

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10746

研究課題名(和文) 虚血肢における障害骨格筋由来マイクロRNAと血行再建後下肢機能予測

研究課題名(英文) To analyze micro RNA derived from the dysfunctional skeletal muscle due to the ischemic limb for predicting limb functional prognosis after revascularization

研究代表者

古屋 敦宏 (KOYA, ATSUHIRO)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：90463752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歩行機能予測関連因子として、単変量解析で「女性」「透析治療」、血清バイオマーカーの「VCAM-1」が挙げられ、多変量解析では「女性」が挙げられた。安静疼痛または足部潰瘍・壊疽を伴う重症虚血症例(20例)では、間欠性跛行症例に比べ、血清中のNT-proBNP、IL-6、intact PTH、Homocysteine、VCAM-1および、筋肉内バイオマーカーとしてYBX-3の発現が有意に高値を示した。術後歩行機能喪失群では、複数回の血行再建再治療を要する症例や観察中の死亡症例が歩行可能群に比して多かった。下肢機能予測に関連する因子として、性差や併存症、血清バイオマーカーなどの因子が候補となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下肢血流障害患者における虚血骨格筋に着目して、骨格筋機能障害の機序や罹患している生活習慣病に伴う慢性炎症や代謝障害に注目し、筋障害の病態や全身への影響を解明し、血行再建後の下肢機能予測に影響するバイオマーカーを同定することで、手術前に血行再建後の機能予測を予測できると考え、各患者に適した治療方法及び管理方法を確立できるデータを蓄積することを目的としている。今回の研究では、下肢血流障害患者の血行再建術後における下肢機能予測の予測において、性差や併存症、また一部のバイオマーカーを予測因子の候補として挙げることができた。

研究成果の概要(英文)：To predict the prognosis of the limb function after the revascularization, female, dialysis and serum VCAM-1 were significant factors by univariate analysis and only female was significant factor by multivariate analysis. In the critical limb ischemic case (n=20) with rest pain or a foot ulcer or gangrene, the expression of YBX-3 from the skeletal muscle and measurement data of NT-proBNP, IL-6, intact PTH, Homocysteine and VCAM-1 from the serum were significantly higher to compare with intermittent claudication case. Factors to influence the prognosis of limb function after revascularization were able to include sex differences and comorbidities, and some serum biomarker.

研究分野：血管外科

キーワード：下肢慢性虚血 frailty sarcopenia revascularization

1. 研究開始当初の背景

下肢閉塞性動脈疾患（PAD）症例の血行再建後の機能予後のデータは乏しく、特に救肢後の高齢血管病患者において日常生活でどの程度のADL改善が達成されているかは良く判っていない。さらに、PAD症例では、その動脈閉塞の罹病期間や動脈病変部位、栄養状態、痛みの有無・程度、組織欠損の有無・程度、虚血期間における筋肉変性程度などが非常に多様であり、術前に血行再建後のADLを推測することは現時点では難しい。

高齢者のPAD症例が増加し、サルコペニアやフレイルが予後に大いに影響すると考えられる中、本研究成果は、エビデンスに基づいて予測された機能予後を見据えた適切な血行再建選択を推進するにとどまらず、下肢機能回復を支援するリハビリテーションの進歩、下肢機能回復がもたらすエネルギー代謝や脳機能など幅広い領域に大いに貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、PADに罹患した虚血肢における虚血骨格筋に着目し、機能障害にある虚血骨格筋そのものの形態的・機能的・生化学的解析、およびそれを取り巻く環境としての生活習慣病を基盤とした慢性炎症や消耗、歩行できないことによる代謝障害・脳機能障害にも注目して、筋障害の病態、全身へのインパクトを解明するとともに、血行再建後の機能改善に影響するバイオマーカーを探索して、術前に血行再建後の機能予後を予測できるデータを蓄積することを目的としている。

さらに、血行再建後の機能回復の良しあしには再生能力が関わっていることも想定されることから、血液中の幹細胞の機能と下肢再建血行の開存性や下肢機能予後・生命予後の関連を調査することにも意義があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 研究の種類・デザイン 前向き観察研究

(2) 主要評価項目：①血行再建後2年における下肢機能予後、
②血行再建後2年における認知機能

(3) 研究・調査項目 対象患者について、以下の項目の調査をおこなう。

1) 日常活動度：①FIM score、②1分間歩行、③活動量計評価、④歩行状態解析

2) サルコペニア評価：①握力、②筋肉量（CT）、③身体組成分析（InBody）

3) フレイル評価およびオーラルフレイル評価

4) 下肢神経伝導速度測定

5) 知的活動度（MMSE）、6) QOL評価（SF-36等）、

7) 抑うつ状態評価（PHQ-9）

8) 下肢評価（ABI、SPP測定、WiFi分類ステージング）

9) 画像情報（CT、血管造影所見）

10) 血液資料：一般的末梢血、一般生化学検査、栄養状態（アルブミン、プレアルブミン）、末梢血中幹細胞（内皮前駆細胞）の細胞数・接着能評価・老化関連因子（ β -Gal assay, Sirtuinなど）発現評価

11) 凍結血液資料；血漿を凍結保存して下記の項目を測定する。

・酸化ストレスレベル（d-ROMテスト、BAPテスト、OXY吸着テスト）

・ホルモンレベル（副腎皮質ホルモン、オキシトシン、セロトニン）

・各種血中サイトカイン、炎症性マーカー、HMGB1

11) 病歴、併存症、既往歴、生活環境（同居人数）、嗜好

12) 実施した血行再建の内容（実施した血行再建手術の手術記録）

13) 手術資料（ソケイ靭帯以下のバイパス術を受ける対象のみ）：バイパスを実施するた

め動脈を露出した術野にて採取した小筋肉片 5mmX5mmX5mm立方体から得られる病理組織標本およびmiRNA

4. 研究成果

2018年1月～2020年4月までに研究登録した症例数は30例で、男性24例、女性6例、平均年齢 67.0 ± 14.3 歳。虚血背景疾患は閉塞性動脈硬化症(ASO)が26例、比較対象疾患としてバージャー病(TAO)2例、及び、急性下肢動脈閉塞2例を合わせて登録した。ASO症例(26例)における内訳は、男性21例、女性5例、平均年齢は $70.1 \pm 11, 2$ 歳。下肢の虚血重症度は、間欠性跛行が6肢、安静疼痛が4肢、足趾潰瘍・壊疽症例が16肢であった。足趾潰瘍・壊疽症例における、WIFI分類は、stage 4が12肢、stage 3が2肢、stage 2及び1が各1肢であった。測定検査データとして、平均のBMI値は 23.0 ± 3.37 、患側肢のABI測定平均値は 0.50 ± 0.27 、安静疼痛症状以上の重症虚血症例20肢における足部の皮膚灌流圧測定値の平均は、足背が 31.9 ± 16.5 mmHg、足底が 23.8 ± 15.3 mmHgであった。

併存症の内訳は、糖尿病18例、高血圧18例、透析治療を要する末期腎不全9例、高脂血症9例、冠動脈疾患8例、不整脈7例であった。心臓超音波検査による心拍出率(EF)の平均値は $57.9 \pm 15.6\%$ であった。

下肢血行再建術として実施した治療の内訳は、血管内治療を3肢、外科的血行再建を24肢に実施した。(血栓内膜摘除6肢、自家静脈バイパス術22肢)

血行再建後の機能不全に対する再治療介入を要したのは11肢で、術後2回以上のグラフト再治療介入を要したのはこのうち4肢であった。また、術後3カ月以内の早期のグラフト不全を4肢に認めた。足部潰瘍、壊疽合併症例に対しては、血行再建と同時、または二期的にデブリードマンまたは小切断を実施した。足部潰瘍感染の増悪により敗血症に至り在院死亡に至った症例を1例認めたが、そのほかの症例では、治療対象肢の足部創傷治癒を得ることができた。

血行再建手術後に歩行困難状態が続き、車いすでの移動生活となった歩行機能喪失症例は5例であった。

ASO症例における、術後の歩行機能喪失に関連する因子として、単変量解析では「女性」($p=0.00559$)、「透析治療」($p=0.0178$)、「VCAM-1」($p=0.00137$)が有意差を示し、多変量解析では「女性」のみが有意な因子であった。($p=0.00674$, odds比=38.0)(表3)

血行再建治療後の経過では、歩行機能喪失群で、血行再建後の機能不全に対し複数回の再治療介入を要する症例の割合が歩行可能群に比べ多かった。($p=0.0419$)さらに、経過観察中の死亡症例も、歩行機能喪失群で4例あり、その多くを占めていた。($p=0.00078$)(表4)

ASO症例のうち安静疼痛または足部潰瘍・壊疽を伴う重症虚血症例(20例)では、間欠性跛行症例に比べ、血清中のNTproBNP($p=0.044$)、IL-6($p=0.0165$)、intact PTH($p=0.0222$)、Homocysteine($p=0.0203$)、VCAM-1($p=0.00016$)の発現が有意に高値を示していた。(表5)

慢性下肢虚血症例の下肢筋肉組織を採取して、筋肉細胞活動により発現していると考えられる、IGF-1、YBX3、IL-6、IL-1 β 、FGF-2の各々の筋肉細胞内の発現比率を比較検討した。下肢血行再建実施時に筋肉細胞を採取した。発現比率の算出に各筋肉組織のGAPDHの発現量を用い標準化した。採取した検体数は18検体(12症例)。筋肉採取部位は腓腹筋12例、前脛骨筋3例、さらに大腿四頭筋、縫工筋、後脛骨筋が各1例であった。発現比率の比較検討において、重症虚血症例では非重症虚血症例に比べ、YBX-3の有意な発現比率の上昇($p=0.0077$)が認められたが、その他の筋肉内バイオマーカーでは、性別、年齢、基礎疾患、術前の虚血度、併存疾患において、発現比率に有意差を認めなかった。(表6)

今回の研究では性別や併存症、血清バイオマーカーなど、下肢機能予後に関連性のあるデータを得ることができた。現在、学内倫理委員会手続きのもと、観察期間の1年間延長の変更手続きを実施済みで、さらに中長期での下肢機能予後を再評価していく計画である。

表 1 下肢動脈硬化 (ASO) 症例 (26 例) 一覽

症例数	26	例
平均年齢	70.1 ± 11.2	歳
男	21	例
BMI	23.0 ± 3.37	
ABI	0.50 ± 0.27	
Fontaine 分類		
II	6	肢
III	4	肢
IV	16	肢
Wifl 分類(stage)		
1	1	肢
2	1	肢
3	2	肢
4	12	肢
皮膚灌流圧(SPP)		
足背	31.9 ± 16.5	mmHg
足底	23.8 ± 15.3	mmHg
併存疾患		
糖尿病	18	例
高血圧	18	例
末期腎不全	9	例
高脂血症	9	例
T-cho	157.01 ± 40.79	mg/dl
TG	112.9 ± 49.2	mg/dl
HDL-C	43.28 ± 16.7	mg/dl
LDL-C	89.06 ± 32.51	mg/dl
Lp(a)	18.47 ± 20.62	mg/dl
冠動脈疾患	8	例
心拍出率(EF)	57.9 ± 15.6	%
不整脈	7	例

表 2. 血行再建治療および成績

血行再建術式		
血管内治療	3	肢
血栓内膜摘除	6	肢
自家静脈バイパス	22	肢
足部創傷治療		
創傷治癒	15(/16)	肢
潰瘍治癒率	96.2%	
術後 ADL		
歩行可能	20	例
車椅子	6	例
血行再建再治療介入		
なし	15	例
あり	11	例

表 3. 術後 ADL 予測に係る単変量・多変量解析

	歩行可能	車椅子	p 値
症例数	20	6	
単変量解析			
女性	1	4	0.00559
末期腎不全	4	5	0.01775
血清中 VCAM-1	1210.5	2447.5	0.00137
多変量解析			
女性	1	4	0.00674
odds 比:38.0			

表 4. 治療成績に係る単変量解析

	歩行可能	車椅子	p 値
症例数	20	6	
血行再建再治療	8	3	0.97109
2 回以上再治療	1	3	0.0419
死亡例	1	4	0.00078

表 5. 下肢虚血重症度に係る血清バイオマーカーの単変量解析

	重症虚血	非重症虚血	p 値
症例数	20	6	
Dopamine	31.628	15.8	0.05132
Cortisol	9.722	7.14	0.2288
IRI	27.297	8.008	0.05855
ACTH	40.9215	23.2333	0.09159
NT-proBNP	15664.192	168.525	0.044
IL-6	11.992	4.05	0.0165
intact PTH	125.872	35.425	0.0222
BNP	706.715	76.6	0.05035
Homocystine	21.925	11.567	0.0203
VCAM-1	1832.17	582.5	0.00016

表 6. 筋肉内バイオマーカーの発現比率の解析結果

	重症虚血例	非重症虚血例	p 値
症例数	15	3	
ICF-1	1.006	0.515	0.221
YBX-3	3.123	1.573	0.0077
IL-6	7.604	11.961	0.612
IL-1 β	1.357	4.218	0.24
FGF-2	0.757	0.946	0.772

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

現在、学内倫理委員会手続きのもと、観察期間の1年間延長の変更手続きを実施済みで、さらに中長期での下肢機能予後を再評価していく計画である。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	東 信良 (AZUMA NOBUYOSHI) (30250559)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	
研究 分 担 者	吉田 有里 (YOSHIDA YURI) (50646057)	旭川医科大学・大学病院・助教 (10107)	