関わらず両群間に有意差を認めなかった。

表 1. 研究対象者の臨床背景

| | non-CAD群 (11名) | CAD群 (14名) | P |
|---------------------------|----------------|------------|--------|
| 年齢, 歳 | 68±14 | 68±11 | 0.99 |
| 男性/女性 | 4/7 | 8/6 | 0.30 |
| BMI, kg/m ² | 23.6±4.2 | 24.3±3.6 | 0.66 |
| 腹部内臓脂肪面積, cm ² | 62.1±49.9 | 96.9±44.0 | 0.08 |
| 左室駆出率, % | 56±16 | 50±15 | 0.37 |
| 冠動脈病変数 : | | | |
| 1 枝病変 | 0 (0) | 2 (14) | |
| 2 枝病変 | 0 (0) | 4 (29) | |
| 3 枝病変 | 0 (0) | 8 (57) | |
| 併存疾患 : | | | |
| 高血圧 | 6 (55) | 10 (71) | 0.38 |
| 糖尿病 | 2 (18) | 11 (79) | 0.003 |
| 脂質異常症 | 2 (18) | 13 (93) | <0.001 |
| 治療薬 : | | | |
| β 遮断薬 | 4 (36) | 8 (57) | 0.30 |
| ACE 阻害薬/ARB | 4 (36) | 9 (64) | 0.24 |
| スタチン | 2 (18) | 14 (100) | <0.001 |
| 糖尿病治療薬 | 2 (18) | 6 (43) | 0.19 |
| HbA _{1c} , % | 5.6±0.3 | 7.2±1.3 | <0.001 |
| 中性脂肪, mg/dL | 140.2±116.0 | 117.1±11.0 | 0.63 |
| HDL コレステロール, mg/dL | 56.7±19.2 | 48.8±11.3 | 0.22 |
| LDL コレステロール, mg/dL | 99.6±36.8 | 95.2±30.5 | 0.75 |

結果は平均値±標準偏差または人数 (%) で示す。BMI, 肥満度指数; HbA_{1c}, 糖化ヘモグロビン; HDL, 高比重リポ蛋白質; LDL, 低比重リポ蛋白質

4.2. EAT ミトコンドリア呼吸能

Non-CAD 群および CAD 群の患者から採取した EAT のミトコンドリア呼吸能を測定した代表的グラフを図 6-1 に示す。

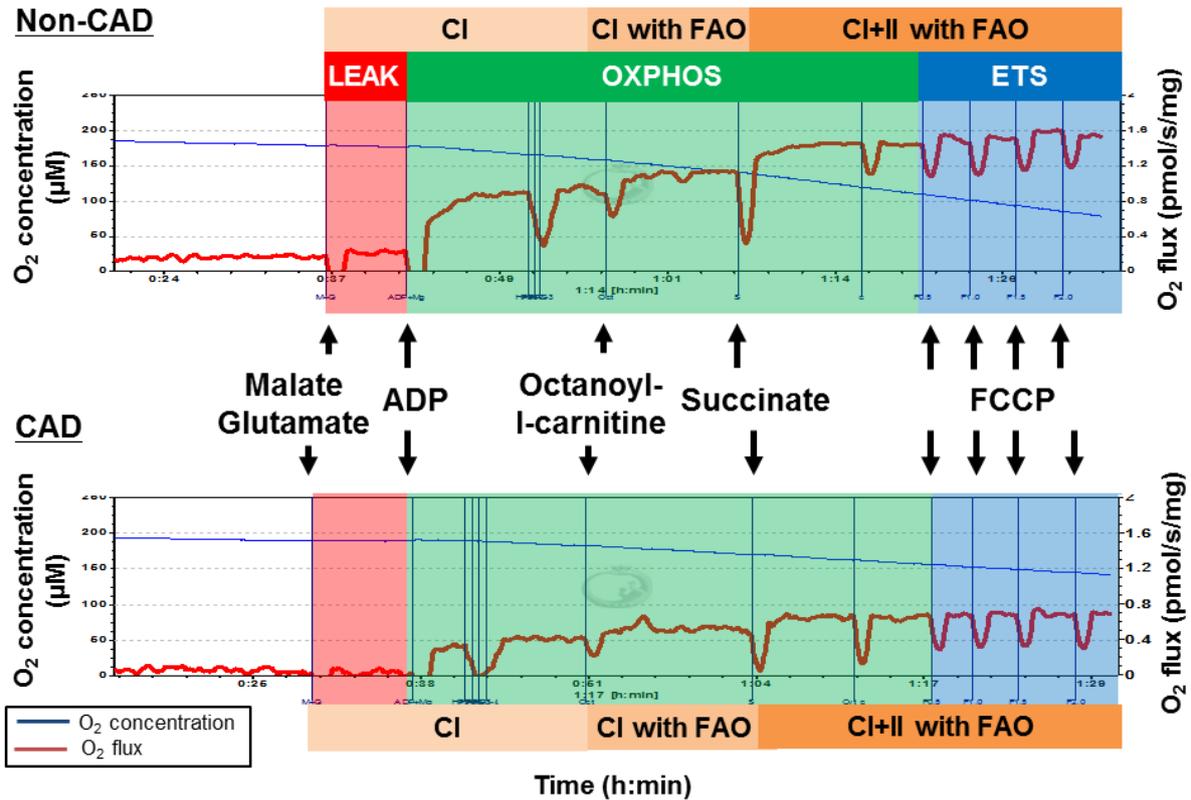


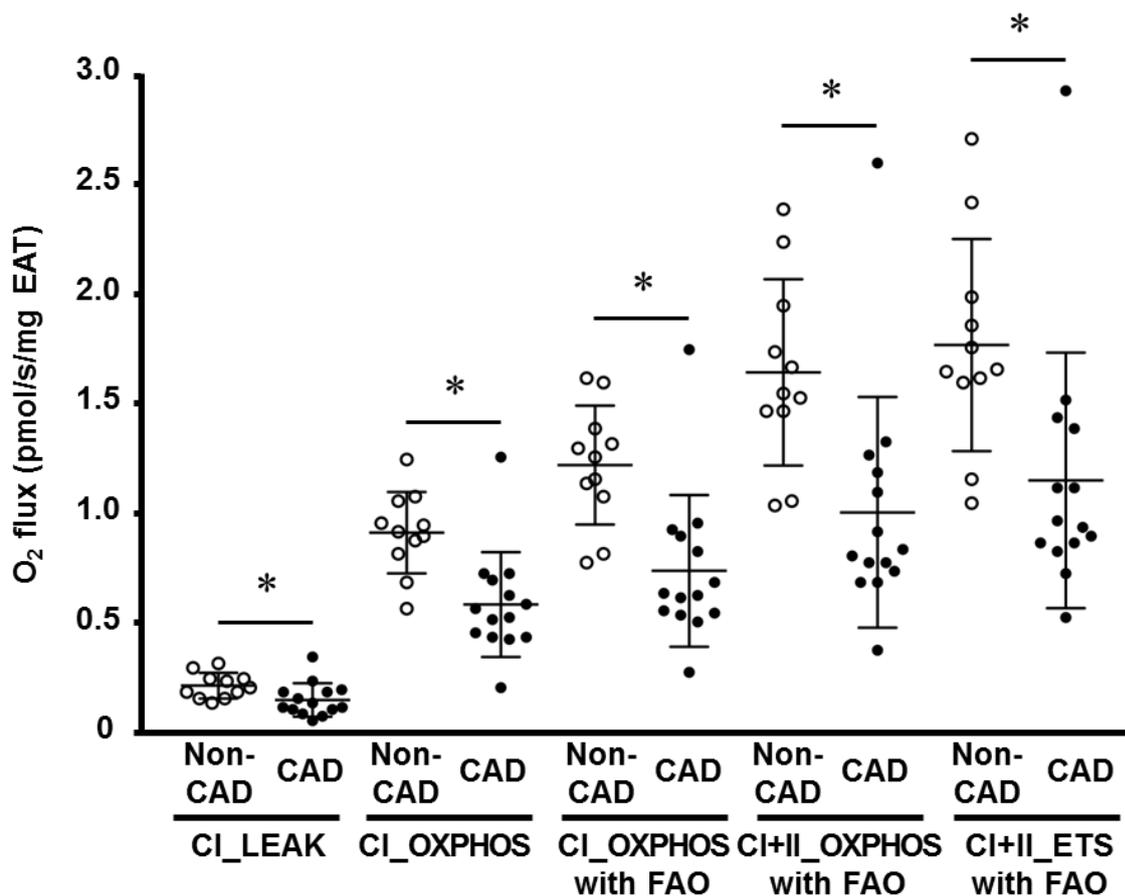
図 6-1. EAT ミトコンドリア呼吸能を測定した代表的グラフ

CAD, 冠動脈疾患; CI, 電子伝達系複合体 I; CI+II, 電子伝達系複合体 I+II; LEAK, プロトンリーク; OXPHOS, 酸化的リン酸化; ETS, 電子伝達系最大能; FAO, 脂肪酸酸化

CAD 群では non-CAD 群と比較して、EAT におけるミトコンドリア電子伝達系複合体 I に関連した基質存在下でのリーク状態 (LEAK; ADP 非存在下の呼吸状態) の呼吸能低下を認めていた (図 6-2)。また CAD 群では、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I に関連した基質存在下での OXPHOS (ADP 存在下での呼吸状態) は、non-CAD 群と比較して有意に低下していた (図 6-2)。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I および I+II に関連した基質に加えて脂肪酸が存在する条件での OXPHOS

においても、CAD 患者では non-CAD 患者と比較して有意に低い呼吸能を示した (図 6-2)。さらに、脱共役剤である FCCP を加えた最大の電子伝達系機能 (ETS) においても CAD 群では non-CAD 群と比較して有意に低下していた (図 6-2)。

図 6-2. EAT ミトコンドリア呼吸能



バーは平均±標準偏差を示す。白丸は non-CAD 患者 (n = 11), 黒丸は CAD 患者 (n = 14) を示す。*P<0.05.

4.3. EAT ミトコンドリア呼吸能と冠動脈硬化重症度との関連

EAT ミトコンドリア呼吸能の低下が Gensini スコアで表される冠動脈硬化重症度と関連するかを検討した。すべてのステートの呼吸能が、Gensini スコアと負の相関を認めた (図 7)。特に OXPHOS において Gensini スコアと強い相関を示した (図 7)。

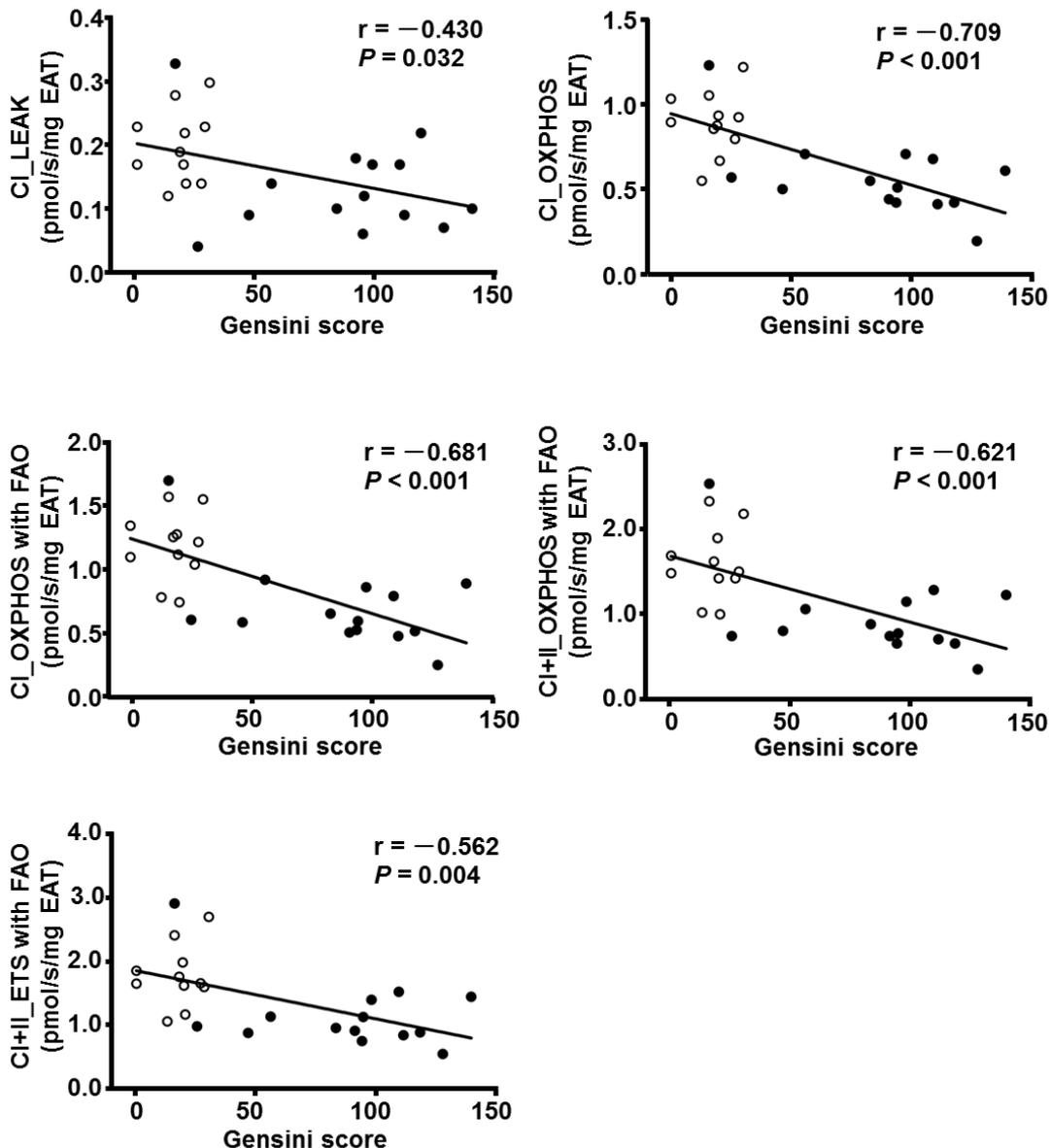


図 7. EAT ミトコンドリア呼吸能と冠動脈硬化重症度との関連

白丸は non-CAD 患者 (n = 11), 黒丸は CAD 患者 (n = 14) を示す。

4.4. EAT ミトコンドリア由来の ROS 産生量

Non-CAD 群と CAD 群において、EAT ミトコンドリアの各ステート (LEAK および OXPHOS) での ROS 産生量に差を認めなかった (図 8)。また EAT ミトコンドリア由来の ROS 産生量は冠動脈硬化の重症度と相関を認めなかった。

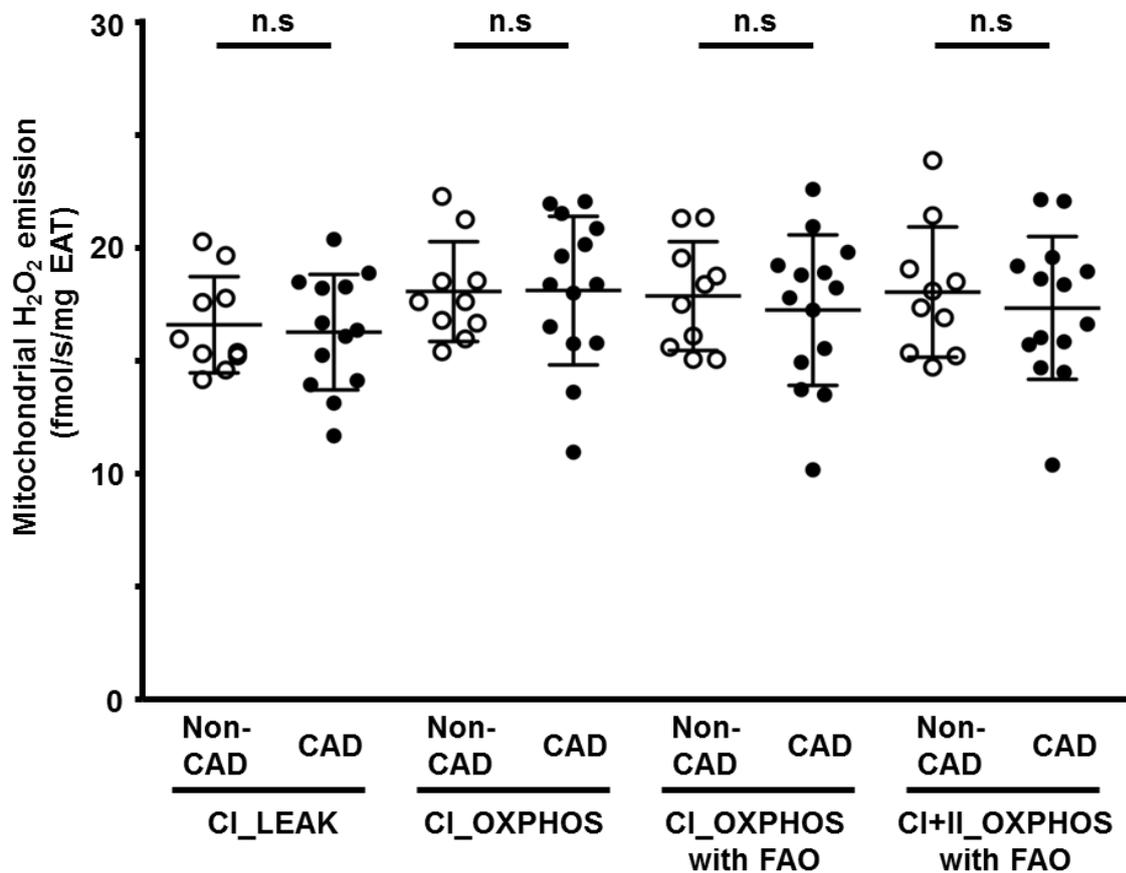


図 8. EAT ミトコンドリア由来の ROS 産生量

バーは平均±標準偏差を示す。白丸は non-CAD 患者 (n = 10), 黒丸は CAD 患者 (n = 13-14) を示す。

4.5. EAT 体積

CAD 群の EAT 体積は non-CAD 群と比較して有意に増加していた (図 9-1A). しかし, EAT 体積と Gensini スコアとの間に相関は認めなかった (図 9-1B).

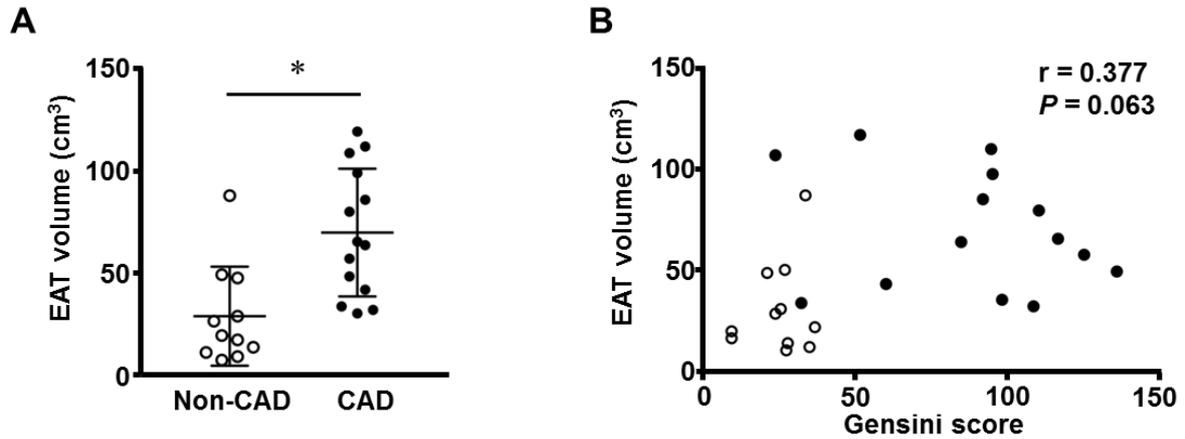


図 9-1. EAT 体積の群間比較 (A) および EAT 体積と冠動脈硬化重症度との関連 (B) バーは平均±標準偏差を示す. 白丸は non-CAD 患者 (n = 11), 黒丸は CAD 患者 (n = 14) を示す. * $P < 0.05$.

また、EAT 体積は、EAT ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 関連基質存在下の OXPHOS とのみ負の相関を認め、他の基質・ステートでは相関を認めなかった (図 9-2)。

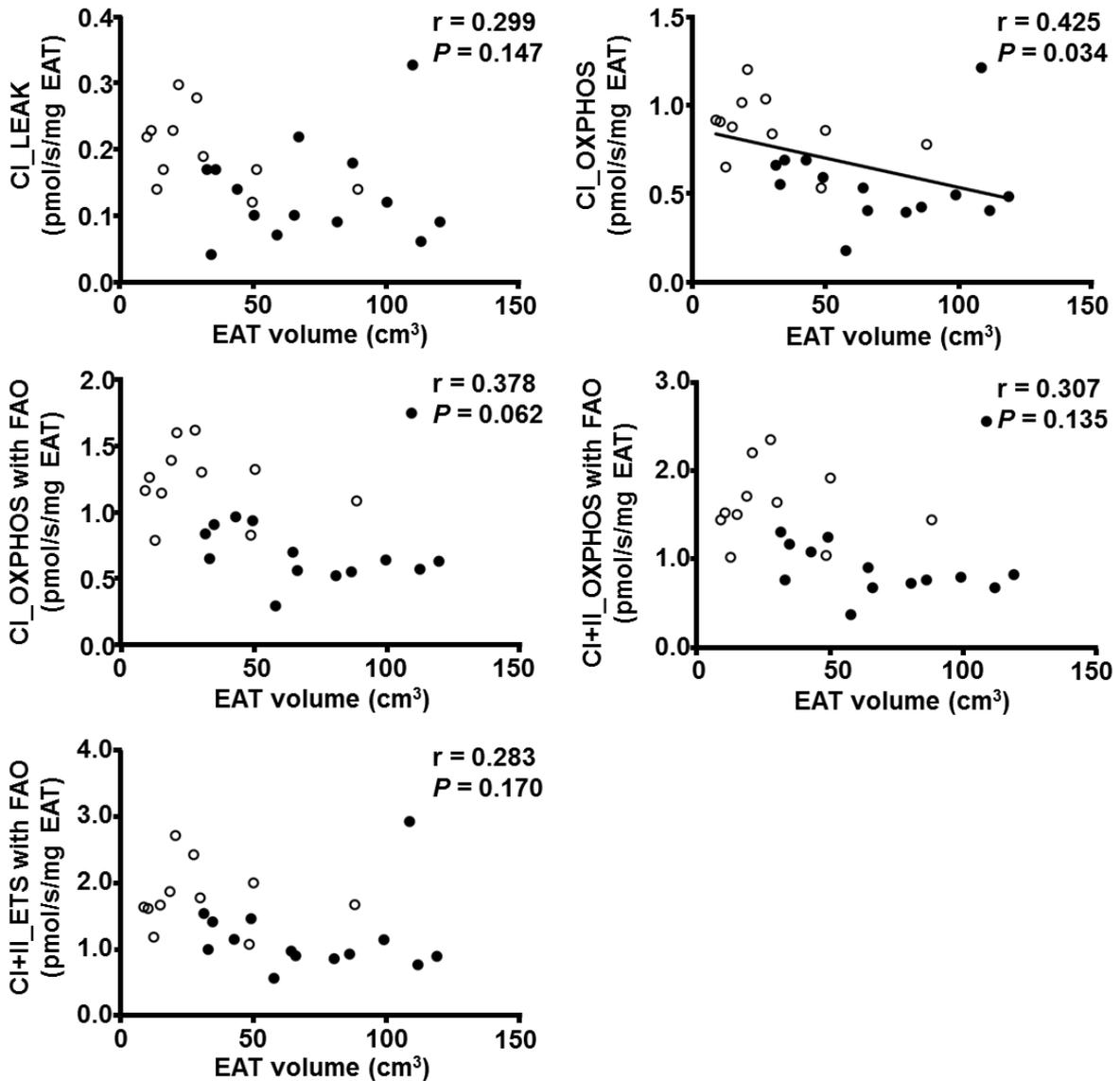


図 9-2. EAT 体積と EAT ミトコンドリア呼吸能との関連

白丸は non-CAD 患者 (n = 11), 黒丸は CAD 患者 (n = 14) を示す。

4.6. EAT におけるアディポネクチン発現量

Non-CAD 患者および CAD 患者における EAT でのアディポネクチン発現量解析結果を図 10-1A ならびに図 10-1B に示す. 図 10-1A は両群の EAT をアディポネクチンで免疫組織化学染色した組織標本画像であり, 心臓周囲脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン量を表す代表的な画像である. EAT のアディポネクチンタンパク量を定量した結果, CAD 群では non-CAD 群と比較して有意に低下していた (図 10-1B).

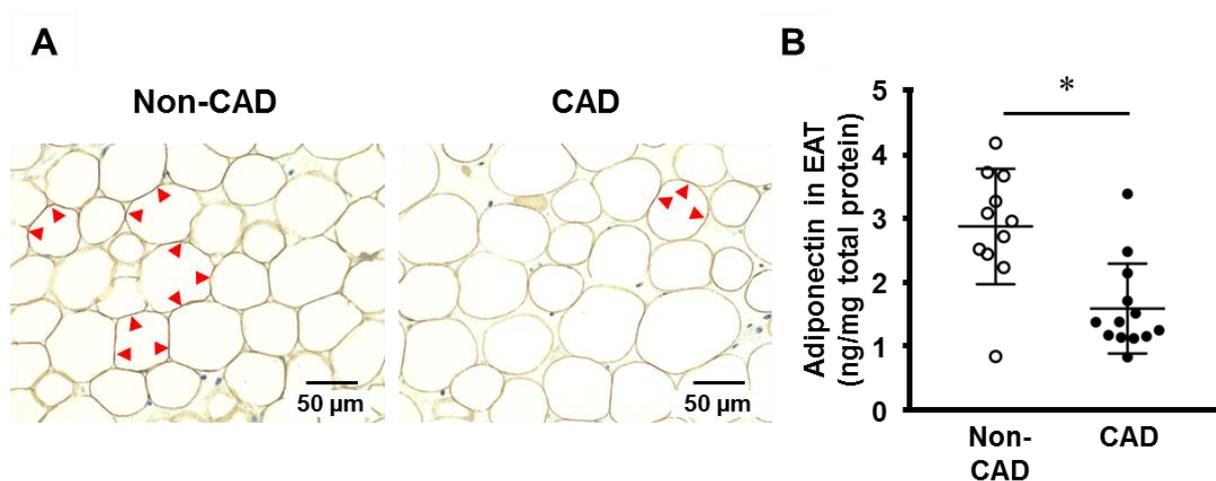


図 10-1. EAT におけるアディポネクチン発現量. 代表的な EAT におけるアディポネクチン免疫組織化学染色画像 (A), アディポネクチン量の群間比較 (B)
赤矢印はブラウン染色されたアディポネクチンを示す. バーは平均±標準偏差を示す.
*P<0.05.

また、EATにおけるアディポネクチンタンパク量は、EATミトコンドリアのOXPHOSおよびETSと正の相関を認めた（図10-2）。一方、EATにおけるアディポネクチンタンパク量はEAT体積とは相関を示さなかった（図10-2）。

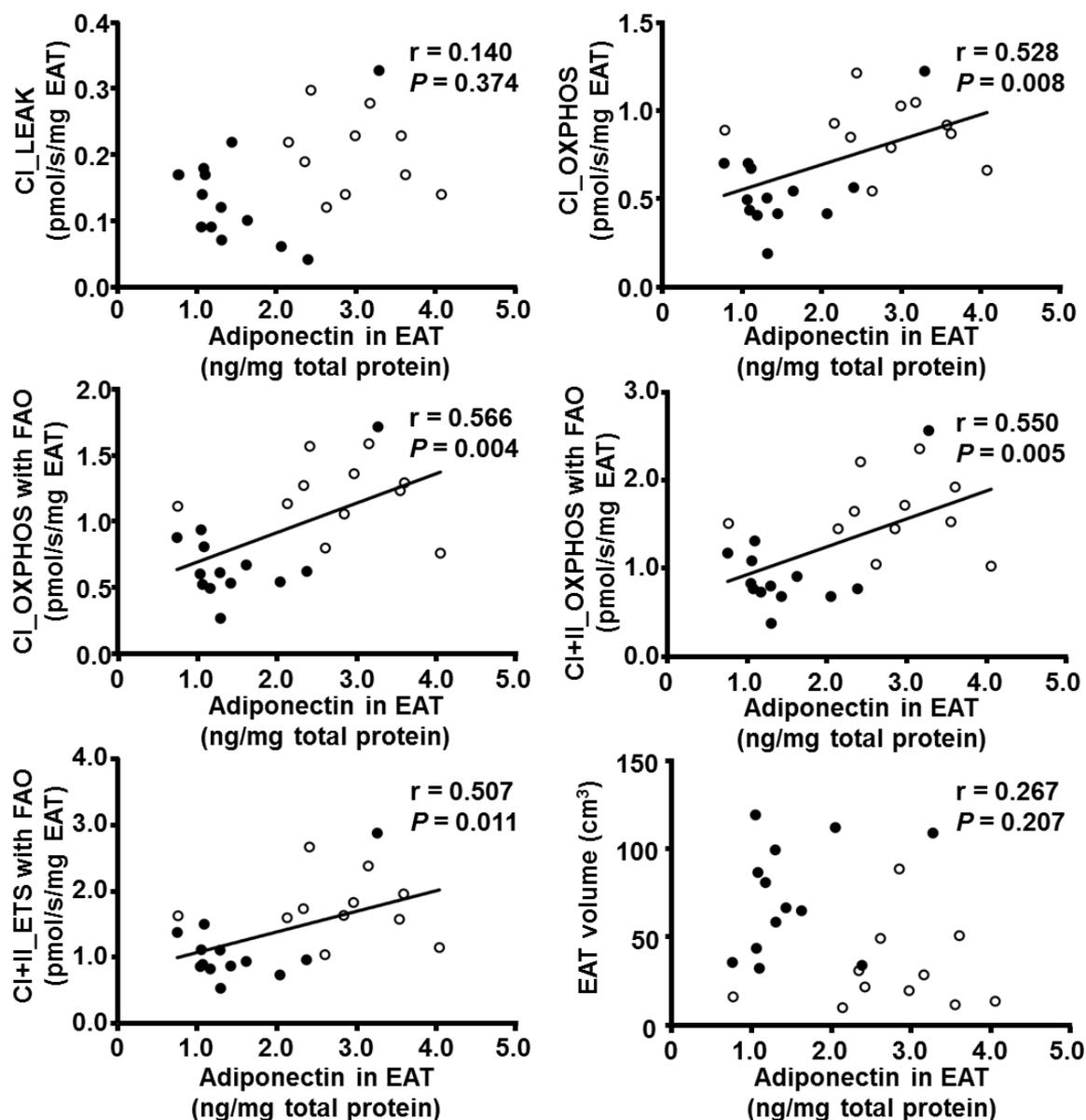


図10-2. EATにおけるアディポネクチンタンパク量とミトコンドリア呼吸能およびEAT体積との関連

白丸は non-CAD 患者 (n = 11), 黒丸は CAD 患者 (n = 13) を示す。

5. 考察

本研究の重要な所見として、CAD患者においてEATミトコンドリア呼吸能はnon-CAD患者と比較して有意に低下していることが示された。さらに、EATミトコンドリア呼吸能は冠動脈造影所見に基づいたGensiniスコアで評価される冠動脈硬化重症度と負の相関を示していた。一方、EAT体積についてはCAD患者で有意に増加していたにもかかわらず、冠動脈硬化の重症度とは相関を認めなかった。興味深いことに、EATで産生されるアディポネクチン量はCAD患者では有意に低下しているのみならず、EATミトコンドリア呼吸能、とくにATP産生に関わるミトコンドリアOXPHOSと正の相関を示していた。

脂肪組織におけるミトコンドリア機能の役割について

今回我々は、CAD患者においてEATミトコンドリア呼吸能が低下していることを明らかにした。これまで心臓周囲脂肪ミトコンドリア呼吸能の解析を行った研究は国内外で存在せず、我々の知る限り本研究が初めての報告となる。

心臓や骨格筋と比較して代謝が活発ではない脂肪組織では、これまでエネルギー代謝に関する知見に乏しかった。その理由の一つとして、脂肪組織ではミトコンドリア量が少なく、その評価が困難であったことが挙げられる。しかし、近年の測定技術の進歩に伴い、脂肪組織でも少量のサンプルからミトコンドリア機能を解析することが可能となった。

Kraunsoeらは、同一人物から採取した腹部の内臓脂肪において、皮下脂肪と比較してエネルギー代謝が亢進していることを報告したが²⁴、腹部内臓脂肪がアディポカインを含む多くの生理活性物質の産生源となっていることを考慮すると、妥当性があると推察された。一方、EATも内臓脂肪のひとつであり、アディポカインを多く分泌する組織であることが知られている²⁸。2型糖尿病患者では、腹部内臓脂肪ミトコンドリアの電子伝達系に関連する遺伝子発現が低下しており、インスリン抵抗性に関与す

ることが報告されている²⁹。したがって、EATを含む内臓脂肪では、ミトコンドリア機能が脂肪組織における代謝能を制御しており、アディポカインの分泌や脂肪酸の貯蔵などの生体の恒常性維持にとって重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

EAT と冠動脈硬化の関連について

一般に、EATは冠動脈の周囲に多く分布しており、冠動脈と心臓周囲脂肪の間に線維性被膜のような構造は介在しない⁵。このため、脂肪の量的または質的異常が冠動脈硬化の進展に影響を及ぼす可能性は十分考えられる。本研究では、過去の研究¹¹と同様に、BMIや腹部内臓脂肪量では有意差がないにも関わらず、CAD患者でEAT量が有意に増加していた。一方で、EAT体積と冠動脈硬化の重症度との間に有意な相関は認めなかった。つまり、全身の内臓脂肪の冠動脈硬化への関与の様式や程度は必ずしも一様ではなく、解剖学的に冠動脈に隣接するEATが冠動脈硬化の進展に最も影響を与えやすく、さらにEATの量的異常よりも質的異常の方が冠動脈硬化の強いリスク因子となりうると考えられた。

実際に、我々はEATミトコンドリア呼吸能の低下が冠動脈硬化の重症度と密接に関連していることを示した。またYudkinらは、血管周囲に沈着した脂肪組織が傍分泌作用などを介して、隣接する血管の動脈硬化の発症に関与することを提唱しており²³、これらはEATの代謝活性が低下することにより、直接あるいは間接的にCADの発症に関与するという我々の仮説を支持するものである。

EATにおけるアディポネクチン分泌能低下について

我々はEATにおけるアディポネクチンの発現量を測定し、CAD患者で有意に低下していることを示した。これは過去の報告とも矛盾のない結果であった^{30,31}。今回重要な点として、EATにおけるアディポネクチン発現量がエネルギー産生の主体であるミトコンドリア呼吸能と正の相関を示したことが挙げられる。一方で、EAT体積とは

相関を認めなかった。脂肪細胞を用いた実験では、ミトコンドリア機能障害がアディポネクチン分泌能を低下させることが過去に報告されている²³。したがって、EAT ミトコンドリア活性は EAT におけるアディポネクチン分泌量を制御している可能性がある。アディポネクチンは血管に対して抗動脈硬化作用、抗炎症作用を有する生理活性物質であり、EAT 由来のアディポネクチン分泌能低下が冠動脈硬化の進展に少なくとも一部は関与していると推測される。

EAT に着目した冠動脈硬化に関与しうる他の機序について

本研究で、我々は EAT ミトコンドリア機能障害が冠動脈硬化の進展に寄与する可能性を明らかにしたが、その他にも冠動脈硬化の進展に関与することを示した EAT の質的变化に関する研究がいくつかある。第一に、CAD 患者の EAT では TNF- α ・IL-6・MCP-1 などの炎症を惹起するサイトカインの遺伝子発現量が増えていることが報告されており²⁸、これらのサイトカイン分泌が増加することで、冠動脈の炎症を引き起こし、結果として動脈硬化の進展に寄与している可能性がある^{28,32}。第二に、EAT に浸潤するマクロファージの表現型（炎症促進型の M1 と炎症抑制型の M2）の比率が変化し、M1 マクロファージの割合が増加することで、EAT における炎症が起こり、冠動脈硬化を進展させる可能性がある³³。さらには、メタボリックシンドロームモデルマウスにおいて、腹部内臓脂肪の酸化ストレスがインスリン抵抗性の形成に関与していることが報告されており³⁴、EAT 由来の酸化ストレスが CAD の悪化につながる可能性が考えられる。但し、本研究では少なくともミトコンドリア由来の ROS 産生量は CAD 患者で増加していなかった。

本研究の限界

本研究には考察すべき限界がいくつかある。第一に、サンプルサイズが小さいことが挙げられる。しかし、少ないサンプルサイズにも関わらず、EAT ミトコンドリア機

能障害と冠動脈硬化重症度との相関を見出すことができた。第二に、EATの採取部位が心外膜内の大動脈基部周囲に沈着している Rindfleisch fat と呼ばれる脂肪としたことである。この脂肪は厳密には冠動脈周囲に沈着している脂肪ではない。しかし、脂肪組織の採取において冠動脈損傷などのリスクを回避し安全性を確保するとともに、心外膜内の脂肪の機能は基本的に均質的であるとの仮定を基に採取部位を決定した。第三に、内臓脂肪の一種としての EAT の特性を評価するために、対照として同一患者の皮下脂肪の評価を行えなかったことが挙げられる。手術中の手技に影響なく、安全に十分量の皮下脂肪を採取することが困難と判断したため、断念せざるを得なかった。第四に、EAT ミトコンドリア呼吸能と冠動脈硬化重症度との相関の有無評価では、CAD 患者のみならず non-CAD 患者を加えていることが挙げられる。今回研究対象となった CAD 患者の多くが冠動脈バイパス術を受けた患者であったため、大半が多枝病変患者であり、CAD 患者のみで解析を行った場合、Gensini スコアの幅が小さくなってしまったため、統計的に有意な相関関係を示すことができなかった。最後に、本研究で EAT ミトコンドリア機能低下と冠動脈硬化の重症度との関連を明らかにしたものの、これらの因果関係を証明したわけではない。モデル動物を使った介入実験によるメカニズムの解明が今後の課題と考えている。

6. 総括および結論

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. CAD 群の EAT ミトコンドリア呼吸能は，non-CAD 群と比較して低下していた。
2. EAT ミトコンドリア呼吸能は冠動脈硬化重症度と負の相関を示した。一方，EAT 体積と冠動脈硬化重症度との間には相関を認めなかった。
3. EAT におけるアディポネクチン産生量は，CAD 群で低下しており，EAT ミトコンドリア呼吸能と正の相関を認めた。

今回の研究結果は，EAT ミトコンドリア機能障害は，少なくとも一部は EAT におけるアディポネクチン分泌能低下を介して冠動脈硬化の進展に寄与する（図 11）という仮説を支持するものであった。

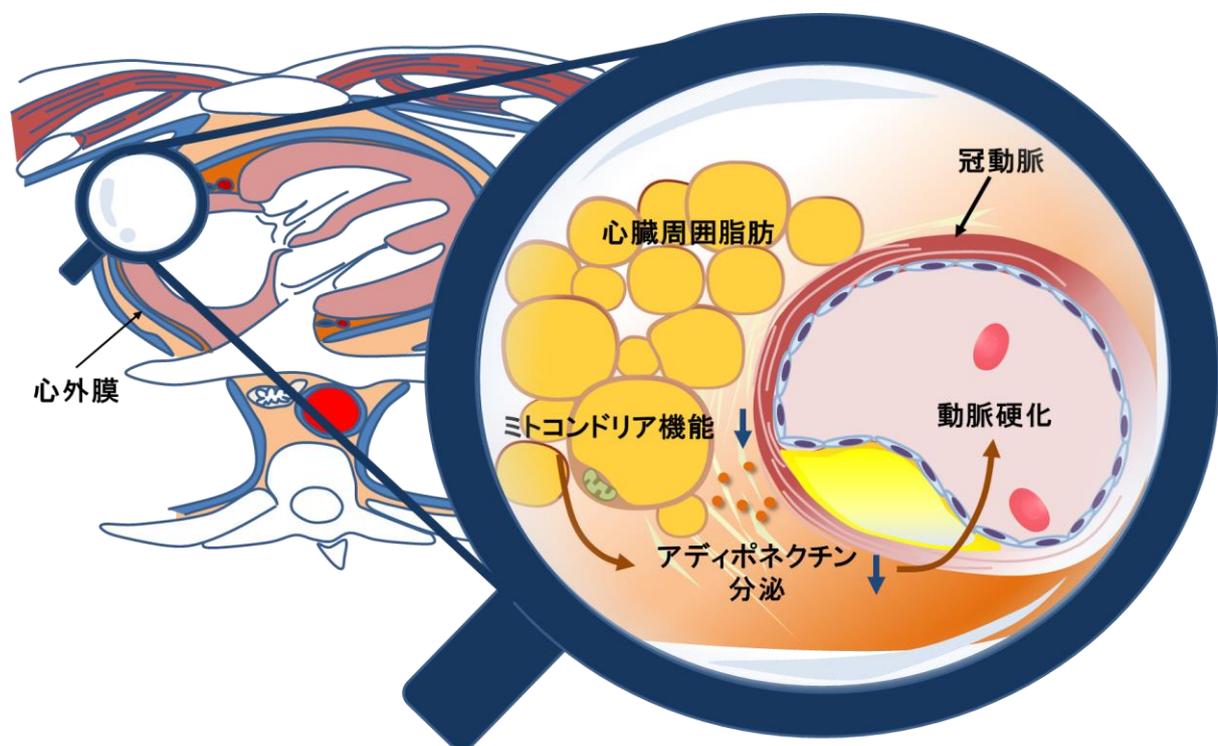


図 11. 『EAT ミトコンドリア機能障害が冠動脈硬化の進展に寄与する』という概念図

つまり、EAT ミトコンドリア機能障害が、脂肪組織内での代謝異常を引き起こし、冠動脈をはじめ大血管・心筋などの EAT に隣接する組織・臓器に悪影響を及ぼすことが予想される。今後、CAD のみならず、同様の危険因子を背景とする硬化性大動脈弁狭窄症などの心血管病の発症・進展における EAT の量的・質的変化の役割などについても検証を行い、心血管病における EAT が果たす病態生理的意義を明らかにしていきたい。また、将来は EAT を標的とした心血管病の新たな治療戦略の開発につながることを期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂くとともに、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学院循環病態内科学教室 安斉 俊久教授に深謝申し上げます。また、本研究全般にわたり親身な御助言と懇切丁寧な御指導を頂きました北海道大学大学院医学院循環病態内科学教室 横田 卓助教に深く感謝の意を表します。

また、本論文作成に当たり、御多忙の中御助言頂きました審査員の先生方には深く感謝いたします。

本研究に当たり、日頃より多くの御指導・御助力を頂きました北海道大学大学院医学院循環病態内科学教室、高田 真吾先生、白川 亮介先生、降旗 高明先生、津田 正哉先生、松本 純一先生、片山 貴史先生、前川 聡先生、南部 秀雄先生、尾畑 嘉一先生、山梨 克真先生、角谷 尚哉先生、福島 新先生、齋藤 晶理先生、絹川 真太郎講師に感謝申し上げます。

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院循環器・呼吸器外科学教室 松居 喜郎教授、新宮 康栄講師、若狭 悟先生、大岡 智学助教、ならびに手稲溪仁会病院循環器外科 山田 陽先生、中西 克彦先生、伊庭 裕先生、氏平 功祐先生に深く感謝申し上げます。

本研究において、免疫組織学的染色に御助力頂きました北海道がんセンターがんゲノム医療センター 西原 広史先生ならびに北海道大学病院がん遺伝子診断部 松岡 亮介先生に深く感謝申し上げます。

本研究の実験遂行にあたり、多くの御助力を頂きました循環病態内科学教室実験助手の池田則子様、山根美和子様、木村友紀様、また秘書室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、有益な助言また激励を下さいました諸先輩方、研究室の皆様、そして研究生活を陰ながら支えてくれた家族に感謝いたします。

引用文献

- 1 Komatsu, A. & Sakurai, I. A study of the development of atherosclerosis in childhood and young adults: risk factors and the prevention of progression in Japan and the USA. The Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Pathol. Int.* 46, 541-547 (1996).
- 2 Rumana, N., Kita, Y., Turin, T. C., Murakami, Y., Sugihara, H., Morita, Y., Tomioka, N., Okayama, A., Nakamura, Y., Abbott, R. D. & Ueshima, H. Trend of increase in the incidence of acute myocardial infarction in a Japanese population: Takashima AMI Registry, 1990-2001. *Am. J. Epidemiol.* 167, 1358-1364 (2008).
- 3 Kitamura, A., Sato, S., Kiyama, M., Imano, H., Iso, H., Okada, T., Ohira, T., Tanigawa, T., Yamagishi, K., Nakamura, M., Konishi, M., Shimamoto, T., Iida, M. & Komachi, Y. Trends in the incidence of coronary heart disease and stroke and their risk factors in Japan, 1964 to 2003: the Akita-Osaka study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 71-79 (2008).
- 4 Shulman, G. I. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N. Engl. J. Med.* 371, 2237-2238 (2014).
- 5 Sacks, H. S. & Fain, J. N. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am. Heart J.* 153, 907-917 (2007).
- 6 Corradi, D., Maestri, R., Callegari, S., Pastori, P., Goldoni, M., Luong, T. V. & Bordi, C. The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovasc. Pathol.* 13, 313-316 (2004).
- 7 Lim, S. & Meigs, J. B. Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. *Int. J. Cardiol.* 169, 166-176 (2013).
- 8 Gaborit, B., Venticlef, N., Ancel, P., Pelloux, V., Gariboldi, V., Leprince, P., Amour, J., Hatem, S. N., Jouve, E., Dutour, A. & Clement, K. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc. Res.* 108, 62-73 (2015).
- 9 Thalmann, S. & Meier, C. A. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc. Res.* 75, 690-701 (2007).
- 10 Alexopoulos, N., McLean, D. S., Janik, M., Arepalli, C. D., Stillman, A. E. & Raggi, P. Epicardial adipose tissue and coronary artery plaque characteristics. *Atherosclerosis* 210, 150-154 (2010).
- 11 Rosito, G. A., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Ruberg, F. L., Mahabadi, A. A., Vasan, R. S., O'Donnell, C. J. & Fox, C. S. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation* 117, 605-613 (2008).
- 12 Ueno, K., Anzai, T., Jinzaki, M., Yamada, M., Jo, Y., Maekawa, Y., Kawamura, A., Yoshikawa, T., Tanami, Y., Sato, K., Kuribayashi, S. & Ogawa, S. Increased epicardial

- fat volume quantified by 64-multidetector computed tomography is associated with coronary atherosclerosis and totally occlusive lesions. *Circ. J.* 73, 1927-1933 (2009).
- 13 Djaberi, R., Schuijf, J. D., van Werkhoven, J. M., Nucifora, G., Jukema, J. W. & Bax, J. J. Relation of epicardial adipose tissue to coronary atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 102, 1602-1607 (2008).
- 14 Tanami, Y., Jinzaki, M., Kishi, S., Matheson, M., Vavere, A. L., Rochitte, C. E., Dewey, M., Chen, M. Y., Clouse, M. E., Cox, C., Kuribayashi, S., Lima, J. A. & Arbab-Zadeh, A. Lack of association between epicardial fat volume and extent of coronary artery calcification, severity of coronary artery disease, or presence of myocardial perfusion abnormalities in a diverse, symptomatic patient population: results from the CORE320 multicenter study. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 8, e002676 (2015).
- 15 Iacobellis, G., Corradi, D. & Sharma, A. M. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2, 536-543 (2005).
- 16 Mathew, H., Castracane, V. D. & Mantzoros, C. Adipose tissue and reproductive health. *Metabolism: Clinical & Experimental* (2017).
- 17 Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. & Matsuzawa, Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100, 2473-2476 (1999).
- 18 Yannakoulia, M., Yiannakouris, N., Melistas, L., Kontogianni, M. D., Malagaris, I. & Mantzoros, C. S. A dietary pattern characterized by high consumption of whole-grain cereals and low-fat dairy products and low consumption of refined cereals is positively associated with plasma adiponectin levels in healthy women. *Metabolism: Clinical & Experimental* 57, 824-830 (2008).
- 19 Wilk, S., Scheibenbogen, C., Bauer, S., Jenke, A., Rother, M., Guerreiro, M., Kudernatsch, R., Goerner, N., Poller, W., Ellingsen-Merkel, D., Utku, N., Magrane, J., Volk, H. D. & Skurk, C. Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 2323-2332 (2011).
- 20 Takemura, Y., Ouchi, N., Shibata, R., Arahamian, T., Kirber, M. T., Summer, R. S., Kihara, S. & Walsh, K. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J. Clin. Invest.* 117, 375-386 (2007).
- 21 Kumada, M., Kihara, S., Sumitsuji, S., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Ouchi, N., Arita, Y., Okamoto, Y., Shimomura, I., Hiraoka, H., Nakamura, T., Funahashi, T. & Matsuzawa, Y. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 85-89 (2003).

- 22 Lesnefsky, E. J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J. & Hoppel, C. L. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1065-1089 (2001).
- 23 Wang, C. H., Wang, C. C., Huang, H. C. & Wei, Y. H. Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. *FEBS J.* 280, 1039-1050 (2013).
- 24 Kraunsoe, R., Boushel, R., Hansen, C. N., Schjerling, P., Qvortrup, K., Stockel, M., Mikines, K. J. & Dela, F. Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. *J. Physiol.* 588, 2023-2032 (2010).
- 25 Kluckova, K., Sticha, M., Cerny, J., Mracek, T., Dong, L., Drahotka, Z., Gottlieb, E., Neuzil, J. & Rohlena, J. Ubiquinone-binding site mutagenesis reveals the role of mitochondrial complex II in cell death initiation. *Cell Death Dis.* 6, e1749 (2015).
- 26 Oyama, N., Goto, D., Ito, Y. M., Ishimori, N., Mimura, R., Furumoto, T., Kato, F., Tsutsui, H., Tamaki, N., Terae, S. & Shirato, H. Single-slice epicardial fat area measurement: do we need to measure the total epicardial fat volume? *Jpn. J. Radiol.* 29, 104-109 (2011).
- 27 Gensini, G. G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 51, 606 (1983).
- 28 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. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108, 2460-2466 (2003).
- 29 Dahlman, I., Forsgren, M., Sjogren, A., Nordstrom, E. A., Kaaman, M., Naslund, E., Attersand, A. & Arner, P. Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* 55, 1792-1799 (2006).
- 30 Iacobellis, G., Pistilli, D., Gucciardo, M., Leonetti, F., Miraldi, F., Brancaccio, G., Gallo, P. & di Gioia, C. R. Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 29, 251-255 (2005).
- 31 Karastergiou, K., Evans, I., Ogston, N., Miheisi, N., Nair, D., Kaski, J. C., Jahangiri, M. & Mohamed-Ali, V. Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1340-1346 (2010).
- 32 Yudkin, J. S., Eringa, E. & Stehouwer, C. D. "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet* 365, 1817-1820 (2005).
- 33 Hirata, Y., Tabata, M., Kurobe, H., Motoki, T., Akaike, M., Nishio, C., Higashida, M., Mikasa, H., Nakaya, Y., Takanashi, S., Igarashi, T., Kitagawa, T. & Sata, M. Coronary

- atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 248-255 (2011).
- 34 Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. & Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752-1761 (2004).