

体液量制御に伴う夏眠反応の誘導メカニズムの解明

香川大学医学部薬理学
北田 研人

本研究の背景・目的：

体液量制御に伴う夏眠様反応誘導メカニズムを免疫細胞/TonEBPの視点から解明する

● 「夏眠」は、肺魚やカエルなどの生物が乾季（乾燥・脱水）を生き抜くために行う体液喪失に対する生体防御反応である。夏眠反応は、①肝臓-筋肉による体液保持のための浸透圧物質・尿素の産生増大および蓄積（エネルギー消費亢進）と、②生体内のエネルギー消費を抑制する交感神経活動抑制および心拍数低下、③皮膚や腎臓における体液喪失の抑制などを特徴とする（図1）。

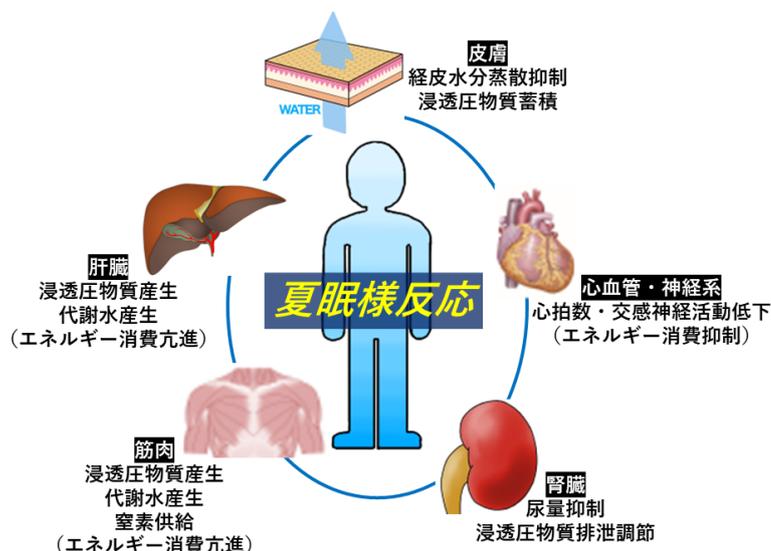


図1. 多臓器連携による体液保持:夏眠様反応の特徴

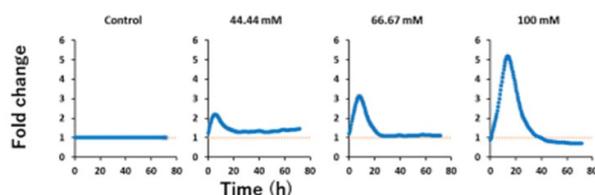
- 我々は、ヒトや齧歯類なども体液喪失下では、これら夏眠反応に類似した全身性の体液保持機構活性化（夏眠様反応）が生じることを報告している（*J Clin Invest* 2017;127:1932-1943, *J Clin Invest* 2017;127:1944-1959, *Hypertens Res* 2020;43:482-491, *Nat Rev Nephrol* 2021;17:65-77, *Acta Physiol (Oxf)* 2021;232:e13629）。
- 夏眠様反応は、体液喪失がトリガーとなって生じるが、その誘導メカニズムの詳細は不明である。体液喪失（脱水）は、組織や細胞中の水分量すなわち容積を減少させるため、組織・細胞中の様々な成分（溶質）が濃縮され、自ずと浸透圧物質（電解質や尿素など）を含む様々な溶質の濃度が増加する。よって、体液喪失は組織局所の浸透圧を上昇させている可能性が考えられる。一方、組織局所の浸透圧物質濃度が上昇すると、免疫細胞などの細胞は、浸透圧応答性エンハンサー結合蛋白質（TonEBP）の発現および機能を亢進させ、浸透圧物質濃度上昇に対して適応反応を起こすことが知られている（*J Clin Invest* 2013;123:2803-2815）。
- そこで本研究では、免疫細胞の浸透圧応答性エンハンサー結合蛋白質（TonEBP）に焦点を当て、夏眠様反応誘導メカニズムの解明を目的とした。

研究結果：

①体液喪失に伴う夏眠様反応誘導における各種組織のTonEBP活性化変化

- 体液喪失ストレス下では、各組織の浸透圧物質が濃縮され、組織局所の浸透圧上昇および免疫細胞のTonEBP活性化が生じていることを証明するために、我々はまず、浸透圧応答特異的に活性化されるTonEBPの遺伝子応答配列（osmotic response sequence: ORS）を同定した（未発表）。また、TonEBPによる本遺伝子応答の活性をルシフェラーゼ発光（ELuc）によりリアルタイムで可視化・測定できるORS-ELuc細胞およびマウスの作製にも成功した（図2、未発表）。
- ORS-ELucマウスを用いた実験により、高食塩摂取（ナトリウム利尿による体液喪失）や飲水制限により体液喪失ストレスおよびそれに伴う夏眠様反応の誘導を行うと、各種組織でルシフェラーゼ活性が上昇することが明らかとなった（未発表）。よって、体液喪失に伴い夏眠様反応の誘導が生じる際に、各種組織でTonEBP活性化が生じていることが示唆された。

培養細胞 TonEBP活性リアルタイム測定



マウス TonEBP活性イメージング

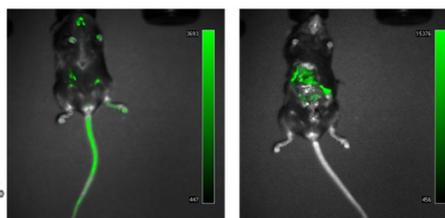


図2. TonEBP/浸透圧応答レポーターシステムの開発(ORS-ELuc細胞・マウス)

- また、最終的にTonEBP活性調節による夏眠様反応制御法を創出するために、ORS-Eluc細胞を用いて、天然化合物ライブラリーや阻害剤ライブラリーなどのスクリーニングを実施したその結果、TonEBP活性を制御する化合物X、化合物Yな複数の薬剤の同定に成功した(図3、未発表)。

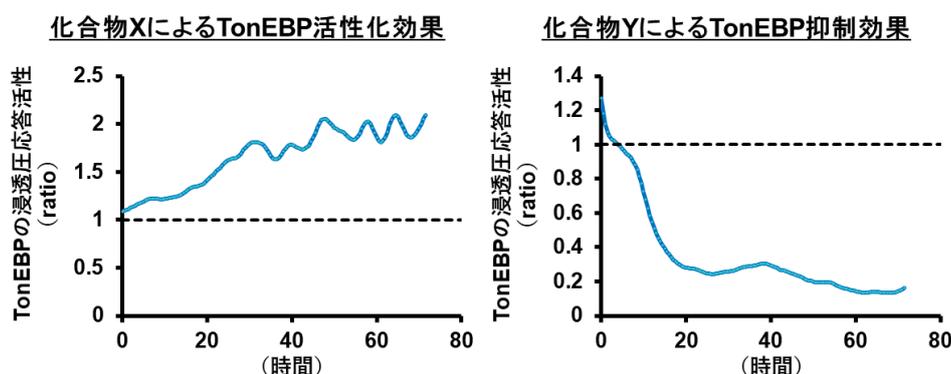


図3. 化合物Xや化合物YによるTonEBP活性制御(ORS-Eluc細胞による検討)

②体液喪失に伴う夏眠様反応誘導における各種免疫細胞/TonEBPの役割

単核貪食細胞(主にマクロファージ) 特異的TonEBP欠損マウス(LysM^{cre}TonEBP^{fllox})を用いた検討

- 単核貪食細胞特異的TonEBP欠損マウスに対して、高食塩摂取により夏眠様反応を誘導したところ、特に筋肉における蛋白質分解による窒素の供給、尿素産生亢進などの適応反応が消失することが明らかとなった(未発表)。一方、腎臓、肝臓などの適応反応に関しては、対照マウスとの差異は認められなかった(未発表)。
- 単核貪食細胞/TonEBPによる夏眠様反応制御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の代謝変化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(未発表)。
- 培養マクロファージ細胞に高食塩培地(+40 mM・24時間)を処置すると、TonEBP蛋白質発現量が増加するとともに、蛋白質Aの発現量および分泌量(培地中)の減少がみられた(未発表)。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、高食塩培地による蛋白質Aの発現量・分泌量減少が、TonEBP siRNAによって抑制された(未発表)。これらマウスおよび培養細胞の実験結果より、高食塩摂取に伴う夏眠様反応誘導の際に、特に筋肉の代謝変化には単核貪食細胞/TonEBP/蛋白質Aが関与している可能性が考えられた。
- さらに、単核貪食細胞特異的TonEBP欠損マウスでは、皮膚に過剰なナトリウム蓄積や血管収縮が生じており、皮膚における体液保持機構の異常により、高血圧が生じていることも明らかとなった。

T細胞特異的TonEBP欠損マウス(CD4^{cre}TonEBP^{fllox})を用いた検討

- T細胞特異的TonEBP欠損マウスに対して高食塩摂取による夏眠様反応を誘導したところ、腎臓における尿素による尿濃縮および尿量増加抑制作用に異常が生じること、また、体液喪失下で正常な心拍数を維持出来ないことが明らかとなった。これらの知見は、高食塩摂取に伴う夏眠様反応の誘導の際に、腎臓における体液喪失抑制や正常な心拍数の維持には、T細胞/TonEBPが重要な役割を果たしている可能性を示している。

B細胞特異的TonEBP欠損マウス (MB1^{cre}TonEBP^{fllox}) を用いた検討

- 対照マウスと比較して、B細胞特異的TonEBP欠損マウスでは、高食塩摂取（ナトリウム利尿）による体液喪失モデルにおいて、体内電解質含量および体液量異常が生じ、食塩感受性低血圧を呈することが明らかとなった。

考察と今後の課題:

- 各種免疫細胞特異的TonEBP欠損マウスを用いた実験より、体液喪失に伴う各臓器における体液保持機構の特徴が、各々の免疫細胞TonEBP欠損により一部消失することが明らかとなった。よって、体液喪失に伴う組織浸透圧の上昇と免疫細胞のTonEBP活性化が、夏眠様反応誘導の重要な因子のひとつである可能性が考えられた。
- マクロファージ、T細胞、B細胞のTonEBPを特異的に欠損させた際に認められる体液保持機構の変化は、それぞれの欠損マウスで異なっていた。よって、臓器ごとに別々の免疫細胞が夏眠様反応の制御を担っている可能性がある。具体的には、筋肉や皮膚においてはマクロファージが、腎臓や心血管・神経系においてはT細胞が夏眠様反応を制御している可能性が考えられる。B細胞特異的TonEBP欠損マウスで認められる体液量と血圧の異常に関しては、その詳細やメカニズムを現在も検討中である。そのため、どの臓器がB細胞の標的なのか等については、現時点では不明である。また、各種免疫細胞がTonEBPを介してどのように各臓器の体液保持能を制御しているのか、その詳細な分子メカニズムも不明であり、今後の検討が必要である。
- 上述の各種免疫細胞特異的TonEBP欠損マウスを用いた検討により、筋肉、皮膚、腎臓、心血管・神経系における体液保持機構の活性化は、免疫細胞/TonEBPにより制御されている可能性を示す知見が得られている。一方で、肝臓に関してはこれらの遺伝子改変マウスで表現型が得られていない。そこで、マウス培養肝細胞を用いて予備実験を行ったところ、肝臓に関しては免疫細胞を介さずに、高浸透圧が直接肝臓の体液保持機構活性化を誘導している可能性を示す知見が得られている。そこで今後の課題として、肝臓特異的TonEBP欠損マウスを用いた実験計画も本研究プロジェクトへ追加する。
- 応募者らが開発したTonEBP/浸透圧応答レポーターシステムにより、TonEBP活性制御を介して夏眠反応をコントロールする可能性をもつ化合物の同定に至ったが、これらの化合物が実際に生体レベルで有効か、毒性が無いかなどは現時点では不明であり、今後の重要な検討課題のひとつとして、現在動物実験を進めている。現在は、これらの薬剤をマウスに投与し、夏眠様反応を制御することが可能かどうかを検証している。