

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：平成 19 年度～平成 21 年度

課題番号：19390226

研究課題名（和文） 睡眠時無呼吸における低酸素ストレスは全身性炎症を惹起し動脈硬化を促進させる

研究課題名（英文） Hypoxic stress in sleep apnea causes systemic inflammation and promotes atherosclerosis.

研究代表者 木村 弘 奈良県立医科大学・医学部・教授
(20195374)

研究成果の概要（和文）：

閉塞型睡眠時無呼吸症候群（OSAS）患者では心血管疾患の合併が高率に認められる。しかし粥状硬化病変の形成機序は今まで明確にされていなかった。今回のわれわれの研究では、OSAS 患者において末梢血単球からの炎症性メディエーター産生が亢進しており、実験的血管壁モデルに対する単球の浸潤能も亢進していた。また可変式の低酸素曝露装置を用いた検討では、間歇的低酸素刺激によりヒト単球細胞の炎症性サイトカイン産生能の亢進、ラット内臓脂肪細胞からのアディポサイトカイン・ケモカインの分泌障害がもたらされることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is frequently associated with the complication of the cardiovascular diseases. However, the precise mechanism causing atherosclerosis has not been fully elucidated. We demonstrated that the productions of inflammatory mediators such as TNF- α and MCP-1 by monocytes were significantly elevated in OSAS patients as compared to in the control subjects. The invasive ability of monocytes evaluated by Matrigel Invasion Chamber was also significantly elevated in OSAS compared to in the control. Furthermore, we demonstrated the experimental exposure to intermittent hypoxia caused not only the increase in the production of inflammatory cytokines by monocytes, but also the decrease in the secretion of adipocytokines by visceral adipocytes of rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：睡眠時無呼吸、低酸素ストレス、動脈硬化、単球、炎症性サイトカイン、アディポサイトカイン、間歇的低酸素、内臓脂肪細胞

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群のうち中年肥満者に特徴的な閉塞型睡眠時無呼吸症候群(OSAS)は高血圧症や虚血性心疾患の独立した危険因子であることが、近年 NIH の大規模疫学調査で明らかになった (Shahar E et al. AJRCCM, 2001)。わが国においてもメタボリック症候群の危険因子として、男性では OSAS の存在が重要であることが 2006 年になり報告された (Sasanabe R et al. Hypertension Res 29:315-322, 2006)。このような中で、われわれは頸動脈の内膜中膜肥厚度の評価から、『OSAS における睡眠時低酸素血症は動脈硬化の独立した危険因子である』ことを報告するとともに (Suzuki T, Kimura H et al. Sleep 27:129-133, 2004)、『睡眠時無呼吸に起因する低酸素血症のゆらぎの頻度 (oxygen desaturation index: ODI) が睡眠時の酸化ストレスと関連する』ことを明らかにした (Yamauchi M, Kimura H et al. Chest 127:1674-1679, 2005)。これらの研究と並行して、われわれは動脈硬化の発症進展に関連する因子としての単球/M ϕ 機能に注目した。本研究計画を推進するにあたっての基礎データとして、少数例の preliminary report ではあるが、OSAS の重症患者では健常者に比べて、早朝起床時に採取した末梢血単球の TNF- α 産生能は単球中の転写因子 NF κ B 活性とともに高値であることを報告した (Yamauchi M, Kimura H et al. Sleep and Breathing 10:189-203, 2006)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OSAS と動脈硬化病変の関連病態を包括的に解析するために、以下の事項を明らかにすることを目的とした。

- (1) 睡眠時無呼吸が炎症性機序を介して動脈硬化の発症・増悪要因となる。
- (2) 睡眠時の低酸素刺激が末梢血単球および内臓脂肪細胞に対して全身性炎症、さらには動脈硬化病変につながる機能変化を惹起する。
- (3) CPAP 治療による低酸素ストレスからの回避は抗動脈硬化作用の観点からも意義がある。

3. 研究の方法

(1) OSAS 患者における末梢血単球からの炎症性メディエーター産生能の検討

①対象は polysomnography (PSG) で診断した OSAS 患者 33 例と健常対照 13 例。患者群は apnea-hypopnea index (AHI) 30 以上の重症群 20 例と 30 未満の軽中等症群 13 例に分類した。年齢は健常群において低値で、BMI は OSAS 重症群で高値であった。PSG は Alice 4[®] (Respironics 社製) で行い、睡眠時低酸素

は AHI、Lowest SpO₂ および SpO₂ < 90% の total sleep time (TST) に対する比率 (%time in SpO₂ < 90%) で評価した。AHI、ODI、%time in SpO₂ < 90% は重症群において有意に高値で、Lowest SpO₂ は有意に低値であった。

②PSG 施行後、翌朝 6 時 30 分にヘパリン加採血を行った。検体採取後直ちにプラスチック付着法で単球を分離し、細胞数を 2.5×10^6 /ml に調整後、LPS $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の刺激下で 24 時間培養し、培養上清中の TNF- α 、MMP-9、MCP-1 濃度を ELISA 法で測定した。また、CPAP 治療を 3 ヶ月以上行っている重症群 10 例に対し、再度、同様の検討を行った。

(2) OSAS 患者における末梢血単球の浸潤能の検討

①対象は男性 OSAS 患者 21 例 (平均年齢 42.4 ± 5.9 歳、BMI $28.1 \pm 3.8 \text{kg}/\text{m}^2$) で、健常男性 17 例 (平均年齢 39.9 ± 7.0 歳、BMI $26.2 \pm 2.8 \text{kg}/\text{m}^2$) と比較検討した。OSAS 群の AHI は 52.0 ± 29.0 で、連続 89 症例のなかで女性および高血圧・糖尿病・脂質異常症などで治療中の症例、または本研究に対する同意が得られなかった症例は除外した。AHI、ODI、%time in SpO₂ < 90% は OSAS 群において有意に高値で、Lowest SpO₂ は有意に低値であった。

②早朝 6 時 30 分にヘパリン加採血を行い、直ちに単球を分離し、細胞数を 0.5×10^6 個に調整した。細胞外基質であるマトリゲルでコートした $8 \mu\text{m}$ ポアサイズのセルカルチャーインサートを実験的血管壁モデルとし、上層に単球浮遊液を撒布し、下層に誘因物質として酸化 LDL $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、37°C 5%CO₂ 下で 24 時間培養を行った。メンブレン下面に浸潤した細胞数を顕微鏡下でカウントし、浸潤能として評価した。

(3) 間歇的低酸素刺激がヒト単球細胞からのサイトカイン産生能に及ぼす影響

①健常人 20 例からヘパリン加採血を行い、検体採取後直ちにプラスチック付着法で単球を分離し、細胞数を 0.5×10^6 /well に調整した。

②単球細胞は可変式の低酸素培養装置 (ワケン電子 9200E SP) を使用し、1) 21%O₂ 下培養 (normoxia, N 群) (2) 1%O₂ 5 分、21%O₂ 10 分の間歇的低酸素培養 (intermittent hypoxia, IH 群) (3) 1% O₂ での持続的低酸素培養 (sustained hypoxia, SH 群) の各群に分類し 5 時間 LPS 無刺激および刺激下で培養を行い、培養上清中の TNF- α 濃度を ELISA 法により測定した。その後単球細胞を計 24 時間まで下記の如く各条件下で LPS 無刺激および刺激下で培養を行った。21%O₂ 下培養は 24 時間継続し (N \rightarrow N 群)、IH、SH 群では normoxia

環境に移し (IH→N 群、SH→N 群)、SH で 24 時間を継続する群も作成した (SH→SH 群)。各群での培養上清中の TNF- α 濃度を ELISA 法により測定した。

(4) 間歇的低酸素曝露が内臓脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生能に及ぼす影響

ラット腸間膜由来内臓脂肪を前駆細胞から 4 日間培養し可変式の低酸素培養装置 (ワケン電子 9200E SP) を用いて、(1) 21%O₂ 下培養 (normoxia, N) (2) 1%O₂ 5 分、21%O₂ 10 分の間歇的低酸素培養 (intermittent hypoxia, IH) (3) 1% O₂ での持続的低酸素培養 (sustained hypoxia, SH) の各条件下で 5 時間培養を行い、その後 N→N 群、IH→N 群、SH→N 群、SH→SH 群に分類し計 24 時間培養を行った。培養上清中のアディポネクチン (APN)、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 濃度を ELISA 法で測定し、各群間での比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) OSAS 患者における末梢血単球からの炎症性メディエーター産生能の検討

①末梢血単球からの炎症性メディエーター産生能を、それぞれの群で睡眠前後での変動について検討した。TNF- α 産生能は、重症 OSAS 群でのみ睡眠後早朝に亢進していた (図 1)。MCP-1 産生能および MMP-9 産生能も同様に、重症 OSAS 群でのみ睡眠後早朝に亢進していた。TNF- α 産生能は AHI、ODI、%time in SpO₂<90% と有意な正の相関を示し、Lowest SpO₂ とは有意な負の相関を示した。

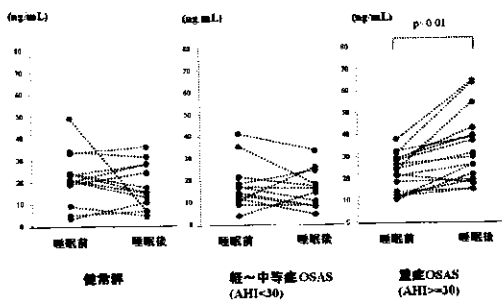


図1. TNF- α 産生能

②各メディエーターの産生能について、年齢および肥満度で補正し各群間の比較を行った。TNF- α 、MCP-1、MMP-9 産生能は重症 OSAS 群で、健常群、軽中等症群と比較して有意に高値であった (図 2)。

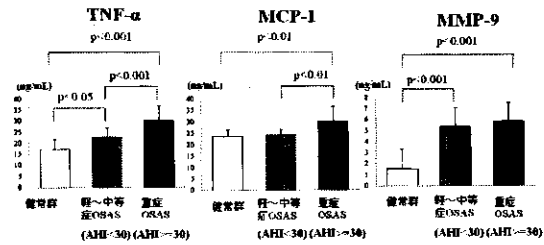


図2. 年齢および肥満度で補正後の炎症性メディエーター産生能

③重症 OSAS 群では、3 か月間の長期 CPAP 治療を行った後の各メディエーターの産生能について検討した。TNF- α 、MCP-1、MMP-9 産生能は治療後に有意に低下していた (図 3)。

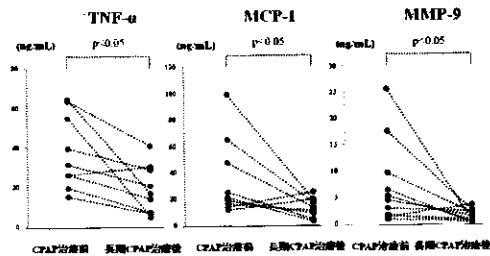
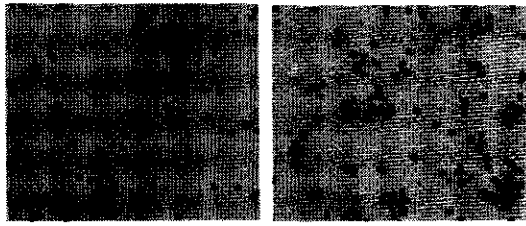


図3. 長期CPAP治療効果

単球から産生される炎症性メディエーターは OSAS 患者では睡眠時低酸素ストレスにより亢進しており、動脈硬化発症の一因となる可能性が示唆された。また CPAP 治療は単球からの過剰な炎症性メディエーターの産生を抑制することにより、動脈硬化の進展を制御する効果も期待しうると考えられた。

(2) OSAS 患者における末梢血単球の浸潤能の検討

①重症 OSAS 患者では健常人に比べ明らかに多くの細胞浸潤を認めており、細胞形態も大型化しておりマクロファージへの分化傾向を認めていた (図 4)。



健常人
(41歳、男性、AHI 1.9)

重症OSAS患者
(42歳、男性、AHI 58.0)

図4. 浸潤細胞

②単球浸潤能は OSAS 群および健常群とも喫煙者・非喫煙者では明らかな差を認めなかった。OSAS 群では健常群に比べて浸潤能は有意に高値であった(図5)。睡眠前後で検討すると、OSAS 群では睡眠後早朝に浸潤能は亢進していた(図6)。また浸潤能は夜間低酸素のゆらぎを示す ODI と正の相関を示した(図7)。短期 CPAP の治療効果を検討すると、CPAP 治療後に浸潤能は有意に低下していた。

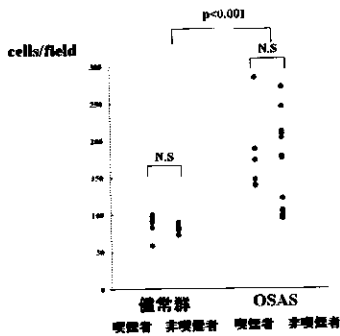


図5. 単球浸潤能

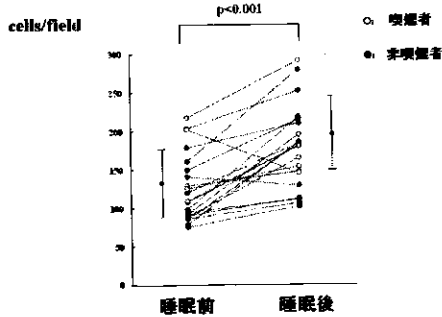


図6. 単球浸潤能の睡眠前後での変動

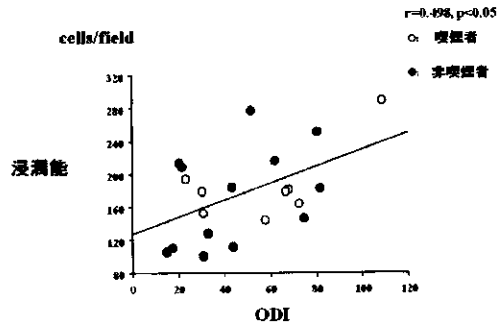


図7. 浸潤能とODIとの相関

動脈硬化病変の形成において、単球・マクロファージの血管内皮への接着および遊走・浸潤は重要な過程である。今回われわれは独創的な動的機能の評価方法を用いて、OSAS 患者では睡眠時低酸素ストレスによって単球の浸潤能が亢進することを明らかにした。OSAS においては炎症性メディエーターの産生亢進のみならず、炎症細胞自体の動的機能の亢進により動脈硬化病変が形成されると考えられる。

(3) 間歇的低酸素刺激がヒト単球細胞からのサイトカイン産生能に及ぼす影響

①曝露後 5 時間の TNF- α 自然産生能では各群間で有意差は認めなかった。LPS 刺激下では IH 群で N 群に比べて TNF- α 産生能が亢進していた。

②24 時間培養を継続した検討では、TNF- α 自然産生能では各群間で有意差は認めなかった。LPS 刺激下培養では、TNF- α 産生能は IH \rightarrow N 群で他の群に比べて亢進していた(図8)。

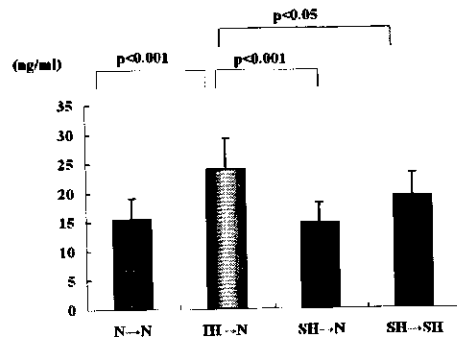


図8. TNF- α 産生能(24時間後 LPS刺激下)

OSAS における低酸素/再灌流ストレスがもたらす病態を明らかにするため、主に動物実験を用いて検討が行われてきた。今回われわれは健常人由来の単球を用いて、低酸素ストレスがサイトカイン産生能に及ぼす影響を明らかにするため低酸素曝露様式を変更して検討を行った。今回の検討で間歇的低酸素曝露によりヒト単球からの炎症性サイトカ

イン産生能が亢進することが示唆された。その反応は LPS 刺激下培養で顕著であったが、LPS は Toll-like receptor 4 に結合して転写因子である NF- κ B の活性化をもたらし、間歇的低酸素刺激により単球の LPS に対する反応性も亢進していると考えられた。

(4) 間歇的低酸素曝露が内臓脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生能に及ぼす影響

①内臓脂肪からの APN 産生能: 24 時間持続的低酸素を行う SH→SH 群では、各群に比べて有意な低下を認めた。IH→N 群では N→N 群、SH→N 群と比較し、APN 産生能の有意な低下を認めた (図 9)。

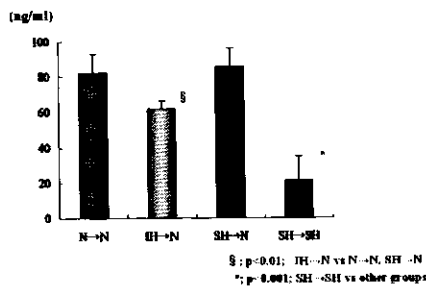


図9. ラット内臓脂肪細胞からのAPN産生能

②内臓脂肪からの MCP-1 産生能: SH→SH 群では、各群に比べて有意な低下を認めた。IH→N 群では N→N 群、SH→N 群と比較すると MCP-1 産生能の有意な低下を認めた (図 10)。

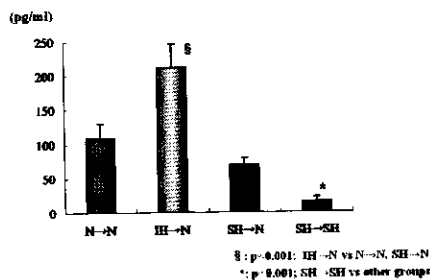


図10. ラット内臓脂肪細胞からのMCP-1産生能

今回の検討では持続的低酸素曝露を継続した群で APN および MCP-1 産生能の低下が認められた。低酸素曝露の持続により脂肪細胞からの分泌不全がもたらされた可能性もあると考える。

一方、間歇的低酸素を行った群で APN の産生低下およびケモカイン産生の亢進がみられた。OSAS における夜間低酸素ストレスが単球/マクロファージのみならず内臓脂肪細胞にも影響を及ぼしメタボリックシンドロームの病態・動脈硬化病変の形成に深く関与し

ている可能性が示唆された。

今後はさらに細胞生物学的手法、遺伝子学的的手法を用いて睡眠時無呼吸症候群における動脈硬化の発症・進展機序を明らかにするとともに、心血管イベントの基盤病態としてのメタボリックシンドロームを合併するメカニズムを解明していく予定である。

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 7 件)

① Tamaki S, Yamauchi M, Fukuoka A, Makinodan K, Koyama N, Tomoda K, Yoshikawa M, Kimura H. Production of inflammatory mediators by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Internal Medicine. 査読あり, 2009; 48: 1255-1262.

② Tamaki S, Yamauchi M, Fukuoka A, Makinodan K, Koyama N, Tomoda K, Yoshikawa M, Kimura H. Nocturnal hypoxic stress activates invasive ability of monocytes in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. Respirology. 査読あり, 2009; 14:689-694.

③ Takegami M, Hayashino Y, Chin K, Sokejima S, Kadotani H, Akashiba T, Kimura H, Ohi M, Fukuhara S. Simple four-variable screening tool for identification of patients with sleep-disordered breathing. Sleep. 査読あり, 2009; 32:939-948

⑤ 山内基雄, 木村 弘. 内分泌疾患と睡眠呼吸障害. Modern Physician. 査読なし, 2009; 29:1149-1151.

⑥ 山内基雄, 木村 弘. 睡眠時無呼吸の薬物療法と新薬の展開. 最新医学. 査読なし, 2009; 64:89-93.

⑦ Yamauchi M, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea: putative pathways to the cardiovascular complications. Antioxid Redox Signal. 査読あり, 2008; 10:755-768.

⑧ Makinodan K, Yoshikawa M, Fukuoka A, Tamaki S, Koyama N, Yamauchi M, Tomoda K, Hamada K, Kimura H. Effect of serum leptin levels on hypercapnic ventilatory response in obstructive sleep apnea. Respiration. 査読あり, 2008; 75:257-364.

[学会発表] (計 11 件)

① Yamauchi M, Kimura H, et al. Should mixed apnoea be classified with obstructive apnea? European Respiratory Society Annual Congress. 2009 年 9 月 15 日, Vienna, Austria.

- ② Ota H, Kimura H, et al. Intermittent hypoxia-specific express of CCL2, CXCL9, and CXCL10 genes via NFkappaB activation in pancreatic beta cells. 45th Annual meeting of European Association for the Study of Diabetes. 2009年9月30日, Vienna, Austria.
- ③ Yamauchi M, Kimura H, et al. Should mixed apnoea be classified with obstructive apnea? The 11th International Symposium on Sleep & Breathing. 2009年9月12日, Pittsburg, USA.
- ④ 児山紀子, 木村 弘, 他7名. 臍帯静脈血管内皮細胞における間歇的低酸素曝露によるvon Willebrand factorの変化の検討. 第49回日本呼吸器学会学術講演会. 2009年6月14日, 東京.
- ⑤ 玉置伸二, 木村 弘, 他8名. 閉塞型睡眠時無呼吸症候群/肥満低換気症候群におけるメタボリックシンドローム合併症例の検討. 第49回日本呼吸器学会学術講演会. 2009年6月13日, 東京.
- ⑥ 山内基雄, Strohl Kingman, 木村 弘. S pontaneous apneaとPost-sigh apneaに対するセロトニン1A受容体アゴニストの効果. 第49回日本呼吸器学会学術講演会. 2009年6月13日, 東京.
- ⑦ 玉置伸二, 木村 弘, 他7名. 間歇的低酸素曝露が内臓脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生能に及ぼす影響. 第48回日本呼吸器学会学術講演会. 2008年6月15日, 神戸.
- ⑧ Kimura H. Sleep disordered breathing and hypoxic adaptation. (Scientific symposium) American Thoracic Society 2008. 2008年5月18日, Toronto, Canada.
- ⑨ Tamaki S, Kimura H, et al. Intermittent hypoxia activates production of inflammatory cytokines by monocytes. Thoracic Society 2008. 2008年5月18日, Toronto, Canada.
- ⑩ 玉置伸二, 木村 弘, 他6名. OSAにおける低酸素ストレスと動脈硬化病変. 日本睡眠学会第32回定期学術集会シンポジウム. 2007年5月12日, 東京.
- ⑪ 玉置伸二, 木村 弘, 他7名. 間歇的低酸素曝露がヒト単球細胞からのサイトカイン産生能に及ぼす影響. 第47回日本呼吸器学会総会. 2007年5月12日, 東京.

[図書] (計1件)

- ① 玉置伸二, 木村 弘. 睡眠時無呼吸症候群-SAS と全身性炎症. 克誠堂出版. 2009年: 82-87.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
木村 弘 (Kimura Hiroshi)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20195374
- (2) 研究分担者
玉置 伸二 (Tamaki Shinji)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30347546
- (3) 研究分担者
山内 基雄 (Yamauchi Motoo)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30405378
- (4) 研究分担者
友田 恒一 (Tomoda Koichi)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90364059
- (5) 研究分担者
吉川 雅則 (Yoshikawa Masanori)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80271203
- (6) 研究分担者
濱田 薫 (Hamada Kaoru)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80228535
- (7) 研究分担者
牧之段 潔 (Makinodan Kiyoshi)
奈良県立医科大学・医学部・医員
研究者番号: 50382304