

氏名	かわしま りえ 川嶋 理恵
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 444 号
学位授与年月日	平成 26年 3月 19日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	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～
論文審査委員	(委員長) 教授 野田 泰子 (委員) 准教授 小宮根 真弓 講師 藤原 研 教授 林 俊治

論文内容の要旨

1 研究目的

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があり、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。また近年、全身疾患を有する患者の割合は増加傾向にあり、特に糖尿病は免疫能が低下し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。 β -defensin は上皮細胞から産生される抗菌ペプチドで、ヒトやマウスの様々な器官に存在する。また粘膜や皮膚では上皮の第一線で自然免疫として機能している。皮膚では、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 Mouse β -defensin-3(mBD-3)発現が低下するとの報告があり、 β -defensin とストレスの関連性が示唆されている。しかしながら、上部消化管粘膜における β -defensin の発現と、ストレスや GC との関連は明らかにされていない。したがって本研究の目的は、2型糖尿病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 の発現に対するストレスや GC の影響を明らかとすることとした。

2 研究方法

実験動物には2型糖尿病モデルマウスである NSY/Hos のオスを使用し、給餌として30%の蔗糖水、高脂肪食を与えた。ストレス実験には27週齢のマウスを使用し、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。ストレス負荷は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。採取した血液を用いて血糖値と血漿コルチコステロン値を測定し、歯肉、食道、胃については Real-time PCR で mBD-3 の遺伝子発現量を測定した。また、食道については免疫組織化学染色を行い mBD-3 のタンパク発現やその局在を調べ、さらに in situ hybridization を行い mBD-3 の遺伝子発現やその局在を調べた。GC の全身投与実験では、26週齢のマウスを使用し、計8匹のうち4匹は Treated 群としてデキサメタゾンの全身投与を行い、残り4匹

は Untreated 群とした。Treated 群では、デキサメタゾン (450 μ g/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。その後食道を摘出し、Real-time PCR で mBD-3 の遺伝子発現量を調べた。

3 研究成果

マウスへの拘束ストレス負荷により血漿コルチコステロン値は有意に上昇した。血糖値は、Non-stressed 群と比較し Stressed 群では増加したものの、両群間に有意差は認められなかった。上部消化管粘膜での mBD-3 の遺伝子発現量は、食道、歯肉、胃の順に多く、各群間で有意差を認めた ($P < 0.05$)。食道では、ストレス負荷により mBD-3 の遺伝子発現量が有意に低下した ($P < 0.05$)。歯肉、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られなかった。免疫組織化学染色により、食道では Non-stressed 群の角化層に mBD-3 のタンパク発現を認めた。Stressed 群ではタンパク発現は認められなかった。In situ hybridization により、食道では Non-stressed 群の基底細胞層に mBD-3 の遺伝子発現が強く認められた。Stressed 群では基底細胞層に弱い遺伝子発現を認めた。GC の全身投与により、食道では mBD-3 の遺伝子発現量が有意に低下した ($P < 0.05$)。

4 考察

血糖値は Stressed 群では平均 296 mg/dl であり、Non-stressed 群の 236mg/dl と比較し高値であったが有意差は認められなかった。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いることから、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のではないかと考えられた。NSY/Hos の血糖値は約 150mg/dl 前後であるという報告と比較し、本実験では高い血糖値を示す糖尿病マウスの確立が可能であった。血漿コルチコステロン値は、ストレス負荷により有意に上昇した。以上のことから、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。

mBD-3 の遺伝子発現量は、歯肉、食道、胃を比較すると食道で高値を示し、胃では低値を示した。上部消化管粘膜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。

マウスへの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。しかしながら歯肉、胃ではストレスによる mBD-3 発現の低下を認めなかった。よって、mBD-3 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と考えられ、ストレスが mBD-3 の発現を遺伝子レベルで低下させ、粘膜の感染防御に悪影響を与えることが示唆された。食道粘膜での免疫組織化学染色では、ストレス負荷により mBD-3 のタンパク発現が低下した。また mBD-3 のタンパク発現は食道粘膜上皮の角化層でのみ認められた。 β -defensin は角化層に貯留して感染防御として機能すると報告されており、これらの結果から食道においても mBD-3 タンパクは角化層に貯留していると考えられた。以上のことより、マウスの食道では mBD-3 タンパクは角化層に局在しており、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、ストレス負荷により Stressed 群により 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、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と顆粒細胞層で認められた。よって食道では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。以上の結果から、食道では mBD-3 はタンパクとして角化層に貯留する一方で、ストレスにより mBD-3 の遺伝子および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。

GC の全身投与により、食道での mBD-3 の遺伝子発現は有意に低下した。生体にストレスが負荷されると GC が分泌され、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。以上の結果から、ストレス負荷によりマウス体内での GC が増加し、GC 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。

5 結論

糖尿病マウスの上部消化管粘膜では、食道では歯肉、胃と比較し mBD-3 の遺伝子発現量が非常に多いことが明らかとなった。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した。以上の結果より、ストレスにより増加した GC が食道での mBD-3 の発現を低下させると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、粘膜上皮から分泌され感染防御に関わる抗菌ペプチド beta-defensin に着目し、ストレス下での粘膜上皮での発現を解析した。感染防御能が低下しているとされる 2 型糖尿病モデルマウスに脂質糖質負荷をおこない、高血糖下で拘束ストレスをかけ、消化管上皮上の beta-defensin-3 (BD3) の発現低下を RNA および蛋白レベルで明らかにした。また glucocorticoid (GC) の増減がこれと相関し、補充により BD3 の発現が低下することも示した。

1. ストレス負荷により、血糖値には有意な上昇はなく、血漿コルチコステロン値が増加した。
2. BD3 は、Real-time PCR で調べた上部消化管粘膜のうち食道で高値を示し、口腔粘膜や胃では発現が少なく、ストレス負荷後は食道にて有意に低下した。
3. BD3 の食道での免疫染色と in situ hybridization でそれぞれ粘膜角化層、顆粒層での発現がみられた。
4. GC の全身投与により、BD3 の食道での低下が確認できた。

本研究は、これまで感染に際し増加することが報告されてきた BD3 が、ストレスにより低下することを明らかにしており、臨床的にも意義を有すると考えられる。内容はすでに国際

英文誌である Yonsei Medical Journal (55:387-394, 2014) に掲載されており、博士（医学）の学位に十分な質を有している。

しかしながら、以下の点は修正を要すると思われる。

1. 本論文のタイトルは『ストレス環境下における上部消化管粘膜での mouse beta-defensin-3 の発現』であり、この実験が高血糖のマウスにておこなったことが明確でない。サブタイトルとして、DM モデルマウスにおける検討を付加することが望ましい。
2. 食道組織の in situ hybridization にて、画像の解像度が低く、また研究者の指摘する顆粒層での増加は明確でない。画像については、紙質に問題がありそうなので、高画質印画紙によってプリントアウトし、各層の名称についてもあらためて検討すること。
3. 『はじめに』の章末において、高血糖存在下で実験をおこなうことになった経緯が不明である。説明を加えること。
4. 『考察』における胃での細菌感染との関連についての記述は、げっ歯類では胃酸の分泌が感染防御に充分でない等の見地からあてはまらない。特に本論と直接関連のない議論なので削除する。
5. また、食道ではストレスが BD3 の発現を遺伝子レベルで低下させ、粘膜の感染防御に悪影響を与えることが示唆された、という記述は、本研究の論証では不十分であり、控えめな論調に変更する。GC の直接作用についても不明であり、今後 GC リセプターの発現を調べる等の追加実験が必要であると記す。
6. 『おわりに』についても、論調をトーンダウンするとともに、臨床における感想を述べているパラグラフについては削除する。
7. その他、細かい表記上の不統一を訂正する。

以上の点を修正した改訂版を審査委員が確認し、論文審査合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおりにより発表を行った。発表は大変に分かりやすく、時間もほぼ予定どおりであった。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査員からは以下のような質問およびコメントが出された。

1. mBD3 が hBD2 のホモログというがどの程度類似しているのか。
2. 高血糖でないマウスでの知見はどうか。
3. げっ歯類では食道については人と異なり角化が見られる。顆粒層という記載は正確か。
4. 食道の染色では、部位による違いはなかったのか。In situ hybridization では、コントロールと粘膜の厚さが異なるが、ストレスにより粘膜が薄くなることはあるのか。
5. なぜ抗菌ペプチドのうち BD3 に着目したのか。ノックアウトの報告はあるのか。易感染性への寄与はどの程度あると考えられているのか。

申請者はいずれの質問に対しても的確に返答し、有意義な discussion が行われた。発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。