

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590860

研究課題名（和文）睡眠時無呼吸における遺伝子多型と細胞の低酸素反応

研究課題名（英文）Gene polymorphisms in patients with sleep apnea and cell responses to hypoxia.

研究代表者

坪井 知正 (TSUBOI TOMOMASA)

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・非常勤講師

研究者番号：00536724

研究成果の概要（和文）：重症閉塞型睡眠時無呼吸(obstructive sleep apnea:OSA)患者は、脳心血管障害が有意に多く予後が悪化するとされるが、血管障害は全ての患者に均等に出現しないので、その差異には酸化ストレス・炎症発生におけるサイトカインや酵素発現に関わる各種(NF- $\kappa$ B, AP-1:activator-1, HO-1:hemo oxygenase-1 などの)遺伝子多型が関与すると考え、京大病院通院中の睡眠時無呼吸患者より血液検体を回収・蓄積している。2013年3月31日現在において、306人の患者より血液検体を採取し遺伝子の抽出を完了している。また、2012年度より、一般住民群より睡眠時無呼吸を有さないコントロール群からの遺伝子抽出を行い、睡眠時無呼吸を有する群との遺伝子多型の比較を検討している。本研究で探索予定の遺伝子多型候補の一つであるHO-1はHeme代謝経路を活性化し一酸化炭素(CO)を産生するので、計測したところOSAがあり且つ血管内皮障害がある群で高値を示した。また、重症OSAのスクリーニングマーカーとして尿中Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS)が有用である可能性を示唆した。また、新しい低酸素暴露装置でOSA類似の間欠的低酸素、持続的低酸素が酸化ストレスとなり炎症系サイトカインを誘導することを細胞実験により確定した。

研究成果の概要（英文）：It is said that patients with severe obstructive sleep apnea (OSA) show higher mortality than controls because of a significant increase in cardiovascular diseases in the former. However, not all but some of the patients with severe OSA have poor prognosis. We hypothesized that the differences in mortality rate among the patients with severe OSA were due to the genetic polymorphism. We have got the blood from 306 patients with OSA and done the gene extraction from them. In addition, we found that Urinary Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) might be a moderately useful marker to identify patients with severe OSA. We also made a new instrument which could produce both intermittent and sustained hypoxic conditions for the target cells. From that instrument, we could find that the intermittent hypoxia induced TNF- $\alpha$  and sustained hypoxia induced hypoxia inducible factor-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：閉塞型睡眠時無呼吸、遺伝子多型、持続的低酸素、間欠的低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

閉塞型睡眠時無呼吸 (obstructive sleep apnea: OSA) は、睡眠中の繰り返す上気道閉塞・呼吸停止に伴う睡眠の分断を特徴とし日中の過度な眠気・集中力の低下を引き起こす疾患である。また、睡眠中に間欠的な低酸素状態に陥ることにより、交感神経の活性化・酸化ストレス・全身性炎症の発生を惹起し高血圧や糖尿病などの生活習慣病、さらには心筋梗塞・脳梗塞などの心血管イベントの危険因子になるとされている。しかし、OSA を有していてもこれらの合併症を発症しない群が存在し、合併症を有する群といかなる差異があるのかは判明していない。我々は、両者の差異の原因として夜間の間欠的低酸素に対する酸化ストレスや全身性炎症の反応の程度にあるのではないかと仮定しそれらの反応経路にあるサイトカインや酵素に焦点を当て、それらの発現に関わる遺伝子多型を調査することにより OSA の合併症発症のメカニズムを解明したいと考えた。候補遺伝子として NF- $\kappa$ B, AP-1: activator-1, HO-1: hemoxygenase-1 などを考慮した。さらに、HO-1 は Heme 代謝経路を活性化し一酸化炭素 (CO) を産生するので、呼気 CO 濃度を血管内皮障害の有無で検討することにより HO-1 の働きを間接的に評価した。また、予後に影響を与えるのは重症 OSA であるとのことが確立されつつあるので、重症 OSA を同定するバイオマーカーも明らかにしたいと考えた。一方、心血管障害を誘導する因子としては全身炎症の概念が重要であるが、OSA に特徴的な間欠的低酸素による酸化ストレスが NF- $\kappa$ B、AP-1、HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) などを介して炎症マーカーとして重要な TNF- $\alpha$  産生を促す可能性が指摘されている。一方で、血清 TNF- $\alpha$  値を規定するのは OSA より肥満であると繰り返し報告されている。このように OSA の病態メカニズムの解明は、しばしば併存する肥満や高血圧などの疾患要素の影響のため、生体レベルの検討のみでは困難である。従って、OSA 由来の低酸素環境 (間欠的低酸素及び持続的低酸素) が生体 (例えば、細胞レベル) にどのような影響を与えるかの検討が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

OSA 患者の酸化ストレス・炎症発生におけるサイトカインや酵素発現に関わる NF- $\kappa$ B, AP-1: activator-1, HO-1: hemo oxygenase-1 などの遺伝子多型を検討し、OSA の合併症発症におけるメカニズムを解明する。HO-1 の働きに関しては呼気 CO を測定することによって間接的に評価する。重症 OSA をスクリー

ニングマーカーを検討する。間欠的低酸素が TNF- $\alpha$  の発現や産生、その他の OSA に合併する病態に与える影響について細胞レベルで検討し、OSA に合併する病態のメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

OSA 患者群および OSA を有しない群での遺伝子を抽出し、TNF- $\alpha$ , GPIIIa (glycoprotein IIIa), PEAR- I (platelet endothelial receptor-I), HO-1 などの低酸素や全身性炎症に関わる遺伝子多型を調査し、実際の合併症の発症状況と比較する。また、HO-1 の働きについて、HO-1 が Heme 代謝活性過程において産生する CO を呼気濃度として測定することにより間接的に同定する。呼気 CO 濃度は本科研費にて購入した Carbolyzer mBA-2000 : Taiyo, Osaka, Japan を使用して測定した。

プロスタグランジン D2 の転換酵素である Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) は眠気に関連して上昇し、近年は虚血心などの循環器疾患患者において高値を示しているため、重症 OSA 患者においても高値を示すと仮定して尿中、血中 L-PGDS の値を持続気道陽圧 (continuous positive airway pressure: CPAP) 治療前後で測定した。

培養細胞を間欠的低酸素に曝露できる装置を自作して、間欠的低酸素による細胞刺激試験を行う。低酸素応答の評価として hypoxia responsive element (HRE) を介した転写活性を Luciferase assay で測定すると共に、炎症応答に関して TNF- $\alpha$  の mRNA 発現を real-time PCR 法で検討する。同系列の細胞を用いて常酸素曝露 (対照群)、持続的低酸素曝露を行い、間欠的低酸素曝露細胞との反応の違いを検討する。

## 4. 研究成果

平成 22 年 6 月 11 日に本研究関連書類を提出し、8 月 18 日に倫理委員会より承諾を得、京大病院通院中の睡眠時無呼吸患者より血液検体を回収・蓄積している。2013 年 3 月 31 日現在において、306 人の患者より血液検体を採取し遺伝子の抽出を完了している。2012 年度より、一般住民群より睡眠時無呼吸を有さないコントロール群からの遺伝子抽出を行い、睡眠時無呼吸を有する群との遺伝子多型の比較を検討している。今後も症例数を増やすとともに、上記の遺伝子多型の解析およびその遺伝子多型と臨床情報との関連を検討していく予定である。

HO-1 により Heme 代謝活性過程において産生される CO は血管拡張作用があるので、OSA 患者において、Peripheral Arterial

Tonometry (PAT) によって Reactive Hyperemia Index (反応性充血指数: RHI) を測定することによって血管内皮障害の有無を測定したのち検討したところ OSA(+) 血管内皮障害(+) 患者で眠前 CO 濃度は OSA(+) 血管内皮障害(-) に比して上昇しているが、早朝への上昇率は逆に減少していた。OSA(+) 血管内皮障害(+) 患者においては覚醒中は CO 濃度を上昇させることにより血管内皮障害を修正する方向に進むが、夜間の OSA に対して、CO を消耗し産生不可能となり、防御は脆弱化している可能性が示唆された。

尿中 L-PGDS は早朝に最低点を持つ日内変動を示し、重症 OSA 患者において、中等症 OSA、軽症または OSA なし群に比して有意に高値を示した。また、CPAP 治療により有意に低下し、他群とほぼ同レベルになった。なお、この間 PAT で測定した血管内皮機能には大きな変化がなかった。これらの結果から尿中 L-PGDS は重症 OSA の有力なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

平成 22 年 6 月 11 日に本研究関連書類を提出した時点で開発中であった間歇的低酸素暴露装置では、細胞を酸素溶解度の異なる培地に交互に入れる「液相法」を用いていたが、細胞を用いた実験では条件が不安定となり調整困難であった。そのため、容器内を低酸素ガス(酸素 1%)と常酸素ガス(同 21%)を交互に封入する「気相式」の曝露装置を新たに開発した(図 1、2)。これにより連続 8 時間以上、1 時間に約 8 回のサイクルの間歇的低酸素に細胞を曝露することが可能となった。これを用いて HeLa 細胞を間歇的低酸素、持続的低酸素、常酸素にそれぞれ 4 時間、8 時間曝露して各種測定を行った。その結果、RT-PCR で検討した TNF- $\alpha$  の mRNA 発現亢進は間歇的低酸素に曝露した細胞のみで、HIF-HRE pathway の誘導および HIF 経路の誘導指標となる VEGFa の mRNA 発現亢進は持続的低酸素に曝露した細胞のみで、認められた。これらの結果は間歇的低酸素が細胞レベルで特異的な応答を引き起こすことを示している。今後はさらに様々な細胞系列を用いて曝露実験を行い、OSA の病態を基礎的に検討していく予定である。



図 1 細胞に対する低酸素曝露装置



図 2 低酸素曝露装置内部

## 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 11 件)

- (1) Chihara Y, Chin K, Aritake K, Harada Y, Toyama Y, Murase K, Yoshimura C, Hitomi T, Oga T, Mishima M, Urade Y. A urine biomarker for severe OSA: Lipocaline-Type prostaglandin D synthase. *European Respiratory Journal* in press. 査読有
- (2) Chihara Y, Tsuboi T, Hitomi T, Azuma M, Murase K, Toyama Y, Harada Y, Aihara K, Tanizawa K, Handa T, Yoshimura C, Oga T, Yamamoto K, Mishima M, Chin K. Flexible positive airway pressure improves treatment adherence compared with auto-adjusting PAP. *Sleep*. 2013 ;36:229-36. doi: 10.5665/sleep.2378. 査読有

- (3) Aihara K, Oga T, Harada Y, Chihara Y, Handa T, Tanizawa K, Watanabe K, Hitomi T, Tsuboi T, Mishima M, Chin K. Analysis of anatomical and functional determinants of obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2012; 16: 473-81. doi: 10.1007/s11325-011-0528-7. 査読有
- (4) 谷澤公伸、坪井知正、陳和夫. 呼吸器疾患と動脈硬化症. *Angiology Frontier* 2012; 11:189-97.  
<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=ailangid&ye=2012&vo=11&nu=3&st=189&UserID=130.54.110.73> 査読無
- (5) Tsuboi T, Oga T, Machida K, Sumi K, Oguri S, Sato A, Kurasawa T, Ohi M, Mishima M, Chin K. PaCO<sub>2</sub> six months after the initiation of long-term noninvasive ventilation in patients with COPD. doi: 10.2169/internalmedicine.50.4310 *Intern Med* 2011; 50: 563-70. 査読有
- (6) Chihara Y, Egawa H, Tsuboi T, Oga T, Handa T, Yamamoto K, Mishima M Tanaka K, Uemoto S, Chin K. Immediate noninvasive ventilation may improve mortality in patients with hepatopulmonary syndrome after liver transplantation. *Liver Transplantation* 2011; 17:144-8. doi: 10.1002/lt.22207. 査読有
- (7) 谷澤公伸、陳和夫. 間欠的低酸素 *medicina* 2011; 48:956-9. doi/URL 無, 査読無.
- (8) Tsuboi T, Ohi M, Oga T, Machida K, Chihara Y, Harada Y, Takahashi K, Sumi K, Handa T, Niimi A, Mishima M, Chin K. Importance of the PaCO<sub>2</sub> from 3 to 6 months after initiation of long-term non-invasive ventilation. *Respir Med*. 2010; 104:1850-7. doi: 10.1016/j.rmed.2010.04.027. 査読有
- (9) Aihara K, Chin K, Oga T, Takahashi K, Hitomi T, Takegami M, Handa T, Niimi A, Tsuboi T, Mishima M. Long-term nasal continuous positive airway pressure treatment lowers blood pressure in patients with obstructive sleep apnea regardless of age. *Hypertension Research* 2010;33:1025-31. doi: 10.1038/hr.2010.133. 査読有
- (10) Murase K, Tomii K, Chin K, Tsuboi T, Sakurai A, Tachikawa R, Harada Y, Takeshima Y, Hayashi M, Ishihara K. The use of non-invasive ventilation

for life-threatening asthma attacks: Changes in the need for intubation. *Respirology*. 2010; 15:714-20. doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01766.x. 査読有

- (11) Narita M, Tanizawa K, Chin K, Ikai I, Handa T, Oga T, Niimi A, Tsuboi T, Mishima M, Uemoto S, Hatano E. Noninvasive ventilation improves the outcome of pulmonary complications after liver resection. *Intern Med*. 2010; 49: 1501-7. doi: 10.2169/internalmedicine.49.3375 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Chin K. Associations between lifestyle-related diseases, sleep apnea and sleep duration. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Respiratory Diseases & ATS in China Forum 2012. 11.8. Shanghai, China.
- (2) 陳和夫. 肥満症と睡眠時無呼吸。第 33 回日本肥満学会 教育講演 2012 年 10 月 12 日 京都市。
- (3) Tanizawa K, Chin K. Effects of intermittent hypoxia on several parameters for cardiovascular risk factors. Industrial Symposium 4 Metabolic risk of sleep apnea. Worldsleep 2011, 2011.10.18. Kyoto.
- (4) Chin K. Effects of CPAP therapy on the several factors for morbidity in patients with OSA. Symposium 3. The 8<sup>th</sup> Annual Meeting of Korea Sleep Research Society. 2011.7.9 Seoul, Korea.
- (5) 谷澤公伸、陳和夫、星野勇馬、小賀徹。全身性疾患としての睡眠時無呼吸症候群 第 50 回日本呼吸器学会学術集会 シンポジウム 12 間欠的低酸素と SAS 2010 年 4 月 25 日 京都市。

[図書] (計 2 件)

- (1) Chin K, Harada Y. Wageningen Academic, The Netherlands, Metabolism, metabolic syndrome, obesity and sleep. Handbook of nutrition, diet and sleep. 2013. p227-40. 総ページ数 p500.
- (2) 坪井知正、陳和夫. 南江堂 東京、睡眠時無呼吸。看護学テキスト NICE 疾病と治療 I. 全身性/呼吸器系/循環器系/感染症/中毒/救急. p132-4, 2010. 総ページ数 p366

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 知正 (TSUBOI TOMOMASA)  
京都大学・医学（系）研究科（研究院）・  
非常勤講師  
研究者番号：00536724

### (2) 研究分担者

陳 和夫 (CHIN KAZUO)  
京都大学・医学（系）研究科（研究院）・  
教授  
研究者番号：90197640

堀内 久徳 (HORIUCHI HISANORI)  
東北大学・加齢研究所・教授  
研究者番号：90291426

星野 勇馬 (HOSHINO YUMA)  
京都大学・医学（系）研究科（研究院）・  
助教  
研究者番号：00378746

### (3) 連携研究者

なし。