

令和 7 年 5 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03030

研究課題名（和文）TITINを軸とした重症病態における筋力低下に関連する筋実質障害の解析

研究課題名（英文）Analysis of muscle injury in severe condition focusing on TITIN

研究代表者

中村 謙介（Nakamura, Kensuke）

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：50466760

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスに腸管内容液CS1mg/gを腹腔内投与することにより敗血症を誘発、体重、握力、前脛骨筋重量およびその断面積（CSA）、尿中TITINを含めたアウトカムを評価、透過型電子顕微鏡で観察した。尿中TITINはCS注射後1日目にピークに達し、TITINを含めた各アウトカムはCS投与量依存的に減少した。Z線間のサルコメアの広がりが観察された。多施設前向き研究ではICU入室した敗血症339例を1年後まで長期フォローした。退院時死亡率は23%、12ヵ月後には37%に増加、3、6、12ヵ月後の死亡またはPICS発生率はそれぞれ60-70%、退院時PICS基準を満たした患者の死亡率は89%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋障害およびPICSバイオマーカーとしてのTITINの意義を明らかとして救急集中治療における同バイオマーカーの活用を世界に提案した。また多施設前向き研究にて敗血症における同PICSの発生状況を明らかとし、社会的問題としてPICSに対策する研究が急務であり今後さらなる研究推進が必要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Sepsis was induced in mice by intraperitoneal administration of intestinal contents solution CS at 1 mg/g, and outcomes including body weight, grip strength, tibialis anterior muscle weight and cross-sectional area CSA, and urinary TITIN were evaluated. Observations were made using a transmission electron microscope. TITIN in urine peaked on day 1 after CS injection, and all outcomes, including TITIN, decreased in a CS dose-dependent manner. Expansion of sarcomeres between Z lines was observed. In a multicenter prospective study, 339 patients with sepsis admitted to the ICU were followed up for one year. The in-hospital mortality rate was 23%, increasing to 37% at 12 months. The mortality or PICS incidence rates at 3, 6, and 12 months were 60-70%, and the mortality rate among patients meeting PICS criteria at discharge was 89%.

研究分野：救急集中治療

キーワード：PICS ICU-AW TITIN CIM

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

救急集中治療医学の向上により救命率は向上したが、生存患者において身体機能、認知機能、精神面での後遺症を生じ、post-intensive care syndrome PICS と呼ばれ問題となっている(図1)1。特に身体面、中でも筋肉の障害はcritical illness myopathy CIMと言われ重篤な身体障害を生じる。神経の障害と相まって、顕著な症例では疾患の治療が完遂した後も体を全く動かすことができなくなるほどの身体障害を残するため2、早期リハビリや栄養療法などの提供が必須であるが3、同時にCIMを抑制する治療介入の開発は急務となっている。

CIMの障害は主に筋肉量減少と筋力低下に分けることができる。集中治療中の筋肉量減少は2週間で20%ともなるとされ、我々の先行研究においても同程度の筋肉量減少が生じ、特に大腿筋群に最も大きいことを実証した。一方で筋力低下に関しては、筋肉量減少や神経障害で説明できない著明な筋力低下がしばしばみられる。一般的にも筋力と筋肉量は必ずしも連動せず、筋力低下、特に骨格筋の筋力低下の直接的機序は明らかになっていなかった。ここで我々は先行研究においてTITINの崩壊が筋力低下に関連する筋障害の鍵の1つであることを報告した。TITINは筋原線維の構造物の1つであり、筋原線維であるアクチンフィラメントのZ帯とミオシンフィラメントのM線を結びつける分子である。筋収縮はアクチンとミオシンによって行われるため筋収縮にとって重要な構造物であり、その崩壊は筋力低下に直結する。先行研究において、集中治療患者ではTITINの崩壊に伴いTITINのN末端フラグメントが健常人の10-100倍のオーダーで尿に検出されることを世界ではじめて示し、また集中治療患者50人の前向き観察研究においてTITIN崩壊量は筋力低下と相関関係を示すことを示した。健常人においても筋力トレーニング後の筋力低下にTITINの障害が影響していることが示されており、先行研究の結果は、CIMにおける筋力低下に関連する筋障害の機序にTITINの崩壊が寄与していることを示唆していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究はtranslational researchとして、基礎研究と臨床研究を同時進行で行うことでTITINの崩壊を鍵とするCIMにおける筋力低下と障害の機序を解明し臨床評価を確立することを目的とした。CIM、特に骨格筋の筋損傷の機序の検討はこれまでに行われていなかったが、筋力に関わる筋肉の障害とTITINの関連を示すことで、今までになかった集中治療後の身体機能障害を改善しうる治療介入の開発への貢献とする。

3. 研究の方法

研究提案当初、CIMをきたしやすいARDS(重症呼吸不全)と敗血症を軸とし、オーストラリアThe Prince Charles HospitalのCritical Care Research Group研究室における羊のARDSモデル(STARDUST study)にてCIMにおけるTITIN崩壊を検討する、敗血症患者の離床とPICSを調査する多施設前向き観察研究ILOSS studyにおいてサブ研究としてTITINを評価し身体機能との関連を検討する、日立総合病院においてTITIN評価とより詳細な身体機能、筋肉量評価を行い、TITIN障害時にどのような身体障害をきたしやすいか検討、挑戦的に超音波による大腿直筋の画像分析を実施、機械学習により筋実質の障害に応じた輝度パターンの探索を行い、TITIN障害や筋力低下を予測する臨床評価の開発を行う、という3つの基礎研究及び臨床研究を主軸として研究を進めた。

STARDUST studyにおけるARDSモデルはすでに完成しており筋肉検体および尿検体を日本に搬送してELISA解析を行ったが、ヒツジTITIN-ELISAキットにて尿中TITINを検出することができず、ELISA検出の限界とともにこのARDSモデルにおいて筋障害が顕著でない可能性が考えられ、ヒツジモデルにおける筋傷害研究を断念し、マウスモデルにおける検討に方針を切り替えた。

マウス敗血症モデルを作成し尿中TITINを計測したところ、同モデルでは早期の筋傷害を確認することができたため、下記方法で研究を実施した。

動物種

7週齢の雄C57BL/6JマウスをCharles River社(カナダ、ケベック州セントコンスタン)から購入した。マウスは12:12時間の明暗サイクルで、温度は22℃で飼育し、餌と水は自由摂取とした。

腹腔内容液CSの腹腔内注による敗血症モデル

CSを調製するために、犠牲にしたマウスの盲腸を70µmメッシュのセルストレーナー

(EASYstrainer™、Greiner Bio-One、Kremsmünster、オーストリア)で粉碎し、1~2mLの滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS、和光、大阪、日本)と混合した。混合物を11,000rpmで1分間遠心し、上清を除去した。残渣を15%グリセロール-PBSと混合し、500 mg/mLの濃度とし、CSを調製した。CS(1mg/g体重)を腹腔内注射し、多菌性敗血症を誘発した。対照として同量のピヒクル(15%グリセロール-PBS)を注射した。用量分割試験では、0.3および2.0 mg/g体重のCSを用いて敗血症を誘発した。マウスはイソフルラン吸入で麻酔し、特定の日にサクリファイスして前脛骨筋を採取した。

握力

握力計(MK-380Si;室町機械、東京、日本)を用いてマウスの握力を測定した。尾を後方に引き、マウスは前足で握力計のバーを掴んだ。握力は3回測定し、最も高い値を比較に用いた。

組織学的検討

マウスの右脚から前脛骨筋を剥離し、0.2%のピクリン酸を含む4%PFAに浸漬し、パラフィンに包埋後、5µmの厚さで切片化した。切片をヘマトキシリン・エオジン溶液(和光、大阪、日本)で染色し、カメラ(オリンパスBX43、東京、日本)付き光学顕微鏡で観察した。Image Jソフトウェアを用いて、筋線維の断面積を20倍の倍率で定量した(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)。1群につき少なくとも3視野で約200本の筋線維を測定した。

ELISA 解析

尿中タイチンNフラグメントはELISAキット(27602 Mouse Titin N-Fragment Assay Kit、株式会社免疫生物研究所)を用いて測定した。製造元の説明書に従って全サンプルを二重測定し、平均値を解析に用いた。マイクロプレートリーダー(iMark™ Microplate Reader、Bio-Rad、Hercules, CA, U.S.)を用い、吸光度と濃度から標準曲線を作成した。

透過型電子顕微鏡

解剖した前脛骨筋を0.2%ピクリン酸を含む4%PFAに浸漬した。固定前に、液体をPBSに浸した。固定細胞を0.05Mカコジル酸緩衝液で5回洗浄し、0.05Mカコジル酸緩衝液中1%四酸化オスmiumで2時間後固定した。ライヒェルト・ニッセイ社製ウルトラミクロトーム(ULTRACUT-N、日精産業、東京、日本)を用いてTEM用の超薄切片を作製し、銅グリッド(200メッシュ)にマウントした。TEM用の超薄切片は、4%(w/v)酢酸ウラニルで10分間、Reynolds' Pbで3分間の二重染色を行った。すべての切片を透過型電子顕微鏡(HT7800型、日立、東京、日本)で観察した。

予定された多施設前向き研究 ILOSS study を下記方法で実施した。

Study settings

多施設前向きコホート研究。日本の20の三次病院、21のICUで実施された。すべての病院から倫理的承認を得て(中央倫理委員会: 済生会宇都宮病院、承認番号: 2019-72)、すべての患者からインフォームドコンセントを得た。本研究はUMIN(UMIN000041433)に登録された。

Patients

2020年11月1日から2022年4月30日までにICUに入室し、ICU入室時に敗血症または敗血症性ショック(Sepsis-3の定義による)と診断された全患者を対象とした。除外基準は、18歳未満、COVID-19と診断された患者、48時間以内にICUから退院する見込みの患者、脳卒中、重度の頭部外傷、脳腫瘍、低酸素脳症などの臨床検査に基づいて敗血症とは無関係と考えられる中枢神経系疾患を有する患者、臨床検査から敗血症とは無関係と考えられる中枢神経系疾患を有する患者、既往の精神症状により意思疎通ができない患者、入院前に歩行補助具を使用しても自立歩行ができない患者、ICU入室時に終末期または終末状態にあり、ICU入室中および入室後の治療制限の一因となりうる患者とした。

Variables

ICU入室時、ICU滞在中、および退院時に、患者の特徴に関する以下のデータを入手した: 年齢、性別、肥満度(BMI)、栄養状態、Charlson Comorbidity Index、入院前のClinical Frailty Score(CFS)、入院前のBarthel Index(家族からの情報に基づく2週間以内の最良の値として記録)、入院前の就労状況、ICU入室経路、感染源、SOFAスコア、ICUでの敗血症性ショックの有無、非侵襲的陽圧換気、高流量鼻カニューレ、侵襲的機械換気、腎代替療法を含むICU滞在中の体外循環サポート、ICU死亡率、IMVの期間、ICUおよび入院期間。

Outcomes

退院時および退院後 3 カ月、6 カ月、12 カ月の追跡時に電話と郵便で調査が実施された。主要アウトカムは、死亡率と PICS の発生率の複合アウトカムとした。PICS の発生率は、以下のいずれかの存在によって定義された：(1) Barthel Index BI90 点以下の身体機能障害、(2) Short Memory Questionnaire SMQ 40 点未満で定義される認知機能障害、または(3) Hospital Anxiety and Depression Scale HADS 8 点以上または Impact of Event Scale-Revised IES-R25 点以上の精神障害。生存退院した患者はさらに PICS の発生率、各機能障害の発生率、各評価のスコア、PICS の 3 領域中 2 領域または 3 領域すべてを有する患者数、QOL 評価のための EuroQoL 5-dimension5-level (EQ-5D-5L) および visual analog scale (EQ-VAS) 就労状況、入院前に就労していた患者における就労率、生存、身体機能障害または精神障害、体重変化、退院後の病院または ICU への再入院、予定外の救急外来受診、リハビリテーションまたは精神科の受診が調査された。

尿検体を採取し、現在筑波大学にて TITIN の ELISA 解析を実施中であるが、まだ全ての検体の解析が終了しておらず解析を続けている。

単施設にて超音波による大腿直筋の筋輝度評価を輝度解析ソフトウェアをレンタルしてパイロット的に実施したが、重症度や筋傷害との関連を証明するのが困難と考えて断念し、の研究に専念した。日立総合病院はの参加施設の中でトップの症例登録数となっている。

4. 研究成果

以下、上記方法 に対応した研究成果につき記載する。

マウス敗血症モデルにおける筋傷害解析

体重、握力、筋重量、筋断面積

CS 注射後、敗血症モデルマウスは体重が著明に減少した (CS モデル vs コントロール; 1 日目 $88.5\% \pm 1.3\%$ vs $100.6\% \pm 1.1\%$, $p < 0.01$; 6 日目 $94.3\% \pm 4.4\%$ vs $101.4\% \pm 1.3\%$, $p < 0.01$)。CS 注射の 6 日後マウスの握力は CS モデルでコントロールよりも低下した (CS モデル対コントロール; $80.2\% \pm 5.5\%$ 対 $95.5\% \pm 7.2\%$, $p = 0.01$)。前脛骨筋の重量は有意な減少はみられなかったが (CS モデル vs コントロール; $37.4\text{g} \pm 2.8\text{g}$ vs $39.8\text{g} \pm 2.8\text{g}$, $p = 0.26$)。断面積では有意な減少が観察された (CS モデル vs コントロール; $453.9 \pm 184.0 \mu\text{m}^2$ vs $647.5 \pm 291.7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$)。

尿中 TITIN

CS 注射後、尿中 TITIN は 1 日目にピークに達した (CS モデル; 0 日目 $2902.8 \pm 1982.4 \text{pmol/L}$ 、1 日目 $21746.8 \pm 6512.2 \text{pmol/L}$ 、6 日目 $4897.8 \pm 2469.1 \text{pmol/L}$)。尿クレアチニンも 1 日目にピークに達した (CS モデル; 0 日目 $22.1 \pm 3.6 \text{mg/dL}$ 、1 日目 $44.0 \pm 16.8 \text{mg/dL}$ 、6 日目 $31.3 \pm 7.9 \text{mg/dL}$)。尿中 TITIN を尿中クレアチニンで除した値は、1 日目に増加し、6 日目に減少した (CS モデル vs コントロール; 0 日目 $12.7 \pm 8.5 \text{pmol/mg Cr}$ vs. $15.6 \pm 13.5 \text{pmol/mg Cr}$, $p = 0.73$; 1 日目 $51.8 \pm 8.5 \text{pmol/mg Cr}$ 対 $23.5 \pm 13.4 \text{pmol/mg Cr}$, $p < 0.01$; 6 日目 $15.5 \pm 5.4 \text{pmol/mg Cr}$ 対 $20.3 \pm 9.4 \text{pmol/mg Cr}$, $p = 0.40$)。

CS 用量依存性

CS 0.3、CS 1.0、および CS 2.0 注射後、体重は 1 日目と 6 日目に用量依存的に有意に減少した。握力も CS 1.0 および CS 2.0 注射後 6 日目に用量依存的に有意に低下した (コントロール vs. CS 1.0: $97.1\% \pm 6.9\%$ vs. $82.7\% \pm 6.8\%$, $p = 0.02$; vs. CS 2.0: $70.6\% \pm 10.8\%$, $p < 0.01$)。さらに、前脛骨筋の重量は、CS 2.0 注射後 6 日目に有意に減少した (コントロール vs. CS 2.0: $42.1 \pm 2.2 \text{g}$ vs. $32.2 \pm 3.8 \text{g}$, $p < 0.01$)。前脛骨筋の断面積は、CS 2.0 注射後、用量依存的に有意な減少を示した (コントロール vs. CS 0.3: $771.8 \pm 333.6 \mu\text{m}^2$ vs. $640.8 \pm 352.8 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$; vs. CS 1.0: $563.2 \pm 284.1 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$; vs. CS 2.0: $384.4 \pm 208.4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$)。

尿中 TITIN の CS 用量

CS1 日後、尿中 TITIN は用量依存的に増加した (コントロール vs. CS 0.3: $23.5 \pm 13.4 \text{pmol/mg Cr}$ vs. $28.4 \pm 13.2 \text{pmol/mg Cr}$, $p = 0.64$; vs. CS 1.0: $51.8 \pm 8.5 \text{pmol/mg Cr}$, $p < 0.01$; vs. CS 2.0: $93.1 \pm 5.8 \text{pmol/mg Cr}$, $p < 0.01$)。それに対して CS6 日後では、尿中 TITIN は用量依存的に変化しなかった (コントロール vs. CS 0.3: $20.3 \pm 9.4 \text{pmol/mg Cr}$ vs. $21.4 \pm 6.4 \text{pmol/mg Cr}$, $p = 0.85$; vs. CS1.0: $15.5 \pm 5.4 \text{pmol/mg Cr}$, $p = 0.40$; vs. CS2.0: $28.1 \pm 6.7 \text{pmol/mg Cr}$, $p = 0.32$)。

尿中 TITIN と他のアウトカムの関係

尿中 TITIN と体重、握力、前脛骨筋の重量および断面積との関係を 20 匹のマウスで検討した。1 日目の尿中 TITIN は 6 日目の体重 ($r = -0.80$, $p < 0.01$)、握力 ($r = -0.85$, $p < 0.01$)、前

脛骨筋の重量 ($r = -0.81$, $p < 0.01$) と相関した。尿中 TITIN と前脛骨筋の断面積との関係を 12 匹のマウスで調べたところ、1 日目の尿中 TITIN は 6 日目の断面積と有意な負の相関関係を示した ($r = -0.78$, $p < 0.01$)。

筋検体の電子顕微鏡解析

Z ライン間のサルコメアの長さは、敗血症モデルではコントロールよりも広がった。太いフィラメントタンパク質ミオシンと細いフィラメントタンパク質アクチンが安定性を失っており、サルコメアの安定性と機能にとって Z-disc に固定されたタイチンが重要であることがわかった。

多施設前向き研究 ILOSS study

25,876 例の ICU 入室のうち、研究期間中に ICU 入室時に敗血症または敗血症性ショックと診断された患者は 1382 例で、本研究の解析対象として 339 例が登録された。患者は高齢で (年齢中央値 74 歳 [IQR : 67-82])、男性が多く (60%)、BMI は 23.4kg/m^2 [20.4-25.8] と低かった。また、合併症は少なく (CCI による中央値 2)、入院前の CFS スコアは中央値 3 [3-5]、BI スコアは中央値 100 [90-100] であった。患者の約 4 分の 1 ($n = 80$, 24%) は、入院前に就労していた。感染源は腹部 (32%) が最も多く、次いで尿路 (19%)、筋骨格系および軟部組織感染 (19%)、呼吸器感染 (17%) であった。ICU 入室時の SOFA スコアは中央値 9 [6-12] で、77% で敗血症性ショックであった。さらに患者の 61% が人工呼吸を、40% が血液浄化療法を受けた。人工呼吸期間の中央値は 5.0 日 [2.8-10.0]、ICU および入院期間の中央値はそれぞれ 6.1 日 [3.7-10.8]、28.7 日 [16.5-51.5] であった。

Primary outcome

退院時の死亡または PICS 基準該当者の発生率は 89% で、主要転帰である死亡率と PICS 発生率の合計は、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月の追跡調査時にそれぞれ 73%、64%、65% であった。死亡率は退院時 23% から 12 ヶ月後追跡調査 37% に増加した。退院時にあらかじめ定義された PICS 基準を満たした患者の割合は 66% で、12 ヶ月後の追跡調査では 28% に減少した。各時点でフォローアップを受けた患者の特徴に差はなかった。

生存者の転帰

退院した生存患者のうち、85% が退院時点で PICS の基準を満たしていた。これは退院後の経過とともに減少し、3 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後の追跡調査では、PICS の割合は 62%、47%、45% と報告された。身体機能障害、認知機能障害、精神障害を含む PICS の 3 領域はすべて、退院後 1 年間に減少した。精神障害の 3 つの症状のうち、うつ病は不安障害や PTSD と比較して 1 年間一貫して有病率が高かった。患者は 2 つ以上の機能障害を同時に経験することが多く、退院時の生存者の 59% から 12 ヶ月後追跡調査では 21% に減少した。QOL として EQ-5D-5L はわずかに改善したが、自己報告式 EQ-VAS はあまり改善しなかった。全体的な就労状況は、退院後 12 ヶ月にわたって低いままであった (15~17%) が、入院前に仕事を持っていた生存者では 12 ヶ月までにわずかに減少がみられた (3 ヶ月で 52%、12 ヶ月で 44%)。体重は退院時のベースラインより減少していた。退院後 1 年間は徐々に改善がみられたが、体重は敗血症による入院前のベースラインには戻らなかった。退院後 1 年以内に 5 分の 2 が再入院し、10 分の 1 が ICU に再入院した。リハビリテーションや精神科の受診は全患者において一貫して低かった。

入院時の栄養状態とアウトカム解析

TITIN の ELISA 解析は現在遂行中であるが、入院時の栄養状態を筋肉量を含めた GLIM 基準で評価しアウトカムとともに解析したところ以下の知見が得られた。

1. ICU 入室敗血症患者のうち GLIM 低栄養はおよそ 2/5 に存在する
2. GLIM 低栄養患者には血液浄化療法を必要とすることが多い
3. GLIM 低栄養患者の予後は悪い (生存率は変わらないが、ICU 滞在期間や入院期間が長く、身体アウトカムが悪い傾向がみられる)
4. GLIM 低栄養患者と非低栄養患者で ICU14 日間の栄養投与量は変わらなかったが、低栄養患者では後半時期の経腸栄養による栄養摂取量が少なく、静脈栄養が多くなる傾向がみられた。ICU 入室から嚥下摂取開始までが遅いことが確認された。
5. GLIM 低栄養患者と非低栄養患者でリハビリテーション開始時期は同等であったが、身体活動度 IMS ごとの到達日は軒並み低栄養患者で遅くなっており、リハビリテーションが進みにくい現状が明らかとなり、入院期間の延長と関連していた。
6. 悪い身体アウトカムに対して、GLIM 低栄養は独立した危険因子になっていた。

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〕

-

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	下條 信威 (Simojo Nobutake) (20462210)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	山川 一馬 (Kazuma Yamakawa) (50597507)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	東條 健太郎 (Kentaro Tojo) (80737552)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	
研究分担者	土井 研人 (Kent Doi) (80505892)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

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