

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10223

研究課題名(和文)セロトニンを標的とした小児睡眠時無呼吸症モデル動物における軟骨性骨形成障害の検証

研究課題名(英文)Validation of serotonin-targeted cartilaginous bone dysplasia in pediatric sleep apnea animal model

研究代表者

細道 純 (Hosomichi, Jun)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00420258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児の閉塞性睡眠時無呼吸症(OSA)患者において小下顎症は頻発するが、そのメカニズムは不明であった。小児OSAの主徴である間欠的低酸素(IH)状態を再現した病態モデルラットを確立し、IH曝露が、軟骨増殖を促す成長因子トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)、転写因子(SOX9)の発現減少を介して、下顎の軟骨性成長を障害することをつきとめた。また、IH曝露による交感神経 β 2受容体の活性化に着目し、病態モデルラットへの β 2受容体の遮断薬の投与が、脂肪細胞産生ホルモンであるレプチンの分泌増加、セロトニンおよび成長ホルモンの分泌減少とともに生じる下顎骨の成長障害を改善することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は、IH曝露に伴う顎顔面成長障害の新たな病態機構を示すとともに、小児OSA患者における顎の形や大きさの不調和に対する治療法開発の糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Activation of the sympathoadrenal system is associated with sleep apnea-related symptoms and metabolic dysfunction induced by chronic intermittent hypoxia (IH). IH can induce hormonal imbalances and growth retardation of the craniofacial bones. However, the relationship between IH and β 2-adrenergic receptor signaling in the context of skeletal growth regulation is unclear. This study aimed to investigate the role of β 2-adrenergic receptors in IH-induced mandibular growth retardation and bone metabolic alterations. Recovery of RANKL expression was observed in IH-exposed rats administered with butoxamine. Collectively, our findings suggest that the activation of β 2-adrenergic receptors and leptin signaling during growth may be involved in IH-induced skeletal growth retardation of the mandible, which may be mediated by concomitant changes in RANKL expression at the growing condyle.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：閉塞性睡眠時無呼吸症 小児 交感神経 骨軟骨代謝 間欠的低酸素状態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉塞性睡眠時無呼吸症 (Obstructive Sleep Apnea; OSA) は、寝ている間に空気の通り道である上気道が閉塞し、いびきとともに何回も呼吸が止まることを繰り返す疾患である。小児においては、神経発達障害、また、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病とともに、成長遅延 (Sleep Med Clin 2019; 14:13) を誘発することから、小児医療における大きな問題となる。小児 OSA 患者は、全身の成長遅延とともに、下顎骨の低成長 (小下顎症) や歯列の狭窄を呈することから、小児 OSA と顎骨の成長障害の両者を結ぶメカニズムの存在が予測されているが、小児 OSA における骨成長障害の発症・進展の詳細なメカニズムについては、未だ不明な点が多く残されている。また、未熟な乳幼児 OSA 患者は、軟骨性骨化で形成される胸骨や肋骨の低形成 (胸郭狭窄) とともに、小下顎症などの顎顔面の軟骨性成長障害を示し、乳幼児突然死症候群の発症の一因の可能性が指摘されている。小児 OSA において睡眠中に反復される呼吸の停止と再開は、夜間の間欠的低酸素 (Intermittent Hypoxia; IH) 血症を生み出し、睡眠の分断化や質の低下のみならず、酸化ストレスや交感神経系の興奮を介して、さまざまな生活習慣病の病態を生み出す。また、間欠的低酸素への曝露は、成長に関わるホルモンの分泌減少を招き、成長低下をもたらす可能性が考えられる。

小児 OSA の先行研究により、成長期の呼吸障害は、成長発達の段階に応じて異なる病態を示すことが知られているが、1) IH 曝露に対する下顎骨成長の感受性の高い時期、2) IH 曝露による軟骨性成長の障害機序は解明されていない。また、交感神経 2 受容体は、軟骨代謝を促す TGF- β や SOX-9 の発現を抑制することが知られている。しかしながら、小児 OSA における交感神経系の亢進が骨軟骨代謝を阻害し、成長を障害するかどうかを検証し、小児 OSA における成長障害の病態の全容を明らかにした報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究は、小児睡眠時無呼吸症モデル動物の骨軟骨代謝および成長の障害の解明を大きな目的とし、具体的には、以下の 5 点について検証を行う。

- 1) 顎骨・下肢骨を対象とした IH 曝露による骨成長障害の部位特異性の検証
- 2) IH 曝露に対する下顎骨成長の感受性の高い時期の検証
- 3) 交感神経 2 受容体の亢進を介した骨成長障害の解析
- 4) IH 曝露による軟骨代謝への影響の検証
- 5) IH 曝露による学習発達障害の基礎研究

3. 研究の方法

1) 小児睡眠時無呼吸症モデル動物の作製

酸素ガスおよび窒素ガスの発生装置、ガス混合装置を接続した飼育チャンバーを用いて、1 日 8 時間、1 時間に 20 サイクルの間隔で、酸素濃度を 4% から 21% に変化させる IH 状態を実験的に再現する。動物は、IH 状態で飼育する「IH 曝露群」および大気下で飼育する「対照群」の 2 群とする。IH 曝露群は、仔ラットを、9 時 ~ 17 時の 8 時間/日に、酸素濃度が 1 時間に 20 サイクルの間隔で、4-21% に変化する IH 環境を再現した飼育ケージ内にて 1 週間飼育し、マイクロ CT 撮影により成長障害を確認する。小児 OSA は、性差による影響の差があるため、雄・雌の双方において比較検証する。

なお、生後 3 週齢以下の仔ラットの場合、授乳する母ラットとともに、同じケージ内で飼育するとともに、IH 曝露下では、食餌量が健常動物に比べて減少する可能性があり、授乳する母ラットからの栄養が等しくなるように、同量の粉末飼料を両群の母ラットに与える。

2) IH 曝露ラットの全身病態の評価およびホルモンの発現量の解析

動物モデルは全飼育期間にわたり、週 1 回、血圧測定、心エコーによる循環機能の評価、パルスオキシメーターによる末梢血酸素飽和度の測定を継続的に行う。IH 曝露期間の終了時、末梢血液一般の血液解析のため、麻酔下にて尾静脈血を採血する。

3) 顎骨・下肢骨を対象とした IH 曝露による骨成長障害の部位特異性の検証

IH 曝露期間終了後、麻酔下にて安楽死をおこない、頭部と脛骨を採取し、頭部 X 線規格写真撮影による頭部および脛骨の形態評価による成長の比較を行い、また、マイクロ CT 撮影による骨密度の解析を実施し、IH 曝露による骨成長障害の部位特異性を検証する。

4) IH 曝露に対する下顎骨成長の感受性の高い時期の検証

離乳期 (幼年期) および青年期の IH 曝露ラットを用いて、IH 曝露が誘発する下顎骨成長障害の成長段階による影響を比較するため、離乳期である 3 週齢と青年期である 7 週齢の SD 系雄性ラットを、各々 3 週間、IH 曝露下で飼育し、実験群 (IH 曝露群) と通常大気下で飼育したラットを対照群 (N 群) の成長量の比較とともに、成長骨末端の組織生化学解析をおこなう。

5) 交感神経 受容体の亢進を介した骨成長障害の解析

IH 曝露による顎骨成長の障害の機序を解明するため、生後 7 週齢の SD 系雄性ラットを用いて、セロトニンの下流である交感神経 2 受容体に対する遮断薬(ブトキサミン)の投与モデルを作製し、3 週間の IH 曝露期間後、マイクロ CT による下顎骨および下肢骨の骨成長の評価および組織生化学的解析をおこなった。

6) IH 曝露による軟骨代謝への影響の検証

軟骨代謝が著しい 1 週齢の乳児ラットを対象とし、1 週間の IH 曝露実験を行った後、下顎骨および脛骨を採集し、顎関節末端および脛骨末端の組織学的解析および生化学的解析をおこなった。

7) IH 曝露による学習発達障害の基礎研究

1 週齢の乳児ラットを対象とし、2 週間の IH 曝露実験を行うとともに、オープンフィールドテスト、Y 字迷路試験、明暗箱試験による仔ラットの行動解析、また、組織生化学的解析および遺伝子発現解析をおこなった。

4. 研究成果

はじめに、酸素ガスおよび窒素ガスの発生装置、ガス混合装置を接続した飼育チャンバーを用いて、1 日 8 時間、1 時間に 20 サイクルの間隔で、酸素濃度を 4% から 21% に変化させる IH 状態を実験的に再現し、3 週齢(幼年期)と 7 週齢(青年期)の SD 系雄性ラットを、各々 3 週間、IH 曝露下で飼育し、実験群(IH 群)と通常大気下で飼育したラットを対照群(N 群)の成長量を比較した結果、青年期においては、対照群と比較して、IH 群の下顎骨の後方部の長さおよび全長は有意に減少し、また、RANKL 発現の減少とともに、骨末端の骨密度の増加が明らかになった。一方、四肢骨の一部である脛骨においては、実験群および対照群との間での有意な成長量の違いは認められなかった。

また、青年期の IH 曝露ラットのホルモンの発現量の解析より、IH 曝露による成長期ラットにおける成長ホルモン(Growth Hormone)の血中濃度の減少が認められ、成長障害の背景の一つとして、成長ホルモンの分泌低下の可能性が示唆された。

次に、IH 曝露による軟骨性骨形成障害の検証を目的に、乳児 OSA の睡眠呼吸病態を再現した生後 1 週齢ラットモデルの下顎頭軟骨を解析対象とした研究において、SOX9 mRNA の発現低下とともに、増殖軟骨の減少および石灰化軟骨の増加が顕著に誘発され、乳児期の下顎骨成長が阻害されることを、国内外で初めて報告し、東京医科歯科大学から国際プレスリリースをされた。

図 1 下顎頭のマイクロ CT 画像

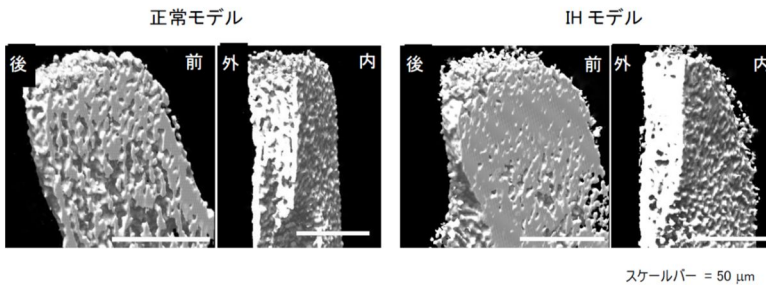


図 2 下顎頭組織像(黄色矢印は軟骨層を示す)

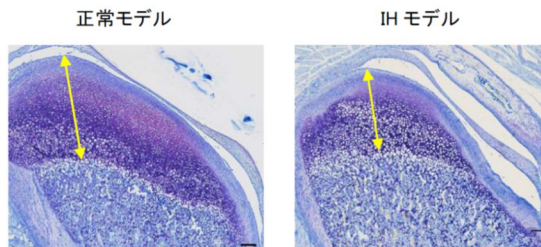
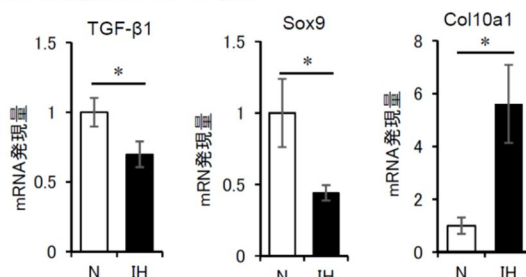


図 3 軟骨組織の遺伝子発現解析(定量 PCR 解析)



さらに、小児 OSA の呼吸病態を再現した間欠的低酸素曝露の成長期ラットに対して、骨組織に多く存在する交感神経 β 受容体に対する選択的遮断薬（ブトキサミン）の投与実験を行い、小児睡眠呼吸障害における交感神経系の変調と下顎骨成長との関与を詳しく解析した結果、小児 OSA に見られる IH 状態を再現した成長期ラットモデルを用い、全身病態の鍵の一つである β 受容体の活性化に対して、 β 受容体遮断薬の投与を行い、レプチンの分泌増加、セロトニンおよび成長ホルモンの分泌減少を伴う下顎の成長障害からの回復を初めて証明され、交感神経 β 受容体遮断薬の投与が、IH 曝露により抑制された下顎骨の軟骨性成長を回復させることを報告し、東京医科歯科大学から国内プレスリリースをされた。

図1. 本研究の全体像

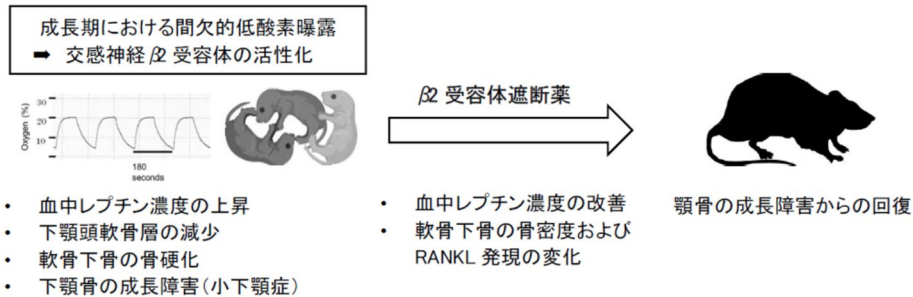
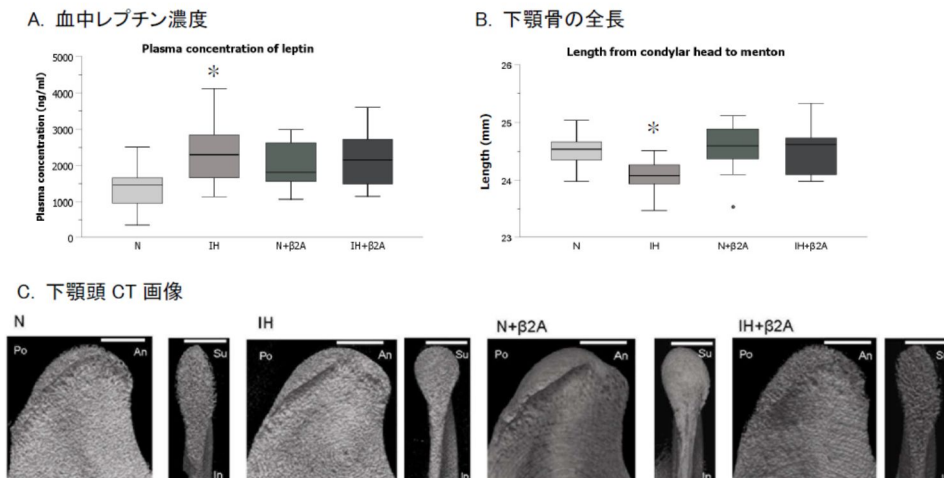


図2. IHモデルにおける β 受容体遮断薬の効果



その他、現在、同モデルにおける仔ラットの認知機能や情動に関わる行動解析を行い、海馬や扁桃体における神経栄養因子の発現変化が判明し、現在、中枢の病態変化に関するデータをまとめ、論文投稿の用意を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hong Haixin, Hosomichi Jun, Maeda Hideyuki, Ishida Yuji, Usumi-Fujita Risa, Yoshida Ken-ichi, Ono Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Selective 2-Adrenoceptor Blockade Rescues Mandibular Growth Retardation in Adolescent Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 676270-676270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2021.676270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Lekvijittada K, Hosomichi J, Maeda H, Hong H, Changsiripun C, Kuma YI, Oishi S, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Intermittent hypoxia inhibits mandibular cartilage growth with reduced TGF- and SOX9 expressions in neonatal rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80303-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuma YI, Hosomichi J, Maeda H, Oishi S, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Intermittent hypoxia induces turbinate mucosal hypertrophy via upregulating the gene expression related to inflammation and EMT in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sleep Breath.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11325-020-02162-6.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hong H, Hosomichi J, Maeda H, Lekvijittada K, Oishi S, Ishida Y, Usumi-Fujita R, Kaneko S, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Intermittent hypoxia retards mandibular growth and alters RANKL expression in adolescent and juvenile rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Orthod.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ejo/cjaa020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 細道 純、臼見 莉沙、藤田 紘一、今井 治樹、本田 康二、山下 陽介、廣田 誠、大村 進、小野 卓史
2. 発表標題 上顎臼歯の先天性欠如に留意してWunderer法併用Le Fort I型骨切り術を行った骨格性 級開咬の一例
3. 学会等名 第31回 日本顎変形症学会 総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Angkanawaraphan K, Hosomichi J, Maeda H, Changsiripun C, Haixin H, Ono T.
2. 発表標題 Effects of intermittent hypoxia on learning and memory functions in infant rats.
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Lekvijittada K, Hosomichi J, Maeda H, Hong H, Changsiripun C, Kuma Y, Oishi S, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T.
2. 発表標題 Intermittent Hypoxia Inhibits Mandibular Cartilage Growth by Reducing TGF- and SOX9 Expression Levels in Infant Rats.
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hong H, Oishi S, Ishida Y, Usami-Fujita R, Kaneko S, Yoshida KI, Ono T.
2. 発表標題 Intermittent hypoxia reduces RANKL expression in impaired mandibular growth through the 2-adrenergic receptor in adolescent rats.
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「小児期の間欠的低酸素曝露による下顎成長障害が 2受容体遮断薬により改善」
<https://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20210114-1.pdf>
東京医科歯科大学プレスリリース（和文）
<https://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20210114-1.pdf>
東京医科歯科大学プレスリリース（英文）
<https://www.tmd.ac.jp/english/press-release/20210114-1/>
東京医科歯科大学公式Twitter【研究成果発表】 大学院医歯学総合研究科 講師 細道 純
https://twitter.com/tmdu_pr/status/1349637390734749696
How Hypoxia Exposure Affects Jaw Cartilage Growth
<https://scienmag.com/the-jaws-of-life-how-hypoxia-exposure-affects-jaw-cartilage-growth/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	前田 秀将 (Maeda Hideyuki) (60407963)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	動物モデルの確立および維持、生理学的解析、結果 解釈
研究 分 担 者	下澤 達雄 (Shimosawa Tatsuo) (90231365)	国際医療福祉大学・医学部・主任教授 (32206)	血液解析、結果解釈

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
タイ	チュラロンコン大学			
中国	深セン大学			