

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18751

研究課題名（和文）HIF1 阻害剤を用いた睡眠時無呼吸症候群治療の検討

研究課題名（英文）Investigation of Sleep Apnea Syndrome Treatment with HIF1a Inhibitor

研究代表者

雑賀 太郎 (Saika, Taro)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70509299

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）：睡眠時無呼吸症候群はこれまでも報告されているように睡眠中に生じる低酸素血症によって心筋梗塞リスクの増加や糖尿病の悪化に關する重大な疾患のうちの1つである。様々な治療は行われているものの病態を改善するには至らない状況となることもあり、睡眠時の間欠的低酸素によって生じる身体的ダメージを根本的に軽減する治療が必要であると考え。そこで、これまでは本疾患の治療として考えられたことのない薬剤を用い、その有効性の検証と副作用が生じることなく使用出来るかについて検討したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠時無呼吸は気道閉塞を解除することでその病態を改善することを治療としてきた。しかし、解剖学的に改善困難な場合は睡眠時の低酸素が残存してしまい、炎症性サイトカイン産生などによる身体的負荷を回避しきれない。そのため、低酸素自体で生じる病態に対する治療を考える必要がある。

研究成果の概要（英文）：Sleep apnea is one of the most serious diseases that have been reported to be associated with increased risk of myocardial infarction and worsening of diabetes mellitus due to hypoxia that occurs during sleep. Although various therapies have been provided, they sometimes fail to improve the condition, and we believe that a treatment that fundamentally reduces the physical damage caused by intermittent hypoxia during sleep is needed. Therefore, we investigated the possibility of using a molecule that has never been considered as a treatment for this disease as a therapy.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：睡眠時無呼吸 間欠的低酸素 サイトカイン 炎症 マウスモデル

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群は上気道狭窄による低酸素血症を病態とし、二次的に心血管疾患、高血圧や糖尿病を悪化させる。その病態において誘導される低酸素誘導因子(Hypoxia inducible factor-1、HIF1)を直接的に治療標的として発表した報告はない。HIF1とは、低酸素環境で誘導される中間産物であり、カスケードの下流には炎症反応の中心である転写因子NF- $\kappa$ Bや血管新生に關与するVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)、活性酸素の産生などが誘導される。

Nanduriらによる2020年のThe Journal of Clinical Investigationのレビューにも記載があるように、睡眠時無呼吸は、睡眠時の間欠的低酸素によって高血圧や2型糖尿病、認知機能低下を併存する疾患でHIFファミリーであるHIF1が關与する。マウスやイヌの動物実験において、睡眠中に生じている間欠的な低酸素によって交感神経活動性が増し、覚醒中でもその影響が残存している。また、2022年においてGbrzyskaらはInternational Journal of Molecular Sciencesのなかで、睡眠時無呼吸はサーカディアンリズムの破綻によってHIF経路を通じて様々な代謝性疾患や心血管疾患のリスク悪化が生じると報告している。サーカディアンリズムを整えるのに必要な蛋白であるCry1はDNA修復に重要で、HIF1蛋白の発現と相関して変化すると言われており、サーカディアンリズムに關与する*Bmal1*、*Cry1*、*CK1 $\delta$* の遺伝子発現は*HIF1 $\alpha$* と正の相関があり、睡眠の質が低下する。また、げっ歯類では間欠的低酸素によってHIF1 $\alpha$ が増加することが報告されている。

これらのことから、睡眠時無呼吸の病態を改善させるうえで、中間産物にあたるHIF1を阻害することは一連の病態を改善させる可能性がある。そのため、HIF1を阻害する物質を用いて二次的に発症する疾患を抑制するかを検証していく必要がある。

## 2. 研究の目的

睡眠時無呼吸症候群の病態である低酸素状態をマウス実験で再現することで、治療を考えるための基盤とするモデルを作製する。ヒトでは試験的に未承認薬剤を使用する事は出来ないため、動物実験で検証する必要がある。その後、実験的低酸素で誘導されるHIF1を阻害するいくつかの薬剤を使用することで二次的に生じる疾患が軽減するのかについて検討する。既報にある抗HIF1として、天然フラボノイドであり、蛋白合成と安定性を抑制することでHIF1発現を特異的に抑制することが出来るChrysinを用いる。これは、チオレドキシンの負の調節因子であるチオレドキシソ相互作用タンパク質を減少し、強力な抗酸化力を示す。その他にも、抗HIF1 $\alpha$ 阻害剤として知られるYC-1や、毒性の検証も必要となるがL-mimosineなども候補として検討する。

## 3. 研究の方法

遺伝子変異動物による研究が可能であるマウスを用いた動物実験で、低酸素環境を再現する装置を作製して大気で飼育するマウスと比較する。「睡眠時」を想定するため、行動量をカウントするシステムであるACTIMO-100Nを用いて予備実験を行って解析した。その結果、およそ8時から20時が睡眠時に該当すると考えられ、日照時間もこれに合わせた。限定して低酸素環境となる装置のなかで飼育したマウス群を低酸素群とした。大気で飼育したマウスの群をコントロール群として、連日2週間同様に飼育した。間欠的低酸素を誘導するには一定周期で低酸素と大気を交互に切り替える必要はあるが、今回の実験では重症の睡眠時無呼吸において血中酸素飽和度が低いまま推移することを想定したモデルとした。低酸素群は、O<sub>2</sub>モニターとしてBiospherix社の酸素コントローラProOx110を用いてアニマルチャンバー内のO<sub>2</sub>濃度が15%となるように設定した。最終日は起床を想定して20時付近で血清を回収し、Luminex 200を用いてサイトカイン・ケモカイン値を測定した。また、一部の群では同日の血清を用いて酸化ストレスdROMs(Reactive Oxygen Metabolites-derived compounds)と抗酸化力BAP(Biological Antioxidant Potential)について酸化還元分析装置REDOXRIBRAを用いて測定

した。

#### 4. 研究成果

低酸素環境の再現性について確認したところ、安定してチャンバー内 O<sub>2</sub> 濃度は 15%を維持した。この装置を用いた低酸素群と大気で飼育するコントロール群で、総行動量を ACTIMO-100N にて比較したところ、低酸素群で明らかに睡眠時の行動量が低下した。日中の行動量では差が認められなかった。低酸素環境でのマウスの SpO<sub>2</sub> を測定するために、チャンバー内で実験小動物用パルスオキシメータ MouseOxPLUS を用いたところ、チャンバー内 O<sub>2</sub> 濃度 15%で経過観察した結果、睡眠時 SpO<sub>2</sub> 値は 70-90%付近で推移した。

血清サイトカインについては、炎症性サイトカインは IL-1 $\beta$ 、IL-6 では差が認められなかったが、TNF $\alpha$  については高い傾向が認められた。これは、本実験系が間欠的低酸素ではなく、持続的低酸素であり、炎症性サイトカイン産生においては非典型的な結果となったものと考えられる。Th1 型サイトカイン、Th2 型サイトカイン、Th17 サイトカインである IL-17 や抑制性サイトカインである IL-10、VEGF はいずれも低酸素群で高い傾向が認められた。VEGF の産生については病態を反映していると考えられる。IL-3 は両群間で差がなく、IL-5、GM-CSF は低酸素群で高かった。その他、マイオカインである IL-15 は低酸素群で明らかに高かった。IL-15 は粘膜免疫に関与するが睡眠時無呼吸との関与についての報告はほとんどなく、その関与については検討を進めたい。ケモカインについては、CCL2 である MCP-1、CCL3 である MIP-1 $\alpha$ 、CCL4 である MIP-1 $\beta$ 、CXCL1 である KC、CXCL2 である MIP-2、CXCL6 である LIX は低酸素群で高い傾向が認められた。MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$  は単球走化性促進因子であり、KC、MIP-2 は好中球ケモカインであり、炎症細胞活性化が生じていることが考えられる。LIX は単球、血小板、内皮細胞および肥満細胞に発現するもので、それらの関与を考える。好酸球走化性因子である Eotaxin については差がなく、本病態との関与が少ないと考えられた。ただし、母数が限定されるため、再現性の検証は途上である。本実験系で抗 HIF1 $\alpha$  薬を投与することでこれらサイトカインがどのように変化するか検討していく必要がある。

酸化ストレス、抗酸化ストレスについては低酸素群で酸化ストレスがやや強い傾向は認められたが明らかな差は認められなかった。今回の研究では睡眠時低酸素となる期間が 2 週間であり、比較的短期間であったことや間欠的低酸素ではなかったため、酸化ストレスがそれほど強くなかった可能性があると考えられた。

今回の検討ではヒトでの実験は十分に検討できなかったが、ヒトでもマウス同様にマルチプレックスアッセイキットを用いてのサイトカイン測定を用いて検討したい。ヒトでの研究ではデータを均一に睡眠時無呼吸患者の早朝採血で検討していきたい。また、2 週間以上の長期的な睡眠時低酸素ではさらに明瞭な表現系を示すと考えられる。今後はまずマウスでの実験結果や、既報を参照して病態の把握と追加実験を進めたいと考える。また、抗 HIF1 $\alpha$  を投与する経路についても経口、頸静脈的に投与して比較検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 雑賀太郎
2. 発表標題 片鼻腔閉鎖マウスを用いた活動性評価の検討
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020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
---------	---------