

regulated by PU.1 in myeloid and B cells (26), it is not surprising that PU.1 plays a crucial role in ILT transcription. To a lesser extent, Sp1 family transcription factors also affected *trans*-activation of ILT2/4, especially ILT2. Because Sp1 is ubiquitously expressed and regulates a large number of genes (27), this may explain the wide tissue distribution of ILT2. In contrast, it is intriguing that transcription of the activating receptor ILT1 is regulated by a unique mechanism. In addition to PU.1, Runx1 (also termed AML1) was important for the transcriptional activity of ILT1. Runx1 is a member of the *runt* family of transcription factors, which is absolutely required for hematopoiesis and is involved in leukemogenesis (28–30). Runx1 functions in numerous gene promoters and is known to interact with *ets* family transcription factors Ets-1 and PU.1 to cooperate in the regulation of TCR α and β enhancers and the M-CSF promoter, respectively (31–33). This corresponds to our findings that Runx1 and PU.1 bound to the ILT1 core promoter in close proximity and cooperated. Furthermore, the Runx1 binding motif TGTGGT was carried only by ILT1, but not by ILT2/4 (TGTGGC; Fig. 1A), supporting the idea that ILT1 alone uses this region as a promoter. The ILT1 core promoter also possesses a heat shock element. Among the NKG2 family of NK receptors, the stimulatory NKG2D receptor recognizes the stress-inducible ligands, MHC class I-related chain A and MHC class I-related chain B (4). As the ligand for ILT1 has not been identified yet, it may possibly be a stress- or heat shock-related protein.

Chromatin remodeling is largely involved in modulation of the immune system, such as controlling Th1 and Th2 deviation or V(D)J recombination (34–36). Open chromatin is characterized by hyperacetylation of associated histones as well as the increased accessibility of transcription factors (37). In our study treatment of cells with TSA enhanced the expression of ILT4, and high levels of histone acetylation and chromatin opening at the ILT4 core promoter locus were observed only in myeloid cells. Thus, chromatin remodeling by histone acetylation contributes to the strictly limited expression of ILT4 within myeloid lineage cells only. The effects of histone acetylation appear to be different between KIR family and ILT family gene expression, because it was recently reported that KIR expression was controlled by DNA methylation, and TSA treatment did not result in the induction of KIR gene expression (38, 39). The mechanisms controlling chromatin structure of the ILT locus remain to be determined; however, there may exist regions that recruit chromatin remodeling factors and affect the transcription of ILT genes in distant locations. In many genes distal regulatory elements, designated locus control regions, can cooperate with proximal promoters by opening local chromatin and maintaining a transcriptionally competent domain that confers tissue-specific and physiological levels of transcription.

A wealth of information has now been accumulated on genomics, structure, distribution, and biochemical and functional characteristics of ILT family receptors. Recently, CD8⁺CD28⁻ alloantigen-specific T suppressor cells were reported to up-regulate ILT3 and ILT4 (40). Although ILTs are certain to modulate the function of myeloid cells, their physiological significance is still largely unknown. HCMV is a major pathogen in immunocompromised individuals, and an active infection usually leads to mortality. Although primary infection elicits an immune response through the

production of various inflammatory cytokines, the response is insufficient to eliminate the virus, and life-long infection persists (16, 41). HCMV has strategies to subvert the immune system, for example, down-regulation of HLA class I molecules and expression of UL-18 to escape from recognition of infected cells by virus-specific T cells and NK cells, respectively (42–45). Myeloid cells, such as monocytes and tissue macrophages, play prominent roles in the host response to HCMV infection and are also an important reservoir during latent infection. HCMV infection of monocytes results in synthesis only of the IE and early gene products, which are critical factors in immunosuppression and have a dramatic influence on monocyte function (46–48). Our experiments showed that HCMV selectively *trans*-activated the ILT2 and ILT4 promoters through the expression of IE1 and IE2 proteins. These results present a potential new mechanism of immune evasion by HCMV to suppress the function of myeloid cells through up-regulation of inhibitory ILTs.

Acknowledgments

We thank Dr. Kayoko Maehara for technical advice, and Dr. Kerry S. Campbell for reading the manuscript. We are grateful to Drs. Thomas Shenk, Yoshiaki Ito, Jennifer Morris, Adam Geballe, Shigekazu Nagata (Osaka University), and Michael Atchison (Pennsylvania State University) for generous gifts of plasmid constructs.

References

- Colonna, M., H. Nakajima, and M. Cella. 2000. A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *Semin. Immunol.* 12:121.
- Moretta, L., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari, and A. Moretta. 2000. Human NK-cell receptors. *Immunol. Today* 21:420.
- Ravetch, J. V., and L. L. Lanier. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science* 290:84.
- McQueen, K., and P. Parham. 2002. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr. Opin. Immunol.* 14:615.
- Nakajima, H., J. Samaridis, L. Angman, and M. Colonna. 1999. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor γ -chain. *J. Immunol.* 162:5.
- Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, and M. L. Hsu. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7:273.
- Trowsdale, J., R. Barten, A. Haude, C. A. Stewart, S. Beck, and M. J. Wilson. 2001. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol. Rev.* 181:20.
- Barten, R., M. Torkar, A. Haude, J. Trowsdale, and M. J. Wilson. 2001. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol.* 22:52.
- Volz, A., H. Wende, K. Laun, and A. Ziegler. 2001. Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex. *Immunol. Rev.* 181:39.
- Vilches, C., and P. Parham. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 20:217.
- Berg, L., G. C. Riise, D. Cosman, T. Bergstrom, S. Olofsson, K. Karre, and E. Carbone. 2003. LIR-1 expression on lymphocytes, and cytomegalovirus disease in lung-transplant recipients. *Lancet* 361:1099.
- Andrews, N. C., and D. V. Faller. 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19:2499.
- Hamajima, F., T. Hasegawa, I. Nakashima, and K. Isobe. 2002. Genomic cloning and promoter analysis of the GAHSP40 gene. *J. Cell. Biochem.* 84:401.
- Hromas, R., B. Davis, F. J. Rauscher III, M. Klemsz, D. Tenen, S. Hoffman, D. Xu, and J. F. Morris. 1996. Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211:159.
- Wang, L. L., D. T. Chu, A. O. Dokun, and W. M. Yokoyama. 2000. Inducible expression of the gp49B inhibitory receptor on NK cells. *J. Immunol.* 164:5215.
- Geist, L. J., M. M. Monick, M. F. Stinski, and G. W. Hunninghake. 1994. The immediate early genes of human cytomegalovirus upregulate tumor necrosis factor- α gene expression. *J. Clin. Invest.* 93:474.
- Kline, J. N., L. J. Geist, M. M. Monick, M. F. Stinski, and G. W. Hunninghake. 1994. Regulation of expression of the IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) gene by

to PCR products containing 0.05–0.5% of the total amount of chromatin. *E*, THP-1 and U937 cells were infected with the AD169 strain of HCMV. After 48-h virus exposure, RNA was extracted, and RT-PCR was performed. The fold increase in quantity as measured by real-time PCR is indicated under the band for each gene. *F*, HCMV IE expression vectors pEQ274 (IE1), pEQ276 (IE1+IE2), pEQ326 (IE2), and control promoter vector (pEQ336) were cotransfected with ILT reporter constructs into THP-1 cells. The fold increase in cotransfectants is shown after normalization to relative light units (RLU) of reporter constructs alone (mean \pm SD).

- products of the human cytomegalovirus immediate early genes. *J. Immunol.* 152:2351.
18. Hagemeyer, C., R. Caswell, G. Hayhurst, J. Sinclair, and T. Kouzarides. 1994. Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *EMBO J.* 13:2897.
 19. Lang, D., S. Gebert, H. Arlt, and T. Stamminger. 1995. Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB. *J. Virol.* 69:6030.
 20. Wara-aswapati, N., Z. Yang, W. R. Waterman, Y. Koyama, S. Tetradis, B. K. Choy, A. C. Webb, and P. E. Auron. 1999. Cytomegalovirus IE2 protein stimulates interleukin 1 β gene transcription via tethering to Spi-1/PU.1. *Mol. Cell. Biol.* 19:6803.
 21. Scott, E. W., M. C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265:1573.
 22. Olson, M. C., E. W. Scott, A. A. Hack, G. H. Su, D. G. Tenen, H. Singh, and M. C. Simon. 1995. PU.1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. *Immunity* 3:703.
 23. McKercher, S. R., B. E. Torbett, K. L. Anderson, G. W. Henkel, D. J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A. J. Feeney, G. E. Wu, C. J. Paige, et al. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 15:5647.
 24. Anderson, K. L., K. A. Smith, K. Connors, S. R. McKercher, R. A. Maki, and B. E. Torbett. 1998. Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* 91:3702.
 25. DeKoter, R. P., and H. Singh. 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288:1439.
 26. Klemsz, M. J., and R. A. Maki. 1996. Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains. *Mol. Cell. Biol.* 16:390.
 27. Courey, A. J., D. A. Holtzman, S. P. Jackson, and R. Tjian. 1989. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* 59:827.
 28. Okuda, T., J. van Deursen, S. W. Hiebert, G. Grosveld, and J. R. Downing. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84:321.
 29. Yergeau, D. A., C. J. Hetherington, Q. Wang, P. Zhang, A. H. Sharpe, M. Binder, M. Marin-Padilla, D. G. Tenen, N. A. Speck, and D. E. Zhang. 1997. Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat. Genet.* 15:303.
 30. Look, A. T. 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278:1059.
 31. Giese, K., C. Kingsley, J. R. Kirshner, and R. Grosschedl. 1995. Assembly and function of a TCR α enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* 9:995.
 32. Sun, W., B. J. Graves, and N. A. Speck. 1995. Transactivation of the Moloney murine leukemia virus and T-cell receptor β -chain enhancers by cbf and ets requires intact binding sites for both proteins. *J. Virol.* 69:4941.
 33. Petrovick, M. S., S. W. Hiebert, A. D. Friedman, C. J. Hetherington, D. G. Tenen, and D. E. Zhang. 1998. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBP α synergize with different regions of AML1. *Mol. Cell. Biol.* 18:3915.
 34. Agarwal, S., and A. Rao. 1998. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9:765.
 35. McMurry, M. T., and M. S. Krangel. 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science* 287:495.
 36. Fields, P. E., S. T. Kim, and R. A. Flavell. 2002. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN- γ loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J. Immunol.* 169:647.
 37. Narlikar, G. J., H. Y. Fan, and R. E. Kingston. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475.
 38. Santourlidis, S., H. I. Trompeter, S. Weinhold, B. Eisermann, K. L. Meyer, P. Wernet, and M. Uhrberg. 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J. Immunol.* 169:4253.
 39. Chan, H. W., Z. B. Kurago, C. A. Stewart, M. J. Wilson, M. P. Martin, B. E. Mace, M. Carrington, J. Trowsdale, and C. T. Lutz. 2003. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 197:245.
 40. Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, et al. 2002. Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 28:28.
 41. Dudding, L., S. Haskill, B. D. Clark, P. E. Auron, S. Sporn, and E. S. Huang. 1989. Cytomegalovirus infection stimulates expression of monocyte-associated mediator genes. *J. Immunol.* 143:3343.
 42. Tortorella, D., B. E. Gewurz, M. H. Furman, D. J. Schust, and H. L. Ploegh. 2000. Viral subversion of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 18:861.
 43. Loenen, W. A., C. A. Bruggeman, and E. J. Wiertz. 2001. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Semin. Immunol.* 13:41.
 44. Xu, X. N., G. R. Screaton, and A. J. McMichael. 2001. Virus infections: escape, resistance, and counterattack. *Immunity* 15:867.
 45. Orange, J. S., M. S. Fasset, L. A. Koopman, J. E. Boyson, and J. L. Strominger. 2002. Viral evasion of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 3:1006.
 46. Rice, G. P., R. D. Schrier, and M. B. Oldstone. 1984. Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6134.
 47. Rodgers, B. C., D. M. Scott, J. Muddin, and J. G. Sissons. 1985. Monocyte-derived inhibitor of interleukin 1 induced by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 55:527.
 48. Kapasi, K., and G. P. Rice. 1986. Role of the monocyte in cytomegalovirus-mediated immunosuppression in vitro. *J. Infect. Dis.* 154:881.

1. ストレスと老化

磯部 健一

Key words: ストレス, 老化, 生体防御

(日老医誌 2003; 40: 565—568)

はじめに

高齢化社会の到来とともに、ひとはなぜ老いるのか？といった、古くからの難問が、社会的に重要な意味を持ってきた。高齢者の疾患は老化の結果として起こるものが少なくないこと、また、いかに肉体的、精神的老化を予防し、活力ある生活をおくるかといった課題に老化研究が果たす役割は大きい。さて、環境ストレス、それによって発生する、あるいは代謝によって発生するラジカルが老化の原因となるとする説はほぼ確立され¹⁾、現在そのメカニズムが盛んに研究されている。最近、ES細胞を含めた幹細胞の研究が発達してきた。生体は最終分化した細胞と幹細胞、分化途中の細胞で構成されている。ここでは、老化研究の対照を幹細胞と最終分化後に分けて考えることで、今までの研究成果を整理し、新しい展望を考える。ところで、ひとを含めた高等動物は神経免疫系を発達させてきた。このことが、下等動物の老化に加えて考えるべき大きな要素である。後半このことを述べる。

幹細胞の老化と最終分化後の老化

私達のからだは受精卵が分化し、肝臓、心臓、脳といった臓器がつくられていくのであるが、その共通した発生、分化過程が近年明らかになってきた。生体には異なる発生段階での幹細胞 (stem cell) が存在し、一部の幹細胞は成長後も、臓器の決まった部位で支持細胞 (feeder cells) に支えられ分裂をくり返しているが、最終分化のあと、分裂せずにある期間組織細胞として生存する (図 1)。例えば、血液細胞は骨髄の stroma に支えられて、血液幹細胞として、リンパ球、顆粒球、マクロファージ、赤血球を分化により産生しつづけるとともに、一部は分

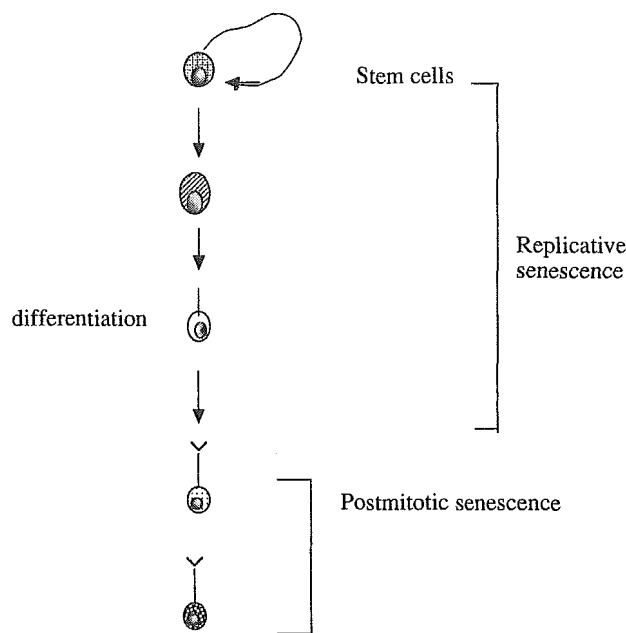


図 1 Two types of senescence

化せずに分裂をくりかえしている。この幹細胞の寿命は細胞の分裂寿命 (replicative senescence) として、そのメカニズムが研究されている。ところで、最終分化のあとも、神経細胞は長く生存していると考えられている。最終分化のあとどれくらい生きられるかは細胞の種類によって大きく異なる。その老化のメカニズムは分裂寿命とは異なるメカニズムが存在すると考えられる (postmitotic senescence)。

分裂寿命と細胞のストレス応答系

現在までに細胞老化として比較的詳しく研究されてきたのは線維芽細胞のみである。線維芽細胞に寿命があるといったのはヘイフリックである²⁾。線維芽細胞を培養すると、人では 50 回程で、マウスでは 10 回以内の分裂で寿命が来る。(マウスでは分裂停止後、一部の細胞が変

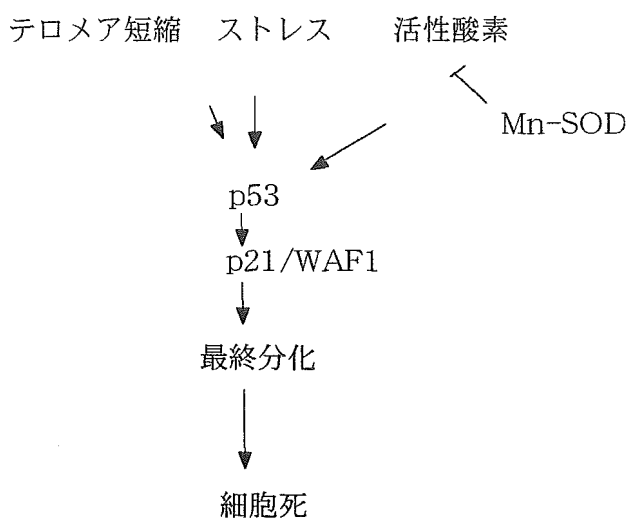


図2 細胞老化

異し、増殖がはじまる)。分裂寿命時期に癌抑制遺伝子である p53 がリン酸化され、p21/WAF1 といった細胞分裂周期を停止させる蛋白発現が上昇する。細胞に、放射線、紫外線、アルキル化剤を加え、ストレス応答を誘起する時におけるストレス応答系と同じシグナル伝達系を細胞は使用している。線維芽細胞は分裂に従いテロメアが短くなり、これが細胞のストレス応答系を活性化して (p53 のリン酸化も考えられている)、分裂を停止させていると考えられる (図2)。最近、リン酸化 p53 を過剰発現させたマウスの寿命がわずかであるが短縮することが報告された³⁾。老化は筋、肝等一部の組織であるが、重要なことは細胞老化が個体の老化とも関係するということである。幹細胞の分裂寿命が p53 の影響する組織で短縮していると考えられることができる。からだのなかにある幹細胞は寿命があるのか? Raff のグループはオリゴデンドロサイトを培養すると分裂寿命がなくなり、分裂しつづけることを報告した⁴⁾。また、消化管の幹細胞は 1,000 回以上分裂することが確かめられている⁵⁾。幹細胞の分裂寿命は組織によって違うと考えられる。ただ、分裂寿命が長くても、幹細胞が老化により機能を持つ細胞に分化できるかどうかは問題である。ごく最近血液幹細胞で老化による変化が調べられた。マウスでは純系といって遺伝的背景が全く同じ系統が多数樹立されている。老化の研究は C57BL/6 (B6) 系が頻用されているが、驚いたことに、このマウスの血液幹細胞は老化すると数が増えるのである。ところが放射線照射マウスに細胞移入して、血液幹細胞の機能を調べてみると、老化により血球への分化能が減弱することがわかった。B6 以外の系統ではこの機能がされに弱まっていること

が判明した。B6 と DBA/2 の HSC をまぜて放射線照射マウスに移入すると B6 のみから赤血球が産生される。B6 が他の系統に比べ長生きなのは HSC の再生能の差、さらには免疫能の差と考えることもできる⁶⁾。血液幹細胞の老化に 2 つの可能性が考えられる。1 つは細胞そのものの成分がストレスにより老化 (遺伝子変異、蛋白変異等) した可能性、もう 1 つは支持組織が老化し、そこから分泌されるファクターが血液幹細胞の機能をささえられなくなった可能性である。

最終分化した細胞の老化と生体防御

神経細胞は個体内で多くが一生涯、すなわち 100 年も生存可能である。私たちは、分化した神経細胞の老化モデルとして、脳青斑核ニューロンを選んだ。脳のストレス応答器官である青斑核はノルアドレナリン含有ニューロンの集まった小さな組織である。ここから全脳に軸索を投射しているが、とりわけ海馬・大脳皮質といった高次機能に関連した部位に密に投射している。青斑核ニューロンは生体にとって、生存を脅かす危機的ストレスに反応し、スパイクの数を増加させ、脳をいわば覚醒状態に保つ働きがある。事実、我々は痛み、血圧低下といった刺激でスパイク数の増加を観察している。私達は約 3 年の寿命であるラットを使い、老化に伴い青斑核ニューロン活動の変化、その神経軸索の数の変化をそれぞれ、電気生理学的、組織学的に検索した。その結果、海馬・前頭葉への投射は加齢に伴い減少するが、驚いたことに、15 月齢を境に投射部位に残った軸索終末で発芽がおこることが明らかになった⁷⁾。このことは、加齢に伴う、軸索の減少を防御する生体防御系が存在することを意味する (図3)。この神経細胞の老化には主として ROS が関与すると考えられている。酸化ストレスと老化の関係はすぐれた総説があるため、ここでは省く⁸⁾。ROS が老化に重要な役割を持つことは線虫の研究でも明らかにされた。ミトコンドリア内にある遺伝子の変異体は短寿命になることが報告されている⁹⁾。人の脳では老化に伴い、神経変性疾患が増加してくる。アルツハイマー病では、異常蛋白 (ペプチド) が脳の細胞外に蓄積し、老人斑を形成する。また、神経細胞内に Tau 蛋白が認められるようになる。アルツハイマー病では遺伝子変異が関与する例 (PS1, APP 変異) が報告されているが、その発症に異常蛋白凝集により引き起こされるストレス応答 (unfolded protein response; UPR) の関与が示唆される。最近 UPR に関与する蛋白 (GCN2, PKR, PERK, HRI) が endoplasmic reticulum (ER) ストレスにより誘起され、細胞の蛋白合成を遮断することが明らかにされた。私達

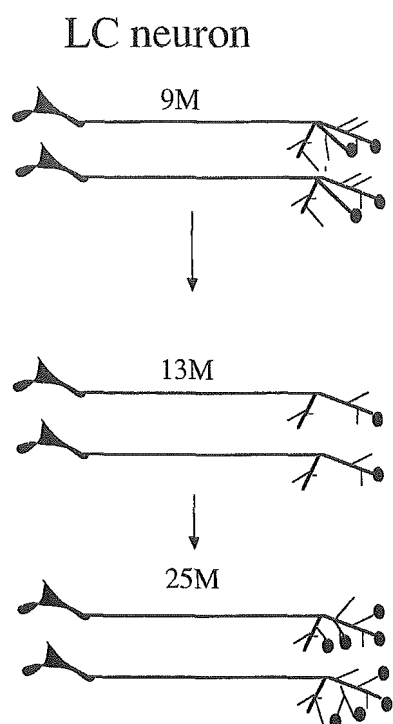


図3 神経細胞の老化と防御

はDNA傷害性ストレス，酸化ストレスで発現が上昇することが知られているGADD34がERストレスで強く誘導され，蛋白合成遮断からの回避に働くことを遺伝子欠損マウスで明らかにした¹⁰⁾。

精神的ストレスと老化

私達の体は精神的ストレスに反応し，様々な応答をしている。この精神的ストレスはなかなか科学的に解明されるまでいかないが，それでも，事実として存在する。一般的には，脳を介して，交感神経が反応し，また，副腎からホルモンが産生され，いわゆる攻撃的反応(心臓の拍動の亢進，血管収縮等)，それに続く副交感神経による安静期の反応を行うことにより，生体の恒常性が保たれている。マウス，ラットに精神的ストレスを加える実験に拘束ストレスの実験がある。私達は，マウスを1晩拘束すると免疫系，とりわけ胸腺細胞の減少によるT細胞機能異常がおこることを観察している。ところが，このマウスの血液を調べたところ強い血液凝固系の機能亢進がみられた。PAI-1(plasminogen activator-1)の血液中，あるいは組織での発現上昇がみられ，腎臓に血栓が観察された。老化にともなって，血栓傾向は増加した。このことは，高齢者の脳血栓，心筋梗塞を考える上に重要である¹¹⁾。

感染ストレスと老化

高齢者は感染症でなくなるのがきわめて多い。全身状態が悪くなると敗血症になる可能性がある。LPSは細菌外膜の成分であり，血中に入ると敗血症の原因となる。LPSによりROS, NO産生が起これミトコンドリアのDNA欠損がおこる。その結果呼吸鎖をコードするNADH dehydrogenase subunit 1.2あるいはcytochrome C oxidase subunit 1の活性が低下する¹²⁾。私達はLPSがPAI-1の発現を上昇させ，血栓傾向が上昇することを見出した。若いマウスに比べ老化マウス程この傾向が強いことが判明した¹³⁾。生体はROSに対してはSOD, Catalase, Glutathione peroxidaseといったROS消去酵素を発達させてきた。私達はLPSあるいはLPSにより産生されるサイトカインTNF- α やIL-1がミトコンドリアに存在するMn-SODを強く発現することを報告した¹⁴⁾。生体は活性酸素を放出することで外敵をやっつけているのであるが，それが，老化を進行させてしまう。細胞はROSから身をまもるため，Mn-SODをはじめとした防御系を発達させた。この防御系はまた老化の防御にもなっている。

まとめ

老化の研究は生物学，医学の進歩によって，より深くなっていくように思える。今までに，酸化ストレス，Hayflick Limit, カロリー制限の理論が広く行き渡っているが，今後の発展により，これらの説も，変更を余儀無くされる可能性を秘めている。私達は老化を研究するにあたって生物科学一般の研究成果を取り入れることが重要であると考え。また，老化によって表れる病気の理解に，老化の研究が役立つことを確信している。本研究は老化機構研究部；城川哲也，石田佳幸，小島英嗣，名古屋大学医学部；山本晃司らとの共同研究による。また，厚生労働省，長寿科学総合研究事業を中心に1部文部科学省の特定研究に援助を受けた。

文 献

- 1) Harman D Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 1957; 2: 298-300.
- 2) Hayflick L: The biology of human aging. Am J Med Sci 1973; 265: 432-445.
- 3) Tyner SD, et al.: Mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. Nature 2002; 415: 45-53.
- 4) Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, Lloyd AC, Raff MC: Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. Science; 2001; 291 (5505):

- 868—871.
- 5) Marshman E, Booth C, Potten CS: The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002 ; 24 : 91—98.
 - 6) Geiger H, Van Zant G: The aging of lymphohematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2002 ; 329—333.
 - 7) Ishida Y, Shirokawa T, Miyaiishi O, Komatsu Y, Isobe K : Age-dependent changes in projections from locus coeruleus to hippocampus dentate gyrus and frontal cortex. *Eur J Neurosci* 2000 ; 12 (4) : 1263—1270.
 - 8) Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000 ; 408 (6809) : 239—247.
 - 9) Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, et al. : A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. 1998 ; 13 ; 394 (6694) : 694—697.
 - 10) Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi F, Hasegawa T, Yamaki K, et al : The function of GADD34 is recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress ; elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB J* Exp in press.
 - 11) Yamamoto K, Takeshita K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Loskutoff DJ, et al. : Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene : implications for stress-induced thrombosis in aged individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 (2) : 890—895.
 - 12) Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA : Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 167 : 570—579.
 - 13) Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Kojima T, Loskutoff DJ : Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis : Increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am J Pathol* 2002 ; 161 (5) : 1805—1814.
 - 14) Maehara K, Hasegawa T, Xiaa H, Takeucia A, Aha R, Isobe K : Cooperative interaction of NF- κ B and C/EBP binding sites is necessary for manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by lipopolysaccharide and interferon-g. *FEBS Letter* 1999 ; 449 : 115—119.
-

【総説】

ストレスと老化

磯部健一、城川哲也

国立長寿医療研究センター・老化機構

はじめに

私達が生をうけ成長し、老いていく過程は遺伝子のプログラムで大きく規定されていることは疑いのない事実である。どんな環境にいても、人の胎生期は10か月、寿命は100才を大きく越えない。ところがなぜ、100才で人がなくなるのかマウスはなぜ2、3年なのか？この難問にまだ答えはでていない。ひとの全遺伝子配列がわかった現在、この難問を解くことができるのか。この疑問に答えるヒントがある。現在、酵母からマウスまで、寿命に関係する可能性のある変異体とらわれている。これらに関係する遺伝子がこの10年程でクローニングされた。ひとでは早老症の1つワーナー症候群の遺伝子がRecQヘリケースであった。そしてわかったことはなにか？寿命に関係する遺伝子の多くがストレス応答に関係するものであった。一方で、ストレス応答の基礎的研究は老化に関して、あるいはそれとは関係なく生物学の基礎研究として進められてきた。最近、活性化p53を過剰発現したマウスの寿命が短くなるという報告があり、癌抑制遺伝子で知られるp53が老化にも関係するということが驚きの声があがっている。ストレス応答蛋白の中心的存在であるp53は世界中で最も基礎研究の進んでいる蛋白の1つである。本総説ではストレスと老化の観点から、過去の老化研究を振り返り、今後の研究戦略を考えてみたい。また、我々の研究を紹介し、ストレスと老化研究への貢献の一端を紹介したい。

1) 代謝量が寿命を決めるのか、ROSが寿命を決めるのか？

人の平均寿命は先進国と発展途上国で大きな差がある。また、先進国でも昔は平均寿命が50才そこそこであった。社会の経済発展によって、大幅に平均寿命が伸びた。しかし、最長寿命はほとんど変わっていない。いったいなにが最長寿命を決定しているのか？現在、最も有力な考え方は代謝それによって産生されるラジカルの量が最長寿命を決めているというものである。Harmanは老化と酸化ストレスの仮説を提唱し、その後多くの老化研究が酸化ストレスと老化の研究に捧げられた。活性酸素は主として代謝により産生され

るため、この説は一代謝の高い動物程寿命が短いという広く知られている説とほぼ同意であると考えられた。代謝率は酸素消費に比例し、カロリー制限は代謝率を下げると思われた。そこで、必要栄養素をみたした上でカロリー制限食を食べさせる実験がマウスでおこなわれ、カロリー制限食を食べた群では、生理的老化が遅れ、寿命が50%以上増加したと報告された^{2,3)}。あとで述べるように、カロリー制限は脳のグルコース受容体に関係し、内分泌系を介した老化により関係が深いと最近報告されている。さて、代謝率とROS産生は比例するであろうか？ほとんどの種で比例していると考えられているが、例外は鳥類と霊長類にあった。鳥類と霊長類は代謝量に比較し、ミトコンドリアROSの産生は弱い。そして、比較的長生きする。言い換えれば鳥類と霊長類は活発に生きてても、ROSの産生が低く長生きすることになる。これらのことから、哺乳類では寿命は代謝でなく、ミトコンドリアROSの産生に比例することが明らかになった⁴⁾。ROSは主としてミトコンドリア電子伝達系で代謝により産生される。多くはComplexIIIのubiquinone-cytochrome c reductaseから、一部はcomplexIのNADH dehydrogenaseからスーパーオキシド(O₂⁻)が産生される。O₂⁻は非常に強力なsuperoxide dismutase (SOD)がこれを消去し、H₂O₂に変える。SODがないと生体細胞は生存できない。H₂O₂はカタラーゼにより水になるが、強力なhydroxyl radical (OH \cdot)に変わりうる。O₂⁻は細胞質でもNADPH oxidaseにより産生される。顆粒球等感染防御にかかわる細胞はNADPH oxidaseからROSを多く産生する。ROSは代謝以外に様々な環境ストレスによって産生される。紫外線、感染、放射線、DNA傷害性薬剤はROSを産生する。紫外線(UVB)はAP-1とNF κ Bを活性化させ、皮膚のmetalloproteinase遺伝子の発現を上昇させ、コラーゲンとエラスチン蛋白を傷害する。このことはSkin aging(photoaging)の原因と考えられている。

ROSが産生されると、核酸、蛋白、脂質に変異が蓄積し、これが老化を引き起こすものになっていると考えられている。環境ストレスはROSを介し、あるいは介さずに直接細胞成分を傷害する(図1)。もちろん、生体は老化するためにROSを産生するだけでなく、ROSは代謝の副産物で有害なごみという側面の他に積極的に生体が防御反応として利用している面もある。鉄は酸化されさびて、ぼろぼろになる。これと同じようなことが生体でもおこる。わかりやすい例は、ブド

連絡先：〒474-8522 愛知県大府市森岡町源吾63-3
Tel: 0562-44-5651 (ext. 832); fax: 0562-44-6591
E-mail: kenisobe@nils.go.jp

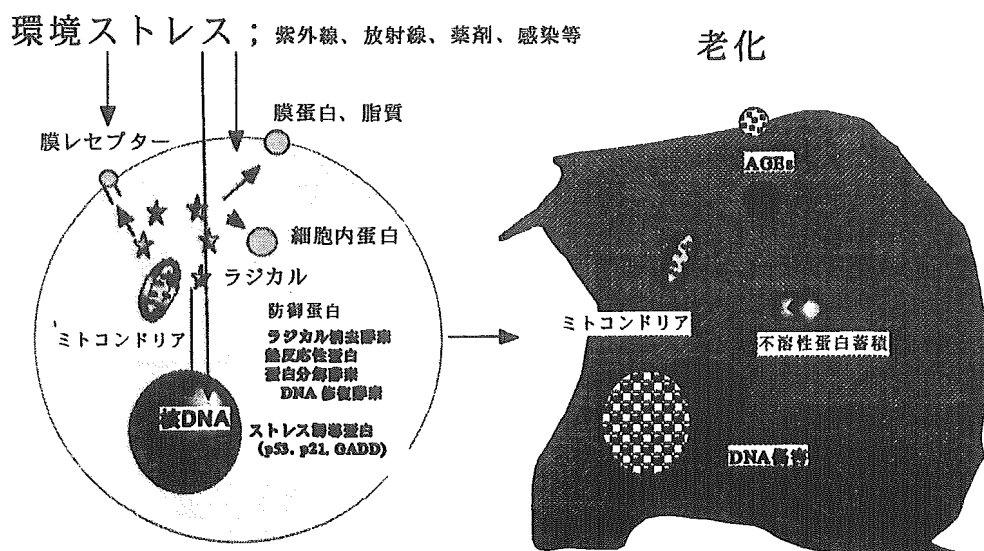


図 1.

ウ糖溶液を試験管につくり、そのままほっておくと茶色に変色する。このことはカルボニル化として知られている。さて、ROSは毒性が強いためそのまま細胞内に放置されれば、細胞は死んでしまう。生体はSOD、Catalase、Glutathione peroxidaseといったROS消去酵素を発達させてきた。Cu/ZnSOD、Catalaseの両方を過剰発現させた蠅は長生きした(5)。私たちはMn-SODが産生される仕組みを研究してきた。Mn-SODはTNF α 、IL-1 β 、IFN γ と言った炎症性サイトカインや、細菌の外膜成分LPSが転写因子NF κ Bを活性化させ発現が上昇すること、代謝を亢進する細胞増殖因子(PDGF)はEGR-1を通して、Mn-SODの発現を上昇させることを明らかにした(6,7)。すなわち、感染ストレス、あるいは代謝によりROSが産生されるのに対抗して、生体はMn-SODを産生させる仕組みを持っていることになる。

2) 寿命変異体とストレス応答

最も下等な酵母の長寿変異体が取られ、そのなかにはストレス耐性のものや、代謝に関係するものが含まれていた⁹⁾。出芽酵母は母細胞が娘細胞を出芽して20分裂で寿命になるが、GuarenteらはSIR2遺伝子が老化を抑えることを見出した。SIR2蛋白はNADとともに働き細胞の代謝と強く関係する⁹⁾。彼等は2%グルコースを0.5%にする飢餓ストレスで1.5倍に寿命が延長することを見出した。彼等は酸化ストレスよりも飢餓ストレスが寿命に関係するとしている(脳によるストレス感知と老化の項で再度取り上げる)。線虫の長寿命体の*age-1*は早くから取られ、ストレス耐性であることが話題となった¹¹⁾。その後、*age-1*、*daf-2*、*daf-16*のコードする遺伝子がインスリンシグナル伝達系に関係することが判明し、ストレス応答は代謝を通じたROSがらみであることが判明した。また、*clk-1*はcoenzyme Q合成に関係する蛋白であり、電子伝達系を介してストレス耐性となる¹²⁾。*Drosophila*で35%

寿命が延長する長寿命体が取られた。この系統は飢餓、熱、パラコート食に抵抗性であった¹³⁾。また、*Drosophila*で2倍も寿命が延長する変異体 *Indy* (I'm not dead yet) が報告された。これは哺乳類の Krebs 回路に関係する sodium bicarboxylate cotransporter と類似蛋白であり、カロリー制限に相当すると考えられている。マウスでは p66(shc)の変異があると30%寿命を延長し、酸化ストレスに抵抗性であった¹⁴⁾。

3) ストレス応答蛋白 p53 は老化に関係するか？

老化を考える時、細胞の分裂停止による不可逆的変化までの過程と、最終分化後細胞の死までの過程を考えるとわかりやすい。Hayflicが線維芽細胞は無限増殖できないという論文を世界ではじめて提出した時、その実験に対して、厳しい疑問が出されたと聞く。現在ではひと線維芽細胞は寿命があることがほぼ確立されている。分裂が終了した時点を細胞の分裂寿命とよぶ。さて、ひと組織では幹細胞が存在し、それが分化することで、免疫細胞なり、神経細胞なりができてくる。神経幹細胞の多くは胎生期に分裂寿命がきて最終分化し、神経細胞としてひとでは100年も生きる。線維芽細胞の分裂寿命の時点を発現してくる蛋白が取られた。その一つ p21/WAF1は細胞周期をG0/G1で停止させる蛋白でもあった。生体レベルで考えると幹細胞が分化する時に発現が上昇する蛋白でもある。また、p21/WAF1はストレス応答蛋白で癌抑制蛋白でもある p53の活性化(リン酸化)により発現が上昇する。放射線、紫外線、活性酸素等により p53が活性化されることが知られている。また、細胞分裂によりテロメアが短縮し、p53が活性化されることが報告されている(図2)。それでは p53は老化関連蛋白と言えるであろうか？。最近 p53過剰発現マウスが老化様症状を示すとする報告が出され、p53は癌を抑制するが、老化には促進的に働くことが示唆された¹⁵⁾。このマウスの老化様病変は変異 p53の過剰発現であり(p53tm)、p53

が常に活性化されている。コントロールマウスの118週に対し、p53tmは96週とわずかに短命となるが、表現系は老化の一部にとどまり、筋、膵臓、肝臓、腎臓、睪丸の重量が減る。その後、正常p53の過剰発現マウスがイタリアのグループによってつくられ、正常p53の過剰発現は癌を抑制するが、老化様症状を呈しないこと、寿命短縮がみられないことが報告された¹⁶⁾。このことから、常にp53が活性化されている状態、すなわち常にストレス状態に置かれていると一部の老化が促進することが判明した。また、ひと Werner 蛋白はp53と結合することが判明した。すべてが、p53に収束しているように見える(図2)。

ところで、ほ乳類の蛋白でp53ほど研究のさかんなものはない。これは癌研究の広がりによるものであるが、それでは果たしてp53は研究つくされたかという点とまだわからないことが多い。私たちはZnフィンガー蛋白Zfp148の欠損マウスを作製する過程で、この蛋白がp53に関連して、精子形成の最も重要な初期過程、すなわち精子形成細胞が激しく分裂後静止する過程で、p53と協調して重要な役割をはたすことを見出した。Zfp148はヘテロ欠損でも精子形成ができなくなる。マウスで13.5日の精子形成幹細胞(PGC)異常がおこる。13.5日胎児PGCではZfp148の発現上昇とp53のリン酸化がみられた。これはいわば精子形成幹細胞(PGC)の最終分化であり、線維芽細胞の分裂寿命に相当する。このように重要なzinc finger転写因子がp53と協調して働くことは興味深い¹⁷⁾。亜鉛(zinc)の欠損が酸化ストレスや、DNA損傷を増大させることを最近AIMSのグループが報告している¹⁸⁾。他の幹細胞はどうだろうか?小腸の幹細胞は1000回以上分裂できることが観察されている。幹細胞に寿命があるか否かは大きな問題であるが少なくとも人の100才あるいはマウスの3才といった個体寿命の時にも明らかに幹細胞は寿命になっていない。それどころか、分裂後も細胞は個体寿命より長生きする場合がある。神経系を考えてみよう。分裂を終えて、100年以上生きた、神経細胞はまだ十分生存可能に見える。ところで分裂寿命はp53依存性であろうか?私達は細胞周期停止に働くp21/WAF1の発現がsodium butylateあるいはTricostatin Aといったヒストンアセチル化酵素で誘導され、細胞が細胞周期から不可逆的に抜け出し、老化様になることを示した。この現象はp53を欠損する細胞でもおきることから、p53非依存的な細胞老化も存在することが示唆された^{19,20)}。

4) 脳によるストレス感知と老化との関係

ストレスを脳が感知していることを、我々は経験からすでに知っている。それでは脳はストレスをどのように感知し、生体はそれにどのように反応するのか、その分子メカニズムの研究はまだ緒についたばかりである。ここでは、老化に関係する3つの話題を取り上げる。1つは前に記したカロリー制限、飢餓ストレスのこと、あとの2つは我々の研究の成果である。脳のストレス受容体としての働きは視床下部、脳下垂体を

介した系がよく知られている。最近、飢餓ストレス、すなわち、低グルコースに反応して視床下部からグルコースホルモン(GH)産生を抑える刺激が脳下垂体に伝えられることが判明してきた。このことはカロリー制限による寿命延長が低グルコース状態を脳が感知することから始まるとする仮説に結びつく。カロリー制限が種々の動物の寿命を延長させる事実は間違いなくある。この場合、代謝量を落として、活性酸素産生を抑制すると一般的に考えられてきたが、このことに関して疑問も提出されている²¹⁾。

哺乳類でカロリー制限は血中グルコースレベルを低下させる。グルコースレベル低下は膵臓ベータ細胞からのインスリン産生を低下させ、恒常性を保っている。カロリー制限はまた、GH, IGF-1, TSH, Gonadotropinといったホルモンを低下させる。視床下部の神経が血中グルコースレベルを感知し、GH分泌に関係することがわかってきた。それでは、血中グルコースレベル低下が膵臓ベータ細胞からインスリン産生を抑える、あるいは視床下部からGH産生を抑えるメカニズムは何か、GuarenteらはNAD/NADHを介して、Sir2が関与していると主張している。かれらは飢餓ストレスがSir2を介して、酵母の寿命を延長させることを示した。Sir2ホモログは哺乳類にも存在する。Guarenteらはカロリー制限による飢餓ストレスが脳を介してGH産生を低下させ、哺乳類の寿命を延長させるのではないかと推測している²²⁾。

私たちはマウスに強い拘束をすることで、逃れられないストレスによる免疫系と、血液凝固系の変化の研究をした。拘束ストレスによる免疫系の変化はすでに報告されていたが、我々の実験でも免疫臓器(胸腺、脾臓)の強い萎縮を観察した。これは主として、交感神経系の刺激によると思われる。血液凝固系の変化では非常におもしろい結果を得た。すなわち、マウスに20時間の拘束ストレスをかけたところ、血液の凝固系

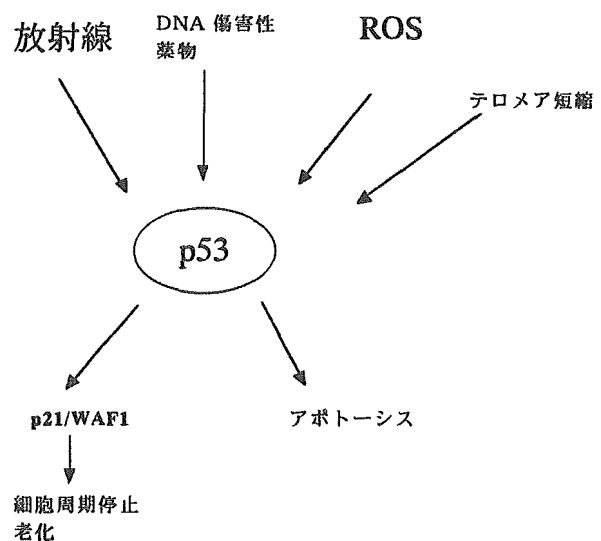


図2.

の亢進がみられ、PAI-1(plasminogen activator -1)の血液中、あるいは組織での発現上昇がみられ、これは遺伝子発現が上昇したことによるものであった。特に、腎臓糸球体、脂肪組織に発現が強く見られた。拘束ストレスによるPAI-1 mRNAの上昇は老化により著しく上昇し、腎臓糸球体の血栓が観察された。PAI-1欠損マウスでは腎臓糸球体の血栓の割合が著しく低下した²³⁾。

青斑核はノルアドレナリン含有ニューロンから構成される脳内最大のノルアドレナリン神経核である。青斑核ニューロンはほぼ脳全体に軸索を投射しているが、とりわけ海馬・大脳皮質といった高次機能に関連した部位に密に投射している。私達は青斑核の機能として“生体の警報システム”としての役割に注目している。実際、生体にとって強いストレスとなる痛みなどの侵害刺激や出血などによる血圧低下は、青斑核ニューロンの活動を増加させることが知られている。青斑核ニューロンの活動の増加は、生体の覚醒レベルを上げ、ストレスに対する行動を惹起することになると考えられる。こうした生体のストレス応答が加齢に伴いどのように変化するかを知るために、私達はラットの青斑核投射をモデルとしてその加齢変化を調べた。青斑核ニューロンの主な投射部位である海馬および前頭葉における軸索終末について電気生理学および形態学的に解析した結果、海馬・前頭葉への投射は加齢に伴い一旦は減少するものの、15月齢を境に投射部位に残った軸索終末で発芽がおこなうことが明らかになった^{24,25,27)}。ラットの寿命(約30月齢)から考えると、可塑的变化は中年期におこっていることになり、青斑核ニューロンは加齢脳においても可塑性を維持していることになる。この加齢変化によって維持されている機能については明らかではないが、発芽によって減少した投射が補償されているものと考えられる。事実、青斑核ニューロンの電気生理学的特性や投射部位におけるノルアドレナリン濃度は加齢による変化が認められない^{26,28)}。

おわりに

ROSが寿命に関係していることはほぼ確立された。しかし、環境ストレスからROS産生への経路は依然不明であるし、ROSが遺伝子発現にどのように関わるかもまだ明らかでない。ROSはほ乳類の系で、MAPK系を介してAP-1、NFκBを活性化させる他に、直接、AP-1、Yap-1、OxyRの2つのSHを酸化し、S-S結合に変換させる。最近このことが細胞のレドックス制御の概念で精力的に研究がすすんでいる。細菌のOxyR、酵母のYap-1がほ乳類のAP-1に相当する。ROSと老化との関係はこれらの仕事の発展でより分子レベルであきらかにされると思われる。環境ストレスのうちDNA傷害性ストレスはp53を活性化させる。ところが、p53活性化へのシグナル伝達系は一部を除いてまだ明らかでない。我々のZfp148等新しいp53結合蛋白、あるいはROSからp53への経路等様々なシグナル伝達系を明らかにし、そのうち何が老化に関係するか検証すべき課

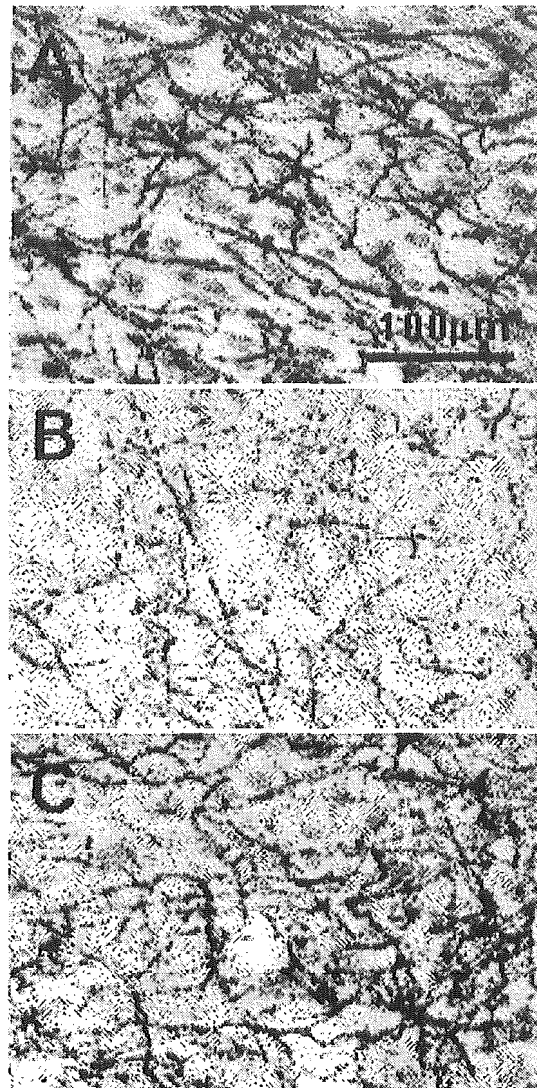


図3. 青斑核ニューロン軸索終末の加齢変化
軸索投射は加齢に伴い減少するが(A, B)、軸索終末密度は老化脳(C)でも維持されている。A:9月齢、B: 13月齢、C: 24月齢

題である。また、p53非依存性の細胞老化がROSからの経路に関係するか否か興味深い。脳はストレス受容体として重要な位置を占めることは間違いない。カロリー制限と寿命延長に脳の飢餓ストレス受容体が本当に関係するかどうかは興味深いテーマである。飢餓ストレスからの経路はSIR2への経路以外にERストレスとして知られるものがあり、今後の進展が期待される。

謝辞

これらの研究は厚生労働省、長寿科学総合研究事業を中心に1部文部科学省の特定研究に援助を受けた。また、私たちの結果は私達の研究室で働いた、長谷川忠男(現名古屋大学医学部細菌学)、Xiao H(現Massachusetts Medical School)、武内章英、前原佳代子、

山本晃士（名古屋大学医学部）、石田佳幸らのデータによる。

引用文献

1. Harman, D.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 2, 298-300, 1957.
2. Weindruch, R. and Walford, R.L.: Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science*, 215, 1415-1418, 1982.
3. Yu, B.P., Masoro, E.J. and McMahan, C.A.: Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J. Gerontol.*, 40, 657-670, 1985.
4. Ku, H. H., Brunk, U. T. and Sohal, R. S.: Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biol. Med.*, 15, 621-627, 1993.
5. Orr, W.C. and Sohal, R.S.: Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263:1128-1130, 1994.
6. Maehara, K., Hasegawa, T., Xiaa, H., Takeucia, A., Aba, R. and Isobe, K.: Cooperative interaction of NF- κ B- and C/EBP binding sites is necessary for manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by lipopolysaccharide and interferon-g. *FEBBS Letter*, 449, 115-119, 1999.
7. Maehara, K., Oh-Hashi, K. and Isobe, K.: Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J.*, 15, 2025-6, 2001.
8. Jazwinski, S.M.: Longevity, genes, and aging. *Science*, 273, 54-59, 1996.
9. Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L.: Transcriptional silencing and longevity protein *Sir2* is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800, 2000.
10. Larsen, P. L. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 8905-8909, 1993.
11. Wong, A., Boutis, P. & Hekimi, S.: Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics*, 139, 1247-1259, 1995.
12. Lin, Y.J., Seroude, L. and Benzer S.: Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant Methuselah. *Science* 282:943-946, 1998.
13. Lithgow, G.J. and Andersen, J.K.: The real Dorian Gray mouse. *Bioessays.*, 22:410-413, 2000.
15. Tyner, S.D. et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 415, 45-53, 2002.
16. Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.C., Blasco, M.A. and Serrano, M.: Related Articles, Links "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.*, 2, 6225-35, 2002.
17. Takeuchi, A., Mishina, Y., Miyaishi, O., Kojima, E., Hasegawa, T. and Isobe, K.: Heterozygosity with respect to Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis. *Nature Genetics*, 33, 172-176, 2003.
18. Ho, E., and Ames, B. N.: Zinc deficiency induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFB and AP1 binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 16770-16775, 2002.
19. Xiao, H., Hasegawa, T., Miyaishi, O., Ohkusu, K., and Isobe, K.: Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21WAF/CIP1 in p53-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237, 457-460, 1997.
20. Xiao, H., Hasegawa, T. and Isobe, K.: p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 275, 1371-6, 2000.
21. McCarter, R., Masoro, E.J., and Yu, B.P.: Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *Am. J. Physiol.*, 248, E488-E490, 1985.
22. Koubova, J. and Guarente, L.: How does calorie restriction work? *Genes Dev.*, 17, 313-21, 2003.
23. Yamamoto, K., Takeshita, K., Shimokawa, T., Yi, H., Isobe, K., Loskutoff, D.J. and Saito, H.: Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: implications for stress-induced thrombosis in aged individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 22, 99, 890-5, 2002.
24. Ishida, Y., Shirokawa, T., Miyaishi, O., Komatsu, Y., and Isobe, K. Age-dependent changes in projections from locus coeruleus to hippocampus dentate gyrus and frontal cortex. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1263-1270, 2000.
25. Shirokawa, T., Ishida, Y., and Isobe, K.: Age-dependent changes in axonal branching of single locus coeruleus neurons projecting to two different terminal fields. *J. Neurophysiol.*, 84, 1120-1122, 2000.
26. Shirokawa, T., Ishida, Y., and Isobe, K.: Changes in electrophysiological properties of axon terminals of locus coeruleus neurons with age in F344 rat. *Neurosci. Lett.*, 289: 69-71, 2000.
27. Ishida, Y., Shirokawa, T., Miyaishi, O., Komatsu, Y., and Isobe, K.: Age-dependent changes in noradrenergic innervations of the frontal cortex in F344 rats. *Neurobiol. Aging*, 22, 283-286, 2001.
28. Ishida, Y., Shirokawa, T., Komatsu, Y., and Isobe, K.: Changes in cortical noradrenergic axon terminals of locus coeruleus neurons in aged F344 rats. *Neurosci. Lett.*, 307: 197-199, 2001.

Pathophysiology of Atrial Fibrillation Evaluated by Cardiopulmonary Exercise Testing

Kenji UESHIMA, Noboru KOBAYASHI, Masahiko SAITOH,
Takuya YAMAZAKI, Masataka NASU, Ikuo SEGAWA,
Motoyuki NAKAMURA, Victor FROELICHER*
and Katsuhiko HIRAMORI

ABSTRACT

We investigated how the cardiopulmonary exercise testing (CPX) contribute to evaluate the pathophysiology of the patients with atrial fibrillation (AF). According to the results of the CPX, among patients with AF having mixed underlying heart disease, a reduction in maximal exercise capacity was observed. In addition, the inordinately high maximum heart rate during exercise cannot adequately compensate for the loss of the atrial contribution. The impairment of the exercise capacity and the prognosis in patients with AF are related more to underlying heart disease than to the arrhythmia itself. The heart rate response to exercise in patients with AF depends on the severity of atrial organic injury.

The organic as well as functional disorders in the patients with AF were estimated by the evaluation of exercise capacity using the CPX.

Key words: atrial fibrillation, cardiopulmonary exercise testing, exercise capacity, prognosis

INTRODUCTION

Atrial fibrillation (AF), which is one form of arrhythmia observed at a high rate, has been considered to occur in 0.15–1.5% of the overall population and 8–17% of patients over 60 years of age.¹⁾ Atrial fibrillation has three clinical problems as follows: the first, atrial thrombus as the source of thrombotic embolism, the second, a decreased cardiac output due to a loss of atrial contraction, and the third, the development of

palpitation due to an irregular heart rate and tachycardia. Historically, the investigations from the view point of the electrophysiology or the cardiac morphology have been widely used in terms of AF. However, we tried to investigate it from the other view points like the exercise cardiology because we should evaluate exercise capacity and prognosis of the patients with AF.

1. The Effects of Cardioversion on Exercise Capacity

The contribution of atrial function to exercise capacity remains unclear. Herein we describe hemodynamic and ventilatory gas exchange responses to maximal

Memorial Heart Center, and Second Department of Internal Medicine, Iwate Medical University

*Cardiology Research Office, Cardiac Division, Palo Alto Veterans Affairs Medical Center

(Received April 23, 2003)

exercise among 20 male patients (mean age 58 +/- 12 years) with AF before and after cardioversion.²⁾

The underlying cardiac diseases were: no underlying heart disease in 6 cases, cardiomyopathy in 5 cases, hypertension in 4 cases, coronary heart disease in 2 cases, valvular heart disease in 2 cases, the other in 1 case. Their mean left atrial dimension and mean left ventricular ejection fraction (LVEF) estimated by 2-D echocardiography were 48 +/- 13 mm and 58 +/- 16%, respectively.

Synchronized direct current cardioversion was performed until sinus rhythm was achieved. Maximal exercise testing with ventilatory gas exchange analysis (cardiopulmonary exercise testing: CPX³⁾ was performed before and an average of 62 days after successful cardioversion. Ventilatory gas exchange was measured on a breath-by-breath basis with a gas analyzer. From these measurements, the ventilatory equivalent for VO₂ was calculated as VE/VO₂ and for CO₂ as VE/VCO₂, and the gas exchange ratio as VCO₂/VO₂. The anaerobic threshold (AT)⁴⁾ was principally determined using the V-slope method. Peak VO₂ was defined as the average of values obtained during the last 30 sec of exercise.

Table 1 summarizes the variables before and after the cardioversion. At rest, mean heart rate was significantly lower after cardioversion. At the AT, mean heart rate was reduced and VO₂ was slightly but significantly higher following cardioversion ($p < 0.01$). Mean maximum heart rate was reduced after cardioversion. The mean maximum heart rate before and after cardioversion was significantly lower than that estimated for age, respectively ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Peak VO₂ was slightly but significantly higher ($p < 0.01$) while VE/VCO₂ was significantly lower following cardioversion ($p < 0.05$). According to the multivariate analysis, echocardiographic measurements of left ven-

tricular function and left atrial size were unrelated to exercise capacity. The strongest variables that was significant predictors of peak VO₂ was the maximum heart rate.

Several investigators have reported hemodynamic differences between normal sinus rhythm and AF before and after cardioversion.⁵⁻¹³⁾ These include marked reductions in heart rate and modest increases in stroke volume and cardiac output. However, no improvement in peak VO₂ or echocardiographic variables was obtained 1 day after successful cardioversion, but significant improvements in stroke volume and peak VO₂ were observed 1 month later.⁶⁾ Atwood et al⁵⁾ reported approximate 10% improvement in peak VO₂ after cardioversion while a mean 48 beats/min reduction in maximal heart rate left many patients chronotropically incompetent. Yigit et al¹²⁾ also reported that restoring sinus rhythm by cardioversion improved excessive heart rate responses to exercise significantly in patients with AF during both isometric and isotonic exercises. Gosselink et al¹³⁾ concluded that cardioversion is the best method of improving functional capacity in patients with atrial fibrillation, whether or not they have underlying heart disease and whatever their functional state.

In summary, among patients with AF having mixed underlying heart disease, a reduction in maximal exercise capacity was observed. After successful cardioversion to normal sinus rhythm, exercise capacity was improved, although it remained less than normal values for age. The heart rate response to exercise after cardioversion is consistent with chronotropic incompetence.

2. Comparison of Exercise Capacity Between Atrial Fibrillation and Normal Sinus Rhythm

Previous cardioversion studies have demonstrated

Table 1 Summary of data at rest, AT (anaerobic threshold) and maximum exertion before and after cardioversion (DC).

	Heart rate at rest (beats/min)	Heart rate at AT (beats/min)	AT (ml/min/kg)	Heart rate at maximum exertion (beats/min)	Peak VO ₂ (ml/min/kg)	VE/VCO ₂ (-)
Before DC	98 ± 25	152 ± 25	16.5 ± 3.7	188 ± 29	22.4 ± 5.9	37.4 ± 6.2
After DC	71 ± 13**	117 ± 18**	17.7 ± 4.3*	143 ± 21**	23.2 ± 5.3*	35.3 ± 5.6*

Predictive value of maximal heart rate for age: 162 ± 12 beats/min. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

small but clinically important hemodynamic advantages of normal sinus rhythm (NSR) over AF,¹³⁾ including increases in submaximal cardiac output and stroke volume and increases in exercise capacity. However, heart rate response to exercise after cardioversion was chronotropically incompetent. Accordingly, we evaluated a group of male patients with AF without underlying heart disease, among whom maximal exercise testing with CPX and matched them by age and ventricular function with a group of normal men with NSR.¹⁴⁾

Twenty male volunteers with chronic AF (mean age 63 \pm 2 years) and 20 male volunteers with NSR (mean age 60 \pm 2 years) were selected for the study, after matching for age and left ventricular ejection fraction by means of resting echocardiography. CPX was performed as described before.

A summary of patients profiles, exercise data, and echocardiographic data is presented in Table 2. Resting heart rate was significantly higher in patients with AF than those with NSR. The group with AF exhibited left atrial dimension consistent with clinical left atrial enlargement which differed from the NSR group ($p < 0.01$), while left ventricular ejection fraction was not significantly different between the 2 groups. The mean maximal heart rate achieved by patients with AF was significantly higher than that predicted for age and that in subjects with NSR ($p < 0.01$, respectively). Mean peak VO_2 among patients with AF was significantly lower than that estimated for age and also lower than that compared to subjects with NSR ($p < 0.01$, respectively).

This investigation demonstrated the comparison of the exercise capacity between AF and normal NSR

without influence of cardioversion which caused chronotropic incompetence. The markedly lower (approximately 20%) peak VO_2 in AF patients despite a higher maximum heart rate and normal resting left ventricular function suggests attenuated stroke volume responses to exercise. Thus the inordinately high maximum heart rate in patients with AF cannot adequately compensate for the loss of the atrial contribution to ventricular filling and thus cardiac output during exercise.

3. Exercise Capacity in Patients with Chronic Atrial Fibrillation Accompanied with Various Underlying Heart Diseases

Recent data have demonstrated that reduction in exercise tolerance in patients with AF are associated with the accompanying heart disease.¹⁵⁾ Moreover, exercise capacity cannot be predicted using routine resting parameters in patients with underlying heart disease.¹⁶⁾ Thus the following study was undertaken to investigate the influence of cardiac size, function, and underlying heart disease on the exercise capacity in AF patients.¹⁷⁾

A total of 79 men (mean age 63 \pm 11 years) were included in the study. They all underwent physical examination, resting echocardiography, and CPX. They were then divided into the following 5 subgroups: those without underlying heart disease (LONE: $n = 17$), hypertension (HT: $n = 11$), dilated cardiomyopathy or a history of congestive heart failure (CHF: $n = 26$), ischemic heart disease (IHD: $n = 13$), and valvular heart disease (VALV: $n = 12$) (Table 3).

Mean values for age, resting heart rate were not significantly different among patients subgroups. Howev-

Table 2 Summary of data at rest and maximum exertion between patients with atrial fibrillation and subjects with normal sinus rhythm.

		Atrial fibrillation	Sinus rhythm	p
Resting	Age (years old)	63 \pm 1	60 \pm 2	0.12
	Left atrial dimension (mm)	46.8 \pm 1.9	40.5 \pm 1.2	< 0.01
	Left ventricular ejection fraction (%)	62.6 \pm 1.5	62.6 \pm 1.7	0.98
	Heart rate (beats/min)	92 \pm 4	65 \pm 2	< 0.01
Maximum exertion	Heart rate (beats/min)	189 \pm 7	160 \pm 4	< 0.01
	Age predicted heart rate (beats/min)	159 \pm 6	159 \pm 6	—
	VO_2 (ml/min/kg)	23.4 \pm 0.8	28.1 \pm 1.3	—
	age predicted VO_2 (ml/min/kg)	28.7 \pm 0.9	28.7 \pm 0.9	< 0.01

Table 3 Summary of data at rest, AT, and maximum exertion in patients with atrial fibrillation accompanied with various underlying heart disease.

		LONE	HT	IHD	VALV	CHF
Resting	Age (years old)	63 ± 2	64 ± 2	64 ± 2	63 ± 2	64 ± 2
	Heart rate (beats/min)	89 ± 3	97 ± 8	89 ± 5	81 ± 4	93 ± 5
	Left atrial dimension (mm)	44.1 ± 1.7	50.9 ± 1.8	46.4 ± 2.2	54.7 ± 2.7	50.2 ± 2.4
	Left ventricular ejection fraction (%)	59.1 ± 2.5	59.2 ± 3.5	59.4 ± 3.2	58.4 ± 3.9	44.6 ± 2.4
AT	VO ₂ (ml/min/kg)	16.4 ± 0.8	18.0 ± 1.3	15.4 ± 0.8	14.8 ± 0.9	14.1 ± 0.6
Maximum exertion	Heart rate (beats/min)	191 ± 8	187 ± 8	178 ± 8	162 ± 8	165 ± 5
	Age predicted heart rate (beats/min)	157 ± 7	156 ± 8	159 ± 8	157 ± 8	157 ± 6
	VO ₂ (ml/min/kg)	23.8 ± 1.1	23.4 ± 1.2	21.2 ± 1.2	19.3 ± 0.9	18.6 ± 0.9
	Age predicted VO ₂ (ml/min/kg)	28.6 ± 0.9	28.5 ± 1.1	28.4 ± 1.3	28.7 ± 1.1	28.6 ± 0.9

LONE: without underlying heart disease, HT: hypertension, IHD: ischemic heart disease, CHF: dilated cardiomyopathy or a history of congestive heart failure, VALV: valvular heart disease, AT: anaerobic threshold.

er, left atrial dimension was significantly greater in VALV than in LONE ($p < 0.05$). Left ventricular ejection fraction in CHF was significantly lower than all other groups ($p < 0.001$). The mean VO₂ at the AT in LONE subjects was higher than in patients with CHF ($p < 0.05$). The mean maximum heart rate for all 79 patients was significantly higher than that estimated for age ($p < 0.01$). These maximum heart rates were particularly high in LONE and HT patients. The mean maximal heart rate observed among LONE subjects was higher than in patients with CHF or VALV ($p < 0.05$, respectively). The average peak VO₂ in all patients, including LONE subjects, was somewhat lower than predicted values for age-matched normal subjects ($p < 0.05$). Peak VO₂ in LONE and HT was significantly higher when compared with values in CHF.

Previous studies have reported that exercise tolerance in patients with AF without underlying heart disease is similar to that of age-matched normal subjects.¹⁰ In a heterogeneous population of patients with AF, Hornsten et al¹⁸ reported that despite an increase in submaximal and maximal heart rates of approximately 25 beats/min among patients with AF compared with age-matched normal subjects, exercise capacity was not different between groups. The studies evaluating the exercise response of patients with AF have been not apt to consider the potential role of underlying heart disease. In the patients with morphologic heart disease, that is, those with congestive heart failure, valvular heart disease, or ischemic heart disease had approximately 20% lower values for peak VO₂ than patients with AF alone or hypertension without mor-

phologic disease in our study. This is in agreement with the findings of Atwood et al,¹⁶ who observed a 19% higher peak VO₂ among patients with AF alone versus patients with AF and associated heart disease. However, even in the patients without morphologic disorders, peak VO₂ was much lower than that expected for age-matched normal subjects. In addition, exercise tolerance is not influenced by cardiac size or function at rest in patients with AF.

The present data demonstrated that peak VO₂ is reduced in patients with chronic AF, but the degree of the reduction is associated with underlying cardiac pathologic conditions. Higher than normal ventricular response to exercise in patients with AF compensate only partially for the loss of atrial function; they are inadequate to maintain normal exercise capacity.

4. Exercise Capacity and Prognosis in Patients with Chronic Atrial Fibrillation

Many patients with AF have underlying heart disease, but several reports suggest that so-called lone AF is more prevalent than previously thought.^{20,21} Prognosis is a concern in patients with AF because of a suspected higher incidence of heart disease and stroke.²²⁻²⁴ However, there were few studies which have examined prognosis using variables obtained by exercise testing or were based on the disease process underlying AF.

We evaluated the response to exercise in patients with chronic AF and investigated whether prognosis could be predicted by exercise variables or underlying heart disease.²⁵ A total of 200 male patients (mean age

64 ± 11 years) with AF were identified retrospectively who underwent resting echocardiography and symptom-limited exercise testing. They were categorized by history, physical examination, resting echocardiography, and/or cardiac catheterization as described above 5 subgroups (Table 4). However, in survival analysis, LONE and HT were combined as LONE, and CHF and VALV were combined as CHF-VD. Treadmill exercise testing was performed using a modified Balke-Ware protocol and VO_2 was estimated from the external work ascribed to the highest completed treadmill stages as the number of metabolic equivalents (METs).

The mean values of left atrial dimension in CHF and VALV were significantly greater than that in LONE. Left ventricular ejection fraction in CHF was significantly lower than all other groups ($p < 0.01$). The mean METs at maximum exertion was significantly higher in LONE than that in IHD and CHF ($p < 0.001$). Stepwise multiple regression among clinical, morphologic, and exercise variables revealed that the classification by group (i.e., underlying heart disease) was the only significant predictor of exercise capacity ($R^2 = 0.13$, $p < 0.01$). After a mean 39.1-month follow-up, 17 of 200 had died from cardiovascular causes. The rate of cardiac death using Kaplan-Meier survival analysis was significantly greater in CHF-VD patients ($p < 0.01$, Fig. 1). Cox hazard ratios were also observed among patients with CHF-VD (7.1, $p < 0.01$).

Prognosis in AF is naturally dependent upon the age of the patient and the underlying cardiac condition. Persistent AF may indicate the presence of a rather

serious cardiac condition with impending, if not actual, heart failure. In the 1960s, a mortality rate of 34% within the first year and 75% within 3 years was considered ordinary in patients with AF, which was attributed to the severity of underlying heart disease.²⁶⁾ Although prognosis has improved markedly in recent years due to advances in therapy, chronic AF continues to be associated with a relatively high mortality.²⁷⁾ Particularly, among chronic AF patients with a history of congestive heart failure, cardiomyopathy, or valvular heart disease, there exists a more abnormal response to exercise and a poorer prognosis than those without morphologic heart disease or with

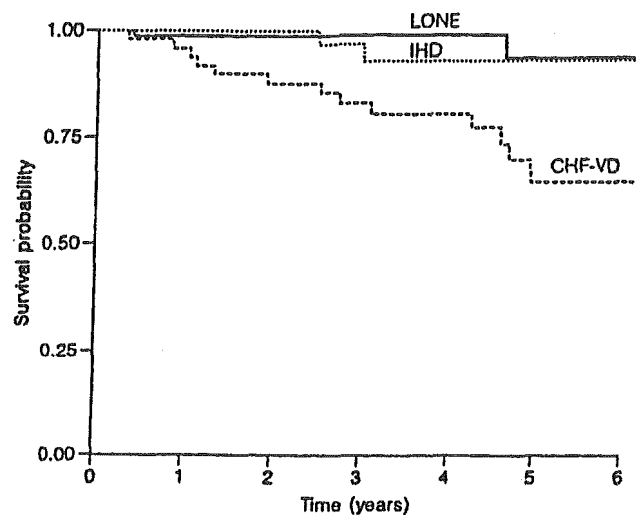


Fig. 1 Kaplan-Meier survival analysis for patients with AF accompanied with various underlying heart diseases. Mortality was higher among CHF-VD (dilated cardiomyopathy, a history of congestive heart failure, or valvular heart disease) versus LONE (without underlying heart disease or hypertension) and IHD (ischemic heart disease).

Table 4 Summary of data at rest, maximum exertion, and prognosis in patients with atrial fibrillation accompanied with various underlying heart disease.

		LONE	HT	IHD	VALV	CHF
Resting	Number	77	25	45	13	40
	Age (years old)	63 ± 1	65 ± 1	64 ± 1	63 ± 2	64 ± 1
	Left atrial dimension (mm)	44.4 ± 0.9	48.6 ± 2.1	45.9 ± 1.2	53.1 ± 3.3	51.7 ± 1.8
	Left ventricular ejection fraction (%)	62.4 ± 1.7	59.8 ± 3.4	60.1 ± 2.2	59.3 ± 3.8	45.7 ± 1.8
Maximum exertion	Heart rate (beats/min)	150 ± 4	157 ± 4	140 ± 5	160 ± 8	150 ± 5
	METs	7.8 ± 0.4	7.2 ± 0.5	6.4 ± 0.4	6.7 ± 0.6	5.8 ± 0.4
	Age predicted METs	8.2 ± 0.3	8.1 ± 0.4	8.2 ± 0.4	8.2 ± 0.6	8.2 ± 0.4
Prognosis	Cardiovascular death (n, (%))	1 (1)	1 (4)	2 (4)	2 (15)	11 (28)

LONE: without underlying heart disease, HT: hypertension, IHD: ischemic heart disease, CHF: dilated cardiomyopathy or a history of congestive heart failure, VALV: valvular heart disease, METs: metabolic equivalents.

ischemic heart disease. The response to exercise and the prognosis in patients with AF are related more to underlying heart disease than to the arrhythmia itself.

5. Predictors of the Heart Rate Response to Exercise in Patients with Chronic Atrial Fibrillation

In patients with AF, the problem of overwhelming tachycardia during exercise is often encountered in the routine clinical setting. With the objective of evaluating the factors that determine the heart rate response to exercise in patients with atrial fibrillation, we conducted the following investigation.²⁸⁾

The subjects included a series of 60 patients with atrial fibrillation (25 men and 35 women, mean age 61 \pm 10 years) who underwent CPX. Blood was sampled before and immediately after exercise testing to determine the concentration of atrial natriuretic peptide (ANP). The underlying cardiac diseases were: mitral stenosis in 12 cases, mitral regurgitation in 27 cases, mitral stenosis with regurgitation in 16 cases, atrial septal defect in 3 cases, aortic insufficiency in 1 case, and constrictive pericarditis in 1 case. The subjects were classified into responder and non-responder groups; those who achieved a maximal heart rate upon the termination of exercise reaching the predicted maximal heart rate by age or more were classified into the responder group (n = 30) and those who did not reach the maximal heart rate into the non-respon-

der group (n = 30). Various parameters of 2-D echocardiography and cardiac catheterization at rest were compared between the 2 groups. In some patients (6 per group), atrial muscles resected during the Maze operation,¹⁾ which is radical surgery for atrial fibrillation, were examined histologically. In the tissues resected from the bilateral atrium, the severity of myocardial degeneration, interstitial fibrosis and endocardial thickening were scored semi-quantitatively as 0, 1, 2 and 3, respectively, and the evaluation was made according to the total score (index of tissue injury).²⁸⁾

Table 5 summarizes the background factors and outcomes in the responder and non-responder groups. The resting and maximum heart rate in the responder group were significantly higher than those in the non-responder group (p < 0.05, p < 0.01 respectively). The left atrial dimension revealed a significant lower values in the responder group (p < 0.05). The tissue injury index was showing a smaller value for the responder group (p < 0.01). The peak VO₂ was significantly high in the responder group compared to the non-responder group (p < 0.01). Although the ANP level at rest was insignificant between the two groups, there was a tendency for a higher ANP after exercise testing in the responder group than in the non-responder group (p = 0.09).

In the present study, we evaluated the factors that determine the heart rate response to exercise in

Table 5 Summary of background characteristics and outcomes of various variables in both responder and non-responder group.

	Responder group	Non-responder group
Number of patients	30	30
Gender; male/female ratio (cases)	12/18	13/17
Age (years)	60 \pm 9	61 \pm 9
Maximum heart rate (beat/min)	184 \pm 19**	132 \pm 19
Resting heart rate (beat/min)	80 \pm 14*	71 \pm 15
Pulmonary wedge pressure (mmHg)	15 \pm 7	14 \pm 6
Left ventricular ejection fraction (%)	58 \pm 14	60 \pm 13
Oral digitalis prescription (cases)	28	26
AT (ml/kg/min)	12.2 \pm 1.8	11.3 \pm 2.3
Peak VO ₂ (ml/kg/min)	18.4 \pm 3.7**	16.3 \pm 2.2
Left atrial dimension (mm)	55 \pm 11*	62 \pm 14
Tissue injury index	7.8 \pm 1.7**	12.0 \pm 1.9
Plasma ANP level at rest (pg/ml)	119 \pm 57	99 \pm 48
Plasma ANP level after exercise (pg/ml)	188 \pm 148	127 \pm 77

ANP: atrial natriuretic peptide, AT: anaerobic threshold. * p < 0.05, ** p < 0.01.

patients with atrial fibrillation. The responder group showed a smaller left atrial dimension than the non-responder group, which suggested a milder load on the left atrium in the responder group than in the non-responder group. We reported that of the patients who underwent the Maze operation those with a smaller left atrial dimension maintained the sinus rhythm after surgery.³⁰⁾ This suggests that the left atrial dimension could be used as an index for representing the severity of left atrial injury. The ANP concentration after exercise testing showed a tendency for a higher value for the responder than the non-responder group. This means that ANP secretion by the atrium is used as an indicator of the left atrial injury. It was also considered from the aspect of ANP secretion that the heart rate response to exercise is larger with milder atrial functional disturbance. Such a higher VO_2 in the responders with a better heart rate response may be interpreted as reflecting the fact that the peak VO_2 depends on the maximum heart rate, maximum stroke volume, and the difference between the maximum arterial and versus oxygen contents. According to a semi-quantitative histological evaluation, heart rate response to exercise was greater with milder anatomical atrial tissue injury.

The heart rate response to exercise in patients with AF depends on the severity of atrial organic injury. Conversely, this may indicate that the severity of atrial injury can be predicted from the heart rate response to exercise.

CONCLUSIONS

The prognosis and the degree of atrial organic injury in the patients with AF were predicted by the evaluation of exercise capacity using the CPX. Accordingly, the examination like exercise testing was needed to estimate the organic as well as functional disorder in the patients with AF.

REFERENCES

- 1) Cox JL, Schuessler RB, D'Agostino HJ Jr, Stone CM, Chang BC, Cain ME, Corr PB, Boineau JP: The surgical treatment of atrial fibrillation. III. Development of a definitive surgical procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991, **101**: 569-583

- 2) Ueshima K, Myers J, Morris CK, Atwood JE, Kawaguchi T, Froelicher VF: *Am Heart J* 1993, **126**: 1021-1024
- 3) Weber KT, Janicki JS, McElroy PA, Reddy HK: Concepts and applications of cardiopulmonary exercise testing. *Chest* 1988, **93**: 843-847
- 4) Wasserman K, Whipp BJ, Castagna J: *J Appl Physiol* 1974, **36**: 457-464
- 5) Atwood JE, Myers J, Sullivan M, Forbes S, Sandhu S, Callahan P, Froelicher V: *Am Heart J* 1989, **118**: 913-918
- 6) Lipkin DP, Frenneaux M, Stewart R, Joshi J, Lowe T, McKenna WJ: *Br Heart J* 1988, **59**: 572-577
- 7) Morris JJ, Entman M, North WC, Kong Y, McIntosh H: The changes in cardiac output with reversion of atrial fibrillation to sinus rhythm. *Circulation* 1965, **31**: 670-678
- 8) Reale A: Acute effects of countershock conversion of atrial fibrillation upon right and left heart hemodynamics. *Circulation* 1965, **32**: 214-222
- 9) Kaplan MA, Gray RE, Iseri LT: Metabolic and hemodynamic responses to exercise during atrial fibrillation and sinus rhythm. *Am J Cardiol* 1968, **22**: 543-549
- 10) Khaja F, Parker JO: Hemodynamic effects of cardioversion in chronic atrial fibrillation. Special reference to coronary artery disease. *Arch Intern Med* 1972, **129**: 433-440
- 11) Shapiro W, Klein G: Alterations in cardiac function immediately following electrical conversion of atrial fibrillation to normal sinus rhythm. *Circulation* 1968, **38**: 1074-1084
- 12) Yigit Z, Akdur H, Arabaci U, Gurses HN, Guzelsoy D: Restoring sinus rhythm improves excessive heart rate response to exercise in patients with atrial fibrillation. *Jpn Heart J* 2003, **44**: 73-82
- 13) Gosselink AT, Crijns HJ, van den Berg MP, van den Broek SA, Hillege H, Landsman ML, Lie KI: Functional capacity before and after cardioversion of atrial fibrillation: a controlled study. *Br Heart J* 1994, **72**: 161-166
- 14) Ueshima K, Myers J, Graettinger WF, Atwood JE, Morris CK, Kawaguchi T, Froelicher VF: Exercise and morphologic comparison of chronic atrial fibrillation and normal sinus rhythm. *Am Heart J* 1993, **126**: 260-261
- 15) Atwood JE, Myers J, Sullivan M, Forbes S, Friis R, Pewen W, Callahan P, Hall P, Froelicher V: Maximal exercise testing and gas exchange in patients with chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 1988, **11**: 508-513
- 16) Eren M, Arikan E, Gorgulu S, Dagdeviren B, Bolca O, Norgaz T, Tezel T: Relationship between resting parameters of the mitral valve and exercise capacity in patients with mitral stenosis: can the diastolic filling period predict exercise capacity? *J Heart Valve Dis* 2002, **11**: 191-198
- 17) Ueshima K, Myers J, Ribisl PM, Atwood JE, Morris CK, Kawaguchi T, Liu J, Froelicher VF: Hemodynamic

- determinants of exercise capacity in chronic atrial fibrillation. *Am Heart J* 1993, **125**: 1301-1305
- 18) Hornsten TR, Bruce RA: Effects of atrial fibrillation on exercise performance in patients with cardiac disease. *Circulation* 1968, **37**: 543-548
 - 19) Brand FN, Abbott RD, Kannel WB, Wolf PA: Characteristics and prognosis of lone atrial fibrillation. 30-year follow-up in the Framingham Study. *JAMA* 1985, **254**: 3449-3453
 - 20) Furberg CD, Psaty BM, Manolio TA, Gardin JM, Smith VE, Rautaharju PM: Prevalence of atrial fibrillation in elderly subjects (the Cardiovascular Health Study). *Am J Cardiol* 1994, **74**: 236-241
 - 21) Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, Whisnant JP, Holmes DR Jr, Ilstrup DM, Frye RL: The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades. *N Engl J Med* 1987, **317**: 669-674
 - 22) Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D: Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998, **98**: 946-952
 - 23) Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB: Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991, **22**: 983-988
 - 24) Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ: A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med* 2002, **113**: 359-364
 - 25) Ueshima K, Myers J, Ribisl PM, Morris CK, Kawaguchi T, Liu J, Froelicher VF: Exercise capacity and prognosis in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiology* 1995, **86**: 108-113
 - 26) Bellet S: *Clinical Disorders of the Heart Beat: Atrial Fibrillation*, ed 3. Lea & Febiger, Philadelphia, 1971, p 244
 - 27) Kannel WM, Wolf PA: Epidemiology of atrial fibrillation. *Atrial Fibrillation: Mechanism and Management* (ed by Falk RH, Podrid PJ), Raven Press, New York, 1992, pp 81-92
 - 28) Ueshima K, Nasu M, Segawa I, Kamata J, Kobayashi N, Nakamura M, Chiba N, Hiramori K: What determines the heart rate response to exercise in patients with atrial fibrillation? *Jpn Heart J* 2000, **41**: 445-450
 - 29) Seagawa I, Tashiro A, Sato M, Hiramori K, Yagi Y, Kawazoe K: Clinical experience of the tissue characterization of the atrium and clinical course after the maze procedure. (abstract, in Japanese) *Jpn Circ J* 1995, **59** suppl I: 179.
 - 30) Kamata J, Nakai K, Chiba N, Hosokawa S, Sato Y, Nasu M, Sasaki T, Kitahara H, Izumoto H, Yagi Y, Itoh C, Hiramori, Kawazoe K: Electrocardiographic nature of restored sinus rhythm after Cox maze procedure in patients with chronic atrial fibrillation who also had other cardiac surgery. *Heart* 1997, **77**: 50-55

糖尿病と虚血性心疾患

伊藤 智範
瀬川 郁夫
平盛 勝彦

糖尿病と虚血性心疾患の疫学

これまでの多数の疫学的研究から、糖尿病は虚血性心疾患の主要な危険因子であることが示されている。わが国の久山町研究によると、糖尿病例での虚血性心疾患の発症率は年間5/1,000人で、非糖尿病例の1.6/1,000人に比較して3倍であった¹⁾。さらに、1997年に行われた厚生省の糖尿病実態調査によると、ヘモグロビンA1cが6.1%以上で糖尿病が強く疑われる例が全国で690万人おり、5.6%以上6.1%未満で糖尿病を否定しえない例を合わせると1,370万人に及ぶと推計された²⁾。40歳以上の日本人の10人に1人以上が糖尿病ないし耐糖能異常と考えられ、合併症としての虚血性心疾患が爆発的に増える可能性がある。本稿では、循環器内科医に必要な糖尿病の病態生理および管理について略述する。

1) Fujishima M, et al :
Diabetes 45 : S14 -
S16, 1996.

2) 糖尿病実態調査の
概要 (速報分) 平成10
年3月18日. 糖尿病
41 : 325-331, 1998.

糖尿病での動脈硬化進展機序

糖尿病が虚血性心疾患の危険因子であるのはなぜか。血糖上昇と動脈硬化進展の病態生理および分子生物学的手法を用いた報告が、諸家からなされている。

高血糖

高血糖が持続すると、ポリオール経路が活性化され、結果的にprotein kinase C (PKC) 活性が高まる (図1)。糖尿病例での心筋細胞・血管平滑筋細胞・血管内皮細胞・腎メサンギウム細胞などでPKC活性の亢進が証明されている³⁾。その結果、サイトカインの産生や間質マトリックス (コラーゲンおよびフィブロネクチンなど) の増加により基底膜の肥厚をきたす。さらに種々の接着分子ならびにマクロファージの遊走を引き起こし、糖尿病性の合併症を招来すると考えられている。

3) Williams B : J
Hypertens 13 : 477
-486, 1995.

酸化ストレス

高血糖の持続は、酸化ストレスの増大をきたしてフリーラジカルを産生する。最近の分子生物学的検索から、ミトコンドリア由来の活性酸素種を抑制すると、培養内皮細胞内での非酵素的糖化後期生成物 (advanced glycation end-products ; AGE) 活性やPKC活性、さらにポリオール経路活性化を抑制しうることが