

表 題 ストレス環境下における
上部消化管粘膜での mouse β -defensin-3 の発現
～糖尿病モデルマウスによる検討～

論文の区分 博士課程

著 者 名 川嶋 理恵

担当指導教員氏名 草間 幹夫 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
消化器疾患学 分野
歯科口腔外科学

2014年1月10日申請の学位論文

目次

はじめに	2
方法	4
結果	7
考察	19
おわりに	22
引用文献	23

はじめに

ストレスは、生体の免疫応答や口腔、食道、胃などの消化器粘膜、創傷治癒過程に悪影響を及ぼすことが知られている[1-6]。口腔外科領域では外傷や悪性腫瘍など侵襲の大きな外科的処置を伴う治療も多く、患者の受ける心理的、身体的ストレスは計り知れない。消化器粘膜や皮膚では、ストレスが潰瘍形成や創傷治癒遅延を惹起するとの報告もあり、その発症や経過に心理的要因が関与していると考えられている[7,8]。さらに、ストレスと粘膜や皮膚のバリア機能との関連についての報告も多い[9-13]。

近年、顎口腔領域の疾患を有する患者のうち、全身疾患を持つ患者の割合は増加傾向にある。特に生活習慣病の一つである糖尿病は、高血糖を呈し免疫能が低下することにより生体の防御機構に異常をきたすことが知られている。さらに粘膜や皮膚では易感染性や創傷治癒遅延を引き起こし、顎口腔領域においても感染の重症化による炎症の増悪や外科処置後の創傷治癒遅延などの合併症に留意しなければならない[14,15]。

Defensinはジスルフィド結合を持つ抗菌ペプチドで、細菌やウイルスに対する宿主の自然免疫を担っている。またDefensinは α -defensinと β -defensinのサブファミリーに分類され、 α -defensinはヒト好中球に存在するのに対し、 β -defensinは上皮細胞から産生され、ヒトやマウスの様々な器官に存在している[16]。さらに、 β -defensinは細菌やウイルス、真菌に対し広いスペクトラム活性を有し、粘膜や皮膚の第一線で自然免疫として機能している[17-19]。粘膜や皮膚に感染が起こると β -defensinの発現は増加し、感染防御としての機能を発揮する。ヒトではHuman β -defensin-1やHuman β -defensin-3と比較し、Human β -defensin-2(hBD-2)は恒常的に発現しており、感染などの刺激によって発現量が影響を受けやすく粘膜上皮において強い抗菌活性を示す[20]。マウスにおいては、Mouse β -defensin-3 (mBD-3)がhBD-2のホモログであることが報告されている[20,21]。

また近年、心理的ストレスが生体内の糖質コルチコイド(GC)を増加させることにより、皮膚の mBD-3 発現が低下すると報告された[11]。ストレスにより視床下部-下垂体-副腎系(HPA系)が刺激され、副腎皮質ステロイドであるGCが放出されることが知られており、粘膜や皮膚のバリア機能の破綻には、ストレスによるGCの増加が関与していると考えられている[11,22-24]。しかしながら、上部消化管粘膜における β -defensinの発現と、ストレスあるいはGCとの関連は明らかにされていない。また、感染の重症化を引き起こす易感染性を有する糖尿病と、上部消化管粘膜における β -defensinの発現についても明らかになっていない。そこで2型糖尿病用モデルマウスであるNSY/Hosを使用し、上部消化

管粘膜における mBD-3 発現とストレス、GC による影響を明らかとすることを本研究の目的とした。

方法

1. 使用動物

2型糖尿病モデルマウスである NSY/Hos のオスを、8 週齢で日本 SLC 株式会社(静岡)から購入した。常温(22±3°C)下の SPF(Specific Pathogen Free)飼育室にて、12 時間の明暗周期のもとマウスを 1 ケージに 5 匹ずつ飼育した。糖尿病モデルマウスに対する給餌として、30%の蔗糖水、高脂肪食を与えた[25,26]。また、NSY/Hos が 25 週齢以降で著明な高血糖を呈するという特徴に基づき、26 または 27 週齢で実験に使用した。本研究で行った全ての動物実験は、神奈川歯科大学の倫理委員会の承認を得て、神奈川歯科大学における動物実験ガイドラインに従って行った。

2. ストレス負荷

ストレス実験では、27 週齢のマウスを使用した。計 10 匹のうち、5 匹は Stressed 群として拘束ストレスを負荷し、残りの 5 匹はストレスを負荷しない Non-stressed 群とした。Stressed 群では、ワイヤーメッシュ(5x5mm)をマウスの身体に巻きつけ、手足以外は動かさず自由に動き回れないように拘束することによってストレスを負荷し、実験期間中は 1 ケージにつき 1 匹として飼育した[27,28]。またマウスは夜行性であることから、ストレス負荷は 18:00 から 10:00 までの 1 日 16 時間とし、16 時間経過後は拘束ストレスを解除した。これを 3 日間繰り返し、3 日目の実験終了後に血液を採取し、歯肉、食道、胃を摘出した。

3. GCの全身投与

GC の全身投与実験では、26 週齢のマウスを使用した。計 8 匹のうち、4 匹は Treated 群として GC の全身投与を行い、残り 4 匹には GC の全身投与は行わず Untreated 群とした。Treated 群では、生理食塩水を溶媒としたデキサメタゾン(450µg/kg)をマウスへ腹腔内投与し、これを 1 日 1 回、3 日間行った[11]。デキサメタゾンの濃度は、GC と皮膚のバリア機能に関する既出の論文を参考とした[10,12,13,29]。Untreated 群では、生理食塩水のみを腹腔内投与した。

4. 血糖値と血漿コルチコステロン値の測定

ストレス実験に使用したマウスは血糖値、血漿コルチコステロン値を測定するため、実験最終日の 10:00 から 12:00 の間に、セボフルランとペントバルビタール(65mg/kg)による麻酔導入後、直ちに右腋窩より血液採取を行った。血糖値の測定は、血液をフッ化ナトリウムと EDTA 含有の BD Vacutainer Plus

tube® (Becton Dickinson, NJ, USA)に採取し、株式会社メディカルラボ (神奈川県)に委託し測定した。血漿コルチコステロン値の測定は、血液を EDTA 含有 Venoject tube® (テルモ,東京)に採取し、遠心分離(2000rpm, 15分, 4°C)を行うことにより血漿成分を分離した。血漿コルチコステロンは SRL 株式会社 (東京)に委託し測定した。

5. 歯肉、食道、胃の摘出

ストレス実験終了後および GC 投与実験終了後の 10:00 から 12:00 までの間に、セボフルランとペントバルビタール(65mg/kg)による麻酔導入後、マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた。その後直ちに、ストレス負荷実験では歯肉、食道、胃を摘出し、GC 投与実験では食道を摘出した。

6. RNAの分離とReal-time PCR

プロトコルに従い、ISOGEN (株式会社ニッポンジーン,富山)を使用して、各摘出サンプルからTotal RNAを分離した。分離したTotal RNAは、電気泳動にかけ臭化エチジウム含有1.5%アガロースゲルをUV照射することにより発現を確認した。各サンプルのRNA濃度は、Bio Spec-nano spectrophotometer (株式会社島津アクセス,神奈川県)を使用し測定した。プロトコルに従い、First-strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics Ltd., Lewes,UK)を用いてTotal RNAから、cDNAを合成した。プロトコルに従いLight Cycler system (Roche)を使用し、Real-time PCRを行った。

mBD-3のプライマー配列は、5'-GCT TCA GTC ATG AGG ATC CAT TAC CTT C-3(forward)と5'-CGG GAT CTT GGT CTT CTC TA-3 (reverse)とし、日本遺伝子研究所(宮城)により設計され、PCR productは218 bpであった。PCR反応は、酵素活性化を95°C、10分で1サイクル行い、増幅は95°Cで10秒、60°Cで15秒、72°Cで15秒として40サイクル行った。また、Housekeeping control としてMouse β -actinを用い、Light Cycler Primer sets (Search-LC, Heidelberg, Germany)を使用した。PCR反応は酵素活性化を95°C、10分で1サイクル行い、増幅は95°Cで10秒、60°Cで10秒、72°Cで10秒として40サイクル行った。mBD-3の遺伝子発現は、各サンプルのmBD-3とMouse β -actinのmRNAコピー数の比率(mBD-3/ Mouse β -actin)で表した。

7. 免疫組織化学染色

ストレス実験において摘出した食道を、既製の4%パラホルムアルデヒドに4°Cで7時間、10%スクロース加PBSに4°Cで4時間、15%スクロース加PBSに4°Cで7時間、20%のスクロース加PBSに4°Cで7時間置換し、液体窒素上でOptimal

Cutting Temperature compound® (サクラファインテックジャパン株式会社, 東京)に封入し凍結ブロックを作製した。各ブロックで3 μ mの凍結切片を作製し、マニュアルに従いHistofine Staining Kit(株式会社ニチレイバイオサイエンス, 東京)を使用してmBD-3の免疫組織化学染色を行った。凍結切片は内因性ペルオキシダーゼの除去を3% H_2O_2 で8分間行い、室温で1次抗体としてanti-mBD-3 polyclonal antibody (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)と1時間反応させた。さらに、室温で2次抗体であるrabbit peroxidase-labeled secondary antibody(株式会社ニチレイバイオサイエンス, 東京)と10分間反応させた。発色には、3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochlorideを使用し、核染色にはヘマトキシリンを使用した。免疫染色のコントロールには、1次抗体の代わりにPBSを使用した。

8. *in situ* hybridization

ストレス実験において摘出した食道を、4%パラホルムアルデヒドに常温で10分固定し、脱水、透徹を行ってパラフィンブロックを作製した。cRNAプローブは、株式会社つくば遺伝子研究所(茨城)に依頼しpGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA)を用いて転写して作成された。Digoxigenin (DIG)-11-UTPに標識されたmBD-3(NM_013756.2)に特異的なオリゴヌクレオチド(nucleotides 38–157, 177–296)をプローブ(120-mer)として用いた。

In situ hybridization は、以前報告した通り下記の方法で行った[30-32]。

3 μ mのパラフィン切片に、proteinase K (1 μ g/mL)を37°Cで20分間反応させた。Hybridizationは、DIG-11-UTPに標識された cRNAプローブを Hybridization medium (和光純薬工業株式会社, 東京)で37°Cで16時間反応させた。その後、DIG non-radioactive nucleic acid detection kit (Roche)を使用し、mRNAを検出した。

9. 統計学的解析

統計処理には、SPSS software, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を使用し、mean \pm SDとした。血糖値と血漿コルチコステロン値は Mann-Whitney *U* testにより統計分析を行った。歯肉、食道、胃の3群間でのmBD-3の遺伝子発現についてはKruskal-Wallis testにより統計処理を行い、3群間に有意差がある場合には、さらに各2群間でMann-Whitney *U* testにより統計処理を行った。P < 0.05のとき有意差ありとした。

結果

1. 血糖値と血漿コルチコステロン値

マウスの高血糖状態と本実験におけるストレス負荷法の有用性を調べるため、血糖値と血漿コルチコステロン値の測定を行った。血糖値は Non-stressed 群 (236.80 ± 40.10 mg/dl, $n = 5$) と比較し、Stressed 群 (296.40 ± 78.85 mg/dl, $n = 5$) で増加を認めたが、両群間に有意差は認めなかった (Fig. 1A)。血漿コルチコステロン値は、Non-stressed 群 (126.44 ± 25.89 ng/ml, $n = 5$) と比較し、Stressed 群 (183.80 ± 35.73 ng/ml, $n = 5$) で有意な増加を認めた ($P < 0.05$, Fig. 1B)。

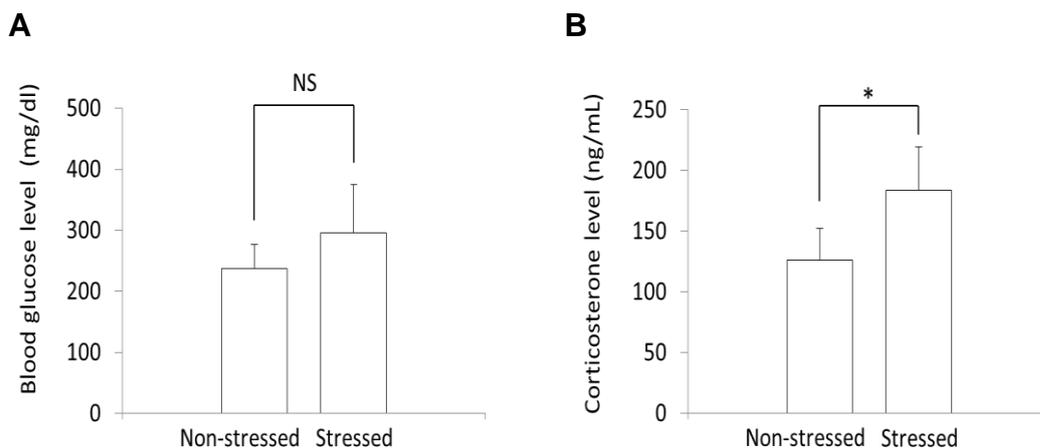


Fig.1 ストレス負荷による血糖値、血漿コルチコステロン値の変化

Stressed群、Non-stressed群における血糖値(A)と血漿コルチコステロン値(B)を示した。血糖値はNon-stressed群(n = 5)と比較し、Stressed群(n = 5)で増加を認めたが、両群間に有意差は認めなかった。血漿コルチコステロン値は、Non-stressed群(n = 5)と比較し、Stressed群(n = 5)で有意な増加を認めた(*P < 0.05)。

2. 上部消化管におけるmBD-3の遺伝子発現

歯肉、食道、胃での mBD-3 の遺伝子発現量を調べるために、Real-time PCR で解析を行った。融解曲線は 1 つの fluorescence peak を示し、電気泳動により PCR 生成物が mBD-3 mRNA であることを確認した。mBD-3 の遺伝子発現量は、食道(0.03645 ± 0.02405 , $n = 4$)、歯肉(0.01025 ± 0.005909 , $n = 4$)、胃(0.000534 ± 0.0007273 , $n = 4$)の順に多く、各群間で有意差が認められた($P < 0.05$, Fig.2)。食道での mBD-3 の遺伝子発現は、歯肉や胃と比較し有意に高値を示した($P < 0.05$)。

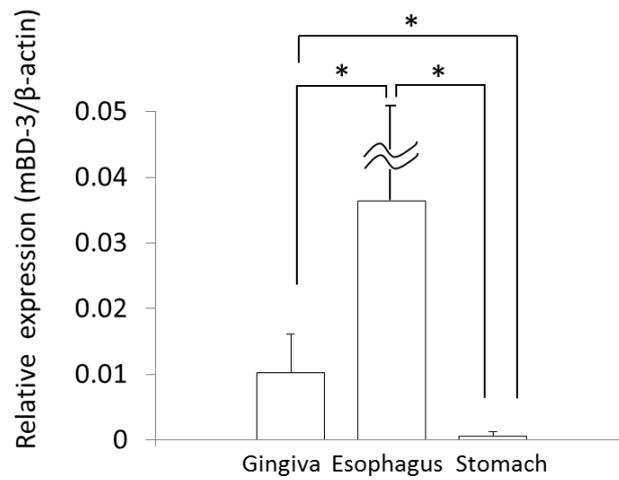


Fig. 2 Real-time PCRによる上部消化管でのmBD-3遺伝子発現量

mBD-3の遺伝子発現量は、食道(Esophagus, n = 4)、歯肉(Gingiva, n = 4)、胃(Stomach, n = 4)の順に多く、食道では他と比較し有意に高値を認めた(*P < 0.05)。各群間には有意差を認めた(*P < 0.05)。

3. ストレス負荷による上部消化管でのmBD-3遺伝子発現量の変化

ストレス負荷による上部消化管でのmBD-3遺伝子発現量の変化を調べるため、Real-time PCRを行った。歯肉では、ストレス負荷によるmBD-3の遺伝子発現量に有意な変化は認めなかった(Non-stressed群, 0.01025 ± 0.005909 , Stressed群, 0.00975 ± 0.007932 , $n = 4$; Fig. 3A)。食道ではNon-stressed群(0.03645 ± 0.02405 , $n = 4$)と比較し、Stressed群(0.00442 ± 0.002369 , $n = 4$)でmBD-3の遺伝子発現量は有意に低下した($P < 0.05$, Fig. 3B)。

胃では、ストレス負荷によるmBD-3の遺伝子発現量に有意な変化は認めなかった(Non-stressed群, 0.000534 ± 0.0007273 , Stressed群, 0.000494 ± 0.0005212 , $n = 4$; Fig. 3C)。

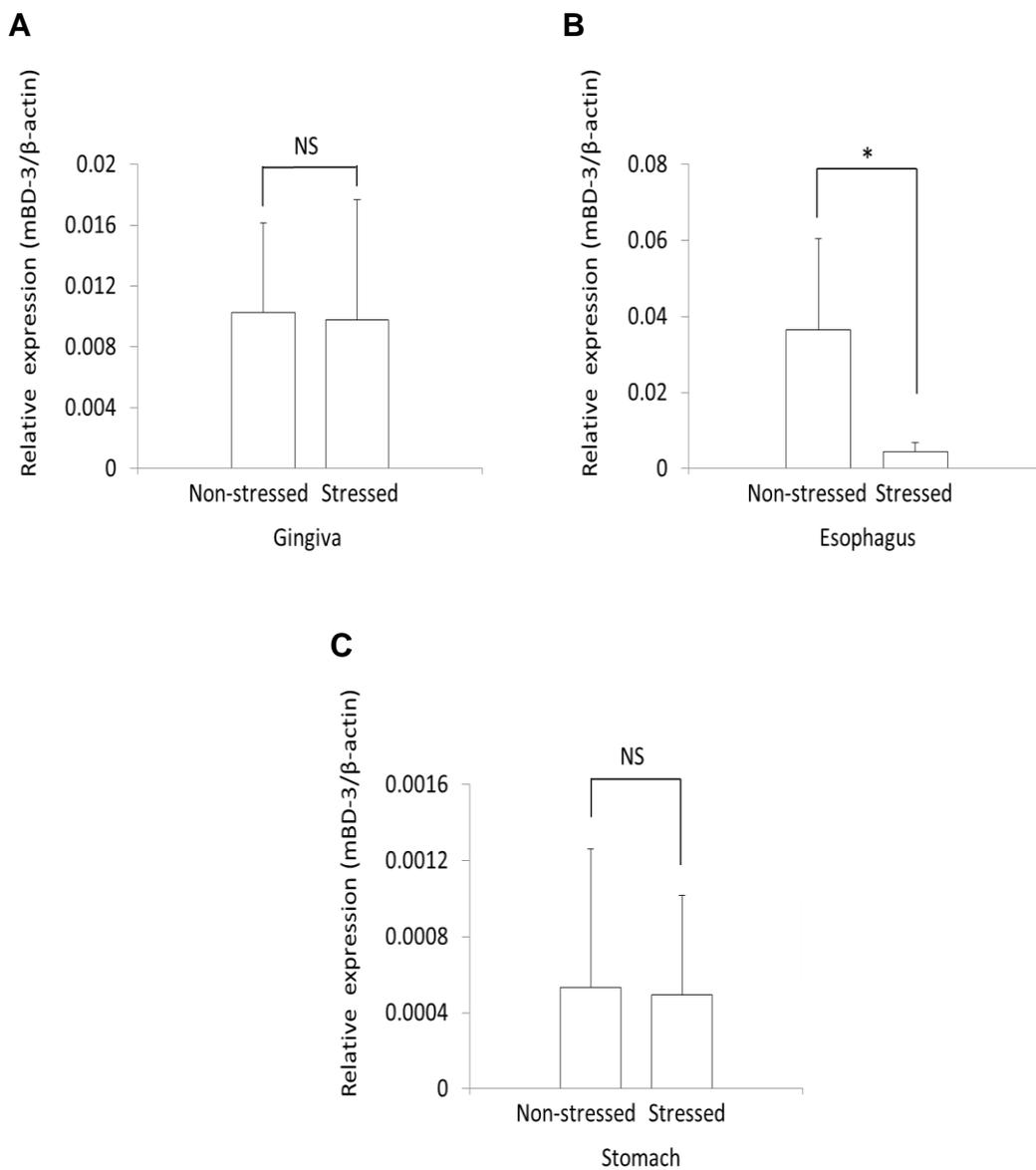


Fig. 3 Real-time PCRによる上部消化管でのストレス負荷によるmBD-3遺伝子発現量の変化

A: 歯肉では、ストレス負荷による mBD-3 の遺伝子発現量に有意な変化は認めなかった(Non-stressed 群,n = 4; Stressed 群,n = 4)。

B: 食道では Non-stressed 群(n = 4)と比較し、Stressed 群(n = 4)で mBD-3 の遺伝子発現量は有意に低下した(* $P < 0.05$)。

C: 胃では、ストレス負荷による mBD-3 の遺伝子発現量に有意な変化は認めなかった(Non-stressed 群,n = 4; Stressed 群,n = 4)。

4. ストレス負荷による食道粘膜でのmBD-3タンパク発現の変化

ストレス負荷による食道粘膜でのmBD-3のタンパク発現の変化を調べるため、免疫組織化学染色を行った。Non-stressed群では角化層にmBD-3タンパクが検出された(Fig. 4A)。基底細胞層や有棘細胞層にはmBD-3タンパクは検出されなかった。Stressed群では、mBD-3タンパクは検出されなかった(Fig.4B)。

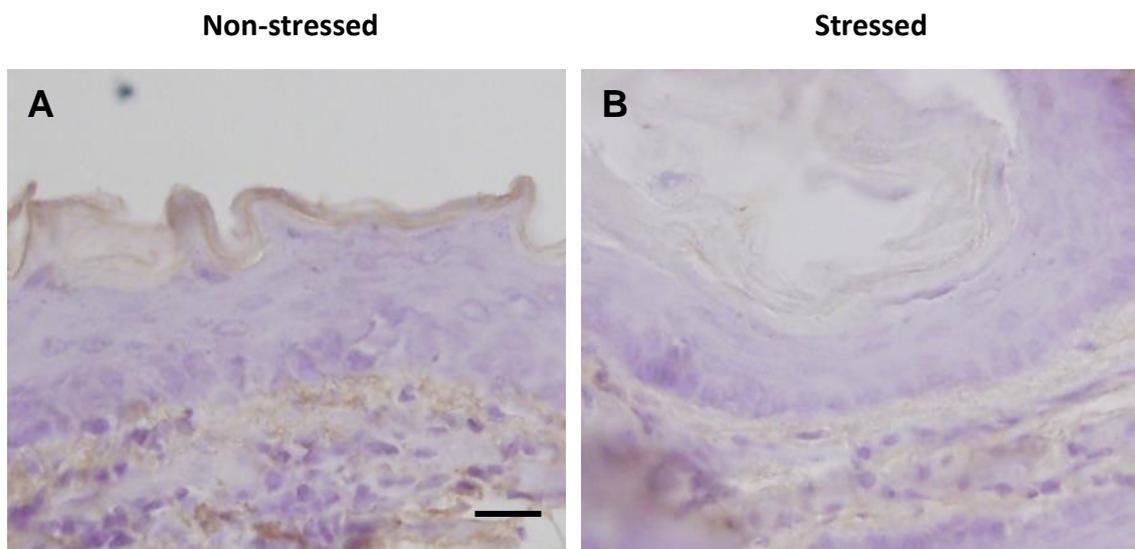


Fig. 4 食道でのストレス負荷によるmBD-3タンパクの局在

Non-stressed群では角化層にmBD-3タンパクが検出された(Fig. 4A)。Stressed群では、mBD-3タンパクは検出されなかった(Fig.4B)。Bar=20 μ m

5. ストレス負荷による食道粘膜でのmBD-3遺伝子発現の変化

ストレス負荷による食道粘膜での mBD-3 mRNA の遺伝子発現の変化を調べるため、*in situ* hybridization を行った。antisense probe では、Non-stressed 群では、食道粘膜上皮の細胞質に、特異的な強いシグナルを認めた(Fig. 5A)。さらに mBD-3 遺伝子の局在は、食道粘膜上皮の基底細胞層と有棘細胞層で認められ、角化層には認めなかった。また、細胞核には非特異的なシグナルを認めた。Stressed 群の食道粘膜上皮の細胞質に特異的な弱いシグナルを認めた(Fig. 5B)。また、細胞核には非特異的なシグナルを認めた。sense probe では、両群ともに食道粘膜でのシグナルを認めなかった(Fig.5C には Non-stressed 群を示す)。

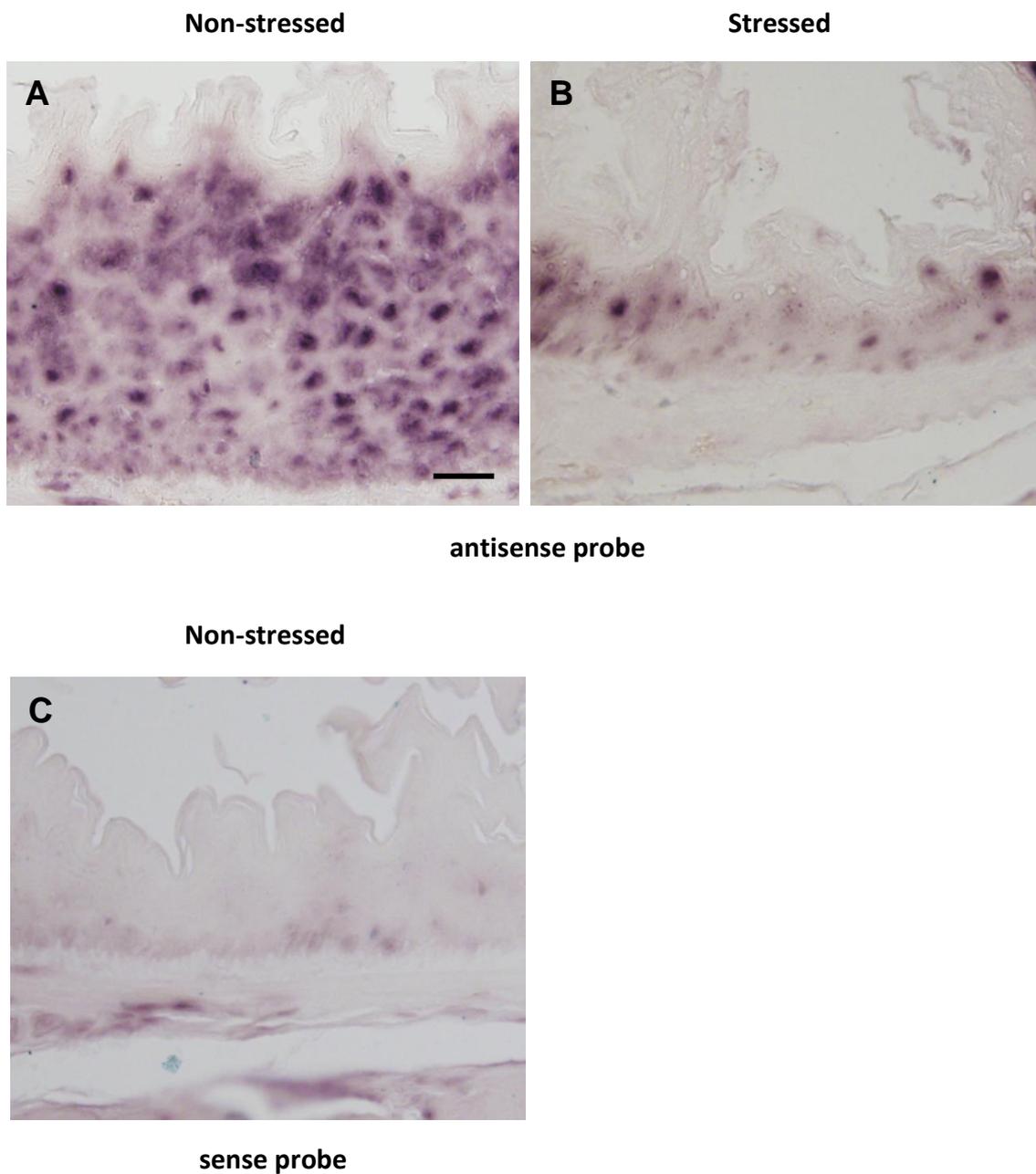


Fig. 5 食道粘膜でのストレス負荷によるmBD-3遺伝子の局在

antisense probeでは、Non-stressed群の食道粘膜上皮の細胞質に、特異的な強いシグナルを認めた(Fig. 5A)。antisense probeのStressed群では、食道粘膜上皮の細胞質に特異的な弱いシグナルを認めた(Fig. 5B)。両群ともに細胞核には非特異的なシグナルを認めた。sense probeでは、食道粘膜上皮でのシグナルを認めなかった(Fig.5CにはNon-stressed群を示す)。

6. GC投与による食道でのmBD-3遺伝子発現量の変化

食道ではストレス負荷によるmBD-3の遺伝子発現量の低下が、ストレスにより上昇したGCと関連しているか否かを明らかにするため、マウスへのデキサメタゾン全身投与を行い、Real-time PCRでmBD-3の遺伝子発現量を測定した。Untreated群($0.000124025 \pm 0.0000419$, n=4)と比較し、Treated群(0.00004 ± 0.0000197 , n=4, Fig.6)ではmBD-3の遺伝子発現量が有意に低下した($P < 0.05$)。

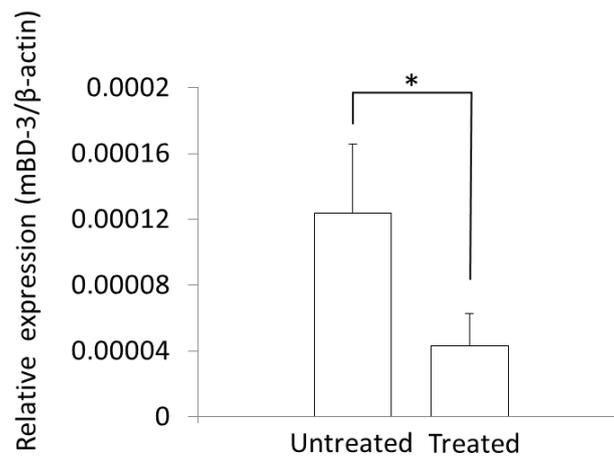


Fig. 6 Real-time PCRによる食道でのGC全身投与によるmBD-3遺伝子発現量の変化

Untreated群(n=4)と比較し、Treated群(n=4)ではmBD-3の遺伝子発現量が有意に低下した(Fig.6)。*P < 0.05

考察

糖尿病は生活習慣病の一つであり、口腔外科診療において糖尿病患者と接する機会は非常に多い。糖尿病患者は免疫能の低下により易感染性となるため、細菌やウイルス感染による炎症の増悪や術後感染、皮膚や粘膜の創傷治癒遅延などが重篤な合併症を発症する場合がある。一方、ヒトやマウスがストレスを感知すると、視床下部-下垂体-副腎系からなるHPA系を介して、ヒトではコルチゾール、マウスではコルチコステロンが分泌され、これらGCの過剰分泌により免疫能が低下することが知られている。特に消化管粘膜では、ストレスが粘膜の防御機能を低下させ潰瘍形成を惹起するとの報告もあり、その発症や経過に心理的因子が密接に関与している。

mBD-3は、マウスの粘膜や皮膚において、自然免疫として感染防御を担う抗菌ペプチドであり、上部消化管粘膜ではmBD-3があらゆる刺激に対し上皮の第一線で感染防御因子として機能する[21,33]。しかしながら上部消化管粘膜において、ストレスやGCがどのようにmBD-3の発現に影響を及ぼすのかは明らかになっていない。そこで本研究では、糖尿病マウスを用いて、ストレスやGCが上部消化管粘膜でのmBD-3の発現に及ぼす影響を検討した。

まず初めに、2型糖尿病モデルマウスであるNSY/Hosの高血糖状態や、拘束ストレスがマウスに与えるストレス効果を調べるため、血糖値、血漿コルチコステロン値を測定した。Non-stressed群のマウスでは平均血糖値は236mg/dlであり、Stressed群においては296 mg/dlであることからNon-stressed群と比較し高値であったが、有意差は認めなかった。NSY/Hosは、Jcl:ICRマウスから品種改良して作出された高血糖を呈する自然発症の2型糖尿病モデルマウスである[34]。本研究ではマウスの高血糖状態を増悪させるため、30%スクロース水と高脂肪食を摂取させて飼育を行い[25,26]、NSY/Hosの血糖値は約150mg/dl前後であるという報告[35]と比較し、本研究ではさらに高い血糖値を示す糖尿病マウスの確立が可能であった。一般的にストレスにより血糖値は増加するとされているが、本研究ではストレス負荷により血糖値の有意な増加は認められなかった。これは本研究で使用したNSY/Hosが、高脂肪食、スクロース水の摂取によりすでに高い血糖値を示しており、ストレス負荷においても両群間の血糖値に差が生じなかったためと考えられた。

血漿コルチコステロン値は、Non-stressed群と比較しStressed群において有意に高値を示した。以前報告しているように、Stressed群ではマウスにワイヤーメッシュを巻きつけることにより拘束ストレスを負荷した[36]。齧歯類において、心理的、身体的ストレスはGCであるコルチコステロンを増加させることが知られており、本研究においても拘束ストレスを負荷することにより、マ

ウスの血漿コルチコステロン値が有意に増加した。以上の結果より、糖尿病マウスに拘束ストレスを負荷することにより、高血糖を呈するストレス負荷モデルマウスを確立することができた。

上部消化管における **mBD-3** の遺伝子発現量を調べるため、**Real-time PCR** を行った。**mBD-3** の遺伝子発現量は、食道、歯肉、胃の順に多く、食道では特に高値を示し胃では低値を示した。各粘膜で **mBD-3** の遺伝子発現量が異なる要因の一つに、粘膜構造の違いが考えられた。食道および歯肉は重層扁平上皮で構成されるのに対し、胃は単層円柱上皮で構成されており、他の粘膜と異なり酸性環境下にある。ヒトでは、食道で **hBD-2** の遺伝子発現量が多く、胃では微量であるという報告があり [33]、**hBD-2** のホモログが **mBD-3** であることから、マウスでは **mBD-3** の発現が食道に多く、胃では少ないという本研究結果と一致していた。またヒトの口腔粘膜では、**hBD-2** が感染防御における重要な因子であるとの報告 [21] があり、マウスの食道、歯肉においても **mBD-3** が感染防御因子としての役割が大きいことが考えられた。一方、胃では **mBD-3** 以外の因子が中心となり感染防御因子として機能しているのではないかと考えられた。さらに、マウスの食道は歯肉と同様に角化しており、食道、歯肉を構成する角化重層扁平上皮は細菌感染などの刺激に対し強固な物理的バリア機能を有する。しかしながら食道の角化層は歯肉と比較し薄いため、食道は歯肉と比較し物理的バリア機能が劣ると考えられる。そのため、食道では歯肉と比較し **mBD-3** の化学的バリアが感染防御に重要な因子であり、**mBD-3** の発現量が高値であるのではないかと推察された。以上のことから、上部消化管では粘膜環境の違いにより **mBD-3** の遺伝子発現量が異なり、特に食道での感染防御には **mBD-3** が重要な役割を担うことが示唆された。

次に、ストレスが上部消化管の **mBD-3** 遺伝子発現に与える影響を調べるためストレス負荷実験を行い、**Real-time PCR** で各粘膜の遺伝子発現量を測定した。**Stressed** 群ではマウスへの拘束ストレス負荷により、食道の **mBD-3** の遺伝子発現量が有意に低下した。**Aberg** ら [11] は、ストレス負荷により皮膚の **mBD-3** 発現が有意に低下し、さらに細菌感染を重症化させると報告しており、ストレスが食道での **mBD-3** の発現を低下させたという本研究の結果と一致していた。しかしながら歯肉、胃においてはストレスによる **mBD-3** 発現の低下を認めなかった。よってマウスでは歯肉や胃と比較し、食道でストレスによる影響を受けやすいことが考えられた。また、食道ではストレスが遺伝子レベルで **mBD-3** の発現を低下させ、粘膜の感染防御に悪影響を与える可能性があることが分かった。

食道粘膜での免疫組織化学染色では、**Non-stressed** 群で **mBD-3** のタンパク発現が認められたが、**Stressed** 群では認められなかった。よって食道では、ス

トレス負荷により mBD-3 のタンパク発現が低下したと言える。また mBD-3 タンパクの局在は食道粘膜上皮の角化層でのみ観察された。β-defensin は菌肉では角化層に貯留して機能すると報告されており [37]、本実験においては食道での mBD-3 タンパクも角化層に貯留していると考えられた。以上のことより、マウスの食道粘膜では mBD-3 タンパクは角化層に局在し、ストレスにより mBD-3 のタンパク発現が低下することが明らかとなった。

食道粘膜での *in situ hybridization* では、Stressed 群では Non-stressed 群と比較し mBD-3 の遺伝子発現が低下した。よって Real-time PCR での解析結果と同様、*in situ hybridization* においても、ストレスが mBD-3 の遺伝子発現を低下させることが明らかとなった。また、免疫組織化学染色では mBD-3 のタンパク発現が角化層に認められたのに対し、*in situ hybridization* では mBD-3 の遺伝子発現は基底細胞層や有棘細胞層で認められた。Dale ら [38] は菌肉の β-defensin について、上皮内での遺伝子とタンパクの局在は異なると報告しており、食道においても基底細胞層で産生された β-defensin がタンパクとして角化層に貯留することにより粘膜上皮の第一線で感染防御因子としての機能を発揮するのではないかと考えられた。以上の結果より、食道粘膜ではストレスが mBD-3 の遺伝子発現、タンパク発現の両者を低下させることが明らかとなった。

さらにストレスで増加した GC が、食道の mBD-3 遺伝子発現に与える影響を調べるためデキサメタゾンの全身投与を行い、Real-time PCR によって mBD-3 の遺伝子発現量を測定した。Untreated 群と比較し Treated 群では、mBD-3 の遺伝子発現量が有意に低下した。生体にストレスが負荷されると、まず HPA 系が活性化され内因性の GC が分泌される。さらに増加した GC が粘膜や皮膚のバリア機能を低下させることが多く報告されている [39-41]。これらの研究には GC としてデキサメタゾンが使用されていることが多く、合成ステロイドであるデキサメタゾンは GC として免疫能の低下などの作用を有する。またデキサメタゾンの全身投与により、マウスの皮膚においても mBD-3 の発現が低下し、さらにデキサメタゾンの機能を抑制、または遮断することにより mBD-3 の発現が正常化したとの報告がある [11]。したがって本研究においても、ストレス負荷によりマウス体内での糖質コルチコイドが増加し、糖質コルチコイドの増加が食道での mBD-3 発現に影響を及ぼし、結果的に mBD-3 の遺伝子発現量が低下したと考えられた。今後は、各粘膜での GC レセプターの発現解析などを行って詳細を明らかにしていきたい。

おわりに

本研究では、糖尿病マウスの上部消化管粘膜において、食道は歯肉、胃と比較し mBD-3 の遺伝子発現量が非常に多いという特徴を明らかにした。さらに、食道ではストレス負荷により mBD-3 の遺伝子発現、タンパク発現が低下し、これと同様に GC の全身投与においても mBD-3 の遺伝子発現が低下することが明らかとなった。これらの結果より、ストレスにより増加した GC が、mBD-3 の発現を低下させる可能性が示された。今後は各粘膜での GC レセプターの発現や血糖値と mBD-3 発現との関連についても明らかにしたい。

結語

本研究により、上部消化管粘膜での mBD-3 の発現やストレス、GC による影響を明らかにした。

謝辞

本研究を進めるにあたり御指導いただいた本学の草間幹夫先生、神部芳則先生に心から感謝致します。

引用文献

- [1] Meddings JB, Swain MG. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 2000;119:1019–1028.
- [2] Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005;54:1481–1491.
- [3] Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 2005;19:3–11.
- [4] Marucha PT, Kiecolt-Glaser JK, Favagehi M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosom Med* 1998;60:362–365.
- [5] Ebrecht M, Hextall J, Kirtley LG, Taylor A, Dyson M, Weinman J. Perceived stress and cortisol levels predict speed of wound healing in healthy male adults. *Psychoneuroendocrinology* 2004;29:798–809.
- [6] Horan MP, Quan N, Subramanian SV, Strauch AR, Gajendrareddy PK, Marucha PT. Impaired wound contraction and delayed myofibroblast differentiation in restraint-stressed mice. *Brain Behav Immun* 2005;19:207–216.
- [7] Gudeman SK, Wheeler CB, Miller JD, Halloran LG, Becker DP. Gastric secretory and mucosal injury response to severe head trauma. *Neurosurgery* 1983;12:175–179.
- [8] Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R. Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet* 1995;346:1194–1196.
- [9] Martin-Ezquerria G, Man MQ, Hupe M, Rodriguez-Martin M, Youm JK, Trullas C, Mackenzie DS, Radek KA, Holleran WM, Elias PM. Psychological stress regulates antimicrobial peptide expression by both glucocorticoid and α -adrenergic mechanisms. *Eur J Dermatol* 2011;2(Suppl 2):S48–S51.
- [10] Choi EH, Brown BE, Crumrine D, Chang S, Man MQ, Elias PM, Feingold KR. Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol* 2005;124:587–595.
- [11] Aberg KM, Radek KA, Choi EH, Kim DK, Demerjian M, Hupe M, Kerbleski J, Gallo RL, Ganz T, Mauro T, Feingold KR, Elias PM. Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide

- expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3339–3349.
- [12] Choi EH, Demerjian M, Crumrine D, Brown BE, Mauro T, Elias PM, Feingold KR. Glucocorticoid blockade reverses psychological stress-induced abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R1657–R1662.
- [13] Denda M, Tsuchiya T, Elias PM, Feingold KR. Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R367–R372.
- [14] Goodson WH 3rd, Hung TK. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res* 1977;22:221–227.
- [15] Bader MS. Diabetic foot infection. *Am Fam Physician* 2008;78:71–79.
- [16] Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3952–3956.
- [17] Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 2002;14:96–102.
- [18] Diamond G, Beckloff N, Ryan LK. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J Dent Res* 2008;87:915–927.
- [19] Diamond G, Ryan L. Beta-defensins: what are they really doing in the oral cavity? *Oral Dis* 2011;17:628–635.
- [20] Bals R, Wang X, Meegalla RL, Wattler S, Weiner DJ, Nehls MC, Wilson JM. Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. *Infect Immun* 1999;67:3542–3547.
- [21] Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T. Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease. *Med Mol Morphol* 2007;40:179–184.
- [22] Denda M, Tsuchiya T, Hosoi J, Koyama J. Immobilization-induced and crowded environment-induced stress delay barrier recovery in murine skin. *Br J Dermatol* 1998;138:780–785.
- [23] Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, Ding W, Granstein RD. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol* 2001;117:309–317.
- [24] Garg A, Chren MM, Sands LP, Matsui MS, Marenus KD, Feingold KR,

- Elias PM. Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders. *Arch Dermatol* 2001;137:53–59.
- [25] Anai M, Funaki M, Ogihara T, Kanda A, Onishi Y, Sakoda H, Inukai K, Nawano M, Fukushima Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high-fat-fed rats. *Diabetes* 1999;48:158–169.
- [26] Nojima K, Ikegami H, Fujisawa T, Ueda H, Babaya N, Itoi-Babaya M, Yamaji K, Shibata M, Ogihara T. Food hardness as environmental factor in development of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;74:1–7.
- [27] Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T, Sato S. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontal Res* 2006;41:527–534.
- [28] Saruta J, Lida M, Kondo Y, To M, Hayashi T, Hori M, Sato S, Tsukinoki K. Chronic stress induces neurotrophin-3 in rat submandibular gland. *Yonsei Med J* 2012;53:1085–1092.
- [29] Kao JS, Fluhr JW, Man MQ, Fowler AJ, Hachem JP, Crumrine D, Ahn SK, Brown BE, Elias PM, Feingold KR. Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities. *J Invest Dermatol* 2003;120:456–464.
- [30] To M, Kamata Y, Saruta J, Shimizu T, Sato T, Kondo Y, Hayashi T, Hamada N, Tsukinoki K. Induction of β -Defensin Expression by Porphyromonas gingivalis-Infected Human Gingival Graft Transplanted in nu/nu Mouse Subdermis. *Acta Histochem Cytochem* 2013;46:25-34.
- [31] Kondo Y, Saruta J, To M, Shiiki N, Sato C, Tsukinoki K. Expression and Role of the BDNF Receptor-TrkB in Rat Adrenal Gland under Acute Immobilization Stress. *Acta Histochem Cytochem* 2010;43:139-47
- [32] Saruta J, Fujino K, To M, Tsukinoki K. Expression and localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in human submandibular gland. *Acta Histochem Cytochem* 2012;45:211-8
- [33] Hosaka Y, Koslowski M, Nuding S, Wang G, Schlee M, Schäfer C, Saigenji K, Stange EF, Wehkamp J. Antimicrobial host defense in the upper gastrointestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:1151–1158.
- [34] Shibata M, Yasuda B. New experimental congenital diabetic mice (N.S.Y. mice). *Tohoku J Exp Med* 1980;130:139–142.

- [35] Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7036–7041.
- [36] Saruta J, Kondo Y, Sato C, Shiiki N, Tsukinoki K, Sato S. Salivary glands as the source of plasma brain-derived neurotrophic factor in stressed rats engaged in biting behavior. *Stress* 2010;13:238–247.
- [37] Abiko Y, Suraweera AK, Nishimura M, Arakawa T, Takuma T, Mizoguchi I, Kaku T. Differential expression of human beta-defensin 2 in keratinized and non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch* 2001;438:248–253.
- [38] Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* 2001;36:285–294.
- [39] Gomez-Merino D, Drogou C, Chennaoui M, Tiollier E, Mathieu J, Guezennec CY. Effects of combined stress during intense training on cellular immunity, hormones and respiratory infections. *Neuroimmunomodulation* 2005;12:164–172.
- [40] Kiank C, Holtfreter B, Starke A, Mundt A, Wilke C, Schütt C. Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun* 2006;20:359–368.
- [41] Cacioppo JT, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Laskowski BF, Rozlog LA, Poehlmann KM, Burleson MH, Glaser R. Autonomic and glucocorticoid associations with the steady-state expression of latent Epstein-Barr virus. *Horm Behav* 2002;42:32–41