

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	慢性心不全におけるCD4+T細胞の活性化
Author(s)	福永, 崇
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11073
Right	

学位論文

Doctor's Thesis

慢性心不全における CD4⁺ T 細胞の活性化

(A role of CD4⁺ T-cell activation in patients with chronic heart failure)

福永 崇

Takashi Fukunaga

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

指導教員

小川久雄教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

2008年3月

学位論文

Doctor's Thesis

論文題名 : 慢性心不全における CD4⁺ T 細胞の活性化
(A role of CD4⁺ T-cell activation in patients with chronic heart failure)

著者名 : 福永 崇

Takashi Fukunaga

指導教員名 : 小川 久雄 教授

審査委員名 :

生体機能薬理学 光山 勝慶 教授

分子遺伝学 尾池 雄一 教授

心臓血管外科学 川筋 道雄 教授

腎臓内科学 富田 公夫 教授

2008 年 3 月

目次

1. 要旨	1
2. 発表論文	5
3. 謝辞	6
4. 略語一覧	7
5. 研究の背景と目的	
5-1-1 慢性心不全	8
5-1-2 虚血性心筋症	9
5-1-3 特発性拡張型心筋症	10
5-2 心筋リモデリング	11
5-3-1 ナトリウム利尿ペプチドファミリーについて	12
5-3-2 ANP、BNP の分泌と心不全の病態生理	14
5-4 ヘルパーT 細胞	16
5-5 心不全と酸化ストレス	17
5-6 心不全とバイオマーカー	19
5-7 本研究の目的	21
6. 研究方法	
6-1 対象	22
6-2 冠危険因子の評価	22
6-3 Interferon (IFN)- γ 陽性 CD4 陽性(CD4 ⁺)T 細胞の測定	23
6-4 その他の検討項目の測定	24
6-5 統計学的解析	24
7. 研究結果	
7-1 患者背景	25
7-2 New York Heart Association 分類と末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4 ⁺ T 細胞および IL-4 陽性 CD4 ⁺ T 細胞の頻度の解析結果	28
7-3 IC 群および IDC 群の各 New York Heart Association 分類における末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4 ⁺ T 細胞の頻度の比較	32
7-4 IC 群および IDC 群の各 New York Heart Association 分類における血漿 brain natriuretic peptide 値の比較	33

7-5	IC 群および IDC 群の各 New York Heart Association 分類における tumor necrosis factor- α 濃度の比較	34
7-6	IC 群および IDC 群の各 New York Heart Association 分類における high-sensitivity C-reactive protein 濃度の比較	35
8.	考察	37
9.	結語	41
10.	文献	42-48

1. 要旨

【目的】慢性心不全 (Chronic Heart Failure : CHF) 患者の心筋内には白血球の浸潤が認められ、特に虚血性心筋症の心筋においてその数の増加は著明であると報告されており、さらに末梢血中の CD4 陽性(CD4⁺) T細胞の割合が左室の収縮不全や左室駆出分画の低下と関連があると報告されている。その他に近年、炎症性サイトカインのひとつである tumor necrosis factor (TNF:腫瘍壊死因子)- α は、心筋の損傷、とりわけ心不全に極めて重要な役割を果たしているとされている。この TNF- α の分泌・産生には CD4⁺ T細胞からの interferon(IFN)- γ が重要な役割を果たしているとされており、また TNF レセプターも IFN- γ で増加すると報告されている。しかしながら、CHF 患者における CD4⁺ T細胞の役割を検討した報告は少ない。そのため本研究では、CHF 患者における重症度 (New York Heart Association : NYHA 分類)と末梢血中の CD4⁺ T細胞の IFN- γ および interleukin (IL)-4 産生について検討した。また以前の報告において虚血性心筋症 (ischemic cardiomyopathy : IC) あるいは特発性拡張型心筋症 (idiopathic dilated cardiomyopathy : IDC)の病態の違いで末梢血の CD4⁺ T細胞の数に違いがあると報告されている。そのため本研究では心不全の誘因として、IC あるいは IDC と診断された患者での NYHA 分類と CD4⁺ T細胞の活性化の関係に違いが認められるかを検証した。

【方法】 研究対象は CHF 患者 47 名 (IC 患者 27 名、IDC 患者 20 名)および対照群としての胸痛症候群 (Chest Pain Syndrome : CPS) 患者 20 名の合計 67 名である。CHF 患者は入院時に NYHA 分類がなされ、すべての患者は入院時に採血が施行された。採血後すぐにサンプルは phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)とイオノマイシンを含む培養液で 4 時間活性化培養した。その後フローサイトメトリー法を用いて、末梢血中の CD4⁺ T細胞の IFN- γ 産生能および IL-4 産生能について検討した。また心不全の重症度の指標

とされる脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide : BNP) との関連を検証した。

｜結果｜ CHF 患者において IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は、CPS 患者に比し有意に増加していた。一方 IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は 3 群間に有意差は認めなかった。CHF 患者において IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度と血漿 BNP 値は NYHA 分類による重症度の増悪とともに増加していた。また IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は IDC 患者に比し、IC 患者において有意に高値であり、IC 群および IDC 群ともに NYHA 分類の重症度の増悪とともに増加していた。さらにいずれの重症度においても、IDC 患者に比し IC 患者において IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は有意に高値であった。

｜考察｜ CHF の発症メカニズムについてはさまざまな要因が現在報告されている。その中で我々の検討では、CHF の進展・増悪に炎症反応とくに IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞が関与していることを明らかにした。CHF 患者においては TNF- α の産生が関与しているという報告があり、本研究においても CHF 患者において高値であった。TNF- α の産生には IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の活性化が重要であり、本研究において IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の活性化、それに伴う TNF- α の産生により心不全の進展・増悪が起こると考えられた。また虚血性心臓病患者においては、心不全重症度の指標の一つとされる BNP 値とともに、IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の活性化を測定することが、治療効果判定などに有用である可能性が示唆された。

｜結論｜ 心不全の重症度分類 (NYHA 分類) と IFN- γ 産生能を有する T 細胞とは密接な関係がある。末梢血中の IFN- γ 産生能を有する T 細胞の頻度は心不全が重症度を増すほどその頻度は増加するが、心不全の原因となる病態によりその増加の程度も異なる。

Summary

Objective: The percentage of CD4⁺ T-cell in blood is known to be correlated with left ventricular dysfunction and reduced ejection fraction in heart disease. The aim of this study was to determine the relation between activation of CD4⁺ T-cell and New York Heart Association (NYHA) functional classes in chronic heart failure (HF), as well as differences in inflammatory activation between ischemic cardiomyopathy (IC) and idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC).

Methods and Results: Blood samples were obtained from 47 patients with HF and 20 controls. The percentages of interferon- γ -positive CD4⁺ T-cell [representative type 1 T helper cells] and interleukin-4-positive CD4⁺ T-cell [representative type 2 T helper cells] were analyzed using three-color flow cytometry. The proportion of interferon- γ -positive CD4⁺ T-cell was higher in patients with HF (28.96 \pm 12.90 %) than in controls (18.12 \pm 5.28, $P=0.0006$), but there was no difference in the percentage of interleukin-4-positive CD4⁺ T-cell between the two groups. Both the proportion of interferon- γ -positive CD4⁺ T-cell and plasma B-type natriuretic peptide (BNP) levels increased with worsening of the NYHA functional class in both IC and IDC groups. The proportion of interferon- γ -positive CD4⁺ T-cell in the IC group (33.88 \pm 13.33 %) was higher than in the IDC group (22.33 \pm 8.88, $P=0.002$); however, plasma BNP levels were higher in the IDC group

(358.0(327.5-1325.7) pg/ml) than in the IC group (82.7(34.7-252.9), $P=0.019$).

Conclusion: we demonstrated pronounced type 1 T helper cell activation in patients with HF in proportion with the severity of HF and that the specificity of T-cell activation differs between patients with IC and IDC.

2. 発表論文

①関連論文

2 編 2 冊

- 1 Fukunaga, T., Soejima, H., Irie, A., Sugamura, K., Oe, Y., Tanaka, T., Nagayoshi, Y., Kaikita, K., Sugiyama, S., Yoshimura, M., Nishimura, Y., Ogawa, H. Relation Between CD4⁺ T-Cell Activation and Severity of Chronic Heart Failure Secondary to Ischemic or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 100: 483-488, 2007.
- 2 Fukunaga, T., Soejima, H., Irie, A., Sugamura, K., Oe, Y., Tanaka, T., Kojima, S., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Nishimura, Y., Ogawa, H. Expression of interferon- γ and interleukin-4 production in CD4⁺ T cells in patients with chronic heart failure. *Heart and Vessels.* 22: 178-183, 2007.

②その他の論文

3 編 3 冊

- 1 Soejima, H., Irie, A., Fukunaga, T., Oe, Y., Kojima, S., Kaikita, K., Kawano, H., Sugiyama, S., Yoshimura, M., Kishikawa, H., Nishimura, Y., Ogawa, H. Osteopontin Expression of Circulating T Cells and Plasma Osteopontin Levels are Increased in Relation to Severity of Heart Failure. *Circ J.* 71: 1879-1884, 2007.
- 2 Soejima, H., Irie, A., Fukunaga, T., Sugamura, K., Kojima, S., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Kishikawa, H., Nishimura, Y., Ogawa, H. Elevated Plasma Osteopontin Levels Were Associated With Osteopontin Expression of CD4⁺ T Cells in Patients With Unstable Angina. *Circ J.* 70: 851-856, 2006.
- 3 Fukunaga, T., Soejima, H., Sugamura, K., Kojima, S., Sugiyama, S., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Tanoue, T., Kageshita, T., Ono, T., Ogawa, H. Acute Myocardial Infarction Induced by Cisplatin-Based Combination Chemotherapy for Malignant Melanoma: A Case Report. *J Cardiol.* 47: 191-195, 2006.

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御支援下さいました熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学分野 小川久雄教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究において直接御指導を頂きました熊本大学保健センター 副島弘文准教授、熊本大学大学院医学教育部博士課程生命医科学専攻免疫識別学分野 入江厚講師、西村泰治教授をはじめ多くの先生方に深く感謝申し上げます。

4. 略語一覽

HMG-CoA:	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
LDL- C:	low-density lipoprotein cholesterol
HDL- C:	high-density lipoprotein cholesterol
hsCRP:	high-sensitivity C-reactive protein
NYHA:	New York Heart Association
TNF:	tumor necrosis factor
CHF:	chronic heart failure
IFN:	interferon
IC:	ischemic cardiomyopathy
IDC:	idiopathic dilated cardiomyopathy
ANP:	atrial natriuretic peptide
BNP:	brain natriuretic peptide
CNP:	C-type natriuretic peptide
CPS:	chest pain syndrome
PMA:	phorbol(-12-)myristate(-13)-acetate
LVEF:	left ventricular ejection fraction
LVDd:	left ventricular end-diastolic dimension
MCP-1:	monocyte chemoattractant protein-1
MMP:	matrix metalloproteinase
BMI:	body mass index
NO:	nitric oxide
AT1:	angiotensin II type1 receptor
mRNA:	messenger ribonucleic acid
RAAS:	renin-angiotensin-aldosterone system
Th1:	type 1 T helper
Th2:	type 2 T helper
IL:	interleukin
NF- κ B:	nuclear factor- κ B
PBS:	phosphate-buffered saline
NADPH:	reduce nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ELISA:	enzyme linked immunosorbent assay
Ig:	immunoglobulin
ROS:	reactive oxygen species
CRP:	C-reactive protein
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
PE:	Phycoerythrin
PCI:	percutaneous coronary intervention
ROC	receiver operating characteristic
IRMA	immunoradiometric assay
ANOVA	analysis of variance

5. 研究の背景と目的

5-1-1 慢性心不全

心筋細胞は刻々と変化する圧負荷・容量負荷といった物理的ストレスに対し、その収縮力を変化させ、適応している。また心筋細胞は神経細胞と並んで終末分化細胞であり、細胞障害によって細胞死が生じると他の細胞のように増殖によって臓器機能を回復できず、ただちに機能不全に陥る。

心不全とは心臓のポンプ機能が不全に陥ったために、①体組織が必要とするだけの動脈血を送り出し得ない(収縮不全)か、②静脈血を十分に受け取ることができない(拡張不全)か、③あるいは両方の機能不全が出現したために生ずる臨床症候群を意味している (1)。高血圧、虚血性心疾患、弁膜症、拡張型心筋症、心筋炎、先天性心疾患などのあらゆる心臓疾患に起因し、壁運動低下や身体活動能力の低下、それに致死的不整脈がみられ、その一部が突然死する致死的な心・血管病の最終臨床像である。低心拍出量、静脈うっ血のため易疲労感、呼吸困難、下腿浮腫、尿量の低下、動悸、肝腫大などの出現により生活の質的低下が生じ、日常生活が障害される。有病率は高齢者ほど高く、75歳以上では10%にも達する。さらに心不全死亡率は循環器系疾患総死亡率が変化していないにもかかわらず、増加している。その予後は依然として悪く5年生存率は50%程度である。心不全状態では、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (Renin-Angiotensin-Aldosterone System; RAAS) の亢進、交感神経系、エンドセリンなどの心筋毒性作用を有すると考えられる神経体液因子が心不全の悪化に関与している。一方、これらの因子に拮抗し、心筋保護に作用するナトリウム利尿ペプチド系、アドレノメジュリンも亢進していることが報告されている。従って心不全は様々な神経体液因子が複雑に絡み合った一つの症候群と考えられるようになってきている (図1)。

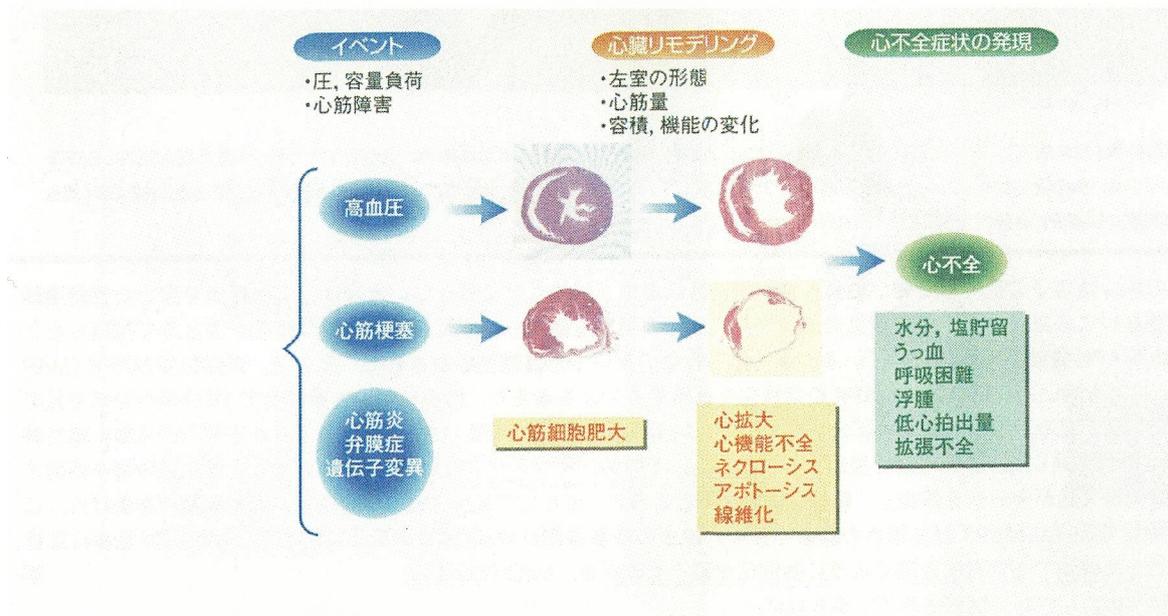


図1 心不全発症の進展の仮説 細胞工学 大津 欣也, 2007.

5-1-2 虚血性心筋症

虚血性心臓病は、慢性心不全の重要な原因の一つである。急性心筋梗塞発症後はできる限り早期に再灌流療法を行い、心筋障害の程度を最小限にすること、残存虚血があれば至適な薬物療法を行うとともに可能であれば冠動脈血行再建を考慮すること、心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制することなどが重要である。また長期にわたる高度な虚血では心筋壊死には至らないものの冬眠心筋(hibernating myocardium)へと進展し、収縮力が低下するため積極的な血行再建術が必要となることがある。さらに、虚血性心臓病を有する患者において二次予防、特に心筋梗塞の発症を予防することが重要である。

急性心筋梗塞では心筋壊死により左室収縮能が低下することから、心筋梗塞発症早期に再灌流療法を行うことで梗塞サイズを縮小し、心機能を保つことが心不全予防に最も重要である。再灌流療法での梗塞サイズ縮小効果は発症からの時間に大きく依存し、発症から 120 分以内に再灌流を行うと、危険域の心筋を比較的多く救済できる可能性がある(2)。しかし、発症から 4-6 時間もたつとプレコンディショニングや梗塞部位への残存血流

が無ければ、救済できる心筋量は少なく心機能改善効果は十分には期待できない。

急性心筋梗塞発症後の慢性心不全への進展には、このほかに繰り返す虚血、hibernating myocardium への進展、リモデリング、慢性の神経内分泌刺激などが関与すると考えられる。心筋梗塞による心筋壊死と瘢痕形成により左室機能が低下し、心不全を代償するために交感神経系および RAAS といった神経体液因子の活性化が起こる。しかし、左室収縮・拡張能の低下、神経体液因子の活性化による左室拡張末期容積および圧の上昇は、梗塞部位の拡張と非梗塞部位の肥大化を生じることで左室リモデリングをきたし、心不全が起こる原因となる。この状況で神経体液因子がさらに活性化すると心不全が増悪すると考えられる。

5-1-3 特発性拡張型心筋症

本症は左室または両心室の拡張と収縮不全を特徴とする。基本病態は、左室または左右両室の拡張と収縮機能障害であり、拡張機能障害を認めることもある。多くの場合、進行性であり、不整脈による突然死、血栓塞栓症を合併することがしばしば認められる。7-30%に家族内発症が見られる (3)。特発性拡張型心筋症の発症原因の一つとしてはウイルス感染が指摘されており、家族内発症は感染症との関連が示唆されている病態である (4,5)。拡張型心筋症の発症率は年間 10 万人の人口に対し 5-8 症例と報告されている。男女比は 3:1 である。一方、5 年および 10 年の生存率はそれぞれ 54%、36%と不良である。拡張型心筋症は、原因不明の心筋疾患であるが、分子生物学的研究が進歩した現在においても、未だに原因がはっきりと解明されていない。本症は、通常心不全症の認められない状態; New York Heart Association (NYHA) クラス I で一定の期間を経過すると考えられる。Left ventricular end-diastolic dimension (LVDd) の拡大と left ventricular ejection fraction (LVEF) の低下が無症状のまま進行する。しかしこれらはどちらが先に進

行するかは不明である。LVEF が低下していても LVDd が拡大しているため、1 回拍出量が保たれている例が多い。そのためかなり病態が進行しているにもかかわらず、ほとんど心不全症状が認められない症例も少なくない。これらの症例では、検診で心拡大、左室肥大、心室性不整脈などの異常を指摘され、精密検査で診断される症例が多い。また、徐々に進行する息切れ後に慢性心不全が急性増悪して、入院する症例も少なくない。これらの症例では LVDd の著明な拡大と、LVEF の高度の低下が観察される。血漿 brain natriuretic peptide (BNP) 値は著明に上昇し、特発性拡張型心筋症心不全発症の急性期には収縮能のみならず、左室の拡張能も高度に低下している症例が多い。

5-2 心筋リモデリング

心臓に圧負荷・容量負荷や心筋障害などの物理的負荷がかかると心筋細胞はそれを感知し、増大する壁応力が低下するため、タンパク質合成が亢進し肥大する。この過程にはタンパク質合成の量的変化のみではなく質的变化を伴い、成人型から胎児型アイソフォームへの形質転換が生じる。しかしながら、そのストレスが過大である場合、あるいは長期にわたった場合、その適応は破綻し心臓は拡大し心筋収縮力は低下する。心臓の拡大はさらに壁応力を増加させ悪循環に陥る。心機能障害が進行すると低心拍出量やうっ血による心不全症状が明らかとなる。この心室の形態、容積、機能の変化は心筋リモデリングと呼ばれ、心不全発症・進展・増悪の本態であると考えられている。

心筋リモデリングにおいては壁応力の増大によってもたらされるアンジオテンシン II、エンドセリン、ノルエピネフリンなどの神経体液因子や tumor necrosis factor (TNF) などのサイトカインの活性化が引き金になるとともに進展因子となっていると考えられている。

これらの因子が細胞膜上の受容体と結合し、細胞内カルシウムや活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) といったセカンドメッセンジャー濃度の上昇を引き起こし、タンパク

質リン酸化酵素などの細胞内情報伝達系を活性化する。そこには細胞保護的に働くものと細胞障害的に働くものが同時に活性化され、そのバランスにより細胞の運命が決定される。細胞内伝達系の変化は心筋細胞肥大さらには細胞骨格異常、細胞死を惹起し最終的には心不全に陥る。細胞死後の細胞脱落により線維芽細胞が増殖し、心収縮力の低下を生じる。また代謝の変化も生じ、メタボリックリモデリングと呼ばれている。さらにカルシウムシグナリングタンパク質の発現変化、活性変化により心収縮力が障害される。タンパク質発現の変化にはさまざまな転写因子が介在している。このように多様な変化がリモデリングには関わっている（図2）。

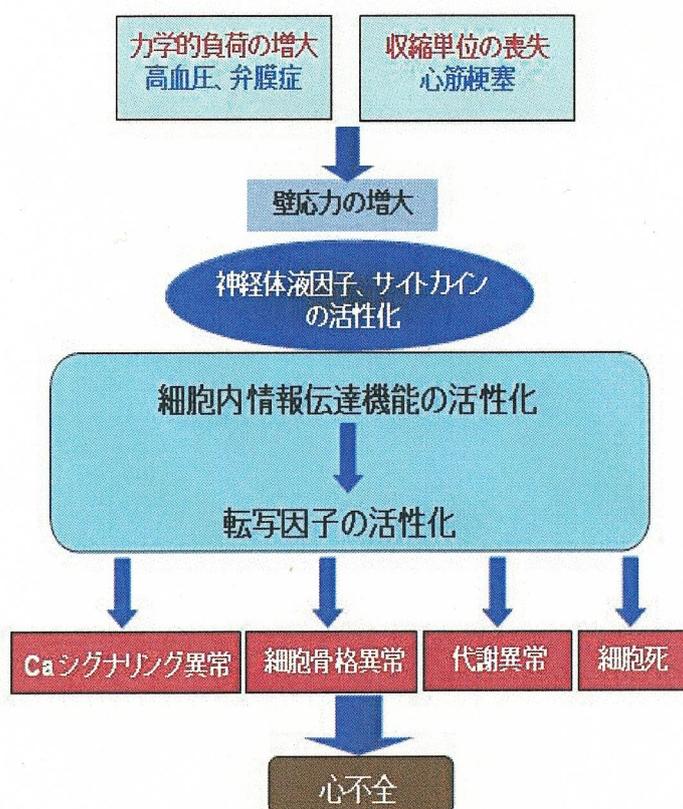


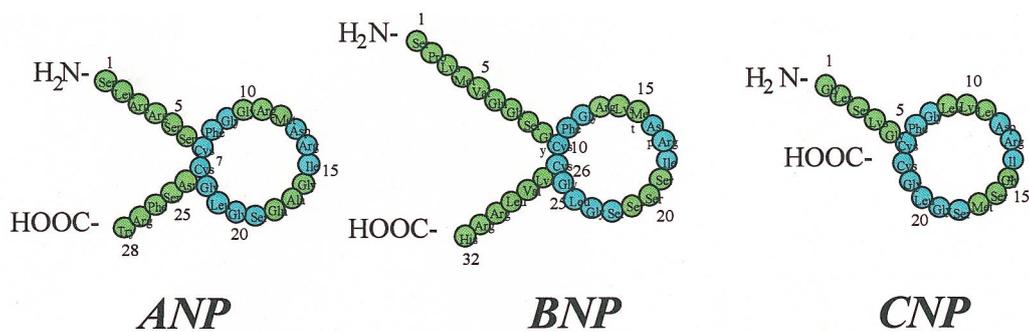
図2 心筋リモデリングの分子構造

5-3-1 ナトリウム利尿ペプチドファミリーについて

不全心の心筋細胞において、心臓由来のナトリウム利尿ペプチドの発現、アクチンやミ

オシンのアイソフォームの変化、サイトカイン(TNF- α 、エンドセリンなど)の増加、デスミンなどの中間フィラメントの増加など、多彩な分子生物学的変化が報告されている(6-9)。

我が国の松尾らは3種類のナトリウム利尿ペプチドを発見した。1983年にヒトおよびラット心房から単離同定されたA型(atrial natriuretic peptide : ANP)(10)、1988年にブタ脳から単離されたB型(BNP)(11)、さらに1990年に同じくブタ脳より発見されたC型(C-type natriuretic peptide : CNP)(12)である。ANPとBNPは主に心筋細胞で生合成・分泌される心臓ホルモンであるのに対し、CNPは中枢神経系および全身の血管内皮細胞やマクロファージで産生され、血管局所因子としての意義が注目されている(13)。これらANP、BNP、CNPのペプチド構造は類似しており、なかでも1つの鎖内ジスルフィド結合で形成される環状構造はこのファミリーの特徴であり、極めて良く保存されている(図3)。神経体液因子のなかではBNPは、強力なナトリウム利尿作用、血管拡張作用、RAASと交感神経系の抑制など幅広い生理作用を持った心臓ホルモンである。BNPは正常心において、主に心室で生合成・分泌されているが、不全心になると心室からの生合成・分泌は著しく増加する。心室にて合成されたBNPはconstitutive pathwayにより常に血中に放出されている。すなわち、遺伝子の転写の増減がそのままBNPの分泌量に反映される。負荷が生じると、心室筋の伸展によりBNPのmessenger ribonucleic acid (mRNA)の発現量は増加し、蛋白合成も増える。末梢血レベルでのBNP濃度は心不全の重症度を示す確立した客観的な指標である。臨床的には、入院、外来診療問わず日常診療において多用されている。現在、左室収縮能低下患者のスクリーニング、心不全の診断および重症度の評価、心不全治療効果判定などに血漿BNP濃度測定の有用性が報告されている(14,15)。



Na利尿ペプチドの主な作用

- (1) ナトリウム利尿作用
- (2) 血管拡張作用
- (3) RAASと交感神経系の抑制
- (4) 心肥大の抑制

図3 ナトリウム利尿ペプチドファミリー

5-3-2 ANP、BNP の分泌と心不全の病態生理

ANP、BNP は、強力なナトリウム利尿作用、血管拡張作用、RAAS と交感神経系の抑制などの幅広い生理作用を持った心臓ホルモンである (16-19)。ANP は主に心房にて合成され、顆粒として蓄えられており、心房負荷がかかると心房筋が伸展され、顆粒中のANPは直ちに血中に放出される。このため心不全症例において血漿 ANP 濃度の増加がみられる (20,21)。このような分泌様式は、regulated pathway と呼ばれている。また、心房負荷が続けば ANP の合成はすすみ、さらに血中濃度は増加する。BNP は ANP と異なり、心房での顆粒としての貯留は少なく、合成されたものは constitutive pathway により常に血中に放出されており、しかもこの分泌は主に心室にて起こる。負荷が生じると、心室筋の伸展により BNP の mRNA の発現量は増加して蛋白合成も増える。心室負荷が生じると、BNP と同様に ANP もまた心室から分泌される (22,23)。よって、心不全の重症例では ANP、BNP の分泌源としての心室の役割は大きい。

末梢血レベルで血漿 ANP、BNP 濃度は心不全の重症度とともに増加し、各種血行動態の指標と相関するが、BNP の増加の程度は ANP を上回る(図 4)(24-26)。

心不全の重症度と血漿ANP、BNP濃度

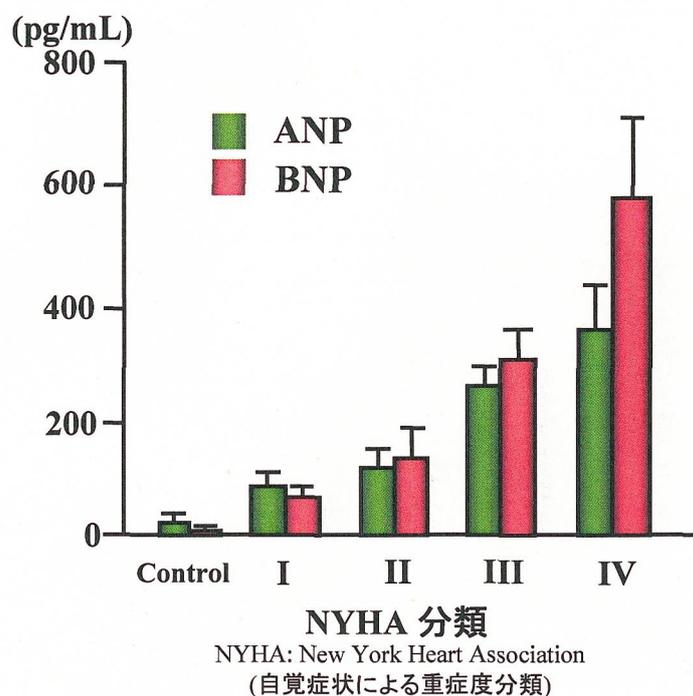


図4 心不全の重症度と血漿ANP、BNPの関係 Mukoyama, et al. *J Clin Invest.* 1991

心不全例において BNP 濃度が健常例の数十倍に増加することはよく見られるが、ときに重症例では数百倍から千倍以上に増加することもある。このように心不全における血中 BNP 濃度の変動は、他のホルモンと比較しても類を見ないほど顕著である。BNP は心不全の重症度にかかわらず、その分泌源は主に心室が主体である (26,27)。

心不全においては RAAS、交感神経系、バゾプレッシン、エンドセリンが賦活化されて、水・ナトリウム貯留、血管収縮の方向に働き、血圧を維持しようとしている (28-35)。しかしながら、これらの代償機構は慢性心不全では過剰に働き、かえって心臓の前負荷・後負荷を増大させ、心機能を低下させることになる。これに対抗して、種々の counter-regulation が働くが、その中でナトリウム利尿ペプチド系の役割は極めて重要であ

る。ナトリウム利尿ペプチドは、不全心筋から大量に合成・分泌され、強力なナトリウム利尿作用と血管拡張作用があり、さらに RAAS、交感神経系、バゾプレッシン、エンドセリン等を抑制する作用も持ち、種々の血管収縮因子に対して拮抗的に働く (25)。このようなナトリウム利尿ペプチドの作用によって心臓の前負荷、後負荷の軽減をもたらす。全身循環系のみならず心臓局所においても RAAS とナトリウム利尿ペプチド系のバランスは、心不全の病態に大きく関与する。

5-4 ヘルパーT細胞

ヘルパーT細胞はそのサイトカイン産生パターンから type 1 T helper (Th1)細胞と type 2 T helper(Th2)細胞の2つのサブセットに分類され、この2つのサブセット間のバランスを保つことにより獲得免疫反応は平衡に保たれていると考えられている。これまで多くの研究から自己免疫性疾患やアレルギー、様々な感染性疾患は、このバランスが崩れることに起因することが明らかにされている。これら2つのサブセットは、ナイーブT細胞が特定のサイトカイン環境のもと抗原刺激を受けることにより分化が制御されており、Th1細胞への分化は interleukin (IL)-12, interferon (IFN)- γ により、Th2細胞への分化は IL-4 によりそれぞれ規定されている。これらのサイトカインは特定の転写因子を誘導して、IFN- γ や IL-4 それぞれの遺伝子座にエピジェネティクスを起こすことにより、サブセット特異的発現を制御している (36)。

Th1細胞は IL-2、IFN- γ を産生することにより、細胞障害性T細胞を活性化して、細胞障害性活性を誘導し、マクロファージを活性化して遅延性過敏性反応を促進することによって、おもにウイルス感染などの細胞内感染防御に働く。一方Th2細胞は IL-4・IL-5・IL-6・IL-9・IL-10・IL-13 を産生し、B細胞における immunoglobulin (Ig)G1 および IgE 抗体のクラススイッチを制御することにより、原虫、真菌、寄生虫、マイコプラズマ、肺炎球菌、

大腸菌など主に細胞外で増殖する微生物に対する感染防御において抗体産生反応を介した反応を制御している (37)。Th1 細胞とTh2 細胞の産生するサイトカインは互いに干渉し合い、Th1/Th2 バランスを形成している (図 5)。例えば、Th1 細胞の産生する IFN- γ は Th2 細胞による IL-4 の作用を抑制し、逆に Th2 細胞の産生する IL-4 は Th1 細胞からの IFN- γ の産生を阻害している。したがって一度、免疫バランスが一方に傾きかけると、その偏向はどんどん増幅され、Th1/Th2 バランスの不均衡が生じる結果となる。

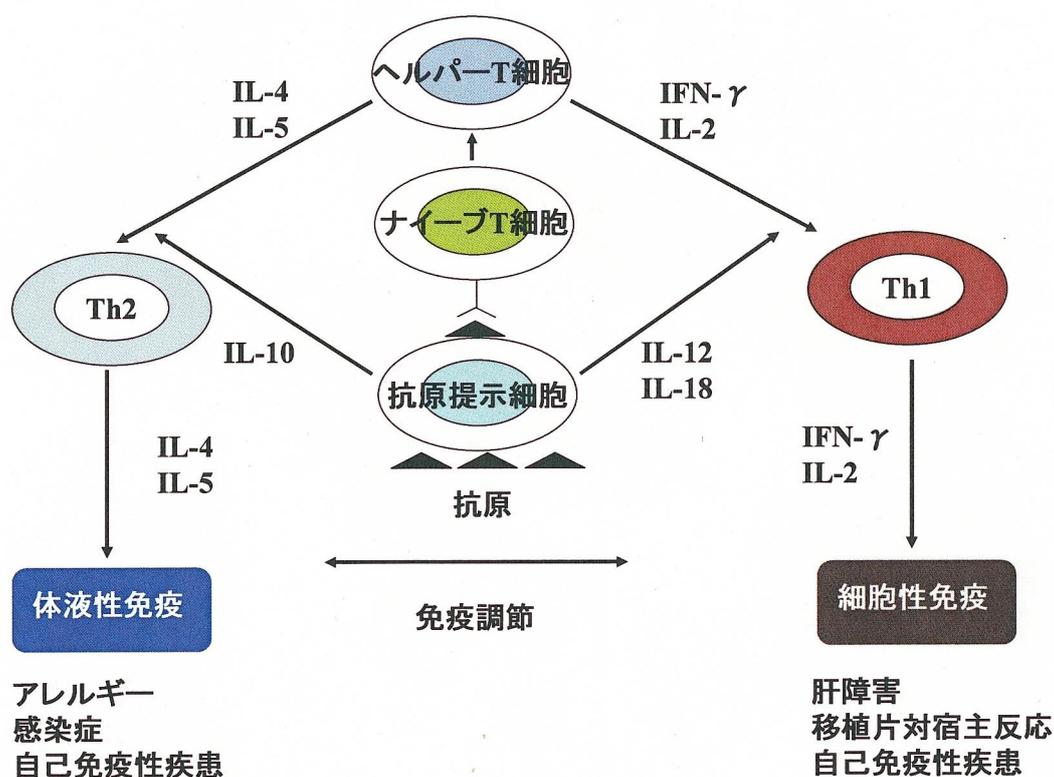


図5 免疫制御に重要なTh1/Th2バランス

5-5 心不全と酸化ストレス

生体は外界から常にさまざまなストレスに曝されているが、そのストレスに抗すべく生体内にはいろいろな制御システムが存在し生体内の恒常性(ホメオスタシス)を保っている。酸化ストレスとは内因性もしくは外因性の原因で生じた活性酸素を生体が十分に処理することができなくなるために生じるものである。ヒトが呼吸して取り入れている酸素の 95%

以上は生体のなかのミトコンドリアの電子伝達系で酸化され、水まで還元される。またミクロソームの電子伝達系では水酸化反応によって水酸化される。このうち数%はこれらの系から還元されない中間体、すなわち活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)として漏出するが、通常は生体の消去系で還元される。ところが活性酸素消去系に破綻が起きたり消去系の能力を超える ROS が生成すると、ROS が蓄積したりさらに反応性の高い ROS が生成し、酸化ストレスとなる。すなわち酸化ストレスとは活性酸素生成と消去(防御)系のバランスが崩れている状態である。循環器領域において、酸化ストレスは虚血・再灌流障害や動脈硬化のみならず、心不全にも関与することが明らかにされつつある。従って、心不全は種々の神経体液因子、サイトカインに加え酸化ストレスもその病態に関連した症候群と考えられるようになってきている (28-32,38)。我々の教室でも酸化ストレスが心不全の重症度を示すマーカーであることを証明した (図 6) (39)。

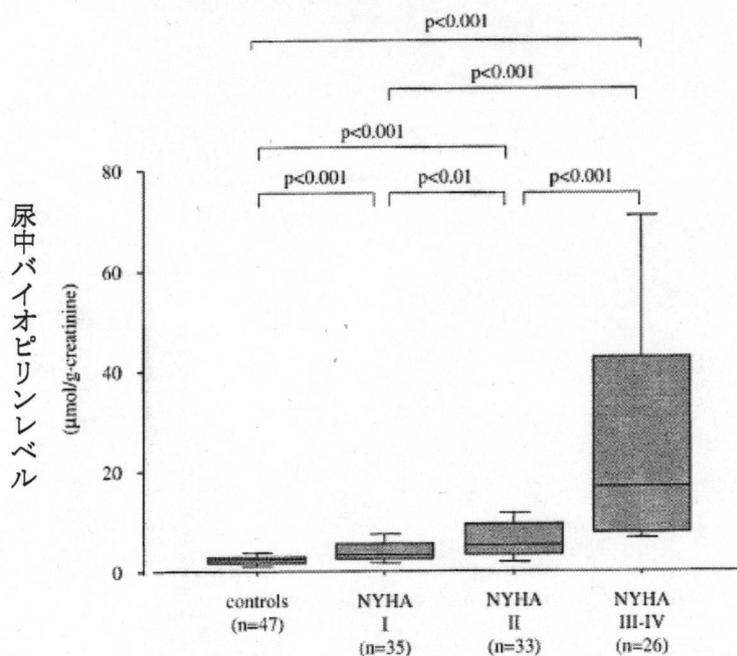


図 6 尿中バイオピリンレベルと心不全の重症度の関係 Hokamaki, et al. *J Am Coll Cardiol.* 2004

尿中バイオピリンは対照群に比し、心不全群において有意に上昇しており、また NYHA 分類において重症になるに従い、尿中バイオピリンレベルも高値を示した。

5-6 心不全とバイオマーカー

冠動脈疾患において、C-reactive protein(CRP)や high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP)が心血管事故の予後因子であるとの報告は多い。CRP は、IL-6 などの炎症性サイトカインにより動脈硬化のみならず、心不全でも増加することが知られており、慢性心不全も慢性炎症症候群である側面がある。実際にIL-6、TNF- α 、可溶性TNF受容体が心不全重症度に伴い増加し、予後との関連が報告されている。冠動脈疾患においては、CRPの濃度は動脈硬化の進展、不安定プラークの存在や急性冠症候群で上昇し、予後予測因子と報告されている。主として、冠動脈疾患による心不全を対象とした大規模臨床研究 (Valsartan Heart Failure Trial ; Val-HeFT)において、CRP、BNP が測定され、CRP は BNP とは独立して予後推測に有用であることが報告された (図7)(40)。

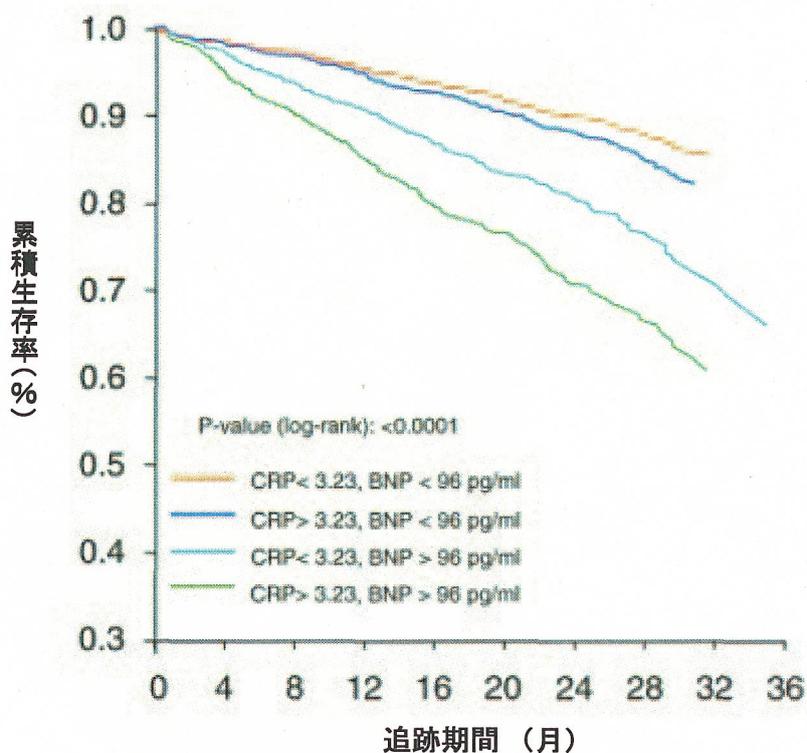


図7 心不全患者の予後とCRP, BNP濃度

Anand, et al. *Circulation*; 2005

最近、拡張型心筋症で hsCRP が BNP 濃度と独立した予後と関連したバイオマーカーと

報告された (図 8)(41)。さらにこの報告では hsCRP が IL-6 より有用である可能性が示された。

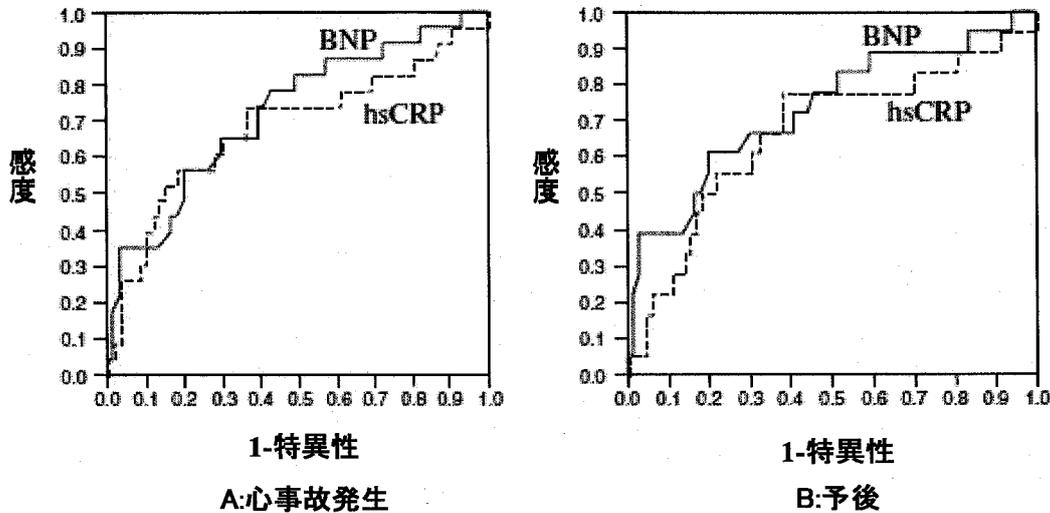


図8 拡張型心筋症患者におけるhsCRPとBNP濃度と予後 (receiver operating characteristic(ROC)解析)

Ishikawa, et al. *Cir J*; 2006

このようにCRPが心不全の予後と関連していた事実は重要で、単なる結果ではなくCRPが内皮依存性血管拡張反応低下の原因となるなど、病態を修飾している可能性がある。

一般に細胞の増殖、分化、死滅や細胞機能の発現、停止は周りの細胞により厳密に制御され、その結果生体の恒常性が維持されている。こうした細胞同士のコミュニケーションは、細胞表面分子を介する直接的な細胞同士の接触や可溶性分子を介して行われており、この細胞間伝達分子が「サイトカイン」である。近年これらサイトカインが新たに心不全と関連していることが報告され、病態修飾因子として注目されている。1990年重症心不全において血中TNF- α が増加していることが報告され(42)、1994年には心筋炎、拡張型心筋症、肥大型心筋症においても同様に増加していることが報告された。その結果サイトカインの一つであるTNF- α が心不全の病態に何らかの関わりを持つ可能性が示された(43)。その後TNF- α の過剰発現マウスでは、左右心室腔の拡大、駆出率の低下および心

筋炎の所見が認められ、心筋障害との関連が示唆された (44,45)。TNF- α は心不全患者における骨格筋アポトーシスを促進することが知られており、重症心不全に認められるいわゆるカヘキシーの病態に関わるともいわれている。

Matsumori らは種々のモデルマウスを用いた実験系において心不全とサイトカインとの関わりを検討しているが、encephalomyocarditis ウイルスによる心筋炎-心不全モデルマウスにおいては血中 TNF- α が上昇し、心筋内の IL-1 β 、IL-2、TNF- α 、IFN- γ の mRNA の発現上昇が早期より認められたことを報告している (46)。さらに心不全を発症するダール食塩感受性高血圧ラット心臓においてマクロファージの浸潤が著明であり、マクロファージの遊走、活性化を示す monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の心臓での産生増加を認めたと報告している (47)。また心不全における中心的な神経体液性因子でもあるアンジオテンシン II が、angiotensin II type 1 receptor (AT1) 受容体を介して転写因子である nuclear factor- κ B (NF- κ B) を活性化し、心臓由来の線維芽細胞からの IL-6 や TNF- α の産生を誘導するとの報告もある (48)。

5-7 本研究の目的

我々は酸化ストレスなどにより活性化され、TNF- α の産生に関与する IFN- γ 産生 T 細胞が心不全の重症度の指標として有用であると推測した。本研究において、心不全の重症度と T 細胞の活性との関係を検討するために、末梢血中の T 細胞の活性を測定し、New York Heart Association (NYHA) 分類との関係を検討した。また心不全の原因となる病態の違いで、T 細胞の活性に違いがあるかを検討した。

6. 研究方法

6-1 対象

本研究において連続 47 名(平均年齢 64±10 歳、男性 38 名、女性 9 名)の心疾患患者(心不全群)を登録した。心疾患の診断は病歴、身体所見、心電図、胸部 X 線写真、心エコー、左室造影、および冠動脈造影に基づいて診断した。NYHA クラス I の心不全群については、心疾患はあるが身体活動の制限に至らない患者、通常身体活動では、疲労、動悸、呼吸困難、または胸痛を引き起こさないものと定義した。NYHA クラス II-IV の心不全群は心不全の何らかの症状を有していた。特に NYHA III+IV の心不全群は浮腫、III 音、肺うっ血等明らかな心不全症状を有していた。心不全の原因は虚血性心臓病患者 27 名、特発性拡張型心筋症患者 20 名であった。膠原病疾患、感染症疾患、悪性疾患、重症の肺疾患、重度の腎不全、高度の肝疾患の患者は炎症反応およびホルモン値に影響を及ぼすため除外した。NYHA クラス分類は入院時に評価した。左室駆出分画(left ventricular ejection fraction: LVEF)は経胸壁心エコーを用いて Simpson 法で測定した。

また我々は本研究において、心不全群と年齢・性別を一致するように胸痛症候群患者 20 名(平均年齢 61±10 歳、男性 12 名、女性 8 名)を対照群とした。すべての対照群の患者は多数の冠危険因子もしくは心電図異常を有し、胸痛の既往があるために心臓カテーテル検査を含めた循環器諸検査を行い、その結果、明らかな心疾患が証明されなかった。本研究の実施にあたってはすべての患者からインフォームド・コンセントを得た。

6-2 冠危険因子の評価

年齢、性別、体格指数(Body mass index : BMI)、高血圧症、糖尿病、脂質異常症、喫煙、使用薬剤の有無を検討した。脂質系、BNP、hsCRP は入院時に評価した。高血圧症

は収縮期血圧 140 mmHg 以上、あるいは拡張期血圧で 90 mmHg 以上と定義した。糖尿病は空腹時血糖が 126 mg/dl 以上か以前糖尿病の診断を受け、内科的加療がなされている患者と定義した。脂質異常症は総コレステロール値が 220 mg/dl 以上、low-density lipoprotein (LDL)コレステロール値が 140 mg/dl 以上、high-density lipoprotein (HDL)コレステロール値が 40 mg/dl 未満、中性脂肪が 150 mg/dl 以上あるいは以前脂質異常症の診断を受け、内科的加療がなされている患者と定義した。

6-3 Interferon- γ (IFN- γ)陽性 CD4 陽性 (CD4⁺) T 細胞の測定

血中 CD4⁺ T 細胞の IFN- γ 産生能の測定用の血液は、入院時にヘパリン管に 21 ゲージ針で採取した。全血を非活性化培養液と活性化培養液のそれぞれに添加し 37 度、5% 炭酸ガス下で 4 時間培養した。非活性化培養液は RPMI1640 に 10%胎児牛血清と 40 μ g/ml のブレフェルدين A (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)を添加したものである。活性化培養液は、非活性化培養液に 40 ng/ml の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Calbiochem, La Jolla, California) と 4 μ g/ml のイオノマイシン (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri)を添加したものである。冷 phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した後、遠心分離し、細胞を一回あたりの検査に 5 \times 10⁵ 個となるように調整した。細胞表面を抗 CD4 サイクロームモノクローナル抗体(BD PharMingen, San Diego, California) にて標識した。Intraprep reagent (Becton-Dickinson, Mountain View, California) を用いて、細胞を固定した後、細胞透過性を高めた。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 IFN- γ モノクローナル抗体と Phycoerythrin (PE) 標識 interleukin(IL)-4 モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson, Mountain View, California)を用いて細胞内の IFN- γ と IL-4 を染色した。IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞と IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞はフローサイトメーターと CellQuest ソフトウェア (Becton-Dickinson, Mountain View, California) を用いて、3 色フローサイトメ

リー法で解析した。同一アイソタイプコントロールモノクローナル抗体を用いた非特異的染色は1%以下であった。

6-4 その他の検討項目の測定

血漿 BNP 濃度の測定はイムノラジオメトリックアッセイ(Immunoradiometric assay; IRMA)法にて行った(Shionoria BNP kit; Shionogi, INC., Osaka, Japan)。また hsCRP 値は免疫比濁法により定量を行った。総コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪値は酵素法により測定した。HDL コレステロール値はコレステロール酸化酵素法により測定した。TNF- α 濃度は酵素免疫測定(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA)法により測定した。ヘモグロビン A1c 値はラテックス凝集免疫比濁法により定量した。

6-5 統計学的解析

正規分布している多群間での連続変数の比較には一元配置分散分析法を用い、平均値 \pm 標準偏差(mean \pm SD)で表記し、one way analysis of variance (ANOVA) および t 検定で比較した。正規分布を示さなかった連続変数(中性脂肪値および血漿 BNP 値)の結果は中央値(50th percentile 値)に加えて 25th-75th percentile で表記し、Kruskal-Wallis test および Mann-Whitney U test を用いて行った。P 値 0.05 未満を統計学的有意と判定した。

7. 研究結果

7-1 患者背景

47名の心不全患者群をNYHA分類に基づき3群に分類した。15名の患者がNYHAクラスI群、13名の患者がNYHAクラスII群、19名の患者がNYHAクラスIII+IV群に分類された。研究対象となった患者の臨床的特徴を表1に示した。対照群と心不全群間に年齢、性別、冠危険因子において有意差は認めなかった。対照群に比し、心不全群で心拍数には有意差を認めた。

表1 患者背景

Variable	Control (n=20)	虚血性心筋症 (n=27)	拡張型心筋症 (n=20)	p 値
年齢	61±10	65±8	62±12	0.26
男性/女性	12/8	20/7	18/2	0.27
心拍数 (bpm)	62±5	87±13	84±14	<0.001
NYHA 分類 (I/II/III/IV)		9/7/6/5	6/6/5/3	0.71
体格指数 ≥25 kg/m ²	5(25%)	5(19%)	5(25%)	0.91
高血圧症	9(45%)	18(67%)	7(35%)	0.19
喫煙	4(20%)	8(30%)	6(30%)	0.84
糖尿病	6(30%)	10(37%)	4(20%)	0.30
ヘモグロビン A1c (%)	5.6±0.6	6.1±1.6	5.9±0.8	0.30
総コレステロール(mg/dl)	183±30	168±27	170±32	0.21
HDL-コレステロール (mg/dl)	55±16	46±11	46±8	0.10
LDL-コレステロール (mg/dl)	111±22	105±32	102±24	0.36
中性脂肪 (mg/dl)	113.0 (78.0-191.8)	107.0 (83.0-162.0)	98.0 (82.5-98.8)	0.51
アンジオテンシン変換酵素阻害薬	3(20%)	17(63%)	18(95%)	
アンジオテンシン II 受容体拮抗薬	3(20%)	9(33%)	8(26%)	
硝酸薬	3(20%)	9(33%)	0(0%)	
β遮断薬	1(5%)	12(44%)	9(47%)	
カルシウム拮抗薬	10(50%)	17(67%)	0(0%)	
利尿薬	0(0%)	11(52%)	20(100%)	
HMG-CoA 還元酵素阻害薬	3(15%)	15(56%)	3(16%)	

HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein,

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

NYHA: New York Heart Association

血漿BNP値、中性脂肪以外の結果は平均値±標準偏差 (mean ± SD)にて表示した。血漿BNP値および中性脂肪は中央値 (50th percentile 値)、および括弧内に25-75th percentile 値で表記した。

高血圧症は収縮期血圧 140 mmHg 以上、あるいは拡張期血圧で 90 mmHg 以上と定義した。糖尿病は空腹時血糖が 126 mg/dl 以上か以前糖尿病の診断を受け、内科的加療がなされている患者と定義した。

表 2 に各 NYHA 分類における諸指標を示した。心拍数は NYHA クラス III+IV 群において最も高値を示した。LVEF は対照群に比し、NYHA クラス I 群、NYHA クラスII群、NYHA クラス III+IV 群は有意に低値を示した。また、NYHA クラス III+IV 群の LVEF は、NYHA クラス I 群、および NYHA クラス II 群と比較して有意に低値を示した。血漿 BNP レベルは NYHA クラス III+IV 群において最も高値を示した。また、血漿 BNP レベルは対照群に比し、NYHA クラス I 群、NYHA クラスII群、NYHA クラス III+IV 群は有意に高値を示した。また NYHA クラス III+IV 群の血漿 BNP レベルは NYHA クラス I 群に比し有意に高値を示した。hsCRP レベルは NYHA クラス III+IV 群において最も高値を示した。また、hsCRP レベルは対照群に比し、NYHA クラス I 群、NYHA クラスII群、NYHA クラス III+IV 群は有意に高値を示した。また NYHA クラス III+IV 群の hsCRP レベルは NYHA クラス I 群に比し、有意に高値を示した。TNF- α レベルは NYHA クラス III+IV 群において最も高値を示した。TNF- α レベルは対照群に比し、NYHA クラスII群、NYHA クラス III+IV 群は有意に高値を示した。また、NYHA クラス III+IV 群の TNF- α レベルは、NYHA クラス I 群、および NYHA クラス II 群に比し、有意に高値を示した。しかし、対照群と NYHA クラス I 群において差は認めなかった。

表 2 患者背景-2

	対照群 (n=20)	NYHA Class I (n=15)	NYHA Class II (n=13)	NYHA Class III+IV (n=19)
心拍数 (bpm)	62±5	74±5 ^{***}	84±5 ^{****††}	99±8 ^{****††††††††}
血漿 BNP (pg/ml)	13.8 (8.6-18.4)	37.7 [*] (21.0-358.0)	144 ^{**} (66.1-538.5)	405.7 ^{***†} (177.3-1,134.0)
左室駆出分画 (LVEF) (%)	66.6±7.2	54.0±12.6 ^{***}	39.3±11.6 ^{****††}	30.0±9.3 ^{****††††††††}
hsCRP (mg/dl)	0.07±0.05	0.29±0.28 ^{**}	0.41±0.27 ^{***†}	0.66±0.35 ^{****††††}
TNF-α (pg/ml)	1.26±0.90	1.90±0.66	2.32±0.95 ^{***†}	5.57±2.61 ^{****††††††††}

血漿BNP値以外の結果は平均値±標準偏差 (mean ± SD)にて表示した。
血漿BNP値は中央値 (50th percentile 値)、および括弧内に25-75th percentile 値で表記した。

*p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 vs. 対照群
†p<0.05; ††p<0.01; †††p<0.001 vs. NYHA Class I.
††p<0.05; †††p<0.001 vs. NYHA Class II.

BNP: brain natriuretic peptide, hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein
TNF: tumor necrosis factor, NYHA: New York Heart Association
LVEF: left ventricular ejection fraction

表 3 に各疾患群での諸指標を示した。hsCRP レベルは虚血性心筋症患者 (ischemic cardiomyopathy; IC) 群および特発性拡張型心筋症患者 (idiopathic dilated cardiomyopathy; IDC) 群において対照群に比し高値を示した。また hsCRP レベルは IC 群と IDC 群に有意な差を認め、IC 群で高値であった。LVEF は対照群に比し、IC 群、IDC 群は有意に低値を示した。また、IDC 群の LVEF は、IC 群と比し、有意に低値を示した。LVDdは対照群に比し、IC 群および IDC 群は有意に高値を示した。また、IDC 群の LVDdは、IC 群に比し、有意に高値を示した。血漿 BNP レベルは IDC 群において最も高値を示した。また、血漿 BNP レベルは対照群に比し、IC 群および IDC 群は有意に高値を示した。また IDC 群の血漿 BNP レベルは IC 群に比し、有意に高値を示した。TNF-α レ

ベルは IC 群において最も高値を示した。TNF- α レベルは対照群に比し、IC 群および IDC 群は有意に高値を示した。また、IC 群の TNF- α レベルは、IDC 群に比し、有意に高値を示した。

表 3 患者背景-3

	対照群 (n=20)	虚血性心筋症 (n=27)	拡張型心筋症 (n=20)
hsCRP (mg/dl)	0.09 \pm 0.08	0.59 \pm 0.35 ^{***}	0.34 \pm 0.24 ^{****†}
血漿 BNP (pg/ml)	13.8 (8.6-18.3)	82.7 ^{**} (34.7-252.9)	358.0 ^{****††} (327.5-1325.7)
左室駆出分画 (LVEF) (%)	67 \pm 7	45 \pm 16 ^{***}	36 \pm 13 ^{****†}
左室拡張末期径 (LVDd) (mm)	46.2 \pm 5.4	53.6 \pm 7.0 ^{***}	69.7 \pm 9.8 ^{****††}
TNF- α (pg/ml)	1.26 \pm 0.90	4.55 \pm 2.78 ^{**}	2.29 \pm 1.23 ^{††}

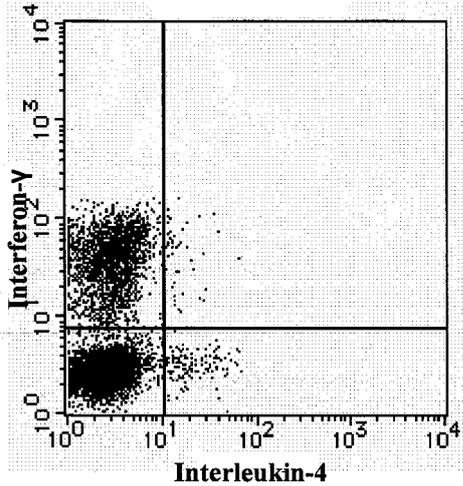
血漿BNP値以外の結果は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD)にて表示した。
血漿BNP値は中央値 (50th percentile 値)、および括弧内に25-75th percentile 値で表記した。

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs. 対照群
†p<0.05; ††p<0.01; †††p<0.001 vs. 虚血性心筋症群

BNP: brain natriuretic peptide, hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein
TNF: tumor necrosis factor, LVEF: left ventricular ejection fraction
LVDd: left ventricular end-diastolic dimension

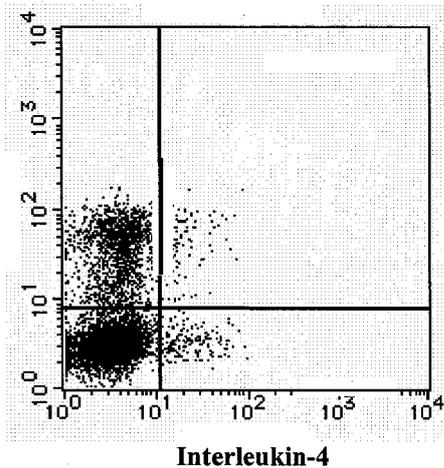
7-2 NYHA 分類と末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞および IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度の解析結果

対照群と心不全群での末梢血中の CD4⁺ T 細胞の IFN- γ 産生能の代表例を図 9 に示す。



upper left quadrant . 30.37%
 upper right quadrant 0.81%
 lower left quadrant 66.16%
 lower right quadrant 2.65%

慢性心不全群



upper left quadrant 18.65%
 upper right quadrant 0.47%
 lower left quadrant 78.59%
 lower right quadrant 2.29%

対照群

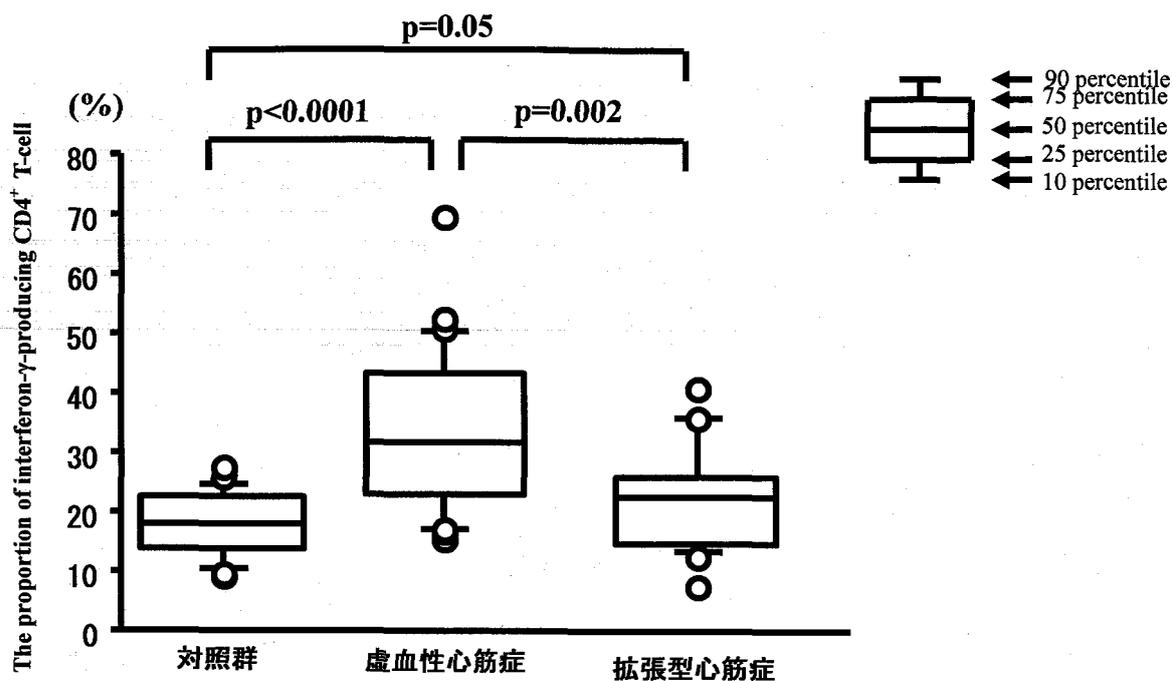
IFN: interferon IL: interleukin

図9 心不全群および対照群の末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞および IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞の代表例

IFN- γ 産生能を有する CD4⁺ T 細胞の頻度は upper left quadrant (UL)と upper right quadrant (UR)を合わせた領域で示される。心不全群では 31.18%、対照群では 19.12%である。

IL-4 産生能は UR と lower right quadrant (LR)を合わせた領域である。心不全群では 3.46%、対照群では 2.76%である。

図 10 に対照群、IC 群および IDC 群の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度を示した。



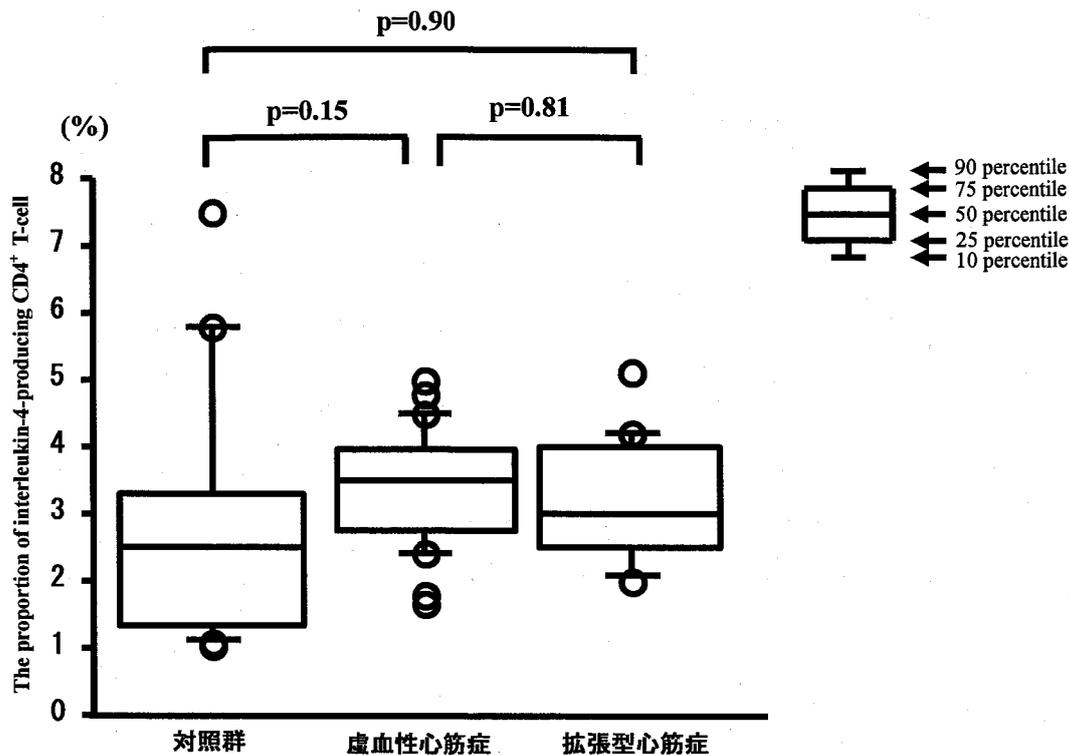
IFN: interferon

心不全患者群で末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度が増加している。また虚血性心筋症群が拡張型心筋症群よりもその頻度は多いことが示されている。

図 10 心不全群および対照群の末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度の比較

対照群に比し、IC 群および IDC 群において IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度が有意に高値であった。また IDC 群に比し、IC 群で IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度が有意に高値であった。

一方、図 11 に対照群、IC 群および IDC 群の IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度を示した。IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は 3 群間において有意差は認めなかった。

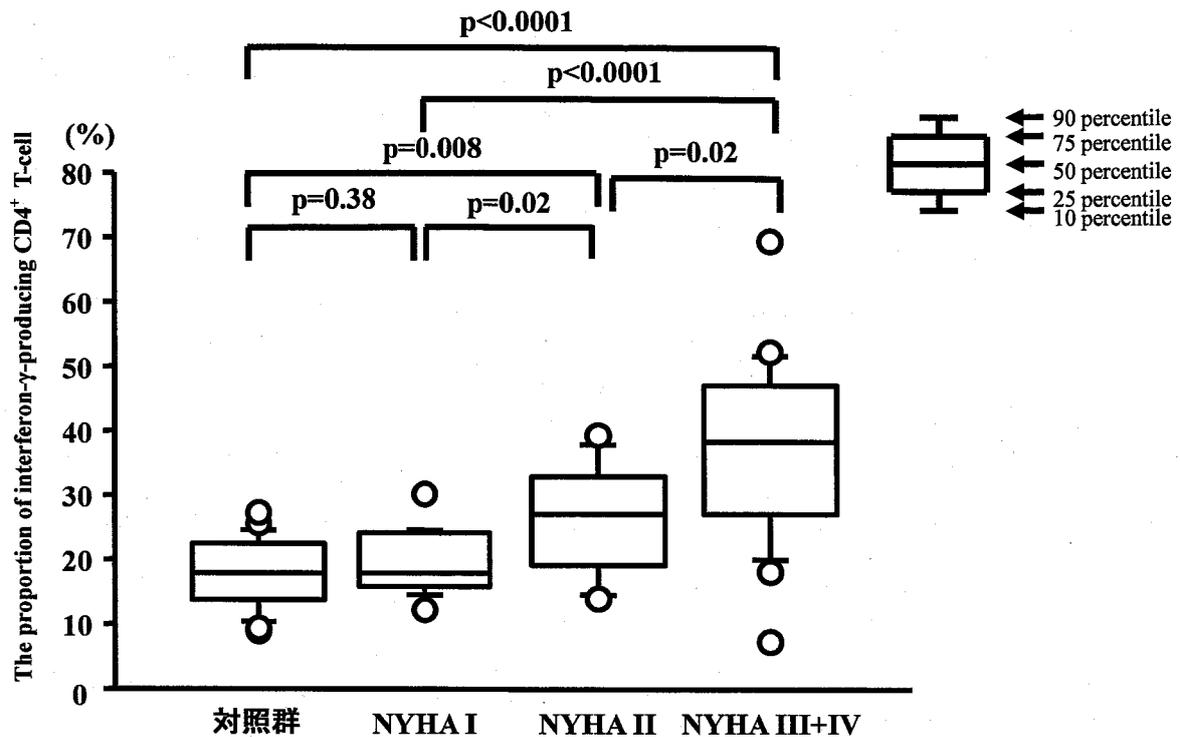


IL: interleukin

対照群と比し、心不全群で IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度に明らかな有意差は認めない。また虚血性心筋症群と拡張型心筋症群においても有意差は認めない。

図 11 心不全群および対照群の末梢血中の IL-4 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度の比較

図 12 に各 NYHA 分類における末梢血中の CD4⁺ T 細胞の IFN- γ 産生能を示した。IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は NYHA クラス III+IV 群において最も高値を示した。IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞に頻度は対照群に比し、NYHA クラス II 群、NYHA クラス III+IV 群では有意に高値を示した。また、NYHA クラス III+IV 群の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は、NYHA クラス I 群、および NYHA クラス II 群に比し、有意に高値を示した。NYHA クラス II 群の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は、NYHA クラス I 群に比し、有意に高値を示した。しかし、対照群と NYHA クラス I 群との間に差は認めなかった。



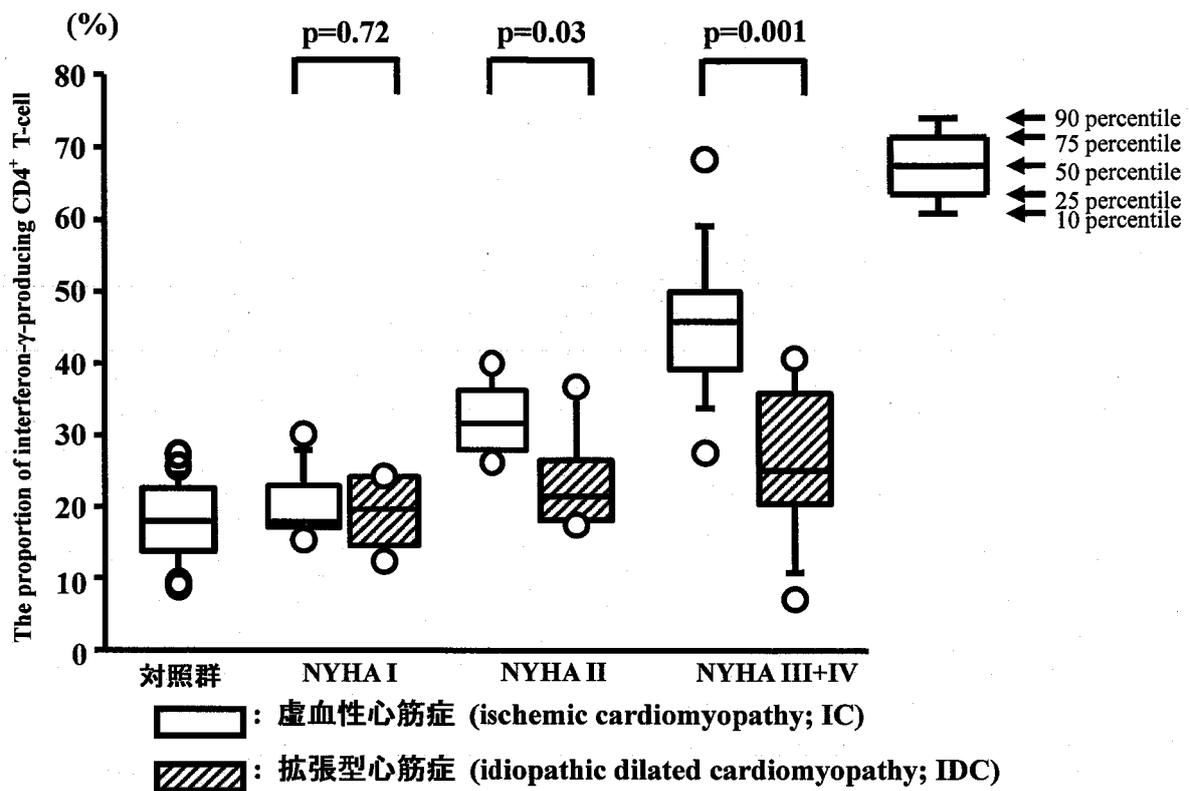
NYHA: New York Heart Association, IFN: interferon, IL: interleukin

IFN- γ 陽性 CD4⁺ T細胞の頻度は対照群に比し、心不全群において有意に増加しており、また心不全の重症度の増悪とともに、末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T細胞の頻度も増加することが示されている。

図 12 NYHA 分類における末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T細胞の頻度の解析結果

7-3 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T細胞の頻度の比較

結果を図 13 に示す。IC 群、IDC 群ともに NYHA 分類の重症度が増すほど、IFN- γ 陽性 CD4⁺ T細胞の頻度は増加しており、特に IC 群においてその頻度は有意に上昇していた。また NYHA クラス II 群、NYHA クラス III+IV 群では IC 群と IDC 群との間において IFN- γ 陽性 CD4⁺ T細胞の頻度に有意な差を認めた。



NYHA: New York Heart Association, IFN: interferon

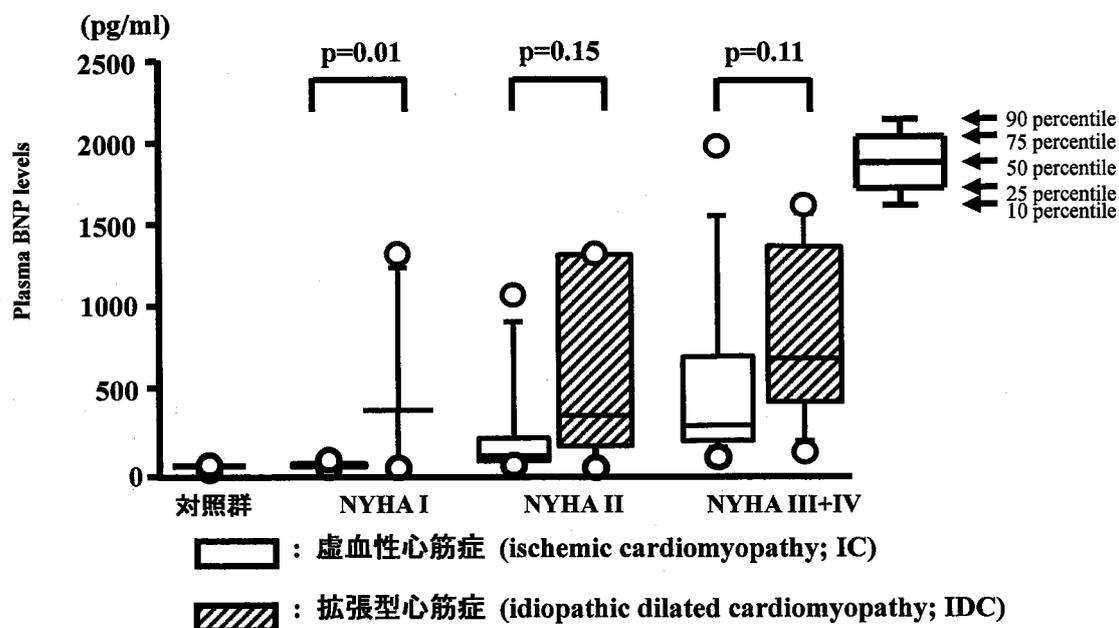
虚血性心筋症群および拡張型心筋症群の両疾患において心不全の重症度の増悪に一致して、IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は増加している。さらに IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度の増加は拡張型心筋症群よりも虚血性心筋症群が大きい。

図 13 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度の比較

7-4 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における血漿 BNP 値の比較

血漿 BNP 値は心不全群で有意に上昇しており、NYHA 分類の重症度が増すほど高値を示し、NYHA クラス III+IV で最も高値であった。本研究でも血漿 BNP 値は心不全の重症度を反映する指標であることが示された(表 2)。

NYHA クラス I 群では IC 群と IDC 群との間において有意な差を認めしたが、NYHA クラス II 群および NYHA クラス III+IV 群においては有意な差は認めなかった(図 14)。



BNP: brain natriuretic peptide, NYHA: New York Heart Association

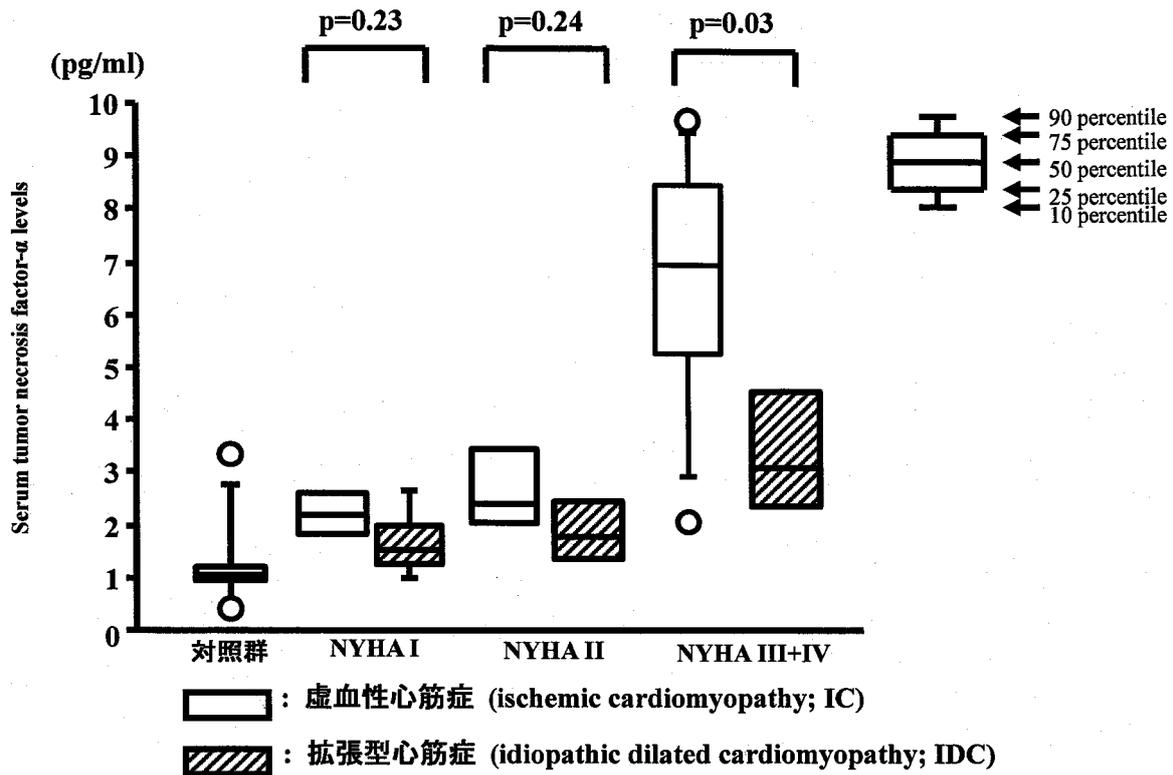
虚血性心筋症群および拡張型心筋症群の両疾患において心不全の重症度の増悪に一致して血漿 BNP レベルは増加している。心不全の重症度が軽度の場合は虚血性心筋症群に比し、拡張型心筋症群で有意に高値である。しかし心不全の重症度が重症化すると虚血性心筋症群と拡張型心筋症群との両群間において有意差は認めない。

図 14 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における血漿 BNP 値の比較

7-5 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における TNF- α 濃度の比較

TNF- α 値は心不全群で有意に上昇しており、NYHA 分類の重症度が増すほど高値を示し、NYHA クラス III+IV で最も高値であった。TNF- α 値は心不全の重症度を反映する指標であることが示された (表 2)。

TNF- α 値は NYHA クラス III+IV 群では IC 群と IDC 群との間において有意な差を認めたが、NYHA クラス I 群および NYHA クラス II 群においては有意な差は認めなかった (図 15)。



TNF: tumor necrosis factor, NYHA: New York Heart Association

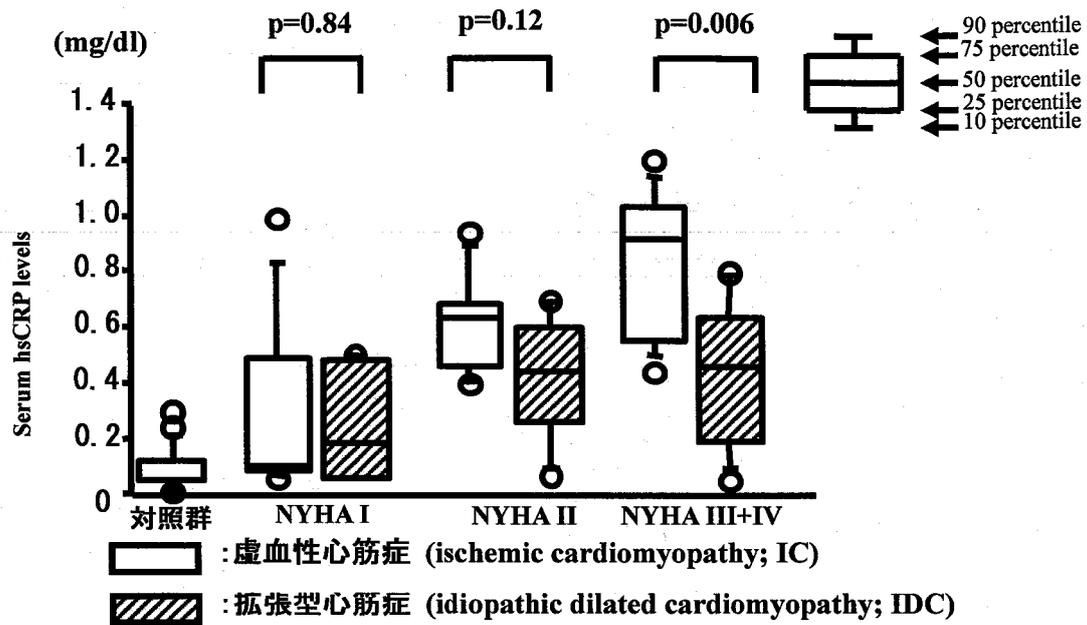
虚血性心筋症群および拡張型心筋症群の両疾患において心不全の重症度の増悪に一致してTNF- α レベルは増加している。TNF- α レベルの増加の程度は拡張型心筋症群よりも虚血性心筋症群が大きい。

図 15 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における TNF- α 濃度の比較

7-6 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における hsCRP 濃度の比較

hsCRP 値は心不全群で有意に上昇しており、NYHA 分類の重症度が増すほど高値を示し、NYHA クラス III+IV で最も高値であった。hsCRP 値は心不全の重症度を反映する指標であることが示された (表 2)。

hsCRP 値は IDC 群に比し IC 群が、NYHA クラス I 群、NYHA クラス II 群および NYHA クラス III+IV 群いずれのクラスでも IC 群で高値を示し、NYHA クラス III+IV 群においては両群間に有意差を認めた (図 16)。



hsCRP: high sensitivity C-reactive protein, NYHA: New York Heart Association

虚血性心筋症群および拡張型心筋症群の両疾患において、心不全の重症度の増悪に一致して hsCRP レベルは増加している。hsCRP 濃度の増加の程度は拡張型心筋症群よりも虚血性心筋症群が大きい。

図 16 IC 群および IDC 群の各 NYHA 分類における hsCRP 濃度の比較

8. 考察

本研究では心不全患者において末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T (type 1 T helper; Th1) 細胞が心不全患者の重症度を反映して上昇すること、病態の違いで末梢血中の Th1 細胞の頻度に違いがあることを示した。

慢性心不全患者の血中に種々のサイトカインが上昇することが報告され、特に MCP-1 などのケモカインや TNF- α , IL-1, IL-6, nitric oxide (NO)などの炎症性サイトカインの活性化が注目されている。なかでも TNF- α は cardiac cachexia の原因として早くから心不全の進展との関連が指摘され、神経体液性因子の一つとしてその役割に、関心が寄せられてきた。基礎実験で、ラットの心筋細胞に心不全で認められるのと同程度の TNF- α を投与すると細胞障害が生じること、心臓に TNF- α が過剰発現する遺伝子導入マウスを作製すると心筋細胞のアポトーシスによる細胞の減少、matrix metalloproteinase の活性化による細胞外マトリックスの分解、間質線維化の増強、さらには左室リモデリング(拡大と菲薄化)が生じ、心不全が進行することが確められた (38,42-45)。

臨床的にも本研究と同様の結果であるが、心不全患者の血中 TNF- α レベルの上昇は、NYHA の重症度と相関すること、また VEST 試験でサイトカインの血中レベルが予後を規定する独立した予測因子であることが示されている (49)。

血中の TNF- α は T 細胞からの IFN- γ により刺激を受け、心筋内組織内では心筋細胞と間質に存在する T 細胞やマクロファージが分泌するサイトカインの一つである。IFN- γ を産生する T 細胞つまり Th1 細胞がその役割をになっていることを Debets らが報告している (50)。Luizzo らは、PMA とイオノマイシンで処理した不安定狭心症患者の末梢血で、刺激を受けた T 細胞から産生された IFN- γ がプラークの不安定化に関与することを示している (51)。われわれは虚血性心臓病患者の末梢血を活性化させた T 細胞を用いて Th1 細胞の関与の重要性を以前証

明している。また冠動脈疾患患者の percutaneous coronary intervention (PCI)後の炎症反応に末梢血中の Th1 細胞が関与し、3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) coenzyme A 還元酵素阻害薬 (Statin)投与が安定狭心症患者の PCIによる T細胞の活性化を抑制することを確認した (52,53)。

本研究においても、われわれはPMAとイオノマイシンで処理した末梢血 T細胞をモノクローナル抗体、フローサイトメリー法を用いて測定し、心不全患者の炎症に対する T細胞の関与の重要性を検討した。その結果、対照群と比較して心不全群において末梢血中の Th1 細胞の頻度が有意に増加していることを明らかにした。この結果は心不全の進行が血中 TNF- α レベルの上昇と関係していることを示しており、これまでの報告に矛盾しない結果である。また末梢血中の Th1 細胞の頻度は心不全が重症化するに従い上昇し、心不全の積極的な治療により減少することも報告している(54,55)。

交感神経系(カテコラミン)やRAASは心不全において心拍出量を維持するための初期の生体反応である。しかしカテコラミンやアンジオテンシンが酸化ストレスを増強することが報告され、さらにカテコラミン濃度は予後と関連していると報告されている (56)。アンジオテンシンやエンドセリンの受容体は、reduce nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)オキシダーゼを活性化する。このスーパーオキシドが mitogen-actiated protein kinase kinase である apoptosis signal-regulating kinase 1 を活性化し c-Jun N-terminal kinase を介して NF- κ B を賦活化する (57)。NF- κ B は各種炎症性サイトカイン発現の転写因子であるため TNF- α などのサイトカインをさらに大量に産生するように働いていることもあり、酸化ストレスにより心不全患者での TNF- α レベルが増加していることも考えられる。またミトコンドリア電子伝達系の障害によって増加したスーパーオキシド由来の酸化ストレスは心不全や心筋リモデリングの形成・進展に重要な役割を果たしていることが報告されている (58)。このため尿中バイ

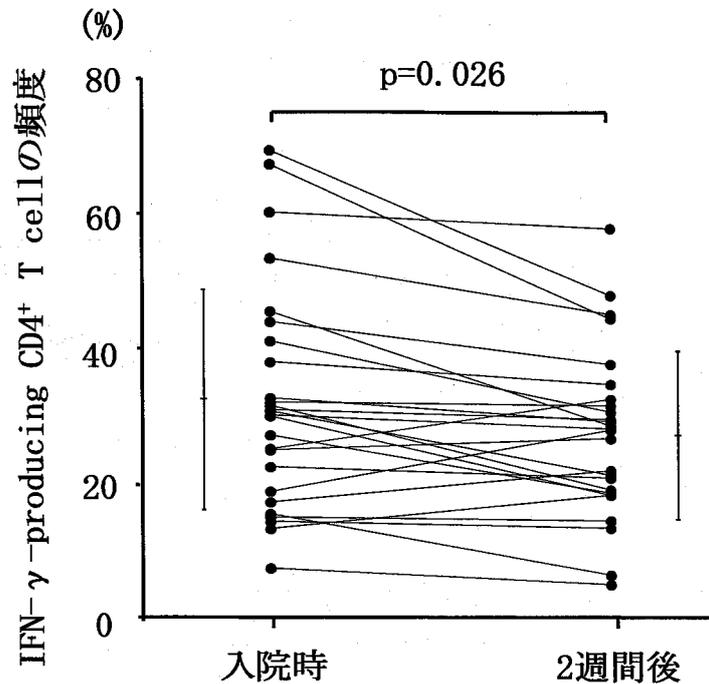
オピリンを生物学的な指標として酸化ストレスの程度を測定し、尿中バイオピリンレベルが心不全重症度と血漿 BNP レベルの両方に関係し変動している事実をわれわれの教室で報告している (39)。

本研究では、従来の報告と比較して、NYHA クラス I 群での LVEF が良い傾向であった。近年、心筋収縮性は比較的保たれているにもかかわらず、心筋拡張性の低下により心不全が出現する、いわゆる“diastolic heart failure”の概念が生まれてきている。血漿 BNP は拡張機能障害でも上昇することがわかっている。血漿 BNP 値は正常範囲を超え、狭心症の治療のために NYHA クラス I 群に登録された患者が存在し、収縮機能障害ではなく、拡張機能障害が疑われる患者が含まれていた。このため本研究では NYHA クラス I 群での LVEF が良い傾向であったものと考えられる。

本研究では、高度の腎機能障害患者や高度の肝障害患者は除外された。しかしながら、冠腎症候群という概念が近年誕生し、冠疾患および腎疾患への炎症の関与が示唆されている。また肝疾患とりわけ C 型肝炎ウイルス罹患患者において、プラークの進行が認められることやプラーク内での炎症細胞の浸潤が多いことなどが確認されている。

本研究において、心不全や虚血性心疾患および心筋症に対する通常の治療がなされていた。アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬および Statin といった薬剤は抗炎症作用を有するものがある。本研究ではアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬服用患者と非服用患者での末梢血中の Th1 細胞の頻度に有意な差は認められなかった。また Statin 服用患者と非服用患者でも末梢血中の Th1 細胞の頻度に明らかな有意差は認められなかったものの、服用患者において Th1 細胞の頻度は少ない傾向にあった。また以前われわれは Statin 服用により Th1 細胞の頻度が減少することも報告している (図 17) (54)。さらに急性心筋梗塞発症患者において Statin 服用患者は心事故

発生も有意に抑制されること、とりわけうつ血性心不全発症に Statin の内服が影響していることを報告している (55)。



慢性心不全患者において Statin 療法開始後 2 週間後には末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺T 細胞の頻度は有意に減少した。

図 17 Statin 療法開始後の末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺T 細胞の頻度の変化

このように Statin の抗炎症作用は、脂質低下作用とは独立して多面的作用のひとつとして認められており、in vitro と in vivo で抗炎症作用はすでに確認されている。

以上のように炎症—免疫—酸化ストレスの連関解明は今後も重要な課題であり、有効な薬剤が期待されている。

このように本研究では心不全の進展に Th1 細胞の関与が重要であることを明らかにし、さらに心不全発症の病態により、Th1 細胞の動態に違いがあることを明らかにした。引き続き心不全患者での T 細胞のみならず、マクロファージ、B 細胞、樹状細胞といった他の炎症細胞や炎症性サイトカインの動態についても明らかにしていく必要がある。

9. 結語

虚血性心筋症患者および特発性拡張型心筋症患者を対象にした本研究において、慢性心不全の進展・増悪に炎症反応、とくに Th1 細胞の免疫応答が関与していることを明らかにした。末梢血中の IFN- γ 陽性 CD4⁺ T 細胞の頻度は、心不全の重症度を反映する有用な指標の一つと考えられる。

10. 文献

1. 泰江 弘文 心不全と神経体液因子 1-16; 1999. 医学書院 東京
2. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GY. ABC of heart failure. Pathophysiology. *BMJ*. 2000; 320: 167-170.
3. 北畠 顕班長:心筋症:診断の手引きと解説. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 特発性心筋症調査研究班. 37-50; 2005.
4. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American College of Chest Physicians; International Society for Heart and Lung Transplantation; Heart Rhythm Society. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005; 112: 154-235.
5. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*. 1996; 93: 841-842.
6. Takemura G, Fujiwara H, Horike K, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Matsuda M, Kawamura A, Ishida M, Kida M, Uegaito T, Tanaka M, Matsumori A, Fujiwara Y, Fujiwara T, Imura H, Kawai C. Ventricular expression of atrial natriuretic polypeptide and its relations with hemodynamics and histology in dilated human hearts. Immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 1989; 80: 1137-1147.

7. Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y. The molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure. *Ann NY Acad Sci.* 1999; 874: 38-48.
8. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* 1998; 274: 577-595.
9. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1991; 83: 504-514.
10. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 118: 131-139.
11. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* 1988; 332: 78-81.
12. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168: 863-870.
13. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens.* 1992; 10: 907-912.
14. Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science.* 1987; 238: 675-678.
15. Chinkers M, Garbers DL. Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60: 553-575.
16. de Bold AJ. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science.* 1985; 230: 767-770.
17. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998; 339: 321-328.
18. Laragh JH. Atrial natriuretic hormone, the renin-aldosterone axis, and blood pressure-electrolyte homeostasis. *N Engl J Med.* 1985; 313: 1330-1340.
19. Needleman P, Greenwald JE. Atriopeptin: a cardiac hormone intimately involved in fluid, electrolyte, and blood-pressure homeostasis. *N Engl J Med.* 1986; 314: 828-834.

20. Burnett JC Jr, Kao PC, Hu DC, Heser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science*. 1986; 231: 1145-1147.
21. Yasue H, Obata K, Okumura K, Kurose M, Ogawa H, Matsuyama K, Jougasaki M, Saito Y, Nakao K, Imura H. Increased secretion of atrial natriuretic polypeptide from the left ventricle in patients with dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1989; 83: 46-51.
22. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1993; 87: 464-469.
23. Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Mukoyama M, Hosoda K, Kawai C, Ban T, Yasue H, Imura H. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest*. 1989; 83: 298-305.
24. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest*. 1991; 87: 1402-1412.
25. Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jougasaki M, Kurose M, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Imura H. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1991; 84: 1581-1588.
26. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994; 90: 195-203.

27. Mizuno Y, Yoshimura M, Harada E, Nakayama M, Sakamoto T, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Saito Y, Nakao K, Yasue H. Plasma levels of A- and B-type natriuretic peptides in patients with hypertrophic cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2000; 86: 1036-1040.
28. Studer R, Reinecke H, Müller B, Holtz J, Just H, Drexler H. Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart. Quantification by competitive RNA polymerase chain reaction. *J Clin Invest.* 1994; 94: 301-310.
29. Zisman LS, Abraham WT, Meixell GE, Vamvakias BN, Quaipe RA, Lowes BD, Roden RL, Peacock SJ, Groves BM, Reynolds MV, Bristow MR. Angiotensin II formation in the intact human heart. Predominance of the angiotensin-converting enzyme pathway. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1490-1498.
30. Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation.* 1986; 73: 615-621.
31. Kurose M, Okumura K, Ogawa H, Yoshimura M, Morita E, Yasue H. Reduced cardiac extraction of norepinephrine and epinephrine in patients with heart failure--correlation with left ventricular function. *Int J Cardiol.* 1994; 47: 21-29.
32. Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretsky E, Yusuf S. 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.* 1990; 82: 1724-1729.
33. Goldsmith SR. Control of arginine vasopressin and congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1993; 71: 629-630.
34. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC Jr. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation.* 1994; 89: 1580-1586.
35. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Macé B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation.* 1997; 96: 1976-1982.

36. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; 136: 2348-2357.
37. O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6: 458-466.
38. Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ Jr, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation.* 2000; 102: 1690-1696.
39. Hokamaki J, Kawano H, Yoshimura M, Soejima H, Miyamoto S, Kajiwara I, Kojima S, Sakamoto T, Sugiyama S, Hirai N, Shimomura H, Nagayoshi Y, Tsujita K, Shioji I, Sasaki S, Ogawa H. Urinary biopyrrins levels are elevated in relation to severity of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 1880-1885.
40. Anand IS, Latini R, Florea VG, Kuskowski MA, Rector T, Masson S, Signorini S, Mocarelli P, Hester A, Glazer R, Cohn JN; Val-HeFT Investigators. C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation.* 2005; 112: 1428-1434.
41. Ishikawa C, Tsutamoto T, Fujii M, Sakai H, Tanaka T, Horie M. Prediction of mortality by high-sensitivity C-reactive protein and brain natriuretic peptide in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J.* 2006; 70: 857-863.
42. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990; 323: 236-241.
43. Ramani R, Mathier M, Wang P, Gibson G, Tögel S, Dawson J, Bauer A, Alber S, Watkins SC, McTiernan CF, Feldman AM. Inhibition of tumor necrosis factor receptor-1-mediated pathways has beneficial effects in a murine model of postischemic remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287: 1369-1377.
44. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res.* 1997; 81: 627-635.

45. Diwan A, Dibbs Z, Nemoto S, DeFreitas G, Carabello BA, Sivasubramanian N, Wilson EM, Spinale FG, Mann DL. Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. *Circulation*. 2004; 109: 262-268.
46. Matsumori A, Kawai C. An experimental model for congestive heart failure after encephalomyocarditis virus myocarditis in mice. *Circulation*. 1982; 65: 1230-1235.
47. Wake R, Kim-Mitsuyama S, Izumi Y, Yoshida K, Izumiya Y, Yukimura T, Shiota M, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Iwao H. Beneficial effect of candesartan on rat diastolic heart failure. *J Pharmacol Sci*. 2005; 98: 372-379.
48. Izumiya Y, Kim S, Izumi Y, Yoshida K, Yoshiyama M, Matsuzawa A, Ichijo H, Iwao H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res*. 2003; 93: 874-883.
49. Cohn JN, Goldstein SO, Greenberg BH, Lorell BH, Bourge RC, Jaski BE, Gottlieb SO, McGrew F 3rd, DeMets DL, White BG. A dose-dependent increase in mortality with vesnarinone among patients with severe heart failure. Vesnarinone Trial Investigators. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1810-1816.
50. Debets JM, van der Linden CJ, Spronken IE, Buurman WA. T cell-mediated production of tumour necrosis factor-alpha by monocytes. *Scand J Immunol*. 1988; 27: 601-608.
51. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 101: 2883-2888.
52. Soejima H, Irie A, Miyamoto S, Kajiwara I, Kojima S, Hokamaki J, Sakamoto T, Tanaka T, Yoshimura M, Nishimura Y, Ogawa H. Preference toward a T-helper type 1 response in patients with coronary spastic angina. *Circulation*. 2003; 107: 2196-2200.

53. Tanaka T, Soejima H, Hirai N, Sakamoto T, Yoshimura M, Kajiwara I, Miyao Y, Fujimoto K, Miyagi H, Irie A, Nishimura Y, Ogawa H. Comparison of frequency of interferon- γ -positive CD4⁺ T cells before and after percutaneous coronary intervention and the effect of statin therapy in patients with stable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2004; 93: 1547-1549.
54. Fukunaga T, Soejima H, Irie A, Sugamura K, Oe Y, Tanaka T, Kojima S, Sakamoto T, Yoshimura M, Nishimura Y, Ogawa H. Expression of interferon- γ and interleukin-4 production in CD4⁺ T-cells in patients with chronic heart failure. *Heart and Vessels.* 2007; 22: 178-183.
55. Sakamoto T, Kojima S, Ogawa H, Shimomura H, Kimura K, Ogata Y, Sakaino N, Kitagawa A; Multicenter study for aggressive lipid-lowering strategy by HMG-CoA reductase inhibitors in patients with acute myocardial infarction investigators. Effects of early statin treatment on symptomatic heart failure and ischemic events after acute myocardial infarction in Japanese. *Am J Cardiol.* 2006; 97: 1165-1171.
56. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984; 311: 819-823.
57. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 1997; 275: 90-94.
58. Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR. Free radicals and myocardial injury: pharmacologic implications. *Circulation.* 1986; 74: 1-5.