

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659109

研究課題名(和文) 間欠的および持続的低酸素濃度操作による多能性幹細胞の性質変化法の開発

研究課題名(英文) The development of methods to make changes in the property of induced pluripotent stem cells by the intermittent or sustained hypoxia.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：細胞に対する新たな低酸素曝露装置を自主開発し、間欠的もしくは持続的低酸素状態を作成可能になった。BEADS-2B細胞において、間欠的低酸素が細胞の損傷修復を阻害することを示した。当初、多能性幹細胞の性質変化法の開発を目指したが、申請時に保有していた低酸素曝露装置では再現性に乏しく新たな装置を開発する必要があり、多能性幹細胞の樹立にも時間がかかり十分な細胞数確保が困難であったため、申請時の研究目標を達成することは困難であった。間欠的低酸素血症が生体内でみられる睡眠時無呼吸症候群の臨床研究を通して、間欠的低酸素の新規バイオマーカーを探索し、間欠的低酸素と高血圧症、脂質代謝、眠気の関連を検討した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new hypoxia exposure apparatus for cellular experiments to produce intermittent and sustained hypoxia (IH and SH). We found that IH prevented cellular wound healing in BEAD S-2B cells. At appliance, we aimed to develop a new method of altering the natures of induced pluripotent stem cells (iPS cells). However, we have not achieved our primary aim because preliminary studies took more time than planned. Firstly, we needed to develop a new hypoxia exposure apparatus by ourselves because our previous hypoxia exposure apparatus at appliance could not reproduce the stable hypoxic status. Secondly, it was also difficult to acquire sufficient iPS cells because producing iPS cells took much time. We also conducted clinical researches of sleep apnea syndrome, which patients showed intermittent hypoxemia in vivo, to seek for novel biomarkers for IH and investigate the relationships between IH and hypertension, lipid metabolism and sleepiness.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：intermittent hypoxia, sustained hypoxia, pluripotent stem cell, BEAD-2B cell, hypoxemia, hypertension, lipid metabolism, sleepiness.

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体が曝露される低酸素状態は、間欠的低酸素と持続的低酸素に大別される。HeLa 細胞を用いた研究では、間欠的低酸素が持続的低酸素と異なる転写因子を誘導することが示されている。我々もまた、間欠的低酸素血症を特徴とする睡眠時無呼吸症候群の臨床研究を通して、間欠的低酸素血症が生体に、持続的低酸素血症とは異なる影響を与えることを明らかにしてきた。

(2) 多能性幹細胞の臨床応用にあたっては、その効率的な樹立や分化にかかわる技術改良が不可欠である。持続的低酸素は多能性幹細胞の樹立、分化にも深く関与することが報告されているが、間欠的低酸素が多能性幹細胞に与える影響は明らかでない。そこで我々は、低酸素曝露を再生医学における新たな手法として確立し、併せて細胞の分化や増殖に関連した新たな因子を見いだすことを目標に、「多能性幹細胞の樹立、分化においても持続的低酸素と間欠的低酸素が異なる反応を惹起する」との仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では、持続的低酸素と間欠的低酸素が人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell, 以下 iPS 細胞)に与える影響ならびにその相違の分子機構を解明することを目的とした。併せて、睡眠時無呼吸症候群の臨床研究を通して、間欠的低酸素血症の臨床的な意義を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞実験に用いる低酸素曝露装置を自主開発し、実験系の条件検討を行った。HeLa 細胞による予備実験ののち、気道上皮細胞(BEAS-2B)の傷害/治癒モデルを用いて、低酸素曝露実験を行った。

(2) 睡眠時無呼吸症候群患者および企業検診受診者において、睡眠時無呼吸と lipocalin-type prostanoid D

synthase(L-PGDS)、neutrophil gelatinase associated lipocalin(NGAL)、高血圧症、脂質代謝、自覚的な眠気の関連を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 研究開始当初に保持していた低酸素曝露装置では十分な間欠的低酸素状態を作成できなかったため、気相法による新たな低酸素曝露装置を自主開発し、実験系の条件検討を行った。溶媒液体中の酸素分圧を 30-80 Torr の安定した 1 時間に 5 回程度の間欠的低酸素状態、もしくは持続的低酸素状態を作り出すことが可能になった(図 1)。

HeLa 細胞を用いた予備実験を行い、間欠的低酸素で NF- $\kappa$ B の下流にある TNF- $\alpha$  の誘導を認め、持続的低酸素状態において、Hypoxia inducible factor-1(HIF-1)の誘導とその下流の vascular endothelial growth factor (VEGF) の誘導を認めた。この結果により、既報と同様に間欠的低酸素曝露と持続的低酸素曝露では異なる経路の遺伝子が誘導されることを確認した(学会発表)。

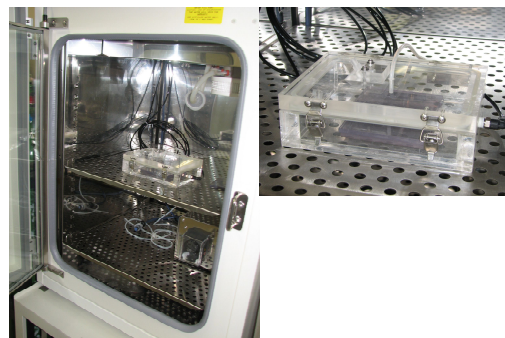


図 1 自主開発した低酸素曝露装置

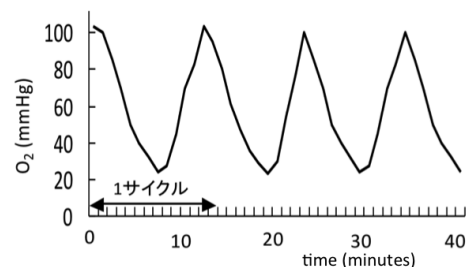
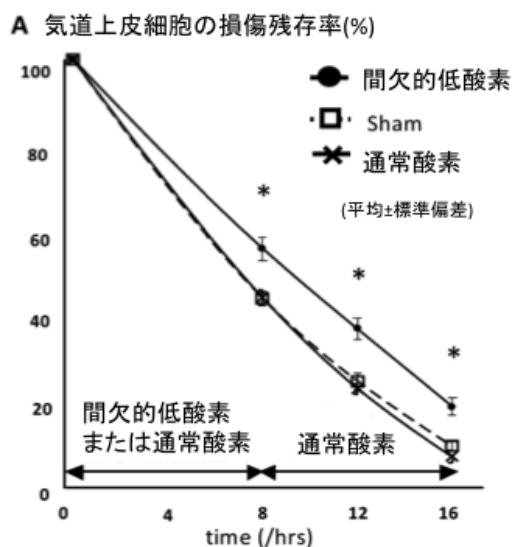


図 2 間欠的低酸素曝露下の培地内 O<sub>2</sub> 濃度の経時的変化

(2)細胞の分化増殖に間欠的および持続的低酸素曝露が与える影響を検討するために、気道上皮細胞 (BEAS-2B) の損傷治癒モデルを用いて、低酸素曝露実験を行った。実験に使用する細胞により培養液中の低酸素条件が大きく異なるため、BEAS-2B 細胞における実験条件を検討し、再現性を確認した。間欠的低酸素曝露では、通常酸素状態に比べて気道上皮の損傷からの治癒過程が有意に阻害された(図 3)。この過程は、抗酸化剤の一つである、N-アセチル-L-システインを用いても完全には改善されなかった。



**B 気道上皮細胞の損傷治癒過程**

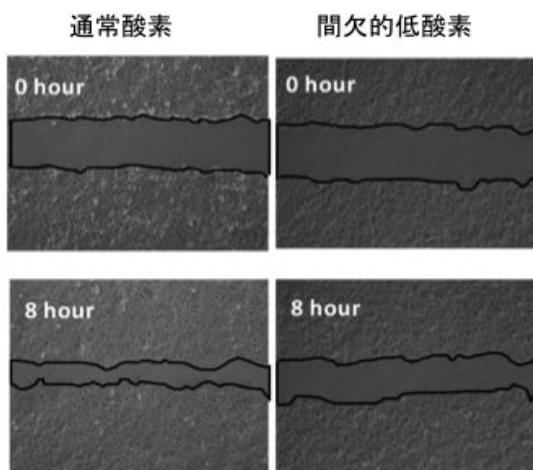


図 3. 間欠的低酸素による損傷治癒の阻害

(3)当初、多能性幹細胞の特質改変法の開発を目指したが、新たな装置を開発する必要があ

り、多能性幹細胞の樹立にも時間がかかり十分な細胞数確保が困難であったため、申請時の研究目標を達成することはできなかった。

(4)睡眠時無呼吸症候群患者において、尿中の lipocalin-type prostaglandin D synthase(L-PDGS)は、間欠的低酸素の指標である無呼吸/低呼吸指数 (apnea/hypopnea index, AHI) と有意に相関し、重症患者では有意に高値であったが、持続陽圧換気 (CPAP) 療法によって正常化した(雑誌論文)。睡眠時無呼吸症候群患者において、血漿中の neutrophil gelatinase associated lipocalin(Ngal)は、間欠的低酸素の指標である 4% oxygen desaturation index (ODI) と有意に相関したが、持続陽圧換気 (CPAP) 療法による改善は見られなかった(雑誌論文)。これらの結果は、尿中 L-PDGS および血漿中 Ngal が、間欠的低酸素の臨床的なバイオマーカーとなりうる可能性を示唆した。

(5)企業検診を受診した都市部男性サラリーマン 275 名において、睡眠時間は高血圧症の有無によらず自覚的な眠気と関連したが、間欠的低酸素の指標である respiratory disturbance index (RDI) が眠気と関連するのは高血圧症の群に限られた(雑誌論文)。同一の都市部男性サラリーマン 275 名において、中性脂肪は RDI と有意に相関したが、総コレステロール値は睡眠時間と相関した(雑誌論文)。これらの結果は、間欠的低酸素が睡眠時間とは異なるかたちで、自覚的な眠気や脂質代謝に影響していることを示唆した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Harada Y, Oga T, Chin K, Takegami M, Takahashi K, Sumi K, Nakamura T, Nakayama-Ashida Y, Minami I, Horita S, Oka Y, Wakamura T, Fukuhara S, Mishima M, Kadotani H. Effects of the presence of hypertension on the relationship

between obstructive sleep apnoea and sleepiness. *J Sleep Res* 2011; 20: 538-543.

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 obstructive sleep apnoea patients: lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Eur Respir J*. 2013;42:1563-74.

Toyama Y, Chin K, Chihara Y, Takegami M, Takahashi K, Sumi K, Nakamura T, Nakayama-Ashida Y, Minami I, Horita S, Oka Y, Wakamura T, Fukuhara S, Mishima M, Kadotani H. Association between sleep apnea, sleep duration, and serum lipid profile in an urban, male, working population in Japan. *Chest*. 2013;143:720-8.

Murase K, Mori K, Yoshimura C, Aihara K, Chihara Y, Azuma M, Harada Y, Toyama Y, Tanizawa K, Handa T, Hitomi T, Oga T, Mishima M, Chin K. Association between plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin level and obstructive sleep apnea or nocturnal intermittent hypoxia. *PLoS One*. 2013;8:e54184.

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.

[学会発表](計8件)

Tanizawa K, Chin K: Effects of intermittent hypoxia on several parameters for cardiovascular risk

factors. Industrial Symposium 4: Metabolic risk of sleep apnea. *Worldsleept2011*. Kyoto, Japan, 2011.10.18.

Chin K, Chihara Y, Aritake K, Harada Y, Azuma M, Toyama Y, Murase K, Aihara K, Tanizawa K, Handa T, Yoshimura C, Hitomi T, Oga T, Mishima M, Hayaishi O, Urade Y. A possible specific urine biomarker for severe obstructive sleep apnea and cardiovascular diseases: lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS). American Thoracic Society International Conference 2012. San Francisco, USA, 2012.5.20.

Chin K, Harada Y, Oga T, Azuma M, Murase K, Toyama Y, Aihara K, Tanizawa K, Chihara Y, Yoshimura C, Hitomi T, Handa T, Mishima M. Visceral fat accumulation in subjects with non-to-moderate and severe obstructive sleep apnea. American Thoracic Society International Conference 2012. San Francisco, USA, 2012.5.23.

陳和夫 睡眠時無呼吸の病態と治療効果  
日本内科学会第46回近畿支部生涯教育  
講演会(招聘講演) 大阪市 2012年6月  
27日

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(招聘講演) 京  
都市 2012年10月12日

Chin K. Associations between lifestyle-related diseases, sleep apnea and sleep duration. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Respiratory Diseases and ATS in China Forum 2012(招聘講演). Shanghai, China. 2012.11.8.

外山善朗 閉塞性睡眠時無呼吸と脂肪肝

含量の関連の検討 日本睡眠学会第 38  
回定期学術集会アブストラクトシンポジ  
ウム 2 秋田市 2013 年 6 月 27 日  
外山善朗 睡眠時無呼吸と脂質代謝、脂  
肪肝 第 53 回日本呼吸器学会学術講  
演会シンポジウム 15 東京 2013 年 4 月  
21 日

〔図書〕(計 0 件)  
なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

戸口田 淳也(TOGUCHIDA, junya)  
京都大学再生委科学研究所教授  
研究者番号: 40273502

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

佐藤 幸保(SATO, yukiyasu)  
京都大学医学(系)研究科(研究院)講師  
研究者番号: 40273502

### (3) 連携研究者

なし