

高塩分摂取あるいは極端な減塩が制御性T細胞分化に及ぼす影響に関する研究

岡本 能弘

千葉科学大学薬学部

概要（背景） これまで塩分の過剰摂取あるいは欠乏が及ぼす生体影響について多くの研究がなされてきた。塩分過剰摂取と高血圧や胃癌との関連性は有名である。しかし、免疫機能に及ぼす塩分摂取の影響は十分に解明されていない。生体の免疫機能制御システムにおいて、制御性 T 細胞(Regulatory T cell, Treg)は、自己組織を攻撃する「自己反応性T細胞」の働きを抑制する役割を担っており、炎症起因性 Th17 細胞と拮抗し、過剰な炎症反応を制御する。この Treg 細胞はヒトでは正常個体末梢リンパ球中の約 10%を占めるとされ、免疫機能の恒常性維持にとって必要不可欠な細胞である。また、Treg 細胞の機能が低下したり、数が不足したりすることが、自己免疫疾患、アレルギー疾患などの場合の過剰な免疫反応の起こる一因とされている。本研究では塩分過剰摂取時の免疫機能変動について、Treg 細胞と Th17 細胞の分化過程やその機能に及ぼす影響の観点から解析し、さらに代表的な自己免疫疾患である関節リウマチの病態に及ぼす影響について動物実験モデルを用いて明らかにした。

（実験方法） 塩分過剰含有飼料は、塩化ナトリウム(NaCl, 和光純薬)を AIN-93G(オリエンタル酵母工業株式会社)に添加し、4%(w/w)飼料を調製した。塩分過剰摂取群には、塩分過剰含有飼料および飲水として 1% NaCl 溶液を自由摂取させた。関節リウマチ病態モデル動物を用いた実験では、DBA/1J(雌, 5 週齢)マウスにウシ II 型コラーゲン 100 µg/匹をフロント完全アジュバントとともに皮内投与し、さらに 3 週間後 II 型コラーゲン 100 µg/匹を皮内に投与することにより関節炎を誘導し、経時的に関節炎の重症度を評価した。健常マウスを用いた実験、病態モデルを用いた実験ともに Treg 細胞、および Th17 細胞の頻度およびサイトカイン産生について、フローサイトメーター、リアルタイム RT-PCR, ELISA を用いて解析した。

（結果および考察） 健常 C57BL/6J マウスに通常飼料、あるいは、塩分過剰食を 39 日間自由摂取させた。塩分過剰摂取条件であっても Treg 細胞の頻度、機能には大きな影響を及ぼさなかった。一方、Th17 細胞の頻度は、変化しないものの、有意に多量の IL-17 を産生した。Th17 細胞が抗原刺激に対する反応性が増していることが考えられる。この結果は、高塩分摂取状況下では、何らかの刺激が入ったとき炎症起因性サイトカインが産生されやすい状況になる可能性を示す。次に塩分過剰摂取条件下で飼育したマウスに、ウシ II 型コラーゲンを投与し、関節リウマチの発症を誘導した。塩分過剰摂取群は、対照群に比較し、関節炎の症状が悪化した。このとき、塩分過剰摂取群の IL-17 産生能は、通常食群に比較し、増加していた。また、Th17 細胞も増加傾向がみられた。一方、Treg 細胞には大きな影響がなかった。従って、塩分過剰摂取は、従来報告されていた多発性硬化症モデルだけでなく、コラーゲン関節炎モデルにおいても症状を悪化させることがわかった。また、その原因に Treg 細胞でなく、Th17 細胞の変化の関与が示唆された。

1. 背景

これまで塩分過剰摂取あるいは欠乏が及ぼす生体影響について多くの研究がなされてきた。塩分過剰摂取と高血圧や胃癌との関連性は有名である。一方、塩分の過

剰摂取を恐れるあまり塩分を控えることが常識となったため、極端な塩分の制限による塩分の不足も起こりうる。実際に腎不全患者などでは塩分摂取制限が長期に続くことが塩の欠乏症(脱水症状, 倦怠感)につながる事が知ら

れている。

最近、塩分摂取と免疫機能に関連して塩分過剰摂取により、炎症起因性のヘルパーT細胞 Th17 細胞分化が亢進し、インターロイキン17(IL-17)産生が増強され、中枢性自己免疫疾患である多発性硬化症が重症化することが動物実験により示された(Kleinweietfeld M. *et al.*, Nature 2013)。また生体において塩分濃度調節を司っているレニン-アンジオテンシン系をブロックすると多発性硬化症モデルマウスの発症率、重症度を高めることが知られている。このように塩分摂取状況が免疫系に影響を及ぼし、自己免疫疾患の発症を促進させること(Platten M. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009)がわかってきた。

免疫機能制御システムにおいて、制御性 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg 細胞)は、自己の組織を攻撃する「自己反応性T細胞」の働きを抑制する役割を担っており、前述の Th17 細胞と拮抗し、過剰な炎症反応を制御する。この Treg 細胞は、ヒトでは正常個体末梢リンパ球中の約10%を占めるとされ、正常な免疫機能の維持にとっては必要不可欠な細胞である。また、Treg 細胞の機能が低下したり、数が不足することが、自己免疫疾患、アレルギー疾患などで見られる過剰な免疫反応の起こる原因とされている(Sakaguchi, S. *et al.*, Science, 2007)。

本研究では塩分過剰摂取時の免疫機能変動について、Treg 細胞と Th17 細胞の数や、その機能の観点から解析する。さらに代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ病態モデル動物を使って塩分過剰摂取の病態に及ぼす影響について Treg 細胞と Th17 細胞機能の観点から解析する。

2. 実験方法

2.1 食塩含有飼料の調製と投与

食塩過剰含有飼料は、塩化ナトリウム(NaCl, 和光純薬)を AIN-93G(オリエンタル酵母工業株式会社)に添加した4%(w/w)飼料を調製した。粉末給餌器にて自由摂取させた。塩分過剰摂取群には食塩過剰含有飼料および1% NaCl 溶液を自由摂取させた。

2.2 塩分過剰摂取マウス

マウス(C57BL/6J 雌マウス,あるいは DBA/1J マウス雌マウス,日本エスエルシー)は、それぞれ、通常食群(C群)、塩分過剰摂取群(high salt diet, HSD 群)とし、通常

食群には粉末標準飼料 AIN-93G(オリエンタル酵母工業株式会社)と精製水を、HSD 投与群には4% NaCl 含有標準粉末飼料と1% NaCl 溶液を、それぞれ一定期間自由摂取させた。

2.3 マウスコラーゲン関節炎(Collagen Induced Arthritis, CIA)の誘導

DBA/1J マウスにウシII型コラーゲン 100 µg/匹をフロイント完全アジュバントとともに皮内投与(一次感作)し、さらに3週間後II型コラーゲン 100 µg/匹を皮内に投与(二次感作)することにより関節炎を誘導した。関節炎の発症・重症度はコラーゲン二次感作以降、経時的にその症状を Wood の評価法(Wood FD. *et al.*, Int Arch Allergy Appl Immunol, 1969)に従ってスコア化した。

2.4 フローサイトメーターによる Treg 細胞および Th17 細胞の分析

単細胞浮遊液を調製後、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、Treg 細胞解析には phycoerythrin(PE)標識抗マウス CD25 抗体(Beckman Coulter)/PE-Cy5 標識抗マウス CD4 抗体(Beckman Coulter)、そして、細胞内 foxp3 分子を PE-anti-forkhead box P3(Foxp3)抗体(アフィメトリクス・ジャパン株式会社)にて染色した。Th17 細胞解析には、PE-Cy5 標識抗マウス CD4 抗体そして、細胞内 ROR γ t 分子を PE 標識 ROR γ t 抗体(アフィメトリクス・ジャパン株式会社)にて染色した。フローサイトメリー装置 Epics ALTRA(Beckman Coulter)を用いて陽性細胞比率を測定した。なお、これら使用した標識抗体の細胞への非特異的な結合に対するコントロール(isotype control)として、FITC 標識ラット IgG2a/PE 標識ラット IgG1/PE-Cy5 標識ラット IgG1(Beckman Coulter)をそれぞれ反応させ同様に測定した。

2.5 リアルタイム RT-PCR による IL-17 mRNA 発現量の定量

細胞から全 RNA を抽出した。逆転写反応は ReverTra Ace(東洋紡ライフサイエンス社)を使用し、全 RNA(100 ng)を鋳型として oligo dT primer(50 pmol/µl)にて 1st strand cDNA 合成を行った。つづいて IL-17A の遺伝子発現量を IL-17A 特異的プライマー(FW:5'-CAGCAGCGATCATCCCTCAAAG-3', RV:5'-CAGGACCAGGATCTCTTGCTG-3'), KOD SYBR qPCR Mix(東洋紡ライフサイエンス)を用いて定量した。リアルタイム PCR 装置には、ABI PRISM 7500 Sequence

Detection System (アプライドバイオシステムズ)を用いた。各群の IL-17A mRNA 量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 量で補正した。

2. 6 サイトカイン産生の評価

各群のマウスから脾細胞浮遊液を調製し、培養上清中の IL-17 量,あるいは IL-10 量について,サンドイッチ ELISA 法 (R&D Systems 社製キット)にて測定した。

2. 7 統計学的解析

得られたデータは平均値±標準誤差で示した。統計学的有意差は, Kruskal-Wallis 多重比較検定法により行い,それぞれ危険率 5%で評価した。

3. 結果および考察

3. 1 塩分過剰摂取による健康マウス Th17, Treg 細胞の変動

(1) 体重増加に及ぼす塩分摂取の影響

健康な C57BL/6J マウス(雌, 5 週齢)に通常飼料(通常食群, standard diet), あるいは, 4% NaCl 含有飼料および 1% NaCl 溶液(塩分過剰食群, HSD)を 39 日間自由摂取させた。HSD 群は, 通常食群に比較し, 体重増加が抑制された(**Fig. 1**)。一般的にヒトでは塩分摂取過剰により, 体内水分保持が増え体重増加すると考えられるが, マウスでは, 逆に低下する。この結果は, 最近報告された Benjamin Jらの報告(Scientific report, 2015)に一致する。彼らはマウスの体内への脂肪吸収が食事中ナトリウムにより抑制されと述べている。

(2) Treg 細胞, Th17 細胞頻度に及ぼす塩分過剰摂取の影響

マウスの脾細胞中の Treg 細胞の表現型をもつ細胞, すなわち Treg 細胞マスター転写因子である Foxp3⁺細胞, あるいは CD25⁺CD4⁺細胞の頻度は, 塩分過剰摂取により増加傾向がみられた(**Fig 2(a)**および**(b)**)が, 統計学的に

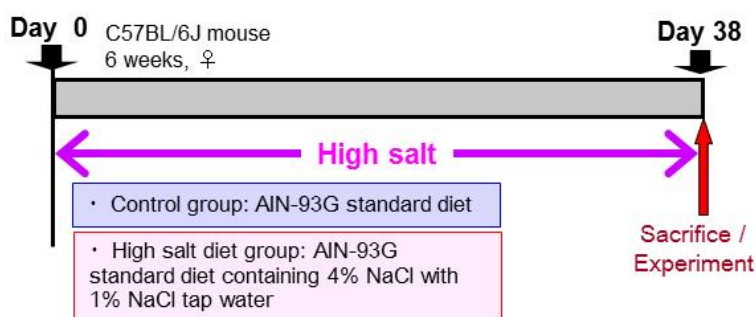


Fig.1. Effect of HSD on healthy mice.

C57BL/6J female mice were fed the control diet (AIN93G) or the high salt diet (AIN93G containing 4% NaCl) from Day 0 until Day 38.

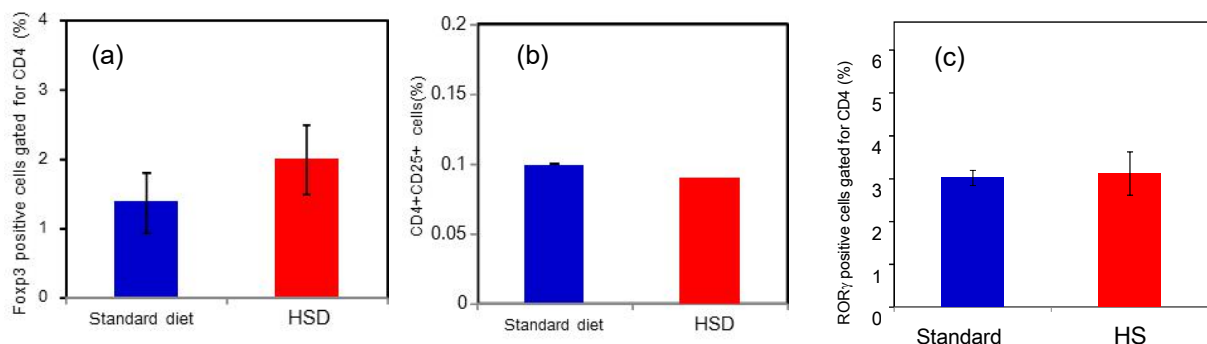
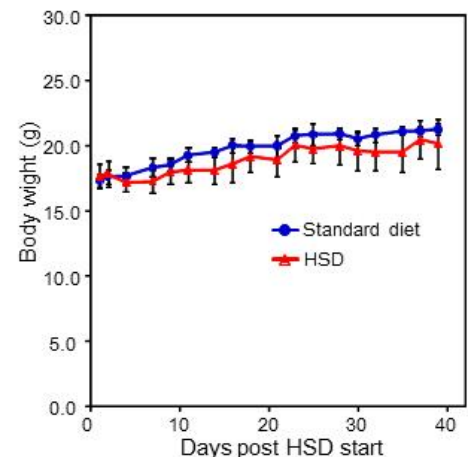


Fig.2. Effect of HSD on the frequency of Treg cells and Th17 cells in healthy mice.

Splenocytes from each group of mice were stained with PE/Cy5-anti CD4 and PE-anti Foxp3 (a), or FITC-CD25 (b), or PE-ROR γ (c). Samples were acquired on EPICS. The result was expressed in mean of duplicate \pm SD.

は有意差がなかった。一方, Treg の機能的に拮抗する Th17 細胞 (ROR γ T陽性細胞) 数もまた, 変動がなかった (Fig. 2(c))。

また, 脾細胞中の T 細胞を CD3 抗体, および CD28 抗体で刺激活性化し, 培養上清中に分泌されたサイトカイン, すなわち Treg 細胞の産生する IL-10, Th17 細胞の産生する IL-17 について ELISA 法にて測定した。その結果, IL-10 の産生量については, 変化はなかった (Fig. 3(a))。この結果から塩分過剰摂取によって Treg 細胞頻度に増加傾向はみられたものの, Treg 細胞の免疫制御作用の一端を担う IL-10 産生能には変化はなかった。Treg 細胞の免疫制御機能に関わるサイトカイン TGF- β や細胞表面の CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) 分子の発現などについても今後さらに精査する必要があるが, 高塩分摂取条件であっても Treg 細胞の頻度, その機能には大きな影響を及ぼさないようである。一方, Th17 細胞は, 有意に多量の IL-17 を産生した (Fig. 3(b))。Th17 細胞頻度は大きく変化しないものの, 抗原刺激に対する反応性が増す。この結果は, 高塩分摂取状況では, 何らかの刺激が入ったとき炎症起因性サイトカインが産生されやすい状況におかれていると考えられた。

3. 2 塩分過剰摂取が関節リウマチ病態へ及ぼす影響

関節リウマチは, 我が国で最も患者数の多い自己免疫疾患であり, その病態形成に Th17 細胞, 及び, Treg 細胞

の関与が考えられている。本研究では, 関節リウマチの病態モデルの一つであるコラーゲン誘導関節炎マウスを用いて塩分過剰摂取の影響を検討した。

(1) 関節炎の重症度に及ぼす塩分過剰摂取の影響

高塩分含有飼料投与開始2週間後に II 型コラーゲンを皮内投与し, 関節炎を誘導した (Fig. 4)。塩分過剰摂取 (HSD) 群は通常飼料群に比較し, 実験期間を通して体重増加の抑制傾向が観察された (Fig. 4)。この結果は, 健康

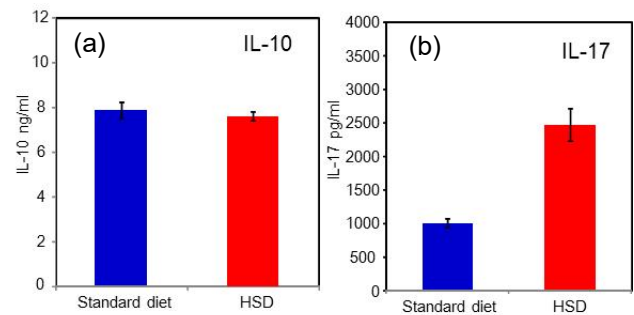


Fig. 3. Effect of HSD on the production of IL-10 and IL-17 in healthy mice

The splenocytes of mice were stimulated with anti-CD3/CD28 mAb for 48 h. The concentrations of IL-10(a) and IL-17(b) in the culture supernatants were measured by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SD of four experiments.

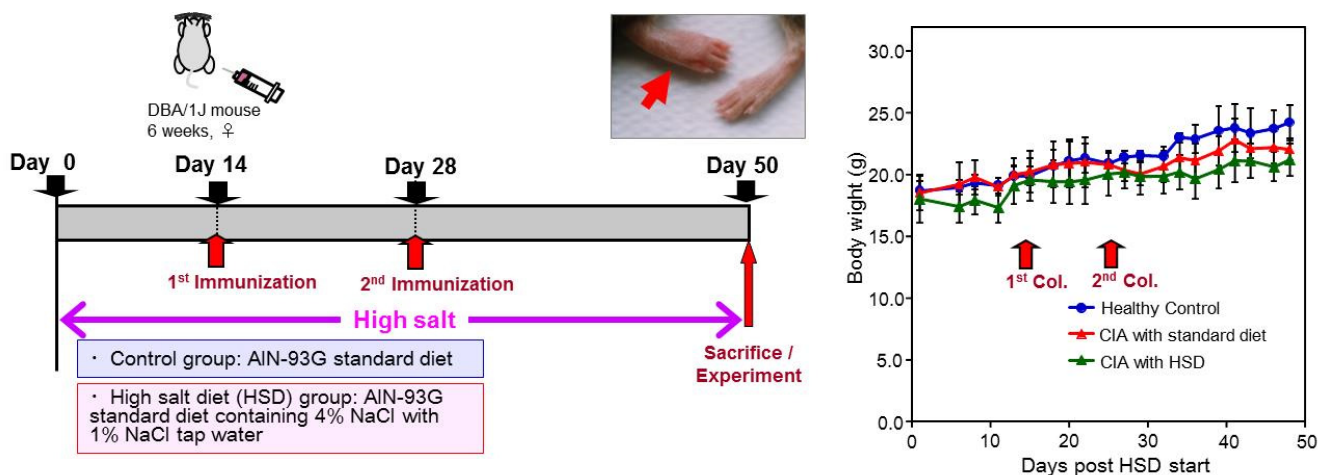


Fig.4. Effect of HSD on collagen induced arthritis mice: experimental protocol

DBA/1J female mice were fed the control diet (AIN93G) or the high salt diet containing 4% NaCl from Day 0 until Day 50. For induction of experimental arthritis, Native bovine type II collagen (BCII) was emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA). The mice had 100 μ g BCII in CFA injected intradermally into their right foot paw. A booster injection containing 100 μ g emulsified BCII in incomplete Freund's adjuvant (IFA) was given subcutaneously to the base of the tail on Day 21 after the first immunization (Courtenay, *et al.*, 1980).

マウスを用いた実験結果(**Fig. 1**)と一致する。関節炎の重症度をスコア化(**Fig. 5(b)**)、さらに、マウス足踵の肥厚度(**Fig. 5(c)**)を評価した(実験開始後 49 日目)。これらの結果は、HSD 群で有意に重症度が高かった。病態モデル動物実験ではあるが、塩分の過剰摂取が関節炎の症状悪化を引き起こすことを今回初めてあきらかにすることができた。今後、ヒトにおいても同様に塩分摂取量と関節リウマチ重症度に関連性が見られるのか興味深い。今後の疫学研究に期待される。

(2) 食塩過剰摂取が CIA マウスのサイトカイン産生に及ぼす影響

関節リウマチの病態形成には Th17 細胞およびこの細胞が産生する IL-17 が関与していることが報告されてい

る。実験開始 50 日目にマウスを安楽死させ、Th17 細胞とその機能を抑制する機能を担う Treg 細胞頻度についてフローサイトメーターで解析した。Treg 細胞および Th17 細胞($CD4^+ROR\gamma^+$)頻度に増加傾向がみられた(**Fig. 6**)。定常状態マウスでは、高塩分摂取時に Th17 細胞頻度増加は、見られなかったが、病態モデルでは増加した。この結果は、高塩分摂取状態がナイーブ $CD4^+$ T 細胞を Th17 細胞分化の方向へプライミングし、そこに刺激が入ったときに Th17 細胞に分化が促進する可能性が考えられる。また、その時の IL-17mRNA 発現量、IL-17 産生量は、関節炎誘導で増加し、塩分過剰摂取でさらに増加していた(**Fig. 7**)。

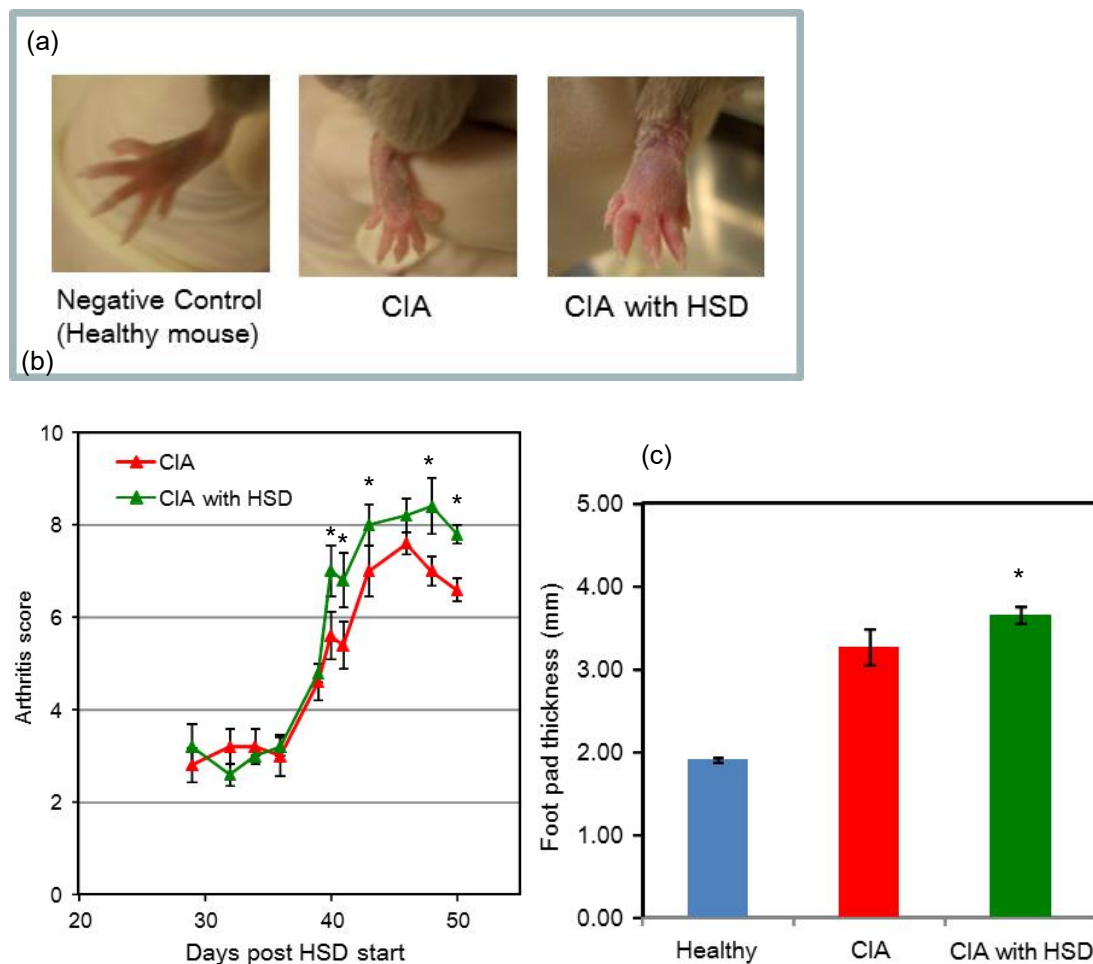


Fig.5. Effect of HSD on collagen induced arthritis mice:

Arthritis scores were assigned according to Wood's assessment (Wood, *et al.*, 1969). All paws were graded from 0 to 4 points. The mice were killed on Day 50 to assess their cytokine production. (a) representative pictures of footpad, (b) arthritis scores and (c) footpad thickness. Data are expressed as the mean \pm SE of five mice. * $p < 0.05$ vs CIA group.

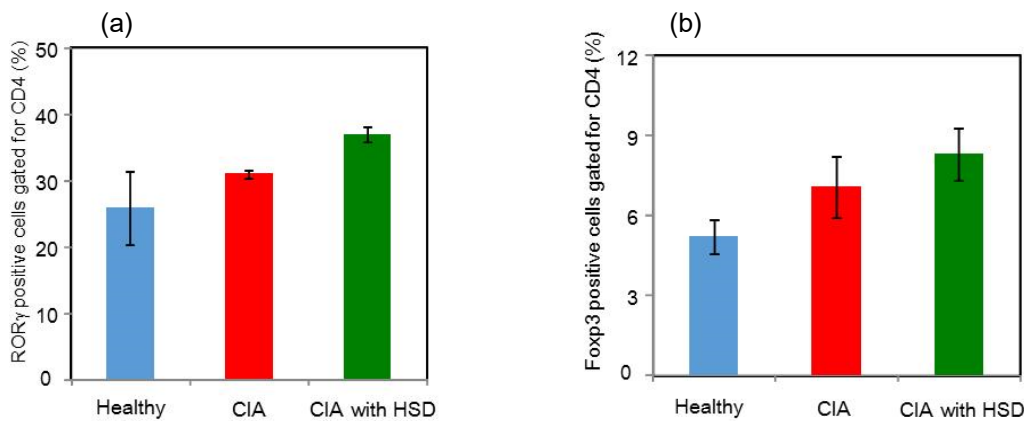


Fig. 6. Effect of HSD on the frequency of Treg cells and Th17 cells in CIA mice

Splenocytes from each group of mice were stained with PE/Cy5-anti CD4 and PE-anti Foxp3 (a), or PE-ROR γ (b). Samples were acquired on EPICS. The result was expressed in mean of duplicate \pm SD.

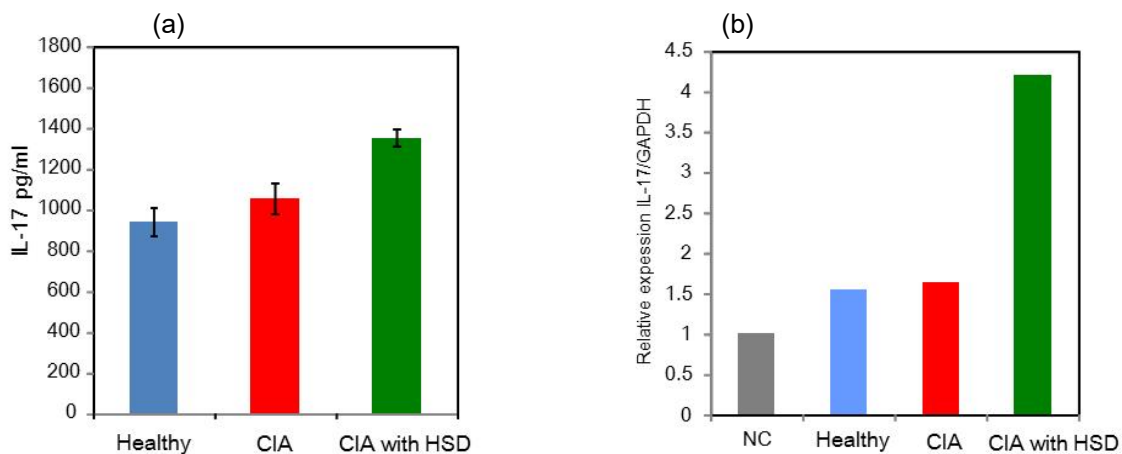


Fig. 7. Effect of HSD on the production of IL-17 in CIA mice

(a) The splenocytes of mice were stimulated with anti- CD3/CD28 mAb for 48 h. The concentrations of IL-17A in the culture supernatants were measured by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SD of five cultures.

(b) mRNA expression of cytokines in spleen cells.

The splenocytes were stimulated with anti- CD3/CD28 mAb for 48 h. Total RNA was isolated and reverse transcribed to cDNA. Real-time PCR was used to analyze IL-17A gene expression in the spleen cells. Data are expressed as the mean \pm SD of two reactions. NC; negative control (without stimulation)

4. 結論

塩分過剰摂取により、Treg 細胞の数、および機能に大きな変化はなかった。塩分過剰時に炎症性疾患である関節リウマチモデルを発症させた場合も、Treg 細胞は量的、質的に大きな変化は無かった。一方、炎症起因性 Th17 細胞は、塩分過剰摂取に伴い、数に変動はないが、刺激に伴い、多量の IL-17 を産生するようになる。さらに塩分過剰摂取は、対照群に比較し、コラーゲン誘導関節炎の症

状を悪化させた。このとき、塩分過剰摂取群脾臓細胞の IL-17 産生能は、通常食群に比較し、増加していた。また、Th17 細胞 (CD4+ROR γ t+) も増加傾向がみられた。従って、塩分過剰摂取は、従来報告されていた多発性硬化症モデルだけでなく、関節リウマチモデルにおいても症状を悪化させることがわかった。また、その原因に Th17 の関与が示唆された。

Effect of High-Salt and Low-Salt Conditions on Differentiation of Regulatory T cells

Yoshihiro Okamoto

Chiba Institute of Science

Summary

Autoimmune inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), have been previously thought to be mediated by the proinflammatory cytokine interleukin 17 (IL-17). The population of IL-17 producing CD4⁺ helper T cells (Th17 cells) plays a pivotal role in autoimmune inflammatory diseases. A second CD4⁺ T lymphocyte subset, termed regulatory T (Treg) cells, is essential for dominant immunologic tolerance. Treg cells have been shown to suppress immune effector cells by a variety of cell contact dependent and independent mechanisms. These include the production of cytokines such as an anti-inflammatory cytokine IL-10, sequestration of cytokines essential for cell growth such and IL-2, surface expression of the immunosuppressive molecule cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), and utilization of the perforin-granzyme pathway to kill activated targets or tumor cells. However, little is known regarding the dietary factors that directly influence Th17 cells or Treg cells. Kleinweietfeld M. *et al.* reported that increased salt (sodium chloride; NaCl) concentrations found locally under physiological conditions *in vivo* dramatically boost the induction of murine and human Th17 cells (Kleinweietfeld M. *et al.*, Nature 2013). In the present study, we examined the effect of increased salt concentrations on the Treg cell differentiation and the function. Furthermore, we investigated the effect of high salt condition on Th17 and Treg cells in collagen induced arthritis (CIA) mice, an experimental model animal of rheumatoid arthritis.

Healthy DBA/1J or C57BL/6j female mice were fed the standard diet (AIN93G) or the high salt diet (AIN93G containing 4% NaCl, HSD) from Day 0 until Day 50. HSD did not affect the frequency of Treg cells and Th17 cells in mice. The IL-10 production from Treg cells in mice with HSD also did not changed. However, the production of IL-17 from Th17 cells in mice with HSD increased. Furthermore, HSD results in the acceleration of the severity of experimental arthritis model (CIA). The frequency of Th17 cells and the IL-17 production also increased in CIA mice with HSD. On the other hand, HSD did not affect the Treg cells frequency and the function in CIA mice.

Here we show that increased diet salt concentrations found under physiological conditions *in vivo* dramatically boost the induction of Th17 cells but not Treg cells in experimental rheumatoid arthritis model animal.