



Title	心臓血管手術後の心房細動（P0AF）における心外膜脂肪組織の質的变化が及ぼす影響の検討
Author(s)	夏井, 宏征
Description	配架番号 : 2844
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15910号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15910
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92163
Type	doctoral thesis
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

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 頁
1. 要旨	2 頁
2. 略語表	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 POAF の定義.....	12 頁
4.4 EAT 体積測定.....	12 頁
4.5 EAT の採取および処理.....	13 頁
4.6 EAT ミトコンドリア呼吸能測定	14 頁
4.7 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 EAT の組織学的評価.....	20 頁
4.9 拡散抽出.....	21 頁
4.10 real time PCR 法による mtDNA コピー数測定	22 頁
4.11 RNA 発現解析.....	23 頁
4.12 統計学的検討.....	25 頁
5. 研究結果	
5.1 患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 EAT 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.	総括及び結論.....	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 の質的变化が 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变化に着目し、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 μm^2 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未滿かつ平均脂肪細胞面積3000 μm^2 未滿; グループ2: TNF- α 100 count以上かつ平均脂肪細胞面積3000 μm^2 未滿; グループ3: TNF- α 100 count未滿かつ平均脂肪細胞面積3000 μm^2 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-1 β , 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

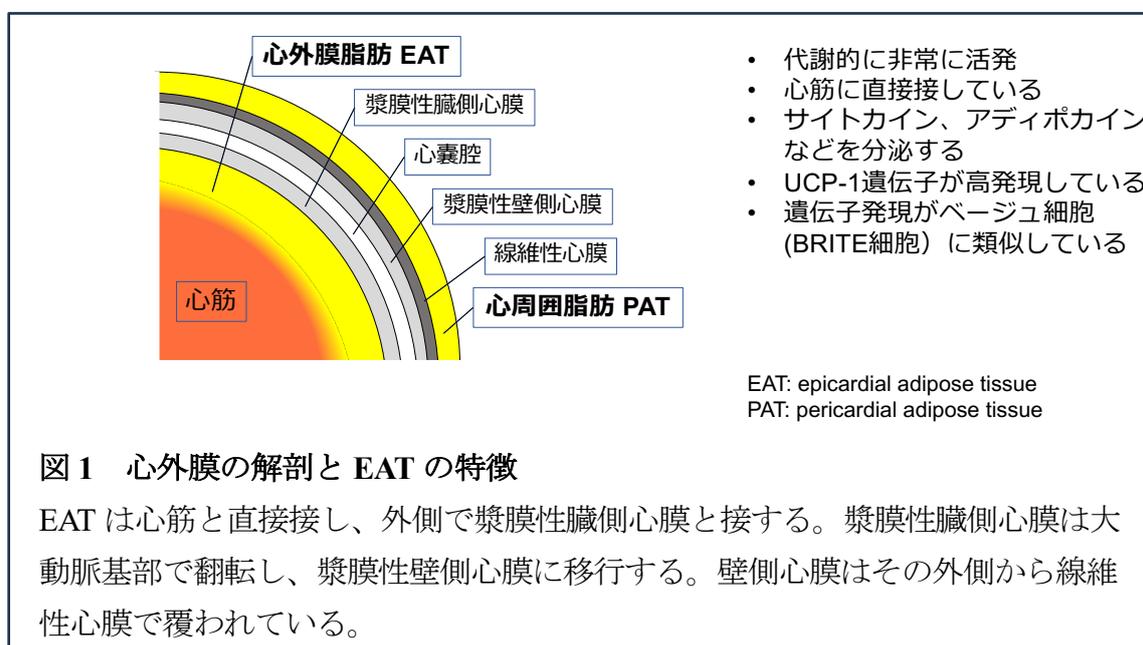
LA: left atrium

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

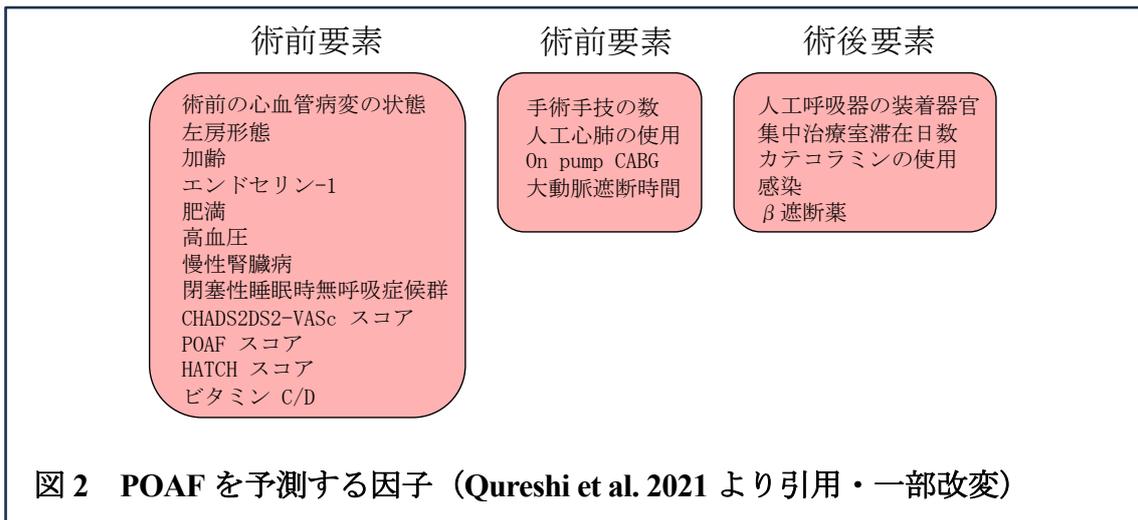
心外膜脂肪組織 (epicardial adipose tissue, EAT) は心嚢内に存在し、組織学的には臓側心外膜の内側に存在している。心筋や冠動脈などの周囲組織と膜構造で隔てられる事なく直接接しており、壁側心外膜の外側に存在する心周囲脂肪 (pericardial adipose tissue, PAT) とは解剖学的に明確に区別されている (図 1)。EAT は様々な生理活性物質のオートクリン・パラクリン分泌を介して周囲組織に影響を与える内分泌組織と考えられており、PAT や皮下脂肪組織とは機能的にも全く異なる特徴を有する。また EAT は主に白色脂肪細胞で構成される皮下脂肪組織と比較して、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-1 β 、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 の質的变化に着目して、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溪仁会病院において、胸骨正中切開による待機的な心臓血管手術を受けた、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 E9™ (GE Healthcare, Horton, Norway)、Vivid S70™ (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 (LAV_{preA}) 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 およびブラ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, %	$(LAV_{\max} - LAV_{\min}) / LAV_{\max}$	○	○	○
LA expansion index, %	$(LAV_{\max} - LAV_{\min}) / LAV_{\min}$	○		
LA passive EF, %	$(LAV_{\max} - LAV_{\text{preA}}) / LAV_{\max}$		○	
LA active EF, %	$(LAV_{\text{preA}} - LAV_{\min}) / LAV_{\text{preA}}$			○

LAV, left atrial 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)、V1 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)。

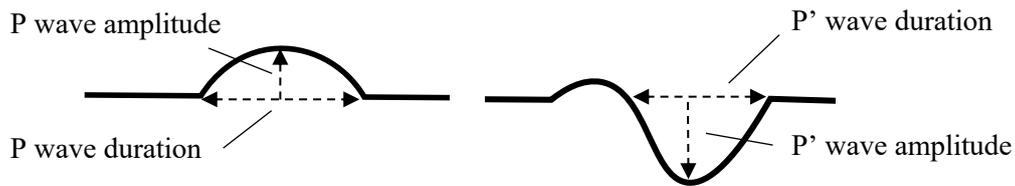


図4 P波指標の計測

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秒以下の場合に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)。

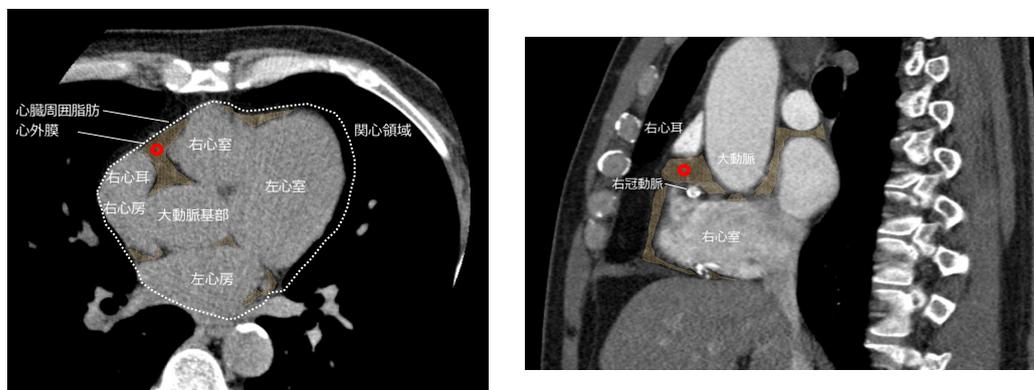


図 4 CT による心臓周囲の脂肪組織の分布と EAT 体積の計測

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 4-morpholineethanesulfonic acid, pH 7.1) に入れ、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) 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°C にて保存した。4 片目は培養上清の作成のために 4°C 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 MgCl_2 , 20 mmol/L taurine, 10 mmol/L KH_2PO_4 , 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 2 mL の Mir05 溶液で満たされており、測定は 37°C 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、 $2\ \mu\text{mol/L}$ の digitonin をチャンバー内に $2\ \mu\text{L}$ 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 μL , 10 mmol/L Glutamate 10 μL
- 2) 5 mmol/L ADP 20 μL , 5 mmol/L MgCl_2 20 μL
- 3) 0.15 mmol/L Octanoyl-l-carnitine 3 μL
- 4) 10 mmol/L succinate 20 μL
- 5) 10 $\mu\text{mol/L}$ cytochrome *c* 5 μL
- 6) Carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 5 μL

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 Octanoyl-l-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。cytochrome *c* はミトコンドリア電子伝達系複合体IV (cytochrome *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 5 μ L 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。

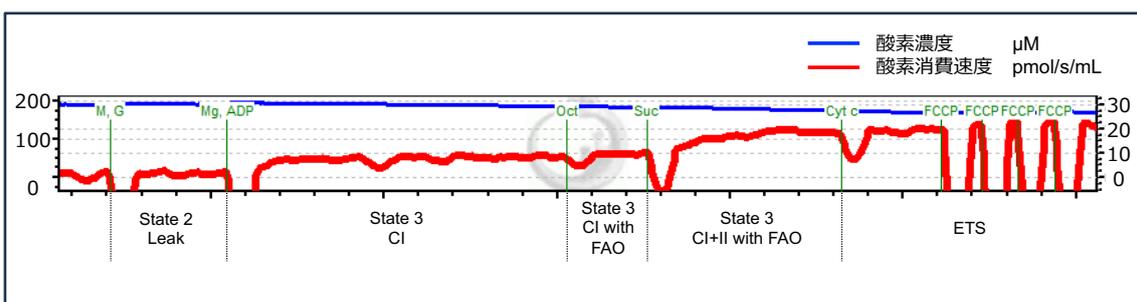


図5 O2k装置を用いたEATミトコンドリア呼吸能の代表的なグラフ

縦軸(左)はO2k装置のチャンバー内の酸素濃度(μM)、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, maleate; 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 °C 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)。

- 1) 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 °C) した。これを 3 回繰り返す、血液などの余分な成分を取り除いた。
- 2) 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、一晚培養した (37 °C, 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 °Cにて保存した。

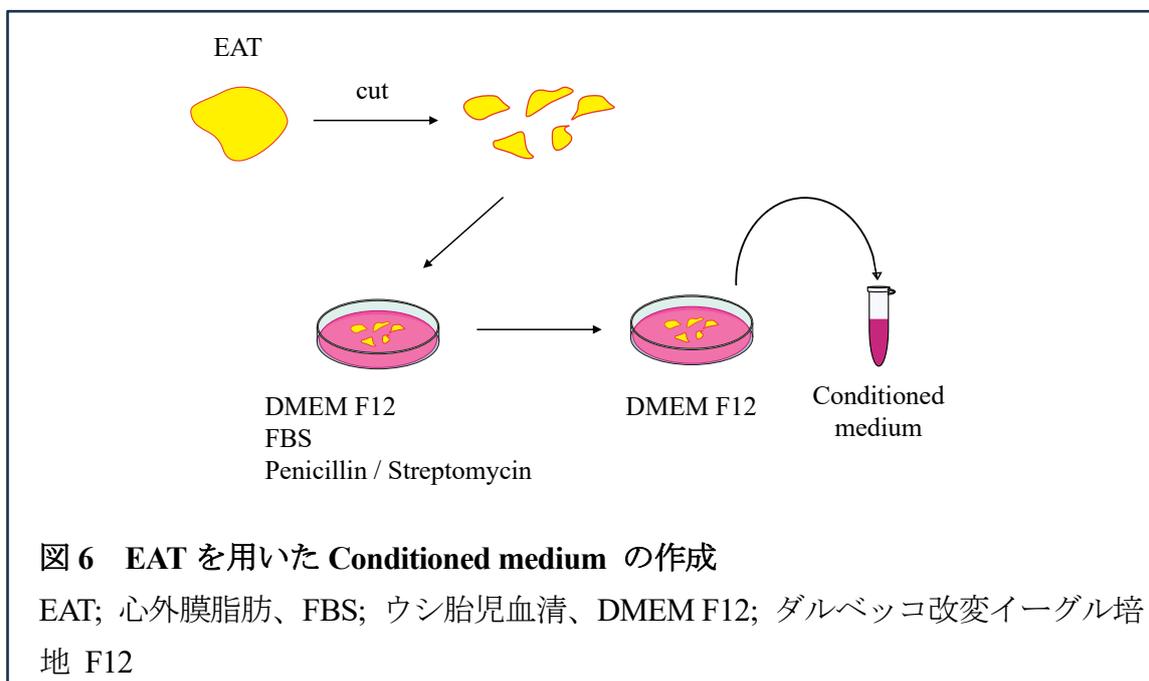


図 6 EAT を用いた Conditioned medium の作成

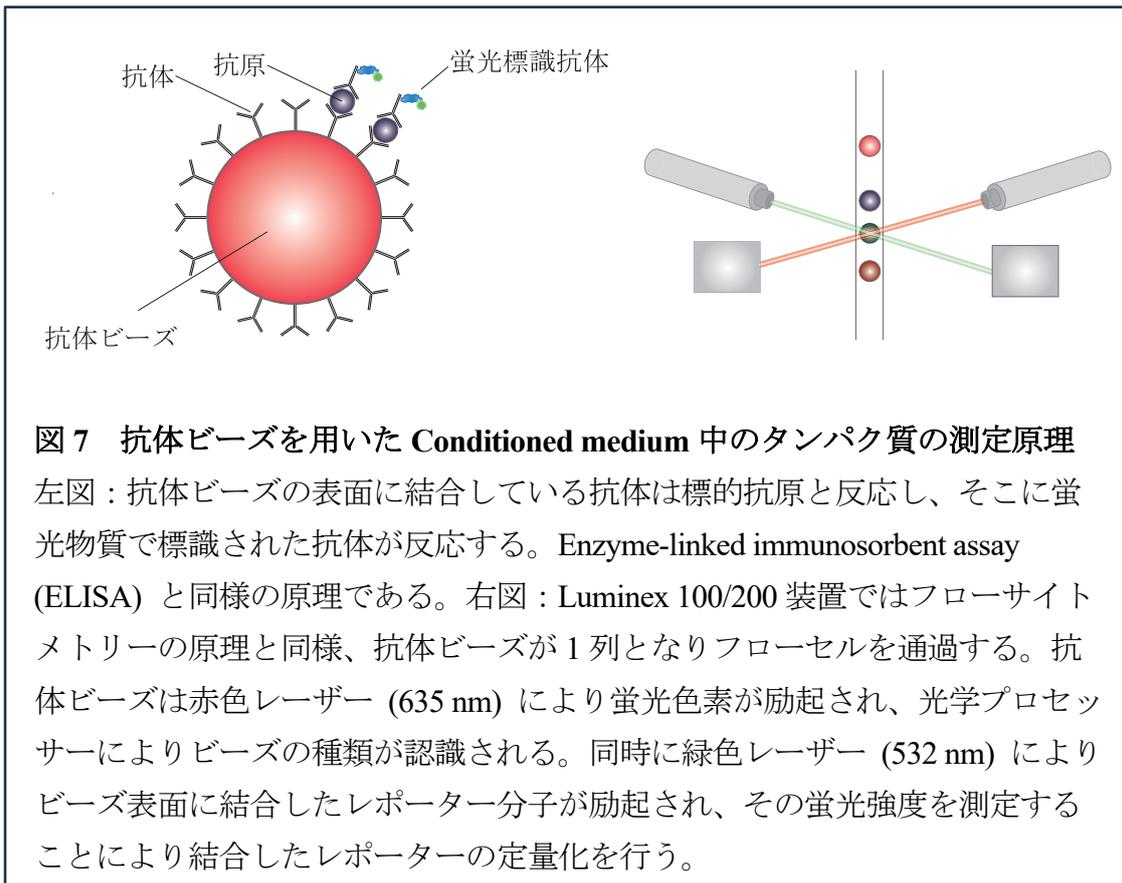
EAT; 心外膜脂肪、FBS; ウシ胎児血清、DMEM F12; ダルベッコ改変イーグル培地 F12

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-1 β)、IL-6、IL-8、プラスミノ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, TNF- α) とした。測定はマルチプレックスアッセイ装置 Luminex100/200™ (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。

- 1) 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 μ L を Mixing bottle に入れ、Bead diluent を使用して最終的に 3 mL に調整した。
- 2) Quality Control (QC) の調整：QC1 および QC2 を 250 μ L の超純水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分攪拌させた後、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 μ L の超純水で希釈し、手順 (2) と同様に攪拌、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 μ L ずつ分注した。50 μ L 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 μ L 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。
- 5) 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 μ L 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 °C で 10 分間攪拌した。攪拌終了後、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 μ L 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 μ L ずつ分注した。サンプルウェルには Assay buffer を 25 μ L を分注し、各 EAT 検体から作成された培 conditioned medium を 25 μ L ずつ注入した。各 Standard 溶液、QC、conditioned 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攪拌した調整済み抗体ビーズ溶液を 25 μ L ずつ素早く分注した。
- 8) プレートシーラーで保護し、アルミホイルで遮光した後、4 $^{\circ}$ C の冷蔵庫内で 16 から 18 時間のインキュベーションを行った。
- 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 buffer を 200 μ L 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 μ L 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 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションした。
- 11) 操作 (9) 同様にプレート洗浄を 3 回行った。各ウェルに 100 μ L 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 μm 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) 。

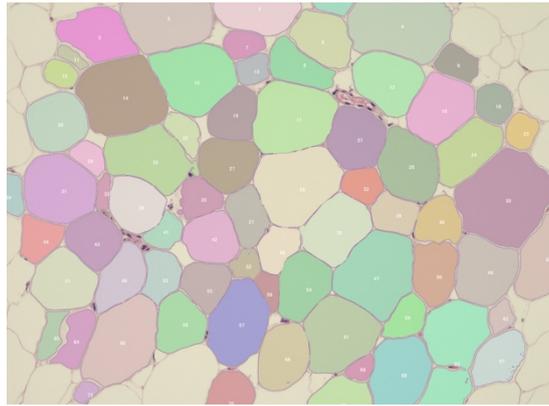


図 8 BZ-X analyzer software を用いた脂肪面積の測定

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。

- 1) ホモジネート作成：-80 °C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 μ L を添加した Lysis Buffer RA1 350 μ L に入れ、ダウンス型ホモジナイザー (BioMasher II, nippi, Tokyo, Japan) を用いて破碎した。
- 2) 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 \times g, 1 min, 24 °C)。
- 3) 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 μ L 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 °C) 。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 °C) 。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 °C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) 。
- 11) 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 °C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、SYBR™ green アッセイによる real time polymerase chain 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 StepOnePlus™ 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°C で保存された DNA 溶液は氷上でゆっくりと解凍した。
- 2) 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。
- 3) 96 well PCR プレートの各ウェルに Master Mix $10\ \mu\text{L}$ 、Primer $1\ \mu\text{L}$ を入れ、サンプル溶液は $10\ \text{ng}$ 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 $20\ \mu\text{L}$ 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 sec, 95°C / 60 sec, 60°C

- 6) 解離曲線を作成するため、再び 95°C で 15 秒間加温した。次に 60°C で 60 秒間維持した後、15 秒毎に 0.3°C ずつ加温し、再び 95°C 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、 $2^{(Ct_{\text{nDNA}} - Ct_{\text{mtDNA}})}$ 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。

表 2 nCounter 解析システムで測定した標的遺伝子

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-1 β	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

4.13 統計学的検討

全ての統計解析は、JMP Pro version 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、カイ二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)。

表 3 患者背景

	全体 (n = 53)	POAF 群 (n = 18)	SR 群 (n = 35)	P 値
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

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, C-reactive protein; ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker

表 4 手術の種類と手術時間

	合計 (n = 53)	POAF 群 (n = 18)	SR 群 (n = 35)	P 値
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。

表 5 経胸壁心エコー検査

	合計 (n = 53)	POAF 群 (n = 18)	SR 群 (n = 35)	P 値
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

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 diameter; 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 P wave 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 P wave terminal force (PTFV1)、V1 誘導の P wave area は SR 群と比較して POAF 群で有意に高値であった。

表 6 12 誘導心電図検査

	合計 (n = 53)	POAF 群 (n = 18)	SR 群 (n = 35)	P 値
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 波高値 (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'波高値 (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

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

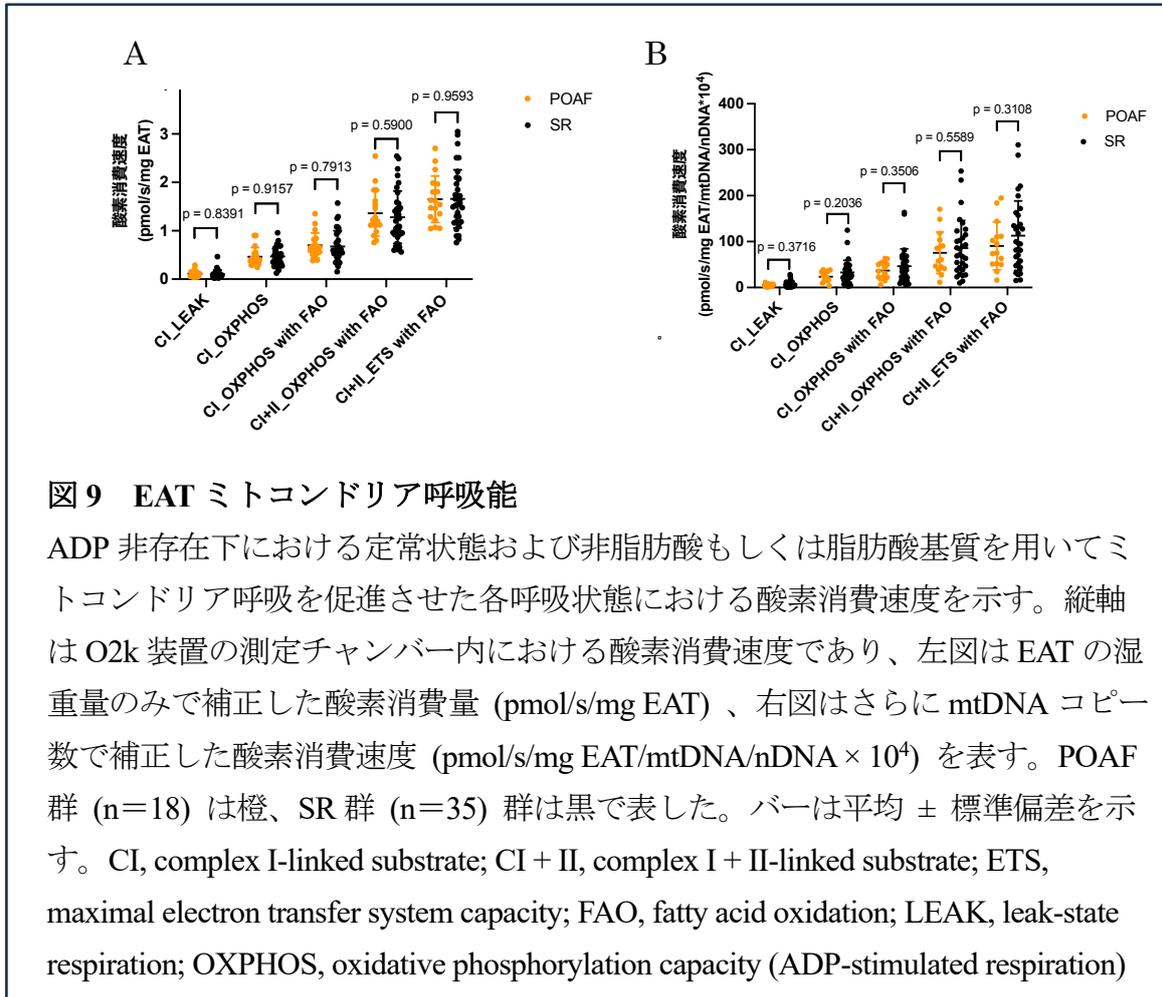
EAT 体積	合計 (n = 53)	POAF 群 (n = 18)	SR 群 (n = 35)	P 値
全体, cm ³	171 (131-253)	150 (119-193)	183 (132-284)	0.144
右房周囲, cm ³	15.7 (11.6-20.0)	15.0 (12.2-16.6)	16.0 (11.2-23.1)	0.364
左房周囲, cm ³	20.0 (11.2-30.1)	18.1 (13.1-22.5)	21.1 (11.1-33.8)	0.257

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)。



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: $2,145 \pm 559 \mu\text{m}^2$ vs. $2,442 \pm 798 \mu\text{m}^2$)。

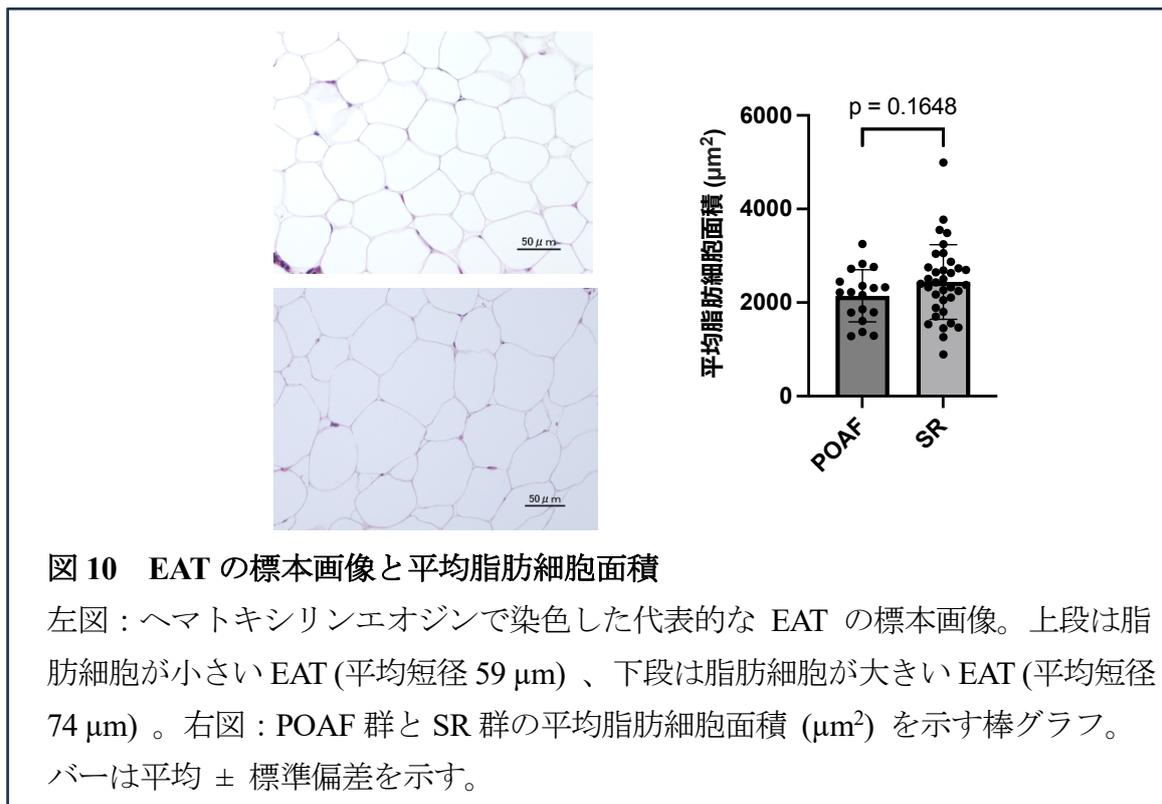


図 10 EAT の標本画像と平均脂肪細胞面積

左図：ヘマトキシリンエオジンで染色した代表的な EAT の標本画像。上段は脂肪細胞が小さい EAT (平均短径 $59 \mu\text{m}$)、下段は脂肪細胞が大きい EAT (平均短径 $74 \mu\text{m}$)。右図：POAF 群と SR 群の平均脂肪細胞面積 (μm^2) を示す棒グラフ。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-1 β 、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-1 β 、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。

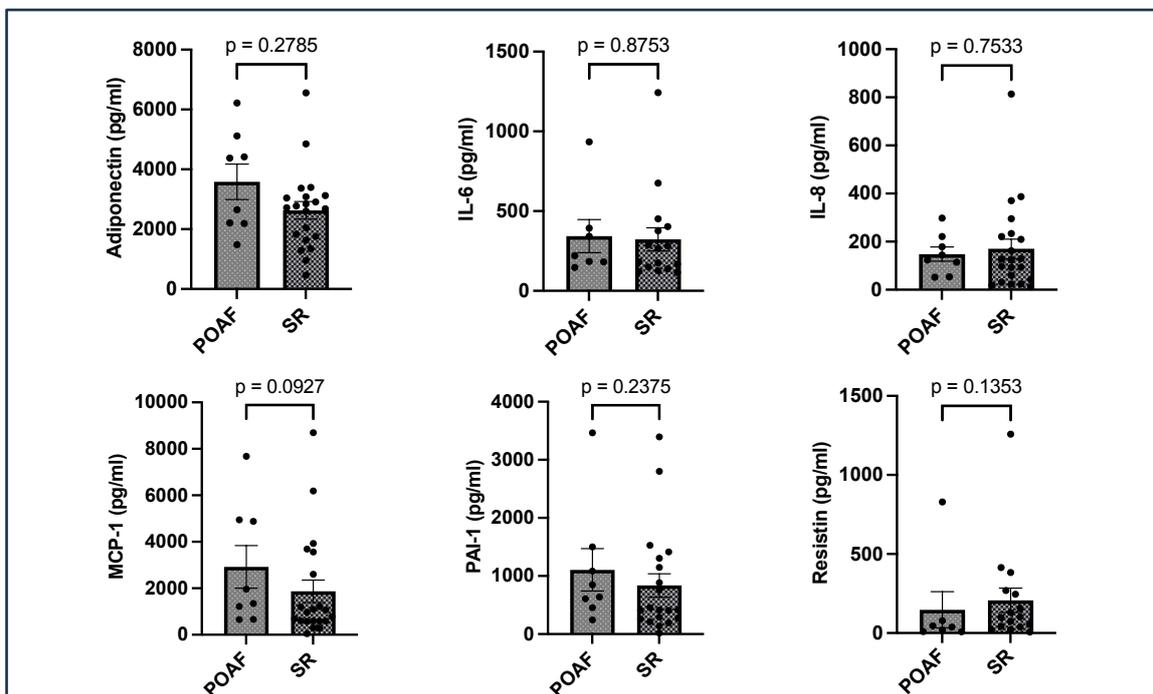


図 11 EAT secretome 中のタンパク質濃度

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-1 β	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, nm ²	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。

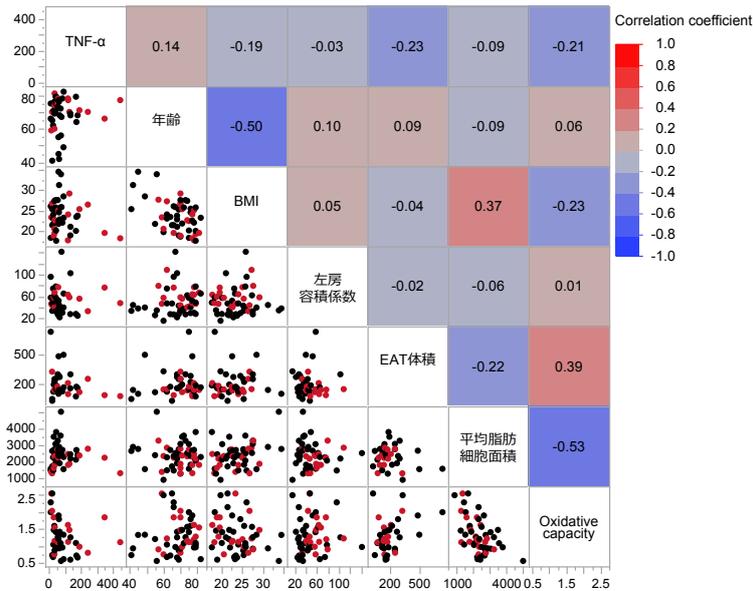


図 12 多変量ロジスティック回帰に用いた説明変数の相関行列ヒートマップ
 左下は散布図であり、右上は相関係数とそのヒートマップを表す。散布図の赤丸は POAF 群、黒丸は SR 群を示す。年齢と BMI、平均脂肪細胞面積とミトコンドリア呼吸能に中等度の負の相関関係があり（相関係数はそれぞれ 0.5 および 0.53）、BMI と平均脂肪細胞面積、EAT 体積とミトコンドリア呼吸能についても弱い正の相関関係が認められた（相関係数はそれぞれ 0.37 および 0.39）。図の Oxidative capacity は EAT ミトコンドリア呼吸能を示し、State 3 (CI+II_OXPPOS with FAO) の呼吸状態における O₂ flux を解析に用いた。TNF- α , tumor necrosis factor- alpha; BMI, body mass index; EAT epicardial adipose tissue

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。TNF- α 、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 μm^2 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 μm^2 のグループ 1、TNF- α \geq 100 count かつ平均脂肪細胞面積 < 3000 μm^2 のグループ 2、および TNF- α < 100 count かつ平均脂肪細胞面積 \geq 3000 μm^2 のグループ 3 の 3 群に分けた。

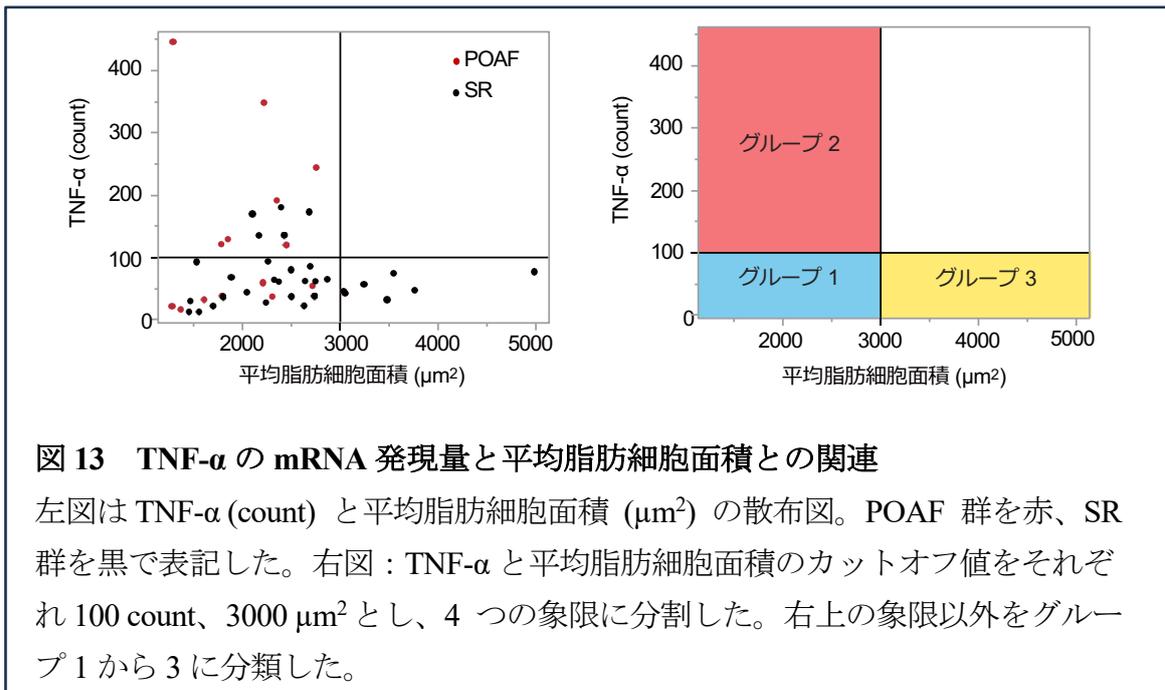


図 13 TNF- α の mRNA 発現量と平均脂肪細胞面積との関連

左図は TNF- α (count) と平均脂肪細胞面積 (μm^2) の散布図。POAF 群を赤、SR 群を黒で表記した。右図：TNF- α と平均脂肪細胞面積のカットオフ値をそれぞれ 100 count、3000 μm^2 とし、4 つの象限に分割した。右上の象限以外をグループ 1 から 3 に分類した。

5.5 新規サブグループ間の比較

TNF- α と平均脂肪細胞面積の散布図を参考にして分類した新規サブグループにおける患者背景および臨床的特徴と EAT のミトコンドリア呼吸能、脂肪細胞面積、EAT secretome 中のタンパク量、および mRNA 発現について比較した。

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。

表 10 新規サブグループにおける患者背景

	グループ 1 (n = 28)	グループ 2 (n = 12)	グループ 3 (n = 7)	P 値
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

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

連続変数は平均 \pm 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。

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

	グループ 1 (n = 28)	グループ 2 (n = 12)	グループ 3 (n = 7)	P 値
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 波高値 (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'波高値 (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 ± 5.6	0.390
LVDs, mm	35.0 ± 7.2	33.2 ± 7.8	35.9 ± 6.3	0.691
LVEF, %	58 (49-66)	55 (40-66)	50 (43-56)	0.420
E, cm/s	69.5 (53.0-89.4)	65.7 (59.3-104.0)	86.9 (52.2- 104.0)	0.979
A, cm/s	72.6 (61.8-91.9)	85.3 (69.1-97.7)	86.3 (77.3- 106.2)	0.221
E/A	0.95 (0.63-1.28)	0.78 (0.67-1.20)	0.70 (0.70- 1.20)	0.570
E/e'	9.3 (8.0-12.3)	13.3 (7.6-20.2)	11.9 (8.3-13.2)	0.465
LAD, mm	42.4 ± 5.2	40.3 ± 5.7	40.3 ± 5.7	0.433
LAVI, mL/m ²	47.0 (40.0-64.4)	51.9 (28.0-63.7)	35.2 (33.2-48.9)	0.334

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 の患者群に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_OXPPOS with FAO および CI_OXPPOS 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_OXPPOS 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 ($p = 0.0357$)。

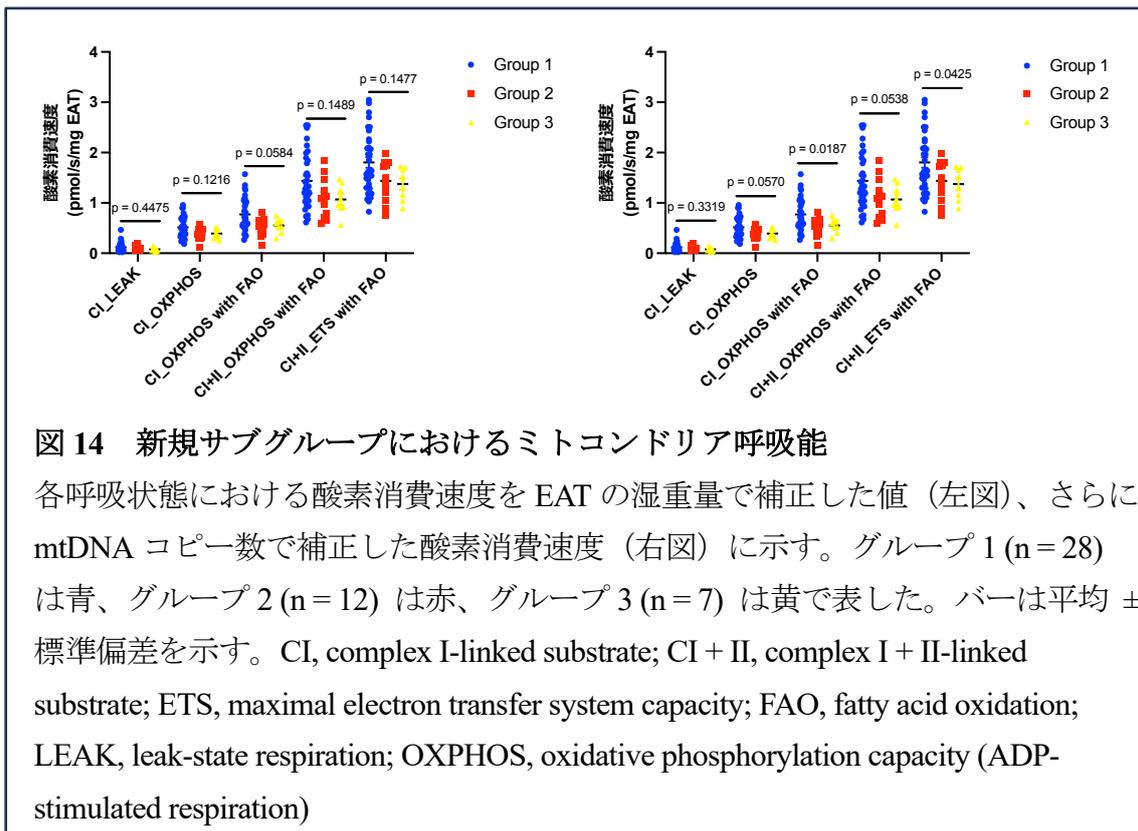


図 14 新規サブグループにおけるミトコンドリア呼吸能

各呼吸状態における酸素消費速度を EAT の湿重量で補正した値 (左図)、さらに mtDNA コピー数で補正した酸素消費速度 (右図) に示す。グループ 1 ($n = 28$) は青、グループ 2 ($n = 12$) は赤、グループ 3 ($n = 7$) は黄で表した。バーは平均 \pm 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; OXPPOS, oxidative phosphorylation capacity (ADP-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 ($p = 0.0147$)。

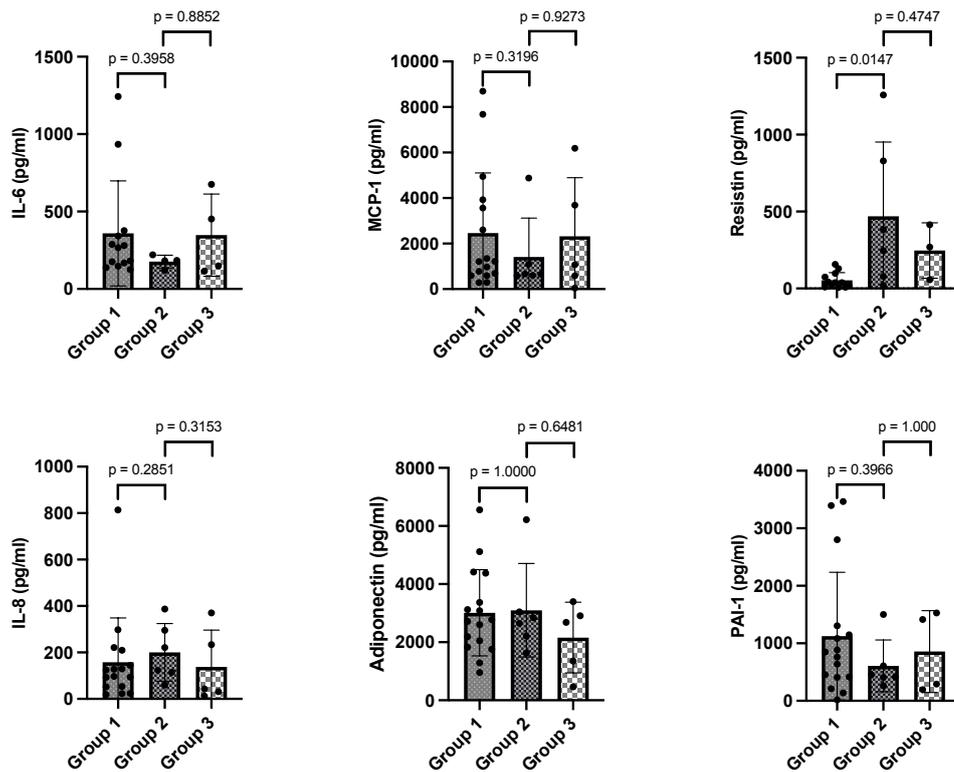


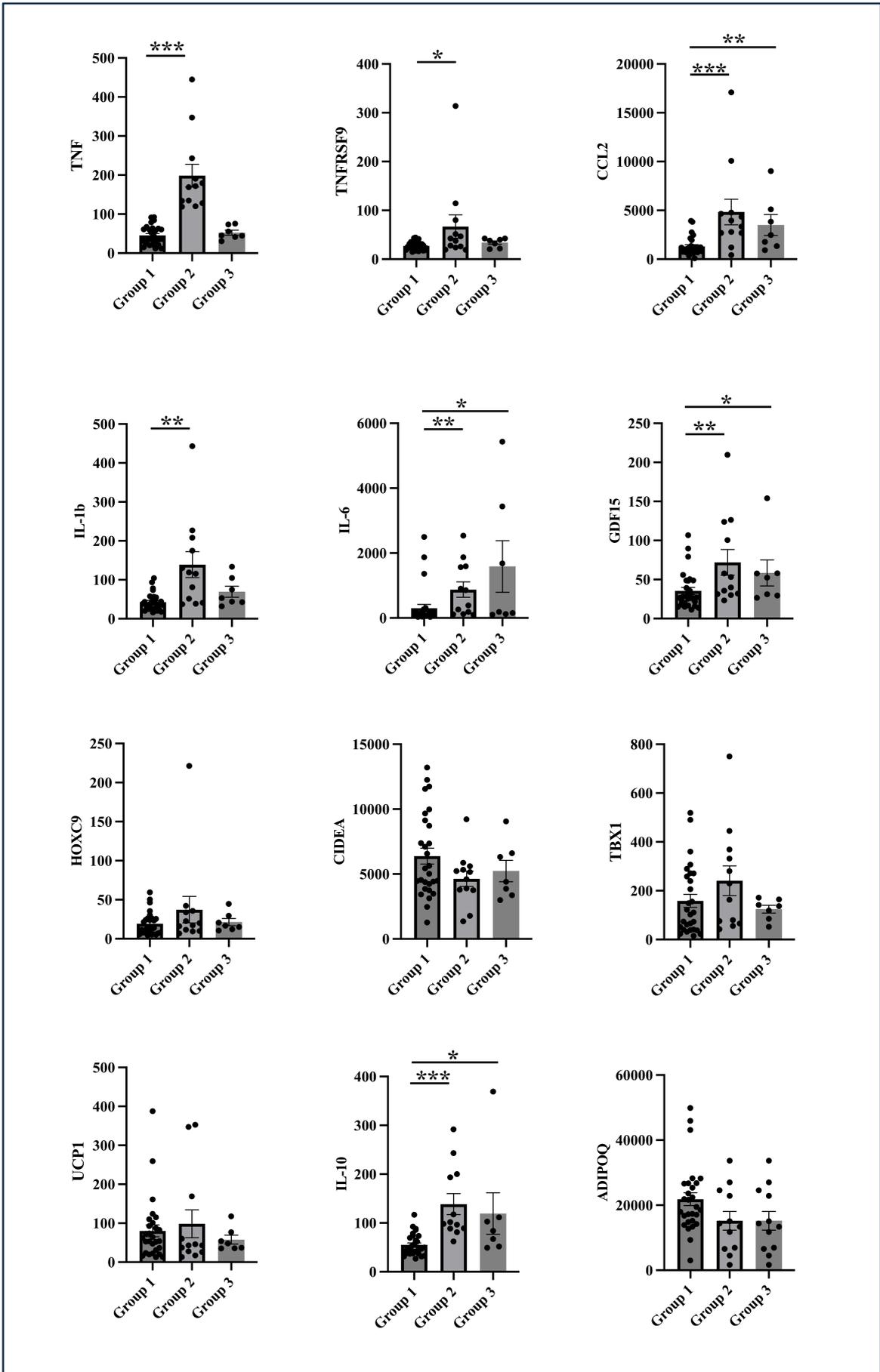
図 15 新規サブグループにおける EAT secretome 中のタンパク質濃度

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濃度を示す。各データは Shapiro Wilk 検定および QQ プロットを作成して正規性を確認し、パラメトリック検定として一元配置分散分析、ノンパラメトリック検定として Kruskal-Wallis 検定を行った。3 群の比較において P 値が有意水準を下回った場合のみ、post hoc 解析としてウィルコクソンの順位和検定を行った。グラフのバーは平均値 ± 標準偏差を示す。

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-1 β 、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、白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。



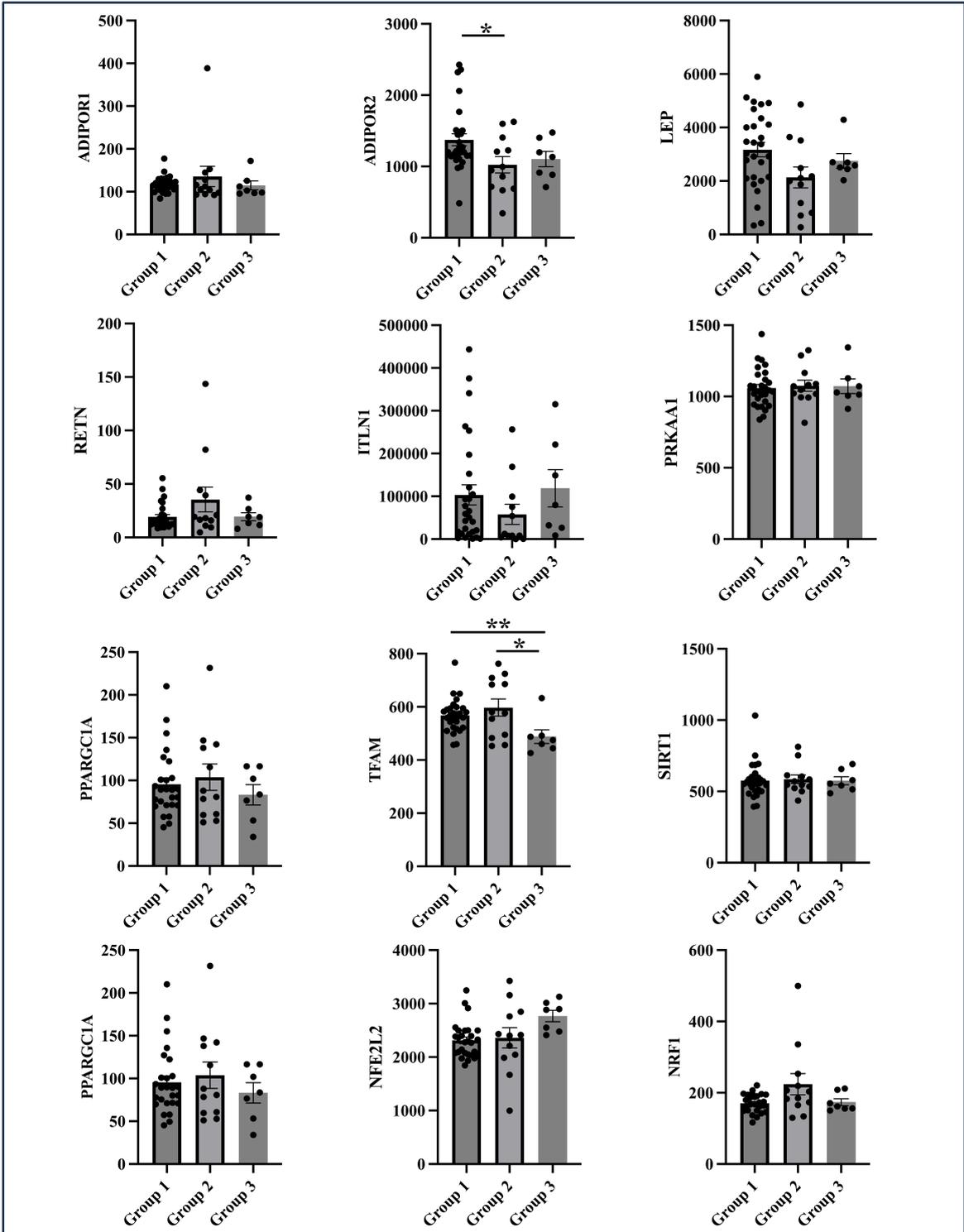


図 16 新規サブグループ間における EAT の mRNA 発現量の比較

統計解析は一元配置分散分析を行い、有意差があった項目については post hoc 解析としてウィルコクソンの順位和検定を行った。グラフのバーは平均値 ± 標準偏差を示す。

* $p < 0.05$ vs. グループ 1, ** $p < 0.01$ vs. グループ 1, *** $p < 0.001$ vs. グループ 1, † $p < 0.05$ 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_OXPPOS で -0.501 、CI_OXPPOS with FAO で -0.520 、CI+II_OXPPOS 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。

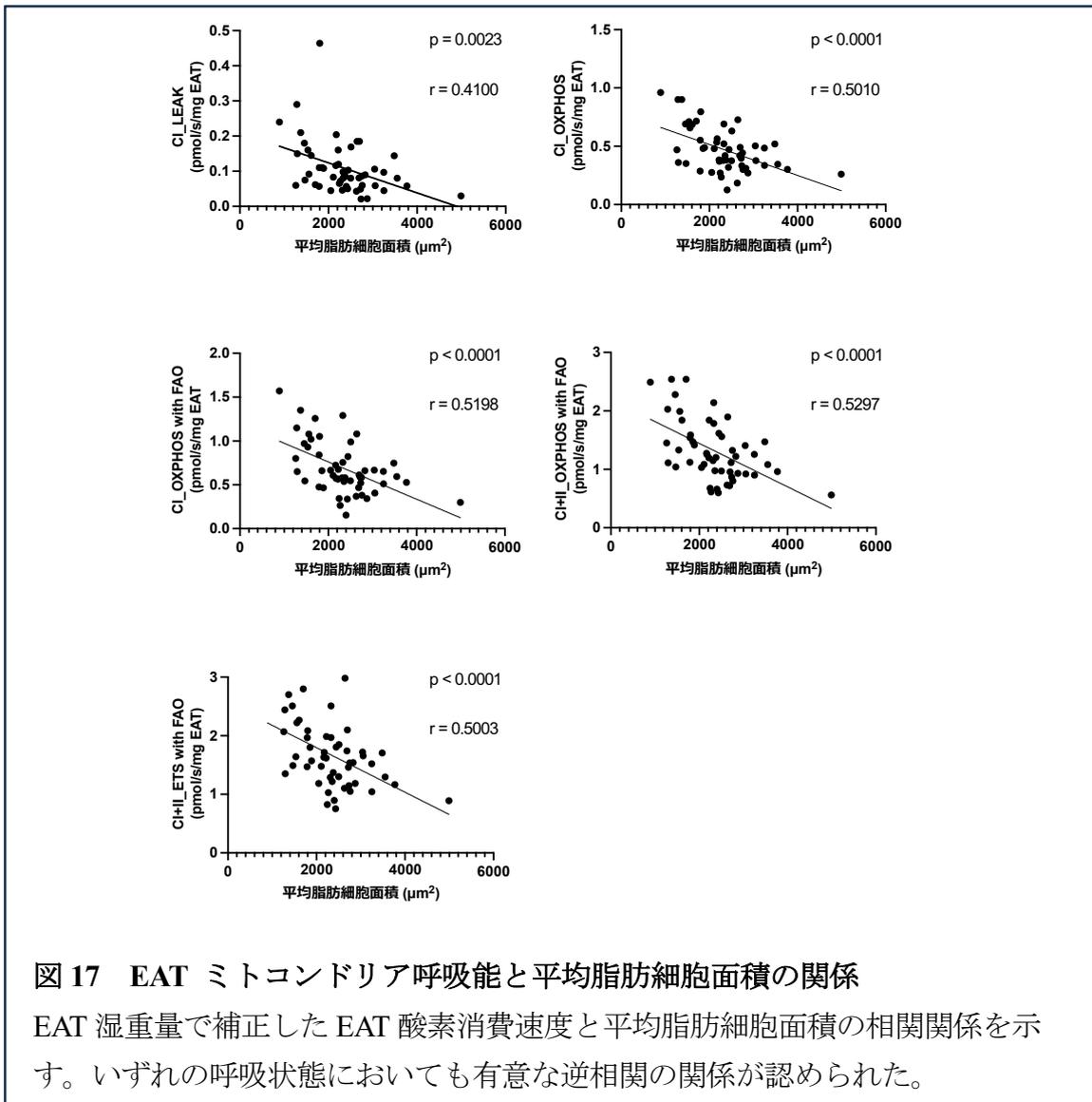


図 17 EAT ミトコンドリア呼吸能と平均脂肪細胞面積の関係

EAT 湿重量で補正した EAT 酸素消費速度と平均脂肪細胞面積の相関関係を示す。いずれの呼吸状態においても有意な逆相関の関係が認められた。

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の発症が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-1 β 、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; Vyas 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- α 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。

Antonopoulos 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)。

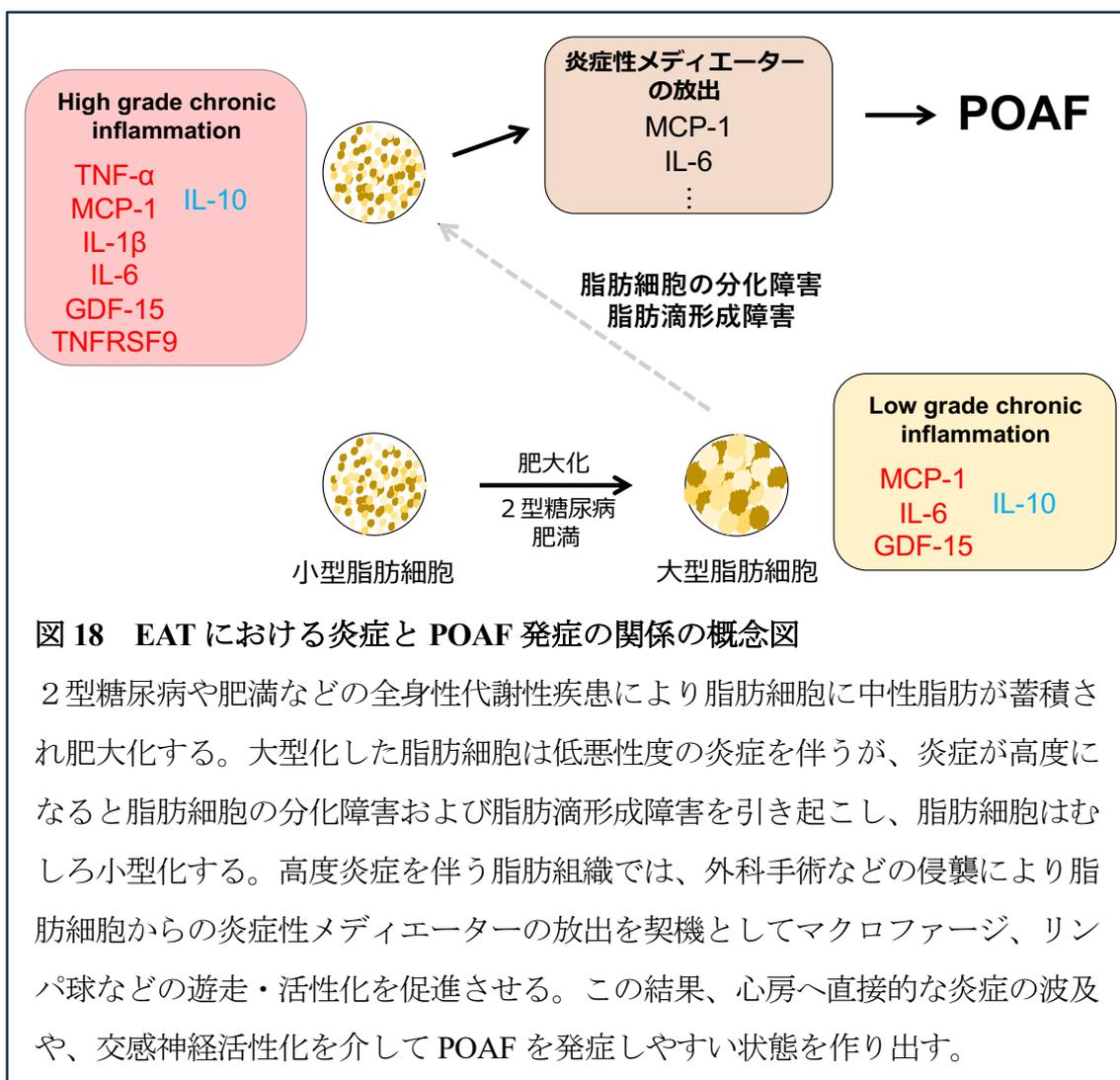


図18 EATにおける炎症とPOAF発症の関係の概念図

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 の質的变化が 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の質的变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の質的变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 渡邊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、並びに手稲溪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。

10. 引用文献

- 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., Bimpas, 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., Serhatlioglu, 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., Fraga-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., Bernasocchi, 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., Ruzylo, 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., Muhl, 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., Nicoloso, 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.