

審査の結果の要旨

氏 名 橋本 昌樹

心臓周囲には心外膜脂肪組織（epicardial adipose tissue）、心膜外脂肪組織（paracardial adipose tissue）と呼ばれる脂肪組織が存在し、これら脂肪組織は総称して心臓周囲脂肪組織（pericardial adipose tissue; PeAT）と呼ばれる。近年 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が報告されたがその機序は分かっていない。本研究は 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ものである。

まず PeAT 肥大マウスモデルとして高脂肪食（high fat diet; HFD）をオスマウスに 8 週間投与したところ通常食（normal diet; ND）を投与したマウスと比較し有意な 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 週間投与したところ 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 発現が増加し病理標本における線維化領域は増加を認めた。

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 に加えて PeAT を除去する実験、PeAT を移植する実験を行った。TAC+PeAT 除去実験では PeAT の除去により HFD 投与時の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。また TAC+PeAT 移植実験では PeAT の移植を行うことにより HFD 投与をしなくとも TAC マウスの心収縮能は低下し、左室肥大は増悪することが示された。

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 PeAT の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、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 $\beta 3$ アドレナリン受容体（ $\beta 3AR$ ）アゴニストであるミラベグロンを TAC マウスに投与したところ、TAC+ミラベグロン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

一カー mRNA 発現増加が起こった。一方、 $\beta 3AR$ 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は軽減した。これらマウスの PeAT における $\beta 3AR$ シグナルの変化をウエ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 $\beta 3AR$ 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 $\beta 3AR$ 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。

上記マウスの心機能悪化と $\beta 3AR$ 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が考えられた。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、HFD 投与時には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。また脂肪組織において $\beta 3AR$ 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 *Tgfb1* mRNA 発現を調べたところ、RAW 264.7 細胞における *Tgfb1* mRNA 発現は添加した PA、SA の濃度依存的に低下するということがわかった。PeAT における $\beta 3AR$ 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。

以上、本論文は、肥大した PeAT が心機能をどのような機序で悪化させるか、分子生物学的機序から考察し、HFD 投与、PeAT 除去、移植といった方法で肥大 PeAT が心機能悪化を来していることを示し、また HFD 投与マウスの PeAT では褐色化が起こっていることを明らかにした。ここから $\beta 3AR$ シグナルの関与を見出し、マクロファージ、TGF β 1 を介して心機能の悪化が引き起こされるという具体的な機序を提唱した。本研究により得られた知見はこれまでになかった PeAT を対象とする新規心不全治療法を開発するにあたり重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。