

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：32620
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590743
 研究課題名（和文）睡眠時無呼吸症候群の病態における酸化ストレスの関与に関する研究
 研究課題名（英文）Studies on involvement of oxidative stresses in pathophysiological investigation of sleep apnea syndrome
 研究代表者
 木村 博子（KIMURA HIROKO）
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号：00053299

研究成果の概要（和文）：4-Hydroxynonenal（HNE）の時間分解蛍光測定法を用いて、若年・中年・高齢者の睡眠時無呼吸症候群（Sleep Apnea Syndrome, SAS）患者群と対照群の血中 HNE 濃度を測定した。SAS 患者はどの年代においても血中 HNE 値が健常者より高かった。SAS のラットのモデルを確立した。ラットの飼育箱の中に窒素ガス発生装置から発生した窒素と空気をブレンドしながら間歇的に低酸素暴露できる（Intermittent Hypoxia, IH）装置を開発した。この装置で IH 暴露したラットは右心肥大、肺高血圧等、SAS の病態を再現していた。IH ラットの血中 HNE 濃度は上昇していた。以上より SAS の病態に HNE や酸化ストレスが関与していると推定される。

研究成果の概要（英文）：4-Hydroxynonenal（HNE）is an useful marker for oxidative stress. We have developed a highly sensitive method to quantify HNE using time-resolved fluoroimmunoassay. By the method, we found higher serum HNE levels in the patients of sleep apnea syndrome（SAS）compared to the healthy control, in young, middle-aged and elderly groups. We also developed an apparatus in which rats are exposed to intermittent hypoxia by use of nitrogen gas generator. The rats underwent IH showed right ventricular hypertrophy and pulmonary hypertension which are pathognomonic for SAS. Serum HNE was increased in the “IH” rats. These observations suggest that HNE and oxidative stress contribute to the pathogenesis of SAS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：睡眠時無呼吸症候群，酸化ストレス，4-ヒドロキシ 2-ノネーナル，ニトロチロシン，時間分解蛍光測定法

1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群（Sleep Apnea

Syndrome: SAS）には中枢性と末梢性があり、後者は肥満による上咽頭筋の緊張低下によ

る上気道閉塞を伴うことが多い。SAS は間歇的低酸素・高炭酸血症，血小板凝集能・血液凝固能上昇，交感神経系過緊張，Renin-Angiotensin System (RAS) の活性化による高血圧，急性冠症候群，不整脈等との関連性が注目されている。

一方，高血圧，耐糖能異常，脂質代謝異常，肥満等が共存するメタボリック症候群による心血管系疾患，特に急性冠症候群のリスク増加が注目されている。そしてこれらの急性冠症候群，メタボリック症候群，SAS の病態には活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) が寄与していることが注目されているがエビデンスは乏しい。

ROS は，心血管系，単球，白血球等の NADPH oxidase，脱共役状態の内皮型一酸化窒素 (NO) 産生酵素 (eNOS)，ミトコンドリア等より生成され，細胞膜の脂質を過酸化して 4-hydroxynonenal (HNE)，malonylaldehyde 等の過酸化脂質を生成し，これが蛋白質の Cys，His 残基と結合し，その機能を傷害する。HNE は signal transduction の key molecule として抗酸化酵素である Heme-Oxygenase (HO)-1 の転写活性化，酸化ストレス関連転写因子 Nrf2 の核への移行を促進し酸化ストレス関連遺伝子群を誘導する (*Prog Lipid Res* 2003)。動脈硬化巣，特に泡沫化細胞に豊富に存在する炎症関連酵素 Cyclooxygenase (COX)-2 の転写活性化に寄与するとされている。私は HNE の時間分解蛍光イムノアッセイを開発し，従来の ELISA の約 100 倍の感度で血液中の HNE を測定可能にした (Kimura H, et al. *Free Radic Res*, 39, 845-851. 2005.)。その結果，LPS 投与軽度炎症モデルラットでの血中単球 NADPH oxidase から一過性の ROS 生成を見出し，また同じ炎症モデルで，腸管粘膜形質細胞の ROS 生成に伴い IgA が HNE 化により多量体化

してその抗体活性を失うことを見出した。これまでの数報の論文では，SAS 患者の血中 ROS や酸化ストレスのマーカーの上昇が報告されているが，酸化ストレスマーカーの日内変動，酸化ストレスの SAS 病態，交感神経活動，炎症・冠動脈症候群の指標との関連性を体系的に調べた研究はなかった。SAS の病態はラット・マウスを使って間歇的低酸素暴露の持続により再現できると考えられる。このモデルを利用して，最近，SAS が心筋収縮能，心筋・神経障害 (細胞死，病変)，高血圧，呼吸不全 (筋緊張，反射) の病態に及ぼす影響に関する研究が散見される。抗酸化剤の効果を検証した論文も 2, 3 あるが，酸化ストレスと SAS の病態の関連性に関する体系的な研究はない。

HNE と同様に酸化ストレスマーカーの一つである Nitrotyrosine (NT) は，ROS と NO が反応して生成する。木村は NT の高感度測定法も開発し，自然発症高血圧ラットに運動を負荷した後，大動脈の抗酸化酵素の Mn SOD が誘導されて NT 上昇が抑制されることを見いだした。SAS 患者血清の NT 測定データは，NO が血圧低下に，ROS が上昇に寄与することを考えると，本研究の SAS の高血圧の病態を理解する上で極めて重要であり，有用である。共同研究者である吉田は，虚血・再灌流による心筋障害・心筋細胞死を長年研究してきた。大野は臨床医師として虎の門病院循環器センター内科の症例を用いて，SAS の無呼吸指数，血中酸素飽和度，炎症指数，急性冠症候群指標などと，酸化ストレスマーカーレベルとの関連性を検討し，治療効果の指標となる知見を得ることを目的とした。そして，法医学のみならず臨床応用にも役立つと考えてこの研究に着手した。

2. 研究の目的

警察官や精神病院の看護師が，興奮している

人の身体を拘束しているときに突然死することがある。これには心肥大、冠動脈硬化症、高血圧等に加えてSASの関与が疑われる人がいる。法医学実務上、死因が不整脈や心臓性突然死であることの証明は難しく、法的には身体拘束をした人の過失責任が問われることがある。SASの関与する突然死の原因を正しく究明するため、SASモデルのラットやSAS患者血清を用いて、身体拘束のような心理ストレスを誘因とする不整脈や心臓性突然死が惹起されるか否か、またそのような突然死の発生やSASの病態に”酸化ストレス”がどのような機序で関与しているかについて検討し、明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

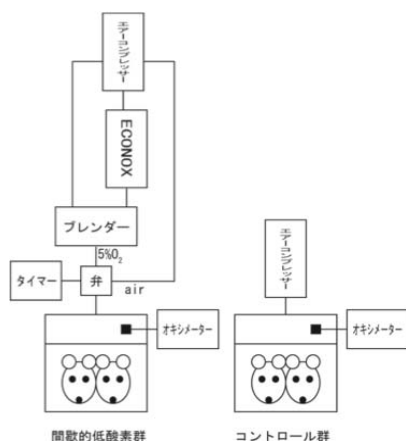


図1. 窒素ガス発生装置を使用した間歇的低酸素暴露装置

睡眠時無呼吸症候群(SAS)のモデルとして、SD雄ラット(7週齢)を1・4・6週、1日8時間間歇的低酸素(4%O₂)に90秒、常酸素(21%O₂)に90秒曝露(Intermittent Hypoxia, IH)した(図1)。血液ガス、心拍数、血圧、心機能、心肥大について評価した。心臓は、右室(R)、左室+心室中隔(L+S)に分離した。さらにP1e(1000 rpm, ppt:核)、P2e(100000 rpm, ppt:ミトコンドリア、小胞体、細胞膜)、S(100000 rpm, sup:細胞質)に分画して酸化ストレスマーカー(HNE, NT)を測定した。

[臨床研究]

虎ノ門病院の睡眠センターでSAS患者と診断された30歳代から70歳代のヒトの血清約50検体、対照として、年齢・性別等を合わせた健康診断の被験者血清を用い(研究は生命倫理委員会で承認され、検体はインフォームドコンセントを得て採取された。)酸化ストレスマーカーである4-hydroxynonenal(HNE)とニトロチロシン(NT)を、私達の開発した時間分解蛍光イムノアッセイで測定した。SAS患者と対照者の就寝前、就寝中、起床直後、日中に血液を採取して、時間分解蛍光測定法によってHNE・NTを測定し、日内変動パターンを調べた。

4. 研究成果

血中のHNE値は、SAS患者は、どの年代においても健常者より高かった(図2)。NT値は30歳代では、SAS患者が健常者より低い傾向を示したが、有意ではなかった。他の年代では、SASと健常者に差を認めなかったが、個体差が大きかった(図3)。また、SAS患者は就寝前と比べて、起床時の酸化ストレスマーカー値が高値を示すことがわかった(図4a)。予想に反して、持続気道陽圧療法(CPAP)1週間後、酸化ストレスマーカーが高値を示した。これは、負担の大きいCPAPによる精神的ストレスの影響と考えられた。

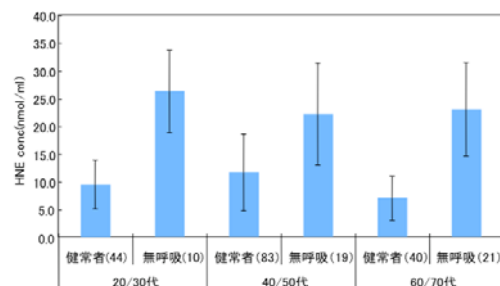


図2. 年代別に比較したSAS患者血清のHNE

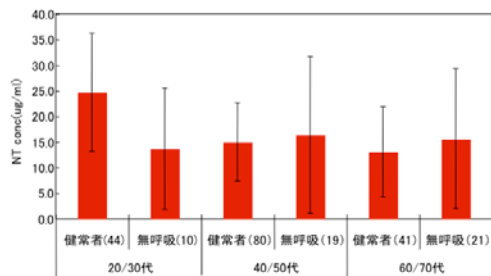


図 3. 年代別に比較した SAS 患者血清の NT

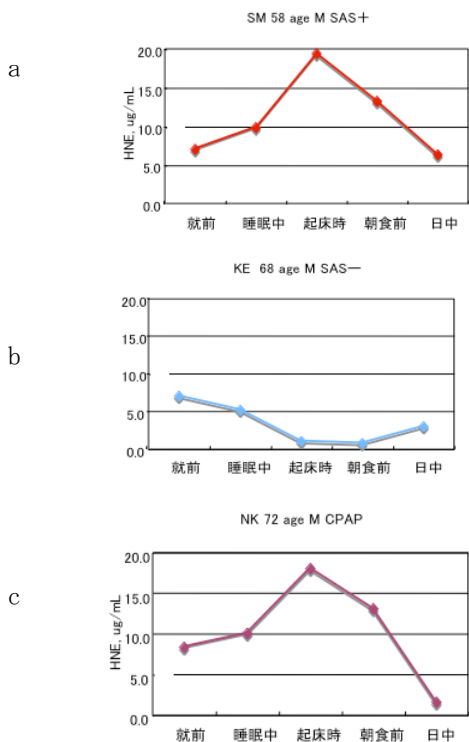


図 4. SAS 患者血清の HNE の日内変動。
a: SAS, b: normal, c: CPAP 装着時を示す。

次に SAS のメカニズム研究のため、ラットを用いた間歇的低酸素曝露 (Intermittent Hypoxia, IH) 装置を開発した。今までのモデルは、小容器に 1 匹ずつ動物を閉じ込めるストレスと、窒素ガスボンベの頻回の交換を要することから、経費・手間がかかり実験効率が悪かった。私達は飼育箱に工夫を凝らし、窒素ガス発生装置を用いた“IH 動物作製装置”を開発した。こうして低酸素ガスを作ることによってチャンバー内ガス濃度を均一化、ソリッドステートタイマーにより確実、正確な時間管理をおこない、電磁弁により低酸素ガス

と air を時間毎に切り替えて永続的にガス供給が可能になった。また、スクロール型エアコンプレッサーで静音化し、プログラムタイマーでフルオート化が可能になった。

6週のIH群は低酸素暴露により

PaO₂25.43torr, PaCO₂17.80torrと有意に低下し、pH7.58と上昇した。収縮期血圧はIHの方が高くなっている (114.89±9.89 vs 126.67±7.76 p<0.05) が、拡張期血圧に对照群とIH群で変化は見られない (93.3±7.78 vs 97.44±2.40 p=0.23)。心拍数は对照群に対してIH群の方が高かった (367.74±41.2 vs 411.67±25.18 p<0.05)。間歇的かつ長期にわたる低酸素血症は、心拍数と収縮期血圧の持続高値を惹起することが分かった。

酸化ストレスマーカーであるHNEとNT値は4週以降増加する傾向が見られた。特に4週では、对照およびIHについて、L+Sについて有意差は見られないがRについてはIH群の値が大きくなっていることが分かった。このことから酸化ストレスは右室に大きく影響していると言える (図 5)。反復性の低酸素血症は心肥大を生じることが分かった (心臓/体重比 0.24±0.01 vs 0.28±0.01 p<0.01)。右室優位な両室肥大と考えられる (R/L+S 0.25±0.02 vs 0.31±0.00 p<0.01)。以上のことからSASは心拍数・収縮期血圧の高値を惹起すること、右室優位の両室肥大を生じること、心エコーにて心収縮能に変化がなかったこと (EF 89.96±3.74 vs 89.00±3.64 p=0.33) から代償性に心機能が維持されていると考えられる。6週ラットでの結果で収縮期血圧が上がっているのになぜ左心には影響が出なかったのか、その心機能の代償性について研究をする必要がある。その背景には右室と左室の組織の違いについても考慮する必要があると考えら

れる。また、外的変化は6週以降で出ると言われているが、酸化ストレスマーカーの値の変化は4週で見られたことからSASの早期発見に応用できるかもしれないと考えられる。

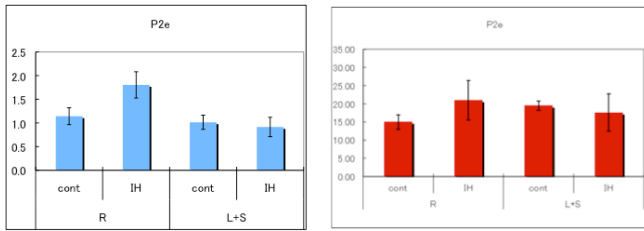


図 5. 間歇的低酸素曝露 4 週間のラット心筋の HNE と NT (右 : HNE, 左 : NT)

こうして“IH 動物作製装置”で、多数のラットを低経費・労力で再現性よく肺高血圧、右心肥大を再現できるようになった。また IH 暴露によって、心臓にオートファジー（二重膜により細胞質小領域・オルガネラを取込み、リソソームと癒合・分解する現象）が誘導されることを見出した。オートファジー阻害剤の存在下、3 週までに再現よく心不全が誘導された。この心臓を分析すると、IH 暴露により、より高分子の HNE 修飾蛋白が増加していることが分かった。また ubiquitin(Ub) 化蛋白が IH により右心室で左心室より強く発現しており、オートファジー阻害剤により、増加することを見出した。HNE, Ub により修飾された蛋白は凝集体をつくりやすく、オートファジーにより処理できない場合、細胞・臓器障害を惹起する。また、可溶性よりも凝集した HNE・Ub 修飾蛋白がより強く収縮不全や細胞死を惹起することから、IH による、HNE, Ub 生成と蛋白修飾が心不全の要因と考えられた。IH 暴露により、HNE・Ub 修飾が増強される細胞、オルガネラを免疫組織法で同定するとともに蛋白質を western blot 法、質量分析によって、HNE・Ub 修飾蛋白を同定しつつある。

5. 主な発表論文

(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 11 件)

- ① 木村博子, 今 信子, 岡村隆寛. 拘束などの心理ストレスによる酸化ストレス産生のメカニズムの解明. 順天堂医学. H20 年度学長特別共同プロジェクト研究報告. 56: 2010 ; 76.
- ② 木村博子, 山倉文幸. 睡眠時無呼吸症候群 (Sleep Apnea Syndrome:SAS) 患者における酸化ストレス反応の測定. H21 年度環境医学研究所プロジェクト研究成果報告書. 順天堂医学. 56: 2010 ; 491.
- ③ Kimura H, Kon N, Furukawa S, Mukaida M, Yamakura F, Matsumoto K, Sone H, Murakami-Murofushi K. Effect of endurance exercise training on oxidative stress in spontaneously hypertensive rats(SHR) after emergence of hypertension. Clinical and Experimental Hypertension. 査読有, 32:2010;407-415.
- ④ Takashi Ueyama, Tetsuya Kawabe, Takuzo Hano, Yoshihiro Tsuruo, Kazuki Ueda, Masao Ichinose, Hiroko Kimura, Ken-ichi Yoshida. Upregulation of Heme Oxygenase-1 in an Animal Model of Takotsubo Cardiomyopathy. Circulation Journal. 査読有, 73: 2009; 1141-1146.
- ⑤ Shintani-Ishida K, Yoshida K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- α , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in

- reperfusion. *Biochim Biophys Acta*. 査読有, 1812:2011: 743-51.
- ⑥ Ueyama T, Yamamoto Y, Ueda K, Kawabe T, Hano T, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M, Yoshida K. Cardiac and vascular gene profiles in an animal model of takotsubo cardiomyopathy. *Heart Vessels*. 査読有, 26(3): 2010;321-37.
- ⑦ Unuma K, Shintani-Ishida K, Yahagi N, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Yoshida K. Restraint stress induces connexin-43 translocation via α -adrenoceptors in rat heart. *Circ J*. 査読有, 74(12):2010; 2693-701.
- ⑧ Unuma K, Shintani-Ishida K, Yahagi N, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Yoshida K, Restraint Stress Induces Connexin-43 Translocation via α -Adrenoceptors in Rat Heart. *Circ J*, 査読有, 74(6): 2010;1087-95.
- ⑨ Unuma K, Harada K, Nakajima M, Ito T, Okutsu K, Yoshida K. Unexpected death of a patient with rheumatoid arthritis complicated by a cervical deformity. *Leg Med*. 査読有, 12(5): 2010;242-5.
- ⑩ Kondo-Nakamura M, hintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K. Brief exposure to carbon monoxide preconditions cardiomyogenic cells against apoptosis in ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 393(3): 2010;449-54.
- ⑪ Unuma K, Shintani-Ishida K, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Kuwahara M, Yoshida K. Connexin-43 redistribution and gap junction activation during forced restraint protects against sudden arrhythmic death in rats. *Circ J*. 査読有, 74(6): 2010;1087-95.
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Hybrid Materials:Second International conference on multifunctional, hybrid and nanomaterials. Matsumoto K, Kimura H, Mukaida M, Yoshida K, Kon N, Ito K. Luminescent europium complexes for time-resolved imaging of oxidative stress products. 6-10 March 2011, Strasbourg (France)
- ② 松本和子, 木村博子, 今信子. 第 71 回分析化学討論会. 希土類蛍光錯体の時間分解測定によるパーオキシダーゼ活性の測定. 2010 年 5 月 15 日~16 日, h島根大学松江キャンパス (島根)
- ③ 松本和子, 木村博子, 今信子. 第 27 回希土類討論会. ユウロピウムの酸化反応を用いるパーオキシダーゼ活性の時間分解蛍光測定. 2010 年 5 月 27 日, 北九州国際会議場 (小倉)
- ④ 木村博子, 今 信子, 吉田謙一. 第 94 次日本法医学会学術全国集会. 睡眠時無呼吸症候群患者における酸化ストレス反応の測定. 2010 年 6 月 23 日~25 日, 東京タワーホール船堀 (東京)
- ⑤ 今信子, 木村博子, 松本和子日本分析化学会第 59 年会. ユウロピウムの酸化反応を利用した時間分解蛍光法によるパーオキシダーゼ活性の測定とその応用. 2010 年 9 月 15 日~17 日, 東北大学川内北キャンパス (仙台)
- ⑥ 木村博子, 今 信子. 第 79 回日本法医学会学術関東地方集会. Eu (II) から Eu(III)への酸化反応を利用した時間分解蛍光法によるパーオキシダーゼ活性

測定とその酸化ストレス反応指標としての応用. 2010年10月30日, 笹川記念会館 (東京)

- ⑦ Matsumoto K, Kimura H, Mukaida M, Makiuchi M, Nishioka T, Hashino K, Yoshida K, Yamaguchi Y. 11th Conference on methods and application of fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes. Time-resolved lanthanide luminescence detection for bio-imaging, microarray, and capillary electrophoresis. 6-9, September, 2009. ELU Congress Center, Budapest (Hungary)
- ⑧ 木村博子, 今信子, 向田政博, 吉田謙一. 第93次日本法医学会総会. 寒冷拘束ラット臓器における酸化ストレス反応の測定. 2009年5月13日~15日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- ⑨ 松本和子, 牧内正男, 橋野仁一, 木村博子, 今信子. 第70回分析化学討論会. : 時間分解蛍光検出マイクロアレイシステムによる金薄膜表面での表面プラズモン共鳴現象の観察. 2009年5月16日~17日, 和歌山大学栄谷キャンパス (和歌山)
- ⑩ 松本和子, 伊藤雅浩, 橋野仁一, 西岡琢哉, 木村博子, 今信子. 第58年会日本分析化学会. 希土類蛍光錯体標識剤を用いる生体組織の時間分解イメージング. 2009年9月24日~26日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター (北海道)
- ⑪ 宇田宗弘, 安田従生, 古川 覚, 川崎広明, 木村博子, 山倉文幸. 第64回日本体力医学会大会. 高血圧モデルラット (SHR) の脳における酸化傷害への自発走運動の効果. 2009年9月18日~20日, 朱鷺メッセ (新潟)

- ⑫ 宇田宗弘, 安田従生, 古川 覚, 川崎広明, 馬場 猛, 木村博子, 山倉文幸. 第82回日本生化学会大会. 高血圧モデルラット (SHR) の高血圧発症に伴う脳の酸化傷害の変化とそれに対する運動の効果. 2009年10月21日~24日神戸国際会議場 (神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村博子 (HIROKO KIMURA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 00053299

(2) 研究分担者

吉田謙一 (YOSHIDA KEN-ICHI)
東京大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号: 40166947

大野 実 (OHNO MINORU)
沖中成人病研究所・研究員
研究者番号: 00185347

(3) 連携研究者

上山敬司 (UEYAMA TAKASHI)
和歌山大学・医学部・准教授
研究者番号: 50264875