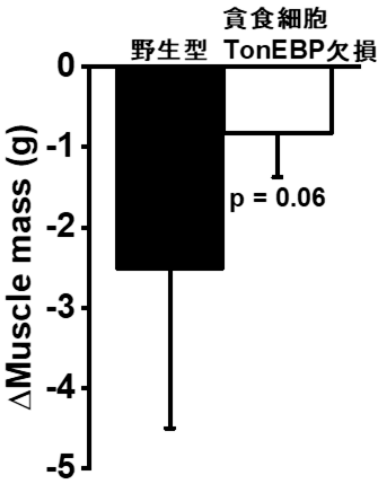
139　高食塩摂取に伴う筋委縮における単核貪食細胞の役割	北田　研人

【目的】現代の生活習慣や加齢に伴う筋肉量および筋力の低下（筋委縮）は、生活習慣病、代謝疾患、骨折、寝たきり、死亡などのリスクを上昇させ、生活の質（QOL）や健康寿命を低下させてしまうが、具体的な予防・治療法が存在しないのが現状である。筋萎縮に対する予防・治療法の開発が困難な理由のひとつとして、加齢や生活習慣の変化に伴い何故筋委縮が生じるのか、その詳細なメカニズムが明らかでないことがあげられる。我々は、腎臓に加えて肝臓や筋肉もナトリウムイオン（Na^+）・体液バランス調節に重要であり、高食塩摂取下で体液の恒常性を維持するためには、①浸透圧物質である尿素を利用した腎臓の水再吸収増加、②肝臓の尿素産生亢進、③尿素産生に必要なアミノ酸・エネルギーを供給するために筋肉の蛋白質異化（カタボリズム）が亢進し、筋肉量が減少することを発見した。本邦は、食塩摂取量が多い国のひとつであり、高食塩摂取による筋肉のカタボリズム亢進（筋肉量減少）は、加齢や現代の生活習慣に伴う筋委縮メカニズムの一因である可能性が考えられる。しかしながら、高食塩摂取に伴う筋肉量減少メカニズムは不明である。そこで本研究では、予備検討にて関与が疑われる単核貪食細胞／TonEBP に焦点を当て、高食塩摂取による筋肉量減少メカニズムを解明し、加齢や現代社会の生活習慣に伴う筋委縮機序の一端を明らかにすることを目的とした。将来的には本研究の成果を基盤とし、食塩の摂り過ぎや加齢による筋委縮に対する予防・治療法の開発へつなげ、ヒトの健康寿命延長を目指す。

【方法】単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウス（$LysM^{cre}TonEBP^{flox}$）およびその野生型マウス（$LysM^{wt}TonEBP^{flox}$）に対して、高食塩摂取による筋肉量減少を誘導した。本実験より、単核貪食細胞の TonEBP が欠損していると、高食塩食摂取に伴う筋肉量低下が抑制されるかを検証した。また、マウス培養マクロファージ（RAW 細胞）を用いて、単核貪食細胞／TonEBP による筋肉量制御メカニズムの探索も実施した。

【結果】野生型マウスに高食塩を 2 週間摂取させると、2.53±1.97 g の筋肉量減少が認められたが、単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスではその減少量が 0.83±0.54 g に抑制されていた（図）。また同マウスの筋肉組織を用いて RNA sequence を実施したところ、高食塩摂取に伴う筋肉量減少と関連する遺伝子として蛋白質 A を同定した。マウス培養マクロファージ（RAW 細胞）に対して高 NaCl 培地を処置すると、TonEBP 発現量の増加および蛋白質 A の発現量・分泌量の減少が認められた。また、高 NaCl 培地刺激によるこれらの変化は、TonEBP siRNA によって、完全に抑制された。以上の実験結果より、高食塩摂取に伴う筋肉量減少には、単核貪食細胞／TonEBP／蛋白質 A が関与している可能性が示唆された。

高食塩摂取 2 週間後における野生型および単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスの筋肉の減少量



139. 高食塩摂取に伴う筋萎縮における単核貪食細胞の役割

北田　研人

香川大学 医学部 薬理学

Key words：塩，体液，筋萎縮，単核貪食細胞，浸透圧

緒　言

本邦は超高齢化社会を迎え、単に寿命を延ばすのではなく、いかに健康寿命を延長させるかが緊急課題となっている。特に、現代の生活習慣や加齢に伴う筋肉量および筋力の低下（筋萎縮）は、生活習慣病、代謝疾患、骨折、寝たきり、死亡などのリスクを上昇させ、生活の質（QOL）や健康寿命を低下させてしまうが、具体的な予防・治療法が存在しないのが現状である。筋萎縮に対する予防・治療法の開発が困難な理由のひとつとして、加齢や生活習慣の変化に伴い何故筋萎縮が生じるのか、その詳細なメカニズムが明らかでないことがあげられる。

生体内のナトリウムイオン（Na^+）を主とする電解質および体液の恒常性維持は、生命維持の根幹である。従来、生体内のNa^+・体液量の恒常性は、主に腎臓によって維持されていると考えられてきた。これに対して我々は、腎臓に加えて肝臓や筋肉もNa^+・体液バランス調節に重要であり、高食塩摂取下で体液の恒常性を維持するためには、①浸透圧物質である尿素を利用した腎臓の水再吸収増加、②肝臓の尿素産生亢進、③尿素産生に必要なアミノ酸・エネルギーを供給するために筋肉の蛋白質異化（カタボリズム）が亢進し、筋肉量が減少することを発見した［1〜3］。本邦は、食塩摂取量が多い国のひとつである。よって、高食塩摂取による筋肉のカタボリズム亢進（筋肉量減少）は、加齢や現代の生活習慣に伴う筋萎縮メカニズムの一因である可能性が考えられる。しかしながら、高食塩摂取に伴う筋萎縮のメカニズムは未解明であり、具体的な予防・治療標的も不明である。

これまでの研究により、マウスに高食塩食を摂取させると各種臓器にNa^+が蓄積し、組織局所の浸透圧が亢進し、マクロファージを主とする単核貪食細胞などの免疫細胞において浸透圧ストレスが生じることが報告されている［4〜6］。また、この組織局所で上昇した浸透圧が単核貪食細胞の浸透圧応答性エンハンサー結合蛋白質（TonEBP）を活性化し、組織に蓄積したNa^+がリンパ管過形成により排泄されることも見出されている［4，5］。本研究では、高食塩摂取による筋肉量減少メカニズムの一端を解明するため、単核貪食細胞／TonEBP に焦点をあて以下の実験を行った。

方　法

1. 単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスを用いた検討

単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウス（$LysM^{cre}TonEBP^{flox}$）およびその野生型マウス（$LysM^{wt}TonEBP^{flox}$）に対して、通常食（0.3% NaCl）あるいは高食塩食を 2 週間摂取させ（4% NaCl＋生理食塩水飲水＋過食無し）、筋肉量測定（NMR）や筋肉量制御に関与する各種因子の解析（RNA-sequence、qRT-PCR および Western Blot）を実施した。これらの実験により、単核貪食細胞の TonEBP が欠損していると、高食塩食摂取に伴う筋肉量低下が抑制されるかを検証した。

2. 培養マクロファージを用いた検討

マウス培養マクロファージ（RAW 細胞）を用いて、単核貪食細胞／TonEBP による筋肉量制御メカニズムの探索を行った。RAW 細胞を通常培地あるいは高 NaCl 培地（＋40 mM）で培養し、筋肉量制御に関与する各種因子の解析を qRT-PCR、Western Blot、ELISA 法により実施した。また変化が見られた因子に対する TonEBP siRNA の影響も検討し、マクロファージが TonEBP を介して、筋肉量を制御する因子を発現および分泌しているかも検証した。

結果および考察

1. 単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスに対する高食塩摂取の影響

野生型マウス（$LysM^{wt}TonEBP^{flox}$）に高食塩を 2 週間摂取させると、2.53±1.97 g の筋肉量減少が認められた（図 1）。一方、単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウス（$LysM^{cre}TonEBP^{flox}$）においては、高食塩摂取による筋肉量減少は 0.83±0.54 g に抑制されていた（図 1）。また、筋肉の蛋白質の分解に関与するオートファジー関連マーカー（LC3、p62 など）も同様の結果であった。よって、高食塩摂取に伴う筋肉量減少メカニズムの一部には、単核貪食細胞／TonEBP が関与していることが考えられた。高食塩摂取により筋肉組織局所に Na^+が蓄積し、それが単核貪食細胞の TonEBP を活性化する可能性が考えられるため、現在、筋肉の Na^+含量解析、メタボローム解析、単核貪食細胞の TonEBP 活性解析を実施している。

高食塩摂取に伴う単核貪食細胞／TonEBP による筋肉量減少メカニズムのさらなる解明を行うため、上述で使用したマウスの筋肉組織を用いて RNA sequence を実施した。その結果、高食塩摂取に伴う筋肉量減少と関連する遺伝子として蛋白質 A を同定した。野生型マウスでは高食塩摂取により蛋白質 A が減少していたが、その減少が単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスでは抑制されていた。過去の文献において、蛋白質 A が筋肉量の増加を促す作用があることが報告されていることから、高食塩摂取は単核貪食細胞の蛋白質 A の発現および分泌を TonEBP 依存的に減少させ、その結果、筋肉量減少が惹起されている可能性が考えられた。

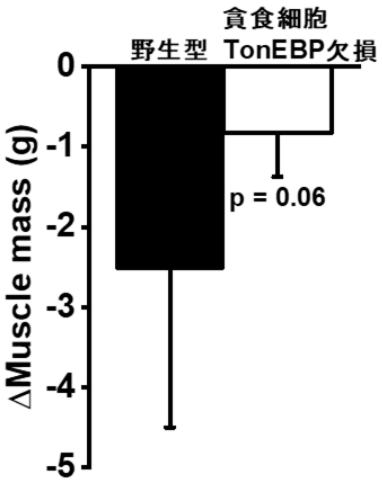


図 1. 高食塩摂取 2 週間後の筋肉の減少量
野生型マウスで認められる高食塩摂取に伴う筋肉量減少が、単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスでは抑制された（unpaired t-test、p＝0.06）。

2. 培養マクロファージに対する高 NaCl 濃度処置および TonEBP siRNA の影響

RAW 細胞に高 NaCl 培地（＋40 mM・24 時間）を処置すると、TonEBP 蛋白質発現量が増加した。一方、RAW 細胞に対する高 NaCl 培地の処置は、蛋白質 A の発現量および分泌量（培地中）の減少を引き起こした。TonEBP siRNA により TonEBP 発現量を抑制した状態で同様の実験を行ったところ、高 NaCl 培地による TonEBP 発現量の増加と蛋白質 A の発現量・分泌量減少が、両者とも TonEBP siRNA により抑制されることが明らかとなった（図 2）。よって、マクロファージが高 Na^+および高浸透圧ストレスにさらされると、TonEBP 依存的に蛋白質 A の発現量および分泌量が減少することが示唆された。

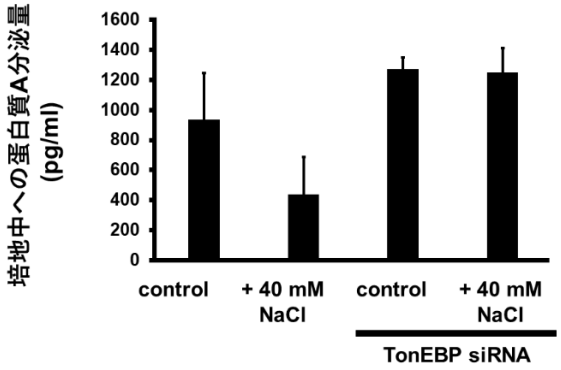


図 2. 高 NaCl 培地および TonEBP siRNA が蛋白質 A 分泌量に及ぼす影響
高 NaCl 培地は、マウス培養マクロファージ（RAW 細胞）の蛋白質 A 分泌量を減少させたが、その変化は TonEBP siRNA により抑制された。

以上の結果より、高食塩摂取に伴う筋肉量減少には、単核貪食細胞／TonEBP／蛋白質 A が関与している可能性が考えられた。今後は、本仮説を完全に証明するために、筋肉組織の Na^+含量測定およびメタボローム解析、筋マクロファージの TonEBP 活性解析、マクロファージの養子移植実験、単核貪食細胞特異的蛋白質 A 欠損マウスを用いた実験などを展開していく。

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西山成教授および藤田医科大学医学部解剖学Ⅱの高橋和男教授である。

文　献

1） Rakova N, Kitada K, Lerchl K, Dahlmann A, Birukov A, Daub S, Kopp C, Pedchenko T, Zhang Y, Beck L, Johannes B, Marton A, Müller DN, Rauh M, Luft FC, Titze J. Increased salt consumption induces body water conservation and decreases fluid intake. J Clin Invest. 2017 May 1;127(5):1932-1943. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28414302 DOI: 10.1172/JCI88530.

2） 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. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28414295 DOI: 10.1172/JCI88532

3） 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. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31932643 DOI: 10.1038/s41440-019-0389-1

4) Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, Park JK, Beck FX, Müller DN, Derer W, Goss J, Ziomber A, Dietsch P, Wagner H, van Rooijen N, Kurtz A, Hilgers KF, Alitalo K, Eckardt KU, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. Nat Med. 2009 May;15(5):545-52. Epub 2009 May 3. PMID: 19412173 DOI: 10.1038/nm.1960

5) Wiig H, Schröder A, Neuhofer W, Jantsch J, Kopp C, Karlsen TV, Boschmann M, Goss J, Bry M, Rakova N, Dahlmann A, Brenner S, Tenstad O, Nurmi H, Mervaala E, Wagner H, Beck FX, Müller DN, Kerjaschki D, Luft FC, Harrison DG, Alitalo K, Titze J. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. J Clin Invest. 2013 Jul;123(7):2803-15. Epub 2013 Jun 3. PMID: 23722907 DOI: 10.1172/JCI60113

6) Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schröder A, Kopp C, Siegert I, Maronna A, Wendelborn D, Linz P, Binger KJ, Gebhardt M, Heinig M, Neubert P, Fischer F, Teufel S, David JP, Neufert C, Cavallaro A, Rakova N, Küper C, Beck FX, Neuhofer W, Muller DN, Schuler G, Uder M, Bogdan C, Luft FC, Titze J. Cutaneous Na+ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. Cell Metab. 2015 Mar 3;21(3):493-501. PMID: 25738463 DOI: 10.1016/j.cmet.2015.02.003