様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９０８４３

研究課題名（和文）睡眠時無呼吸症候群動物モデルにおける心血管病変の解析

研究課題名（英文）Investigation of cardio-pulmonary disorder in the animal model of sleep apnea syndrome

研究代表者
永井　恒志（Hisashi, Nagai）

東京大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：６０６００３６９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　4,200,000円、（間接経費）　1,260,000円

研究成果の概要（和文）：睡眠時無呼吸症候群（SAS）に合併する肺高血圧の誘因として間歇的低酸素（IH）が重要であるが、SAS患者は必ずしも肺高血圧を伴う訳ではなくその原因は不明であった。そこでIH暴露ラットを用いて研究したところ、IH由来肺高血圧は低酸素性肺血管収縮（HPV）が主因であった。しかしIHでは血中単球から遊走・分化集簇した肺M1マクロファージがβ3受容体/iNOS経路を介して一酸化窒素（NO）を分泌することによりHPVを強く抑制していた。その結果、IHでは肺高血圧の発生が抑高度に抑制されていた。この結果よりIH由来肺高血圧の発生は単球由来肺M1マクロファージに強く依存していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In sleep apnea syndrome (SAS), intermittent hypoxia (IH) accompanying sympathoadrenal activation induces repeated episodes of hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) during sleeping periods, which contributes to pulmonary arterial hypertension (PAH). However, the prevalence of PAH is low and severity is mostly mild in SAS patients. The question then arises as to why PAH is not a universal finding in SAS if repeated hypoxia of sufficient duration causes cycling of HPV. In the present study, we revealed that the repeated HPV is a chief cause of the pathogenesis of PAH in IH and that the circulating monocyte-derived pulmonary M1 macrophages prevent PAH progression by attenuating HPV via beta3AR/iNOS signaling. Here, we propose a new concept that the M1 pulmonary macrophage plays a pivotal role in the control of pulmonary vascular tone and preserving homeostasis of the pulmonary circulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：睡眠時無呼吸症候群　間歇的低酸素　肺高血圧　低酸素性肺血管収縮　マクロファージ

１．研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群（SAS）は一般人口の約4%と有病率が高く、高血圧、心筋梗塞、心臓性突然死などの心血管系障害の独立した危険因子として広く知られている。肺高血圧合併率も有意に高く、慢性肺疾患を有する患者においては 75%で肺高血圧による肺性心を合併している。また高度肥満者では肺高血圧の合併率が極めて高くなる。日中においても持続的な肺高血圧を来す患者が 21～43%認められ、慢性的な肺高血圧は右心系への圧負荷から予後不良となる。しかし、SAS における肺高血圧の発症メカニズムについては未解明の点が多い。その理由として第一に、臨床研究では SAS 患者は肥満、高血圧などの合併症を複合していることが多く、純粋な SAS の病態解明が困難であること、第二に、基礎研究では動物モデルの作成が困難であることが挙げられる。 臨床研究による病態解明が非常に困難な疾患であるため、動物モデルによる基礎研究の成果が病態解明に必須である。

臨床的には SAS 患者において夜間に低酸素性肺血管収縮（HPV）を繰り返しており、その繰り返しの最中に持続的に肺動脈圧が上昇する現象が知られている（Sleep Med Rev 2002;6:175)。しかしながら SAS 患者における肺高血圧の合併率は 21～43%程度と、HPV を毎夜繰り返している一方、全例で肺高血圧を認めるわけではない。肺高血圧を合併して予後不良になる群と合併しない群との病態の違いは依然不明である。

２．研究の目的

これまでの IH 暴露動物実験による肺高血圧の論文において肺高血圧の程度は様々であり、肺高血圧を呈さなかったとするものから軽度あるいは中等度の肺高血圧を呈したとするものまで幅広い。これは動物種の違いや IH 条件（低酸素の程度、繰り返し回数、暴露期間など）の影響と考えられているが、概して IH による肺高血圧は慢性低酸素（CH）による肺高血圧よりも軽度であり、そのため IH は CH の低酸素負荷が弱い状態であると考えられている。そこでまず重症 SAS の IH 条件を検討した後に IH6 週間暴露における肺高血圧の程度を、肺血管リモデリングや HPV の定量化を含めて評価する。CH 性肺高血圧では近年、低酸素暴露早期の M2 macrophage が関与していることが明らかになった。そこで IH における macrophage の関連性について調べる。Macrophage の関与が認められた場合には、M1、M2 を同定し、肺高血圧に及ぼす影響について生理学的あるいは生化学的に明らかにする。

３．研究の方法

雄 7 週齢の SD ラットを独自に開発した IH 装置に入れて、6 週間連続で IH 暴露する。IH 条件は 4-21%O2×3 分サイクル×8 時間/日(9時～17 時）×連日 6 週間である。心エコー、圧カテーテル検査、心重量比、肺組織における中膜肥厚の定量などから、肺高血圧・右室肥大を評価する。組織免疫染色法、Western Blot を使用して肺内における macrophage 数や M1/M2 バランス、NOS・βAR subtype を明らかにする。蛍光リポソーム静注により IH による血中単球の肺内遊走を確認する。肺の nitrite を定量する。また IH 後の肺から抽出した macrophage にβAR 刺激薬あるいは NOS 阻害薬を添加し NO 合成を定量する。macrophage の NOS 発現量は Western Blot で測定する。HPV は肺微小血管造影（SPring8）で直接的に評価する。特に低酸素暴露、低酸素暴露＋β3AR 阻害薬 SR59230A を比較検討し、HPV 抑制作用を検証する。また IH でβ3AR 刺激薬 CL316243 投与により肺血管が拡張するか観察する。この拡張作用が iNOS 阻害薬 L-NIL により消失するか調べる。Macrophage の関与を明らかにするために、IH6W 後直ちに clodronate を気管内投与して macrohage を消失させ、肺血管造影にて HPV の程度を計測する。さらに clodronate 慢性投与群、β3AR 阻害薬 SR59230A 慢性投与群で IH において肺高血圧が惹起されるか調べる。この肺において中膜肥厚の程度を定量する。

４．研究成果

我々はまず独自に開発した IH 装置を用いて、これまで報告されている中で最も厳しい低酸素条件である 4%O2 に 90 秒毎に繰り返し、血液ガス分析により IH 暴露中における血中ガス分圧の状態を計測した。その結果、吸入期酸素濃度（FiO2）が 4%にまで低下した時点での PaO2 は 25.4mmHg、PaCO2 は 17.8mmHg、pH は 7.58 であった。しかし FiO2 が 21%に戻った時点では PaO2 88.3mmHg、PaCO2 32.5mmHg、pH 7.41 と正常値に回復し、IH 暴露でこれを繰り返した。PaO2 25.4mmHg（FiO2 4%）は最も重篤な SAS と言って良く、以後この条件で実験を開始した。

我々は IH 暴露により肺高血圧を生じるとの予測のもと、従来の報告に従って 7 週齢ラットに対する IH6 週間暴露を繰り返し行ったが、肺高血圧、右室肥大は惹起されなかった。しかしながら IH 暴露群の肺組織像は対照群とは異なっていた。IH 群では血管周囲を中心とする macrophage の集簇を認めており、かつこれらの細胞は免疫染色でβ3AR を高発現していた（Fig.1)。

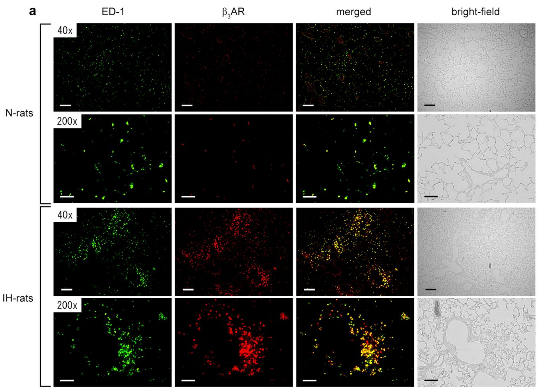

Fig.1 IH では肺に macrophage 集簇を認め、β3AR を高発現する。

集簇している macrophage は resident macrophage の分裂ではなく、血管内単球に由来する可能性があるため、clodronate の間歇的静脈内投与による血中単球消失モデルに対して IH6 週暴露したところ著明な肺高血圧を呈した。またβ3AR 阻害薬 SR59230A 持続皮下注モデルに対しても同様の暴露を行ったところ肺高血圧を惹起した（Fig.2)。

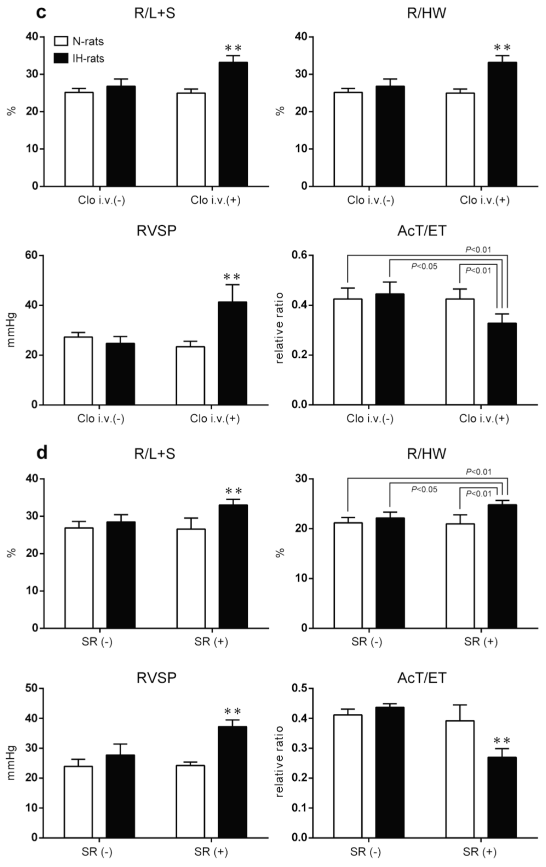

Fig.2 clodronate 慢性投与、β3AR 遮断薬 SR59230A 慢性投与群では IH で肺高血圧が生じる。

これらの結果より 7 週齢 IH ラットでは IH により血中単球が肺内に遊走し macrophage に分化することで肺高血圧の発生を抑制しており、この機序にはβ3AR が関与している可能性が高い。CH では macrophage が肺高血圧を惹起するとの報告があり（Circ 2011;123:1986)、IH とは逆の現象が起きていると思われる。これらの結果は、IH と CH が全く異なる刺激条件であり、従来のように IH を軽度の CH と位置づけで、全て CH の病態の延長線上で検討することに限界があることを示している。心筋細胞ではβ3AR の下流として eNOS を介する NO 合成が知られている（Canadian J Physiol Pharma 2006;85:1051)。一方、macrophage における NOS の発現は主に iNOS が知られており、LPS 負荷時に典型的に増加してくる炎症性 macrophage、すなわち M1 macrophage が iNOS を介して NO を合成し血管を拡張することで血圧を下げる。
そこで IH の肺で集簇している macrophage の subtype を決定するために BALF により回収した macrophage を用いた Western blot と免疫染色を行ったところ、iNOS、IL-6、TNFαを高発現する M1 macrophage であることが分かった。逆に M2 marker である Ym-1、Arginase1、CD206 の発現は減弱していた。β3AR の下流に iNOS が位置することで NO 合成を介して肺高血圧の発生を抑制している可能性を考慮し、BALF で回収した M1 macrophage に対してβ3AR 刺激薬 CL316243 を投与すると、有意な NO 分泌が認められた。この NO 合成は iNOS 阻害剤 L-NIL の同時投与によって消失した。しかし、この反応は対照群では見られなかった。一方、propranolol による刺激では IH 群、対象群ともに NO 合成は減少した（Fig.3)。この結果より、IH では M1 macrophage に対するβ3AR/iNOS 系が活性化しており NO 合成が肺高血圧発生を抑制していると考えられた。

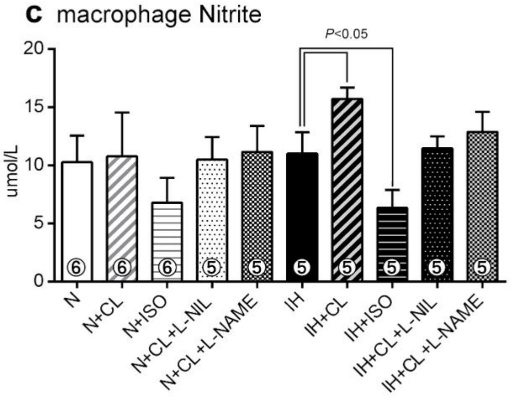

Fig.3 IH の集簇 macrophage は M1 タイプ。

IH における肺高血圧の発生機序としては、大きく肺血管リモデリングと HPV の 2 つが考えられる（Current opinion in pharmacology 2009;9:287)。そこで clodronate 慢性投与群およびβ3AR 阻害薬慢性投与群で IH の肺血管壁を定量した。その結果、いずれも中膜肥厚

は生じておらず、肺血管リモデリングはないことが分かった。したがって IH における肺高血圧は HPV が主な原因であると考えられた。そこで IH ラットを高輝度放射光施設（Spring8）に搬送し、急性低酸素暴露下で肺微小血管造影を行い、HPV の強度を計測した。その結果、IH6w 暴露ラットでは対照群と異なり、HPV が高度に抑制されていることを発見した。この IH ラットに対してβ3AR 阻害薬を静注してから低酸素暴露を行うと HPV は正常レベルで復活した。このことから IH ではβ3AR 刺激が肺血管を拡張性制御することで HPV を抑制している可能性がある。そこで今度はβ3AR 刺激薬 CL316243 を投与すると IH では肺血管が有意に拡張したが対照群では反応しなかった。またβ3AR 刺激薬投与前に iNOS 阻害薬 L-NIL を前投与しておくと、この拡張反応は生じなかった。それゆえβ3AR/iNOS 系が IH では直接的に肺血管を拡張し HPV を抑制していることが判明した。かつ、この系がマクロファージで働いていることを確認するために、IH6W 後直ちに clodronate を気管内投与して肺内マクロファージを消失させたモデルを作成し、この肺血管造影を試みたところ、HPV が正常レベルで発現した。以上の結果より、IH では単球由来肺 M1macrophage がβ3/iNOS 系を活性化して HPV を抑制することで肺高血圧の進展を防いでいることが明らかとなった。この発見はマクロファージに直接的に血流を制する能力があること示しており、IH では心肺循環を保護していることを示している。

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 0 件）
投稿中

〔学会発表〕（計 3 件）
①永井恒志, 奈良明奈, 前田秀将, 吉田謙一. 睡眠時無呼吸症候群モデルラットの低酸素性肺血管収縮に対するβ1, 2blocker の影響. 第 97 次日本法医学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2013；B15：p70. 北海道.

②永井恒志， 白井幹康， 桑平一郎， 吉田謙一. 睡眠時無呼吸症候群モデルラットの肺血管に対する低酸素暴露およびβ受容体遮断薬の効果. 第16 回酸素ダイナミクス研究会. 2012 年 9 月. 東京.

③永井恒志， 前田秀将， Lisa Wingenfeld, 吉田謙一. 睡眠時無呼吸症候群モデルラットの肺血管に対する低酸素暴露およびβ受容体遮断薬の効果. 第 96 回日本法医学会全国集会. 日本法医学雑誌. 2012；66：p69. 静岡.

〔図書〕（計 0 件）

〔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
永井　恒志（NAGAI, Hisashi）
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60600369

(2)研究分担者
下澤　達雄（SHIMOSAWA, Tatsuo）
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90231365

(3)連携研究者
吉田　謙一（YOSHIDA, Kenichi）
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40166947