

## 1. 検査基準値の考え方—医学における正常と異常—

下方 浩史<sup>1)</sup> 安藤富士子<sup>2)</sup>

**要約** 検査値から臨床的判断を下す際に、その人が「正常」であるか「異常」であるかを区別するために用いられる検査値を正常値という。高齢者では個人差が大きく、集団としての正常値を設定することは困難であり、そのため通常は検査値の判定には基準値が使われている。しかし基準値は単に健康な集団での平均的な検査値の範囲を示すだけであり、現在及び将来の健康状態の判定や推測を行うように作成されたものではない。老年医学の実践の場においては生活自立を予測するような生活習慣病の検査基準値の設定が是非とも必要である。本研究では生活自立と関連する認知機能低下に関して、その危険因子の基準値について検討した。認知機能低下の危険因子は多いが、それぞれの因子の寄与は小さく、従来の方法でカットオフ値を明確に決定することは多くの場合困難であった。縦断的なデータから生活習慣病の検査値の最適な範囲の設定を行う新たな方法論が必要である。

**Key words** : 検査基準値, 基準範囲, 生活自立, 縦断研究, 老化

(日老医誌 2013; 50: 168-171)

### はじめに

生活習慣病の多くの研究が、脳血管障害や虚血性心疾患、がんなどの疾患発症や、死亡をエンドポイントとして研究されてきた。高齢化が進み、健康長寿が求められるわが国の健康施策の中で、日常生活活動能力、QOLや認知機能の低下を予防することが重要であり、これらをエンドポイントとした検査基準値の設定が求められている。本研究では、地域住民を対象とした大規模な縦断疫学データを用いて、高齢期の生活自立の障害となる認知機能障害を指標とした生活習慣病の検査値の最適な範囲の設定を模索することを目的とする。

### 研究方法

対象は国立長寿医療研究センター周辺（大府市および知多郡東浦町）の地域住民からの無作為抽出者（観察開始時年齢40～79歳）である。調査内容資料の郵送後、調査内容に関する説明会を開催し、文書による同意（インフォームドコンセント）を得ている。対象者は40, 50, 60, 70歳代男女同数とし一日7名、1年間で約1,200人

について多数の老化関連要因の検査を年間を通して行い、2年ごとに追跡観察を行っている。追跡中のドロップアウトは、同じ人数の新たな補充を行い、定常状態として約2,400人のダイナミックコホートとすることを目指している。平成22年度に第6次調査を終了し、引き続き第7次調査を実施している<sup>1,2)</sup>。

検査および調査項目は、医学分野では、問診、聴打診、生活調査、病歴調査、喫煙・飲酒などの嗜好調査、使用薬物調査、血液検査では血球計算、一般生化学検査、糖代謝、微量元素など、頭部MRI、血圧、脈拍、安静時心電図、心エコー、頸動脈エコー、ABI、脈波速度、二重X線吸収装置（DXA）による全身及び腰椎、左右大腿骨頭骨密度測定、膝X線写真を実施している。形態測定としては身長、体重、腹囲、腰囲、腹部前後幅等、脂肪厚・筋肉厚測定は腹膜上、腹部、大腿前部、上腕三頭筋部を超音波法で測定、腹腔内脂肪量は腹部CTで計測している。運動生理学分野では総合体力診断システムによる体力測定、重心動揺検査、3次元歩行動作分析、身体活動は詳細な聞き取り調査と3次元加速度計モーションカウンタの一週間の装着を行っている。栄養学分野では、秤量法及び写真記録を併用した3日間食事記録調査、サプリメント調査、嗜好飲料・柑橘類調査を行っている。心理学分野では認知機能及び知能検査としてMMSE、WAIS-R-SF、WAIS数唱等を実施、またライ

1) H. Shimokata : 国立長寿医療研究センター予防開発部

2) F. Ando : 愛知淑徳大学健康医療科学部スポーツ・健康医科学科

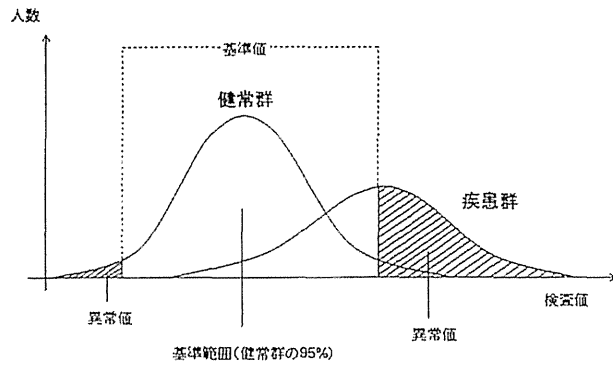


図1 健常群と疾患群における基準値と異常値  
健常群でも基準値をはずれる場合があり、また疾患群でも基準値内の場合もある

イベント、日常苛立ち事尺度、余暇に関する調査、ADL (老研式活動能力指標)、仕事に対するコミットメント尺度、生きがい調査、生活満足度 (LSI-K)、自尊感情尺度 (Self Esteem)、死に対する態度尺度、抑うつ (CES-D)、ソーシャルサポート、ソーシャルネットワーク等を調査している。これらのデータを用いて、今回は高齢者の生活自立に関連する認知機能低下を指標とした高齢者の基準値の設定を行うための方法論の構築を目指す。

基準値の設定は NCCLS (アメリカ臨床検査標準協議会) の方法に準じて行われることが一般的である<sup>34)</sup>。健康な基準個体を集めて基準母集団を設定し、その中から基準標本群を無作為に抽出する。抽出された集団の検査測定値の分布をもとにして、その95パーセント内に含まれる値を基準範囲、上限および下限を基準値と定義する (図1)。しかし、この方法では単に正常者の分布を意味しているだけで異常者との鑑別には役立たず、高齢者の生活自立認知機能を指標としての基準値を決めることはできない。そこで、まず横断的解析から、認知機能正常および認知機能低下が認められる高齢者集団での血圧及びHbA1c検査値の分布から基準値の設定が可能かどうかを、感度、特異度から最適なカットオフ値を求めるためのROC曲線を用いて検討した。さらに縦断的研究から、10年間認知機能が正常であった高齢者集団での、ベースラインの検査値の分布から基準値を推定した。

### ROC 曲線による基準値の設定

生活習慣病に関連する検査値として、血圧についての検討を行った。図2はMMSEが28点以上の高齢者と、MMSEが27点以下の認知機能障害の可能性がある高齢者での収縮期血圧をプロットしたものである。ピーク値は認知機能低下の高齢者でやや高い方に偏っているが、

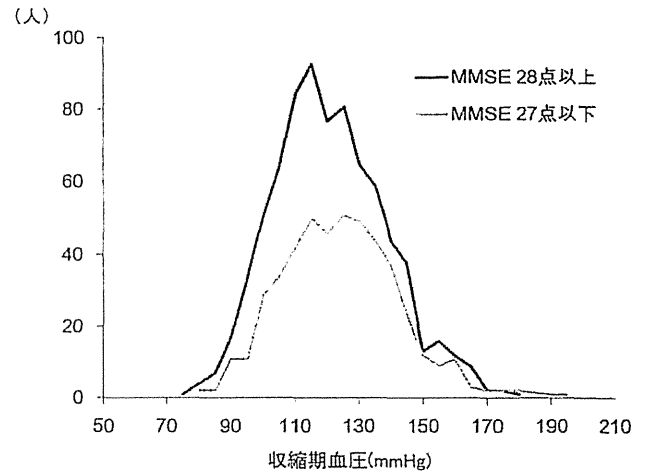


図2 認知機能障害の有無と収縮期血圧の分布  
認知機能障害がない群とある群では、後者の方がピークは高値に偏ってはいるが、全体の分布はほとんど重なっている

全体の分布はほとんど重なっていることが分かる。拡張期血圧についても同様に、血圧の値の分布は認知機能障害のある高齢者とない高齢者でほとんど重なっていた。

ROC 曲線を使って認知機能障害の有無を判定する血圧のカットオフ値を求めてみた。収縮期血圧によるROC曲線では、カットオフ値は120 mmHgとなるが、ROC曲線は直線に近い。ROC曲線の下部分の面積であるAUCは0.5~1.0の値となり、一般には0.5~0.7がlow accuracy, 0.7~0.9がmoderate accuracy, 0.9~1.0がhigh accuracyとされる。今回の検討ではAUCは0.546と小さな値であり、判定能はきわめて低かった。ROC曲線で求められた収縮期血圧120 mg/Hgというカットオフ値は、実際に図2でみると、健常者・異常者ともにもっとも頻度の高いところであり、これでは異常・正常を分離できないことがわかる。同様に収縮期血圧によるROC曲線を描いてみたところ、カットオフ値は65 mmHgでAUCは0.531であり、この方法では血圧の基準値を設定することができなかった。

糖尿病の指標であるHbA1cについても、認知機能障害の有無による分布をプロットした。ピーク値は認知機能低下の高齢者で、やはりわずかに高い方に偏っているが、全体の分布はほとんど重なっていた。さらに認知機能障害の有無を判定するHbA1cのカットオフ値を求めてみたところ、HbA1cが5.9%で、ROC曲線の下部分の面積であるAUCは0.516と、やはりきわめて小さな値であった。横断的にMMSEによる判定を認知機能障害の指標とした場合、血圧、HbA1cではROC曲線を満足させるような感度・特異度の良いカットポイントを決

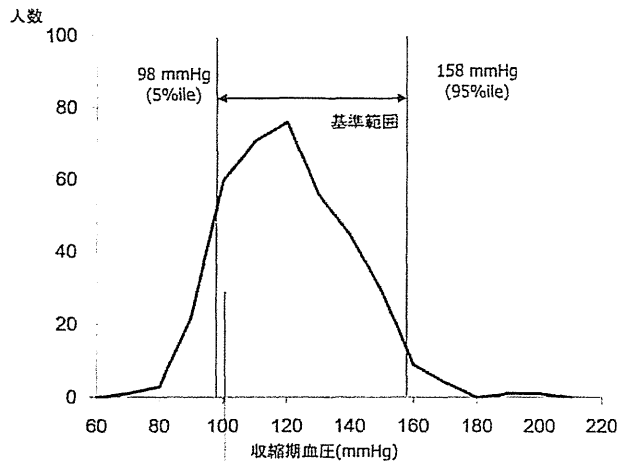


図3 収縮期血圧の基準範囲例 (5パーセンタイルと95パーセンタイル)  
10年間認知機能が正常範囲であった308名を対象として、収縮期血圧の分布を示している

定することはできなかった。

### 縦断的データからの基準値の推定

疾患の有無によるカットオフ値を求めるのではなく、縦断的なデータから10年間認知機能が正常範囲であった者の検査値の基準範囲を求める試みを行った。図3には10年間MMSEが28点以上で認知機能が正常範囲であった者の収縮期血圧の分布を示している。5パーセンタイルが98 mmHg、95パーセンタイルが158 mmHgである。もう少し条件を厳しくして、半数の人が基準値に入る25パーセンタイルと75パーセンタイルを基準値にすると、110 mmHg～139 mmHgが基準範囲となる。同様に拡張期血圧で基準範囲を求めると、5パーセンタイルと95パーセンタイルを基準値にした場合には、基準範囲は59 mmHg～94 mmHg、55パーセンタイルと75パーセンタイルを基準値にした場合には、68 mmHg～84 mmHgとなった。

本方法では10年間認知機能が正常である、ということを用いてNCCLSの健常集団の定義のかわりに使って、血圧での基準値を試算しているが、この場合、異常者での血圧分布を示していないので、この基準値に意味があるかどうかは不明である。また求められた基準値や、基準範囲についての臨床的意義についても判断は難しい。

### 生活自立を指標とした検査基準値の設定

認知症やADL、QOLの障害は、加齢に伴う様々な因子によって引き起こされる。今回の検討では認知機能障害を対象に、まず横断的解析により認知機能低下群と正

常群で、血圧、HbA1cの検査値の分布に差があるかどうか、ROC曲線でこれらの検査値のカットオフ値を決定できるかどうかの探索的な検討をまず行った。しかし血圧、HbA1cの検査値の分布は、認知機能障害群、正常群でほとんど重なっており、感度、特異度による検査値のカットオフ値を求めることは、ほとんど不可能であった。そのため、認知機能が維持できている群での生活習慣病検査値の分布を求め、それにより検査値の基準値や基準範囲を求めた。この方法は簡便ではあるが、求められた基準値の臨床的意義の判断が難しい。

加齢に伴う影響を含めた解析を行うためには、ベースラインの検査値とエンドポイントとしての認知機能障害のデータを用いるようなコホート研究が必要であろう。今回は、10年間認知機能が正常であった高齢者集団での、ベースラインの検査値の分布から検査基準値や基準範囲の単純な算出を行ったが、認知機能障害をエンドポイントにして、飲酒、喫煙、食事、運動などの生活習慣を調整した多重ロジスティック回帰やCox比例ハザードモデルによる基準値のカットオフ値を探るような研究も必要であろう。さらにベースラインデータとエンドポイントの追跡だけでなく、例えば高齢者集団10年間の認知機能と検査値の変動から、生活習慣が最良かつ認知機能が維持できていた場合の検査値の分布やカットオフ値を、一般化推定方程式(GEE)や一般化加法モデル(GAM)を用いて推定するような縦断的なアプローチも試みるべきであろう。

### まとめ

「認知機能低下」、「ADL低下」への生活習慣病に関連した危険因子は多いが、それぞれの因子の寄与は小さく、従来の方法でカットオフ値を明確に決定することは多くの場合困難である。縦断的なデータから生活習慣病の検査値の最適な範囲の設定を行う新たな方法論が必要である。

### 文 献

- 1) Shimokata H, Ando F, Niino N: A new comprehensive study on aging—the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). J Epidemiol 2000; 10: S1-S9.
- 2) 下方浩史, 安藤富士子: 長期縦断疫学で分かったこと. 日老会誌 2008; 45: 563-572.
- 3) 下方浩史: 検査の基準値・異常値のみかた. 生涯教育シリーズ77, 高齢者診療マニュアル. 日本医師会雑誌 2009; 138 (Suppl 2): S64-S65.
- 4) 下方浩史編著: 高齢者検査基準値ガイド. 中央法規, 東京, 2000, p2-5.

## The perspective of reference value—normal and abnormal in medicine

Hiroshi Shimokata<sup>1)</sup> and Fujiko Ando<sup>2)</sup>

### Abstract

A normal value is a laboratory parameter to discriminate between "normal" and "abnormal" in clinical decision-making. Because individual differences in the elderly are large, it can be difficult to determine a normal value as a group, thus reference values are basically used to assess laboratory parameters. However, the reference value only shows the range of average values in the healthy population, and does not determine or predict present and future health status. In geriatric practice, reference values of laboratory parameters in life-style related disease to predict independent life is indispensable. Although there are many risk factors of cognitive impairment related to independent life, the contribution rate of each factor is small and it is often difficult to determine a cut-off point by conventional methods. A new methodology is required to determine the optimal range of clinical parameter of life-style-related disease using longitudinal data.

**Key words:** *Reference value, Reference range, Independent life, Longitudinal study, Aging*  
(Nippon Ronen Igakkai Zasshi 2013; 50: 168–171)

---

1) Department for Development of Preventive Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology

2) Faculty of Health and Medical Sciences, Department of Sports and Health Sciences, Aichi Shukutoku University

# Geriatric Medicine

老年医学 2013・Vol. 51

## 健康増進 高齢者における

特集—編集—鈴木 隆雄(国立長寿医療研究センター研究部長)

### 連載

高齢者診療のワンポイント・アドバイス

高齢者の薬物療法でみられる諸問題

岩本 俊彦(国際医療福祉大学高齢者総合診療科教授)

高齢者特有疾患の漢方ベストチョイス 72

在宅医療と漢方

秋葉 哲生(あきば伝統医学クリニック院長)

**特集**

# 高齢者における健康増進

鈴木 隆雄(国立長寿医療研究センター研究所長)

	序文 .....	鈴木 隆雄	883
総説	1. 老年医学の視点からみた高齢者の健康増進とは .....	荒井 秀典	885
	2. 高齢期の健康増進の総合的方策—健康日本 21 における視点から— .....	辻 一郎	889
	3. 老化の長期縦断研究からみた高齢期の健康増進の解明 .....	下方 浩史	895
Seminar	1. 運動からみた高齢期の健康増進：身体活動基準 2013 とアクティブガイド .....	宮地 元彦	901
	2. 日々の食事を介した高齢期の健康増進 .....	大塚 礼	907
	3. 社会的要因からみた高齢期の健康増進(地域を中心に) .....	鈴木 佳代	913
	4. 精神心理的側面からみた高齢者の健康増進 .....	杉原 陽子	917
	5. 地域での居場所創りと高齢者の健康増進 .....	澤岡 詩野	923
	6. 慢性疾患に向けた健康運動とその効果 .....	田中喜代次	927
	7. 介護予防と健康づくり・地域づくり .....	櫃本 真幸	933
	8. サルコペニア予防と健康増進 .....	金 憲経	937
	9. 認知症予防と健康増進 .....	島田 裕之	941
	10. 歯科・口腔領域からみた高齢期の健康増進 .....	渡邊 裕	947
	11. 自治体における高齢期の健康増進 .....	芳賀 博	953
原著	ドネペジル, ガランタミン, リバスタグミンのアルツハイマー型認知症に対する 有効性の比較検討：国内第3相試験を統合した有効性の間接比較 .....	繁田 雅弘	957
研究報告	新しいパーキンソン病治療薬アデノシン A <sub>2A</sub> 受容体選択的拮抗薬 イストラディフィリン(ノウリアスト®)の高齢者での使い方 .....	横江 勝	965
連載	高齢者診療のワンポイント・アドバイス 第66回 高齢者の薬物療法でみられる諸問題 .....	岩本 俊彦	970
	定額医療時代における高齢者漢方診療の意義：第72回 高齢者特有疾患の漢方ベストチョイス72 在宅医療と漢方 .....	秋葉 哲生	972
	Clinical Pathological Conference 右下肢の筋力低下で発症、その後進行性に四肢筋力低下、呼吸不全を来した1例 .....		975
NEWS	●政府・社会保障制度改革国民会議 —最終報告書を取りまとめる 税と社会保障一体改革の具体化へ—ほか .....		987
	次号予告 .....		992
	Vol.51 総索引 .....		993
	投稿規定 .....		1001

## 総説

3. 老化の長期縦断研究からみた  
高齢期の健康増進の解明

下方 浩史 安藤富士子

## KEY WORD

- 長期縦断研究
- 高齢者
- 疫学
- 健康増進
- 健康長寿

## SUMMARY

■要支援・要介護となるような高齢者の虚弱を早期に見出して、その対策を行うことは高齢化が急速に進行するわが国において急務である。このような高齢者の虚弱の予防、健康維持のためのエビデンスを得るには、老化に関しての長期縦断研究が必要である。無作為抽出された地域住民 3,126 人の 6 年間の長期縦断調査データから SF36 Physical Function 得点が 75 点以下を虚弱であるとし、これをエンドポイントとして虚弱の危険因子について検討した。解析の結果、慢性疾患やうつを予防し、栄養を摂ること、十分に運動して歩行能力や体力を保つことが ADL の低下を予防し、健康維持増進につながる事が明らかになった。

## はじめに

日本人の平均寿命は年々長くなり、高齢者、特に後期高齢者の人口が急増している。しかし、高齢になるほど ADL の低下した虚弱な高齢者は増加する。その一方で少子化が進み、今後は若い労働力が不足していくことが予想される。このような状況で、介護のために若い人材の労働力が費やされるようでは、日本の国が成り立っていかなくなってしまうだろう。要支援・要介護となるような高齢者の ADL 低下への対策を行い、高齢者の健康増進を目指すことは高齢化が急速に進行するわが国において急務である<sup>1)</sup>。地域住民における ADL 低下の危険因子を見出し、予防施策に資することを目的に、無作為抽出された地域住民のコホートでの 6 年間の縦断的データを用いて検討を行った。

## 老化に関する長期縦断研究

1 人ひとりの対象者を長期にわたって観察を続けていく研究を縦断的研究という。縦断的研究には長い研究期間と多くの専門家の協力、そして多くの研究費を要するために、実現が難しい。施設での詳細な検査・調査を実施し縦断的追跡を行っている縦断的研究は、その重要性にもかかわらず世界的にみてもほとんどない<sup>2)</sup>。

われわれは、平成 9 年より研究所周辺の地域に住む 40~79 歳までの男女を対象にして「国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)」を実施してきた<sup>3-6)</sup>。1 日の検査人数は 7 人とし、火曜から金曜までの週 4 日、年間 1,200 人、2 年で 2,400 人のコホートを完成し、以後 2 年ごとに調査を実施した。検査および調査のほとんどを施設内に設けた専用の検査センターで行った。ここでは詳細を紹

■しもかた ひろし(名古屋学芸大学大学院栄養科学研究科)／あんどう ふじこ(愛知淑徳大学健康医療科学部)

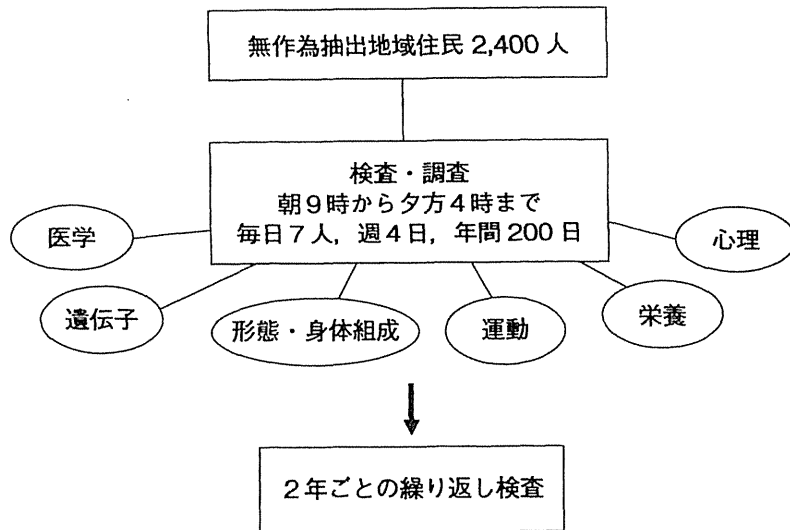


図1 国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)の概要

介することはできないが、朝9時から夕方4時までの間に分刻みでスケジュールを組んで、MRIや超音波断層、骨密度測定など最新の機器を利用した医学検査のみならず、詳細な生活調査、食事調査、運動機能調査、心理検査など広汎で学際的な、しかも精度の高い検査・調査を実施してきた(図1)。

### 長期縦断研究による虚弱の危険因子の解析

NILS-LSAの第4次調査から第7調査までの6年間に、調査に参加した40歳以上の地域在住中高年者3,126人(男性1,567人、女性1,559人)を対象として解析を行った。平均年齢は、男性 $58.4 \pm 13.2$ 歳、女性 $58.9 \pm 13.5$ 歳である。今回の虚弱危険因子の検討に用いた測定項目は、背景要因として喫煙習慣、高血圧症、心疾患、脂質異常症、糖尿病、脳卒中の既往歴、自覚的健康度、血圧、Center for Epidemiologic Studies Depression Scale(CES-D)での評価による抑うつの有無<sup>7)</sup>、Mini Mental State Examination(MMSE)による認知機能評価<sup>8)</sup>を用いた。また身体活動として余暇身体活動量、総身体活動量、1日歩数、体格としてBMI、大腿中部周囲長、下腿周囲長、上腕周囲長、二重エネルギーX線吸収法(DXA)による体脂肪率を用いた。栄養

摂取量としては、写真撮影を併用した3日間の秤量食事記録法により算出した総エネルギー摂取量、たんぱく質、ビタミンD、アルギニン、分岐鎖アミノ酸のイソロイシン、ロイシン、バリン摂取量および血清アルブミンを用いた。体力は、普通歩速度、速歩速度、上体起こし回数、膝伸展筋力、脚伸展パワー、握力、閉眼片足立ち、開眼片足立ち、全身反応時間を用いた。身体機能としてはSF36のPhysical Function項目を用いた<sup>9,10)</sup>。その具体的な項目は以下の通りである。体を前に曲げる、百メートル以上歩く、適度の運動、階段を1階上まで登る、数百メートル以上歩く、階段を数階上まで登る、激しい運動、少し重い物を運ぶ、1km以上歩く。これらの項目による得点が75点以下は、要支援・要介護となる程度のADLの障害があると判定される。Physical Function得点が75点以下となる6年間のリスクを各種要因について、一般化推定方程式(GEE)で性別・年齢を調整して推定し、オッズ比を計算した<sup>11)</sup>。

### ADL低下の危険因子解析結果(表1)

1. 生活習慣・背景要因などとADLの低下との関連  
喫煙習慣はADLの低下とは有意な関連はみ



表1 生活習慣・背景要因などとADLの低下との関連

SF36 Physical Functionが75点以下となる6年間のリスクを各種要因について、一般化推定方程式(GEE)で性別・年齢を調整し全対象者で推定し、オッズ比を計算した

		オッズ比	95%信頼区間	p値
<b>生活習慣・背景要因</b>				
喫煙	吸う vs 吸わない	1.070	0.796 — 1.437	NS
高血圧症	あり vs なし	1.564	1.324 — 1.846	<0.0001
心疾患	あり vs なし	1.768	1.329 — 2.352	<0.0001
脂質異常症	あり vs なし	1.266	1.055 — 1.521	0.0014
糖尿病	あり vs なし	1.739	1.321 — 2.291	<0.0001
脳卒中	あり vs なし	2.428	1.702 — 3.463	<0.0001
自覚的健康	普通・悪い vs よい	3.198	2.659 — 3.846	<0.0001
収縮期血圧	10 mmHg ごと	1.031	0.990 — 1.074	NS
拡張期血圧	10 mmHg ごと	1.008	0.939 — 1.081	NS
抑うつ	CES-D 15 以下 vs 16 以上	0.468	0.391 — 0.560	<0.0001
認知機能	MMSE 24 以上 vs 23 以下	0.702	0.530 — 0.930	0.0136
<b>身体活動</b>				
余暇身体活動量	100,000 METS*min/y ごと	0.518	0.408 — 0.658	<0.0001
総身体活動量	100,000 METS*min/y ごと	0.569	0.467 — 0.693	<0.0001
歩数	1,000 歩ごと	0.812	0.783 — 0.843	<0.0001
<b>体格</b>				
BMI	1 m/kg <sup>2</sup> ごと	1.080	1.045 — 1.116	<0.0001
大腿中部周囲長	1 cm ごと	0.999	0.995 — 1.002	NS
下腿周囲長	1 cm ごと	0.993	0.980 — 1.005	NS
上腕周囲長	1 cm ごと	1.004	0.985 — 1.023	NS
体脂肪率(DXA)	10% ごと	1.782	1.470 — 2.160	<0.0001
<b>栄養</b>				
エネルギー摂取量	100 kcal/日ごと	0.940	0.918 — 0.963	<0.0001
たんぱく質摂取量	10 g/日ごと	0.870	0.824 — 0.919	<0.0001
ビタミンD摂取量	5 μg/日ごと	0.943	0.891 — 0.997	0.0379
イソロイシン摂取量	1 g/日ごと	0.763	0.678 — 0.858	<0.0001
ロイシン摂取量	1 g/日ごと	0.854	0.797 — 0.915	<0.0001
バリン摂取量	1 g/日ごと	0.790	0.714 — 0.873	<0.0001
アルギニン摂取量	1 g/日ごと	0.827	0.756 — 0.904	<0.0001
血清アルブミン	1 g/dL ごと	0.725	0.604 — 0.869	0.0005
<b>体力</b>				
握力	10 kg ごと	0.377	0.307 — 0.462	<0.0001
開眼片足立ち	10 秒ごと	0.942	0.923 — 0.962	<0.0001
閉眼片足立ち	10 秒ごと	0.815	0.721 — 0.923	0.0012
全身反応時間	0.1 秒ごと	1.371	1.256 — 1.496	<0.0001
脚伸展パワー	10W ごと	0.947	0.937 — 0.957	<0.0001
上体起こし	1 回/分ごと	0.926	0.904 — 0.948	<0.0001
膝伸展筋力	10 kg ごと	0.522	0.455 — 0.599	<0.0001
普通歩速度	1 m/分ごと	0.019	0.011 — 0.031	<0.0001
速歩速度	1 m/分ごと	0.944	0.937 — 0.951	<0.0001

られなかった。高血圧症、心疾患、脂質異常症、糖尿病、脳卒中は疾患を有する群でADLが低

下するリスクは高かった。自覚的健康度は、「よい」群に比べ「悪い」、「普通」の群はADL低

下のリスクが有意に高く、そのオッズ比は3.2 (95%信頼区間 2.7~3.8)と高い値であった。血圧は有意な結果とならなかった。抑うつは、ある群に比べてない群で有意にADL低下のリスクが低くなっていた。認知機能は低下がない群でADL低下のリスクが下がっていた。

## 2. 身体活動量とADLの低下との関連

余暇活動量、総活動量、1日の歩数の身体活動指標は、いずれも高いほどADL低下のリスクを下げていた。

## 3. 体格とADLの低下との関連

BMIは高くなるほどADL低下のリスクを上げていた。DXAで測定した体脂肪率は、高いほどADL低下のリスクが高くなっていた。しかし、大腿中部周囲長、下腿周囲長、上腕周囲長はADL低下との関連が認められなかった。

## 4. 栄養とADLの低下との関連

総エネルギー摂取量、たんぱく質、ビタミンD、アルギニン、分岐鎖アミノ酸のイソロイシン、ロイシン、バリン摂取量、血清アルブミンの栄養の指標はすべてADL低下に関連しており、数値が低いとADL低下のリスクとなっていた。

## 5. 体力とADLの低下との関連

普通歩速度、速歩速度、上体起こし回数、膝伸展筋力、脚伸展パワー、握力、開眼片足立ち、閉眼片足立ち、全身反応時間と体力指標すべてで成績が悪いとADL低下のリスクとなっていた。

## 高年齢期のADL低下の予防

解析の結果からADL低下に関連する要因が数多く得られた。喫煙は様々な慢性疾患の要因ではあるが、今回の検討ではADLの低下要因とはならなかった。6年間でADLの低下を来すような集団は、既に喫煙を止めている可能性がある。一方で、高血圧症、心疾患、脂質異常

症、糖尿病、脳卒中のような慢性疾患は程度の差はあるが、すべてADL低下の要因となっていた。自覚的健康度はよい場合に比べて、普通あるいは悪い場合にはADLの低下の強い要因であった。自己判断による健康状態が、その後ADL低下を予測する要因であることは興味深い。また抑うつもADL低下の強い要因であった。認知機能低下は有意ではあったが、ADL低下への影響はそれほど大きくはなかった。

身体活動量は余暇身体活動量、総身体活動量、1日歩数のいずれもが多いほどADL低下を予防するという結果であり、身体活動の重要性が確認された。体格は、BMIや体脂肪率が高いほどADL低下を来しやすいという結果であり、一般住民では痩せよりも肥満予防の重要性が示された。栄養の指標はすべての項目でADLの低下と関係していた。体力もすべての項目でADL低下の予防因子であり、筋力、柔軟性、持久力、平衡機能、歩行能力のいずれもが重要であることが明らかになった。

ADL低下や虚弱を予防し、高齢期の健康維持増進を目指すには多くのアプローチがあるが、慢性疾患やうつを予防し、栄養を摂ること、十分に運動して歩行能力や体力を保つことが重要であることが、今回の検討で確認することができた。

## おわりに

高齢期の健康増進を目指してその方法を解明するためには、健康維持増進の障害となるようなADL低下の危険因子を明らかにしていくことが必要である。長期縦断研究により、生活習慣、体力、栄養など様々な要因についての縦断的な解析から、高齢者のADL低下のリスク要因を明らかにするとともに、その予防方法の開発を進めることが可能となる。しかし、老化の様々な側面を長期にわたって総合的に観察していく縦断研究には、膨大な研究費と学際的な多数の研究者や専門家の協力が必要であり、実施は困難である。15年にわたって続けられてきたNLS-LSAは、日本人の老化についての様々な

データを集積してきた。今後もこの貴重なデータを用いて研究を進め、高齢者の健康増進へ大きく貢献する多くの成果を上げることができるものと期待している。

## 文 献

- 1) 下方浩史, 安藤富士子: 疾病予防のための理想的生活. 生活習慣改善による疾病予防—エビデンスを求めて. 成人病と生活習慣病 2010; 40: 1026-1031.
- 2) 下方浩史: 加齢研究の方法—横断的研究と縦断的研究. 新老年学 改訂第3版(大内尉義, 秋山弘子編), 東京大学出版会, 東京, 2010; pp333-346.
- 3) 下方浩史: 長期縦断研究の目指すもの. Geriatr Med 1998; 36: 21-26.
- 4) Shimokata H et al: A new comprehensive study on aging — the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). J Epidemiol 2000; 10: S1-S9.
- 5) 下方浩史, 安藤富士子: 長期縦断疫学で分かったこと. 日老医誌 2008; 45: 563-572.
- 6) 下方浩史, 安藤富士子: 長期縦断疫学で分かったこと. 老年医学 update2009-10(日本老年医学会雑誌編集委員会編), メジカルビュー社, 東京, 2009; pp.123-133.
- 7) 島 悟ほか: 新しい抑うつ性自己評価尺度について. 精神医学 1985; 27: 717-723.
- 8) 森 悦朗ほか: 神経疾患患者における日本語版 Mini-Mental State テストの有用性. 神経心理学 1985; 1: 82-90.
- 9) Fukuhara S et al: Translation, adaptation, and validation of the SF-36 Health Survey for use in Japan. J Clin Epidemiol 1998; 51: 1037-1044.
- 10) Fukuhara S et al: Psychometric and clinical tests of validity of the Japanese SF-36 Health Survey. J Clin Epidemiol 1998; 51: 1045-1053.
- 11) Albert PS et al: A generalized estimating equation approach for modeling random length binary vector data. Biometrics 1997; 53: 1116-1124.

---

(執筆者連絡先) 下方浩史 〒470-0196 愛知県日進市岩崎町竹ノ山57 名古屋学芸大学大学院栄養科学研究科

# Mechanisms With Clinical Implications for Atrial Fibrillation—Associated Remodeling: Cathepsin K Expression, Regulation, and Therapeutic Target and Biomarker

Masaya Fujita, MD; Xian Wu Cheng, MD, PhD, FAHA; Yasuya Inden, MD, PhD; Masayuki Shimano, MD, PhD; Naoki Yoshida, MD, PhD; Aiko Inoue, MS; Toshihiko Yamamoto, MD; Kyosuke Takeshita, MD, PhD, FAHA; Seifuku Kyo, MD; Noriko Taguchi, MD; Guo-Ping Shi, DSc; Masafumi Kuzuya, MD, PhD; Kenji Okumura, MD, PhD; Toyoaki Murohara, MD, PhD

**Background**—The cysteine protease cathepsin K (CatK) has been implicated in the pathogenesis of cardiovascular disease. We sought to determine the link between atrial fibrillation (AF) and plasma CatK levels and to investigate the expression of an therapeutic target for CatK in vivo and in vitro.

**Methods and Results**—Plasma CatK and extracellular matrix protein peptides (intact procollagen type I of N-terminal propeptide carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen [ICTP]) were measured in 209 consecutive patients with AF (paroxysmal AF, 146; persistent AF, 63) and 112 control subjects. In addition, the regulation of CatK expression was investigated in vivo and vitro. Patients with AF had higher plasma CatK and ICTP levels than did control subjects. Patients with persistent AF had higher levels of plasma CatK and ICTP than did patients with paroxysmal AF. CatK was correlated with ICTP concentration and left atrial diameter in all subjects. In rabbits, superoxide production, CatK activity, fibrosis, and the levels of atrial tissue angiotensin II, angiotensin type 1 receptor, gp91phox, phospho-p38 mitogen-activated protein kinase, and CatK were greater in those with tachypacing-induced AF than in controls, and these changes were reversed with angiotensin type 1 receptor antagonist. Olmesartan and mitogen-activated protein kinase inhibitor decreased the CatK expression induced by angiotensin II in rat neonatal myocytes.

**Conclusions**—These data indicated that increased plasma CatK levels are linked with the presence of AF. Angiotensin type 1 receptor antagonist appears to be effective in alleviating atrial fibrosis in a rabbit AF model, partly reducing angiotensin type 1 receptor-p38mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent CatK activation, thus preventing AF. (*J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000503 doi: 10.1161/JAHA.113.000503)

**Key Words:** angiotensin type 1 receptor • atrial fibrillation • cathepsin K • extracellular matrix • mitogen-activated protein kinase

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia in clinical practice. AF itself has been shown to cause changes in the function and structure of the atria, providing a possible explanation for the progressive nature of this arrhythmia.<sup>1–3</sup> In the atria, the extracellular matrix provides supportive scaffolding for cardiomyocytes, maintains

the structural integrity of cardiac tissue, and is necessary for electrical conduction via cardiomyocytes.<sup>4</sup> Growing evidence supports the concept that structural remodeling of the extracellular matrix may be the key event leading to the development of AF and atrial mechanical dysfunction. Lysosomal protease cathepsins (Cats) traditionally have been known to degrade unwanted intracellular or endocytosed proteins. However, the recent recognition of the inducible CatK and CatS has revealed their proteolytic functions in inflammatory disease, including atherosclerosis-based vascular disease processes.<sup>6–8</sup> More recently, several studies have reported that Cats play a functional role in intracellular and extracellular protein degradation in cardiac myocytes by contributing to matrix turnover, chamber dilation, and structural remodeling.<sup>9–12</sup> A few reports suggest that circulating Cats have predictive value for proteolysis-associated disease, and related research has focused on vascular disease (including coronary artery diseases and aortic aneurysm).<sup>13,14</sup> To date, no studies have examined atrial Cat expression and plasma levels as potential biomarkers for atrial remodeling in atrial disease.

From the Department of Cardiology (M.F., X.W.C., Y.I., M.S., N.Y., T.Y., K.T., S.K., N.T., K.O., T.M.) and Community Healthcare & Geriatrics (A.I., M.K.), Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA (G.P.S.); Department of Cardiology, Yanbian University Hospital, Yanji, China (X.W.C.); Department of Internal Medicine, Kyung Hee University Hospital, Seoul, Korea (X.W.C.).

**Correspondence to:** Xian Wu Cheng, MD, PhD, FAHA, or Yasuya Inden, MD, PhD, Department of Cardiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan. E-mail: xianwu@med.nagoya-u.ac.jp, inden@med.nagoya-u.ac.jp

Received August 26, 2013; accepted November 26, 2013.

© 2013 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley Blackwell. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Recently, activation of the renin–angiotensin system has been implicated as part of the mechanism of AF.<sup>15</sup> Cardiac-specific overexpression of angiotensin-converting enzyme in mice results in excessive levels of cardiac angiotensin II (Ang II), and the mice develop spontaneous AF.<sup>16</sup> Ang II has numerous cardiovascular effects that might lead to cardiac arrhythmia, including the induction of fibrosis and the proliferation of cardiac fibroblasts, the increased synthesis of collagen, and the promotion of reactive oxygen species generation.<sup>17</sup> Ang II has been shown to induce p38mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)/extracellular signal-regulated kinase activation and atrial interstitial fibrosis.<sup>18,19</sup> Several recent studies have demonstrated that angiotensin inhibition prevents left ventricular fibrosis by decreasing the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase–dependent Cat activation.<sup>11,20</sup> Although the inhibition of Ang II through the use of Ang II type 1 receptor (AT1R) antagonists or angiotensin-converting enzyme inhibitors has prevented AF in animal models and a diverse human population with AF or at risk of developing AF,<sup>21–24</sup> the underlying mechanism is poorly understood.

In this study, we sought to determine whether circulating CatK levels are closely linked to the presence of AF and increased levels of the collagen type I degradation marker. In addition, we explored the possible mechanisms by which Ang II inhibition mitigates atrial remodeling and AF in a rabbit tachypacing model.

## Methods

### Study Population

We recruited 209 consecutive patients with paroxysmal AF (PAF; n=146) or persistent AF (PeAF; n=63) who were admitted to Nagoya University Hospital between March 2009 and December 2010 for scheduled radiofrequency catheter ablation with coronary angiography. AF in these patients had been diagnosed in light of symptoms, 12-lead electrocardiogram, and Holter electrocardiogram. As described previously,<sup>25</sup> PAF was defined on the basis of a history of 1 or more episodes of AF that self-resolved or were terminated medically within 7 days, and PeAF was defined according to a history of 1 or more episodes of AF over 7 days that required pharmacological or electrical cardioversion to establish normal sinus rhythm. None of the patients in this study had permanent AF. We excluded patients with dilated or hypertrophic cardiomyopathy, myocardial infarction, congenital heart disease, congestive heart failure, or valvular heart diseases and those receiving hemodialysis. AF patients were receiving standard therapy with antiarrhythmic drugs,  $\beta$ -blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors or AT1R blockers, and statins at the time they underwent ablation. We also assessed 112

subjects with and without paroxysmal atrial arrhythmia (previously documented AF), who were considered to represent the control group. The study protocol was approved by the ethics committee of the Nagoya University School of Medicine and written informed consent was obtained from all patient

### Laboratory Assay

Laboratory measurements were performed under blind conditions. Human and rabbit plasma CatK levels were determined by using ELISA kits (Biomedica Gruppe, Biomedizinprodukte). Serum interleukin-1 $\beta$  levels were measured by using commercially available kits. Serum levels of intracellular procollagen type I N-terminal propeptide (I-PINP), carboxy terminal telopeptide of collagen type I (ICTP), atrial natriuretic peptide, cystatin C, high-sensitivity C-reactive protein, hemoglobin A1c, and atrial tissue Ang II were measured at commercial laboratory (SRL [Tokyo, Japan]). Plasma Ca values were expressed as ng/mL, and interassay and intraassay coefficients of variation were <8% (n=20).

### Echocardiography

Two-dimensional and Doppler echocardiography was performed by an experienced sonographer using a Vivid4 System (GE Healthcare Bio-Sciences). The images were recorded on DVD recorder and analyzed offline. Left atrial diameter (LA) was obtained by using standard M-mode measurements, recommended by the American Society of Echocardiography. The left ventricular ejection fraction was calculated using the modified Simpson's rule.

### Animal Model and Treatment

A rabbit AF model was induced by ventricular tachypacing described previously.<sup>26</sup> The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Nagoya University School of Medicine. Eleven-week-old male New Zealand White rabbits (Kitayama Labs) underwent surgery with or without the implantation of right ventricular pacemaker (Medtronic) under anesthesia with ketamine hydrochloride 35 mg/kg and xylazine 3 mg/kg. After the animals recover from surgery, the pacemakers were programmed to pace 380 beats/min for 4 weeks. Rabbits were divided into groups as follows: nonpaced control rabbits (control rabbits; n=7), rabbits subjected to ventricular tachypacing treated with vehicle (0.5% carboxymethylcellulose, AF rabbits; n=7), a rabbits subjected to tachypacing with olmesartan treatment (Olm rabbits; n=5). Daily oral administration of olmesartan (1 mg/kg; Daichi-Sankyo) via gastric tube was initiated 1 week before surgery and continued throughout the study period. Electrocardiograms were monitored once per week to adjust

the pacing rate to the maximum rate, thus allowing for 1:1 capture in each rabbit. At the end of 4 weeks of ventricular tachypacing, open chest electrophysiological studies were performed under anesthesia and ventilated mechanically with isoflurane-containing room air (0.5% per 2 L/min) as described previously.<sup>26</sup> After electrophysiological evaluation, both atria were harvested for biologic and histological analyses.

### Western Blotting

On postoperative day, tissue samples obtained on operative day 28 were homogenized lysis buffer containing 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 150 mmol/L NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 1 mmol/L sodium orthovanadate, and protease inhibitor mixture (Sigma). The protein content was determined by using the Bradford method. The same amount of protein (40 µg) was loaded per lane and separated using denaturing 10% polyacrylamide gels. The membranes were probed with antibodies to CatK,<sup>27</sup> to AT1R (Santa Cruz Biotechnology), to gp91phox (BD Biosciences), and to total p38MAPK and phosphorylated p38MAPK (p-p38MAPK) (Cell Signaling Technology, Inc). Bands were visualized using chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences).

### Immunohistochemistry

On postoperative day 28, transverse sections (5-µm thickness) of atrial tissues were stained with rabbit polyclonal antibody to CatK (dilution, 1:100) as described previously.<sup>27</sup> As a negative control, the primary antibody was replaced by nonimmune immunoglobulin G (Vector). Azan Mallory staining was applied to evaluate fibrotic deposition in rabbit atria. We set a threshold to automatically compute the blue pixel area for the histochemical stain and then computed the ratio (percent) of the positively stained area to the total cross-sectional atrial free-wall area using BZ-II Analyzer, Exe 1.42 software (Keyence). Three random microscopic fields (×400) from 8 independent cross sections of atrial free-wall (24 fields) in each animal were quantified and averaged for each animal.

### Assay of Superoxide Production

Specific NADPH oxidase activity of total homogenates of fresh left atrial tissue was measured with the use of a lucigenin-based enhanced chemiluminescence assay as described.<sup>20</sup> A low lucigenin concentration (5 mmol/L) was used to minimize artifactual O<sub>2</sub><sup>-</sup> production attributable to redox cycling. In brief, homogenate protein (1 mg) lysis buffer (1 mL; 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L ethylene glycol tetraacetic acid, and 1% Triton X-100) was transferred to an assay tube, and NADPH

and dark-adapted lucigenin were added to final concentrations of 100 and 5 mmol/L, respectively, immediately before the measurement of chemiluminescence. All assays were performed in triplicate. The chemiluminescence signal was sampled every minute for 12 minutes using a tube luminometer (20/20; Turner Biosystems), and the respective background counts were subtracted from the experimental values.

### Cell Culture and Simulation

Neonatal rat atrial myocytes from 1-day-old Wistar rats were isolated as described previously<sup>28</sup> and cultured in a mixture (50:50, v/v) of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics.<sup>11</sup> After 24 hours of culture, the cells (5×10<sup>4</sup>/well in 12-well plates) were pretreated with or without various reagents for appropriate amounts of time, and the cells were subjected to the related biologic assays.<sup>11</sup>

### Gene Expression Assay

Total RNA was isolated from cultured cells and was subjected to reverse transcription with a PCR Core kit (Applied Biosystems). The resulting cDNA was subjected to quantitative real-time PCR analysis with targeted gene primers and with use of the ABI 7300 Real-Time PCR System under the following conditions: 50°C (2 minutes) for UNG incubation, 94°C (10 minutes) for AmpliTaq Gold activation, 95°C (15 seconds), and 59°C (1 minute) for 40 cycles as previously described.<sup>27</sup> The amount of each mRNA was normalized against the corresponding amount of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA.

### Assay of Collagenolytic Activity

Total protein (100 µg) from the extracts of cells and atrial tissues was incubated with 500 µg/mL fluorescein-labeled type I collagen (Molecular Probes Inc) for 6 hours. Reaction were performed in the absence or presence of several protease inhibitors at indicated concentrations as described previously.<sup>29</sup>

### Statistical Analysis

Summary descriptive statistics for continuous parameter are presented as mean±SD values. Categorical variables were compared among study groups by using the  $\chi^2$  test. Student's *t* test (for comparison of continuous parameter between 2 groups) or 1-way ANOVA (for comparison of continuous parameters among 3 or more groups), followed by Tukey's post-hoc test, was used to test significant differences. Cystatin C and high-sensitive C-reactive protein

concentrations were logarithmically transformed because the data showed a skewed distribution. If the homogeneity of the variance assumption was violated, the nonparametric Kruskal–Wallis test was used instead. The factors that related at the  $P<0.1$  level were selected as independent variable candidates for multiple logistic regression analysis and were used to evaluate the independent contribution of clinical parameters to AF. Correlation coefficients were calculated using linear regression analysis. In animal and in cell experiments, we performed the test related to ensuring normality for the tests with very small sample sizes. StatFlex (version 6.0; Artech) was used for all statistical analysis.  $P$  values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### All Patients

The baseline clinical and demographic features of the study population are shown in Table 1. The AF group was older and had more men than did the control group ( $P<0.001$ ). There were no differences between the AF and control groups in potential causal factors. AF patients had taken more  $\beta$ -blockers than had the control subjects ( $P=0.02$ ). Patients with AF had significantly ( $P<0.05$ ) larger LADs and worse ejection fractions than did control subjects.

Compared with controls, patients with AF had significantly ( $P<0.001$ ) higher plasma CatK, interleukin-1 $\beta$ , ICTP, and I-PINP levels and lower I-PINP:ICTP ratios than did control subjects. Compared with controls, AF patients had higher levels of hemoglobin A1c ( $P<0.001$ ), high-sensitive C-reactive protein ( $P=0.04$ ), and atrial natriuretic peptide ( $P<0.001$ ), whereas there were no significant differences in potassium or in low-density and high-density lipoproteins. In all subjects, univariate regression analysis revealed that there was a positive correlation between CatK and ICTP ( $r=0.3$ ,  $P<0.0001$ ; Figure 1A) and LAD ( $r=0.4$ ,  $P<0.0001$ ; Figure 1B).

### PAF Versus PeAF

The baseline characteristics of the PAF and PeAF groups are presented in Table 2. Patients with PeAF had larger LADs and worse ejection fractions than did PAF patients ( $P<0.05$ ). With the exception of age, the percentage of women, chronic heart failure, and use of statin treatments, there were no significant differences between the 2 groups. As expected, the PeAF group had increased levels of plasma high-sensitive C-reactive protein and atrial natriuretic peptide ( $P<0.05$  for both) compared with patients with PAF. In addition, the levels of CatK, ICTP, and interleukin-1 $\beta$  were higher and the I-PINP:ICTP ratio lower among subjects in the PeAF group compared

Table 1. Patient Characteristics

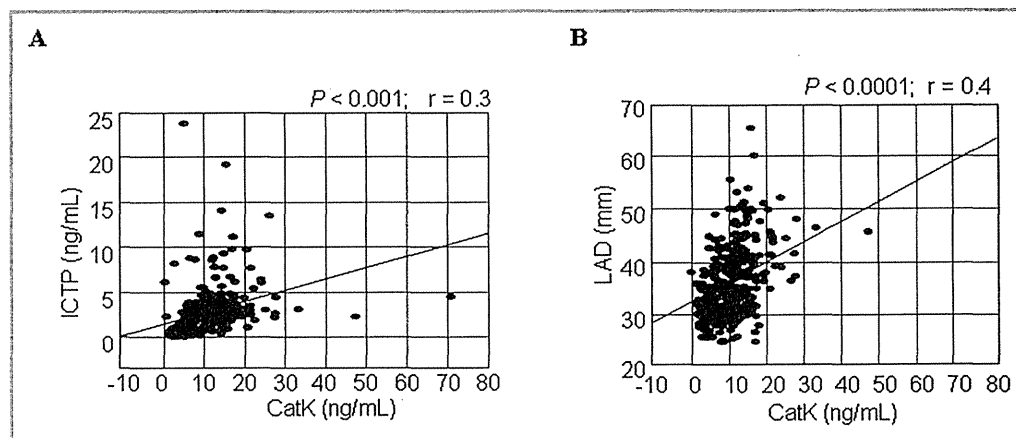
	AF (n=209)	Control (n=112)	P Value
<b>Demographic Characteristics</b>			
Age, y	60.1±10.9	54.8±10.7	<0.001
Female, %	23.0	42.9	<0.001
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	23.7±3.4	23.0±2.8	0.09
Smokers, %	30.1	23.2	0.25
<b>Causal factors</b>			
Hypertension, %	45.5	38.4	0.26
Diabetes mellitus, %	20.1	12.5	0.09
Ischemic heart disease, %	8.1	3.6	0.12
Chronic heart failure, %	7.2	4.5	0.34
<b>Echocardiography</b>			
Left atrial diameter, mm	39.0±6.9	32.3±4.9	<0.001
LV ejection fraction, %	61.8±8.4	77.1±6.9	0.002
<b>Blood examination</b>			
Potassium, mEq/L	4.3±0.4	4.2±0.4	0.48
LDL, mg/dL	118.4±27.8	121.2±29.3	0.40
HDL, mg/dL	55.7±14.2	57.4±13.3	0.32
Hemoglobin A1c, %	5.6±0.7	5.2±0.7	<0.001
ANP, pg/mL	70.9±70.9	27.3±29.9	<0.001
hs-CRP, mg/dL	0.14±0.4	0.06±0.1	0.04
IL-1 $\beta$ , pg/mL	14.3±7.0	10.9±7.9	<0.001
I-PINP:ICTP	13.7±7.7	25.1±19.2	<0.001
ICTP, ng/mL	3.8±2.7	1.5±1.3	<0.001
CatK, ng/mL	13.1±6.7	6.1±3.9	<0.001
<b>Medications</b>			
ACEIs, %	4.3	8.0	0.17
ARBs, %	30.1	26.8	0.53
CCBs, %	20.1	17.0	0.50
$\beta$ -Blockers, %	29.7	8.9	0.02
Statins, %	20.1	22.3	0.64
Antiarrhythmic drugs, %	100	0	

Values are expressed as mean±SD. AF indicates atrial fibrillation; LV, left ventricle; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; ANP, atrial natriuretic peptide; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL, interleukin; I-PINP, intact procollagen type I N-terminal propeptide; ICTP, carboxyl-terminal telopeptide of type collagen; CatK, cathepsin K; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor blocker; CCB, calcium channel blocker.

with those in the PAF group ( $P<0.05$  for all comparison; Figure 2).

### Biomarkers for Prediction of AF

Table 3 shows the results of the multiple logistic regression analyses to assess the factors (included at the  $P<0.1$  level



**Figure 1.** Correlations between plasma levels of CatK and ICTP (A) and (B) LAD. In all patients, there were positive correlations between plasma levels of cathepsin (CatK) and carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) and left atrial diameter (LAD).

Table 1) that independently contributed to AF. According to the multiple logistic regression analyses, only LAD (odds ratio, 1.19; 95% CI, 1.06 to 1.36;  $P < 0.05$ ), CatK (odds ratio, 1.27; 95% CI, 1.10 to 1.39;  $P < 0.01$ ), and I-PINP:ICTP (odds ratio, 0.79; 95% CI, 0.69 to 0.90;  $P < 0.001$ ) were significantly associated with AF.

### Inhibitory Effect of AT1R Antagonism on CatK Expression and Atrial Remodeling With AF

Immunostaining showed that the expression of CatK was markedly increased throughout the atrial tissue of AF rabbits, with apparent expression in the myocytes, and this change was inhibited by olmesartan (Figure 3A). As shown in Figure 3B, collagenolytic activity was higher in AF rabbits than in controls, and this change was more sensitive to a specific CatK inhibitor (CatK-II) and the broad-spectrum cysteine protease E64 than to GM6001, an inhibitor of matrix metalloproteinases (Figure 3B). Olmesartan reduced the amount of increased collagenolytic activity in the atrial extract of AF rabbits ( $0.56 \pm 0.09$  versus  $0.94 \pm 0.19$  fluorescence intensity,  $P < 0.01$ ).

AF rabbits had increased levels of NADPH oxidase activity (Figure 3C) and of an NADPH oxidase subunit, gp91phox protein (Figure 3D;  $P < 0.01$ ). As shown in Figure 3D and 3E, Western blotting revealed that the levels of CatK, AT1R, and p-p38MAPK proteins were greater in AF rabbits than in controls ( $P < 0.01$ ). All of these changes were reversed with olmesartan ( $P < 0.01$ ). In addition, rabbits with AF had significantly higher atrial tissue Ang II levels than did control rabbits ( $78.3 \pm 6.0$  versus  $36.2 \pm 4.8$  pg/100 mg,  $P < 0.01$ ), and this effect was also reduced by olmesartan ( $45.1 \pm 3.7$  versus  $78.3 \pm 6.0$ ,  $P < 0.05$ ). The duration of AF was  $11.8 \pm 0.2$  seconds in ventricular-tachypaced rabbits, whereas AF was not induced in nonpaced controls (Figure 4A). The

duration of AF was significantly reduced in olmesartan treated rabbits ( $3.2 \pm 0.1$  seconds) compared with ventricular tachypacing-only rabbits ( $P < 0.01$ ). Furthermore, olmesartan significantly suppressed atrial fibrosis compared with the control group ( $3.9 \pm 0.6$  versus  $9.8 \pm 1.6\%$ ,  $P < 0.05$ ) (Figure 4 and 4C).

Quantitative real-time PCR demonstrated that both  $H_2C$  and Ang II significantly ( $P < 0.05$ ) enhanced CatK mRNA expression and that olmesartan reduced CatK expression in response to Ang II in cultured rat neonatal atrial myocyte (Figure 5A). Ang II enhanced the collagenolytic activity in cell extracts, and this effect was sensitive to CatK-II and E64 (Figure 5B). Western blots showed olmesartan-mediated reductions in the level of Ang II-induced CatK, gp91phox and p-p38MAPK (Figure 5C). Furthermore, Ang II-induced CatK gene expression was suppressed ( $P < 0.001$ ) by olmesartan as well as by NADPH oxidase inhibitor apocynin or p38 inhibitor SB202190 (Figure 5D). Furthermore, apocynin markedly enhanced MAPK inhibitor-mediated action.

## Discussion

### Plasma Biomarkers of CatK and Collagen Turnover and AF

Several studies have examined the effect of myocardial collagen turnover on the pathogenesis of AF and the outcome of AF ablation.<sup>26,30,31</sup> Multiple lines of evidence indicate that CatK is the most abundant and important cysteine enzyme synthesized by the cardiovascular system and that it is relevant to cardiovascular disorders, including atherosclerosis,<sup>6–8</sup> osteoarthritis,<sup>32</sup> and heart failure.<sup>27</sup> To the best of our knowledge, this is the first study to show that patients with AF had higher levels of plasma CatK than did control subjects. In agreement with this observation, CatK levels and CatK-related



**Table 2.** Patient Characteristics

	Control (n=112)	PAF (n=146)	PeAF (n=63)	ANOVA (P Value)
<b>Demographic characteristics</b>				
Age, y	54.8±10.7	61.1±10.6*	57.8±11.3*†	0.04
Female, %	42.9	27.4*	12.7†‡	<0.001
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	23.0±2.8	3.5±3.5	24.0±3.1	0.21
Smoker, %	23.2	28.1	34.9	0.31
<b>Causal factors</b>				
Hypertension, %	38.4	46.6	42.9	0.48
Diabetes mellitus, %	12.5	21.9	15.9	0.47
Ischemic heart disease, %	3.6	7.5	9.5	0.25
Chronic heart failure, %	4.5	3.4	15.9†‡	0.002
<b>Echocardiography</b>				
Left atrial diameter, mm	32.3±4.9	37.2±6.1	43.1±7.0†‡	<0.001
LV ejection fraction, %	77.1±6.9	63.5±7.6*	58.0±9.0†‡	<0.001
<b>Blood examination</b>				
Potassium, mEq/L	4.6±0.4	4.2±1.5	4.3±1.3	0.06
LDL, mg/dL	121.3±29.3	120.0±26.5	114.7±30.4	0.24
HDL, mg/dL	57.4±13.3	55.9±15.1	55.3±11.8	<0.001
Hemoglobin A1c, %	5.2±0.7	5.6±0.6*	5.6±0.8*	0.89
hs-CRP, mg/dL	0.06±0.1	0.14±0.1*	0.16±0.2†‡	0.02
ANP, pg/mL	27.3±29.9	59.5±69.9*	97.3±66.4†‡	<0.001
Cystatine C, mg/L	0.9±0.3	1.0±0.2	1.1±0.9	0.23
<b>Medications</b>				
ARBs or ACEIs, %	34.8	37.7	27.0	0.08
CCBs, %	17.0	19.9	20.6	0.05
β-Blockers, %	8.9	30.8*	27.0*	0.01
Statins, %	22.3	25.3	7.9†‡	0.01

Values are expressed as mean±SD. PAF indicates paroxysmal atrial fibrillation; PeAF, persistent atrial fibrillation; LV, left ventricular; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; ANP, atrial natriuretic peptide; ARB, angiotensin II receptor blocker; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; CCB, calcium channel blocker.

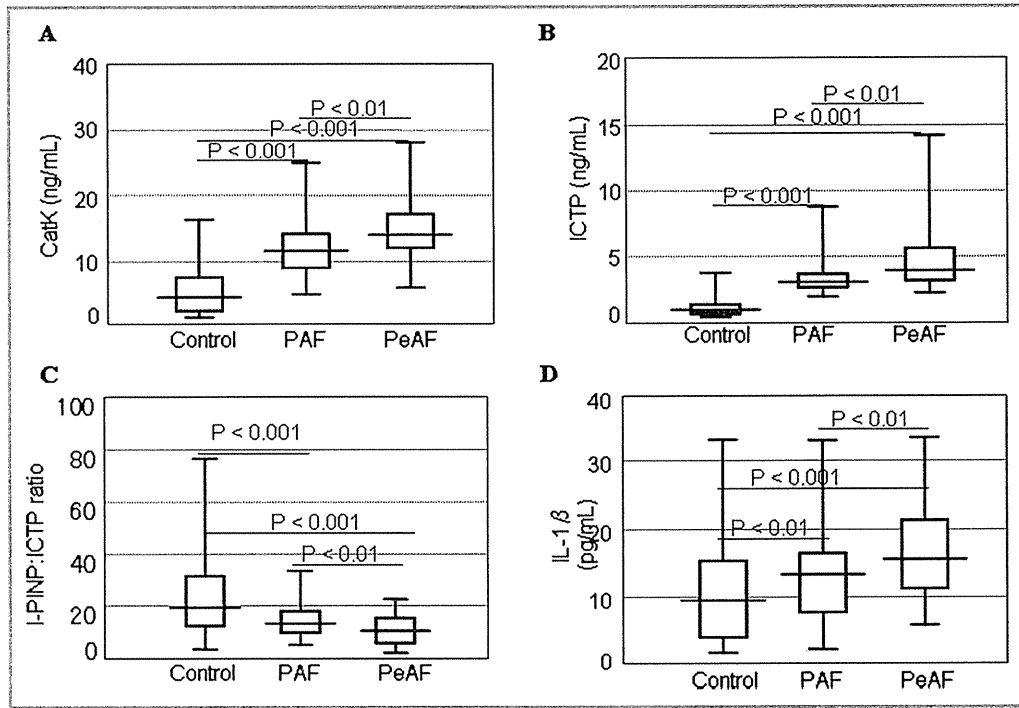
\*P<0.05 compared with control value.

†P<0.01 compared with control values.

‡P<0.05 compared with value for PAF vs PsAF patients.

collagenolytic activity were increased substantially in the atrial tissue of rabbits with tachypacing-induced AF. Univariate regression analysis showed a positive correlation between plasma ICTP and CatK levels. Moreover, multivariable logistic regression analysis clearly showed that CatK and the I-PINP:ICTP ratio were independent predictors of AF. Coupled with several recent studies showing increased serum levels of several Cats (S and L) in association with ischemic heart disease,<sup>8,14</sup> our findings indicate that elevated plasma levels of CatK with a collagen metabolism–related index (I-PINP:ICTP ratio) can serve as a novel marker of AF and a noninvasive method of documenting the mechanisms of atrial fibrosis in AF.

Patients initially presenting with PAF often exhibit disease progression and eventually develop PeAF.<sup>1</sup> Although the exact pathophysiological mechanisms remain unclear, the persistence of AF is thought to result from atrial remodeling.<sup>3</sup> Increasing evidence suggests that atrial fibrosis, which has a slower time course than does AF, may be involved in the development and recurrence of AF.<sup>1,30</sup> In the current study, CatK and ICTP (a marker of collagen degradation) levels were higher, but the I-PINP:ICTP ratio was lower, in the PeAF group than in the PAF group. Interestingly, CatK levels were positively correlated with LAD, and patients with PeAF had larger LADs than did those with PAF. These findings imply that—in addition to the duration of arrhythmia—impaired



**Figure 2.** Box plot depiction of the differences in the levels of plasma CatK, I-PINP, ICTP, and IL-1β. Plasma levels of CatK, I-PINP, ICTP, and IL-1β. Levels of (A) CatK and (B) ICTP gradually increased, whereas (C) the I-PINP:ICTP ratios decreased from control subjects to patients with PAF to subjects with PeAF. D, IL-1β levels in control subjects differed from those in both PAF and PeAF patients. Boxes represent the median (black line), 25th percentile, and 75th percentile of observed data; whiskers show the 5th and 95th percentiles of each group. Values are expressed as mean ± SD. \**P* < 0.01 vs control; †*P* < 0.01 vs PAF. CatK indicates cathepsin K; ICTP, carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen; IL, interleukin; I-PINP, intact procollagen type I of N-terminal propeptide; PAF, paroxysmal atrial fibrillation; PeAF, persistent atrial fibrillation.

**Table 3.** Independent Predictors of AF According to Multivariable Logistic Regression Analysis

	Odds Ratio Estimate	95% CI	P Value
LAD	1.19	1.06 to 1.36	<0.05
CatK	1.27	1.10 to 1.39	<0.01
I-PINP/ICTP ratio	0.79	0.69 to 0.90	<0.001

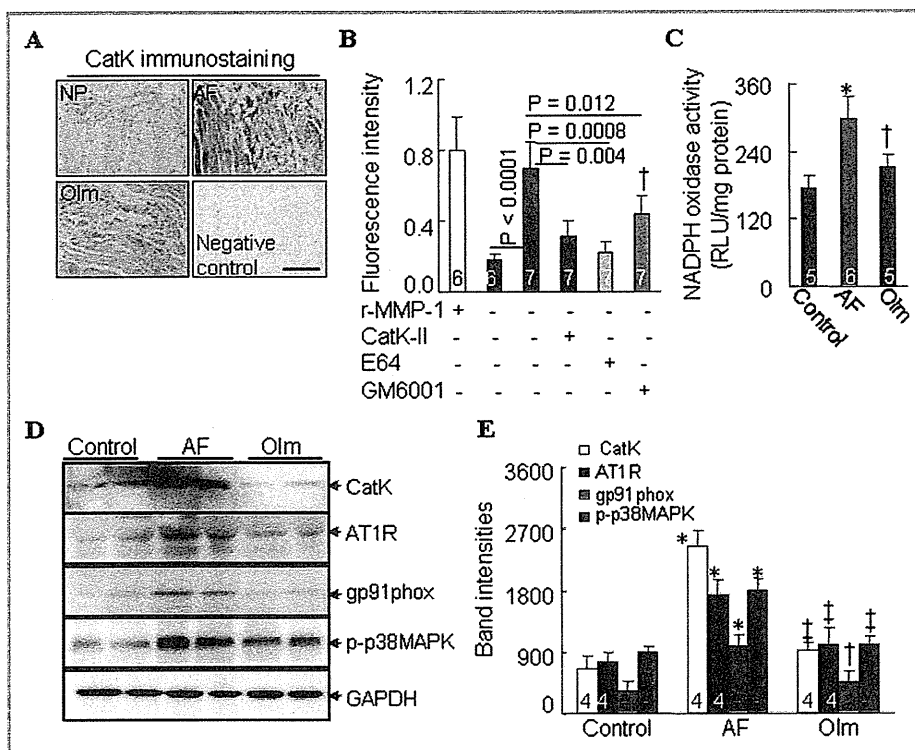
AF indicates atrial fibrillation; LAD, left atrial diameter; CatK, cathepsin K; I-PINP, intact procollagen type I N-terminal propeptide; ICTP, carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen.

balance between collagen synthesis and metabolism may be one of the initiating factors for AF. However, it should be noted that there are also other initiating factors such as the pulmonary veins for the initiation and maintenance of AF.<sup>30</sup>

### Ang II Inhibition Alleviates Structural Remodeling Related to AF

Many of the Ang II-induced actions in intracellular signaling transduction pathways that regulate gene expression are mediated by the activation and nuclear translocation of MAPKs.<sup>33,34</sup> We have shown that Ang II promotes p38MAPK

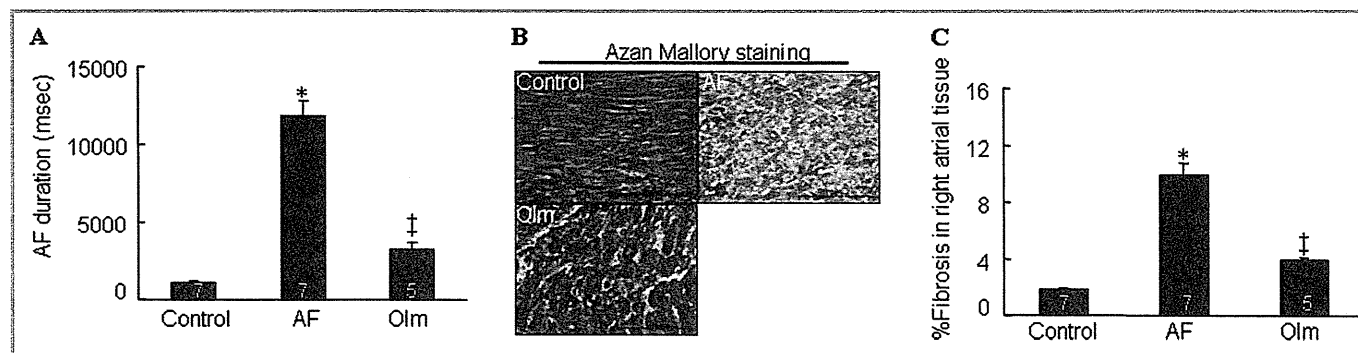
phosphorylation and CatK expression in cultured rat neonatal atrial myocytes and that these effects are reversed with olmesartan. An inhibitor of p38MAPK inhibited Ang II-induced CatK gene expression. In vivo studies, AF rabbits exhibited substantial protein expression of CatK accompanied by increased atrial levels of Ang II, AT1R, an phosphorylated p38MAPK proteins, and these changes were reversed by olmesartan. Thus, AT1R antagonism appears to attenuate CatK expression through the AT1R-p38MAPK dependent signaling pathway in the atrial tissues of AF rabbits. Recently, it was reported that the Cat inhibitor E64 prevented hypertensive cardiac remodeling and dysfunction in a Dahl rat model.<sup>11</sup> In this study, olmesartan attenuated the duration of AF and atrial fibrosis in tachypacing rabbit. Furthermore, olmesartan reduced the increase in collagenolytic activity in the atrial tissue of AF rabbits. The data from enzyme assays demonstrated that increased collagenolytic activity in both atrial tissues and neonatal atrial myocyte-conditioned medium was attenuated by a Cat-specific inhibitor as well as a broad-spectrum Cat inhibitor. Coupled with several recent clinical trials showing the prevention of AF with Ang II inhibition,<sup>22,24</sup> these findings indicate that the attenuation of AT1R/p38MAPK-dependent



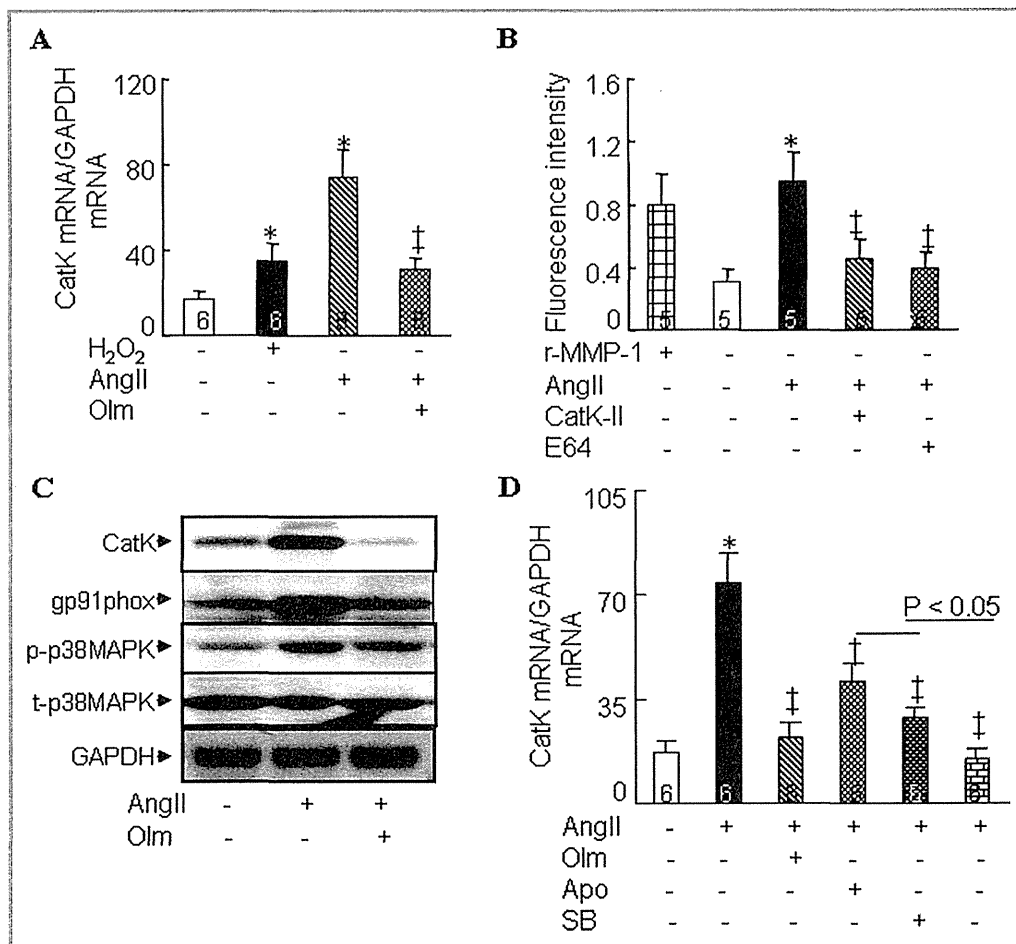
**Figure 3.** CatK protein expression and NADPH oxidase activity in nonpaced control (NP), ventricular tachypacing (VTP), and ventricular tachypacing plus administration of olmesartan (Olm) rabbits. A, Representative images for CatK immunostaining in the atrial tissues of NP, VTP, and Olm rabbits and negative controls (without primary antibody). B, ELISAs of collagenolytic activity in untreated atrial tissues or in those treated with a broad-spectrum inhibitor of CatKs (*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane [E64], 20 μmol/L; Molecular Probes), a CatK-specific inhibitor (CatK-II, 10 μmol/L), and an inhibitor of matrix metalloproteinases (GM6001, 10 μmol/L; both from Calbiochem). Recombinant matrix metalloproteinase 1 (rMMP-1) was included as a positive control. C, Chemiluminescence showing NADPH oxidase activity in atrial tissues from groups. D, Representative Western blots and (E) quantitative data showing the levels of CatK, AT1R, gp91phox, p-p38MAPK, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in left atrial tissue from rabbits. Analyzed animal numbers indicated on related bars. Scale bars indicate 50 μm. Values are expressed as mean±SEM. \**P*<0.01 vs NP; †*P*<0.01 vs VTP. AF indicates atrial fibrillation; AT1R, angiotensin type receptor; CatK, cathepsin K; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

CatK expression and activity by Ang II inhibition could represent a novel mechanism for the protection of structural remodeling-related AF, at least in an animal model. In addition, the data from our study and the findings of other

researchers<sup>35,36</sup> suggest that the inhibition of matrix metalloproteinases also contributes to collagen metabolism in atrial fibrosis. To attain a deeper understanding of the importance of CatK participation in this context, additional



**Figure 4.** A, Duration of AF in NP, VTP, and olmesartan (Olm)-treated rabbits. B, Representative images and quantitative data show interstitial fibrosis in the right atrial tissues of 3 experimental groups. Analyzed animal numbers indicated on related bars. Scale bars indicate 100 μm. Values are expressed as mean±SEM. \**P*<0.01 vs control; †*P*<0.01 vs VTP. AF indicates atrial fibrillation; NP, nonpaced control; VTP, ventricular tachypacing.



**Figure 5.** Regulation of CatK expression in cultured rat neonatal atrial myocytes. A, Quantitative real-time PCR assays showing the expression of CatK mRNA levels in cultured cells treated with and without olmesartan (Olm, 1 μmol/L) in the presence of Ang II (1 μmol/L) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μmol/L) for 24 hours. B, Immunofluorescence shows the collagenolytic activity induced by Ang II in cells left untreated or treated with Cat II (10 μmol/L) and E64 (10 μmol/L). C, Representative Western blots showing the levels of CatK, gp91phox, p-p38, and t-p38 induced by Ang II cultured neonatal atrial myocytes untreated or treated with Olm (p-p38MAPK and t-p38MAPK levels for 30 minutes; CatK and gp91phox levels for 24 hours). D, Quantitative PCR shows Ang II-mediated CatK mRNA expression in cells left untreated or treated with Olm (1 μmol/L), apocyn (Apo, 100 μmol/L), SB202190 (SB, 10 μmol/L), or Apo+SB for 24 hours. Analyzed numbers indicated on related bars. Scale bars indicate 50 μm. Values are expressed as mean ± SEM. \*P < 0.05 vs control; †P < 0.01, ‡P < 0.001 vs corresponding control. Ang indicates angiotensin CatK, cathepsin K; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; rMMP1, recombinant matrix metalloproteinase 1.

experiments using animals with conditional gene knockout may be necessary.

### Cross-talk Between NADPH Oxidase and Ang II/AT1R Signaling Pathway

NADPH oxidase has been implicated in the pathogenesis of cardiovascular disease.<sup>37,38</sup> Our data show that the abundance and activity of the NADPH oxidase and its subunit gp91phox markedly increased in the atria from rabbits with AF. In vitro, we observed that both Ang II and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhanced CatK expression and activity in cultured neonatal atrial myocytes. Furthermore, NADPH oxidase inhibition with apocynin showed an inhibitory effect on CatK expression in response to Ang II. Because Ang II inhibition attenuated CatK

expression and activation via the reduction of NADPH oxidase activity in cultured macrophages,<sup>6</sup> we propose that superoxide generation by NADPH oxidase, through “cross talk” with the Ang II signaling pathway, can regulate the proteolytic activity of CatK as well as contribute to the pathophysiology of AF. This notion is supported by current and previous findings that AT1R antagonism attenuated atrial and ventricular remodeling and fibrosis associated with NADPH oxidase-derived superoxide production and CatK expression and activation.<sup>11,20</sup> It is noteworthy that apocynin enhanced SB202190-mediated inhibitory effects on CatK expression in neonatal atrial myocytes. This effect raises the possibility that NADPH-oxidase-derived O<sub>2</sub><sup>-</sup> signaling directly affects CatK expression independent of the AT1R/p38MAPK signaling pathway.