

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249038

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸症候群モデル動物における心臓突然死に関する研究

研究課題名(英文) Study on sudden cardiovascular death in animal model of sleep apnea syndrome

研究代表者

吉田 謙一 (Yoshida, Ken-ichi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40166947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,300,000円、(間接経費) 11,490,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを多数、長時間間歇的低酸素(IH)暴露できる装置を開発し、ラットを3週暴露すると、心臓にautophagyが誘導され、傷害器官や変性蛋白の処理により、心不全の発症が防止された。成年相当ラットを3週IH暴露すると、arginaseの発現増加と活性化、一酸化窒素(NO)産生低下より肺高血圧を発症した。一方、若年ラットを6週IH暴露すると、肺に 3-Adrenalin受容体と誘導型NO産生酵素(iNOS)を高発現した単球が動員され、交感神経活性化によりNO産生が増し、肺高血圧が防止された。高脂肪食負荷後IH暴露すると、凝固亢進、endothelin系活性化より肺高血圧となった。

研究成果の概要(英文)：We have exploited apparatus that can expose many rats to intermittent hypoxia (IH) for a long period. IH for 3 weeks induces autophagy in the myocardium of the young rats, thereby preventing heart failure through degradation of injured organnels and degenerated proteins.

In adult (9 month) but not young (2 month) rats, IH for 3 weeks induces pulmonary artery (PA) hypertension (PAH) through activation of arginase and reciprocal inhibition of nitric oxide (NO) synthase (NOS). In young rats, IH for 6 weeks induces recruitment of macrophage with enhanced expression of beta3-adrenergic receptor-inducible NOS around PAs. With sympathetic overdrive, the macrophage-derived NO prevents PAH. In young rats fed high fat diet, IH for 4-5days induced PAH through activation of endothelin or coagulation systems. Collectively, IH induces adaptative mechanisms to prevent heart failure or PAH in young and healthy rats, but IH exerts deleterious effects in adult and hyperlipidemic rats.

研究分野：社会医学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：睡眠時無呼吸症候群 間歇低酸素暴露 心不全 肺高血圧 オートファジー 一酸化窒素 アルギナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群 (Sleep Apnea Syndrome, SAS) は有病率、労働中の事故発生率、心臓突然死の発生率が高いが、診断・治療が難しい。また、全身・肺高血圧、心不全、虚血性心疾患等が高頻度合併するが、原因・病態は未解明の部分が多い。そのため病態の解明が喫緊の課題であるが、1匹ずつ小容器に入れ、動物にストレスのかかる窒素ガスを注入する方式でしかモデルが作成できず、窒素ガスポンベの頻回の交換に伴う労力・費用もあり、研究の進展を妨げてきた。

## 2. 研究の目的

飼育箱の気密性を高め、工業用窒素ガス発生装置を利用して、多数のラットを間歇的低酸素 (Intermittent Hypoxia, IH) に長時間暴露できる装置の開発に成功した。そこで、健常・病態ラットを IH 暴露することにより、SAS における心血管疾患の病態を再現し、その病態の分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

動物実験は、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に従い、各大学の動物ケア・使用委員会の承認を経て行った。ラットを IH (4%-21%O<sub>2</sub>) のサイクルを3分毎に1日8時間繰り返した。対照ラットは、IH ラットの隣のケージで、IH 暴露なしに飼育した。

心機能は、パルスドップラー超音波診断装置を用いて評価した。肺高血圧は、isoflurane 麻酔下、the acceleration time (AcT) /the ejection time (ET) を用いて評価した。一部のラットでは、右心室内圧 (RVSP) を、pentobarbital 麻酔下、pressure-volume catheter を用いて測定

して、肺高血圧の有無を確認した。

## 4. 研究成果

### 4-1. IH 暴露ラット心臓の autophagy 誘導による心不全防止 (東大)

Autophagy は、細胞内に autophagosome (隔離膜) を生じ、傷害 organelles や変性蛋白を囲って、lysosome と癒合、分解し、再利用する“生存戦略”である。健常ラットを3週間 IH 暴露すると、活性化 LC3 から成る autophagosome を生じた。一方、autophagy 阻害剤を投与したラットを IH 暴露すると、心不全が惹起された。IH による autophagy 誘導により心不全の発症が防止されることが分かった。

### 4-2. 高脂血症ラット IH 暴露による肺高血圧誘導 (東大)

高脂血症負荷したラットを IH 暴露すると、4~5日後、Endothelin-1 (ET-1) 及び ET-1 受容体 type A (ET<sub>A</sub>) が誘導され肺高血圧を発症するが、3週までには、ET-1, ET<sub>A</sub> が減少し、ET<sub>B</sub> と内皮型一酸化窒素 (NO) 産生酵素 (eNOS) が増加していた。一方、血中 thrombin が肺高血圧出現と一致して活性化され抗凝固剤 heparin を前投与すると、IH による肺高血圧が抑制された。

高脂血症状態で IH 暴露されると、endothelin 系活性化による血管収縮、肺微小血栓形成により、肺高血圧が発症することが示唆された。

### 4-3. 高齢ラットの肺高血圧発症 (東大)

SAS 患者に肺高血圧が合併することが多い。動物の血管では加齢に伴い arginase が活性化される結果、収縮・硬度が増すことが知られている。NOS 由来の NO は血管拡張、動脈硬化抑制を

促進するが、多くの病態では、uncoupling より NO 産生低下、活性酸素 O<sub>2</sub> 増生より高血圧、動脈硬化等が促進される。Arginase は NOS と基質 L-arginine を共有するため、arginase 活性化は NOS 活性低下、uncoupling より血管収縮が促される。成年(9ヶ月)のラットを IH 曝露すると、3~4 週で肺高血圧を発症する。肺動脈内皮の arginase I, 外膜の arginase II が増加、arginase 活性上昇、NO 代謝物 (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>) が減少した。Arginase 阻害剤は、全てを解消したことから、成人 SAS 患者の肺高血圧の発症に arginase 発現上昇・活性化が寄与することが示された。

#### 4-4. 若年ラットにおける肺高血圧発症抑制(東大, 国立循環器病センター, 東海大)

SAS では睡眠中に繰り返す無呼吸による低酸素血症が低酸素性肺血管収縮 hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV) を生じ、肺高血圧の原因になるとされる。しかし SAS における肺高血圧の合併率は 20~43%程度である。齧歯類の IH 曝露による肺高血圧につき賛否両論がある。若年ラットを 6 週間 IH 曝露したが、肺高血圧は生じなかった。また、IH ラットでは、β<sub>3</sub>-Adrenergic Receptor(β<sub>3</sub>-AR)と誘導型 NO 産生酵素 (iNOS)を高発現した macrophage が肺動脈周囲に動員された。β<sub>3</sub>-AR 遮断剤投与、macrophage 消去処置、iNOS 阻害剤投与の後、IH 曝露すると、肺高血圧が出現した。これらの結果より、若年者では、SAS の初期に、β<sub>3</sub>-AR-iNOS を高発現した macrophage が肺に動員されて、NO 増生により、HPV と肺高血圧が抑制されていることが示唆される。

4-5. IH 曝露中、中枢 β<sub>1</sub>-AR・肺交感神経活性化による急性低酸素血管収縮抑制 (国立循環器病センター、東海大学)  
ラットを IH に 6 週曝露し、麻酔下で放射光肺微小血管造影記録 (Spring 8) を行った。低酸素負荷に対する肺小動脈収縮反応 (HPV) は、対照群に比べ、IH 群では減弱した。肺交感神経活動記録によると、交感神経活動レベルは、ベース、低酸素応答とも IH 群で高かった。一方、β<sub>1</sub>-AR 遮断剤を脳室内投与した後、IH 群では HPV 減弱が防止され、肺交感神経活動が抑制された。以上の結果より、IH 曝露により、中枢 β<sub>1</sub>-AR 活性化による肺交感神経活動亢進より、急性低酸素性曝露による微小血管収縮反応が減弱し、肺高血圧発症を抑制されている可能性が示唆された。

#### 4-6. 卵巣摘出ラットの IH による血圧上昇と Estrogen による抑制 (奈良女子大学)

SAS 患者に高血圧の合併が多く、女性の高血圧合併率は、閉経後、急増する。

ラットを卵巣摘出後、placebo pellet または 17β-estradiol を補充した。その 2 週間後に、血圧・心拍数をテレメトリシステムを用いて測定した。また、摘出した腸間膜動脈の血管機能を薬理的に評価した。

Estrogen は、IH による NO 由来血管拡張反応の減弱を防止することにより、IH 誘発性血圧上昇を抑制することが示唆された。

#### 4-7. 虚血再灌流障害に対する加齢の影響 (順天堂大, 和歌山県立医大)

2 か月齢と 8 か月齢のラットを IH 曝露し、摘出灌流心を用い虚血・再灌流実験を行った。2 か月齢 IH 群において、

虚血時の圧・心拍数積低下が抑制され、再灌流時の収縮力回復が促進されていた。一方、8か月齢 IH 群では、低酸素耐性は認められず、逆に不可逆的心筋傷害を認めた。心室筋の遺伝子発現をマイクロアレイ解析および qPCR 解析を行い、パスウェイ解析したところ、2か月齢 IH 群のみ、イオン輸送、脂質代謝、cGMP の合成に関する変化がみられた。8か月齢では、細胞周期、細胞死、心血管疾患。白血球動員に関係するネットワークに変化が見られた。

#### 4-8. 高脂肪食負荷ラットの IH 暴露による

Hemeoxygenase-1 (HO-1)誘導 (東大)  
Hemeoxygenase-1 (HO-1)は、hemoglobin (Hb)等の heme 蛋白を分解し、抗酸化作用のある一酸化炭素(CO)及び biliverdin を生じる。CO は、血管拡張を促進し、炎症を抑える作用もある。高脂肪食ラットを IH 暴露すると、4-5 日で肺高血圧を発症するが、3 週後には肺動脈圧が正常化する。しかし、HO 阻害剤を投与すると、肺高血圧が維持される。HO-1 欠損マウスに肺高血圧が発症すること、IH 暴露後、組織に HO-1 が誘導されることから、HO-1 誘導が肺高血圧の正常化に寄与していると考えられる。一方、IH 暴露により赤血球数、Hb が増加する。

肝臓においては、IH6 週曝露後、肝細胞が鉄陽性となり、heme 結合蛋白 ferritin-1 が増加し、Kupffer 細胞の HO-1、Hb が増える。一方、IH 暴露は、高脂肪食による脂肪肝及び高脂血症を防止する一方、肝細胞の脂質過酸化物質 4-hydroxynonenal (HNE)免疫染色が増強する。heme 蛋白代謝過程で生じる鉄は、Fenton 反応によって hydroxyl radical を生じ、これが多価不飽和脂肪酸と反応して HNE を生じ、蛋白、DNA と反

応して、細胞を障害すると考えられている。

これらの結果は、SAS に伴う多血症、Hb 増加に伴って heme 代謝を促進する HO-1 が誘導されるが、代謝過程で生じる鉄が触媒して HNE 等、酸化ストレスを生じる。しかし、HO-1 の代謝産物、CO, biliverdin の抗酸化作用、ferritin-1 の鉄処理作用により、酸化ストレスは軽減される。IH が高脂肪食による脂肪肝を軽減する現象は予期できなかったが、HO-1 の寄与を含めて、分子機構の解明が俟たれる。

#### 4-9. 糖尿病動物の IH 暴露による心冠微小循環不全(国立循環器病センター、東大)

糖尿病では、心臓等の微小血管の拡張障害が多く、SAS 患者に糖尿病の合併が多いことに注目して、treptozotocin 投与による 1 型糖尿病及び健常ラットを IH 暴露し、Spring 8 における心臓血管造影により評価した。IH3 週曝露後、内皮依存性血管拡張反応の鈍化を認めた。糖尿病 + IH ラットでは、内皮障害に加えて、平滑筋の NO 依存性拡張反応も鈍化していることが分かった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件、全て査読あり)

- 1) Ogura S, Shimosawa T, Mu S, Sonobe T, Kawakami-Mori F, Wang H, Uetake Y, Yoshida K, Yatomi Y, Shirai M, Fujita T. Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing the oxidized LDL receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(2):H155-62.
- 2) Sugihara M, Odagiri F, Suzuki T, Murayama T, Nakazato Y, Unuma K,

- Yoshida K, Daida H, Sakurai T, Morimoto S, Kurebayashi N. Usefulness of running wheel for detection of congestive heart failure in dilated cardiomyopathy mouse model. PLoS One. 2013;8(1):e55514. doi: 10.1371/journal.pone.0055514 (on-line journal).
- 3) Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Maeda H, Unuma K, Uchiyama Y, Yoshida K. Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers. Hepatol Res. 2013; Jun 17. doi: 10.1111/hepr.12183.
  - 4) Shintani-Ishida K, Saka K, Yamaguchi K, Hayashida M, Nagai H, Takemura G, Yoshida K. MDMA induces cardiac contractile dysfunction through autophagy upregulation and lysosome rupture in rats. Biochim Biophys Acta (molecular basis of disease) 2013, 1842(5):691-700
  - 5) Maeda H, Nagai H, Takemura G, Shintani-Ishida K, Komatsu M, Ogura S, Aki T, Shirai M, Kuwahira I, Yoshida K. Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart. Biochim Biophys Acta (molecular basis of disease) 2013;1832(8):1159-1166.
  - 6) Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K. Ischemia-Reperfusion Induces Myocardial Infarction Through Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Overload. J Mol Cell Cardiol 2012, 53(2):233-9.
  - 7) 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. 2011;26(3):321-37
  - 8) Shintani-Ishida K, Yoshida K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- $\alpha$ , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. Biochim Biophys Acta (molecular basis of disease). 2011;1812:743-51.
- [学会発表](計6件)
- 1) Omoto S, Tazumi S, Yoshida R, Nagai H, Yoshida K, Kudo R, Hatake K, Yano S, Morimoto K. Effects of estrogen replacement on intermittent hypoxia-induced hypertension in ovariectomized rats. 第37回国際生理学会世界大会(IUPS). 2013年7月25日
  - 2) 前田秀将, 永井恒志, 山口るつ子, 加島淳平, 新谷香, 吉田謙一. Heart failure induced by intermittent hypoxia in rat fed high-fat diet. 第97次日本法医学会学術全国集会. 札幌 2013年6月27日
  - 3) 加島淳平, 前田秀将, 山口るつ子, 永井恒志, 坂幹樹, 吉田謙一. Fatty liver disease induced by intermittent hypoxia in rat fed on high-fat diet. 第97次日本法医学会学術全国集会. 同上
  - 4) 永井恒志, 奈良明奈, 前田秀将, 吉田謙一. 睡眠時無呼吸症候群モデルラットの低酸素性肺血管収縮に対する $\beta_1$ , 2blockerの影響. 第97次日本法医学会学術全国集会. 同上。
  - 5) 尾本さよ, 田積昇子, 吉田利恵, 永井恒志, 吉田謙一, 工藤利彩, 羽竹勝彦, 森本恵子. 卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充が間欠的低酸素暴露誘発性血圧上昇を減弱する. 第90回日本生理学会大. 2013年3月28日

6) 前田秀将, 永井恒志, 新谷香, Lisa Wingenfeld, 吉田謙一, Intermittent hypoxia induces autophagy to prevent heart failure in rats. 第 96 次日本法医学会学術全国集会. 浜松, 2012 年 6 月 7 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 謙一 (Ken-ichi Yoshida)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40166947

### (2) 研究分担者

森本 恵子 (Keiko Morimoto)  
奈良女子大学・生活環境学部・教授  
研究者番号：30220081

### (3) 呉林 なごみ (Nagomi Kurebayashi)

順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：50133335

### (4) 上山 敬司 (Takashi Ueyama)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50264875

### (5) 桑平 一郎 (Ichiro Kuwahira)

東海大学・医学部・教授  
研究者番号：60186567

### (6) 白井 幹康 (Mikiyasu Shirai)

国立循環器病研究センター・心臓生理機能部・部長  
研究者番号：70162758

### (3) 連携研究者

なし