

論文の内容の要旨

論文題目 不全心形成における心臓周囲脂肪組織の役割

氏名 橋本 昌樹

心臓周囲には脂肪組織が存在することが知られている。臓側心膜の内側、心筋に接して存在する心外膜脂肪組織 (epicardial adipose tissue)、壁側心膜の外側に接している心膜外脂肪組織 (paracardial adipose tissue) である。これら脂肪組織を総称して心臓周囲脂肪組織

(pericardial adipose tissue; PeAT) と呼ぶ。PeAT と虚血性心疾患や心房細動など各種心疾患との関連がこれまで多く報告されてきた。そして近年では PeAT の量が多いと心不全を発症するリスクが高まるということも報告されたが、これは他部位の脂肪量や Body Mass Index などで補正しても同様の結果であった。しかし PeAT が多いとなぜ心不全を発症しやすくなるのか、その機序は分かっていない。本研究では PeAT の増加、肥大がどのようにして心不全発症に寄与するのか、分子生物学的機序を解明することを目的とした。

全てのマウス実験で 8-10 週齢の野生型オスマウスを使用した。まず PeAT 肥大モデルとして高脂肪食 (high fat diet; HFD) を 8 週間投与した。対照群には通常食 (normal diet; ND) を投与した。結果、HFD 群で有意な PeAT の重量増加を認めた。

次に心不全を惹起するために心不全誘発方法として知られている大動脈弓縮窄術 (transverse aortic constriction; TAC) をマウスに行い、圧負荷心不全モデルとした。TAC 施行後、ND あるいは HFD を 8 週間投与した。TAC+HFD 群では TAC+ND 群と比較し左室収縮能がより低下し左室肥大も増悪した。左室心筋の定量 PCR では心筋線維化マーカーの mRNA 発現増加を認めた。

HFD による心機能悪化が PeAT の肥大を介して起こっているかを評価するために TAC+PeAT 除去実験、TAC+PeAT 移植実験を行った。TAC+PeAT 除去実験では TAC 時に PeAT を外科的に除去し、その後は HFD を投与した。対照群として TAC 時に PeAT を除去しない群を用意し、こちらにも HFD を投与した。結果、TAC+PeAT 除去群では非除去群と比較し左室収縮能低下の程度が軽減し、左室心筋の心不全マーカー、線維化マーカー mRNA 発現は低下を認めた。一方、TAC+PeAT 移植実験ではあらかじめ用意した別マウスに HFD を投与し肥大させた PeAT を TAC マウスの心臓周囲に移植し、その後は ND を投与した。対照群として非移植群、内臓白色脂肪を移植した群を用意した。結果、PeAT 移植群は非移植群、内臓白色脂肪移植群と比較し心収縮能低下、左室肥大増悪を認めた。これらより HFD によって肥大した PeAT が心機能悪化を来すということが示唆された。

HFD によって肥大した PeAT ではどのような性質変化が起こっているかを調べるために網羅的遺伝子発現解析 (バルク RNA シーケンス解析) を行った。結果、HFD 投与マウスの PeAT では *Ucp1*、*Dio2*、*Cox7a1* といった褐色脂肪に特徴的な mRNA (褐色マーカー) の発

現が増加していた。他部位の脂肪における挙動も定量 PCR で調べたところ、HFD 投与によるこれら褐色マーカーの mRNA 発現増加は PeAT に特徴的であることが分かった。

HFD で肥大した PeAT で褐色マーカーの mRNA 発現が増加すること、いわゆる「褐色化」が起こることが分かった。そこで褐色化を促す薬剤である β_3 アドレナリン受容体 (β_3 AR) アゴニストであるミラベグロンを TAC マウスに投与することとした。結果、ミラベグロン投与群では左室収縮能の低下と左室肥大の増悪、左室心筋の心不全マーカー、線維化マーカー mRNA 発現増加が起こった。一方、 β_3 AR アンタゴニストである SR59230A を TAC+HFD マウスに投与すると左室収縮能低下が軽減した。これらマウスの PeAT における β_3 AR シグナルの変化をウェスタンブロットで評価したところ、TAC+ミラベグロンマウスの PeAT では β_3 AR の発現低下、その下流シグナルである hormone-sensitive lipase (HSL) のリン酸化の低下が起こることが分かった。一方、TAC+HFD マウスでは HSL のリン酸化は低下するが、TAC+HFD+SR59230A マウスではその低下が軽減する傾向を示した。つまり、PeAT における β_3 AR シグナルは HFD、ミラベグロンで低下、SR59230A で保持される傾向にあるということが分かった。In vitro でもマウス由来血管周囲脂肪を用いてミラベグロンによる持続的刺激が *Adrb3* mRNA 発現低下を起こすことを確認した。

上記マウスの心機能悪化と β_3 AR シグナル低下をつなぐ因子として、心筋の線維化や心機能障害との関連が報告されている TGF β 1 に着目した。心機能悪化を来した TAC+HFD、TAC+ミラベグロンマウスの PeAT では定量 PCR において *Tgfb1* mRNA 発現が増加していたのに対し、心機能悪化の抑えられた TAC+HFD+SR59230A マウスの PeAT では *Tgfb1* mRNA 発現の発現も抑えられていた。これより、PeAT における TGF β 1 の増加が心機能悪化に寄与している可能性を考えた。脂肪組織における TGF β 1 の産生源の一つとしてマクロファージが知られており、また HFD 負荷時に脂肪組織ではマクロファージからの TGF β 1 産生が増加することが報告されているため、マクロファージと PeAT における β_3 AR シグナル低下の関連に着目した。脂肪組織において β_3 AR シグナルは中性脂肪の加水分解を引き起こし遊離脂肪酸の放出を引き起こす。そこで脂肪酸がマクロファージの TGF β 1 産生にどのように影響するかを調べるためにマクロファージ細胞株である RAW 264.7 細胞に飽和脂肪酸のパルミチン酸 (palmitic acid; PA)、ステアリン酸 (stearic acid; SA) を添加して *Tgfb1* mRNA 発現の変化を見た。結果、PA、SA は濃度依存性に RAW 264.7 細胞の *Tgfb1* mRNA 発現を低下させた。PeAT における β_3 AR シグナルが低下することで遊離脂肪酸の放出が減り PA、SA 濃度も減ることで PeAT のマクロファージからの TGF β 1 産生が相対的に増加し、心筋線維化を惹起、心機能悪化を来す、という可能性が考えられた。

本研究から、PeAT の肥大と心不全発症との関連について、肥大 PeAT における β_3 AR シグナルの低下による遊離脂肪酸の放出低下、これによるマクロファージからの TGF β 1 産生増加が心筋線維化、心機能悪化を惹起し心不全発症に寄与するという機序が示唆された。これらの結果は PeAT と心不全の関係に対する新たな見識を与えるものである。