

心不全における抗酸化因子チオレドキシンの意義

Significance of the Antioxidant Factor, Thioredoxin, in Heart Failure

塩路 圭介
岸本 千晴
中村 肇*
淀井 淳司*
篠山 重威

Keisuke SHIOJI, MD
Chiharu KISHIMOTO, MD
Hajime NAKAMURA, MD*
Junji YODOI, MD*
Shigetake SASAYAMA, MD,

Abstract

Objectives. Increases in oxidative stress may be involved in the progression of heart diseases. However, the serum levels of thioredoxin, a redox regulating protein, have been poorly investigated in patients with heart diseases. This study evaluated the clinical significance of the serum thioredoxin levels in patients with heart failure.

Methods. The serum thioredoxin levels were determined with a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay in a total of 34 patients with dilated cardiomyopathy ($n = 5$), acute coronary syndrome ($n = 7$), and stable angina ($n = 18$), including effort angina ($n = 7$) and vasospastic angina ($n = 11$), and control subjects ($n = 4$).

Results. The serum thioredoxin levels were significantly elevated in patients with acute coronary syndrome (30.6 ± 4.9 ng/ml, $p < 0.001$) and dilated cardiomyopathy (36.9 ± 8.6 ng/ml, $p < 0.001$), but not in patients with stable angina (16.8 ± 5.7 ng/ml, $p = 0.27$) compared with the control subjects ($n = 4$, 13.0 ± 4.9 ng/ml). The serum thioredoxin level in patients with and functional classes of the New York Heart Association ($n = 8$, 33.3 ± 8.6 ng/ml, $p < 0.001$) was significantly higher than in the control subjects. In addition, the serum thioredoxin levels were negatively correlated with left ventricular ejection fractions of the patients ($r = 0.59$, $p < 0.001$).

Conclusions. These results indicate a possible association between thioredoxin and the severity of heart failure.

J Cardiol 2002 Aug; 4(2): 59-63

Key Words

- Heart failure
- Free radicals (redox)
- Antioxidants (thioredoxin)
- Clinical trials

はじめに

急性および慢性心不全の病態では活性酸素上昇など酸化ストレスが亢進することや、それとは対照的にスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼのような抗酸化酵素が減少することがすでに報告されている^{1,2)}。また、酸化ストレス自体が心血管系の重篤な

障害を引き起こすことが報告されている。このことより、心不全の病態において酸化ストレスは、重要な役割を果たしているといえる^{2,3)}。今回、-Cys-Gly-Pro-Cys-という活性部位により、酸化還元(レドックス)を調節する蛋白であるチオレドキシんに焦点を当て⁴⁾、心不全患者の血清を用いて心不全とレドックスの関係を検討した。

京都大学大学院医学研究科 循環病態学: 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54; *京都大学ウイルス研究所 生体応答学研究部門, 京都

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto; * Department of Biological Responses, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto

Address for correspondence: KISHIMOTO C, MD, Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaracho 54, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507

Manuscript received March 4, 2002; revised May 30, 2002; accepted June 7, 2002

対象と方法

1. 対象

対象は、当施設で1998年10月-2000年5月に入院した患者34例である。心不全の重症度はNew York Heart Association (NYHA) 心機能分類を用いて評価し、内訳は、拡張型心筋症5例(平均年齢 53.2 ± 10.5 歳, 男性3例, 女性2例, NYHA / / + 度: 0/0/5), 急性冠症候群7例(64.3 ± 8.1 歳, 男性6例, 女性1例, NYHA / / + 度: 3/1/3), 安定狭心症18例, そのうち安定労作性狭心症7例(60.3 ± 9.1 歳, 男性5例, 女性2例, NYHA / / + 度: 5/2/0), 安定異型狭心症11例(62.8 ± 9.4 歳, 男性10例, 女性1例, NYHA / / + 度: 9/2/0)である。正常対照患者も当施設に同時期に入院した対照群4例(56.8 ± 8.8 歳, 男性3例, 女性1例)であり、すべて胸痛症候群患者である。

2. 方法

すべての拡張型心筋症例には冠動脈造影および心内膜生検を行い、拡張型心筋症の診断を下した⁵⁾。左室駆出率は左室造影法より計測した。急性冠症候群は、3週間以内に心電図異常の出現もしくはクレアチンキナーゼMB分画の上昇を伴い、安静時に虚血による胸痛を有した患者とした。安定狭心症の診断は、過去1ヵ月の間に新たな狭心痛の出現もしくは症状の悪化を認めないものとした。労作性狭心症の診断は、冠動脈造影上で有意狭窄を認め、労作時に胸痛とともに心電図上で一過性のST部分の低下を伴うものとした。異型狭心症の診断は安静時に胸痛とともに心電図上で一過性のST部分の上昇もしくは低下を伴い、冠動脈造影上でアセチルコリン負荷により冠動脈の攣縮を認めるものとした⁶⁾。

患者の血清は、朝食前空腹時に肘静脈より採取した。遠心分離後の血清は、測定するまで -70°C で保存した。前述のように⁷⁾、サンドイッチenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて血清チオレドキシシン値を測定した。キットは、富士レビオ製のものを用いた。血清チオレドキシシン値は、平均 \pm 標準偏差で表記し、各群間の統計学的比較には分散分析法を用いた。分散分析法において有意差が認められたとき、さらにFisher's protected least significant difference法に

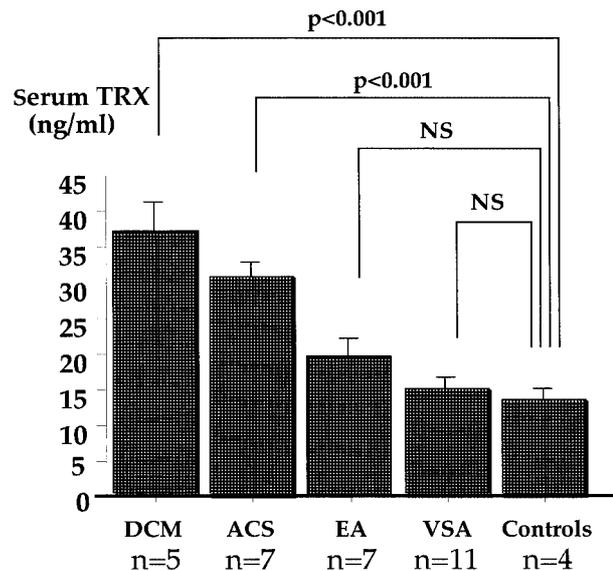


Fig. 1 Serum thioredoxin levels in patients with dilated cardiomyopathy, acute coronary syndrome and stable angina, and control subjects

* $p < 0.001$ vs control. Values are expressed as mean \pm SD.

DCM = dilated cardiomyopathy; ACS = acute coronary syndrome; EA = stable effort angina; VSA = stable vasospastic angina; TRX = thioredoxin.

より、各群間の比較を行った。 $p < 0.05$ を有意差の判定とした。

結 果

1. 各群間における血清チオレドキシシン値の比較

今回の症例において血清チオレドキシシン値は、年齢、性別、喫煙、血清総コレステロール値、高血圧ならびに糖尿病合併症と相関が認められなかった。各群の血清チオレドキシシン値をFig. 1に記した。拡張型心筋症($36.9 \pm 8.6 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$)および急性冠症候群($30.6 \pm 4.9 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$)のチオレドキシシン値は、対照群($13.0 \pm 4.9 \text{ ng/ml}$)に比べて有意な上昇を認めた。しかしながら、安定狭心症群($16.8 \pm 5.7 \text{ ng/ml}$, $p = 0.27$)では対照群と比べて有意な血清チオレドキシシン値の上昇は認められなかった。さらに安定狭心症群において安定労作性狭心症群($19.4 \pm 6.3 \text{ ng/ml}$)と安定異型狭心症群($15.1 \pm 4.7 \text{ ng/ml}$)との間には有意差は認められなかった($p = 0.64$)。

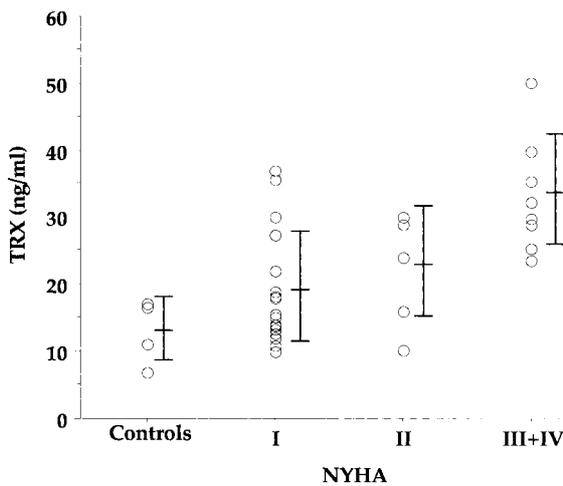


Fig. 2 Comparison of the serum thioredoxin levels between patients with New York Heart Association , and plus , and control subjects

A significant difference was found between patients with NYHA plus and control subjects, but no significant differences between patients with NYHA or and control subjects.

* $p < 0.001$ vs control subjects.

NYHA = New York Heart Association. Other abbreviation as in Fig. 1.

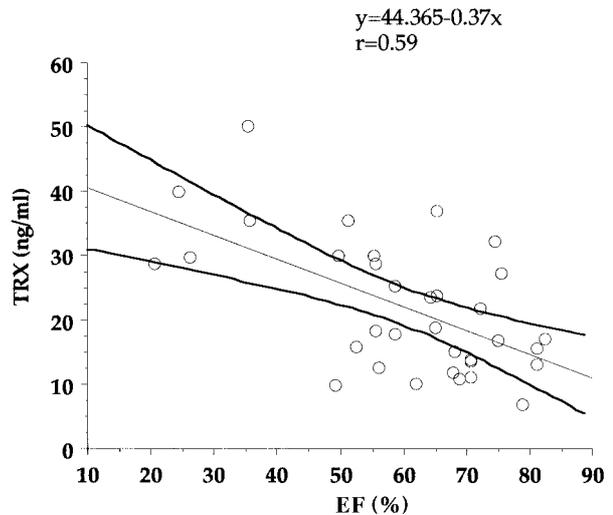


Fig. 3 Relationship between serum thioredoxin levels and left ventricular ejection fraction

The serum thioredoxin levels were inversely correlated with left ventricular ejection fraction ($r = 0.59, p < 0.001$) in all subjects.

Bold lines indicate the $\pm 95\%$ reliability zone.

EF = ejection fraction. Other abbreviation as in Fig. 1.

2. 血清チオレドキシン値と心不全の重症度の相関

血清チオレドキシン値と心不全の重症度の指標であるNYHA分類の相関を検討したところ、Fig. 2に示すようにNYHA 度群 (17例, $19.1 \pm 8.5 \text{ ng/ml}, p = 0.19$) およびNYHA 度群 (5例, $21.8 \pm 8.6 \text{ ng/ml}, p = 0.11$) では対照群と比べて有意差は認められなかった。しかしながら、NYHA + 度群では対照群に比べて有意差をもって血清チオレドキシン値は上昇していた(8例, $33.3 \pm 8.6 \text{ ng/ml}, p < 0.001$)。さらにFig. 3に示すように、血清チオレドキシン値と左室造影法より計測した左室駆出率との間には有意な負の相関が認められた($r = 0.59, p < 0.001$)。

考 察

本研究において急性冠症候群や拡張型心筋症で血清チオレドキシン値が上昇することが明らかになった。さらに血清チオレドキシン値は、心不全の重症度の指標であるNYHA分類と正の相関を示し、左室駆出率とは負の相関を示すことが明らかになった。これらのことより、血清チオレドキシン値と心不全の重症度と

の間には関連がある可能性が示唆された。

酸化ストレスと左室機能不全の間に明らかな関連性が示唆され、とりわけ酸化ストレスは左室リモデリングに関与することが報告されている^{1,8)}。また、心不全患者では、血中の酸化脂質の割合が亢進し、左室駆出率とは負の相関を示すことが報告されている²⁾。これら心不全と酸化ストレスの関連には、以下のような機序が働いていることが考えられている。すなわち、不全心において心筋収縮性は圧負荷や容量負荷によって低下しているが、これにより相対的に心筋虚血が生じ、この心筋虚血により活性酸素種が生じる。虚血によって生じた活性酸素種は、膜脂質やイオンチャンネルに酸化的な変化を生じることから、虚血によって誘導された傷害をより悪化させる^{9,10)}。さらに不全心では抗酸化酵素の減少やカテコールアミンなどの増加が活性酸素種の産生を亢進させる¹¹⁾。さらに虚血による細胞内のpHの低下は、プロスタグランジンやロイコトリエンの産生を促すが、この産生系においても活性酸素種は産生される。またロイコトリエンB₄は多核白血球を活性化し、多核白血球により活性酸素種は分泌される^{12,13)}。以上のような機序で不全心に増加した活性酸素種は、筋小胞体におけるCaの結合や取り込

みを抑制することによって、さらに心筋の収縮性を低下させる¹⁴⁾。このように、活性酸素種は、心不全の病態に関与するのみならず、心不全をより悪化させる因子であることが示唆される。

一方、チオレドキシシおよびそのファミリー分子群は、酸化還元を調節するレドックス制御分子として細胞内の情報伝達の調節に関わることが明らかになっている⁴⁾。大腸菌のDNA合成に必須な酵素であるリボヌクレオチドレダクターゼにニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソンのプロトンを提供する補酵素として発見された。その後、1989年、成人T細胞白血病由来因子としてチオレドキシシがクローニングされたことを契機として、ヒトチオレドキシシを中心にその生物活性とチオレドキシシの関与するレドックス調節によるシグナルカスケードに対する研究が現在進んでいる¹⁵⁾。チオレドキシシは、-Cys-Gly-Pro-Cys-という活性部位を有しており、2つのシステイン残基の間で-S-S-結合を作る酸化型と-SH-SHの還元型が存在し、還元型チオレドキシシは、基質蛋白のジスルフィド結合を還元し、自らは酸化型となる。再びニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソンの酸とチオレドキシシレダクターゼにより還元型に還元される。チオレドキシシは、種々の酸化ストレスにより誘導され、チオレドキシシ依存性ペルオキシダーゼであるペルオキシレドキシシとともに活性酸素種消去作用を示すほか、核内では、種々の転写因子のDNA結合を制御する。さらに細胞外に放出され、サイトカイン・ケモカイン様作用を示す⁴⁾。また、いくつかの薬剤では、チオレドキシシを誘導することで細胞防御的に働くことが明らかにされつつある¹⁶⁾。チオレドキシシを生体内で過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いた実験では、脳虚血再灌流モデルにおいて臓器障害は抑制された。このことより、虚血再灌流障害において内因性レドックスの活性化は有効であることが示されて

いる¹⁷⁾。

心疾患では、チオレドキシシはラット心臓再灌流モデルにおいて再灌流性不整脈の抑制に有効であることが報告された¹⁸⁾。また、ヒト動脈硬化巣においてチオレドキシシの発現の亢進が認められ、バルーンによる障害を受けたラット動脈壁においてもチオレドキシシの発現の亢進が認められた¹⁹⁾。ラット自己免疫性心筋炎モデルにおいては、急性期の病変部の炎症浸潤細胞と傷害心筋においてチオレドキシシの発現の亢進が認められた²⁰⁾。臨床患者においても急性心筋炎患者の血清チオレドキシシ値が亜急性期に上昇していた²¹⁾。以上のことより、本研究において重症心不全患者における血清チオレドキシシ値の上昇は、心不全によって増加した活性酸素種を消去するため代償性にチオレドキシシの産生が生体において亢進したためと推察される。今回の検討では、拡張型心筋症と急性冠症候群で血清チオレドキシシ値の上昇を認めたが、急性冠症候群と拡張型心筋症では、心筋虚血の程度が異なっていると考えられることや、急性冠症候群では、動脈硬化巣や不安定プラークの影響が血清チオレドキシシ値に与える影響も考えられることから¹⁹⁾、この2疾患におけるチオレドキシシ値上昇の背景は異なっている可能性がある。今後、動脈硬化や不安定プラークと血清チオレドキシシ値との関係について明確にする必要がある。また、今回の検討では、血清チオレドキシシ値が左室駆出率との間に良好な負の相関を認めた。今後、血清チオレドキシシ値と脳性Na利尿ペプチドをはじめとした心不全の指標や左室拡張能との関連についても明確にする必要がある。

結 論

サンドイッチELISA法を用いて測定した心不全患者の血清チオレドキシシ値は、心不全の重症度と関連することが示唆された。

要 約

目的: 心疾患の進展において酸化ストレスの増加が関与していることが示されている。しかしながら、心疾患を有する患者において、レドックス調節蛋白であるチオレドキシシの血中濃度の検討については報告が少ない。心不全を有する患者の血清チオレドキシシ値の臨床的な重要性について評価した。

方 法: 心疾患を有する患者34例〔拡張型心筋症5例、急性冠症候群7例、安定狭心症18例、安定

労作性狭心症7例および安定異型狭心症11例), 対照群4例)の血清を用いてチオレドキシン値をサンドイッチELISA法により測定した。

結果: 拡張型心筋症($36.9 \pm 8.6 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$)および急性冠症候群($30.6 \pm 4.9 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$)のチオレドキシン値は, 対照群($13.0 \pm 4.9 \text{ ng/ml}$)に比べて有意な上昇を認めしたが, 安定狭心症($16.8 \pm 5.7 \text{ ng/ml}$, $p = 0.27$)では対照群に比べて有意な上昇を認めなかった。NYHA心機能分類度および度の患者(8例, $33.3 \pm 8.6 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$)の血清チオレドキシン値は, 対照群に比べて有意な上昇を認めた。また, 血清チオレドキシン値は, 左室駆出率と負の相関($r = 0.59$, $p < 0.001$)を示した。

結論: 血清チオレドキシン値は心不全の重症度と相関することが示唆された。

—J Cardiol 2002 Aug; 40(2): 59 - 63—

文 献

- 1) Ghatak A, Brar MJ, Agarwal A, Goel N, Rastogi AK, Vaish AK, Sircar AR, Chandra M: Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol* 1996; **57**: 119 - 127
- 2) Belch J, Bridges AB, Scott N, Chopra M: Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 1991; **65**: 245 - 248
- 3) Chandra M, Chandra N, Agrawal R, Kumar A, Ghatak A, Pandey VC: The free radical system in ischemic heart disease. *Int J Cardiol* 1994; **43**: 121 - 125
- 4) Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J: Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 351 - 369
- 5) Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyrfas 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) Kishimoto C, Lee JD, Shimizu H, Ueda T, Maruya E, Saji H: HLA antigens in patients with variant angina in Japan. *Int J Cardiol* 1999; **70**: 249 - 252
- 7) Nakamura H, De Rosa S, Roederer M, Anderson MT, Dubs JG, Yodoi J, Holmgren A, Herzenberg LA, Herzenberg LA: Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 1996; **8**: 603 - 611
- 8) Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR: Free radicals and myocardial injury : Pharmacologic implications. *Circulation* 1986; **74**: 1 - 5
- 9) McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; **312**: 159 - 163
- 10) Katz AM: Cellular mechanisms in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1988; **62**: 3A - 8A
- 11) Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF: Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol* 1978; **14**: 644 - 653
- 12) Henry TD, Archer SL, Nelson D, Weir EK, From AH: Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990; **67**: 1453 - 1461
- 13) Mullane K, Barst S, McGiff JC: Leukotrienes in myocardial ischemia. *Prog Clin Biol Res* 1985; **199**: 127 - 140
- 14) Hess ML, Okabe E, Kontos HA: Proton and free oxygen radical interaction with the calcium transport system of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 1981; **13**: 767 - 772
- 15) Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N, Arai K, Yokota T, Wakasugi H, Yodoi J: ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin: Possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J* 1989; **8**: 757 - 764
- 16) Hirota K, Nakamura H, Arai T, Ishii H, Bai J, Itoh T, Fukuda K, Yodoi J: Geranylgeranylacetone enhances expression of thioredoxin and suppresses ethanol-induced cytotoxicity in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 825 - 830
- 17) Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J: Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 4131 - 4136
- 18) Aota M, Matsuda K, Isowa N, Wada H, Yodoi J, Ban T: Protection against reperfusion-induced arrhythmias by human thioredoxin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; **27**: 727 - 732
- 19) Takagi Y, Gon Y, Todaka T, Nozaki K, Nishiyama A, Sono H, Hashimoto N, Kikuchi H, Yodoi J: Expression of thioredoxin is enhanced in atherosclerotic plaques and during neointima formation in rat arteries. *Lab Invest* 1998; **78**: 957 - 966
- 20) Shioji K, Kishimoto C, Nakamura H, Toyokuni S, Nakayama Y, Yodoi J, Sasayama S: Upregulation of thioredoxin (TRX) expression in giant cell myocarditis in rats. *FEBS Lett* 2000; **472**: 109 - 113
- 21) Shioji K, Matsuura Y, Iwase T, Kitaguchi S, Nakamura H, Yodoi J, Hashimoto T, Kawai C, Kishimoto C: A case report of successful immunoglobulin treatment for fulminant myocarditis with analysis of serum thioredoxin (TRX). *Jpn Circ J* 2002; **66** [in press]