

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検証した。気相法では液相法よりも安定して培養細胞を間歇的低酸素に曝露させることができた。これらの装置を用い、HIF-1 pathway は持続的低酸素によって、一方 NF- κ B pathway は間歇的低酸素によって誘導されることを示した。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が確認でき、睡眠時無呼吸症候群の病態を細胞レベルで解明するために必要な実験系の確立に成功した。

A. 研究目的

睡眠時無呼吸症候群の病態メカニズムは、しばしば併存する肥満、高血圧などの疾患要素の影響により、生体レベルの検討のみでは解明が困難である。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検討することも有用と考えられ、この目的のため間歇的低酸素曝露装置を開発して実験系の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 細胞を酸素溶解度の異なる培地に交互に入れる、液相法による低酸素曝露装置を作成し、その実験系の確率を目指した。
2. さらに長時間、安定して間歇的低酸素

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%)と常酸素ガス(同21%)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。

3. これらの間歇的低酸素曝露装置を用いて HeLa 細胞を間歇的低酸素に曝露した。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- α の mRNA 発現を real-time PCR 法で検討した。同系列の細胞

を持続的低酸素にも暴露して、間歇的低酸素に暴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. 液相法により、約 6 回 / 時(無呼吸低呼吸指数 = AHI 6 に相当)の間歇的低酸素曝露が可能となった。これにより 4 時間の間歇的低酸素曝露が可能となった。

2. 気相式間歇的低酸素曝露装置を用いた場合、間歇的に約 8 回 / 時(AHI 8 相当)で培養液を低酸素化することが可能となった。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。

3. 液相法で 4 時間、気相法で 8 時間の間歇的低酸素曝露実験を行って細胞応答を解析した。同時間の持続低酸素曝露群および対照群の応答と比較した。いずれの実験系でも HIF (Hypoxia Inducible Factor) -HRE pathway の誘導は間歇的低酸素曝露群および対照群では認められず、持続的低酸素曝露群でのみ認められた。また 8 時間曝露細胞では、HIF 経路の誘導指標として RT-PCR により VEGFa の mRNA 発現も検討を行ったが、これも対照群に比し持続的低酸素群でのみ亢進していた。RT-PCR で検討した TNF- α の mRNA 発現亢進は間歇的低酸素曝露群の場合はいずれの実験系でも認められたが、持続的低酸素群では認められなかった。

D. 考察

液相法も気相法も間歇的低酸素曝露実験に利用することが出来たが、気相法を用いるこ

とで液相法より安定かつ長時間の間歇的低酸素曝露実験が可能であった。

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- κ 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曝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曝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。

細胞レベルでの低酸素刺激実験により間歇的低酸素に特異的な細胞応答を認めることが示され、我々の開発した実験系は睡眠時無呼吸症候群の病態を細胞レベルで解明するのに有用であると考えられた。

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

- 1) 谷澤公伸、陳和夫、星野勇馬、小賀徹
 間歇的低酸素と SAS . 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 12
 全身性疾患としてのスイン民事無呼吸症候群 2010 年 4 月 25 日

- 2) Kiminobu Tanizawa, Kazuo Chin: Effects of Intermittent Hypoxia On Several Parameters for Cardiovascular Risk Factors. *World Sleep 2011. Industrial Symposium 4.* October 18th, 2011.

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