

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22876

研究課題名（和文）単核貪食細胞による筋肉のカタボリズム亢進メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of muscle catabolism by mononuclear phagocytes

研究代表者

北田 研人（Kitada, Kento）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30882493

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、食塩の過剰摂取が筋肉の蛋白質異化（カタボリズム）を亢進させ、筋肉量減少を引き起こすことを報告した。しかしながら、高食塩摂取に伴う筋肉量減少メカニズムは不明である。そこで本研究では、予備検討にて関与が疑われる単核貪食細胞/TonEBPに焦点を当て、高食塩摂取による筋肉量減少メカニズムを解明し、加齢や現代社会の生活習慣に伴う筋萎縮機序の一端を明らかにすることを目的とした。本研究の実験結果より、高食塩摂取に伴う筋肉量減少メカニズムには、単核貪食細胞/TonEBP/蛋白質Aが関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の生活習慣や加齢に伴う筋肉量および筋力の低下（筋萎縮）は、生活の質（QOL）や健康寿命を低下させてしまうが、具体的な予防・治療法が存在しないのが現状である。本邦は、食塩摂取量が多い国のひとつであり、高食塩摂取による筋肉のカタボリズム亢進（筋肉量減少）は、加齢や現代の生活習慣に伴う筋萎縮メカニズムの一因である可能性が考えられる。本研究により、高食塩摂取に伴う筋萎縮のメカニズムに、単核貪食細胞/TonEBP/蛋白質Aが関与していることが明らかとなった。将来的には本研究の成果を基盤とし、食塩の摂り過ぎや加齢による筋萎縮に対する予防・治療法の開発へつなげ、ヒトの健康寿命延長を目指す。

研究成果の概要（英文）：We have reported that high salt intake induces muscle protein catabolism and muscle loss in rodents. However, the mechanism of high salt-induced muscle wasting remains to be clarified. In this research project, we focused on the role of mononuclear phagocytes in high salt-induced muscle loss. From the experimental results of this study, we found that the mononuclear phagocytes/TonEBP/protein A pathway plays an important role in salt-driven muscle wasting.

研究分野：薬理学・生理学

キーワード：食塩 筋萎縮 マクロファージ 浸透圧 TonEBP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- 本邦は超高齢化社会を迎え、単に寿命を延ばすのではなく、いかに健康寿命を延長させるかが緊急課題となっている。特に、現代の生活習慣や加齢に伴う筋肉量および筋力の低下(筋萎縮)は、生活習慣病、代謝疾患、骨折、寝たきり、死亡などのリスクを上昇させ、生活の質(QOL)や健康寿命を低下させてしまうが、具体的な予防・治療法が存在しないのが現状である。
- 従来、生体内のナトリウム・体液量の恒常性は、主に腎臓によって維持されていると考えられてきた。これに対して我々は、腎臓に加えて肝臓や筋肉もナトリウム・体液バランス調節に重要であり、高食塩摂取下で体液の恒常性を維持するためには、浸透圧物質である尿素を利用した腎臓の水再吸収増加、肝臓の尿素産生亢進、尿素産生に必要なアミノ酸・エネルギーを供給するために筋肉の蛋白質異化(カタボリズム)が亢進し、筋肉量が減少することを発見した。
- 本邦は、食塩摂取量が多い国のひとつである。よって、高食塩摂取による筋肉のカタボリズム亢進(筋肉量減少)は、加齢や現代の生活習慣に伴う筋萎縮メカニズムの一因である可能性が考えられる。しかしながら、高食塩摂取に伴う筋萎縮のメカニズムは未解明であり、具体的な予防・治療標的も不明である。

2. 研究の目的

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

3. 研究の方法

単核貪食細胞特異的 TonEBP 欠損マウスを用いた検討

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

2. 培養マクロファージを用いた検討

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

4. 研究成果

野生型マウス(LysMwtTonEBPflax)に高食塩させると筋肉量の減少が生じたが、単核貪食細胞特異的 TonEBP 欠損マウスにおいては、その減少が有意に抑制された。また、筋肉の蛋白質の分解に関与するオートファジー関連マーカー(LC3、p62など)も同様の結果であった。よって、高食塩摂取に伴う筋肉量減少メカニズムの一部には、単核貪食細胞/TonEBPが関与していることが考えられた。

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

マウス培養マクロファージに高NaCl培地(+40mM・24時間)を処置すると、TonEBP蛋白質発現量が増加した。一方、RAW細胞に対する高NaCl培地の処置は、蛋白質Aの発現量および分泌量(培地中)の減少を引き起こした。TonEBP siRNAによりTonEBP発現量を抑制した状態で同様の実験を行ったところ、高NaCl培地によるTonEBP発現量の増加と蛋白質Aの発現量・分泌量減少が、両者ともTonEBP siRNAにより抑制されることが明らかとなった。よって、マクロ

ファージが高浸透圧ストレスにさらされると、TonEBP 依存的に蛋白質 A の発現量および分泌量が減少することが示唆された。

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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wild Johannes, Kitada Kento, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Aestivation motifs explain hypertension and muscle mass loss in mice with psoriatic skin barrier defect	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Physiologica	6. 最初と最後の頁 e13628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.13628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kovarik Johannes J., Morisawa Norihiko, Wild Johannes, Marton Adriana, Takase Minegishi Kaoru, Minegishi Shintaro, Daub Steffen, Sands Jeff M., Klein Janet D., Bailey James L., Kovalik Jean Paul, Rauh Manfred, Karbach Susanne, Hilgers Karl F., Luft Friedrich, Nishiyama Akira, Nakano Daisuke, Kitada Kento, Titze Jens	4. 巻 16
2. 論文標題 Adaptive physiological water conservation explains hypertension and muscle catabolism in experimental chronic renal failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Physiologica	6. 最初と最後の頁 e13629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.13629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kidoguchi Satoshi, Kitada Kento, Nakajima Kazuki, Nakano Daisuke, Ohsaki Hiroyuki, Kittikuluth Wararat, Kobara Hideki, Masaki Tsutomu, Yokoo Takashi, Takahashi Kazuo, Titze Jens, Nishiyama Akira	4. 巻 289
2. 論文標題 Hepatocellular carcinoma induces body mass loss in parallel with osmolyte and water retention in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120192 ~ 120192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2021.120192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北田研人
2. 発表標題 腎機能低下に伴う体液変化とサルコペニア
3. 学会等名 第11回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 北田研人
2. 発表標題 高血圧学におけるモデル動物の再考：ワンポイント測定のとし穴
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 北田研人
2. 発表標題 Water conservation system -多臓器に制御される水・ナトリウム代謝
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関