HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	白川, 亮介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2460 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13446号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74353
Type	doctoral thesis
File Information	Ryosuke_Shirakawa_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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（要約）

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

1. 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の患者数が今後飛躍的に増加することが見込まれており，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る。慢性心不全の進展には全身の酸化ストレスが重要な役割を果たしていると考えられているが，そのメカニズムは十分に明らかにされていない．

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．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．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．

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) の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．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について調べた研究は存在しない．

本研究では「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」という仮説を立て，検証することにした．

2. 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，更に慢性心不全患者をニューヨーク心臓協会 (NYHA; New York Heart Association) 分類 I-II 群 16 名，NYHA 分類 III 群 18 名の 2 群に分類し，比較検討を行った．

末梢静脈より採血後，Ficoll-paque gradient media を用いて PBMC を分離し，高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置である Oxygraph-2k を用いて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．

残りの血液検体の一部を用いて院内の通常検査にて脂質プロファイル，HbA1c, および血漿脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP; brain natriuretic peptide)などの測定を行った．残りの血液検体と尿検体は－80°C フリーザーに保管し，後日全身の炎症マーカーである血清高感度 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を用いて，全身の酸化ストレスマーカーである尿中 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を用いてそれぞれ評価した．

また，慢性心不全患者については左室駆出率（LVEF; left ventricular ejection fraction）を含む心機能を心エコーで，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）を心肺運動負荷試験（CPET; cardiopulmonary exercise testing）にてそれぞれ評価した．

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．

3. 結果

慢性心不全患者およびコントロール群の間で，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血清 hsCRP，尿中 8-OHdG が有意に増加していた．

NYHA 分類 I-II 群と NYHA 分類 III 群の間で，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 および尿中 8-OHdG についても有意差はなかった．血漿 BNP 値は NYHA 分類 III 群で有意に高値であり，LVEF，peak VO_2 はともに NYHA 分類 III 群で有意に低値であった．

慢性心不全患者と健常者の間では PBMC ミトコンドリア呼吸能に有意差を認めなかった．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いた．

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 産生が有意に増加していた．また，NYHA III 群では NYHA I-II 群と比較して 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．

慢性心不全患者において，PBMC ミトコンドリア ROS 産生量は全身の酸化ストレス，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，運動耐容能の指標である peak VO_2 と有意な負の相関を認めた．

4. 考察

本研究で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，慢性心不全患者では白血球や血小板の ROS の含有量が増加しており，好中球 NADPH オキシダーゼ由来の ROS 産生量も増加していることが報告されている．これらのことから，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と考えられる．

慢性心不全患者では，重症群において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．一方，慢性心不全患者を健常者と比較すると，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．

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．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．

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．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 VO_2が負の相関を認めることを示した．VO_2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 VO_2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．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は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おり，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考えられる．

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は，先行研究にて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，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．

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. 結論

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．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．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および心不全の重症度指標と強い正の相関を示し，運動耐容能と負の相関を示した．