



Title	心不全患者における骨格筋障害の診断法および影響する因子の解明に関する研究
Author(s)	仲野, 一平
Description	配架番号 : 2549
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14037号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14037
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94726
Type	doctoral thesis
File Information	Ippei_Nakano.pdf



学位論文

心不全患者における骨格筋障害の診断法
および影響する因子の解明に関する研究
**(Studies on skeletal muscle abnormality in
patients with heart failure: Elucidation of novel
diagnostic methods and influencing factors)**

2020 年 3 月

北海道大学

仲野 一平

学位論文

心不全患者における骨格筋障害の診断法
および影響する因子の解明に関する研究
**(Studies on skeletal muscle abnormality in
patients with heart failure: Elucidation of novel
diagnostic methods and influencing factors)**

2020 年 3 月

北海道大学

仲野 一平

目 次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
要旨	2
略語表	5
第 1 章 序論.....	7
1.1. 緒言.....	7
1.2. 本研究の概論	12
第 2 章 心不全患者の骨格筋の超音波法による評価についての研究	13
2.1. 緒言.....	13
2.2. 方法.....	15
2.2.1. 対象患者.....	15
2.2.2. 研究プロトコル	16
2.2.3. 超音波法による骨格筋の評価.....	17
2.2.4. 骨格筋量および骨格筋機能の評価	18
2.2.5. 運動耐容能の評価	18
2.2.6. その他の評価項目	18
2.2.7. 統計学的解析	19
2.3. 結果.....	20
2.3.1. 患者背景.....	20
2.3.2. 大腿四頭筋の筋輝度・筋厚と各評価項目との関連	23
2.4. 考察.....	25
2.4.1. 心不全における骨格筋の EI の意義.....	25
2.4.2. QEI と運動耐容能や筋機能との関連について	26
2.4.3. QMT と運動耐容能との関連について	26
2.4.4. 本研究の限界	27
2.5. 結論.....	27
第 3 章 心不全患者の骨格筋障害と BDNF の関連についての研究	29
3.1. 緒言.....	29
3.2. 方法.....	31

3.2.1. 対象患者および研究プロトコール	31
3.2.2. 血清 BDNF の測定	31
3.2.3. 骨格筋量および骨格筋機能の評価	33
3.2.4. 運動耐容能の評価	33
3.2.5. その他の評価項目	33
3.2.6. 統計学的解析	33
3.3. 結果.....	34
3.3.1. 患者背景.....	34
3.3.2. 心不全群および対照群の血清 BDNF 値	35
3.3.3. 心不全群における血清 BDNF 値と各評価項目との関連	36
3.4. 考察.....	39
3.4.1. 心不全患者と対照群での血清 BDNF 値および運動耐容能との関連	39
3.4.2. 心不全患者における血清 BDNF 値と骨格筋指標との関連.....	40
3.4.3. 骨格筋機能における BDNF の役割.....	41
3.4.4. 本研究の限界	41
3.5. 結論.....	42

第4章 心不全患者におけるループ利尿薬と骨格筋萎縮との関連に関する研究..43

4.1. 緒言.....	43
4.2. 方法.....	45
4.2.1. 対象患者	45
4.2.2. 研究プロトコール	45
4.2.3. 評価項目	46
4.2.4. 統計学的解析	46
4.3. 結果.....	47
4.3.1. 患者背景.....	47
4.3.2. ループ利尿薬使用の有無における筋萎縮	49
4.3.3. 筋萎縮の規定因子	49
4.4. 考察.....	51
4.4.1. 心不全患者における骨格筋萎縮.....	51
4.4.2. ループ利尿薬と骨格筋萎縮との関連.....	51
4.4.3. 本研究の限界	52
4.5. 結論.....	53

第 5 章：総括および結論.....	54
謝辞	55
利益相反.....	56
引用文献.....	57

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掲載された。

1) Ippei Nakano, Hiroaki Hori, Arata Fukushima*, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Yasuyuki Kitaura, Naoya Kakutani, Takahiro Abe, Toshihisa Anzai. Enhanced Echo Intensity of Skeletal Muscle Is Associated with Exercise Intolerance in Patients with Heart Failure. Journal of Cardiac Failure.

2) Ippei Nakano, Shintaro Kinugawa*, Hiroaki Hori, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Shingo Takada, Naoya Kakutani, Yoshikuni Obata, Katsuma Yamanashi, Toshihisa Anzai. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Associated with Skeletal Muscle Function But Not with Muscle Mass in Patients with Heart Failure. International Heart Journal.

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1) Ippei Nakano, Masaya Tsuda, Shintaro Kinugawa*, Arata Fukushima, Naoya Kakutani, Shingo Takada, Takashi Yokota. Loop Diuretic Use Is Associated with Skeletal Muscle Wasting in Patients with Heart Failure. Journal of Cardiology.

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) Ippei Nakano, Hiroaki Hori, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Yasuyuki Kitaura, Naoya Kakutani, Takahiro Abe, Toshihisa Anzai. Increased Echo Intensity of Skeletal Muscle Is Associated with Exercise Intolerance in Patients with Heart Failure. Euro Prevent 2019. April 12, 2019, Lisbon, Portugal. Young Investigator's Award.
- 2) Ippei Nakano, Hiroaki Hori, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Yasuyuki Kitaura, Naoya Kakutani, Takahiro Abe, Toshihisa Anzai. 心不全患者において超音波で評価した骨格筋輝度は運動耐容能と関連する。第25回日本心臓リハビリテーション学会学術集会, 2019年7月14日, 大阪. 優秀演題賞.

要旨

【背景と目的】

我が国では心不全患者の増加および高齢化が進行しており、今後もさらに増加すると予測されている。一方で依然として高い死亡率のみならず再入院率の高さが臨床的・社会的な問題となっており、心不全の長期的な管理において効果的な治療介入が求められている。心不全患者では種々の要因により骨格筋の障害、サルコペニアを多く合併するが、心不全における骨格筋障害は自覚症状や運動耐容能、予後の悪化とも関連する重要な因子である。現在運動耐容能の低下した心不全患者における唯一の介入法は運動療法であり、運動療法を必要とする骨格筋障害を有する患者を適切に、効率的に診断することが不可欠であるとともに、骨格筋障害のリスクとなりうる要因を排除しサルコペニアの進展を予防していくことが重要である。しかし、現在臨床診療において骨格筋障害を簡便に評価することは困難である。

我々は、心不全患者に合併する骨格筋障害の新たな評価・診断法を開発すること、また心不全患者の骨格筋障害のリスクとなる要因を検討することを目的とし、本研究を行った。

【方法】

心不全患者における骨格筋の量的・質的な障害を簡便に評価する方法として、超音波法による画像的な評価、および血液検査で骨格筋より分泌されるマイオカインの一種である脳由来神経栄養因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor) を測定することによる評価を検討した。超音波法による評価の検討では、北海道大学病院に通院中の心不全患者 58 名および心不全を有さない対照群 28 名を登録し、運動耐容能や骨格筋量・骨格筋機能の指標を含めた各臨床指標と超音波法により測定した大腿四頭筋厚、大腿四頭筋輝度との関連について検討した。血清 BDNF による評価の検討では、北海道大学病院に通院中の心不全患者 60 名および心不全を有さない対照群 29 名を登録し、運動耐容能や骨格筋量・骨格筋機能の指標を含めた各臨床指標と、ELISA 法により測定した血清 BDNF 値との関連について検討した。

また、骨格筋障害に影響を及ぼす因子については、最近骨格筋障害を引き起こすことが報告され心不全治療に多く用いられるループ利尿薬に着目した。多施設コホート研究のデータから心不全患者 155 名におけるループ利尿薬の使用と、骨格筋萎縮の指標である大腿周径との関連を検討した。

【結果】

超音波法により測定した大腿四頭筋厚は全身の骨格筋量を、大腿四頭筋の輝度は骨格筋の質をそれぞれ反映し、いずれも心不全患者で低下していた。心不全患者において筋輝度は年齢、ニューヨーク心臓協会 (NYHA: New York Heart Association) 分類、運動耐容能の指標である最大酸素摂取量 (peak VO₂: peak oxygen uptake)、嫌気性代謝閾値 (AT: anaerobic threshold) と相関し、peak VO₂ は筋輝度の独立した規定因子であることが示された。

血清 BDNF 値は心不全患者で対照群と比べて低下しており、心不全患者において peak VO₂, AT および骨格筋機能の指標である 10 m 歩行試験、下肢筋力と相関を示した。一方で骨格筋量の指標である除脂肪量、肥満度指数 (BMI: body mass index) とは相関しなかった。下肢筋力は血清 BDNF 値の独立した規定因子であると示された。

ループ利尿薬を使用していた心不全患者では使用していなかった患者と比べて大腿周径が有意に減少していた。大腿周径は年齢、BMI、血清ヘモグロビン、ループ利尿薬の使用と関連を示した。ループ利尿薬の使用は大腿周径減少の独立した規定因子であると示された。

【考察】

現在の心不全患者の増加や高齢化の中、長期的な生活の質の維持や再入院抑制、予後の改善にはサルコペニアの進行を抑制することが不可欠であり、適切な骨格筋の評価と運動療法による介入が必要である。しかしながら運動療法の必要な患者や介入の効果をはかる簡便な方法はこれまで存在せず、日常臨床において大きな障壁となっていた。

超音波法による骨格筋の筋厚は全身の骨格筋量を反映するのに対し、筋輝度の上昇は筋内脂肪や線維化を反映し、骨格筋の質をはかる指標であると考えられている。心不全患者において筋厚が減少、筋輝度が上昇し運動耐容能の低下と相関を示したことは、心不全における運動耐容能を主に規定する因子である骨格筋の障害を反映したものであることが示唆され、我々がこれまで報告した心不全患者における骨格筋内脂肪の増加や運動耐容能との関連とも合致する結果であった。超音波法は簡便、非侵襲的であり広く汎用されており、心不全患者の骨格筋障害を診断する指標となり得ることは心不全の臨床診療において有用であると考えられる。

また、マイオカインである BDNF は心不全において特に障害される遅筋より分泌されることから、心不全患者における特徴的な骨格筋障害をよく反映する可能性が示唆される。これまで我々は血清 BDNF が心不全患者の運動耐容能や予後と関連することを報告してきたが、今回の結果から BDNF は骨格筋の量的障害ではなく特

に質的障害と関連することが示された。BDNF は骨格筋活動によって産生されると考えられ、骨格筋内のミトコンドリア機能を制御することを通して運動耐容能を既定することが示唆される。骨格筋量は評価する方法はいくつか存在するが、骨格筋の質や機能は日常診療で簡便に測定することが困難であり、血液検査で心不全患者における骨格筋の質的障害を評価できる可能性が示唆されたことは運動療法を必要とする心不全患者の診断や運動療法の効果の評価において有用である可能性があると考えられる。

心不全の管理において骨格筋障害の診断と同様に重要なことは、骨格筋障害を引き起こす因子を明らかにし予防していくことである。最近、ループ利尿薬が様々な病態生理学的な機序のみならず、直接骨格筋に作用し萎縮を引き起こすことが報告された。我々の今回の結果から心不全における体液量の管理のため最も頻用されているループ利尿薬が心不全患者の予後を悪化させる骨格筋萎縮を引き起こす可能性が示唆されたことは、特にサルコペニアのリスクがある患者や運動療法を行っている患者における利尿薬の選択において臨床的に重要な意味をもつと考えられる。

【結論】

今回、我々の研究結果から超音波法による筋厚や筋輝度の測定、あるいは血液検査による血清 BDNF 値の測定は心不全患者の骨格筋の障害を簡便、効率的に評価する手法として有用であることが初めて示された。また、心不全患者における骨格筋障害に影響を及ぼす因子について、ループ利尿薬の使用が骨格筋萎縮と関連したことが初めて示された。

これらの結果をふまえて臨床診療において心不全の骨格筋障害を診断し、適切な介入および予防を行っていくことは心不全患者におけるサルコペニアの抑制と予後を改善する有用な手段となり得ると考えられる。また、この新しい知見は運動療法の恩恵を受ける患者を明らかにし、骨格筋障害の程度をはかることにより運動療法の個別化の普及につながるとともに、心不全由来の骨格筋障害に対する新規の薬物療法等の治療法への重要な手がかりとなり得ると考えられる。

略語表

ACE-I: angiotensin converting enzyme inhibitor; アンジオテンシン変換酵素阻害薬
AMP: adenosine monophosphate; アデノシン一リン酸
AMPK: AMP-activated protein kinase; AMP 活性化型タンパク質キナーゼ
ARB: angiotensin II receptor blocker; アンジオテンシン II 受容体拮抗薬
AT: anaerobic threshold; 嫌気性代謝閾値
BDNF: brain-derived neurotrophic factor; 脳由来神経栄養因子
BIA: bioelectrical impedance analysis; 生体電気インピーダンス法
BMI: body mass index; 肥満度指数
BNP: brain natriuretic peptide; 脳性ナトリウム利尿ペプチド
BW: body weight; 体重
CPX: cardiopulmonary exercise testing; 心肺運動負荷試験
CREB: cAMP response element binding protein; サイクリック AMP 応答配列結合タンパク
CT: computed tomography; コンピュータ断層撮影
DEXA: dual-energy X-ray absorptiometry; 二重エネルギーX線吸収測定法
eGFR: estimated glomerular filtration rate; 推定糸球体濾過率
EI: skeletal muscle echo intensity; 筋輝度
Hb: hemoglobin; 血色素濃度
HF: heart failure; 心不全
ICC: intra-class correlation coefficient; 級内相関係数
ICD: implantable cardioverter defibrillator; 植込み型除細動器
LAD: left atrial diameter; 左房径
LV: left ventricle; 左室
LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter; 左室拡張末期径
LVEF: left ventricular ejection fraction; 左室駆出率
LVESD: left ventricular end-systolic diameter; 左室収縮末期径
LVMI: left ventricular mass index; 左室重量係数
MRI: magnetic resonance imaging; 磁気共鳴画像法
MRS: magnetic resonance spectroscopy; 磁気共鳴分光法
NKCC: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体
NYHA: New York Heart Association; ニューヨーク心臓協会
peak VO_2 : peak oxygen uptake; 最大酸素摂取量

PGC: peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator; ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター γ 共役因子

Plt: platelets; 血小板数

QEI: quadriceps echo intensity; 大腿四頭筋輝度

QMT: quadriceps muscle thickness; 大腿四頭筋厚

RAAS: renin-angiotensin-aldosterone system; レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系

第1章 序論

1.1. 緒言

心不全 (HF, heart failure) は「なんらかの心臓機能障害, すなわち, 心臓に器質的および/あるいは機能的異常が生じて心ポンプ機能の代償機転が破綻した結果, 呼吸困難・倦怠感や浮腫が出現し, それに伴い運動耐容能が低下する臨床症候群」と定義されており, 心臓のポンプ機能が種々の要因により障害されるため全身の不具合を生じる慢性疾患である. 近年, 高齢化や生活習慣の欧米化に伴う高血圧, 虚血性心疾患や弁膜症患者の増加により, わが国の心不全発症患者は増加している (Shimokawa et al., 2015) (図 1.1). 一方で, エビデンスに基づいた標準的薬物治療の普及や植込み型除細動器 (ICD: implantable cardioverter defibrillator) や心臓再同期療法などの非薬物療法の進歩と相まって心不全患者の生命予後は改善している (Bristow et al., 2004). このような状況下で, 高齢の心不全患者数は増加し続け2030年には130万人に達すると推計されている (Okura et al., 2008) (図 1.2).

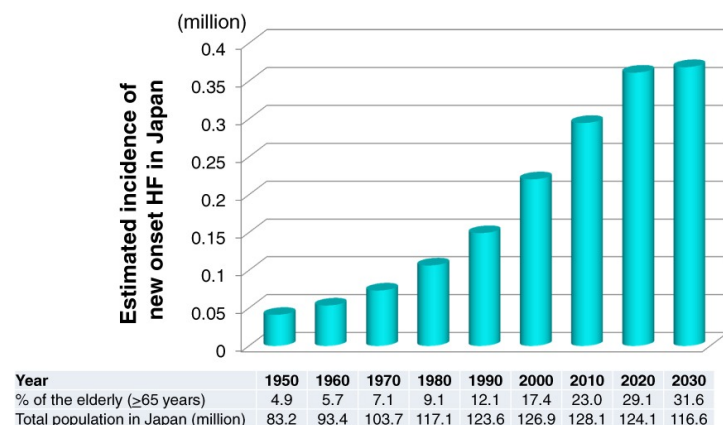


図 1.1. 日本における新規心不全発症患者の推移 (Shimokawa et al., 2015) より引用

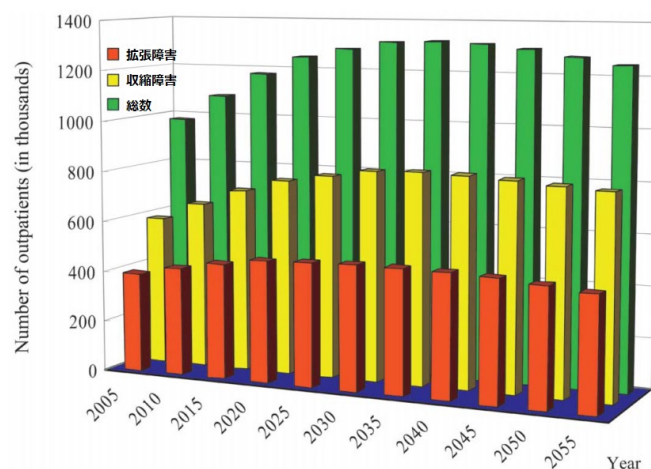


図 1.2. 日本における心不全患者数の推移 (Okura et al., 2008) より引用, 改変

心不全は多くの場合発症後に治療によって症状は改善するが、心不全そのものが完治することではなく、増悪や改善を繰り返しながら進行し最終的に死に至る慢性の病態である。また慢性心不全では他の慢性疾患と同様に心機能以外にも貧血や腎機能障害、サルコペニアなどの全身性の障害を合併し、それらが予後に影響を及ぼすことが知られている。このような中で高齢の心不全患者の増加にあたり、日常生活での活動量の低下や繰り返す入院、高い死亡率などの臨床面の問題に加えて、医療経済などの社会的な問題も含めた包括的な対応が急務である (Roger, 2013)。

慢性心不全患者では運動耐容能が低下しており、患者の自覚症状の悪化のみならず心不全の重症度や予後とも密接に相関する重要な指標である (図 1.3) (Mancini et al., 1991)。心不全患者の長期的な管理においてはこの運動耐容能の低下を予防し、予後を悪化させないための介入が不可欠である。

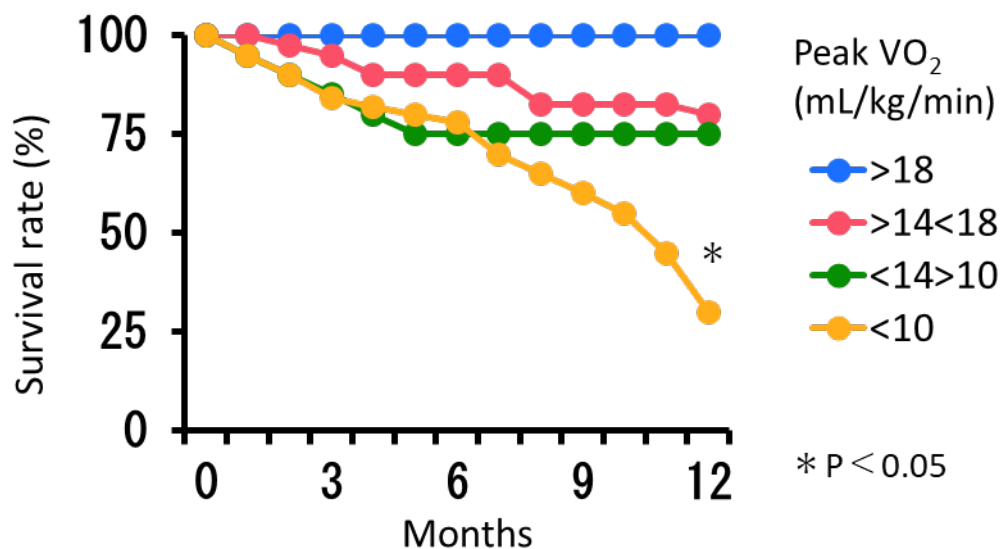


図 1.3. 運動耐容能と予後の関連 (Mancini et al., 1991) より引用, 改変

運動耐容能は呼吸系、循環系、骨格筋機能によって規定され、Wasserman の歯車で表される (図 1.4)。肺呼吸で摂取した酸素は循環系によって末梢臓器へ輸送され、さらに末梢臓器の代謝によって産生された二酸化炭素は循環系で肺へ送られる。この呼吸-循環系による酸素と二酸化炭素のガス輸送が適切に行われることは運動にとって必要な条件ではあるが、心不全患者における運動耐容能の主な規定因子は心機能ではなくエネルギー産生の主体である骨格筋であるとされている (Esposito et al., 2011; Harrington et al., 1997)。

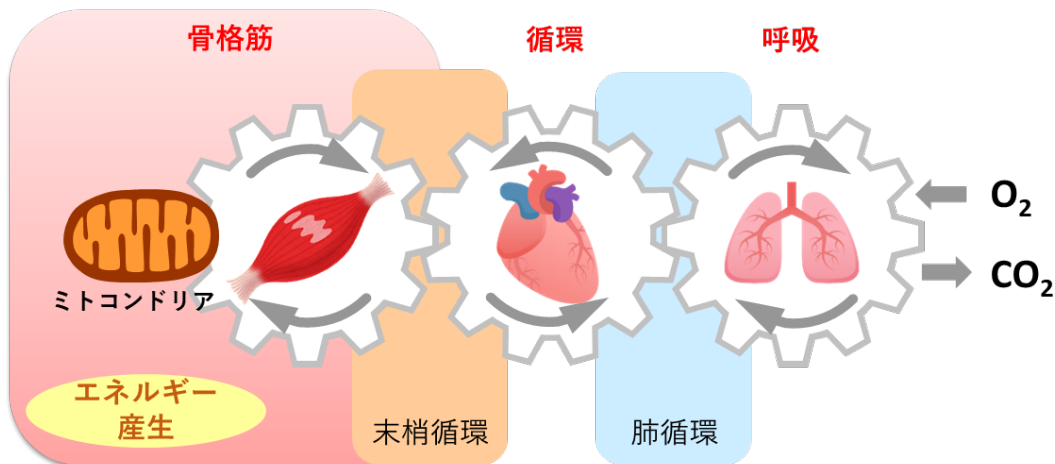


図 1.4. 運動耐容能の規定因子 (Wasserman の歯車)

骨格筋の量および機能の低下をサルコペニアというが、心不全患者でも骨格筋が量的、質的に障害されていることが知られており、これは疾患による活動量の低下などによる原因のみならず心不全の存在自体が様々な病態生理学的な機序によって骨格筋障害を引き起こすと報告されている (Yin et al., 2019). 心不全における骨格筋の異常には筋萎縮、筋線維の遅筋 (type I) から速筋 (type II) への線維型の変化、筋内脂肪の増加、微小血管障害、ミトコンドリアの量的及び質的障害によるエネルギー代謝障害などが報告されているが (Fulster et al., 2013; Kinugawa et al., 2015; Kitzman et al., 2016; Mancini et al., 1989), 加齢を原因とする一次性サルコペニアに対してこのような心不全などの慢性疾患によるものを二次性サルコペニアという。実際に心不全患者では一般の高齢者と比べて高い割合でサルコペニアを合併しており (Fulster et al., 2013), これらの異常はいずれも心不全患者の運動耐容能を低下させる重要な因子であると考えられている (図 1.5) (Coats et al., 1994; Tucker et al., 2018).

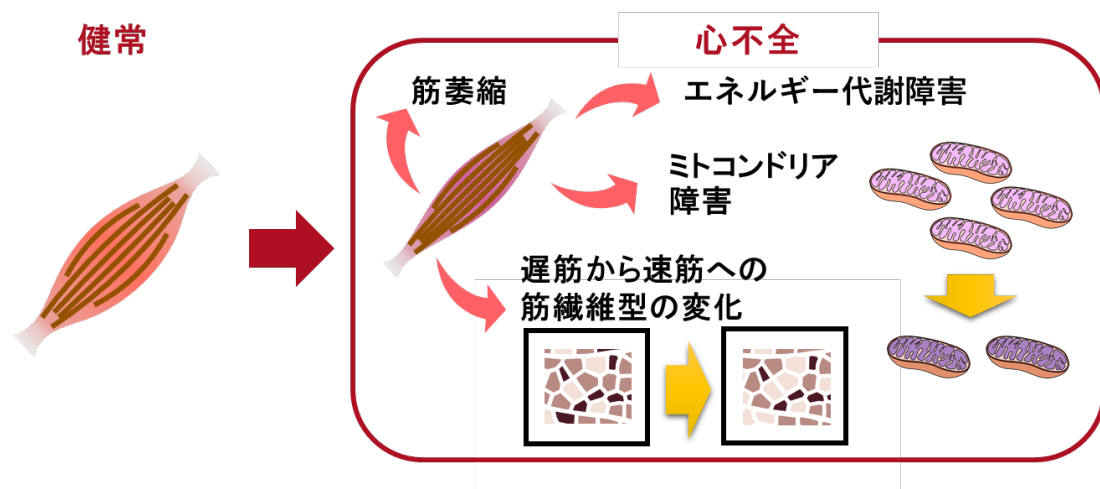


図 1.5. 心不全患者における骨格筋障害の概略図

したがって、心不全患者の予後の改善のためには骨格筋障害をターゲットとした治療介入が必須である。現時点では、運動トレーニングが心不全による骨格筋異常およびそれに伴う運動耐容能低下を改善し予後の改善に寄与する唯一の治療法であり(図 1.6) (Belardinelli et al., 1999; Piepoli et al., 2004), 心不全の重症度が高く、運動耐容能の低下やサルコペニアを合併する患者には継続して定期的な運動トレーニングを行う「心臓リハビリテーション」の概念が普及してきている。

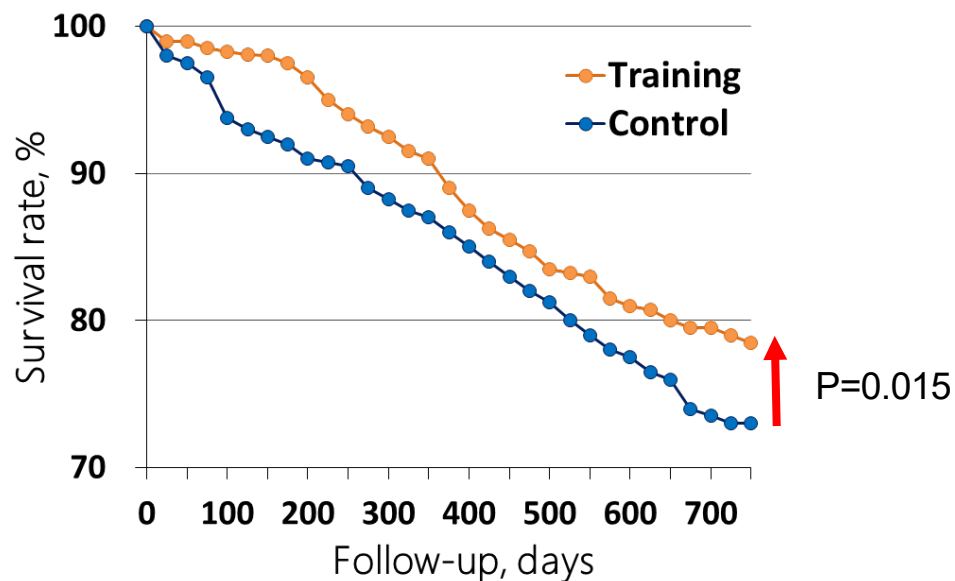


図 1.6. 心不全患者における運動トレーニングの効果 (Piepoli et al., 2004) より引用, 改変

今後の心不全診療においては、このような骨格筋障害を合併する患者を正しく評価し、適切に心臓リハビリテーションの導入を行っていくことが必要である。

一方で、日常臨床診療において心不全患者における骨格筋障害を評価することは容易ではない。現在、骨格筋障害の評価についてはサルコペニアのガイドラインにおいてコンピュータ断層撮影 (CT: computed tomography), 磁気共鳴画像法 (MRI: magnetic resonance imaging), 二重エネルギーX線吸収測定法 (DEXA: dual-energy X-ray absorptiometry), 生体電気インピーダンス法 (BIA: bioelectrical impedance analysis) の記載がなされている (図 1.7) (Cruz-Jentoft et al., 2019)。しかし、これらはいずれも専用の機器が必要であり、必ずしも日常診療において簡便に使用できるものではない。

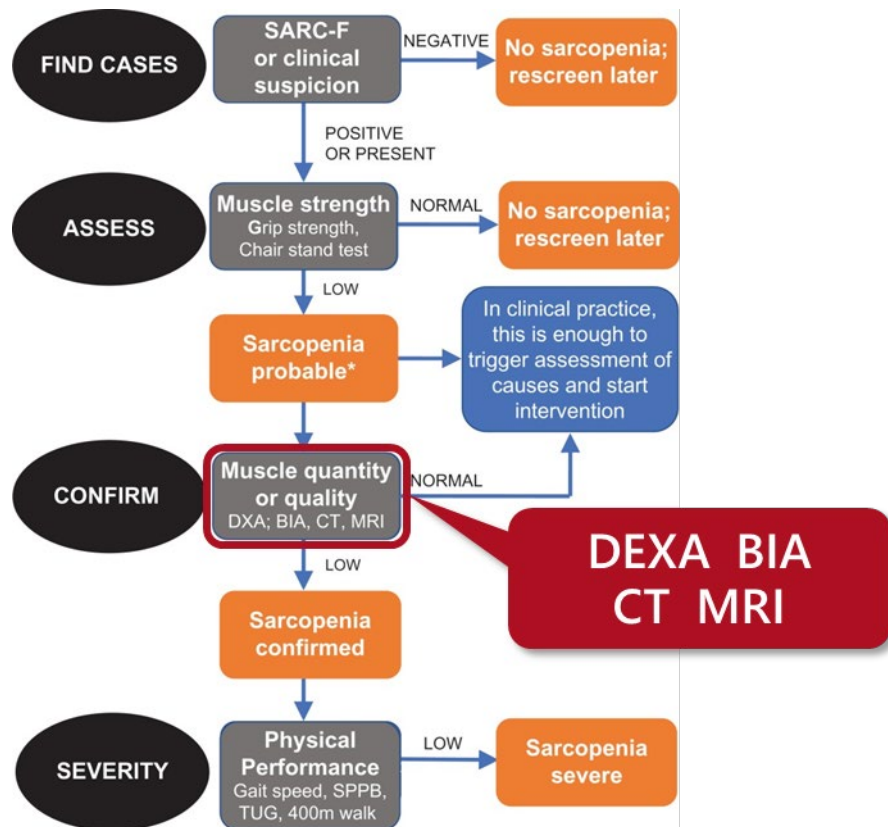


図 1.7. サルコペニアの診断アルゴリズム (Cruz-Jentoft et al., 2019) より引用, 改変

心不全における骨格筋障害は、心不全患者の症状や予後に密接に関連する運動耐容能の主要な規定因子であり、また運動耐容能向上を目的とした運動療法における主な介入点である。しかし現時点で骨格筋の量的、質的な障害を簡便に評価する方法は確立されておらず、骨格筋をターゲットとした治療の大きな障壁となってきた。

今後の心不全患者数のさらなる増加や高齢化を鑑みると、骨格筋障害を合併し介入を必要とする患者数はますます増えることが想定される。そのため心不全の日常臨床診療の中で、骨格筋障害を適切に、効率的に評価・診断することが不可欠であるとともに、骨格筋障害のリスクとなりうる要因を排除しサルコペニアの進展を予防していくことが重要である。

我々は、心不全患者に合併する骨格筋障害の新たな評価・診断法を開発すること、また心不全患者の骨格筋障害のリスクとなる要因を検討することを目的とし、本研究を行った。

1.2. 本研究の概論

本研究の目的は心不全における骨格筋障害の新たな診断方法の開発、および骨格筋障害に影響する因子の検討である。

本研究は3つの臨床研究(それぞれ第2,3,4章)から構成された。

第2章では、画像検査による骨格筋障害の評価について検討した。骨格筋障害の画像による評価方法として、我々は超音波法に着目した。骨格筋の超音波による評価は骨格筋量および質の評価における有用性が近年報告されているが、心不全患者における使用、および運動耐容能との関連をみた報告はない。心不全患者の骨格筋障害を超音波で評価できれば臨床において広く利用できると考えられ、心不全患者と対照群において骨格筋の超音波指標の比較、および運動耐容能との関連を検討した。

第3章では、血液生化学検査による骨格筋の評価について検討した。血液検査は一般診療で汎用されており、心不全診療においては一例として心筋伸展により分泌される脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP: brain natriuretic peptide) は心不全の重症度のマーカーとして広く利用されている。骨格筋の障害を反映するマーカーを検討することは心不全患者の骨格筋を簡便に評価することに寄与すると考えられる。骨格筋は単に骨格の運動を制御するのみならず、マイオカインという種々のホルモンを分泌し全身的に生理学的影響を及ぼしていることが近年知られてきている。その中でも我々は脳由来神経栄養因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor) に着目し、心不全患者と対照群での比較、および心不全患者における筋量、筋機能と BDNF との関連について検討した。

第4章では、心不全患者における骨格筋障害を引き起こす因子について検討した。最近、ループ利尿薬が骨格筋萎縮を引き起こすことが報告され、腎不全患者および肝不全患者においてループ利尿薬の使用が筋萎縮やサルコペニアと関連したとの報告がなされた。ループ利尿薬は心不全患者のうっ血の解除や症状の改善に第一選択薬として広く用いられ、心不全の薬物治療になくってはならないものである。心不全患者においても同様に骨格筋萎縮作用を示せば予後の悪化などの不利益となり得るため、心不全診療においてループ利尿薬の使用にあたり留意が必要となる。これまで心不全患者でのループ利尿薬と骨格筋障害との関連についての報告はなく、我々は多施設コホート研究のデータからループ利尿薬の使用と骨格筋萎縮との関連を検討した。

第2章 心不全患者の骨格筋の超音波法による評価についての研究

2.1. 緒言

心不全では運動耐容能の低下と骨格筋障害を併い、心不全症状や予後の悪化と関連する。心不全における骨格筋の異常には第1章で言及した様々な変化が報告されており、いずれも心不全患者の運動耐容能を低下させる重要な因子であると考えられている。骨格筋におけるエネルギー代謝異常の観点では、我々は先行研究で磁気共鳴分光法 (MRS: magnetic resonance spectroscopy) を用いて大腿四頭筋における高エネルギーリン酸化代謝物であるクレアチンリン酸が心不全患者において運動時に不足する傾向にあることを報告した (Okita et al., 1998)。さらに、下肢における代謝障害の存在は運動耐容能の強い規定因子であった (Chati et al., 1994)。

この心不全患者の骨格筋におけるエネルギー代謝の低下は、ミトコンドリア障害による脂肪酸 β 酸化などの酸化的リン酸化の障害が原因であることが示されている (Mancini et al., 1989)。我々は、拡張型心筋症患者の前脛骨筋で筋内脂肪が増加しており、運動耐容能と負の関連を示したことを報告した (Hirabayashi et al., 2014)。加えて、Kitzman らは心不全患者の大腿筋における異常な脂肪蓄積が運動耐容能の低下と関連することを報告し (Kitzman et al., 2016)、骨格筋量と、脂肪蓄積などの骨格筋の質がいずれも運動耐容能を規定すると考えられている。

しかしながら、骨格筋量や骨格筋の質を評価するためには現在のガイドラインではCTやMRI, DEXA, BIAが必要とされており、専用の機器が必要であり、大掛かりで利用できる施設も限られており、日常診療において必ずしも容易に利用できるものではない。さらにCTやDEXAでは放射線被曝を伴うという問題があり、またMRIやBIAは、心不全患者で多く装着されるペースメーカーやICDなどの体内金属との干渉により使用できない患者がいるなどの問題がある (図2.1)。

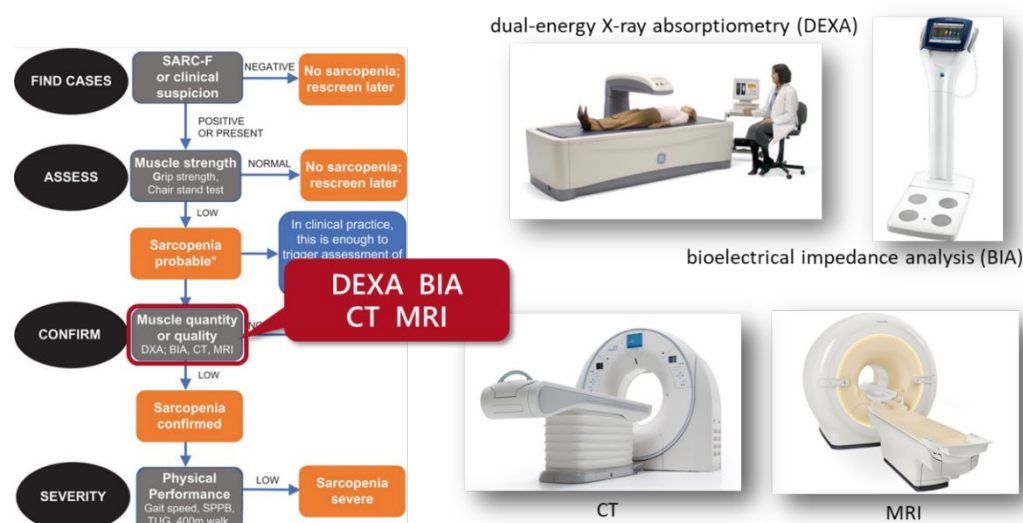


図 2.1. 骨格筋の評価に必要な機器 (Cruz-Jentoft et al., 2019)より引用, 改変

超音波法による骨格筋の評価は量的、質的の両面において近年注目されてきている。超音波法で測定した骨格筋の筋厚はCTやMRIでの測定値と高い相関を示すと報告されているほか (Dupont et al., 2001; Smith et al., 2017), Yasuda らは超音波で評価した大腿筋の筋厚とBIAで評価した全身の骨格筋量がよく相関することを報告した (Yasuda et al., 2017) (図 2.2).

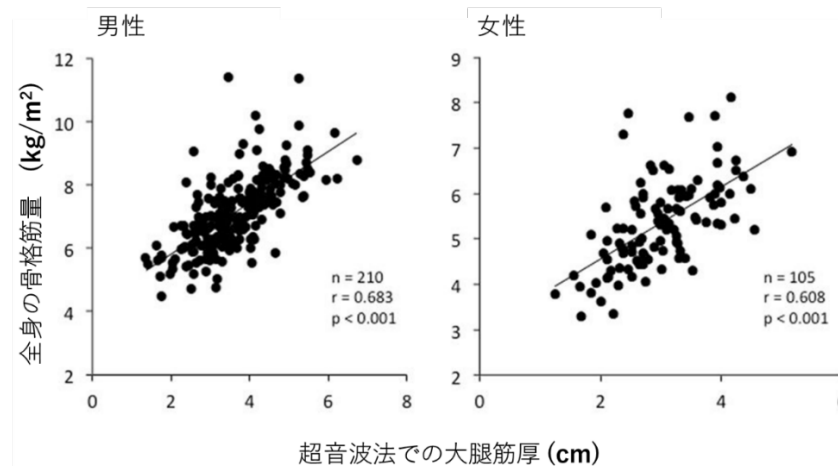


図 2.2. 超音波による大腿筋厚と骨格筋量との関連 (Yasuda et al., 2017) より引用, 改変

また、超音波法で筋の明るさである筋輝度 (EI: skeletal muscle echo intensity) を測定することにより、骨格筋の質を評価できると考えられている。EI の上昇はMRIや組織学的な評価による骨格筋内の脂肪や線維化といった骨格筋の質の低下を反映すると報告されている (Pillen et al., 2006; Young et al., 2015) (図 2.3)。さらに、健常高齢者においてEIの上昇は筋力や有酸素運動強度と負の相関を示すことが報告された (Cadore et al., 2012; Fukumoto et al., 2012; Watanabe et al., 2013)。

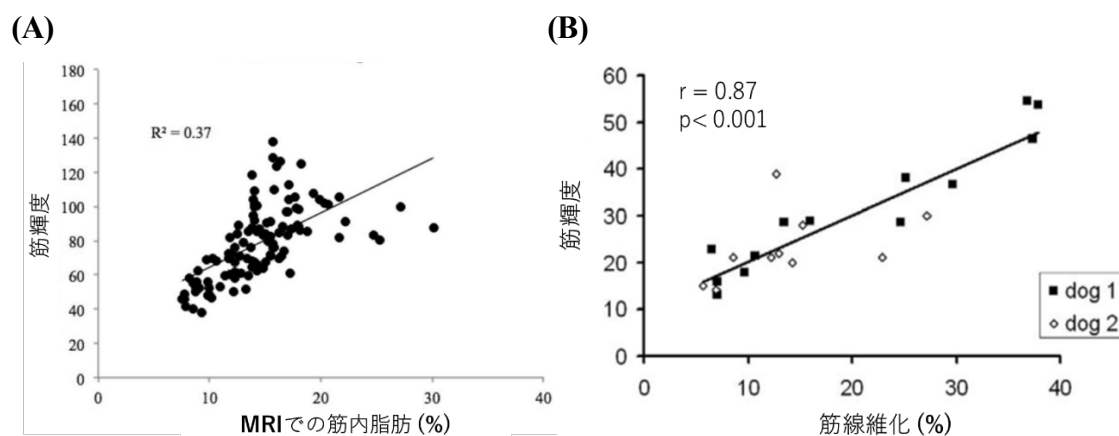


図 2.3. 超音波法による EI と筋内脂肪(A)、線維化(B)との関連 (Pillen et al., 2006; Young et al., 2015) より引用, 改変

日常診療において超音波法は多くの施設で普及しており、非侵襲的、安全、簡便であり低費用で繰り返し測定可能である。心不全患者で生じている骨格筋の異常を超音波法で評価することができ、運動耐容能の低下との関連も認められれば心不全の診療における骨格筋障害の有用な評価法として広く利用可能となり、特にサルコペニアやフレイルを多く合併している高齢の心不全患者にとって有益であると考えられる。しかしながら、心不全患者においてこれまで超音波法により骨格筋を評価した報告はない。

運動耐容能低下の主要な規定因子が下肢骨格筋障害であるとされていることから (Esposito et al., 2011; Harrington et al., 1997), 我々は「超音波法を用いた下肢骨格筋の量的、質的評価は心不全患者における骨格筋の異常を反映し、運動耐容能の予測因子となりうる」と仮説を立てた。とりわけ、心不全患者において骨格筋量は運動耐容能の規定因子であると知られているのに対し (Fulster et al., 2013; Miyagi et al., 2018), 骨格筋の質の評価および運動耐容能との関連については他の測定手法を含め報告がなく、骨格筋の質の指標と考えられる EI に着目し解析を行った。

本研究の目的は、心不全患者において超音波法により骨格筋、特に骨格筋の質を評価し運動耐容能との関連を明らかにすることである。

2.2. 方法

2.2.1. 対象患者

対象は北海道大学病院循環器内科に入院中または通院中の慢性心不全患者を心不全群とし、心不全を有さない対照群を設定した。以下に選択基準および除外基準を示す。

(1) 心不全群の選択基準

- ① 同意取得時において年齢が 20 歳以上の者
- ② フラミンガムの心不全診断基準 (McKee et al., 1971) を満たす心不全増悪による入院治療歴が過去に少なくとも 1 回以上あり、最終退院から 1 ヶ月以上が経過したニューヨーク心臓協会 (NYHA: New York Heart Association) 分類 I-III 度で安定している心不全患者
- ③ 心肺運動負荷検査が可能である者
- ④ 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

(2) 心不全群の除外基準

- ① NYHA 分類 IV 度の患者

- ② 整形外科的疾患を有する患者
 - ③ 神経筋疾患を有する患者
 - ④ 閉塞性動脈硬化症を有する患者
 - ⑤ 活動性の感染症, 透析中, 肝不全, 高度肥満 (肥満度指数 [BMI: body mass index] >35)の患者
 - ⑥ その他, 研究責任者が研究対象者として不適当と判断した者
- (3) 対照群の選択基準
- ① 同意取得時において年齢が 20 歳以上の者
 - ② 心エコー図検査にて左室駆出率 (LVEF: left ventricular ejection fraction) >50% の者
 - 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) 対照群の除外基準
- ① 心不全の既往がある, または治療中の者
 - ② 整形外科的疾患を有する者
 - ③ 神経筋疾患を有する者
 - ④ 閉塞性動脈硬化症を有する者
 - ⑤ 活動性の感染症, 透析中, 肝不全, 高度肥満 (BMI >35) の者
 - ⑥ その他, 研究責任者が研究対象者として不適当と判断した者

2017 年 9 月から 2018 年 9 月の間に上記基準に合致する心不全群 58 名, 対照群 28 名を登録した.

2.2.2. 研究プロトコール

全ての研究参加者に対し, 血液検査, 心エコー図検査, 診療録からの患者基本情報および合併疾患, 服薬状況の収集を行った. また, 運動耐容能や骨格筋量および骨格筋機能の評価として心肺運動負荷試験, 体組成測定, 下肢筋力測定, 握力測定, 10 m 歩行試験を施行した. 骨格筋の超音波測定では大腿四頭筋の筋厚および筋輝度を測定した.

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 017-0119), 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.

2.2.3. 超音波法による骨格筋の評価

骨格筋の超音波測定は運動耐容能に主に寄与するとされる大腿四頭筋で行った。両側の大腿四頭筋について、大腿直筋、外側広筋、内側広筋、中間広筋のそれぞれを超音波診断装置 HI-VISION Avius (Hitachi, Tokyo) にて計測した。各筋の測定位置および測定方法は、先行研究 (Fukunaga et al., 2001; Korhonen et al., 2009; Rutherford and Jones, 1992) に基づき同一の基準で行った。背臥位の膝関節伸展位とし、外側広筋は大転子と大腿骨外側上顆を結んだ線上 50%の外側広筋上とした。大腿直筋および中間広筋は膝蓋骨上縁と上前腸骨棘を結んだ線上 50%の大腿直筋上とし、皮下脂肪下から大腿直筋膜を大腿直筋、中間広筋膜から大腿骨前面を中間広筋とした。内側広筋は外側膝関節裂隙と大腿骨大転子間の距離の遠位 30%とした。画像表示モードは B モード、5-12 MHz のプローブで撮影を実施し、全ての対象者について深度 70 mm, ゲイン 90 dB の同一条件で行った (図 2.4)。



図 2.4. 骨格筋の超音波測定風景

SF: subcutaneous fat (皮下脂肪), RF: rectus femoris (大腿直筋), VI: vastus intermedius (中間広筋), femoral bone: 大腿骨.

筋厚はプローブジェルを十分に用いて筋の圧迫による変形を避け、各筋の筋膜間の距離を測定した。各筋の左右の平均を求め、4 つの筋の合計を大腿四頭筋厚 (QMT: quadriceps muscle thickness) とした (Wilhelm et al., 2014)。

筋輝度は Adobe Photoshop CC 2014 (Adobe Systems, San Jose, CA) を使用し、超音

波診断装置で得られた画像から各筋を最大限含むように関心領域を設定し、8-bit gray-scale analysis の histogram function を用いて輝度を測定した。関心領域内の平均輝度は0 (黒) ～255 (白) の256段階で表現され、左右の各筋の輝度の平均を大腿四頭筋輝度 (QEI: quadriceps echo intensity) とした (Wilhelm et al., 2014)。

骨格筋の筋厚および筋輝度の測定は全て同一検者が施行した。超音波測定の信頼性を確認するため、検者内・検者間誤差の評価を行った。検者内誤差は同一の検者により5名 (23±2 歳, 男性) の超音波測定をそれぞれ2度行い評価した。級内相関係数 (ICC: intra-class correlation coefficient) 1.1 はQEIで0.97, QMTで0.99であった。検者間誤差は3名の検者により5名 (24±2 歳, 男性) の超音波測定を行い評価した。ICC 1.2 はQEIで0.89, QMTで0.93であった。

2.2.4. 骨格筋量および骨格筋機能の評価

骨格筋量はBIA (Inbody 770, Tokyo) で測定した (Lukaski et al., 1985)。体内金属との干渉のため、ペースメーカーやICDを装着した患者は除外した。下肢筋力は等速度運動器 (Biodex System 4, Biodex Medical Systems, Shirley, NY) を使用して測定した。起座位で膝関節伸展運動を最大努力で行うように指示し、180°/secの設定速度で10回の運動を行い最大トルク値を得た (Maughan et al., 1983)。握力は握力計 (Grip-D; Takei Scientific Instruments, Tokyo) を用いて測定した両側の握力の平均値を使用した。10 m 歩行試験はスタートとゴールより前後2 m ずつ余裕を持たせ合計14 m の歩行路とし、最大歩行速度での10 m の所要時間を2回計測し、最小値を使用した。

2.2.5. 運動耐容能の評価

自転車エルゴメーター (Aerobike 75XLII, Combi Wellness, Tokyo) による Ramp 漸増負荷法を用いた心肺運動負荷試験 (CPX: cardiopulmonary exercise testing) を行い、下肢疲労あるいは息切れによる症候限界まで負荷を行った。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、運動耐容能の指標である最大酸素摂取量 (peak VO₂: peak oxygen uptake) および嫌気性代謝閾値 (AT: anaerobic threshold) を評価した。ATはVスロープ法により決定した (Kakutani et al., 2018)。

2.2.6. その他の評価項目

研究参加者の体重および身長を測定し、BMI (体重/身長², kg/m²) を計算した。併存症や内服薬、心不全の原因は診療録より取得した。血液検査は静脈より採血を行い、院内の通常検査にて血色素濃度 (Hb: hemoglobin)、推定糸球体濾過率 (eGFR:

estimated glomerular filtration rate), HbA1c, BNP を測定した。経胸壁心エコー図検査では傍胸骨長軸像より左室拡張末期径 (LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter), 左室収縮末期径 (LVESD: left ventricular end-systolic diameter), 左房径 (LAD: left atrial diameter) を, 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 LVEF を計測した。左室重量係数 (LVMI: left ventricular mass index) は Devereux の式より左室重量を計算し, 体表面積で補正した。

2.2.7. 統計学的解析

本研究で必要なサンプルサイズは, 92 名の健常高齢者 (平均年齢 70.4 ± 5.5 歳) において EI と筋力の有意な負の相関 (相関係数 -0.40) を認めた先行研究 (Fukumoto et al., 2012) より, 両側有意水準 5%, 検出力 80%, 心不全群/対照群を 2 として心不全群 46, 対照群 23 と計算された。統計処理は, JMP 14.0.0 software (SAS, Cary, NC, USA) を用いて行った。データは, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。2 群間の平均値の差の検定は連続変数では Student の t 検定または Mann-Whitney の U 検定を, 名義変数では χ^2 乗検定を行った。正規性の検定は Shapiro-Wilk の正規性検定で行った。QEI と他の評価項目の相関を評価するために単回帰分析を行った。QEI の独立した規定因子を評価するため多変量解析を行った。p 値 < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

2.3. 結果

2.3.1. 患者背景

心不全群および対照群の患者背景を表 2.1 に示す。両群で年齢、性別、既往歴に有意な差はなかった。心不全群では BMI が有意に低かった。心不全群では、NYHA 分類で I が 7 名、II が 45 名、III が 12 名であった。心不全の原因は 16 名が虚血性心疾患、42 名が非虚血性心疾患であった。内服薬に関して、心不全群においてアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE-I: angiotensin converting enzyme inhibitor) またはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB: angiotensin II receptor blocker) は 98%で、 β 遮断薬は 93%で、アルドステロン拮抗薬は 60%で、利尿薬は 64%で使用されていた。心エコー図検査では心不全群は対照群と比べて有意に大きい LVEDD および有意に低い LVEF を示した。CPX では、peak VO₂ および AT は心不全群で有意に低かった。血液検査では心不全群で BNP 値が有意に高く、eGFR は有意に低かった。

対照群および心不全群での大腿四頭筋の超音波の代表的な画像を図 2.5 に示す。QEI 値は心不全群で対照群と比べて有意に高値であった (図 2.6 A)。QMT は心不全群で有意に低値であった (図 2.6 B)。また、骨格筋量、握力、10 m 歩行試験、下肢筋力はいずれも心不全群で低値であった。

表 2.1. 心不全群と対照群の患者背景

	対照群 (n=28)	心不全群 (n=58)	p 値
臨床所見と併存症:			
年齢, yrs	58 ± 14	61 ± 12	0.225
男性, n (%)	22 (79)	34 (59)	0.069
BMI, kg/m ²	25.2 ± 3.2	23.3 ± 4.8	0.037
高血圧, n (%)	11 (39)	16 (28)	0.273
糖尿病, n (%)	6 (21)	16 (28)	0.540
脂質異常症, n (%)	15 (54)	34 (59)	0.658
NYHA (I / II / III)		(8 / 41 / 6)	
内服薬, n (%):			
ACE-I または ARB	7 (25)	56 (98)	<0.001
アルドステロン拮抗薬	1 (4)	34 (60)	<0.001
β 遮断薬	3 (11)	52 (93)	<0.001
利尿薬	0 (0)	36 (64)	<0.001
スタチン	12 (43)	33 (60)	0.138

心不全の原因, n (%):			
虚血性心疾患	—	16 (28)	
非虚血性心疾患	—	42 (72)	
血液検査結果:			
Hb, g/dL	14.7 ± 1.2	13.5 ± 1.3	<0.001
eGFR, mL/min/1.73m ²	78.4 ± 16.9	53.3 ± 19.2	<0.001
HbA1c, %	5.9 ± 0.7	6.0 ± 0.7	0.764
BNP, pg/mL	38.4 ± 51.6	177.2 ± 216.2	0.001
心エコー図検査:			
LVEDD, mm	47.5 ± 3.6	60.4 ± 11.6	<0.001
LVESD, mm	29.9 ± 3.3	50.0 ± 14.9	<0.001
LAD, mm	37.8 ± 6.0	43.9 ± 7.6	<0.001
LVEF, %	65.6 ± 4.5	38.3 ± 14.7	<0.001
LVMI, g/m ²	78.7 ± 14.7	112.2 ± 33.1	<0.001
心肺運動負荷試験:			
Peak VO ₂ , ml/kg/min	25.4 ± 6.1	16.2 ± 4.1	<0.001
AT, ml/kg/min	13.9 ± 2.7	9.9 ± 2.1	<0.001
最大心拍数, /min	153 ± 27	113 ± 25	<0.001
最大収縮期血圧, mmHg	201 ± 22	145 ± 29	<0.001
最大呼吸交換比	1.24 ± 0.08	1.19 ± 0.12	0.049
骨格筋指標:			
QMT, cm	6.54 ± 1.34	5.21 ± 1.10	<0.001
QEI	81.1 ± 7.5	88.3 ± 13.4	0.010
骨格筋量, kg	48.5 ± 7.9	38.7 ± 7.4	<0.001
握力, kg	35.9 ± 10.6	27.9 ± 7.1	<0.001
10 m 歩行試験, sec	5.1 ± 0.8	6.1 ± 1.5	<0.001
下肢筋力, Nm	107.9 ± 27.5	84.2 ± 24.3	<0.001

数値は平均値±標準偏差または人数 (%) で示す

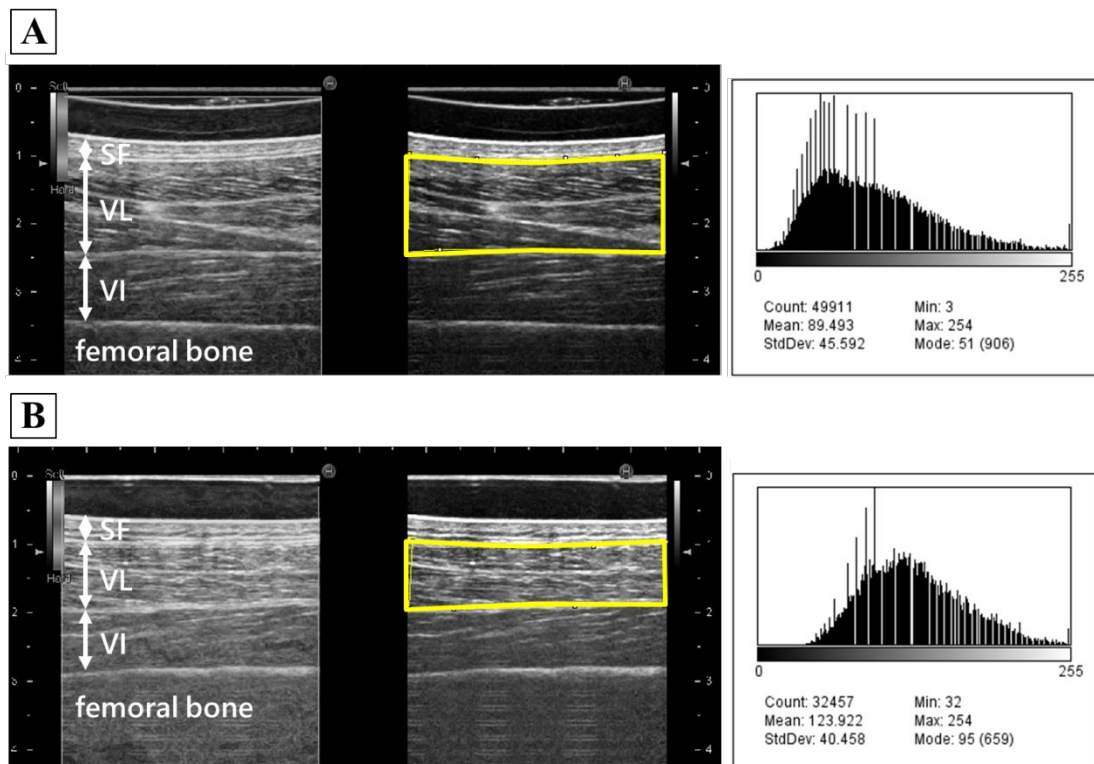


図 2.5. 対照群 (A) および心不全群 (B) での大腿四頭筋の超音波の代表的画像
SF: subcutaneous fat (皮下脂肪), VL: vastus lateralis (外側広筋), VI: vastus intermedius (中間広筋), femoral bone: 大腿骨.

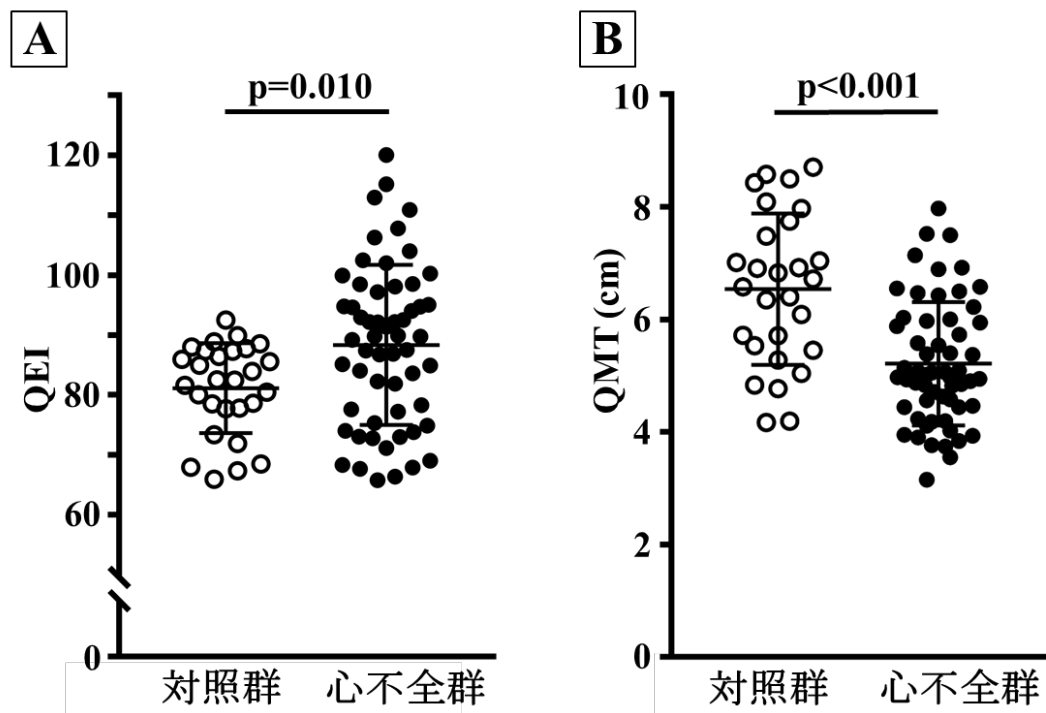


図 2.6. 対照群および心不全群での QEI (A) と QMT (B) の比較

2.3.2. 大腿四頭筋の筋輝度・筋厚と各評価項目との関連

心不全群および集団全体において、QEI と peak VO₂ は有意な負の相関を示した (それぞれ $r = -0.38, p = 0.006, r = -0.34, p = 0.002$). また、心不全群および集団全体において QMT は peak VO₂ と有意な負の相関を示した (それぞれ $r = 0.29, p = 0.038, r = 0.53, p < 0.001$) (図 2.7).

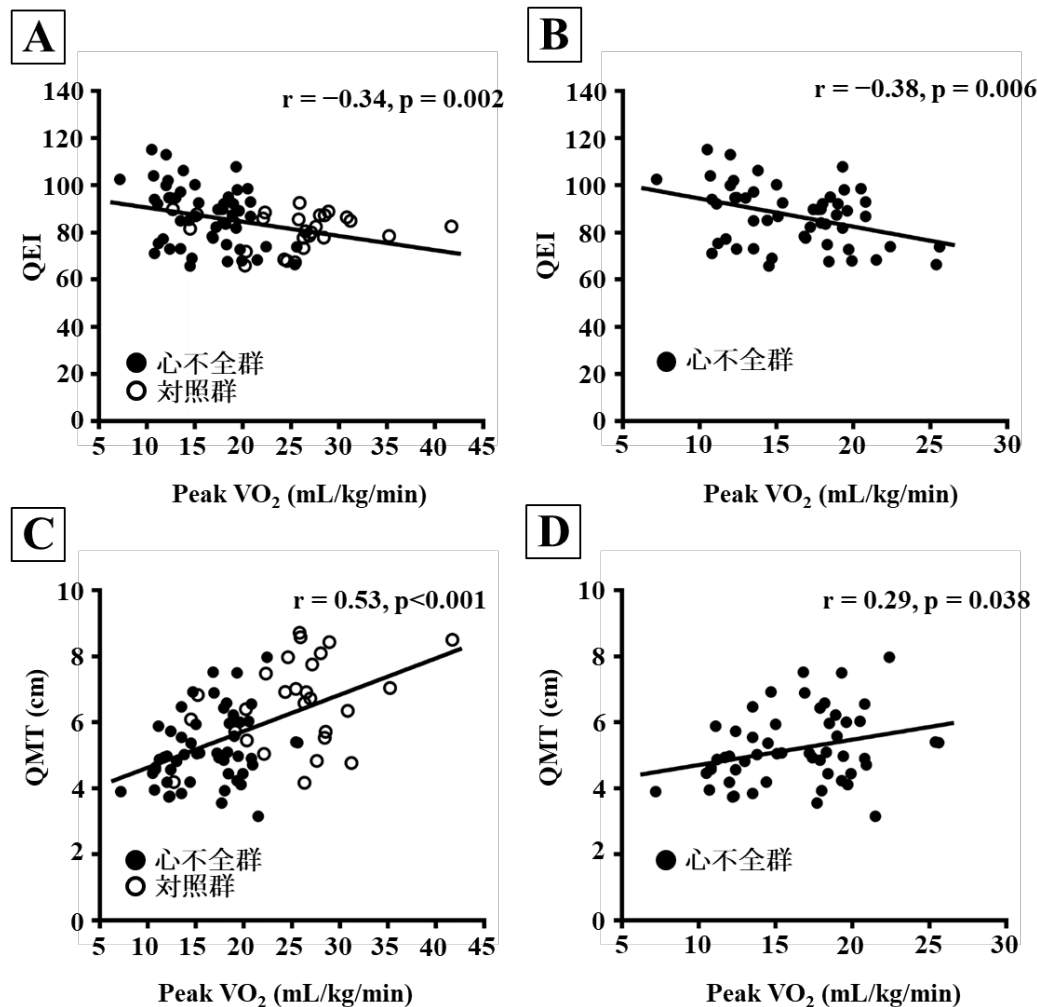


図 2.7. 集団全体 (A) と心不全群 (B) での QEI と peak VO₂ の相関および集団全体 (C) と心不全群 (D) での QMT と peak VO₂ の相関

心不全群における単回帰分析において、QEI は年齢 ($r = 0.266, p = 0.046$), NYHA 分類 ($r = 0.353, p = 0.007$), AT ($r = -0.326, p = 0.018$), peak VO₂ ($r = -0.378, p = 0.006$) と有意な相関を示したが、BMI, LVEDD, LVEF, eGFR, HbA1c, log BNP 値とは有意な関連を示さなかった。また、QEI は QMT, 骨格筋量, 握力, 10 m 歩行試験, 下肢筋力とも有意な関連を示さなかった (表 2.2).

表 2.2. 心不全群における QEI の単回帰分析

変数	相関係数	p 値
年齢, yrs	0.266	0.046
BMI, kg/m ²	-0.144	0.285
NYHA 分類	0.353	0.007
LVEDD, mm	-0.120	0.374
LVEF, %	0.021	0.880
Peak VO ₂ , mL/kg/min	-0.378	0.006
AT, mL/kg/min	-0.326	0.018
eGFR, mL/min/1.73m ²	0.054	0.693
Log BNP, pg/mL	0.191	0.156
HbA1c, %	-0.034	0.807
QMT, cm	-0.238	0.075
骨格筋量, kg	-0.281	0.194
握力, kg	-0.177	0.189
10 m 歩行試験, sec	-0.105	0.440
下肢筋力, Nm	-0.200	0.136

多変量解析において, peak VO₂ と BMI が QEI の独立した規定因子として示された (表 2.3).

表 2.3. 心不全群における QEI の多変量解析

変数	回帰係数	95% 信頼区間	p 値
年齢, yrs	4.85	-2.37 – 12.1	0.183
男性 (0)	-0.96	-4.54 – 2.61	0.589
BMI, kg/m ²	-11.67	-22.2 – -1.12	0.031
QMT, cm	2.69	-6.80 – 12.17	0.572
Peak VO ₂ , mL/kg/min	-11.80	-20.73 – -2.86	0.011

男性と女性はそれぞれ 0 と 1 で示した

2.4. 考察

本研究の主な結果は、心不全患者において大腿四頭筋の EI は対照群と比べて上昇していること、また年齢、性別、BMI、筋厚で調整後も EI は peak VO₂ と関連し、その程度は筋厚よりも強かったことである。本研究の結果から、下肢の EI は心不全患者において運動耐容能を規定する骨格筋の質を反映する指標となり得ると考えられ、我々の仮説は支持された。これまで、DEXA や MRI で評価した心不全による骨格筋の変化が peak VO₂ と関連するという報告はいくつかされている (Cicoira et al., 2001; Haykowsky et al., 2014)。一方、超音波法は汎用されており簡便、非侵襲的であり費用対効果も高く、病院やクリニックのみならず在宅医療等でも使用可能であり、特に高齢のフレイルを合併した心不全患者にとって有用である。我々の知る限り、心不全患者の骨格筋障害に対し超音波法の臨床的な利用について報告した初めての研究となる。

2.4.1. 心不全における骨格筋の EI の意義

骨格筋の EI はこれまでサルコペニア (Akima et al., 2017; Miron Mombiela et al., 2017; Wilhelm et al., 2014) や慢性閉塞性肺疾患 (Ye et al., 2017)、筋疾患 (Heckmatt et al., 1982) 等の病態で上昇し、筋力や運動耐容能と関連する (Cadore et al., 2012; Rech et al., 2014; Wilhelm et al., 2014) ことが報告されている。MRI で観察した筋内脂肪が EI の上昇と関連すると報告されているほか (Young et al., 2015)、筋生検での筋内脂肪の割合と EI が正の相関を示したとの報告もあり (Reimers et al., 1993)、EI の上昇は筋内脂肪の増加を反映していると考えられている。この筋内脂肪は炎症性サイトカインを発生させ、骨格筋に対し異化作用を示すと報告されている。さらに、インスリン抵抗性を生じ骨格筋の異化を促進したり、ミトコンドリア障害や骨格筋内でのタンパク合成を障害する (Upadhyaya et al., 2015)。また筋内脂肪は筋線維に対する血液供給を減らし、運動中の骨格筋への酸素供給を阻害するとの報告もある (Heinonen et al., 2012)。今回の研究では心不全患者で EI が高値を示し、以前我々が MRS を用いて心不全患者の骨格筋内の脂肪が増加していることを示した報告 (Hirabayashi et al., 2014) とも合致する結果であった。また、本研究での心不全群における QEI 値は対照群より広い分布を示しており、心不全に由来する骨格筋の質的障害の程度がより広く分布していることが示唆される。

この心不全患者における骨格筋内の脂肪の増加は、脂肪酸の β 酸化障害により生じていると考えられる。過去の報告では心不全患者の骨格筋生検で β 酸化の酵素である β -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase 活性が低下していることが示されており (Mancini et al., 1989)、我々も最近心不全モデルマウスにおいて骨格筋ミトコンド

リアの酸化的リン酸化が障害されていること (Takada et al., 2016), そして脂肪酸 β 酸化の異常を伴っていること (Tsuda et al., 2018) を報告した. 同様に, Stephan らは心不全患者の骨格筋におけるミトコンドリアの酸化能が peak VO_2 と強く関連していることを報告している (van der Zwaard et al., 2016).

一方で, Pillen らは筋ジストロフィー犬での研究において EI の増加が骨格筋の線維化を反映していると報告した (Pillen et al., 2009). 骨格筋の線維化は心不全患者において心筋の線維化と共に生じるとされている (Dunnigan et al., 1987). しかし, 心不全患者における骨格筋の線維化についてはまだ報告が少なく知見は不十分であり, 今後さらなる検討が望まれる.

2.4.2. QEI と運動耐容能や筋機能との関連について

本研究で我々は下肢の EI と運動耐容能の指標である peak VO_2 との負の相関を示した. 以前我々や他のグループは, MRS を用いて測定した心不全患者の骨格筋での代謝異常が運動耐容能の低下に寄与することを報告した (Chati et al., 1994; Okita et al., 1998). また, 心不全患者で大腿四頭筋のトレーニングにより運動耐容能の改善を認めた報告もあり (Esposito et al., 2011), QEI は大腿四頭筋の局所の変化を観察しているものの, 運動耐容能に関与する全身的な骨格筋の質的障害の情報を表していると考えられる.

EI と筋力や筋機能との関連については, これまで高齢者において QEI が下肢筋力と有意な相関を示したとの報告がある (Cadore et al., 2012; Rech et al., 2014). しかし我々の今回の研究ではこの報告とは異なり QEI は握力や 10 m 歩行試験, 下肢筋力との相関を示さなかった. この不一致に関しては, EI は年齢や BMI に影響されることが知られていることから (Akima et al., 2016; Wilhelm et al., 2014) 本研究の対象者がこれまでの他の報告と比べて比較的若年であったことが要因の可能性がある. また, 心不全患者の骨格筋の質的障害は健常高齢者のものと異なっている可能性も示唆される. いずれにしても我々の結果では年齢や BMI, 骨格筋量で調整後も EI は peak VO_2 と有意な関連を示し, このことは EI が骨格筋の質的障害, 特に骨格筋持久能力と関連していることを示している.

2.4.3. QMT と運動耐容能との関連について

本研究では QMT も心不全患者で対照群と比べて低下しており, peak VO_2 と正の相関を示した. QMT は全身の骨格筋量を反映することが知られており (Nijholt et al., 2017), 本研究でも QMT は BIA で評価した全身の骨格筋量と強い相関を示した ($r=0.741, p<0.001$). 心不全患者において骨格筋の萎縮は運動耐容能の低下に関与す

ることが報告されており (Fulster et al., 2013; Miyagi et al., 2018), 骨格筋量の低下を意味する QMT の低下が運動耐容能の低下と関連することは容易に想定される。しかし QMT と peak VO₂ の相関は, 集団全体と比べて心不全患者では有意であるものの, 弱かった。この原因として, 今回研究対象となった心不全患者は安定した慢性心不全の通院患者であり, 骨格筋の萎縮が比較的少なかった患者群であった可能性が示唆される。その一方で, このような筋萎縮の程度が少ない患者においても EI の骨格筋の質が運動耐容能の主要な規定因子となることは特筆すべき点である。

2.4.4. 本研究の限界

本研究では何点かの考慮すべき限界がある。まず, 本研究は比較的少人数の対象者による横断研究であり運動耐容能と EI による骨格筋質との間の因果関係は明らかでない。今後より大規模な縦断研究が望まれる。

次に, 現段階で骨格筋に対する超音波検査は比較的新しい概念であるため, その測定方法や計測部位などの一般化された方法は存在しない。また骨格筋の EI は相対的な値であり測定環境や機器により異なるため, 施設間のデータの比較や標準化が難しい。また, 一般的に超音波検査はその結果が検者の技量や習熟度により影響される面がある。骨格筋に対する超音波法はこれまで高い信頼性や再現性があると報告されており (Dupont et al., 2001; Nijholt et al., 2017; Smith et al., 2017), 本研究でも検者内・検者間誤差は少ないことが示されているが, その信頼性を完全に保証することは困難である。今後他の測定法との比較などを通して信頼性を検証していく必要がある。

最後に, 先にも述べたように心不全患者における EI の上昇が, 心不全に由来した骨格筋内の脂肪もしくは線維化等の骨格筋の質的障害を反映しているかは直接的には明らかとなっていない。今回の研究結果が広く受け入れられるためには他の測定機器や, 組織学的な評価によるさらなる検討と検証が不可欠である。

2.5. 結論

本研究の結果から, 超音波法による骨格筋の筋輝度の測定は心不全患者において運動耐容能を規定する骨格筋の障害を評価する簡便で臨床的に有用な方法となり得ると考えられる。現在の心不全患者の増加や高齢化の中, フレイルやサルコペニアを合併し日常生活の活動レベルが低下したり入院を繰り返す心不全患者は社会的な問題となっている。骨格筋障害に対しては運動療法が唯一の介入法であるが, その必要な患者や介入の効果をはかる簡便な方法はこれまで存在せず, 日常臨床において大きな障壁となっていた。本研究はそのような運動療法の恩恵を受ける患者を明

らかにしたり，骨格筋障害の程度をはかることにより運動療法の個別化の普及につながる新たな有用な方法となり得る．

第3章 心不全患者の骨格筋障害と BDNF の関連についての研究

3.1. 緒言

心不全患者数の増加が続き社会的な問題となっているなか、心不全患者の長期管理において日常の活動レベルの低下を招き自覚症状の悪化のみならず心不全の重症度や予後とも関連する骨格筋障害を簡便に評価する方法が望まれている。現段階で骨格筋の評価においては画像による診断が主であるが、日常臨床において汎用される血液検査で骨格筋障害を評価できれば心不全の診療において大きな利点となると考えられる。

骨格筋は体重の 40%を占める生体内最大の臓器ととらえることができるが、近年骨格筋は単に伸展収縮により動作を生み出すという役割のみならず、「マイオカイン」と総称される様々なサイトカインや成長因子を分泌し骨格筋機能や骨格筋量の制御、全身の代謝調節などに関与していることが知られてきている (Pedersen and Febbraio, 2012) (図 3.1)。これらのマイオカインが骨格筋の異常により分泌様態が変化すれば、血液検査でそれを測定することにより骨格筋の障害を評価する指標となり得ると考えられる。

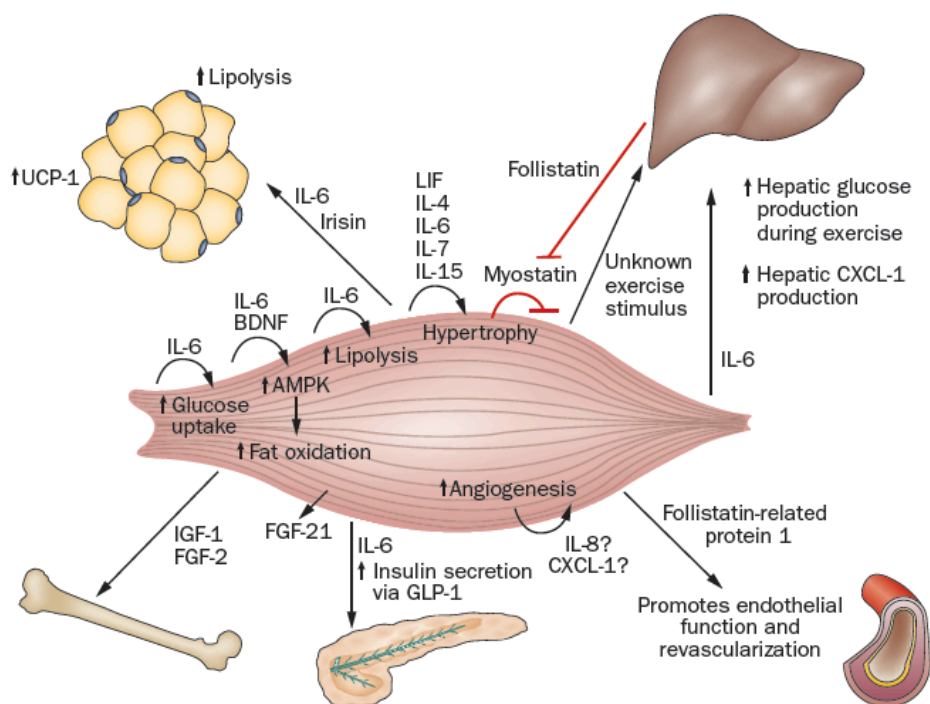


図 3.1. マイオカインの概略図 (Pedersen and Febbraio, 2012) より引用

表 3.1. 現在知られている主なマイオカインの一覧

略称	マイオカイン	骨格筋細胞からの分泌 (刺激様式)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	収縮刺激
FGF-21	Fibroblast growth factor-21	C2C12 (インスリン)
FSTL1	Follistatin-like 1	C2C12 (FSTL1過剰発現)
IL-6	Interleukin-6	C2C12 (電気刺激)
IL-7	Interleukin-7	Primary human satellite cell (刺激なし)
IL-8	Interleukin-8	Primary human satellite cell (伸展刺激)
IL-15	Interleukin-15	<i>Not detected</i>
Irisin	Fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5)	—
LIF	Leukemia inhibitory factor	Skeletal muscle satellite cells (刺激なし)
Myonectin	C1q/TNF-related protein 15 (CTRP15)	L6 myotubes (mtDNA-depleted myocytes)
Myostatin	Growth/differentiation factor-8 (GDF-8)	Skeletal muscle cells (刺激なし)
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine	C2C12 (伸展刺激)

現在報告されている主なマイオカインを表 3.1 に示す。これまでのマイオカインの報告では培養細胞での実験系での報告が多く、正常細胞やマウスに対する実験が大半であった。また、疾患におけるマイオカインの変化を報告した研究はほとんどなかった。その中で、我々は骨格筋の中でも唯一遅筋に多く存在することが示されていた BDNF に着目した (Mousavi et al., 2004)。心不全による骨格筋の異常では遅筋 (type I) から速筋 (type II) への線維型の変化が知られており、これに伴い遅筋に特徴的なミトコンドリア機能・酸化的リン酸化の障害を来す。そのため、遅筋で産生される BDNF は心不全における特徴的な骨格筋障害をよく反映する可能性があると考えられた。

BDNF は neurotrophin family のひとつであり、もともとは主に海馬に存在し神経の分化や再生、保護、シナプス可塑性などの神経栄養機能において様々な重要な役割を担うことが報告されていた (Lewin and Barde, 1996; Mattson et al., 2004)。その後、BDNF は骨格筋にも存在し、骨格筋の収縮刺激に伴い産生されることが報告された (Matthews et al., 2009)。BDNF は骨格筋においてミトコンドリアの生合成や脂肪酸代謝に関与しており (Wood et al., 2018)、運動トレーニングにより血清 BDNF 値が増加するとの報告もされている (Ferris et al., 2007)。

我々は以前、心不全患者において血清 BDNF 値が健常者と比較して低下しており、BDNF が患者の peak VO₂ と正の相関を示すことを報告した (Fukushima et al., 2013). また我々や他のグループから、心不全患者において BDNF の低下は再入院や心血管死と関連することも報告されており、血清 BDNF 値は心不全の重症度を反映し、予後を簡便に予測できるマーカーである可能性が示唆されている (Fukushima et al., 2015; Shibata et al., 2018; Takashio et al., 2015). さらに、我々は最近心不全モデルマウスを用いてヒト組換え BDNF の投与がマウスの骨格筋ミトコンドリア機能の改善を通して運動耐容能を改善したことを報告した (Matsumoto et al., 2018). これらの基礎および臨床研究の結果から、心不全患者において BDNF の低下が運動耐容能や心不全の重症度と関連していることが明らかとなっており、心不全患者の骨格筋の異常を反映している可能性が高いと考えられる. しかし、心不全患者における骨格筋の量的・質的障害と血清 BDNF 値との関連を直接検討した報告はこれまでにない.

心不全患者で骨格筋量と骨格筋機能、すなわち筋力やミトコンドリア機能は運動耐容能を規定する主要な因子であることから、我々は「血清 BDNF が骨格筋量および骨格筋機能と相関を示す」と仮説を立てた. 本研究ではその関連を明らかにすることを目的とし、心不全患者において血清 BDNF 値と骨格筋量および機能との関連について評価した.

3.2. 方法

3.2.1. 対象患者および研究プロトコール

本研究の対象患者および研究プロトコールは、第 2 章で記載したものと同一レジストリーを用いた. 2017 年 9 月から 2018 年 9 月の間に心不全群 60 名、対照群 29 名を登録した.

3.2.2. 血清 BDNF の測定

以下に用いた実験材料の由来及び調整法、実験器具を示した.

<1> 装置

- ・超純水製造装置: Milli-Q[®] Advantage A 10 system (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)
- ・マイクロプレートリーダー: Multiskan[™] GO マイクロプレートスペクトロフォトメータ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- ・ボルテックスミキサー: VORTEX-GENIE 2 Mixer (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)

- ・卓上型微量高速遠心器: Minispin (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- ・微量高速冷却遠心器: MX-307 (Tomy Digital Biology Co., Ltd.)
- ・ユニバーサル冷却遠心器: 5911 (Kubota Corporation, Tokyo, Japan)

<2> キット

- ・ Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

全ての研究参加者より末梢静脈から採血を行い、室温で 30 分間静置した後に 4°C で 1 晩静置し血液を凝固させた。その後 1000×g, 4°C, 15 分間遠心分離を行い、上清の血清を回収して測定まで -80°C のフリーザーに保管した。採血は心肺運動負荷試験や筋力測定を行う前に施行した。

血清 BDNF 濃度の測定は、Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit によるサンドウィッチ ELISA 法で解析した (Laske et al., 2006)。

- 1) 血清サンプルをキット付属の RD6P (血清・血漿試料用希釈バッファー) でそれぞれ 20 倍に希釈した。
- 2) BDNF Standard を 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 pg/mL となるように調製した。
- 3) 捕捉用抗 BDNF 抗体がコートされた 96 well マイクロプレートにキット付属の RD1S (測定用バッファー) を各 100 µL 注入した。
- 4) 調製した Standard および血清サンプルをマイクロプレートに各 50 µL 注入した。
- 5) マイクロプレートをプレートシーラーで覆い、室温で 2 時間静置した。
- 6) キット付属の BDNF conjugate (horseradish peroxidase 標識検出用抗 BDNF 抗体) をマイクロプレートに各 100 µL 注入した。
- 7) マイクロプレートをプレートシーラーで覆い、室温で 1 時間静置した。
- 8) キット付属の Wash buffer concentrate (洗浄用バッファー) を蒸留水で 25 倍に希釈し、Wash buffer を作製した。
- 9) プレート内の溶液を除去し、Wash buffer で 3 度洗浄した。
- 10) キット付属の Color reagent A (安定化させた H₂O₂) と Color reagent B (horseradish peroxidase 発色基質) を等量混合し、Substrate solution (基質溶液) を作製した。
- 11) Substrate solution をマイクロプレートに各 200 µL 注入した。
- 12) マイクロプレートをプレートシーラーで覆い、遮光して室温で 30 分間静置した。
- 13) キット付属の Stop solution (反応停止液) をマイクロプレートに各 50 µL 注入し、溶液が青色から黄色に変化することを確認した。
- 14) 30 分以内にプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。540 nm の吸光度で補正した。

全ての検体は正確を期するため duplicate で測定を行い、検体の患者情報がわからない状態で行った。

3.2.3. 骨格筋量および骨格筋機能の評価

骨格筋量の評価は、DEXA (Discovery-A, Hologic, Marlborough, MA, USA) で除脂肪量を測定した (Chen et al., 2007)。また、体重および身長を測定し、BMI (体重/身長², kg/m²) を計算した。骨格筋機能の評価として、Biodex による下肢筋力の評価および 10 m 歩行試験を第 2 章と同様の方法で施行した。

3.2.4. 運動耐容能の評価

自転車エルゴメーター (Aerobike 75XLII, Combi Wellness, Tokyo) による Ramp 漸増負荷法を用いた CPX を第 2 章と同様の方法で施行した。

3.2.5. その他の評価項目

第 2 章と同様に研究参加者の併存症や内服薬、心不全の原因の取得、および採血による Hb、血小板数 (Plt: platelets)、eGFR、HbA1c、BNP の測定、経胸壁心エコー図検査を行った。

3.2.6. 統計学的解析

本研究で必要なサンプルサイズは Fukushima らの先行研究 (Fukushima et al., 2013) から、両側有意水準 5%、検出力 80%、心不全群/対照群を 2 として心不全群 51、対照群 25 と計算された。統計処理は、JMP 14. 0. 0 software (SAS, Cary, NC, USA) を用いて行った。データは、平均値±標準偏差で示した。2 群間の平均値の差の検定は連続変数では Student の t 検定または Mann-Whitney の U 検定を、名義変数では χ^2 二乗検定を行った。血清 BDNF 値と他の評価項目との相関を評価するために単回帰分析を行った。血清 BDNF 値の独立した規定因子を評価するため多変量解析を行った。p 値 < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

3.3. 結果

3.3.1. 患者背景

心不全群および対照群の患者背景を表 3.2 に示す。両群で年齢、性別、既往歴に有意な差はなかった。心不全群では BMI が有意に低かった。心不全群では、NYHA 分類で I が 8 名, II が 44 名, III が 8 名であった。心不全の原因は 18 名が虚血性心疾患, 42 名が非虚血性心疾患であった。内服薬に関して、心不全群において ACE-I または ARB は 97% で、 β 遮断薬は 92% で、アルドステロン拮抗薬は 62% で、利尿薬は 63% で使用されていた。

心エコー図検査では心不全群は対照群と比べて有意に大きい LVEDD および有意に低い LVEF を示した。CPX では peak VO_2 および AT は心不全群で有意に低かった。血液検査では心不全群で BNP 値が有意に高く、Hb と eGFR は有意に低かった。骨格筋指標では、除脂肪量、10 m 歩行速度、下肢筋力はいずれも心不全群で有意に低値であった。

表 3.2. 心不全群と対照群の患者背景

	対照群 (n=29)	心不全群 (n=60)	p 値
臨床所見と併存症:			
年齢, yrs	61 $\pm$ 16	63 $\pm$ 13	0.632
男性, n (%)	19 (66)	35 (58)	0.514
BMI, kg/m ²	24.9 $\pm$ 3.2	23.3 $\pm$ 3.7	0.049
高血圧, n (%)	13 (45)	18 (30)	0.169
糖尿病, n (%)	7 (24)	15 (25)	0.930
脂質異常症, n (%)	16 (55)	38 (63)	0.460
NYHA: I / II / III		8 / 44 / 8	
内服薬, n (%):			
ACE-I または ARB	8 (28)	58 (97)	<0.001
アルドステロン拮抗薬	3 (10)	37 (62)	<0.001
β 遮断薬	4 (14)	55 (92)	<0.001
利尿薬	1 (3)	39 (65)	<0.001
スタチン	14 (48)	38 (63)	0.177
心不全の原因, n (%):			
虚血性心疾患	—	18 (30)	
非虚血性心疾患	—	42 (70)	

血液検査結果:			
Hb, g/dL	14.3 ± 1.4	13.3 ± 1.4	0.001
Plt, × 10 ⁴ /μL	215 ± 51	196 ± 51	0.097
eGFR, mL/min/1.73m ²	76.2 ± 18.0	52.3 ± 18.9	<0.001
HbA1c, %	6.0 ± 0.7	6.0 ± 0.7	0.936
Log BNP, pg/mL	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	<0.001
血清 BDNF, ng/mL	28.6 ± 7.0	24.9 ± 6.8	0.021
心エコー図検査:			
LVEDD, mm	47.5 ± 3.2	60.5 ± 11.2	<0.001
LVEDS, mm	30.1 ± 2.2	49.9 ± 14.6	<0.001
LVEF, %	65.3 ± 4.7	38.1 ± 14.2	<0.001
心肺運動負荷試験:			
Peak VO ₂ , mL/kg/min	24.8 ± 6.6	16.8 ± 4.3	<0.001
AT, mL/kg/min	13.9 ± 2.8	10.2 ± 2.2	<0.001
最大呼吸交換比	1.23 ± 0.08	1.20 ± 0.09	0.267
骨格筋指標:			
除脂肪量, kg	49.3 ± 9.8	41.7 ± 7.5	0.004
10 m 歩行試験, sec	5.4 ± 1.1	6.1 ± 1.4	0.023
下肢筋力, Nm	101.8 ± 29.9	84.5 ± 22.9	0.004

数値は平均値±標準偏差または人数(%)で示す

3.3.2. 心不全群および対照群の血清 BDNF 値

血清 BDNF 値は心不全群で対照群と比較して有意に低値であった (24.9±0.9 vs. 28.6±1.3 ng/mL, p=0.021) (図 3.2). 心不全群の 60 名のうち, BDNF 値は性別 (p=0.939) や糖尿病の有無 (p=0.882) を始めとした各臨床指標の有無における有意差を示さなかった.

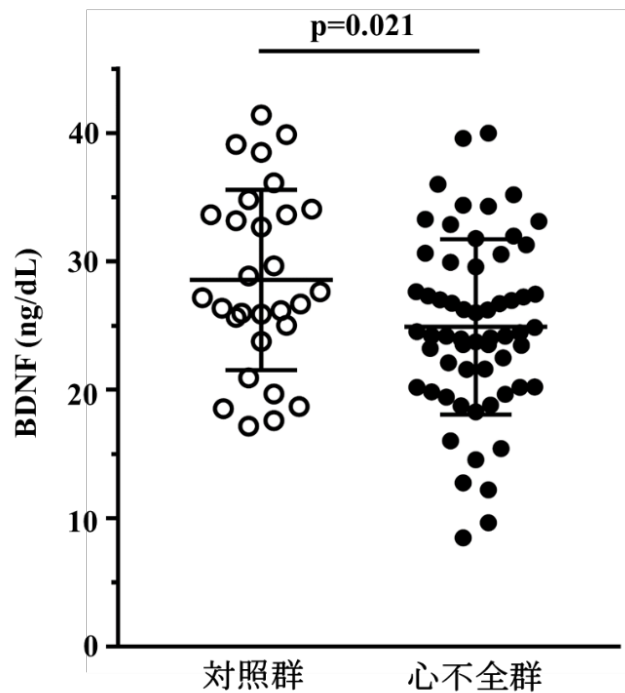


図 3.2. 対照群および心不全群での血清 BDNF 値の比較

3.3.3. 心不全群における血清 BDNF 値と各評価項目との関連

心不全群での単回帰分析において、血清 BDNF 値は peak VO_2 ($r=0.372$, $p=0.007$), AT ($r=0.372$, $p=0.006$), Hb ($r=0.412$, $p=0.001$), eGFR ($r=0.305$, $p=0.018$), 10 m 歩行試験 ($r=-0.368$, $p=0.005$), および下肢筋力 ($r=0.342$, $p=0.009$) と有意な相関を示した。一方で年齢, BMI, 除脂肪量, LVEDD, LVEF, HbA1c, BNP とは相関を示さなかった (表 3.3, 図 3.3, 3.4)。

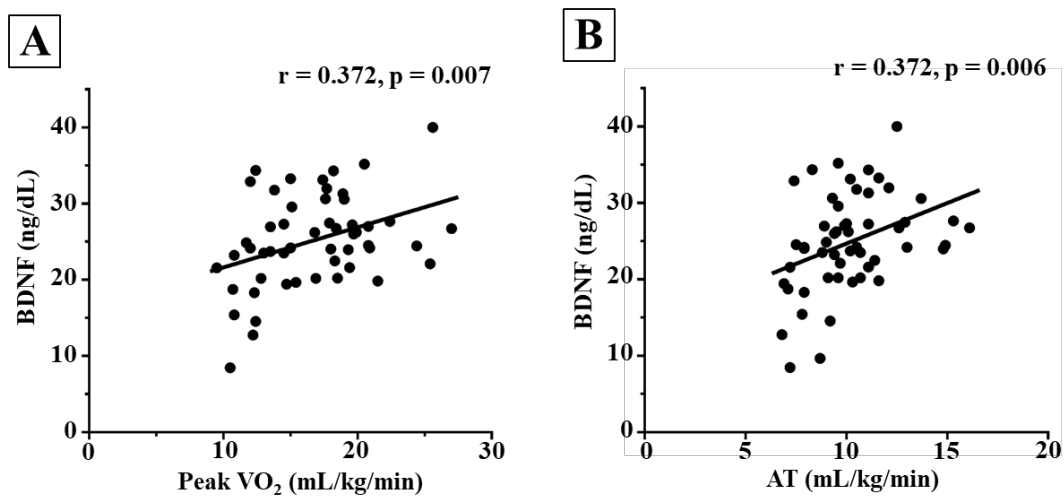


図 3.3. 心不全群における血清 BDNF 値と peak VO_2 (A) および AT (B) との相関

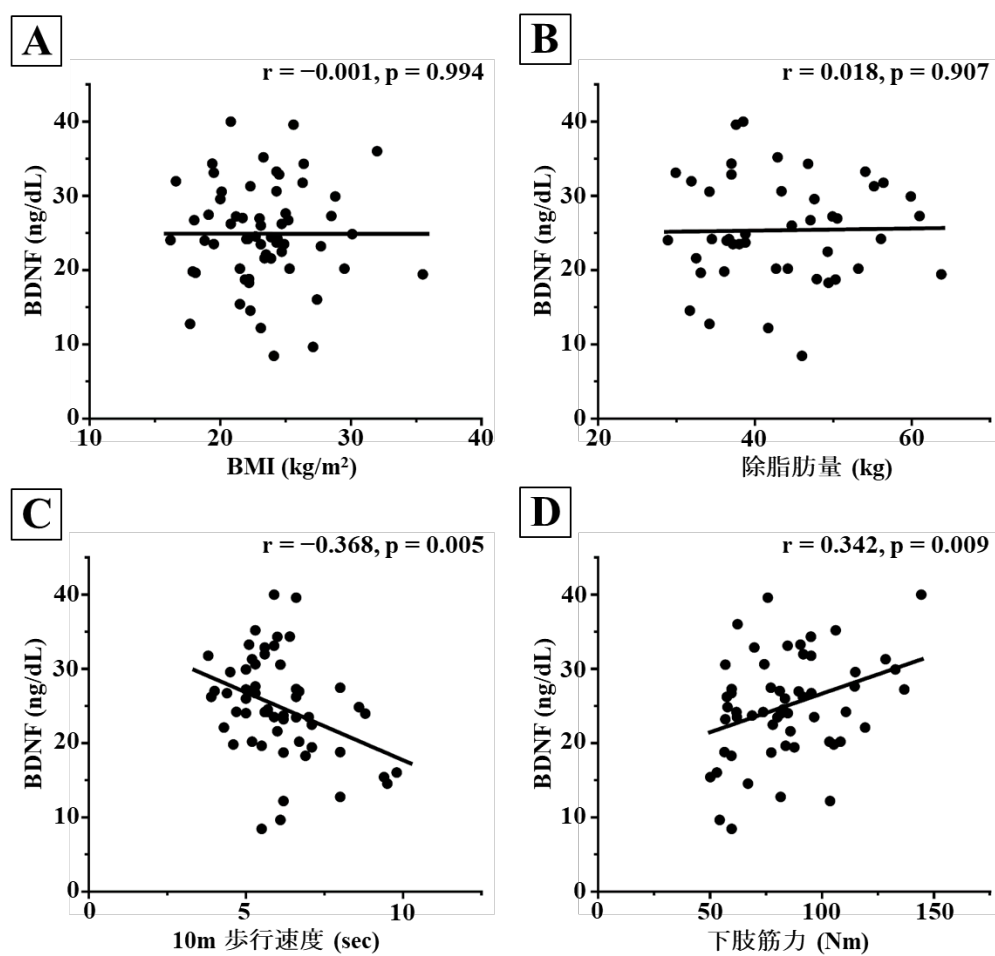


図 3.4. 心不全群における血清 BDNF 値と BMI (A), 除脂肪量 (B), 10 m 歩行試験 (C), および下肢筋力 (D) との相関

表 3.3. 心不全群における血清 BDNF 値の単回帰分析

変数	相関係数	p 値
年齢, yrs	0.018	0.891
BMI, kg/m ²	-0.001	0.994
LVEDD, mm	-0.103	0.434
LVEF, %	0.174	0.185
Peak VO ₂ , mL/kg/min	0.321	0.019
AT, mL/kg/min	0.372	0.006
Hb, g/dL	0.412	0.001
eGFR, mL/min/1.73m ²	0.305	0.018
Log BNP, pg/mL	-0.176	0.186
HbA1c, %	-0.143	0.278
除脂肪量, kg	0.018	0.907
10 m 歩行試験, sec	-0.368	0.005
下肢筋力, Nm	0.342	0.009

多変量解析では、下肢筋力が血清 BDNF 値の独立した規定因子と示された (β -coefficient=2.80, 95%CI: 1.89–11.8, $p=0.008$) (表 3.4).

表 3.4. 心不全群における血清 BDNF 値の多変量解析

変数	回帰係数	95%信頼区間	p 値
年齢, yrs	3.67	-1.72 – 9.07	0.175
男性 (0)	-1.16	-4.97 – 2.65	0.541
LVEF, %	-1.89	-2.66 – 6.43	0.406
Log BNP, pg/mL	-0.31	-4.89 – 4.27	0.892
除脂肪量, kg	1.44	-5.68 – 8.56	0.684
下肢筋力, Nm	6.85	1.89 – 11.8	0.008

男性と女性はそれぞれ 0 と 1 で示した

3.4. 考察

本研究の主要な結果は、心不全患者において血清 BDNF 値が対照群と比べて低下しており、運動耐容能と相関を示したこと、また心不全患者において血清 BDNF 値は下肢筋力や 10 m 歩行試験といった筋機能の指標と有意な相関を示したが、BMI や除脂肪量といった筋肉量の指標とは相関を示さなかったことである。

骨格筋、特に遅筋より分泌されるマイオカインである BDNF は心不全における骨格筋の量的および質的障害を反映するとの仮説のうち、質的障害については支持されたが量的障害については明らかな関連は示されなかった。

骨格筋量は BMI や BIA などで評価する方法は他にも存在するが、骨格筋の質や機能は日常診療で簡便に測定することが困難である。本研究の結果から血液検査で心不全患者における骨格筋の質的障害を評価できる可能性が示唆されたことは、運動療法を必要とする心不全患者の診断や運動療法の効果の評価において有用である可能性がある。

3.4.1. 心不全患者と対照群での血清 BDNF 値および運動耐容能との関連

本研究では心不全患者において、血清 BDNF 値は peak VO₂ や AT といった運動耐容能の指標と相関を示した。これは我々や他の研究グループのこれまで報告 (Fukushima et al., 2013; Fukushima et al., 2015; Kadowaki et al., 2016; Shibata et al., 2018) とも合致する結果である。一方で、本研究での心不全患者の BDNF 値は過去の報告のものと比べて高値であった。この違いは、本研究に参加した心不全患者の重症度が関係している可能性がある。本研究では心不全患者の平均血清 BDNF 値が 24.9 ng/mL であったが、87%の患者が NYHA I/II 度、13%が NYHA III 度であり、CPX での平均 peak VO₂ が 16.8 mL/kg/min であった。我々が以前報告した研究 (Fukushima et al., 2013) では心不全患者の平均血清 BDNF 値は 16.6 ng/mL であったが、76%が NYHA I/II 度、24%が NYHA III 度であり、平均 peak VO₂ が 14.0 mL/kg/min とより重症度が高く運動耐容能の低い患者群であった。さらに、Kadowaki らの報告 (Kadowaki et al., 2016) では心不全患者の平均血清 BDNF 値 14.7 ng/mL であったが、53%の患者が NYHA II 度、47%が NYHA III/IV 度で非代償性心不全患者も含まれていた (Kadowaki et al., 2016)。すなわち、より重症度の高い患者群においてより低い BDNF 値が示されており、BDNF の低値が運動耐容能の低下や予後の低下と関連していること (Fukushima et al., 2013; Fukushima et al., 2015) と合わせると、これらの結果から血清 BDNF 値は心不全患者の重症度をよく反映する指標であると考えられる。

3.4.2. 心不全患者における血清 BDNF 値と骨格筋指標との関連

心不全患者では骨格筋が量的および質的の両面において障害されることが知られており (Fulster et al., 2013; Kinugawa et al., 2015; Mancini et al., 1989), これらの異常は心不全患者における運動耐容能低下の重要な要因であるとされている. 我々は以前心不全患者における BDNF と運動耐容能が関連していることについては報告したが, BDNF と骨格筋自体の量および質との関連については不明であった. 本研究で我々は初めて血清 BDNF 値は下肢筋力や 10 m 歩行試験といった骨格筋機能と相関を示すが, BMI や除脂肪量といった骨格筋量の指標とは相関しないことを明らかにした. Tsai らは 2 型糖尿病患者において, 運動トレーニングにより血清 BDNF 値が上昇したが, BDNF 値は BMI ではなく筋力の変化と相関したことを報告しており (Tsai et al., 2015), 本研究の結果とも合致する. したがって, これらの結果からは BDNF の上昇には骨格筋量というより骨格筋の質・機能や活動が重要であることが示唆される.

BDNF は運動により産生が増加することはよく知られており, 例えば運動により海馬の BDNF が増加し, 認知機能の改善に寄与することなどが報告されているほか (Abeer et al., 2015; Kim et al., 2015; Wrann et al., 2013), 運動は血清 BDNF 値も上昇させることが示されている (Huang et al., 2014). BDNF は運動や収縮刺激により骨格筋でも合成されることが示されている (Hurtado et al., 2017; Lee et al., 2017; Matthews et al., 2009). Matthews らは骨格筋細胞そのものが収縮刺激により BDNF を産生することを示したが (Matthews et al., 2009), 一方で彼らは骨格筋内での BDNF の上昇が血清 BDNF 値と相関しないことを報告し, 骨格筋の BDNF は少なくとも運動後の急性期においては血流に入らずに, 骨格筋内の脂肪酸酸化の亢進など局所的に作用する可能性に言及している. 血液中の BDNF の産生源についてはまだ十分明らかではなく, いくつかの可能性が考えられる. 血液中の BDNF の大部分は血小板に貯留されており, 運動による血小板からの BDNF 放出の活性化が血清 BDNF 値の上昇に関与している可能性や (Tang et al., 2008), 脳も BDNF を産生し BDNF は脳血管関門を通過することが知られており (Pan et al., 1998), 限定的なエビデンスながら運動による血液中の BDNF 増加の 70-80%が脳由来との報告もある (Rasmussen et al., 2009).

他方で, 慢性期における骨格筋由来の BDNF は骨格筋内のエネルギー代謝調整の役割のみに留まらないことも報告されている (Yu et al., 2017). 我々の今回の結果からは, 骨格筋量と比べて骨格筋活動が血清 BDNF 値とよく相関していることから, 心不全患者のような骨格筋が慢性的に障害されている環境では骨格筋で産生された BDNF が血液中の BDNF 値にも関与しており, 骨格筋活動が血清 BDNF 値の

上昇に重要である可能性が示唆される。しかしながら心不全患者における血清 BDNF の産生源については今後さらなるエビデンスの蓄積が必要である。

3.4.3. 骨格筋機能における BDNF の役割

BDNF は骨格筋内のミトコンドリア量や機能を調整することにより運動耐容能に関与することが知られているが、骨格筋機能と BDNF との間の因果関係、つまり BDNF が高値であるために骨格筋機能が良いのか、あるいは骨格筋の活動が高いことによって BDNF も高値となるのかについては明らかでない。BDNF はアデノシン一リン酸 (AMP: adenosine monophosphate) 活性化型タンパク質キナーゼ (AMPK: AMP-activated protein kinase) を活性化することで脂肪酸酸化を促進し (Matthews et al., 2009), AMPK/サイクリック AMP 応答配列結合タンパク (CREB: cAMP response element binding protein) /ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター γ 共役因子 (PGC: peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator)-1 α 経路を通して骨格筋内のミトコンドリア生合成を惹起することで細胞の呼吸能を増加させることが知られている (Wood et al., 2018)。また骨格筋細胞 C2C12 において BDNF の欠乏は AMPK と PGC-1 α 蛋白のリン酸化を低下させたと報告されているほか (Zhang et al., 2019), 我々も最近、心筋梗塞後の心不全モデルマウスの骨格筋で BDNF が低下しており、ヒト組換え BDNF の投与によって骨格筋内のミトコンドリア呼吸能や運動耐容能の低下が抑制されたことを報告した (Matsumoto et al., 2018)。

総合すると、これらの報告から BDNF は AMPK/CREB/PGC-1 α を通してミトコンドリア機能を制御し、運動耐容能に関与することが示唆される。現在、BDNF が直接骨格筋量や機能を制御しているという報告はなく、本研究の結果からは BDNF によって骨格筋機能がコントロールされているというよりは、骨格筋機能の強度が BDNF 産生を制御しているという可能性が高いと考えられる。このメカニズムの解明については今後さらなる検討が必要である。

3.4.4. 本研究の限界

本研究では何点かの考慮すべき限界がある。まず、本研究は比較的少人数の対象者による横断研究であり、BDNF と骨格筋機能との因果関係については明確な結論を出すことは困難である。そのためその機序は大部分がこれまでの報告を元にした推測に留まる。今後より多数の対象者によるさらなる検討が望まれる。

また、現段階で血液中の BDNF の産生源については明確ではない。BDNF は骨格筋の収縮や活動により産生されることは明らかであるが、骨格筋と血清 BDNF の関

連および血清中の BDNF の骨格筋に対する正確な役割については今後の解明が待たれる。

3.5. 結論

本研究で我々は初めて血清 BDNF 値が骨格筋量ではなく骨格筋機能と関連することを明らかにした。BDNF は骨格筋活動によって産生されると考えられ、骨格筋内のミトコンドリア機能を制御することを通して運動耐容能を既定することが示唆される。高齢の心不全患者は骨格筋の量的および質的な障害であるサルコペニアを多く合併している。サルコペニアの存在は心不全患者における独立した予後規定因子であり、これまで運動耐容能の低下には骨格筋の量の低下あるいは骨格筋の質の障害のどちらがより関与しているかは心不全患者の病態を考慮するうえで大きな関心であった。サルコペニアを合併した心不全患者では運動トレーニングが効果的であるが、一般的に骨格筋のトレーニングでは筋量の改善に先立って筋力が改善し (Borde et al., 2015), 骨格筋量を増やすことは容易ではない。本研究の結果からは、骨格筋機能の改善は BDNF を含むマイオカインを増加させ、運動に伴う種々の効果に寄与し、臨床において大きな意味を持つものと考えられる。またこの新しい知見は心不全由来の骨格筋障害に対する薬物治療等の新規の治療法への重要な手がかりとなり得る。

第4章 心不全患者におけるループ利尿薬と骨格筋萎縮との関連に関する研究

4.1. 緒言

ループ利尿薬は心不全患者の体液量管理のために広く用いられている。現在のガイドラインにおいてループ利尿薬は心不全患者のうっ血や体液量過剰による諸症状を改善する第一選択薬として推奨されており (Tsutsui et al., 2019), その効果は強く臨床においてなくてはならない薬物である。しかしながら, 複数の研究でループ利尿薬の使用は心不全患者の臨床転機を悪化させるとの報告がなされている (Ahmed et al., 2008; Cooper et al., 1999; DeVore et al., 2015; Hasselblad et al., 2007). 我々も心不全患者の多施設研究で, 患者の長期フォローアップにおいてループ利尿薬の使用が再入院や心血管死のリスクの増加と関連したことを報告した (Hamaguchi et al., 2012).

骨格筋の萎縮は心不全に多く合併しており, 二次性サルコペニアとして知られている。心不全患者においてサルコペニアは身体活動量の低下から生じるのみならず, 心不全自体が様々な病態生理学的機序によりサルコペニアを促進する。これらの変化は心不全患者の運動耐容能低下と関連し, 自覚症状の悪化のみならず心不全の重症度や予後の悪化にも関連する重要な因子である。したがって, 心不全患者において骨格筋萎縮を引き起こす要因を明らかにすることは心不全患者の長期的な予後を改善するために重要である。

これまでループ利尿薬の骨格筋に対する影響は大部分が不明であったが, 最近 Mandai らはループ利尿薬が骨格筋の生合成を障害することを報告した (Mandai et al., 2017). ループ利尿薬は $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter) 1 の機能を障害するが, NKCC1 は骨格筋にも強く発現しており, 骨格筋細胞の分化において重要な役割を果たし骨格筋の生成や再生に関与している。彼らはループ利尿薬による NKCC1 の障害が, *in vitro* において骨格筋細胞 C2C12 の分化を, *in vivo* においてマウスの運動による骨格筋肥大を共に障害したことを示し, ループ利尿薬の投与がサルコペニア形成の病態に関与している可能性に言及した (図 4.1).

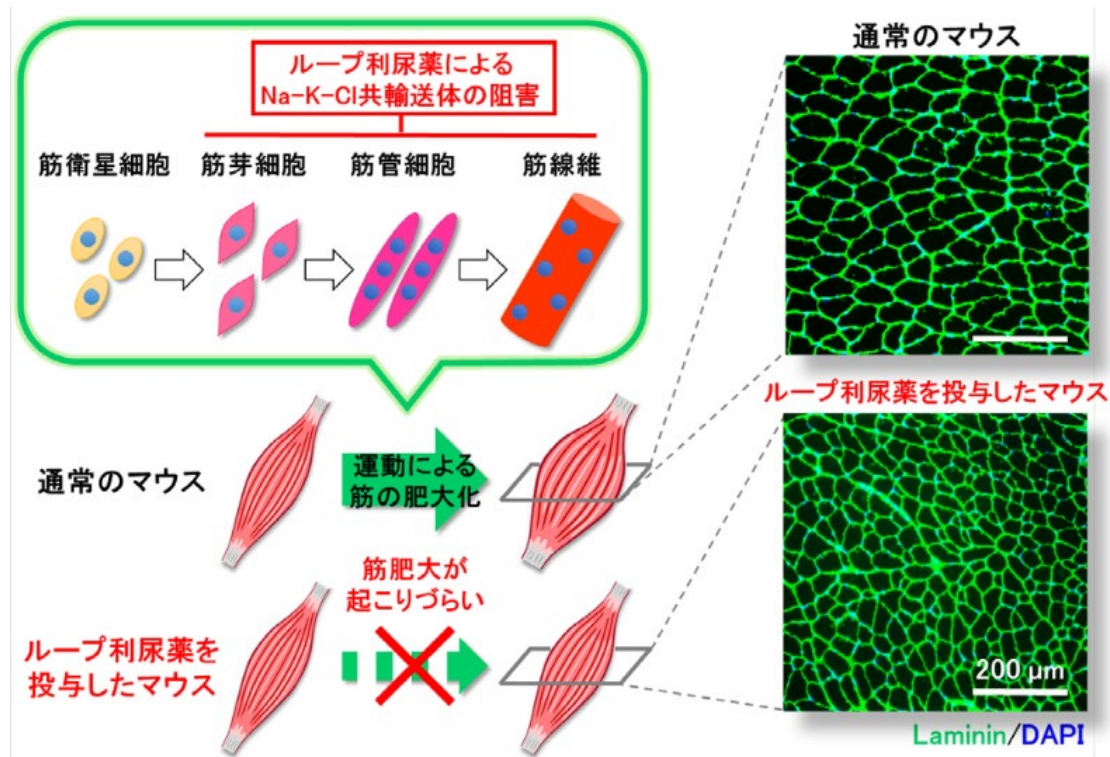


図 4.1. ループ利尿薬による骨格筋分化, 筋肥大の抑制 (東京医科歯科大学プレスリリース: <http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20170418.pdf>) より引用

また Hanai らによる臨床研究では、肝不全患者に対するループ利尿薬の使用は肝不全の重症度と独立して高用量であるほどより骨格筋量の低下が促進され、患者の予後が悪化したと報告した (Hanai et al., 2019). 同様に, Ishikawa らの研究では腎不全患者においてループ利尿薬の使用がサルコペニアのリスク増加と関連することが示された (Ishikawa et al., 2018).

これらの研究よりループ利尿薬は骨格筋障害のリスクファクターと考えられ、ループ利尿薬を使用する機会が多い心不全患者においてもその使用が骨格筋萎縮を引き起こす可能性があることは臨床診療において重要であると考えられた。現在心不全患者でループ利尿薬が骨格筋萎縮に影響を及ぼすかについては明らかでなく、我々は「心不全患者においてループ利尿薬の使用は骨格筋量萎縮と関連する」と仮説を立て、心不全患者の多施設コホート研究のデータを用いてループ利尿薬と骨格筋萎縮の関連を検討することを目的に本研究を行った。

4.2. 方法

4.2.1. 対象患者

対象は、北海道大学病院循環器内科を始めとした 10 施設に通院中の慢性心不全患者のコホート研究に参加した 155 名の心不全患者とした。心不全患者の選択基準および除外基準を以下に示す。

(1) 心不全群の選択基準

- ① 同意取得時において年齢が 20 歳以上の者
- ② フラミンガムの心不全診断基準 (McKee et al., 1971) を満たす心不全増悪による入院治療歴が過去に少なくとも 1 回以上あり、最終退院から 1 ヶ月以上が経過した NYHA 分類 I-III 度で安定している慢性心不全患者
- 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、本人の自由意思による文書同意が得られた患者

(2) 心不全群の除外基準

- ① NYHA 分類 IV 度の患者
- ② 維持透析中の患者
- ③ ネフローゼ症候群、肝不全、進行性の悪性腫瘍、コントロール不良の糖尿病 ($\text{HbA1c} > 7.0\%$) と診断され治療中の患者
- ④ 3 ヶ月以内の心不全以外の入院歴がある患者
- ⑤ 3 ヶ月以内の消化管手術歴を有する患者
- ⑥ 食欲、食事内容、体組成に影響を及ぼす薬剤 (ステロイド、抗悪性腫瘍薬、抗うつ薬) を内服中の患者
- 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

4.2.2. 研究プロトコール

本研究は慢性心不全患者において、栄養状態と臨床転帰の関連を検討することを目的としたコホート研究のデータを用いたサブ解析である。

同コホートでは全ての研究参加者に対し、血液検査、尿検査、心エコー図検査、診療録からの患者の身長、体重、BMI 等の基本情報および合併疾患、服薬状況、NYHA 分類の収集、質問票による栄養状態や抑うつ度、日常生活動作の評価を行った。また、6 分間歩行試験または心肺運動負荷試験、大腿周径の測定を施行した。

研究プロトコールは北海道大学病院 (承認番号 012-0224) および各参加施設の倫理審査委員会の承認を受け、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。

4.2.3. 評価項目

本研究では上記コホートのデータうち、患者の年齢、性別、体重と身長から計算した BMI (体重/身長², kg/m²), 併存症、内服薬、心不全の原因、NYHA 分類、経胸壁心エコー図検査結果、血液検査結果を使用した。

血液検査は静脈より採血を行い、各施設の通常検査にてアルブミン、クレアチニン、尿酸、ナトリウム、カリウム、Hb、BNP が測定された。経胸壁心エコー図検査では傍胸骨長軸像より LVEDD, LVESD が、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 LVEF が計測された。

筋萎縮の指標として大腿周径を使用した (Santos et al., 2019)。

4.2.4. 統計学的解析

統計処理は、JMP 14.0.0 software (SAS, Cary, NC, USA) を用いて行った。データは、平均値±標準偏差または平均値と四分位数で示した。2 群間の平均値の差の検定は連続変数では Welch の t 検定を、名義変数では χ^2 乗検定を行った。正規性の検定には Shapiro-Wilk 正規性検定を用いた。大腿周径と他の評価項目の相関を評価するために単回帰分析を行った。大腿周径の独立した規定因子を評価するため多変量解析を行った。p 値<0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

4.3. 結果

4.3.1. 患者背景

心不全患者の背景を表 4.1 に示す. 男性 107 名 (69%), 女性 48 名 (31%) で, 平均年齢 67 ± 13 歳であった. 心不全の原因は虚血性心疾患が 32% であり, 90% の患者が NYHA 分類 I-II 度であった. 心エコー図検査では, LVEDD 57 ± 11 mm であり, LVEF は $45 \pm 14\%$ であった.

155 名の患者のうち, 120 名 (77%) がループ利尿薬を使用しており, 残りの 35 名 (23%) は使用していなかった. ループ利尿薬を使用していた群では, 使用していない群と比べて BMI が有意に低値であった (22.9 ± 3.9 対 25.6 ± 7.2 , $p=0.038$). 尿酸値と血清 BNP 値は利尿薬を使用していた群で高値であった. ACE-I および ARB, β 遮断薬の使用は両群間で差はなかった. アルドステロン拮抗薬の使用はループ利尿薬を使用していた群で有意に多かった (68% 対 26%, $p<0.001$).

表 4.1. 患者背景

	全患者 (n=155)	ループ利尿薬 不使用 (n=35)	ループ利尿薬 使用 (n=120)	p 値
年齢, yrs	67 $\pm$ 13	67 $\pm$ 12	67 $\pm$ 13	0.900
男性, n (%)	107 (69)	23 (66)	84 (70)	0.629
体重, kg	62 $\pm$ 14	67 $\pm$ 17	60 $\pm$ 13	0.032
BMI, kg/m ²	23.5 $\pm$ 5.0	25.6 $\pm$ 7.2	22.9 $\pm$ 3.9	0.038
心不全の原因:				
虚血性心疾患, n (%)	49 (32)	12 (34)	37 (31)	0.699
高血圧性心臓病, n (%)	24 (16)	9 (26)	15 (13)	0.057
拡張型心筋症, n (%)	48 (31)	11 (31)	37 (31)	0.947
心臓弁膜症, n (%)	34 (22)	3 (9)	31 (26)	0.030
NYHA 分類:				0.121
I-II, n (%)	140 (9)	34 (97)	106 (88)	
III, n (%)	15 (10)	1 (3)	14 (12)	
併存症:				
高血圧, n (%)	84 (54)	23 (66)	61 (51)	0.120
糖尿病, n (%)	39 (25)	12 (34)	27 (23)	0.157
慢性腎臓病, n (%)	6 (4)	1 (3)	5 (4)	0.724
血液検査結果:				

アルブミン, mg/dL	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.4	0.568
クレアチニン, mg/dL	1.2 ± 0.8	1.1 ± 1.0	1.2 ± 0.8	0.601
尿酸, mg/dL	6.9 ± 2.0	6.2 ± 1.7	7.1 ± 2.0	0.013
ナトリウム, mEq/L	140.3 ± 2.7	141.1 ± 3.3	140.0 ± 2.4	0.069
カリウム, mEq/L	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.4	0.953
Hb, g/dL	13.1 ± 1.9	13.2 ± 1.5	13.0 ± 1.9	0.588
log BNP, pg/mL	2.14 ± 0.59	2.11 ± 0.43	2.15 ± 0.63	0.696
心エコー図検査:				
LVEDD, mm	57 ± 11	55 ± 8	57 ± 12	0.282
LVEDS, mm	45 ± 14	45 ± 15	42 ± 10	0.145
LVEF, %	45 ± 14	48 ± 14	43 ± 16	0.113
内服薬:				
ACE-I, n (%)	79 (51)	17 (49)	62 (52)	0.747
ARB, n (%)	40 (26)	6 (17)	34 (28)	0.183
β 遮断薬, n (%)	134 (87)	30 (86)	104 (87)	0.885
アルドステロン拮抗薬, n (%)	91 (59)	9 (26)	82 (68)	<0.001
その他の利尿薬, n (%)	10 (7)	0 (0)	10 (8)	0.077

数値は平均値±標準偏差, または人数(%)で示す

4.3.2. ループ利尿薬使用の有無における筋萎縮

ループ利尿薬を使用していた心不全患者では使用していなかった群と比べて大腿周径が有意に減少していた (39.9 ± 4.8 対 43.5 ± 6.9 cm, $p < 0.001$) (図 4.2)。

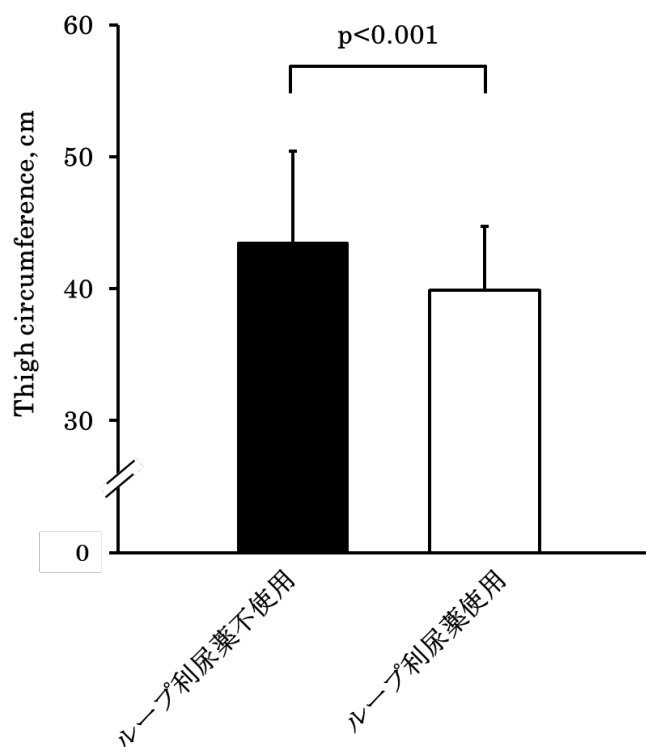


図 4.2. ループ利尿薬使用の有無での大腿周径の比較

4.3.3. 筋萎縮の規定因子

大腿周径とその他の評価項目との関連について、表 4.2 に示す。単回帰分析では、高齢 ($\text{beta} = -0.11$, 95%CI: $-0.18 - -0.044$, $p = 0.001$)、低 BMI ($\text{beta} = 0.99$, 95%CI: $0.91 - 1.08$, $p < 0.001$)、貧血 ($\text{beta} = 0.97$, 95%CI: $0.52 - 1.42$, $p < 0.001$)、ループ利尿薬の使用 ($\text{beta} = -1.77$, 95%CI: $-2.79 - -0.76$, $p = 0.001$) が大腿周径の減少と有意な関連を示した。多変量解析では、ループ利尿薬の使用は大腿周径減少の独立した規定因子である ($\text{beta} = -0.51$, 95%CI: $-0.98 - -0.046$, $p = 0.032$) と示された。

表 4.2. 大腿周径の単回帰分析および多変量解析

	単回帰分析		多変量解析	
	Beta (95%CI)	p 値	Beta (95%CI)	p 値
年齢, years	-0.11 (-0.18 - -0.044)	0.001	-0.04 (-0.076 - -0.013)	0.007
BMI, kg/m ²	0.99 (0.91 - 1.08)	<0.001	0.94 (0.86 - 1.00)	<0.001
ループ利尿薬の使用	-1.77 (-2.79 - -0.76)	0.001	-0.51 (-0.98 - -0.046)	0.032
NYHA III 度	-0.78 (-2.27 - 0.71)	0.426	0.12 (-0.55 - 0.79)	0.717
Hb, g/dL	0.97 (0.52 - 1.42)	<0.001	0.21 (-0.04 - 0.45)	0.096
男性 (1)	0.15 (-0.38 - 3.41)	0.117	0.76 (-0.17 - 1.70)	0.109

男性, 女性はそれぞれ 1 と 0 で示した

4.4. 考察

心不全患者 155 名を解析した本研究では、ループ利尿薬の使用が筋萎縮と関連を示すことが明らかとなり、多変量解析においてループ利尿薬の使用は筋萎縮の独立した規定因子であると示された。ループ利尿薬の使用は心不全患者において心不全の重症度とは独立して骨格筋萎縮の重要なリスクファクターの一つであると考えられ、我々の仮説は支持された。本研究は我々の知る限り心不全患者でのループ利尿薬と筋萎縮の関連を示した初めての報告である。心不全における体液量の管理のため最も汎用されているループ利尿薬が患者の予後を悪化させる骨格筋萎縮を引き起こす可能性を示唆しており、臨床的に重要な意味をもつと考えられる。

4.4.1. 心不全患者における骨格筋萎縮

骨格筋萎縮はサルコペニアの主な表現型であり心不全患者において多く認められ、自覚症状の悪化に関与するのみならず心不全患者の転機が悪化に直接的な影響をもたらす。Fulster らは心不全患者の研究で 19.5%の患者が骨格筋萎縮を伴っていたと報告しており (Fulster et al., 2013), これは同じ年齢の一般人口の 2-4 倍の割合である (Morley et al., 2014). 心不全そのものが様々な病態生理学的な機序によりサルコペニアの進行を促進すると報告されており、筋量の減少, 運動耐容能の低下, 心機能の低下, そして心不全入院や心臓死などの臨床転帰の悪化を引き起こす (Fulster et al., 2013; Onoue et al., 2016). そのため、心不全患者において骨格筋萎縮を引き起こす要因を明らかにすることは非常に重要である。

4.4.2. ループ利尿薬と骨格筋萎縮との関連

近年、ループ利尿薬の使用が心不全において予後の悪化と関連しているとのエビデンスが蓄積されてきている。ループ利尿薬はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS: renin-angiotensin-aldosterone system) の活性化 (Bayliss et al., 1987) や交感神経活性の亢進 (Francis et al., 1990; Zhang and Anderson, 2014) といった神経体液性機構の悪化を引き起こし (Gupta et al., 2010; von Lueder et al., 2013), 心筋の線維化や酸化ストレス, 炎症性サイトカインの賦活化を惹起し, 心不全を進行させる有害な作用を示すと報告されている (Lijnen and Petrov, 2000; Lopez et al., 2010; Oudit et al., 2007; Weber and Brilla, 1991). さらに、ループ利尿薬は糸球体濾過量を低下させ (Damman et al., 2016), 腎機能の低下は心不全患者においてよく知られた独立した予後悪化因子である (Damman et al., 2016; de Silva et al., 2006; Hamaguchi et al., 2009). したがって、これらはループ利尿薬の使用が心不全患者の予後を悪化させる原因の説明の一つとなり得る。骨格筋の観点からは、RAAS (Cabello-Verrugio et al.,

2015; Yoshida et al., 2013) や交感神経活性 (Fonseca et al., 2019), 腎機能 (Moorthi and Avin, 2017; Wang and Mitch, 2014) はいずれも骨格筋萎縮に影響することが報告されている。このため、ループ利尿薬が骨格筋に対し負の影響を及ぼすことが想定される。

さらに直接的な説明として、最近 Mandai らは *in vivo* および *in vitro* においてループ利尿薬が骨格筋における筋細胞分化や、運動による筋肥大を障害することを報告した (Mandai et al., 2017)。ループ利尿薬は NKCC の阻害薬であるが、骨格筋に強く発現している NKCC (Wong et al., 1999) の阻害によって、筋細胞の生合成に必須の制御因子である脱分極起因性 Ca^{2+} シグナル (Przybylski et al., 1994; Wong et al., 1999) の減少が引き起こされる可能性を示した。これがループ利尿薬の骨格筋萎縮に対する直接的なメカニズムの一つと考えられる。

今回の我々の結果と同様に、肝不全患者 (Hanai et al., 2019) や腎不全患者 (Ishikawa et al., 2018) を対象とした臨床研究においてもループ利尿薬の使用と骨格筋量の低下との間に独立した関連が示されている。これらの結果と本研究での我々の結果をふまえると、ループ利尿薬が骨格筋の萎縮とサルコペニアの形成に関与しているという仮説が支持される。さらに、ループ利尿薬によって運動による筋肥大が障害されたことを考慮すると (Mandai et al., 2017), ループ利尿薬が運動トレーニングにおいても悪影響を与える可能性がある。これは現在心不全患者の骨格筋障害に対する唯一の介入法が運動療法であることから、大きな不利益となり得る。今後この可能性についてのさらなる検証が望まれる。

4.4.3. 本研究の限界

本研究では何点かの考慮すべき限界がある。まず、本研究では骨格筋萎縮の指標として大腿周径を評価し、実際に DEXA や BIA で骨格筋量を測定していない。大腿周径は全身の骨格筋量をよく反映すると報告されているが (Santos et al., 2019), その正確性は DEXA はや BIA と比較して低い可能性がある。一方で、大腿周径の測定は簡易で非侵襲的な手法であり、必ずしも DEXA や BIA が一般診療で使用可能ではないこと、また放射線被曝や心不全患者に多く装着されているペースメーカー等の体内金属との干渉の点などを考慮すると利点となると考えられる。

次に、本研究ではループ利尿薬の用量についてはデータが存在せず、用量と各評価項目との関連については評価できていない。Hanai らは肝不全患者において高用量のループ利尿薬がより骨格筋量の低下を促進したと報告しているが (Hanai et al., 2019), 本研究では心不全患者におけるループ利尿薬の用量と骨格筋障害との関連については検討できない。

また、本研究は比較的少人数の対象者による横断研究であり、心不全患者におけるループ利尿薬と骨格筋萎縮や予後との関連を解明するためには今後より大きな対象者による縦断的な研究が必要である。

次に、本研究ではループ利尿薬以外の利尿薬についてのデータが不足している。特に V_2 受容体拮抗薬であるトルバプタンは心不全患者の体液量管理に効果的であり、腎機能や血行動態、RAAS に影響を及ぼさないと報告されている (Gheorghiade et al., 2007; Jujo et al., 2016)。加えて、トルバプタンは NKCC に対する作用がないことから、筋の分化にも影響しないと考えられる。ループ利尿薬を高用量で使用するよりは、トルバプタンと組み合わせて使用することで骨格筋量の低下を予防し、イベントの抑制できる可能性があるが、この可能性を解明するためにはさらなる検討を要する。

最後に、利尿薬の使用は心不全の重症度に強く依存する。即ち、より重症度の高い患者は軽症の患者より利尿薬を多く用いていると考えられ、そのような患者はより骨格筋萎縮のリスクが高いことが想定される。我々の解析ではループ利尿薬の使用は患者の心不全重症度の指標である NYHA 分類で調整後も筋萎縮の独立した規定因子であることが示された。しかし、これらの因子の間に存在する様々な相互関係を完全に除外することは困難である。

4.5. 結論

本研究で我々は初めて心不全患者において心不全の重症度と独立してループ利尿薬の使用が骨格筋萎縮と関連することを明らかにした。心不全の治療においてループ利尿薬が広く用いられていることを考慮すると、我々の本研究の結果は臨床において大きな影響を与えられと考えられる。特にサルコペニアのリスクが高い患者や、運動療法を行う患者では、ループ利尿薬の使用にあたって慎重な考慮が必要である。骨格筋の観点からは、心不全患者の治療に際し高用量のループ利尿薬を使用するより他の利尿薬との組み合わせを使用することが有益となる可能性が示唆される。

第5章 総括および結論

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. 超音波法で測定した心不全患者の骨格筋の筋厚は対照群と比べて低下しており、輝度は対照群と比べて上昇している。
2. 心不全患者の骨格筋の筋厚および筋輝度は運動耐容能と有意に相関する。
3. 骨格筋輝度は心不全患者における運動耐容能の独立した規定因子である。
4. 心不全患者の血清 BDNF は対照群と比べて低下している。
5. 心不全患者の血清 BDNF 値は骨格筋量とは相関しないが、骨格筋機能と相関する。
6. 筋力は心不全患者における血清 BDNF 値の独立した規定因子である。
7. ループ利尿薬を使用している心不全患者はそうでない患者と比べて大腿周径が減少している。
8. ループ利尿薬の使用は心不全患者において筋萎縮の独立した規定因子である。

今回の研究結果から、超音波法による筋厚や筋輝度の測定、あるいは血液検査による血清 BDNF 値の測定は心不全患者の骨格筋の障害を簡便に、効率的に評価する手法として有用であることが示された。また、心不全患者における骨格筋障害に影響を及ぼす因子について、ループ利尿薬の使用が骨格筋萎縮と関連したことが示された。これらの結果をふまえて臨床診療において心不全の骨格筋障害を診断し、適切な介入および予防を行っていくことは心不全患者におけるサルコペニアの抑制と予後を改善する有用な手段となり得ると考えられた。

今後の展望として、BDNF 以外のマイオカインと骨格筋との関連も検討し、筋量と関連するものを検索することや、骨格筋超音波の指標との組み合わせによりサルコペニアの診断に有用となるような評価法の検討を行いたいと考えている。また、本研究はいずれも横断研究であり、心不全における骨格筋障害が筋輝度あるいは BDNF、ループ利尿薬の使用とどのような因果関係にあるか、またイベントや予後との関連については明らかでない。今後も患者の追跡を継続し、縦断的な評価・解析も行っていきたい。

謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するに当たり、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 安斉俊久教授に深く感謝申し上げます。

また、博士課程での研究全般にわたり親身なご助言と多くのご指導を賜りました、北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 絹川真太郎講師、福島新客員研究員に心より感謝申し上げます。

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 尾畑嘉一先生、山梨克真先生、角谷尚哉先生、白川亮介先生、南部秀雄先生、前川聡先生、片山貴史先生、津田正哉先生、高田真吾先生、齋藤晶理先生、石森直樹特任准教授、北海道大学病院臨床研究開発センター 横田卓特任講師に感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者として御助力頂きました北海道大学病院リハビリテーション部 堀弘明主任を始めとしたリハビリテーション部の皆様に感謝申し上げます。

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委員の先生に深く感謝いたします。

本研究の実験遂行にあたり、御助力を頂きました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、また秘書室の皆様に感謝申し上げます。

本研究に参加、ご協力いただいた全ての患者の方々に心より感謝申し上げます。
最後に、多忙な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。

2020 年 3 月
仲野一平

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abeer, E.D., Doaa, M.S., and Fatma, I.D. (2015). Impact of exercise and vitamin B1 intake on hippocampal brain-derived neurotrophic factor and spatial memory performance in a rat model of stress. *J Nutr Sci Vitaminol* *61*, 1-7.
- Ahmed, A., Young, J.B., Love, T.E., Levesque, R., and Pitt, B. (2008). A propensity-matched study of the effects of chronic diuretic therapy on mortality and hospitalization in older adults with heart failure. *Int J Cardiol* *125*, 246-253.
- Akima, H., Hioki, M., Yoshiko, A., Koike, T., Sakakibara, H., Takahashi, H., and Oshida, Y. (2016). Intramuscular adipose tissue determined by T1-weighted MRI at 3T primarily reflects extramyocellular lipids. *Magn Reson Imaging* *34*, 397-403.
- Akima, H., Yoshiko, A., Tomita, A., Ando, R., Saito, A., Ogawa, M., Kondo, S., and Tanaka, N.I. (2017). Relationship between quadriceps echo intensity and functional and morphological characteristics in older men and women. *Arch Gerontol Geriatr* *70*, 105-111.
- Bayliss, J., Norell, M., Canepa-Anson, R., Sutton, G., and Poole-Wilson, P. (1987). Untreated heart failure: clinical and neuroendocrine effects of introducing diuretics. *Br Heart J* *57*, 17-22.
- Belardinelli, R., Georgiou, D., Cianci, G., and Purcaro, A. (1999). Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation* *99*, 1173-1182.
- Borde, R., Hortobagyi, T., and Granacher, U. (2015). Dose-Response Relationships of Resistance Training in Healthy Old Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med* *45*, 1693-1720.
- Bristow, M.R., Saxon, L.A., Boehmer, J., Krueger, S., Kass, D.A., De Marco, T., Carson, P., DiCarlo, L., DeMets, D., White, B.G., *et al.* (2004). Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* *350*, 2140-2150.
- Cabello-Verrugio, C., Morales, M.G., Rivera, J.C., Cabrera, D., and Simon, F. (2015). Renin-angiotensin system: an old player with novel functions in skeletal muscle. *Med Res Rev* *35*, 437-463.
- Cadore, E.L., Izquierdo, M., Conceicao, M., Radaelli, R., Pinto, R.S., Baroni, B.M., Vaz, M.A., Alberton, C.L., Pinto, S.S., Cunha, G., *et al.* (2012). Echo intensity is

associated with skeletal muscle power and cardiovascular performance in elderly men. *Exp Gerontol* 47, 473-478.

Chati, Z., Zannad, F., Robin-Lherbier, B., Escanye, J.M., Jeandel, C., Robert, J., and Aliot, E. (1994). Contribution of specific skeletal muscle metabolic abnormalities to limitation of exercise capacity in patients with chronic heart failure: a phosphorus 31 nuclear magnetic resonance study. *Am Heart J* 128, 781-792.

Chen, Z., Wang, Z., Lohman, T., Heymsfield, S.B., Outwater, E., Nicholas, J.S., Bassford, T., LaCroix, A., Sherrill, D., Punyanitya, M., *et al.* (2007). Dual-energy X-ray absorptiometry is a valid tool for assessing skeletal muscle mass in older women. *J Nutr* 137, 2775-2780.

Cicoira, M., Zanolla, L., Franceschini, L., Rossi, A., Golia, G., Zamboni, M., Tosoni, P., and Zardini, P. (2001). Skeletal muscle mass independently predicts peak oxygen consumption and ventilatory response during exercise in noncachectic patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 37, 2080-2085.

Coats, A.J., Clark, A.L., Piepoli, M., Volterrani, M., and Poole-Wilson, P.A. (1994). Symptoms and quality of life in heart failure: the muscle hypothesis. *Br Heart J* 72, S36-39.

Cooper, H.A., Dries, D.L., Davis, C.E., Shen, Y.L., and Domanski, M.J. (1999). Diuretics and risk of arrhythmic death in patients with left ventricular dysfunction. *Circulation* 100, 1311-1315.

Cruz-Jentoft, A.J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyere, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A.A., *et al.* (2019). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* 48, 16-31.

Damman, K., Kjekshus, J., Wikstrand, J., Cleland, J.G., Komajda, M., Wedel, H., Waagstein, F., and McMurray, J.J. (2016). Loop diuretics, renal function and clinical outcome in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 18, 328-336.

de Silva, R., Nikitin, N.P., Witte, K.K., Rigby, A.S., Goode, K., Bhandari, S., Clark, A.L., and Cleland, J.G. (2006). Incidence of renal dysfunction over 6 months in patients with chronic heart failure due to left ventricular systolic dysfunction: contributing factors and relationship to prognosis. *Eur Heart J* 27, 569-581.

DeVore, A.D., Hasselblad, V., Mentz, R.J., O'Connor, C.M., Armstrong, P.W., McMurray, J.J., Ezekowitz, J.A., Tang, W.H., Starling, R.C., Voors, A.A., *et al.*

(2015). Loop diuretic dose adjustments after a hospitalization for heart failure: insights from ASCEND-HF. *Eur J Heart Fail* 17, 340-346.

Dunnigan, A., Staley, N.A., Smith, S.A., Pierpont, M.E., Judd, D., Benditt, D.G., and Benson, D.W., Jr. (1987). Cardiac and skeletal muscle abnormalities in cardiomyopathy: comparison of patients with ventricular tachycardia or congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 10, 608-618.

Dupont, A.C., Sauerbrei, E.E., Fenton, P.V., Shragge, P.C., Loeb, G.E., and Richmond, F.J. (2001). Real-time sonography to estimate muscle thickness: comparison with MRI and CT. *J Clin Ultrasound* 29, 230-236.

Esposito, F., Reese, V., Shabetai, R., Wagner, P.D., and Richardson, R.S. (2011). Isolated quadriceps training increases maximal exercise capacity in chronic heart failure: the role of skeletal muscle convective and diffusive oxygen transport. *J Am Coll Cardiol* 58, 1353-1362.

Ferris, L.T., Williams, J.S., and Shen, C.L. (2007). The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Med Sci Sports Exerc* 39, 728-734.

Fonseca, G., Santos, M.R.D., Souza, F.R., Costa, M., Haehling, S.V., Takayama, L., Pereira, R.M.R., Negrao, C.E., Anker, S.D., and Alves, M. (2019). Sympatho-Vagal Imbalance is Associated with Sarcopenia in Male Patients with Heart Failure. *Arq Bras Cardiol* 112, 739-746.

Francis, G.S., Benedict, C., Johnstone, D.E., Kirlin, P.C., Nicklas, J., Liang, C.S., Kubo, S.H., Rudin-Toretsky, E., and Yusuf, S. (1990). Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 82, 1724-1729.

Fukumoto, Y., Ikezoe, T., Yamada, Y., Tsukagoshi, R., Nakamura, M., Mori, N., Kimura, M., and Ichihashi, N. (2012). Skeletal muscle quality assessed from echo intensity is associated with muscle strength of middle-aged and elderly persons. *Eur J Appl Physiol* 112, 1519-1525.

Fukunaga, T., Miyatani, M., Tachi, M., Kouzaki, M., Kawakami, Y., and Kanehisa, H. (2001). Muscle volume is a major determinant of joint torque in humans. *Acta Physiol Scand* 172, 249-255.

Fukushima, A., Kinugawa, S., Homma, T., Masaki, Y., Furihata, T., Yokota, T., Matsushima, S., Abe, T., Suga, T., Takada, S., *et al.* (2013). Decreased serum

brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 168, e142-144.

Fukushima, A., Kinugawa, S., Homma, T., Masaki, Y., Furihata, T., Yokota, T., Matsushima, S., Takada, S., Kadoguchi, T., Oba, K., *et al.* (2015). Serum brain-derived neurotrophic factor level predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. *J Card Fail* 21, 300-306.

Fulster, S., Tacke, M., Sandek, A., Ebner, N., Tschöpe, C., Doehner, W., Anker, S.D., and von Haehling, S. (2013). Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *Eur Heart J* 34, 512-519.

Gheorghiade, M., Konstam, M.A., Burnett, J.C., Jr., Grinfeld, L., Maggioni, A.P., Swedberg, K., Udelson, J.E., Zannad, F., Cook, T., Ouyang, J., *et al.* (2007). Short-term clinical effects of tolvaptan, an oral vasopressin antagonist, in patients hospitalized for heart failure: the EVEREST Clinical Status Trials. *JAMA* 297, 1332-1343.

Gupta, S., Waywell, C., Gandhi, N., Clayton, N., Keevil, B., Clark, A.L., Ng, L.L., Brooks, N., and Neyses, L. (2010). The effects of adding torasemide to standard therapy on peak oxygen consumption, natriuretic peptides, and quality of life in patients with compensated left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Heart Fail* 12, 746-752.

Hamaguchi, S., Kinugawa, S., Tsuchihashi-Makaya, M., Goto, D., Yamada, S., Yokoshiki, H., Takeshita, A., and Tsutsui, H. (2012). Loop diuretic use at discharge is associated with adverse outcomes in hospitalized patients with heart failure: a report from the Japanese cardiac registry of heart failure in cardiology (JCARE-CARD). *Circ J* 76, 1920-1927.

Hamaguchi, S., Tsuchihashi-Makaya, M., Kinugawa, S., Yokota, T., Ide, T., Takeshita, A., and Tsutsui, H. (2009). Chronic kidney disease as an independent risk for long-term adverse outcomes in patients hospitalized with heart failure in Japan. Report from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Circ J* 73, 1442-1447.

Hanai, T., Shiraki, M., Miwa, T., Watanabe, S., Imai, K., Suetsugu, A., Takai, K., Moriwaki, H., and Shimizu, M. (2019). Effect of loop diuretics on skeletal muscle depletion in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 49, 82-95.

Harrington, D., Anker, S.D., Chua, T.P., Webb-Peploe, K.M., Ponikowski, P.P.,

Poole-Wilson, P.A., and Coats, A.J. (1997). Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* *30*, 1758-1764.

Hasselblad, V., Gattis Stough, W., Shah, M.R., Lokhnygina, Y., O'Connor, C.M., Califf, R.M., and Adams, K.F., Jr. (2007). Relation between dose of loop diuretics and outcomes in a heart failure population: results of the ESCAPE trial. *Eur J Heart Fail* *9*, 1064-1069.

Haykowsky, M.J., Kouba, E.J., Brubaker, P.H., Nicklas, B.J., Eggebeen, J., and Kitzman, D.W. (2014). Skeletal muscle composition and its relation to exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Am J Cardiol* *113*, 1211-1216.

Heckmatt, J.Z., Leeman, S., and Dubowitz, V. (1982). Ultrasound imaging in the diagnosis of muscle disease. *J Pediatr* *101*, 656-660.

Heinonen, I., Bucci, M., Kemppainen, J., Knuuti, J., Nuutila, P., Boushel, R., and Kalliokoski, K.K. (2012). Regulation of subcutaneous adipose tissue blood flow during exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985) *112*, 1059-1063.

Hirabayashi, K., Kinugawa, S., Yokota, T., Takada, S., Fukushima, A., Suga, T., Takahashi, M., Ono, T., Morita, N., Omokawa, M., *et al.* (2014). Intramyocellular lipid is increased in the skeletal muscle of patients with dilated cardiomyopathy with lowered exercise capacity. *Int J Cardiol* *176*, 1110-1112.

Huang, T., Larsen, K.T., Ried-Larsen, M., Moller, N.C., and Andersen, L.B. (2014). The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: A review. *Scand J Med Sci Sports* *24*, 1-10.

Hurtado, E., Cilleros, V., Nadal, L., Simo, A., Obis, T., Garcia, N., Santafe, M.M., Tomas, M., Halievski, K., Jordan, C.L., *et al.* (2017). Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKCalpha and cPKCbeta. *Front Mol Neurosci* *10*, 147.

Ishikawa, S., Naito, S., Iimori, S., Takahashi, D., Zeniya, M., Sato, H., Nomura, N., Sohara, E., Okado, T., Uchida, S., *et al.* (2018). Loop diuretics are associated with greater risk of sarcopenia in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease. *PLoS One* *13*, e0192990.

Jujo, K., Saito, K., Ishida, I., Furuki, Y., Kim, A., Suzuki, Y., Sekiguchi, H., Yamaguchi, J., Ogawa, H., and Hagiwara, N. (2016). Randomized pilot trial comparing tolvaptan with furosemide on renal and neurohumoral effects in acute

heart failure. *ESC Heart Fail* *3*, 177-188.

Kadowaki, S., Shishido, T., Honda, Y., Narumi, T., Otaki, Y., Kinoshita, D., Nishiyama, S., Takahashi, H., Arimoto, T., Miyamoto, T., *et al.* (2016). Additive clinical value of serum brain-derived neurotrophic factor for prediction of chronic heart failure outcome. *Heart Vessels* *31*, 535-544.

Kakutani, N., Fukushima, A., Yokota, T., Katayama, T., Nambu, H., Shirakawa, R., Maekawa, S., Abe, T., Takada, S., Furihata, T., *et al.* (2018). Impact of High Respiratory Exchange Ratio During Submaximal Exercise on Adverse Clinical Outcome in Heart Failure. *Circ J* *82*, 2753-2760.

Kim, Y.M., Ji, E.S., Kim, S.H., Kim, T.W., Ko, I.G., Jin, J.J., Kim, C.J., Kim, T.W., and Kim, D.H. (2015). Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing hippocampal cell proliferation in quinolinic acid-induced Huntington's disease rats. *J Exerc Rehabil* *11*, 5-11.

Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Okita, K., and Tsutsui, H. (2015). Skeletal Muscle Abnormalities in Heart Failure. *Int Heart J* *56*, 475-484.

Kitzman, D.W., Brubaker, P., Morgan, T., Haykowsky, M., Hundley, G., Kraus, W.E., Eggebeen, J., and Nicklas, B.J. (2016). Effect of Caloric Restriction or Aerobic Exercise Training on Peak Oxygen Consumption and Quality of Life in Obese Older Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* *315*, 36-46.

Korhonen, M.T., Mero, A.A., Alen, M., Sipila, S., Hakkinen, K., Liikavainio, T., Viitasalo, J.T., Haverinen, M.T., and Suominen, H. (2009). Biomechanical and skeletal muscle determinants of maximum running speed with aging. *Med Sci Sports Exerc* *41*, 844-856.

Laske, C., Stransky, E., Leyhe, T., Eschweiler, G.W., Wittorf, A., Richartz, E., Bartels, M., Buchkremer, G., and Schott, K. (2006). Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* *113*, 1217-1224.

Lee, H.W., Ahmad, M., Wang, H.W., and Leenen, F.H. (2017). Effects of exercise training on brain-derived neurotrophic factor in skeletal muscle and heart of rats post myocardial infarction. *Exp Physiol* *102*, 314-328.

Lewin, G.R., and Barde, Y.A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* *19*, 289-317.

Lijnen, P., and Petrov, V. (2000). Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J*

Mol Cell Cardiol 32, 865-879.

Lopez, B., Gonzalez, A., and Diez, J. (2010). Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation* 121, 1645-1654.

Lukaski, H.C., Johnson, P.E., Bolonchuk, W.W., and Lykken, G.I. (1985). Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am J Clin Nutr* 41, 810-817.

Mancini, D.M., Coyle, E., Coggan, A., Beltz, J., Ferraro, N., Montain, S., and Wilson, J.R. (1989). Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation* 80, 1338-1346.

Mancini, D.M., Eisen, H., Kussmaul, W., Mull, R., Edmunds, L.H., Jr., and Wilson, J.R. (1991). Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 83, 778-786.

Mandai, S., Furukawa, S., Kodaka, M., Hata, Y., Mori, T., Nomura, N., Ando, F., Mori, Y., Takahashi, D., Yoshizaki, Y., *et al.* (2017). Loop diuretics affect skeletal myoblast differentiation and exercise-induced muscle hypertrophy. *Sci Rep* 7, 46369.

Matsumoto, J., Takada, S., Kinugawa, S., Furihata, T., Nambu, H., Kakutani, N., Tsuda, M., Fukushima, A., Yokota, T., Tanaka, S., *et al.* (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice With Heart Failure. *Circulation* 138, 2064-2066.

Matthews, V.B., Astrom, M.B., Chan, M.H., Bruce, C.R., Krabbe, K.S., Prelovsek, O., Akerstrom, T., Yfanti, C., Broholm, C., Mortensen, O.H., *et al.* (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52, 1409-1418.

Mattson, M.P., Maudsley, S., and Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27, 589-594.

Maughan, R.J., Watson, J.S., and Weir, J. (1983). Strength and cross-sectional area of human skeletal muscle. *J Physiol* 338, 37-49.

Miron Mombiola, R., Facal de Castro, F., Moreno, P., and Borrás, C. (2017). Ultrasonic Echo Intensity as a New Noninvasive In Vivo Biomarker of Frailty. *J*

Am Geriatr Soc 65, 2685-2690.

Miyagi, M., Kinugasa, Y., Sota, T., Yamada, K., Ishisugi, T., Hirai, M., Yanagihara, K., Haruki, N., Matsubara, K., Kato, M., *et al.* (2018). Diaphragm Muscle Dysfunction in Patients With Heart Failure. J Card Fail 24, 209-216.

Moorthi, R.N., and Avin, K.G. (2017). Clinical relevance of sarcopenia in chronic kidney disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 26, 219-228.

Morley, J.E., Anker, S.D., and von Haehling, S. (2014). Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology-update 2014. J Cachexia Sarcopenia Muscle 5, 253-259.

Mousavi, K., Parry, D.J., and Jasmin, B.J. (2004). BDNF rescues myosin heavy chain IIB muscle fibers after neonatal nerve injury. Am J Physiol Cell Physiol 287, C22-29.

Nijholt, W., Scafoglieri, A., Jager-Wittenaar, H., Hobbelen, J.S.M., and van der Schans, C.P. (2017). The reliability and validity of ultrasound to quantify muscles in older adults: a systematic review. J Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 702-712.

Okita, K., Yonezawa, K., Nishijima, H., Hanada, A., Ohtsubo, M., Kohya, T., Murakami, T., and Kitabatake, A. (1998). Skeletal muscle metabolism limits exercise capacity in patients with chronic heart failure. Circulation 98, 1886-1891.

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.

Onoue, Y., Izumiya, Y., Hanatani, S., Tanaka, T., Yamamura, S., Kimura, Y., Araki, S., Sakamoto, K., Tsujita, K., Yamamoto, E., *et al.* (2016). A simple sarcopenia screening test predicts future adverse events in patients with heart failure. Int J Cardiol 215, 301-306.

Oudit, G.Y., Kassiri, Z., Patel, M.P., Chappell, M., Butany, J., Backx, P.H., Tsushima, R.G., Scholey, J.W., Khokha, R., and Penninger, J.M. (2007). Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. Cardiovasc Res 75, 29-39.

Pan, W., Banks, W.A., Fasold, M.B., Bluth, J., and Kastin, A.J. (1998). Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. Neuropharmacology 37, 1553-1561.

Pedersen, B.K., and Febbraio, M.A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. Nat Rev Endocrinol 8, 457-465.

- Piepoli, M.F., Davos, C., Francis, D.P., and Coats, A.J. (2004). Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* *328*, 189.
- Pillen, S., Tak, R.O., Zwarts, M.J., Lammens, M.M., Verrijp, K.N., Arts, I.M., van der Laak, J.A., Hoogerbrugge, P.M., van Engelen, B.G., and Verrips, A. (2009). Skeletal muscle ultrasound: correlation between fibrous tissue and echo intensity. *Ultrasound Med Biol* *35*, 443-446.
- Pillen, S., van Keimpema, M., Nievelstein, R.A., Verrips, A., van Kruijsbergen-Raijmann, W., and Zwarts, M.J. (2006). Skeletal muscle ultrasonography: Visual versus quantitative evaluation. *Ultrasound Med Biol* *32*, 1315-1321.
- Przybylski, R.J., Szigeti, V., Davidheiser, S., and Kirby, A.C. (1994). Calcium regulation of skeletal myogenesis. II. Extracellular and cell surface effects. *Cell Calcium* *15*, 132-142.
- Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M.V., Leick, L., Hart, E., Secher, N.H., Pedersen, B.K., and Pilegaard, H. (2009). Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol* *94*, 1062-1069.
- Rech, A., Radaelli, R., Goltz, F.R., da Rosa, L.H., Schneider, C.D., and Pinto, R.S. (2014). Echo intensity is negatively associated with functional capacity in older women. *Age (Dordr)* *36*, 9708.
- Reimers, K., Reimers, C.D., Wagner, S., Paetzke, I., and Pongratz, D.E. (1993). Skeletal muscle sonography: a correlative study of echogenicity and morphology. *J Ultrasound Med* *12*, 73-77.
- Roger, V.L. (2013). Epidemiology of heart failure. *Circ Res* *113*, 646-659.
- Rutherford, O.M., and Jones, D.A. (1992). Measurement of fibre pennation using ultrasound in the human quadriceps in vivo. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* *65*, 433-437.
- Santos, L.P., Gonzalez, M.C., Orlandi, S.P., Bielemann, R.M., Barbosa-Silva, T.G., and Heymsfield, S.B. (2019). New prediction equations to estimate appendicular skeletal muscle mass using calf circumference: Results from NHANES 1999-2006. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, Advance online publication. doi: 10.1002/jpen.1605.
- Shibata, A., Hanatani, A., Izumi, Y., Kitada, R., Iwata, S., and Yoshiyama, M. (2018). Serum brain-derived neurotrophic factor level and exercise tolerance

complement each other in predicting the prognosis of patients with heart failure. *Heart Vessels* *33*, 1325-1333.

Shimokawa, H., Miura, M., Nochioka, K., and Sakata, Y. (2015). Heart failure as a general pandemic in Asia. *Eur J Heart Fail* *17*, 884-892.

Smith, A.C., Jakubowski, K., Wasielewski, M., Lee, S.S., and Elliott, J.M. (2017). Lower extremity muscle structure in incomplete spinal cord injury: a comparison between ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Spinal Cord Ser Cases* *3*, 17004.

Takada, S., Masaki, Y., Kinugawa, S., Matsumoto, J., Furihata, T., Mizushima, W., Kadoguchi, T., Fukushima, A., Homma, T., Takahashi, M., *et al.* (2016). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. *Cardiovasc Res* *111*, 338-347.

Takashio, S., Sugiyama, S., Yamamuro, M., Takahama, H., Hayashi, T., Sugano, Y., Izumiya, Y., Hokimoto, S., Minamino, N., Yasuda, S., *et al.* (2015). Significance of low plasma levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with heart failure. *Am J Cardiol* *116*, 243-249.

Tang, S.W., Chu, E., Hui, T., Helmeste, D., and Law, C. (2008). Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. *Neurosci Lett* *431*, 62-65.

Tsai, S.W., Chan, Y.C., Liang, F., Hsu, C.Y., and Lee, I.T. (2015). Brain-derived neurotrophic factor correlated with muscle strength in subjects undergoing stationary bicycle exercise training. *J Diabetes Complications* *29*, 367-371.

Tsuda, M., Fukushima, A., Matsumoto, J., Takada, S., Kakutani, N., Nambu, H., Yamanashi, K., Furihata, T., Yokota, T., Okita, K., *et al.* (2018). Protein acetylation in skeletal muscle mitochondria is involved in impaired fatty acid oxidation and exercise intolerance in heart failure. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* *9*, 844-859.

Tsutsui, H., Isobe, M., Ito, H., Ito, H., Okumura, K., Ono, M., Kitakaze, M., Kinugawa, K., Kihara, Y., Goto, Y., *et al.* (2019). JCS 2017/JHFS 2017 Guideline on Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure- Digest Version. *Circ J* *83*, 2084-2184.

Tucker, W.J., Haykowsky, M.J., Seo, Y., Stehling, E., and Forman, D.E. (2018). Impaired exercise tolerance in heart failure: Role of skeletal muscle morphology

and function. *Curr Heart Fail Rep* 15, 323-331.

Upadhyia, B., Haykowsky, M.J., Eggebeen, J., and Kitzman, D.W. (2015). Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: more than a heart problem. *J Geriatr Cardiol* 12, 294-304.

van der Zwaard, S., de Ruiter, C.J., Noordhof, D.A., Sterrenburg, R., Bloemers, F.W., de Koning, J.J., Jaspers, R.T., and van der Laarse, W.J. (2016). Maximal oxygen uptake is proportional to muscle fiber oxidative capacity, from chronic heart failure patients to professional cyclists. *J Appl Physiol* (1985) 121, 636-645.

von Lueder, T.G., Atar, D., and Krum, H. (2013). Diuretic use in heart failure and outcomes. *Clin Pharmacol Ther* 94, 490-498.

Wang, X.H., and Mitch, W.E. (2014). Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 10, 504-516.

Watanabe, Y., Yamada, Y., Fukumoto, Y., Ishihara, T., Yokoyama, K., Yoshida, T., Miyake, M., Yamagata, E., and Kimura, M. (2013). Echo intensity obtained from ultrasonography images reflecting muscle strength in elderly men. *Clin Interv Aging* 8, 993-998.

Weber, K.T., and Brilla, C.G. (1991). Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83, 1849-1865.

Wilhelm, E.N., Rech, A., Minozzo, F., Radaelli, R., Botton, C.E., and Pinto, R.S. (2014). Relationship between quadriceps femoris echo intensity, muscle power, and functional capacity of older men. *Age (Dordr)* 36, 9625.

Wong, J.A., Fu, L., Schneider, E.G., and Thomason, D.B. (1999). Molecular and functional evidence for Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 277, R154-161.

Wood, J., Tse, M.C.L., Yang, X., Brobst, D., Liu, Z., Pang, B.P.S., Chan, W.S., Zaw, A.M., Chow, B.K.C., Ye, K., *et al.* (2018). BDNF mimetic alleviates body weight gain in obese mice by enhancing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Metabolism* 87, 113-122.

Wrann, C.D., White, J.P., Salogiannnis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., Lin, J.D., Greenberg, M.E., and Spiegelman, B.M. (2013). Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway. *Cell Metab* 18, 649-659.

Yasuda, T., Nakajima, T., Sawaguchi, T., Nozawa, N., Arakawa, T., Takahashi, R.,

- Mizushima, Y., Katayanagi, S., Matsumoto, K., Toyoda, S., *et al.* (2017). Short Physical Performance Battery for cardiovascular disease inpatients: implications for critical factors and sarcopenia. *Sci Rep* *7*, 17425.
- Ye, X., Wang, M., and Xiao, H. (2017). Echo intensity of the rectus femoris in stable COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* *12*, 3007-3015.
- Yin, J., Lu, X., Qian, Z., Xu, W., and Zhou, X. (2019). New insights into the pathogenesis and treatment of sarcopenia in chronic heart failure. *Theranostics* *9*, 4019-4029.
- Yoshida, T., Tabony, A.M., Galvez, S., Mitch, W.E., Higashi, Y., Sukhanov, S., and Delafontaine, P. (2013). Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int J Biochem Cell Biol* *45*, 2322-2332.
- Young, H.J., Jenkins, N.T., Zhao, Q., and McCully, K.K. (2015). Measurement of intramuscular fat by muscle echo intensity. *Muscle Nerve* *52*, 963-971.
- Yu, T., Chang, Y., Gao, X.L., Li, H., and Zhao, P. (2017). Dynamic Expression and the Role of BDNF in Exercise-induced Skeletal Muscle Regeneration. *Int J Sports Med* *38*, 959-966.
- Zhang, D.Y., and Anderson, A.S. (2014). The sympathetic nervous system and heart failure. *Cardiol Clin* *32*, 33-45.
- Zhang, Z., Wang, B., and Fei, A. (2019). BDNF contributes to the skeletal muscle anti-atrophic effect of exercise training through AMPK-PGC1alpha signaling in heart failure mice. *Arch Med Sci* *15*, 214-222.