

## 14. 細胞レベルでの間歇的低酸素曝露による睡眠時無呼吸症病態メカニズムの解明

研究分担者 星野 勇馬

京都大学医学部附属病院呼吸器内科 助教

### 研究要旨

睡眠時無呼吸症候群に特徴的な間歇的低酸素の影響を評価する細胞実験系を確立した。実験系の不安定性が問題だった液相法と異なり、気相法を採用することで安定した曝露実験が可能となった。この装置を用い、HIF-1 pathway は持続的低酸素によって、一方 NF- $\kappa$ B pathway は間歇的低酸素によって誘導されることを示し、この現象が実験系に依存しない普遍的な現象であることを確認した。

### A. 研究目的

睡眠時無呼吸症候群に特徴的な間歇的低酸素の影響を細胞レベルで解明し、漢方製剤の治療効果を検討する。

### B. 研究方法

1. 間歇的低酸素に培養細胞を曝露するため、培養用のディッシュを入れた密閉容器内を低酸素ガス(酸素 1%、二酸化炭素 5%、窒素 94%)と常酸素ガス(同 21%、5%、74%)を交互に封入できる装置を作成した(気相式間歇的低酸素曝露装置)。低酸素ガスと常酸素ガスの封入条件を様々に変えて密閉容器内と液体培地内の酸素分圧を測定し、細胞を間歇的低酸素に曝露できる条件を検討した。

2. 気相式間欠的低酸素曝露装置を用い

て HeLa 細胞および HRE (Hypoxia Responsive Element)-luc 導入後の HeLa 細胞を間歇的低酸素に曝露し、Luciferase assay および RT-PCR 解析を行った。同系列の細胞を持続的低酸素にも曝露して、間歇的低酸素に曝露した細胞との反応の違いを検討した。また対照とするため、常酸素条件下でも同様の実験・解析を行った。

### C. 研究結果

1. 気相式間歇的低酸素曝露装置の容器内を低酸素ガス 4 分、常酸素 2 分で交互に満たすことにより、液体培地内酸素分圧が 30 ~ 80 mmHg の間を約 8 回 / 時の周期で変化した。さらにこの周期変化が 8 時間以上にわたり安定して得られることも確認できた。

2. HIF (Hypoxia Inducible Factor) -HRE pathway の誘導は間歇的低酸素暴露群および対照群では認められず、持続的低酸素暴露群でのみ認められた。RT-PCR では、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現亢進は間歇的低酸素暴露群で認められたが、持続的低酸素群では認められなかった。VEGF $\alpha$  の mRNA 発現は対照群に比し、持続的低酸素群でのみ亢進していた。

#### D. 考察

気相法を採用することで、液相法より安定かつ長時間の間歇的低酸素暴露実験が可能となった。

持続的低酸素はHIF-1経路を誘導するのに対し、間歇的低酸素はNF- $\kappa$ Bを誘導していた。この結果は、我々の液相式間歇的低酸素暴露装置を用いた検討およびRyanらの報告 (*Circulation* 2005)と合致しており、持続的および間歇的な低酸素暴露に対する細胞応答の違いが実験系に依存しない普遍的な現象であることを示唆するものと考えられた。

#### E. 結論

本装置により睡眠時無呼吸を in vitro で模した間歇的低酸素モデルが確立できた。さらにその他の睡眠関連分子についても間歇的低酸素の影響を検証していく予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyokawa H, Muro S, Oguma T, Sato S, Tanabe N, Takahashi T, Kudo M, Kinose D, Kondoh H, Kubo T, Hoshino Y, Oguma E, Hirai T, Mishima M: Impact of COPD. Exacerbations on Osteoporosis Assessed by Chest CT Scan. *COPD*. 9(3): 235-42: 2012.6.
- 2) Kinose D, Ogawa E, Hirota T, Ito I, Kudo M, Haruna A, Marumo S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Sakai H, Date H, Tamari M, Mishima M: A NOD2 gene polymorphism is associated with the prevalence and severity of chronic obstructive pulmonary disease in a Japanese population. *Respirology*. 17(1): 167-71. 2012.1.
- 3) Tanabe N, Muro S, Hirai T, Oguma T, Terada K, Marumo S, Kinose D, Ogawa E, Hoshino Y, Mishima M: Impact of exacerbations on emphysema progression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J respire Crit Care Med*. 15.183(12): 1653-9. 2011.1.
- 4) Nishioka M, Ogawa E, Kinose D, Haruna A, Ohara T, Ito I, Hoshino Y, Ito Y, Matsumoto H, Niimi A, Mio T, Chin K, Hirai T, Muro S, Mishima M: Lipopolysaccharide induced connective tissue growth factor gene expression in human bronchial epithelial cells. *Respirology*. 15(4): 669-76. 2010.5.

2. 学会発表  
該当なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし