

16. 夏眠メカニズムの解明とその制御

西山 成

香川大学 医学部 薬理学

Key words : 夏眠様反応, 恒常性維持, 交感神経, 異化反応, 浸透圧物質

緒言

生体は環境の変化やストレスに適応する能力を持つが、徐々にその力は減衰し、老いととも様々な病気が発症することが多い。個々の病態に対して治療薬の開発が進んでいるものの、そのいずれもが単なる対症療法に過ぎず、根本的な解決にはつながっていない。すなわち、これまでの研究すべてが機能低下の「原因・要因」に着目するものばかりであり、個体の機能低下を防ぐための生体の「環境適応能力（防御反応）」に着目したものが皆無であったことが、最大の問題であると考えられる。

一方で感染を生じた際の免疫反応など、生命体にはカラダを守る様々な力がある。例えば、生物が水中から陸上へ移動した進化の際、水の少ない乾燥環境に適応するために「夏眠」して体液を保持する防御能力を獲得したとされている。肺魚は乾季に土中に潜り、数ヶ月から数年の間、「夏眠」して水を全く飲まずに雨を待つ。この乾燥に対する「夏眠」と呼ばれる生体の反応は、尿素などの浸透圧物質を産生し、その浸透圧の力によって水分を保持することによる「適応現象」として知られている。これに対して我々は最近、この「体液を保持するために生じる夏眠」という適応能力の一部が、陸上高等動物であるマウスやヒトにも潜在していることを世界で初めて発見し、「夏眠様反応 (aestivation-like response)」と名づけた [1]。

現在、我々の研究グループでは、「夏眠様反応」に関する様々な研究を展開しているが、本研究はその基盤となるものとして、生体防御能力・「夏眠様反応」の制御メカニズムを探究し、疾患や環境変化との関連を明らかにする事を目的に立案された。さらに本研究では、「夏眠様反応」を変化させる介入法の検証についても、併せて実施した。

方法

1. 「夏眠様反応」の制御メカニズムの探究

我々は齧歯類に「夏眠」と似た「夏眠様反応」を誘導する実験的手法をすでに確立している [1]。そこで「夏眠様反応」に伴って生じる生体の変化を特定し、特に交感神経の役割を明らかにする事を目的に以下を実施した。

実験は、雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに対して高食塩負荷 (4% NaCl 含有餌+0.9% 食塩水) による脱水ストレスを与え、体液変化として皮膚、骨格筋、骨の水分とナトリウムイオンの含有量を、「夏眠様反応」の指標として肝臓の尿素産生量とアルギナーゼをそれぞれ測定した。一方、同じ週齢の SD ラットに対してイソフルラン麻酔下に腎交感神経に電極を設置してテレメトリー装置に接続し、覚醒下に交感神経活性を持続的にモニタリングすることによって、体液量変化・夏眠様反応との関連について検討した。身体データは食塩を負荷しない群と比較した (各群 n=6~10)。

さらに、両側の腎交感神経切除が「夏眠様反応」に与える影響について検討した。実験は雄性 C57BL/6 マウスを用い、両側の腎臓交感神経の外科的切除術、あるいは偽手術を実施し、「夏眠様反応」の指標として肝臓の尿素産生量とアルギナーゼ活性を測定した (各群 n=7~9)。

2. 病態における「夏眠様反応」の役割の検証

本研究項目では、食塩感受性高血圧と腎不全と肝不全の病態モデルにおける「夏眠様反応」の役割、ならびに宇宙空

間で飼育したマウスの体液変化を検証した。

ダール食塩感受性高血圧ラットはアルギナーゼに関連する遺伝子の先天的異常があり、正常な尿素サイクル制御ができない。これが「夏眠様反応」を正常に制御できないことにつながり、病態の発症・進展に関与している可能性について検証した。雄性ダール食塩感受性高血圧ラットに対して高食塩負荷（4% NaCl 含有餌+0.9%食塩水）による脱水ストレスを与え、体液の変化として皮膚、骨格筋、骨の水分とナトリウムイオンの含有量を測定し、テレメトリー法にて動脈圧と心拍数を経時的にモニタリングした。データは食塩を負荷しない群と比較した（各群 n=7~9）。

次いで、腎臓を5/6摘出（Nx）した腎不全SDラット（雄性）とdiethylnitrosamine投与による肝不全SDラット（雄性）において、体液バランスと「夏眠様反応」の役割を検証した。さらに、JAXAマウスサンプルシェアによる共同研究契約を締結後、JAXAより得た宇宙空間で飼育した雄性C57BL/6マウスの皮膚組織での体液変化も検証した。こちらについてはサンプルの制限があり、「夏眠様反応」は検証できなかった（各群 n=6~12）。

3. 「夏眠様反応」制御法の探求

体液のロスへの適応反応として「夏眠様反応」が生じることから、利尿効果を生じるSGLT2阻害薬、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬、ループ利尿薬、バゾプレッシンV2受容体拮抗薬を投与し、体液の変化と「夏眠様反応」の指標を評価した。このうちミネラルコルチコイド受容体拮抗薬とループ利尿薬の実験データはまだ解析中であるので、ここではSGLT2阻害薬とバゾプレッシンV2受容体拮抗薬の実験について示す。実験は、雄性C57BL/6マウスとSDラットに対して、それぞれSGLT2阻害薬であるエンパグリフロジン（10 mg/kg/day）とバゾプレッシンV2受容体拮抗薬であるトルバプタン（0.1%混餌）を経口投与し、上記方法にて体液の変化と「夏眠様反応」を評価した。

結果および考察

1. 「夏眠様反応」の制御メカニズムの探求

雄性SDラットに対して脱水ストレスを与えたところ、肝臓の尿素産生量とアルギナーゼ活性を増加し、皮膚、骨格筋、骨の水分とナトリウムイオンの含有量は一定に維持されていた。すなわち、脱水にて尿素サイクルが活性化され、産生された尿素が体液を保持に関与していることが示唆された。一方、別のラットにテレメトリーを装着して循環動態を覚醒下に持続的にモニタリングしたところ、脱水刺激で血圧には変化がなかったものの、有意に交感神経活動と心拍数を減少させることが明らかとなった。すなわち、脱水に対抗して体液保持のために発動される夏眠様反応は交感神経活動の抑制を伴い、心臓のエネルギー代謝などを減少させていることが示唆された（図1）[2]。

一方、C57BL/6マウスに対して両側の腎交感神経切除を施行し、肝臓の尿素産生とアルギナーゼ活性を偽手術群と比較したところ、脱水刺激による尿素産生とアルギナーゼ活性化が腎交感神経切除によって減弱していることが示された。これらのデータより、腎交感神経が夏眠様反応の制御に対して関与しているものと考えられた（未発表）。

2. 病態における「夏眠様反応」の役割の検証

雄性ダール食塩感受性高血圧ラットに対して脱水ストレスを与えたところ、予想通り肝臓での尿素産生とアルギナーゼの活性化は生じなかった。一方、テレメトリー法にて動脈圧と心拍数を経時的にモニタリングしたところ、正常SDラットとは異なり、高食塩負荷による脱水ストレスによって、交感神経の増加を伴った血圧の上昇を生じた。これらの結果より、夏眠様反応の先天的な欠如が食塩感受性高血圧の病態に一部関与しているものと考えられた [2]

次いで、腎不全ラットと体液バランスと夏眠様反応の役割を検証したところ、腎不全ラットでは多尿による脱水が生じ、これに対抗して肝臓での尿素産生とアルギナーゼ活性化が生じており、皮膚、骨格筋、骨の水分とナトリウムイオンの含有量と水分量が維持されていた [3]。一方、肝不全ラットでは、このような生体反応が減弱していた。以上の結果より、腎不全多尿期には夏眠様反応が発動され、体液を維持されていることが示唆された。しかし、肝不全の病態では、肝臓の尿素産生が障害されているので、このような適応反応が生じないものと示唆された [4]。

JAXAと協力し、宇宙空間で飼育したC57BL/6マウスと地上飼育したものの皮膚保存組織での体液変化を検証したところ、宇宙空間の微小重力飼育のマウスの皮膚のナトリウムイオン含量と水分量は、著明に下半身（下肢）では減少しているが、上半身（背中）では逆に増加していることが明らかとなった（図2）[5]。すなわち、無重力状態では体

液の急激なシフトが生じたことが明らかとなったことから、このような変化に対して夏眠様反応が発動され、恒常性が維持されているのかについて、今後、検証を進める予定である。

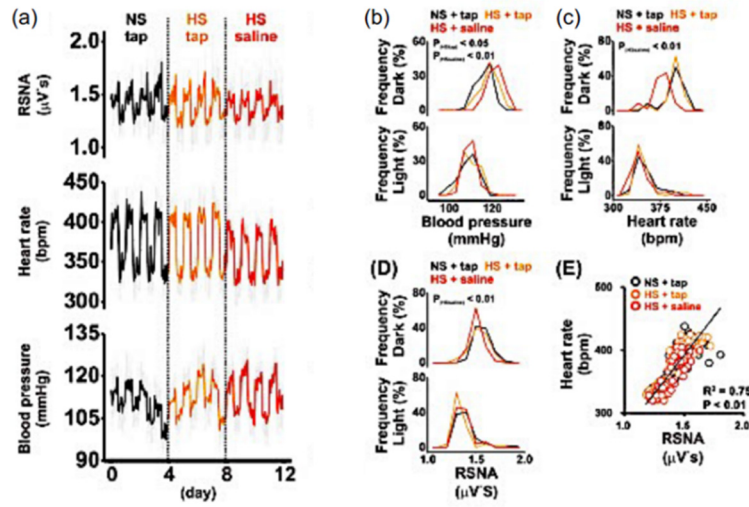


図1. 覚醒ラットにおける高食塩負荷による脱水ストレスの腎交感神経活動 (RSNA)、心拍数、平均血圧に及ぼす影響 (n=3)

- a) 0.2% NaCl 食+水道水 (NS+tap)、4% NaCl 食+水道水 (NS+tap)、4% NaCl 食+生理食塩水 (HS+saline)、4% NaCl 食+生理食塩水 (HS+saline) を与えた際の経時的な各パラメーターの平均データ。
- b) それぞれの群の平均血圧分布。
- c) それぞれの群の心拍数分布。
- d) それぞれの群の RSNA 分布。
- e) a) で示した全時間平均データ (n=288) の心拍数 (bpm) と RSNA (μ Vs) の関係。

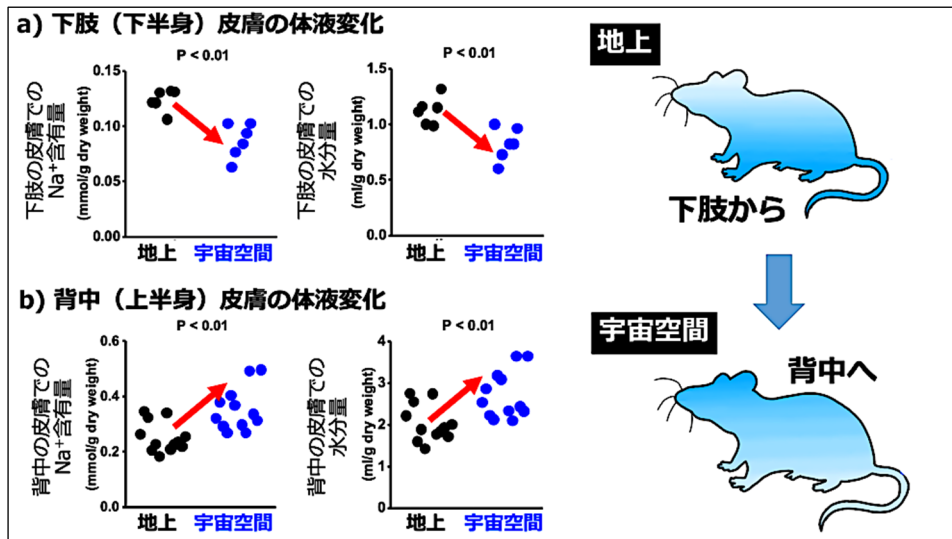


図2. マウスにおける重力変化に応じた体液移動 (n=6 and 12, respectively)

- a) 下肢の皮膚中のナトリウムイオン (Na^+) 含有量と水分量を示す。地上で飼育したマウスと宇宙空間の微小重力環境下で 34.6 日間飼育したマウスの組織を比較した。
- b) 同じマウスの背中の皮膚中のナトリウムイオン (Na^+) 含有量と水分量を示す。統計解析は IBM SPSS ソフトウェア (IBM Corp., Armonk, NY, USA) を使用し、two-tailed unpaired Student t-tests にて検定した。

3. 「夏眠様反応」制御法の探求

尿糖に伴って浸透圧利尿を生じる SGLT2 阻害薬を C57BL/6 マウス投与したところ、肝臓での尿素産生とアルギナーゼ活性化については有意差が見られなかったが、関連する代謝変化に変化が見られた。そこで、新たに実験条件や実験系を組み直し、現在、メタボローム解析などによるさらなる詳細な検証を実施中であるが、そのコンセプトについてはすでに公表している [6, 7]。一方、SD ラットにバゾプレッシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンを経口投与したところ、尿量は著明に増加したものの、その分、飲水量も増えて水分バランスは保たれ、肝臓での尿素産生とアルギナーゼ活性化には変化が認められなかった。すなわち、バゾプレッシン V2 受容体拮抗薬は夏眠用反応に影響を与えないものと考えられた [8]。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、香川大学医学部薬理学の北田研人助教、藤田医科大学解剖学Ⅱの高橋和男教授、神戸大学大学院保健学研究科の大崎博之准教授、DUKE-NUS 医学部 Cardiovascular and Metabolic Disease Programme の Jens M Titze 准教授である。

文 献

- 1) Kitada K, Daub S, Zhang Y, Klein JD, Nakano D, Pedchenko T, Lantier L, LaRocque LM, Marton A, Neubert P, Schröder A, Rakova N, Jantsch J, Dikalova AE, Dikalov SI, Harrison DG, Müller DN, Nishiyama A, Rauh M, Harris RC, Luft FC, Wassermann DH, Sands JM, Titze J. High salt intake reprioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation. *J Clin Invest*. 2017 May 1;127(5):1944-1959. doi: 10.1172/JCI88532.
- 2) Morisawa N, Kitada K, Fujisawa Y, Nakano D, Yamazaki D, Kobuchi S, Li L, Zhang Y, Morikawa T, Konishi Y, Yokoo T, Luft FC, Titze J, Nishiyama A. Renal sympathetic nerve activity regulates cardiovascular energy expenditure in rats fed high salt. *Hypertens Res*. 2020 Jun;43(6):482-491. doi: 10.1038/s41440-019-0389-1.
- 3) Kovarik JJ, Morisawa N, Wild J, Marton A, Takase-Minegishi K, Minegishi S, Daub S, Sands JM, Klein JD, Bailey JL, Kovalik JP, Rauh M, Karbach S, Hilgers KF, Luft F, Nishiyama A, Nakano D, Kitada K, Titze J. Adaptive physiological water conservation explains hypertension and muscle catabolism in experimental chronic renal failure. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021 May;232(1):e13629. doi: 10.1111/apha.13629.
- 4) Kidoguchi S, Kitada K, Nakajima K, Nakano D, Ohsaki H, Kittikulsuth W, Kobara H, Masaki T, Yokoo T, Takahashi K, Titze J, Nishiyama A. Hepatocellular carcinoma induces body mass loss in parallel with osmolyte and water retention in rats. *Life Sci*. 2022 Jan 15;289:120192. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120192.
- 5) Nishiyama A, Kitada K, Suzuki M. Blood pressure adaptation in vertebrates: Comparative biology. *Kidney Int*. 2022 Aug;102(2):242-247. doi: 10.1016/j.kint.2022.03.032.
- 6) Kitada K, Kidoguchi S, Nakano D, Nishiyama A. Sodium/glucose cotransporter 2 and renoprotection: From the perspective of energy regulation and water conservation. *J Pharmacol Sci*. 2021 Nov;147(3):245-250. doi: 10.1016/j.jphs.2021.07.006.
- 7) Marton A, Kaneko T, Kovalik JP, Yasui A, Nishiyama A, Kitada K, Titze J. Organ protection by SGLT2 inhibitors: role of metabolic energy and water conservation. *Nat Rev Nephrol*. 2021 Jan;17(1):65-77. doi: 10.1038/s41581-020-00350-x.
- 8) Kidoguchi S, Kitada K, Fujisawa Y, Nakano D, Yokoo T, Titze J, Nishiyama A. Tolvaptan induces body fluid loss and subsequent water conservation in normal rats. *J Pharmacol Sci*. 2022 Jul;149(3):115-123. doi: 10.1016/j.jphs.2022.04.008.