

題目

睡眠時無呼吸症候群の HDL 代謝と機能
に及ぼす影響に関する検討

えんどう やすひろ

遠藤 康弘

(循環器病学専攻)

防衛医科大学校

令和 4 年度

目次

第1章 緒言	5
第1節 閉塞型睡眠時無呼吸症候群と動脈硬化性疾患	5
第2節 閉塞性睡眠時無呼吸症候群と脂質異常症	6
第3節 持続的陽圧換気呼吸療法及び脂質異常症	6
第4節 HDL-C 濃度と心血管疾患	7
第5節 HDL 機能	8
第2章 睡眠時無呼吸症候群における HDL 機能に与える影響への検討	10
第1節 研究背景	10
第2節 方法	11
第1項 対象及び研究デザイン	11
第2項 ポリソムノグラフィー (PSG) 検査項目	13
第3項 生化学検査	13
第4項 観察研究におけるコレステロール引き抜き能 (Cholesterol Efflux Capacity ; CEC) 測定	13
第5項 介入研究における CEC の測定	17
第6項 HDL の抗酸化能の評価	17
第7項 統計解析	19

第4節	結果.....	20
第1項	観察研究.....	20
第2項	介入研究.....	22
第5節	考察.....	24
第6節	小括.....	30
第3章	睡眠時無呼吸症候群における HDL プロテオームに与える影響	30
第1節	背景	30
第2節	方法.....	31
(1)	対象患者.....	31
(2)	超遠心法を用いたヒト血清からの HDL 単離.....	32
(3)	HDL プロテオーム解析.....	32
(4)	Gene Ontology エンリッチメント解析 (GO enrichment analysis)	33
(5)	候補蛋白の選択.....	33
(6)	血中 Angiogenin 及び Orosomucoid 1 の蛋白濃度の測定.....	34
(7)	MinSp02 3 分位における Orosomucoid1 の蛋白濃度の比較.....	35
第3節	結果.....	35
(1)	患者背景	35
(2)	HDL プロテオーム解析	35

(3) GO エンリッチメント解析	36
(4) CEC との重回帰分析	36
(5) 候補蛋白の選定	36
(6) Anigenin 及び Orosomucoid1 と CEC との単相関	36
(8) MinSp023 分位での Orosomucoid 1 の比較	37
第 4 節 考察	37
第 5 節 小括	42
第 4 章 総括	42
第 5 章 結論	43
謝辞	44
単語・略語説明	45
引用文献	48

第1章 緒言

第1節 閉塞型睡眠時無呼吸症候群と動脈硬化性疾患

睡眠時無呼吸症候群（Sleep Apnea Syndrome；SAS）は、睡眠中に呼吸停止、低呼吸を繰り返す疾患で、本邦において推定患者数は400万～500万人と推定される。本疾患は、日中の眠気を惹起するため、SASに罹患した患者による自動車・バス・電車での事故が多く報告されており、社会的に着目されている。

SASは、睡眠関連呼吸障害（sleep related breathing disorders：SRBD）の1つで、閉塞性（obstructive sleep apnea：OSA）と中枢性（central sleep apnea syndrome：CSA）に大別されるが前者が大部分を占める。SASの頻度として、無呼吸低呼吸指数（Apnea Hypoxia Index：AHI）が15以上と定義するとその有病率は50歳代の女性で10%弱、男性で10～20%程度とされ、SRBDに昼間の過度の眠気（EDS）と定義するとその有病率は男性で5%前後、女性2～3%前後と報告される（1-11）。このように、SASは頻度の高い病態であり、肥満、男性、加齢がOSAの危険因子であることが知られている（9，12-14）。

本疾患では、間欠的に低酸素環境を呈することで、交感神経活動の賦活化、インスリン抵抗性、慢性炎症、脂質異常症を生じ、動脈硬化性疾患を惹起する

ことが報告されてきた(15) (図 1)。

第 2 節 閉塞性睡眠時無呼吸症候群と脂質異常症

脂質異常症は、動脈硬化性疾患発症の危険因子である。動物研究では間欠的低酸素環境により肝臓での脂質産生が誘導され、脂質異常症を惹起することが知られている(16-18)。OSA 患者を対象とした横断研究が報告されているが、Coughlin らは、61 名の OSA 患者では 41 名の健常者と比較して Body Mass Index (BMI) と独立してトリグリセリド値(TG)及び LDL-コレステロール(LDL-C)値が高値で、HDL-コレステロール(HDL-C)値が低値であった(19)。また、40 歳以上の 6440 名の OSA 患者を対象とした Sleep Heart Health Study において Newman らは BMI と独立して低 HDL-C 血症及び高 TG 血症と関連することを示した(20)。さらに 64 報を対象とした横断研究のメタ解析で、Nadeem らはメタ回帰分析の結果、AHI が、BMI と独立して高 TG 血症、低 HDL-C 血症と関連することを報告した(21)。このように、睡眠時無呼吸症候群は肥満と独立して脂質異常症、特に高 TG 及び低 HDL-C 血症と関連することが示されている。

第 3 節 持続的陽圧換気呼吸療法及び脂質異常症

持続陽圧換気呼吸 (CPAP) は、OSA の標準的な治療法である。OSA 患者では、睡眠中に繰り返される無呼吸及び低呼吸に伴う覚醒反応のために睡眠の質

が低下し、日中の眠気、集中力低下を招くが、CPAP は眠気等の主観的症状の改善効果を有する(22)。また、OSA 患者では高血圧の合併率が高いことが知られているが、CPAP は、メタアナリスにより収縮期血圧及び拡張期血圧を 2-3 mmHg 程度低下させることが知られている(23)。Robinson らは未治療の OSA 患者 220 名を対象としたランダム化比較試験で 1 ヶ月の CPAP 治療により総コレステロールが 10.8mg/dl 低下することを報告した(24)。また、Philips らは、中等度・重症の OSA 患者 29 名を対象としたクロスオーバー比較試験で 2 ヶ月の CPAP 治療により食後の TG 上昇が抑制されることを示した(22)。一方で、OSA 患者 613 名を対象とした前向きコホート研究では、傾向スコアマッチング後に CPAP のアドヒアランス良好な 199 名の患者と CPAP 非使用者の 118 名と比較したところ、治療 2 年後での TC、HDL-C 及び TG の変化量は両群で差は認められなかった(25)。このように、CPAP 療法による脂質改善作用は議論が分かれており結論は得られていない。

第 4 節 HDL-C 濃度と心血管疾患

HDL-C と動脈硬化性疾患については、Framingham Heart Study や PROCAM study などの疫学研究で、HDL-C が心血管疾患（CVD）発症と負の相関関係にあることが知られている(26, 27)。従って、高 HDL-C 血症は、長寿症候群の一部として考えられていたが、近年国内外の研究において著明な 高 HDL-C 血症で

は長寿効果や心血管保護作用に否定的な報告がされている。具体的には、2017年にデンマークで施行された約11万人を対象とした観察研究では高HDL-C血症者の全死亡のハザード比の上昇を認め(28)、2018年に国内における9つのコホート研究(約4万人)を対象としたプール解析(EPOCH-JAPAN)では90mg/dl以上の高HDL-C血症の対象者の心血管疾患ハザード比の上昇を認めた(29)。さらにゲノムワイド関連解析(GWAS)で、SR-B1機能喪失型変異ではHDL-C上昇を認めるも心血管疾患のリスクを高めた(30)。さらに、HDL-C増加を介した抗動脈硬化作用を期待されたCETP阻害薬は、心血管疾患の発症抑制効果を示すことができなかった(31-33)。このように、HDL-Cの高値/上昇が必ずしも心血管疾患の抑制効果につながらない結果となった。

第5節 HDL 機能

HDLは、コレステロール逆転送(Reverse cholesterol Transport:RCT)、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、血管拡張作用、抗血栓作用などの多面的な抗動脈硬化作用を有することが報告されてきた(34-41)。

特に、RCTは主要な抗動脈硬化作用であり、HDLが、末梢の泡沫化マクロファージや平滑筋細胞等から余剰コレステロールを引き抜き、肝臓へと転送し、さらに胆汁から腸管へと排泄する経路である(図2)。中でも、最初のマクロ

ファージからのコレステロール引き抜きが RCT を規定しておりこの経路はコレステロール逆転送系と呼ばれる（図 2）。このコレステロール引き抜き能の臨床応用のため、Rothblat や Rader のグループは、ヒト血清を用いた HDL の引き抜き能のアッセイ（Cholesterol Efflux Capacity: CEC）を確立した(42)。

本アッセイを使って、2011 年および 2014 年に国外の横断研究及び前向き研究で、CEC が、HDL-C とは独立した心血管疾患発症の負の予測因子であることが明らかになった(43, 44)。本邦においても、申請者の研究室において CEC が冠動脈疾患の予測因子であることを報告した(45)。

また、HDL 機能の一つには抗酸化能が挙げられ、動脈硬化惹起性を有する酸化 LDL から過酸化脂質や酸化リン脂質を除去し、抗動脈硬化作用を発揮することが知られている。特に、HDL には、パラオキシナーゼ（Paraoxonase 1: PON1）が結合しており、炎症惹起性の酸化リン脂質の加水分解能を有する(46)。PON1 は肝臓から産生され、HDL に結合する蛋白であり、パラオキシソニ分解活性（パラオキシナーゼ活性）やアシルエステラーゼ活性等の複数の酵素活性を有する。PON1 は、LDL 酸化抑制能を持ち(47)、PON1 ノックアウトマウスでは動脈硬化惹起性に働くことが知られていることから、PON 1 は HDL の抗酸化能に寄与する蛋白であることが知られる(48)。

そのような背景から HDL の量(コレステロール値)ではなく機能(抗動脈硬化作用)が重要であるとの認識が高まりつつある。

第2章 睡眠時無呼吸症候群における HDL 機能に与える影響への検討

第1節 研究背景

睡眠時無呼吸症候群(SAS)は、酸化ストレス、炎症、交感神経活性の亢進、血圧上昇、インスリン抵抗性を基盤とする糖脂質代謝異常が惹起され、心血管疾患(CVD)のリスクを高めるとの報告がある。

睡眠時無呼吸症候群の標準的な治療として、持続的陽圧換気療法(CPAP 療法)が挙げられ、OSA による高血圧の降圧効果や眠気等の QOL 改善効果が期待できる。CPAP 療法は食後 TG 血症改善効果の報告もあるが(22)、統一された見解はない。これまで、Tan らは、OSA 患者で HDL の抗酸化能が低下することを報告したが(49)、SAS 及び CPAP の HDL 機能については極めて限定的であり、CPAP 療法の HDL 機能に与える影響について報告はない。そこで、本研究では、OSA が HDL 機能に与える影響について観察研究を通して検証し、その標準的治療である CPAP 療法が HDL 機能に与える影響を検討した。

第2節 方法

第1項 対象及び研究デザイン

(1) 観察研究

2017年4月から2022年4月までに睡眠総合ケアクリニック代々木及びしん
とこ駅前クリニックで、睡眠時無呼吸症候群(SAS)が疑われる116名の患者が
登録された。20歳以上で本研究の同意を得られた患者が参加し、1) HbA1c >
10%、2) 最近の脳血管イベント(6か月)、3) 肝機能障害(AST / ALTが正常
上限の3倍を超える)、4) 血液透析を含む腎不全、5) NYHA III / IVの心不全
6) 担癌患者 7) 妊婦 8) 重度の感染症および 9) 主治医が研究への参加に不適
切であると判断した患者は本研究から除外された。登録患者は、睡眠ポリソム
ノグラフィー検査が施行され、その翌朝空腹時に血液を採取した。この際に臨
床試験のインフォームドコンセントは、登録されたすべての患者から得た。対
象のOSA患者は、SASの重症度の指標であるAHIを用いて non SAS群(AHI<5)及
び SAS群($5 \leq \text{AHI}$)の2群もしくは non SAS (AHI<5)、mild SAS ($5 \leq \text{AHI} < 15$)
moderate SAS ($15 \leq \text{AHI} < 30$) 及び severe SAS ($\text{AHI} \geq 30$)の4群で区分し、後述す
る生化学検査、CEC、HDL 抗酸化能を評価した。本研究は、防衛医科大学校倫理
委員会より「睡眠時無呼吸症候群患者における HDL 機能不全の検討(登録番号

4305)」で承認を受けている。

(2) 介入研究

2017 年 4 月から 2022 年 4 月までに睡眠総合ケアクリニック代々木及びしんとこ駅前クリニックにおいて睡眠ポリソムノグラフィー検査で Apnea hypoxia Index (AHI) 15 以上の中等度以上の OSA と診断された患者の中で、CPAP 療法の同意が得られた 34 名の患者が参加された。CPAP 療法施行前にすべての患者からインフォームドコンセントを得た。除外基準としては観察研究と同じ基準を用いた。3 ヶ月間の CPAP 療法後の外来診察時に採血検査を随時で施行し、後述する生化学項目及び CEC を CPAP 療法前後で評価した。さらに、CPAP 装着状況を確認し、1 日 4 時間及び週 5 日をカットオフにコンプライアンス良好群及び不良群に区分し、CPAP 療法前後で収縮期血圧、体重、eGFR を測定し、それぞれ血圧上昇群/低下群、体重増加群/体重減少群、腎機能改善群/腎機能低下群に区分し、CPAP 療法前後の CEC の変動差 (Δ CEC) を評価した。

CPAP 療法前の年齢、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、eGFR、HDL-C、AHI、ODI3%、MinSpO₂ (%) 及び CEC の 3 分位における Δ CEC を比較した。本研究は、防衛医科大学校倫理委員会より「睡眠時無呼吸症候群患者における持続陽圧呼吸療法 (CPAP) の HDL 機能改善効果の検討 (登録番号 4306)」で承認を受けて

いる。

第2項 ポリソムノグラフィー (PSG) 検査項目

眠気のアナケートとしてエプワース眠気尺度 (ESS) を用いた。PSG では総睡眠時間、無呼吸数、低呼吸数が測定された。無呼吸・低呼吸指数 AHI, 無呼吸指数 (AI) 及び低呼吸指数 (HI) は表 1 の計算式で算出された。

第3項 生化学検査

血清脂質 (総コレステロール、TG)、尿酸 (UA) 及び血糖は酵素法、HDL-C 濃度はホモジニアス法で測定し、LDL-C は Friedewald の計算式で算出した。アポ蛋白 A-1 (ApoA-1) は免疫比濁法により測定した。ヘモグロビン A1c (HbA1c) は高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法) を用いた。インスリンは化学発光酵素測定法 (CLEIA) で測定した。高感度 CRP は酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) で測定した。

第4項 観察研究におけるコレステロール引き抜き能 (Cholesterol Efflux Capacity ; CEC) 測定

観察研究においては、既報に従い CEC の測定を実施した (44)。

(1) 試薬

^3H -cholesterol は Perkin-Elmer より、8-Bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-Br-cAMP) 及び 3-[Decyldimethylsilyl]-N-[2-(4-methylphenyl)-1-phenethyl]propanamide (Sandoz 58-035) は Sigma Aldrich (St. Louis, MI, USA) より購入した。

(2) 細胞

J774.1 細胞は、理研細胞バンクより有償譲渡された。マウス由来 J774.1 細胞は 56°C で 30 分間非動化した 10 % fetal bovine serum (FBS)、Penicillin (100 IU/mL) 及び Streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) (GIBCO, Grand Island, NY) を含む RPMI1640 (Sigma Aldrich) により、5% CO_2 、37°C で培養した。

(3) アポ B 含有リポタンパク除去血清 (PEG 沈血清) の調製

患者の血液を採血管で採取及び静置後、遠心機 (CAX-371, トミー精工、東京) で遠心分離 (3,000rpm、15 分、4°C) して血清を分取した。1.5mL マイクロチューブに血清 125 μL を添加後、0.2M glycine buffer で pH7.4 に調整された polyethylene glycol (PEG6000、富士フイルム和光純薬、大阪) 50 μL を加え、攪拌した。室温で 20 分間静置後、遠心機 (MX-207、トミー精工、東京) で遠心分離 (10,000rpm、30 分、4°C) し上清を分取し、アポ B 含有リポタンパク除去

血清（PEG 沈血清）とした。

(4) 血清及び Blank 培地の作成

1.5mL マイクロチューブに 0.1%BSA 及び Sandoz 58-035 $2\mu\text{g/mL}$ を添加した RPMI1640 培地 $972\mu\text{L}$ に PEG 沈血清 $28\mu\text{L}$ を加え、血清培地とした。また 0.1% BSA 及び Sandoz 58-035 $2\mu\text{g/mL}$ を添加した RPMI1640 培地 $972\mu\text{L}$ に血清を加えない、Blank 培地を作成した。

(5) CEC の測定

① ^3H -cholesterol を用いた J774.1 細胞へのラベリング (図 3A ①)

J774.1 細胞を 24 ウェルプレート (Corning) に播種し、5% CO_2 、 37°C で培養した。培地を除去し、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DBPS) で 2 回洗浄した。洗浄後、J774.1 細胞は ^3H -cholesterol $2\mu\text{Ci/mL}$ 、Sandoz 58-035 $2\mu\text{g/mL}$ 、0.1%BSA を含む RPMI1640 培地を加えることによりラベリングした。J774.1 細胞にはさらに 8-Br-cAMP 0.3mM を同時に加え、24 時間インキュベーションした。

② HDL を含む PEG 沈血清の添加及びコレステロールの引き抜き (図 3A②③)

0.1%BSA、Sandoz 58-035 $2\mu\text{g/mL}$ 及び患者 PEG 沈血清を含む血清培地及び Blank 培地を添加し、5% CO_2 、 37°C で 4 時間培養した。

③ 細胞内の脂質抽出・培地上清及び細胞内の ^3H 放射活性の測定(図 3A④⑤)

A 脂質抽出及び細胞内の ^3H 放射活性の測定

培養後、培地上清を回収した。回収後、脂質溶解液 (Hexane : isopropanol = 1 : 1, Vol/Vol) 500 μL を添加し、1 時間振盪し、細胞脂質抽出物全量をシンチレーションバイアル (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に入れた。その後、脂質溶解液 500 μL を各ウェルに再度添加し、1 時間振盪し、細胞脂質抽出物全量をシンチレーションバイアルに加えて、Ultima Gold (Perkin-Elmer, MA, USA) 4mL を添加した。

B 培地上清の ^3H 放射活性の測定

回収した上清は遠心分離 (10,000rpm、3 分、4°C) し、上清 200 μL を別のシンチレーションバイアルに入れ、ウルチマゴールド 4mL を添加した。添加後、培地上清、細胞脂質抽出液の ^3H 放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

④ CEC の計算方法(図 3B)

Cholesterol efflux は、培地上清の ^3H 放射活性を培地上清と細胞の ^3H 放射活性の和で除することで算出した。各患者の Cholesterol efflux を 6 名の健康成人から分取したプール血清から作成した PEG 沈血清の cholesterol efflux で

補正することで、CEC を算出した。

第5項 介入研究における CEC の測定

介入研究においては、2019 年以降、防衛医科大学校 RI 施設の工事のために ^3H -コレステロールを用いた CEC 測定ができなかったため、CEC と高い相関を示す Cholesterol Uptake Assay で評価した(50, 51)。

Cholesterol Uptake Assay では、血清に biotin-PEG-labeled cholesterol を加え、磁性粒子にコートした抗 ApoA-1 抗体を用いて血清の HDL を捕捉後、コレステロールを Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin で酵素標識化し、化学発光基質(CDP-Star Chemiluminescent Substrate)を加え、シグナル強度を HI-1000TM システム(Sysmex、Kobe、Japan)で測定し、Cholesterol Uptake Capacity (CUC)値を測定した(図 4)。測定に関しては、シスメックス社(神戸)に委託した。6 名の健常成人から分取したプール血清の CUC 値で補正し、CEC として評価した。

第6項 HDL の抗酸化能の評価

(1) 活性酸素吸収能力 (Oxygen Radical Absorbance Capacity : ORAC) (図 5)

ORAC は、既報に基づき測定を行った(52)。HDL を含んだ PEG 沈血清に蛍光基

質及び酸化開始剤を添加する。抗酸化能が高い程、蛍光基質の蛍光強度の減退は抑制されるため、抗酸化能を測定することが可能である。血清もしくは PEG 沈血清をリン酸緩衝液に溶解した。Fluorescein ($0.15 \mu\text{mol/L}$ 、Sigma Aldrich) 及び 2, 2-azobis dihydrochloride (AAPH; $60 \mu\text{mol/L}$ 、Sigma Aldrich) を添加した。AAPH 添加後、分光光度計 (TriStar LB942 Multimode Reader、Berthold Technologies GmbH & Co, KG、Bad Wildbad、Germany) を用いて 2 分おきに蛍光強度を励起波長 485nm および蛍光波長 535nm で測定した。対照としてビタミン E アナログである Trolox (Sigma Aldrich) を使用し、抗酸化能 (ORAC 値) を Trolox 相当量で表した。全てのアッセイはそれぞれ 6 回ごと測定し、プールの PEG 沈血清の Trolox 量で補正した。

(2) 血中パラオキシナーゼ及びアシルエステラーゼ活性の測定

パラオキシナーゼ活性及びアシルエステラーゼ活性は、Full Automated Paraoxonase Assay Kit (Rel Assay Diagnostics、Turkey) 及び Full Automated Arylesterase Assay Kit (Rel Assay Diagnostics) を用いて測定を行った。

パラオキシナーゼ活性は、Paraoxon の加水分解により産生される p-nitrophenol の吸光度変化で算出された。具体的には、基質添加後 1 分あたりの p-nitrophenol

の吸光度変化を測定し、p-nitrophenol の分子吸光係数 18920 で割ることで酵素活性を求めた。(パラオキシナーゼ活性 1 unit/L は 37°C で 1 分間に 1 μ mol のパラオキシソンの加水分解能と定義した。)

一方、アリルエステラーゼ活性は、phenol acetate の加水分解により產生される phenol の吸光度変化で算出された。その際に、phenol の吸光度変化は potassium ferricyanide 及び 4-aminoantipyrine の酸化のカップリングを利用して測定された。発色生成物の分子吸光係数 4000 で割ることで酵素活性を求めた。(アリルエステラーゼ活性 1 unit/L を 1 分あたり酢酸フェニル 1 mmol/L の分解能と定義した。)

第 7 項 統計解析

データ解析は、JMP 13.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) 及び Prism 8 (GraphPad Software, CA, USA) を用いた。連続変数の 2 群比較の解析では、対応ある t 検定及び対応のない t 検定もしくは ウィルコクソンの符号順位検定もしくはマンホイットニー U 検定を用いた。3 群もしくは 4 群比較では、1 元配置分散分析 (one-way analysis of variance、One-way ANOVA) を実施し、事後解析 (post hoc analysis) として Tukey 法で多重比較を行なった。カテゴリー変数は、カイ二乗検定を用いた。データは、正規分布に従うものに関しては平均及び標準

偏差及び正規分布に従わないものは、中央値及び四分位で表した。正規性については、シャピロ-ウィルク検定で評価を行なった。2 変量の相関分析としては、スピアマンの順位相関係数を用いた。p 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意差があるものと判断した。また、重回帰分析では、CEC を従属変数とし、年齢、性別、BMI、喫煙歴、高血圧、糖尿病、脂質異常症、総コレステロール値(TC)、対数変換したトリグリセリド値 (log TG)、HDL-C、パラオキシナーゼ、アシルエステラーゼ、対数変換した高感度 CRP (log hsCRP)、MinSpO₂を独立変数として重回帰分析を実施した。

第 4 節 結果

第 1 項 観察研究

(1) 患者背景

本研究では 116 名の患者が登録された。Non SAS 群 (AHI<5, n=11) 及び SAS 群 (AHI≥5, n=105) との比較では、BMI、高血圧の有病率及び TG は、SAS 群で有意に高値であった (表 2A)。さらに、SAS の重症度区分の 4 群での比較では、severe SAS 群は non SAS 群と比較し、BMI 及び TG は severe SAS 群で有意に高値だった (表 2B)。

(2) コレステロール引き抜き能に与える影響

Non SAS 群 (AHI<5) 及び SAS 群 (AHI \geq 5) での比較では、CEC は SAS 群で有意に低下していた (1.06 ± 0.15 vs 0.96 ± 0.14 $p=0.01$) (図 6A)。しかし、SAS の重症度区分の 4 群の比較では CEC に有意な差は認めなかった (図 6B)。

(3) ORAC 値に与える影響

HDL の抗酸化能評価のため、Non SAS 群 (AHI<5) 及び SAS 群 (AHI \geq 5)、SAS 重症度の 4 群比較では、ORAC 値に統計学的な有意差は認めなかった (図 7)。

(4) パラオキシナーゼ及びアシルエステラーゼ活性に与える影響

Non SAS 群 (AHI<5) 及び SAS 群 (AHI \geq 5)、SAS 重症度の 4 群比較では、パラオキシナーゼ及びアシルエステラーゼ活性に統計学的な有意差は認めなかった (図 8、9)。

(5) 高感度 CRP (hsCRP) に与える影響

Non SAS 群 (AHI<5) 及び SAS 群 (AHI \geq 5) との比較では log hsCRP は SAS 群で有意に高値であった。SAS 重症度で 4 群の比較では、severe SAS では non SAS、mild SAS、moderate SAS と比較して有意に高値であった (図 10)。

(6). コレステロール引き抜き能と各種臨床パラメータとの単相関

CEC と相関する因子を検証するため、CEC と各種臨床パラメータとの相関解析

を実施したところ、CEC は、BMI、log TG 及び log hsCRP と負の相関を示し、ApoA-1 及び HDL-C と正の相関関係を示した。また、ポリソムノグラフィのパラメーターに関しては、AHI、AI、ODI (3%) で負の相関を示し、低酸素の指標である MinSpO₂ (%) と正の相関を示した (表 3)。

(7). コレステロール引き抜き能と各種臨床パラメータとの重回帰分析

さらなる CEC の規定因子の検索をするため、CEC を従属変数として年齢、性別、BMI、喫煙歴、高血圧、糖尿病、脂質異常症、TC、log TG、HDL-C、パラオキシナーゼ、アリルエステラーゼ、log hsCRP、MinSpO₂ を独立変数として重回帰分析を実施し、log TG、MinSpO₂、log hsCRP で相関関係を認めた (表 4)。

第 2 項 介入研究

(1) 患者背景

介入研究では、中等度の SAS 患者 36 名を対象とした。表 5A のように対象患者は、年齢 47±11 歳で 94% が男性であった。BMI は、30 (25-35) kg/m² で、冠動脈疾患の既往の患者は認めなかった。

(2) CPAP 療法による各種臨床パラメータに与える影響

表 5B に、CPAP 療法前後の臨床パラメータについて示した。また、血圧を含め

て BMI、脂質パラメータは、CPAP 前後で有意差を認めなかった。

(3) CPAP 療法がコレステロール引き抜き能(CEC)に与える影響

CPAP 療法前後の CEC では、統計学的有意差は認めなかった (図 11)。

(4) CPAP 療法前の CEC が CPAP 療法前後の Δ CEC に及ぼす影響

CPAP 治療前の CEC の 3 分位の患者背景は、Q3 群は Q1 群に比較して AHI は有意に低く及び HDL-C は有意に高かった。Q1 群でのみ、CPAP による CEC の有意な上昇を認めた (図 12)。

(5) 血圧、体重及び腎機能(eGFR)変化が、CEC 変動差 (Δ CEC) に及ぼす影響

CPAP 療法により HDL 機能の改善する患者群を検索するため、図 13 のように CPAP 療法前後の腎機能改善/低下群、体重増加/減少群、血圧上昇/減少群、コンプライアンス良好/不良群で Δ CEC を比較したが、いずれも統計学的有意差を認めなかった。

(6) CPAP 療法前の各種パラメータが Δ CEC に及ぼす影響

CPAP 療法前の年齢、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、eGFR, HDL-C, AHI、ODI3%, MinSpO₂ (%) を 3 分位 (Q1、Q2、Q3) に区分し、 Δ CEC を比較したところ、いずれも統計学的有意差を認めなかった (図 14)。

第5節 考察

SAS は、上気道閉塞による頻回の呼吸停止を生じることで、睡眠の断片化が起こることが知られている。断片化により睡眠の質を下げ、日中の眠気や集中力低下等の QOL 低下を招くほか、過去の臨床研究の報告では、SAS は冠動脈疾患や脳血管障害の発症率や死亡率と関連することが報告されている(53-55)。SAS における動脈硬化発症のメカニズムについては、前述のように動物研究が行われてきたが、依然統一された見解はなく、今回、我々は抗動脈硬化作用を有する HDL 機能に焦点を当てた。

第1に、SAS 群で HDL の抗動脈硬化作用の一つである CEC が低下することを示した。前述の様に、動脈壁や末梢組織から過剰なコレステロールを引き抜き、胆汁として排泄する機能は RCT とよばれ、HDL が大部分を介在している。CEC は、末梢組織からコレステロールを引き抜く搬出能と定義され、RCT の最初のステップである。HDL が末梢組織からコレステロールを引き抜く過程で、血管外から血管内にコレステロールを引き抜く必要があり、脂質非結合型アポリポ蛋白 (ApoA-1 や ApoE) や脂質欠乏した円盤状 HDL (Nascent HDL) では ABCA1 (ATP binding cassette subfamily A member 1) を介して、Cholesteryl ester-rich HDL (mature HDL) では ABCG1 (ATP binding cassette subfamily G member 1) や SR-B1 (Scavenger receptor class B member 1) を介してコレステロールが引き抜か

れることが知られているが(56)、SAS においてこの過程が障害されている可能性が示唆された。

前述の通り、2006 年に Tan らは SAS での HDL 抗酸化能の低下を示したが(49)、その他の HDL 機能への影響は明らかではなかった。今回、我々は初めて SAS 患者で HDL の主要な抗動脈硬化作用である CEC が低下することを示し、SAS における HDL 機能不全を見出した。

第 2 に、CEC の規定因子の多変量解析の結果、低酸素の指標である MinSpO_2 と炎症の指標である高感度 CRP が BMI や HDL-C と独立して相関関係を示した(表 4)。この結果は、SAS による炎症及び低酸素が、肥満とは独立して CEC の低下に関連することを示唆している。高感度 CRP は non-SAS 群と比較して SAS 群で上昇し、重症 SAS において統計学的に有意に上昇することを見出した(図 10)。過去の報告においても SAS 患者では、炎症性サイトカインや炎症性マーカーである TNF α 、CRP、IL-6、IL-8 の血中濃度が上昇することが知られており、本章の結果は既報と合致した結果であった(54, 55)。SAS においては第 1 章で述べた様に、夜間の間欠的低酸素が特徴的であり、肥満とは独立して交感神経活動が賦活化することが知られる(57)。交感神経活動の賦活化は、慢性炎症の原因として考えられており、SAS 群で hsCRP 高値であることの要因として考えられた。

炎症と動脈硬化発症の関連は 1999 年に Russel Ross により提唱された(58)。それ以降、動脈硬化病変のプラークには、B 細胞(59)、T 細胞(60)、マクロファージ(61)等の様々な免疫細胞が関与することが明らかになり、さらに炎症関連のシグナルカスケードである Toll like receptor シグナル(62)やインフラゾーム(63, 64)が動脈硬化病変の進展に関与していることが知られている。一方で、ロスバスタチンを使用した 2 次予防の試験である Jupiter 試験(65)、IL-1 β 阻害薬であるカナキヌマブ (canakinumab) を使用した CANTOS 試験(66)では、治療介入による炎症反応の抑制が心血管疾患発症のリスク減少につながることを報告され、炎症そのものが動脈硬化進展に寄与していることが示されている。本研究では、severe SAS 群で高感度 CRP が高値であり、SAS が動脈硬化惹起性疾患であることを支持する結果となった。

第 3 に、SAS の診断検査であるポリソムノグラフィー検査の一項目である MinSpO₂ (経皮的動脈血酸素飽和度) が高感度 CRP や BMI とは独立して CEC と正の相関にあることを見出した。過去の報告では、SAS において、低酸素の指標である MinSpO₂、平均血中酸素飽和度である MeanSpO₂ 及び酸素飽和度 90%未満の睡眠時間 TST90 が、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度 (Intima Media Thickness:IMT) 増加と関連することが報告されており(67)、AHI 以外の低酸素の指標もまた動脈硬化進展に寄与している可能性が示唆されている。また、前述の様に、CEC は心

血管疾患疾患の負の予測因子であり(43)、CEC 低下は動脈硬化性疾患発症に関与することが知られている。上記の内容を統合すると、SAS では低酸素の強度が高い程、CEC は低下し、動脈硬化が促進される可能性が示唆された(67-75)。低酸素環境が CEC に影響を与えるメカニズムについて、第 3 章でプロテオーム解析を実施することで介在因子について検索する方針とした。

第 4 に、HDL 抗酸化能について検証を行った。臨床研究において、PON1 活性は、冠動脈疾患や家族性高コレステロール血症で低下することが報告されている(76)。一方、ORAC 法は、食品成分の抗酸化能評価に用いられてきたが、当講座において HDL 抗酸化能の評価のためのアッセイとして臨床研究に応用した(52)。SAS では、酸化ストレスの指標である TBRS(2-thiobarbituric acid reactive substances)の上昇の報告(77)があり、HDL 抗酸化能低下することが予想されたが、SAS は PON1 及び ORAC に影響を与えなかった。

Lavie らは CVD を合併した SAS 患者では、健常者と比較して PON1 活性低下を認め、重回帰分析では PON1 活性は AHI と負の相関関係を認めた(77)。一方で、CVD の既往のない中高年の男性を対象とした SAS の観察研究においては、本研究と同様に PON1 活性に影響を与えなかったことから(78)、SAS 単独では PON1 活性に影響を与えないことが示唆された。

観察研究では以下 2 点の研究限界が挙げられる。

1) 患者背景では、SAS 群と non-SAS 群の 2 群で、サンプル数のばらつき及び BMI や HDL-C で統計学的有意差を認めた。肥満患者では CEC が低下することが知られ(79, 80)、肥満やサンプル数のばらつきが本研究の交絡因子として CEC の値に影響を与えた可能性は否定できない。

2) さらに、抗糖尿病薬であるピオグリタゾン[®]はコレステロール引き抜き能に影響を与えることが知られ(81)、SAS 群で抗糖尿病薬の内服患者が含まれていたことから、投薬内容が CEC の値に影響を与えた可能性がある。

介入研究においては CPAP 治療前の年齢、BMI、腎機能、AHI や治療前後の血圧、腎機能、体重変化や CPAP 療法のコンプライアンスは CEC に影響を与えなかったが、CEC 低下群で CPAP による CEC 改善作用を認める結果を見出した。上記の結果は CPAP 療法が、SAS における低酸素そのものの是正を介して、CEC 低下を緩和させた可能性が示唆されるが、本研究では CPAP 療法前後の MinSpO₂ や MeanSpO₂ の変化は不明であり、今後の臨床研究で検証していく必要がある。

さらに、CPAP による CEC 改善作用は、腎機能、体重変化、CPAP コンプライアンス及び血圧変化とは独立した効果であると考えられる。メカニズムの解明には、今後動物研究を含めたさらなる解析が必要であるが、CPAP 治療の新規作用を見出

した点で特筆すべき所見であった。

本章では、前述の様に 3 ヶ月の CPAP 療法により血圧を含めたパラメータには変化は認めず、既報とは合致しなかった(23)。その原因として、34 例中 27 例で体重増加を認め、半数の症例では CPAP のコンプライアンスが poor であり、コンプライアンス良好群では中央値で 1.0mmHg の収縮期血圧の低下を認めることから、体重が増加したことや CPAP が適切に実施できなかったことが、血圧変化に影響したと考えられる。

HDL 機能に着目すると治療前 CEC の中間及び高値の群である Q2 及び Q3 群は、CEC 改善作用を認めず、治療前の CEC が低値の Q1 群でのみ CEC 改善効果を認めたことから、治療前の CEC が CPAP 療法の HDL 機能改善効果の予測因子として考えられた。将来的な心血管疾患発症リスクが高い HDL 機能不全の OSA 患者において CPAP は心血管疾患予防のための有効な治療手段をなり得ることが示唆された。

前述のように一部の薬剤は CEC に影響を与えることが知られる(81)。介入研究中の内服薬変更の有無は不明であるため、投薬内容の変更が CEC に影響を与えた可能性は除外できない。また、Cholesterol Uptake Assay は、HDL を抗 ApoA-1 抗体で補足するため、ABCA1 を介したコレステロール引き抜き能が評価できな

い点が、介入研究での研究限界に挙げられる。

第6節 小括

第2章の臨床研究の結果から CEC を規定する因子として、炎症の指標である高感度 CRP 及び低酸素の指標である MinSpO₂ が挙げられた。そのため、SAS において炎症及び低酸素環境が CEC に影響を与えることが示唆された。また、介入研究においては、CPAP 療法前の CEC が低下している症例において CEC 改善効果を認めており、SAS による HDL 機能不全例において CPAP 療法は HDL 機能改善効果が期待できる結果となった。

第3章 睡眠時無呼吸症候群における HDL プロテオームに与える影響

第1節 背景

HDL は、脂質と蛋白の複合体であるが、かつて脂質代謝に関わるアポリポ蛋白や酵素しか有していないと考えられてきた。1979 年に HDL 構成蛋白として Serum Amyloid A (SAA) の存在が確認され、それ以降プロテオミクス解析の技術進歩により、図 15 に示すような様々な蛋白が存在することが知られてきた (82)。

これらは脂質代謝以外の補体活性、感染防御や急性相反応に関連し、生体防御に重要な役割を担うことが知られる。Davidson らのグループが公開している

HDL 蛋白データベース (HDL Proteome Watch 2021) (82)によると、2005 年から 2021 年までの期間で、45 報の論文報告があり、936 個の蛋白が報告されている。過去には、動脈硬化性疾患 (83-87)、腎疾患 (88)、肝硬変 (89)、皮膚乾癬 (90)、COVID-19 (91) で、HDL プロテオームが変化することが報告され、その中で、Gordon らは HDL 機能との関係について焦点を当て、HDL プロテオーム内の 16 個の蛋白が CEC と相関関係を有する報告をした。(87) また、Vaisar らは、serum amyloid A (SAA) 上昇に伴う HDL プロテオームの変化により CEC が低下することを示した (86)。

前述のように、我々は SAS 群で CEC が低下すること、さらに低酸素の指標である MinSpO_2 が CEC と正の相関関係にあることを明らかにした。このような背景から、我々は SAS における HDL プロテオームの変化がコレステロール引き抜き能低下に寄与したと仮説を立て、HDL プロテオーム解析を実施し、引き抜き能低下に寄与した蛋白を同定する方針とした。

第 2 節 方法

(1) 対象患者

2017 年 4 月から 2019 年 4 月までに防衛医科大学大学校及び睡眠総合ケアクリニック代々木で、SAS の疑いで登録された 116 名の患者中で、登録患者は、

睡眠ポリソムノグラフィー(PSG)検査が施行され、MinSpO₂のデータを取得した。前章の観察研究で、MinSpO₂が炎症とBMIと独立してCECと相関を認めたことから低酸素の強度が高い程、HDLプロテオームに影響を与える可能性を考え、PSGで測定されたMinSpO₂の上位5名(High MinSpO₂群: 92±2%)、下位5名(Low MinSpO₂群: 40±6%)を抽出した。

(2) 超遠心法を用いたヒト血清からのHDL単離

患者から採取した血液検体は、遠心(4℃、3000rpm、15分)後、患者血清500uLを超遠心法(比重1.063-1.210)でHDL単離を行った。

(3) HDLプロテオーム解析

超遠心でHDL単離後に、トリプシンによるペプチド断片化を行った後にnanoLC: UltiMate 3000 RSLCnano LC System (Thermo Fisher Scientific)及びMS: Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific)を用いた。Mass spectrometry(MS)分析はOverlapping window DIAを用いた。Scaffold DIA (Proteome Software)を用いて解析し、Peptide FDR (False Discovery Rate:FDR)とProtein FDRがともに1%以下となるタンパク質・ペプチドの同定ならびに定量値を算出した。

データ解析はPerseus (<https://maxquant.net/perseus/>)で定量値をLog2変換

し、欠損値（定量値が 0）を検出限界以下となる低い値でランダムに代入した。各群の平均値が 2 倍以上の変動かつ群間の差が $P < 0.05$ （2 群：T test, 3 群以上 ANOVA）となるタンパク質を抽出した。それぞれの定量値を Z-score に変換した（図 16）。プロテオーム解析は、株式会社かずさゲノムテクノロジーズ（木更津、千葉）で解析を実施した。

(4) Gene Ontology エンリッチメント解析 (GO enrichment analysis)

GO エンリッチメント解析は、QuickGOdata (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) を用いて解析を行った。Enrichment factor と p 値は、Fisher の正確確率検定を用いて計算した。また、Benjamini-Hochberg 法を用いて、FDR を評価した。Low MinSpO₂ 群で、発現上昇 (fold change ≥ 1.0) を認めた蛋白を抽出し、Gene Ontology Biological Process (GOBP) で分類し、Enrichment factor > 1 及び p 値 < 0.05 の GO name を選択した。

(5) 候補蛋白の選択

候補蛋白の同定のため下記の 5 つの group を用いた。

Group1 : HDL 蛋白データベース (HDL Proteome Watch 2021) で検出された蛋白群 (936 個) を選定した (82)。

Group2 : 前章で低酸素の指標である MinSpO₂ が CEC と相関関係が見出されたた

め、All of Gene expression (AOE) (<https://aoe.dbcls.jp/>) のデータベースから低酸素刺激により変動する遺伝子群をキュレーションしたデータから、hypoxia-normoxia score (HN-score) を計算し、上位 100 個の遺伝子群を選定した(92)。

Group3：重回帰分析にて年齢や BMI と独立して CEC と相関を認めた蛋白群を選択した。

Group4：本研究で Low MinSpO₂ 群で変動した蛋白群を選択した。

Group5：前述の様に CEC 低下に関連のある SAA は、GO:0006953 acute-phase response にマッピングされているため、本研究において同様の GO name にマッピングされる蛋白群が CEC に関連すると仮説を立て、本研究で検出された蛋白群において QuickGO database において GO:0006953 acute-phase response に分類された蛋白群を Group5 に選定した。

これらのグループを <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) を用いてベン図を作成し、重複する蛋白を選定した。

(6) 血中 Angiogenin 及び Orosomucoid 1 の蛋白濃度の測定

前章の観察研究の対象患者 116 名の Angiogenin 及び Orosomucoid1 の蛋白濃度は、Human Angiogenin ELISA kit (Proteintech, USA) 及び Human ORM1 ELISA

kit (Proteintech)を用いて測定した。

(7) MinSpO₂ 3 分位における Orosomucoid1 の蛋白濃度の比較

前章の観察研究の対象患者 116 名を MinSpO₂ の高い順に 3 分位 (T1, T2, T3) に区分し、Orosomucoid 1 の蛋白濃度を比較した。3 群での比較は、クラスカルウォリス検定を実施し、事後解析として Dunn の多重比較検定を行なった。

第 3 節 結果

(1) 患者背景

対象患者は全員男性であった。low MinSpO₂ 群は High MinSpO₂ 群と比較して、BMI、log TG 及び loghsCRP は有意に高く、HDL-C 及び ApoA-1 は有意に低値であった。さらに、SAS 関連の項目では low MinSpO₂ 群では high MinSpO₂ 群と比較して AI, HI 及び ODI (3%) は有意に高値であった (表 6)。

(2) HDL プロテオーム解析

各群の平均値が 2 倍以上の変動かつ群間差が $p < 0.05$ となるタンパクを抽出し、それぞれの定量値を Z-score に変換して Heatmap を作成した (図 17)。

Low MinSpO₂ 群では High MinSpO₂ 群と比較して 159 個の蛋白が変動し、その内 11 蛋白で減少し、148 蛋白が増加した (表 9)。

(3) GO エンリッチメント解析

今回、変動した 159 個の蛋白群を用いて GO エンリッチメント解析を実施したところ、変動蛋白は主に炎症や補体を含めた自然免疫に関わる経路に関わることが示された（表 7）。

(4) CEC との重回帰分析

年齢及び BMI と独立して CEC と相関を認めた蛋白を重回帰分析で実施したところ、34 個の蛋白で変動を認めた（表 8）。

(5) 候補蛋白の選定

Group1~5 でベン図を作成したところ、angiogenin（Group 1, 2, 3, 4）及び orosomucoid 1（Group1, 3, 4, 5）が最も多くのグループに属していた（図 18）。

(6) Angiogenin 及び Orosomucoid1 と CEC との単相関

対象患者 116 名における CEC と Angiogenin 及び Orosomucoid1 との相関解析を実施したところ、CEC は Angiogenin と相関は認めず、Orosomucoid 1 と逆相関を示した。（表 10）

(7) Orosomucoid1 と CEC との重回帰分析

CEC を従属変数として年齢、BMI、HDL-C、log hsCRP 及び Orosomucoid1 を独立変数として重回帰分析を実施し、Orosomucoid1 は、その他の変数(年齢、BMI、HDL-C 及び log hsCRP)と独立して CEC と相関を認めた。(表 11)

(8) MinSp02 3 分位での Orosomucoid 1 の比較

MinSp02 が低値の T3 群での Orosomucoid 1 は、T1 群と比較して有意に高値であった。(図 19)

第 4 節 考察

第 3 章では、SAS における CEC 低下のメカニズムの解明のため HDL プロテオーム解析を実施し、159 種類の蛋白変動を認め、GO エンリッチメント解析の結果から炎症や自然免疫に関わる蛋白に変動が生じることを見出した。これらの結果は、SAS において HDL プロテオームの炎症性リモデリングが生じる可能性が示唆される結果となった。HDL プロテオームの炎症性リモデリングに関しては 2007 年に初めて Vaisar らにより冠動脈疾患の患者の単離 HDL を用いたショットガンプロテオミクスで検証され、CAD-HDL においては健常者の HDL と比較して補体活性に関わる蛋白 (C3) や acute phase protein に関連する蛋白 (PON1, SAA1) が上昇することを報告し、冠動脈疾患の患者では HDL プロテオームの炎症性リモデリングが生じることがわかった(93)。また、2012 年には、皮膚の炎症性疾患

である乾癬の患者の HDL においてプロテオームの炎症性リモデリングが生じるとともに、CEC が低下することが示され、炎症性疾患における HDL プロテオームの変化が HDL 機能に影響を与える可能性について示唆された(90)。さらに、前述の Vaisar らは、エンドトキシン投与により HDL プロテオームで acute phase response に関わる SAA1/2 が上昇、CEC が減少し、一方で SAA1/2 ノックアウトマウスではエンドトキシン投与による CEC 低下は認めなかった。このことは HDL プロテオームの炎症性リモデリングが CEC に直接的な影響を与えることを示している(86)。

さらに、HDL プロテオームの炎症性リモデリングに疾患特異性があるのではないかと考えられる。今回、CEC 低下に寄与した候補因子の検索として、我々は、独立変数として年齢、BMI を用いて重回帰分析を行い、34 個の蛋白が CEC と相関関係にあることを見出した。

6 種類の蛋白 (ORM1, SERPINF1, F2, SERPINA3, APCS, AHSG) が GO:0006953:acute-phase response に分類されることがわかり、このような知見から、SAS における HDL プロテオームの炎症性リモデリングは CEC に対して直接的な影響を与える可能性が示唆された。

我々は、さらなる候補分子の検索のため、前述の HDL proteome Watch(2021)

を使用した(82)。さらに、我々は、低酸素の指標である MinSpO₂ が、CEC と相関を認めることから、CEC 低下に低酸素刺激により上昇する蛋白が寄与している可能性も考えられるため NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (94)、EBI ArrayExpress (AE) (95) DDBJ Genomic Expression Archive (GEA) (96)を統合したデータベースである AOE データベースから低酸素刺激により上昇する遺伝子をキュレーションしたメタアナリス(92)より 100 遺伝子を抽出し、group1, 3, 4 を含めて解析したところ ANG(Angiogenin)が選択された (図 18)。

Angiogenin (ANG) は、リボヌクレアーゼ活性を有する唯一の血管新生蛋白であり、低酸素刺激により発現が上昇する。その機能として tRNA を分解し、tRNA-derived smRNAs(tDRs)を産生することで、ストレス環境下での転写調節することが知られている(97)。HDL は、tDR を運搬することが知られており、石灰化を伴う冠動脈硬化の患者の HDL では tDRs が多く含まれることが報告されているが(98)、tDRs 産生蛋白である Angiogenin の HDL 機能への影響についてはこれまで検討されていない。一方で、今回、炎症の指標である hsCRP が CEC と相関を認めることから、炎症に関連する蛋白が CEC 低下に寄与している可能性があった。

今回、既報及び表 8 では acute-phase response に分類される蛋白が CEC に関連することが見出されており、本章で検出された HDL 蛋白で GO:0006953:acute-phase response に関連する蛋白を抽出し、group1, 3, 4 を含めて解析したところ

ORM1 (orosomucoid1) が選択された(図 18)。

Orosomucoid1 は、リポカリンファミリーに属し、組織障害や炎症で上昇する蛋白(99)であり、心不全や肝細胞癌で上昇することが知られている(100, 101)。また、Orosomucoid1 は、肝切除後の肝再生にも関わることが報告された(102)。Orosomucoid1 が、HDL プロテオームに存在することは 14 論文で報告されているが、HDL 機能に及ぼす影響は現状不明であった。今回、我々は初めて Orosomucoid1 が単相関及び重回帰分析で CEC と相関を認め、MinSpO₂ 低値(T3)群で高値であることを見出し、Orosomucoid1 が SAS の HDL 機能不全を介在している可能性を示した。

今回、HDL プロテオームでは、HDL proteome Watch(2021)で報告されていない蛋白が検出され、さらに既報とは異なる蛋白が CEC と相関を認めた。また、本章の GO エンリッチメント解析では、low MinSpO₂ で変動した HDL プロテオームに補体活性 (GO:006957) 及び acute phaseResponse (GO:006953) に分類される蛋白が含まれていたが、既報の蛋白 (C3, PON1, SAA1) は変動しなかった。

この要因として既報の HDL プロテオームにおいて MS におけるデータ取得方法の多くは DDA (Data Dependent Acquisition) が用いられているが、今回、データ取得にあたり DIA (Data Independent Acquisition) を用いたことに起因する。

DDA は、MS1 で取り込んだ全イオン群のうち、強度の高かったプリカーサーイオンを選択して MS/MS の取得を行う。一方、DIA は、MS1 を取得する結果に依存せず、指定した質量範囲の MS/MS データを連続的に取得するため、より多くの蛋白が検出することが可能である。Goetze らは、HDL プロテオームを DIA 法で測定を行ったが、DIA 法は 296 種類の蛋白が検出し、既報と比較して 2 倍以上の検出差があることを報告した(103)。本研究においても DIA 法を用いることで HDL 蛋白として 525 種類の蛋白が同定されており、他施設と比較して多くの蛋白を同定し得た。研究限界としては下記の 2 点が挙げられる。

1. HDL 蛋白の翻訳後修飾 (ApoA-1) がコレステロール引き抜き能を与えることは、既報で知られているが(104, 105)、トリプシンを用いてサンプル処理をしているため翻訳後修飾は評価困難であった。そのため、変動のない蛋白においても翻訳後修飾により引き抜き能に影響を与えた可能性は否定できない。

2. 本章では、HDL プロテオームにおいて CEC と相関のある蛋白を抽出しているが、直接的な因果関係については未知である。今回、候補蛋白の選定で抽出された Orosomucoid1 が、CEC に直接的に与える影響に関しては、in vivo におけるノックダウンもしくはノックアウトモデルでの検証が必要であり、今後の課題と考える。

第5節 小括

SAS においては HDL プロテオームの炎症性リモデリングを認め、Orosomucoid1 が CEC 低下の介在因子として考えられた。

第4章 総括

SAS は、夜間の低呼吸・無呼吸を繰り返す疾患である。本研究では、SAS の HDL 機能への影響について観察研究を通して検証するとともに、SAS の標準的な治療方法である CPAP 療法が HDL 機能に及ぼす影響について、3 ヶ月の CPAP 療法で評価を行った。

観察研究では、SAS 群で HDL のコレステロール引き抜き能は低下することを示し、さらに低酸素の程度を示す MinSpO₂ 及び炎症を示すバイオマーカーである hsCRP が BMI や HDL-C と独立して CEC と相関関係にあることを見出した。この知見より、SAS が低酸素及び炎症を介して HDL 機能に影響を与えた可能性が示唆された。

介入研究においては、CPAP 療法実施前の CEC 低下群において CPAP 療法前後の CEC 改善効果を認めるも、体重や血圧変化等の他の臨床パラメーターは CEC に影響を与えなかった。この知見により、治療前の CEC が、CPAP 療法の HDL 機能改善効果の予測因子になり得る可能性が示唆された。将来的な心血管疾患発症

リスクが高い HDL 機能不全の OSA 患者において CPAP は心血管疾患予防のための有効な治療手段をなり得ることが示唆された。

さらに、SAS における CEC 低下のメカニズムを検索するため HDL プロテオーム解析を実施したところ、acute-phase response に関連する蛋白の上昇を低酸素の程度が高い群 (low MinSpO₂) で認めた。この知見により、SAS において炎症性リモデリングを生じた可能性が示唆された。また、公共データベースと比較することで、Orosomucoid 1 が介在因子の候補として見出された。

以上の結果から、SAS における低酸素環境及び炎症は HDL プロテオームの変化を呈し、コレステロール引き抜き能を低下させることで、動脈硬化性疾患発症に寄与することが示唆された。また、CPAP 療法は、重症の SAS における HDL 機能不全の緩和が期待できる (図 19)。

HDL 機能不全に対する治療介入が、SAS における動脈硬化惹起性を抑制させるかどうかについては今後、臨床研究での検討が必要であり、上記の介在因子による CEC 低下及び CPAP 療法による HDL 機能改善効果のメカニズムについては基礎研究での評価が必要である。

第 5 章 結論

睡眠時無呼吸症候群では CEC 低下を認め、MinSpO₂ 及び hsCRP は CEC と統計学

的有意な相関関係を認めた。CPAP 療法は、CEC 低下群において CEC 改善作用を認めた。睡眠時無呼吸症候群においては HDL プロテームの炎症性リモデリングが生じた。今後、SAS での HDL 機能不全に対する CPAP での治療介入は、将来的な心血管疾患抑制効果に期待できる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において御指導、ご高閲を賜りました、防衛医科大学校内科学講座教授 池脇克則先生に深甚なる感謝の意を表します。また終始懇切に多大なるご指導いただきました神経・抗加齢血管内科 助教 佐々木誠先生に深謝致します。共同研究機関として本研究にご支援賜りました、しんとこ駅前クリニック 綾織 誠人先生、睡眠総合ケアクリニック代々木 井上雄二先生、東京医科大学睡眠医学講座教授 中山秀章先生に厚く御礼申し上げます。本論文を作成するにあたり、大変有用なご助言を賜りました防衛医科大学校薬理学講座教授 石塚俊晶先生、防衛医科大学校病院 感染対策部 准教授 藤倉雄二先生に深謝致します。

単語・略語説明

AlBG: Alpha-1-B glycoprotein,

ABCA1: ATP binding cassette subfamily A member 1

ABCG1: ATP binding cassette subfamily G member 1

AHI : Apnea Hypoxia Index

AHSG:Alpha2-HS, glycoprotein,

AMBP:Alpha-1-microglobulin/bikunin recursor,

ANG:Angiogenin,

APCS:Amyloid P component,

AZGP1:Alpha-2-glycoprotein

BMI:Body Mass Index

BSA: Bovine serum albumin

C8B: Complement C8 beta chain,

CEC: Cholesterol Efflux Capacity(コレステロール引き抜き能)

CETP: Cholesteryl ester transfer protein

CFD: Complement factor D,

CFHR2: Complement factor H related 2,

CLEC3B: C-type lectin domain family 3 member B,

CPAP: Continuous Postive Airway Pressure(持続陽圧換気呼吸)

CSA: central sleep apnea syndrome (中枢性無呼吸症候群)

CST3:CystatinC,

CUC:Cholesterol Uptake Assay

CVD: Caridovascular disease (心血管疾患)

DBPS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水)

F2: Coagulation factor II,
F9: Coagulation factor IX,
FBS : fetal bovine serum (胎児牛血清)
GNA12:G protein subunit alpha 12, ■
GPX3: Glutathione peroxidase 3,
HDL-C:HDL-コレステロール
HDL: High Density Lipoprotein
HPX: Hemopexin,
ICAM1; Intercellular adhesion molecule 1,
IGKC: Immunoglobulin kappa constant,
KNG1: Kininogen 1,
LCAT: lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL-C:LDL-コレステロール
LRG1 Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1,
LTF: Lactotransferrin,
LUM: Lumican,
Log TG: 対数変換した TG 値
Log hsCRP : 対数変換した hsCRP 値
MSN: Moesin,
MinSpO₂: minimal SpO₂
ORM1: Orosomucoid 1
OSA: obstructive sleep apnea syndrome (閉塞性睡眠時無呼吸症候群)
PAF-AH: Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase
PGLYRP2: Peptidoglycan recognition protein 2 ,
PLTP: Phospholipid transfer protein

PON1: Paraoxonase 1

RBP4: Retinol binding protein 4,

RCT: reverse cholesterol transport (コレステロール逆転送系)

SAS: Sleep Apnea Syndrome (睡眠時無呼吸症候群)

SCD-1: stearyl coenzyme A desaturase 1

SCD-AS0: SCD-1 アンチセンスオリゴヌクレオチド

SEPINA3: Serpin family A member 3,

SERPINA5: Serpin family A member 5,

SERPINA7: Serpin family A member 7,

SERPINF1: Serpin family F member 1,

SR-B1: Scavenger receptor class B member 1

SRBD:sleep related breathing disorders (睡眠関連呼吸障害)

SREBP-1: terol regulatory element binding protein 1

TG : 中性脂肪

TTR: Transthyretin

hsCRP : high sensitive CRP (高感度 CRP)

引用文献

1. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *The New England journal of medicine*. 1993;328(17):1230-5.
2. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(3 Pt 1):608-13.
3. Duran J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(3 Pt 1):685-9.
4. Ip MS, Lam B, Laufer IJ, Tsang KW, Chung KF, Mok YW, et al. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese men in Hong Kong. *Chest*. 2001;119(1):62-9.
5. Baldwin CM, Kapur VK, Holberg CJ, Rosen C, Nieto FJ, Sleep Heart Health Study G. Associations between gender and measures of daytime somnolence in the Sleep Heart Health Study. *Sleep*. 2004;27(2):305-11.
6. Ip MS, Lam B, Tang LC, Laufer IJ, Ip TY, Lam WK. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese women in Hong Kong: prevalence and gender differences. *Chest*. 2004;125(1):127-34.
7. Kim J, In K, Kim J, You S, Kang K, Shim J, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(10):1108-13.
8. Udwadia ZF, Doshi AV, Lonkar SG, Singh CI. Prevalence of sleep-disordered breathing and sleep apnea in middle-aged urban Indian men. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(2):168-73.
9. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010;11(5):441-6.
10. Franklin KA, Sahlin C, Stenlund H, Lindberg E. Sleep apnoea is a common occurrence in females. *The European respiratory journal*. 2013;41(3):610-5.
11. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, Marti-Soler H, Andries D,

- Tobback N, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir Med*. 2015;3(4):310-8.
12. Young T, Skatrud J, Peppard PE. Risk factors for obstructive sleep apnea in adults. *JAMA*. 2004;291(16):2013-6.
 13. Jennum P, Riha RL. Epidemiology of sleep apnoea/hypopnoea syndrome and sleep-disordered breathing. *The European respiratory journal*. 2009;33(4):907-14.
 14. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol*. 2013;177(9):1006-14.
 15. Drager LF, McEvoy RD, Barbe F, Lorenzi-Filho G, Redline S. Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: Lessons From Recent Trials and Need for Team Science. *Circulation*. 2017;136(19):1840-50.
 16. Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;175(12):1290-7.
 17. Savransky V, Jun J, Li J, Nanayakkara A, Fonti S, Moser AB, et al. Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearyl coenzyme A desaturase. *Circulation research*. 2008;103(10):1173-80.
 18. Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, Shin MK, Bevans-Fonti S, Gay J, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(2):240-8.
 19. Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *European heart journal*. 2004;25(9):735-41.
 20. Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, Lind BK, Redline S, Pickering TG, et al. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol*. 2001;154(1):50-9.
 21. Nadeem R, Singh M, Nida M, Waheed I, Khan A, Ahmed S, et al. Effect of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on lipid profile: a meta-regression analysis. *J Clin Sleep Med*. 2014;10(5):475-89.
 22. Phillips CL, Yee BJ, Marshall NS, Liu PY, Sullivan DR, Grunstein

- RR. Continuous positive airway pressure reduces postprandial lipidemia in obstructive sleep apnea: a randomized, placebo-controlled crossover trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;184(3):355-61.
23. Fava C, Dorigoni S, Dalle Vedove F, Danese E, Montagnana M, Guidi GC, et al. Effect of CPAP on blood pressure in patients with OSA/hypopnea: a systematic review and meta-analysis. *Chest*. 2014;145(4):762-71.
24. Robinson GV, Pepperell JC, Segal HC, Davies RJ, Stradling JR. Circulating cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnoea: data from randomised controlled trials. *Thorax*. 2004;59(9):777-82.
25. Keenan BT, Maislin G, Sunwoo BY, Arnardottir ES, Jackson N, Olafsson I, et al. Obstructive sleep apnoea treatment and fasting lipids: a comparative effectiveness study. *The European respiratory journal*. 2014;44(2):405-14.
26. Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis*. 1988;8(6):737-41.
27. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am J Cardiol*. 1992;70(7):733-7.
28. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *European heart journal*. 2017;38(32):2478-86.
29. Hirata A, Sugiyama D, Watanabe M, Tamakoshi A, Iso H, Kotani K, et al. Association of extremely high levels of high-density lipoprotein cholesterol with cardiovascular mortality in a pooled analysis of 9 cohort studies including 43,407 individuals: The EPOCH-JAPAN study. *Journal of clinical lipidology*. 2018;12(3):674-84 e5.
30. Zanoni P, Khetarpal SA, Larach DB, Hancock-Cerutti WF, Millar JS, Cuchel M, et al. Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease. *Science*. 2016;351(6278):1166-71.
31. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for

- coronary events. *The New England journal of medicine*. 2007;357(21):2109–22.
32. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *The New England journal of medicine*. 2012;367(22):2089–99.
 33. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA, et al. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *The New England journal of medicine*. 2017;376(20):1933–42.
 34. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation research*. 2004;95(8):764–72.
 35. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of lipid research*. 2004;45(6):993–1007.
 36. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation research*. 2006;98(11):1352–64.
 37. Out R, Hoekstra M, Hildebrand RB, Kruit JK, Meurs I, Li Z, et al. Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(10):2295–300.
 38. Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, Wang N, Mzhavia N, Langlois R, et al. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(11):3701–13.
 39. Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(38):15093–8.
 40. Ong DS, Anzinger JJ, Leyva FJ, Rubin N, Addadi L, Kruth HS. Extracellular cholesterol-rich microdomains generated by human macrophages and their potential function in reverse cholesterol transport. *Journal of lipid research*. 2010;51(8):2303–13.

41. Fotakis P, Kothari V, Thomas DG, Westerterp M, Molusky MM, Altin E, et al. Anti-Inflammatory Effects of HDL (High-Density Lipoprotein) in Macrophages Predominate Over Proinflammatory Effects in Atherosclerotic Plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2019;39(12):e253-e72.
42. de la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, Cuchel M, Rader DJ, Rothblat GH. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(4):796-801.
43. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *The New England journal of medicine*. 2014;371(25):2383-93.
44. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011;364(2):127-35.
45. Ishikawa T, Ayaori M, Uto-Kondo H, Nakajima T, Mutoh M, Ikewaki K. High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity as a relevant predictor of atherosclerotic coronary disease. *Atherosclerosis*. 2015;242(1):318-22.
46. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin*. 2017;8:66-77.
47. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free radical biology & medicine*. 2005;38(2):153-63.
48. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998;394(6690):284-7.
49. Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong WK, Tam S, et al. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis*. 2006;184(2):377-82.
50. Harada A, Toh R, Murakami K, Kiriya M, Yoshikawa K, Miwa K, et al. Cholesterol Uptake Capacity: A New Measure of HDL Functionality for Coronary Risk Assessment. *J Appl Lab Med*. 2017;2(2):186-200.

51. Fujimoto D, Otake H, Kawamori H, Toba T, Nagao M, Nakano S, et al. Cholesterol uptake capacity: A new measure of high-density lipoprotein functionality as a predictor of subsequent revascularization in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis*. 2022;345:44-50.
52. Umezawa A, Maruyama C, Endo Y, Suenaga Y, Shijo Y, Kameyama N, et al. Effects of Dietary Education Program for the Japan Diet on Cholesterol Efflux Capacity: A Randomized Controlled Trial. *J Atheroscler Thromb*. 2021.
53. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 2005;365(9464):1046-53.
54. Ming H, Tian A, Liu B, Hu Y, Liu C, Chen R, et al. Inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , interleukin-8 and sleep monitoring in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Exp Ther Med*. 2019;17(3):1766-70.
55. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation*. 2003;107(8):1129-34.
56. Zanutti I, Potì F, Cuchel M. HDL and reverse cholesterol transport in humans and animals: Lessons from pre-clinical models and clinical studies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022;1867(1):159065.
57. Narkiewicz K, Somers VK. The sympathetic nervous system and obstructive sleep apnea: implications for hypertension. *J Hypertens*. 1997;15(12 Pt 2):1613-9.
58. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-26.
59. Tsiantoulas D, Sage AP, Mallat Z, Binder CJ. Targeting B cells in atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(2):296-302.
60. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(7):387-401.
61. Barrett TJ. Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2020;40(1):20-33.

62. Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(6):1213-9.
63. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.
64. Fidler TP, Xue C, Yalcinkaya M, Hardaway B, Abramowicz S, Xiao T, et al. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis. *Nature*. 2021;592(7853):296-301.
65. Ridker PM. Rosuvastatin in the primary prevention of cardiovascular disease among patients with low levels of low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein: rationale and design of the JUPITER trial. *Circulation*. 2003;108(19):2292-7.
66. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine*. 2017;377(12):1119-31.
67. Gunnarsson SI, Peppard PE, Korcarz CE, Barnet JH, Hagen EW, Hla KM, et al. Minimal nocturnal oxygen saturation predicts future subclinical carotid atherosclerosis: the Wisconsin sleep cohort. *J Sleep Res*. 2015;24(6):680-6.
68. Suzuki T, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Yamauchi M, et al. Obstructive sleep apnea and carotid-artery intima-media thickness. *Sleep*. 2004;27(1):129-33.
69. Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, et al. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest*. 2005;128(5):3407-12.
70. Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(5):613-8.
71. Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Tanaka A, Oda N, et al. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory

markers in obstructive sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(5):625-30.

72. Schulz R, Seeger W, Fegbeutel C, Husken H, Bodeker RH, Tillmanns H, et al. Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea. *The European respiratory journal*. 2005;25(1):69-74.

73. Saletu M, Nosiska D, Kapfhammer G, Lalouschek W, Saletu B, Benesch T, et al. Structural and serum surrogate markers of cerebrovascular disease in obstructive sleep apnea (OSA): association of mild OSA with early atherosclerosis. *J Neurol*. 2006;253(6):746-52.

74. Szaboova E, Tomori Z, Donic V, Petrovicova J, Szabo P. Sleep apnoea inducing hypoxemia is associated with early signs of carotid atherosclerosis in males. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;155(2):121-7.

75. Baguet JP, Nadra M, Barone-Rochette G, Ormezzano O, Pierre H, Pepin JL. Early cardiovascular abnormalities in newly diagnosed obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:1063-73.

76. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991;86(2-3):193-9.

77. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2004;27(1):123-8.

78. Andaku DK, D'Almeida V, Carneiro G, Hix S, Tufik S, Togeiro SM. Sleepiness, inflammation and oxidative stress markers in middle-aged males with obstructive sleep apnea without metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Respir Res*. 2015;16(1):3.

79. Paavola T, Kuusisto S, Jauhiainen M, Kakko S, Kangas-Kontio T, Metso J, et al. Impaired HDL2-mediated cholesterol efflux is associated with metabolic syndrome in families with early onset coronary heart disease and low HDL-cholesterol level. *PloS one*. 2017;12(2):e0171993.

80. Annema W, Dijkers A, de Boer JF, van Greevenbroek MMJ, van der Kallen CJH, Schalkwijk CG, et al. Impaired HDL cholesterol efflux in metabolic syndrome is unrelated to glucose tolerance status: the CODAM study. *Sci Rep*. 2016;6:27367.

81. Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, Terao Y, Uto-Kondo H, Yakushiji E, et al. Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR γ /LXR α pathway: findings

- from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):141-50.
82. Davidson WS, Shah AS, Sexmith H, Gordon SM. The HDL Proteome Watch: Compilation of studies leads to new insights on HDL function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022;1867(2):159072.
 83. Alwaili K, Bailey D, Awan Z, Bailey SD, Ruel I, Hafiane A, et al. The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1821(3):405-15.
 84. Oberbach A, Adams V, Schlichting N, Heinrich M, Kullnick Y, Lehmann S, et al. Proteome profiles of HDL particles of patients with chronic heart failure are associated with immune response and also include bacteria proteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;453:114-22.
 85. Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, et al. Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation*. 2013;127(8):891-904.
 86. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Suffredini AF, et al. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *Journal of lipid research*. 2015;56(8):1519-30.
 87. Gordon SM, Chung JH, Playford MP, Dey AK, Sviridov D, Seifuddin F, et al. High density lipoprotein proteome is associated with cardiovascular risk factors and atherosclerosis burden as evaluated by coronary CT angiography. *Atherosclerosis*. 2018;278:278-85.
 88. Kopecky C, Haidinger M, Birner-Grunberger R, Darnhofer B, Kaltenecker CC, Marsche G, et al. Restoration of renal function does not correct impairment of uremic HDL properties. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(3):565-75.
 89. Trieb M, Horvath A, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stadlbauer V, Taschler U, et al. Liver disease alters high-density lipoprotein composition, metabolism and function. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1861(7):630-8.
 90. Holzer M, Wolf P, Curcic S, Birner-Gruenberger R, Weger W, Inzinger M, et al. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *Journal of lipid research*. 2012;53(8):1618-24.

91. Begue F, Tanaka S, Mouktadi Z, Rondeau P, Veeren B, Diotel N, et al. Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19. *Sci Rep.* 2021;11(1):2291.
92. Bono H, Hirota K. Meta-Analysis of Hypoxic Transcriptomes from Public Databases. *Biomedicines.* 2020;8(1).
93. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *The Journal of clinical investigation.* 2007;117(3):746-56.
94. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D991-5.
95. Athar A, Füllgrabe A, George N, Iqbal H, Huerta L, Ali A, et al. ArrayExpress update - from bulk to single-cell expression data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D711-d5.
96. Kodama Y, Mashima J, Kosuge T, Ogasawara O. DDBJ update: the Genomic Expression Archive (GEA) for functional genomics data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D69-d73.
97. Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol.* 2009;185(1):35-42.
98. Michell DL, Allen RM, Cavnar AB, Contreras DM, Yu M, Semler EM, et al. Elucidation of physico-chemical principles of high-density lipoprotein-small RNA binding interactions. *The Journal of biological chemistry.* 2022;298(6):101952.
99. Lee YS, Choi JW, Hwang I, Lee JW, Lee JH, Kim AY, et al. Adipocytokine orosomucoid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(29):22174-85.
100. Agra RM, Varela-Román A, González-Ferreiro R, Viñuela JE, Castro-Pais A, Fernández-Trasancos Á, et al. Orosomucoid as prognosis factor associated with inflammation in acute or nutritional status in chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2017;228:488-94.
101. Falletti E, Pirisi M, Fabris C, Bortolotti N, Soardo G, Toniutto P, et al. Increase of serum alpha 1-acid glycoprotein despite the decline of liver synthetic function in cirrhotics with hepatocellular carcinoma.

Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1993;31(7):407-11.

102. Qin XY, Hara M, Arner E, Kawaguchi Y, Inoue I, Tatsukawa H, et al. Transcriptome Analysis Uncovers a Growth-Promoting Activity of Orosomucoid-1 on Hepatocytes. EBioMedicine. 2017;24:257-66.

103. Goetze S, Frey K, Rohrer L, Radosavljevic S, Krützfeldt J, Landmesser U, et al. Reproducible Determination of High-Density Lipoprotein Proteotypes. Journal of proteome research. 2021;20(11):4974-84.

104. Shao B, Pennathur S, Pagani I, Oda MN, Witztum JL, Oram JF, et al. Modifying apolipoprotein A-I by malondialdehyde, but not by an array of other reactive carbonyls, blocks cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. The Journal of biological chemistry. 2010;285(24):18473-84.

105. Huang Y, DiDonato JA, Levison BS, Schmitt D, Li L, Wu Y, et al. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. Nature medicine. 2014;20(2):193-203.

図表

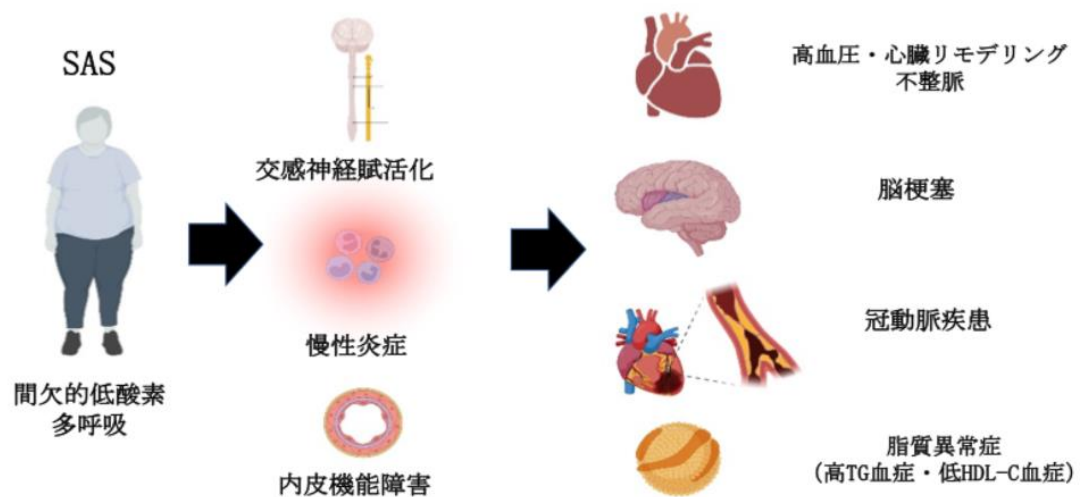


図 1：睡眠時無呼吸症候群が、心血管疾患及び脂質代謝に及ぼす影響

睡眠時無呼吸症候群では、内皮機能障害、炎症や交感神経活動の賦活化を介して心血管疾患・脂質代謝に影響を与える。

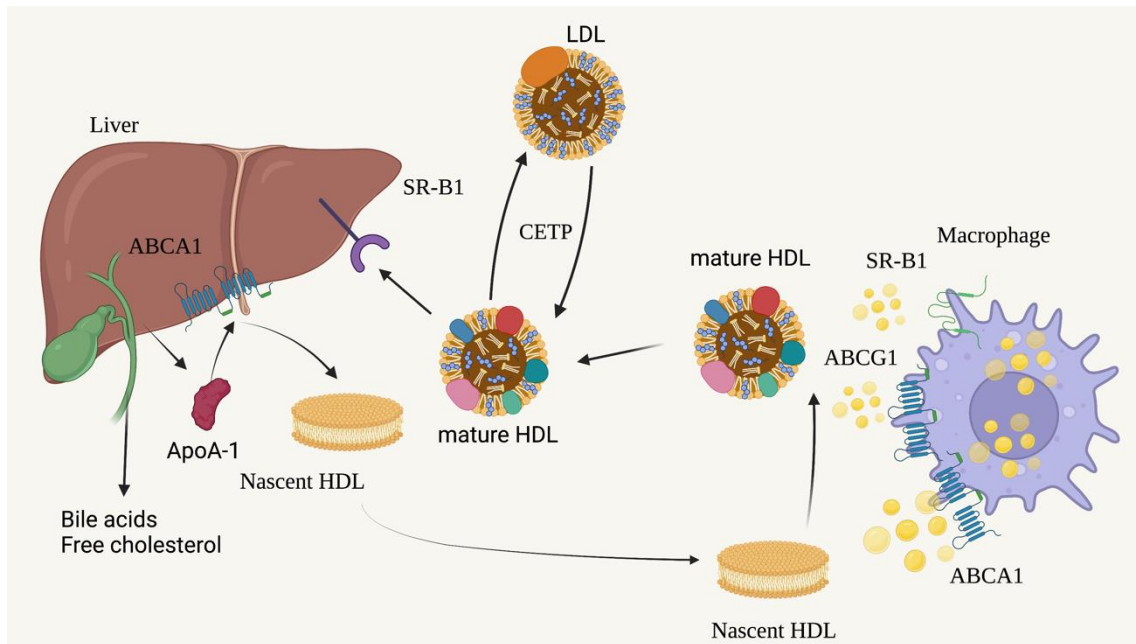
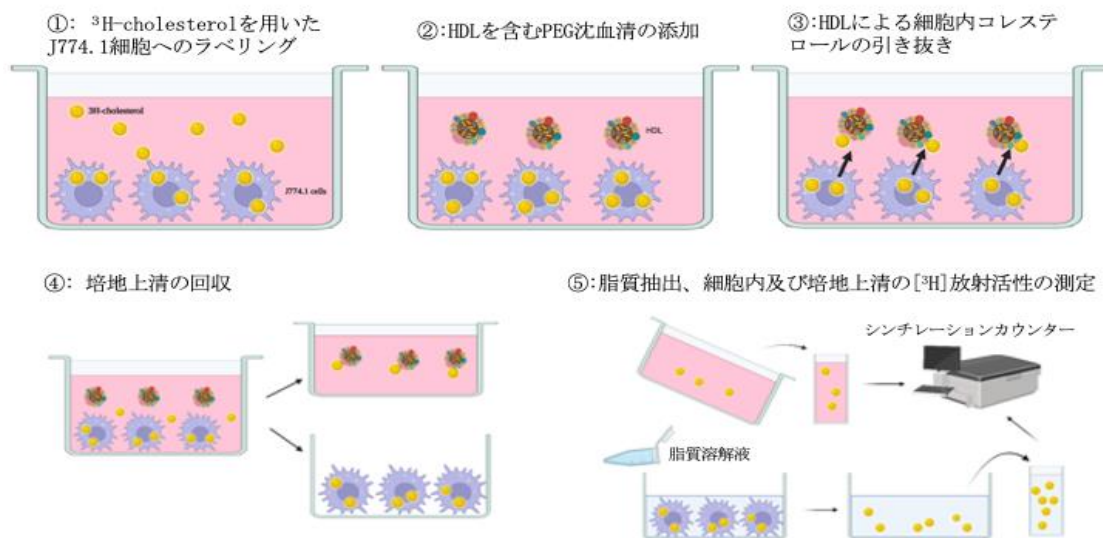


図 2 : コレステロール逆転送作用における HDL の役割

略語 : HDL : High-Density Lipoprotein, LDL: Low-Density Lipoprotein

ABCA1: ATP binding cassette subfamily A member 1, ABCG1: ATP binding cassette subfamily G member 1, SR-B1: Scavenger receptor class B member 1, CETP: Cholesteryl ester transfer protein

A)



B)

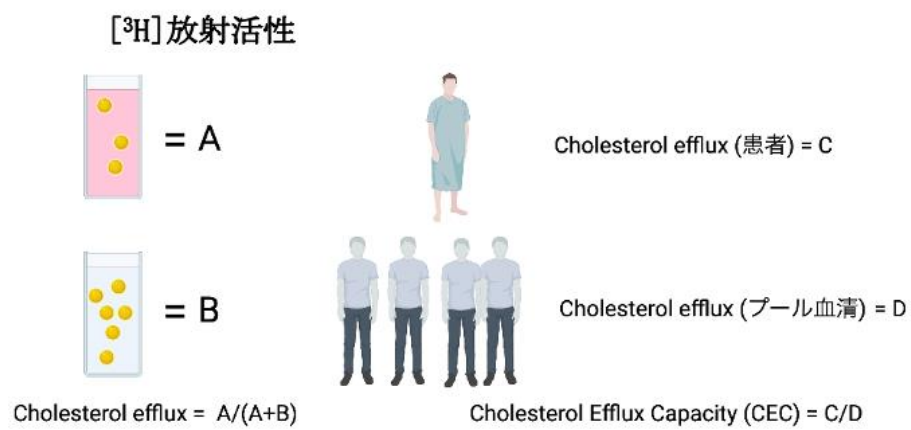


図 3：観察研究におけるコレステロール引き抜き能の測定方法

- A) ^3H でラベルされたコレステロールを J774.1 細胞に取り込ませ (①)、HDL を含む PEG 沈血清を添加した (②)。その後、HDL によって細胞内コレステロールは引き抜かれ (③)、4 時間培養後に培地上清を回収した (④)。脂質溶解液で細胞内の脂質抽出を行い、細胞内及び培地上清の $[\text{}^3\text{H}]$ 放射活性を測定した。
- (⑤)
- B) Cholesterol efflux は、細胞内及び培地上清の $[\text{}^3\text{H}]$ 放射活性から算出し、プール血清との相対比で Cholesterol Efflux Capacity (CEC) を求めた。

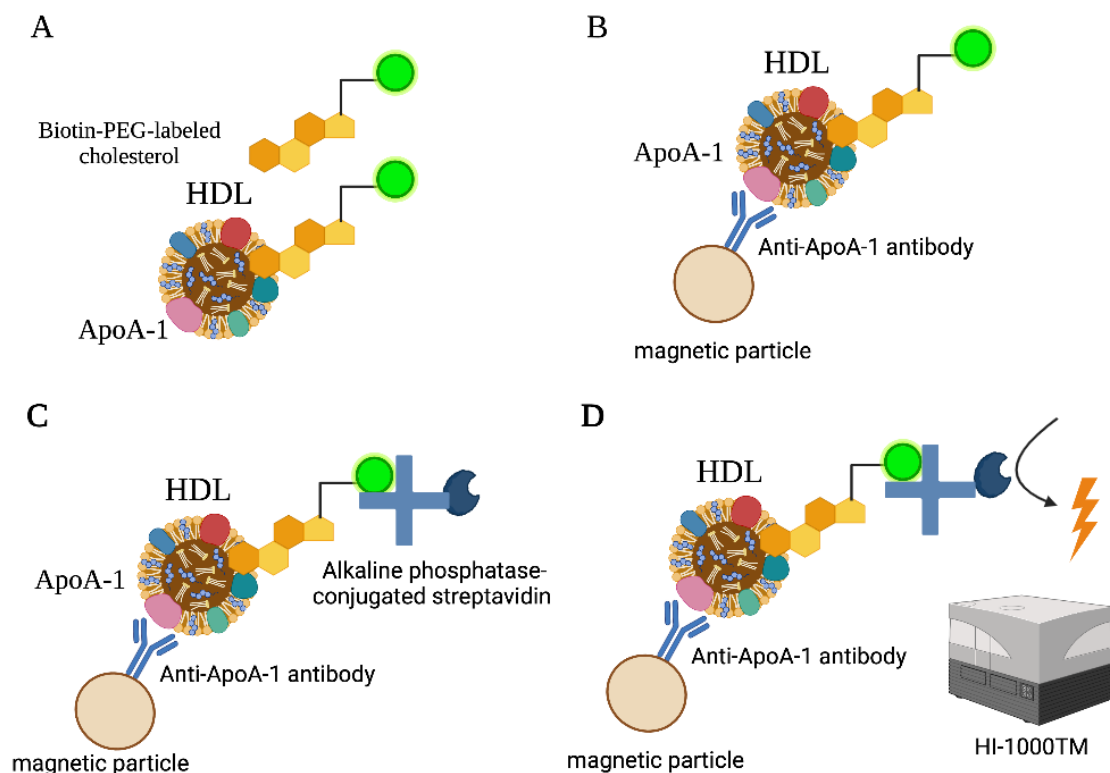


図 4 介入研究におけるコレステロール引き抜き能の測定方法

A) 血清に biotin-PEG-labeled cholesterol を添加する。B) magnetic particle にコートした抗 ApoA-1 抗体を用いて HDL を捕捉した。C) Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin で酵素標識化した。D) 化学発光基質を加え、シグナル強度を HI-1000TM システムで Cholesterol Uptake Capacity (CUC) 値を測定した。プール血清の CUC 値で補正し、CEC として評価した。

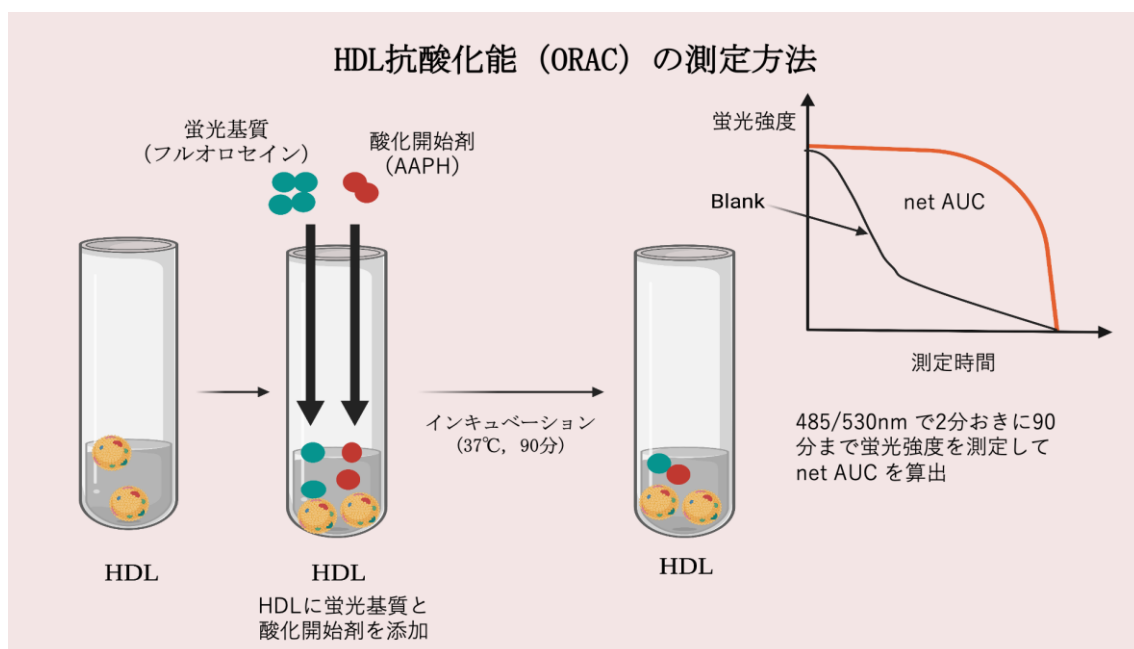


図5 HDL 抗酸化能の測定方法の概略図

HDL を含んだ PEG 沈血清に蛍光基質であるフルオロセイン及び酸化開始剤である AAPH を添加し、37℃, 90 分間でインキュベーションを実施した。2 分おき蛍光強度を測定し、netAUC を算出し、標準物質であるトロロックス相当量を計算し、プール血清との相対比を算出した。

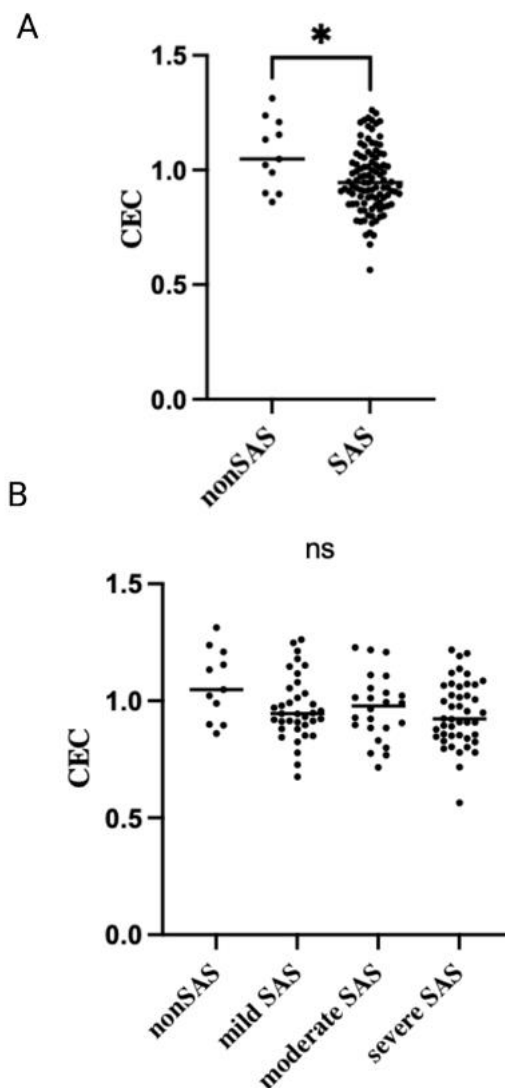


図 6：睡眠時無呼吸症候群が CEC に与える影響：

A 観察研究において non SAS (n=11) と SAS (n=105) の CEC を比較した。二群比較として、対応のない t 検定で解析した。* p=0.01

B non SAS (n=11)、mild SAS (n=37)、moderate SAS (n=24)、severe SAS での CEC を比較した。4 群比較として、one-way ANOVA で検定を行い、事後解析として Tukey 法を用いた。ns: not significant

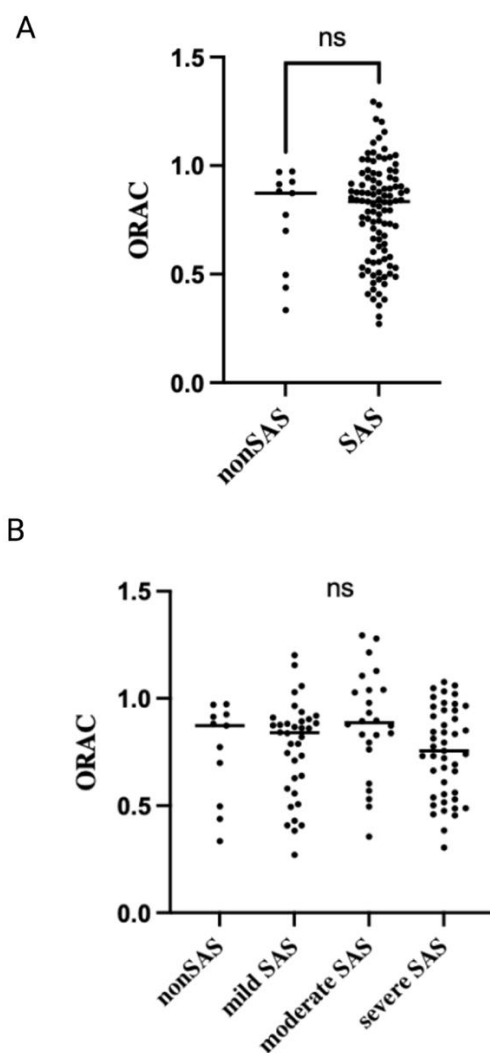


図 7 睡眠時無呼吸症候群が ORAC に及ぼす影響

A 観察研究において non SAS (n=11) と SAS (n=105) の ORAC 値を比較した。二群比較として、対応のない t 検定を用いた。

B non SAS (n=11)、 mild SAS (n=37)、 moderate SAS (n=24)、 severe SAS (n=44) での ORAC を比較した。4 群比較として、one-way ANOVA 及び事後解析として Tukey 法を用いた。略語：ns：not significant

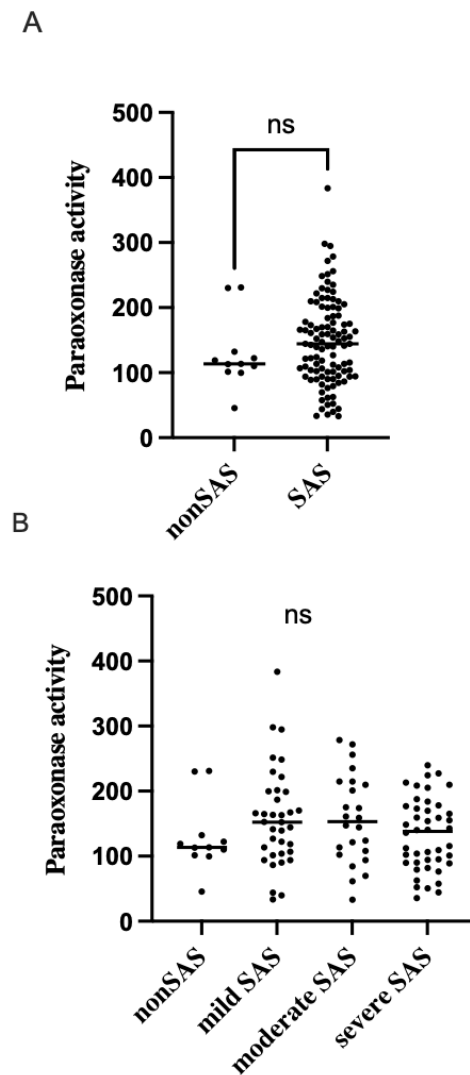


図 8 睡眠時無呼吸症候群がパラオキシナーゼ活性 (Paraoxonase activity) に及ぼす影響：

A 観察研究において non SAS (n=11) と SAS (n=105) のパラオキシナーゼ活性を比較した。二群比較として対応のない t 検定を用いた。

B non SAS (n=11)、mild SAS (n=37)、moderate SAS (n=24)、severe SAS (n=44) でパラオキシナーゼ活性を比較した。4 群比較として, one-way ANOVA 及び事後解析として Tukey 法を用いた。略語：ns：not significant

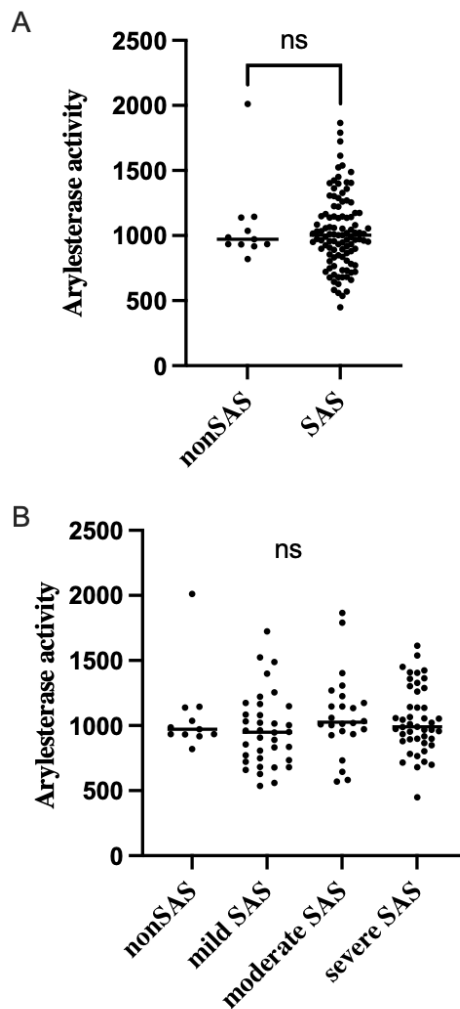


図9 睡眠時無呼吸症候群がアリルエステラーゼ活性(Arylesterase activity)に及ぼす影響

A 観察研究において non SAS(n=11)と SAS(n=105)のアリルエステラーゼ活性を比較した。二群比較として対応のないt検定を用いた。

B non SAS(n=11)、 mild SAS(n=37)、 moderate SAS(n=24)、 severe SAS(n=44)でのアリルエステラーゼ活性を比較した。4群比較として、one-way ANOVA及び事後解析としてTukey法を用いた。略語：ns：not significant

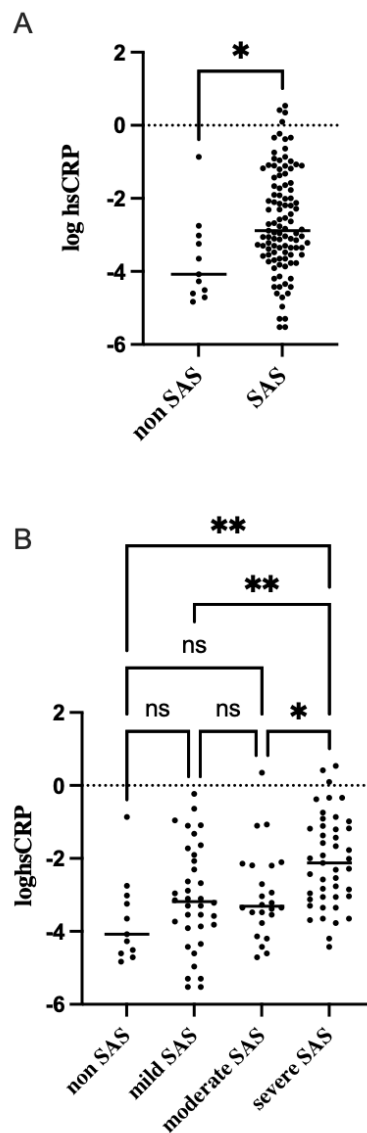


図 10 睡眠時無呼吸症候群が対数変換した高感度 CRP (loghsCRP) に及ぼす影響

A 観察研究において non SAS (n=11) と SAS (n=105) の loghsCRP を比較した。

二群比較として対応のない t 検定を用いた。* $p < 0.05$

B non SAS (n=11)、mild SAS (n=37)、moderate SAS (n=24)、severe SAS (n=44)

で LoghsCRP を one-way ANOVA 及び事後解析として Tukey 法を用いて解析し

た。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

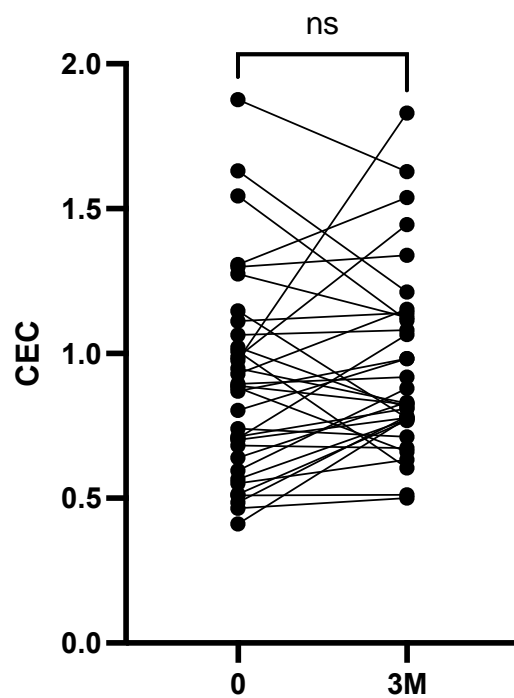


図 11 : CPAP 療法前後のコレステロール引き抜き能 (CEC) の変化

各値は、平均値±標準偏差（ただし、AHI、ESS、BMI 及びトリグリセリド値は中央値と四分位範囲）で表した。CPAP 療法後の CEC を CPAP 療法前の CEC と対応する t 検定で解析した。ns: not significant

A

	Q1	Q2	Q3
年齢	42 ± 9	47 ± 10	53 ± 13
AHI	73 ± 25	55 ± 21	43 ± 25*
BMI	33 ± 6	29 ± 5	29 ± 3
収縮期血圧, mmHg	135 ± 17	133 ± 15	135 ± 17
拡張期血圧, mmHg	86 ± 13	83 ± 13	81 ± 9
TC, mg/dl	224 ± 41	197 ± 34	198 ± 39
HDL-C, mg/dl	38 ± 8	48 ± 9	60 ± 14*
TG, mg/dl	298 (125-372)	166 (198-218)	125 (118-132)
CEC	0.56 ± 0.09	0.85 ± 0.10	1.25 ± 0.27

B

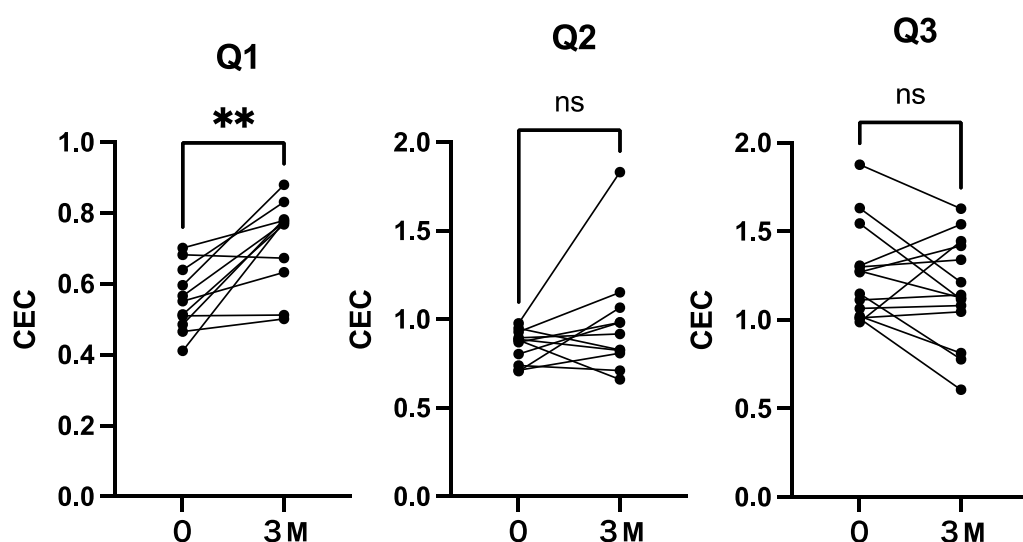


図 12 : CPAP 療法が CEC に与える影響

A) CEC3 分位における患者特徴 B) 介入前後の CEC の比較 : 介入前の CEC を 3 分位 (Q1、Q2、Q3) にわけ、CPAP 療法前後での臨床パラメータ及び CEC を比較した。各値は、平均値 ± 標準偏差 (ただし、トリグリセリド値は中央値と四分位範囲) で表した。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ と表記した。

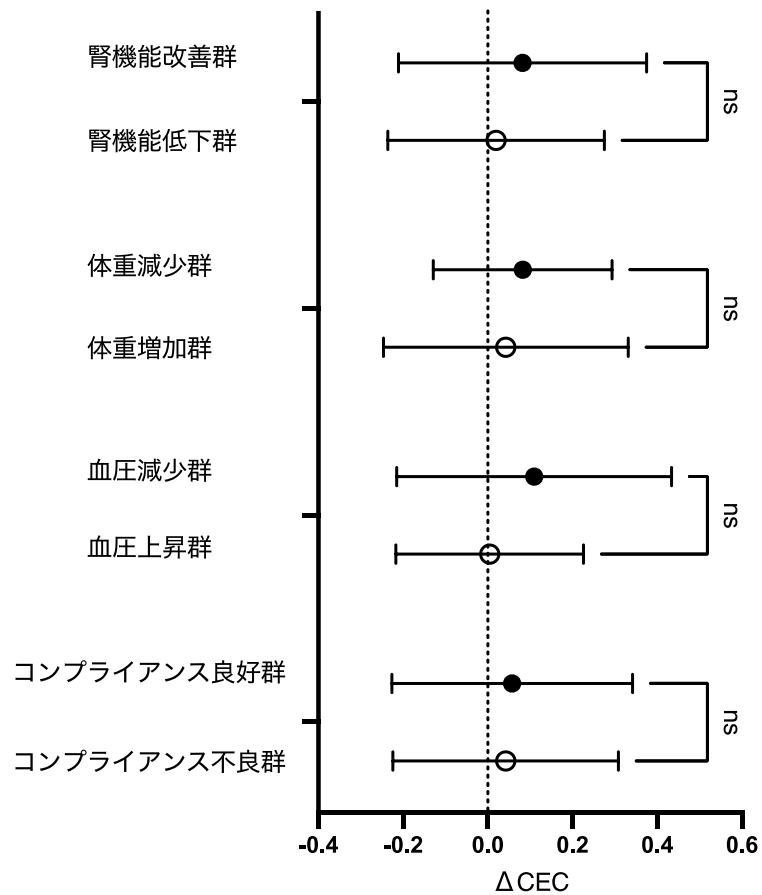


図 13：腎機能、体重、血圧変化及び CPAP 療法のコンプライアンスが CPAP 療法前後の CEC 変動差（ Δ CEC）に及ぼす影響

3 ヶ月の CPAP 療法前後の腎機能、体重、血圧及び CPAP 療法のコンプライアンスで 2 群に区分し、各群を対応のない t 検定で比較を行った。

ns: not significant

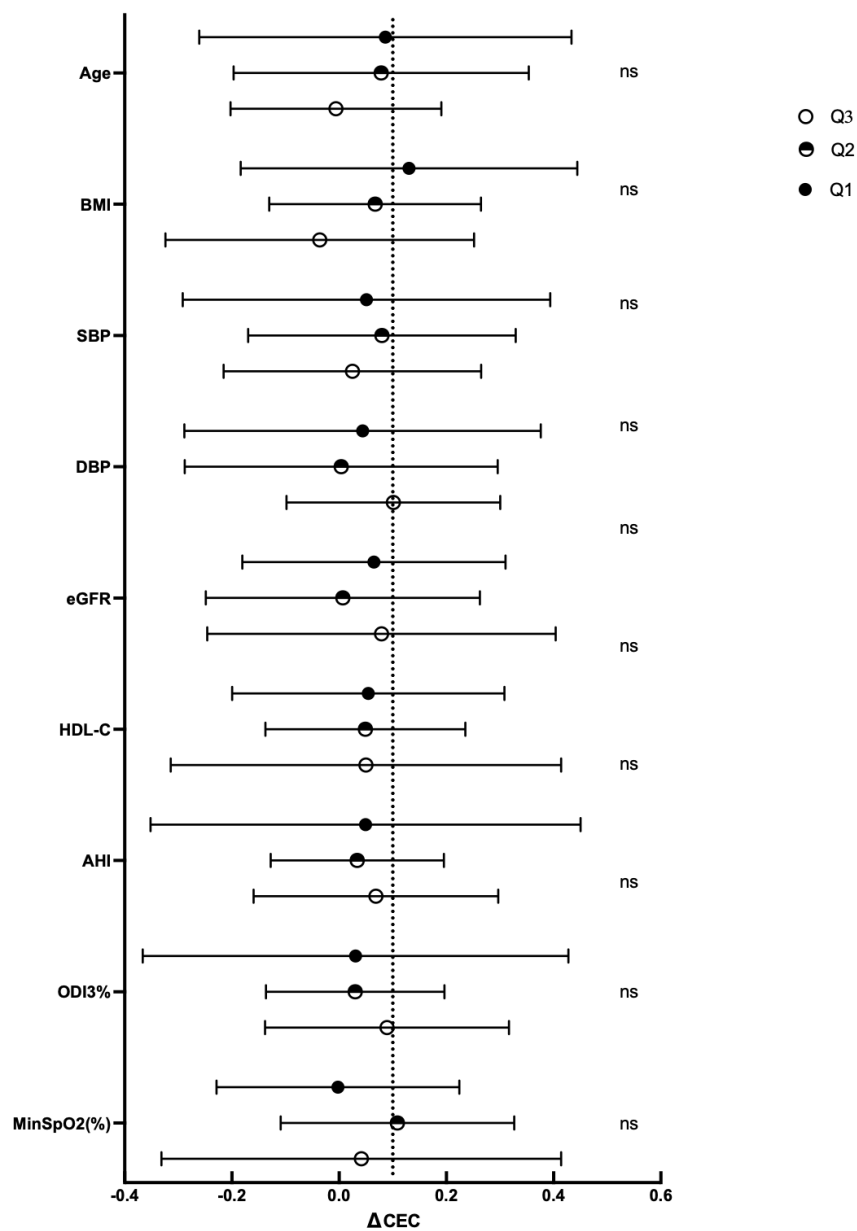


図 14:CPAP 療法前の臨床パラメーターが CPAP 療法前後の Δ CEC に及ぼす影響

年齢、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、eGFR、HDL-C、AHI、ODI3%、MinSpO₂(%)及びCECを3分位(Q1、Q2、Q3)に区分し、 Δ CECを比較した。

ns: not significant

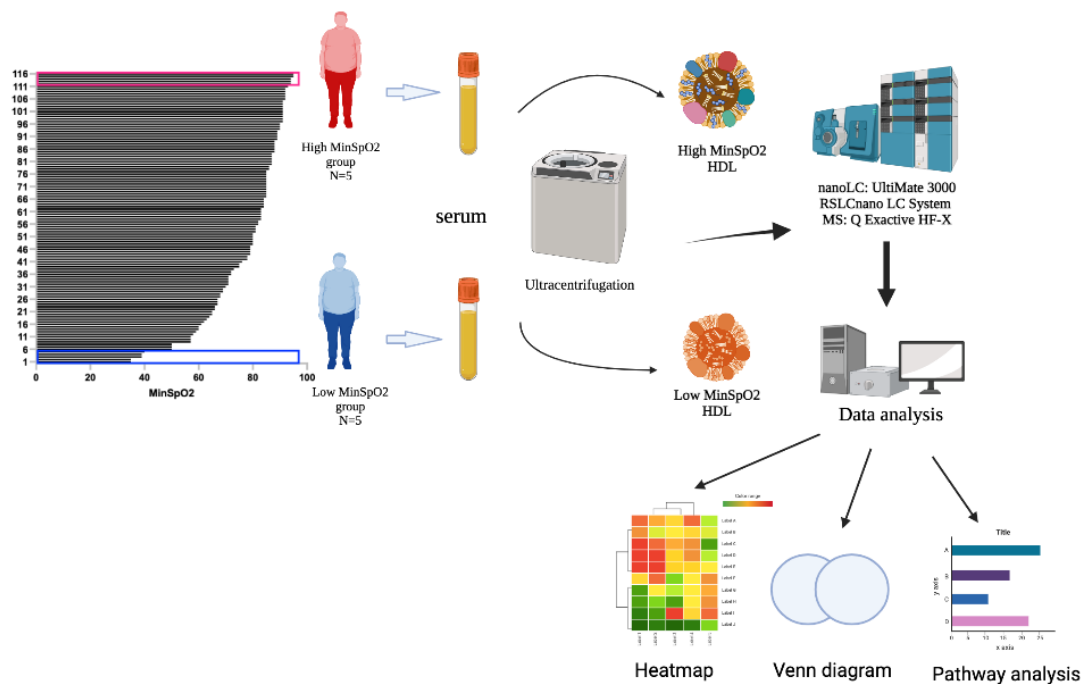


図 16 : HDL プロテオーム解析のプロトコール :

low MinSpO₂ 及び High MinSpO₂ に区分し、患者 5 名ごと抽出し、患者血清から超遠心法を用いて単離した。HDL プロテオームについては、nanoLC: UltiMate 3000 RSLC nano LC System (Thermo Fisher Scientific) 及び MS: Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific) で評価し、Perseus software (MaxQuant) を用いてデータ解析を行なった。

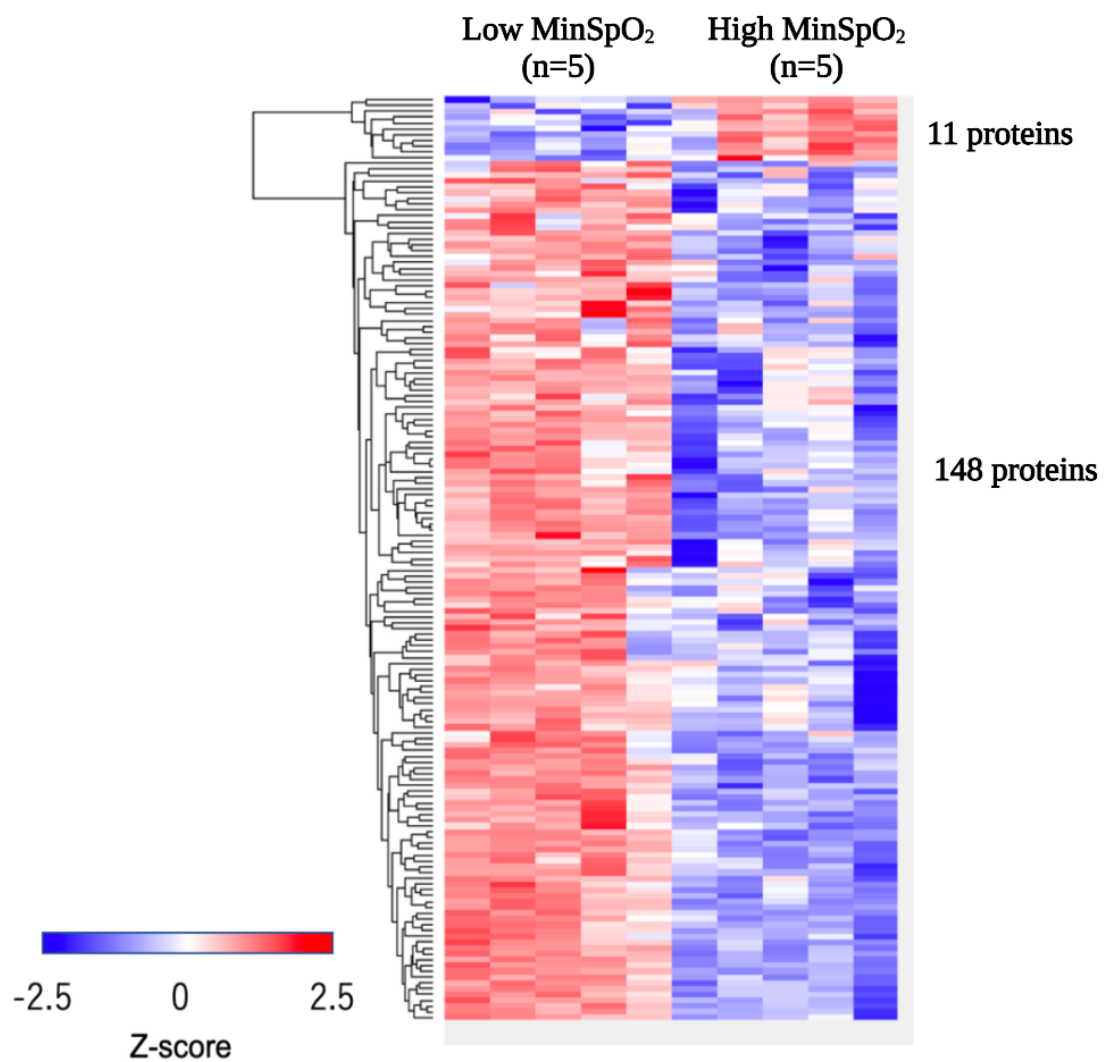
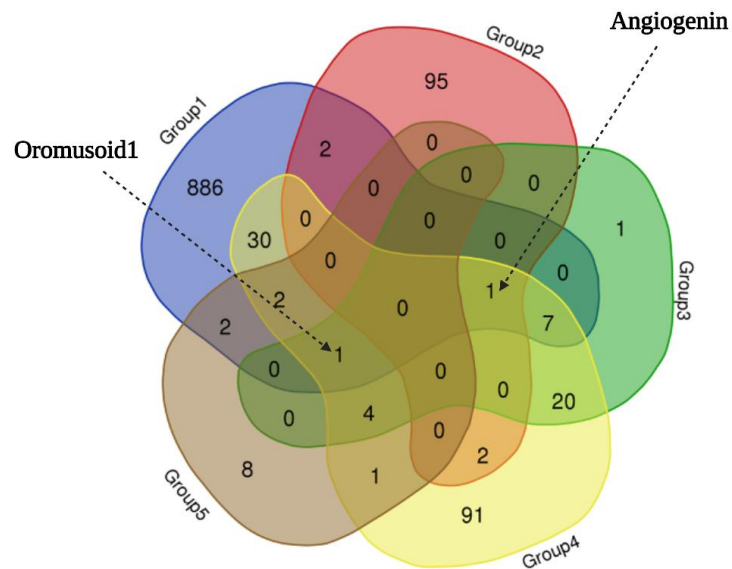


図 17 HDL 蛋白のヒートマップ図：(各群の平均値が 2 倍以上の変動かつ郡間差が $p < 0.05$ となるタンパクを抽出する。それぞれの定量値を Z-score に変換して Heatmap を作成した。)

A



B

グループ名				total	略語	蛋白名
Group1	Group2	Group3	Group4	1	ANG	angiogenin
Group1	Group3	Group4	Group5	1	ORM1	orosomucoid 1

図 18 : Group1～5 を用いたベン図

Group1 : HDL プロテオームデータベースに記載された蛋白群 (文献 68)

Group2 ; 低酸素刺激で変動する上位 100 個の遺伝子群 (文献 78)

Group3 ; CEC と相関を認めた蛋白群(表 8)

Group4 ; low MinSpO₂ 群で変動した蛋白群 (表 9)

Group5 : 本研究で検出された HDL プロテオームで、G0:0006953 acute-phase response でマッピングされた蛋白群

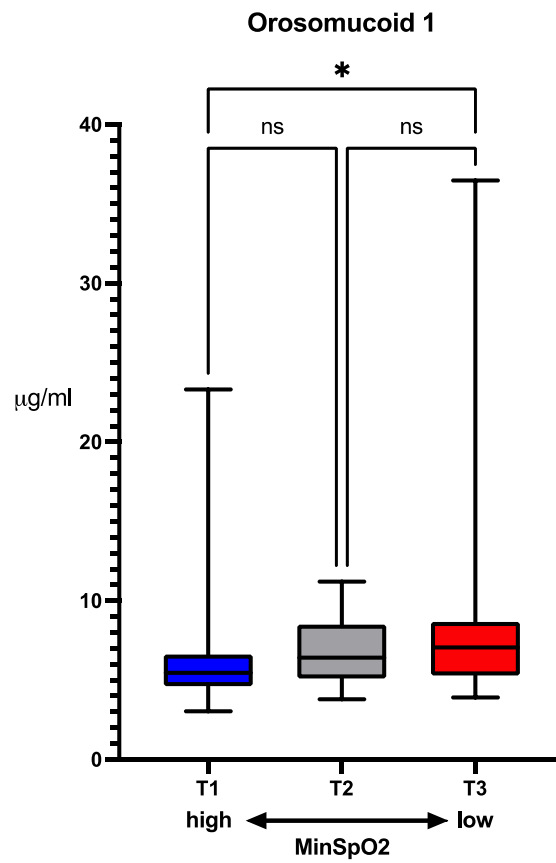


図 19 MinSpO2 3 分位における Orosomucoid1 の蛋白濃度の比較

観察研究の MinSpO2 を 3 分位 (T1、T2、T3) にわけ、Orosomucoid 1 蛋白濃度を比較した。* $p < 0.05$ と表記した。

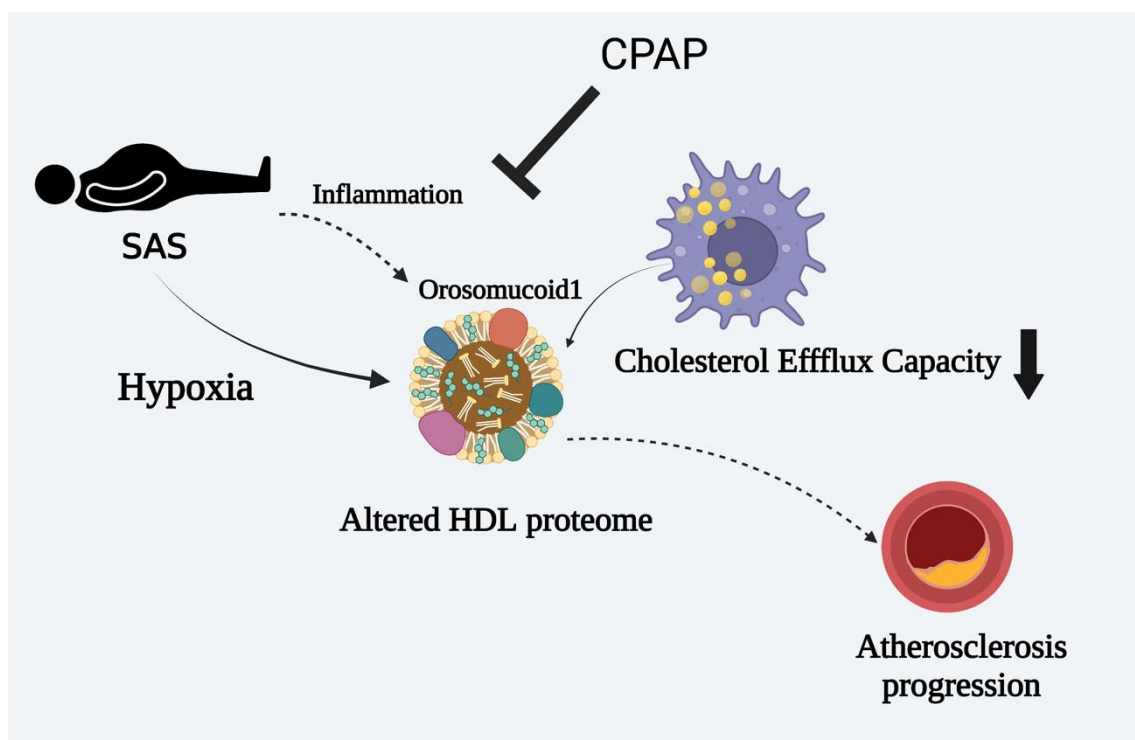


図 20： 研究結果の概念図 （SAS における低酸素環境は HDL プロテオームの変化を呈し、コレステロール引き抜き能を低下させることで動脈硬化性疾患発症に寄与することが示唆された。また、CPAP 療法は、SAS による HDL 機能不全を緩和させる可能性が示唆された。

表 1：睡眠時無呼吸症候群（SAS）関連用語の定義

略語	指標名	定義
ESS	エプワース眠気尺度	8 項目からなる主観的な眠気の尺度
AHI	無呼吸・低呼吸指数	$(\text{無呼吸} + \text{低呼吸数} \times 60) / \text{総睡眠時間}$
AI	無呼吸指数	$(\text{無呼吸数}) \times 60 / \text{総睡眠時間}$
HI	低呼吸指数	$(\text{低呼吸数}) \times 60 / \text{総睡眠時間}$
MinSpO ₂	睡眠中最低SpO ₂ 値	睡眠中の最低SpO ₂ 値
ODI3%	3%desaturation指数	1 時間当たりの3% desaturation 回数
non SAS	SASなし	$\text{AHI} < 5$
mild SAS	軽症SAS	$5 \leq \text{AHI} < 15$
moderate SAS	中等度SAS	$15 \leq \text{AHI} < 30$
severe SAS	重症SAS	$\text{AHI} \geq 30$

表 2: 116 名の対象者の観察研究における患者特徴

A

	AHI<5 nonSAS (N=11)	AHI≥5 SAS (N=105)	p 値
年齢	41±13	47±11	ns
性別 (男性)	8 (73%)	98 (93%)	ns
ESS	8.8±4.6	9.1±5.2	ns
BMI kg/m ²	23.9±2.0	27.2±5.4	0.049
収縮期血圧, mmHg	126±17	133±17	ns
拡張期血圧, mmHg	78±16	82±12	ns
高血圧	0 (0%)	20 (27%)	0.02
糖尿病	0 (0%)	6 (5.7%)	ns
総コレステロール, mg/dl	197±16	211±39	ns
HDLコレステロール mg/dl	64±16	54±20	ns
中性脂肪, mg/dl	88 (70-108)	141 (97-254)	0.004
血糖, mg/dl	98±19	105±28	ns
冠動脈疾患の既往	0 (0%)	0 (0%)	ns
脳梗塞の既往 (内服) n	1 (9.1%)	1 (1.0%)	ns
脂質低下薬	2 (18%)	11 (10%)	ns
抗糖尿病薬	0 (0%)	4 (3.8%)	ns
降圧剤	0 (0%)	23 (22%)	ns

B

	AHI<5 non-SAS (n=11)	5≤AHI<15 mild SAS (n=37)	15≤AHI<30 moderateSAS (n=24)	30≤AHI SevereSAS (n=44)	
年齢	41 ± 13	49 ± 13	46 ± 12	47 ± 11	
性別 (男性)	8 72%	32 86%	23 96%	43 98%	
ESS	8.8 ± 4.6	8.4 ± 4.5	8.6 ± 4.8	9.9 ± 5.8	
BMI kg/m ²	24 ± 2	25 ± 5	26 ± 4	30 ± 6	***
収縮期血圧 mmHg	126 ± 17	131 ± 17	128 ± 15	138 ± 17	
拡張期血圧, mmHg	78 ± 16	83 ± 12	77 ± 9	86 ± 12	
高血圧	0 0%	8 22%	4 17%	1 31%	
糖尿病	0 0%	2 5.4%	2 8.3%	2 4.6%	
脂質異常症	1 9.0%	1 2.7%	4 16%	8 18%	
喫煙	4 36%	6 16%	5 21%	1 21%	
総コレステロール, mg/dl	197 ± 16	214 ± 40	208 ± 40	210 ± 38	
HDLコレステロール, mg/dl	64 ± 16	57 ± 17	56 ± 14	51 ± 25	*
中性脂肪, mg/dl	88 (70-108)	121 (76-286)	130 (106-221)	166 (109-269)	**
血糖, mg/dl	95 ± 19	100 ± 18	100 ± 20	106 ± 30	
内服薬, n (%)					
脂質低下薬	2 18.2%	2 5.4%	2 8.3%	7 16%	
抗糖尿病薬	0 0%	1 2.7%	1 4.2%	2 4.5%	
降圧剤	0 0%	7 19%	4 17%	12 27%	

A ; SAS 群と non SAS 群 を比較して、対応のない t 検定で解析した。B : 各重症度の SAS 群を non SAS と比較し、統計学的有意のあった群に *p <0.05, **p <0.01, *** p <0.001 と表記した。各値は、平均値±標準偏差（ただし、トリグリセリド値は中央値と四分位範囲）で表した。

表 3： CEC と各種臨床パラメーターとのスピアマンの順位相関係数

変数	相関係数	p 値
Age	0.137	0.144
ESS	0.005	0.961
BMI	-0.273	0.003
ORAC	0.079	0.400
収縮期血圧	0.031	0.744
拡張期血圧	0.017	0.859
パラオキシナーゼ	0.090	0.342
アリルエステラーゼ	-0.037	0.692
AHI	-0.197	0.034
AI	-0.192	0.040
HI	-0.066	0.485
minSpO2 (%)	0.198	0.034
ODI (3%)	-0.214	0.022
TC	0.048	0.611
logTG	-0.369	p<0.001
HDL-C	0.617	p<0.001
glu	-0.020	0.836
Insulin	-0.151	0.108
UA	-0.147	0.117
ApoA-1	0.551	p<0.001
log hsCRP	-0.354	p<0.001

CEC と各種臨床パラメーターとの相関係数は、スピアマンの順位相関係数を用いて解析した。

表 4 : CEC と睡眠時無呼吸症候群のパラメーターとの重回帰分析

	β	p value
性別	-0.15	0.083
年齢	0.07	0.449
喫煙	-0.06	0.460
BMI	0.15	0.226
高血圧	0.05	0.613
糖尿病	0.13	0.119
パラオキシナーゼ	0.07	0.428
アシルエステラーゼ	-0.08	0.354
MinSpO ₂ (%)	0.2	0.047
TC	0.01	0.902
logTG	-0.29	0.011
HDL-C	0.19	0.067
log hsCRP	-0.21	0.039

CEC を従属変数として年齢、性別、BMI、喫煙の有無、高血圧の有無、糖尿病の有無、TC、logTG、HDL-C、MinSpO₂、パラオキシナーゼ活性、アシルエステラーゼ活性及び loghsCRP を独立変数として重回帰分析を行った。

表 5：介入研究の患者背景及び臨床パラメータの変化

A

	N=36
年齢	47±11
性別（男性）	34 (94%)
AHI	46 (35-78)
ESS	8 (5-11)
BMI	30 (25-35)
収縮期血圧, mmHg	134±16
拡張期血圧, mmHg	83±12
高血圧	12 (64. 7%)
糖尿病	2 (5. 9%)
脂質異常症	5 (15%)
総コレステロール, mg/dl	205±39
HDLコレステロール mg/dl	48±13
トリグリセリド, mg/dl	150 (107-254)
冠動脈疾患の既往	0 (0%)
脳梗塞の既往	1 (2. 9%)

B

	CPAP前	CPAP後	p value
BMI	30 (25-35)	30 (26-34)	ns
収縮期血圧, mmHg	134±16	135±18	ns
拡張期血圧, mmHg	83±12	83±11	ns
総コレステロール, mg/dl	206±38	204±42	ns
HDLコレステロール mg/dl	50±14	50±13	ns
トリグリセリド, mg/dl	150 (107-254)	189 (124-245)	ns
eGFR, mL/min/1.73m ²	77±18	77±17	ns

各値は、平均値±標準偏差（ただし、AHI, ESS, BMI 及び中性脂肪は中央値と四分位範囲）で表した。ns: not significant

表 6：HDL プロテオーム解析に登録された患者群

	Low MinSpO ₂ (n=5)	High MinSpO ₂ (n=5)	p value
年齢	35 ± 9	36 ± 5	ns
AHI	93 ± 12	3.4 ± 1.9	p<0.001
ESS	16 ± 4	6.4 ± 4.2	p<0.001
BMI	36 ± 5	24 ± 3	p<0.001
CEC	0.78 ± 0.13	1.13 ± 0.09	p<0.001
ORAC	0.6 ± 0.21	0.67 ± 0.25	ns
パラオキシナーゼ	151 ± 78	157 ± 67	ns
アリルエスエラーゼ	1270 ± 243	1039 ± 101	ns
収縮期血圧	138 ± 20	130 ± 21	ns
拡張期血圧	86 ± 13	89 ± 15	ns
AI	59 ± 37	1.4 ± 1.1	0.009
HI	35 ± 31	1.9 ± 1.3	0.046
MinSpO ₂ (%)	40 ± 6	92 ± 2	p<0.001
ODI (3%)	87 ± 19	2 ± 2	p<0.001
TC	196 ± 52	197 ± 20	ns
LDL-C	106 ± 43	108 ± 23	ns
log TG	5.4 ± 0.6	4.5 ± 0.4	0.0185
HDL-C	38 ± 9	70 ± 8	p<0.001
ApoA-1	118 ± 16	165 ± 17	0.0016
log hsCRP	-1.04 ± 0.58	-4.17 ± 0.88	p<0.001

High MinSpO₂ (n=5) 及び Low MinSpO₂ (n=5) の各種臨床パラメーターを対応のな
い t 検定で評価した。

表 7 HDL プロテオームにおける GO エンリッチメント解析

GO ID	GO name	Enrichment factor	pvalue
GO:0050778	positive regulation of immune response	3.5473	4.7.E-04
GO:0006957	complement activation, alternative pathway	3.1926	6.9.E-05
GO:0016525	negative regulation of angiogenesis	2.759	2.4.E-03
GO:0006956	complement activation	2.027	1.6.E-02
GO:0010951	negative regulation of endopeptidase activity	1.9899	6.4.E-05
GO:0006958	complement activation, classical pathway	1.9623	2.8.E-05
GO:0006953	acute-phase response	1.7736	2.6.E-02
GO:0002250	adaptive immune response	1.708	1.2.E-02
GO:0006955	immune response	1.5463	1.4.E-02
GO:0006954	inflammatory response	1.4876	3.6.E-02
GO:0045087	innate immune response	1.3236	2.4.E-02

GO アノテーションは、QuickGO database (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>).

を用いてマッピングして解析を行った。

表 8:重回帰分析にて年齢及び BMI と独立して CEC と相関を認めた蛋白群

蛋白名	β	p value	蛋白名	β	p value
A1BG	-0.969	0.009	HPX	-0.933	0.029
AGT	-1.037	0.006	ICAM1	-0.959	0.026
AHSG	-0.845	0.014	IGKC	-1.049	0.034
AMBP	-0.710	0.030	KNG1	-0.927	0.032
ANG	-0.837	0.021	LRG1	-1.042	0.003
APCS	-0.762	0.036	LTF	-0.777	0.039
AZGP1	-1.069	0.003	LUM	-1.077	0.001
C8B	-0.933	0.029	MSN	-0.500	0.044
CFD	-0.796	0.037	ORM1	-1.102	0.001
CFHR2	-0.680	0.022	PGLYRP2	-0.841	0.029
CLEC3B	-0.956	0.013	RAB7A	-1.083	0.020
CST3	-0.727	0.003	RBP4	-0.704	0.048
F2	-1.047	0.012	SERPINA3	-0.804	0.022
F9	-0.790	0.012	SERPINA5	-0.913	0.006
GNA12	-0.675	0.016	SERPINA7	-0.821	0.011
GNAI2	-0.581	0.019	SERPINF1	-0.740	0.003
GPX3	-0.89226	0.0172	TTR	-0.900	0.033

CEC を従属変数として HDL プロテオーム解析で変動を認めた蛋白群の蛋白強度

年齢及び BMI を独立変数として重回帰分析を行った。

表 9：HDL プロテオーム解析において変動を認めた蛋白群

Accession Number	Gene Symbol	Fold-change	p-value	Accession Number	Gene Symbol	Fold-change	p-value	Accession Number	Gene Symbol	Fold-change	p-value
P00739	HPR	0.3	6.7E-03	P23142	FBLN1	12.0	1.6E-02	P01344	IGF2	13.4	2.8E-02
P80108	GPLD1	0.4	1.6E-02	Q02094	RHAG	3.8	3.1E-02	P01861	IGHG4	6.5	1.2E-02
Q5UCC4	EMC10	0.4	3.6E-02	P16581	SELE	5.3	3.5E-02	P09486	SPARC	21.9	3.8E-03
Q96EG1	ARSG	0.2	2.1E-02	A0A0B4J2D9	IGKV1D-13	2.3	4.5E-02	P17936	IGFBP3	47.1	1.0E-02
Q8TDL5	BPIFB1	0.4	4.2E-03	P21730	C5AR1	3.7	3.1E-02	P00742	F10	9.2	2.4E-03
P17301	ITGA2	0.2	1.4E-02	P13671	C6	9.2	9.9E-03	P05160	F13B	45.8	5.3E-03
Q12884	FAP	0.3	2.3E-03	O00187	MASP2	9.1	3.2E-02	P01019	AGT	2.0	5.1E-03
P55058	PLTP	0.5	3.8E-02	P12259	F5	13.7	5.9E-03	P05543	SERPINA7	3.3	1.7E-03
P05556	ITGB1	0.5	4.1E-02	P34096	RNASE4	16.3	7.1E-03	P02766	TTR	2.6	6.1E-03
Q9UKX5	ITGA11	0.3	7.7E-03	A0A075B6K4	IGLV3-10	9.2	1.3E-02	P00746	CFD	8.8	3.5E-03
P16070	CD44	0.4	1.1E-02	P07357	C8A	2.7	8.0E-03	P06396	GSN	3.3	7.0E-03
Accession Number	Gene Symbol	Fold-change	p-value	P01714	IGLV3-19	8.2	1.9E-02	Q14574	DSC3	7.3	2.2E-02
Q9ULI3	HEG1	10.2	3.6E-02	A0A075B7D8	IGHV3OR15-7	6.8	2.7E-02	P69905	HBA2	3.6	8.4E-04
P07355	ANXA2	2.4	2.3E-02	P02774	GC	3.1	4.5E-03	P68871	HBB	4.0	2.4E-04
P06133	UGT2B4	3.1	2.4E-02	A0A075B6S2	IGKV2D-29	2.7	2.0E-02	P62879	GNB2	18.9	6.6E-03
P50502	ST13	4.0	8.3E-03	P01834	IGKC	2.9	2.6E-02	P36980	CFHR2	18.8	5.2E-03
A0A087WSY6	IGKV3D-15	9.2	3.4E-02	Q16610	ECM1	8.0	4.2E-02	P26038	MSN	2.3	2.9E-04
Q14651	PLS1	7.2	2.0E-02	P06312	IGKV4-1	2.0	3.5E-02	P04899	GNAI2	3.3	5.0E-05
P80723	BASP1	2.3	7.6E-03	P0DOY2	IGLC2	2.5	2.6E-02	P02042	HBD	23.2	8.4E-04
Q969P0	IGSF8	8.7	1.3E-02	P04003	C4BPA	2.9	3.1E-02	Q92954	PRG4	30.3	1.5E-03
P33908	MAN1A1	8.9	1.4E-02	P08571	CD14	27.1	6.2E-03	P13796	LCP1	14.2	1.7E-04
P11142	HSPA8	4.9	4.8E-02	Q9UGM5	FETUB	7.7	3.2E-02	P05546	SERPIND1	5.0	5.2E-04
P18428	LBP	8.0	3.0E-03	P10643	C7	22.9	6.5E-03	Q03113	GNAI2	2.3	1.0E-03
P02748	C9	2.2	2.8E-02	Q08380	LGALS3BP	10.7	4.9E-02	O75955	FLOT1	5.6	3.2E-02
P08575	PTPRC	9.9	3.3E-04	P03952	KLKB1	5.8	4.5E-02	P08185	SERPINA6	7.8	4.3E-02
Q8WUM4	PDCD6IP	7.5	1.2E-02	Q13103	SPP2	7.3	3.1E-02	P00747	PLG	4.0	3.0E-03
P05156	CFI	19.0	3.3E-03	P07225	PROS1	3.9	1.6E-02	P08603	CFH	6.1	3.7E-04
O15400	STX7	15.5	2.8E-04	P61626	LYZ	7.8	1.6E-02	P02749	APOH	2.3	4.0E-03
P22748	CA4	9.2	2.0E-02	P02775	PPBP	6.5	1.4E-02	Q96PD5	PGLYRP2	3.1	3.5E-03
P02747	C1QC	31.5	8.9E-03	P02776	PF4	10.0	2.1E-02	P02753	RBP4	3.3	3.3E-04
Q06033	ITIH3	4.6	1.2E-02	P00734	F2	4.5	2.1E-03	P02788	LTF	3.5	3.2E-04
Q14624	ITIH4	2.8	1.5E-02	Q12805	EFEMP1	8.4	1.5E-02	P01034	CST3	6.5	4.3E-05
P00748	F12	21.7	1.6E-02	A0A0B4J1X8	IGHV3-43	11.7	6.8E-03	P36955	SERPINF1	5.1	5.8E-05
A0A0J9YX35	IGHV3-64D	11.9	1.1E-02	P02760	AMBP	2.4	1.3E-03	P02763	ORM1	5.2	3.9E-04
P11166	SLC2A1	2.3	2.1E-03	P01009	SERPINA1	2.3	3.1E-03	P01042	KNG1	4.0	5.1E-04
P02730	SLC4A1	4.4	4.7E-04	A0A0B4J1V0	IGHV3-15	7.5	2.0E-03	P02750	LRG1	7.0	3.4E-04
P01780	IGHV3-7	5.5	9.0E-03	P06681	C2	25.5	2.9E-03	P25311	AZGP1	3.5	4.9E-04
A0A0A0MRZ8	IGKV3D-11	3.2	7.0E-03	P43251	BDT	34.2	5.7E-04	P01008	SERPINC1	2.4	5.2E-03
A0A0C4DH25	IGKV3D-20	3.9	4.6E-03	P02743	APCS	4.6	3.9E-05	P51884	LUM	6.0	1.8E-04
P62258	YWHAE	6.8	3.2E-02	P03950	ANG	44.9	2.5E-04	P00915	CA1	6.3	1.6E-04
P05362	ICAM1	6.6	2.8E-02	Q16627	CCL14	15.4	7.6E-04	P05154	SERPINA5	4.5	1.8E-05
P26447	S100A4	5.1	1.8E-02	P48740	MASP1	12.9	2.4E-04	Q03591	CFHR1	67.9	1.5E-05
P51149	RAB7A	3.3	1.0E-02	P19823	ITIH2	4.7	9.8E-04	P22352	GPX3	4.2	4.9E-05
Q8NG11	TSPAN14	9.7	1.7E-03	P19827	ITIH1	4.5	3.7E-04	P02790	HPX	5.7	1.8E-06
A0A0B4J1Y9	IGHV3-72	8.2	4.7E-02	P01857	IGHG1	5.1	8.1E-04	P04217	A1BG	4.3	2.2E-04
A0A075B7B8	IGHV3OR16-12	9.9	2.2E-02	P00736	C1R	5.7	5.0E-04	P07998	RNASE1	12.4	4.7E-04
P01033	TIMP1	19.5	4.5E-03	P00450	CP	9.0	6.5E-04	P02765	AHSN	4.1	4.5E-04
P02671	FGA	7.3	1.9E-02	P02751	FN1	4.2	4.5E-03	P05452	CLEC3B	5.0	6.9E-04
P07360	C8G	31.6	1.9E-02	P35443	THBS4	33.5	3.4E-04	P07358	C8B	4.8	3.4E-04
P30041	PRDX6	19.5	7.8E-03	P00740	F9	11.9	3.0E-04	P43652	AFM	4.0	1.3E-04
P07996	THBS1	20.4	1.7E-02	P09871	C1S	12.7	4.2E-04	P02787	TF	6.5	6.2E-04
P14618	PKM	9.7	3.5E-02	P01011	SERPINA3	4.3	3.0E-04	P02768	ALB	3.0	2.2E-03
P12429	ANXA3	3.3	3.9E-02	P00751	CFB	6.9	5.5E-04				
P62937	PPIA	2.6	4.7E-02	P01031	C5	6.4	9.8E-04				

表 10： CEC と Angiogenin 及び Orosomucoid1 とのスピアマンの順位相関係数

変数	相関係数	p value
Orosomucoid 1	-0.22	0.019
Angiogenin	-0.13	0.18

CEC と Angiogenin 及び Orosomucoid1 は、スピアマンの順位相関係数を用いて解析した。

表 11: CEC と Orosomucoid 1 との重回帰分析

変数	β	p value	VIF
Orosomucoid 1	-0.0063	0.0388	1.128
年齢	0.00062	0.5449	1.078
BMI	0.00049	0.8558	1.479
HDL-C	0.0021	0.0026	1.305
log hsCRP	-0.025	0.0116	1.349

CEC を従属変数として年齢、BMI、HDL-C 及び loghsCRP を独立変数として重回帰分析を行った。