

— Review —

低酸素ストレスと心血管病

林 哲也

Hypoxic Stress and Cardiovascular Diseases

Tetsuya HAYASHI

*Department of Cardiovascular Pharmacotherapy and Toxicology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences,
4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan*

(Received October 16, 2020 ; Accepted December 1, 2020)

Abstract In patients with sleep disordered breathing, intermittent hypoxia causes increased oxidative stress, accelerates atherosclerosis and pulmonary hypertension, resulting in life threatening arrhythmia and congestive heart failure. Hypoxic stress caused by intermittent hypoxia might be involved in the pathophysiology of many cardiovascular diseases. A better understanding of these mechanisms may enable the development of novel and effective therapeutic strategies against cardiovascular diseases.

Key words — intermittent hypoxia, oxidative stress, atherosclerosis, heart failure, pulmonary hypertension.

1. はじめに

私は令和3年3月をもって退職するが、恩師である大阪医科大学第3内科河村慧四郎先生のご指導で研究を始めてから、大阪医科大学と本学の両校で合わせて35年間にわたって臨床をしながらの研究生活を過ごした。さらに米国テキサス大学で研究にどっぷり浸かった2年間を加えると、なんと37年間も電子顕微鏡を覗いていたことになる。奇しくも、本学は令和3年4月から大阪医科薬科大学として再出発することになり、本稿はさまざまな思いの詰まった感慨深い私の最終論文となる。

2. 低酸素ストレスと心機能障害

2.1. 睡眠呼吸障害と心不全

欧米の多くの先進国では、国民の死因の第一位は心不全と報告されている。心不全は高齢者に多い疾患であり、人口の高齢化が進む我が国では心不全患者の著しい増加が予想され、社会経済面においても重要な問題である。さらに、心不全にチ

ェーン・ストークス呼吸 (Cheyne-Stokes Respiration: CSR) を代表とする睡眠呼吸障害 (sleep disordered breathing: SDB) を合併する場合には、患者予後が不良とされている^{1),2)}。

SDBとは、自覚症状の有無を問わずに無呼吸低呼吸指数 (apnea hypopnea index: AHI) ≥ 5 であって、そのうち閉塞型呼吸イベントが優位なものが閉塞性無呼吸、中枢型呼吸イベントが優位なものが中枢性無呼吸と定義される。具体的に、無呼吸とは10秒以上呼吸が停止し、中途覚醒を伴うものであり、低呼吸とは30%以上の気流低下を伴う浅い呼吸が持続するために、酸素飽和度の低下や中途覚醒が起こるものである。何れの場合もSDBは患者の睡眠パターンを妨げ多彩な影響を及ぼすことが知られている。

CSRは、繰り返される無呼吸、低呼吸、そして過呼吸からなり、10分以上持続する漸増漸減の呼吸パターンを示す中枢性無呼吸である³⁾。心血管疾患におけるSDB合併頻度は、海外では薬剤耐性高血圧症が80%と最も高く、次いで心不全76%と報告されている。心不全患者におけるSDBの特徴

は、閉塞型に加え、CSRを伴う中枢型を高率に認めることである⁴⁾。

2.2. 睡眠時無呼吸症候群

近年、メタボリックシンドロームが増加しており、社会的ならびに経済的に問題となっている。メタボリックシンドロームや肥満患者に睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome: SAS) が合併することが多く⁵⁾、とくに閉塞型 SAS (obstructive SAS: OSAS) が多いことが知られている。さらに SAS の患者には心血管合併症が多いことが知られており⁶⁾、睡眠時無呼吸と心房細動出現頻度との関連性についても報告されている⁷⁾。

我々は、OSAS患者の心筋収縮予備能について、ドプタミン負荷心エコーを用いて評価した⁸⁾。その結果、重症 OSAS 患者では拡張能のみならずストレス負荷時の収縮予備能が低下しており、心筋間質の線維化などの変性所見が疑われた (Fig. 1)。OSAS の病態生理は複雑であるが、交感神経活性亢進、血管内皮機能障害、酸化ストレス、代謝異常、そして炎症や凝固能亢進などが関与すると考えられた (Fig. 2)。

2.3. 間歇的低酸素負荷と酸化ストレス

そこで我々は、低酸素後の酸素化による酸化ストレスの増加と心血管リモデリングの関連性に注目し、低酸素状態を自由に制御できる間歇的低酸素負荷装置を用いた *in vivo* 実験系を確立し (Fig. 3)、間歇的低酸素負荷が心筋細胞に与える影響について検討した⁹⁾。本装置内にて飼育したマウスの血圧は、間歇的低酸素負荷中の血圧変動が激しく、また連続低酸素負荷 10 日目には収縮期血圧ならびに脈圧の増加が確認された (Fig. 4)¹⁰⁾。

さらに酸化ストレス応答の役割を明らかにするため、gp91phox-containing NADPH oxidase のノックアウト (gp91^{-/-}) マウスを用いた実験を行った。その結果、間歇的低酸素負荷後 10 日目の左室心筋において、TGF- β 、TNF- α 、IL-6 などのサイトカイン mRNA の発現が有意に上昇するとともに、スーパーオキシド産生量、lipid peroxide の増加が確認され、免疫組織化学染色により 4-hydroxy-2-

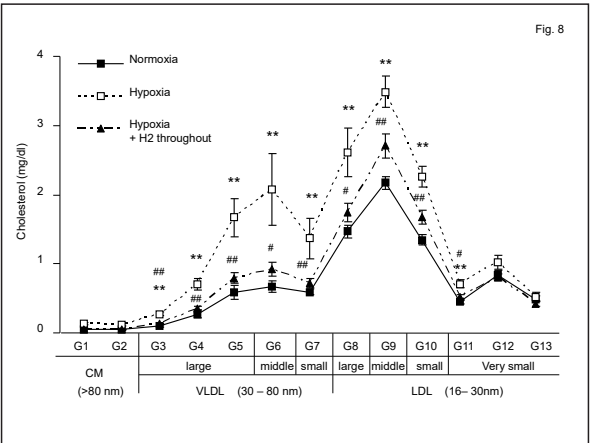
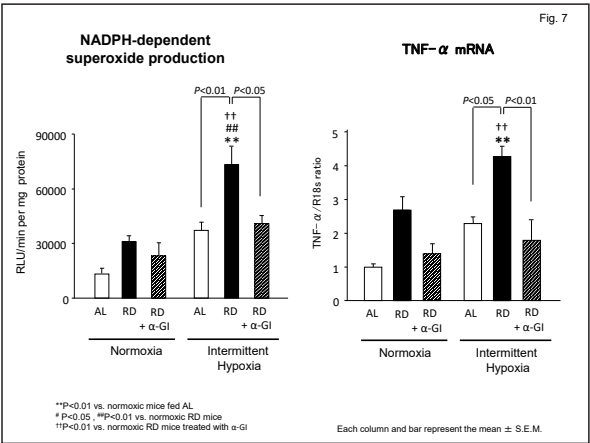
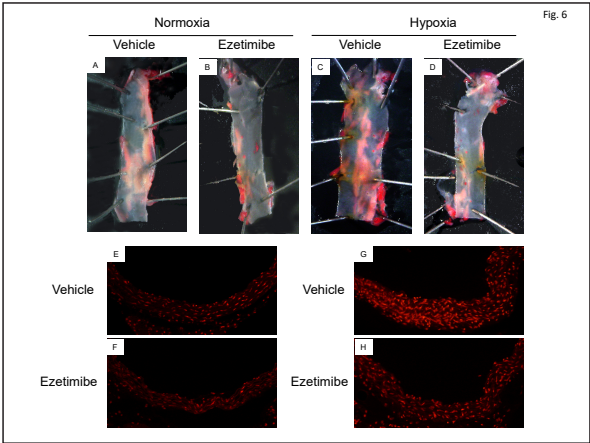
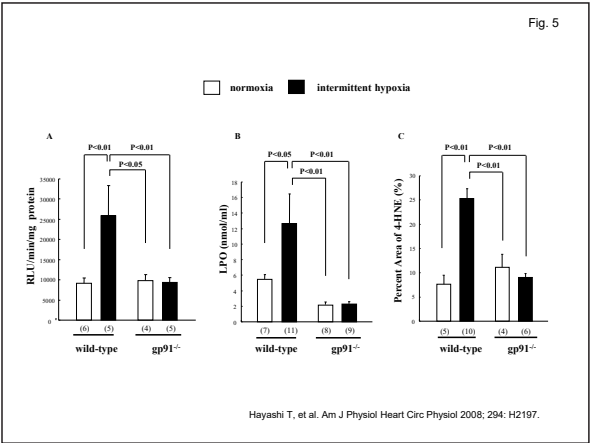
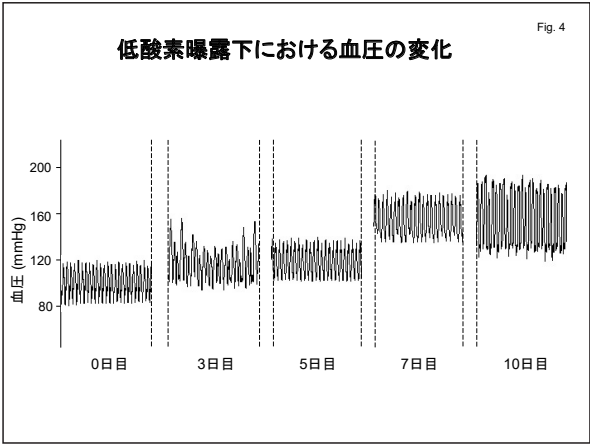
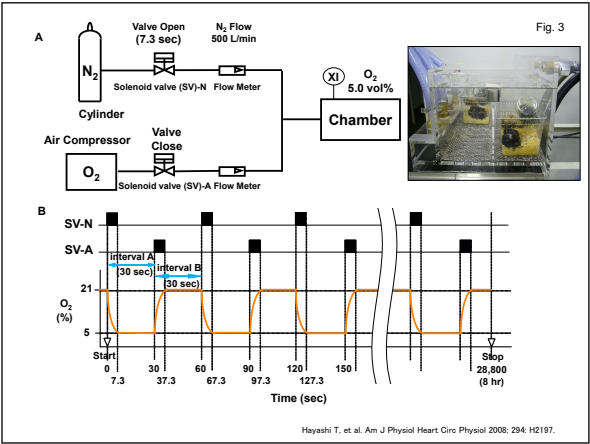
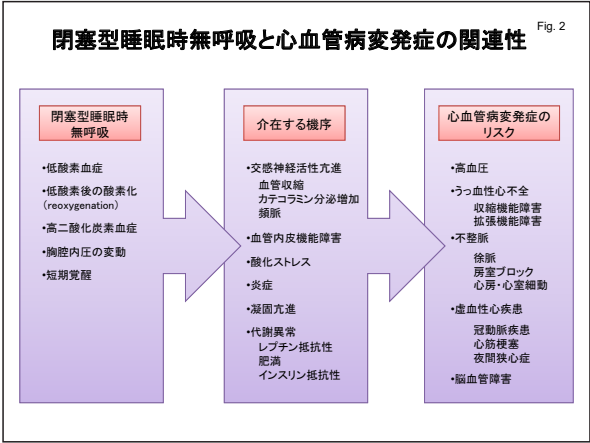
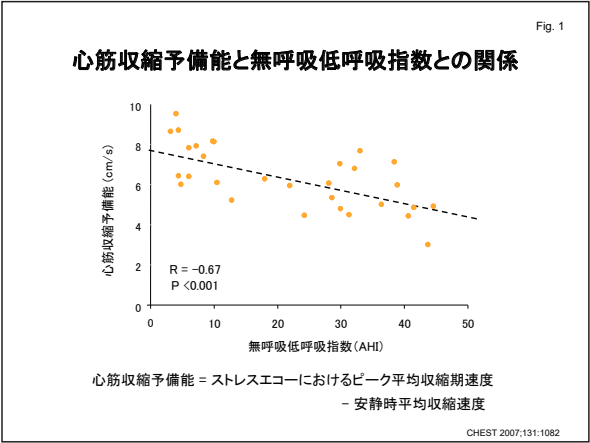
nonenal タンパク量の増加が認められた。野生型マウスでは心筋細胞横径や血管周囲の線維化も増加していたのに対し、gp91^{-/-}マウスではこれらの病理変化は認めず、各種サイトカイン mRNA の増加も認めなかった (Fig. 5)⁹⁾。以上の結果より、間歇的低酸素負荷に伴う酸化ストレスの上昇に NADPH が重要な役割を果たしていることが理解できる。

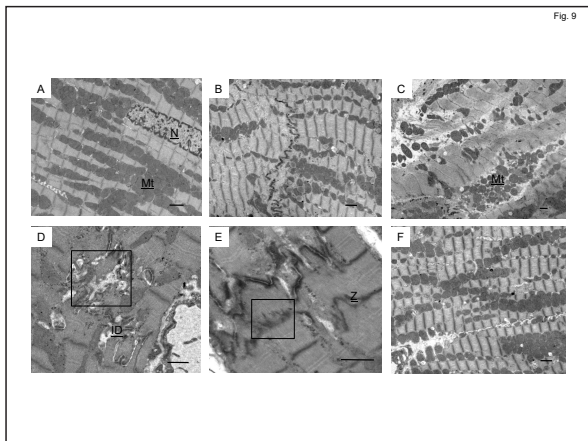
3. 低酸素ストレスと心血管リモデリング

動脈硬化病変に対する低酸素ストレスの影響について、アポリポタンパク E ノックアウトマウスを用いて検討した結果、間歇的低酸素負荷により動脈硬化病変は有意に増加した (Fig. 6)。その機序として、LDL や VLDL などのコレステロールプロファイルの変化に加え、コレステロールの腸管からの再吸収の増大、およびスーパーオキシド産生量や酸化ストレスの増加が考えられた¹¹⁾。

心臓への影響では、間歇的低酸素負荷により右室肥大が先行して出現し、長期的には拡張不全と左室肥大も確認された。特に、糖尿病や心不全状態では、すでに酸化ストレスが増加していることが予測され、低酸素負荷により重大な影響を受けることが考えられる。我々は、糖尿病ラットに低酸素負荷を与えた際の心臓リモデリングとそれに対するアンジオテンシン II 受容体遮断薬の有効性について報告している¹²⁾。

そこで、食後高血糖のモデルラットを作成して間歇的低酸素負荷を与え、合わせて α -glucosidase (α -GI) の有効性について評価した。食後高血糖は予想以上に酸化ストレスを誘導し、心筋細胞における変性所見が増加した。注目すべき点は、 α -GI による食後高血糖の是正による組織保護効果に加え、抗酸化作用や抗炎症作用が確認されたことである (Fig. 7)。これは、 α -GI 投与健常者の呼気中水素ガス濃度が上昇するという事実より、水素ガスによるラジカルスカベンジ作用と関連する可能性が考えられた¹³⁾。



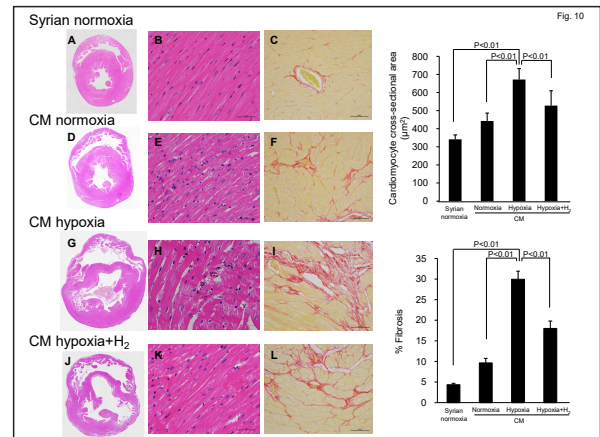


4. 心不全と水素ガス

これまでの研究から、低酸素ストレスが糖尿病における心血管合併症や動脈硬化病変を増悪させ、その機序にはレニン・アンジオテンシン系の関与や酸化ストレスが関与することが明らかとなった^{12), 14-16)}。さらに、スタチン系薬剤などを用いる抗酸化療法が病変進展を抑制することを確認した¹⁷⁾。特に、睡眠時無呼吸に見られるような間歇的な低酸素状態においては酸化ストレスの増加と転写因子であるNF- κ Bの役割が重要であることが判明した。スーパーオキシドや過酸化水素は高濃度で存在する場合には細胞毒性を発揮する一方、低濃度ではアポトーシスや細胞分化といった生物にとって重要なプロセスを制御している。従って、酸化ストレスのコントロールは抗動脈硬化・抗加齢医学の観点からも重要な課題である。

近年、水素ガスはヒドロキシルラジカルを選択的に消去し、ラットの脳梗塞や心筋虚血再灌流後の梗塞サイズを減少することが知られている^{18), 19)}。さらに小児に対する麻酔薬の副作用を水素ガスが軽減する可能性も報告されている²⁰⁾。我々の研究では、水素ガス吸入が間歇的低酸素負荷にて惹起される脂質代謝異常を改善し、酸化ストレスを軽減した (Fig. 8)²¹⁾。

次に、心不全モデルであるBIO14.6心筋症ハムスターに間歇的低酸素負荷を行い、水素ガスの心不全治療における有効性について検討した。間歇的低酸素負荷は心筋症ハムスターの心肥大と線維化を有意に増加させ、収縮機能の低下と心不全の



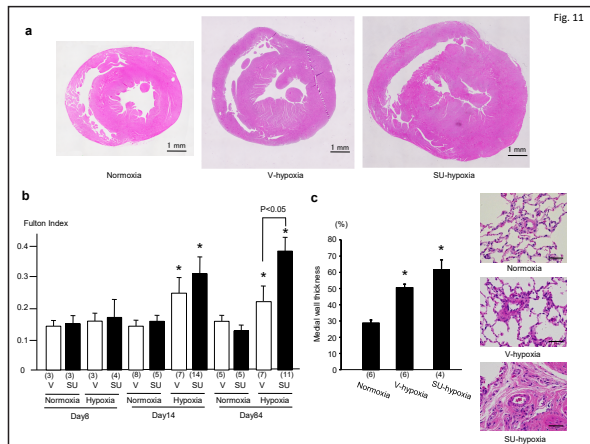
増悪が明らかとなった。微細構造学的には、心筋細胞内オートファゴソームの増加や核の変形が著しく、不全心においてはZ-bandや筋原線維の融解が特徴的であった (Fig. 9)。さらに不全心においては間歇的低酸素負荷が脳利尿ペプチド、 β -ミオシン重鎖に加えてc-fos、c-junなどのmRNA発現を増加させた²²⁾。

一方、1.3vol%の低濃度水素ガスを低酸素負荷中に投与した動物においては、これらのmRNAの発現が抑制されており、心筋細胞肥大や間質の線維化も軽度であった (Fig. 10)。本研究で検討を行ったc-fosおよびc-junは、activator protein 1 (AP-1)の構成因子であり、AP-1の活性化でaldose reductase-like geneが活性化されることが報告されている。また、aldose reductase-like geneはsarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2)の発現を抑制するPGF2 α の産生に関与することが報告されており、この一連の流れが心不全進展の原因の一つと考えられた。

以上のことから低濃度の水素ガス吸入は、心不全患者の予後を改善する可能性が示唆され、無呼吸症候群を合併した心不全患者に対する治療に関して重要な知見を与えるものである²²⁾。

5. 肺高血圧症に関連する新たな治療戦略

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺小動脈の中膜肥厚と毛細血管叢状病変を特徴とする肺高血圧症の1つであり、右室リモデリングから右心不全



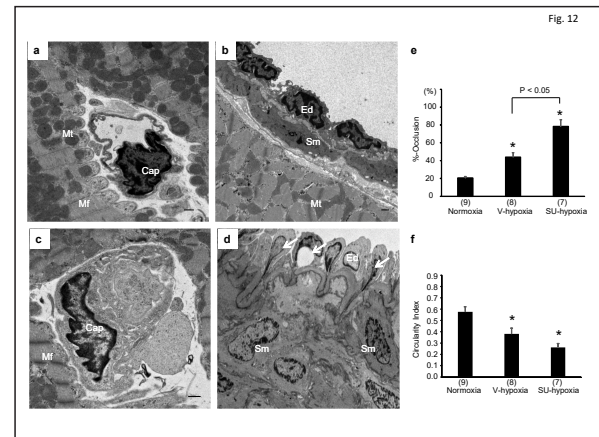
に至る予後不良の難治性疾患である²³⁾。肺高血圧症の病因は低酸素を含めて数多くあるが、患者予後を左右する重要な因子は右室リモデリングの進展と心不全発症の有無である²⁴⁾。我々の研究からも低酸素ストレスが心血管リモデリングを惹起し、心不全を増悪することが明らかとなっている。しかしながらPAHにおける右室リモデリングの発症・進展メカニズムには不明な点が多く、詳細な検討と新たな治療法が必要とされる。

5.1. 実験動物モデル

近年、vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体拮抗薬 Sugen5416 の投与と低酸素負荷の組み合わせによる PAH ラットモデルが報告され、PAH 患者肺病理組織像と近似することから、ヒトの病態により近い検討ができると考えられている²⁵⁾。

雄性 Sprague-Dawley ラット (7 週齢、n=82) を用い、Sugen5416 (20mg/kg) あるいは注射溶解液 (Carboxymethyl cellulose) のみを単回皮下注射後、低酸素状態 ($10 \pm 1\% \text{O}_2$) にて 2 週間飼育した。その後、通常大気下に於てさらに 10 週間飼育し、それぞれ SU-Hypoxia 群、V-Hypoxia 群を作成した。低酸素負荷開始後 3 日目 (Day 3)、8 日目 (Day 8)、低酸素負荷終了後 (Day 14) ならびに実験終了後 (Day 84) に屠殺して心臓、肺組織を採取した。

その結果、SU-Hypoxia 群においては右室圧の顕著な上昇や肺病変が進展し、ヒト PAH 類似の病変が確認された (Fig.11)。興味深いことに、SU-Hypoxia 群において Day 3 より右室心筋微細構造に



変性所見が出現し、臨床的に血行動態に影響を及ぼさない時期から毛細血管の変性所見が確認された。さらに、以降の右室リモデリングに低酸素誘導性 VEGF の発現と受容体を介する ERK ならびに MAPK (mitogen-activated protein kinase) 活性化が関与すると考えられた²⁶⁾。

なお本実験モデルは、肺小動脈の中膜肥厚や叢状病変の存在など、ヒト PAH 近似の肺病変が認められ多くの研究者に利用されているが、右室心筋微細構造にて毛細血管病変が早期から出現するなど、Sugen5416 の影響が全身的なものであったと考えられ (Fig. 12)、Sugen5416 と同様の作用をもつチロシナーゼ阻害薬のような分子標的薬の心血管合併症について、低酸素ストレスの影響が致命的となる可能性がある²⁷⁾。この点については次項に述べるヒト iPS 細胞を用いた Onco-Cardiology のテーマとして検討している。

5.2. アルドステロンと Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)

PAH 患者においてレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進が確認されており血漿中アルドステロン濃度上昇も報告されている²⁸⁾。Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) は副腎皮質ミトコンドリアにおけるステロイド産生において重要な役割を果たすことは知られているが、心筋細胞における StAR ならびにミネラルコルチコイド受容体 (MR) の局在や役割に関しては不明な点が多い²⁹⁾。そこで StAR とミトコンドリアダイナミクスについてヒト剖検心や PAH モデル動

物を用いて検討した。

PAHにて死亡した患者13名、対照として脳出血・間質性肺炎で死亡した患者8名の右房及び右室心筋標本を用い、光顕・電顕ならびにStAR, MR発現に関する免疫組織化学的検索を行った。その結果、PAH患者の右室においてStARやMRの発現が増加しており、心筋細胞の細胞質や核の一部にも陽性所見が認められた。

動物実験では前述のPAHを発症した雄性SDラットを用い、Spironolactone (25mg/kg/day) あるいはEplerenone (50mg/kg/day) を4週間投与した結果、c-Fos、c-Jun、StAR、MR、NF- κ B、ERK、Mfn、DrpなどのmRNA、タンパク量の増加がPAHの出現とともに増加したが、MR拮抗薬の投与にて抑制され、PAH治療におけるMR拮抗薬の有効性が確認された。さらに、*in vitro*実験として、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト心臓微小血管内皮細胞(HCMEC)を用いて同様の検索を行い、これらの結果を2019年米国フィラデルフィアにて開催されたAHA米国循環器学会総会にて発表した。

5.3. ヒトiPS細胞を用いた新たな実験系

PAH患者の右室心筋における病態を明確にするために、ヒトiPS細胞から心筋細胞を分化させ、1%低酸素12時間負荷時のHIF-1 α 、StAR、JNK、ERKの発現を定量評価した。その結果、ヒトiPS細胞から分化した心筋細胞において、低酸素負荷によりすべての検討項目において発現の増加が確認された。研究データは論文として投稿中である。

近年、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術が進歩し、2020年のノーベル化学賞にドイツMax Planck Institute for Infection BiologyのEmmanuelle Charpentier所長と米国California大学Berkeley校のJennifer Doudna教授が受賞した。このCRISPR/Cas9法により全生物のゲノムを自由自在に改変することが可能となった³⁰⁾。さらにCas9の代わりに、活性中心に点変異を導入してヌクレアーゼ活性を欠損させたdead Cas9 (dCas9)を使用することで、標的遺伝子の発現を制御できる。CRISPRi法はdCas9に転写抑制因子(KRAB)を融合させた

因子をゲノム上の標的遺伝子座へ誘導するsingle guided RNA (sgRNA)によって、標的遺伝子の発現を抑制する手法であり、iPSCおよびiPSC由来の心臓前駆細胞、心筋細胞、およびTリンパ球における遺伝子発現を効率的かつ可逆的に阻害することができる³¹⁾。

現在我々は、ヒトiPS細胞由来心筋細胞でのStARの役割を明確にするために、CRISPRi法によってStARノックダウンiPS細胞を作成して詳細な検討を行っている。本法は、PAHにおける心筋リモデリングの詳細な病態解明に有効な手段であり、新たな治療法の開発にも利用できる。この研究の一部は学術交流・研究推進プロジェクトの報告書に記載している。

6. おわりに

2017年、第38回日本循環制御医学会総会・学術集会を主催する機会に恵まれ、「心血管リモデリングと循環制御：基礎と臨床」をテーマとしてシンポジウムやパネルディスカッションを行った。内科、外科、麻酔科領域から重要な課題について最新の情報を共有するとともに看護師、薬剤師、臨床工学技士らも含めた医療チームとして熱心な議論を交わすことができた (Fig. 13)。本稿の一部は会長講演で発表した内容であり、詳細は学会誌「循環制御」(2017第38巻、第3号、pp171-176)を参照していただきたい。

私は、循環制御という言葉は血行動態コントロールのみならず、病院廃液などの制御にも配慮する必要があると考えている。例えば、医療機関では疾病の治療のため恒常的に薬剤が使用される一方、患者の排泄物を含む病院廃液から薬剤が河川に流出する可能性がある。こういった状況では、特殊な廃液処理を医療チームで一丸となって取り組む事が重要であり、環境面に配慮した検討と対応に取り組むことこそ、社会的なニーズに応える医療従事者の義務であると考えられる。

学会では「病院廃液に関する重要課題と今後の展望」というテーマでパネルディスカッションを開催し、本学環境分子生理学研究室(現 衛生化



Fig. 13

学研究室) 東剛志博士を中心とする研究チームの貴重な成果を報告した³²⁾。我々の日常は臨床や研究に追われる日々であるが、人・動物・環境に配慮することは医療の質を高めることにとどまらず、長期的には地域との相互協力や広域の安全保障、ひいては人類の繁栄と持続可能な社会に寄与するところが少なくない。今後も医療従事者としての責務を果たすべく努力し続けたいと考えている。

謝辞：これまでに約90篇の原著英語論文を発表してきた。わずかな数の論文ではあるが、それぞれの論文について作成時の苦労とアクセプトされた時の喜びを思い出す。自分一人では何もできなかったが、恩師や同僚、研究生やコメディカル、そして秘書の皆さんに支えられた業績として大切にしたいと思う。末筆ではありますが、これまでお世話になったすべての方々に厚く御礼申し上げます。とくに、海外留学や研究など好きなことをさせてくれた妻や子供たち、そして今は亡き両親に感謝している。

文献

- 1) Javaheri S., Shukla R., Zeigler H., Wexler L., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **49**, 2028-2034 (2007).
- 2) Mortara A., Sleight P., Pinna G.D., Maestri R., Capomolla S., Febo O., La Rovere M.T., Cobelli F., *Am. J. Cardiol.*, **84**, 900-904 (1999).
- 3) Costanzo M.R., Khayat R., Ponikowski P., Augostini R., Stellbrink C., Mianuli M., Abraham W.T., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **65**, 72-84 (2015).
- 4) Oldenburg O., Lamp B., Faber L., Teschler H., Horstkotte D., Topfer V., *Eur. J. Heart Fail.*, **9**, 251-257 (2007).
- 5) Coughlin S.R., Mawdsley L., Mugarza J.A., Calverley P.M.A., Wilding J.P.H., *Eur. Heart J.*, **25**, 735-741 (2004).
- 6) Marin J.M., Carrizo S.J., Vicente E., Agusti A.G.N., *Lancet*, **365**, 1046-1053 (2005).
- 7) Gami A.S., Hodge D.O., Herges R.M., Olson E.J., Nykodym J., Kara T., Somers V.K., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **49**, 565-576 (2007).
- 8) Okuda N., Ito T., Emura N., Suwa M., Hayashi T., Yoneda H., Kitaura Y., *Chest*, **131**, 1082-1089 (2007).
- 9) Hayashi T., Yamashita C., Matsumoto C., Kwak C.J., Fujii K., Hirata T., Miyamura M., Mori T., Ukimura A., Okada Y., Matsumura Y., Kitaura Y., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, H2197-2203 (2008).
- 10) Nishioka S., Yoshioka T., Nomura A., Kato R., Miyamura M., Okada Y., Ishizaka N., Matsumura Y., Hayashi T., *Hypertens. Res.*, **36**, 934-939 (2013).
- 11) Kato R., Nishioka S., Nomura A., Ijiri Y., Mitamura M., Ukimura A., Okada Y., Kitaura Y., Hayashi T., *Eur. J. Pharmacol.*, **765**, 7-14 (2015).

- 12) Inamoto S., Hayashi T., Tazawa N., Mori T., Yamashita C., Nakano D., Matsumura Y., Okuda N., Sohmiya K., Sakai A., Furuya E., Kitaura Y., *Circ. J.*, **70**, 787-792 (2006).
- 13) Miyamura M., Schnell O., Yamashita C., Yoshioka T., Matsumoto C., Mori T., Ukimura A., Kitaura Y., Matsumura Y., Ishizaka N., Hayashi T., *J. Pharmacol. Sci.* **114**, 32-40 (2010).
- 14) Nakano D., Hayashi T., Tazawa N., Yamashita C., Inamoto S., Okuda N., Mori T., Sohmiya K., Kitaura Y., Okada Y., Matsumura Y., *Hypertens. Res.*, **28**, 837-845 (2005).
- 15) Yamashita C., Hayashi T., Mori T., Tazawa N., Kwak C.J., Nakano D., Sohmiya K., Okada Y., Kitaura Y., Matsumura Y., *Hypertens. Res.*, **30**, 1219-1230 (2007).
- 16) Matsumoto C., Hayashi T., Kitada K., Yamashita C., Miyamura M., Mori T., Ukimura A., Ohkita M., Jin D., Takai S., Miyazaki M., Okada Y., Kitaura Y., Matsumura Y., *Hypertension*, **54**, 164-171 (2009).
- 17) Inamoto S., Yoshioka T., Yamashita C., Miyamura M., Moti T., Ukimura A., Matsumoto C., Matsumura Y., Kitaura Y., Hayashi T., *Hypertens. Res.*, **33**, 579-586 (2010).
- 18) Ohsawa I., Ishikawa M., Takahashi K., Watanabe M., Nishimaki K., Yamagata K., Katsura K., Katayama Y., Asoh S., Ohta S., *Nat. Med.*, **13**, 688-694 (2007).
- 19) Hayashida K., Sano M., Kaminura N., Yokota T., Suzuki M., Ohta S., Fukuda K., Hori S., *Circulation*, **130**, 2173-2180 (2014).
- 20) Yonamine R., Satoh Y., Kodama M., Araki Y., Kazama T., *Anesthesiology*, **118**, 105-113 (2013).
- 21) Hayashi T., Yoshioka T., Hasegawa K., Miyamura M., Mori T., Ukimura A., Matsumura Y., Ishizaka N., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H1062-H1069 (2011).
- 22) Kato R., Nomura A., Sakamoto A., Yasuda Y., Amatani K., Nagai S., Sen Y., Ijiri Y., Okada Y., Yamaguchi T., Izumi Y., Yoshiyama M., Tanaka K., Hayashi T., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **307**, H1626-H1633 (2014).
- 23) D'Alonzo G.E., Barst R.J., Ayres S.M., Bergofsky E.H., Brundage B.H., Detre K.M., Fishman A.P., Goldring R.M., Groves B.M., Kernis J.T., et al., *Ann. Intern. Med.*, **115**, 343-349 (1991).
- 24) Zangiabadi A., De Pasquale C.G., Sajkov D., *Biomed. Res. Int.*, (doi: 10.1155/2014/739674), 739674 (2014).
- 25) Abe K., Toba M., Alzoubi A., Ito M., Fagan K.A., Cool C.D., Voelkel N.F., McMurtry I.F., Oka M., *Circulation*, **121**, 2747-2754 (2010).
- 26) Woo E., Kato R., Imano H., Fujiwara Y., Ijiri Y., Okada bY., Yamaguchi T., Izumi Y., Yoshiyama M., Katsumata T., Hayashi T. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **15**, 589-598 (2017).
- 27) Litz J., Warshamana-Greene G., Sulanke G., Lipson K.E., Krystal G.W., *Lung Cancer*, **46**, 283-291 (2004).
- 28) Maron B.A., Leopold J.A., *Pulm. Circ.*, **4**, 200-210 (2014).
- 29) Maron B.A., Oldham W.M., Chan S.Y., Varges S.O., Arons E., Zhang Y.Y., Loscalzo J., Leopold J.A., *Circulation*, **130**, 168-179 (2014).
- 30) Doudna J.A., Charpentier E., *Science*, **346**, 1258096 (2014).
- 31) Mandegar M.A., Huebsch N., Frolov E.B., Shin E., Truing A., Olvera M.P., Chan A.H., Miyaoka Y., Holmes K., Spencer C., et al., *Cell Stem Cell*, **18**, 541-553 (2016).
- 32) Azuma T., Otomo K., Kunitou M., Shimizu M., Hosomaru K., Mikata S., Ishida M., Hisamatsu K., Yunoki A., Mino Y., Hayashi T., *Sci. Total Environ.*, **657**, 476-484 (2019).

Figure Legends

Fig.1. ドブタミン負荷ストレスエコーにて計測した心筋収縮予備能と無呼吸低呼吸指数との関連性。
平均収縮期速度は組織ドプラ法にて僧帽弁輪収縮速度を測定した。睡眠時無呼吸症候群が重症にな

ると、左室拡張能のみならず収縮能も低下し、それには心筋細胞の肥大や間質の線維化が関与すると考えられる。

Fig.2. 閉塞型睡眠時無呼吸と心血管病変発症の関連性. 本文参照.

Fig.3. A: Intermittent hypoxic exposure system. Solenoid valve (SV)-N was opened to flush N₂ (500 l/min) into the chamber to reduce O₂ level. After SV-N was closed, SV-A was opened to flush compressed air. Valves were regulated via a personal computer with custom-made software. B: O₂ level in the chamber during each period. O₂ was reduced to 4.5–5.5% for 30 s and then returned to 21% in the following 30 s. Hatched bars indicate that SV-N or SV-A is open.

Fig. 4. 間歇的低酸素負荷時 (Hypoxic stress) におけるマウスの血圧変動.

テレメトリシステム (PA-C10, Data Sciences International) を用いた実験. 本文参照.

Fig. 5. A: Effect of intermittent hypoxic stress on NADPH-dependent superoxide production in homogenates from LV tissues of wild-type and gp91^{-/-} mice. B: Plasma lipid peroxide (LPO) levels in wild-type and gp 91^{-/-} mice exposed to normoxia or intermittent hypoxia. C: Percent area of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) protein in LV myocardium from wild-type and gp91^{-/-} mice exposed to normoxia or intermittent hypoxia. Values are means \pm SE of number of animals in parentheses. RLU, relative light units.

Fig. 6. Representative examples of thoracic aortas (en face dissection) stained with oil red O (A–D) and labeled with dihydroethidium (DHE) (E–H). Intermittent hypoxia increases atherosclerotic lesions (C) and superoxide production (G) in the thoracic aorta. Treatment with ezetimibe suppresses atherosclerosis and superoxide production in mice exposed to intermittent hypoxia as well as in normoxic mice (B, D, F and H).

Fig. 7. NADPH-dependent superoxide production (A) and expression of TNF- α mRNA (B) in the LV myocardium by RT-PCR.

Columns and bars represent the mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$ vs. normoxic mice fed AL, ^{##} $P < 0.01$ vs. normoxic RD mice, ^{††} $P < 0.01$ vs. normoxic RD mice treated with acarbose (α -GI). NADPH: reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, TNF: tumor necrosis factor, mRNA: messenger ribonucleic acid, LV: left ventricular, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, AL: ad libitum, RD: restricted diet, α -GI: alpha-glucosidase inhibitor.

Fig. 8. Plasma lipoproteins analyzed using high-performance liquid chromatography. Intermittent hypoxia (Hypoxia) elevated low- and very low-density lipoproteins (LDL and VLDL, respectively) of plasma cholesterol in mice (\square). Inhalation of H₂ gas throughout the experiment (\blacktriangle) significantly suppressed the increases in LDL and VLDL. Marks and bars represent means \pm SE. ** $P < 0.01$ vs. normoxia (\blacksquare); [#] $P < 0.05$ and ^{##} $P < 0.01$ vs. hypoxia.

Fig. 9. Electron micrographs of the LV myocardium. A normal Syrian hamster (A). Mt, mitochondria; N, nucleus. Mild myofiber disarray and variation of mitochondrial sizes are observed in CM hamster maintained under normoxic conditions (B). Intermittent hypoxia (IH) has increased myofibrillar lysis and Mt degeneration in a CM hamster (C). Partial dissociation (square) of intercalated disc (ID) (D) and Z-line (Z) streaming (square) (E) were often observed in the CM hypoxia group.

All the changes seen in CM hamsters due to IH were suppressed by inhaling hydrogen gas (F). Scale bar, 1 μ m.

Fig. 10. Representative light micrographs, cardiomyocyte cross-sectional area, and collagen content (% Fibrosis) in the LV myocardium of cardiomyopathic (CM) hamsters. Intermittent hypoxia caused cardiac hypertrophy (G), cardiomyocyte degeneration (H), and increased perivascular fibrosis (I). These abnormalities were suppressed by inhalation of hydrogen gas (J–L). Intermittent hypoxia significantly increased the cardiomyocyte cross-

sectional area and interstitial fibrosis, whereas inhaling hydrogen gas (H₂) significantly suppressed these changes. Values are shown as means \pm SE (n = 5–16).

Fig. 11. Effect of hypoxia on heart and the muscular arteries in lung. **(a)** Representative light micrographs of cross-sectional area (haematoxylin and eosin stain, x4). Hypertrophy of biventricular myocardium is prominent in SU-hypoxia rats on Day 84. **(b)** Each heart was excised and the Fulton index was calculated (right ventricular weight/septal weight + left ventricular weight). Data are shown as the mean and standard error of the mean (SEM) of the number of animals in parentheses. **P* < 0.05, vs. Normoxia. **(c)** Representative light micrographs of the muscular artery on Day 14. The medial wall thickness in the muscular arteries was significantly increased in the V-hypoxia group, as well as in the SU-hypoxia group. Scale bar indicates 50 μ m. **P* < 0.05, vs. Normoxia. V-hypoxia, group treated with carboxymethyl cellulose under hypoxia; SU-hypoxia, group treated with Sugen 5416 under hypoxia; V, V-hypoxia; SU, SU-hypoxia.

Fig. 12. Representative electron micrographs of the right ventricular myocardium and quantification of capillary. Scale bar indicates 1 μ m. In the V-hypoxia group, myocardial cells and a capillary **(a)** show normal configuration on Day 3. A small artery with

normal endothelial cells and smooth muscle cells **(b)** are observed in the V-hypoxia group. In the SU-hypoxia group, however, occlusive capillary **(c)**, And endothelial cell degeneration (arrows) with hypertrophied smooth muscle cells **(d)** are observed on Day 3. **(e)** Quantitative measurement of capillary occlusion on Day 14. The percentage of capillary occlusion (%-Occlusion) was significantly increased in both hypoxic rats, which was significantly exacerbated in the SU-hypoxia group. Data are shown as the mean and standard error of the mean (SEM) of the number of animals in parentheses. **P* < 0.05, vs. Normoxia. **(f)** The circularity index was calculated from the formula $4\pi\text{area}/\text{perimeter}^2$, and perfect circle is 1.0. In both hypoxic rats, circularity index was significant decreased, meaning irregular form of capillaries, although there was no significant difference between V-hypoxia and SU-hypoxia group on Day 14. **P* < 0.05, vs. Normoxia. V-hypoxia, group treated with carboxymethyl cellulose under hypoxia; SU-hypoxia, group treated with Sugen 5416 under hypoxia; Mt, mitochondria; Mf, myofibrils; Cap, capillary; Ed, endothelial cell; Sm, smooth muscle cell.

Fig. 13. 2017年に第38回日本循環制御医学会総会を大阪グランキューブにて開催した。多くの参加者ならびに当研究室スタッフ、配属研究生の協力に感謝する。