

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590923

研究課題名（和文）睡眠時無呼吸症候群による時計遺伝子障害に関する研究

研究課題名（英文）Influence of sleep apnea syndrome on clock gene dysfunction

研究代表者

鯉岡 直人（BURIOKA NAOTO）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50252854

研究成果の概要（和文）：

閉塞性睡眠時無呼吸症候群(OSAS)は睡眠中に間歇的低酸素(IH)を生じる。培養細胞実験のIH状態で転写因子NF-κBシグナル経路が活性化され炎症性サイトカインIL-6のmRNA発現は亢進したが時計遺伝子の発現に影響しなかった。血清IL-6濃度はOSAS患者群で上昇し持続気道陽圧(CPAP)療法で低下した。IH状態は時計遺伝子発現に影響を与えないがIL-6産生に関与しOSAS患者の全身炎症の一因となる。治療はCPAP療法が有用である。

研究成果の概要（英文）：

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) clinically causes intermittent hypoxia (IH) during sleep. The levels of an inflammation cytokine interleukin-6 (IL-6) mRNA significantly elevated by IH condition in cultured human lung adenocarcinoma epithelial cells (A549), due to activation of the signaling pathway of nuclear factor-κB (NF-κB) which is a potent transcriptional activator of IL-6. However, the treatment of cells with IH had little effect on clock gene expressions. Serum concentrations of IL-6 in OSAS patients were significantly higher than in healthy subjects, but elevated levels of IL-6 in OSAS patients fell to the level of healthy subjects after CPAP therapy. The condition of IH can activate signal transduction to an inflammatory response, but not to circadian clock regulation. The increase of serum IL-6 may cause systemic inflammation in patients with OSAS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：睡眠時無呼吸症候群，間歇的低酸素，時計遺伝子，IL-6，VEGF

1. 研究開始当初の背景

1990年代に哺乳類の視交叉上核に約24時間を刻む体内時計の存在が確認され体内時計を駆動するための遺伝子群である時計遺伝子が同定された。多くの生体活動に約24時間周期で変動する概日リズムが認められ

る。時計遺伝子は視交叉上核に発現する中枢時計遺伝子とそれ以外の組織に発現する末梢時計遺伝子がある。中枢時計遺伝子の障害は概日リズム睡眠障害やうつ病の発症に関係する。また、末梢時計遺伝子の障害は肥満、腫瘍増殖、循環器疾患に関与する。

閉塞性睡眠時無呼吸症候群(OSAS)は高血圧症など多くの合併症の基礎疾患となる重要な疾患である。中等症以上の患者には経鼻マスク式持続気道陽圧(CPAP)呼吸療法が施行される。多くのOSAS患者は昼の過眠症が特徴的である。OSASは、交感神経機能亢進に加えて間歇的低酸素血症を引き起こす。我々は以前、OSASの交感神経機能亢進が間接的に末梢時計遺伝子に影響をおよぼす可能性を報告した。しかし、OSASが睡眠中に生体に生じさせる間歇的低酸素状態が時計遺伝子に影響を及ぼすか不明であった。また、OSAS患者の全身炎症は動脈硬化などの原因となり予後を規定する重要な因子であると報告されている。間歇的低酸素状態が炎症性サイトカイン産生に関与するか実験し炎症性サイトカインが増加する場合、生体内濃度で時計遺伝子に影響を及ぼし得るか調べる必要があった。

2. 研究の目的

臨床的にOSASにおいては持続的低酸素血症ではなく間歇的低酸素血症が生じる。最近、OSAS患者の間歇的低酸素血症が転写因子のNF-κBを介して炎症性サイトカインを産生し病態悪化に関与することが報告された(Ryan S, et al. *Circulation* 112, 2660-2667, 2005)。本研究において、①間歇的低酸素状態が時計遺伝子発現変化に関与の可能性、②間歇的低酸素状態が炎症性サイトカインを増加させる機序、③OSAS患者の間歇的低酸素が産生促進した炎症性サイトカインの種類を調べ時計遺伝子に影響を及ぼす程度の濃度か検討する。これらを明らかにすればOSASの臨床病態を新しい観点から明確にする可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 正常酸素状態、持続的低酸素状態(2%酸素, 24時間)、間歇的低酸素状態(2%酸素10分間曝露後、20%酸素10分間曝露を1セット、最大10回繰り返し)の3条件で転写因子NF-κBおよびHIF-1のシグナル経路の関与を調べた。具体的には培養細胞(A549)にpNF-κB-Luc reporterあるいはHRE-Luc reporterを導入しルシフェラーゼ・レポーターアッセイで正常酸素状態、持続的低酸素状態、間歇的低酸素状態の3条件で変化を調べた。

(2) 転写因子NF-κBの標的遺伝子として遺伝子上流にNF-κB response elementを持つ*IL-6*を考えた。転写因子HIF-1の標的遺伝子として遺伝子上流にhypoxia response element(HRE)を持つ*VEGF*を考えた。培養細胞を用い、*in vitro*で正常酸素状態、持続的低酸素状態、間歇的低酸素状態の3条件の*IL-6* mRNA発現をRT-PCR法で調べた。

(3) 健常者、OSAS患者、3ヶ月間nCPAP

呼吸療法を試行したOSAS患者の3群の血清*IL-6*濃度および*VEGF*濃度をELISAで調べた。

(4) 正常酸素状態、持続的低酸素状態、間歇的低酸素状態の3条件で培養細胞を用いて*Period1*、*Period2* mRNAなどの時計遺伝子発現促進の有無をRT-PCR法で確認した。

4. 研究成果

(1) 結果の概要

①ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ結果。培養細胞の*in vitro*実験から間歇的低酸素状態で転写因子NF-κBシグナル経路が活性化された。持続的低酸素状態で転写因子HIF-1シグナル経路が活性化された。この結果は従来の報告と一致した。

②転写因子NF-κBおよび転写因子HIF-1の標的遺伝子の発現解析(RT-PCR)結果。

持続的低酸素状態で*VEGF* mRNA発現が亢進したが*IL-6* mRNA発現は変化なかった。逆に間歇的低酸素状態は*IL-6* mRNA発現を亢進したが*VEGF* mRNA発現は変化なかった。

③ELISAで血清*IL-6*、*VEGF*濃度測定結果。

健常者群、OSAS患者群、持続気道陽圧(CPAP)呼吸療法を3ヶ月行った後のOSAS患者群の3群で、血清*IL-6*濃度は健常者群に比べてOSAS患者群において有意に上昇していたがCPAP呼吸療法により有意に低下した。一方、血清*VEGF*濃度は3群間で有意な変化はなかった。

④時計遺伝子群の発現(RT-PCR)結果。

培養細胞実験で持続的低酸素あるいは間歇的低酸素の低酸素状態は時計遺伝子*Period1*、*Period2*、*Cry Clock*、*Bmal1* mRNA発現に影響を与えなかった。

⑤その他

糖尿病患者では健常者に比べて末梢時計遺伝子発現に違いがあると報告がある(Ando H, et al. *Chronobiol Int.* 27:194-203, 2010, Ando H, et al. *Diabetologia.* 52:329-35, 2009)。本研究でOSAS患者のうち、高血圧合併症例群と合併していない群の末梢血(白血球)時計遺伝子*Period1* mRNA発現を検討したが、明確な差異を認めなかった。しかし、少数例における解析であるため、さらなる検討が必要と考えられた。

⑥客観的CPAP装置圧決定法。

本研究においてOSAS患者に全例CPAP呼吸療法を行ったが、これまで客観的CPAP装置圧決定法が明確なものがなかった。複雑系解析に利用されている時系列データを高次元空間に埋め込む方法を応用し、呼吸努力から至適CPAPを決定する新規表示法を開発して鳥取大学とともに特許出願した。

(2) 研究の主な成果

① 間歇的低酸素状態は時計遺伝子に *in*

vitro で影響しない。

② 間歇的低酸素は IL-6 産生を促進させる。

OSAS 患者の主要病態である睡眠中の間歇的低酸素血症は VEGF 産生に影響は少なく、NF-κB シグナル経路を介して IL-6 産生に大きな影響を及ぼし OSAS 患者の全身炎症の一因となる可能性がある。

③ OSAS 患者の間歇的低酸素血症によるヒト血中 IL-6 増加による時計遺伝子への影響は直接的にはない。

以前 IL-6 を培養細胞に添加して時計遺伝子発現に対する影響を調べた実験から (Burioka N, Koyanagi S, et al. Eur Respir J 32, 105-112, 2008), 今回の OSAS 患者の間歇的低酸素血症によるヒト血中 IL-6 増加では時計遺伝子発現に直接的には影響を及ぼさない濃度と推測された。

本研究は従来の報告 (間歇的低酸素状態は転写因子 HIF-1 シグナル経路でなく NF-κB シグナル経路を活性化する) を一部追試確認している点で重要である。また、間歇的低酸素、持続的低酸素ともに時計遺伝子 *Period1*, *Period2*, *Cry Clock*, *Bmal1* mRNA 発現に影響をおよぼさないことを初めて明らかにした。しかし生体内では間接的に影響を及ぼす可能性もあり今後も検討が必要である。

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 4 件)

① Burioka N, Fukuoka Y, Koyanagi S, Miyata M, Takata M, Chikumi H, Watanabe M, Endo M, Sako T, Suyama H, Ohdo S, Shimizu E. Asthma: chronopharmacotherapy and the molecular clock. Adv Drug Deliv Rev 62: 946-955, 2010.

② Burioka N, Koyanagi S, Fukuoka Y, Okazaki F, Fujioka T, Kusunose N, Endo M, Suyama H, Chikumi H, Ohdo S, Shimizu E. Influence of intermittent hypoxia on the signal transduction pathways to inflammatory response and circadian clock regulation. Life Sci 85: 372-378, 2009.

③ Burioka N, Miyata M, Endo M, Fukuoka Y, Shimizu E. Day-night variations of serum interleukin-6 in patients with severe obstructive sleep apnea syndrome before and after continuous positive airway pressure (CPAP). Chronobiol Int 25: 827-834, 2008.

④ Burioka N, Koyanagi S, Takata M, Endo M, Fukuoka Y, Miyata M, Takeda K, Chikumi H, Ohdo S, Shimizu E. Clock gene dysfunction in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Eur Respir J 32: 105-112, 2008 .

[学会発表] (計 2 件)

① Burioka N, et al. Influence of intermittent hypoxia on the expression of IL-6, VEGF, and clock gene in patients with obstructive sleep apnea syndrome. 第 49 回日本呼吸器学会総会 (English mini-symposium), 2009 年 6 月 14 日, 東京国際会議場)

② 鰐岡直人 他, 閉塞性睡眠時無呼吸症候群に残された臨床的問題点. 第 48 回日本呼吸器学会総会 (ミニシンポジウム 睡眠呼吸障害), 2008 年 6 月 16 日, 神戸国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称: 生体信号解析装置, 生体信号解析方法, 生体信号解析プログラム

発明者: 鰐岡直人

権利者: 国立大学法人鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-169094

出願年月日: 2010 年 7 月 28 日

国内外の別: 国内

②名称: 生体信号解析装置, 生体信号解析方法, 生体信号解析プログラム

発明者: 鰐岡直人

権利者: 国立大学法人鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-244165

出願年月日: 2009 年 10 月 23 日

国内外の別: 国内

○ [その他]

ホームページ等

<http://ww7.enjoy.ne.jp/~nburioka/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鰐岡 直人 (BURIOKA NAOTO)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 50252854

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

千酌 浩樹 (CHIKUMI HIROKI)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号: 90283994

清水 英治 (SHIMIZU EIJI)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：50187449