

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590267

研究課題名(和文) 間歇的低酸素負荷に伴う臓器別ストレス応答とラジカルスカベンジによる新たな治療戦略

研究課題名(英文) A novel strategy using radical scavengers against intermittent hypoxia-induced oxidative stress in heart, kidney, and brain

研究代表者

林 哲也 (HAYASHI, TETSUYA)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30257852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠時無呼吸に関連する間歇的低酸素負荷は、肥満や糖尿病患者における心・血管病合併に影響を与えるのみならず、心不全においては患者予後を左右することが知られている。本研究では、間歇的低酸素負荷にて活性酸素種の産生と酸化ストレスが増加し、脂質代謝異常や血圧変動とともに、心肥大や心筋微細構造の変性所見が進行した。一方、これらの変化はラジカルスカベンジャーである水素ガス吸入や抗酸化作用を有する選択的アドレナリン<sub>1</sub>受容体遮断薬の投与にて予防可能であることが明らかとなった。さらに、糖尿病が基礎疾患として存在する場合、大脳辺縁系におけるFos蛋白発現の低下が活動性の低下に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intermittent hypoxia (IH) relevant to sleep apnea is known to increase the risk of cardiovascular morbidity and mortality. This study showed that IH increased superoxide production, oxidative stress, and inflammatory cytokine expression in heart and kidney, accelerating histological degeneration due to hypoxic stress. Inhalation of hydrogen (H<sub>2</sub>) gas improved lipid metabolism and reduced oxidative stress. Furthermore, H<sub>2</sub> gas improved the deteriorated systolic function in Bio14.6 cardiomyopathic hamster exposed to IH. On the other hand, treatment with celiprolol, a beta 1-selective adrenoceptor blocker, suppressed blood pressure fluctuation during IH, restored eNOS expression, and attenuated cardiac remodeling caused by IH. Intriguingly, limbic Fos expression was significantly suppressed in obese diabetic mice exposed to IH, associated with sedative and/or depressive behavioral signs, which may related to the neuropsychological disturbances in diabetic patients with sleep apnea.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：間歇的低酸素負荷 糖尿病マウス 心筋症ハムスター 酸化ストレス 水素ガス ラジカルスカベンジャー 大脳辺縁系 Fos

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、メタボリックシンドロームが増加しており、社会的ならびに経済的にも問題となっている。メタボリックシンドロームや肥満患者に睡眠時無呼吸症候群が合併することが多く (Eur Heart J 2004; 25: 735) さらに睡眠時無呼吸症候群の患者には心血管合併症が多いこと (Lancet 2005; 365: 1046) が知られている。さらに、睡眠時無呼吸と心房細動出現頻度との関連性についても報告されており (J Am Coll Cardiol 2007; 49: 565) 低酸素と心血管リモデリングの関連性が注目されている。しかしながら、無呼吸に伴う間歇的低酸素負荷が心血管リモデリングを惹起する詳細な機序は未だ不明であった。

(2) 申請者はこれまでに、持続的低酸素負荷が左室心筋における Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1- やエンドセリンを増加させること、低酸素状態が糖尿病に伴う左室リモデリングを進行させることなどを報告した (Circ J 2006; 70: 787) また、レニン-アンジオテンシン系の抑制が低酸素状態にある心血管保護に重要であることを明らかにした (Hypertens Res 2007; 30: 1219) さらに、睡眠時無呼吸に見られるような間歇的低酸素負荷においては酸化ストレスの増加と核転写因子である nuclear factor -B の役割が重要であることが判明した (J Am Coll Cardiol 2006; 47: 296A) スーパーオキシドや過酸化水素は高濃度で存在する場合には細胞毒性を發揮する一方、低濃度ではアポトーシスや細胞分化といった生物にとって重要なプロセスを制御している。従って、酸化ストレスのコントロールは抗動脈硬化・抗加齢医学の観点からも重要な課題である。

## 2. 研究の目的

睡眠時無呼吸症候群は、メタボリックシンドロームや糖尿病に合併する事が多く、致死的心血管イベントの独立した危険因子でもある。しかしながら、間歇的低酸素負荷が各臓器に及ぼす影響には不明な点が多い。本研究は、糖尿病や心不全のモデル動物を用い、申請者が独自に開発した低酸素曝露装置にて低酸素負荷中の血圧ならびに心拍数をモニターし、酸化ストレスの組織学的定量評価とともに、心臓・腎臓・脳を中心に検討する事を目的とする。さらに、交感神経系抑制薬や水素ガスによるラジカルスカベンジをターゲットとする新たな治療戦略について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 間歇的低酸素負荷が脂質代謝ならびに心臓・腎臓の組織形態に及ぼす影響と水素ガスによる予防効果について

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、日中、1日8時間、1分ごとに酸素濃度が5%、21%となるよう設定し、hypoxia 群とした。また、

通常酸素濃度下で飼育した群を normoxia 群とした。さらに hypoxia 群の一部は、図1のように3つの異なったタイミングで水素ガス (1.3 vol/100 vol) を吸入させた。

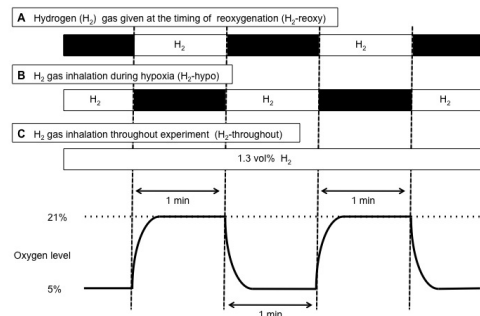


図1

低酸素曝露7日後に採血、屠殺し、光顕・電顕ならびに免疫組織化学的検索を行った。さらに、炎症性サイトカインや brain natriuretic peptide (BNP) の mRNA 発現量を定量した。

(2) 選択的アドレナリン 1 受容体遮断薬 セリプロロールが間歇的低酸素曝露マウスの心リモデリングに与える影響について

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、日中、1日8時間、30秒ごとに酸素濃度が5%、21%となるよう設定し、hypoxia 群とした。また、通常酸素濃度下で飼育した群を normoxia 群とした。さらに、各々の群を vehicle として蒸留水を経口投与する群、セリプロロール 100 mg/kg/day の用量で経口投与する群に分けた。実験開始1週間前に送信機を植え込み、間歇的低酸素曝露時の血圧および心拍数を経時的に測定した。実験開始から10日後、心臓カテーテル検査によって心行動態の測定を行い、その後、採血及び心臓を摘出した。心臓は、組織学検討、酸化ストレス、tumor necrosis factor (TNF)- および BNP mRNA 発現量、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) および arginase II タンパク発現量測定のために用いた。

(3) 間歇的低酸素負荷が糖尿病マウス脳組織における Fos 蛋白発現に与える影響について

9週齢の雄性 db/db (BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J) マウスを用い、酸素濃度5%が1分間、21%が5分間となるような計6分間のサイクルを日中、1日8時間 (80 サイクル) 実施し、hypoxia 群とした。連続14日間、低酸素曝露した後、一部のマウスについては活動性と depression-like behavior を評価するために、open-field test ならびに force swim test を実施した。また、採取した脳組織において Fos 蛋白発現を免疫組織化学的に検索し定量した。

(4) 間歇的低酸素負荷が心筋症ハムスターの心機能に与える影響について

20~24 週齢の Bio14.6 心筋症ハムスターと Syrian ハムスターを用い、酸素濃度 5% が 1.5 分間、21% が 5 分間となるような低酸素負荷を 1 日 8 時間、連続 14 日間実施し、hypoxia 群とした。麻酔下に心臓超音波検査を実施後、屠殺して心臓を摘出し光顕・電顕ならびに免疫組織学的検索を行った。

4. 研究成果

(1) 間歇的低酸素負荷による臓器ストレス応答と脂質代謝異常について

コレステロール分画の変化と水素ガス吸入の効果

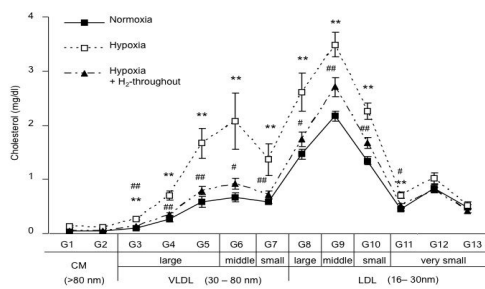


図 2

間歇的低酸素負荷にて G5, G6 分画の VLDL や G9 分画の LDL が有意に増加したが、水素ガス吸入はそれらの変化を抑制した。

間歇的低酸素負荷が心臓・腎臓に及ぼす影響と水素ガスの保護効果

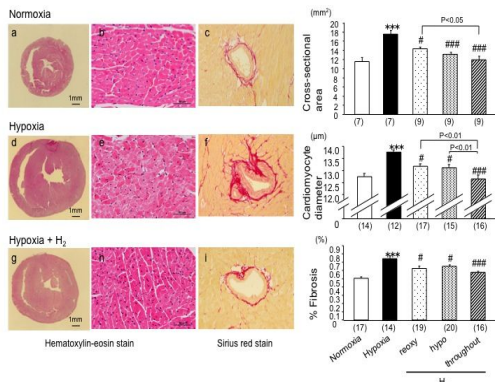


図 3

組織学的に、間歇的低酸素負荷にて心肥大や血管周囲の線維化が増加したが、水素ガス吸入にて心リモデリングは抑制された。なお、再酸素化時 (reoxy) ならびに日中を通じて水素ガスを吸入させた群 (throughout) にて組織保護作用はよ

り効果的であった。

一方、腎臓における低酸素負荷の影響については、これまでは近位尿管における変性所見が中心に報告されて来たが、電顕的観察にて、糸球体基底膜にも肥厚や空胞変性が存在することが明らかとなった。電子スピン共鳴装置にて水素ガス投与によるラジカル除去作用を確認し、さらに組織保護的に作用することも確認された (図 4)。

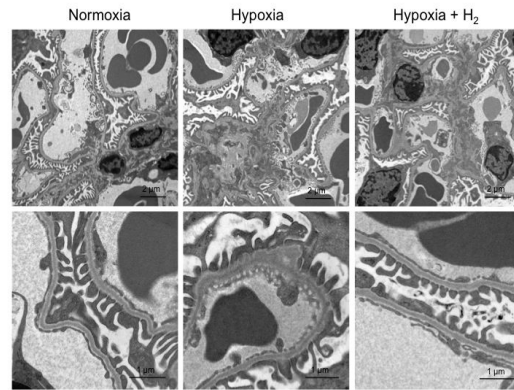


図 4

(2) 選択的アドレナリン<sub>1</sub>受容体遮断薬セリプロロールの心保護効果について

テレメーター植え込み術を施行したマウスを用いて間歇的低酸素負荷が血圧変動に与える影響について評価した結果、図 5 のように低酸素負荷中も再酸素化時も同様に顕著な変動が認められ、低酸素負荷開始 10 日目には平均血圧が有意に上昇した。これに対してセリプロロール投与群では血圧変動が抑制され、10 日目の平均血圧上昇も軽微であった。

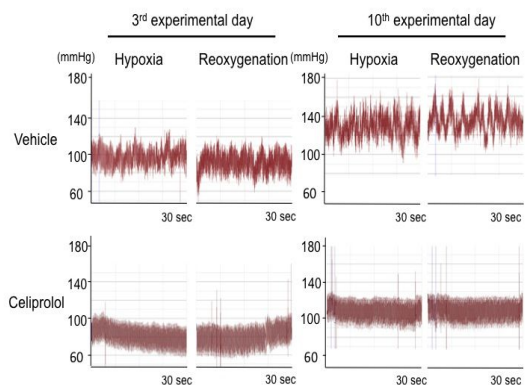


図 5

さらに、図 6 のように、間歇的低酸素負荷にて eNOS の発現低下ならびに arginase II 発現増加が認められたが、これらの変化はセリプロロール投与にて有意に抑制された。

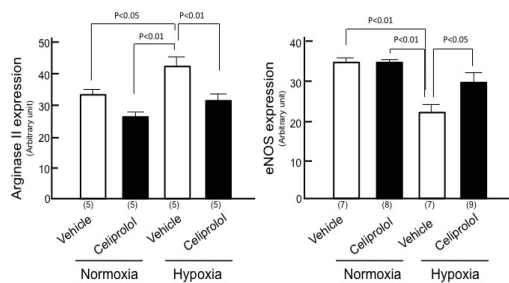


図 6

L-アルギニンは一酸化窒素合成酵素 (NOS) により一酸化窒素 (NO) を産生する一方で、アルギナーゼによって尿素とL-オルニチンも産生する。よって、NOS とアルギナーゼは競合関係にある。アルギナーゼは動物実験において、肺高血圧、冠動脈疾患、高血圧で増加することが報告されている。さらに、アルギナーゼ活性の亢進が、NOS による L-アルギニンの利用率を減少するため、NO の産生を減少することが考えられている。そのため、本研究における arginase II のダウンレギュレーションと eNOS 発現量減弱の抑制は、セリプロロールによる血管弛緩反応の重要な役割を担っていることが考えられる。

### ( 3 ) 糖尿病マウス脳組織における Fos 蛋白発現について

糖尿病マウス脳組織において Fos 蛋白発現を網羅的に検索した ( 図 7 )。

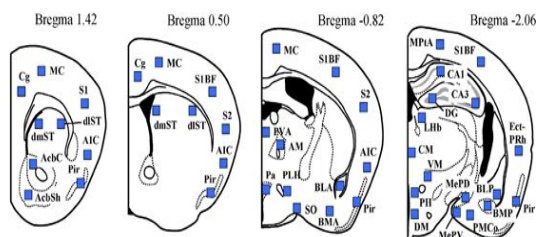


図 7

その結果、間歇的低酸素負荷により、糖尿病マウスにおける Fos 蛋白発現は主に大脳辺縁系において有意に低下した。さらに、中脳ドパミン作動性核における腹側被蓋領域 (ventral tegmental area; VTA) にて有意に低下したが、黒質緻密層 (substantia nigra pars compacta; SNC) では変化を認めなかった ( 図 8 )。

さらに、間歇的低酸素負荷を受けた糖尿病

マウスにおいて活動性の低下や depressive behavioral sign の増加が確認され、糖尿病患者に睡眠時無呼吸が合併することによって認知症の出現や知的活動の低下が認められる可能性が示唆された。

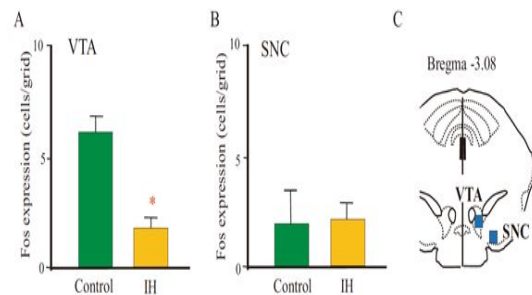


図 8

### ( 4 ) 間歇的低酸素負荷が心筋症ハムスターの心機能に与える影響について

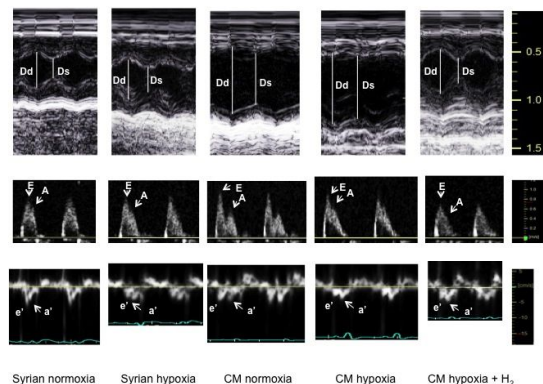


図 9

間歇的低酸素負荷は、心筋症ハムスターの収縮能ならびに拡張能をとも悪化させたが、水素ガス吸入にて予防可能であった ( 図 9 )。この結果は、重症心不全患者における Cheyne-Stokes 呼吸の合併が心機能を悪化させる病態生理学的機序の一部を明らかにすると同時に、水素ガス吸入が有力な治療戦略であることを証明するものであり、臨床的にも極めて重要な知見であると考えられる。

### ( 5 ) 得られた成果の国内外における位置づけと今後の展望

本研究の特色は、様々な条件の間歇的低酸素負荷が可能なガスチャンバーを使用しており、これまで長年にわたって心血管リモデリングに関する免疫組織化学的ならびに微細構造学的研究を積み重ねてきた点にある。また、虚血再灌流障害に関連するリオキシゲネーション (re-oxygenation、再酸素化) に注目した実験を実施しており、水素ガスを用いる治療戦略では臓器移植にも関連する極めて幅広

い研究である。

今回の研究で得られた結果は、いずれも臨床的にも極めて重要な知見で、国内外の学会に数多く発表し、またインパクトファクターを持つ英文雑誌にも順調に採択されている。今後は、分子レベルでの詳細な機序を明確にするために、培養細胞を用いた実験を平行して実施する計画である。

#### 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 6 件)

Nishioka S, Yoshioka T, Nomura A, Kato R, Miyamura M, Okada Y, Ishizaka N, Matsumura Y, Hayashi T. Celiprolol reduces oxidative stress and attenuates left ventricular remodeling induced by hypoxic stress in mice. *Hypertens Res* 2013; 36: 934-939.  
DOI: 10.1038/hr.2013.60

Mukai T, Nagao Y, Nishioka S, Hayashi T, Shimizu S, Ono A, Sakagami Y, Watanabe S, Ueda Y, Hara M, Tokudome K, Kato R, Matsumura Y, Ohno Y. Preferential suppression of limbic Fos expression by intermittent hypoxia in obese diabetic mice. *Neuroscience Res* 2013; 77: 202-207.  
DOI: 10.1016/j.neures.2013.09.013

Hayashi T, Yoshioka T, Hasegawa K, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Matsumura Y, Ishizaka N. Inhalation of hydrogen gas attenuates left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H1062-H1069.  
DOI: 10.1152/ajpheart.00150.2011.

[学会発表](計 12 件)

Hayashi T, Sasaki M, Watanabe A, Furukawa Y, Nakagawa T, Nomura A, Uehashi W, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Asahi M. O-Linked N-Acetyl Glucosamine (O-GlcNAc) Regulates Autophagy and Apoptosis in Cardiomyocytes: a Double-Edged Sword in Intermittent Hypoxia-Induced Cardiac Remodeling. 64th ACC Congress 2014 (March 29-31, 2014, Washington DC, USA)

Nomura A, Kato R, Ijiri Y, Sakamoto A, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Tanaka K, Hayashi T. Intermittent hypoxia accelerates cardiac remodeling and systolic dysfunction in cardiomyopathic hamster. 第 78 回日本循環器学会総会、平成 26 年 3 月 21-23 日、東京

Woo E, Nishioka S, Nemoto S, Katsumata T, Hayashi T. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Cardiac Remodeling due to Hypoxic Stress. 23rd European Meeting on Hypertension & Cardiovascular Protection (June 14-17, 2013, Milan, Italy)

上橋和佳、野村篤生、加藤隆児、宮村昌利、井尻好雄、石坂信和、林哲也。間歇的低酸素曝露による左室リモデリングに対する新規 ARB azilsartan の効果。第 61 回日本心臓病学会、平成 25 年 9 月 20-22 日、熊本

供田菜々花、野村篤生、加藤隆児、井尻好雄、宮村昌利、石坂信和、阪本英二、田中一彦、林哲也。間歇的低酸素負荷が不全心に及ぼす影響と水素ガスのラジカルスカベンジ効果。第 61 回日本心臓病学会、平成 25 年 9 月 20-22 日、熊本

東森健志、西岡慧、野村篤生、加藤隆児、宮村昌利、石坂信和、松村靖夫、林哲也。間歇的低酸素負荷に伴う血圧変動と酸化ストレスに対する celiprolol の有効性。第 36 回日本高血圧学会総会、平成 25 年 10 月 24-26 日、大阪

Fujiwara Y, Nomura A, Kato R, Miyamura M, Ijiri Y, Ishizaka N, Hayashi T. Azilsartan reduces oxidative stress and attenuates cardiac remodeling induced by hypoxia in rats. 第 17 回日本心不全学会学術集会、平成 25 年 11 月 28-30 日、大宮

Nishioka S, Hayashi T, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Okada Y, Ishizaka N, Yoshioka T, Hasegawa K, Matsumura. Effect of hydrogen gas inhalation on lipid metabolism and left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia. ESC Congress 2012 (August 25-29, 2012, Munich).

Nomura A, Nishioka S, Yamaguchi S, Tagawa A, Furukawa Y, Kato R, Ijiri Y, Matsumura Y, Okada Y, Asahi M, Tanaka

K, Hayashi T. Intermittent hypoxia-induced cardiovascular remodeling in diabetes mellitus. 第35回心筋代謝研究会（平成24年7月7-8日、東京）

禹英喜、根本慎太郎、勝間田敬弘、松村靖夫、林哲也. 持続的低酸素曝露にともなう心室リモデリングにおける VEGF の意義と重要性. 第35回日本高血圧学会総会（平成24年9月20日-22日、名古屋）

〔その他〕

大阪薬科大学循環病態治療学研究室

ホームページ

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/jyunkanbyoutaitiryu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 哲也 (HAYASHI, Tetsuya)

大阪医科大学・内科学 III・非常勤講師

大阪薬科大学・循環病態治療学研究室・

教授

研究者番号：30257852