

高食塩摂取が免疫系に及ぼす影響の解析

吉田 達士, 奥田 司

京都府立医科大学分子生化学

概要 塩分の過剰摂取は、高血圧や脳・心血管疾患につながる事が知られているが、免疫系へ影響を及ぼすことも明らかになってきた。高塩分食を摂取したマウスでは、ヘルパーT細胞のサブセットの一つである Th17 細胞への分化を促進し、脳機能の低下や自己免疫疾患を増悪させることが報告されている。高塩分食を摂取は、NK 細胞を活性化させることによって、マウスに移植した悪性黒色腫などの腫瘍の増殖を抑制させる抗腫瘍効果を発揮することができる。一方、ヒトのコホート疫学調査では、食塩摂取量が高い男性では胃がん発症リスクが上昇することが明らかとなっている。

近年、新たな免疫制御機構として免疫チェックポイントが注目され、これは、過剰な免疫反応を抑えるブレーキ役として機能する。一方、がん細胞ではこの免疫チェックポイントを利用して免疫監視機構から逃れている。免疫細胞は受容体 PD-1 を細胞表面上に発現しており、これにリガンドである PD-L1 が結合すると免疫抑制が引き起こされる。多くのがん細胞は PD-L1 を発現して免疫細胞からの攻撃を回避し、生存を可能としており、PD-1 と PD-L1 の結合を阻害する抗体は、有力な抗がん剤として承認されている。本研究では、高塩分摂取によって免疫チェックポイント因子を制御するか検証して免疫系に及ぼす影響について解析を行った。

Th17 細胞分化系において用いられていた濃度の NaCl を添加した培地で白血球細胞 K562 を培養したところ、PD-1 と PD-L1 の発現が減弱していることが見られた。この培養条件での細胞増殖に及ぼす影響を調べたところ、死細胞はほとんど増えず、細胞周期にもほとんど変化がないことが明らかになった。

我々は、PD-L1 の発現制御因子を探索し、血球分化・免疫機能に関わる RUNX1 が PD-L1 発現を転写レベルで増加させることを見出した。高 NaCl 培地での培養は RUNX1 の発現を減弱させた。また、我々が RUNX1 の標的と見出した抗腫瘍性サイトカイン TRAIL の発現を減少させることを見出した。

次にマウスに高食塩食を摂取させて解析した。7日間高食塩食を摂取したマウスでは、白血球数の減少と血小板量の増加がみられたが顕著なものではなかった。血球表面上での PD-1 と PD-L1 の発現への影響を調べたところ、脾臓において PD-1 の発現がわずかに高食塩食摂取マウスの方で増加していたが、PD-L1 は変化なかった。

今後、より長い期間高食塩食摂取させたときの影響や、血球成分を細分化することによって、免疫チェックポイント因子の発現を解析する必要があると考えられた。

1. 研究目的

塩分の過剰摂取は、高血圧や脳・心血管疾患につながる事が知られているが、免疫系へ影響を及ぼすことも明らかになってきた。高塩分食を摂取したマウスでは、ヘルパーT細胞のサブセットの一つである Th17 細胞への分化を促進する⁽¹⁾。Th17 細胞は病原体に対する宿主の防御システムにおいて役

割を担っているが、炎症や自己免疫疾患の発生にも関係している。高塩分食を摂取したマウスでは、Th17 細胞分化誘導に伴い、脳機能の低下や自己免疫疾患を増悪させることが報告されている^(1,3)。一方で、高塩分食を摂取は、NK 細胞を活性化させることによって、マウスに移植した悪性黒色腫などの腫瘍の増殖を抑制させる抗腫瘍効果を発揮することができる^(4,5)。

しかしながら、胃がん発症においては、高塩分摂取は高リスク要因である。ヒトのコホート疫学調査では、食塩摂取量が高い男性では胃がん発症リスクが2倍ほど上昇することが明らかとなっている⁶⁾。

近年、新たな免疫制御機構として免疫チェックポイントが注目されている^{7,8)}。これは、過剰な免疫反応を抑えるブレーキ役として機能する。一方、がん細胞ではこの免疫チェックポイントを利用して免疫監視機構から逃れている。免疫細胞は受容体 Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1, also referred to as CD279)^{9,10)} を細胞表面上に発現しており、これにリガンドである Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1, also referred to as CD279 and B7-H1)¹¹⁾ が結合すると免疫抑制が引き起こされる。多くのがん細胞はPD-L1を発現して免疫細胞からの攻撃を回避し、生存を可能としている¹²⁾。そこで、PD-1とPD-L1の結合を阻害する抗体は、有力な抗がん剤として承認されている¹³⁻¹⁵⁾。さらに最近の研究では、免疫チェックポイントと老化との関係も報告されている^{16,17)}。老化細胞ではPD-L1を発現して炎症反応を惹起し、T細胞からの免疫監視機構から逃れており、抗PD-1抗体をマウスに投与することによって老化細胞を除去し老化現象や生活習慣病を防ぎ抗老化作用を発揮することができる。

本研究では、高塩分摂取によって免疫チェックポイント制御を制御するか検証し、それを介した免疫系に及ぼす影響について解析を行った。

2. 研究方法

2.1 組織培養

慢性骨髄性白血病細胞株K562はRiken BioResource Centerから購入し、RPMI1640 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) + 10%ウシ胎児血清(Sigma)培地にて培養した。これらの細胞株は37°C, 5% CO₂, 加湿条件下で培養した。

2.2 プラスミドの作成

ヒトPD-1およびヒトPD-L1遺伝子の上流に座位する転写制御領域プロモーターをヒトゲノムDNA (Promega)からPrimeStar GXL DNA polymerase (Takara Bio Inc.)を用いてPCR法によって増幅し、ルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3 (Promega)に組み込んだ。作成したプラスミドのシーケンスは、Genetic analyzer 3500 (Thermo Fisher Scientific)を用いて確認した。

2.3 プラスミドのトランスフェクション

K562細胞にはNucleofector2b (Lonza, Program T-016)を用いてエレクトロポレーション法によってプラスミドを導入した。

2.4 ルシフェラーゼアッセイ

プラスミドを導入した細胞を回収し、1x濃度に調製したPassive lysis buffer (Promega)を用いて細胞抽出液を作成した。Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)とルミノメーター (Berthold Detection Systems)を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。Reporter plasmidと同時に*Renilla reniformis* ルシフェラーゼ活性測定用のphRL-TKプラスミドも導入し、各サンプルでのトランスフェクション効率の違いを補正するために、ホタルルシフェラーゼ活性をレニラルシフェラーゼ活性で割った値をデータとした。

2.5 RT-qPCR

細胞を培養した後、Isogen II (Nippon gene)を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNAから、oligo(dT), dNTP mix, superscript IV (すべて Thermo Fisher Scientific)を用いて complementary DNA (cDNA)を作成した。ヒトPD-1, ヒトPD-L1, ヒトRUNX1 およびヒトTRAILに対する特異的 primer (Eurofins genomics によって合成), THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (Toyobo), 作成したCdnaを混和し、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific)を用いて、RT-qPCRを行った。

2.6 細胞増殖測定

培養した細胞を回収し、等量のトリパンブルー液を加えた。血球計算版を用いて顕微鏡下で細胞数を計測した。青く染色された細胞を死細胞、染色されていない細胞を生細胞として評価した。

2.7 細胞周期測定

培養した細胞を回収して Propidium iodide (PI) 液 (10 mg/ml PI, 0.1% Triton X-100 を含む PBS) に懸濁した。Triton X-100 によって裸核し、PI によって核内 DNA を染色した。FACS Canto II (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー法によって、DNA 量を計測し細胞周期と細胞死を判定した。細胞死では核内 DNA が分断されるため、細胞周期の G1 期より DNA 量の少ない sub-G1 期を測定することによって細胞死を解析した。

2. 8 高食塩食摂取したマウスの解析

C57BL/6JJmsSlc マウスに High Salt Diet (HSD) また標準食 (Control) を与え、7 日間飼育した。飼育前と飼育後に体重を測定し、HSD 摂取を評価した。脾臓、脳、心臓、肝臓、腎臓、精巣を摘出し、重量測定および外観の観察を行った。また、心臓から採血し、血球表面上の免疫チェックポイント因子発現解析を行った。

2. 9 細胞表面発現解析

マウス脾臓を採取し、2 枚のスライドガラスの間ですりつぶし、遠心分離によって沈殿化させることによって脾臓細胞を得た。調製した脾細胞液と採取した血液に PharM Lyes (PharMingen) を加えて赤血球を浸透圧で破碎除去した。脾細胞液と血液に PE 標識抗マウス PD-1 抗体 (Biolegend) または PE 標識抗マウス PD-L1 抗体 (Biolegend) を氷上で 30 分させた後、FACS Canto II を用いて解析した。

2. 10 統計解析

データは Student's T-test を用いて解析し、 $P < 0.05$ の時に有意差があると評価した。

3. 研究結果

3. 1 PD-1 と PD-L1 発現解析

免疫チェックポイント因子 PD-1 と PD-L1 の発現に高食塩摂取が及ぼす影響を調べるため、白血病細胞 K562 細

胞を用いて解析を行った。細胞培養用の培地に NaCl を 10, 20, 40, 80 mM を添加して 48 時間培養した。この濃度は、*in vitro* 系で naïve T 細胞を Th17 細胞に分化させる実験に用いられた食塩濃度である⁽¹⁾。培養した K562 から total RNA を抽出して PD-1 と PD-L1 の特異的 primer set を用いて RT-qPCR を行ったところ、PD-1 と PD-L1 の発現が濃度依存的に減少していた (Fig. 1)。

3. 2 高食塩の細胞増殖への影響

用いた NaCl の細胞増殖における影響を調べるため、トリパンブルー染色法を行った。生細胞では膜の排泄機構によってトリパンブルー色素を細胞外へ排出するため顕微鏡下の観察では白く見えるが、死細胞では排泄できないため細胞質全体が青く染色された像が観察される。NaCl 80 mM の濃度でも青く染まった死細胞はほとんど観察されず、用いた濃度では細胞毒性は少ないと考えられた (Fig. 2)。また、フローサイトメーターを使用して細胞周期の変化を解析した。細胞周期にはほとんど変化は認められなかった。死んだ細胞は核内の DNA 量が減少して、G1 期より DNA 量が少ない Sub-G1 期に観察される。NaCl を加えて培養しても Sub-G1 期の増加はほとんど見られず、実験に用いた NaCl 濃度では細胞毒性をほとんど示さないことが明らかとなった (Fig. 3)。

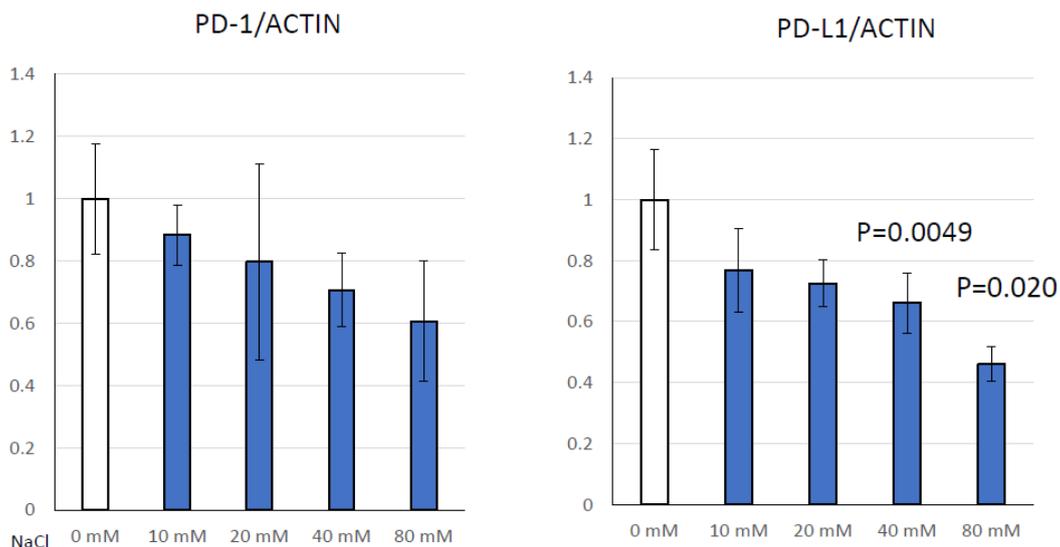


Fig. 1 RT-qPCR of PD-1 and PD-L1

K562 leukemia cells were incubated with medium plus indicated concentration of NaCl for 48 hours.

Total RNA was extracted and cDNA was generated. RT-qPCR was performed with PD-1 and PD-L1 primer sets. Actin was used as control.

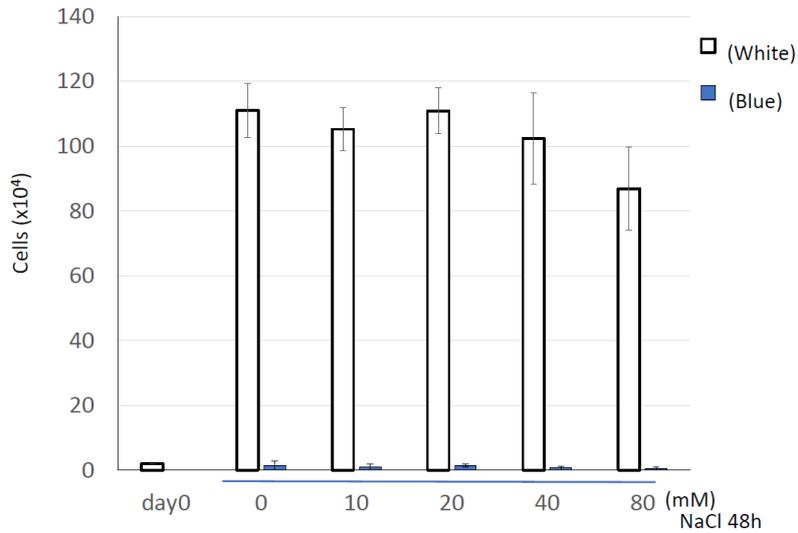


Fig. 2 Cell count

K562 leukemia cells were incubated with medium plus indicated concentration of NaCl for 48 hours. Cells were harvested and mixed with trypan blue solution and cell numbers were calculated under a microscope. Blue cells were estimated as dead cells and white cells were estimated as living cells.

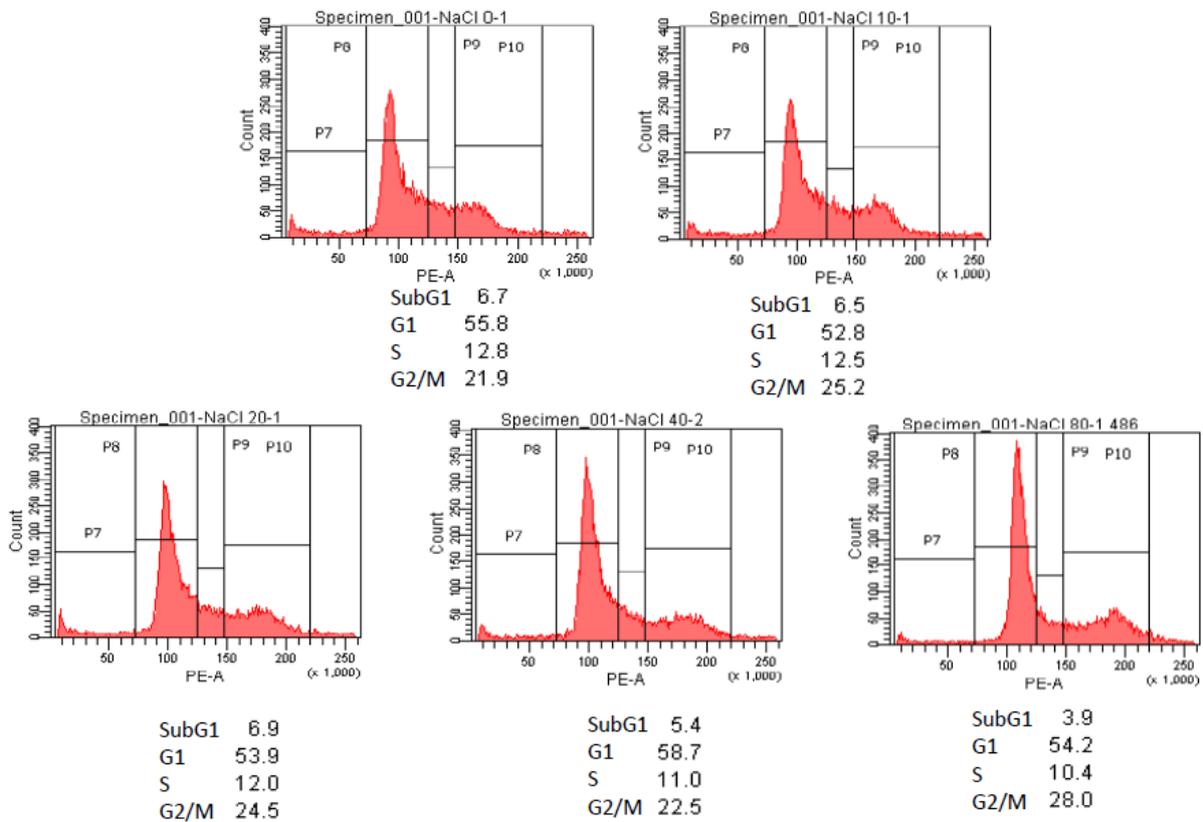


Fig. 3 Cell cycle analysis

K562 leukemia cells were incubated with medium plus indicated concentration of NaCl for 48 hours. Cells were stained with PI and DNA contents were analyzed by flow cytometry.

3.3 RUNX1とTRAIL発現解析

ヒトPD-L1の遺伝子発現制御領域プロモーターのDNA配列を解析したところ、血球分化や免疫系に関わる転写因子 Runt related transcription factor 1 (RUNX1, also referred to as AML1 or PEBP2)^(18, 19)の結合配列が認められた。プロモーター領域をレポーターアッセイ用のプラスミド pGL3 に組み替え hPD-L1-luc を作成した。RUNX1 は cofactor の Core binding protein (CBF) β とコンプレックスを形成して標的遺伝子の転写制御を行う⁽²⁰⁾。RUNX1 と CBF β 発現プラスミドと hPD-L1-luc を K562 細胞に導入したところ PD-L1 の転写活性が上昇し、PD-L1 が RUNX1 の転写標的遺伝子であることが示された。次に、RUNX1 と CBF β 発現プラスミドを K562 に導入して RNA レベルでの発現を解析した。PD-L1 の内在性発現も RUNX1 によって増加することが明らかになった (Fig. 4)。

NaClを添加した培地でK562細胞を培養し、RUNX1の発現を解析した。また、RUNX1の標的遺伝子として見いだした Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL)^(21, 22)の発現解析も行った。TRAILは抗腫瘍性サイトカインであり、種々のがん細胞に対しアポトーシス細胞死を誘導することが知られており、TRAIL ノックアウトマウスは発がんすることからがんの免疫監視の役割を担

っていると考えられている⁽²³⁻²⁵⁾。そしてリコンビナント TRAIL は様々なタイプのがんに対して臨床試験が行われ、その一部は臨床第 III 相試験が実施されている^(26,27)。NaClを添加した培地での培養は TRAIL の発現を濃度依存的に減少させたが、RUNX1 は高濃度の時のみ減少が見られた (Fig. 5)。

3.4 高食塩食摂取マウスの解析

次に高食塩食を摂取したマウスを用いて実験を行った。C57BL/6JmsSlc 系統のマウスに High Salt Diet (HSD)を与え、7日間飼育した。飼育前と飼育後に体重を計測したところ、普通食を食べさせたマウスと比べて変化はなく、HSDも普通食同様に摂食していることがわかった (Fig. 6)。血球解析を行った。各臓器(脾臓, 脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 精巣)を摘出し、観察した。萎縮や肥大は見られず、重量も普通食摂取と高食塩食摂取では差は見られなかった (Fig. 7)。心臓から採血し、血球計算機によって血液成分を解析した。HSD 摂取の方で、白血球数(WBC)の減少と血小板数(PLT)の増加が少し見られたが有意差はなかった (Fig. 8)。赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(HGB)ヘマトクリット(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン数(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)には変化は見られなかった。

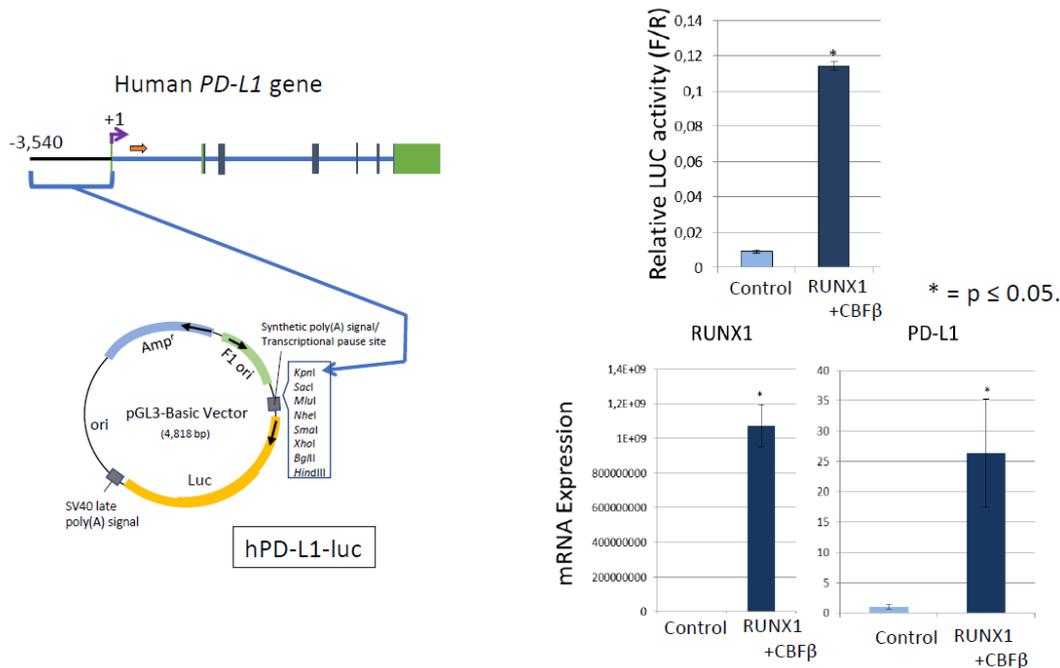


Fig. 4 PD-L1 is upregulated by RUNX1

PD-L1 promoter region was inserted into pGL3 and hPD-L1-luc was generated (Left).

RUNX1+CBF β expression increased promoter activity (Upper right) and PD-L1 mRNA level in K562 leukemia cells.

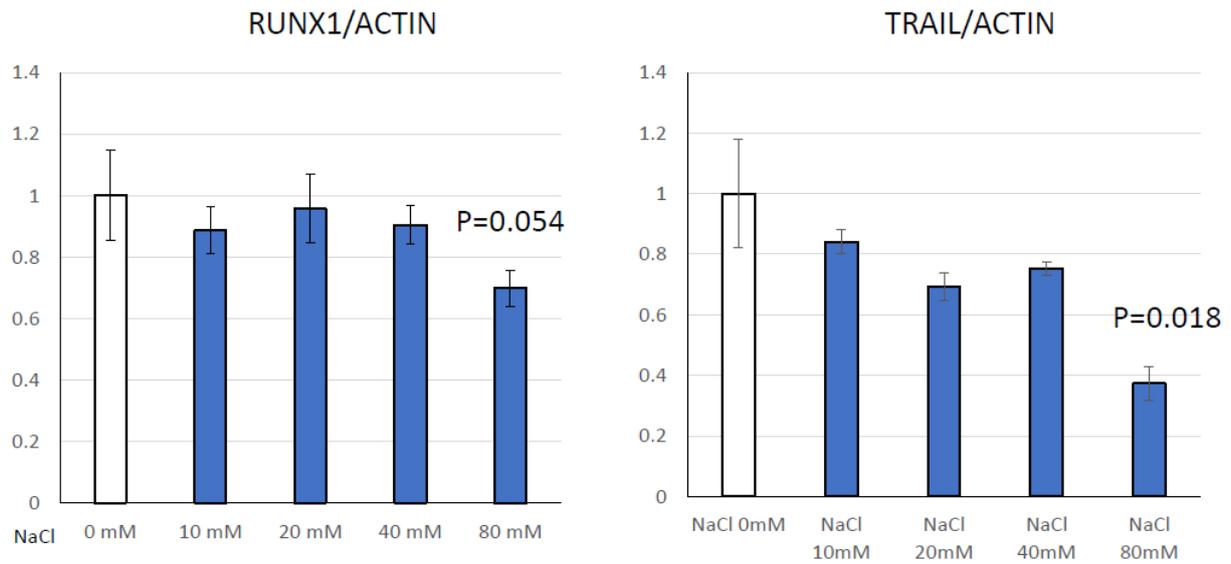


Fig. 5 RT-qPCR of RUNX1 and TRAIL
 K562 leukemia cells were incubated with medium plus indicated concentration of NaCl for 48 hours. Total RNA was extracted and cDNA was generated. RT-qPCR was performed with RUNX1 and TRAIL primer sets. Actin was used as control.

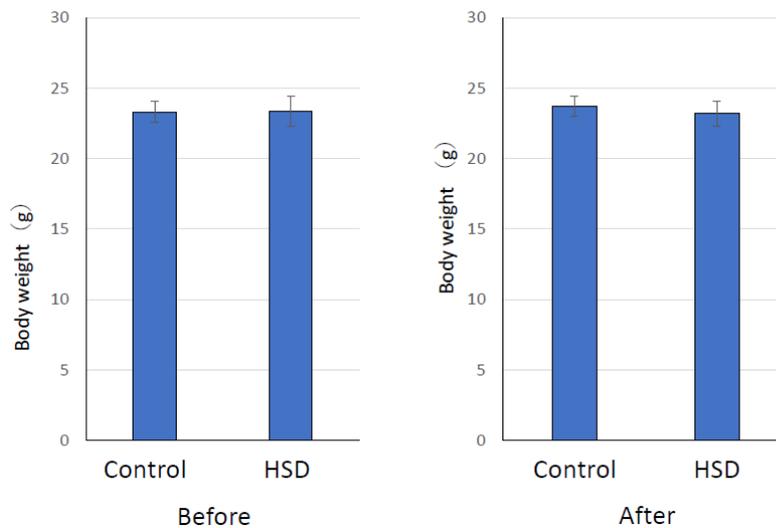


Fig. 6 Body weight of mice
 C57BL/6JmsSlc mouse's body weights were measured before and after fed of high salt diet (HSD) for 7 days.

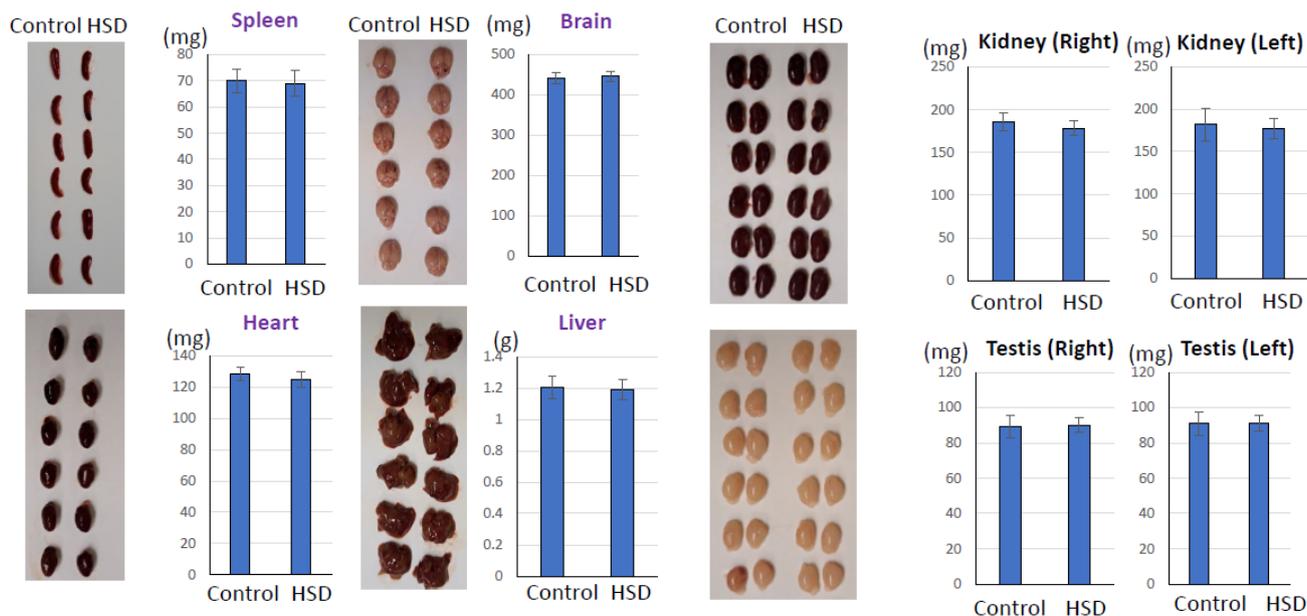


Fig. 7 Body weight of mice
 C57BL/6JmsSlc mouse's tissues were obtained after fed of high salt diet (HSD) for 7 days.
 The tissue morphologies and weights were compared with those of control (normal diet).

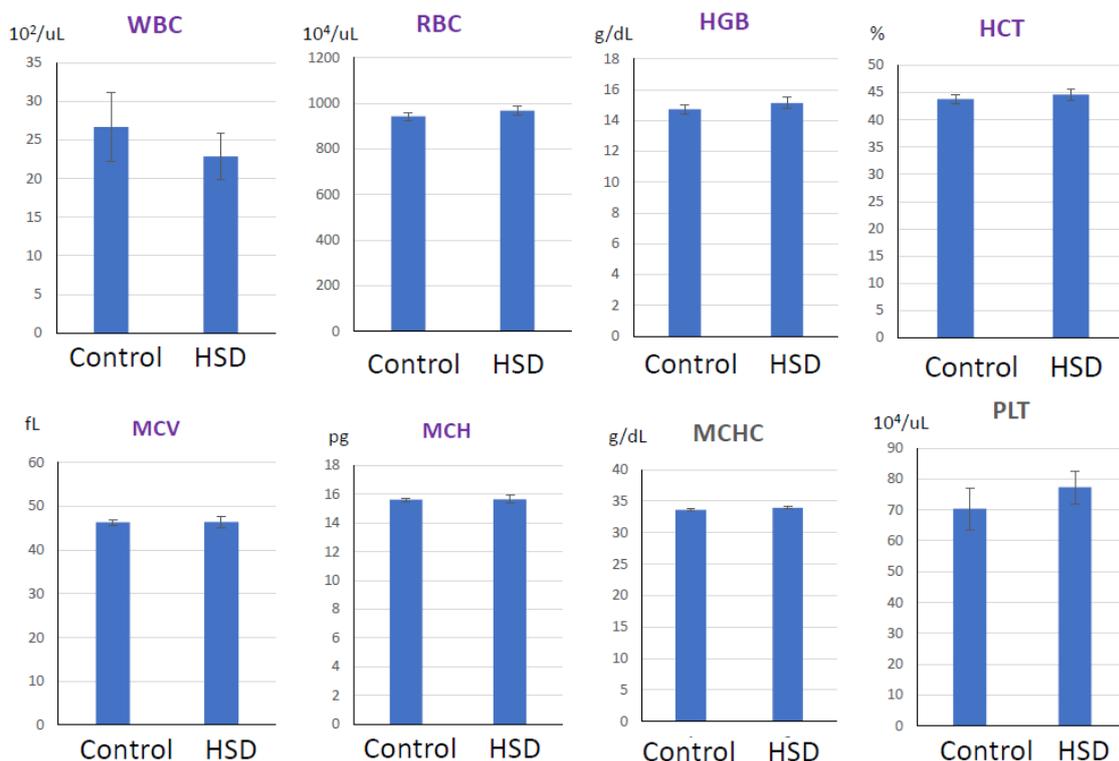


Fig. 8 Blood conditions
 C57BL/6JmsSlc mouse's bloods were obtained after fed of high salt diet (HSD) for 7 days.
 The conditions of blood cells were compared with those of control (normal diet).

3. 5 高食塩食摂取マウスの PD-1 と PD-L1 発現解析

脾臓細胞と採血から得た白血球の細胞表面上での PD-1 および PD-L1 の発現をフローサイトメリーで解析した。高食塩

食摂取の脾臓で PD-1 の発現増加がわずかに見られたが有意差はなく、他は変化なかった (Fig. 9, 10)。

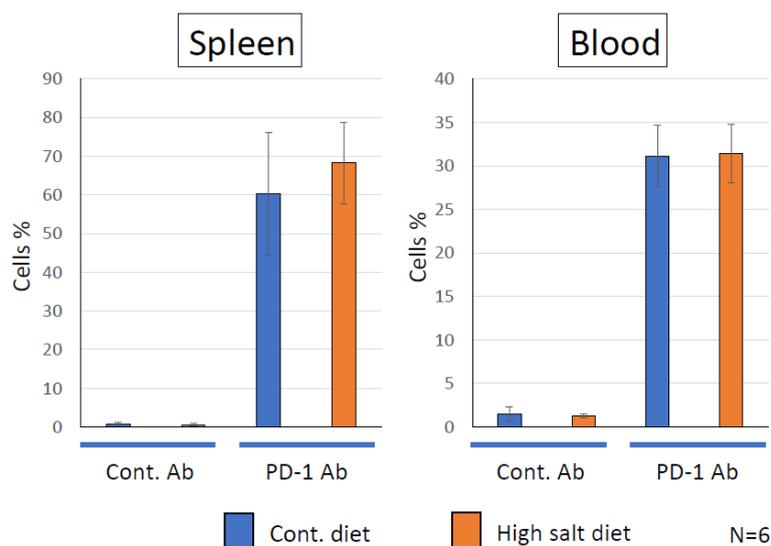


Fig. 9 Cell surface expressions of PD-1

C57BL/6JmsSlc mouse's bloods were obtained after fed of high salt diet (HSD) for 7 days.

The white blood cells were collected and stained with PE-labeled antibodies of PD-1, then the cell surface expressions were analyzed by flow cytometry.

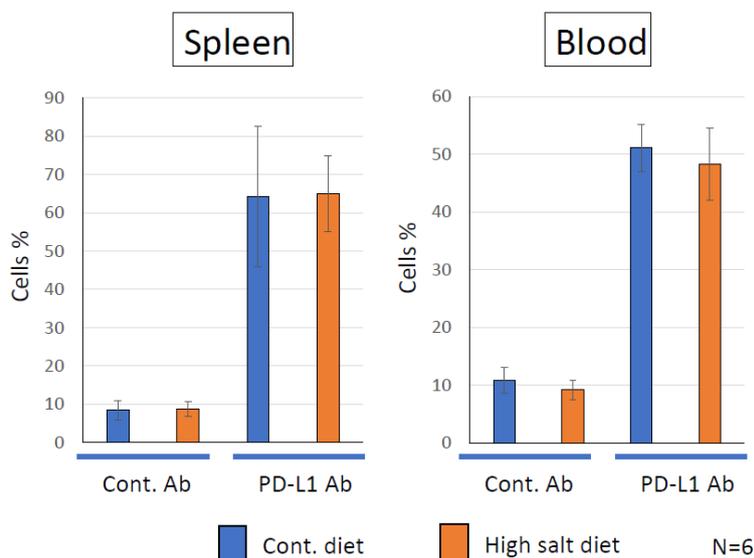


Fig. 10 Cell surface expressions of PD-L1

C57BL/6JmsSlc mouse's bloods were obtained after fed of high salt diet (HSD) for 7 days.

The white blood cells were collected and stained with PE-labeled antibodies of PD-L1, then the cell surface expressions were analyzed by flow cytometry.

4. 考察

本研究では、高食塩食摂取が免疫チェックポイント因子の発現にどのように影響を及ぼすか解析を行った。培養細胞を用いた *in vitro* 系では NaCl 濃度を増やした培地での培養によって PD-1 と PD-L1 の発現が減少することを見出した。その分子メカニズムを解析するために、関係する転写因子を調べた。血球分化・免疫に関わる転写因子 RUNX1 が PD-L1 の発現制御を行うことを発見した。しかしながら、NaCl 処理では 80 mM の高濃度でのみ RUNX1 の発現が減少しており、RUNX1 は部分的に PD-L1 の発現制御

に関わっている可能性があるものの、より低濃度においては、他の転写因子によって制御されていることが示唆された。高食塩処理では、p38 map kinase が浸透圧変化のセンサーとして機能し⁽²⁸⁾、NFAT5 が遺伝子発現を制御する転写因子として機能することが明らかとなっている^(29,30)。パブリックデータの解析では、ヒト PD-L1 プロモーターの転写開始点付近に NFAT5 が結合している Chromatin immunoprecipitation (ChIP) データがある。NFAT5 が高食塩処理によって PD-1 と PD-L1 の転写制御に関わっていることが示唆される。

マウスを用いた解析では、免疫チェックポイント因子の発現に顕著な変化は見られなかった。今回、血球全体での解析結果であったが、さらに血球成分を細分化することによって、免疫チェックポイント因子の発現を解析する必要があると考えられた。また、より長い期間高食塩食摂取させたときの影響も調べてみたいと思う。

5. 文献

1. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013 496(7446):518-22. doi: 10.1038/nature11868.
2. Faraco G, Brea D, Garcia-Bonilla L, Wang G, Racchumi G, Chang H, Buendia I, Santisteban MM, Segarra SG, Koizumi K, Sugiyama Y, Murphy M, Voss H, Anrather J, Iadecola C. Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nat Neurosci*. 2018 21(2):240-249. doi: 10.1038/s41593-017-0059-z.
3. Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomaeus 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, Côte-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 551(7682):585-589. doi: 10.1038/nature24628.
4. Rizvi ZA, Dalal R, Sadhu S, Kumar Y, Kumar S, Gupta SK, Tripathy MR, Rathore DK, Awasthi A. High-salt diet mediates interplay between NK cells and gut microbiota to induce potent tumor immunity. *Sci Adv*. 2021 7(37):eabg5016. doi: 10.1126/sciadv.abg5016.
5. He W, Xu J, Mu R, Li Q, Lv DL, Huang Z, Zhang J, Wang C, Dong L. High-salt diet inhibits tumour growth in mice via regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation. *Nat Commun*. 2020 11(1):1732. doi: 10.1038/s41467-020-15524-1.
6. Tsugane S, Sasazuki S, Kobayashi M, Sasaki S. Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer*. 2004 90(1):128-34. doi: 10.1038/sj.bjc.6601511.
7. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 12(4):252-64. doi: 10.1038/nrc3239.
8. Ljunggren HG, Jonsson R, Höglund P. Scand Seminal immunologic discoveries with direct clinical implications: The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine honours discoveries in cancer immunotherapy. *J Immunol*. 2018 88(6):e12731. doi: 10.1111/sji.12731.
9. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 11(11):3887-95. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
10. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009 114(8):1537-44. doi: 10.1182/blood-2008-12-195792.
11. Sanmamed MF, Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J*. 2014 20(4):256-61. doi: 10.1097/PPO.0000000000000061.
12. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015 21(1):24-33. doi: 10.1016/j.molmed.2014.10.009.
13. Zhao L, Yang Y, Gao Q. Efficacy and safety of nivolumab plus apatinib in advanced liver carcinosarcoma: a case report. *Immunotherapy*. 2019 11(8):651-656. doi: 10.2217/imt-2018-0214.
14. Hussain SA, Birtle A, Crabb S, Huddart R, Small D, Summerhayes M, Jones R, Protheroe A. From Clinical Trials to Real-life Clinical Practice: The Role of Immunotherapy with PD-1/PD-L1 Inhibitors in Advanced Urothelial Carcinoma. *Eur Urol Oncol*. 2018 1(6):486-500. doi: 10.1016/j.euo.2018.05.011.
15. Schiwitza A, Schildhaus HU, Zwerger B, Rüschoff J, Reinhardt C, Leha A, Andreas S, Rittmeyer A. Monitoring efficacy of checkpoint inhibitor therapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy*. 2019 11(9):769-782.

- doi: 10.2217/imt-2019-0039.
16. Lages CS, Lewkowich I, Sproles A, Wills-Karp M, Chougnet C. Partial restoration of T-cell function in aged mice by in vitro blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. *Aging Cell*. 2010 9(5):785-98. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00611.x.
 17. Wang TW, Johmura Y, Suzuki N, Omori S, Migita T, Yamaguchi K, Hatakeyama S, Yamazaki S, Shimizu E, Imoto S, Furukawa Y, Yoshimura A, Nakanishi M. Blocking PD-L1-PD-1 improves senescence surveillance and ageing phenotypes. *Nature*. 2022 611(7935):358-364. doi: 10.1038/s41586-022-05388-4.
 18. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 88(23):10431-4. doi: 10.1073/pnas.88.23.10431.
 19. Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 90(14):6859-63. doi: 10.1073/pnas.90.14.6859.
 20. Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol*. 1993 13(6):3324-39. doi: 10.1128/mcb.13.6.3324-3339.1993.
 21. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995 3(6):673-82. doi: 10.1016/1074-7613(95)90057-8.
 22. LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*. 2003 10(1):66-75. doi: 10.1038/sj.cdd.4401187.
 23. Zerafa N, Westwood JA, Cretney E, Mitchell S, Waring P, Izzi M, Smyth MJ. Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J Immunol*. 2005 175(9):5586-90. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.5586.
 24. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol*. 2002 168(3):1356-61. doi: 10.4049/jimmunol.168.3.1356.
 25. Finnberg N, Klein-Szanto AJ, El-Deiry WS. TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2008 118(1):111-23. doi: 10.1172/JCI29900.
 26. Snajdauf M, Havlova K, Vachtenheim J Jr, Ozaniak A, Lischke R, Bartunkova J, Smrz D, Strizova Z. The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials. *Front Mol Biosci*. 2021 Mar 10;8:628332. doi: 10.3389/fmolb.2021.628332.
 27. Ouyang X, Shi M, Jie F, Bai Y, Shen P, Yu Z, Wang X, Huang C, Tao M, Wang Z, Xie C, Wu Q, Shu Y, Han B, Zhang F, Zhang Y, Hu C, Ma X, Liang Y, Wang A, Lu B, Shi Y, Chen J, Zhuang Z, Wang J, Huang J, Wang C, Bai C, Zhou X, Li Q, Chen F, Yu H, Feng J. Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined with vinorelbine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2018 36(2):315-322. doi: 10.1007/s10637-017-0536-y.
 28. Shapiro L, Dinarello CA. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 92(26):12230-4. doi: 10.1073/pnas.92.26.12230.
 29. Go WY, Liu X, Roti MA, Liu F, Ho SN. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 101(29):10673-8. doi: 10.1073/pnas.0403139101.
 30. Kino T, Takatori H, Manoli I, Wang Y, Tiulpakov A, Blackman MR, Su YA, Chrousos GP, DeCherney AH, Segars JH. Brx mediates the response of lymphocytes to osmotic stress through the activation of NFAT5. *Sci Signal*. 2009 2(57):ra5. doi: 10.1126/scisignal.2000081

Analysis of the High-Salt Intake Effect on Immune System

Tatsushi Yoshida, Okuda Tsukasa

Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

Excessive salt intake is known to lead to hypertension and cardiovascular diseases, but it has not been fully elucidated how excessive salt intake affects the immune system. It has been reported that mice fed a high-salt diet promote differentiation into Th17 cells and exacerbate brain dysfunction and autoimmune diseases. Ingestion of a high-salt diet can exert an anti-tumor effect that suppresses the growth of tumors such as malignant melanoma transplanted into mice by activating NK cells. On the other hand, human cohort epidemiological studies have revealed that men with high salt intake have an increased risk of developing gastric cancer.

In recent years, immune checkpoints have attracted attention as a new immune control mechanism, which functions as a brake to suppress excessive immune reactions. On the other hand, cancer cells use this immune checkpoint to escape immune surveillance. Immune cells express the receptor PD-1 on the cell surface, and binding of the ligand PD-L1 causes immunosuppression. Many cancer cells express PD-L1 to avoid attacks from immune cells and enable survival. Antibodies that inhibit the binding of PD-1 and PD-L1 are approved as anti-cancer agents. In this study, we examined whether immune checkpoint factors are regulated by high salt intake and analyzed the effects on the immune system.

When leukemic cell K562 was cultured in a medium supplemented with NaCl at the concentration used in the Th17 cell differentiation, it was found that the expression of PD-1 and PD-L1 was attenuated. When the effect on cell proliferation under these culture conditions was investigated, it was found that the number of dead cells and the cell cycle was hardly changed. We analyzed regulators of PD-L1 expression and found that RUNX1, which is involved in blood cell differentiation and immune function, increased PD-L1 expression at the transcriptional level. Culturing in high NaCl medium attenuated the expression of RUNX1. We also found that high NaCl medium decreased the expression of the antitumor cytokine TRAIL, which we found to be a target of RUNX1. The mice were then fed a high-salt diet and analyzed. Mice fed a high-salt diet for 7 days showed a decrease in white blood cell count and an increase in platelet count, but this was not significant. When we examined the effects on the expression of PD-1 and PD-L1 on the surface of blood cells, we found that PD-1 expression in the spleen was slightly increased in high-salt-fed mice, whereas PD-L1 was not change. It would be necessary to analyze the effects of a high-salt diet for a longer period and the expression of immune checkpoint factors by dividing blood cell components.