

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 476

氏 名 北田 研人

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: Duke-NUS Medical School (国名: シンガポール)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

T 細胞によるリンパ管を介した皮膚の電解質・体液調節機構の解明

3. 派遣期間: 平成 29 年 12 月 1 日 ~ 令和 元年 11 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

Duke-NUS Medical School, Program in Cardiovascular and Metabolic Disorders

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 | 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

平成 29 年 12 月より、シンガポール Duke-NUS Medical School、Cardiovascular and Metabolic Disorders、Jens Titze 教授の研究室において、本研究計画を実施しており、現在までの研究遂行状況および研究成果を下記に記載する。

研究目的①「皮膚の電解質・体液調節機構における T 細胞の役割およびその制御メカニズムの解明」の遂行状況及び成果

これまでの研究背景と実験結果より、免疫細胞の T 細胞は、TonEBP/IFN- γ を介して皮膚のリンパ管形成を阻害し、皮膚からのナトリウムイオン (Na^+) 排泄を抑制することで、 Na^+ /体液バランスの恒常性を維持している可能性が考えられる (図 1)。本仮説を最終的に証明するために、T 細胞欠損マウス、IFN- γ 欠損マウス、T 細胞特異的 TonEBP 欠損マウスなどを用いて、T 細胞が皮膚のリンパ管形成制御を介して、電解質・体液を調節していることを解明することが本研究項目の目的である。

研究成果①-1: T 細胞の養子移植実験

CD4⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞が、皮膚の Na^+ ・体液バランスを制御していることを最終的に証明するために、WT マウスの脾臓から CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞を磁気細胞分離 (MACS) 法により抽出し、CD4 欠損 (CD4^{-/-}) マウスと CD8 欠損 (CD8^{-/-}) マウスへ養子移植を行った。その結果、CD4^{-/-}マウスおよび CD8^{-/-}マウスに低 NaCl 食を摂取させた際に生じる皮膚の Na^+ 喪失が、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞それぞれの養子移植によって消失することが明らかとなった (図 2)。また、T 細胞欠損マウスに低 NaCl 食を摂取させた際に観られる皮膚のリンパ管形成の増大および



図 1. 本研究の仮説

水分の喪失に関しても、T細胞の養子移植により抑制されることが確認された。これらの研究結果より、T細胞がリンパ管形成制御を介して、皮膚におけるNa⁺/体液バランスの恒常性を調節していることを証明した。

尚、研究成果の一部を第41回日本高血圧学会総会の日中韓 Perspectives of Hypertension Research in Eastern Asia (シンポジウム)において発表した。

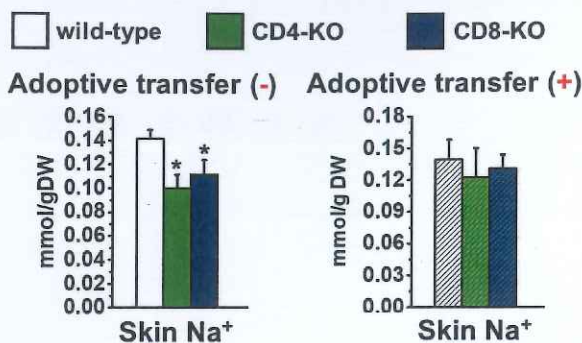


図2. T細胞の養子移植実験

研究成果①-2: T細胞特異的 TonEBP 欠損マウス (CD4^{cre}TonEBP^{flox}) を用いた検討

T細胞による皮膚のNa⁺・体液制御機構に透圧応答エンハンサー結合蛋白質であるTonEBPが関与しているかを検討するため、T細胞特異的TonEBP欠損マウス(CD4^{cre}TonEBP^{flox/flox})およびその野生型マウス(CD4^{wt}TonEBP^{flox/flox})マウスを用いて検討を行ったところ、CD4^{cre}TonEBP^{flox/flox}マウスに低NaCl食を摂取させると皮膚の水分量、Na⁺量が有為に減少することが明らかとなった。これらの実験結果は、T細胞がTonEBPを介して皮膚のNa⁺含量および水分量を制御している可能性を示すものである。現在、低NaCl食を摂取させた際の皮膚のリンパ管形成、TonEBP/VEGF-C/IFN- γ 発現量など、詳細な機序解明を行っている。

研究成果①-3: 内因性グルコルチコイド活性化マウス (MC3R^{-/-}) を用いた検討

また、T細胞がリンパ管形成制御を介して、皮膚のNa⁺及び体液量を制御するその上流の因子として、エネルギー代謝や免疫反応を調節するホルモンとして知られているグルコルチコイドが関与していることを発見した。我々は、健康人を対象として行われた100日以上にも及ぶ長期間の塩・体液バランス研究(Mars500 study)の詳細なデータ解析により、グルコルチコイド(コルチゾール及びコルチゾン)分泌量が多い日に、摂取したNa⁺量と飲水量よりも多くのNa⁺と体液が体内から尿中へ排泄されることを見出している(Kitada et al., J Clin Invest 2017)。本知見より、内因性のグルコルチコイド活性化により、皮膚からNa⁺及び水分が体外へ排泄させることが考えられた。そこで、内因性グルコルチコイド活性化マウスとして知られているMelanocortin-3 receptor欠損(MC3R^{-/-})マウスを用いて下記の実験を行い、以下の研究成果が得られている。

MC3R^{-/-}マウスの内因性グルコルチコイド活性化

まず、MC3R^{-/-}マウスに低食塩食を4週間摂取させた際の本マウスのグルコルチコイド活性化を確認した。グルコルチコイドの活性化は、脂肪を増加させる一方で筋肉量を減少させることが知られている。そこで、マウスの身体組成を測定したところ、野生型マウスと比較してMC3R^{-/-}マウスでは、脂肪組織量の増加および筋肉量の減少が観られた。また、MC3R^{-/-}マウスの筋肉において、グルコルチコイド受容体(GR)活性化マーカーのひとつであるGRのDNA結合率の顕著な増大が認められた。これらの結果より、MC3R^{-/-}マウスは低食塩摂取下においても、内因性のグルコルチコイド活性化が生じていることが確認できた。

MC3R^{-/-}マウスの腎臓と皮膚におけるNa⁺/体液量制御

低食塩食を4週間摂取させた際の腎臓と皮膚におけるNa⁺及び体液量制御を検討したところ、野生型マウスと比較してMC3R^{-/-}マウスは、皮膚のNa⁺含量および水分含量が著しく低下して

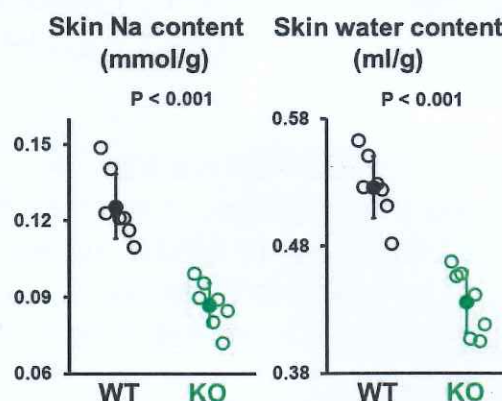


図3. 皮膚のNa及び水分量

皮膚組織における電解質勾配の分布変化を energy-dispersive X-ray spectroscopy scanning electron microscopy (EDX-SEM) を用いて可視化することに挑戦し、腎臓のみならず、皮膚においても電解質量の制御が行われていることを直接的に測定することが本研究項目の目

的である。正常マウスに高 NaCl 食、通常食あるいは低 NaCl 食を摂取させ、皮膚組織のサンプリングを行い、EDX-SEM による皮膚の電解質勾配の測定系の確立に従事している。令和元年 12 月の時点では、測定系の確立に至っていないが、液体窒素を用いた皮膚組織の凍結方法に問題が見つかり、今後は、固体窒素による組織凍結法などを代用していくことで本測定系の確立を目指す。本測定系の確立後は、正常マウス、T 細胞欠損マウス、MC3R⁺マウスに対して、高 NaCl 食、通常食あるいは低 NaCl 食を摂取させた際の皮膚の電解質勾配を EDX-SEM によって測定し、NaCl 摂取量の変化に伴って皮膚の電解質勾配の分布に変化が生じるかを検討する。また、現在は EDX-SEM のみならず、質量分析イメージング法による皮膚組織の Na⁺の可視化も並行して行っている。今後も継続して EDX-SEM の研究および質量分析イメージング法による皮膚の電解質勾配の可視化の確立を行い、本研究を遂行する。