



Title	慢性心不全における末梢血単核球ミトコンドリア由来の活性酸素種産生量の増加は疾患重症度や運動耐容能低下と関連する
Author(s)	白川, 亮介
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13446号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13446
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91674
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2460
File Information	Ryosuke_Shirakawa.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

慢性心不全における末梢血単核球ミトコンドリア
由来の活性酸素種産生量の増加は疾患重症度や
運動耐容能低下と関連する

**(Increased mitochondrial reactive oxygen species
generation in circulating peripheral blood
mononuclear cells in patients with chronic heart
failure: Correlations with disease severity and
exercise intolerance)**

2019年3月

北海道大学

白川 亮介

学位論文

慢性心不全における末梢血単核球ミトコンドリア
由来の活性酸素種産生量の増加は疾患重症度や
運動耐容能低下と関連する

**(Increased mitochondrial reactive oxygen species
generation in circulating peripheral blood
mononuclear cells in patients with chronic heart
failure: Correlations with disease severity and
exercise intolerance)**

2019年3月

北海道大学

白川 亮介

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
要旨.....	3
1. 略語表.....	7
2. 緒言.....	9
3. 研究方法.....	16
3.1. 対象患者.....	16
3.2. 研究プロトコール.....	18
3.3. ミトコンドリア呼吸能測定.....	19
3.4. ミトコンドリア由来の ROS 産生量測定.....	21
3.5. 全身の酸化ストレスおよび炎症の測定.....	23
3.6. 統計学的解析.....	23
4. 研究結果.....	24
4.1. 研究対象者背景および臨床的特徴.....	24
4.1.1. 慢性心不全患者とコントロール群の比較.....	24
4.1.2. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の比較.....	24
4.2. PBMC ミトコンドリア呼吸能.....	26
4.2.1. 慢性心不全群とコントロール群の比較.....	26
4.2.2. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の比較.....	27
4.3. PBMC ミトコンドリア ROS 産生能.....	28
4.3.1. 慢性心不全群とコントロール群の比較.....	28
4.3.2. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の比較.....	29
4.3.3. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と全身の酸化ストレスとの相関.....	29
4.3.4. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と心不全重症度との相関.....	31
4.3.5. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と運動耐容能との相関.....	32
5. 考察.....	33
5.1. 慢性心不全患者における酸化ストレス.....	33
5.2. PBMC ミトコンドリア由来の ROS と全身の酸化ストレスとの関連.....	33
5.3. 慢性心不全における PBMC ミトコンドリア呼吸能低下と PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生増加.....	34
5.4. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と心不全重症度との関連.....	34
5.5. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と運動耐容能との関連.....	34
5.6. 慢性心不全患者における PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生増加のメカニズム.....	35
5.7. PBMC ミトコンドリアの呼吸状態 (respiratory state) と ROS 産生.....	35
5.8. 本研究の限界.....	36
6. 総括および結論.....	37

謝辭.....	38
利益相反.....	39
引用文獻.....	40

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) Ryosuke Shirakawa, Takashi Yokota, Takayuki Nakajima, Shingo Takada, Miwako Yamane, Takaaki Furihata, Satoshi Maekawa, Hideo Nambu, Takashi Katayama, Arata Fukushima, Akimichi Saito, Naoki Ishimori, Flemming Dela, Shintaro Kinugawa, Toshihisa Anzai. Increased mitochondrial reactive oxygen species generation in circulating peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced chronic heart failure: correlations with disease severity and exercise intolerance. *European Journal of Heart Failure*.

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) Ryosuke Shirakawa, Takashi Yokota, Takayuki Nakajima, Shingo Takada, Takaaki Furihata, Satoshi Maekawa, Arata Fukushima, Akimichi Saito, Shintaro Kinugawa, Toshihisa Anzai. Role of mitochondrial reactive oxygen species from circulating blood cell in heart failure: the association with severity of heart failure and exercise intolerance. Cell Symposia Multifaceted Mitochondria, Jun 4, 2018, San Diego, USA.
- 2) Ryosuke Shirakawa, Takashi Yokota, Takayuki Nakajima, Shingo Takada, Miwako Yamane, Takaaki Furihata, Junichi Matsumoto, Masaya Tsuda, Takashi Katayama, Satoshi Maekawa, Hideo Nambu, Arata Fukushima, Akimichi Saito, Shintaro Kinugawa, Toshihisa Anzai. Excessive mitochondrial reactive oxygen species emission from circulating blood cells is associated with severity of heart failure and exercise intolerance. European Society of Cardiology Congress 2018. Aug 26, 2018, Munich,

Germany.

- 3) Ryosuke Shirakawa, Takashi Yokota, Takayuki Nakajima, Shingo Takada, Miwako Yamane, Akimichi Saito, Satoshi Maekawa, Naoya Kakutani, Takaaki Furihata, Junichi Matsumoto, Masaya Tsuda, Takashi Katayama, Hideo Nambu, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Ippei Nakano, Arata Fukushima, Shintaro Kinugawa, Toshihisa Anzai. Excessive mitochondrial reactive oxygen species emission from circulating blood cells is associated with systemic oxidative stress, severity of heart failure, and exercise intolerance. 91st American Heart Association Scientific Session, Nov 12, 2018, Chicago, USA.

要旨

【背景と目的】

慢性心不全 (CHF; chronic heart failure) は心機能障害のみならず、貧血や腎不全、血管内皮機能障害、骨格筋障害などの全身障害を特徴とする慢性症候群である。慢性心不全患者では全身の酸化ストレスが増加し、心不全の重症度や予後と関連することが示されている。活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) は酸化ストレスに寄与するため、心筋由来の過剰な ROS 産生は心不全発症の原因の一つと考えられている。一方、全身の酸化ストレスは慢性心不全の進展に重要な役割を果たしていると考えられているが、そのメカニズムはまだ十分に解明されていない。

ミトコンドリアはエネルギーの主要な産生源として生命維持に必要な不可欠な細胞内小器官であると同時に ROS の産生源でもあるため、ミトコンドリア機能障害は細胞そのものや、隣接する細胞あるいは臓器の障害に関与すると考えられている。全身を循環する血球の中でも、リンパ球と単球で構成される末梢血単核球 (PBMC; peripheral blood mononuclear cell) はミトコンドリアによる好気性代謝に依存しており、これまでに PBMC ミトコンドリア機能障害は、自閉症、うつ病、および筋萎縮性軸索硬化症といった様々な疾患の発症・進展に関与していることが明らかにされている。さらに近年、左室肥大などの軽度の心機能異常を有する高血圧あるいは2型糖尿病患者においても PBMC ミトコンドリア呼吸能が低下していることが報告された。

そこで我々は、慢性心不全の進展における PBMC ミトコンドリアの役割に着目し、「PBMC ミトコンドリア由来の過剰な ROS 産生は、骨格筋機能や血管内皮機能など全身の臓器機能を低下させ、結果として慢性心不全の進展に寄与する」という仮説を立て、慢性心不全患者における心不全の重症度や運動耐容能低下と PBMC ミトコンドリア ROS 産生量との関連について検証することにした。

【対象と方法】

慢性心不全患者 34 名，心疾患を有さないコントロール群 10 名を登録した．慢性心不全患者のうち，16 名をニューヨーク心臓協会 (NYHA; New York Heart Association) 分類 I-II 群 (軽症群) に，18 名を NYHA 分類 III 群 (中等度～重症群) に分類し，2 群間で比較検討を行った．全ての研究参加者に対し，末梢静脈より空腹時採血を行うとともに，尿検体を採取した．血液検体の一部から Ficoll-paque gradient media を用いて PBMC を分離し，蛍光吸光度計付き高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置を用いて，ミトコンドリア呼吸能および ROS 産生量を測定した．また残りの血液および尿検体は -80°C フリーザーに保管し，後日全身の酸化ストレスなどを解析した．さらに慢性心不全患者では，心エコーによる心機能評価，および心肺運動負荷試験 (CPET; cardiopulmonary exercise testing) による運動耐容能評価を行った．

【結果】

慢性心不全患者において，NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の間では，年齢，性別，体重，BMI，心不全の基礎疾患，動脈硬化リスク因子，および内服薬に有意差は認めなかった．一方，NYHA 分類 III 群は，NYHA 分類 I-II 群と比べて，左室収縮能の指標である LVEF (left ventricular ejection fraction) は有意に低下しており，心不全の重症度マーカーである血漿 BNP (brain natriuretic peptide) は有意に高値であった．さらに運動耐容能の指標である最大酸素摂取量 (peak VO₂; peak oxygen uptake) は NYHA 分類 III 群で有意に低下していた．

コントロール群と比較して，慢性心不全患者の PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は増加していたが，PBMC ミトコンドリア呼吸能については両群で差がなかった．一方，慢性心不全患者の間で比較した場合，NYHA 分類 III 群では NYHA 分類 I-II 群と比べて，PBMC ミトコンドリア呼吸能が有意に低下しており，PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量も有意に増加していた．

慢性心不全患者では，PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は，全身の酸化

ストレスマーカーである尿中 8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine) と正の相関を認められた。さらに PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は血漿 BNP と有意な正の相関を、peak VO₂ と有意な負の相関を認め、心不全重症度や運動耐容能との関連が示唆された。

【考察】

慢性心不全患者では、NYHA 分類 I-II 群と比較して NYHA 分類 III 群で PBMC ミトコンドリア呼吸能が低下しており、PBMC ミトコンドリア由来 ROS 産生量が増加していた。また PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は、尿中 8-OHdG と正の相関を有しており、全身の酸化ストレスと関連を認めた。さらに、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は、血漿 BNP レベルや運動耐容能の指標である peak VO₂ と強い相関を認めた。これらの指標は心臓のみならず全身の臓器障害を反映している可能性があり、PBMC が全身を循環する中で過剰に ROS を産生し、心筋のみならず、骨格筋や末梢血管内皮などの他臓器を障害することにより、心不全の重症化に関与している可能性が推測された。

本研究では、中等度～重症の心不全患者において、特にミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる state 3 での PBMC 由来の ROS 産生量が増加していることを明らかにした。PBMC は血球の中でもミトコンドリアの酸化的リン酸化によるエネルギー代謝に大きく依存しているため、ex vivo での測定ではあるが、この結果は体内での生理的条件に近い状態での PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量を反映している可能性が示唆された。

運動耐容能を規定する因子として、心機能や骨格筋機能、さらには血管内皮機能などが挙げられ、これらの機能低下が慢性心不全の進展に寄与することが知られている。PBMC ミトコンドリア機能は心筋や骨格筋のミトコンドリア機能と相関することが報告されており、本研究では心筋や骨格筋におけるミトコンドリア由来の ROS 産生量を測定していないものの、中等度～重症の慢性心不全患者における

PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量増加は、これらの臓器での ROS 産生量増加を反映している可能性がある。

【結論】

慢性心不全患者では、NYHA 分類 I-II 群と比較して、NYHA 分類 III 群では PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が増加しており、心不全の重症度や運動耐容能低下と関連を認めた。本研究結果は、「PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量増加は全身の酸化ストレス亢進に関与し、全身の機能低下を介して慢性心不全の進展に寄与する」という仮説を支持するものである。

1. 略語表

8-OHdG : 8-hydroxydeoxyguanosine ; 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン

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

ARB : Angiotensin receptor blocker ; アンジオテンシン受容体拮抗薬

BMI : Body mass index ; 体格指数

BNP : Brain natriuretic peptide ; 脳性ナトリウム利尿ペプチド

CHF : Chronic heart failure ; 慢性心不全

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

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

CPET : Cardiopulmonary exercise testing ; 心肺運動負荷試験

ETS : Electron transfer system ; 電子伝達系

FCCP : Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone ; カルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン

HbA1c : Hemoglobin A1c ; 糖化ヘモグロビン

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

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

hsCRP : High sensitive C-reactive protein ; 高感度 C 反応性蛋白

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

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

LVEF : Left ventricular ejection fraction ; 左室駆出率

NYHA : New York Heart Association ; ニューヨーク心臓協会

OCR : Oxygen consumption rate ; 酸素消費速度

OXPPOS : Oxidative phosphorylation ; 酸化的リン酸化

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell ; 末梢血単核球

Peak VO₂ : Peak oxygen uptake ; 最大酸素摂取量

ROS : Reactive oxygen species ; 活性酸素種

ROX : Residual oxygen consumption ; 残存酸素消費

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

2. 緒言

わが国では人口の高齢化に伴い、虚血性心疾患、高血圧、さらにはこれら器質的心疾患の終末像である慢性心不全 (CHF; chronic heart failure) の患者数が今後飛躍的に増加することが見込まれ、2030年には心不全患者が130万人を超えることが予測されている (Okura et al., 2008). 近年、心不全に対する治療は急速な進歩を遂げ、心不全患者の死亡率は年々減少傾向ではあるものの、依然として心不全発症後の平均生存期間は男性で2.34年、女性で1.79年と短く (Jhund et al., 2009), 心不全の発症・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の課題である.

慢性心不全は心機能障害のみならず、貧血や腎不全、血管内皮機能障害、骨格筋障害などの全身障害を特徴とする慢性症候群であり (Al-Ahmad et al., 2001; Ezekowitz et al., 2003; Fischer et al., 2005; Okita et al., 2013), 全身の酸化ストレスは心不全発症後の慢性心不全の進展に重要な役割を果たしていると考えられている. 慢性心不全患者では全身の酸化ストレスが亢進しており、心不全の重症度分類であるニューヨーク心臓協会 (NYHA; New York Heart Association) 分類や予後と関連することが示されている (図 1-1) (Banfi et al., 2008; Kobayashi et al., 2011; Tang et al., 2007). しかしながら、全身の酸化ストレスが心不全の進展に寄与するメカニズムは十分に明らかにされていない.

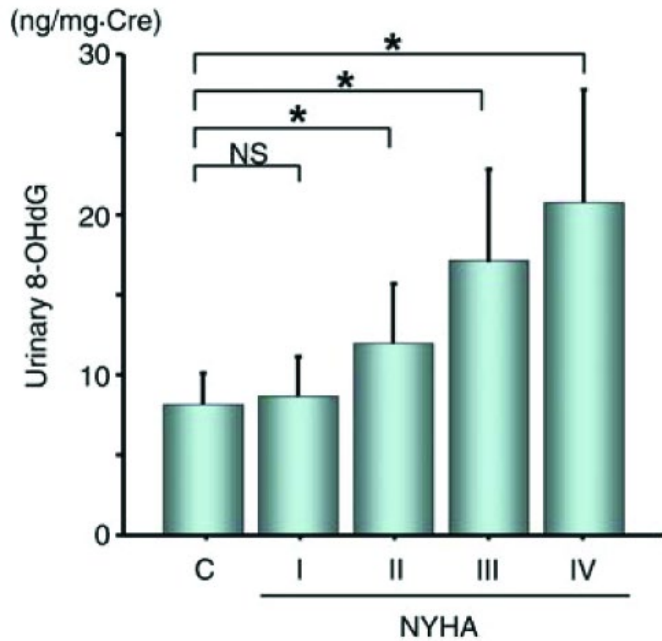


図 1-1. 全身の酸化ストレスと心不全重症度. (Kobayashi et al., 2011)より引用

全身の酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine)は心不全の重症度分類である NYHA クラス分類と関連する。

一般に、活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) は酸化ストレスの主要な構成成分であり、心臓由来の ROS の過剰産生は心不全の発症要因の一つと考えられている (Borchi et al., 2010; Heymes et al., 2003; Ide et al., 2000)。慢性心不全では、おもに心筋のミトコンドリア機能が障害されていることが報告されている (Ide et al., 1999; Stride et al., 2013) が、ミトコンドリアはエネルギーの主要な産生源として生命維持に必要不可欠な細胞内小器官であると同時に、ROS の主要な産生源でもある (図 1-2)。ミトコンドリアが電子伝達系における酸化的リン酸化によって ATP を産生する際に各複合体やコエンザイム Q から漏れ出した電子によって酸素分子が一電子還元され、superoxide が発生する。更に、ミトコンドリア由来の ROS により一旦ミトコンドリアがダメージを受けると、障害されたミトコンドリアから大量の ROS が放出され、悪循環を形成することが知られている (Zhou and Tian, 2018)。慢性心不全患者では末梢血の血球ミトコンドリアの ROS が増加していることも示されている (図 1-3) (Ijsselmuiden et al., 2008)。

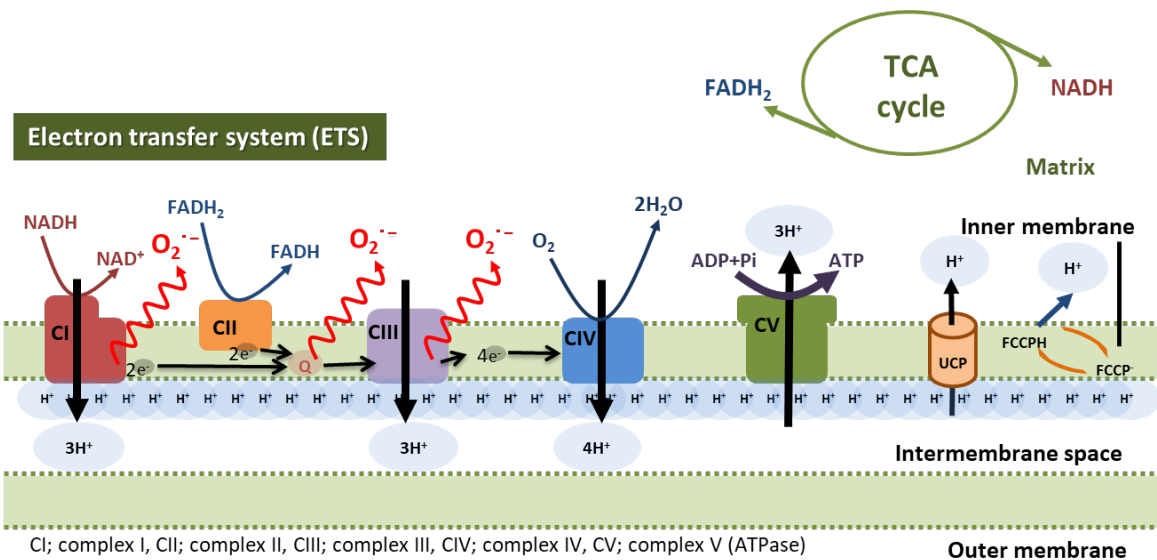


図 1-2. ミトコンドリア電子伝達系.

ミトコンドリアは電子伝達系による酸化リン酸化により ATP を産生するが、電子伝達の際に漏れ出した電子によって酸素分子が還元され、superoxide も発生する。

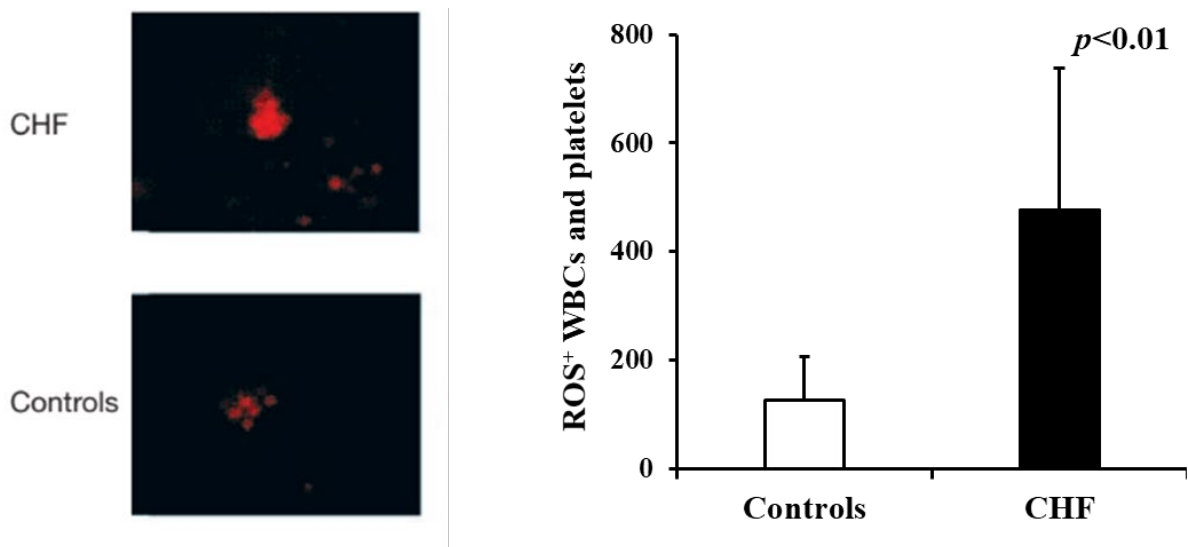
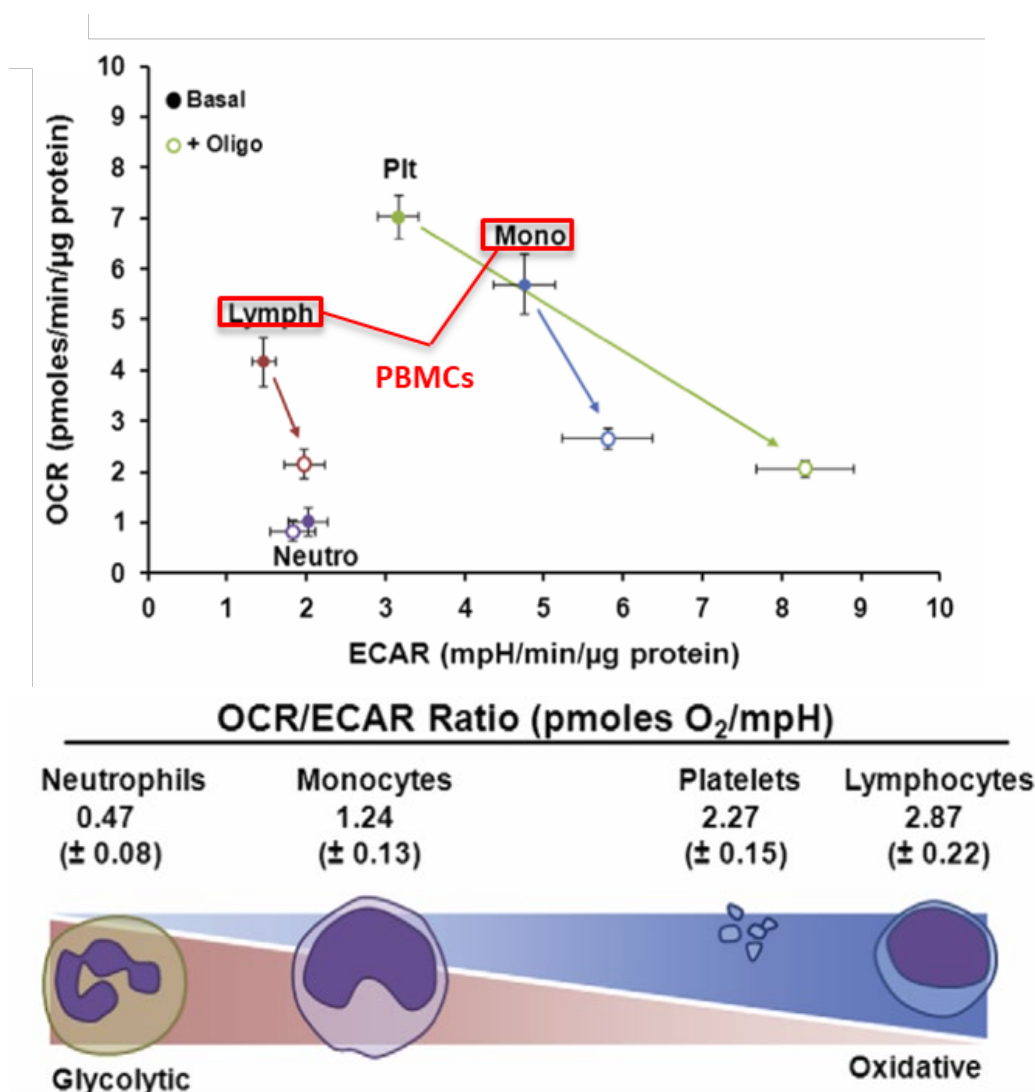


図 1-3. 末梢血血球ミトコンドリアの ROS. (Ijsselmuiden et al., 2008)より引用・改変
慢性心不全患者では末梢静脈血における ROS 陽性細胞数が有意に増加している。

全身を循環する血球のうち、リンパ球と単球からなる末梢血単核球 (PBMC; peripheral blood mononuclear cell) は単離が容易であるため、近年 PBMC を用いた研究が盛んに行われている。PBMC は豊富なミトコンドリアを有しており、エネルギー代謝を好中球と比べると酸化的リン酸化による好気性代謝が占める割合が高い (図 1-4) (Kramer et al., 2014).



- OCR, oxygen consumption rate (=oxidative metabolism)
- ECAR, extracellular acidification rate (=glycolytic metabolism)

図 1-4. 血球のエネルギー代謝. (Kramer et al., 2014) より引用・改変

PBMC を構成するリンパ球と単球は好気性代謝の指標である酸素消費速度 (OCR; oxygen consumption rate) の割合が高い。

従って、PBMCにおけるミトコンドリア機能に着目した研究が増加傾向となっており、PBMCミトコンドリア機能障害は自閉症やうつ病、筋萎縮性軸索硬化症など、様々な疾患の発症や進展に関与していることが報告されている (Ehinger et al., 2015; Giulivi et al., 2010; Karabatsiakakis et al., 2014). また、左室肥大などの軽度心機能障害を有する高血圧あるいは2型糖尿病患者においてPBMCのミトコンドリア呼吸能が低下していることが示されている (図 1-5) (Li et al., 2015). しかしながら、症候性の慢性心不全患者におけるPBMCミトコンドリア機能、あるいは心不全の重症度とPBMCミトコンドリア機能の関連について調べた研究は存在しない。

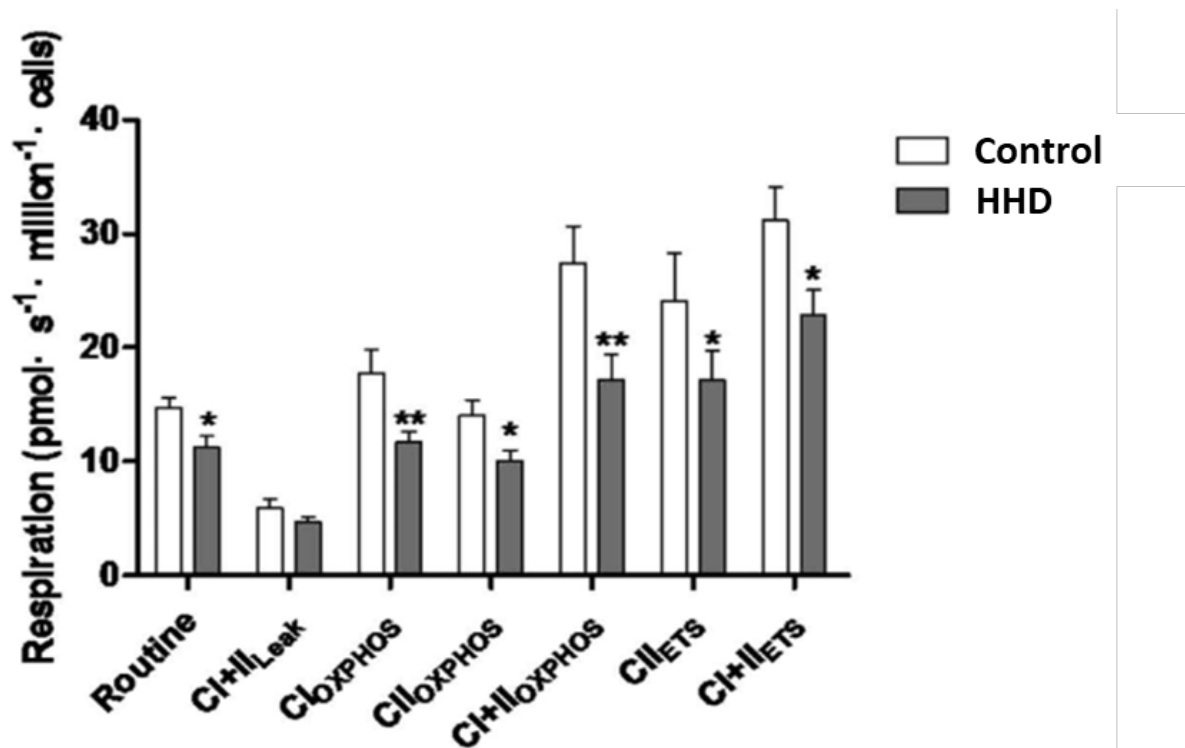


図 1-5. 高血圧性心疾患患者における PBMC ミトコンドリア呼吸能. (Li et al., 2015)

より引用・改変

心不全の重症度の指標の一つとして、運動耐容能の低下が挙げられる。心不全患者における運動耐容能の低下と予後には密接な関係があり、運動能力の指標である最高酸素摂取量 (Peak $\dot{V}O_2$) で心不全患者を分類すると、最も運動能力が低い Peak $\dot{V}O_2$ 10 ml/kg/min 未満の患者では有意に生存率が低下していた (図 1-6)。(Mancini and Schulzer, 1999)

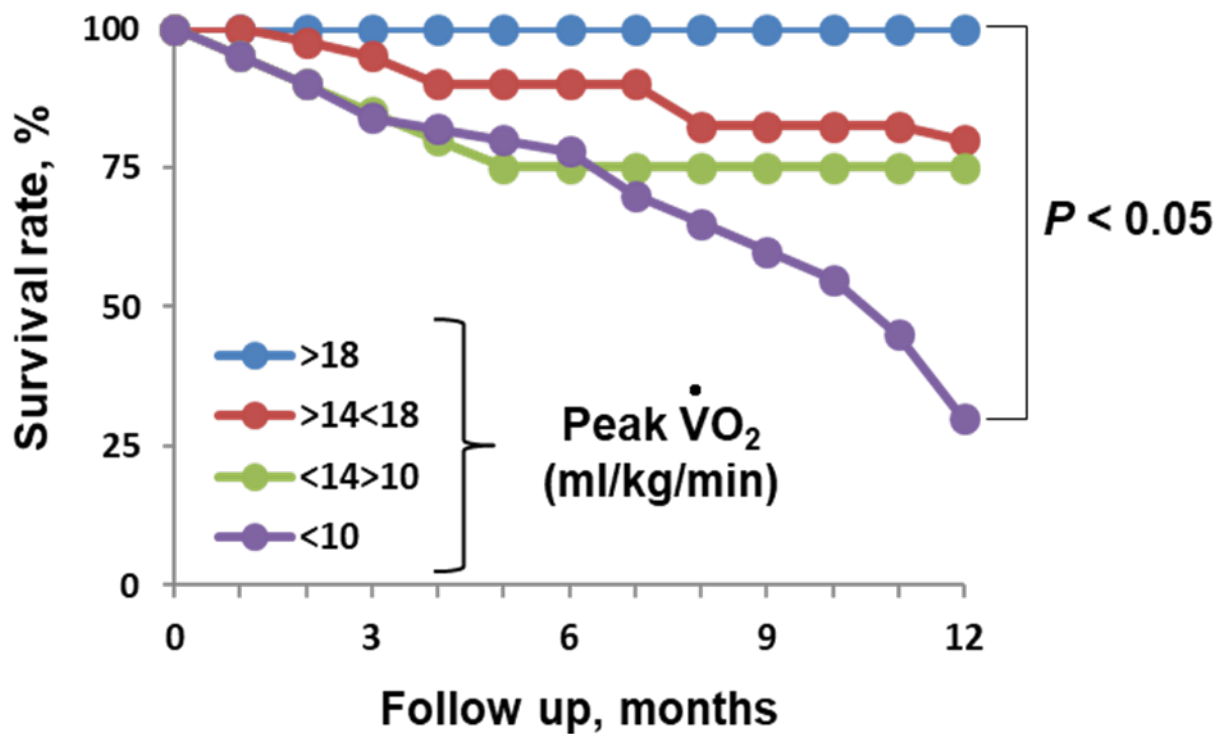


図 1-6. 運動耐容能と予後の関連。(Mancini and Schulzer, 1999)より引用・改変

そこで我々は、慢性心不全における全身の酸化ストレス亢進の原因として、PBMC ミトコンドリア由来の ROS の役割に着目し、「慢性心不全では、PBMC ミトコンドリア呼吸能の障害とともに PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が増加しており、過剰な PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生は全身の酸化ストレス亢進に関与し、結果として心不全の重症化や運動耐容能の低下に寄与する」という仮説（図 1-7）を立て、1) 慢性心不全患者では健常者と比較して PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が増加しているか、2) 慢性心不全患者では病態が進行しているほど PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が増加しており、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が心不全重症度および運動耐容能低下と関連を認めるかについて検証することにした。

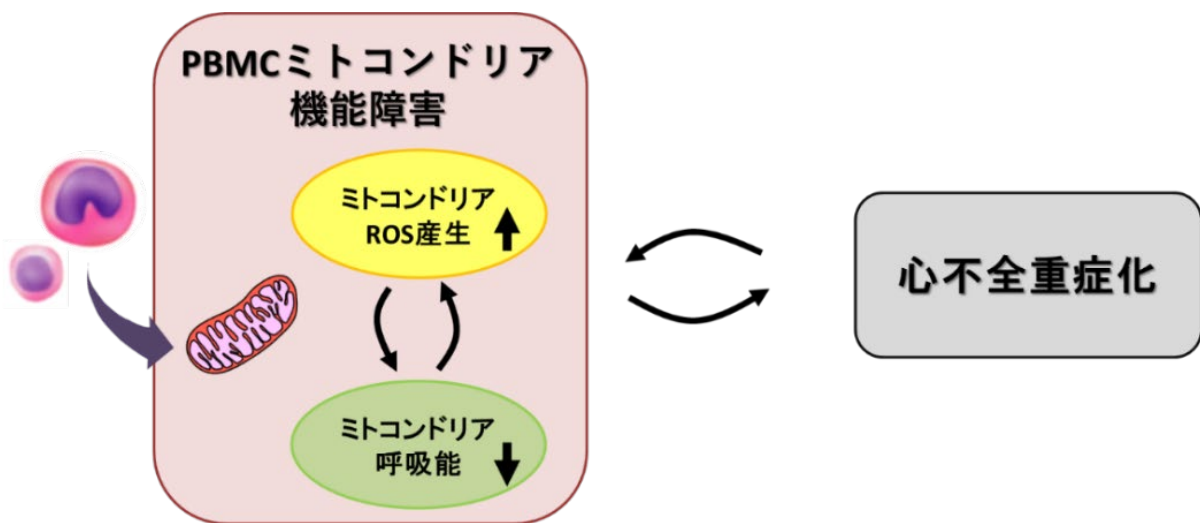


図 1-7. 本研究の仮説.

3. 研究方法

3.1. 対象患者

対象は北海道大学病院循環器内科に通院または入院中の慢性心不全患者とし、心疾患を有さない健常者をコントロール群とした。以下に選択基準および除外基準を示す。

(1) 慢性心不全患者の選択基準

- ① 同意取得時において年齢が 20 歳以上の者
- ② フラミンガムのうっ血性心不全診断基準 (McKee et al., 1971) を満たす心不全増悪による入院治療歴のある通院中の心不全患者または心不全増悪のため入院中の心不全患者
- ③ 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人の自由意思による文書同意が得られた患者

(2) 慢性心不全患者の除外基準

- ① 活動性の炎症を有する患者
- ② 悪性腫瘍を有する患者
- ③ ステロイドまたは免疫抑制剤を内服中の患者
- ④ 維持透析中の慢性腎不全患者
- ⑤ 文書による同意が得られない患者
- ⑥ その他、研究責任者が研究対象者として不相当と判断した者

(3) コントロール群の選択基準

- ① 同意取得時において年齢が 20 歳以上の者
- ② 循環器内科医による診察（問診・身体所見）で、明らかな異常を認めない者
- ③ 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、本人の自由意思による文書同意が得られた者

(4) コントロール群の除外基準

- ① 心不全の既往がある，または治療中の者
- ② 心疾患の既往がある，または治療中の者
- ③ 活動性の炎症を有する者
- ④ 悪性腫瘍を有する者
- ⑤ ステロイドまたは免疫抑制剤を内服中の者
- ⑥ 文書による同意が得られない者
- ⑦ その他，研究責任者が研究対象者として不相当と判断した者

2017年3月から2017年11月の間に上記基準に合致する慢性心不全患者34名，コントロール群10名を登録した．また慢性心不全患者のうち，自覚症状に基づいてニューヨーク心臓協会 (NYHA; New York Heart Association) 分類 I-II の16名を NYHA 分類 I-II 群 (軽症群)， NYHA 分類 III の18名を NYHA 分類 III 群 (中等度～重症群) の2群に分類し，各指標について比較検討を行った．

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 015-0468)，UMIN 臨床試験登録システムに登録した (登録番号 000022564)．全研究参加者より研究登録前に文書によるインフォームドコンセントを取得し，「ヘルシンキ宣言 (2013年10月修正)」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」 (平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号) を遵守して研究を実施した．

3.2. 研究プロトコール

全ての研究参加者に対し、10時間以上の絶食の後、末梢静脈より採血を行うとともに、尿検体を採取した。ヘパリンナトリウム入り採血管（ベノジェクト®II 真空採血管; TERUMO, Tokyo, Japan）に保存した 20 mL の血液より、Ficoll-paque gradient media (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) を用いて PBMC を分離し（図 2）、採血当日（採血後 6 時間以内）にミトコンドリア呼吸能およびミトコンドリア由来の ROS 産生量の測定を行った。また、血液検体の一部と尿検体は -80°C フリーザーに保管し、後日全身の酸化ストレスマーカーや炎症マーカーの評価に用いた。脂質プロファイル、HbA1c、および血漿脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP; brain natriuretic peptide) は、院内の通常検査にて測定を行った。

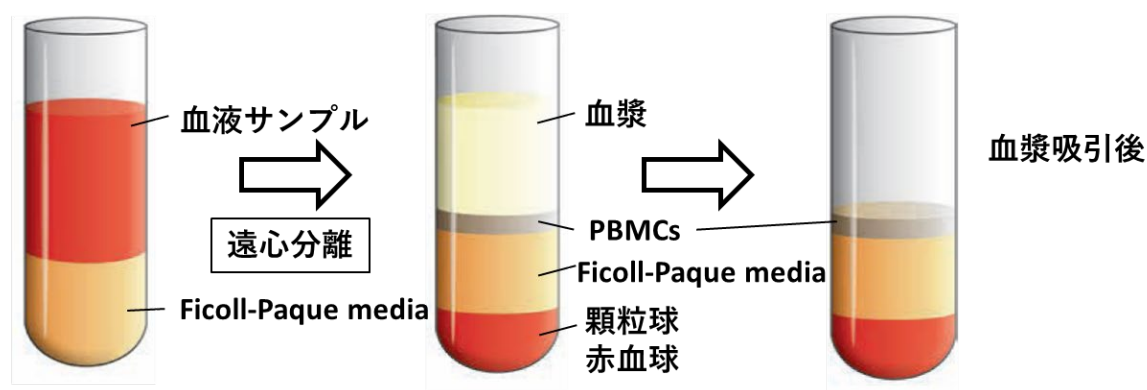


図 2. PBMC の分離

また、慢性心不全患者の心機能は心エコーで評価した。左室駆出率 (LVEF; left ventricular ejection fraction) は心尖部四腔像および二腔像から二断面ディスク法を用いて計測した。さらに自転車エルゴメーターによる Ramp 漸増負荷法を用いた心肺運動負荷試験 (CPET; cardiopulmonary exercise testing) を行い、同時に呼気ガス分析装置 (Aeromonitor AE-310S; Minato Medical Science, Osaka, Japan) を用いて breath-by-breath 法で呼気ガス分析を行うことで、運動耐容能の指標のひとつである最大酸素摂取量 (peak VO_2 ; peak oxygen uptake) を評価した。

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、先行研究を参考に、高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置 (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) を用いて測定した (Li et al., 2015).

単離した PBMC は呼吸能測定用保存液である MiR05 (0.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 3 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 20 mM Taurine (Sigma-Aldrich), 10 mM KH₂PO₄ (Merck Millipore, Burlington, MA, USA), 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 10 mM D-sucrose (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany), 60 mM K-lactobionic acid (Sigma-Aldrich), 1 g/L essentially fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) に懸濁し、最終濃度である 2×10⁶ cells/mL に調整した。

呼吸能測定装置のチャンバーに PBMC 懸濁液 2 mL を入れ、37°C で常時攪拌しながら測定を行った。Routine respiration を測定した後、digitonin (2 μmol/L) を加えて細胞膜透過処理 (permeabilization) を行った (図 3)。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、外部から投与した物質を細胞内へ到達させることが可能となる。

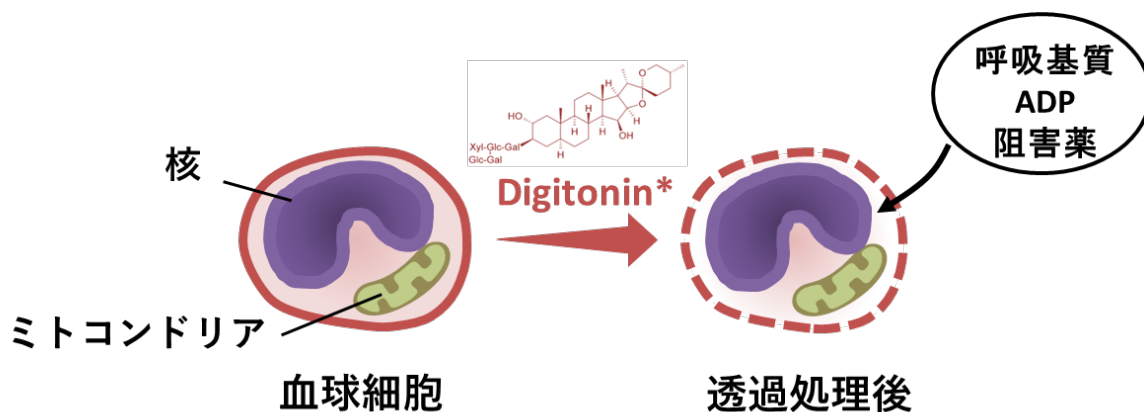


図 3. 細胞膜透過処理 (permeabilization) の概念図.

その後、以下に示すプロトコールで呼吸基質、ADP、脱共役薬、阻害薬を加え、ミトコンドリア呼吸能を測定した。

- 1) Complex Iに関連する基質であるリンゴ酸 (2 mmol/L) とピルビン酸 (10 mmol/L) およびグルタミン酸 (10 mmol/L) を加えた. Complex Iに関連する ADP に依存しない呼吸状態 (state 2 または leak state) でのミトコンドリア酸素消費速度 (O_2 flux) として, CI_L と示した.
- 2) ADP (5 mmol/L) および $MgCl_2$ (5 mmol/L) を加えた. Complex Iに関連する ADP に依存する呼吸状態 (state 3) での O_2 flux は, ミトコンドリア酸化リン酸化能 (OXPHOS; oxidative phosphorylation capacity) を意味し, CI_P と示した.
- 3) さらに Complex II に関連する基質であるコハク酸を O_2 flux が最大となるまで 2 mmol/L ずつ段階的に加えた. この状態での O_2 flux は, Complex I+II に関連する OXPHOS capacity を意味し, CI+II_P と示した.
- 4) 脱共役薬のカルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP; Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) を O_2 flux が最大となるまで 0.5 μ mol/L ずつ段階的に加えた. これは Complex I+II に関連する最大の電子伝達系 (ETS; electron transfer system) の能力を意味し, CI+II_E と示した.
- 5) 次に Complex I 阻害薬であるロテノン (0.5 μ mol/L) を加えた. Complex II に関連する最大の ETS 能力を示しており, CII_E と示した.
- 6) その後 Complex III 阻害薬であるアンチマイシン A (2.5 μ mol/L) を加え, ミトコンドリア呼吸を停止後, ミトコンドリア呼吸に依存しない O_2 flux として残存酸素消費 (ROX; residual oxygen consumption) を測定した.

各呼吸状態における O_2 flux は pmol/s/million cells of PBMCs で表し, ROX の値を引いて補正した. なお, データ解析には DatLab ソフトウェア (Oroboros Instruments) を使用した.

3.4. ミトコンドリア由来の ROS 産生量測定

Oxygraph-2k に装着した蛍光分光測定器 (Fluorescence LED2-Module; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) を用いて PBMC ミトコンドリア呼吸能と同時に ROS 産生量を測定した (Jang et al., 2018). ミトコンドリアで産生されるおもな ROS は O_2^- であるが, O_2^- は半減期が短く不安定であるため, O_2^- を H_2O_2 に変換することにより, H_2O_2 を PBMC ミトコンドリア由来の ROS として評価した. 具体的には, スーパーオキシドディスムターゼ (SOD; superoxide dismutase 5 U/mL), 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP; horseradish peroxidase 1 U/mL), Amplex[®] UltraRed 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 μ mol/L を加えた. SOD で O_2^- は H_2O_2 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. 蛍光分光測定機の resorufin 用フィルターセット (励起波長 525 nm, 検出蛍光波長 587 nm) を用いて測定を行った (図 4).

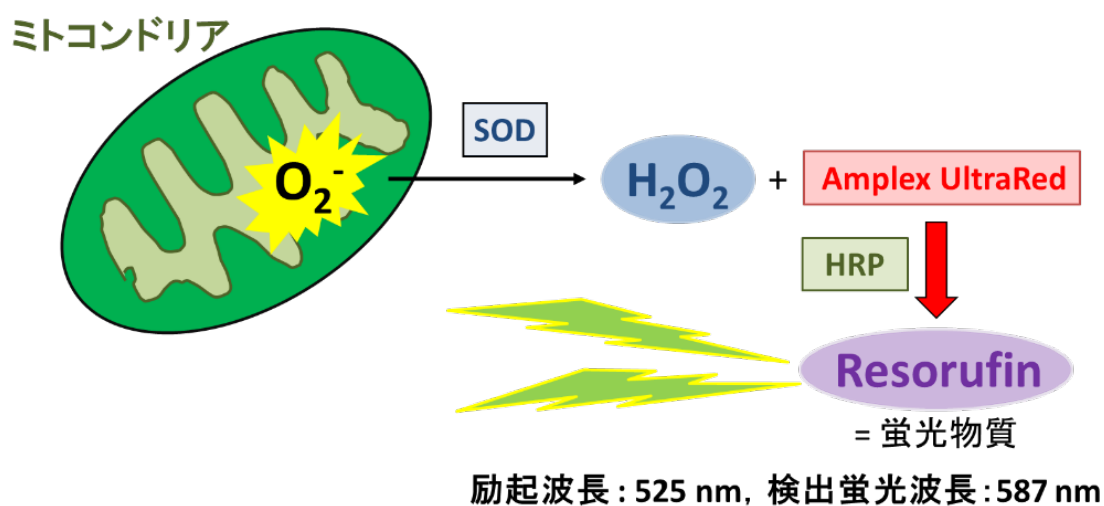


図 4. ROS 産生量測定のプロセスを示す概念図。

resorufin による蛍光量はミトコンドリア呼吸能の測定と同時にリアルタイムで計測した。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 0.1 $\mu\text{mol/L}$ を 2 回添加し感度補正を行った。なお、 H_2O_2 産生量は pmol/s/million cells of PBMCs で表した。

3.5. 透過型電子顕微鏡による PBMC ミトコンドリアの評価

PBMC ミトコンドリアの量や形態を評価するため、透過型電子顕微鏡 (H-7650; HITACHI, Tokyo, Japan) による PBMC ミトコンドリアの評価を試みた。分離した PBMC を $1\times\text{PBS}$ で 2 回洗浄し、遠心分離の後、2.5 % グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸塩緩衝液を用いて 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩前固定を行った。0.1 M リン酸塩緩衝液で洗浄後、1 % 酸化オスミウムを含む 0.1 M リン酸塩緩衝液にて後固定を行い、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察した。必要採血量を評価する目的で健常者から採血して予備実験を行い、得られた画像を図 5 に示す。

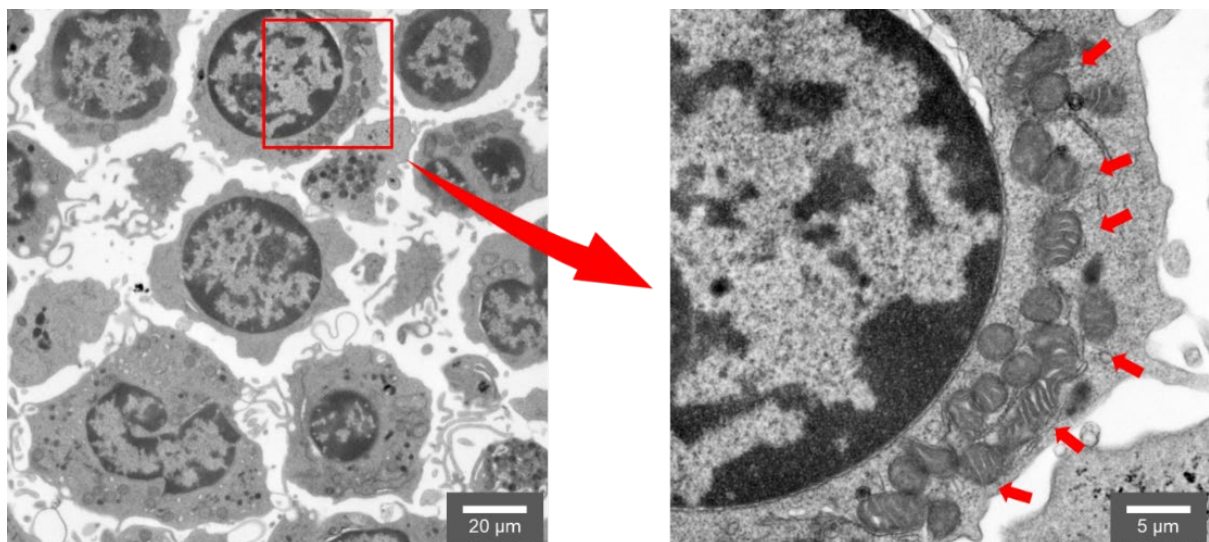


図 5. PBMC ミトコンドリアの透過型電子顕微鏡画像.

弱拡大像は PBMC の透過型電子顕微鏡画像。強拡大像はリンパ球であり、ミトコンドリアを矢印で示す。

PBMC のミトコンドリアは偏在して存在している上、個々の血球でミトコンドリア含有量も大きく異なることから、定量評価は困難であると考えられた。また、必要最低限の採血量で評価を試みたが、上記方法での評価には 5×10^6 cells 程の PBMC が必要であり、この量の PBMC を安定して採取するためには 40 ml 程度の採血を要した。心不全患者から 40 ml の追加採血を行うことは侵襲性の観点から許容できないと判断し、上記方法による評価は断念した。

3.6. 全身の酸化ストレスおよび炎症の測定

全身の酸化ストレスは、尿中 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG; 8-hydroxydeoxyguanosine) を酵素結合免疫吸着法キット (Highly sensitive 8-OHdG check; Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan) を用いて評価した。また全身の炎症は、血清高感度 C 反応性蛋白 (hsCRP; high sensitive C-reactive protein) をラテックスネフェロメトリー法による測定キット (CardioPhase hsCRP; Siemens Healthcare Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) を用いて評価した。

3.7. 統計学的解析

全ての統計解析は、統計解析ソフトウェア JMP pro 14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) で行った。各計測値は、平均値±標準偏差で表した。2 群間の平均値の差の検定には対応のない Student *t* 検定を行った。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. 研究対象者背景および臨床的特徴

4.1.1. 慢性心不全患者とコントロール群の比較

慢性心不全群およびコントロール群の患者背景を表 1 に示す。両群で、年齢、性別、体重、および体格指数 (BMI; body mass index) に有意な差を認めなかった。慢性心不全患者では全身の炎症マーカーである血清 hsCRP 値が有意に上昇していた。また、尿中 8-OHdG は慢性心不全患者で有意に増加しており、慢性心不全における全身の酸化ストレス亢進が示唆された。

表 1. 慢性心不全群とコントロール群の患者背景。

	コントロール群 (n = 10)	慢性心不全群 (n = 34)	p 値
年齢, 歳	64 ± 8	62 ± 14	0.612
男性	8 (80)	30 (88)	0.504
体重, kg	69.7 ± 9.9	66.4 ± 13.5	0.488
BMI, kg/m ²	25.0 ± 3.0	24.3 ± 4.1	0.609
血清 hsCRP, mg/L	0.48 ± 0.33	1.18 ± 1.66	0.007
尿中 8-OHdG, ng/mg Cr	7.8 ± 1.8	11.2 ± 10.7	0.007

数値は平均値 ± 標準偏差または人数(%)で示す。

4.1.2. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の比較

慢性心不全患者のうち、NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の患者背景を表 2 に示す。両群で年齢、性別、体重、BMI、心不全の基礎疾患、心血管病リスク因子、内服薬に有意差を認めなかった。総コレステロールは NYHA 分類 III 群で有意に低値であったが、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、および HbA1c に差はなかった。また血清 hsCRP についても両群間で有意差を認めなかった。尿中 8-OHdG は NYHA 分類 III 群で高い傾向にあったが、有意差はなかった。

血漿 BNP 値は NYHA 分類 III 群で有意に高値であった。さらに LVEF, peak VO₂ はともに NYHA 分類 III 群で有意に低値であった。

表 2. NYHA I-II 群および NYHA III 群の患者背景および臨床的特徴.

	NYHA I-II (n = 16)	NYHA III (n = 18)	p 値
年齢, 歳	61 ± 15	62 ± 13	0.952
男性	15 (94)	15 (83)	0.347
体重, kg	68.0 ± 12.0	65.0 ± 14.9	0.536
BMI, kg/m ²	24.8 ± 3.7	24.0 ± 4.4	0.538
収縮期血圧, mm Hg	114 ± 17	105 ± 19	0.191
拡張期血圧, mm Hg	68 ± 13	62 ± 11	0.143
心不全の基礎疾患			
虚血性	4 (25)	7 (39)	0.388
非虚血性	12 (75)	11 (61)	0.388
心血管リスク因子			
高血圧	5 (31)	2 (11)	0.147
糖尿病	4 (25)	7 (39)	0.388
脂質異常症	6 (38)	11 (61)	0.169
代謝関連			
HbA1c, %	6.0 ± 0.4	6.2 ± 0.7	0.437
総コレステロール, mmol/L	4.87 ± 0.59	4.32 ± 0.73	0.031
HDL コレステロール, mmol/L	1.29 ± 0.26	1.28 ± 0.34	0.932
LDL コレステロール, mmol/L	2.87 ± 0.48	2.56 ± 0.69	0.149
中性脂肪, mmol/L	1.85 ± 1.56	1.32 ± 0.66	0.269
血清 hsCRP, mg/L	1.28 ± 2.17	1.09 ± 1.08	0.750
尿中 8-OHdG, ng/mg Cr	9.6 ± 3.1	12.6 ± 7.7	0.141
血漿 BNP, pg/dL	95.0 ± 104.5	297.6 ± 253.0	0.007
LVEF, %	43.9 ± 14.1	26.7 ± 5.9	<0.001
Peak VO ₂ , mL/kg/min	19.5 ± 4.6	14.5 ± 4.3	0.004
内服薬			
β 遮断薬	15 (94)	17 (94)	0.932
ACE 阻害薬/ARB	13 (81)	10 (100)	0.054
アルドステロン拮抗薬	10 (63)	13 (72)	0.545
スタチン	6 (38)	12 (67)	0.089

数値は平均値 ± 標準偏差または人数(%)で示す。

4.2. PBMC ミトコンドリア呼吸能

4.2.1. 慢性心不全群とコントロール群の比較

慢性心不全患者と健常者の間で、いずれの呼吸状態 (respiratory state) においても PBMC ミトコンドリア呼吸能に有意差を認めなかった (図 6).

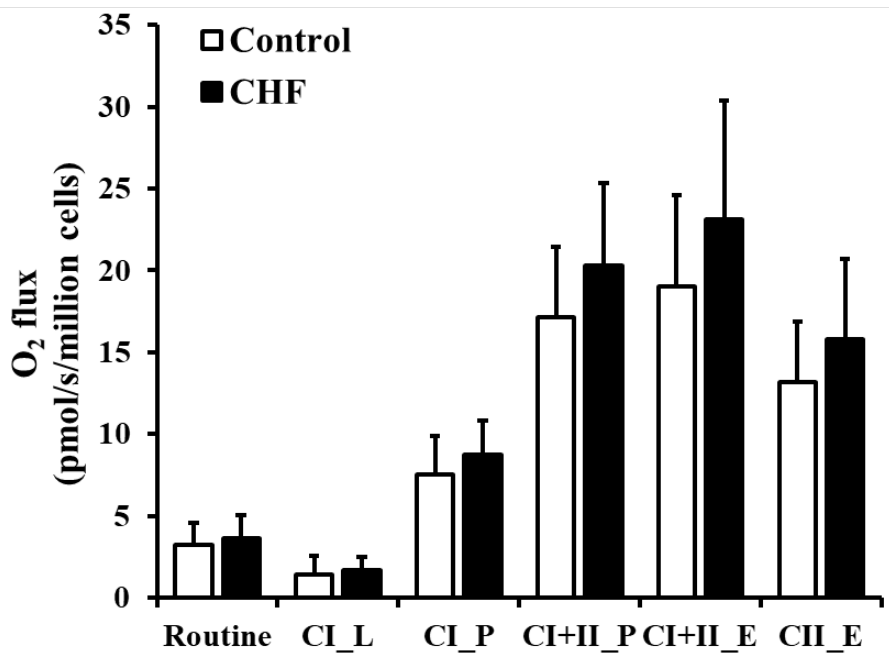


図 6. 慢性心不全群とコントロール群の PBMC ミトコンドリア呼吸能.
結果は平均±標準偏差で示す. 白棒はコントロール群を, 黒棒は慢性心不全患者を示す.

4.2.2. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の比較

慢性心不全患者のうち、NYHA 分類 III 群では、NYHA 分類 I-II 群と比べて、routine respiration, CI+II_P, CI+II_E, および CII_E において、PBMC ミトコンドリア呼吸能が有意に低下していた (図 7)。

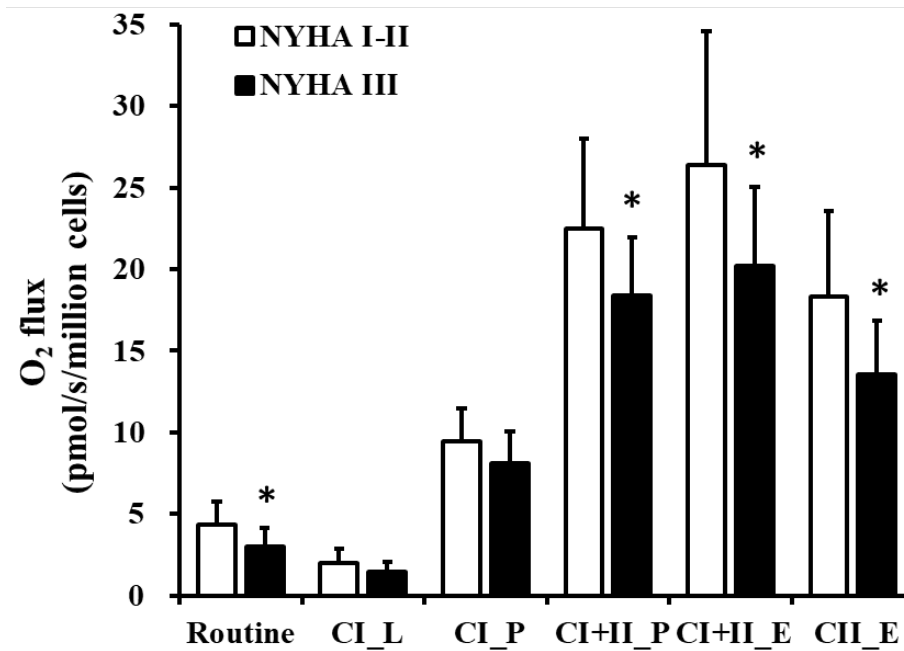


図 7. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の PBMC ミトコンドリア呼吸能。結果は平均±標準偏差で示す。白棒は NYHA 分類 I-II 群を、黒グラフは NYHA 分類 III 群を示す。* $p < 0.05$ 。

4.3. PBMC ミトコンドリア ROS 産生能

4.3.1. 慢性心不全群とコントロール群の比較

慢性心不全患者では、健常者と比較して、CI_P における ROS 産生が有意に増加していた (図 8)。

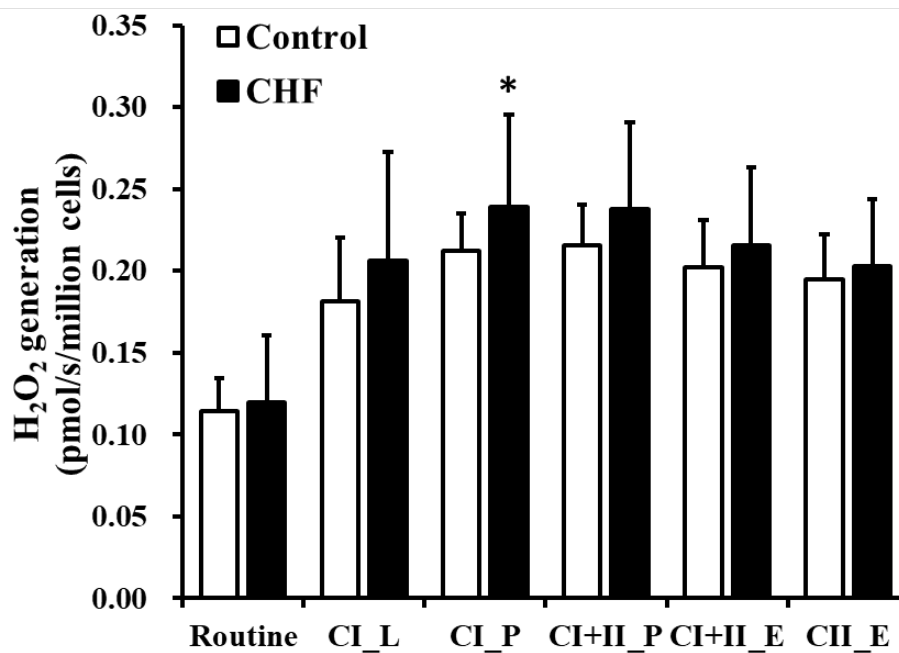


図 8. 慢性心不全群とコントロール群の PBMC ミトコンドリア ROS 産生能。結果は平均±標準偏差で示す。白棒はコントロール群を、黒棒は慢性心不全群を示す。
* $p < 0.05$.

4.3.2. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の比較

慢性心不全患者のうち、NYHA III 群では CI+II_P, CI+II_E, および CII_E において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が有意に増加していた (図 9)。

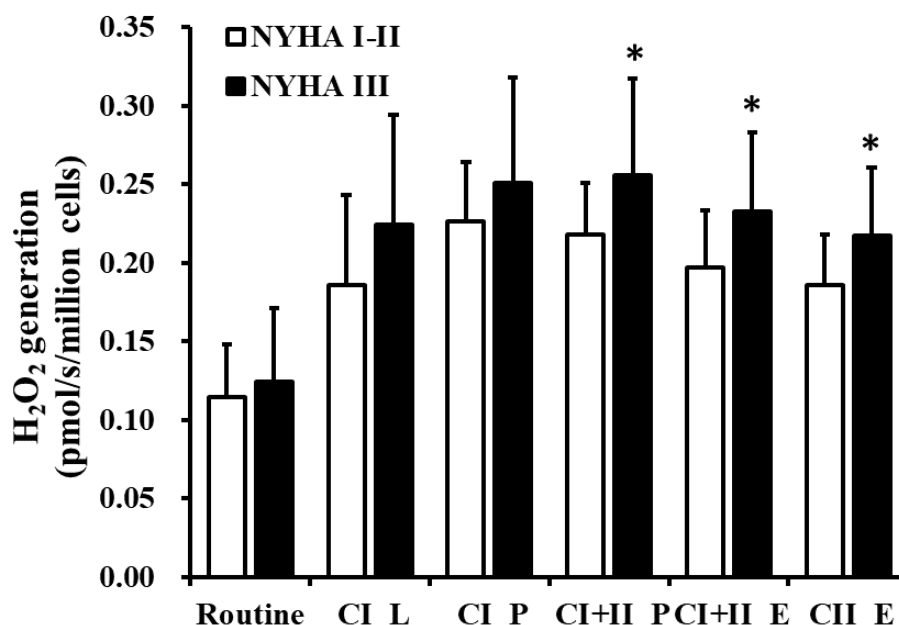


図 9. NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量.

結果は平均±標準偏差で示す. 白棒は NYHA 分類 I-II 群を, 黒棒は NYHA 分類 III 群を示す. * $p < 0.05$.

4.3.3. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と全身の酸化ストレスとの相関

慢性心不全患者において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と全身の酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG との相関を調べた. Routine および CI_P を除く呼吸状態において、PBMC ミトコンドリア ROS 産生量は全身の酸化ストレスと正の相関を認めた (図 10)。

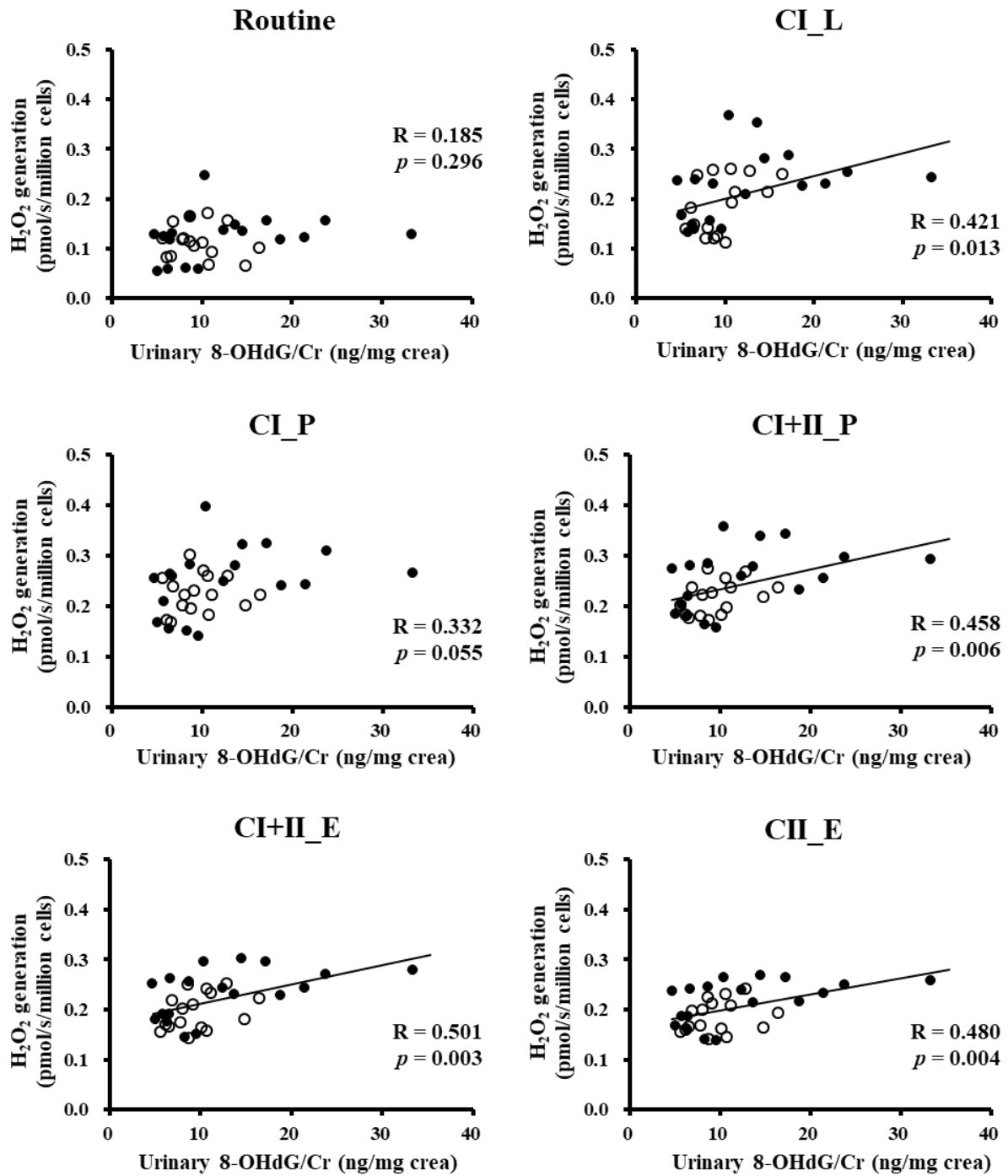


図 10. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と全身の酸化ストレスとの相関。
 白丸は NYHA 分類 I-II 群を，黒丸は NYHA 分類 III 群を示す。

4.3.4. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と心不全重症度との相関

慢性心不全患者では、全ての呼吸状態において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は心不全重症度マーカーである血漿 BNP レベルと有意な正の相関を認めた (図 11)。

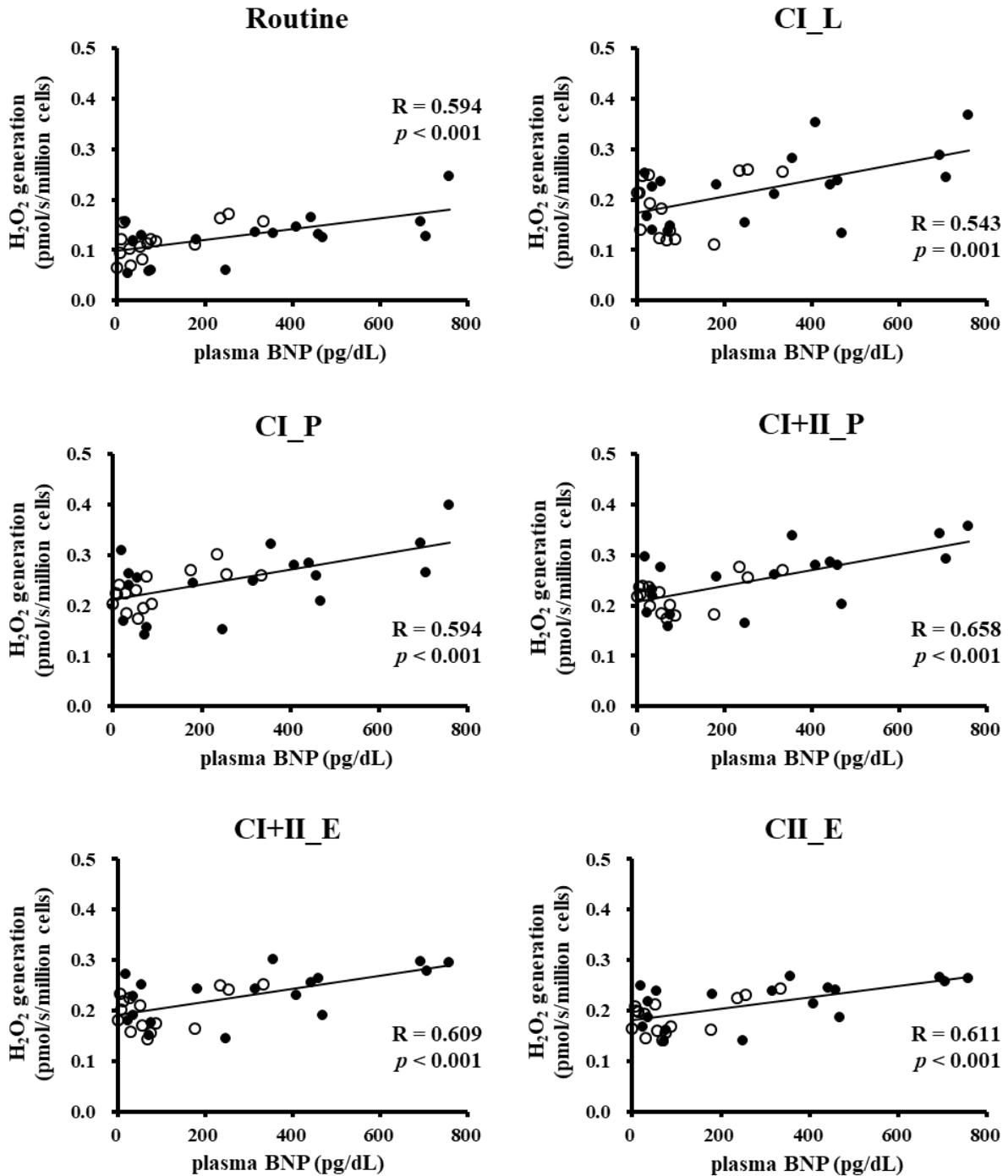


図 11. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と心不全重症度の相関。

白丸は NYHA 分類 I-II 群を、黒丸は NYHA 分類 III 群を示す。

4.3.5. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と運動耐容能との相関

慢性心不全患者では、全ての呼吸状態において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は、peak VO₂ と有意な負の相関を認めた (図 12)。

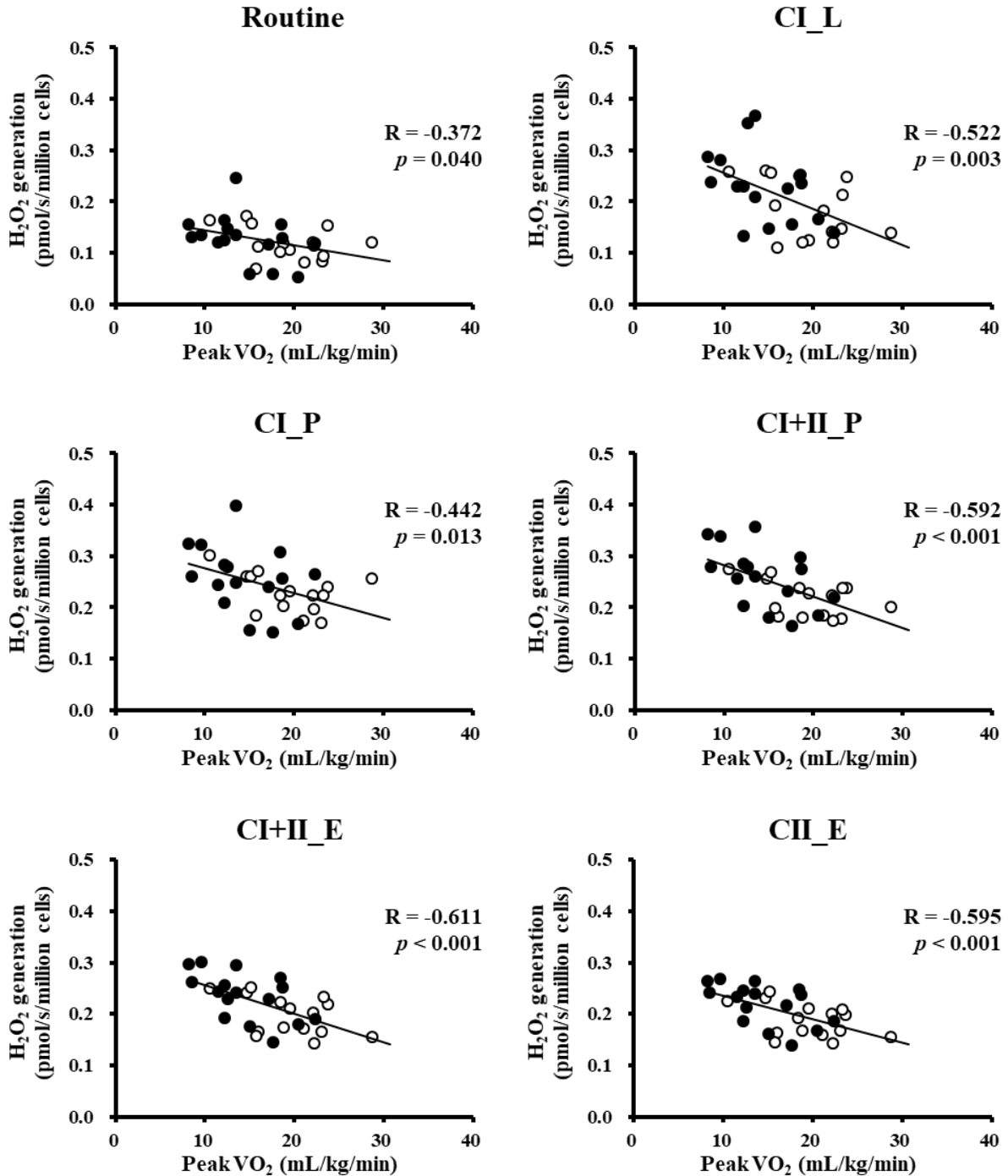


図 12. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と運動耐容能との相関。

白丸は NYHA 分類 I-II 群を、黒丸は NYHA 分類 III 群を示す。

5. 考察

我々の知る限り，本研究は，慢性心不全患者において，PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量がより進行した慢性心不全患者で増加していることを示した初めての報告である．さらに PBMC ミトコンドリア呼吸能も，NYHA 分類 I-II 群と比べて NYHA 分類 III 群で有意に低下していた．また慢性心不全患者では，PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は全身の酸化ストレスマーカーと正の相関を示し，心不全の重症度および運動耐容能低下と密接に関連していた．

5.1. 慢性心不全患者における酸化ストレス

不全心においては心筋の ROS 過剰産生が心臓の収縮不全や構造的障害を引き起こし，心筋障害の原因となる (Borchi et al., 2010; Heymes et al., 2003; Ide et al., 2000)．一方，慢性心不全は血管内皮機能障害や骨格筋変化，腎機能障害などを含む全身性の疾患であり，全身の酸化ストレスは慢性心不全の進展において重要な役割を果たしている (Grieve and Shah, 2003)．今回我々は慢性心不全患者で健常者と比較して尿中 8-OHdG が上昇していることを示したが，これは先行研究の結果と一致している (Kobayashi et al., 2011)．

5.2. PBMC ミトコンドリア由来の ROS と全身の酸化ストレスとの関連

我々は慢性心不全患者において，全身の酸化ストレスが PBMC ミトコンドリア由来 ROS 産生量と正の相関を示すことを明らかにした．先行研究にて，健常者と比べて，蛍光色素法により解析した ROS の含有量が慢性心不全患者の白血球や血小板で多いことが示されている (Ijsselmuiden et al., 2008)．また，慢性心不全患者では，好中球 NADPH オキシダーゼ由来の ROS 産生量が増加していることが報告されている (Ellis et al., 2000)．以上より，全身を循環する血球由来の ROS が，慢性心不全患者の全身の酸化ストレス亢進に貢献している可能性がある．

5.3. 慢性心不全における PBMC ミトコンドリア呼吸能低下と PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生増加

慢性心不全患者では、NYHA 分類 I-II 群と比べて、NYHA 分類 III 群では PBMC ミトコンドリア呼吸能が低下しており、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が増加していた。一方、慢性心不全患者では健常者と比べて PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は増加していたものの、予想に反して PBMC ミトコンドリア呼吸能は低下していなかった。したがって、PBMC ミトコンドリア呼吸能の低下は心不全発症の原因ではなく、また慢性心不全では PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生増加が PBMC ミトコンドリア呼吸能低下より先行して起こると推察される。

5.4. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と心不全重症度との関連

血漿 BNP レベルは心不全患者の予後や心不全増悪入院を含む臨床的転機を予測するバイオマーカーとして広く知られている (Latini et al., 2004)。本研究では、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と血漿 BNP レベルが正の相関を呈していたが、PBMC ミトコンドリア由来の ROS レベルが心不全の重症度を反映している可能性が高いことが示唆された。

5.5. PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と運動耐容能との関連

慢性心不全は、労作時息切れや易疲労感に代表される運動耐容能低下を特徴とする症候群であり、運動耐容能は慢性心不全患者の独立した予後予測因子である (Anker and Coats, 1999)。今回我々は、慢性心不全患者における PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量と peak VO₂ が負の相関を認めることを示した。VO₂ の規定因子は、心機能、肺循環、末梢循環、骨格筋機能などの多岐にわたるが、peak VO₂ の低下はこれらの機能が低下していることを意味する。先行研究では、血球のミトコンドリア呼吸能は心筋や骨格筋のエネルギー代謝を反映することが示されている

(Tyrrell et al., 2016). したがって、慢性心不全患者の PBMC ミトコンドリアにおける ROS の過剰産生は、心筋や骨格筋機能の障害に関与している可能性がある。また、慢性心不全患者において、全身の酸化ストレスは血管内皮機能障害と関連することが示されている (Ellis et al., 2000). 本研究では血管内皮機能を測定していないが、PBMC ミトコンドリア由来の ROS により血管内皮機能障害が生じ、運動中の末梢血流低下を介して運動耐容能が低下した可能性もある。

5.6. 慢性心不全患者における PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生増加のメカニズム

慢性心不全患者において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生が増加するメカニズムについて、本研究の結果のみで説明することは困難である。先行研究では、慢性心不全患者において、蛍光色素法で調べた ROS 陽性の血球ミトコンドリアの割合は末梢静脈血よりも冠状静脈洞で著明に高値であることが示されているため (Ijsselmuiden et al., 2008), 一つの仮説として、全身を循環する血球 (PBMC) が心臓を通過する際に心筋由来の酸化ストレスに曝露されることで、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生が増加する可能性が考えられる。また、サイトカインによる全身性炎症と酸化ストレスとの相互作用の可能性も考えられる。全身炎症は慢性心不全の病因の一つと考えられており (Yndestad et al., 2006), 今回の研究においても健常者と比較して、慢性心不全患者では血清 hsCRP 値が有意に高値であった。慢性心不全患者において PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生が増加するメカニズム解明のためのさらなる研究が必要である。

5.7. PBMC ミトコンドリアの呼吸状態 (respiratory state) と ROS 産生

本研究では、中等度～重症の心不全患者において、特にミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる state 3 での PBMC 由来の ROS 産生量が増加していることを明ら

かにした。PBMCは血球の中でもミトコンドリアの酸化的リン酸化によるエネルギー代謝に大きく依存しているため、この結果は体内での生理的条件とほぼ同じ状態でのPBMCミトコンドリア由来のROS産生量を反映している可能性が示唆された。

5.8. 本研究の限界

本研究には考察すべき限界がいくつか存在する。第一に、本研究は横断的研究であり縦断的に調査していないため、PBMCミトコンドリア由来のROS産生量が慢性心不全患者の予後に与える影響については検討できなかった。第二に、PBMCミトコンドリア由来のROS産生量と慢性心不全患者の疾患重症度および運動耐容能低下との因果関係は明らかにできない。最後に、PBMCミトコンドリア機能への他の因子による影響は除外できていない。例えば、内服薬のスタチンは抗酸化作用を有することが知られている (Antoniades et al., 2012)。

6. 総括および結論

本研究の結果から得られた知見の要約を以下に述べる。

- 1) 慢性心不全患者では健常者と比較して、PBMC ミトコンドリア呼吸能は同等であったが、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が増加していた。
- 2) 慢性心不全患者において、NYHA 分類 I-II 群と比べて、NYHA 分類 III 群では PBMC ミトコンドリア呼吸能が低下し、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量が増加していた。
- 3) 慢性心不全患者において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は全身の酸化ストレスマーカーと正の相関を示した。
- 4) 慢性心不全患者において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は心不全の重症度指標と強い正の相関を示した。
- 5) 慢性心不全患者において、PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量は運動耐容能と負の相関を示した。

今回の研究結果は、「PBMC ミトコンドリア由来の ROS 産生量増加は全身の酸化ストレス亢進に関与し、全身の機能低下を介して慢性心不全の進展に寄与する」という仮説を支持するものである。PBMC ミトコンドリア由来の酸化ストレスに着眼した我々の知見は、将来の心不全バイオマーカーとしての活用、さらには PBMC における酸化ストレス制御をターゲットとした慢性心不全の新規治療法の開発に貢献することが期待される。

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、多くの御指導と御支援を賜りました北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 筒井 裕之前教授(現 九州大学大学院医学研究院循環器内科学教室) に深謝申し上げます。2017年9月に赴任後、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研究院循環病態内科学教室 安斉 俊久教授に心より感謝申し上げます。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病院循環器内科 横田 卓特任助教に深く感謝の意を表します。

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研究院循環病態内科学教室の中島 孝之先生、高田 真吾先生、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、仲野 一平先生、角谷 尚哉先生、齋藤 晶理先生、福島 新助教、絹川 真太郎講師、北海道大学病院臨床研修センターの石森 直樹准教授に深く感謝申し上げます。

本研究の基礎論文作成において、御多忙の中多くの御助言を賜りましたデンマーク、コペンハーゲン大学の Flemming Dela 教授に深く感謝申し上げます。

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。

本研究の遂行にあたり、多くの御助力を頂きました北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室実験助手の山根 美和子様、木村 友紀様、池田 則子様、小川 ちひろ様、北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室技術員の佐藤 真実様、また秘書室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を陰ながら支えてくれた妻と娘に感謝いたします。

2019年3月

白川 亮介

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Al-Ahmad, A., Rand, W.M., Manjunath, G., Konstam, M.A., Salem, D.N., Levey, A.S., and Sarnak, M.J. (2001). Reduced kidney function and anemia as risk factors for mortality in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 38, 955-962.
- Anker, S.D., and Coats, A.J. (1999). Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* 115, 836-847.
- Antoniades, C., Demosthenous, M., Reilly, S., Margaritis, M., Zhang, M.H., Antonopoulos, A., Marinou, K., Nahar, K., Jayaram, R., Tousoulis, D., *et al.* (2012). Myocardial redox state predicts in-hospital clinical outcome after cardiac surgery effects of short-term pre-operative statin treatment. *J Am Coll Cardiol.* 59, 60-70.
- Banfi, C., Brioschi, M., Barcella, S., Veglia, F., Biglioli, P., Tremoli, E., and Agostoni, P. (2008). Oxidized proteins in plasma of patients with heart failure: role in endothelial damage. *Eur J Heart Fail.* 10, 244-251.
- Borchi, E., Bargelli, V., Stillitano, F., Giordano, C., Sebastiani, M., Nassi, P.A., d'Amati, G., Cerbai, E., and Nediani, C. (2010). Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 1802, 331-338.
- Ehinger, J.K., Morota, S., Hansson, M.J., Paul, G., and Elmer, E. (2015). Mitochondrial dysfunction in blood cells from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol.* 262, 1493-1503.
- Ellis, G.R., Anderson, R.A., Lang, D., Blackman, D.J., Morris, R.H., Morris-Thurgood, J., McDowell, I.F., Jackson, S.K., Lewis, M.J., and Frenneaux, M.P. (2000). Neutrophil superoxide anion--generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy. *J Am Coll Cardiol.* 36, 1474-1482.
- Ezekowitz, J.A., McAlister, F.A., and Armstrong, P.W. (2003). Anemia is common in heart failure and is associated with poor outcomes: insights from a cohort of 12 065 patients with new-onset heart failure. *Circulation* 107, 223-225.
- Fischer, D., Rossa, S., Landmesser, U., Spiekermann, S., Engberding, N., Hornig, B., and Drexler, H. (2005). Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J.* 26, 65-69.
- Giulivi, C., Zhang, Y.F., Omanska-Klusek, A., Ross-Inta, C., Wong, S., Hertz-Picciotto, I., Tassone, F., and Pessah, I.N. (2010). Mitochondrial dysfunction in autism. *JAMA* 304, 2389-2396.
- Grieve, D.J., and Shah, A.M. (2003). Oxidative stress in heart failure. More than just damage. *Eur Heart J.* 24, 2161-2163.

Heymes, C., Bendall, J.K., Ratajczak, P., Cave, A.C., Samuel, J.L., Hasenfuss, G., and Shah, A.M. (2003). Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* *41*, 2164-2171.

Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Suematsu, N., Hayashidani, S., Ichikawa, K., Utsumi, H., Machida, Y., Egashira, K., and Takeshita, A. (2000). Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res.* *86*, 152-157.

Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., Kang, D., Hattori, N., Uchida, K., Arimura, K., Egashira, K., and Takeshita, A. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* *85*, 357-363.

Ijsselmuiden, A.J., Musters, R.J., de Ruiter, G., van Heerebeek, L., Alderse-Baas, F., van Schilfgaarde, M., Leyte, A., Tangelder, G.J., Laarman, G.J., and Paulus, W.J. (2008). Circulating white blood cells and platelets amplify oxidative stress in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* *5*, 811-820.

Jang, D.H., Khatri, U.G., Shortal, B.P., Kelly, M., Hardy, K., Lambert, D.S., and Eckmann, D.M. (2018). Alterations in mitochondrial respiration and reactive oxygen species in patients poisoned with carbon monoxide treated with hyperbaric oxygen. *Intensive Care Med Exp.* *6*, 4.

Jhund, P.S., Macintyre, K., Simpson, C.R., Lewsey, J.D., Stewart, S., Redpath, A., Chalmers, J.W., Capewell, S., and McMurray, J.J. (2009). Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* *119*, 515-523.

Karabatsiakos, A., Bock, C., Salinas-Manrique, J., Kolassa, S., Calzia, E., Dietrich, D.E., and Kolassa, I.T. (2014). Mitochondrial respiration in peripheral blood mononuclear cells correlates with depressive subsymptoms and severity of major depression. *Transl Psychiatry.* *4*, e397.

Kobayashi, S., Susa, T., Tanaka, T., Wada, Y., Okuda, S., Doi, M., Nao, T., Yoshiga, Y., Yamada, J., Okamura, T., *et al.* (2011). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine reflects symptomatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* *13*, 29-36.

Kramer, P.A., Ravi, S., Chacko, B., Johnson, M.S., and Darley-Usmar, V.M. (2014). A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol.* *2*, 206-210.

Latini, R., Masson, S., Anand, I., Salio, M., Hester, A., Judd, D., Barlera, S., Maggioni, A.P., Tognoni, G., Cohn, J.N., *et al.* (2004). The comparative prognostic value of plasma neurohormones at baseline in patients with heart failure enrolled in Val-HeFT. *Eur Heart J.* *25*, 292-299.

Li, P., Wang, B., Sun, F., Li, Y., Li, Q., Lang, H., Zhao, Z., Gao, P., Zhao, Y., Shang, Q., *et al.* (2015). Mitochondrial respiratory dysfunctions of blood mononuclear cells link with cardiac

disturbance in patients with early-stage heart failure. *Sci Rep.* 5, 10229.

Mancini, G.B., and Schulzer, M. (1999). Reporting risks and benefits of therapy by use of the concepts of unqualified success and unmitigated failure: applications to highly cited trials in cardiovascular medicine. *Circulation* 99, 377-383.

McKee, P.A., Castelli, W.P., McNamara, P.M., and Kannel, W.B. (1971). The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* 285, 1441-1446.

Okita, K., Kinugawa, S., and Tsutsui, H. (2013). Exercise intolerance in chronic heart failure--skeletal muscle dysfunction and potential therapies. *Circ J.* 77, 293-300.

Okura, Y., Ramadan, M.M., Ohno, Y., Mitsuma, W., Tanaka, K., Ito, M., Suzuki, K., Tanabe, N., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2008). Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ J.* 72, 489-491.

Stride, N., Larsen, S., Hey-Mogensen, M., Sander, K., Lund, J.T., Gustafsson, F., Kober, L., and Dela, F. (2013). Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Heart Fail.* 15, 150-157.

Tang, W.H., Tong, W., Troughton, R.W., Martin, M.G., Shrestha, K., Borowski, A., Jasper, S., Hazen, S.L., and Klein, A.L. (2007). Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 49, 2364-2370.

Tyrrell, D.J., Bharadwaj, M.S., Jorgensen, M.J., Register, T.C., and Molina, A.J. (2016). Blood cell respirometry is associated with skeletal and cardiac muscle bioenergetics: Implications for a minimally invasive biomarker of mitochondrial health. *Redox Biol.* 10, 65-77.

Yndestad, A., Damas, J.K., Oie, E., Ueland, T., Gullestad, L., and Aukrust, P. (2006). Systemic inflammation in heart failure--the whys and wherefores. *Heart Fail Rev.* 11, 83-92.

Zhou, B., and Tian, R. (2018). Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest.* 128, 3716-3726.