

令和元年5月28日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19058

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸による心血管病の発症・進展メカニズムの解明と予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of prophylaxis and clarification of the development and the progression mechanisms of obstructive sleep apnea induced-cardiovascular diseases

研究代表者

京谷 陽司 (Kyotani, Yoji)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10706534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠時無呼吸症(OSA)は、低酸素を繰り返す間歇的低酸素(IH)を特徴とし、心血管病の危険因子である。我々は本研究において、IHにより血管の肥厚に関わるエピレグリン(ER)が増加すること、またその増加には炎症に関わるインターロイキン(IL)-6が関与することを発見した。ERはIL-6による炎症増幅回路の因子であることが近年報告されていることから、IHによるERとIL-6の増加は心血管病だけでなく様々な疾病の発症・進展に関与する可能性がある。今後、IHに対するより詳細な細胞応答メカニズムの解明によりOSAにおける様々な病態に対して新たな予防・治療の方法が確立されるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間歇的低酸素(IH)によるエピレグリン(ER)発現増加にインターロイキン(IL)-6が関与することが明らかとなった。IL-6はその増幅回路により慢性炎症性疾患に関わっており、ERはその増幅回路の因子の1つである。これにより、OSAが慢性炎症性疾患の発症・進展に関与する可能性が示唆された。

IHによるER増加メカニズムに関して、我々は転写因子やマイクロRNAの関与に否定的なデータを得ており、このERの発現制御メカニズムは限られてきている。

本研究は、IHによるER発現増加メカニズムの解明の足がかりとなると共に、その解明が慢性炎症性疾患等の治療および予防戦略へと繋がることを示した。

研究成果の概要(英文)：Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by intermittent hypoxia (IH) and a risk factor in the progression of cardiovascular diseases. In this study, we found that IH induced pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-6, resulting in an increase of epiregulin (ER) which is involved in vascular wall thickness. It was recently reported that ER was a crucial factor in an inflammation amplifier which was induced by IL-6. It is therefore thought that IH-induced increases of ER and IL-6 are involved in the development and the progression of several diseases as well as cardiovascular diseases. Further investigation of intracellular mechanisms for IH will establish the therapeutic strategy and prophylaxis against several diseases in patients with OSA.

研究分野：薬理学

キーワード：間歇的低酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

閉塞性睡眠時無呼吸症 (obstructive sleep apnea; OSA)は、高血圧、糖尿病並びに冠動脈疾患等の危険因子であることに加え、心血管病等による死亡率を上昇させる (Cardiology. 1999;92:79-84, Am J Respir Crit Care Med. 2010;182:269-77)。また、OSA は間歇的低酸素血症 (intermittent hypoxia; IH) を特徴とすることから、IH による刺激が各種疾患の発症と心血管病関連死を誘発すると考えられている。OSA の治療には持続陽圧呼吸療法 (continuous positive airway pressure; CPAP) が用いられており、OSA 患者における心血管病の発症とその関連死を改善することも報告されている (Lancet. 2005;365:1046-53)。しかし、CPAP の使用においては使用時の不快感、上気道の乾燥および圧迫感等から決してコンプライアンスが良好とはいえない (Thorax. 1994;49:263-6)。そこで OSA による心血管病やその関連死のリスクを低減させるために、CPAP に代わる新たな予防法・治療法が望まれる。一方で、心血管病の主要な病態にアテローム性動脈硬化があるが、アテローム性動脈硬化ではその特徴の1つとして血管平滑筋細胞の増殖が認められる。我々は、IH が血管平滑筋細胞へ及ぼす影響を検討することで、OSA による心血管病の発症・進展に繋がるメカニズムを解明し、OSA 患者における心血管病発症の予防法並びにその進展を遅延させる方法が確立できるのではないかとという着想に至った (図 1)。

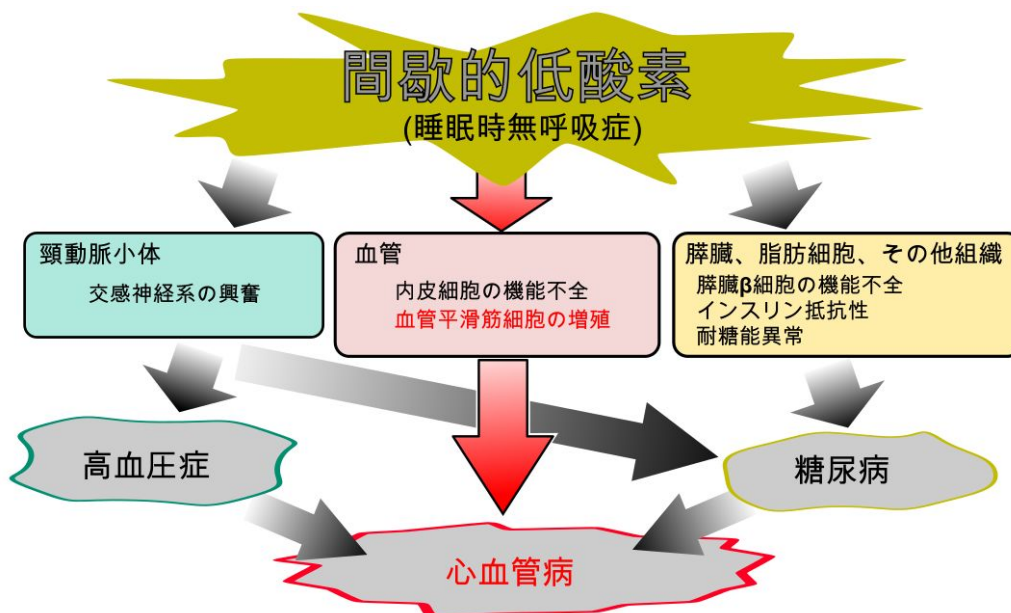


図 1 間歇的低酸素 (IH) から各種病態への流れ.

### 2. 研究の目的

我々は、in vitro における酸素暴露条件を「Normoxia (N) および Sustained Hypoxia (SH) の酸素濃度はそれぞれ 21%と 1%、IH は 1% (5 分間) と 21% (10 分間) を繰り返す。また、暴露時間は 24 時間とする。」と定めて既に検討を行っている。培養ラット大動脈平滑筋細胞 (rat aortic smooth muscle cell; RASMC) を用いて IH による影響を検討した結果、我々は IH が直接的に血管平滑筋細胞の増殖を促進することを明らかにした。また、エピレグリン (epiregulin; EREG) をはじめとする一部の上皮成長因子 (epidermal growth family; EGF) やその受容体である erbB2 受容体の増加を認め、erbB2 受容体の阻害剤を使用することで IH による細胞増殖が抑制されたことから、これら EGF ファミリー並びに erbB2 受容体が IH による血管平滑筋細胞の増殖に一部関与することを発見した (Exp Cell Res. 2013;319(19): 3042-50.)。しかし、その細胞内応答メカニズムやその他細胞内分子に関しては不明な点が多い。そこで、本研究ではこれまでの RASMC に加えて不死化ヒト冠動脈平滑筋細胞 (human coronary artery smooth muscle cell; hCASMC) を用いて、IH に対する血管平滑筋細胞内応答メカニズムの解明と OSA における心血管病発症の鍵となる分子の同定を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

細胞は、適正数まで培養した後、血清を含まない細胞培養液にて 24 時間飢餓状態に置いてから以下に示す条件にて暴露した。各暴露条件は、normoxia (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)、sustained hypoxia (SH; 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) 又は IH (10 min normoxia と 5 min SH を繰り返す) とした (図 2)。

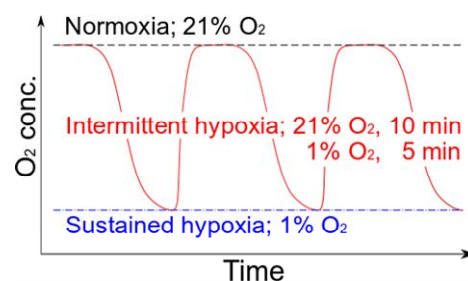


図 2 In vitro における normoxia, IH, SH の暴露条件.

## (2) Real-time RT-PCR

messenger RNA (mRNA) の発現量を real-time RT-PCR にて定量した。Normoxia、IH および SH 暴露後の細胞からキットを用いて全ての mRNA を回収・定量した後、逆転写を行って complementary DNA (cDNA) を得た。cDNA、目的とする mRNA に特異的なプライマーおよび real-time PCR キットを用い、目的とする mRNA をサーマルサイクラーにより増幅・定量した。また、各 mRNA の発現レベルは  $\beta$ -アクトリン mRNA の発現量にて補正した。

## (3) プロモーターアッセイ

mRNA の生成を制御する DNA 上のプロモーター領域の活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。ルシフェラーゼはホタルに由来する発光蛋白質であるため、ルシフェラーゼを目的遺伝子のプロモーター領域に組み合わせ、発現した蛋白質による発光を検出することでプロモーターの活性を評価することができる。分子生物学的手法により EREG のプロモーター (-1345/+118) をクローニングし、それをルシフェラーゼ遺伝子の組み込まれたベクターに挿入した。この EREG の組み込まれたベクターをリポフェクチン法にて導入後 18~24 時間経過した細胞を、normoxia、IH または SH に 24 時間暴露した。暴露後、細胞を溶解させてルシフェラーゼアッセイシステムによりルシフェラーゼの活性を測定した。遺伝子導入効率の標準化は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの組み込まれたベクターを同時に導入し、暴露後にガラクトシダーゼ活性を測定することで行った。

## (4) RNA 干渉

Small interfering RNA (siRNA) は、標的とする mRNA に結合することでその分解を誘導し、タンパク質の発現を抑制することができる。特定の mRNA に特異的にデザインされた siRNA をリポフェクチン法にて細胞内に導入した。

## (5) Enzyme linked immunosolvent assay (ELISA)

特定のタンパク質の発現量を、ELISA キットを用いて定量した。抗原抗体反応は特異的でかつ感度が非常に高く、ELISA はこの抗原と抗体の反応を利用して特定のタンパク質の発現量を高感度に検出できる。

## 4. 研究成果

### (1) IH は hCASM C における EREG の発現を増加させる。

これまでの IH の研究は RASMC を用いて行ってきたが、プロモーターアッセイにおける遺伝子導入効率が高く、試薬の変更や遺伝子導入方法の変更等を行っても改善が見られなかった。そこで、遺伝子導入効率の改善、IH に対する普遍的な細胞応答の解明並びに本研究が最終的に OSA 患者を対象とした研究であることを踏まえ、本研究は主としてヒト由来の hCASM C を使用することとした。CASM C の IH に対する反応性およびその RASMC との相同性を確認するために、IH 24 時間暴露における EREG mRNA 発現の変動を確認した。その結果、CASM C における EREG mRNA の発現は、RASMC の場合と同様、IH により増加し、SH では変化しなかった (図 3A)。また、細胞内で合成された EREG は、細胞膜上に移行し (pro-EREG)、一部が切り離されて細胞外へ放出される (EREG)。Pro-EREG および EREG のいずれも、mRNA と同様に、IH にてその発現量が増加した (図 3B および C)。

一方で、IH による EREG の発現増加がラットだけでなくヒトでも確認されたことにより、この反応は IH に対する種を越えた普遍的な細胞応答であることが示唆される。

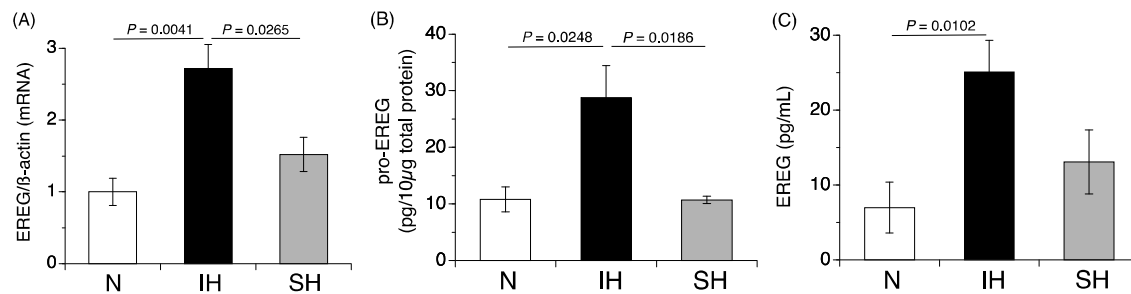


図 3 IH による EREG の発現. A: EREG mRNA, B: pro-EREG, C: EREG.

### (2) IH による EREG 遺伝子の発現は、転写による直接的な制御ではない。

IH による EREG mRNA の増加が転写活性によるものか確認するために、EREG のプロモーターを発現ベクター pGL4.17 のルシフェラーゼ遺伝子に融合させて hCASM C に導入した。次いで IH 暴露を行ったが、IH による EREG プロモーターの有意な活性化は認められなかった (図 4)。このことは、IH による EREG の発現増加が転写によるものではないことを示唆している。

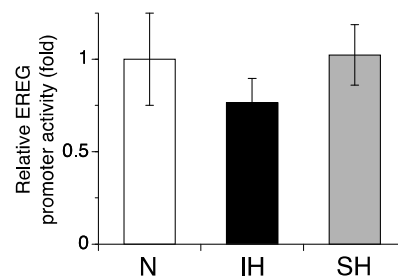
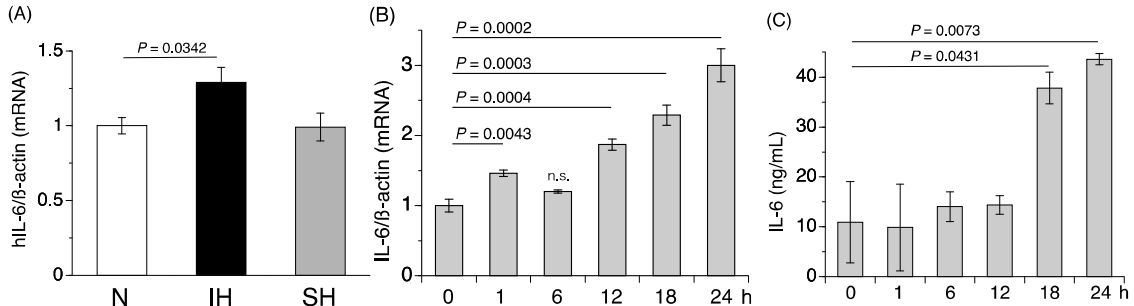


図 4 EREG プロモーター (-1345/+118) に対する IH の影響。

**(3) IH は時間依存的にインターロイキン (Interleukin; IL)-6 の発現を増加させる。**

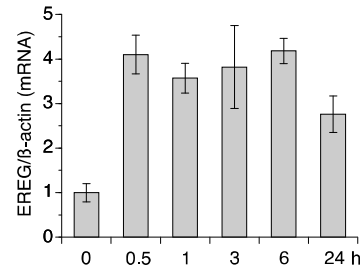
臨床において OSA 患者では炎症マーカーの IL-6 が増加していると報告されていることから、real-time RT-PCR を用いて IL-6 mRNA の発現を確認した。図 4A に示すように、IL-6 mRNA の発現は IH において有意に増加したが、SH では増加を認めなかった。また、IH は IL-6 mRNA の発現を時間依存的に増加させた (図 4B)。さらに、細胞培養液中における成熟 IL-6 も mRNA と同様に時間依存的な増加を示した (図 4C)。これらの結果は、中程度または高度な OSA 患者における血中 IL-6 の増加と矛盾しない。



**図 4 IH による時間依存的な IL-6 の発現。A: IH による IL-6 mRNA の発現増加, B: IH による IL-6 mRNA の時間依存的な発現の増加, C: IH による IL-6 の時間依存的な発現の増加。**

**(4) IL-6 による刺激は EREG mRNA の発現を増加させる。**

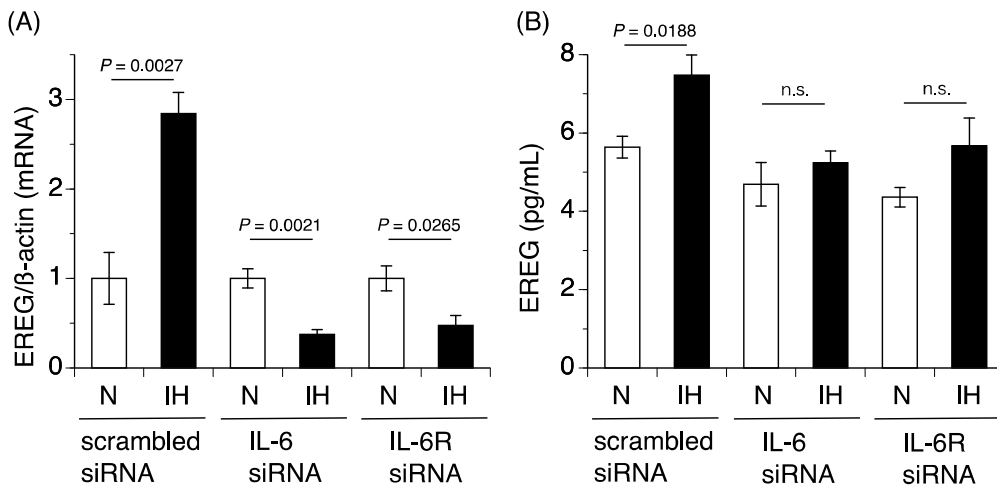
マウス内皮細胞を用いた研究で IL-6 が EREG mRNA の発現を増加させると報告されているので、hCASC でも IL-6 が EREG mRNA の発現を増加させるのか確認した。図 5 に示したように IL-6 (100 ng/mL) にて hCASC を刺激すると、刺激後 0.5 から 24 時間にかけて EREG mRNA の増加を認めた。この結果は、IH による EREG mRNA の増加は IL-6 の増加に起因することを示唆している。



**図 5 IL-6 による EREG mRNA の発現**

**(5) IL-6 および IL-6 受容体に対する siRNA は、IH による EREG の増加を抑制する。**

IH による IL-6 の増加 (図 4B および C) と IL-6 による EREG mRNA の増加 (図 5) から、IH による IL-6 の増加が IH による EREG の増加を引き起こしているのではないかと考えた。このことを確認するために、IL-6 および IL-6 受容体に対する siRNA を用いた RNA 干渉を行った。図 6A に示すように、対照の scrambled siRNA では IH により EREG mRNA が有意に増加したのに対して、IL-6 および IL-6 受容体に対する siRNA の処理をしたサンプルでは IH による EREG mRNA の増加が抑制された。さらに ELISA を用いた検討においても、scrambled siRNA では IH による培養液中の EREG の有意な増加を認めたが、IL-6 および IL-6 受容体 siRNA を処理したサンプルではその増加が抑制された (図 6B)。この結果は、IL-6/IL-6 受容体システムが血管平滑筋における EREG 増加に対して重要な役割を担っていることを示している。



**図 6 IH による EREG 発現の増加に対する IL-6 および IL-6 受容体の siRNA の影響。A: EREG mRNA, B: EREG**

本研究は、当初予定していた研究計画に基づいて研究を進めていたが想定していたものと異なる結果となったことで他のメカニズムの関与を模索しながら遂行することとなった。そのような中で、IHによる EREG 発現増加には少なくとも炎症性サイトカインである IL-6 が関与することが明らかとなった。近年、慢性炎症性疾患に関わる IL-6 の発現増幅回路が報告されており、EREG もその因子の 1 つである。これらのことから、OSA が癌を含む様々な慢性炎症性疾患の発症・進展に関わる可能性がある。また、EREG を含む上皮成長因子は各種病態、細胞の増殖や分化などに関わるため、そのメカニズムの解明は OSA による心血管病だけでなく、様々な疾病の治療や予防戦略の確立に繋がると期待される。我々の一連の研究では IH による EREG 増加における転写因子やマイクロ RNA の関与に否定的なデータを得たことから、EREG の発現を制御すると考えられるメカニズムはより限られてきた。以上のことから、本研究により IH による EREG 発現増加メカニズムの解明に近づくと共に、その解明が慢性炎症性疾患や他の疾患に対する治療および戦略と繋がる可能性がより高まった。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoji Kyotani, Jing Zhao, Asako Itaya Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto Tsuchida, Mai Makino, Shin Takasawa, Masanori Yoshizumi. Intermittent Hypoxia Induces Expression of Epiregulin mRNA via Upregulation of Interleukin-6 in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Diabetes*, 査読有, 67(Supplement 1), 2018, -. <https://doi.org/10.2337/db18-472-P>.

Yoji Kyotani, Asako Itaya Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto Tsuchida, Mai Makino, Shin Takasawa, Masanori Yoshizumi. *FEBS Open Bio*, 査読有, 8, 2018, 868-876. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12430>.

### 〔学会発表〕(計 4 件)

Yoji Kyotani, Jing Zhao, Asako Itaya Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto Tsuchida, Mai Makino, Shin Takasawa, Masanori Yoshizumi. Intermittent hypoxia-induced cell proliferation via upregulations of interleukin-6 and epiregulin. 18<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018.

Yoji Kyotani, Jing Zhao, Asako Itaya Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto Tsuchida, Mai Makino, Shin Takasawa, Masanori Yoshizumi. Intermittent Hypoxia Induces Expression of Epiregulin mRNA via Upregulation of Interleukin-6 in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. 78<sup>th</sup> American Diabetes Association Scientific Sessions, 2018.

Yoji Kyotani, Asako Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Tsuchida, Mai Makino, Shin Takasawa, Masanori Yoshizumi. Intermittent hypoxia induces epiregulin mRNA expression through the increase of interleukin-6 in human coronary artery smooth muscle cells. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会, 2017.

京谷陽司, 趙晶, 高沢伸, 吉栖正典. 間歇的低酸素暴露によるインターロイキン-6 の発現増加を介した上皮成長因子の遺伝子発現. 第 131 回日本薬理学会近畿部会. 2017.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。