

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07401

研究課題名（和文）夜間低酸素血症の改善が効を奏すNASH患者の同定とその臨床応用

研究課題名（英文）Identification of NASH patients who obtain therapeutic benefit from the improvement of nocturnal intermittent hypoxia and its application for clinical practice.

研究代表者

廣野 玄 (Hirono, Haruka)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：80386268

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：閉塞性睡眠時無呼吸症（OSA）は夜間の慢性間欠的低酸素（CIH）の病態を本質とし、高率に非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を合併する。以前、我々は、持続陽圧呼吸（CPAP）療法によるCIHの改善がNAFLD合併のOSA患者の肝機能を有意に改善させ、NAFLDから非アルコール性脂肪肝炎（NASH）への進展を抑制させうることを示した。今回、controlマウスに比べ、NAFLDマウスでは動脈硬化因子であるRANTESが深く病態に関与していた。また、NAFLD合併のOSA患者の血清ではCPAP施行半年後のRANTESが低下していたことから、CIHの改善が動脈硬化の進展予防になりうると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDを合併したOSA患者の血清において、CPAP施行後のRANTESが有意に低下していたことから、CPAPという薬物療法によらない治療法がOSAを有するNAFLDの患者の動脈硬化の進展予防法にもなる可能性があり、有効な治療法がないNAFLDにおいてこの研究の社会的意義は大きい。今回の夜間低酸素の病態解析を切り口にして、今後、CIHとNAFLD、そして動脈硬化の3者の病態ネットワークが明らかになれば、この研究の学術的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：Obstructive sleep apnea (OSA) is a condition in which patients are a state of chronic intermittent hypoxia (CIH), and OSA is well known to be highly complicated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). We previously reported that the improvement of CIH by continuous positive airway pressure (CPAP) significantly improved the liver injury in the OSA patients with NAFLD, which could suppress the progression from NAFLD to NASH. In this animal study, the mice with NAFLD were deeply associated with expression of RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted), which is one of the arteriosclerosis factors. And CPAP in good compliance improved RANTES in serum of the OSA patients with NAFLD. Therefore, CIH and NAFLD, and arteriosclerosis might be strongly correlated, and the improvement of CIH by CPAP could clinically suppress the progression of arteriosclerosis in OSA patients with NAFLD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：閉塞性睡眠時無呼吸症 慢性間欠的低酸素 非アルコール性脂肪性肝疾患 非アルコール性脂肪肝炎 持続陽圧呼吸

様式 C - 19、F - 19 - 1 (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) は肥満と密接な関係を有する頻度の高い疾患であり、無呼吸による夜間の慢性間欠的低酸素 (chronic intermittent hypoxia: CIH) の状態を病態の本質とする。同様に、肥満と密接に関係する非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) や非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) は未だに有効な治療法のない疾患であり、肝硬変や肝癌の原因として重要である。申請者らは先行研究 (H28 年基盤研究 C No.16K09564) において、夜間 CIH が NAFLD 発症の一因であり、持続陽圧呼吸 (continuous positive airway pressure: CPAP) 療法による CIH の改善が NAFLD から NASH への進展を予防する効果がありうることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究では先行研究を更に発展させ、CIH が NAFLD から NASH への肝線維化進展機序に及ぼす影響、およびそれを評価する最も効果的なマーカーは何かを明らかにし、夜間の CIH を改善させる CPAP 療法が NAFLD から NASH への肝線維化進展の予防法ないし治療法として提案できるか否かを検証することである。NAFLD から NASH への進展において、CIH によって惹起されるサイトカインなどマーカーが解明できれば、NASH の進展機構の解明に一石を投じることができる。さらに、OSA 合併 NASH の高危険群の囲い込みができれば、薬物によらない NAFLD/NASH の新たな治療法になりうると考える。

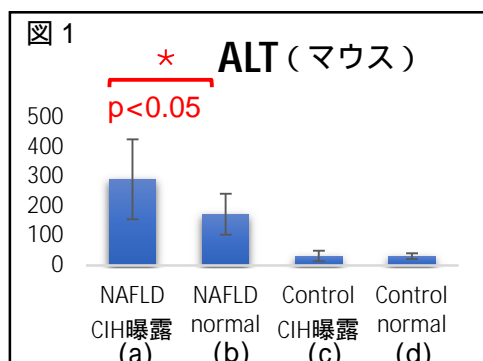
3. 研究の方法

- (1) 8 週齢オスのマウス C57BL6/J 29 匹を、(a) CIH+NAFLD 群 8 匹、(b) 非 CIH+NAFLD 群 8 匹、(c) CIH+control 群 6 匹、(d) 非 CIH+control 群 7 匹に分類した。最初の 20 週間はすべてのマウスを通常 air 環境下において飼育し、(a)と(b)では高脂肪食を、(c)と(d)では通常食を与えて飼育した。20 週目よりそれぞれ同じ餌のまま、(b)と(d)はそのまま通常 air 環境下で、(a)と(c)は CIH 環境下 (AM 10:00 ~ PM 6:00 まで CIH 環境下、残りの時間は非 CIH 環境下) でそれぞれさらに 4 週間飼育した。CIH はマウス用の低酸素チャンバー (写真) を用いて行い、チャンバー内への窒素の急速注入にて 6 分かけて低酸素状態 (酸素濃度約 10%) にし、その後すぐに空気を 6 分かけて急速注入して通常酸素状態 (酸素濃度約 21%) に戻し、これを繰り返し行った。24 週の飼育が終わった時点で (a) ~ (d) のマウスをサクリファイスし、血清、肝臓組織を取り出し、肝臓組織は RNA 抽出用、ホルマリン固定用、液体窒素での保存用に使用し、(a) ~ (d) の 4 群間で検討項目について比較検討を行った。検討項目は、24 週時点でのマウスの体重、空腹時血糖、AST、ALT、TG、LDL-C、HDL-C、LDH、インスリン、HOMA-IR であり、それぞれ比較検討を行った。また、マウス肝を用い、包括的サイトカインアッセイを行った。



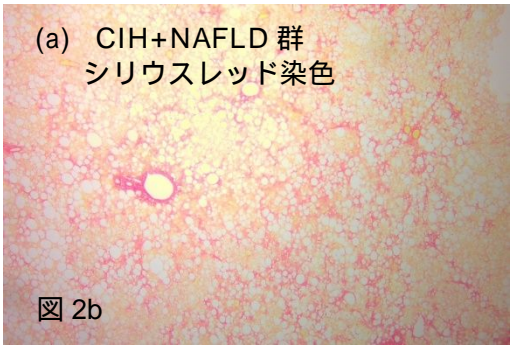
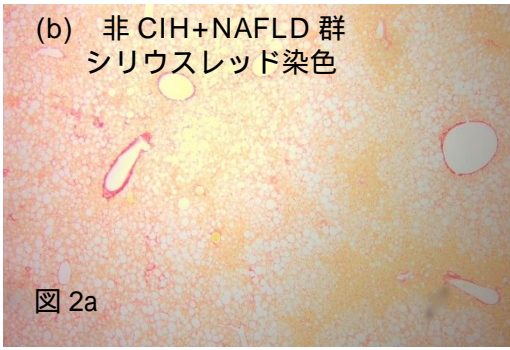
- (2) マウス肝にて (a) CIH+NAFLD 群で強く発現が見られたサイトカインについて、ヒトコホート研究で CPAP のコンプライアンスが良好 (良好の基準は文献 Hirono H et al. *World J Clin Cases*. 2021 July 6;9(19): 5112-5125 に記載) であった NAFLD 合併 OSA 患者 28 名の血清を用い、CPAP 前と CPAP 施行半年後の血清中のサイトカインの発現を比較検討した。

4. 研究成果



- (1) マウスの体重と肝重量は、両者とも control 群 (c) + (d) に比べ NAFLD 群 (a) + (b) では有意に高値を示したが、CIH の有無 (a) vs (b)、(c) vs (d) では差がなかった。

- (1) マウスの血清では、NAFLD 群 ((a) + (b)) はコントロール群 ((c) + (d)) に比べ、ALT 値が有意に高値であり、さらに (a) 群は (b) 群に比べ、ALT 値が有意に高値であった (図 1)。他の検討項目では CIH の有無に差は認められなかった。



(1) マウス肝のシリウスレッド染色では、(b) 非 CIH+NAFLD 群に比べ、(a) CIH+NAFLD 群では線維化が多く見られた (図 2a,b)。このことから CIH は NAFLD における NASH への一因であることが予想された。

(1) マウス肝抽出蛋白からサイトカイン包括的アッセイを行った。control 群((c) + (d)) に比べ NAFLD 群 ((a) + (b)) において、動脈硬化因子である RANTES、及び血小板顆粒放出マーカーである P-Selectin の発現が強く発現していた (図 3a,b)。また、(a) CIH+NAFLD 群は他の群に比べ、Fc 受容体 IIb、オステオポンチン (OPN)、ICAM-1 の発現が強く見られた (図 4a,b)。

(2) マウス肝でのサイトカインアッセイの結果から、我々は OSA のヒトコホート研究の血清を用いて、NAFLD 合併 OSA 患者 28 名の CPAP 施行前と CPAP 施行半年後の RANTES の値を、ELISA 法を用いて比較検討した。その結果、CPAP 施行半年後では RANTES の値が有意に低下していた (図 5 CPAP 前の RANTES 値: 42166 ± 30355 pg/ml、CPAP 後の RANTES 値: 29257 ± 15195 pg/ml, $p=0.0061$)。

以上のことから、動脈硬化因子の一つである RANTES は、OSA、NAFLD、動脈硬化をつなぐ 1 つのサイトカインであることが考えられた。今後は更に研究を進展させ、P-Selectin などの血小板サイトカインについて、CIH の改善や動脈硬化の改善につながるかどうか検証を行う予定である。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	Axl	ILC (CXCL13)	CD30 Ligand (TNFRSF8)	CD30 (TNFRSF5)	CD40 (TNFRSF5)	CRG-2	CTACK (CCL27)	CXCL16	Eotaxin-1 (CCL11)
3	Eotaxin-2 (CCL24)	Fas Ligand (TNFSF6)	Fractalkine (CX2CL1)	G-CSF	GM-CSF	IFN-gamma	IGFBP-3	IGFBP-5	IGFBP-6	IL-1 alpha (IL-1F1)	IL-1 beta (IL-1F2)	IL-2	IL-3	IL-3 R beta
5	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70	IL-13	IL-17A	KC (CXCL1)	Leptin R	Leptin	LIX	L-Selectin (CD62L)
7	Ltn (CXCL1)	MCP-1 (CCL2)	MCP-5	M-CSF	MIG (CXCL9)	MIP-1 alpha (CCL3)	MIP-1 gamma	MIP-2	MIP-3 beta (CCL19)	MIP-3 alpha (CCL20)	PF-4 (CXCL4)	P-Selectin	RANTES (CCL5)	SCF
9	SDF-1 alpha (CCL17)	TARC (CCL17)	I-309 (TCA-3/CCL1)	TECK (CCL25)	TIMP-1	TNF alpha	TNF RI (TNFRSF1A)	TNF RI (TNFRSF1B)	TPO	VCAM-1 (CD106)	VEGF-A	BLANK	BLANK	POS

図 3a サイトカインアレイマップ

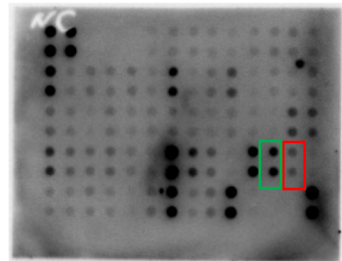


図 3b (a) CIH+NAFLD 群

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	bFGF	CD26 (DPPIV)	Dtk	E-Selectin	Fc gamma RIIB	Fit-3 Ligand	GITR (TNFRSF18)
3	HGFR	ICAM-1 (CD54)	IGFBP-2	IGF-1	IGF-2	IL-15	IL-17 RB	IL-7	I-TAC (CXCL11)	Lungkine (CXCL15)	MDC (CCL22)	MMP-2
5	MMP-3	OPN (SPP1)	OPG (TNFRSF11B)	Pro-MMP-9	Resistin	Shh-N	TCK-1 (CXCL7)	TIMP-2	TRANCE (TNFSF11)	TROY (TNFRSF19)	TSLP	VEGFR1
7	VEGFR2	VEGFR3	VEGF-D	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

図 4a サイトカインアレイマップ

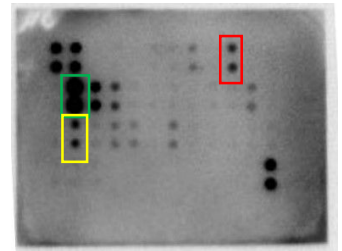


図 4b (a) CIH+NAFLD 群

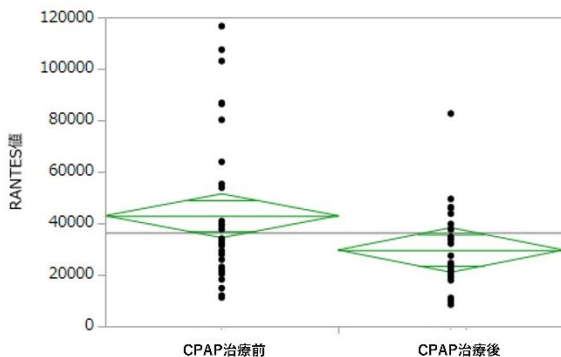


図 5 CPAP 治療前後の RANTES 値の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirono Haruka, Watanabe Kazuhiko, Hasegawa Katsuhiko, Kohno Masaki, Terai Shuji, Ohkoshi Shogo	4. 巻 9
2. 論文標題 Impact of continuous positive airway pressure therapy for nonalcoholic fatty liver disease in patients with obstructive sleep apnea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Clinical Cases	6. 最初と最後の頁 5112-5125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12998/wjcc.v9.i19.5112	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	大越 章吾 (Ohkoshi Shogo) (70231199)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究 分担者	長谷川 勝彦 (Hasegawa Katsuhiko) (60328870)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授 (32667)	
研究 分担者	河野 正己 (Kohno Masaki) (20170201)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究 分担者	石川 博 (Ishikawa Hiroshi) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	

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
---------	---------