
助成研究報告書

医学プロジェクト研究

(2022 - 2024年度)

適切な塩分摂取で挑む超高齢社会

Tackling the Super-Aged Society with Appropriate Salt Intake

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

2026年3月



公益財団法人
ソルト・サイエンス研究財団

プロジェクト研究報告書 目次

医学分野

22C-24C

適切な塩分摂取で挑む超高齢社会

1	まえがき 森田 啓之（東海学院大学）	1
2	低ナトリウム血症による筋・骨関連フレイル病態に関する研究 （22C1-24C1） 梶 博史（近畿大学）	5
3	慢性低ナトリウム血症による精神症状のメカニズムの解明とその治療法の開発 （22C2-24C2） 藤沢 治樹（藤田医科大学）	21
4	塩分摂取が神経-免疫系を介する誤嚥性肺炎の軽減効果に与える影響の解明 （22C3-24C3） 安部 力（岐阜大学）	43
5	食塩摂取量と口腔常在微生物叢および口腔の健康との関連についての疫学的検討 （22C4-24C4） 竹下 徹（九州大学）	55
6	神経系-免疫系を介した塩分感受性高血圧制御メカニズムの解明 （22C5-24C5） 井上 剛（長崎大学）	71

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES OF MEDICAL SCIENCE

22C – 24C

Studies on “Tackling the Super-Aged Society with Appropriate Salt Intake”

1	Introduction Hironobu Morita (Tokai Gakuin University)	3
2	Study on Muscle and Bone-Related Frailty Induced by Hyponatremia (22C1 – 24C1) Hiroshi Kaji (Kindai University)	20
3	Elucidating the Mechanisms of Chronic Hyponatremia-Induced Psychosis and Development of Its Treatment (22C2– 24C2) Haruki Fujisawa (Fujita Health University)	42
4	The Effect of Daily Salt Intake on Protection from Aspiration Pneumonia via Neuro-Immune System (22C3– 24C3) Chikara Abe (Gifu University)	53
5	Relationship between Salt Intake and Oral Microbiota and Health Conditions (22C4 – 24C4) Toru Takeshita (Kyushu University)	70
6	Elucidation of the Regulatory Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension through the Nervous System-Immune System (22C5 – 24C5) Tsuyoshi Inoue (Nagasaki University)	83

まえがき

森田 啓之

プロジェクトリーダー
東海学院大学 教授

我が国の平均寿命は女性 87.13 歳, 男性 81.09 歳, 65 歳以上の高齢者人口は 29.3%で, とともにトップレベルの超高齢社会である(厚生労働省, 総務省・統計局 2024 年)。一方, 自立した生活を送れない期間を指す「平均寿命と健康寿命の差(不健康期間)」は 9~12 年であり, 超高齢社会のわが国において, 健康寿命を延ばし, この差をいかにして縮めるかが大きな課題となっている。

健康寿命を延ばすために克服しなければならない疾患・病態として, フレイル(心身虚弱状態), サルコペニア(加齢性筋量・筋力減少症), 骨粗鬆症, 認知症, 心不全, 脳卒中, 生活習慣病, 慢性腎臓病, 嚥下障害・誤嚥性肺炎, 歯・口腔疾患・・・などがあげられ, そのうちいくつかは, 食塩摂取との関連性が示唆されている。特に, 高血圧をはじめとする生活習慣病と食塩摂取の関係はよく研究されており, これまで本財団の助成研究でも数多く取り上げられてきた。また最近, 塩分摂取とフレイルや食欲・嚥下機能などに関する知見も散見される。

いうまでもなく, 塩分は, 体液維持や興奮性調節に関与する人体に必須の栄養素である。自力で栄養を摂取し, 身体活動を維持し, 自立した生活を送るうえで, 塩分を制限するだけではなく塩分を適切に摂取することは, 健康寿命延長のためにも重要である。しかし, 減塩指導以外の適切な塩分摂取量のエビデンスは存在しない。健康寿命延長に貢献する「適切な塩分摂取」を提言するための基礎的エビデンス構築を目的として, 2022-2024 年度の医学分野プロジェクト研究「適切な塩分で挑む超高齢社会」を企画し, 以下の 3 つのサブテーマからなる 5 研究課題を採択した。

✓ サブテーマ 1:

塩分バランスの変化とフレイルに関する研究

- ・22C1~24C1; 低ナトリウム血症による筋・骨関連フレイル病態に関する研究
- ・22C2~24C2; 慢性低ナトリウム血症による精神症状のメカニズムの解明とその治療法の開発

✓ サブテーマ 2:

塩分摂取と歯・口腔内の健康および摂食・嚥下機能に関する研究

- ・22C3~24C3; 塩分摂取が神経-免疫系を介する誤嚥性肺炎の軽減効果に与える影響の解明
- ・22C4~24C4; 食塩摂取量と口腔常在微生物叢および口腔の健康との関連についての疫学的検討

✓ サブテーマ 3:

塩分摂取と自律神経制御・腎機能に関する研究

- ・22C5~24C5; 神経系-免疫系を介した塩分感受性高血圧制御メカニズムの解明

3 年間の研究によって, いくつかの重要な知見が見いだされた。

サブテーマ 1: 慢性低 Na 血症モデル動物を用い, 塩分バランス異常がフレイル, サルコペニア, 骨粗鬆症に及ぼす影響を検討し, 低 Na 血症では, 筋量・筋力低下, 骨量減少, 不安様行動増強などがみられることが確認できた。これらの症状は塩分補充により回復した。さらに, 高齢者の臨床データを用いた疫学的検討では, 低および高 Na

血症両方がフレイルの重症度と関連していることが明らかになった。低 Na 血症は高齢者でみられる電解質異常の中でも最も頻度が高い状態であり、これらの成果は高齢者の適正な食塩摂取量を考慮する際の重要なエビデンスとなると期待できる。

サブテーマ 2: 口腔内健康および誤嚥性肺炎と塩分摂取量の関係を、疫学のおよびモデルマウスにて検討した。40～79 歳の疫学的検討では、食塩摂取量が口腔健康状態に及ぼす影響には男女差があることが分かった。男性では塩分摂取量が多いほど健康関連常在細菌群比率が低く、う蝕関連細菌群および歯周病関連細菌群の構成比率が高くなり、現在歯数が有意に少なくなったが、女性ではこのような関連は認められなかった。培養口腔微生物叢を用いた誤嚥性肺炎モデルマウスでは、塩分摂取増加により肺炎症状が増悪することが分かった。歯の喪失防止、健康な口腔の維持および誤嚥性肺炎予防は健康寿命の延伸において重要であり、これらの成果は歯科保健指導や栄養指導を行ううえで重要なエビデンスになると期待できる。

サブテーマ 3: 慢性的な塩分過剰摂取により病態が悪化することが知られている 2 つの病態、高血圧症と慢性腎臓病の関連と発症メカニズムの解明を目指した。塩分感受性高血圧モデルマウスでは、腎臓におけるマクロファージが増加し、腎臓の線維化が進展した。また、マクロファージを除去することで、高血圧および腎臓線維化が抑制された。さらに、マクロファージ特異的にアセチルコリン受容体 X を欠損させたマウスにおいては高血圧誘導が抑制されたことから、神経系－免疫系による高血圧発症という新たな視点を提供した。高血圧症と慢性腎臓病の病態理解と治療戦略への重要な提言となることが期待できる

Studies on “Tackling the Super-Aged Society with Appropriate Salt Intake”

Introduction

Hironobu Morita, MD & PhD

Project Leader

Tokai-Gakuin University

Japan's average life expectancy is 87.13 years for women and 81.09 years for men, with 29.3% of the population aged 65 or older, making it one of the world's most super-aged societies (Ministry of Health, Labor and Welfare, Statistics Bureau, Ministry of Internal Affairs and Communications, 2024). Meanwhile, the "gap between average life expectancy and healthy life expectancy (period of ill health)," referring to the period during which a person is unable to live independently, is 9 to 12 years. In this super-aged society, extending healthy life expectancy and narrowing this gap is a major challenge.

Diseases and conditions that must be overcome to extend healthy lifespans include frailty (a state of physical and mental weakness), sarcopenia (age-related muscle mass and muscle strength loss), osteoporosis, dementia, heart failure, stroke, lifestyle-related diseases, chronic kidney disease, swallowing disorders/aspiration pneumonia, dental and oral diseases, and more, some of which have been suggested to be related to salt intake. In particular, the relationship between lifestyle-related diseases such as hypertension and salt intake has been well studied and has been the subject of many research projects funded by our foundation. Recently, there has also been some evidence relating salt intake to frailty, appetite, swallowing function, and other conditions.

Needless to say, salt is an essential nutrient for the human body, involved in maintaining body fluids and regulating excitability. In order to obtain nutrition on one's own, maintain physical activity, and live an independent life, it is important not only to limit salt intake but also to consume it appropriately, which also leads to a longer healthy life expectancy. However, there is no evidence regarding appropriate salt intake other than advice to reduce salt intake. Therefore, with the aim of building basic evidence to propose "appropriate salt intake" that contributes to extending healthy lifespan, we have planned a medical project research project for 2022-2024 titled "Tackling the super-aging society with appropriate salt intake," and have selected five research topics consisting of the following three sub-themes.

- ✓ Subtheme 1: Research on changes in salt balance and frailty
22C1-24C1; Study on Muscle and Bone-Related Frailty Induced by Hyponatremia.
22C2-24C2; Elucidating the Mechanisms of Chronic Hyponatremia-Induced Psychosis and Development of Its Treatment.
- ✓ Subtheme 2: Research on salt intake, dental/oral health, and eating/swallowing function.
22C3-24C3; The Effect of Daily Salt Intake on Protection from Aspiration Pneumonia via Neuro-Immune System.
22C4-24C4; Relationship between Salt Intake and Oral Microbiota and Health Conditions.
- ✓ Subtheme 3: Research on salt intake, autonomic nervous system control, and renal function.
22C5-24C5; Elucidation of the Regulatory Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension through the Nervous System-Immune System.

Three years of research have yielded several important findings.

Subtheme 1: Using an animal model of chronic hyponatremia, the effects of salt imbalance on frailty, sarcopenia, and osteoporosis were examined, and confirmed that hyponatremia is associated with decreased muscle mass and strength, bone loss, and increased anxiety-like behavior. These symptoms were reversed by salt supplementation. Furthermore, an epidemiological study using clinical data from elderly individuals revealed that both hypo- and hypernatremia are associated with the severity of frailty. Hyponatremia is the most common electrolyte abnormality observed in the elderly, and these results are expected to provide important evidence for considering appropriate salt intake in the elderly.

Subtheme 2: The relationship between oral health, aspiration pneumonia, and salt intake was examined epidemiologically and using a mouse model. An epidemiological study of individuals aged 40 to 79 years revealed gender differences in the impact of salt intake on oral health. In men, higher salt intake was associated with lower proportions of health-related resident bacteria, higher proportions of caries-related and periodontal disease-related bacteria, and significantly fewer present teeth. However, no such association was observed in women. In a mouse model of aspiration pneumonia using cultured oral microbiota, increased salt intake was found to exacerbate pneumonia symptoms. Preventing tooth loss, maintaining a healthy oral cavity, and preventing aspiration pneumonia are important for extending healthy lifespan. These findings are expected to provide important evidence for dental health and nutritional guidance.

Subtheme 3: This study aimed to elucidate the relationship and pathogenesis of two conditions known to be exacerbated by chronic excessive salt intake: hypertension and chronic kidney disease. In a mouse model of salt-sensitive hypertension, kidney macrophages increased and renal fibrosis progressed. Furthermore, macrophage ablation suppressed hypertension and renal fibrosis. Furthermore, mice with a macrophage-specific deletion of acetylcholine receptor X suppressed hypertension induction, providing a new insight into the nervous-immune mechanism of hypertension development. It is expected that this will provide important insights into the pathology and treatment strategies for hypertension and chronic kidney disease.

低ナトリウム血症による筋・骨関連フレイル病態に関する研究

梶 博史, 河尾 直之

近畿大学医学部再生機能医学教室

概要 低ナトリウム(Na)血症は、骨粗鬆症、サルコペニア、フレイルと関連するが、その分子機序は未だ詳細に検討されていない。近年、サルコペニアと骨粗鬆症の関連から、筋・骨連関が注目されている。しかしながら、低Na血症が骨格筋、骨および筋・骨連関におよぼす影響は不明である。本研究では、マウスを用いて、低Na血症が骨格筋と骨代謝の指標および骨代謝に影響をおよぼすマイオカイン発現と、低Na血症の筋と骨への負の作用に対する塩分投与の効果を検討した。

9週齢の雄マウスに、抗利尿剤であるデスマプレシン(dDAVP)を0.5 ng/hrの用量で8週間投与した。利尿剤であるフロセミドをマウス皮下に250 mg/kgの用量で1週間あたり5回の頻度で8週間投与した。塩分投与群は1% NaCl溶液を飲水させて飼育した。

dDAVPは四肢握力を減少させたが、腓腹筋・ヒラメ筋重量に影響をおよぼさなかった。フロセミドは全身筋量、腓腹筋・ヒラメ筋重量、四肢握力を有意に減少させた。dDAVPおよびフロセミドは、大腿骨の海綿骨骨量、海面骨骨密度、骨梁幅および皮質骨骨密度を減少させた。腓腹筋とヒラメ筋において、骨代謝に影響するマイオカインの発現を検討したところ、dDAVPおよびフロセミドはIGF-1の発現を減少させた。さらに、dDAVPおよびフロセミドは血中IGF-1濃度を減少させた。また、低Na血症によるこれらの効果は塩分投与によって回復した。次に、腓腹筋とヒラメ筋のRNAシーケンス解析を行い、低Na血症により発現が減少する液性因子としてDel-1を抽出した。初代培養マウス筋管細胞において、低Na刺激はDel-1の発現を減少させた。マウス骨芽細胞において、Del-1は骨分化に関連するアルカリホスファターゼとオステオカルシンの発現を増加させた。実験に用いたマウスの単相関分析により、海綿骨骨量および皮質骨骨密度は、血中IGF-1、腓腹筋IGF-1およびDel-1発現と有意な正相関を示した。

以上の結果より、マウスにおいて、骨格筋でのIGF-1およびDel-1発現低下が、低Na血症による骨量減少に寄与することが示唆された。さらに、塩分バランスの異常が筋量および筋力低下を引き起こし、適切な塩分摂取が低Na血症によるサルコペニアやフレイルの予防に有効である可能性が示唆された。

1. 研究目的

超高齢社会を迎えた本邦において、運動器の障害によって要介護状態に陥るリスクが高い骨粗鬆症や、身体的フレイルの中核疾患であるサルコペニアの病態解明と予防・治療の重要性はますます高まっている。また、骨粗鬆症がフレイルとサルコペニアの両者に関連することが示唆されている¹⁾。低ナトリウム(Na)血症は骨量減少および骨折リスク増加と関連することが知られており、

最近、抗利尿ホルモン不適合分泌症候群の患者で、血中Na濃度が骨形成マーカーと関連することが示されている^{2,3)}。また、近年、軽度の低Na血症高齢者では、骨格筋量・筋力・身体機能低下と関連することを示唆する知見や、慢性腎臓病患者で透析前の血中Na濃度が握力と関連することが報告されている^{4,5)}。これらのエビデンスより、低Na血症が筋骨格系に影響し、サルコペニアや骨粗鬆症、フレイルの原因になるものと考えられるが、その分子的な

病態機序や、病態に対する対処法についてはこれまでにほとんど検討されていない。

近年、サルコペニアと骨粗鬆症の病態の共通性から筋と骨の相互関連(筋・骨連関)が注目されている。私共は以前より、筋・骨連関に関する研究を進めており、これまでに、筋・骨連関に関与する新たなマイオカインとして、オステオグリシン、FAM5c を^{6,7)}、メカニカルストレス、重力変化あるいは運動によって誘導されるマイオカインとして、フォリスタチン、アイリシン、オルファクトメジン 1, Dkk2, PMP22 を見出した⁸⁻¹¹⁾。

これらの背景から、低 Na 血症が筋と骨に同時に影響をおよぼすことで、サルコペニア、骨粗鬆症およびフレイルの原因に寄与する可能性が考えられる。しかし、これまでに低 Na 血症の筋と骨への影響のメカニズムについては不明な点が多く残っており、特に、筋と骨の臓器連関及び治療効果の視点からは全く検討されていない。そこで本研究課題では、低 Na 血症の筋と骨への影響について、筋と骨の臓器連関の視点から検討し、塩分バランス異常のフレイル、サルコペニア、骨粗鬆症に共通する病態機序への寄与、および塩分摂取による治療効果を検討することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 実験動物および低 Na 血症病態モデルマウスの作製

実験には 9 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを使用した。2% イソフルラン麻酔下で、マウスの背部皮下に、1-desamino-8-D-arginine vasopressin (dDAVP, セレックバイオテック) 溶液を充填した浸透圧ミニポンプ(ALZET, 室町機械)を埋め込み、0.5 ng/h の用量で 8 週間投与した¹²⁾。慢性的な水分負荷を行うため、マウスにゼリー状の餌(蒸留水 72%, 粉末状 CE-2(日本クレア) 27%, Agar 1%)を与えて飼育した¹³⁾。

フロセミド溶液はマウス皮下に 250 mg/kg の用量で 1 週間あたり 5 回の頻度で 8 週間投与した。塩分投与群は 1% NaCl 溶液を飲水させて飼育した。

本研究の動物実験は、近畿大学動物実験委員会の承認を得て、動物の愛護および管理に関する法律、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針、近畿大学動物実験規程を遵守して実施した。

2.2 血清の採取および血清 Na 濃度測定

安楽死させたマウスから血液を採取し、30 分静置後、4°C、1500 g で 15 分間遠心し、得られた血清をオリエンタル酵母株式会社に送付し、血清 Na 濃度の測定を依頼した。

2.3 血清 insulin-like growth factor-1(IGF-1)濃度測定

マウス血清中の IGF-1 濃度は、Mouse IGF-1 ELISA Kit (Cat. No. EMI1001-1, Assaypro LLC)を用いて測定した。

2.4 握力測定

dDAVP またはフロセミドの投与開始 8 週間後、マウスの握力を実験動物用握力メータ(1027SM, Columbus Instruments)を用いて測定した。各マウスの握力は 5 回測定し、平均値を算出して解析した。

2.5 定量 CT 解析

実験動物用 X 線 CT 装置(Latheta LCT-200, 日立アロカ)を用いて、定量 CT 解析を行った。dDAVP またはフロセミド投与開始 8 週間後、2% イソフルラン麻酔下でマウスの全身および下腿を撮影した。ボクセルサイズは、全身筋量の解析では、96 × 192 × 1008 μm を使用した。筋量は Latheta ソフトウェア(version 3.41)を用いて解析した。

2.6 マイクロ CT 解析

実験動物用マイクロ CT 装置(CosmoScan GXII, リガク)を用いて、マイクロ CT 解析を行った。dDAVP またはフロセミド投与開始 8 週間後、2% イソフルラン麻酔下でマウス大腿骨の遠位部および骨幹部を撮影した。ボクセルサイズは、10 × 10 × 10 μm を使用した。得られたデータは、CosmoScan GX Image Analysis ソフトウェアを用いて、5.5 × 5.5 × 5.5 μm のボクセルサイズに再々構成したのち、解析ソフトウェア(Analyze 14.0, AnalyzeDirect)を用いて構造解析を行った。海綿骨の評価では、大腿骨遠位部の成長板から近位部へ 100 μm 離れた部位から 1 mm の領域を関心領域として、海綿骨骨量(BV/TV), 海綿骨骨密度(TbBMD), 骨梁幅(Tb.Th), 骨梁間隙(Tb.Sp)を解析した。皮質骨の評価では、大腿骨骨幹部の 1 mm の領域を関心領域として、皮質骨骨密度(CtBMD), 皮質骨幅(Ct.Th), 皮質骨面(Ct.Ar)を解析した。

2.7 ウェスタンブロット

マウスより採取した腓腹筋およびヒラメ筋を細胞溶液(Cell signaling technology)中で、ビーズ式冷却破碎装置(Tomy)を用いて破碎した後、15000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、分離した上清を回収した。得られた抽出液を 4-20%

Mini-Protean Tris-Glycine extended precast gels (BioRad Laboratories) にて電気泳動した後、PVDF membrane (Millipore) に転写した。その後、3%スキムミルク溶液でブロッキングし、一次抗体と 4°C で一晩反応させ、HRP で標識された二次抗体を室温で 1 時間反応させた。標的のタンパクは ECL select Western blot detection system (GE Healthcare) を用いて発色させ、Amersham Imager 600 (GE Healthcare) にて撮影した。

2. 8 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

マウスより採取した腓腹筋およびヒラメ筋を TRIzol 溶液 (Thermo Fisher Scientific) 中で、ビーズ式冷却破碎装置 (Tomy) を用いて破碎した。TRIzol 1 mL に対してクロロホルムを 0.2 mL 加えて攪拌した後、15000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、分離した水層を回収した。水層 350 μ L に等量の 2-プロパノールを加え、ボルテックスで混合した後、RNeasy plus mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を精製した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster) を用いて、total RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA と Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、ABI StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) にて、リアルタイム PCR を行った。得られた結果は、18S ribosomal RNA (18S rRNA) を内部標準として、 $\Delta\Delta$ Ct 法によって解析した。

2. 9 RNA シークエンス解析

マウスより採取した腓腹筋から TRIzol 溶液 (Thermo Fisher Scientific) と、RNeasy plus mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を精製した。NEBNext rRNA Depletion Kit (New England Biolabs) を用いて rRNA を除去した後、NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いてライブラリーを作製した。作製したライブラリーと NextSeq500 High Output Kit v2 (Illumina) を用いて、Illumina (2 \times 36-bp paired-end reads) にてシークエンス解析を行った。

2. 10 細胞培養

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は 10%ウシ胎仔血清、100 ユニット/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。C2C12 細胞の筋管細胞への分化は、DMEM に 2%ウマ血清、100 ユニット/ml ペニ

シリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で 4 日間培養することで誘導した。

マウス初代培養筋芽細胞の培養は以下の方法により行った。マウス下肢の骨格筋を採取し、脂肪組織などを取り除き、細かく切断した。その後、0.2%コラーゲンゼ II 溶液を添加し、37°C で 60 分間インキュベートした。細胞はコラーゲンコートディッシュに播種し、高グルコース含有 DMEM に 30%ウシ胎仔血清、100 ユニット/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、1%ニワトリ胚抽出物、100 μ g/ml bFGF を添加した培地で一晩培養した。翌日に細胞を回収し、マトリゲルコートディッシュに播種し、上記の培地で 5 日間培養した。筋管細胞への分化は、高グルコース含有 DMEM に 5%ウマ血清、100 ユニット/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で 3 日間培養することで誘導した。

2. 11 統計解析

得られたデータは平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は、Mann-Whitney の U 検定あるいは Tukey-Kramer 検定を使用した。単相関分析は、Pearson の相関検定を使用した。p < 0.05 を有意差ありと判定した。

3. 研究結果

3. 1 低ナトリウム血症が体重と骨格筋におよぼす影響

マウスにおいて、8 週間の dDAVP 投与およびフロセミド投与は、血中 Na 濃度を有意に減少させた (**Fig. 1A, F**)。dDAVP は体重および全身筋量を増加させたが、四肢握力を減少させた (**Fig. 1B-E**)。また、dDAVP は腓腹筋およびヒラメ筋重量に影響をおよぼさなかった。フロセミドは体重、全身筋量、四肢握力、腓腹筋およびヒラメ筋重量を有意に減少させた (**Fig. 1G-J**)。

3. 2 低ナトリウム血症が骨におよぼす影響

マウス大腿骨のマイクロ CT 解析において、dDAVP およびフロセミドは、海面骨骨量 (BV/TV)、海綿骨骨密度、骨梁幅を有意に減少させ、骨梁間隙を有意に増加させた (**Fig. 2A, B**)。さらに、dDAVP およびフロセミドは皮質骨骨密度、皮質骨幅、皮質骨面を有意に減少させた (**Fig. 2A, B**)。

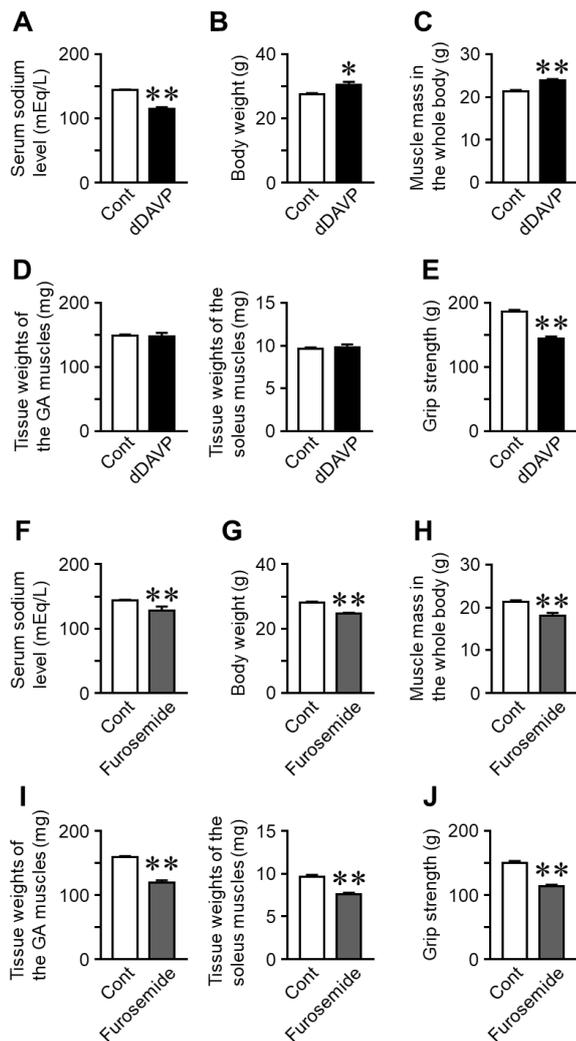


Fig. 1. 低ナトリウム血症が筋におよぼす影響
 (A, F) dDAVP (A) またはフロセミド (F) 初回投与 8 週間後にマウスの血清を採取し、血清 Na 濃度を測定した。
 (B, G) dDAVP (B) またはフロセミド (G) 初回投与 8 週間後にマウスの体重を測定した。
 (C, H) dDAVP (C) またはフロセミド (H) 初回投与 8 週間後に定量 CT を用いて全身筋量を測定した。
 (D, I) dDAVP (D) またはフロセミド (I) 初回投与 8 週間後にマウス腓腹筋 (GA) とヒラメ筋の重量を測定した。
 (E, J) dDAVP (E) またはフロセミド (J) 初回投与 8 週間後にマウスの四肢握力を測定した。
 グラフは、平均値±標準誤差を示す。**P < 0.01. *P < 0.05.

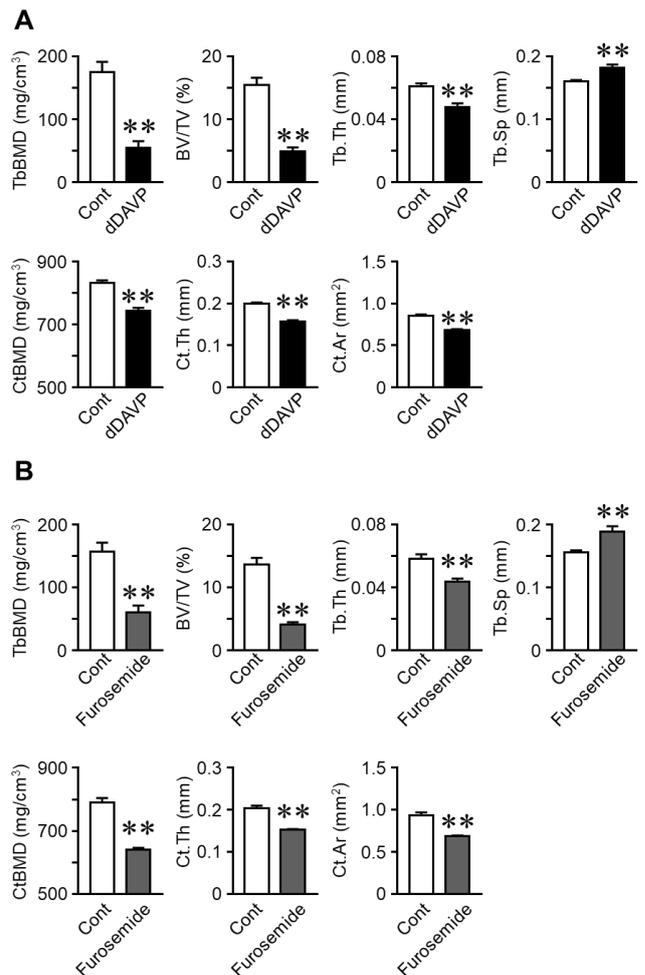


Fig. 2. 低ナトリウム血症が骨におよぼす影響
 (A, B) dDAVP (A) またはフロセミド (B) 初回投与 8 週間後に μ CT を用いて、マウス大腿骨の海綿骨骨密度 (TbBMD)、海綿骨骨量 (BV/TV)、海綿骨幅 (Tb.Th)、海綿骨骨梁間隙 (Tb.Sp)、皮質骨骨密度 (CtBMD)、皮質骨幅 (Ct.Th)、皮質骨面 (Ct.Ar) を測定した。
 グラフは、平均値±標準誤差を示す。**P < 0.01. **P < 0.01.

3. 3 低ナトリウム血症が筋タンパク合成・分解系におよぼす影響

dDAVP とフロセミド投与が骨格筋のタンパク合成系に関連する Akt/p70 S6 キナーゼ系におよぼす影響を検討した。dDAVP とフロセミドは、腓腹筋およびヒラメ筋において Akt と p70 S6 キナーゼのリン酸化を有意に抑制した (Fig. 3A, B)。

次に、筋タンパク分解に関連するユビキチン-プロテアソーム系におよぼす影響を検討した。dDAVP はヒラメ筋 MuRF1 mRNA 発現を有意に減少させ、フロセミドはヒラメ筋 atrogen-1 mRNA 発現を有意に減少させた (Fig. 3C)。一方、dDAVP およびフロセミドは腓腹筋 MuRF1 および atrogen-1 発現に影響をおよぼさなかった (Fig. 3C)。

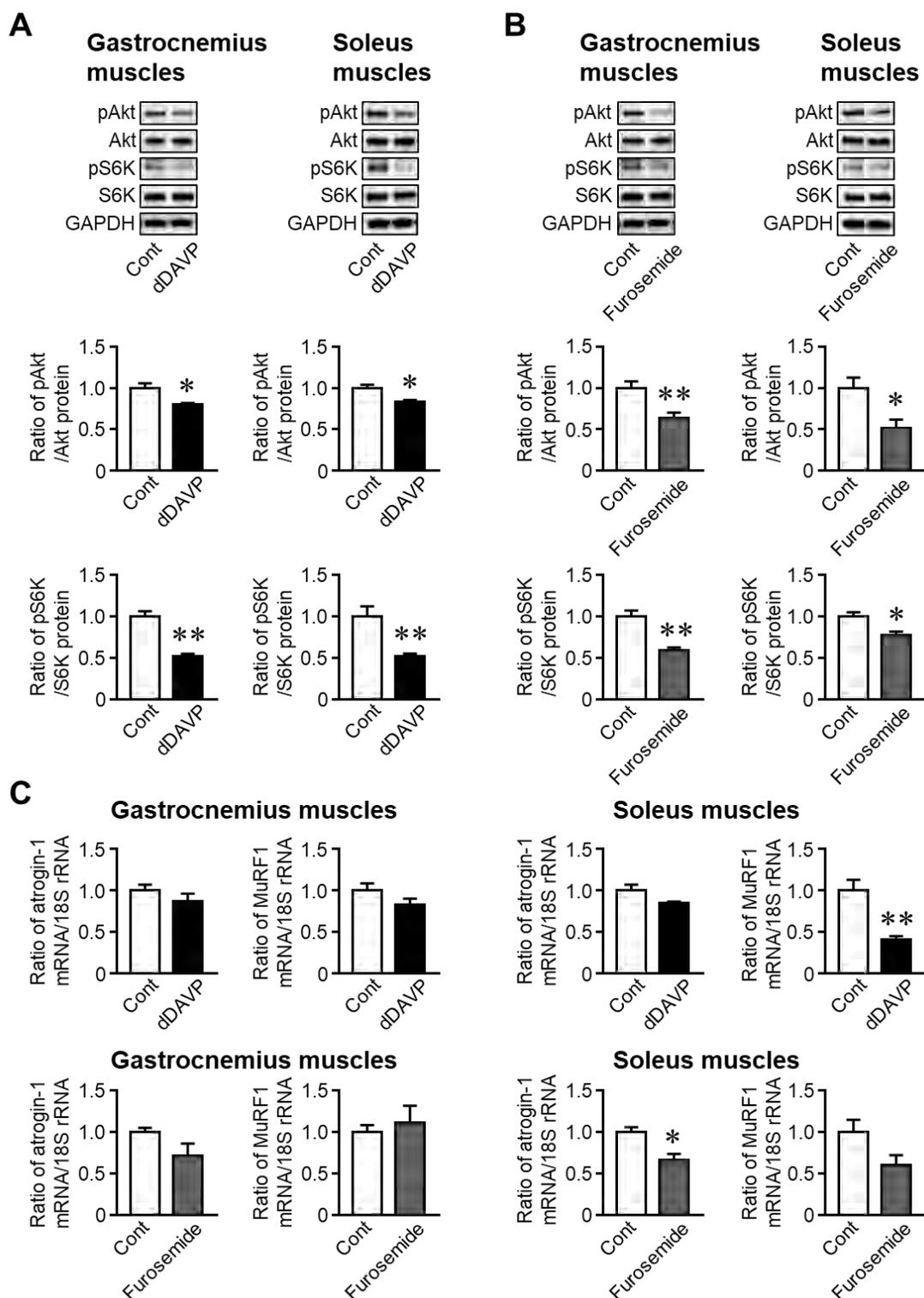


Fig. 3. 低ナトリウム血症が筋タンパク質合成・分解におよぼす影響

(A, B) dDAVP (A) またはフロセミド (B) 初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋とヒラメ筋からタンパク質を抽出し、リン酸化 Akt (pAkt), Akt, リン酸化 p70 S6 キナーゼ (pS6K), S6K, GAPDH のウェスタンブロット解析を行った。pAkt, Akt, pS6K, S6K のタンパク質発現レベルをデンストメトリーによって定量し、GAPDH の発現レベルで補正した。

(C) 初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋とヒラメ筋から total RNA を抽出し、atrogin-1, MuRF1, 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を実施した。

結果のグラフは、平均値±標準誤差を示す。 **P < 0.01. *P < 0.05.

3. 4 低ナトリウム血症がマイオカイン発現におよぼす影響

次に、dDAVP およびフロセミドが骨に作用するマイオカインの発現におよぼす影響を検討した。dDAVP は腓腹筋とヒラメ筋の IGF-1 mRNA およびタンパク発現量を減少させ、IL-6 発現を増加させた (Fig. 4A-D)。また、dDAVP はヒラメ筋マイオスタチン発現を減少させたが、FGF2, Fndc5 (アイリシン), フォリスタチン, アクチビン, TGF- β 発現に影響をおよぼさなかった (Fig. 4A, C)。

フロセミドは腓腹筋とヒラメ筋の IGF-1 mRNA およびタンパク発現量を減少させた (Fig. 5A-D)。また、フロセミドは腓腹筋の Fndc5, IL-6, アクチビン発現を減少させたが、

ヒラメ筋の IL-6 発現を増加させた (Fig. 5A, C)。フロセミドは、腓腹筋およびヒラメ筋において、FGF2, マイオスタチン, フォリスタチン, TGF- β 発現に影響をおよぼさなかった (Fig. 5A, C)。

次に、dDAVP とフロセミドが血中および各組織における IGF-1 発現におよぼす影響を検討した。dDAVP およびフロセミドは血中 IGF-1 濃度を有意に減少させた (Fig. 6A)。また、dDAVP およびフロセミドは腓腹筋の IGF-1 発現を減少させたが、大腿骨, 肝臓, 白色脂肪組織, 腎臓の IGF-1 発現に影響をおよぼさなかった (Fig. 6B)。

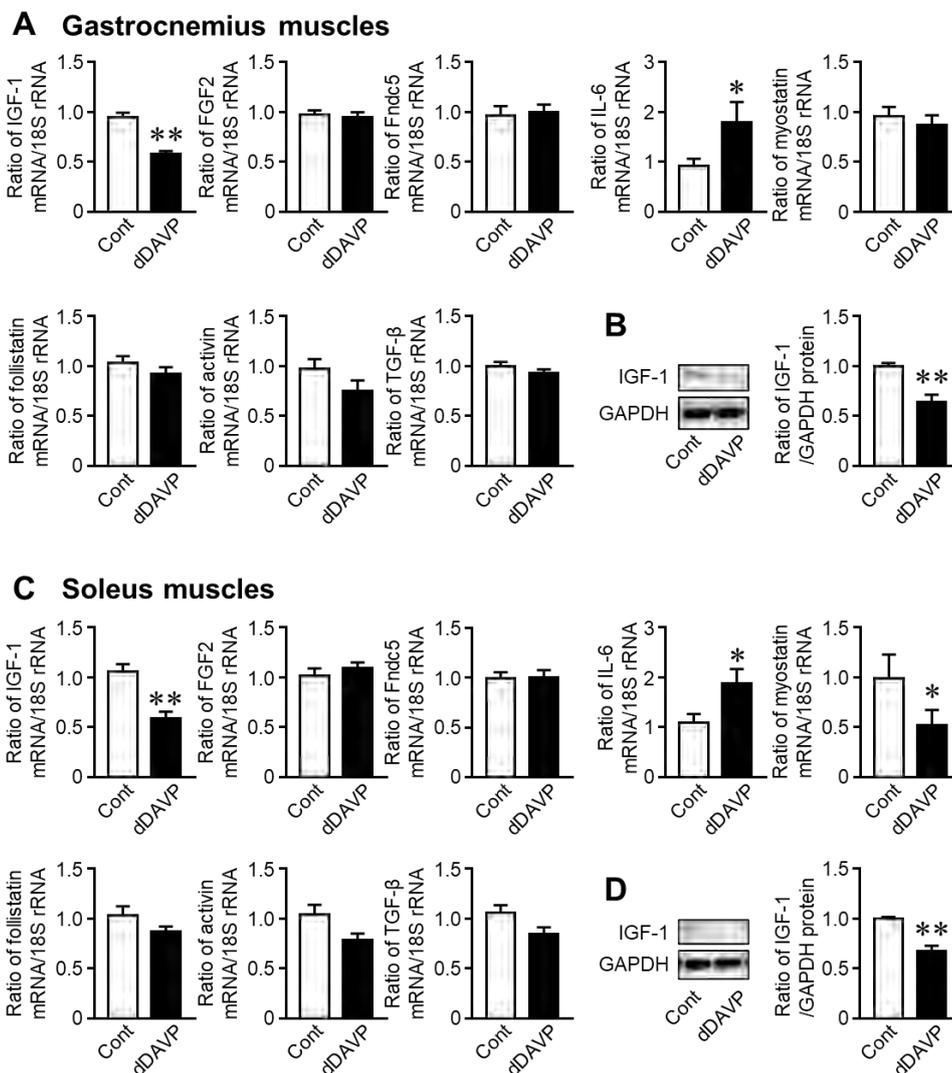


Fig. 4. dDAVP 誘発低ナトリウム血症がマイオカイン発現におよぼす影響

(A, C) dDAVP 初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋 (A) とヒラメ筋 (C) から total RNA を抽出し、IGF-1, FGF2, Fndc5, IL-6, myostatin, follistatin, activin, TGF- β , 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。
 (B, D) dDAVP 初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋 (B) とヒラメ筋 (D) からタンパク質を抽出し、IGF-1 と GAPDH のウェスタンブロット解析を行った。IGF-1 タンパク質の発現レベルをデンシトメリーによって定量し、GAPDH の発現レベルで補正した。グラフは、平均値±標準誤差を示す。 **P < 0.01. *P < 0.05.

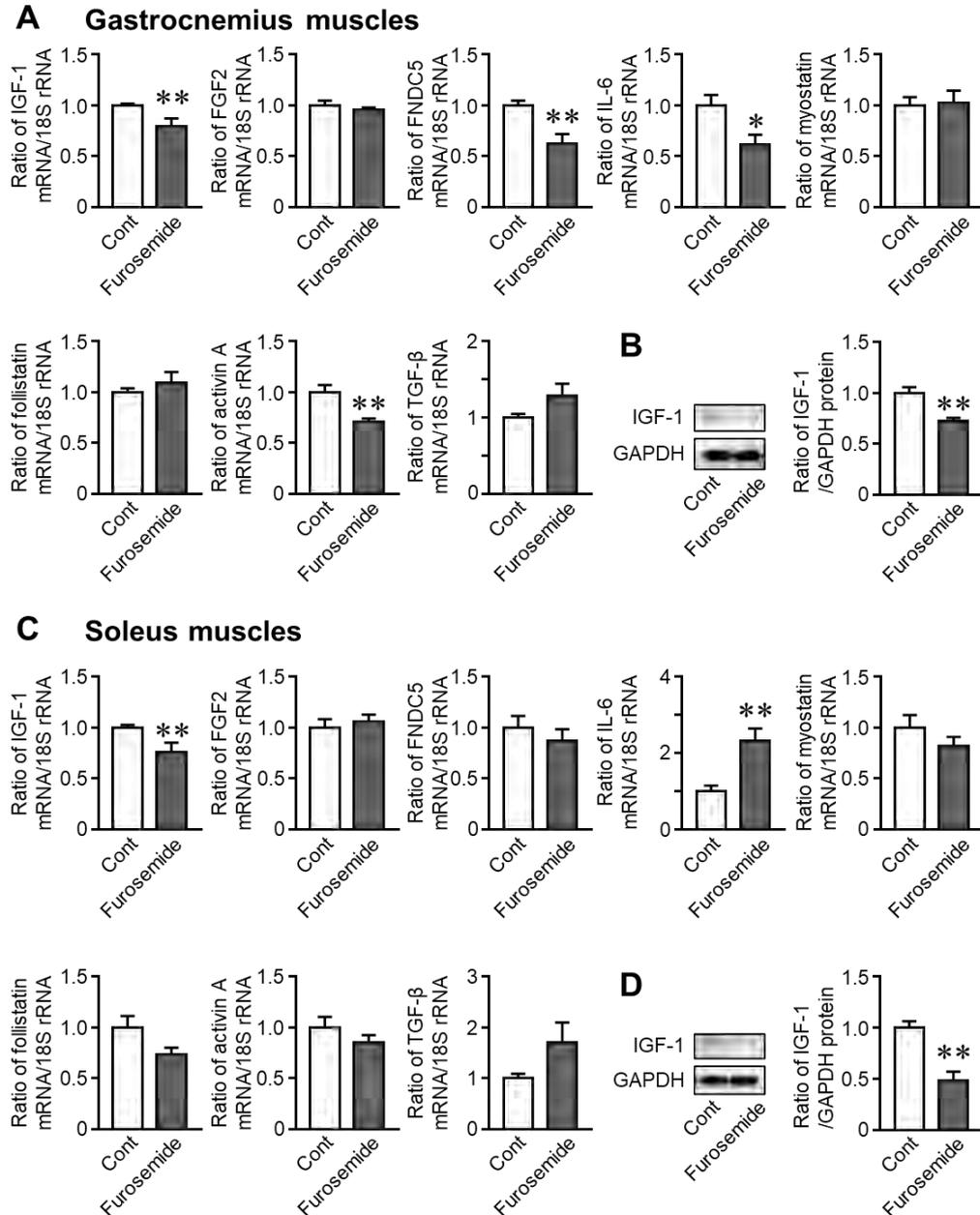


Fig. 5. フロセミド誘発低ナトリウム血症がマイオカイン発現におよぼす影響
 (A, C) フロセミド初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋 (A) とヒラメ筋 (C) から total RNA を抽出し、IGF-1, FGF2, Fndc5, IL-6, myostatin, follistatin, activin, TGF-β, 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。
 (B, D) フロセミド初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋 (B) とヒラメ筋 (D) からタンパク質を抽出し、IGF-1 と GAPDH のウェスタンブロット解析を行った。IGF-1 タンパク質の発現レベルをデンシトメトリーによって定量し、GAPDH の発現レベルで補正した。グラフは、平均値±標準誤差を示す。 **P < 0.01. *P < 0.05.

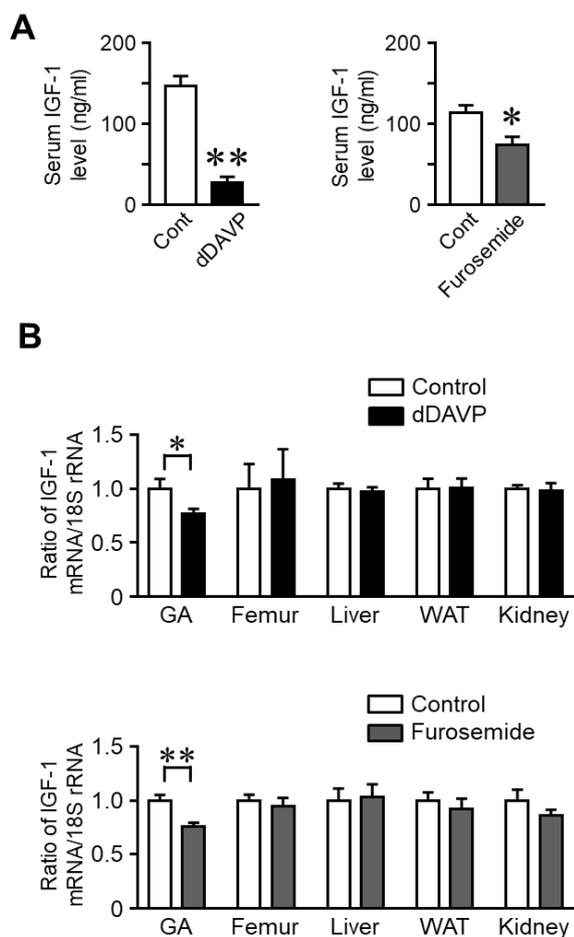


Fig. 6. 低ナトリウム血症がマウス血中および各組織の IGF-1 発現におよぼす影響

(A) dDAVP またはフロセמיד初回投与 8 週間後に、マウス血清を採取し、血清 IGF-1 濃度を測定した。

(B) dDAVP またはフロセמיד初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋 (GA)、大腿骨、肝臓、白色脂肪組織 (WAT)、腎臓から total RNA を抽出し、IGF-1 と 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。

グラフは、平均値 ± 標準誤差を示す。 **P < 0.01. *P < 0.05.

3. 5 IGF-1 発現と骨格筋・骨指標との単相関分析

次に、実験に使用したマウスにおいて、IGF-1 発現と骨および骨格筋指標との単相関分析を行った。腓腹筋およびヒラメ筋 IGF-1 発現は、大腿骨の海面骨 BV/TV、皮質骨骨密度、握力と有意な正相関を示した (Table 1)。さらに、血中 IGF-1 濃度は、大腿骨の海面骨 BV/TV、皮質骨骨密度、握力と有意な正相関を示した (Table 2)。また、血中 IGF-1 濃度は腓腹筋およびヒラメ筋の IGF-1 発現と有意な正相関を示した (Table 2)。

Table 1. 骨格筋 IGF-1 mRNA 発現量と筋および骨指標との関連

	IGF-1 mRNA levels			
	Gastrocnemius muscle		Soleus muscle	
	r	P	r	P
dDAVP				
BV/TV	0.893	<0.001	0.714	0.002
CtBMD	0.778	<0.001	0.678	0.004
Grip strength	0.882	<0.001	0.644	0.007
Furosemide				
BV/TV	0.704	0.022	0.702	0.016
CtBMD	0.738	0.009	0.733	0.010
Grip strength	0.756	0.007	0.741	0.009

dDAVP またはフロセמיד初回投与 8 週間後におけるマウス腓腹筋およびヒラメ筋 IGF-1 mRNA 発現量と海面骨骨量 (BV/TV)、皮質骨骨密度 (CtBMD)、握力との単相関分析を行った。

Table 2. 血清 IGF-1 濃度と筋および骨指標との関連

	Serum IGF-1		Furosemide	Serum IGF-1	
	r	P		r	P
dDAVP					
BV/TV	0.761	0.001		0.715	0.013
CtBMD	0.782	<0.001		0.684	0.020
Grip strength	0.844	<0.001		0.725	0.012
IGF-1 mRNA GA muscle	0.756	0.001		0.699	0.017
Soleus muscle	0.827	<0.001		0.751	0.008

dDAVP またはフロセמיד初回投与 8 週間後におけるマウス血清 IGF-1 濃度と海面骨骨量 (BV/TV)、皮質骨骨密度 (CtBMD)、握力、腓腹筋 (GA) およびヒラメ筋 IGF-1 mRNA 発現量との単相関分析を行った。

3. 6 塩分投与が低ナトリウム血症による握力と筋量の減少におよぼす影響

次に、塩分投与がフロセמידによる握力と筋量の減少におよぼす影響を検討した。塩分投与は、フロセמידによる血中 Na 濃度低下を有意に回復させた (Fig. 7A)。塩分投与は、フロセמידによる体重減少と握力低下を有意に回復させた (Fig. 7B, C)。さらに、塩分投与は、フロセמידによる全身筋量、腓腹筋重量、海面骨骨密度、海面骨 BV/TV、皮質骨骨密度の減少を有意に回復した (Fig. 7D-F)。また、塩分投与はフロセמידによる腓腹筋 IGF-1 発現および血中 IGF-1 濃度の低下を有意に回復した (Fig. 7G, H)。

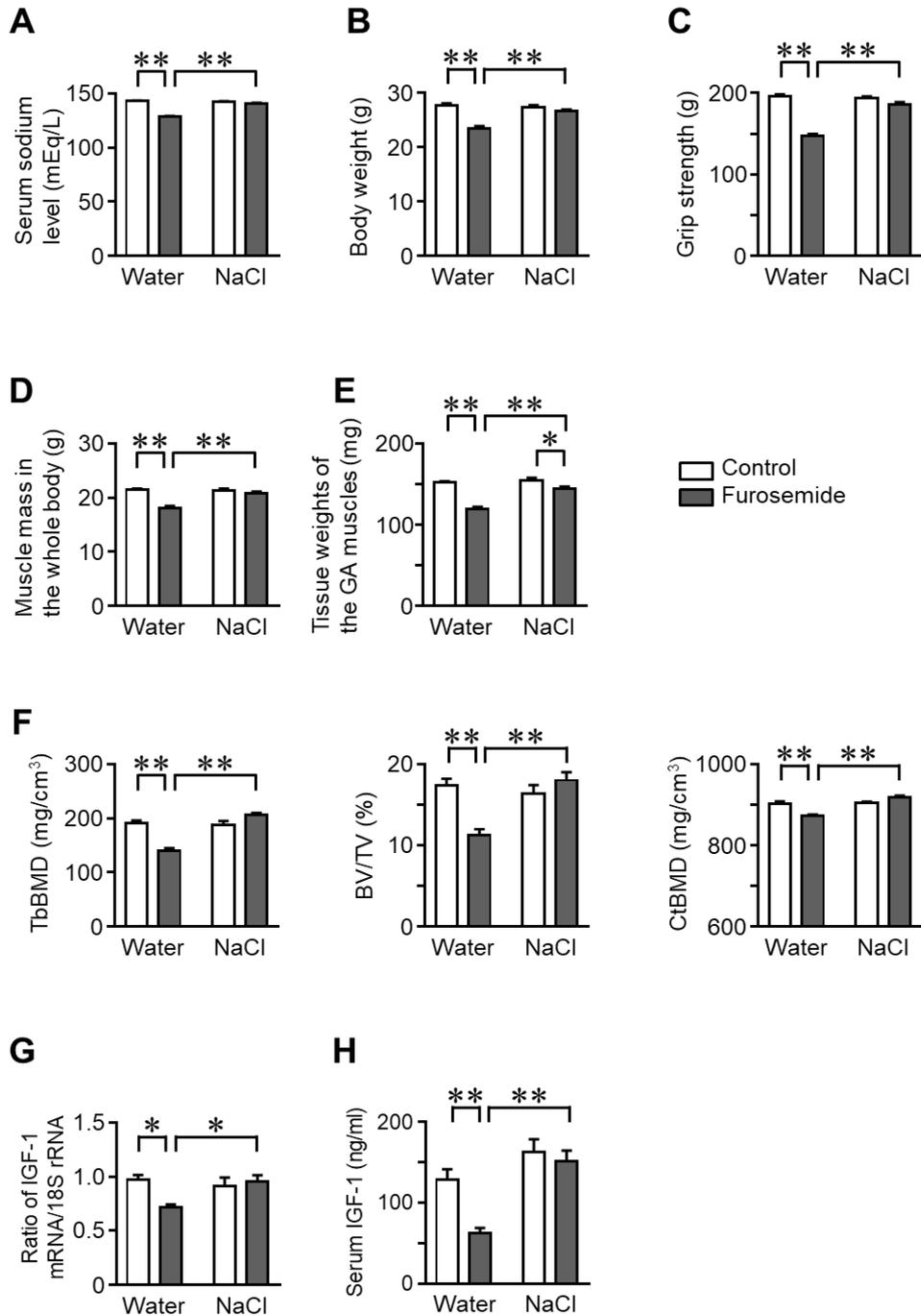


Fig. 7. NaCl 投与がフロセミド誘発低ナトリウム血症マウスの筋と骨におよぼす影響

(A) フロセミド初回投与 8 週間後に、NaCl 投与マウスおよび対照群から血清を採取し、血清ナトリウム濃度を測定した。

(B) フロセミド初回投与 8 週間後における NaCl 投与マウスと対照群の体重を測定した。

(C) フロセミド初回投与 8 週間後に NaCl 投与マウスと対照群の四肢握力を測定した。

(D) フロセミド初回投与 8 週間後に定量 CT を用いて全身筋量を測定した。

(E) フロセミド初回投与 8 週間後にマウス腓腹筋 (GA) の重量を測定した。

(F) フロセミド初回投与 8 週間後に μ CT を用いて、マウス大腿骨の海綿骨骨密度 (TbBMD)、海綿骨骨量 (BV/TV)、皮質骨骨密度 (CtBMD) を測定した。

(G) フロセミド初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋から total RNA を抽出し、IGF-1 と 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。

(H) フロセミド初回投与 8 週間後に、マウス血清を採取し血清 IGF-1 濃度を測定した。

グラフは、平均値±標準誤差を示す。*P < 0.05. **P < 0.01.

3. 7 低ナトリウム血症による骨量と筋力の減少に寄与する新規因子の探索

RNA シークエンス解析を行い、dDAVP あるいはフロセミドによって、腓腹筋で 3 倍以上発現が増減した因子を抽出した (Table 3, 4)。抽出した因子のうち、細胞外に局在する因子に着目し、増加した因子として *Selp* (P-セレクトイン)、減少した因子として *Edil3* (Del-1) 発現を検討した。dDAVP は、腓腹筋 P-セレクトイン発現を増加させ、腓腹筋 *Del-1* 発現を減少させた (Fig. 8A, B)。フロセミドは、腓腹筋 P-セレクトイン発現を増加させ、*Del-1* 発現を減少させた (Fig. 8A, B)。

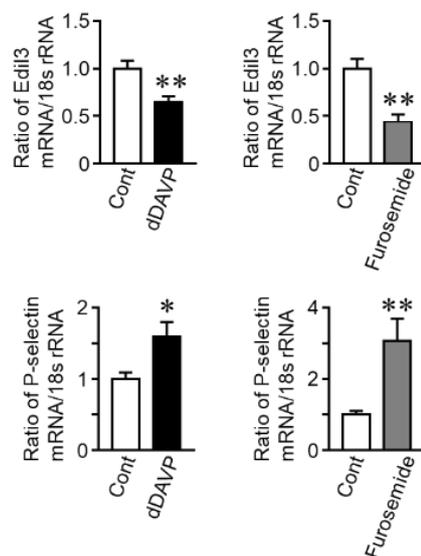
Table 3. 低ナトリウム血症マウスの腓腹筋およびヒラメ筋で発現が増加した因子

Gene	Gene accession number	Fold change			
		Gastrocnemius muscle		Soleus muscle	
		dDAVP (≥3.0)	Furosemide (≥3.0)	dDAVP	Furosemide
<i>Myh7</i>	BC158070	729.0	9.1	1.3	1.3
<i>Tnnc1</i>	NM_009393	177.7	10.7	1.3	1.0
<i>Tnni1</i>	BC023170	97.7	9.8	1.9	1.3
<i>Sln</i>	NM_025540	25.2	5.0	3.0	1.0
<i>Tnnt1</i>	AF020946	22.5	3.7	1.3	1.4
<i>Adora1</i>	KC881107	17.1	18.9	0.9	2.1
<i>Mybph</i>	BC116684	11.9	15.5	10.8	82.8
<i>Selp</i>	NM_011347	8.3	3.4	2.2	2.2
<i>Tpm3</i>	BC092045	8.2	5.1	1.2	1.2
<i>Atp1a3</i>	BC020177	4.2	5.2	1.9	0.9
<i>Myh7b</i>	NM_001085378	4.1	5.9	2.2	1.9
<i>Prima1</i>	NM_133364	4.0	4.0	2.3	2.3
<i>H2-Q10</i>	NM_010391	3.8	3.5	0.2	0.4
<i>Pnmt</i>	NM_008890	3.6	22.2	2.7	22.5
<i>Actc1</i>	NM_009608	3.3	3.4	1.2	1.0
<i>Sim1</i>	NM_011376	3.2	4.1	1.1	0.9
<i>Hist1h1b</i>	NM_020034	3.0	4.0	1.1	2.4
<i>Fmo2</i>	AF184981	3.0	4.0	2.1	4.6

Table 4. 低ナトリウム血症マウスの腓腹筋およびヒラメ筋で発現が減少した因子

Gene	Gene accession number	Fold change			
		Gastrocnemius muscle		Soleus muscle	
		dDAVP (≤0.33)	Furosemide (≤0.33)	dDAVP	Furosemide
<i>Dpfl</i>	NM_013874	0	0.23	1.61	1.25
<i>Gm14288</i>	NM_001033123	0	0.28	0.22	0
<i>Grm8</i>	NM_008174	0.20	0.16	1.07	0.60
<i>Cnga3</i>	XM_017313745	0.25	0.24	1.20	0.77
<i>Caena2d4</i>	NM_001033382	0.29	0.29	0.93	5.50
<i>Ccl24</i>	NM_019577	0.30	0.08	2.00	0.09
<i>Edil3</i>	NM_001037987	0.31	0.27	1.33	0.17

A Gastrocnemius muscles



B Gastrocnemius muscles

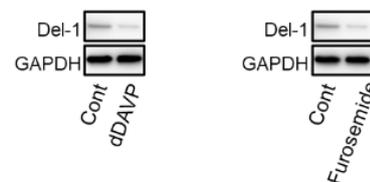


Fig. 8. 低ナトリウム血症が骨格筋 *Del-1* および P-セレクトイン発現におよぼす影響

(A) dDAVP あるいはフロセミド初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋から total RNA を抽出し、*Edil3* (*Del-1*), P-セレクトイン、18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。グラフは、平均値 ± 標準誤差を示す。** $P < 0.01$. * $P < 0.05$ 。
(B) dDAVP あるいはフロセミド初回投与 8 週間後に、マウス腓腹筋からタンパク質を抽出し、*Del-1* と GAPDH のウェスタンブロット解析を行った。

3. 8 低ナトリウム刺激がマウス筋細胞の *Del-1* および P-セレクトイン発現におよぼす影響

低 Na 刺激は、初代培養筋芽細胞から分化させた筋管細胞において、*Del-1* 発現を減少させたが、P-セレクトイン発現には影響をおよぼさなかった (Fig. 9A)。さらに、低 Na 刺激は、筋管に分化させた C2C12 細胞においても *Del-1* 発現を有意に減少させたが、P-セレクトイン発現に影響をおよぼさなかった (Fig. 9B)。次に、実験に使用したマウスにおいて、骨格筋 *Edil3* 発現と骨および骨格筋指標との単相関分析を行った。腓腹筋 *Edil3* 発現は、大腿骨の海面骨 BV/TV、皮質骨骨密度、握力と有意な正相関を示した (Table 5)。

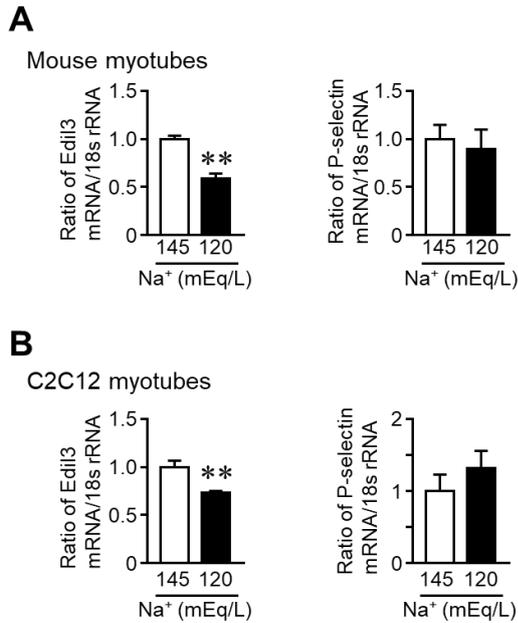


Fig. 9. 低ナトリウム刺激がマウス筋細胞 Del-1 および P-セレクトイン発現におよぼす影響 (A, B) マウス筋芽細胞 (A) およびマウス筋芽細胞系 C2C12 細胞 (B) から分化誘導させた筋管を低ナトリウム濃度培地で 24 時間培養した後, total RNA を抽出し, Edil3 (Del-1), P-セレクトイン, 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。グラフは, 平均値±標準誤差を示す。 **P < 0.01.

Table 5. 骨格筋 Del-1 発現量と筋および骨指標との関連

	Edil3 mRNA levels			
	Gastrocnemius muscle		Soleus muscle	
	r	P	r	P
dDAVP				
BV/TV	0.767	0.001	0.377	0.150
CtBMD	0.530	0.035	0.379	0.148
Grip strength	0.647	0.007	0.383	0.144
Furosemide				
BV/TV	0.727	0.011	0.885	<0.001
CtBMD	0.736	0.010	0.870	0.001
Grip strength	0.728	0.011	0.727	0.011

dDAVP またはフロセמיד初回投与 8 週間後におけるマウス腓腹筋およびヒラメ筋 Edil3 (Del-1) mRNA 発現量と海綿骨骨量 (BV/TV), 皮質骨骨密度 (CtBMD), 握力との単相関分析を行った。

3. 9 Del-1 がマウス骨芽細胞におよぼす影響

マウス初代培養骨芽細胞において, Del-1 は骨芽細胞分化に関連するアルカリホスファターゼ (ALP), オステオカルシン発現を有意に増加させたが, 骨吸収に関連する receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) とオステオプロテジェリン発現に影響をおよぼさなかった (Fig. 10A, B)。

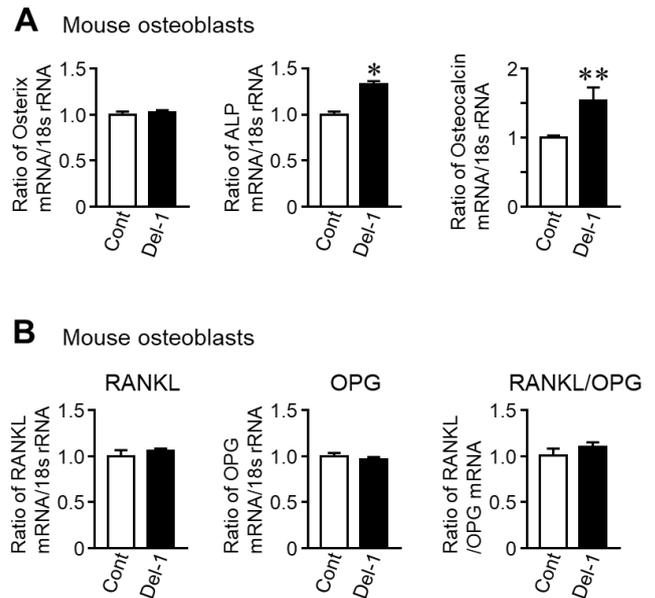


Fig. 10. Del-1 がマウス骨芽細胞におよぼす影響

(A, B) マウス骨芽細胞を Del-1 存在, 非存在下で 24 時間培養した後, total RNA を抽出し, Osterix, アルカリホスファターゼ (ALP), オステオカルシン, receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL), オステオプロテジェリン (OPG), 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。グラフは, 平均値±標準誤差を示す。 **P < 0.01. *P < 0.05.

3. 10 Del-1 がマウス筋細胞におよぼす影響

マウス初代培養筋芽細胞において, Del-1 は atrogen-1 および MuRF1 発現を有意に減少させた (Fig. 11A)。さらに, Del-1 はマウス筋芽細胞において Akt と p70 S6 キナーゼのリン酸化を増加させた (Fig. 11B)。一方, Del-1 はマウス筋管細胞において, Akt のリン酸化を増加させたが, p70 S6 キナーゼのリン酸化には著明な影響をおよぼさなかった (Fig. 11B)。

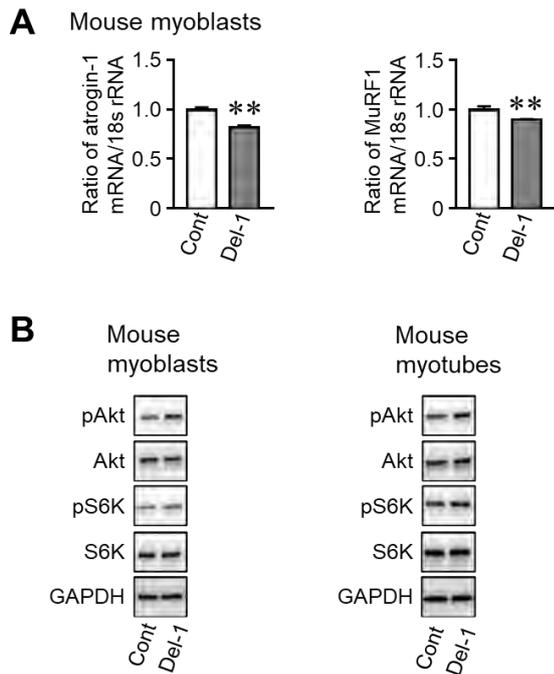


Fig. 11. Del-1 がマウス筋細胞におよぼす影響

- A) マウス筋芽細胞を Del-1 存在, 非存在下で 5% ウマ血清含有培地にて 72 時間培養した後, total RNA を抽出し, atrogin-1, MuRF1, 18S rRNA のリアルタイム PCR 解析を行った。グラフは, 平均値±標準誤差を示す。 **P < 0.01。
- B) Del-1 存在, 非存在化で 1 時間培養したマウス筋芽細胞および筋管からタンパク質を抽出し, リン酸化 Akt (pAkt), Akt, リン酸化 p70 S6 キナーゼ (pS6K), S6K, GAPDH のウェスタンブロット解析を行った。

4. 考察

本研究では, dDAVP はマウス握力を減少させ, フロセミドはマウスの握力, 全身筋量, 腓腹筋およびヒラメ筋組織重量を有意に減少させた。さらに, 塩分投与はフロセミドの骨格筋に対する効果を回復させた。Barsony らはラットにおいて dDAVP による慢性的な低 Na 血症が筋量を減少させることを報告している¹⁴⁾。これらの結果から, 低 Na 血症はマウスにおいて筋量と筋力を低下させることが示唆される。しかしながら, 今回, dDAVP は体重と全身筋量を増加させたが, 腓腹筋およびヒラメ筋の組織重量には影響をおよぼさなかった。dDAVP は体液量を増加させることから, dDAVP による筋量や骨格筋重量の変化は体液量増加による影響を受けている可能性を考慮する必要がある。

骨格筋と骨の間には体液性因子を介した臓器連関(筋・骨連関)が存在しており, これには, 骨格筋から分泌され骨代謝に影響をおよぼす IGF-1 などのマイオカイン

の寄与が報告されている¹⁾。本研究では, dDAVP あるいはフロセミドによる低 Na 血症によって, 腓腹筋やヒラメ筋における IGF-1, IL-6, マイオスタチン, アイリシン, アクチビンなどのマイオカイン発現が変化した。これより, 低 Na 血症はマウスにおいて骨格筋のマイオカイン分泌に影響をおよぼすことが示唆された。また, 今回の研究において, dDAVP およびフロセミドは血中および骨格筋の IGF-1 発現を減少させ, 塩分投与は dDAVP とフロセミドによるこれらの効果を回復させた。これより, 低 Na 血症は骨格筋 IGF-1 発現を減少させることが考えられる。

循環血中の IGF-1 は主に肝臓で産生され, 様々な組織で成長効果を発揮する。また, IGF-1 は, ほとんどの組織に発現しており, 局所的に作用を發揮する¹⁵⁾。これまでの報告では, IGF-1 は筋芽細胞の分化や増殖の亢進, 筋タンパク合成増加, 筋タンパク分解抑制によって筋量増加に寄与することが知られている^{15, 16)}。それゆえ, 今回得られた結果から, 骨格筋における IGF-1 発現減少が低 Na 血症による筋量減少に寄与することが考えられる。

今回, dDAVP およびフロセミドによる低 Na 血症は, マウスの握力を減少させ, さらに, 塩分投与はフロセミドによる握力減少を有意に回復させた。これらの結果から, 低 Na 血症はマウスで筋力を減少させることが示唆された。今回, マウスにおいて骨格筋 IGF-1 発現は握力と有意な正相関を示した。また, van Nieuwpoort らは高齢者において血中 IGF-1 レベルが握力と関連することを報告している¹⁷⁾。これより, 骨格筋での IGF-1 発現低下が, 低 Na 血症による握力低下に寄与する可能性が考えられる。

本研究において, dDAVP およびフロセミドはマウス大腿骨の海面骨骨量, 海面骨骨密度, 皮質骨骨密度を減少させた。さらに, 塩分投与はフロセミドによる骨量減少を有意に回復させた。これまでにも, 低 Na 血症が骨量を減少させることは既に報告されており^{14, 17)}, 今回も同様の結果が得られた。骨格筋はマイオカイン分泌を介して骨と相互作用することが知られているが¹⁾, 今回, 血中 IGF-1 濃度と骨格筋の IGF-1 発現は骨指標と有意な正相関を示した。IGF-1 は, 骨芽細胞による骨形成を亢進させ, 骨量を増加させる¹⁵⁾。さらに, IGF-1 は, 間葉系幹細胞において骨芽細胞分化と BMP-2 による石灰化を促進させる¹⁹⁾。これらの結果から, 血中 IGF-1 や骨格

筋由来 IGF-1 の減少が低 Na 血症による骨量減少に寄与する可能性が考えられる。

RNA シークエンス解析により、低 Na 血症で発現が変化する新規マイオカインを探索し、増加する因子として P-セレクトチンを、減少する因子として Edil3 を抽出した。P-セレクトチンは血管内皮や血小板に豊富に発現している膜貫通タンパク質であり、接着分子として機能している²⁰⁾。P-セレクトチンは骨格筋でも発現することが示されているが、その機能は不明であり、骨代謝における役割も不明である²⁰⁾。Edil3 は Del-1 とも呼ばれ、骨においては、骨分化促進、破骨細胞形成抑制、骨再生促進などの作用が報告されている²¹⁻²³⁾。今回、低 Na 刺激はマウス筋細胞において P-セレクトチン発現に影響をおよぼさなかったが、Del-1 発現を減少させた。さらに、骨格筋 Del-1 発現は、海面骨骨量および皮質骨骨密度と正の相関を示し、Del-1 はマウス骨芽細胞において骨芽細胞分化に関連する因子の発現を増加させた。これらの結果から、Del-1 は低 Na 血症により発現が減少し、骨に作用する新規マイオカインである可能性が考えられる。また、Del-1

はマウス筋細胞において、筋タンパク分解系に関連する因子の発現を低下させ、タンパク合成系に関連するシグナル経路を促進させた。これより、骨格筋 Del-1 発現の低下が低 Na 血症による筋量および筋力低下に寄与する可能性が示唆された。

本研究課題では、低 Na 血症の筋と骨への影響について、筋と骨の臓器連関の視点から検討することにより、低 Na 血症による骨量低下、筋力および筋量減少に、骨格筋の IGF-1 と Del-1 の発現低下が寄与することを見出した (Fig. 12, 13)。さらに、低 Na 血症によるこれらの影響は、塩分投与による血中 Na 濃度の正常化によって回復したことから、適切な塩分摂取はサルコペニアと骨粗鬆症を抑制し、健康寿命を延伸させる可能性が示唆された。また、今回の結果から、塩分バランス異常によるサルコペニアおよび骨粗鬆症に共通する病態機序に、IGF-1 と Del-1 が寄与していることが考えられ、IGF-1 と Del-1 は、塩分バランス異常によるサルコペニアと骨粗鬆症に共通したバイオマーカーになることが期待される。

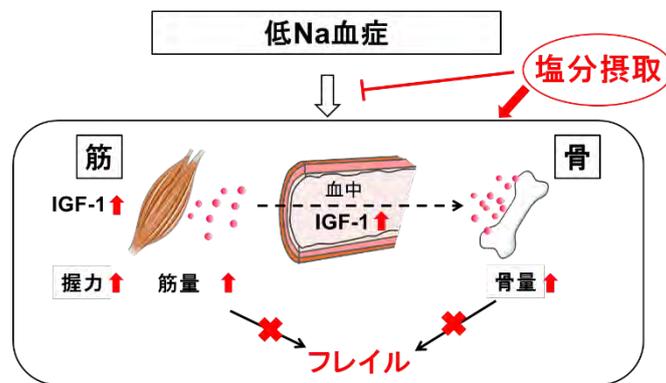


Fig. 12. 低ナトリウム血症による筋量と骨量減少におよぼす塩分摂取の効果

低ナトリウム血症による筋量、握力、骨量、骨格筋 IGF-1 発現量、血中 IGF-1 濃度の低下は、塩分摂取によって回復することが示唆された。

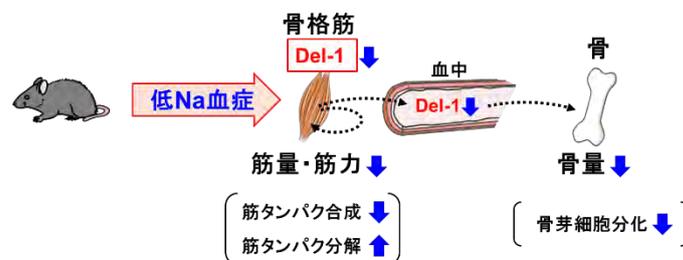


Fig. 13. 低ナトリウム血症における Del-1 の役割

低ナトリウム血症による筋量および筋力の低下に、骨格筋 Del-1 発現量の低下が寄与することが示唆された。

5. 今後の課題

これまでの研究成果により、バソプレシンあるいはフロセミドによる低 Na 血症は、骨格筋に影響をおよぼし、マイオカインとしての骨格筋 IGF-1 および Del-1 発現の減少が、低 Na 血症による骨量減少に寄与することが示唆された。しかしながら、低 Na 血症が骨格筋の IGF-1 および Del-1 発現を減少させるメカニズムについては不明であることから、今後、初代培養筋細胞やマウス筋芽細胞系細胞株を用いて検討を進めたい。さらに、Del-1 の筋や骨の細胞におよぼす影響とその作用メカニズムを検討し、低 Na 血症がサルコペニアと骨粗鬆症を起こすメカニズムにおける Del-1 の役割を明らかにしていく必要がある。

6. 文献

1. Kawao N, Kaji H. Interactions between muscle tissues and bone metabolism. *J Cell Biochem.* 2015;116(5):687-95.
2. Potasso L, Refardt J, Meier C, Christ-Crain M. Effect of hyponatremia normalization on osteoblast function in patients with SIAD. *Eur J Endocrinol.* 2021;186(1):1-8.
3. Monnerat S, Refardt J, Potasso L, Meier C, Christ-Crain M. An Increase in Plasma Sodium Levels Is Associated With an Increase in Osteoblast Function in Chronic SIAD. *J Clin Endocrinol Metab.* 2023;108(10):e1027-e1033.
4. Markaki A, Kyriazis P, Dermitzaki EK, Maragou S, Psylinakis E, Spyridaki A, Drosataki H, Lygerou D, Grammatikopoulou MG, Petrakis I, Stylianou K. The Association Between Handgrip Strength and Predialysis Serum Sodium Level in Patients With Chronic Kidney Disease Stage 5D. *Front Med (Lausanne).* 2021;7:610659.
5. Fujisawa C, Umegaki H, Sugimoto T, Samizo S, Huang CH, Fujisawa H, Sugimura Y, Kuzuya M, Toba K, Sakurai T. Mild hyponatremia is associated with low skeletal muscle mass, physical function impairment, and depressive mood in the elderly. *BMC Geriatr.* 2021;21(1):15.
6. Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki Y, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. FAM5C is a soluble osteoblast differentiation factor linking muscle to bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418(1):134-9.
7. Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki Y, Katagiri T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. *J Biol Chem.* 2012;287(15):11616-28.
8. Kawao N, Morita H, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Role of follistatin in muscle and bone alterations induced by gravity change in mice. *J Cell Physiol.* 2018;233(2):1191-1201.
9. Kawao N, Moritake A, Tatsumi K, Kaji H. Roles of Irisin in the Linkage from Muscle to Bone During Mechanical Unloading in Mice. *Calcif Tissue Int.* 2018;103(1):24-34.
10. Shimoide T, Kawao N, Morita H, Ishida M, Takafuji Y, Kaji H. Roles of Olfactomedin 1 in Muscle and Bone Alterations Induced by Gravity Change in Mice. *Calcif Tissue Int.* 2020;107(2):180-190.
11. Kawao N, Morita H, Iemura S, Ishida M, Kaji H. Roles of Dkk2 in the Linkage from Muscle to Bone during Mechanical Unloading in Mice. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):2547.
12. Kawakami T, Fujisawa H, Nakayama S, Yoshino Y, Hattori S, Seino Y, Takayanagi T, Miyakawa T, Suzuki A, Sugimura Y. Vasopressin escape and memory impairment in a model of chronic syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in mice. *Endocr J.* 2021;68(1):31-43.
13. Lee JW, Alsady M, Chou CL, de Groot T, Deen PMT, Knepper MA, Ecelbarger CM. Single-tubule RNA-Seq uncovers signaling mechanisms that defend against hyponatremia in SIADH. *Kidney Int.* 2018;93(1):128-146.
13. Lee JW, Alsady M, Chou CL, de Groot T, Deen PMT, Knepper MA, Ecelbarger CM. Single-tubule RNA-Seq uncovers signaling mechanisms that defend against hyponatremia in SIADH. *Kidney Int.* 2018;93(1):128-146.
14. Barsony J, Manigrasso MB, Xu Q, Tam H, Verbalis JG. Chronic hyponatremia exacerbates multiple manifestations of senescence in male rats. *Age (Dordr).* 2013;35(2):271-88.
15. Bikle DD, Tahimic C, Chang W, Wang Y, Philippou A, Barton ER. Role of IGF-I signaling in muscle bone interactions. *Bone.* 2015;80:79-88.
16. Ahmad SS, Ahmad K, Lee EJ, Lee YH, Choi I. Implications of Insulin-Like Growth Factor-1 in Skeletal Muscle and Various Diseases. *Cells.* 2020;9(8):1773.

17. van Nieuwpoort IC, Vlot MC, Schaap LA, Lips P, Drent ML. The relationship between serum IGF-1, handgrip strength, physical performance and falls in elderly men and women. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(2):73-84.
18. Verbalis JG, Barsony J, Sugimura Y, Tian Y, Adams DJ, Carter EA, Resnick HE. Hyponatremia-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2010;25(3):554-63.
19. Koch H, Jadlowiec JA, Campbell PG. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2005;14(6):621-31.
20. Ling T, Liu J, Dong L, Liu J. The roles of P-selectin in cancer cachexia. *Med Oncol.* 2023;40(11):338.
21. Shin J, Maekawa T, Abe T, Hajishengallis E, Hosur K, Pyaram K, Mitroulis I, Chavakis T, Hajishengallis G. DEL-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in nonhuman primates. *Sci Transl Med.* 2015;7(307):307ra155.
22. Yuh DY, Maekawa T, Li X, Kajikawa T, Bdeir K, Chavakis T, Hajishengallis G. The secreted protein DEL-1 activates a $\beta 3$ integrin-FAK-ERK1/2-RUNX2 pathway and promotes osteogenic differentiation and bone regeneration. *J Biol Chem.* 2020;295(21):7261-7273.
23. Oh SH, Kim JW, Kim Y, Lee MN, Kook MS, Choi EY, Im SY, Koh JT. The extracellular matrix protein Edil3 stimulates osteoblast differentiation through the integrin $\alpha 5 \beta 1$ /ERK/Runx2 pathway. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188749.

Study on muscle and bone-related frailty induced by hyponatremia

Hiroshi Kaji, Naoyuki Kawao

Department of Physiology and Regenerative Medicine, Kindai University Faculty of Medicine

Summary

Hyponatremia causes sarcopenia and osteoporosis. Although the interactions between skeletal muscles and bone have been reported, the mechanisms underlying muscle and bone loss as well as the interactions between muscle and bone in hyponatremia remain unclear. Here, we investigated the effects of hyponatremia on muscle and bone in mice.

1-desamino-8-D-arginine vasopressin (dDAVP) was administered to mice at 0.5 ng/hr for 8 weeks. Mice were injected subcutaneously with 250 mg/kg furosemide five times per week from 12 week old for 8 weeks. Mice in the salt administration groups were drunk 1% NaCl solution.

dDAVP significantly reduced grip strength, but did not affect tissue weights of gastrocnemius or soleus muscles of mice. Furosemide significantly decreased muscle mass, tissue weights of gastrocnemius and soleus muscles, and grip strength in mice. dDAVP and furosemide decreased trabecular BMD, trabecular bone volume, and cortical BMD at the femurs. Among myokines linking muscle to bone, hyponatremia reduced expression of insulin-like growth factor (IGF)-1 in gastrocnemius and soleus muscles and serum IGF-1 levels in mice. The administration of NaCl significantly improved the muscle and bone parameters decreased by furosemide. Del-1 was identified as a gene whose expression was reduced in the gastrocnemius muscles of hyponatremia mice using RNA sequencing analysis. Low sodium concentrations significantly reduced Del-1 levels in mouse myotubes. Del-1 increased osteogenic differentiation-related factors in mouse osteoblasts. In simple regression analyses, serum IGF-1 levels as well as IGF-1 and Del-1 levels in gastrocnemius muscles of mice were positively related to trabecular bone volume, cortical BMD, and grip strength in mice.

The present study suggests that IGF-1 and Del-1 might be related to muscle wasting and bone loss induced by hyponatremia in mice. Moreover, adequate salt intake may be effective in preventing hyponatremia-induced sarcopenia and frailty.

慢性低ナトリウム血症による精神症状のメカニズムの解明とその治療法の開発

藤沢 治樹¹, 梶村 益久¹, 鈴木 敦詞¹, 宮川 剛², 毛利 彰宏³, 藤沢 知里⁴

- ¹ 藤田医科大学医学部内分泌・代謝・糖尿病内科学,
² 藤田医科大学医科学研究センターシステム医科学研究部門,
³ 藤田医科大学大学院保健学研究科レギュラトリーサイエンス分野,
⁴ 名古屋大学大学院医学系研究科地域在宅医療学・老年科学

概要 低ナトリウム(Na)血症は最も頻度の高い電解質異常症である。我々は、不適切抗利尿症候群(Syndrome of inappropriate antidiuresis:SIAD)による慢性低Na血症モデルラットを用いて、慢性低Na血症により記憶障害、歩行障害が生じること、さらにそのメカニズムを明らかにした。しかし、慢性低Na血症と精神症状の関連については不明な点が多い。そこで、本研究は、動物モデルを用いた慢性低Na血症による不安様行動の解析、メカニズムの解明、および治療法の開発を行うことを目的とした。また、高齢者の臨床データを用いて、慢性低Na血症とFrailtyの関連性について疫学的検討を行った。慢性低Na血症モデルマウスを用いた行動解析により、慢性低Na血症が不安様行動を増強することが明らかになった。また、慢性低Na血症モデルマウスの扁桃体ではセロトニン、ドーパミンの含有量が有意に低下していた。さらに、低Na血症を補正することにより、不安様行動の増強が改善し、扁桃体セロトニン、ドーパミン含有量も正常化した。疫学的に、Frailtyが高い高齢者では、低および高Na血症患者が有意に増加することが明らかとなった。

このように、慢性低Na血症の補正は重要であると考えられるが、慢性低Na血症の治療時に、急激に血清Na濃度が上昇すると透圧性脱髄症候群(ODS)を発症することがある。我々は、ODSの発症にミクログリアの活性化が重要であることを明らかにしてきたが、ODSで認められるミクログリアの活性化が急激な血清Na濃度上昇の直接的な影響によるのか、組織障害等による二次的なものであるかはわかっていない。さらに、慢性低Na血症のミクログリアへの影響も不明である。そこで、我々は、ミクログリア細胞株BV-2と6-3細胞を用いて低Na濃度およびその急速補正のミクログリアへの影響の評価を行った。10日間程度の低Na濃度環境(36 mEq/Lの低下)では、NOS2依存性のNO産生が有意に低下した。また、Na濃度の急速補正時、低Na濃度環境下と比較して、NOS2依存性NO産生は有意に上昇し、Na濃度の急速補正の直接的なミクログリアへの影響は、ODSの病態に部分的に関与する可能性が示唆された。また、これらの変化には、転写因子であるNFAT5が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

このように、慢性低Na血症により扁桃体の機能の変化を通して不安様行動が増強すること、低Na血症の補正によりそれらが改善することを明らかになり、低Na血症の予防および治療が重要であることが改めて示された。また、低Na濃度環境がミクログリアの機能に影響することも明らかとなり、慢性低Na血症患者における神経機能の変化に関与している可能性が示唆された。

1. 研究目的

低ナトリウム(Na)血症は、電解質異常症の中で最も頻度が高い疾患である。従来、慢性の低Na血症においては、

脳が低Na血症に対して適応するため、慢性の安定した低Na血症は無症状であると考えられてきた。しかし、軽度の慢性低Na血症患者において認知機能障害、歩行時の

バランス障害などの神経症状が認められ、転倒、骨折のリスクが増加し Quality of life (QOL) の低下及び生命予後の悪化などの疫学的調査結果が報告されてきた。しかしながら、慢性低 Na 血症による神経症状の発症機構について検討した研究は少なく、低 Na 血症により神経症状が生じるメカニズムについてはほとんど明らかにされていなかった。

そこで、我々は、不適切抗利尿症候群 (Syndrome of inappropriate antidiuresis: SIAD) による慢性低 Na 血症モデルラットを作製し、それらを用いて行動解析、電気生理学的・分子生物学的解析を行い、慢性低 Na 血症により記憶障害、歩行障害が生じること、さらにそのメカニズムについて明らかにしてきた⁽¹⁾。その研究の中で、慢性低 Na 血症モデルラットが不安様行動の増強を示すことが示唆された。また、我々は 70 歳以上の高齢者を対象とした臨床研究においても、軽度の低 Na 血症が抑うつ症状と関連していることを明らかにしている⁽²⁾。しかしながら、慢性低 Na 血症による精神異常のメカニズムおよびその治療法については明らかとなっていない。

多くの脳部位が不安様行動と関連しているが、特に扁桃体は重要な役割を果たしており、さらに、多種類の神経伝達物質が不安様行動の発現に関与している。扁桃体には、特に、縫線核からのセロトニン (5-HT) ニューロンが強く投射しており、実験動物において、薬理的または、光遺伝学的に扁桃体の 5-HT 作用を調節することにより、不安様行動が変化することが報告されている⁽³⁻⁵⁾。また、ヒトにおいても、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) は、感情的刺激に対する扁桃体の活動に影響を与えることが報告されている⁽⁶⁾。このように、5-HT は、扁桃体機能の調節を介して感情の表出に影響することが示唆されている。さらに、ドーパミン (DA)、ノルアドレナリン (NA) も扁桃体の機能の変化を通じて、不安様行動を調節していることが報告されている^(7, 8)。

中枢神経系の細胞は、低 Na 血症に対して適応することができる。具体的には、急性期には、細胞外 Na 濃度・浸透圧が低下して水が細胞内へ移動し細胞が膨張する。その後、細胞は、電解質、およびミオイノシトール、グルタミン酸などの浸透圧性物質の放出を介して細胞内の水を減少させ、細胞膨張を軽減させる。このように、慢性期には、細胞の体積は正常化する。しかし、この低 Na 血症に対する

適応の結果、神経伝達物質を含めた細胞内の浸透圧物質は正常時と比べて減少している。このため、不安様行動に関連する、5-HT や DA、NA についても低 Na 血症の状態では変化していることが示唆される。

そこで、今回の研究では、申請者のグループが開発した SIAD モデルマウスを用いて、慢性低 Na 血症による不安様行動のメカニズムの解明および低 Na 血症の補正による不安様行動の可逆性を評価することを目的とした。また、高齢者の臨床データを用いて、低 Na 血症とフレイルの関連性の解析を行うことも目的としている。

また、我々は、低 Na 血症を補正することにより、記憶障害、歩行障害が改善することも見出し^(1, 9)、慢性低 Na 血症の補正が臨床的にも重要であることが明らかとなっている。しかしながら、慢性低 Na 血症の治療時に、急激に血清 Na 濃度が上昇すると中枢神経系の脱髄を生じ、意識障害、四肢麻痺、偽性球麻痺、呼吸障害等の一部は不可逆的な症状を呈し、しばしば致命的となる浸透圧性脱髄症候群 (osmotic demyelination syndrome: ODS) を発症することがある。我々は、ODS の発症にミクログリアの活性化が重要であることを明らかにしてきた^(10, 11)。

中枢神経系内のマクロファージ様の免疫細胞であるミクログリアは神経発達、恒常性の維持、組織障害や感染に対する反応に重要な役割を有する。また、ミクログリアはシナプスの機能調節にも関与する。さらに、ミクログリアは、多発性硬化症、筋委縮性側索硬化症、アルツハイマー病や精神疾患の発症にも関与している。ミクログリアは外部刺激や病原生物に反応すると活性化され、一酸化窒素 (NO)、tumor necrosis factor alpha (TNF- α)、interleukin-1beta (IL-1 β) 等のサイトカインを産生し、外部刺激による神経障害をさらに悪化させることもある。我々は、ODS の病態において、脱髄病変に多数のミクログリアが凝集し、IL-1 β 、TNF- α 、誘導型 NO 合成酵素 (NOS2) の発現が上昇することを見出し^(10, 11)。また、ODS モデルラットにおいて低 Na 血症の治療前にデキサメタゾンまたはミノサイクリンを投与することにより、ミクログリアの活性化を抑制することで、ODS の発症率を低下させることを見出してきた。しかしながら、ODS で認められるミクログリアの活性化が急激な血清 Na 濃度上昇の直接的な影響によるのか、組織障害等による二次的なものであるかはわかっていない。

さらに、慢性低 Na 血症のミクログリアへの直接的な影響も不明である。

これまでに、細胞外 Na 濃度がマクロファージ, helper T 細胞, regulatory T 細胞の機能に影響することが数多く報告されているが、これらの報告のほとんどは高 Na 濃度の免疫機能への影響である。特に、マクロファージについては、細胞外高 Na 濃度が nuclear factor of activated T cells-5 (NFAT5) の発現を増加させ、これにより、NOS2 依存性の NO 産生が増加することが報告されている⁽¹²⁾(NFAT5 は当初、腎臓の髄質において高浸透圧に反応する転写因子として同定された遺伝子である⁽¹³⁾)。しかしながら、低 Na 濃度の免疫機能に与える影響、特にミクログリアに与える影響については明らかになっていない。

そこで、我々は、ミクログリア細胞株 BV-2 と 6-3 細胞を用いて低 Na 濃度およびその急速補正のミクログリアへの影響を評価した。また、そのメカニズムとして、NFAT5 を介する調節機構についても評価を行った。

2. 研究方法

2.1 モデル動物作製

8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに液体食投与とデスマプレシン酢酸塩水和物 (dDAVP) の持続皮下注を行った。dDAVP の用量はコントロール群 0.03 ng/h、慢性低 Na 血症群 0.3 ng/h とした (Fig. 1A)。慢性低 Na 血症群のマウスはコントロール群と比較して、安定して血清 Na 濃度が低下することを報告している⁽⁹⁾ (Fig. 1B)。各種実験は、

dDAVP 投与開始後、2 週間以上経過してから行った。また、液体食投与および dDAVP の持続皮下注の中止により、低 Na 血症の補正を行った。

2.2 行動解析

2.2.1 オープンフィールドテスト

40×40 cm の箱にマウスを入れ、30 分間、マウスの行動を記録した。そして、全移動距離、立ち上がり回数、中央区画滞在時間を記録した⁽¹⁴⁾。

2.2.2 明暗選択テスト

明箱と暗箱を連結させた装置の暗箱にマウスを入れ、10 分間、マウスの行動を記録した。そして、明箱と暗箱内でのそれぞれの移動距離、滞在時間、および明箱と暗箱を行き来した回数を測定した⁽¹⁴⁾。

2.3 モノアミン含有量測定

モノアミンおよび、その代謝産物は HPLC システム (HTEC-500, Eicom) で測定した⁽¹⁵⁾。凍結させた脳各部位のサンプルの重量を測定し、インターナルスタンダードとして isoproterenol を含んだ 0.2 M perchloric acid に入れて、超音波破碎装置でホモジェネートした。ホモジェネートは 20000 g, 15 分で遠心し、上清を 1 M sodium acetate で pH 3.0 に調整し、HPLC システムにインジェクトした。

2.4 トリプトファン含有量の測定

トリプトファンの含有量は HPLC システム (島津製作所) を用いて、既報の通り測定を行った⁽¹⁶⁾。

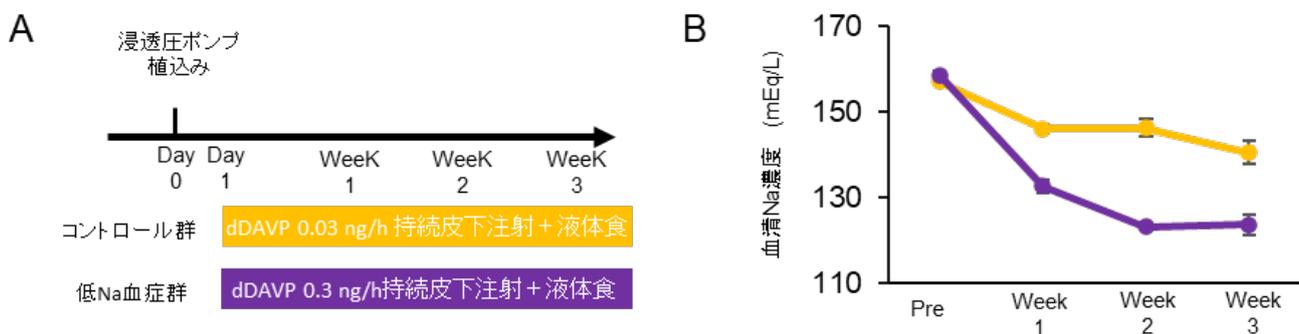


Fig. 1. 慢性低 Na 血症モデルマウスの作製

(A) 動物実験プロトコール.

(B) 血清 Na 濃度 黄色:コントロール群 紫:低 Na 血症群

2. 5 細胞培養

マウスミクログリア細胞株である, BV-2と6-3細胞を用いた。低 Na 濃度 (Low salt; LS) 群では, 低 Na 濃度に適応させるため, 1~2 日毎に培養液の Na 濃度を徐々に低下させた。コントロール群では, 1~2 日毎に培養液を通常の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で交換を行った (Fig.6A)。また, マンニトールを添加し, 低 Na 濃度であるが, 浸透圧はほぼコントロール群と同等である LS + Mannitol 群を作製した。また, 低 Na 濃度の急速補正の影響の評価を行うために, 低 Na 濃度を誘導した後, 通常の DMEM に変える LS + Correction 群を作製した (Fig.7A)。最後の培養液交換時に, LPS 刺激群では, LPS を添加した (NO 産生量の評価時は 100 ng/mL, それ以外は, 10 ng/mL の LPS を使用した)。最後の培養液交換後, 6 時間後または 24 時間後に細胞の評価を行った。

2. 6 Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RNeasyMini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて細胞から RNA を抽出した。それらの RNA は, ReverTra Ace quantitative qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写し, cDNA を作製した。さらに, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて, qPCR を行った。目的遺伝子の mRNA 発現量は, *Actb* の mRNA 発現量で補正を行った。

2. 7 Western blotting (ウェスタンブロット)

RIPA buffer を用いて, 組織・細胞溶解液を作製し, polyacrylamide gel 電気泳動を行い, メンブレンに転写したのち, NFAT5 Polyclonal Antibody (PA1-023, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) (D3E5I) XP® Rabbit mAb #51124 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), monoclonal anti- β -actin antibody clone AC-74 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いて免疫染色を行った。

2. 8 一酸化窒素 (NO) 濃度測定

培養液の NO 濃度は Griess Reagent System (Promega, Madison, WI) を用いて測定を行った。

2. 9 Immunocytochemistry (免疫細胞化学)

細胞は, 4% paraformaldehyde で 10 分間固定後, 0.3% Triton X-100 で 10 分間透過処理を行った。細胞は, NFAT5 Polyclonal Antibody (PA1-023, Thermo Fisher Scientific) で染色を行い, DAPI (D212, DOJINDO

LABORATORIES, Kumamoto, Japan) で核染色を行った。染色した細胞は, コンフォーカルレーザー顕微鏡 (LSM710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で撮影を行った。それらの画像において, CellProfiler を用いて核・細胞質比の解析を行った。

2. 10 NFAT5 過剰発現株の作製

ドキシサイクリン (DOX) 投与下で NFAT5 と GFP を発現する PiggyBac トランスポゾンベクターを作製した (VectorBuilder, Chicago, IL) (pPB[TetOn]-TRE>mNfat5:T2A:EGFP-rev[CBh>tTS:T2A:rtTA:P2A:Puro])。このプラスミドと PBase を発現するプラスミドを K4® Transfection system (Biontex Laboratories, Munich, Germany) を用いて, BV-2 にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞は, 5 μ g/mL puromycin の存在下で選択を行った。Puromycin 耐性の細胞において, DOX (D5207, Sigma-Aldrich) を投与し, NFAT5 と GFP の発現を誘導した。次に, これらの細胞において, MoFlo Astrios sorter (Beckman Coulter, Brea, CA) を用いて GFP の蛍光の強い細胞を選択し, 96 well プレートにまいてクローニングを行った。DOX 投与後, RT-qPCR と western blotting で NFAT 発現量の高いクローンの選択を行った。

2. 11 Magnetic-activated cell sorting (MACS)

コントロール群のマウスはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で, 低 Na 血症群のマウスは 0.8 倍に薄めた PBS で灌流した後, 大脳皮質を摘出した。Neural Tissue Dissociation Kit—Postnatal Neurons (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて組織を分散・破碎した。Myelin Removal Beads II (Miltenyi Biotec) でミエリンデブリを除去し, 抗 CD16/CD32 抗体 (14-0161-82, Thermo Fisher Scientific) で Fc ブロックを行った後, 抗 CD11b microBeads (130-093-634, Miltenyi Biotec) を反応させた。CD11b 陽性ミクログリアは, autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) で単離した。

2. 12 疫学的検討

血清 Na 濃度異常とフレイルティの関連を調べるため, 横断研究を行った。2010 年から 2017 年の間に, 国立長寿医療研究センター物忘れ外来を受診した 70 歳以上の男女 4617 人を対象とした。

(1) 重度の腎機能障害 (estimated glomerular filtration rate [eGFR] < 15 mL/min/1.73 m²), (2) 肝酵素の上昇 (aspartate

aminotransferase [AST] and/or alanine aminotransferase [ALT]) > five times the upper limit of normal), (3) 甲状腺機能低下症 (thyroid-stimulating hormone [TSH] > 10 μ U/mL), (4) 重度の貧血 (serum hemoglobin [Hb] < 8.0 mg/dL), (5) 高血糖 (serum glucose > 400 mg/dL), (6) 利尿薬服用中の患者は除外した。

フレイルティは各患者において、Frailty Index (FI) score を算出し⁽¹⁷⁾, non-frail group (total FI score \leq 0.2), mildly frail group ($0.20 <$ total FI score \leq 0.3), moderately frail group ($0.3 <$ total FI score $<$ 0.4), and severely frail group ($0.4 \leq$ total FI score) に区分した。

また、血清 Na 濃度 < 136 mEq/L を低 Na 血症、血清 Na 濃度 \geq 146 mEq/L を高 Na 血症と定義した。

低および高 Na 血症の頻度の各 frail group 間の差は、chi-square test を用いて解析した。低および高 Na 血症と FI score,

FI domain scores の関連性は Multiple logistic regression model を用いて評価した。

3. 研究結果

3.1 行動解析

オープンフィールドテストでは、全移動距離 (Fig. 2A), 立ち上がり回数 (Fig. 2B) にコントロール群と低 Na 血症群で有意差を認めず、活動性については両群間で差がないことが示された。また、中央区画滞在時間は有意に低 Na 血症群で短く (Fig. 2C), 低 Na 血症群で不安様行動が増強していることが示唆された。

また、明暗選択テストでは、明室の滞在時間 (Fig. 2D), 明室内での移動距離 (Fig. 2E), 明室と暗室の移動回数 (Fig. 2F) は、コントロール群と比較して、低 Na 血症群で有意に小さく、オープンフィールドテストの結果と合わせて、不安様行動が低 Na 血症群で増強していることが示された。

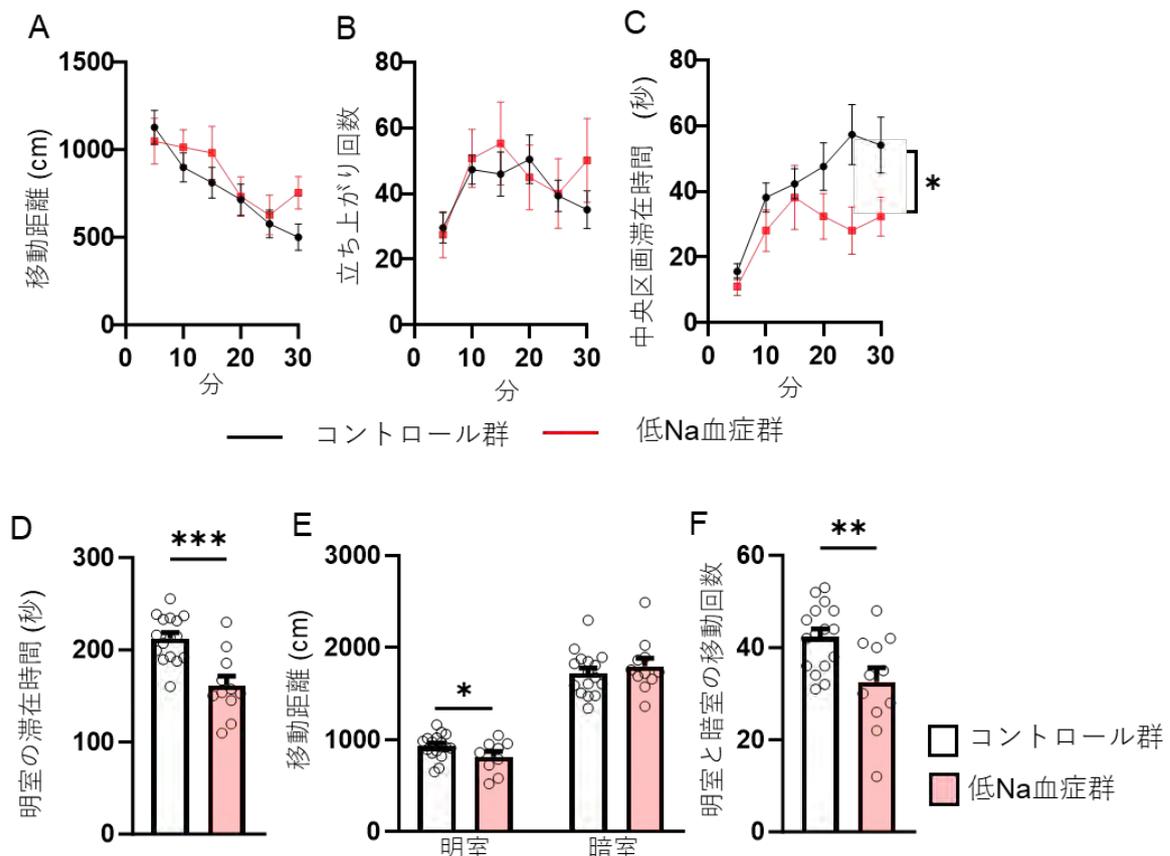


Fig. 2. 慢性低 Na 血症は不安様行動を増強する

(A~C) オープンフィールドテストの結果; (A) 全移動距, (B) 立ち上がり回数, (C) 中央区画滞在時間 (D~F) 明暗選択テストの結果; (D) 明室の滞在時間, (E) 明室および暗室内での移動距離, (F) 明室と暗室の移動回数。コントロール群 n = 16, 低 Na 血症 n = 11, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

3. 2 脳各部位のモノアミン含有量

前頭前野, 側坐核, 線条体, 海馬, 扁桃体でモノアミン含有量の測定を行った。特に, 扁桃体において, コントロール群と比較して低 Na 血症群で 5-HT, DA 含有量の低下, NA 含有量の増加を認めた (Fig.3 A, D, H)。他の部位では, 両群間に有意差を認めなかった。

また, 扁桃体において, 5-HT, DA, NA それぞれの代謝産物, 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 3,4-

Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), Homovanillic acid (HVA), 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) との比を計算し, 各モノアミンの代謝回転の指標としたが, コントロール群, 低 Na 血症群間に有意差を認めなかった (Fig.3. B, C, E-G, I, J)。

さらに, 5-HT の前駆体であるトリプトファン含有量 (Fig. 3K) および, 5-HT 合成の律速酵素である TPH-2 の発現量 (Fig. 3L) に両群間で有意差を認めなかった。

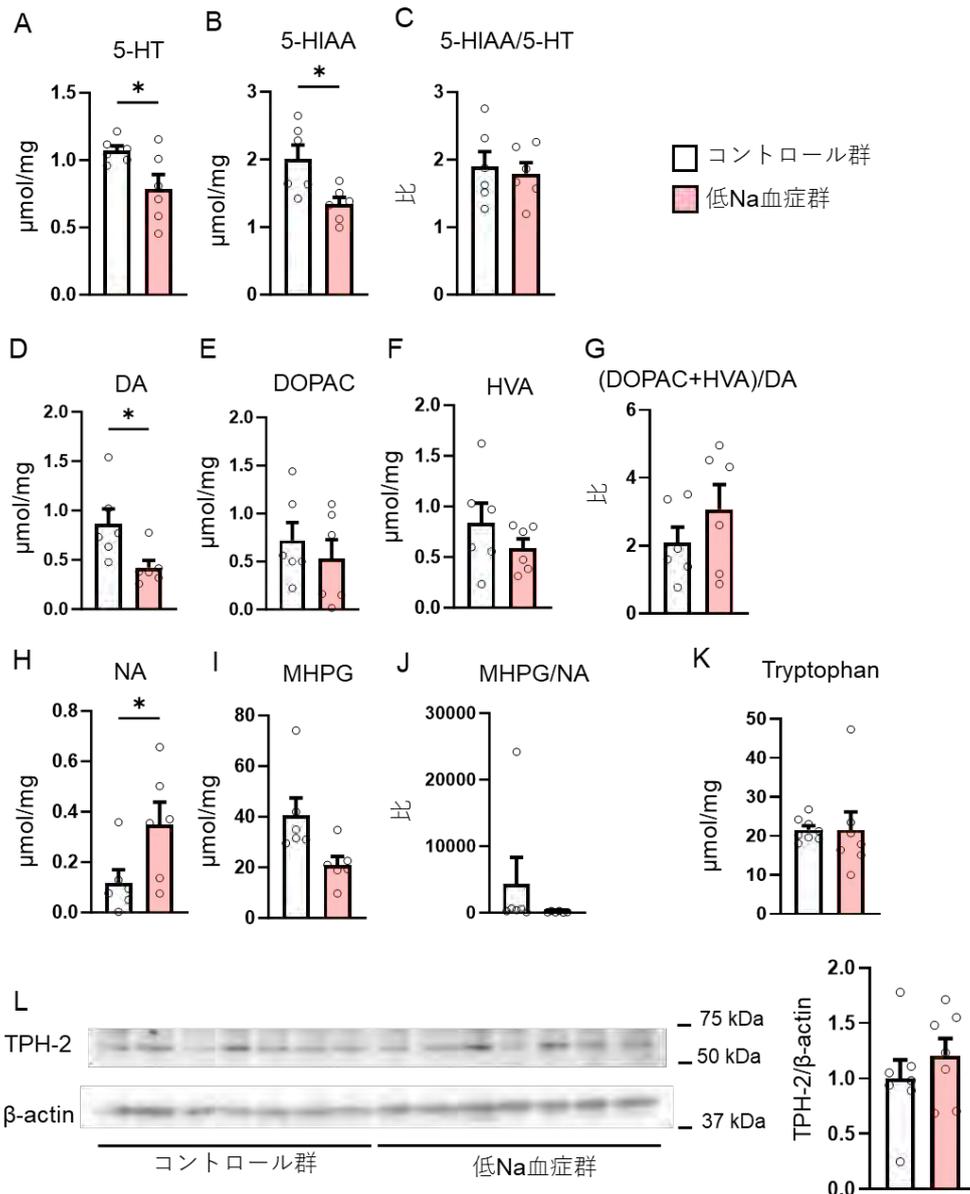


Fig. 3. 慢性低 Na 血症による扁桃体のモノアミン含有量の変化

(A~J) 扁桃体のモノアミンおよびその代謝物の含有 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ tissue); (A) Serotonin (5-HT), (B) 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), (C) 5-HT の代謝回転 (5-HIAA/5-HT), (D) Dopamine (DA), (E) 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), (F) Homovanillic acid (HVA), (G) DA の代謝回転 (DOPAC+HVA/DA), (H) Noradrenaline (NA), (I) 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), (J) NA の代謝回転 (MHPG/NA)。n=6。 (K) 扁桃体の Tryptophan 含有量 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ tissue), コントロール群 n=8, 低 Na 血症群 n=7。 (L) TPH-2 のタンパク発現量。n=6。*P<0.05。

3. 3 慢性低 Na 血症補正後の変化

液体食および dDAVP 持続投与中止 1 か月後, コントロール群と慢性低 Na 血症補正群(補正群)間で血清 Na 濃度に有意差を認めなかった(Fig. 4A)。

オープンフィールドテストでは, 全移動距離(Fig. 4B), 立ち上がり回数(Fig. 4C), 中央区画滞在時間(Fig. 4D)にコントロール群と補正群で有意差を認めなかった。さらに, 明暗選択テストでも, 明室の滞在時間(Fig. 4E), 明室内での移動距離(Fig. 4F), 明室と暗室の移動回数(Fig. 4G)は,

コントロール群と補正群に有意差を認めなかった。これらのことから, 低 Na 血症を補正することにより, 不安様行動は減弱することが示唆された。

さらに, コントロール群と補正群で, 扁桃体の 5-HT (Fig. 5A)と DA (Fig. 5D)含有量に有意差を認めなかった。NA 含有量(Fig. 5H)については, 補正群で有意に低下していた。5-HT, DA および NA の代謝回転に両群間で有意差を認めなかった(Fig. 5B, C, E-G, I, J)。

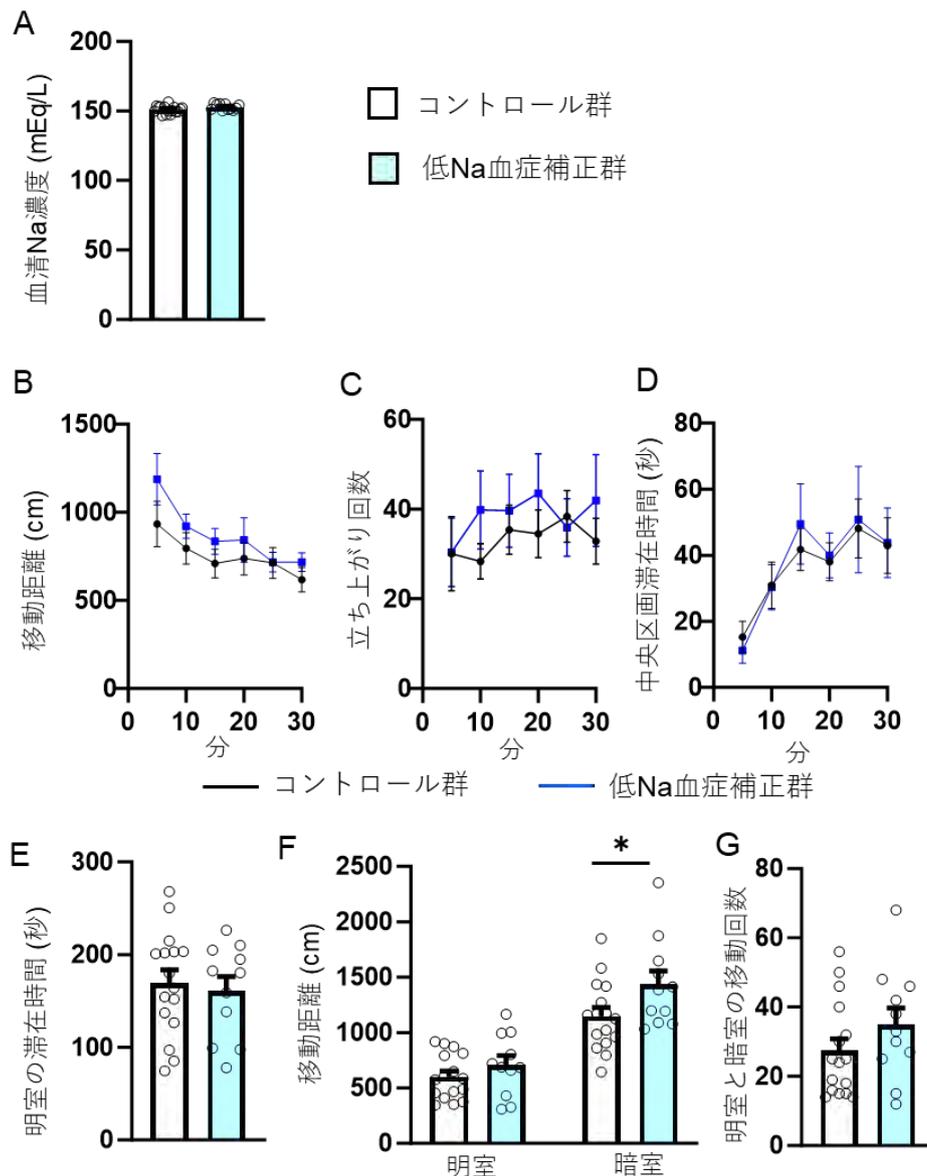


Fig. 4. 慢性低ナトリウム血症の補正により, 不安様行動の増強は改善する

(A) 血清 Na 濃度。(B-D) オープンフィールドテストの結果; (B) 全移動距離, (C) 立ち上がり回数, (D) 中央区画滞在時間。(E-G) 明暗選択テストの結果; (E) 明室の滞在時間, (F) 明室および暗室内での移動距離, (G) 明室と暗室の移動回数。コントロール群 n=16, 低 Na 血症補正群 n=11。*P<0.05。

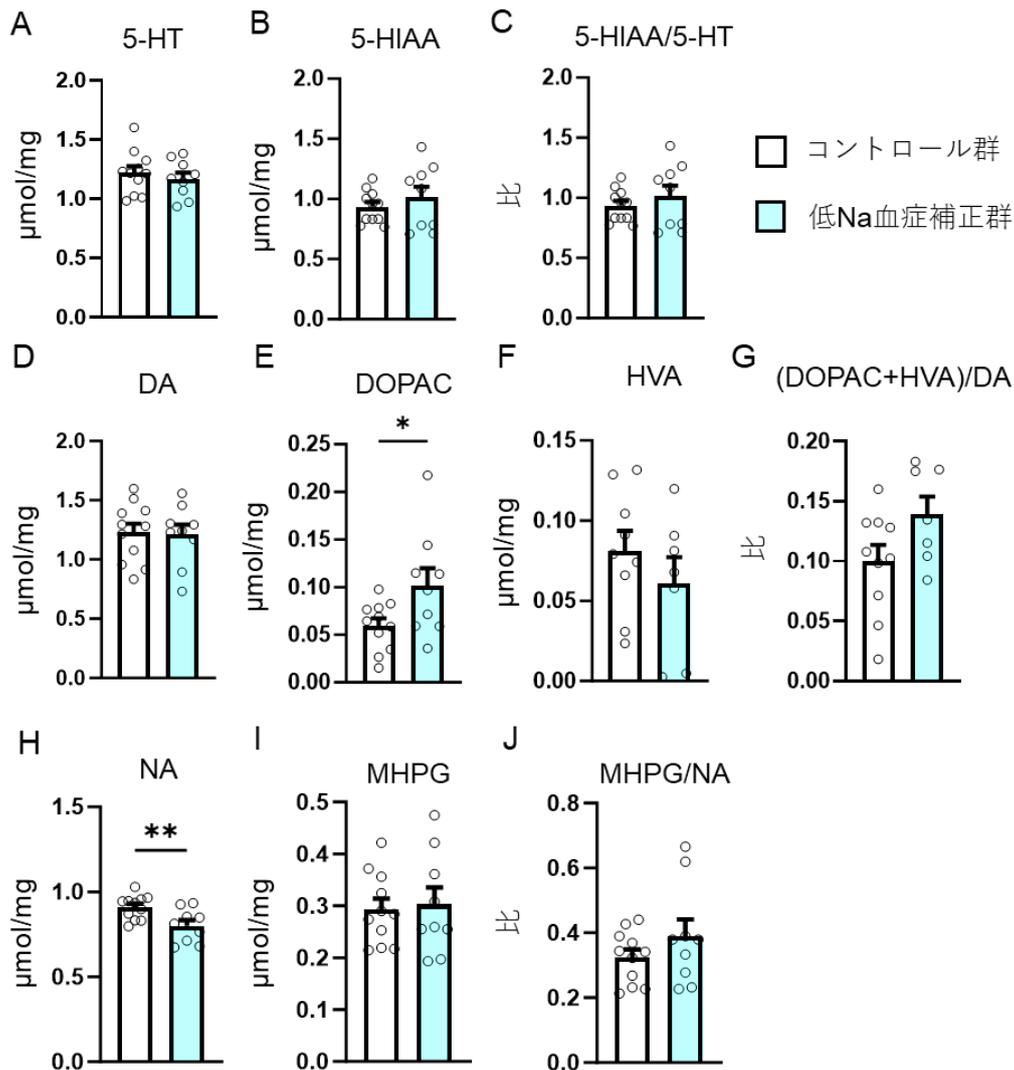


Fig. 5. 慢性低 Na 血症補正後の扁桃体のモノアミン含有量の変化

扁桃体のモノアミンおよびその代謝物の含有量 (μmol/mg tissue) ; (A) Serotonin (5-HT), (B) 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), (C) 5-HT の代謝物 (5-HIAA/5-HT), (D) Dopamine (DA), (E) 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), (F) Homovanillic acid (HVA), (G) DA の代謝回転 ([DOPAC+HVA]/DA), (H) Noradrenaline (NA), (I) 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), (J) NA の代謝回転 (MHPG/NA)。

コントロール群 n = 11, 低 Na 血症補正群 n = 9。*P<0.05; **P<0.01。

3. 4 低 Na 濃度のミクログリアの NOS2 発現および NO 産生への影響

Nos2 mRNA 発現量は, BV-2, 6-3 細胞ともに, LPS 刺激あり, なし, いずれの状態においても, 培養液交換後, 6時間後, 24時間後に, LS 群で有意に低下した (Fig.6B, D)。NO 産生量も BV-2, 6-3 細胞とも, LPS 刺激下, 有意に LS 群で低下した (Fig.6C, E)。

次に, LS による *Nos2* mRNA 発現量, NO 産生量の低下が, 低 Na 濃度によるのか, 浸透圧の低下によるのか検討を行った。LPS 刺激なしの状態では, BV-2, 6-3

細胞ともに, *Nos2* mRNA の発現は, LS+Mannitol 群において, LS 群とほぼ同等に低下した (Fig.6 B, D)。対照的に, LPS 刺激ありの状態では, BV-2 における LPS 刺激 6 時間後の *Nos2* mRNA 発現量と BV-2, 6-3 細胞の NO 産生量は, LS 群と比較して, LS+Mannitol 群では有意に上昇していた。この結果から, ミクログリアは, LPS 刺激なしの状態では, 低 Na 濃度のみに反応し, LPS 刺激ありの状態では, 低 Na 濃度と低浸透圧の両者に反応していると推察された。

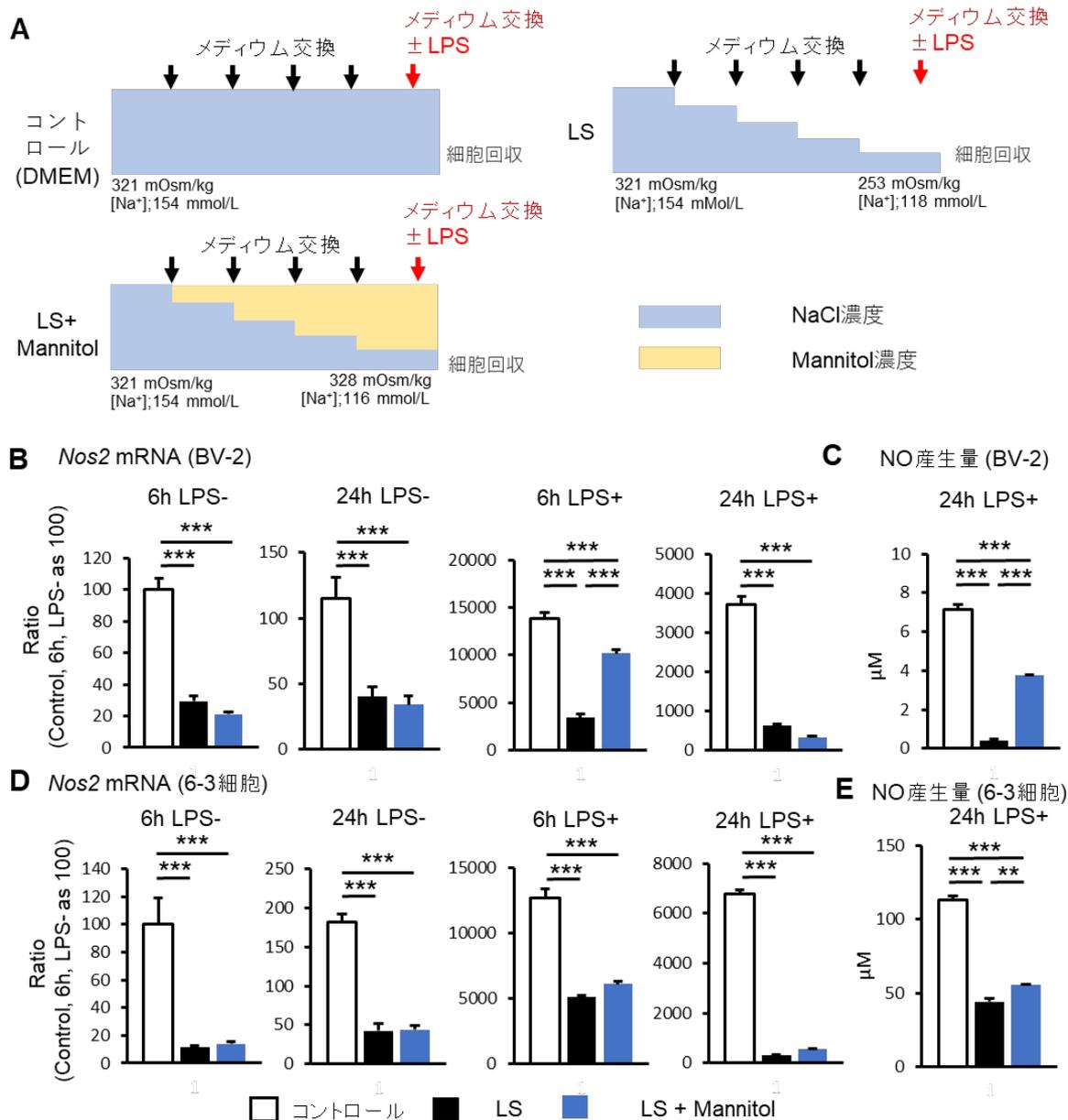


Fig. 6. 低 Na 濃度 (LS) の *Nos2* mRNA 発現と NO 産生への影響

(A) LS 群と LS+Mannitol 群の作製方法。(B, C) BV-2 の *Nos2* mRNA 発現量 (B) と NO 産生 (C)。(D, E) 6-3 細胞の *Nos2* mRNA 発現量 (D) と NO 産生量 (E)。n = 5~6。** p < 0.01 ; *** p < 0.001。

3. 5 低 Na 濃度の急速補正のミクログリアへの直接的な影響

BV-2 において、LPS 刺激なしの 6, 24 時間後および LPS 刺激ありの 6 時間後では、*Nos2* mRNA の発現量は、LS 群と LS+Correction 群間では有意差を認めなかった (Fig. 7B)。

また、NO 産生量は、LS+Correction 群においては、LS 群と比較して、有意に上昇したが、コントロール群と比べ

て有意に小さかった (Fig. 7C)。6-3 細胞では、*Nos2* mRNA の発現量は、LPS 刺激なしの 24 時間後、LPS 刺激ありの 6 時間、24 時間後で、LS 群と比較して、LS+Correction 群で有意に増加した (Fig. 7D)。NO 産生量も LS 群と比較して、LS+Correction 群で有意に増加した (Fig. 7E)。これらの結果から、低 Na 血症の急速補正は、ミクログリアの *Nos2* mRNA 発現量および NO 産生を少なくとも部分的に上昇させることが示唆された。

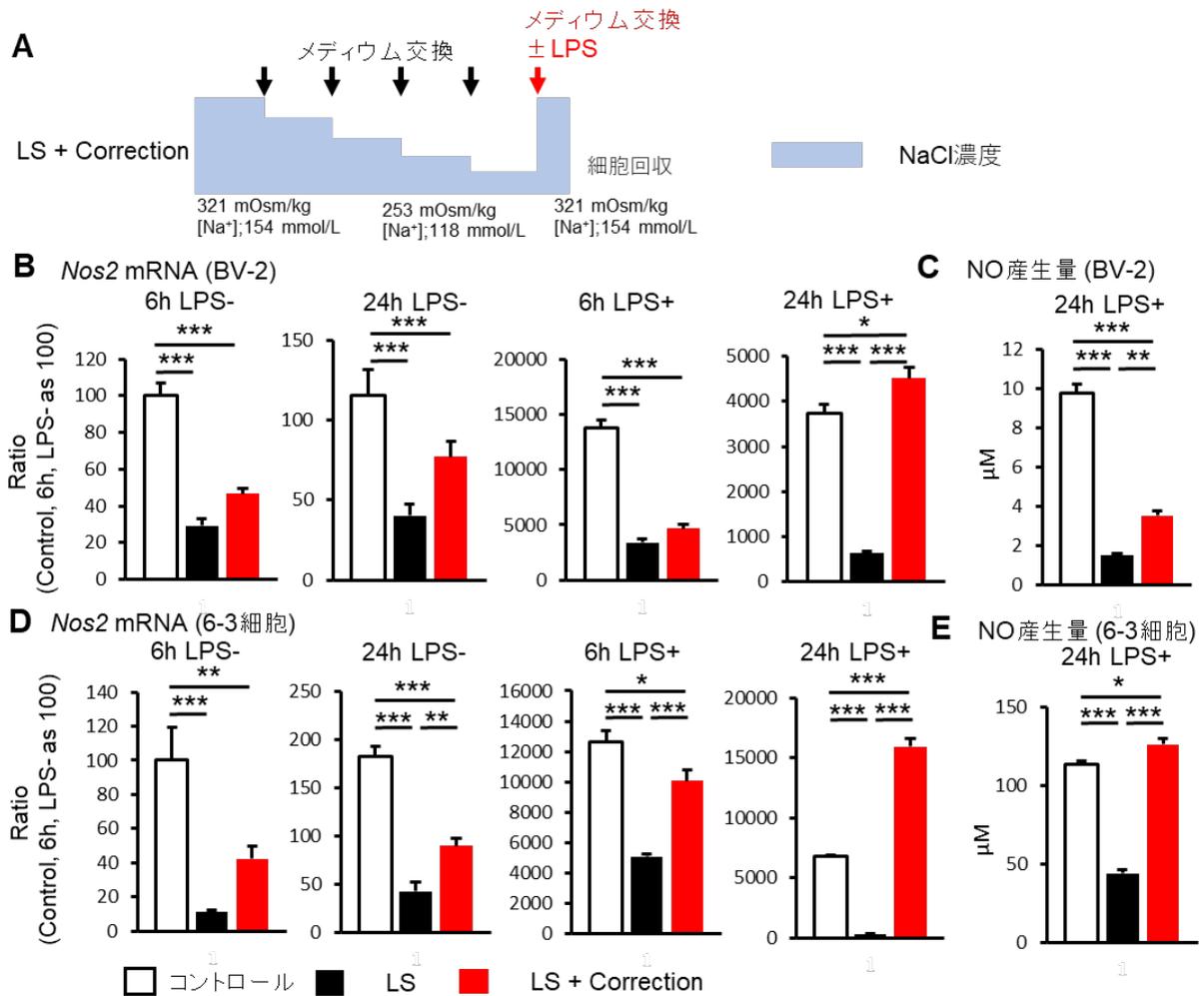


Fig. 7. 低 Na 濃度 (LS) の急速補正の影響

(A) LS の誘導とその急速補正の方法。(B, C) BV-2 の *Nos2* mRNA 発現量 (B) と NO 産生量 (C)。(D, E) 6-3 細胞の *Nos2* mRNA 発現量 (D) と NO 産生量 (E)。n = 5~6。* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001。

3. 6 低 Na 濃度の NFAT5 の発現量への影響

Nfat5 mRNA の発現量は、BV-2、6-3 細胞ともに、コントロール群と比較して LS 群では、有意に低下した (Fig. 8A, C)。NFAT5 タンパク量も、LS 群で有意に低下していた (Fig. 8 B, D)。LS + Mannitol 群においても、*Nfat5* mRNA 発現量、タンパク量ともにほぼ LS 群と同じレベルまで低下していた。このことから、NFAT5 は低浸透圧ではなく、低 Na 濃度に反応して、発現量が低下することが示された。また、LS + Correction 群では、NFAT5 の mRNA 発現量、タンパク量ともに LS と比較して有意に上昇していた (Fig. 9A~D)。

3. 7 低 Na 濃度の NFAT5 の核内移行への影響

NFAT5 の活性は核内移行によっても調節されることが知られている。そこで、低 Na 濃度の NFAT5 の核内移行への影響について、NFAT5 に対する免疫染色を行って評価した。

BV-2 において、Fig. 10 に示す通り、LPS 刺激に関わらず NFAT5 の核内移行は LS 群において有意に低下した。6-3 細胞においても、LPS 刺激なしの状態では、LS 群で NFAT5 の核内移行は有意に抑制されていた。

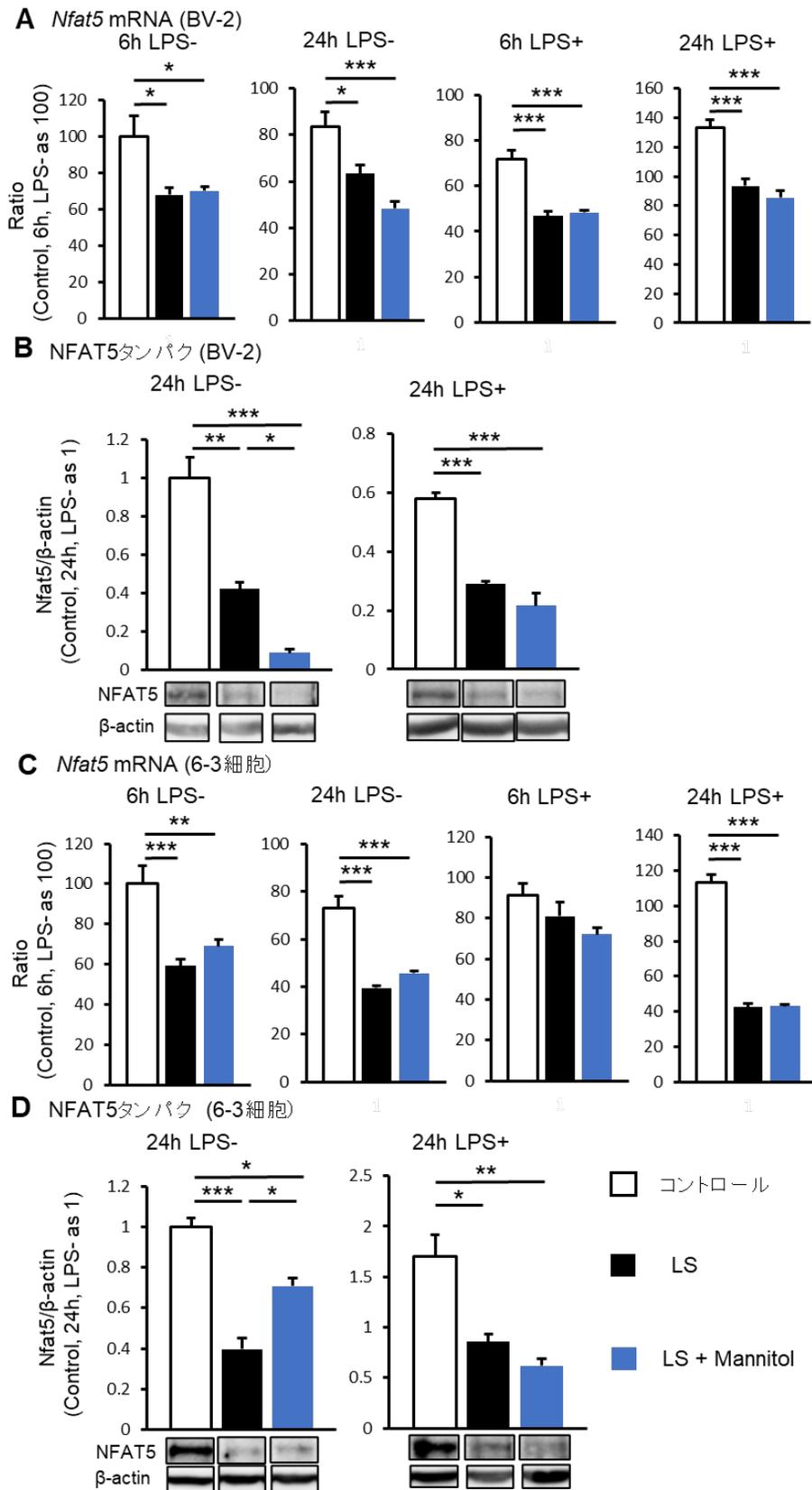


Fig. 8. 低 Na 濃度 (LS) の NFAT5 発現への影響

(A, B) BV-2 における *Nfat5* mRNA 発現量 (A) とタンパク発現量 (B)。

(C, D) 6-3 細胞における NFAT5 mRNA 発現量 (C) とタンパク発現量 (D)。n = 5~6。* p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001.

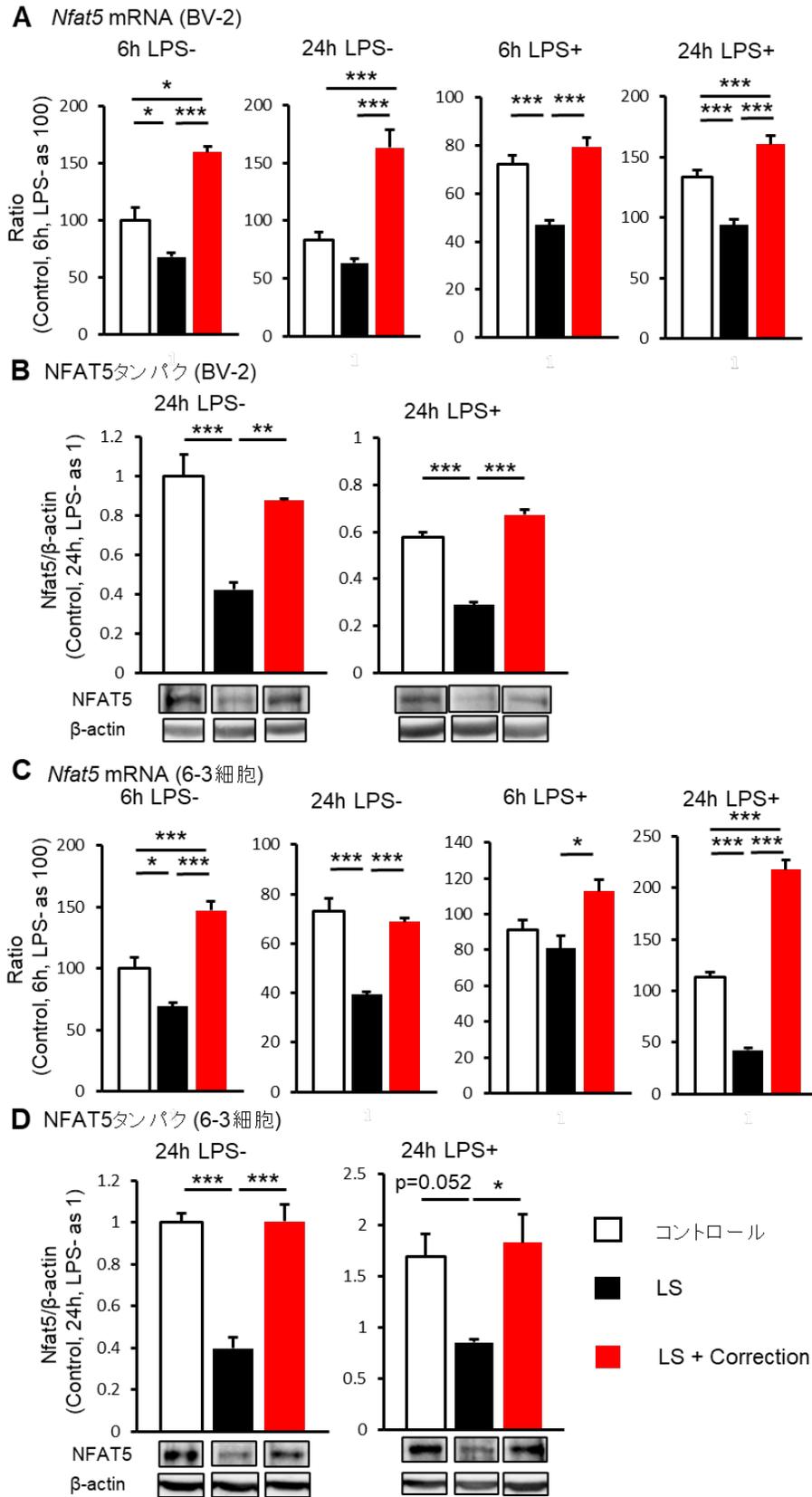


Fig. 9. 低 Na 濃度 (LS) の急速補正の NFAT5 発現への影響

(A, B) BV-2 における *Nfat5* mRNA 発現量 (A) とタンパク発現量 (B)。

(C, D) 6-3 細胞における NFAT5 mRNA 発現量 (C) とタンパク発現量 (D)。n=5~6。*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001。

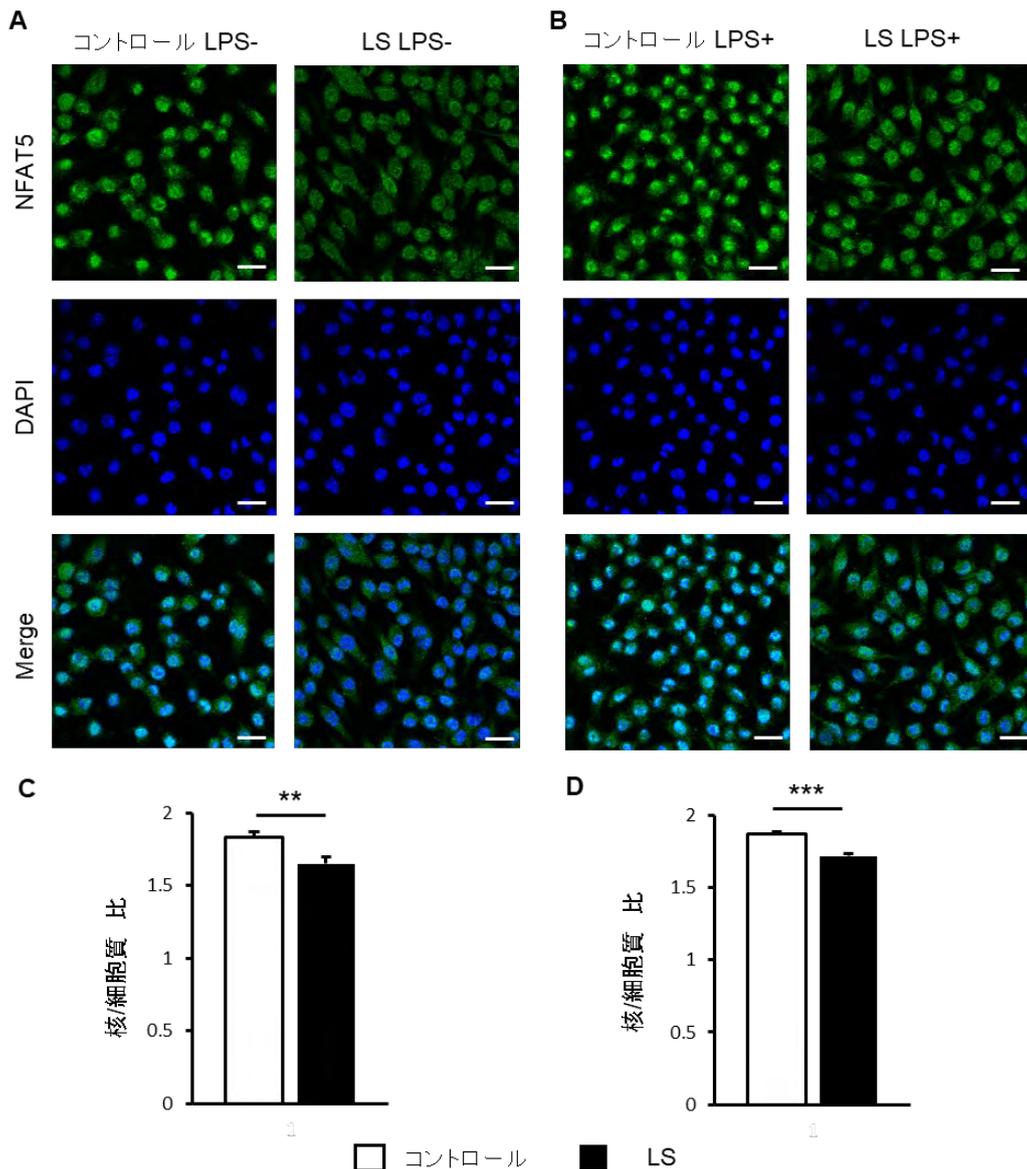


Fig. 10. 低 Na 濃度 (LS) の NFAT5 の核内移行への影響

(A, B) BV-2 の NFAT5 免疫染色像。NFAT5 (緑), DAPI (青); (A) LPS なし, (B) LPS あり。スケールバー: 20 μ m。
(C, D) NFAT5 の蛍光強度の核/細胞質比の計測結果; (C) LPS なし, (D) LPS あり。** p < 0.01; *** p < 0.001.

3. 8 低 Na 濃度下での NFAT5 の過剰発現の影響

BV-2 において, DOX 誘導性の NFAT5 過剰発現株を作製した。この細胞を用いて, 低 Na 濃度下で NFAT5 の過剰発現により *Nos2* mRNA の発現量および NO 産生量の低下をレスキューできるかを評価した。

ナイーブ BV-2 に DOX を添加すると既報⁽¹⁸⁾の通り, *Nos2* mRNA 発現量, NO 産生量は低下したが, NFAT5 の発現には影響を与えなかった (Fig. 11A~C)。DOX 誘導性 NFAT5 過剰発現株においては, DOX を加えることにより, *NFAT5* mRNA 発現量, タンパク量

ともに増加した (Fig. 11D, E)。LS 群において, NFAT5 を過剰発現することにより, *Nos2* mRNA 発現量 (Fig. 11F) および NO 産生量 (Fig. 11G) ともに有意に増加した。このことから, 低 Na 濃度により, NFAT5 を介して *Nos2* mRNA 発現量, NO 産生量が低下することが示された。

3. 9 *In vivo* での低 Na 血症のミクログリアへの影響

コントロール群のマウスの大脳皮質から単離したミクログリアと比較して, 低 Na 血症群のマウスから単離したミクログリアでは, *Nfat5* と *Nos2* mRNA 発現量が有意に低下していた (Fig. 12)。

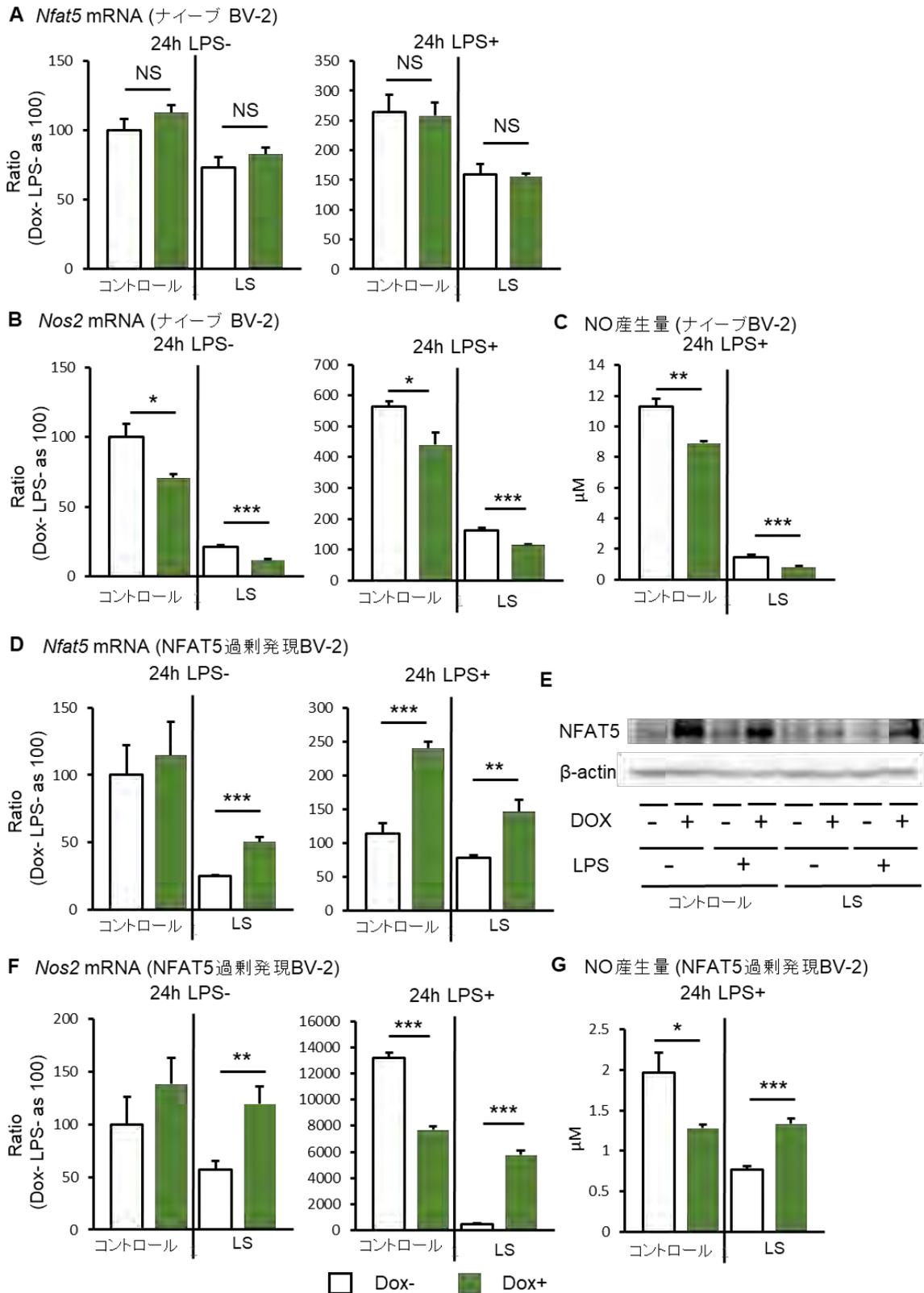


Fig. 11. NFAT5 過剰発現の影響

(A~C) ナイーブ BV-2 における *Nfat5* (A), *Nos2* (B) mRNA 発現量と NO 産生量 (C)。
 (D~G) ドキシサイクリン (Dox) 誘導性 NFAT5 過剰発現 BV-2 における *Nfat5* mRNA 発現量 (D), NFAT5 タンパク発現量 (E), *Nos2* mRNA 発現 (F) と NO 産生量 (G)。n = 5~6。* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001。

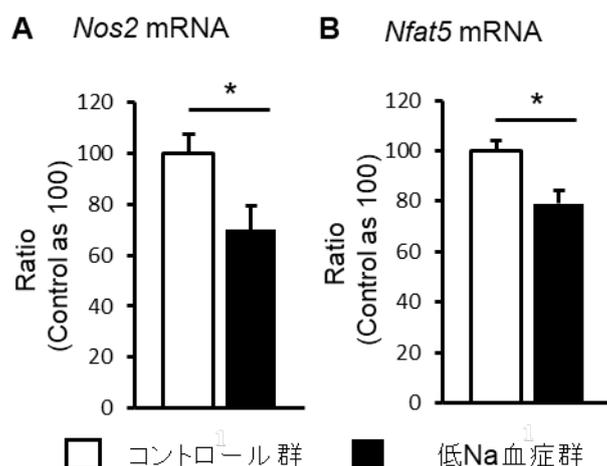


Fig. 12. 慢性低 Na 血症モデルマウスから MACS で単離したミクログリアの解析
マウス大脳皮質から MACS で単離したミクログリアの *Nos2* (A) と *Nfat5* (B) mRNA 発現量。n = 5, * p < 0.05.

3. 10 ヒトにおける低 Na 血症とフレイルの関連性

395 人が除外基準に相当し、合計 4204 人について検討を行った。

年齢、性別、教育期間、Ca 製剤の使用、ビスフォスフォネートの使用、AST、CRP、貧血、高血糖で補正後も FI score が高い群で、有意に低および高 Na 血症の odds ratio が増加した (Table 1)。

FI を項目別に評価すると、低 Na 血症は、Basic ADL, Instrumental ADL, Physical function, Nutrition, Fall risks from physical weakness, Fall risks from comorbidities の項目の悪化と、高 Na 血症は Cognitive function and mood, Basic ADL, Instrumental ADL の項目の悪化とそれぞれ相関を認めた (Table 2)。

Table 1. フレイルティの重症度および Frailty Index (FI) の血清 Na 異常症への影響のロジスティック回帰分析

従属変数	独立変数	n	オッズ比 (95%信頼区間) ^a	n	オッズ比 (95%信頼区間) ^b
低 Na 血症	軽度フレイル (基準群: フレイルなし)	4060	1.63 (0.79-3.38)	3922	1.48 (0.71-3.10)
	中等度フレイル (基準群: フレイルなし)		2.12 (1.02-4.38)*		1.85 (0.89-3.85)
	重度フレイル (基準群: フレイルなし)		4.27 (2.14-8.54)**		3.63 (1.78-7.40)**
	FI (0.1 上昇毎)		1.53 (1.34-1.76)**		1.52 (1.31-1.75)**
	高 Na 血症		軽度フレイル (基準群: フレイルなし)		4089
高 Na 血症	中等度フレイル (基準群: フレイルなし)	4089	2.16 (1.20-3.89)*	3951	2.19 (1.21-3.95)**
	重度フレイル (基準群: フレイルなし)		2.04 (1.11-3.76)*		2.01 (1.07-3.8)*
	FI (0.1 上昇毎)		1.13 (0.99-1.29)		1.15 (1.01-1.32)*

^a 年齢、性別について調整。

^b 年齢、性別、教育期間、カルシウム製剤、ビスフォスフォネート、aspartate aminotransferase、C-reactive protein、貧血、高血糖について調整。

* p < 0.05, ** p < 0.01.

Table 2. Frailty Index (FI) 各ドメインスコアの 0.1 増加ごとの血清 Na 異常症に及ぼす影響のロジスティック回帰分析

ドメイン	併存疾患	認知機能と情緒	基本的 ADL	手段的 ADL
低 Na 血症	1.08 (0.93-1.26)	1.06 (0.99-1.14)	1.25 (1.15-1.37)**	1.10 (1.03-1.17)**
高 Na 血症	1.07 (0.93-1.23)	1.07 (1.01-1.14)*	1.12 (1.02-1.23)*	1.08 (1.02-1.15)*

ドメイン	身体機能	栄養状態	身体的虚弱による 転倒リスク	併存疾患による 転倒リスク
低 Na 血症	1.12 (1.03-1.21)**	1.11 (1.03-1.20)**	1.17 (1.09-1.25)**	1.15 (1.06-1.26)**
高 Na 血症	1.03 (0.97-1.10)	0.98 (0.91-1.06)	1.03 (0.96-1.09)	1.01 (0.94-1.09)

年齢, 性別, 教育期間, カルシウム製剤, ビスフォスフォネート, aspartate aminotransferase, C-reactive protein, 貧血, 高血糖について調整。

* p < 0.05, ** p < 0.01. ADLs : activities of daily living.

4. 考察

我々の慢性低 Na (ナトリウム) 血症モデルラットを用いた研究(1)において, オープンフィールドテストの結果, 慢性低 Na 血症により, 不安様行動が増強することが示唆されていたが, マウスモデルを用いた本研究でも同様の結果となり, 慢性低 Na 血症により不安様行動が増強することが示された。また, 我々の高齢者を対象とした疫学研究(2)でも低 Na 血症患者において, うつ様症状を有する率が高いことが明らかとなっている。

大脳皮質-辺縁系の神経回路の異常と不安様行動の関連性が明らかとなっているが, 本研究により, 慢性低 Na 血症による不安様行動の増強は, 扁桃体の機能異常との関連が示唆された。低 Na 血症マウスの扁桃体では, 5-HT (セロトニン) の含有量が低下していたが, 低 Na 血症の補正により, 不安様行動の改善とともに, 5-HT の含有量も正常化した。扁桃体の 5-HT 含有量の低下と不安様行動との関連が明らかとなっており^(19, 20), 慢性低 Na 血症による不安様行動の増強は 5-HT 含有量の低下と関連すると考えられる。慢性低 Na 血症モデルマウスでは, コントロール群と比較して, 5-HT の代謝回転に差はなく, 5-HT の分解については, 慢性低 Na 血症の影響はないと考えられる。また, 5-HT 産生の律速酵素である TPH-2 の発現量および, 5-HT の前駆体であるトリプトファン含有量にも有意差を認めなかった。これらのことから, 低 Na 血症が直接 TPH-2 の活性を抑制することや, 低 Na 血症への適応の過程で, 5-HT が細胞外に流出したことが推測される。

また, 低 Na 血症マウスでは, 扁桃体の DA 含有量の低下および NA 含有量の上昇を認めたが, 低 Na 血症の補正により, DA 含有量は正常化, NA 含有量はコントロール群と比較して有意に低下していた。扁桃体に投射する DA ニューロンの活動の低下⁽⁷⁾および NA ニューロンの活動性の上昇⁽⁸⁾は不安様行動の増強と関連することが報告されており, 扁桃体における DA と NA の変化も慢性低 Na 血症による不安様行動の増強に関与していると考えられる。

さらに, 低 Na 血症を補正することにより, 不安様行動の増強が改善することも示された。我々は, 低 Na 血症による記憶障害, 歩行障害も低 Na 血症を補正することにより改善することを報告している⁽¹⁾。このため, 低 Na 血症を補正すること, すなわち, SIAD による低 Na 血症患者については, 積極的に水分制限や塩分投与が必要と考えられる。また, 低 Na 血症を予防することも重要と考えられ, 低 Na 血症を誘発する利尿薬等の薬剤を内服したり, 電解質調節機能の低下していることの多い高齢者においては, 特に極端な塩分制限は控えるべきであると考えられる。

本研究の結果から, 細胞外低 Na 濃度環境により, ミクログリアの *Nos2* mRNA 発現量および NO 産生が低下することが示された。さらに, これらの変化が低 Na 濃度そのものによるものか, 低浸透圧によるものかについても評価を行った。本研究の結果からは, LPS 刺激のない状態においては, ミクログリアは低 Na 濃度そのものに反応し, LPS 刺激下では, 低 Na 濃度と低浸透圧の両者に反応し

ていることが示唆された(Fig.6 B~E)。マクロファージについては、40 mMのNaCl濃度の上昇には反応するが、尿素濃度の上昇には反応せず、マクロファージは高Na濃度のみ反応すると報告されている⁽²¹⁾。しかしながら、マクロファージは、LPS刺激下において、200 mOsmのNaClとグルコース濃度の上昇に同等に反応するという報告もある⁽²²⁾。これらのことから、マクロファージは浸透圧変化が比較的小さい場合は浸透圧ではなくNa濃度の変化に反応し、浸透圧変化が大きい場合は、浸透圧の変化に反応していると推測される。このように、ミクログリアとマクロファージでは、Na濃度および浸透圧の変化を感知するメカニズムが異なっている可能性がある。また、高Na濃度と低Na濃度で、細胞が、Na濃度そのもの変化に反応するのか、または浸透圧の変化に反応するのかが異なっている可能性もある。これらの点についてさらなる研究が必要と考えられる。

ODS(透圧性脱髄症候群)は低Na血症を急速補正した際に発症する重篤な疾患である。ODSの詳しい病態はまだわからないことが多いが、血液脳関門の破綻、アストロサイトの細胞死やミクログリアの活性化が病態発症早期の現象とであることが報告されている。我々は、ODSモデルラットを用いて、脱髄部位のミクログリアが時間経過とともに増え、発症早期(2日目)には、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NOS2、Matrix metalloproteinase (MMP) 2、MMP9やMMP12を発現し、後期(5日目)にはLeukemia inhibitory factorを発現し、myelin debrisを貪食することを明らかにした。これらの結果は、ODSの病態において、早期にはミクログリアがODSの病態を悪化させ、後期には組織保護的に働いていることが推測される⁽¹⁰⁾。さらに我々は、ミノサイクリンを投与することにより、ミクログリアの活性化を抑制し、ODSの病態を軽減させることを報告している⁽²³⁾。これらのデータはミクログリアの活性化がODSの病態に関与していることを示している。しかしながら、このようなミクログリアの活性化が、Na濃度の急速補正の直接的な効果なのか、組織障害による二次的なものであるのかは明らかになっていない。また、ODS動物モデルでは、この課題について評価を行うことは困難である。そこで、本研究では、*in vitro*で、ミクログリアに対する低Na濃度の急速補正の影響について評価を行った。ODSの*in vivo*での病変では、障害された細胞や、血液脳関門を

通過した血液成分、細胞から分泌されたサイトカイン等の免疫細胞を活性化させる物質が存在しているため、本研究の*in vitro*の系では、LPS刺激下の条件がODSの病態を反映していると考えられる。LPS刺激下の条件では、LS+Correction群のNos2 mRNA発現量、NO産生量は、LS群と比較して有意に上昇していた(Fig.3B~E)。これらのデータから、ODSの病態において、低Na血症の急速補正は、部分的に直接的にミクログリアのNos2 mRNA発現量とNO産生量を増加させると推測される。

NFAT5は、腎髄質において、高浸透圧環境に対する反応の中心的な調節因子として同定された⁽¹³⁾。高浸透圧環境は、NFAT5の発現と核内移行を誘導し、浸透圧適応に関する遺伝子発現を調節する。その後、NFAT5は、免疫細胞において、高Na濃度に反応してサイトカインの産生を誘導することが報告された⁽²⁴⁾。今日では、NFAT5は浸透圧依存のおよび非依存的に免疫機能を調節することが知られている⁽²⁵⁾。ミクログリアにおいては、免疫シグナルがNFAT5の発現を誘導することが報告されているが、細胞外Na濃度の変化がNFAT5の変化を誘導するかは明らかになっていない。そこで、本研究で、LS群でNFAT5の発現および核内移行が抑制されること、さらにNFAT5の過剰発現により、LS群においてNos2 mRNA発現量およびNO産生量が増加することを示し、ミクログリアでもNFAT5が浸透圧に対する調節に関与していることを明らかにした。

MDCK細胞において、低浸透圧メディウムによる培養下でNFAT5の発現量および核内移行は抑制されることが報告されており⁽²⁶⁾、NFAT5は高浸透圧だけでなく、低浸透圧に対しても反応すると考えられている。マクロファージにおいては、細胞外Na濃度50 mMの状態では、TNF- α の産生が低下することが報告されているが⁽²⁷⁾、低Na濃度における免疫細胞の変化にNFAT5が関与しているかは明らかでなかった。そこで、本研究では、低Na濃度に対する免疫細胞の反応においてNFAT5が関与していることも明らかにした。

ミクログリアはシナプス可塑性の調節を介して、学習・記憶機能にも関与することが知られている。そのため、ミクログリアの炎症促進機能と抗炎症機能のバランスが崩れることにより、シナプス可塑性も影響を受けることが報告されている⁽²⁸⁾。このため、本研究で認められたミク

グリアの変化が、慢性低 Na 血症による記憶障害^(1, 9)にも関与している可能性が考えられる。

また、今回の臨床研究では、高齢者において、血清 Na 濃度の異常がフレイルの重症度と関連していることが明らかとなった。血清 Na 濃度異常のある高齢者については、彼らの併存症だけでなく、栄養状態や生活環境等への配慮も必要と考えられる。

5. 今後の課題

本研究では、慢性低 Na 血症により、扁桃体のモノアミンシステムの変化を介して不安様行動を増強させることを明らかにした。しかしながら、低 Na 血症により、5-TH, DA および NA ニューロンの活動が変化するメカニズムについては明らかではなく、さらなる研究が必要である。また、オプトジェネティクスを用いて、扁桃体に投射する 5-HT, DA および NA ニューロンの活動を変化させ、低 Na 血症による不安様行動が改善するかの実験も必要と考える。

さらに、本研究では、ミクログリアにおける NFAT5 を介する浸透圧に対する反応について明らかにした。しかしながら、細胞外低 Na 濃度を感知するセンサーについては明らかになっていない。また、これらのセンサーから NFAT5 につながる細胞内シグナルも不明なままである。そのため、今後、これらの解明が必要と考えられる。

加えて、低 Na 血症によるミクログリアの変化の *in vivo* での役割の解明も必要と考える。そのために、慢性低 Na 血症モデルマウスにおいて、Colony-stimulating factor 1 レセプター阻害薬である PLX5622 を投与し、ミクログリアを除去した際の行動の評価も計画していく予定である。

また、疫学的検討については、各患者について追跡調査を行っており、低 Na 血症患者の縦断的研究も行う予定である。

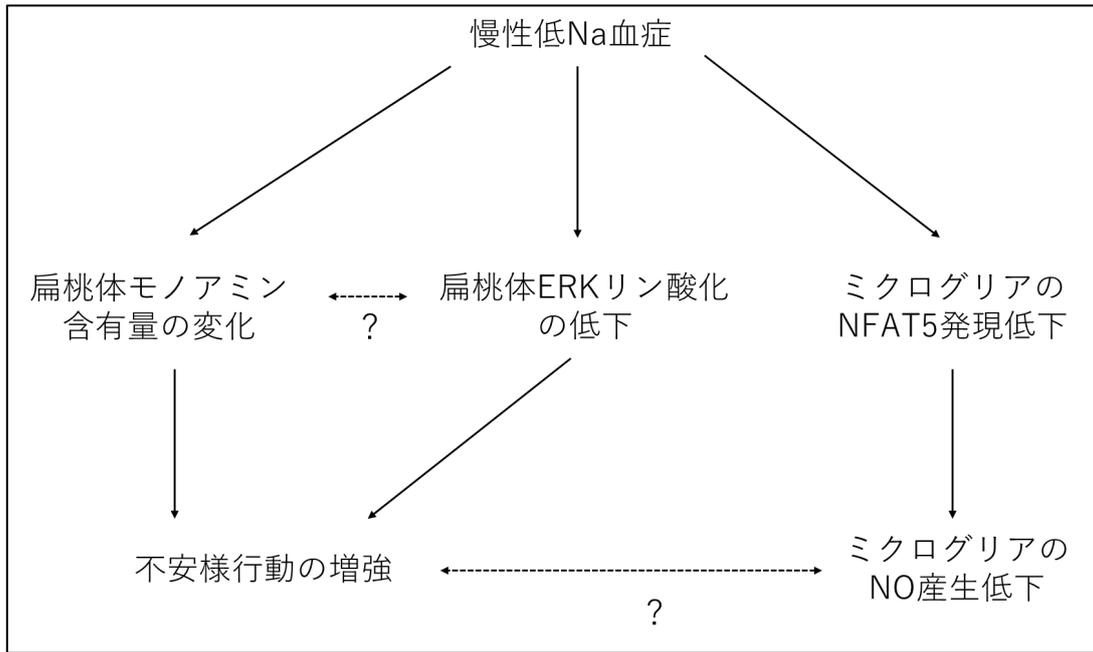
6. 文献

1. Fujisawa H, Sugimura Y, Takagi H, Mizoguchi H, Takeuchi H, Izumida H, Nakashima K, Ochiai H, Takeuchi S, Kiyota A, Fukumoto K, Iwama S, Takagishi Y, Hayashi Y, Arima H, Komatsu Y, Murata Y, Oiso Y. Chronic Hyponatremia Causes Neurologic and Psychologic Impairments. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27:766-780
2. Fujisawa C, Umegaki H, Sugimoto T, Samizo S, Huang CH, Fujisawa H, Sugimura Y, Kuzuya M, Toba K,

- Sakurai T. Mild hyponatremia is associated with low skeletal muscle mass, physical function impairment, and depressive mood in the elderly. *BMC Geriatr* 2021; 21:15
3. Baratta MV, Kodandaramaiah SB, Monahan PE, Yao J, Weber MD, Lin PA, Gisabella B, Petrossian N, Amat J, Kim K, Yang A, Forest CR, Boyden ES, Goosens KA. Stress Enables Reinforcement-Elicited Serotonergic Consolidation of Fear Memory. *Biol Psychiatry* 2016; 79:814-822
4. Yu XD, Zhu Y, Sun QX, Deng F, Wan J, Zheng D, Gong W, Xie SZ, Shen CJ, Fu JY, Huang H, Lai HY, Jin J, Li Y, Li XM. Distinct serotonergic pathways to the amygdala underlie separate behavioral features of anxiety. *Nat Neurosci* 2022; 25:1651-1663
5. Matthiesen M, Mendes LD, Spiacci A, Jr., Fortaleza EA, Correa FM, Zangrossi H, Jr. Serotonin 2C receptors in the basolateral amygdala mediate the anxiogenic effect caused by serotonergic activation of the dorsal raphe dorsomedial subnucleus. *J Psychopharmacol* 2020; 34:391-399
6. Bigos KL, Pollock BG, Aizenstein HJ, Fisher PM, Bies RR, Hariri AR. Acute 5-HT reuptake blockade potentiates human amygdala reactivity. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33:3221-3225
7. Morel C, Montgomery SE, Li L, Durand-de Cuttoli R, Teichman EM, Juarez B, Tzavaras N, Ku SM, Flanigan ME, Cai M, Walsh JJ, Russo SJ, Nestler EJ, Calipari ES, Friedman AK, Han MH. Midbrain projection to the basolateral amygdala encodes anxiety-like but not depression-like behaviors. *Nat Commun* 2022; 13:1532
8. McCall JG, Siuda ER, Bhatti DL, Lawson LA, McElligott ZA, Stuber GD, Bruchas MR. Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *Elife* 2017; 6
9. Kawakami T, Fujisawa H, Nakayama S, Yoshino Y, Hattori S, Seino Y, Takayanagi T, Miyakawa T, Suzuki A, Sugimura Y. Vasopressin escape and memory impairment in a model of chronic syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in mice. *Endocr J* 2021; 68:31-43

10. Iwama S, Sugimura Y, Suzuki H, Suzuki H, Murase T, Ozaki N, Nagasaki H, Arima H, Murata Y, Sawada M, Oiso Y. Time-dependent changes in proinflammatory and neurotrophic responses of microglia and astrocytes in a rat model of osmotic demyelination syndrome. *Glia* 2011; 59:452-462
11. Takefuji S, Murase T, Sugimura Y, Takagishi Y, Hayasaka S, Oiso Y, Murata Y. Role of microglia in the pathogenesis of osmotic-induced demyelination. *Exp Neurol* 2007; 204:88-94
12. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schroder 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, Kuper 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; 21:493-501
13. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2538-2542
14. Shoji H, Ikeda K, Miyakawa T. Behavioral phenotype, intestinal microbiome, and brain neuronal activity of male serotonin transporter knockout mice. *Mol Brain* 2023; 16:32
15. Lu Q, Mouri A, Yang Y, Kunisawa K, Teshigawara T, Hirakawa M, Mori Y, Yamamoto Y, Libo Z, Nabeshima T, Saito K. Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression. *Behav Brain Res* 2019; 372:112053
16. Tashiro T, Murakami Y, Mouri A, Imamura Y, Nabeshima T, Yamamoto Y, Saito K. Kynurenine 3-monooxygenase is implicated in antidepressants-responsive depressive-like behaviors and monoaminergic dysfunctions. *Behav Brain Res* 2017; 317:279-285
17. Searle SD, Mitnitski A, Gahbauer EA, Gill TM, Rockwood K. A standard procedure for creating a frailty index. *BMC Geriatr* 2008; 8:24
18. Cho Y, Son HJ, Kim EM, Choi JH, Kim ST, Ji IJ, Choi DH, Joh TH, Kim YS, Hwang O. Doxycycline is neuroprotective against nigral dopaminergic degeneration by a dual mechanism involving MMP-3. *Neurotox Res* 2009; 16:361-371
19. Faria R, Magalhaes A, Monteiro PR, Gomes-Da-Silva J, Amelia Tavares M, Summavielle T. MDMA in adolescent male rats: decreased serotonin in the amygdala and behavioral effects in the elevated plus-maze test. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1074:643-649
20. Dimonte S, Sikora V, Bove M, Morgese MG, Tucci P, Schiavone S, Trabace L. Social isolation from early life induces anxiety-like behaviors in adult rats: Relation to neuroendocrine and neurochemical dysfunctions. *Biomed Pharmacother* 2023; 158:114181
21. Neubert P, Homann A, Wendelborn D, Bar AL, Krampert L, Trum M, Schroder A, Ebner S, Weichselbaum A, Schatz V, Linz P, Veelken R, Schulte-Schrepping J, Aschenbrenner AC, Quast T, Kurts C, Geisberger S, Kunzelmann K, Hammer K, Binger KJ, Titze J, Muller DN, Kolanus W, Schultze JL, Wagner S, Jantsch J. NCX1 represents an ionic Na⁺ sensing mechanism in macrophages. *PLoS Biol* 2020; 18:e3000722
22. Ip WK, Medzhitov R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nat Commun* 2015; 6:6931
23. Suzuki H, Sugimura Y, Iwama S, Suzuki H, Nobuaki O, Nagasaki H, Arima H, Sawada M, Oiso Y. Minocycline prevents osmotic demyelination syndrome by inhibiting the activation of microglia. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:2090-2098
24. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene

- transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 2001; 15:47-58
25. Lee N, Kim D, Kim WU. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2019; 10:270
26. Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278:F1006-1012
27. Sehnert B, Pohle S, Heuberger C, Rzepka R, Seidl M, Nimmerjahn F, Chevalier N, Titze J, Voll RE. Low-Salt Diet Attenuates B-Cell- and Myeloid-Cell-Driven Experimental Arthritides by Affecting Innate as Well as Adaptive Immune Mechanisms. *Front Immunol* 2021; 12:765741
28. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2010; 6:193-201



研究概念図

Elucidating the Mechanisms of Chronic Hyponatremia-Induced Psychosis and Development of Its Treatment

Haruki Fujisawa¹, Yoshihisa Sugimura¹, Atsushi Suzuki¹, Tsuyoshi Miyakawa², Akihiro Mouri³,
Chisato Fujisawa⁴

¹Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, School of Medicine, Fujita Health University,

²Division of Systems Medical Science, Center for Medical Science, Fujita Health University,

³Department of Regulatory Science for Evaluation & Development of Pharmaceuticals & Devices, Fujita Health University Graduate School of Health Science, Department of Community Healthcare and Geriatrics,

⁴Nagoya University Graduate School of Medicine

Summary

Hyponatremia (HN) is the most common clinical electrolyte disorder. Once thought to be asymptomatic in response to adaptation by the brain, recent evidence suggests that chronic HN (CHN) may induce neurological manifestations, including psychological symptoms. However, the specific psychological symptoms induced by CHN, the mechanisms underlying these symptoms, and their potential reversibility remain unclear. Therefore, this study aimed to determine whether monoaminergic neurotransmission is associated with innate anxiety-like behaviors potentiated by CHN in a mouse model of CHN secondary to the syndrome of inappropriate antidiuresis. In the present study, we showed that CHN potentiated innate anxiety-like behaviors in the light/dark transition and open field tests. We also found that serotonin and dopamine levels in the amygdala were significantly lower in mice with CHN than in the controls. Notably, after correcting for CHN, increased innate anxiety-like behaviors, decreased serotonin and dopamine levels in the amygdala were normalized. These findings further underscore the importance of treating CHN and demonstrate potential new therapeutic strategies for anxiety in patients with CHN, which will improve their quality of life.

However, in the treatment of CHN, overly rapid correction of HN can cause osmotic demyelination syndrome (ODS), a central demyelinating disease. Using a rat model, we have previously shown that microglia play a critical role in the pathogenesis of ODS. However, the direct effect of rapid correction of HN on microglia is unknown. Furthermore, the effect of CHN on microglia remains elusive. Using microglial cell lines BV-2 and 6-3, we showed that low extracellular sodium concentrations (36 mmol/L decrease; LS) suppress *Nos2* mRNA expression and nitric oxide (NO) production of microglia. On rapid correction of LS, NO production was significantly increased in both cells, suggesting that acute correction of HN partly directly contributes to increased *Nos2* mRNA expression and NO release in ODS pathophysiology. LS also suppressed expression and nuclear translocation of NFAT5, a transcription factor that regulates the expression of genes involved in osmotic stress. Furthermore, overexpression of NFAT5 significantly increased *Nos2* mRNA expression and NO production in BV-2 cells in LS. Expressions of *Nos2* and *Nfat5* mRNA were also modulated in microglia isolated from cerebral cortex in CHN model mice. These data indicate that LS modulates microglial NO production dependent on NFAT5 and suggest that microglia contribute to HN-induced neuronal dysfunctions.

塩分摂取が神経-免疫系を介する誤嚥性肺炎の軽減効果に与える影響の解明

安部 力

岐阜大学大学院医学系研究科

概要 オーラルフレイルの特徴として、「滑舌低下、食べこぼし、わずかなむせ、かめない食品が増える」などがあり、症状の進行により誤嚥性肺炎の発症リスクが増大することが知られている。現在の死亡者数約 4 万人が 2030 年には約 13 万人と約 3 倍に増加すると予測されており、誤嚥性肺炎の予防・軽減手法開発は喫緊の課題となっている。

最近の研究から、高血圧と脾臓との関係性が明らかになってきており、食塩負荷が脾臓免疫細胞に悪影響を及ぼすことが示唆されている。我々は、自律神経系刺激による脾臓免疫細胞を介した抗炎症効果を報告してきた。この手法は、誤嚥性肺炎の軽減にも用いることができる可能性があるものの、食塩感受性高血圧との関係性は不明である。そこで本研究では、食塩感受性高血圧が脾臓を介する免疫制御システムに与える影響を明らかにすることを目的とした。

2022 年度は、マウスの培養した口腔内微生物叢を用いて誤嚥性肺炎の作製に成功した。さらに、この新規モデルマウスでは、食塩負荷により誤嚥性肺炎の症状が増悪することを明らかにした。

また、2023 年度は、新規モデルマウスを用いて、1) 延髄 C1 ニューロン刺激でも口腔内微生物気道内投与による肺炎症状が軽減しないこと、2) 食塩感受性高血圧により誤嚥性肺炎症状は増悪し、この症状は延髄 C1 ニューロン刺激でも軽減できないこと、を明らかにした。

さらに 2024 年度は、食塩負荷による誤嚥性肺炎症状の増悪分子メカニズムを明らかにするために、脾臓免疫細胞の網羅的遺伝子解析を行い、マクロファージの遊走能が影響を受けることを明らかにした。

3 年間の研究から、新規誤嚥性肺炎モデルマウスの作製と、食塩負荷による誤嚥性肺炎の増悪が明らかになった。食塩負荷による抗炎症効果の低下には、脾臓免疫細胞のマクロファージ遊走能低下が示唆されたが、詳細はまだまだ不明である。今後は、食塩負荷による免疫細胞の機能低下を明らかにすることで、食塩感受性高血圧患者の誤嚥性肺炎における、『健康寿命延長に貢献する「適切な塩分摂取」を提言するための基礎的エビデンス構築』に貢献したい。

1. 研究目的

オーラルフレイルの特徴として、「滑舌低下、食べこぼし、わずかなむせ、かめない食品が増える」などがあり、症状の進行により誤嚥性肺炎の発症リスクが増大することが知られている⁽¹⁾。現在の死亡者数約 4 万人が 2030 年には約 13 万人と約 3 倍に増加すると予測されており、誤嚥性肺炎の予防・軽減手法開発は喫緊の課題となっている。臨床の現場では口腔ケアと摂食嚥下トレーニングの組み合わせを中心に誤嚥性肺炎の予防を行っており、特に長期臥床の高齢者には、1) 誤嚥しやすい姿勢を避け、

口腔内を清潔に保つ、2) 口腔乾燥を防ぐために保湿液やスプレーなどを利用して口腔粘膜を潤す、3) 義歯を使用している場合は、洗浄と消毒により微生物の増殖を防ぐ、などの取り組みが行われている^(2,3)。これらの取り組みにより、誤嚥性肺炎の発症が 10~50%抑えられる。しかしながら、最近の研究から、不顕性誤嚥である微量誤嚥(マイクロアスピレーション)を介した気道内への口腔内微生物侵入も肺炎の発症に関与していることが明らかになってきた⁽⁴⁾。高齢者では嚥下反射や咳反射の機能が低下しているため、唾液や胃液が気道に流れ込みやすくなっており、マイクロ

アスピレーションが起りやすい。適切な予防指導等にもかかわらず口腔内微生物の誤嚥が生じた場合、肺炎の発症・重症化は個人の免疫力に左右されることになる。すなわち、あらかじめ免疫細胞が炎症応答しやすい準備状況を作り出すことで、誤嚥性肺炎の発症リスクを抑えることが可能になると考えられる。

炎症の制御には、局所の免疫システムに加え自律神経が重要な役割を担っている⁽⁵⁾。この免疫機構での神経系は、求心路、中枢と遠心路で構成されている。求心路には迷走神経感覚路が含まれ、末梢のサイトカインが求心神経軸索末端に結合し、情報が中枢に送られる。一方、遠心路は交感神経と副交感神経が関与しており、脾臓の免疫細胞を活性化する。面白いことに、迷走神経の求心路を刺激すると、免疫細胞が炎症応答しやすい準備状況になり、その後には生じる疾患症状が抑えられる。我々はこれまで、動物実験にて、炎症が起きる前に迷走神経求心路の電気刺激を 10 分間行くと、その後には生じる敗血症や急性腎不全が抑えられることを明らかにした^(6, 7)。また、迷走神経求心路だけではなく、前庭器などの他の器官からの入力でも、抗炎症効果が生じることを明らかにしてきた⁽⁸⁾。この系の中核側では延髄 C1 ニューロンが中心的な役割を担っており、ここからの交感神経の活性化と脾臓免疫細胞との相互作用が抗炎症効果に重要であることを明らかにした⁽⁹⁾。さらに、我々は、10 分間の延髄 C1 ニューロン特異的の刺激が脾交感神経を介する脾臓免疫細胞の活性化により、気道内 LPS 直接投与による誤嚥性肺炎に対して有効であることを確認している⁽¹⁰⁾。このことは、短時間の延髄 C1 ニューロンの刺激では、炎症に対して脾臓免疫細胞が「良い状態」になっていることを意味している。

一方、最近の研究から、食塩負荷による高血圧が脾臓摘出により抑えられることが明らかになってきた^(11, 12)。これには、過剰な食塩による脾交感神経の慢性的な活性化が脾臓免疫細胞の形質を変え、腎臓における食塩調節系を破綻させることが示唆されている。さらに、延髄 C1 ニューロンを特異的に除去すると食塩負荷による高血圧が抑えられることから⁽¹³⁾、長時間の延髄 C1 ニューロンの刺激による脾交感神経の活性化が、脾臓免疫細胞を「悪い状態」にしていることが考えられる。

我々は、新しい誤嚥性肺炎の予防・軽減手法において、神経-免疫系の活性化は欠かせないと考えている。しかし

ながら、この系のカギとなる脾臓が、脾臓交感神経の刺激のパターンにより「善」にも「悪」にもなりうるようになってきた。実際、臨床において食塩感受性高血圧と誤嚥性肺炎との関連が示唆されていることから、神経-免疫系の臨床応用のためには、塩分摂取と「延髄 C1-脾交感神経-脾臓免疫細胞」の系との関係性を明らかにすることは非常に重要である。

これまで我々は、LPS 気道内投与による誤嚥性肺炎モデルマウスを用いて実験を行ってきた。しかしながら、このモデルでは、1) 生きた微生物を用いていないこと、2) 急性肺炎は生じるものの、症状が慢性化しないこと、3) どの週令にも関わらず肺炎が同程度生じてしまうこと、の問題点がある。このことから、神経-免疫系を介する誤嚥性肺炎の新規予防方法を開発するには、適切な動物モデルを使用した基礎研究が必要となってくる。

これまでの研究では、急性肺損傷を引き起こすために、人工呼吸器、リポ多糖類(LPS)、高酸素症、プレオマイシン、オレイン酸、盲腸結紮および穿刺、および生きた微生物が使用されてきた⁽¹⁴⁾。これらのモデル動物の中では、生きた微生物を使用するモデルが誤嚥性肺炎に適していると考えられている。動物では、気管内カテーテル、経気管支注射、直接気管支鏡注射、およびエアロゾル化の使用により肺への微生物投与を行うことができ、これまでに大腸菌、シュドモナス・エルギノーサ、アクチノバチルス・プレウロニューモニエ血清型 1、またはクレブシエラ・ニューモニエを含む単一グループの生きた微生物が使用されてきた。しかしながら、単一微生物の誤嚥によって誘発される肺炎は生理学的ではないため、適切な動物モデルでは口腔微生物叢そのものを使用する必要がある。これに対し、2022 年度は、マウスの培養した口腔内微生物叢を用いて誤嚥性肺炎の作製に成功した。さらに、この新規モデルマウスでは、食塩負荷により誤嚥性肺炎の症状が増悪することを明らかにした。また、2023 年度は、新規モデルマウスを用いて、1) 延髄 C1 ニューロン刺激でも口腔内微生物気道内投与による肺炎症状が軽減しないこと、2) 食塩感受性高血圧により誤嚥性肺炎症状は増悪し、この症状は延髄 C1 ニューロン刺激でも軽減できないこと、を明らかにした。さらに 2024 年度は、食塩負荷による誤嚥性肺炎症状の増悪分子メカニズムを明らかにするために、脾臓免疫細胞の網羅的遺伝子解析を行った。

2. 研究方法

2.1 実験動物

本研究は、日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に従って行われた。また、本実験計画は、岐阜大学動物実験委員会によって承認された。224週令以上の雄のC57BL/6Jマウス(体重20~35g)を日本SLCから購入した。すべてのマウスは、12:12時間の明暗サイクル下で、グループで飼育した。室温は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。

2.2 新規誤嚥性肺炎モデルマウスの病態評価

培養された口腔微生物叢の気管内注射によって誤嚥性肺炎を作製した(Fig. 1)。意識下マウスからの滅菌スワブによって口腔内微生物叢を採取した。滅菌したスワブの先端を滅菌したハサミで切り、培養液(ブレイン・ハート・インフュージョン・ブロス)に浸漬した。CO₂インキュベーター内で培養し、濁度の変化を分光光度計(600nm)にて測定した。得られたシグモイドカーブを $[a/(1+\exp(b*(x-c)))]+d$ とすると、フィッティングカーブの各係数は以下ようになった。 $a = 1.9461$, $b = -0.02784$, $c = 549.9269$, $d = 1.9461$ 。フィッティングカーブの最大ゲインは式の二回微分によって得られ、最大ゲインを示す時間は培養開始から約9時間であった。したがって、本実験では、誤嚥性肺炎を引き起こすために、9時間培養した口腔内微生物叢を使用した。一方、対照群では、綿棒を浸しただけの微生物叢を含む培養液を気管内注射した。

マウスをイソフルランで麻酔し、口から気管チューブを挿入した。気管チューブには、ポリエチレンチューブ(PE-10およびPE-50, Becton, Dickinson and Company)を用いた。誤嚥性肺炎を引き起こすために、培地を含む100 μL の培養口腔内微生物叢を、チューブを介して気管内に投与した。気管内投与の3, 9, 24, 48時間後に、

気管切開後の肺胞内洗浄(生理食塩水(800 μL))にて、気管支肺胞洗浄液(BAL)を得た。生理食塩水で2~50倍に希釈したBALを使用し、サイトカインを測定した。一方、培養していない口腔内微生物叢を気管内投与したマウスのBALは、生理食塩水で4倍に希釈し、サイトカインを測定した。BAL中のサイトカインは、ELISAキット(Thermo Fisher Scientific)を使用してIL-6を測定した。

2.3 食塩感受性高血圧が誤嚥性肺炎の病態に与える影響の評価

食塩感受性高血圧を発症させるために、浸透圧ポンプでアンジオテンシンII(0.5mg/kg/day)を2週間投与しながら、飲水にて生理食塩水を与える系を用いた。アンジオテンシンII投与2週間後に、培地を含む100 μL の培養口腔内微生物叢を気管内投与し、BAL中のIL-6の値から食塩感受性高血圧が誤嚥性肺炎に与える影響を評価した。

2.4 延髄C1ニューロン特異的操作のためのオプトジェネティクス技術

ケタミン(120mg/kg)およびキシラジン(12mg/kg)麻酔下にて、左側RVLM領域にAAV2-CaMK2-ChR2-mCherryのウイルスベクターを投与し、延髄C1ニューロン特異的に光受容体のひとつであるチャンネルロドプシンを発現させた。同時に、延髄C1ニューロンの光刺激のために、ウイルスベクター投与直上部に光ファイバーを留置した。この手法により、473nmのレーザー光を用いて、延髄C1ニューロンを活性化することができる。手術後4週間程度のリカバリー期間を経て実験を行った。なお、実験を行う前に、延髄C1ニューロンに目的の光受容体が発現しているかどうかを調べるために、プレチスモグラフィチャンバーを用いて光刺激に対する呼吸数の増加を確認した。光刺激による呼吸数の増加がみられるマウスのみを実験に用いた。

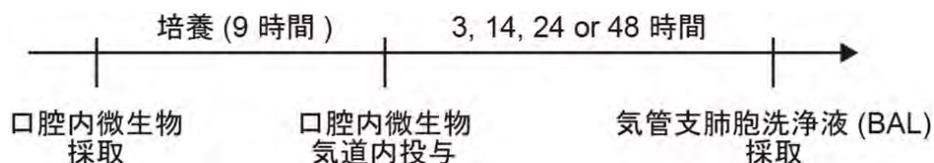


Fig. 1. 誤嚥性肺炎実験のタイムライン。

2.5 脾臓免疫細胞の網羅的遺伝子解析(RNA-seq)

すべてのマウスにイソフルラン麻酔を行った後、脾臓組織を摘出した。脾臓免疫細胞の RNA は RNeasy FFPE キット (73504, Qiagen, ドイツ, ヒルデン) を使用して精製した。サンプルを 40 μ L の Buffer PKD にて溶解し, 3 μ L のプロテイナーゼ K 溶液を加えて, 56°C で 15 分間インキュベートし, その後 80°C で 10 分間インキュベートした。RNA サンプルに 120 μ L の TRIzol LS Reagent を加えたのちに, 32 μ L のクロロホルムを加えた。サンプルをボルテックスミキサーで混合し, 4°C 13000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を 1.5 mL のマイクロチューブに移し, 10 μ g のグリコーゲンを加えて RNA を沈殿させた。ペレットは 4°C 13000 rpm で 15 分間遠心分離して回収し, 80%エタノールで 2 回洗浄した。最終的なペレットを 6 μ L の水に溶解した。

精製された RNA の品質は RNA 6000 Pico Kit で確認した。精製された RNA (3.5 μ L) を SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit Pico Input Mammalian を使用してシーケンシングライブラリに変換した。ライブラリ反応の 1 μ L を使用してリアルタイム PCR を行い, ライブラリ増幅における PCR テンプレート量と PCR サイクル数を調整した。最終的な PCR ステップはインデックスプライマーを使用して行った。その後 PCR 産物を, Stranded Elution Buffer と水を 1:1 の比率で組み合わせることで溶出した。

サンプルの RNA プロファイルを取得するためのライブラリ作製は, NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) および NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina を使用して行った。最終的な PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit の EB バッファーで精製・溶出した。

ライブラリの品質と濃度は High Sensitivity DNA Kit を使用して測定した。ライブラリを等モル濃度で混合し, マルチプレックスシーケンシングを行った。シーケンシングには NextSeq500 System を使用した。FASTQ ファイルは BaseSpace Onsite によって生成した。FASTQ ファイル内のリードを CLC main Workbench にインポートし, マウスのリファレンスゲノム(mm10)にマッピングされた 49585

遺伝子のアノテーションセットを使用して定量化した。Total Count および Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (RPKM) 値を取得しサンプル解析を行った。サンプルの解析には, RPKM 値を正規化し, 差異およびフォールドチェンジ値を計算した。ヒートマップのために正規化された RPKM 値は擬似カウント 0.01 を追加した後, log-2 タイプに変換した。Total Count 値を正規化し, ANOVA 解析を行った。さらに, RNAseqChef (https://kan-e.github.io/RNAseqChef_manual_japanese/) を用いて, パスウェイおよび遺伝子オントロジー解析を行った。

2.6 統計処理

すべてのデータについて, D'Agostino-Pearson 検定または Kolmogorov-Smirnov 検定を使用して正規分布を調べた。等分散については, Brown-Forsythe 検定を用いて検討した。正規分布と等分散の基準が満たされた場合, 統計的有意性は t 検定, 一元配置または二元配置の ANOVA を用いて評価した。また, 必要に応じて Tukey, Dunnett もしくは Bonferroni の多重比較検定を適用した。すべての値は平均値 \pm 平均値の標準誤差で表示され, 統計的有意性は $P < 0.05$ とした。

3. 研究結果

3.1 新規誤嚥性肺炎モデルマウスの病態評価

培地にて 9 時間培養した口腔内微生物を気管内に投与すると, 投与 14 時間にて BAL 中 IL-6 の値が有意に増加した (**Fig. 2**)。一方, 培地にて 9 時間培養した口腔内微生物であっても, 投与 3 時間後では有意な増加は見られなかった。従来手法である LPS の気管内投与では, BAL 中の IL-6 が投与 3 時間後にピークに達するのに対し, 培養した口腔内微生物気管内投与では, BAL 中 IL-6 の値が投与 24 時間後および 48 時間後で有意に増加した。また, 8 週令と 24 週令のマウスを比較すると, 投与 48 時間後の BAL 中 IL-6 の値が高齢マウスで有意に高かった。さらに, 性差にて肺炎症状を比較すると, 投与 48 時間後の BAL 中 IL-6 の値が雌に比べ雄で有意に高かった。

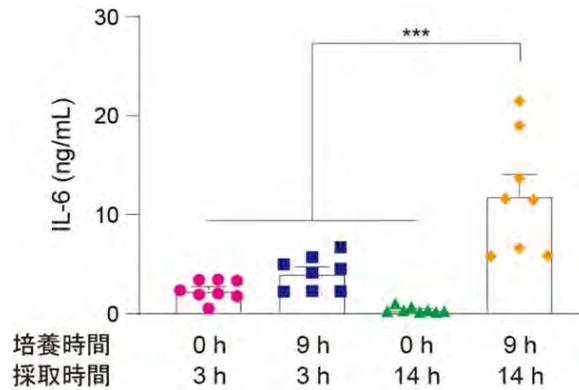


Fig. 2. 誤嚥性肺炎の病態評価.

誤嚥性肺炎惹起のために、9時間の口腔内微生物の培養時間と気道内投与してから気管支肺胞洗浄液（BAL）採取までの時間を14時間に設定した。

3. 2 食塩感受性高血圧が誤嚥性肺炎の病態に与える影響の評価

浸透圧ポンプでアンジオテンシン II (0.5 mg/kg/day) 投与しながら、飲水にて生理食塩水を与えると、動脈血圧が 83.8 ± 1.1 mmHg から 119.8 ± 2.6 mmHg に有意に増加した。このマウスでは、コントロール群に比べ BAL 中の IL-6 の値が有意に高かった。一方で、アンジオテンシン II は投与せず生理食塩水を飲ませたマウスでも BAL 中の IL-6 の値がコントロール群に比べ有意に高かった。

3. 3 延髄 C1 ニューロン刺激による誤嚥性肺炎症状への影響

LPS 投与群では溶媒もしくは LPS 投与 3 時間後に、口腔内微生物投与群では微生物叢投与 24 時間後に、それぞれ BAL を採取した。8 週令および 24 週令以上のマウスにおいて、LPS もしくは培養した口腔内微生物を気道内に投与すると、BAL 中の IL-6 の値は有意に増加し、週令によるサイトカイン量の違いは見られなかった (Fig. 4)。LPS 気道内投与マウスでは、8 週令のマウスだと延髄 C1 ニューロン刺激により BAL 中 IL-6 の値が有意に低下するのに対し、24 週令以上のマウスでは有意な低下が見られなかった (Fig. 3)。一方、培養した口腔内微生物を気道内に投与したマウスでは、8 週令のマウスでも 24 週令以上のマウスでも延髄 C1 ニューロン刺激による抗炎症効果は見られなかった (Fig. 4)。

3. 4 食塩負荷性誤嚥性肺炎増悪に対する延髄 C1 ニューロン刺激の効果

食塩負荷による高血圧マウスでは、培養した口腔内微生物の気道内投与により BAL 中の IL-6 の値が有意に増加した (Fig. 5)。このマウスに延髄 C1 ニューロンを行っても、増加した BAL 中の IL-6 の値を軽減させるような有意な変化は生じなかった (Fig. 5)。

3. 5 臓免疫細胞の網羅的遺伝子解析 (RNA-seq)

脾臓サンプルの多変量解析を行うと、誤嚥性肺炎を発症したマウスでは、塩分負荷した場合 (SB) としていない場合 (WB) の遺伝子発現パターンは大きく異なっていた (Fig. 6)。

塩分負荷により増加した遺伝子の数は 532 であり、遺伝子発現が減少した遺伝子の数は 14 であった (Fig. 7)。さらに、GO 解析を行うと、塩分負荷により減少した遺伝子はマクロファージの遊走能に関するものであった (Fig. 8)。

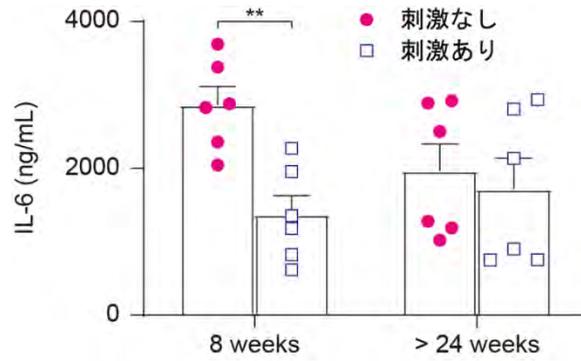


Fig. 3. 延髄 C1 ニューロン刺激による急性肺炎の軽減効果

8 週令マウスでは延髄 C1 ニューロン刺激により、LPS による急性肺炎後の気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の IL-6 は有意に低下したのに対し、24 週令以上のマウスでは、この効果は見られなかった。** P < 0.01。

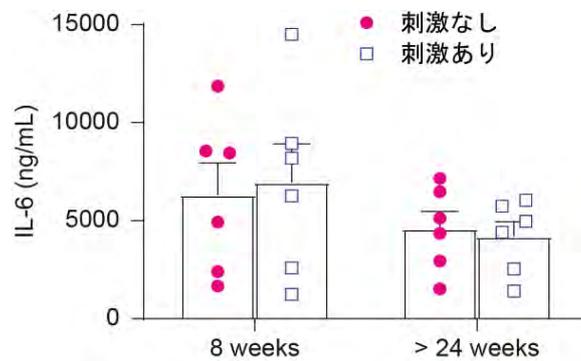


Fig. 4. 延髄 C1 ニューロン刺激による慢性肺炎の軽減効果

増殖させた口腔内微生物の気道内投与による慢性肺炎において、延髄 C1 ニューロン刺激による抗炎症効果は見られなかった。

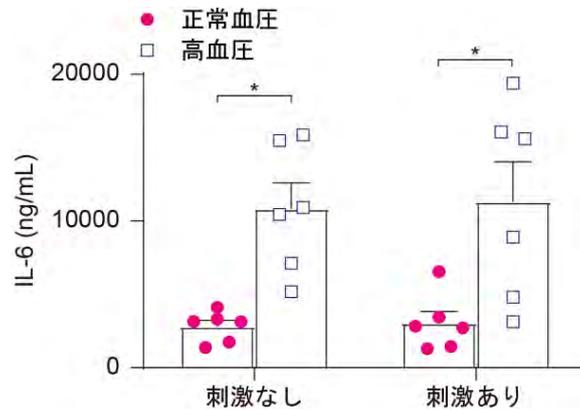


Fig. 5. 慢性肺炎に対する塩分摂取の影響

増殖させた口腔内微生物の気道内投与による慢性肺炎において、塩分摂取による高血圧により、気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の IL-6 は有意に増加した。* P < 0.05。

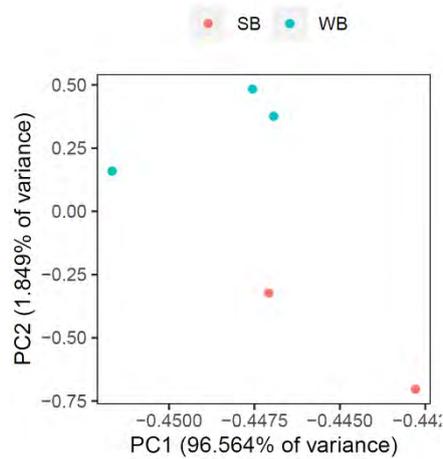


Fig. 6. 脾臓細胞の RNA-seq を用いた多変量解析
 誤嚥性肺炎を発症したマウスでは、塩分負荷した場合 (SB) としていない場合 (WB) の遺伝子発現パターンは大きく異なっていた。

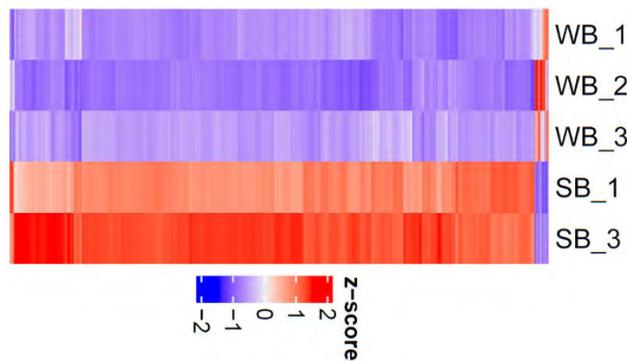


Fig. 7. RNA-seq によるヒートマップ
 塩分負荷により増加した遺伝子の数は 532 であり、遺伝子発現が減少した遺伝子の数は 14 であった

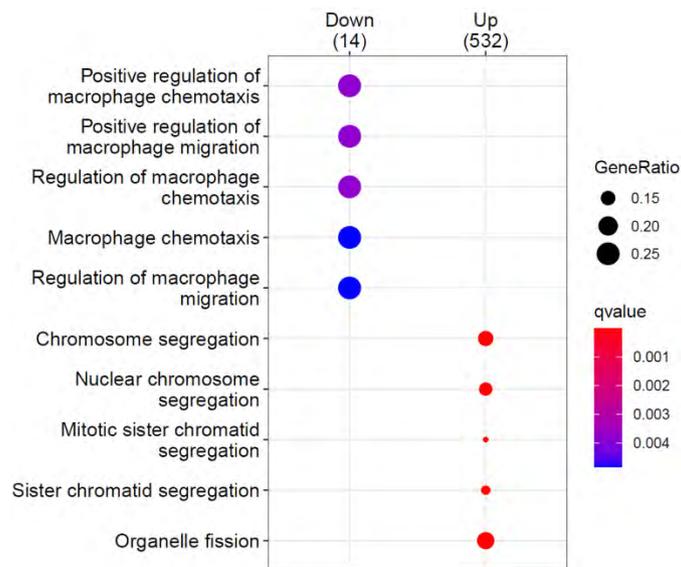


Fig. 8. RNA-seq データの GO 解析
 塩分負荷により減少した遺伝子はマクロファージの遊走能に関するものであった。

4. 考察

本研究では、マウスから得た口腔内微生物を 9 時間培養し、同じマウスの気管内に投与することで BAL 中の IL-6 の値が有意に増加した。現在、投与した培養液中の微生物プロファイルと BAL 中の微生物プロファイルを比較することで、肺炎特異的な微生物の抽出を目指しているが、本研究では、少なくとも口腔内微生物の量そのものが増えることが肺炎の惹起に重要であることが明らかになった。さらに、高齢および雄にて肺炎症状が悪化することから、本研究にて開発した新規誤嚥性肺炎モデルマウスは臨床症状に近いモデルマウスといえる。現在の手法では、麻酔下のマウスに気管内にチューブを挿管する必要があることから、今後は嚥下障害を引き起こすマウスの作製も必要になると考えられる。

我々はこれまで、延髄 C1 ニューロンを刺激すると、神経-免疫系を介して LPS 気道内投与による急性肺炎が軽減されることを報告してきた⁽¹⁰⁾。この経路では、脾臓交感神経や副腎交感神経が活性化することで、ノルアドレナリンやアドレナリンが免疫細胞を活性化する。実際、抗炎症効果は副腎髄質のカテコラミン陽性細胞を特異的に除去すると、延髄 C1 ニューロンを介する抗炎症効果が消失する。さらに、脾臓免疫細胞の CD4 T 細胞を単離して $\beta 2$ 受容体のアゴニストであるサルブタモールを処理し、その細胞をレシピエントマウスに投与すると、そのマウスでは急性肺炎の軽減効果が見られる。このように、延髄 C1 ニューロンと脾臓免疫細胞は密接な関りがあることがわかる。

これまでの研究では、8 週令のマウスを用いており、本研究でもその再現を取ることができた。一方、本研究では、24 週令以上のマウスにおいて、延髄 C1 ニューロンを刺激しても急性肺炎の軽減効果が見られないことが明らかになった。加齢の影響として、免疫系の機能低下や神経伝達の低下が考えられる。我々はすでに、24 週令以上のマウスでも、延髄 C1 ニューロン刺激による副腎交感神経の誘発電位が見られ、その応答性が低下しないことを明らかにしていることから、神経系の機能は保たれていることが示唆される。このことから、抗炎症効果の低下には、加齢に伴う免疫機能の低下が関与している可能性が考えられる。

一方、口腔内微生物を投与した場合では、延髄 C1 ニューロン刺激による抗炎症効果が見られなかった。我々はこれまで、急性炎症を中心に神経-免疫系の効果を見てきた。今回の新規モデルは炎症が長く続く慢性型のモデルであることから、自然免疫系だけではなく獲得免疫系の動員も関わっている可能性が考えられ、この免疫系の時間的変化が延髄 C1 ニューロン刺激の効果を消失している可能性が考えられる。

本研究では、食塩感受性高血圧が誤嚥性肺炎の症状を悪化させると仮説を立てていたにも関わらず、高血圧を発症しない食塩負荷だけでも肺炎症状を悪化させることが明らかになった。神経-免疫系の活性化には交感神経系の活性化が必要である。しかしながら、食塩負荷ではナトリウムイオンの排出を促さなければならないので、少なくとも腎臓の交感神経活動は低下する。食塩負荷による脾臓交感神経活動への影響は不明であるものの、食塩負荷そのものでも、神経-免疫系の活動低下が肺炎症状を悪化させた可能性が考えられた。

最後に、食塩負荷だけでも肺炎症状が悪化するメカニズムを明らかにするために、脾臓免疫の網羅的遺伝子解析を行った。食塩負荷で減少する遺伝子の数は 14 と少ないものの、マクロファージの遊走に係る遺伝子の変化が顕著であった。これは、肺で炎症が生じたときに脾臓免疫細胞の遊走能が低下していることで、肺での炎症制御が悪化していることが示唆された。今後は、塩分負荷のどのようなストレスが脾臓免疫細胞の遊走能に影響を与えているかどうかを明らかにする必要がある。

5. 今後の課題

本研究にて、新規誤嚥性肺炎モデルマウスの作製と、食塩負荷による誤嚥性肺炎の増悪が明らかになった。食塩負荷による抗炎症効果の低下には、脾臓免疫細胞のマクロファージ遊走能低下が示唆されたが、詳細はいまだ不明である。今後は、食塩負荷による免疫細胞の機能低下を明らかにすることで、食塩感受性高血圧患者の誤嚥性肺炎における、『健康寿命延長に貢献する「適切な塩分摂取」を提言するための基礎的エビデンス構築』に貢献していきたいと考えている。

6. 文献

1. Ebihara S, Sekiya H, Miyagi M, et al. Dysphagia, dystussia, and aspiration pneumonia in elderly people. *J Thorac Dis.* 2016;8(3):632-9.
2. Mandell LA, Niederman MS. Aspiration Pneumonia. *N Engl J Med.* 2019;380(7):651-63.
3. Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, et al. Oral care and pneumonia. Oral Care Working Group. *Lancet.* 1999;354(9177):515.
4. Kosutova P, Mikolka P. Aspiration syndromes and associated lung injury: incidence, pathophysiology and management. *Physiol Res.* 2021;70(Suppl4):S567-S83.
5. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420(6917):853-9.
6. Inoue T, Abe C, Sung SS, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7nAChR+$ splenocytes. *J Clin Invest.* 2016;126(5):1939-52.
7. Tanaka S, Abe C, Abbott SBG, et al. Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(12).
8. Abe C, Katayama C, Ohbayashi K, et al. Galvanic vestibular stimulation-induced activation of C1 neurons in medulla oblongata protects against acute lung injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2023;324(2):R152-R60.
9. Abe C, Inoue T, Inglis MA, et al. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nat Neurosci.* 2017;20(5):700-7.
10. Abe C, Katayama C, Bazek M, et al. Repeated activation of C1 neurons in medulla oblongata decreases anti-inflammatory effect via the hypofunction of the adrenal gland adrenergic response. *Brain Behav Immun.* 2023;111:138-50.
11. Carnevale D, Pallante F, Fardella V, et al. The angiogenic factor PIGF mediates a neuroimmune interaction in the spleen to allow the onset of hypertension. *Immunity.* 2014;41(5):737-52.
12. Perrotta M, Lori A, Carnevale L, et al. Deoxycorticosterone acetate-salt hypertension activates placental growth factor in the spleen to couple sympathetic drive and immune system activation. *Cardiovasc Res.* 2018;114(3):456-67.
13. Ribeiro N, Martins Sa RW, Antunes VR. Depletion of C1 neurons attenuates the salt-induced hypertension in unanesthetized rats. *Brain Res.* 2020;1748:147107.
14. Grigg ER. Peripatetic pioneer: William Smith, M. D., D.O. (1862-1912). *J Hist Med Allied Sci.* 1967;22(2):169-79.

本研究の概要

最終目標

塩分摂取が神経-免疫系を介する誤嚥性肺炎の軽減効果を悪化させる機序の解明

本研究で明らかにしたこと

- 塩分負荷は誤嚥性肺炎を悪化させ、脾臓免疫細胞のマクロファージ遊走能を低下させる。
- 塩分負荷による延髄C1ニューロンを介した神経-免疫系の機能低下が肺炎軽減効果の消失に関与。

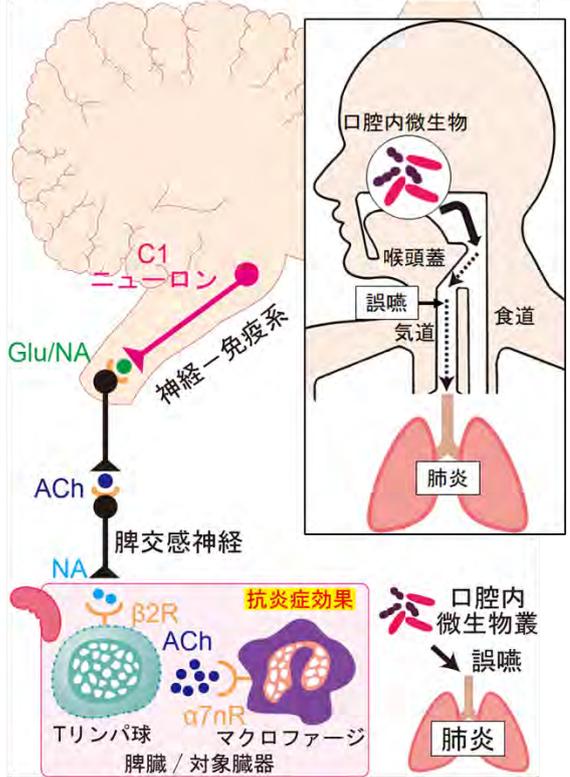
ヒトへの応用へ

将来展望

- ヘルスプロモーションへの貢献
- 神経-免疫系を強化する新しい誤嚥性肺炎予防法の開発
 - 高齢者に対する“適切な塩分摂取量”の科学的根拠の提示



誤嚥性肺炎
食塊や唾液、微生物などが食道ではなく気道・肺に侵入して炎症が生じる



The Effect of Daily Salt Intake on Protection from Aspiration Pneumonia via Neuro-Immune System

Chikara Abe

Gifu University Graduate School of Medicine

Summary

Oral frailty is known that the progression of symptoms increases the risk of developing aspiration pneumonia. It is predicted that the number of deaths from aspiration pneumonia will increase from the current 40,000 to 130,000 by 2030, a three-fold increase, making the development of methods to prevent and reduce aspiration pneumonia an urgent issue. Recent studies have revealed a relationship between salt-load-induced hypertension and the spleen. It has been suggested that salt load adversely affects splenic immune cells. We have reported an anti-inflammatory effect mediated by splenic immune cells through autonomic nervous system stimulation, and this system also functions in pneumonia. Although this technique could potentially be used to reduce aspiration pneumonia, its relationship to salt-sensitive hypertension is unknown. Therefore, the aim of this study was to determine the impact of salt-sensitive hypertension on the spleen-mediated immune regulatory system. Aspiration pneumonia was successfully created using the cultured oral microbiota of mice. Furthermore, in this novel mouse model, we found that the symptoms of aspiration pneumonia were exacerbated by salt loading. Using the new mouse model, we also showed that stimulation of medullary C1 neurons does not alleviate the symptoms of pneumonia induced by oral microbial airway administration. Furthermore, salt-sensitive hypertension exacerbates aspiration pneumonia symptoms, which cannot be alleviated even by stimulation of medullary C1 neurons. We also conducted a comprehensive genetic analysis of spleen immune cells to elucidate the molecular mechanism of salt-induced exacerbation of aspiration pneumonia symptoms, and found that the migratory ability of macrophages is affected. exacerbation of aspiration pneumonia by salt loading. The decrease in anti-inflammatory effect of salt loading was suggested to be due to decreased macrophage migration of spleen immune cells, but the details are still unknown. In the future, we would like to contribute to the “establishment of basic evidence to propose ‘appropriate salt intake’ that contributes to extending healthy life expectancy”.

食塩摂取量と口腔常在微生物叢および口腔の健康との関連についての疫学的検討

竹下 徹¹, 古田 美智子¹, 内田 和宏², 二宮 利治³

¹九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座口腔予防医学分野, ²中村学園大学栄養学部栄養学科,

³九州大学大学院医学研究院衛生・公衆衛生学分野

概要 食事は消化管に生息する微生物の栄養源でもあり, 常在微生物叢構成に関わりうる環境要因の一つである。なかでも塩分は, 塩濃度が温度や pH とともに微生物の増殖における重要な物理的要件であることを考えれば, 大きな役割を担っていることが推察される。にもかかわらず塩分摂取が口腔常在微生物叢, さらに口腔の健康に及ぼす影響については十分に知見がないのが現状である。そこで本研究では食塩摂取量と口腔常在微生物叢および口腔保健状態との関連について疫学的検討を行った。分析には 2012 年に福岡県糟屋郡久山町で行われた生活習慣病予防健診における栄養調査で取得した 40 歳から 79 歳の受診者の食塩相当量の情報, 歯科健診の結果および唾液を用いた。唾液中の総細菌量および細菌構成をそれぞれ 16S rRNA 遺伝子の V5 領域をターゲットとした定量 PCR 法と V1-V2 領域の塩基配列解読に基づく網羅的細菌群集解析法を用いて決定した。

食塩相当量に基づく四分位群において比較したところ, 女性では食塩相当量の最も多い群でも食塩相当量の最も少ない群と現在歯数はほぼ同等であったのに対し男性では食塩相当量が多い群ほど有意に現在歯数が少なかった。続いて口腔常在微生物叢の比較を行ったところ, 唾液中の総細菌量は男性, 女性のいずれでも四分位群間に差異を認めなかった。一方で男性においては食塩相当量の多い群で口腔状態が良好な者で高い構成比率を占めることが報告されているグループ 2 常在細菌群の構成比率の有意に低い傾向を認めた。女性においては細菌構成にも注目すべき差異を認めなかった。

本研究により男性における食塩摂取量の増加と口腔の健康状態の不良および口腔微生物叢の構成バランスの悪化との関連が示唆された。特に男性においては口腔の健康維持を考えるうえでも食塩摂取量の管理に注意を払う必要があると考えられる。本研究の成果は健康寿命の延伸を目指し歯科保健指導や栄養指導を進めていくうえで重要なエビデンスになると期待できる。

1. 研究目的

消化管の入り口に位置する口腔には, 下部消化管に劣らない数の微生物が複雑ながら安定な生態系を構築して生息している¹⁾。近年, 培養を介さず DNA を分析する網羅的細菌群集解析法の確立によりその全体像の把握が可能となり, ディスバイオーシスと呼ばれる構成バランス異常と口腔の健康との関連が明らかとなってきた²⁻⁵⁾。一方で人それぞれ異なる微生物叢構成の決定に関わる要因に

は不明なままであり, 口腔常在微生物叢の管理に基づく口腔保健アプローチは未だ確立されていない。

食事は消化管に生息する微生物の栄養源でもあり, 常在微生物叢構成に関わりうる環境要因の一つである。なかでも塩分は, 塩濃度が温度や pH とともに微生物の増殖における重要な物理的要件であることを考えれば, 大きな役割を担っていることが推察される。実際大腸では食塩の大量摂取が常在微生物叢構成に変化をもたらし, 免疫機構を介して高血圧に寄与することが報告されている⁶⁾。

また塩分摂取は口腔微生物の増殖制御に深く関わる唾液の分泌や組成にも関与する。にもかかわらず塩分摂取が口腔常在微生物叢や口腔の健康に及ぼす影響についてはほとんど知見がないのが現状である。

そこで本研究では地域住民の食塩摂取量と口腔常在微生物叢の細菌構成および口腔保健状態の情報を重ね合わせ両者の関連の検討を行うこととした。これにより、正常な口腔常在微生物叢、そして健康な口腔を維持していくうえで適正な食塩摂取についての理解を目指した。

2. 研究方法

2.1 調査対象者

2012年に福岡県糟屋郡久山町で40歳以上の住民を対象に行われた生活習慣病予防健診に参加した者を本研究の対象とした。本健診では助成研究者の所属する九州大学歯学研究院口腔予防医学分野が歯科・歯周病健診を担当しており、受診者から口腔健康状態に関する情報を取得した。さらに研究参加への同意を得た対象者から口腔常在微生物叢を分析するために唾液の採取を行った。また本健診では栄養調査も行われ、各対象者の食塩摂取量の情報も取得している。食塩摂取量と口腔の健康状態との関連においては歯科健診を受診するとともに栄養調査に回答した者を分析対象者とした。また唾液の提供についても同意した者については食塩摂取量と口腔常在微生物叢との関連についての分析の対象者とした。取得情報と分析内容の詳細を以下に示す。

2.2 調査内容

歯科健診では視診および触診にて歯の状態を、歯周ポケットプローブを用いて歯周組織状態を評価し、現在歯数、う蝕に関する指標としてう蝕経験歯数、歯周病に関する指標として歯周ポケット深さ、クリニカルアタッチメントロス、プロービング時出血の有無に関する情報を取得した。また舌表面の湿潤度を検査用濾紙(キソウェット, KISOサイエンス株式会社)を用いて測定した。

栄養調査は半定量的食物摂取頻度調査法を用いて行った。各食品の摂取状況に対する回答から四訂日本食品標準成分表に基づいて計算されたナトリウム量をもとに食塩相当量を算出した。

口腔常在微生物叢解析のため対象者に2分間のガムの咀嚼を依頼した。ガム咀嚼中に分泌された唾液をコンカルチュールに吐出された刺激唾液の重量を測定・記録したのち

氷上にて研究室に持ち帰り、口腔常在微生物叢の分析を行った。

2.3 口腔常在微生物叢の評価

2.3.1 各検体に含まれる総細菌量の評価

研究室に持ち帰った唾液検体それぞれからビーズ破砕法を用いて微生物群集DNAを抽出した。唾液に含まれる口腔常在微生物叢の総細菌量は取得した微生物群集DNAを鋳型とした定量PCR法を用いて決定した。細菌共通配列である806F(5'-TTA GAT ACC CYG GTA GTC C-3')および926R(5'-CCG TCA ATT YCT TTG AGT TT-3')とSYBR Greenを用いて16S rRNA遺伝子V5領域をリアルタイムPCR法により増幅し、既知の量の細菌DNAとの増幅曲線と比較することで算出した。

2.3.2 各検体に含まれる細菌構成の評価

口腔常在微生物叢の細菌構成については細菌16S rRNA遺伝子V1-V2領域の塩基配列に基づく網羅的細菌群集解析法を用いた。まず塩基配列解読用のアダプター配列および検体識別用のタグ配列を付与した細菌共通配列8F(5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3')および338R(5'-TGC TGC CTC CCG TAG GAG T-3')をプライマーとしたPCR法により各微生物群集DNA検体に含まれる細菌16S rRNA遺伝子V1-V2領域を網羅的に回収・増幅した。各対象者から得られた検体識別用のタグ配列の異なる増幅断片を300名分程度ずつ混合し精製したのち、エマルジョンPCR法により塩基配列解読に用いる鋳型DNAとして調整した。調整した鋳型DNAの塩基配列を次世代シーケンサーIon PGM(Thermo Fisher Scientific社)を用いて決定した。

取得した塩基配列情報はアダプター配列を除去したのち検体識別用タグ配列をもとに各対象者に振り分けた。続いて解読断片長やクオリティスコア等に基づき低品質な塩基配列の除去を行った。さらに97%以上一致する塩基配列をoperational taxonomic unit(OTU, 操作上の菌種)に纏めたのち、それぞれの代表配列を口腔細菌塩基配列データベースであるexpanded Human Oral Microbiome Database(eHOMD)に対し相同性検索を行うことで該当する菌種を同定した。各検体に含まれる菌種に該当する塩基配列のそれぞれの対象者に由来する塩基配列に対する比率を算出することで細菌構成を決定した。

2. 4 分析

2. 4. 1 食塩摂取量と口腔保健状態との関連の検討

生活習慣病予防健診において歯科健診を受診するとともに唾液検体を提供した被験者のうち栄養調査にも回答した者を本分析の対象者とした。各食品の摂取状況に対する回答から四訂日本食品標準成分表に基づいて計算されたナトリウム量をもとに算出された食塩相当量を歯科健診で取得した対象者の口腔の健康状態に関する結果と連結し、分析用データセットを作成した。食塩相当量に基づき対象者を四分位群に分けたのち、口腔の健康状態および常在微生物叢の状態との関連について分析した。またエネルギー1000 kcalあたりの食塩相当量についても算出し、これについても四分位群に分けたのち口腔の健康状態および常在微生物叢の状態との関連について分析を行った。

歯科健診では歯の状態と歯周組織状態を評価し、現在歯数、う蝕に関する指標としてう蝕経験歯数、歯周病に関する指標として歯周ポケット深さ、プロービング時出血の有無に関する情報を分析に使用した。う蝕、歯周病、歯の喪失と食塩相当量との関連を統計的に分析し、歯の健康と食塩摂取との関連について検討を行った。

2. 4. 2 食塩摂取量と口腔常在微生物叢との関連についての検討

まず食塩相当量に基づいた四分位群における構成比率の唾液中の総細菌量との関連の有無について検討した。続いて細菌構成解析にて α -diversity 指標として検出 OTU 数, Shannon diversity index, Phylogenetic diversity を算出した。 β -diversity 指標として UniFrac 距離を算出し細菌構成の比較に用いて検討を行った。

続いて過去の研究で口腔の健康状態との関連が指摘されている以下の 4 つの細菌群の構成比率を算出し、食塩相当量に基づいた四分位群における構成比率の差異の有無について検討した。

- グループ 1 細菌群(疾患関連常在細菌群)⁷⁾:
Streptococcus parasanguinis, *Prevotella histicola*, *Streptococcus salivarius*, *Veillonella parvula*, *Veillonella rogosae*
- グループ 2 細菌群(健康関連常在細菌群)⁷⁾:
Neisseria flavescens, *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella sanguinis*, *Granulicatella adiacens*
- 歯肉縁下特異細菌群(歯周病関連細菌群)⁸⁾:

Porphyromonas gingivalis, *Tannerella forsythia*, *Streptococcus constellatus*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fretibacterium* sp. HMT-359, *Filifactor alocis*, *Desulfobulbus* sp. HMT-041, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium* sp. HMT-370, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*

- う蝕関連細菌群:

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* species

2. 4. 3 食塩摂取量と唾液分泌量および組成との関連の検討

本調査で口腔常在微生物叢解析のために提供を受けた唾液はガムを 2 分間咀嚼しながら吐出された刺激唾液であり、その重量を単位時間あたりの唾液分泌量として評価した。また単位時間に舌上に置いた検査用濾紙に唾液が浸透した長さを舌湿潤度として評価した。これらの情報と食塩相当量の情報を連結し、両者の関連の有無について検証を行った。一部の対象者の唾液については Human s-IgA (Saliva) ELISA Kit (株式会社矢内原研究所)を用いて IgA 濃度を測定し食塩相当量との関連を検討した。

2. 5 口腔微生物叢培養系を用いた食塩添加が細菌構成に与える影響の検討

口腔内における食塩濃度の上昇が常在微生物叢の構成に直接影響を与えうるか確認するため、唾液・舌苔微生物叢のほぼ全ての優占種を微生物叢内での構成比率を大きく変えることなく増殖させることができる Basal medium containing mucin (BMM) 培地を用いた口腔常在微生物叢培養系⁹⁾による検討を行った。20~50 歳の研究参加者から取得した舌苔微生物叢を異なる濃度 (0, 32, 64, 125, 250 mM) の食塩を加えた BMM 培地にてそれぞれ 13 時間培養し、培養後に遠心分離により沈殿を収集し取得した沈殿から前述の方法を用いて DNA を回収した。得られた DNA を鋳型として PCR 法により各微生物群集 DNA 検体に含まれる細菌 16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を網羅的に回収・増幅したのち、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報について各配列のクオリティーチェック等の前処理を行ったのち口腔細菌塩基配列データベースで eHOMD に対し相同性検索を行うことで該当する菌種を同定し、細菌構成を決定した。添加食塩量の増加に伴い増加あるいは減少している菌種を特定し、地域住民調査で示された細菌構成の差異が食塩への曝露によるものか検証した。

3. 研究結果

3.1 食塩摂取量と口腔保健状態との関連の検討

3.1.1 分析対象者

2012年に福岡県糟屋郡久山町で行われた生活習慣病予防健診において歯科健診を受診した40歳から79歳の住民のうち、半定量的食物摂取頻度調査法を用いた栄養調査にも回答し四訂日本食品標準成分表に基づいて算出された食塩相当量の情報を取得可能な者は2320名であった。

3.1.2 食塩摂取量と口腔の健康状態との関連

食塩相当量と口腔の健康状態との関係を明らかにするため、食塩相当量の四分位に基づき対象者を第一分位群(Q1群, ≤ 8.316 g; n = 582), 第二分位群(Q2群, 8.334–10.016 g; n = 579), 第三分位群(Q3群, 10.020–12.480 g; n = 579), 第四分位群(Q4群, > 12.520 g; n = 580)の4群に分類した。

上記4群について現在歯数, う蝕の状態(う蝕経験歯数), 歯周病の状態(平均歯周ポケット深さ, 平均クリニカルアタッチメントロス)を比較した結果をTable 1に示す。現在歯数, う蝕経験歯数, 平均歯周ポケット深さ, 平均クリニカルアタッチメントロスのいずれも4群間において有意な差は認めなかった。

Table 1 食塩相当量と口腔の健康状態との関係

	Dietary salt intake (sodium chloride equivalent), quartile				p-value ^a
	Q1	Q2	Q3	Q4	
No. of present teeth	23.6 ± 0.3	23.4 ± 0.3	23.6 ± 0.3	23.2 ± 0.3	0.311
Dental caries status					
No. of DFT	13.9 ± 0.2	14.1 ± 0.2	13.8 ± 0.2	13.5 ± 0.2	0.213
Periodontal conditions					
Mean CAL	2.35 ± 0.04	2.33 ± 0.04	2.33 ± 0.04	2.32 ± 0.04	0.646
Mean PPD	2.10 ± 0.03	2.06 ± 0.03	2.07 ± 0.03	2.08 ± 0.03	0.682

Age and sex-adjusted mean ± SE. ^aMultivariate regression analysis.

Abbreviation: DFT, decayed and filled teeth; CAL, clinical attachment loss; PPD, periodontal pocket depth.

3.1.3 食塩摂取量と口腔の健康状態の関連の男女別での検討

食塩摂取量は女性では男性に比べ少なく, 口腔の健康状態も男性に比べ女性のほうが良好であることが知られている。本集団でも両者ともに男女間で明らかな差異が認められることから対象集団を男性と女性に分け, 食塩相当量と口腔の健康状態との関連について再度検討した。

男性では食塩相当量の多い群ほど現在歯数が少なく, この減少傾向は統計的にも有意であった(P = 0.023, 重回帰分析, Fig. 1)。食塩相当量の最も少ない群(Q1群)の年齢調整後の平均現在歯数は23.8 ± 0.4歯であるのに対し食塩相当量の最も多い群(Q4群)では22.4 ± 0.4本

であり, 両群の間に有意な差が認められた。一方で女性では食塩相当量と現在歯数との間に有意な関連は認められず, 食塩相当量の最も少ない群(Q1群)の年齢調整後の平均現在歯数は23.5 ± 0.3歯と男性の食塩相当量の最も少ない群(Q1群)と同等であるのに対し, 食塩相当量の最も多い群(Q4群)でも23.7 ± 0.3歯と有意な差を認めなかった。

一方で, これまでの歯周病の蓄積を示す指標である平均クリニカルアタッチメントロスについては, 女性では統計的にも有意ではないものの食塩相当量の多い群ほど小さい傾向が認められ, Q4群とQ1群の差異に関するP値は0.1を下回った(P = 0.118, 重回帰分析, Fig. 2)。この結果は

女性においてはむしろ食塩相当量の多いものほど歯周組織の状態が良好である可能性があることを示唆している。さらなる慎重な検討は不可欠であるものの女性ではある程度の食塩摂取が口腔の健康の維持に必要とされる可能性が考えられる。男性においては食塩相当量と平均クリニカルアタッチメントロスとの間に関連を認めなかった ($P = 0.501$, 重回帰分析, **Fig. 2**)。

これまでのう蝕罹患を示すう蝕経験歯数については食塩相当量の異なる 4 群の間に注目すべき差異は認めなかった (男性: $P = 0.456$, 女性: $P = 0.118$, 重回帰分析, **Table 3**)。現在の歯周病の状態を示す指標である平均歯周ポケット深さについても食塩相当量の異なる 4 群の間に特筆すべき差異は認めなかった (男性: $P = 0.874$, 女性: $P = 0.356$, 重回帰分析, **Table 3**)。

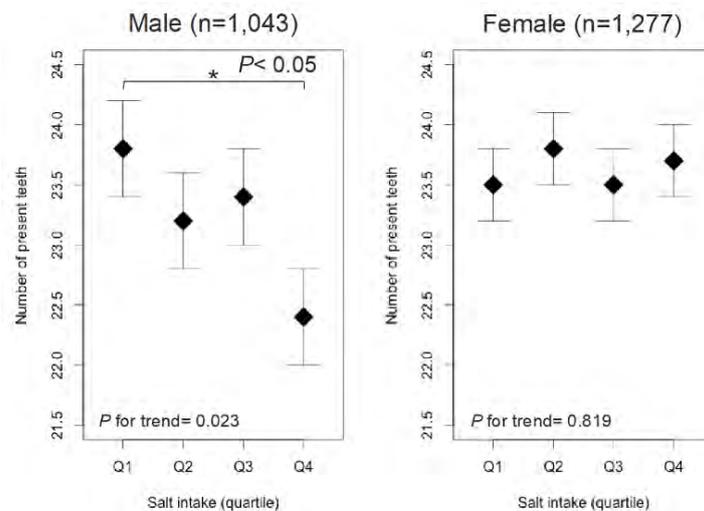


Fig. 1. 性と女性それぞれにおける食塩相当量（四分位群）と年齢調整後の現在歯数との関係

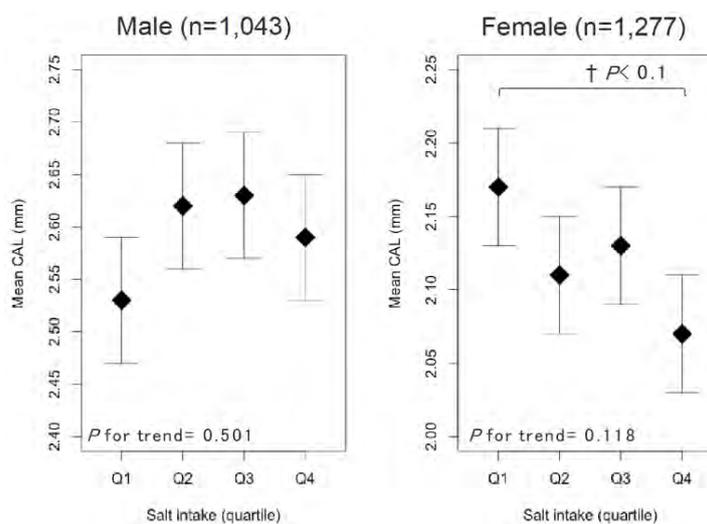


Fig. 2. 男性と女性それぞれにおける食塩相当量（四分位群）と平均クリニカルアタッチメントロス（これまでの歯周病の蓄積を示す指標）との関係

Table 3 男性と女性それぞれにおける食塩相当量（四分位群）とう蝕経験歯数および平均歯周ポケット深さ（現在の歯周病の状況を示す指標）との関係

	Dietary salt intake (sodium chloride equivalent) , quartile				p-value ^a
	Q1	Q2	Q3	Q4	
Male (n= 1,043)					
No. of DFT	12.9±0.4	12.6±0.4	13.2±0.4	12.3±0.4	0.456
Mean PPD	2.22±0.05	2.24±0.05	2.24±0.05	2.23±0.05	0.874
Female (n= 1,277)					
No. of DFT	14.8±0.3	15.1±0.3	14.8±0.3	14.2±0.3	0.118
Mean PPD	1.97±0.04	1.95±0.04	1.95±0.04	1.92±0.04	0.356

Age and sex-adjusted mean ± SE. ^aMultivariate regression analysis.

Abbreviation: DFT, decayed and filled teeth; CAL, clinical attachment loss; PPD, periodontal pocket depth.

3. 2 食塩摂取量と口腔常在微生物叢との関連の検討

3. 2. 1 分析対象者の抽出

歯科健診を受診した 40～79 歳の成人住民のうち栄養調査にも回答した者で、唾液の提供に同意し口腔常在微生物叢解析が可能であった者 1903 名を本分析の対象とした。対象者の口腔常在微生物叢の総細菌量と細菌構成を決定し、食塩相当量に基づき分類した四分位群にて比較を行った。口腔常在微生物叢と食塩相当量についても男女に分けて分析を進めた。

3. 2. 2 食塩摂取量と唾液中総細菌量との関連

各対象者の唾液中に含まれる総細菌量については SYBR Green を用いたリアルタイム PCR 法にて 16S rRNA 遺伝子のコピー数を算出することで決定した。唾液 500 μl あたりの総細菌量の中央値は男性、女性それぞれ 10^{7.53} コピー、10^{7.64} コピーであり、女性の方が有意に高かった (P < 0.001, ウィルコクソンの順位和検定)。

食塩相当量に基づき分類した四分位群における総細菌量は男性、女性のいずれにおいても群間に総細菌量の差を認めなかった (男性:P = 0.650, 女性:P = 0.334, ヨンクヒール-タプストラ検定, **Fig. 3**)。口腔常在微生物叢と食塩相当量についても男女に分けて分析を進めた。

3. 2. 3 唾液中の細菌構成の決定

唾液中の細菌構成の決定には DNA の塩基配列の分析に基づく細菌群集解析法を用いた。各検体から抽出した微生物群集 DNA を鋳型として PCR 法を用いて網羅的に回収・増幅した細菌 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサー-Ion PGM を用いて決定した。14 回のシーケンスランで取得した 61,089,034 リードの解読配列から、

対象者に由来する高品質塩基配列 23,084,339 リードを選出し細菌構成の決定に使用した。細菌属レベルの分類で最優占種は *Streptococcus* 属であり、続いて *Prevotella*, *Rothia*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Fusobacterium* といった菌属が高い割合を占めていた。これらの菌属は過去の唾液中に含まれる微生物叢の解析でも優占種として報告されているものと一致していた。

3. 2. 4 男性での食塩摂取量と唾液中の細菌構成の関連

男性における食塩摂取と口腔常在微生物叢構成との関連の有無を明らかにするため、食塩相当量に基づく四分位群での唾液中の細菌構成の差異について検討を行った。細菌構成の複雑さを示す α -diversity 指標である検出 OUT (菌種) 数, Shannon index, Phylogenetic diversity には四分位群間に有意な差異を認めなかった。細菌構成類似度指標 unweighted UniFrac に基づく β -diversity 解析においても四分位群の細菌構成に有意な違いを認めず (P = 0.059, PERMANOVA), 食塩相当量と口腔微生物叢の全体構成との間に関連を認めないことが示唆された。*Streptococcus* 属をはじめとする主要な 14 の細菌属の構成比率にも統計的に有意な差を認めなかった (**Fig. 4**)。

続いて過去の研究で口腔の健康状態との関連が指摘されている 4 つの細菌群の構成比率について四分位群で比較を行った。う蝕関連細菌群, 歯周病関連細菌群, グループ 1 常在細菌群の構成比率には群間で有意な差を認めなかった一方でグループ 2 常在細菌群の構成比率は食塩相当量の多い群ほど有意に低かった (**Table 4**)。グループ 2 常在細菌

菌群は口腔の健康状態が良好な者で構成比率が高いことから、食塩摂取量の多い者ほど口腔常在微生物叢の細菌構成が悪化していることが示唆された。

食塩相当量は食事量、すなわち摂取エネルギー量が増えると一般的に増加することからエネルギー1000 kcalあたりの食塩相当量についても算出し、四分位群(Q1 群, <5.601 g; Q2 群, 5.601–6.771 g; Q3 群, 6.779–8.327 g; Q4 群, > 8.327 g)において再度細菌構成の関連について検討を行った。食塩相当量での分析の際と同様に α -diversity 指標である検出 OUT(菌種)数, Shannon index, Phylogenetic diversity にはエネルギー調整後の食塩相当量の四分位群間に有意な差異を認めなかった(**Table 5**)。一方で、細菌構成類似度指標 unweighted UniFrac に基づく β -diversity 解析においては四分位群の細菌構成に有意な違いを認め ($P = 0.025$, PERMANOVA, **Fig. 5**)、主座標分析プロットにおいて食塩相当量の多い群ほど第二主座標の正方向に局在している傾向を認めた。またエネルギー調整前の食塩相当量と関連を認めたグループ 2 常在細菌群の構成比率は食塩相当量の多い群ほど有意に低かった(**Table 6**)。加えてグループ 1 常在細菌

群の構成比率は食塩相当量の多い群で有意に高く、う蝕関連細菌群および歯周病関連細菌群の構成比率も有意に高かった(**Table 6**)。エネルギー調整後の食塩相当量を用いて分析した場合食塩相当量を用いた場合と比べて細菌構成の悪化との間により強い関連を認めたことから、食塩量の多い食事への曝露が細菌構成の変化に影響を及ぼしている可能性が示された。

過去の研究でグループ 2 常在細菌群の構成比率は高齢の者やう蝕経験菌の多い者ほど低いことを報告されている^{5,7)}。エネルギー調整後の食塩相当量の増加とグループ 2 常在細菌群の構成比率の関連がそれらの交絡因子による影響である可能性を排除するため、年齢、う蝕経験菌数、プラークインデックス(歯垢付着量)を共変量として重回帰分析を行った。エネルギー調整後の食塩相当量は上記共変量の影響を考慮してもグループ 2 常在細菌群の構成比率と有意な関連を認めたことから($P = 0.019$)、食塩摂取が口腔常在微生物叢の構成バランスに影響を及ぼしている可能性が示された。

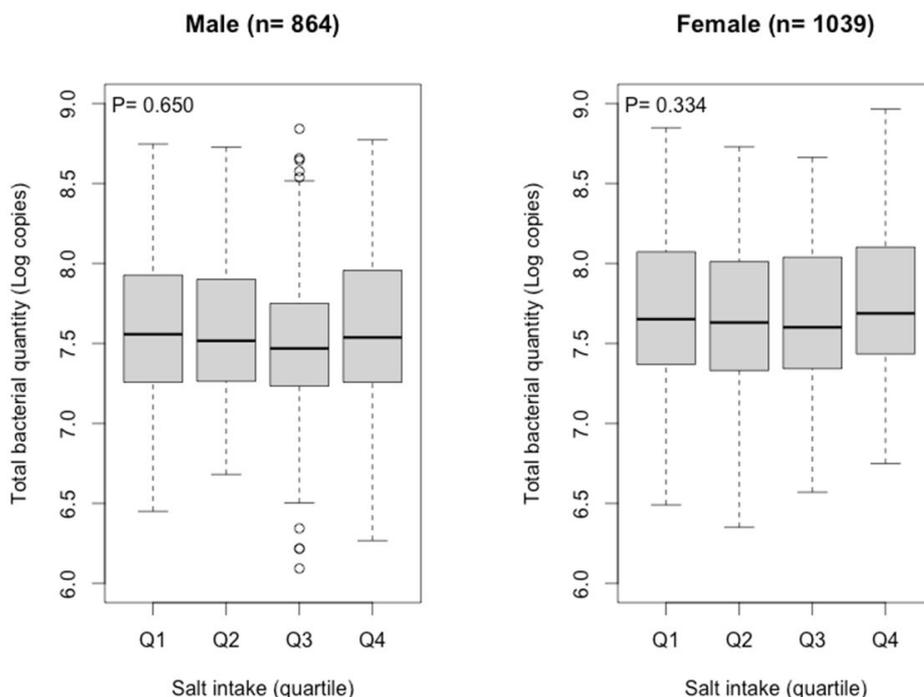


Fig. 3. 男性と女性それぞれにおける食塩相当量（四分位群）と唾液中総細菌量（対数值）との関係

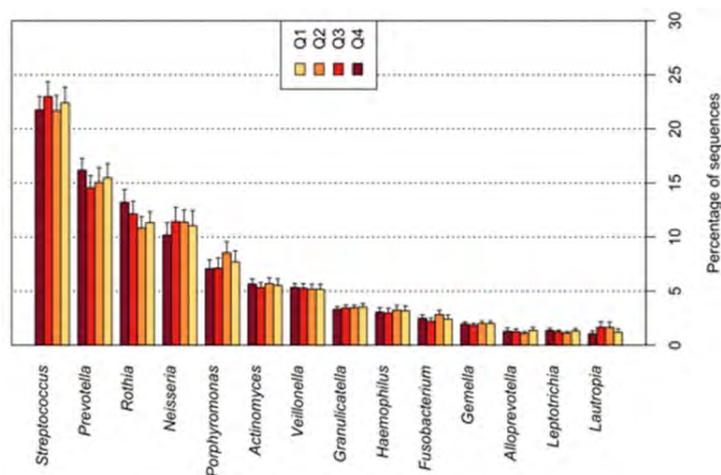


Fig. 4. 男性の口腔常在微生物叢における主要な 14 の細菌属の構成比率
対象者を食塩相当量で四分位群に分け示した。いずれの細菌属の構成比率についても四群間に有意な
差は認めなかった（ボンフェローニ検定）。

Table 4 男性の口腔常在微生物叢における 4 つの口腔疾患関連細菌群の構成比率

Bacterial group	Dietary salt intake levels (sodium chloride equivalent), quartile				p-value
	Q1	Q2	Q3	Q4	
Group 1 commensals	12.12±9.82	11.9±9.84	12.34±9.67	12.55±9.55	0.239
Group 2 commensals	20.55±11.88	22.12±12.37	20.19±11.66	19.04±12.03	0.044
Dental caries-associated taxa	0.37±1.73	0.22±0.79	0.31±1.08	0.27±0.82	0.097
Periodontitis-associated taxa	0.77±2.92	0.61±1.14	0.66±0.94	0.73±1.08	0.074

食塩相当量の異なる四分位群で比較した。p 値はボンフェローニ検定に基づき算出した

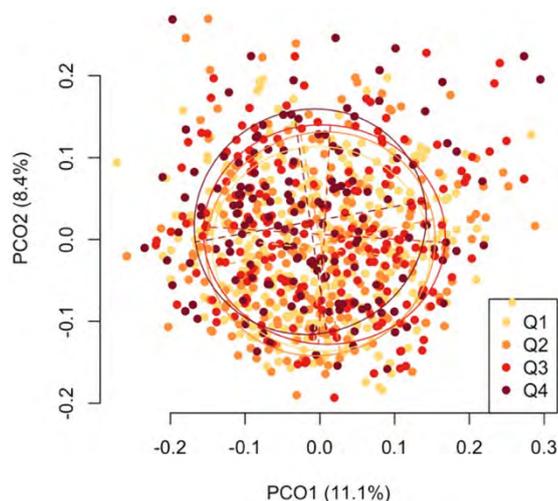


Fig. 5. 男性の口腔常在微生物叢の細菌構成の類似度関係（Unweighted UniFrac 指標で評価）を示す主座標解析
プロット
図中の各点はそれぞれの対象者を示し、エネルギー1000 kcal あたりの食塩相当量（四分位群）に基づき異なる色
で示した。

Table 5 男性におけるエネルギー1000 kcal あたりの食塩相当量（四分位群）と口腔常在微生物叢の細菌構成の α 多様性との関係

	Dietary salt intake levels (sodium chloride equivalent per 1,000 kcal), quartile				p-value
	Q1	Q2	Q3	Q4	
Alpha diversity indices					
No of identified OTU	209.2±37.1	20.06±37.4	204.8±39.9	207.6±40.5	0.729
Shannon diversity index	3.61±0.32	3.57±0.36	3.57±0.38	3.58±0.36	0.900
Phylogenetic diversity	10.92±1.57	10.88±1.59	10.83±1.74	11.05±1.7	0.466

p 値はヨルクヒール-タプトスピラ検定に基づき算出した

Table 6 男性の口腔常在微生物叢における 4 つの口腔疾患関連細菌群の構成比率

	Dietary salt intake levels (sodium chloride equivalent per 1,000 kcal), quartile				p-value
	Q1	Q2	Q3	Q4	
Bacterial group					
Group 1 commensals	11.49±9.32	11.87±9.8	13.09±9.92	13.16±9.88	0.018
Group 2 commensals	21.42±12.38	21.17±12.4	19.15±10.84	18.81±12.02	0.015
Dental caries-associated taxa	0.23±0.77	0.35±1.69	0.24±0.83	0.38±1.08	0.005
Periodontitis-associated taxa	0.75±2.49	0.54±0.78	0.66±0.96	0.86±1.19	0.035

エネルギー1000 kcal あたりの食塩相当量の異なる四分位群で比較した。

p 値はヨルクヒール-タプトスピラ検定に基づき算出した。

3. 2. 5 女性での食塩摂取量と唾液中の細菌構成の関連

女性においても男性と同様に食塩相当量に基づく四分位群での唾液中の細菌構成の差異について検討を行った。いずれの α -diversity 指標も四分位群間に有意な差異を認めなかった。細菌構成類似度指標 UniFrac に基づく β -diversity 解析においても四分位群の細菌構成に有意な違いを認めず ($P < 0.79$, PERMANOVA), 女性では食塩相当量と口腔微生物叢の全体構成との間に関連を認めないことが示唆された。*Streptococcus* 属をはじめとする主要な細菌属の構成比率にも統計的に有意な差を認めなかった。

口腔の健康状態との関連が指摘されている前述の4つの細菌群の構成比率についても四分位群で比較を行った。う蝕関連細菌群, 歯周病関連細菌群, グループ1常在細菌群, グループ2常在細菌群のいずれの構成比率についても四分位群の群間に有意な差は認めなかった。エネルギー量

調整後の食塩相当量の四分位群間においてもう蝕関連細菌群, 歯周病関連細菌群, グループ1常在細菌群, グループ2常在細菌群の構成比率のいずれについても有意な差は認めなかった (Table 7)。

3. 2. 6 口腔微生物叢培養系における食塩添加の細菌構成への影響

男性で認められた食塩相当量の違いに伴う細菌構成の差異が高濃度の食塩への曝露による直接的影響かを検証するため, 11名(男性5名, 女性6名, 23~44歳)から採取した舌苔微生物叢を異なる濃度(0, 32, 64, 125, 250 mM)の食塩を添加したBMM培地にてそれぞれ13時間培養し, 培養後の細菌構成を比較した (Fig. 6)。

培養後の細菌構成の β -diversity 解析を行ったところ, 添加濃度の違いによる差異は11名の細菌構成の個人差に比べ明らかに小さく, 高濃度の食塩への持続的曝露は口腔微生物叢の構成を大きく変えるようなものではないことが示唆された。

培養後の歯周病関連細菌群, グループ 1 常在細菌群, グループ 2 常在細菌群の構成比率にも添加濃度の差異に伴う有意な違いは検出されなかった ($P = 0.272$, $P = 0.326$, $P = 0.946$; ヨンクヒール-タプストラ検定)。

それでもグループ 2 常在細菌群のうち *Haemophilus parainfluenzae* と *Gemella sanguinis* の構成比率は添加濃度が高いほど有意に低い傾向を認めた ($P = 0.002$, $P = 0.002$, $P = 0.018$; ヨンクヒール-タプストラ検定; Fig. 7)。食塩相当量

の多い男性の口腔微生物叢におけるグループ 2 常在細菌群の構成比率の減少の一部が高濃度の食塩への持続的曝露による可能性が示された。ただしグループ 2 常在細菌群に属する *Granulicatella adiacens* は添加濃度が高いほど有意に増加する傾向を認められており (Fig. 7), グループ 2 常在細菌の中でも食塩添加への反応に差異があることも示された。

Table 7 女性の口腔常在微生物叢における 4 つの口腔疾患関連細菌群の構成比

Bacterial group	Dietary salt intake levels (sodium chloride equivalent), quartile				p-value ^a
	Q1	Q2	Q3	Q4	
Group 1 commensals	13.93±11.57	13.81±10.72	15.06±10.91	14.13±10.63	0.308
Group 2 commensals	22.72±12	21.04±12.5	20.55±11.79	21.12±12.5	0.130
Dental caries-associated taxa	0.29±1.42	0.28±0.87	0.48±2.24	0.34±1.05	0.141
Periodontitis-associated taxa	0.47±0.77	0.47±0.98	0.53±0.84	0.46±0.76	0.289

エネルギー1000 kcal あたりの食塩相当量の異なる四分位群で比較した。
p 値はヨンクヒール-タプストラ検定に基づき算出した。

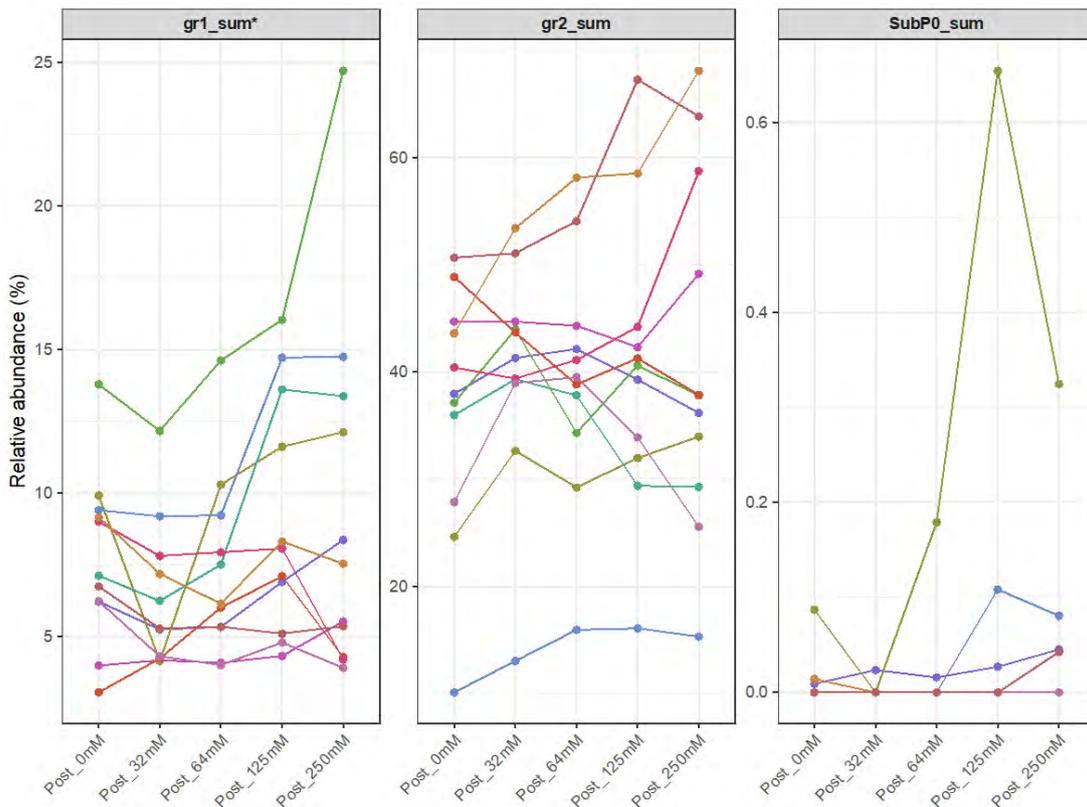


Fig. 6. 異なる濃度 (0, 32, 64, 125, 250 mM) の食塩を添加した BMM 培地にて舌苔微生物叢を 13 時間培養した後の口腔疾患関連細菌群 (グループ 1 常在細菌群, グループ 2 常在細菌群, 歯周病関連細菌群) の構成比率 11 名それぞれの結果を異なる色で示した。

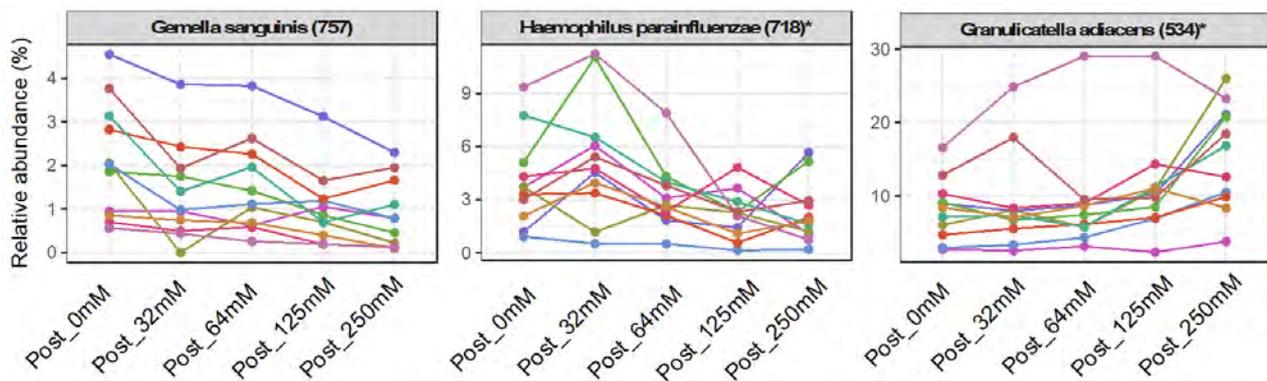


Fig. 7. 異なる濃度 (0, 32, 64, 125, 250 mM) の食塩を添加した BMM 培地にて舌苔微生物叢を 13 時間培養した後のグループ 2 常在細菌群に含まれる菌種の構成比率

3. 3 食塩摂取量と唾液量・組成との関連についての検討

3. 3. 1 食塩相当量と唾液分泌量との関連の検討

塩分摂取は口腔の自浄作用に強く関わる唾液分泌量の分泌や組成にも関与する。そこで歯科健診とともに栄養調査に回答した 1923 名のガム咀嚼 2 分間あたりの刺激唾液量および検査用濾紙を用いて測定した舌表面の湿潤度の情報を食塩相当量のデータを連結し、口腔内湿潤度と食塩摂取との間の関連について検討した。

食塩相当量の四分位に基づいて分類した四群について刺激唾液分泌量を男女別で比較したところ、男女いずれについても群間に有意な差を認めなかった(男性:P=0.386, 女性:P=0.615, Kruskal-Wallis test, Fig. 8)。舌湿潤度についても男女別で比較を行ったが、こちらも男女いずれも群間に有意な差を認めなかった(男性:P=0.696, 女性:P=0.597, Kruskal-Wallis test)。男性で見られる食塩相当量と歯の状態および口腔微生物叢との関係が口腔内湿潤度の低下を介するものではないことが示唆された。

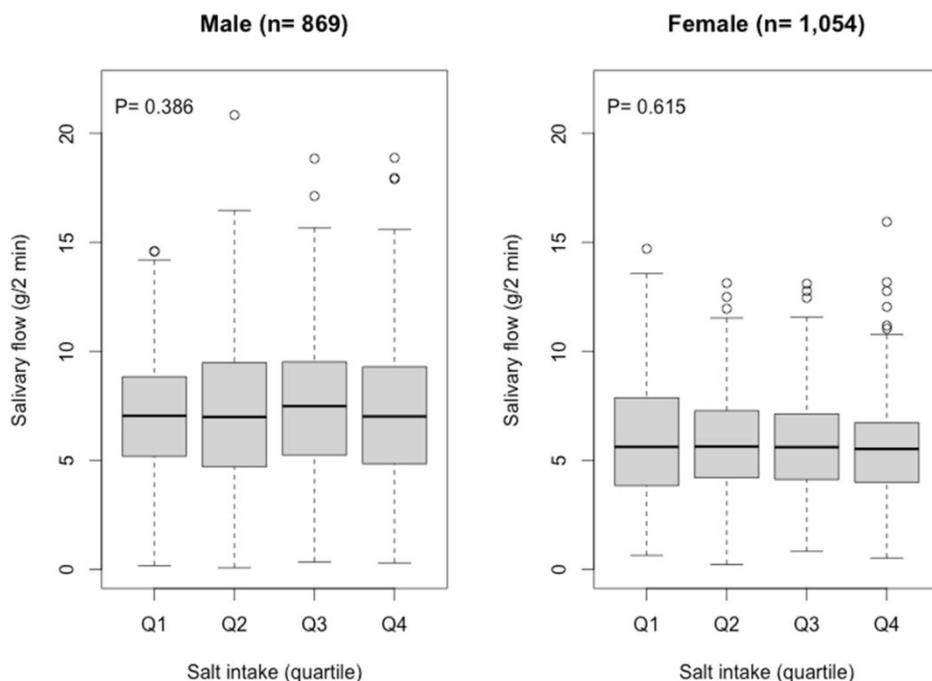


Fig. 8. 男性と女性それぞれにおける食塩相当量 (四分位群) と 2 分間の刺激唾液分泌量との関係 p 値は Kruskal-Wallis 検定に基づき算出した。

3. 3. 2 食塩相当量と唾液中 IgA 濃度との関連の検討

対象者のうち節目年齢に該当する 383 名の唾液中 IgA 濃度を測定し、食塩相当量との関連を分析した。男性、女性のいずれでも両者の間に有意な相関は認めなかった。

4. 考察

本研究ではまず過去の地域住民を対象とした調査結果を用いて食塩摂取と口腔保健状態との関連についての検討を行った。まず全対象者において栄養調査で取得した食事における食塩相当量と歯科健診で取得した現在歯数、う蝕の状態、歯周病の状態といった口腔の健康状態との関連について検討したものの、両者の間に有意な関連は認めなかった (Table 1)。一方でこれまでの報告¹⁰⁾と同様に本集団でも食塩相当量と口腔の健康状態のいずれも男女間で大きな差異が認められたことから、男女に分けて食塩相当量と口腔の健康状態との関連を検討することとした。その結果、女性では食塩相当量の最も多い群でも食塩相当量の最も少ない群と現在歯数はほぼ同等であったのに対し、男性では食塩相当量が多い群ほど有意に現在歯数が少ないことが明らかになった (Fig. 1)。このことから食塩摂取量の増加は特に男性において口腔の健康状態の不良と関連を示すことが示唆された。

続いて口腔常在微生物叢の総細菌量および細菌構成のデータセットを構築し、口腔常在微生物叢の状態と食塩相当量との関連について男女に層別化して検討を行った。微生物叢に関する分析でも食塩相当量に基づく四分位群において女性では注目に値する差異を認めなかった一方で (Table 7)、男性においては過去の研究で口腔の健康状態との関連が指摘されている細菌群の構成比率に四分位群間で有意な差異を認めた (Table 6)。食塩摂取の多い男性では口腔の健康状態の悪化に加え口腔常在微生物叢の状態の悪化がみられることが示唆された。

とはいえ男性においても α -diversity や β -diversity といった口腔常在微生物叢の全体像を捉えた微生物群集指標の分析では、注目に値するほどの大きな差異を認めただけではない (Table 5, Fig. 5)。このことから食塩摂取の多寡と関連する口腔常在微生物叢の変化は優占種が大きく入れ替わるようなものではなく、あくまで常在細菌の構成バランスの小さなシフトであることが示唆される。

口腔における飲食物の停滞時間がそれほど長くないことを考えればこの結果は理にかなったものであると言える。それでもこうした構成バランスのシフトと健康状態との関係が過去に多数指摘されており^{1-5, 7, 11-13)}、本研究でも残存菌数にも食塩摂取量の多寡との関連が認められている。今回認められた常在細菌の構成バランスのシフトでも長期間持続することで口腔の健康状態に影響が及んでいる可能性が考えられる。したがって男性における食塩摂取量の管理が口腔の健康増進において有用である可能性は十分にあると言える。

単位エネルギー量あたりの食塩相当量の最も少ない Q1 群に該当する男性では健康状態が良好な者の口腔で高い割合を占めるグループ 2 常在細菌群の構成比率は $21.4 \pm 12.3\%$ であり、Q1 群の女性 ($22.7 \pm 12.0\%$) とほとんど変わらなかった。一方で食塩相当量の最も多い Q4 群の女性におけるグループ 2 常在細菌群の構成比率が $21.1 \pm 12.5\%$ と Q1 群とほぼ同等だったのに対し、Q4 群の男性では $18.8 \pm 12.0\%$ であり Q1 群と比べ大きな減少を認めた (Table 6)。多変量解析を用いて加齢や、う蝕経験歯数といった過去の研究でグループ 2 常在細菌群の構成比率の減少との関連が指摘されている交絡因子の影響を考慮した場合もグループ 2 常在細菌群の構成比率との間に有意な関連を認めたことから、男性においては食事における高濃度の塩分への曝露が口腔常在微生物叢の構成バランスに影響を及ぼしている可能性が示された。また口腔微生物叢培養系での検討においてもグループ 2 常在細菌群に該当する 2 つの菌種の培養後の構成比率はより高濃度の食塩を添加した場合において低くなる傾向を認めており (Fig. 7)、グループ 2 常在細菌群の構成比率の減少の一部が高濃度の食塩への持続的曝露によるものである可能性を支持している。ただし口腔微生物叢培養系で認めた添加食塩濃度と口腔微生物叢構成との関連は地域住民調査で男性において認めた関連と完全に一致するものではないことから、食塩摂取量の多い男性にみられるその他の特徴が口腔微生物叢に影響を与えている可能性がある。両者の関連の詳細については今後更なる検討が必要である。

食塩摂取は口腔の自浄作用に強く関わる唾液の分泌状況に影響を及ぼす可能性が考えられることから、食塩相当量と唾液分泌量、口腔内の湿潤度および IgA 濃度

との関連についても検討を行ったものの、男性と女性のいずれにおいても食塩相当量との間には有意な関連を認めなかった (**Fig. 3**)。男性でみられた食塩摂取量と口腔の健康状態の悪化や微生物叢構成の悪化は唾液の変化に起因するものではないと考えられる。

本研究により男性における食塩摂取量の増加と口腔の健康状態の不良および口腔微生物叢の構成バランスの悪化との関連が示唆された。特に男性においては口腔の健康維持を考える上でも食塩摂取量の管理に注意を払う必要があると考えられる。歯の喪失防止および健康な口腔の維持は健康寿命の延伸において重要であり、本研究の成果は歯科保健指導や栄養指導を行ううえで重要なエビデンスになると期待できる。

5. 今後の課題

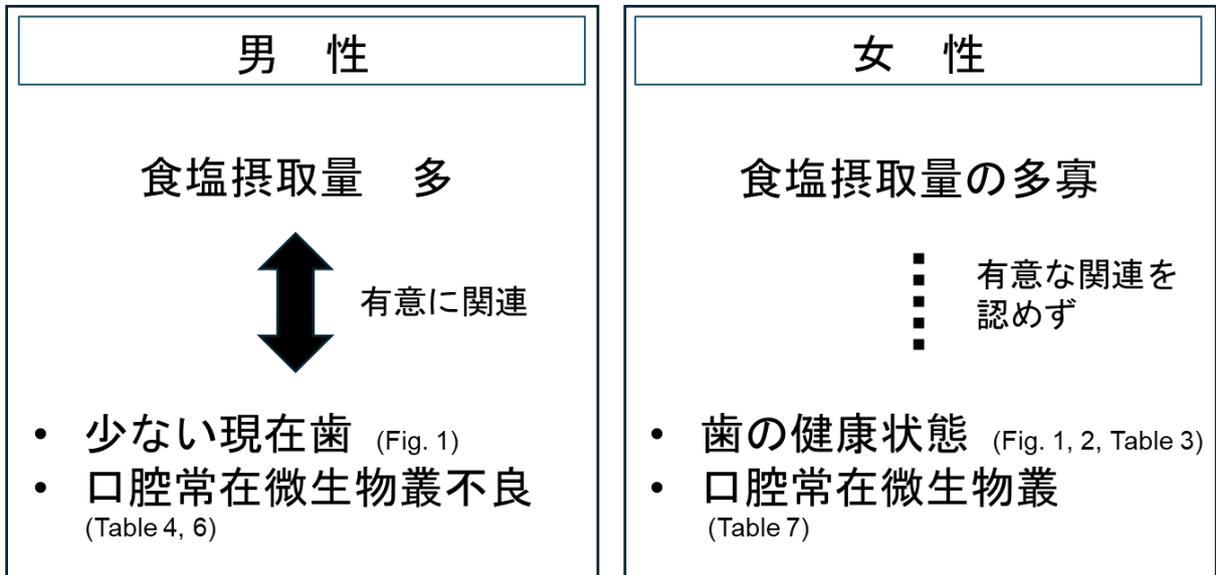
本研究で男性では食塩摂取量の増加と口腔保健状態および口腔微生物叢構成の悪化との関連を認めた一方で女性において同様の関係性がみられなかった原因は不明なままである。一つの可能性として男性では女性と比べ歯周組織の状態が不良であることが関連している可能性が考えられる。歯周病の臨床的指標に加え、唾液中の歯周病関連細菌群の構成比率についても男性は女性と比べ有意に高かった ($P < 0.001$, ウィルコクソンの順位和検定)。こうした歯周組織の炎症や歯周病関連細菌の増加、それに伴う唾液に含まれるタンパク成分や代謝物の変化と食塩摂取の増加が併存した場合に口腔常在微生物叢の構成バランスに影響が及ぶのかもしれない。女性で食塩摂取量の増加と口腔状態の悪化に寄与しない理由を明らかにすることで口腔常在微生物叢の構成バランスを制御する口腔保健アプローチの開発に向けた手がかりに繋がる可能性があることから、今後さらなる検討を行なっていく必要があると言える。

6. 文献

1. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci.* 2017;59 (2) :201-206. doi: 10.2334/josnusd.16-0856. PMID: 28637979.
2. Zhang D, Takeshita T, Furuta M, Kageyama S, Asakawa M, Nambu K, Yamashita Y. Tongue Microbiota Composition and Dental Caries Experience in Primary School Children. *mSphere.* 2021 Apr 28;6 (2) :e01252-20. doi: 10.1128/mSphere.01252-20. PMID: 33910998; PMCID: PMC8092142.
3. Asakawa M, Takeshita T, Furuta M, Kageyama S, Takeuchi K, Hata J, Ninomiya T, Yamashita Y. Tongue Microbiota and Oral Health Status in Community-Dwelling Elderly Adults. *mSphere.* 2018 Aug 15;3 (4) :e00332-18. doi: 10.1128/mSphere.00332-18. PMID: 30111628; PMCID: PMC6094060.
4. Zaura E, Brandt BW, Prodan A, Teixeira de Mattos MJ, Imangaliyev S, Kool J, Buijs MJ, Jagers FL, Hennequin-Hoenderdos NL, Slot DE, Nicu EA, Lagerweij MD, Janus MM, Fernandez-Gutierrez MM, Levin E, Krom BP, Brand HS, Veerman EC, Kleerebezem M, Loos BG, van der Weijden GA, Crielaard W, Keijser BJ. On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *ISME J.* 2017 May;11 (5) :1218-1231. doi: 10.1038/ismej.2016.199. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28072421; PMCID: PMC5475835.
5. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, Shimazaki Y, Akifusa S, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Sci Rep.* 2016 Feb 24;6:22164. doi: 10.1038/srep22164. PMID: 26907866; PMCID: PMC4764907.
6. Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomeaus H, Haase S, Mähler A, Balogh A, Markó L, Vvedenskaya O, Kleiner FH, Tsvetkov D, Klug L, Costea PI, Sunagawa S, Maier L, Rakova N, Schatz V, Neubert P, Frätzer C, Krannich A, Gollasch M, Grohme DA, Côrte-Real BF, Gerlach RG, Basic M, Typas A, Wu C, Titze JM, Jantsch J, Boschmann M, Dechend R, Kleinewietfeld M, Kempa S, Bork P, Linker RA, Alm EJ,

- Müller DN. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature*. 2017 Nov 30;551(7682) :585-589. doi: 10.1038/nature24628. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29143823; PMCID: PMC6070150.
7. Asakawa M, Takeshita T, Furuta M, Kageyama S, Takeuchi K, Hata J, Ninomiya T, Yamashita Y. Tongue Microbiota and Oral Health Status in Community-Dwelling Elderly Adults. *mSphere*. 2018 Aug 15;3(4) :e00332-18. doi: 10.1128/mSphere.00332-18. PMID: 30111628; PMCID: PMC6094060.
 8. Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamanaka W, Yamashita Y. Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. *PLoS One*. 2017 Apr 3;12(4) :e0174782. doi: 10.1371/journal.pone.0174782. PMID: 28369125; PMCID: PMC5378373.
 9. Chen BJ, Takeshita T, Tajikara T, Asakawa M, Kageyama S, Shibata Y, Ayukawa Y, Yano Y, Yamashita Y. Butyrate as a Potential Driver of a Dysbiotic Shift of the Tongue Microbiota. *mSphere*. 2023 Feb 21;8(1) :e0049022. doi: 10.1128/msphere.00490-22. Epub 2022 Dec 12. PMID: 36507724; PMCID: PMC9942584.
 10. Furuta M, Takeuchi K, Takeshita T, Shibata Y, Suma S, Kageyama S, Asakawa M, Shimazaki Y, Hata J, Ninomiya T, Yamashita Y. Baseline periodontal status and modifiable risk factors are associated with tooth loss over a 10-year period: Estimates of population attributable risk in a Japanese community. *J Periodontol*. 2022 Apr;93(4) :526-536. doi: 10.1002/JPER.21-0191. Epub 2022 Feb 3. PMID: 34435683; PMCID: PMC9305417.
 11. Zhang D, Takeshita T, Furuta M, Kageyama S, Asakawa M, Nambu K, Yamashita Y. Tongue Microbiota Composition and Dental Caries Experience in Primary School Children. *mSphere*. 2021 Apr 28;6(2):e01252-20. doi: 10.1128/mSphere.01252-20. PMID: 33910998; PMCID: PMC8092142.
 12. Takeshita T, Nakano Y, Kumagai T, Yasui M, Kamio N, Shibata Y, Shiota S, Yamashita Y. The ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva is correlated with oral health status. *ISME J*. 2009 Jan;3(1):65-78. doi: 10.1038/ismej.2008.91. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18830275.
 13. Kageyama S, Takeshita T, Furuta M, Tomioka M, Asakawa M, Suma S, Takeuchi K, Shibata Y, Iwasa Y, Yamashita Y. Relationships of Variations in the Tongue Microbiota and Pneumonia Mortality in Nursing Home Residents. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018 Jul 9;73(8):1097-1102. doi: 10.1093/gerona/glx205. PMID: 29053769.

本研究の結果のまとめ



男性の口腔保健を考えるうえでの食塩摂取管理の重要性が示唆された

Relationship between Salt Intake and Oral Microbiota and Health Conditions

Toru Takeshita¹, Michiko Furuta¹, Kazuhiro Uchida² and Toshiharu Ninomiya³

¹ Section of Preventive and Public Health Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University,

² Department of Health Promotion, School of Health and Nutrition Science, Nakamura-Gakuen University,

³ Department of Epidemiology and Public Health, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

Summary

Diet is a source of nutrients for us, as well as microorganisms colonizing in the enteric tract, and is an important environmental factor that would affect the bacterial composition of the indigenous microbiota. Salt concentration, along with temperature and pH, is an important physical requirement for the growth of microorganisms. Therefore, dietary salt intake is thought to be involved in the bacterial community structure of oral indigenous microbiota and oral health conditions. In this study, epidemiological analysis was performed on community-dwelling adults aged 40-79 years using data on oral health status, oral indigenous microbiota in saliva, and dietary salt intake obtained from the health examinations and nutritional survey. Total bacterial density and bacterial composition were determined by quantitative PCR and 16S rRNA gene sequencing analyses using a next-generation sequencer, respectively. Participants were classified into quartiles based on their dietary salt intake levels and oral health and microbiota status were compared. Male participants in the high quartile group of sodium chloride equivalent had significantly fewer current teeth than those in the lower quartile, but no such relationship was found in female participants. No significant differences were observed in the total bacterial density in saliva between male and female participants with different levels of dietary salt intake. In contrast, the relative abundance of group II commensals, which were previously implicated as oral health-associated taxa were significantly lower in the male participants with higher levels of dietary salt intake. No significant differences were found in the bacterial composition of female participants with different levels of dietary salt intake. These results suggest that high dietary salt intake in male adults is associated with poorer oral health and a dysbiotic pattern of the oral indigenous microbiota. More attention should be paid to dietary salt intake when considering oral health promotion, especially in male.

神経系—免疫系を介した塩分感受性高血圧制御メカニズムの解明

井上 剛¹, 安部 力²

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学, ²岐阜大学大学院医学系研究科生理学

概要 高血圧発症への免疫細胞の関与は以前より少しずつ報告されていたが、近年そのメカニズムの解明が進むとともに、免疫細胞による血圧制御機構の存在が少しずつ明らかになってきている。そこで、神経系—免疫系という新しい切り口から、塩分感受性高血圧発症のメカニズム解明を目指すことを目的とする。

動物は 8～12 週齢の雄野生型マウス(C57BL/6J)およびマクロファージ特異的アセチルコリン受容体 X ノックアウトマウスを使用。塩分感受性高血圧としてアンジオテンシン II 誘導高血圧モデルを使用した。非観血的血圧測定および観血的血圧測定、各臓器における免疫細胞の動態評価、腎臓線維化の評価を行った。マクロファージ除去はクロドロン酸を 5 日に 1 回投与することで行なった。腎臓マクロファージを単離の上、網羅的遺伝子発現解析を施行した。

高血圧を誘導後に各臓器における免疫細胞の割合および数の変化を比較したところ、高血圧誘導マウスでは腎臓におけるマクロファージの増加を認めた。高血圧群では腎臓の線維化が進展していることも確認した。また、高血圧誘導時に、マクロファージを除去することで、高血圧の誘導および腎臓線維化が抑制されることを見出した。マクロファージ除去の効果は高血圧誘導後にも認めた。さらに、神経系—免疫系を介した血圧制御メカニズムを解明するために、マクロファージ特異的にアセチルコリン受容体 X を欠損させたマウスを用いた検討を行なったところ、これらのマウスにおいては高血圧誘導が抑制されることを見出した。高血圧を誘導した野生型マウスおよび高血圧誘導が抑制された遺伝子欠損マウスの腎臓よりマクロファージを単離し、遺伝子網羅的解析を行ったところ、高血圧によって誘導され、遺伝子欠損マウス由来マクロファージでは誘導されない遺伝子群を同定することができた。

塩分感受性高血圧モデルにおいてマクロファージが重要であること、高血圧誘導にマクロファージ上のアセチルコリン受容体 X が重要であることを見出すことができた。一方、①マクロファージがどこで自律神経のシグナルや Na 刺激を受け取っているのか。②マクロファージの形質が自律神経や Na 刺激を受け取った後にどのように変化するのか。③形質が変わったマクロファージがどのようにして血圧を制御するのか。に関してはほとんど分かっておらず、今後これらの解析を進めていく。

1. 研究目的

腎臓は高度に発達した臓器であり、体液・電解質の調整、血圧の調整、エリスロポエチン(造血ホルモン)の産生、ビタミン D の活性化など多岐に渡る機能を有している。腎臓には糸球体・尿細管・集合管からなる計 200 万個のネフロンがあり、それぞれのネフロンの間には間質(血管や線維芽細胞など)が存在し、10 種類以上の

細胞が複雑に相互作用しながら、これらの機能を果たしている。腎臓の線維化に特徴づけられる慢性腎臓病(CKD)患者は本邦で現在 2000 万人いるものの、腎臓病の根本的治療はいまだに存在せず、新たな治療法の開発は喫緊の課題である。申請者は、これまでに、迷走神経刺激、延髄にある C1 ニューロンの刺激、交感神経刺激などの神経刺激によって腎臓が保護されることを見

出した。また、これらの神経刺激に伴う腎保護作用発揮には、CD4 陽性 T 細胞やマクロファージなどの免疫細胞が重要な役割を果たすことを数々明らかにし⁽¹⁻⁶⁾、本分野で世界をリードする研究を行ってきた(Fig. 1)。

一方、高血圧患者は本邦にて 4300 万人存在し、高血圧に起因する脳血管障害による死亡は年間 10 万人に達する。高血圧の多くは原因不明な本態性高血圧であり、本邦では塩分摂取が高血圧発症に与える影響も非常に大きい。慢性的な塩分摂取過多により病態の悪化を認める CKD と高血圧は密接な関係があり、CKD は高血圧の発症リスクとなるとともに、逆に高血圧は腎臓病を悪化させるといふ悪循環を引き起こす。高血圧発症への免疫細胞の関与は以前より少しずつ報告されていたが、近年そのメカニズムの解明が進むとともに、免疫細胞による血圧制御機構の存在が少しずつ明らかになってきている(詳細は以下に記載)⁽⁷⁾。

免疫細胞が高血圧発症に寄与することを示した先行論文

- 片側腎動脈結紮高血圧ラットモデルからのリンパ節細胞移植によって高血圧が誘導される⁽⁸⁾。
- DOCA-salt 高血圧ラットモデル(鉱質コルチコイド受容体(MR)アゴニストであるデオキシコルチコステロン酢酸塩(DOCA)の慢性投与+塩分負荷)からの脾細胞移入によって血圧上昇をきたす⁽⁹⁾。

- 胸腺摘出によりラットでの高血圧発症を遅らせることができる⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。
- 胸腺のないヌードマウスでは DOCA-salt による高血圧誘導が抑制され、胸腺移植によって高血感受性が回復する⁽¹²⁾。
- B 細胞および T 細胞がない Rag1 ノックアウトマウスでは、アンジオテンシン II および DOCA-salt による高血圧誘導が抑制される⁽¹³⁾。
- CD8 陽性 T 細胞ノックアウトマウスおよび制御性 T 細胞移入によって、アンジオテンシン II 誘発高血圧モデルにおいて血圧上昇が抑制される⁽¹⁴⁾。
- CD8 陽性 T 細胞は、遠位尿細管の Na-Cl 共輸送体(NCC)を刺激し、塩分感受性高血圧を引き起こす⁽¹⁵⁾。

さらに、DOCA-salt 誘導高血圧マウスでは脾交感神経の興奮が誘発され、 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体ノックアウトマウスや頸部迷走神経切断では、高血圧による脾交感神経の興奮が抑制されること、脾神経除神経によって高血圧モデルマウスにおける動脈や腎臓への CD8 陽性 T 細胞の浸潤が抑制されることが報告され⁽¹⁶⁾、神経系—免疫系が血圧制御に関与していることが示唆された。そこで本研究では、神経系—免疫系という新しい切り口から、塩分感受性高血圧発症のメカニズム解明を目指す。

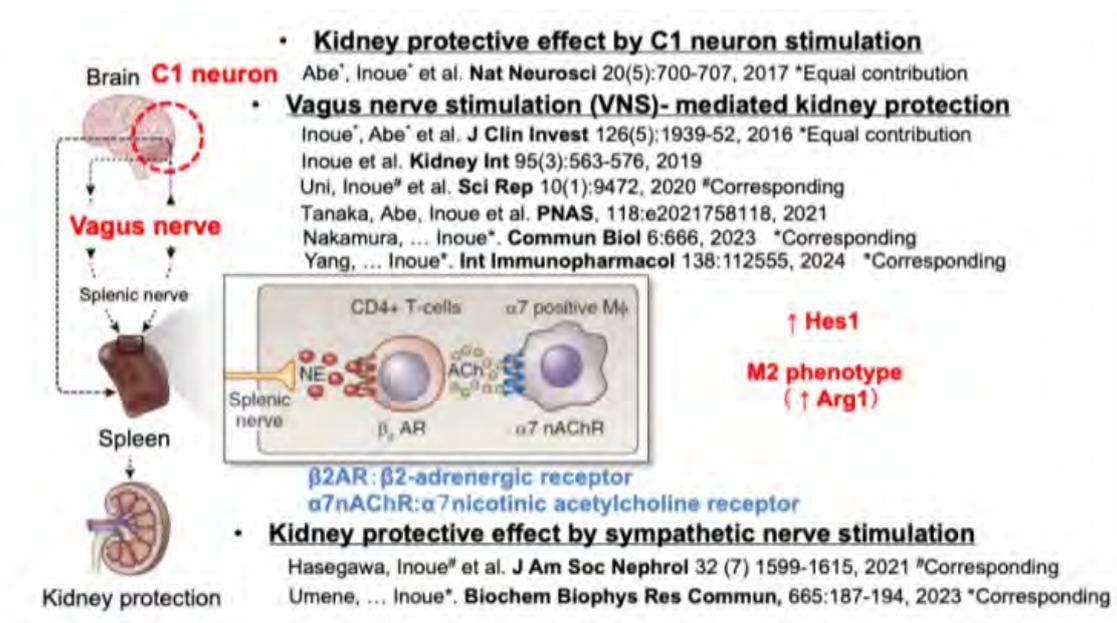


Fig. 1. これまでに我々が明らかにした神経系—免疫系を介した抗炎症・腎保護メカニズム

2. 研究方法

2.1 高血圧モデル

塩分感受性高血圧を誘導するために、マウスで一般的に使用されているアンジオテンシン II 誘導高血圧モデル (C57BL/6J 雄マウスに浸透圧ポンプ (Alzet) を用いてアンジオテンシン II 1.5 mg/kg/day を投与 + 生理食塩水を飲水) を使用した。対象群では浸透圧ポンプ内には溶媒である生理食塩水を使用し、飲用水として通常の水 (塩分なし) を使用した。動物は 8~12 週齢の雄性野生型マウス (C57BL/6J) を使用した。

また、マクロファージ特異的神経伝達物質受容体 (X) 欠損マウス (LysMCre:Xflox マウス) を用いて高血圧が誘導されるのかの評価を行った。

2.2 血圧測定

血圧測定は、尻尾を用いて行い、無加温型非観血式血圧計 MK-2000ST (室町機械株式会社) を使用した。実際の血圧は、5 回測定したものの平均値を用いた。

また、観血的血圧測定も行った。左頸動脈を露出したのち、カテーテル (BD) を挿入し、血圧トランスデューサーに接続し (MLT0670, ADInstruments, Colorado Springs CO, USA), ブリッジアンプおよびパワーラボ (ADInstruments, Colorado Springs CO, USA) を使用し、経時的に血圧を測定し、非観血的血圧計との比較を行った。

2.3 免疫細胞の評価

脾臓および腎臓における免疫細胞の動態評価には、フローサイトメーター AttuneNxT (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。抗体は以下のものを使用した。CD45-APC (104, Biolegend), B220-PECy7 (RA3-6B2, eBioscience), CD3e-APC eFluor 780 (17A2, eBioscience), CD4-FITC (GK1.5, Biolegend), CD8a-eFluor 450 (53-6.7, eBioscience), CD11b-Brilliant Violet 421 (M1/70, Biolegend), CD11c-FITC (N418, Biolegend), F4/80-PE (BM8, Biolegend), MHC Class II-eFluor 506 (NIMR-4, eBioscience)。生死の判別には 7-AAD (ThermoFisher Scientific) を使用した。死細胞およびダブレット細胞を除去後、CD45 陽性細胞を免疫細胞とし、その中で B220 陽性・CD3 陰性細胞を B 細胞, CD3 陽性・B220 陰性細胞を B 細胞とした。

また、免疫細胞のうち、MHC classII および CD11c 陰性・F4/80 および CD11b 陽性細胞をマクロファージ, MHC classII および CD11c 陽性細胞を樹状細胞として評価を行った。

2.4 腎臓の評価

腎臓の傷害や線維化は、血漿クレアチン・尿素窒素 (BUN), 腎臓組織 (PAS 染色, Trichrome 染色, Picrosirius red 染色など), 腎臓での線維化マーカーの発現レベル (α SMA・コラーゲン I および III など) などを用いて評価を行った。

また、免疫染色を行い、腎臓の線維化の程度 (Col1, E8F4L, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) およびマクロファージの浸潤数 (F4/80, MCA497R, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) の評価を行った。

2.5 生体におけるマクロファージ除去

生体内におけるマクロファージの機能を解明するために、クロドロン酸 (10mg/kg, Xygieia Bioscience, Osaka, Japan) 投与 (5 日に 1 回) によるマクロファージ除去を行なった。

2.6 腎臓マクロファージの網羅的遺伝子発現解析

高血圧誘導後に腎臓よりセルソーター (BD FACS Aria II) を用いてマクロファージを単離し、RNA を抽出後、外注のうへ RNA-seq を施行した。セルソーターに用いた抗体は以下の通りである。

CD45-APC (104, Biolegend), CD11b-Brilliant Violet 421 (M1/70, Biolegend), F4/80-PE (BM8, Biolegend)。生死の判別には 7-AAD (ThermoFisher Scientific) を使用した。死細胞およびダブレット細胞を除去後、CD45 陽性細胞を免疫細胞とし、その中で F4/80 および CD11b 共に陽性のものをマクロファージとした。

また、データの解析には RNAseqChef⁽¹⁷⁾ を使用した。

3. 研究結果

3.1 マウス塩分感受性高血圧症モデルの確立

当初、塩分感受性高血圧を誘導するために、マウスで一般的に使用されている「DOCA-salt マウス: 鉍質コルチコイド受容体 (MR) アゴニストであるデオキシコルチコステロン酢酸塩 (DOCA) の慢性投与 + 塩分負荷 (0.9% 生理食塩水を飲水として使用)」を使用する予定であった。しかし、DOCA 製剤の流通が滞っていたこと、製剤価格が高騰していたことなどから、アンジオテンシン II 誘導高血圧モデル (C57BL/6J 雄マウスに浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシン II 1.5 mg/kg/day を投与 + 生理食塩水を飲水) の確立を行った。Fig. 2A に示すタイムコースを用いて、アンジオテンシン II 投与の有無および生理食塩水の飲水の有無を含む 4 群を用いて評価をした。その結果、ポンプの埋め込みおよび食塩水摂取開始から数日後より、アンジオテンシン II 投与 + 食塩水飲水グループでは、血圧が上昇し始め、他のグループでは高血圧誘導がみられず、マウス塩分感受性高血圧症モデルを確立した (Fig. 2B)。

3.2 高血圧誘導マウスにおける免疫細胞の動態評価

高血圧を誘導したマウスにおいてどのような免疫細胞の変化があるかを確認するために、高血圧を誘導後に脾臓、腎臓、肺、心臓、肝臓の各臓器における免疫細胞の割合および数の変化を、フローサイトメーターを用いて評

価した。Fig. 3 は脾臓での免疫細胞全体 (CD45 陽性細胞) における各免疫細胞の割合 (B 細胞, CD4 陽性 T 細胞, CD8 陽性 T 細胞, マクロファージ, 樹状細胞) を示している。Fig. 3 に示すように、脾臓においては、高血圧誘導によって、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞軽度増加傾向およびマクロファージの軽度減少傾向を認められたものの、血圧正常群ならびに高血圧群における免疫細胞の割合の明らかな変化は認めなかった。一方、腎臓においては、Fig. 4A にあるように、高血圧の誘導によって B 細胞の割合が減少し、マクロファージの割合が増加することが認められた。また、免疫染色を用いて、腎臓内のマクロファージを観察したところ、高血圧誘導によって、腎臓内のマクロファージが増加することが確認できた (Fig. 4B&C)。

3.3 高血圧誘導に伴う腎臓線維化

高血圧誘導に伴い、腎臓にどのような変化があるかを確認するために、高血圧を誘導後に腎臓の傷害の程度を PAS 染色や Masson's Trichrome 染色等を用いて評価を行った。その結果、高血圧誘導に伴い、腎臓の線維化が促進されることが Masson's Trichrome 染色を用いて明らかとなった (Fig. 5A&B)。また、腎臓における線維化マーカー遺伝子の発現を評価したところ、線維化マーカーの発現も高血圧誘導に伴って増加することが明らかとなった (Fig. 5C)。

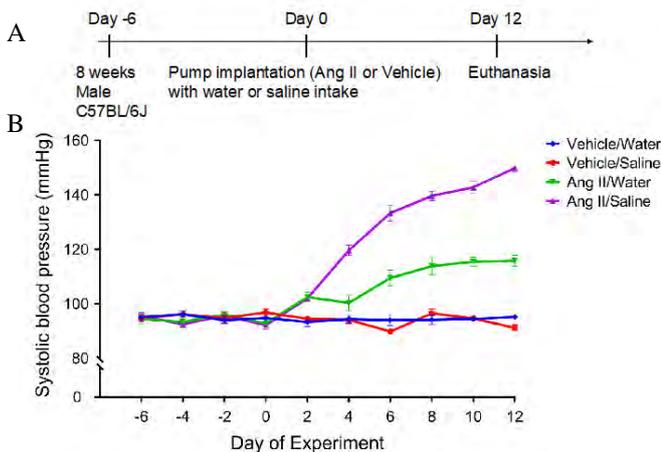


Fig. 2. 食塩感受性高血圧モデルの確立

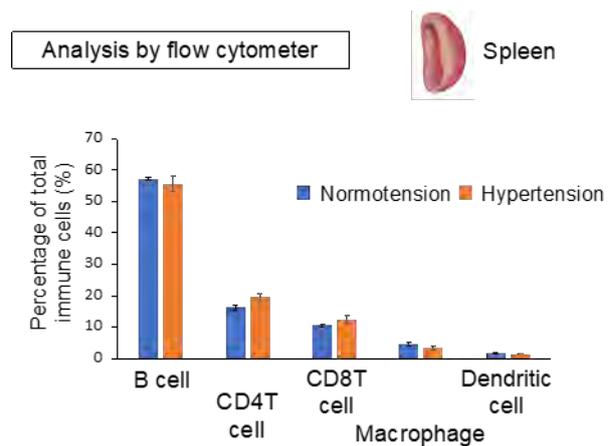


Fig. 3. 高血圧誘導マウスにおける脾臓内での免疫細胞の割合変化

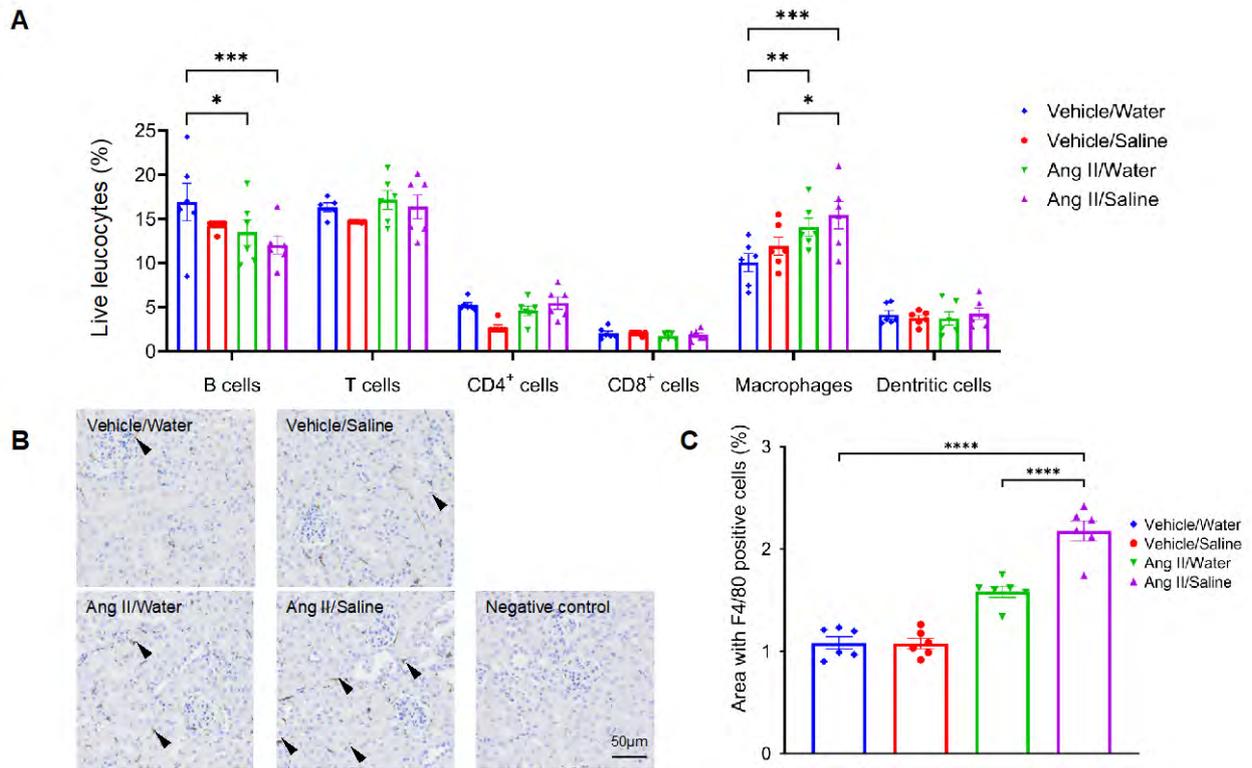


Fig. 4. 高血圧誘導マウスの腎臓内ではマクロファージ数が増加する

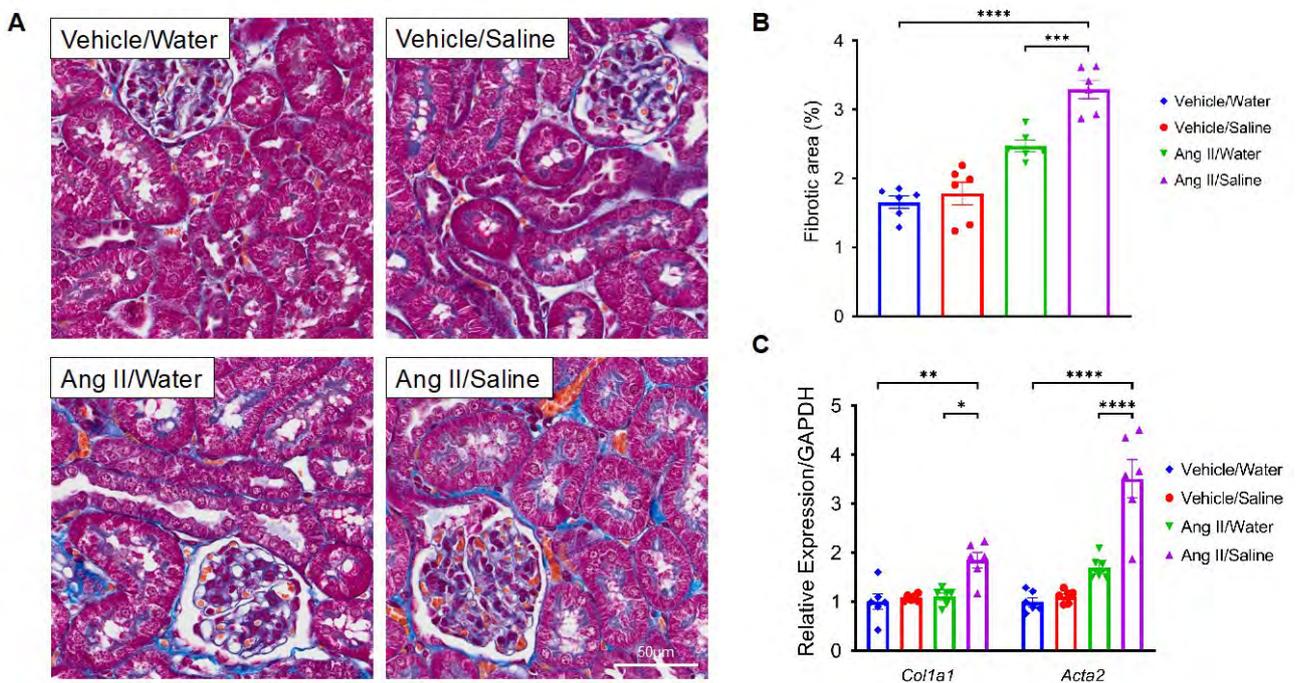


Fig. 5. 高血圧誘導に伴い、腎臓線維化が誘導される

3. 4 マクロファージ除去による高血圧誘導および腎臓線維化の抑制

以上の結果より、マクロファージが高血圧誘導および腎臓線維化に関わっている可能性が示唆されたため、マクロファージ除去実験を行った。アンジオテンシン II 投与および食塩水飲水を開始する前よりクロドロン酸投与を開始し、5 日に1回クロドロン酸の継続投与を行った (**Fig. 6A**)。その結果、腎臓および脾臓においてマクロファージ数が有意に抑制されることをフローサイトメーターにより確認した (**Fig. 6B&C**)。また、腎臓における免疫染色によっても腎臓におけるマクロファージが除去されていることも確認できた (**Fig. 6D&E**)。

これらのマクロファージ除去下において、アンジオテンシン II 投与および食塩水飲水を行い、高血圧の誘導を行なった。**Fig. 7** にあるように、クロドロン酸のコントロールとしてリポソームの投与を行った際 (緑) には、アンジオテンシン II 投与および生理食塩水飲水によって高血圧が誘導されたものの、クロドロン酸投与によってマクロファージを除去すると、この高血圧誘導が抑制された (紫)。

また、同条件下における腎臓線維化を評価したものが **Fig. 8** となる。腎臓線維化がクロドロン酸によるマクロファージ除去によって抑制されることが Masson's Trichrome 染色において確認できた (**Fig. 8A&B**)。マクロファージ除去による腎臓線維化抑制は、リアルタイム PCR を用いた線維化マーカーの発現レベルの評価 (**Fig. 8C**) および Coll1a1 の免疫染色 (**Fig. 8D&E**) によっても確認できた。

以上の研究成果は、本研究を始めて 2 年足らずで行い、論文化することができた⁽¹⁸⁾。

3. 5 マクロファージ除去による高血圧治療効果

これまでの研究成果は高血圧誘導前よりマクロファージを除去することで、高血圧誘導を抑えることであったが、実臨床においては、高血圧が起こった後に病院を受診するため、高血圧誘導後へのマクロファージ除去の効果の評価を行った。アンジオテンシン II 持続投与および食塩水飲水による高血圧誘導開始 7 日後に血圧上昇をしたのちにクロドロン酸によるマクロファージ除去を行なった。その結果、**Fig. 9** に示すように、高血圧誘導後もマクロファージ除去を行うことで、血圧を低下させることが明らかとなった。また血圧低下に伴い腎臓の線維化も改善することが明らかとなった (データ未掲載)。

3. 6 マクロファージを介した高血圧誘導に重要な神経伝達物質受容体の同定

神経系—免疫系を介した塩分感受性高血圧制御メカニズムを解明するために、マクロファージ特異的に自律神経伝達物質受容体を欠損させたマウスを用いて高血圧が誘導されるかの評価を行った。その結果、**Fig. 10** に示すように、神経伝達物質受容体 X をマクロファージで欠損させると、アンジオテンシン II 投与および食塩水飲水による高血圧誘導が抑制された。

3. 7 マクロファージを介した高血圧誘導に関わる因子の解析

マクロファージにおける高血圧誘導に関わる因子の同定を目指して、高血圧を誘導した野生型マウスおよび高血圧誘導が引き起こされないマクロファージ特異的アセチルコリン受容体 X ノックアウトマウスの腎臓よりマクロファージを採取した。その後、これらのマクロファージより RNA を抽出し、RNA-seq を施行した。**Fig. 11** がその解析結果となるが、高血圧が誘導された野生型マウス由来のマクロファージで発現が誘導され、ノックアウトマウスでは発現が誘導されない遺伝子群の存在が確認できた。これらの遺伝子の中に、高血圧誘導に関わる遺伝子が存在することが想定されるため、今後これらの遺伝子に着目した研究を推進する。

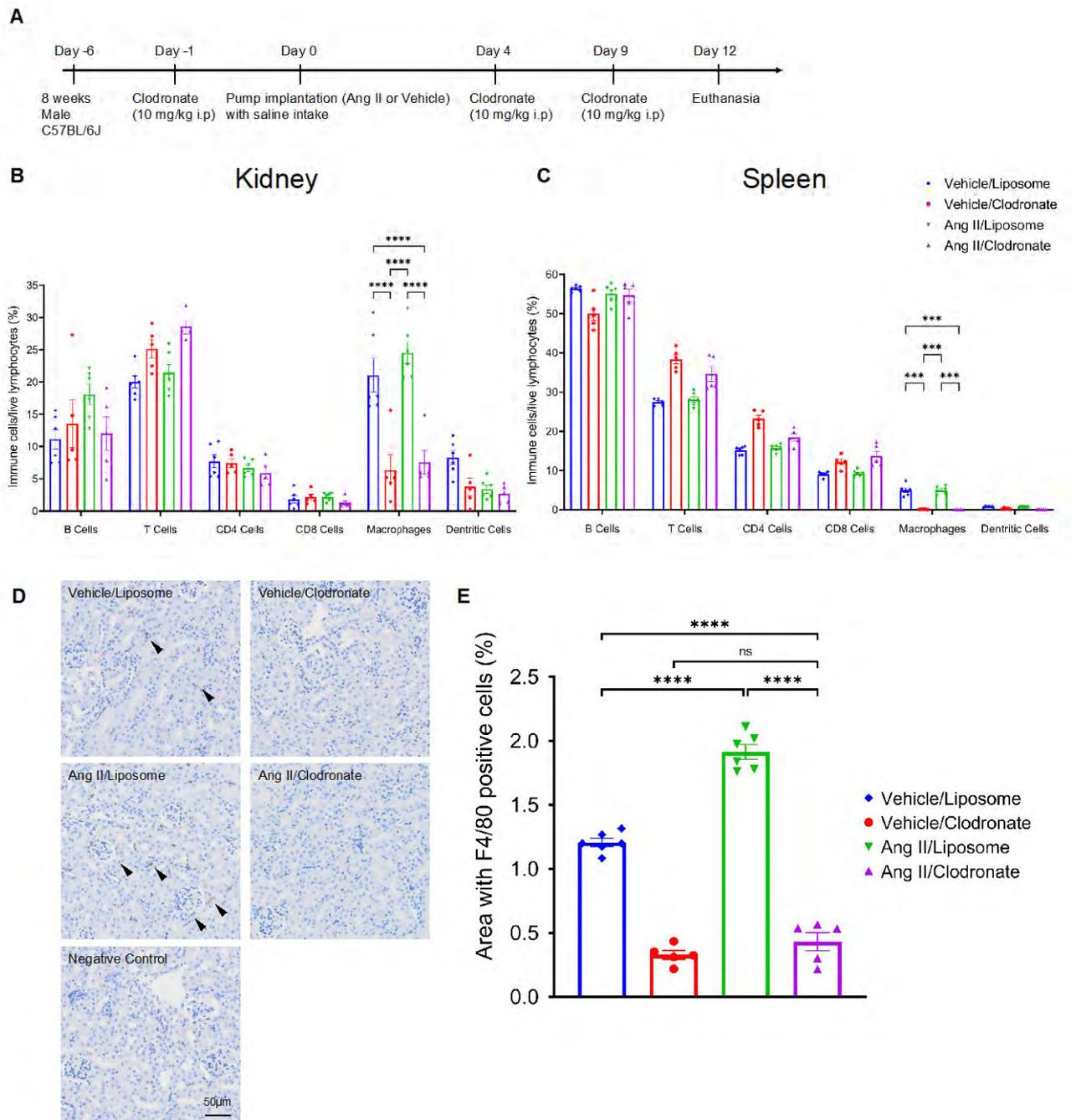


Fig. 6. クロドロン酸を用いたマクロファージ除去

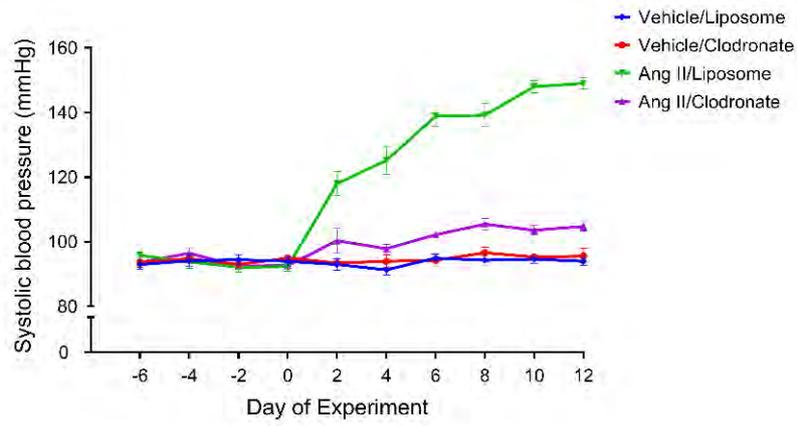


Fig. 7. クロファージ除去により高血圧誘導が抑制された

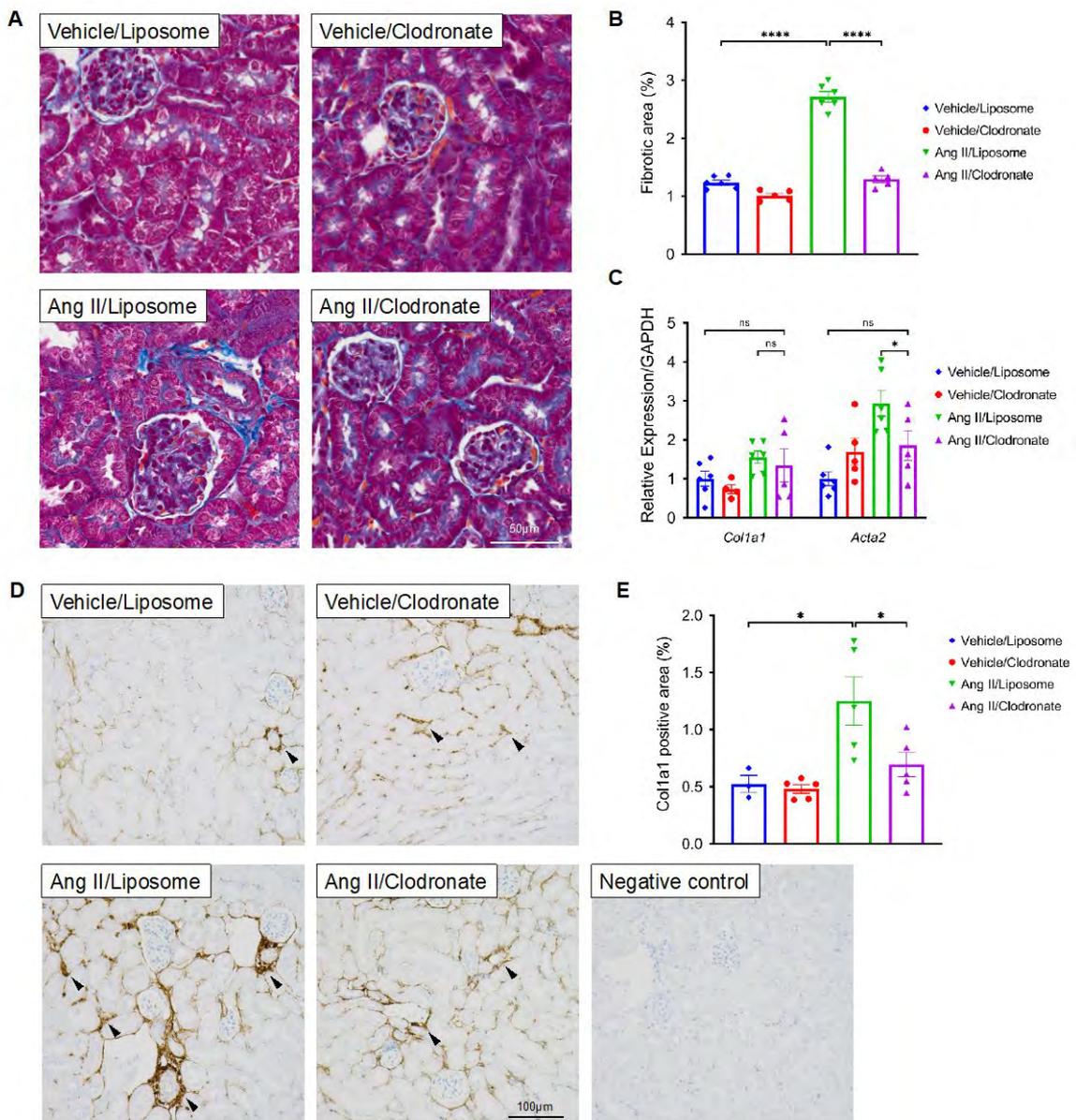


Fig. 8. マクロファージ除去により腎臓線維化が抑制された

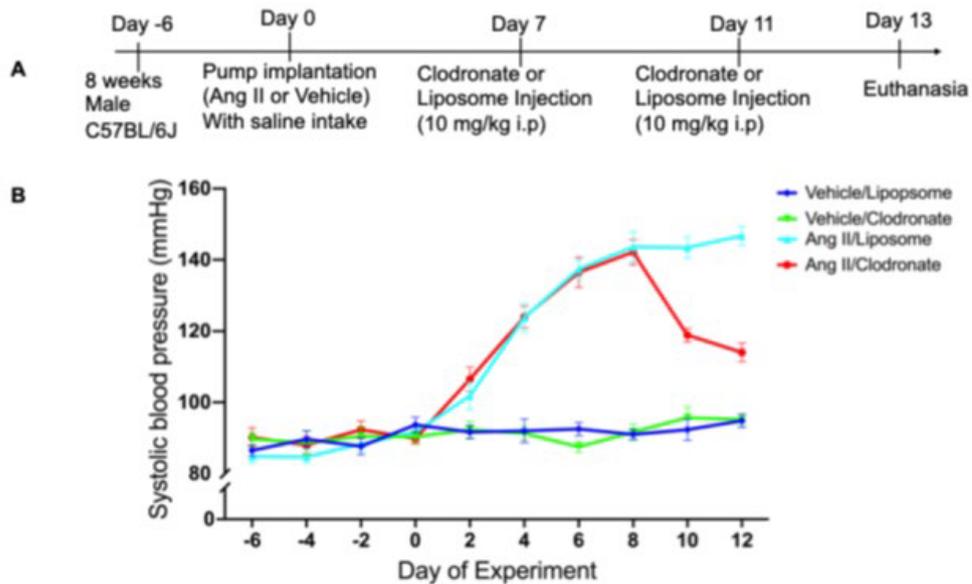


Fig. 9. マクロファージ除去によって誘導された高血圧が改善された

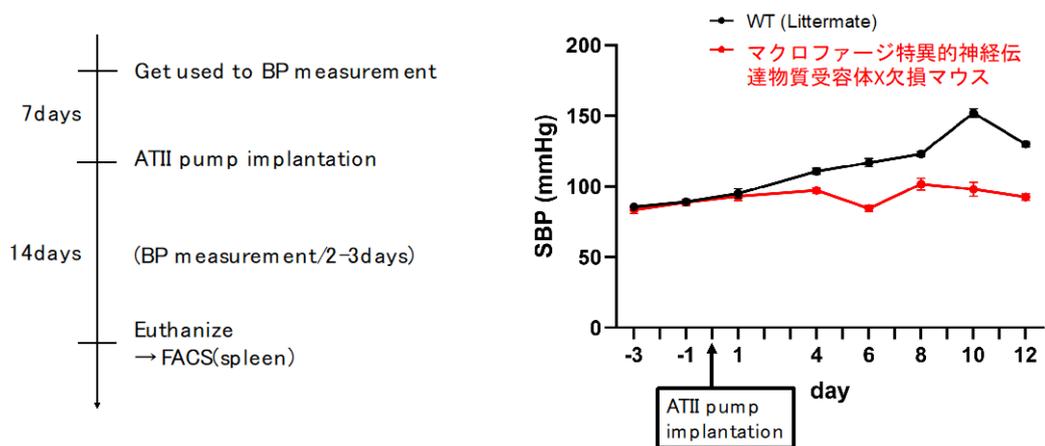


Fig. 10. クロファージ特異的の自律神経伝達物質受容体 X 欠損マウスでは高血圧誘導が抑制された

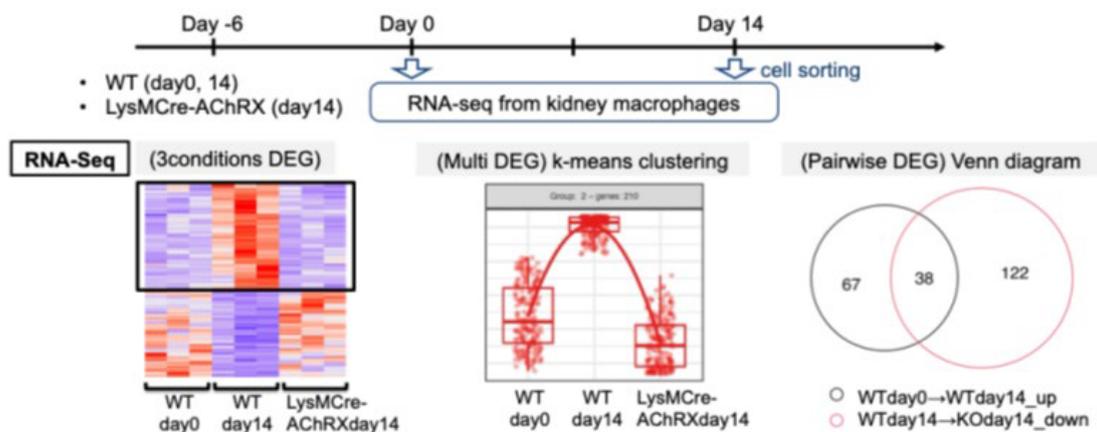


Fig. 11. 網羅的の遺伝子発現解析によって高血圧誘導に関わる遺伝子群を同定した

4. 考察

本研究助成を頂き、塩分感受性高血圧モデルを確立した。また、塩分感受性高血圧モデルにおける血圧制御にマクロファージが関与することを臓器内のマクロファージ数の解析や薬剤によるマクロファージ除去によって明らかにすることができた。マクロファージ除去が高血圧治療としても効果がある可能性も示すことができた。加えて、高血圧誘導に関わるマクロファージにおける神経伝達物質受容体の同定、遺伝子候補の絞り込みにも至っている。一方、実際にどのようなようにマクロファージが血圧制御しているかは明らかにできておらず、今後これらを明らかにしていく。

5. 今後の課題

マクロファージによる血圧制御メカニズムを解明するには以下に示した3つのメカニズムを解明する必要がある。①マクロファージがどこで自律神経のシグナルやNa刺激を受け取っているのか。②マクロファージの形質が自律神経やNa刺激を受け取った後にどのように変化するのか。③形質が変わったマクロファージがどのようにして血圧を制御するのか。

①に関しては、現時点では神経伝達物質やNaを高感度かつ高い時間・空間分解能があり簡便な検出手法を持ち合わせていないため、間接的な手法を用いながら、少しずつ研究を進める。②の解析が進めば、高血圧を誘導するマクロファージのマスターレギュレーターの発現レベルを評価することにより、マクロファージがNaや自律神経のシグナルをどこで受け取るのかを明らかにすることができる可能性がある。

②に関しては、ある程度解析が進んでおり、マクロファージの形質転換を制御するマスターレギュレーター候補遺伝子の同定に至っている。これらの遺伝子群の遺伝子を骨髄由来マクロファージに過剰発現させ、マウスに移入し、高血圧が誘導されるかの評価を行う。これにより高血圧誘導に関わるマスターレギュレーター同定を目指す。

また、③に関しては、血圧制御およびナトリウム制御に関わる遺伝子発現を調節したマクロファージを蛍光色素で標識し、レシピエントマウスに移入した後に、これらのマクロファージが腎臓内(もしくは他の臓器も含め)のどこへ移動するのかを明らかにする。さらに、腎臓を用いたシングルセルRNA-seqを施行し、細胞間相互作用を解析する

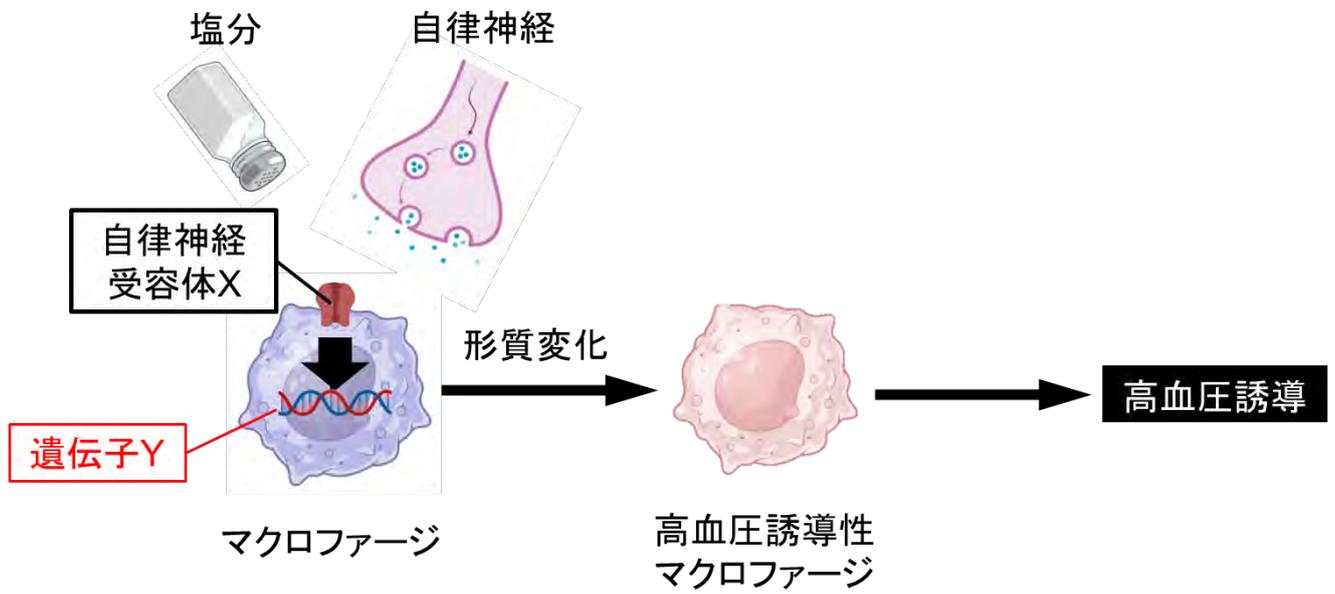
ことにより、マクロファージが腎臓内のどの細胞に影響を与えるかを同定する。加えて、分子生物学的手法を駆使することで、その制御機構を明らかにする。

以上により、自律神経刺激およびNa刺激を受けたマクロファージがどのようなメカニズムで血圧を制御しているかを解明することを目指す。

6. 文献

1. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through alpha7nAChR+ splenocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(5):1939-52.
2. Abe C, Inoue T, Inglis MA, Viar KE, Huang L, Ye H, et al. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nature neuroscience*. 2017;20(5):700-7.
3. Inoue T, Abe C, Kohro T, Tanaka S, Huang L, Yao J, et al. Non-canonical cholinergic anti-inflammatory pathway-mediated activation of peritoneal macrophages induces Hes1 and blocks ischemia/reperfusion injury in the kidney. *Kidney Int*. 2019;95(3):563-76.
4. Uni R, Inoue T, Nakamura Y, Fukaya D, Hasegawa S, Wu CH, et al. Vagus nerve stimulation even after injury ameliorates cisplatin-induced nephropathy via reducing macrophage infiltration. *Sci Rep*. 2020;10(1):9472.
5. Hasegawa S IT, Nakamura Y, Fukaya D, Uni R, Wu CH, Fujii R, Peerapanyasut W, Taguchi A, Kohro T, Yamada S, Katagiri M, Ko T, Nomura S, Ozeki NA, Susaki EA, Ueda HR, Akimitsu N, Wada Y, Komuro I, Nangaku M, and Inagi R. . Activation of sympathetic signaling in macrophages blocks systemic inflammation and protects against renal ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2021 in press.
6. Tanaka S, Abe C, Abbott SBG, Zheng S, Yamaoka Y, Lipsey JE, et al. Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2021;118(12).

7. Drummond GR, Vinh A, Guzik TJ, Sobey CG. Immune mechanisms of hypertension. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(8):517-32.
8. Okuda T, Grollman A. Passive transfer of autoimmune induced hypertension in the rat by lymph node cells. *Tex Rep Biol Med.* 1967;25(2):257-64.
9. Olsen F. Transfer of arterial hypertension by splenic cells from DOCA-salt hypertensive and renal hypertensive rats to normotensive recipients. *Acta Pathol Microbiol Scand C.* 1980;88(1):1-5.
10. Bataillard A, Freiche JC, Vincent M, Sassard J, Touraine JL. Antihypertensive effect of neonatal thymectomy in the genetically hypertensive LH rat. *Thymus.* 1986;8(6):321-30.
11. Khraibi AA, Smith TL, Hutchins PM, Lynch CD, Dusseau JW. Thymectomy delays the development of hypertension in Okamoto spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1987;5(5):537-41.
12. Svendsen UG. Evidence for an initial, thymus independent and a chronic, thymus dependent phase of DOCA and salt hypertension in mice. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1976;84(6):523-8.
13. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *The Journal of experimental medicine.* 2007;204(10):2449-60.
14. Trott DW, Thabet SR, Kirabo A, Saleh MA, Itani H, Norlander AE, et al. Oligoclonal CD8+ T cells play a critical role in the development of hypertension. *Hypertension.* 2014;64(5):1108-15.
15. Liu Y, Rafferty TM, Rhee SW, Webber JS, Song L, Ko B, et al. CD8(+) T cells stimulate Na-Cl co-transporter NCC in distal convoluted tubules leading to salt-sensitive hypertension. *Nat Commun.* 2017;8:14037.
16. Carnevale D, Perrotta M, Pallante F, Fardella V, Iacobucci R, Fardella S, et al. A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication. *Nat Commun.* 2016;7:13035.
17. Etoh K, Nakao M. A web-based integrative transcriptome analysis, RNAseqChef, uncovers the cell/tissue type-dependent action of sulforaphane. *J Biol Chem.* 2023;299(6):104810.
18. Peter JK, Umene R, Wu CH, Nakamura Y, Washimine N, Yamamoto R, et al. Renal macrophages induce hypertension and kidney fibrosis in Angiotensin II salt mice model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024;715:149997.



これまでの成果および仮説をまとめた図

自律神経刺激および塩分負荷によってマクロファージの形質が変化し高血圧を誘導する

Elucidation of the Regulatory Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension through the Nervous System-Immune System

Tsuyoshi Inoue¹, Chikara Abe²

¹Nagasaki University, ²Gifu University

Summary

While immune cell involvement in hypertension has been gradually reported, recent studies have begun to uncover mechanisms of blood pressure regulation by immune cells. This study aims to elucidate the mechanism of salt-sensitive hypertension through the neuro-immune axis.

We used male wild-type mice (C57BL/6J, 8–12 weeks) and macrophage-specific acetylcholine receptor X knockout mice. Angiotensin II-induced hypertension served as the model. Blood pressure was measured non-invasively and invasively. Immune cell dynamics in organs and renal fibrosis were evaluated. Macrophages were depleted using clodronate administered every five days. Renal macrophages were isolated for transcriptome analysis.

Comparative analysis of changes in the number and proportion of immune cells in various organs following hypertension induction revealed an increase in renal macrophages in hypertensive mice. Renal fibrosis progression was also observed in the hypertensive group. Furthermore, macrophage depletion during hypertension induction suppressed both the development of hypertension and renal fibrosis. This effect of macrophage depletion was also observed after hypertension induction. Additionally, to investigate blood pressure regulation via the neuro-immune axis, we used macrophage-specific acetylcholine receptor X knockout mice and found that these mice exhibited suppressed hypertension development. Comprehensive gene expression analysis of macrophages isolated from the kidneys of hypertensive wild-type mice and gene-deficient mice (in which hypertension was suppressed) identified a group of genes induced by hypertension that were not induced in the gene-deficient mice.

This study identified macrophages as key players in the salt-sensitive hypertension model and highlighted the importance of acetylcholine receptor X on macrophages in the development of hypertension. However, several questions remain: (1) Where do macrophages receive autonomic nervous system signals or sodium stimuli? (2) How do macrophage phenotypes change after receiving these signals? (3) How do phenotype-altered macrophages regulate blood pressure? These aspects remain largely unknown and will be the focus of future investigations.

プロジェクト助成研究報告書 (医学)
Project Research Report (Medical Science)

2026年3月
March, 2026

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒105-0003 東京都港区西新橋3-5-2 西新橋第一法規ビル
Nishishinbashi Dai-ichi Hoki Bldg. 3-5-2 Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-0003, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712
URL <https://www.saltscience.or.jp>

I S B N 9 7 8 - 4 - 9 0 2 1 9 2 - 6 9 - 8

助成研究報告書

医学プロジェクト研究(2022-2024)

適切な塩分摂取で挑む超高齢社会

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団