

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15753

研究課題名(和文) 中枢性骨形成シグナルによる小児閉塞性睡眠時無呼吸症候群の顎顔面成長障害機構の解明

研究課題名(英文) The study to clarify the mechanism of mandibular growth retardation regulated by central mediators for bone formation in pediatric obstructive sleep apnea

研究代表者

小野 卓史 (ONO, Takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30221857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的な間欠性低酸素血症を伴う小児の閉塞性睡眠時無呼吸症候群(OSA)は、小顎症や歯列狭窄の顎顔面劣成長を呈することから、顎顔面領域の形態との関連が考えられる疾患である。しかし、小児OSAに関する病理研究や病態を再現したモデルを用いた報告は少なく、病態形成の詳細は不明である。本研究では、小児OSAにおける顎顔面骨の成長障害機構の解明を目的とする。間欠的低酸素血症による交感神経受容体の機能亢進および交感神経受容体を介した骨形成制御を予想し、間欠的低酸素曝露モデルへの $\alpha_2$ 受容体阻害剤の投与を行い、実験モデルの顎骨成長および代謝を解析した結果、 $\alpha_2$ 受容体を介した顎骨成長障害の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Repetitive episodes of hypoxia during sleep is a pathology of obstructive sleep apnea (OSA). However, the mechanism of impaired craniofacial growth caused by intermittent hypoxia (IH) is unknown. The aim of this study was to demonstrate the role of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor in the craniofacial growth retardation of adolescent rats exposed to IH. Seven-week-old male rats underwent 20 cycles of IH (nadir of 4% oxygen to peak of 21% oxygen) for 8 hours each day for 3 weeks. Rats were medicated with a  $\alpha_2$ -adrenergic antagonist (butoxamine) intraperitoneally. The control rats were exposed to room air, and administrated with saline intraperitoneally. IH caused mandibular growth retardation and a significant increase in bone mineral density (BMD). Butoxamine attenuated mandibular growth retardation, especially in the posterior part and also increases BMD in the condylar head and gene expression level of RANKL in the IH group.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：小児期閉塞性睡眠時無呼吸症候群 間欠的低酸素曝露 成長期動物

## 1. 研究開始当初の背景

閉塞性睡眠時無呼吸 (Obstructive sleep apnea: OSA) は、睡眠中に上気道閉塞による呼吸停止または低呼吸状態が繰り返し生じる睡眠呼吸障害であり、低酸素血症や高炭酸ガス血症を呈する。成人の OSA は、高血圧、心筋梗塞および脳梗塞などの重篤な合併症を誘発することが多くの研究から示されている。一方、近年では成人のみならず、小児における OSA の報告がなされている。2005 年には、アメリカ睡眠医学会において小児 OSA の診断基準が定義され、小児 OSA に対する治療の重要性が提唱された。しかしながら、小児 OSA に関する臨床研究は少なく実験モデルが確立していないことから小児 OSA の病態機構は不明な点が多い。

OSA の小児患者において、小顎症や歯列狭窄などの顎顔面領域の劣成長とともに、慢性炎症を伴う上部気道の狭窄が認められ、就寝時における気道拡張筋の筋緊張の低下による舌根沈下により、慢性的な間欠性低酸素血症が生じている。

成人 OSA 患者を対象とした臨床研究、間欠的低酸素曝露を再現した動物モデルを用いた基礎研究から、間欠的低酸素曝露は、交感神経の 2 受容体を活性化し、循環器疾患や全身性炎症の病態に關与することが知られている。

小児 OSA を対象とした臨床調査および小児 OSA の病態を再現した成長期モデル動物を用いた研究は、いずれも国内外を問わず少なく、成長期における間欠的低酸素曝露による顎骨成長障害の病態形成機構の詳細は不明である。また、これまで研究代表者らは、間欠的低酸素曝露を再現した動物モデルを用いた基礎研究における顎顔面骨 (下顎骨および鼻骨) の成長障害について報告してきたが、間欠的低酸素曝露を受けた成長段階による顎顔面骨成長の影響の差異は、未だに検討されていない。

さらに、成長期ラットにおいて、間欠的低酸素曝露による鼻腔の軟組織気道の狭窄が生じることについて明らかにされてきたが、上気道粘膜における炎症惹起については検討されていない状況である。

## 2. 研究の目的

はじめに、(1) 異なった成長段階における間欠的低酸素曝露の顎顔面成長への影響を解明することを目的とする。さらに、顎顔面成長における病態形成機構の詳細を明らかにする目的にて、(2) 交感神経 2 受容体に対する薬理的阻害実験を実施する。また、(3) 上気道炎症惹起の様相の詳細を明らかにする目的にて、鼻腔粘膜の炎症性因子の生化学的解析を実施する。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物モデル作製

夜行性である雄性 Sprague Dawley ラットを、午前 9 時から午後 5 時までの 8 時間、20 回/時間のサイクルで、内部の酸素濃度を 4% ないし 21% の間で反復的に変動することができる低酸素チャンバー内にて飼育し、夜間の間欠的低酸素曝露の環境を再現した。対照群は、低酸素ガスの代わりに、通常の大気を供給するチャンバー内で、実験群と同一期間、飼育した。実験群および対照群の飼育チャンバーは隣接した場所に置き、酸素環境以外の条件は全て同じとなるようにし、また、全身性成長の実験群と対照群との間で等しくするため、pair-feeding による給餌を行った。

### (2) 異なった成長段階における間欠的低酸素曝露の顎顔面成長への影響の検討

哺乳期 (1 週齢) 離乳期 (3 週齢) および思春期前後 (7 週齢) の異なる成長段階のラットへの間欠的低酸素曝露実験を行い、その後、顎顔面骨の形態評価、骨密度の評価を実施した。

### (3) 交感神経 2 受容体の阻害実験

上記 (2) の解析後、7 週齢ラットに対して、間欠的低酸素曝露開始時に、吸入麻醉下に於て薬剤徐放性ポンプを腹腔内に埋入し、実験群には 2 受容体阻害剤 (プトキサミン)、対照群に生理的食塩水を、3 週間、持続投与し、実験期間終了後、顎顔面骨の形態評価、骨密度の評価を行った。

### (4) 上気道組織における炎症性因子の発現レベルの生化学的評価

上記 (2) の各成長段階のラットから鼻粘膜を採取し、組織学的手法による鼻粘膜の肥厚の検証とともに、リアルタイム PCR による炎症性サイトカイン TNF、CTGF の発現レベルの解析を実施した。

## 4. 研究成果

世界的に、睡眠呼吸障害の病態に関する研究は、成人患者を対象とした研究が主体であり、本疾患の病態モデル動物である間欠的低酸素曝露モデル動物に関する先行研究の多くも、成体動物を対象としている。したがって、成長遅延をとまなう小児 OSA の病態解明を目的とした研究は、これまで国内外を問わず極めて少なく、成長段階による睡眠呼吸障害の成長への影響の差異について、国内外において報告されていない状況であった。そこで、本研究は、実験動物の適切な成長段階を設定するために、はじめに、哺乳期 (1 週齢)、離乳期 (3 週齢) および思春期前後 (7 週齢) の異なる成長段階のラットへの間欠的低酸素

素曝露実験を行い、結果として、哺乳期および思春期前後のモデルにおいて、下顎骨の成長障害が著しく生じることを、国内外において、はじめて報告した。

また、鼻気道粘膜を対象とした炎症性サイトカインの定量PCRにより、哺乳期、離乳期においては、転写レベルの上昇が認められず、思春期前後のモデルにおいてのみ、TNF、CTGFのmRNAレベルの発現上昇が有意に認められた。さらに、舌骨筋を対象としたPCR解析においても、同様の結果が得られた。したがって、間欠的低酸素曝露の影響は成長段階に影響され、低酸素曝露の影響は思春期前後において大きい可能性が示唆された。

さらに、小児OSAにおける顎顔面骨の成長障害機構の解明を目的に、病態の主徴である間欠的低酸素血症による交感神経受容体の機能亢進と骨代謝変調との連関を仮説とし、最も重篤な顎顔面骨の成長障害を呈する7週齢の間欠的低酸素曝露モデルに対して、の交感神経2受容体阻害剤であるプトキサンミンの投与実験を行い、プトキサンミンの投与、が選択的に、下顎骨の成長を回復させることを、国内外において、はじめて明らかにした。

以上のことを踏まえ、本研究の成果は、第一に、成長期の睡眠呼吸障害への治療的介入の時期が極めて重要である可能性を示唆するものである。第二に、病態モデルへの薬理的介入実験の成果は、交感神経2受容体の機能制御が、小児OSA患者における骨代謝障害の治療の新たなターゲットとなりうることを示唆し、これらの本研究で得られた成果は、今後、小児OSAの先制医療の開発の基盤となることが予測される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 3 件)

Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Maeda H, Nagai H, Usumi-Fujita R, Kaneko S, Shibutani N, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, Intermittent Hypoxia Influences Alveolar Bone Proper Microstructure via Hypoxia-Inducible Factor and VEGF Expression in Periodontal Ligaments of Growing Rats, *Front Physiol*, 査読有, 7 巻, 2016, 416  
PubMed PMID: 27695422  
Hosomichi J, Kuma Y, Oishi S, Nagai H, Maeda H, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T. Intermittent hypoxia causes mandibular growth retardation and macroglossia in growing rats, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 査読有, 151 巻, 2017, 363-371.

doi:10.1016/j.ajodo.2016.02.033.  
Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Nagai H, Maeda H, Usumi-Fujita R, Kaneko S, Shitano C, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, Intermittent hypoxia induces disturbances in craniofacial growth and defects in craniofacial morphology. *Arch Oral Biol*, 査読有, 61 巻, 2016, 115-124  
doi:10.1016/j.archoralbio.2015.10.017.

##### [学会発表](計 8 件)

Hong H, Hosomichi J, Maeda H, Lekvijittada K, Oishi S, Kuma Y, Yamaguchi H, Ishida Y, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, 2-adrenergic antagonist butoxamine reduces the mandibular growth retardation caused by intermittent hypoxia in adolescent rats, 第77回日本矯正歯科学会大会, 2018

Hong H, Hosomichi J, Maeda H, Lekvijittada K, Oishi S, Kuma Y, Yamaguchi H, Ishida Y, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, The impact of a  $\beta$ 2-adrenergic antagonist, butoxamine on mandibular growth retardation caused by intermittent hypoxia in growing rats, The 11th Asian Pacific Orthodontic Conference, 2018

Lekvijittada K, Hosomichi J, Maeda H, Hong H, Changsiripun C, Kuma Y, Oishi S, Yamaguchi H, Ishida Y, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, Influences of intermittent hypoxia on condylar growth: A study in infant rats, The 11th Asian Pacific Orthodontic Conference, 2018

Hong H, Hosomichi J, Maeda H, Lekvijittada K, Oishi S, Kuma Y, Yamaguchi H, Ishida Y, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, The impact of a  $\beta$ 2-adrenergic antagonist, butoxamine on mandibular growth retardation caused by intermittent hypoxia in growing rats, 第5回東京医科大学記念会館ポスター発表懇談会, 2018

Lekvijittada K, Hosomichi J, Maeda H, Hong H, Changsiripun C, Kuma Y, Oishi S, Yamaguchi H, Ishida Y, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, Influences of

intermittent hypoxia on condylar growth: A study in infant rats, 第5回東京医科大学記念会館ポスター発表懇談会, 2018

Hosomichi J, Maeda H, Kuma Y, Oishi S, Yoshida KI, Ono T. Differential effects of intermittent hypoxia on phenotypic and metabolic features of airway muscles in weaning- and adolescent-aged rats, World Sleep 2017, 2017

Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Usumi-Fujita R, Maeda H, Nagai H, Kaneko S, Shibutani N, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T, Intermittent hypoxia influences bone microstructure via hypoxia inducible factor and VEGF in growing rats. The 10th Asia Pacific Orthodontic Conference, 2016

隈陽一郎, 臼見莉沙, 細道純, 大石修史, 山口博之, 沖藤明日香, 清水康広, 渋谷直樹, 石田雄之, 金香佐和, 鈴木淳一, 吉田謙一, 小野卓史, 成長期における間欠的低酸素曝露がラット鼻腔気道の炎症亢進と形態変化をもたらす, 第75回日本矯正歯科学会大会, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 卓史 (ONO, Takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30221857

### (2) 研究分担者

吉田 謙一 (YOSHIDA, Ken-ichi)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：40166947

鈴木 淳一 (SUZUKI, Jun-ichi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：90313858

清水 康広 (SHIMIZU, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60631968

臼見 莉沙 (USUMI, Risa)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院 プロジェクト助教

研究者番号：90706946

### (3) 連携研究者

細道 純 (HOSOMICHI, Jun)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：00420258

### (4) 研究協力者

なし