

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860217

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸患者における心血管病発症・進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis and progression of cardiovascular diseases in patients with obstructive sleep apnea

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠時無呼吸症(SA)は、血液中の酸素の低下を繰り返す病態(IH)を示し、動脈硬化による心筋梗塞の危険因子である。本研究はSAにおける心筋梗塞の予防法を見出すことを目標として始まり、これまでに我々はIHが動脈硬化へ繋がるエピレグリンの増加を引き起こすことを見出したが、そのメカニズムは不明であった。今回の研究では、IHによるエピレグリンの増加に炎症性蛋白質IL-6が関与することが示された。IL-6は様々な炎症と関連しているため、IHによるIL-6の上昇は、SA患者における心筋梗塞等の発症・進展において重要な役割を担っていると考えられ、それらの予防戦略において鍵となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sleep apnea (SA) is characterized by intermittent hypoxia (IH) and a risk factor for atherosclerosis which consequently cause myocardial infarction (MI). We finally aim to discover the prophylaxis against MI and previously found out that IH induced an increase of epiregulin which had a relation to atherosclerosis. However, its underlying mechanisms have been remained. In this study, we show that the proinflammatory cytokine IL-6 might be involved in the IH-induced increase of epiregulin. IL-6 has a relation to several inflammatory diseases and may play a pivotal role in the progression of MI and inflammatory diseases including autoimmune disease in patients with SA. IL-6 and its increase in IH may be an important for the establish of prophylaxis.

研究分野：vascular complication

キーワード：Obstructive sleep apnea vascular smooth muscle epiregulin interleukin-6

1. 研究開始当初の背景

閉塞性睡眠時無呼吸 (OSA) 患者では心血管病およびその関連死のリスクが高いことが知られている。OSA は間歇的低酸素症 (IH) を特徴とし、高血圧症、糖尿病、酸化ストレス及び脂質代謝異常等との関連が報告されているのに加えて、それらの疾患がアテローム性動脈硬化の危険因子であることから、IH が直接的又は間接的にアテローム性動脈硬化を誘発する結果、OSA 患者における心血管病による致死率の上昇につながっていると考えられる。一方、一般に OSA 治療に用いられる人工呼吸器 (CPAP) は OSA に起因する心血管病による致死率を改善するが、使用時の不快感等から決してコンプライアンスは良好とはいえず、OSA による心血管病やその関連死のリスクを低減させる新たな予防法・治療法が望まれる。そこで、IH が血管平滑筋細胞へ及ぼす影響とそのメカニズムを解明することで、IH による心血管病発症の予防法を確立するという考えにより本研究を行うに至った。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、IH の血管平滑筋細胞に対する影響とそのメカニズムを解明し、OSA 患者に頻発する心血管病発症の新しい予防法を探求することである。

我々は、細胞の暴露条件を「Normoxia (N) および Sustained Hypoxia (SH) の O₂ 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。」と定めて既に検討を行っている。IH の暴露時間を 24 時間と定めて検討を進めた結果、IH が直接的に血管平滑筋細胞の増殖を促進することを発見した。また、その細胞増殖には上皮成長因子 (EGF) ファミリーおよび erbB2 受容体が一部関与していることも明らかにしている。すなわち、OSA の特徴である IH は、一部の EGF ファミリーと erbB2 受容体の発現増加を介してアテローム性動脈硬化の発症・進展の一端を担う血管平滑筋細胞の増殖を引き起こす。しかしながら、現在その詳細なメカニズムはいまだ明らかにはなっていない。本研究では、IH に対する血管平滑筋細胞の細胞内応答メカニズムを解明し、OSA による心血管病発症の鍵となる分子の同定を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

本実験の一部において培養ラット大動脈平滑筋細胞 (RASMC) を用いている。その実験にあたっては学内の動物実験委員会の承認の後、改正「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成 23 年 6 月 24 日法律第 24 号)を遵守して実施した。

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各条件にて暴露した。各暴露条件は、normoxia (21% O₂, 5% CO₂)、SH (1% O₂, 5% CO₂) 又は IH (10 min normoxia と 5 min SH を繰り返す) とした。

(2) 蛋白質の定量

検出対象の蛋白質に対して特異的な抗体を反

応させ、専用の試薬で発光させて定量化した。

(3) 細胞増殖の評価

細胞増殖の評価は WST-8 試薬を用いて行い、その手順は添付の説明書に従った。実際には、細胞およびその培養液に対して WST-8 試薬を添加すると、一般に細胞の数に比例して次第に呈色するため、その呈色の度合を検出した。

(4) メッセンジャーRNA (mRNA) の定量

蛋白質生成の前段階である mRNA の定量は、Real-time RT-PCR 法を用いて行った。

(5) プロモーター領域の活性測定

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によるレポーター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。IH 暴露は遺伝子導入から 18~24 時間後に行い、暴露終了後に発光の程度を評価した。

(6) インターロイキン-6 (IL-6) の定量

炎症性蛋白質である IL-6 の検出には市販されているキットを用い、その手順は添付の説明書に従った。

4. 研究成果

(1) hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の活性は、本実験系の RASMC では上昇しない。IH に関する研究において、低酸素暴露により活性化される HIF-1 の活性化の結果が論文によって異なっているため、本研究でも RASMC におけるその活性化を検討したが、IH による HIF-1α に変化は認められなかった。また、研究協力者が膵臓の β 細胞を用いて IH 暴露して検討した結果、HIF-1 が関与する領域の活性化を認めなかった。

このことから、本研究における実験条件では HIF-1 の活性化は生じないと考えられた。

(2) IH の 24 時間暴露により RASMC における Elk-1、ERK-1/2 および Akt のリン酸化は抑制される。

RASMC を用いた検討にて、細胞増殖等に関わる ERK-1/2 および Akt のリン酸化 (活性化) は IH 暴露時間依存的に増加して 3 時間をピークに低下し、24 時間後には N よりも低い値を示した。各種 mRNA の発現に関わる転写因子 Elk-1 の活性化に関しても IH の 24 時間暴露後は N と比して低い値を示した (図 1; ERK1/2)。

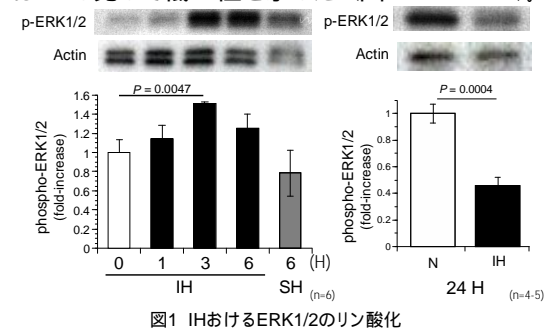


図1 IHにおけるERK1/2のリン酸化

(3) IH により RASMC における DUSP1 mRNA の発現が増加する。

(2) の結果から IH による脱リン酸化酵素

DUSP1、PHLPP 1 および PHLPP2 mRNAs の発現への影響を RASMC を用いて検討した。IH 24 時間暴露群の DUSP1 mRNA は N のそれと比して有意な増加を示したが、IH 6 時間暴露群ではそのような増加は認めず、また PHLPP1 および 2 でも有意な発現の増加は確認できなかった(図 2; DUSP1 mRNA)。(2) および (3) の結果より、IH の長時間暴露により ERK1/2 等の細胞増殖に与える蛋白質の活性化が DUSP1 により抑制される可能性が考えられた。

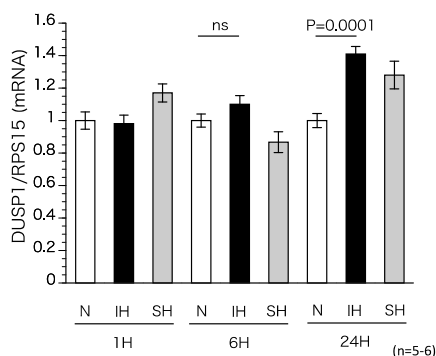


図2 IHによるDUSP1 mRNA発現への影響

(4) アスコルビン酸は IH による RASMC の増殖を抑制する。

IH は酸素濃度の低下と回復を繰り返すため、酸化ストレスが関与すると考えられている。そこで、抗酸化剤であるビタミン C (アスコルビン酸) を用いた検討にて、アスコルビン酸が濃度依存的に IH による細胞増殖を抑制することを見出した(図 3)。しかしながら、その他の抗酸化剤(アセチルシステイン、Tempol、Trolox C および diphenyleneiodonium) では、IH による細胞増殖に対して有意な抑制効果は認められなかった。

このことから、本実験系における酸化ストレスの関与に関しては、今後のより詳細な検討が必要なものと考えている。

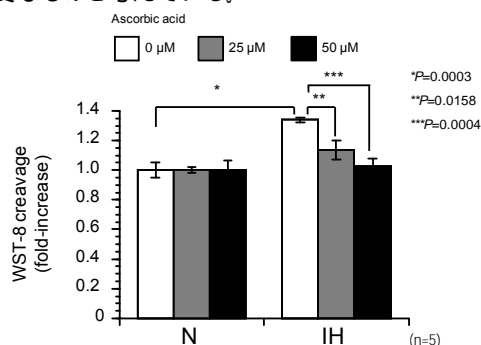


図3 IHに起因する細胞増殖に対するアスコルビン酸の抑制効果

(5) ラット EREG のプロモーター領域(-1825/+15)に IH 応答性の領域が存在する。RASMC にて IH 応答性のプロモーター領域とその mRNA の発現に関わる転写因子を特定するために、EREG のプロモーター領域に関する検討を行った結果、EREG の-1825/+15 に IH 応答性の領域が存在することが示された(図 4)。しかしながら、その IH による活性化の程度は、有意ではあるものの主要な転写領域を特定でき

るほどではなかった。また、その遺伝子導入効率も低かったため、試薬の変更や遺伝子導入方法の変更等を行ったが改善が見られなかった。このことから IH に対する EREG の発現増加は、プロモーター領域の活性化よりも mRNA の分解低下による寄与が大きい可能性が考えられた。

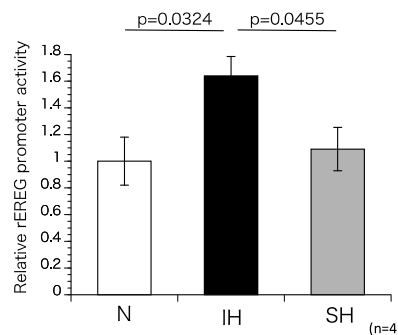


図4 ラットEREGのプロモーター領域(-1825/+15)のIHにおける活性化

(6) 不死化ヒト冠動脈血管平滑筋細胞(CASMC)は、IH暴露により EREG mRNA の発現を RASMC と同様に増加させる。

(5) の結果を受けて、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 CASMC を使用することとした。

CASMC 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、CASMC 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 5)。また、EREG と同じ EGF ファミリーの一つである amphiregulin (AREG) mRNA についても RASMC と同様に IH にて発現が増加することを確認している。

このことから、ヒト由来の CASMC は EREG や AREG の発現においてラット由来の RASMC と同様の反応を示しており、これらの発現は IH に対する種を越えた普遍的な細胞の応答であると考えられる。

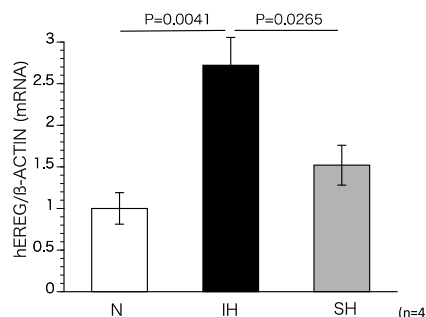


図5 hCASMCでのIHによるEREG mRNA発現の増加

(7) CASMC における EREG の promoter 領域(-1367/+118)は IH に応答しない。

(5) と同様の検討を CASMC にて行ったが、EREG の promoter 領域(-1367/+118)は IH に応答しなかった(図 6)。

(5) および (7) の結果から IH に対する EREG

の発現増加は、プロモーター領域の活性化ではなく mRNA の分解低下による寄与が大きい可能性がより高まった。

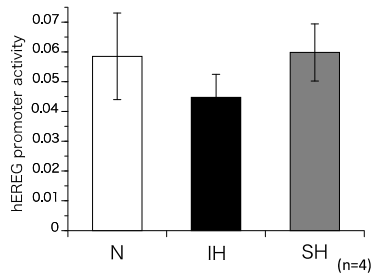


図6 ヒトEREGのプロモーター領域 (-1367/+118) におけるIHの影響

(8) miR-192-5p microRNA は IH により減少したが、その阻害剤による有意な効果は認められなかった。

(5) および (7) の結果から、IH による EREG mRNA の増加は microRNA による mRNA の分解の低下の可能性を考えるに至った。マウス、ラット並びにヒトに共通し、かつその寄与の大きいと推察される microRNA として miR-192-5p および miR-215 を選出し、それらの IH における発現の変動を検出した。その結果、IH により miR-192-5p のみその発現量が有意に減少した (図 7A)。そこで、miR-192-5p に対する阻害実験を行ったが、阻害剤を含まない群と阻害剤を含む群の IH における EREG mRNA の増加率に差は認められなかった (図 7B)。

プロモーターおよび microRNA といったように IH における EREG mRNA 増加メカニズムの解明を目的とした検討を進めたが、結果的に IH における EREG の増加メカニズムを解明するには至らなかった。

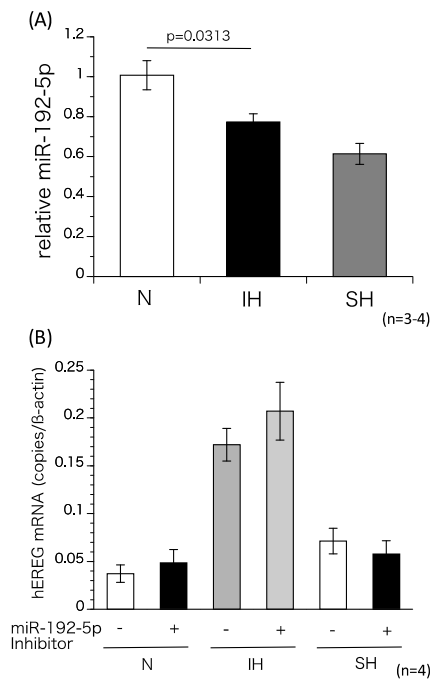


図7 (A) IHIによるmiR-192-5p発現の減少および (B) IHIによるhREG mRNA発現の増加に対するmiR-192-5p阻害剤の影響

(9) RASMC および CASMC のいずれにおいても IH により IL-6 mRNA が増加する。

IH による EREG mRNA の発現増加メカニズムの解明には至らなかったため、他の要因をスクリーニングした結果、RASMC と CASMC のいずれにおいても炎症性蛋白質である IL-6 の mRNA が誘導されることを見出した (図 8、図 9A)。

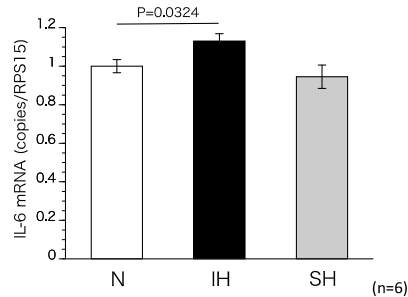


図8 RASMCでのIHIによるIL-6 mRNA発現の増加

(10) CASMC における IL-6 mRNA および成熟 IL-6 の発現は、IH のサイクル数依存的に増加する。

CASMC における IL-6 mRNA の発現は、IH のサイクル数依存的に増加し、培養液中への成熟 IL-6 の発現も mRNA と同様に IH のサイクル数依存的に増加した (図 9A, B)。

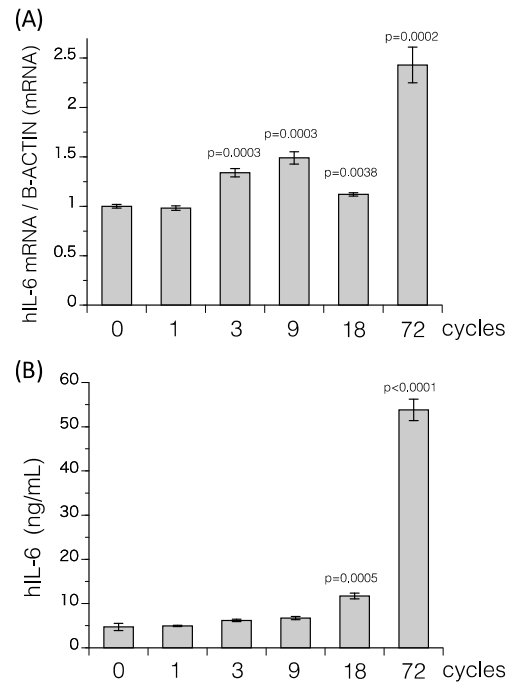


図9 (A) hIL-6 mRNA および (B) hIL-6 の発現におけるIHサイクル数依存的変化

(11) IL-6 刺激により CASMC における EREG および AREG mRNAs の発現が増加する。

(10) の結果から、IH による EREG の発現増加に対する IL-6 の関与の有無を確認するために、CASMC を IL-6 (100 ng/mL) にて刺激した。EREG mRNA は、IL-6 添加 30 分後から 24 時間まで有意な増加を示した (図 10A)。AREG mRNA は、IL-6 添加 3 時間後まで経時的に増

加し、その後減少した(図 10B)。このことから、IH により増加した IL-6 が EREG mRNA や AREG mRNA の増加を引き起こしている可能性が示された。

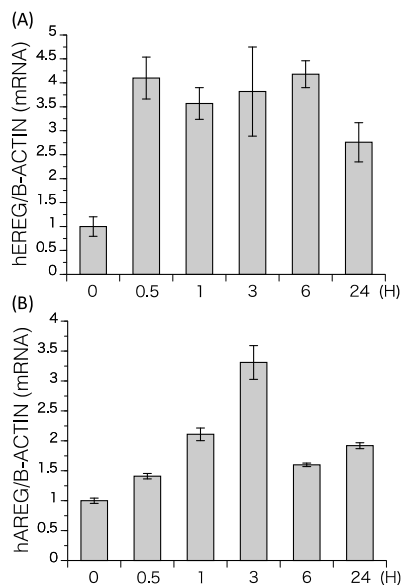


図10 IL-6 (100 ng/mL) による (A) hEREG mRNA および (B) hAREG mRNA 発現の経時的変化

前半の検討にて、本実験系において HIF-1 の活性は認められないこと、ERK1/2 等の一過性の活性化とその後の活性の低下および脱リン酸化酵素の発現上昇の可能性、酸化ストレスによる細胞増殖の可能性が示されたが、その程度の低さやその後の検討の困難さ、同様の検討内容の論文が発表されるなどがあり、中止したものや一時中断しているものもある。

また、IH による EREG mRNA の発現上昇に直接的に関わるプロモーター領域の特定や microRNA の関与を明確に示すことができなかったが、最後に炎症性蛋白質であり、かつ各種病態と密接に関わる IL-6 が IH による EREG および AREG mRNA の発現上昇に関与することを示唆するデータを得ることが出来た。2017年6月現在、IH における EREG mRNA 増加に対して IL-6 の直接的関与を示すデータが得られており、論文へ纏めている状況である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

Yoji Kyotani, et al. Underlying mechanisms for arteriosclerosis in Intermittent hypoxia or biomechanical stretch. 第 89 回日本薬理学会年会、2016.3.9-11、パンフィコ横浜 会議センター (神奈川県)

Yoji Kyotani, et al. Sleep apnea syndrome as an emerging risk factor for type 2 diabetes and atherosclerosis: evidence and underlying mechanism.

9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress. 2014.9.12-14. Kyoto International Conference Center (Kyoto prefecture).

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

高澤 伸 (TAKASAWA, Shin)