

令和元年6月11日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09219

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸症候群の呼吸異常における硫化水素・セロトニンの関与に関する研究

研究課題名(英文) Hydrogen sulfide and Serotonin in sleep apnea syndrome

研究代表者

平井 宗一 (HIRAI, SHUICHI)

愛知医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：70516054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性睡眠時無呼吸症候群の過去の実験動物モデルは、覚醒している(意識下)実験動物の周囲の酸素濃度を変更する(低酸素状態)にすることで、解析を行っていた。実際の閉塞性無呼吸症候群では、舌根沈下などにより、急速な呼吸不全が起こっており、間歇的低酸素曝露とは異なることが予想された。本研究において、麻酔下(無意識下)において間歇的閉塞性呼吸不全と間歇的低酸素(無酸素)曝露が異なる病態であることが明らかになった。また、閉塞回数ではなく、閉塞時間が病態の悪化に関連していることを明確にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉塞型睡眠時無呼吸症候群は、舌根沈下などにより睡眠時の呼吸が停止することを繰り返すことで、良好な睡眠の妨げ、日中傾眠を誘発する。その結果、交通事故・災害事故・社会生活や家族問題を引き起こすなど、社会的問題になっている。本研究にて、新たに、閉塞型睡眠時無呼吸症候群の臨床病態を反映した実験動物モデルを確立したことにより、今後、診断、治療への応用研究が加速すると予想される。

研究成果の概要(英文)：The intermittent hypoxic exposure of the awake (under conscious) experimental animals has been analyzed as experimental animal models of obstructive sleep apnea syndrome. However rapid respiratory failure due to tongue root depression is occurred in actual cases of obstructive sleep apnea syndrome. Therefore, it is expected that it is different condition from obstructive sleep apnea syndrome. In this study, it became clear that intermittent obstructive respiratory failure and intermittent hypoxic exposure under anesthesia (unconsciousness) are different pathologies. In addition, we clarified that the occlusion time, not the number of occlusions, is related to the deterioration of the pathological condition.

研究分野：ガスバイオロジー

キーワード：睡眠時無呼吸症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群 (Sleep Apnea Syndrome: SAS) は、低酸素反復曝露の結果、心血管系異常などをきたし、中枢性の無呼吸を端緒に突然死する場合もある。

SAS の病態は、従来、齧歯類を小容器に閉じ込め、窒素ガスを吹き込むことによる短時間の虚血再灌流反復による Intermittent Hypoxia(IH) で再現してきた。しかしながら、これまで様々な方法、プロトコルにて

Table 1: 過去に報告されたSASモデルのまとめ

大気下酸素濃度(%) / 吸入時間(s)	酸素濃度(%) / 吸入時間(%)	継続時間(h)	著者,年
21 / 30	10 / 10	10	Zhan et.al,2005
21 / 30	5 / 30	12	Li et.al,2005
21 / 300	5 / 5	8	Ying et.al,2006
21 / 40	5 / 20	6	Almendros et.al,2013
21 / 60~120	8 / 60~120	10	Jin et.al,2017

解析が行われており (Table 1) 明確なモデルの基準が確立されていなかった。さらに、ストレスの影響、コスト、動物数の制限等の問題があり実験が困難であった。吉田 (研究分担者) 等は、窒素ガス発生装置を用い、多数のラットを通常の cage 内で最小限のストレス下に長期間、低コストで、IH (底値 4~5%O<sub>2</sub> まで 90 秒、21%O<sub>2</sub> まで 90 秒、1 日 8 時間) 曝露する装置を開発した。この装置で IH 曝露すると、若年ラットでは、adrenalin 受容体依存性に肺高血圧を抑制されるが、中年 (ヒト相当) ラットでは、arginase 依存性に肺高血圧が発症することを見出した (Nagai H et al. 2014, 2015; Nara A et al. 2015)。また、肺高血圧の発症にも 5-HT 受容体が寄与しており、また、若年ラットには、IH が上気道を狭小化する顎骨変化を惹起し (Kuma Y et al, 2014) 上気道軟部組織には、cytokine 増加、筋肥厚を認めた。さらに、IH は若年ラットに自家消化 (autophagy) による変性蛋白処理を介して心収縮恒常性を保持 (autophagy 阻害により心不全誘発) していることを明らかにした (Maeda H et al, 2013)。

一方で、SAS の約 84% は、閉塞性睡眠時無呼吸症候群であり、睡眠時 (無意識下) に、突然の呼吸不全 (上気道閉塞) を繰り返す病態である。これまでは、覚醒時 (意識下) に、低酸素に曝露するモデルであり、実験動物の努力性呼吸を誘発するなど、閉塞性 SAS の病態を表現できていない可能性があった。本課題では、モデルの比較検討を行った。

2. 研究の目的

閉塞性 SAS モデルの検証と確立を行い、より病態に類似したプロトコルにて、解析を行う。

3. 研究の方法

以下の 2 つの観点にてモデルの比較検討を行った。

(1) 間歇的無酸素吸入と間歇的閉塞の比較

対象: C57BL/6 マウス

(8 週齢 ~ 10 週齢 21g ~ 28g)

方法: ペントバルビツール系麻酔薬を

腹腔内注射 (0.648mg/g)

呼吸回数が 80~120 回/min に安定した

のを確認し、実験開始

評価: 呼吸回数の計測

実験群: 閉塞群、無酸素吸入群は 10 秒ごとに閉塞もしくは、無酸素を施行する (図 1)

覚醒時 (意識下) 閉塞群は、動物愛護の観点から施行しなかった。

(2) 閉塞時間が SAS の病態に与える影響の検討

対象、方法、評価は (1) と同様に行う

実験群: 10 秒、20 秒、30 秒の閉塞時間にて比較検討を行う。呼吸可能時間は、閉塞時間と同じ時間とする (図 2)。

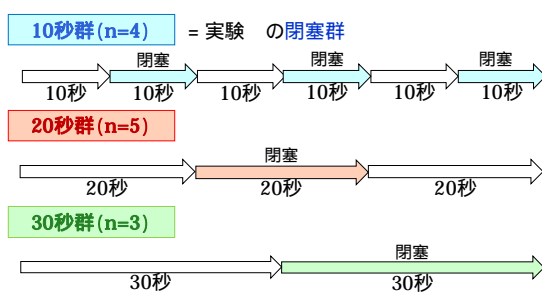


図 1

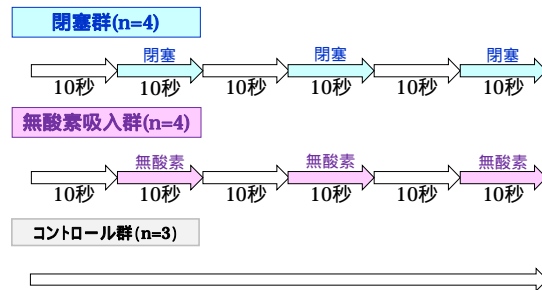


図 2

#### 4. 研究成果

##### 1) 間歇的無酸素吸入と間歇的閉塞の比較

1200 秒まで、観察を行った結果、コントロールおよび、閉塞群は呼吸停止には至らなかった。一方で、無酸素吸入群は急激に呼吸数が低下し、平均 285 秒で呼吸停止に至った (図 3)。

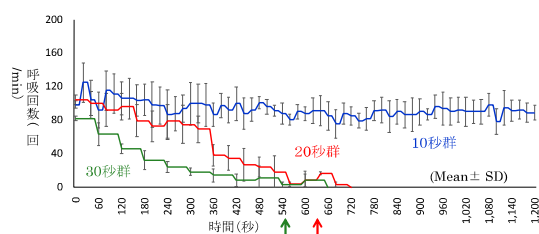


図 3 閉塞群と無酸素吸入群の比較  
赤矢印は無酸素吸入群における平均呼吸停止時間 (285 秒) を示す。

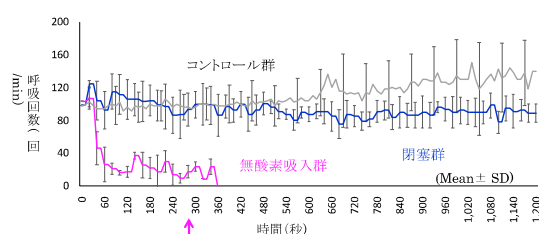


図 4 閉塞群時間の検討  
赤矢印は 20 秒群、緑矢印は 30 秒群における平均呼吸停止時間 (それぞれ 636 秒、550 秒) を示す。

##### (2) 閉塞時間が SAS の病態に与える影響の検討

10 秒群では呼吸停止に至らないのに対し、20 秒、30 秒群は徐々に呼吸数が低下し、それぞれ平均 636 秒・平均 550 秒で、呼吸停止に至った (図 4)。

##### (3) 新たなモデルにおける H<sub>2</sub>S 産生酵素、5-HT 受容体の、呼吸中枢、化学受容器における局在の解析

過去の研究の報告によると、神経上皮細胞 (neuroepithelial cells, NECs) の H<sub>2</sub>S 産生酵素遺伝子の欠損により低酸素時の呼吸促進が抑制され (Porteus CS et al., 2014)、頸動脈体では、低酸素による CBS・CSE 由来 H<sub>2</sub>S 産生が増加し、換気が増強される (Kemp PJ et al., 2014)。さらに、気道末梢の NECs は 5-HT 分泌を介して低酸素・高炭酸に対する心呼吸反応を開始する (Perry SF et al., 2015)。このように、中枢・末梢の化学受容体、延髄呼吸中枢において、H<sub>2</sub>S と 5-HT が低酸素刺激を感受し、mediator として呼吸を促迫している可能性が高い。現在、新たに立ち上げた閉塞性 SAS モデルにて H<sub>2</sub>S 産生酵素、5-HT 受容体の、呼吸中枢、化学受容器における局在の解析を行っている。

#### 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 14 件)

Kei Hayashida, Aranya Bagchi, Yusuke Miyazaki, Shuichi Hirai, Divya Seth, Michael G Silverman, Emanuele Rezoagli, Eizo Marutani, Naohiro Mori, Aurora Magliocca, Xiaowen Liu, Lorenzo Berra, Allyson G Hindle, Michael W. Donnino, Rajeev Malhotra, Matthews O. Bradley, Jonathan S. Stamler and Fumito Ichinose. Improvement in Outcomes After Cardiac Arrest and Resuscitation by Inhibition of S-Nitrosoglutathione Reductase. *Circulation*. Feb 5;139(6):815-827. 2019.

Manabu Kakinohana, Eizo Marutania, Kentaro Tokuda, Kotaro Kida, Shizuko Kosugi, Shingo Kasamatsu, Aurora Magliocca, Kohei Ikeda, Shinichi Kai, Masahiro Sakaguchi, Shuichi Hirai, Ming Xian, Masao Kaneki and Fumito Ichinose. Breathing hydrogen sulfide prevents delayed paraplegia in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. Feb 1;131:243-250. 2019.

Naoyuki Hatayama, Shuichi Hirai (corresponding author), Munekazu Naito, Hayato Terayama, Jun Araki, Hiroki Yokota, Masayuki Matsushita, Xiao-Kang Li and Masahiro Itoh. Preservation of rat limbs by hyperbaric carbon monoxide and oxygen. *Scientific Reports*. 26;8(1):6627. 2018.

Hayato Terayama, Shuichi Hirai (equal contribution), Munekazu Naito, Ning Qu, Chiaki Katagiri, Kenta Nagahori, Shogo Hayashi, Hiraku Sasaki, Shota Moriya, Masaki Hiramoto, Keisuke Miyazawa, Naoyuki Hatayama, Zhong-Lian Li, Kou Sakabe, Masayuki Matsushita and Masahiro Itoh. Specific autoantigens identified by sera obtained from mice that are immunized with testicular germ cells alone. *Scientific Reports*. 18:6:35599. 2016.

Kohei Ikeda, Xiaowen Liu, Kotaro Kida, Eizo Marutani, Shuichi Hirai, Masahiro Sakaguchi, Lars W. Andersen, Aranya Bagchi, Michael N. Cocchi, Katherine M. Berg, Fumito Ichinose and Michael W. Donnino. Thiamine as a neuroprotective agent after cardiac arrest. *Resuscitation*. 105:138-144. 2016.

～ 共著 9 件。いずれも査読あり。

〔学会発表〕(計23件)

加藤佑啓, 梅本佳納榮, 大矢祐輔, 畑山直之, 平井宗一, 内藤宗和, 中野隆. 閉塞性睡眠時無呼吸症候群病態解析のための無意識下間歇的気道閉塞モデルの確立. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018.

畑山直之, 平井宗一, 横田紘季, 矢倉富子, 福重香, 中野隆, 内藤宗和. 高圧ガスを用いた新たな移植臓器の保存方法. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018.

～⑳ 共同発表

〔産業財産権〕

取得状況(計4件)

名称: 生体材料の保存方法、生体材料の生産方法、生体材料、移植材料、移植方法および生体材料の保存装置

発明者: 畑山直之、内藤宗和、平井宗一、伊藤正裕

番号: 特開2018-16654(P2018-16654A)

取得年月日: 2018年2月1日

国内外の別: 国内

名称: 組成物、甘味付組成物、風味改善組成物、微小気泡を含む対象物の製造方法、甘味付与方法、風味改善方法、飲食品、および飲食品の製造方法。

発明者: 畑山直之、内藤宗和、平井宗一、坂上茂樹。

番号: 特願2018-226902。

国内外の別: 国内

名称: 生体材料保存組成物、生体材料の保存方法、生体材料の生産方法、移植材料、および移植方法。

発明者: 畑山直之、内藤宗和、平井宗一、坂上茂樹。

番号: 特願2018-105405。

国内外の別: 国内

名称: 組成物、細胞保存組成物、細胞培養組成物、細胞製剤、微小気泡を含む対象物の製造方法、細胞の保存方法、細胞の培養方法、および細胞製剤の製造方法。

発明者: 畑山直之、内藤宗和、平井宗一、坂上茂樹。

番号: 特願2018-105404。

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井宗一 (Shuichi Hirai)

愛知医科大学・医学部・教授(特任)

研究者番号: 70516054

(2) 研究分担者

吉田謙一 (Yoshida Kenichi)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号: 40166947

前田秀将 (Maeda Hideyuki)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60407963

畑山直之 (Hatayama Naoyuki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80534792