

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K16447  
研究課題名（和文）チオ硫酸のICU-AWに対する予防効果の検討

研究課題名（英文）The preventive effect of thiosulfate on ICU-AW

研究代表者  
甲斐 慎一（KAI, SHINICHI）  
京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：30770177  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、チオ硫酸ナトリウム（STS）が敗血症による筋肉量低下に及ぼす影響について検討を行った。まず、培養細胞（C2C12細胞）を用いた実験では、STSはLPS投与の有無にかかわらず筋肉量を減少させた。これは、ユビキチンプロテアソーム経路を介する蛋白異化の亢進が関与していると考えられた。次に、マウスを用いた実験では、マウスにSTSの前投与はLPS投与による筋肉量減少を抑制した。この機序は、ユビキチンプロテアソーム経路およびオートファジー経路が関与していることが示唆された。二つの実験において、STSの効果が一定でないためSTSの全身炎症への関与を含めてさらなる実験を検討している。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

ICU患者の高齢化が本邦では進んでおり、ICU退室後患者が社会復帰するためには筋力低下を呈すICU-AWに対する予防方法の確立は重要な課題である。本研究では、敗血症モデルにおいてSTSが筋肉量低下を抑制する効果を認めた。培養細胞を用いた実験との結果が一貫しておらず今後STSが全身炎症に及ぼす影響も含めて詳細な実験を行う必要はあるが、臨床使用している薬剤が予防効果が示唆されたことは予防方法の確立に大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of sodium thiosulfate (STS) on sepsis-induced skeletal muscle loss. First, in experiments using cultured cells (C2C12 cells), STS reduced muscle mass with or without LPS administration. Our results suggest that STS reduced muscle mass through ubiquitin-proteasome pathway (UPP). Second, in experiments with mice, pre-administration of STS to mice suppressed LPS-induced muscle mass loss. Our experiments suggest that the UPP and autophagy pathway are involved. The effect of STS was not constant between in vitro and in vivo experiments. Therefore, we would like to examine the impact of STS on systemic inflammation.

研究分野：麻酔科

キーワード：ICU-AW チオ硫酸ナトリウム 敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

ICU-AW は集中治療を要する重症患者に生じる筋力低下を特徴とした疾患であり、critical illness myopathy (CIM)と critical illness neuropathy (CIN)とその二つを合併した病態に分類される。ICU-AW の発症は、人工呼吸期間や ICU 在室日数を延長させるだけでなく、QOL 低下など長期的アウトカムにも影響を及ぼす。特に、近年 ICU 患者の高齢化が進んでおり患者の社会復帰のためには喫緊の課題となっている。発症頻度は7日以上的人工呼吸器装着患者で25-47%であるのに対し、敗血症患者では70-100%と高率に発症している。

敗血症では引き起こされた全身炎症反応により、エネルギー産生の低下、細胞内抗酸化物質の枯渇やアポトーシスの誘導などが生じる。これにより筋組織は、ユビキチンプロテアソーム経路やオートファジー経路を介して蛋白分解が亢進し筋肉量が低下する。これまで侵襲から早期回復を図るために蛋白異化の抑制と蛋白合成の促進を目指した治療法に関する研究が盛んに行われてきたが、インスリン療法による高血糖の是正が ICU-AW 発症に少なからず予防効果を示しただけで、蛋白異化の亢進を抑制するような新たな治療方法は確立していない。

硫化水素は、抗炎症作用を始め様々な生理薬理作用を有するガス状分子である。臨床応用が期待されるが、半減期が短く高用量で強い毒性(ミトコンドリア呼吸鎖阻害)を呈することが難点である。一方で、硫化水素の代謝産物であるチオ硫酸は、比較的安定した物質である。チオ硫酸ナトリウム(STS)は、抗酸化作用を有しシアン化合物の解毒薬としてすでに臨床使用されている。これまでに脳虚血再灌流モデルや敗血症モデルにおいて細胞保護効果を認め、抗炎症作用の他に Caspase の Sulfhydration による抗アポトーシス作用を有することを示されている。また、チオ硫酸の一部は細胞内で酵素反応を介して硫化水素に変換されるため硫化水素による作用も期待できる。

そのため、本研究ではチオ硫酸が敗血症による敗血症による ICU-AW に対し予防効果を示すという仮説に基づき、筋肉量低下とそのメカニズムに焦点を当て検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

ICU-AW の発症は患者の生命予後及び QOL 低下に関与するため予防法や治療法の確立が望まれている。敗血症による全身炎症は ICU-AW の主要な危険因子の一つである。一方、チオ硫酸は硫化水素の代謝産物であるが、安定的でありすでに臨床でも使用されている。その作用は、硫化水素同様抗炎症作用や抗アポトーシス作用など細胞保護に働き、近年ミトコンドリア合成にも関与することが示された。本研究では敗血症モデルを用いてチオ硫酸による ICU-AW への予防効果を検討する。

## 3. 研究の方法

培養細胞を用いた *in vitro* 実験とマウスを用いた *in vivo* 実験に分けて研究を遂行した。

### (1) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験

マウス由来筋芽細胞(C2C12細胞)を培養し分化させ、LPS(500 ng/mL)を投与後チオ硫酸ナトリウム(STS)の効果を検討する。検討項目は以下の通りである。

- ・ Western blot 法を用いたミオシン(MHC)発現量の解析
- ・ qPCR 法を用いたユビキチンプロテアソーム経路の遺伝子(Atrogin-1、MuRF)発現量の解析
- ・ qPCR 法を用いた炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6)の遺伝子発現量の解析

### (2) マウスを用いた *in vivo* 実験

8-12週齢のC57BL/6マウスを用いて実験を行った。

以下の4つの群に分けて比較検討を行う。

(Sham + PBS)群 / (Sham + STS)群 / (LPS + PBS)群 / (LPS + STS)群

マウスに STS 2g/kg または PBS を腹腔内投与 30 分後に LPS 10mg/kg を腹腔内投与し 24 時間後筋組織(前脛骨筋)を採取し解析した。

検討項目は以下の通りである。

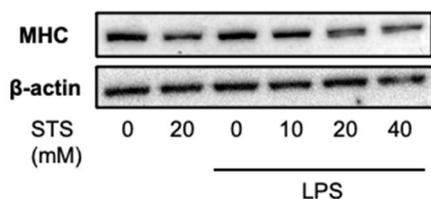
- ・採取した筋肉重量及び体重の測定
- ・ Western blot 法を用いた蛋白発現量の解析
  - > MHC
  - > ユビキチンプロテアソーム経路 (Atrogin-1、MuRF)
  - > オートファジー経路 (LC3B)
- ・ qPCR 法を用いた遺伝子発現量の解析
  - > ユビキチンプロテアソーム経路 (Atrogin-1、MuRF)
  - > オートファジー経路 (LC3B、Bnip3)
  - > 炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6)
- ・ ELISA を用いた血中濃度の解析
  - > 炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6)

#### 4. 研究成果

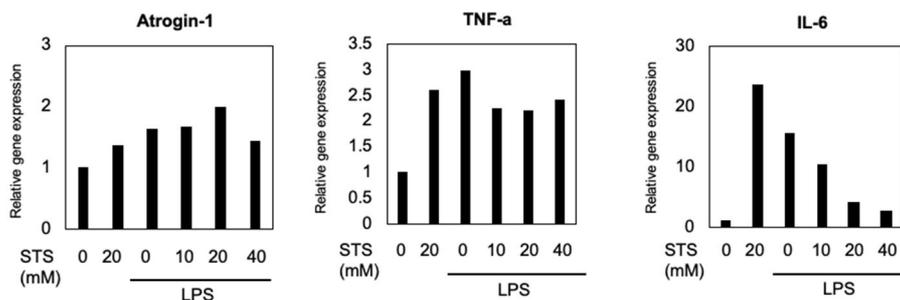
本研究は、敗血症における筋萎縮に対する STS の効果を検討した。敗血症モデルとして、LPS 刺激を行って実験を遂行した。

##### (1) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験

マウス由来筋芽細胞 (C2C12 細胞) を培養し分化させ、LPS を投与し STS の効果を検討した。まず、投与 24 時間後に MHC の蛋白発現量を解析したが、STS は LPS の投与に関係なく MHC 発現量を低下させた。(下図)



次に、投与 3 時間後に Atrogin-1、IL-6 と TNF- $\alpha$  mRNA 発現量を解析した。STS 投与のみで Atrogin-1 mRNA 発現量はやや増加し、IL-6 と TNF- $\alpha$  mRNA の発現量は著明に増加した。LPS 投与下では STS による発現量の変化は Atrogin-1 と TNF- $\alpha$  mRNA では発現量に変化はなかったものの、IL-6 mRNA 発現量は著明に抑制した。(下図)



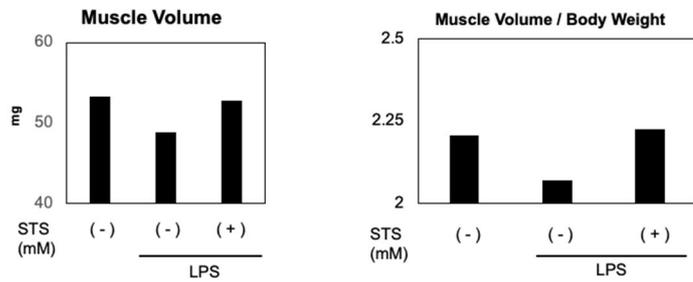
C2C12 細胞を用いた実験において STS は IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA や Atrogin-1 mRNA 発現を誘導し MHC 蛋白の発現量を低下させた。このことから、*in vitro* 実験においては LPS 刺激に関係なく STS は蛋白異化を亢進し筋肉量を低下させる可能性が示唆される。

##### (2) マウスを用いた *in vivo* 実験

8-12 週 of C57BL/6 マウスを用いて実験を行った。マウスに STS 2g/kg または PBS を腹腔内投与 30 分後に LPS 10mg/kg を腹腔内投与し、24 時間後に安楽死させ筋組織 (前脛骨筋) を採取し解析を行なった。

##### 筋肉流量

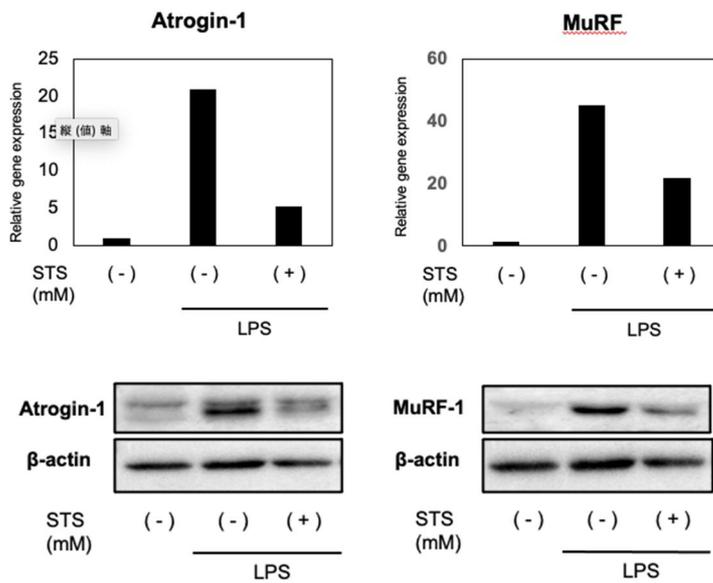
まず、前脛骨筋の重量を計測した。コントロール群 (PBS 投与のみ) に対して LPS 投与群では筋組織の重量が低下した。一方で、LPS 投与前に STS を腹腔内投与下群では、筋組織の重量の減少は抑制されていた。*in vitro* 実験と異なり、*in vivo* 実験では STS は LPS による筋肉量の低下を抑制した。(下図、次頁)



### ユビキチンプロテアソーム経路

次に、筋肉量の低下が抑制された機序について検討を行った。ユビキチンプロテアソーム経路における代表的なユビキチンリガーゼである Atrogin-1 及び MuRF について qPCR、Western blot を用いてそれぞれ遺伝子と蛋白の発現量を解析した。

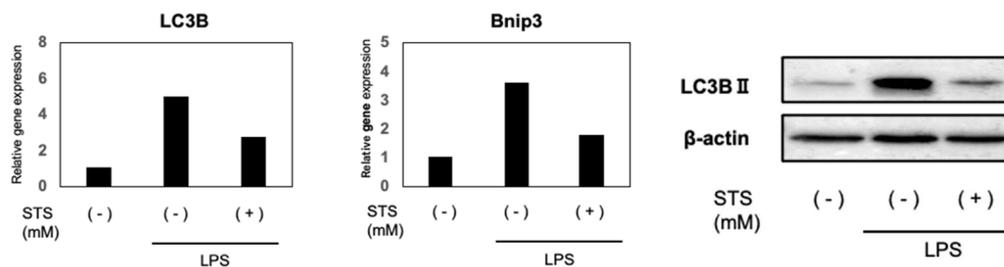
(下図 > 上段：mRNA 発現量、下段：蛋白発現量)



### オートファジー経路

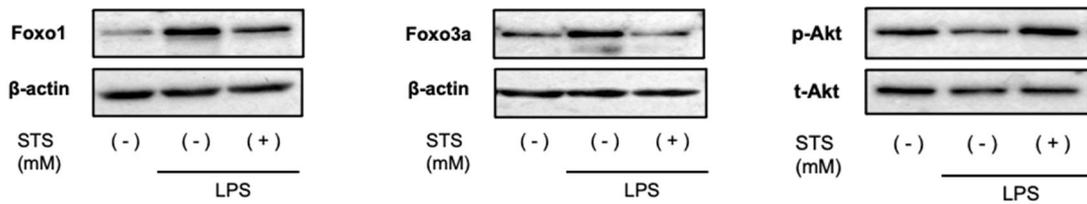
オートファジー経路において代表的な関連蛋白である、LC3B 及び Bnip3 について qPCR、Western blot を用いてそれぞれ遺伝子と蛋白の発現量を解析した。

(下図 > 左側：mRNA 発現量、右側：蛋白発現量)



### Akt-FOXO 経路

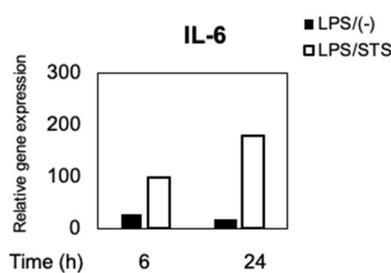
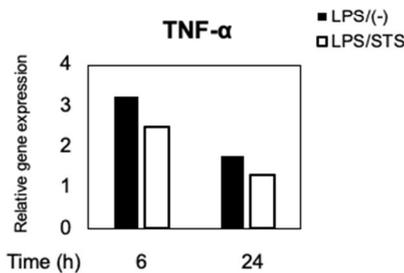
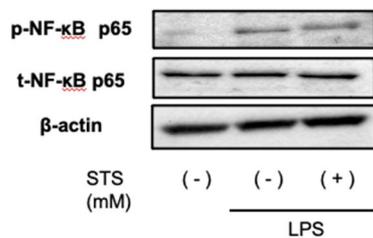
ユビキチンプロテアソーム経路に関する Atrogin-1 及び MuRF の発現増加を STS が抑制していたことから、上流である Akt-FOXO 経路に関して検討した。FOXO ファミリーである FOXO1 及び FOXO3a の蛋白発現及びその上流に位置する Akt のリン酸化について Western blot で解析した。FOXO1 及び FOXO3a は LPS 刺激により蛋白発現量が増加したが、STS はその蛋白発現量の増加を抑制した。また、Akt のリン酸化においても、STS は LPS によるリン酸化の低下を抑制していた。これにより、FOXO 経路により Atrogin-1、MuRF の発現量低下が抑制された可能性が示唆された。(下図、次頁)



### NF-κB 経路

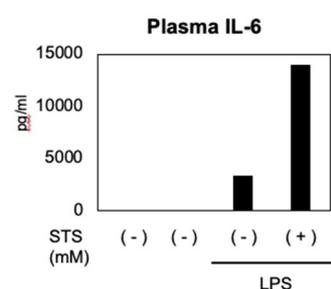
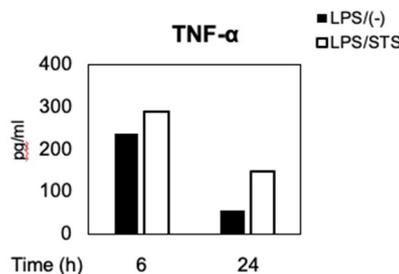
ユビキチンプロテアソーム経路に関する Atrogin-1 及び MuRF の発現増加を STS が抑制していたことから、上流である NF-κB 経路についても検討した。NF-κB 活性化を評価するため、NF-κB p65 のリン酸化を Western blot で解析した。LPS 投与により NF-κB p65 はリン酸化されたが、STS はリン酸化を変化させなかった。また、筋組織における炎症性サイトカインである TNF-α と IL-6 について検討するため qPCR で mRNA 発現量を解析した。6、24 時間後に採取した筋組織において STS は TNF-α mRNA 発現量をやや抑制した。一方で、IL-6 mRNA の発現量に関して STS は LPS 投与下で 6、24 時間共に著明に増加させた。

(下図 > 上段：NF-κB p65 リン酸化、下段：mRNA 発現量)



### 血中サイトカイン濃度

C2C12 細胞を用いた *in vitro* 実験では STS は筋肉量を低下させる結果であったが、*in vivo* 実験は LPS 刺激に対する筋肉量低下を抑制する結果を示した。そのため、STS が全身炎症に及ぼす影響を評価するために、血中の炎症性サイトカイン (TNF-α と IL-6) 濃度を測定した。TNF-α に関しては、6、24 時間ともに STS 投与により血中 TNF-α 濃度はやや上昇していた。一方、IL-6 に関しては 24 時間後の血中 IL-6 濃度が著明に増加していた。STS は LPS による全身炎症を助長している可能性がある。これらの現象は、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験における筋組織で見られた結果の違いに影響を及ぼしているかもしれない。



本研究では、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験において STS は異なる効果を示したが、STS は筋組織に対して多大な影響を与える可能性が示唆された。二つの実験系による差は STS が全身炎症にも影響を与えた結果と考えられるが、いまだ検討されていない課題であり今後は筋組織を含めた全身の影響に検討対象を広げて詳細に検討したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shino Matsukawa, Shinichi Kai, Hideya Seo, Kengo Suzuki, Kazuhiko Fukuda	4. 巻 16(5)
2. 論文標題 Activation of the $\alpha$ -adrenergic receptor exacerbates lipopolysaccharide-induced wasting of skeletal muscle cells by increasing interleukin-6 production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0251921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松川志乃、甲斐慎一、鈴木堅悟、瀬尾英哉、福田和彦
2. 発表標題 カテコラミンは 2 刺激によるIL-6産生増加を介してLPS投与による筋萎縮を増悪させる
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 甲斐慎一、松川志乃、鈴木堅悟、瀬尾英哉、福田和彦
2. 発表標題 IL-6はLPS投与によるAtrogin-1遺伝子の発現量を増加させる
3. 学会等名 第48回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松川志乃、甲斐慎一、鈴木堅悟、瀬尾英哉、福田和彦
2. 発表標題 カテコラミンは 2 刺激によるIL-6産生増加を介してLPS投与による筋萎縮を増悪させる。
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松川志乃、甲斐慎一、鈴木堅悟、瀬尾英哉、福田和彦
2. 発表標題 マウス筋芽細胞においてエビネフリンはLPS刺激によって誘導されるIL-6とAtrogin-1 mRNA発言を増強する
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------