



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the Function of α -Defensin, Paneth cell-secreted Antimicrobial Peptide, as a Regulator of Intestinal Ecological System under Psychological Stress [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	鈴木, 康介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14663号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83597
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kosuke_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 鈴 木 康 介

学 位 論 文 題 名

Study on the Function of α -Defensin, Paneth cell-secreted Antimicrobial Peptide,
as a Regulator of Intestinal Ecological System under Psychological Stress
(心理ストレス下における腸内エコロジーシステム制御因子としての
Paneth 細胞分泌抗菌ペプチドである α -defensin 機能に関する研究)

【背景】

ヒトの腸管内腔には 1×10^{14} 個以上の細菌が生息し、宿主と調和して正常な腸内細菌叢を形成し、腸管の恒常性維持に貢献している。小腸陰窩に存在する Paneth 細胞が分泌する α -defensin は、自然免疫の主要なエフェクター因子であり、病原体を殺傷する一方で常在菌に対しては殺菌作用を弱めることで、腸内の排除と共生の両方に重要な役割を果たしている。 α -defensin の分泌異常による dysbiosis は様々な疾患との関連が示されており、 α -defensin は腸内細菌叢やその代謝物を制御することで、全身の恒常性維持に貢献している。

うつ病は大きな社会的損失をもたらす重篤な疾患である。うつ病の発症には、モノアミン系神経伝達物質の減少をはじめ複数の要因が関与しているが、中でも、心理的ストレスは重要な因子と考えられている。近年では腸内細菌叢とうつ病との関係が研究され、心理的ストレスは dysbiosis とそれに伴う腸内代謝物の恒常性破綻を引き起こし、うつ病の発症や増悪に寄与していることが報告されている。しかしながら、心理的ストレスによる腸内エコシステム破綻のメカニズムはまだ解明されていない。

本研究では、心理的ストレスによるうつ病モデルである社会敗北ストレスモデルマウスを用いて、心理的ストレスによる dysbiosis や腸内代謝物の構成異常と Paneth 細胞が分泌する α -defensin の関係解明を目的とする。

【方法】

慢性的社会敗北ストレス (Chronic Social Defeat Stress; CSDS) モデル作製のため、アクリル板で 2 区画に仕切られたケージにおいて、C57BL/6J マウスとストレッサーマウスを同じ区画に入れる直接接触と別区画に入れる間接触を繰り返すことで社会敗北ストレスを与え、社会性を評価するために行動解析 (ICR マウスとの Interaction time) を行った。腸内への α -defensin 分泌を評価するために糞便中のマウス α -defensin である Cryptdin-1 (Crp1) を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法で測定し、Paneth 細胞数および顆粒面積を評価するために、Crp1 抗体を用いて小腸の免疫蛍光染色解析を行った。CSDS モデルにおける腸内細菌叢および腸内代謝物変化を解析し、さらに α -defensin 分泌との関係を解析するため、CSDS モデルにマウス α -defensin である Cryptdin-4 (Crp4) を $250 \mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ で 32 日間 1 日 1 回経口投与し、naïve 群、CSDS 群、CSDS+Crp4 投与群 (Crp4 群) の 3 群間で解析を行った。マウス糞便の腸内細菌叢解析には 16S rDNA メタゲノム解析を用い、腸内メタボローム解析には CE-TOFMS を用いた。

【結果】

1. CSDS の負荷は Paneth 細胞を減少させ、 α -defensin 分泌を低下させる

CSDS 負荷はマウスの行動解析における Interaction time を減少させ、CSDS モデルに特徴的な社会性の減少が確認された。糞便中 Crp1 量の naive 群 day1 に対する比は、ストレス負荷 9 日目では 33% ($p=0.004$) に、ストレス負荷 14 日目では 45% ($p=0.037$) に有意に減少した。また、ストレス負荷 14 日において小腸の Paneth 細胞数および Crp1⁺顆粒面積の減少が認められ、CSDS 負荷は Paneth 細胞数を減少させることで、腸内への α -defensin 分泌を減少させることが明らかとなった。

2. CSDS による α -defensin 分泌低下は dysbiosis を引き起こし、 α -defensin 投与により改善する

腸内細菌叢の β 多様性は、naive 群と CSDS 群 ($p=0.027$) および CSDS 群と Crp4 群 ($p=0.037$) では有意に異なっていたが、一方で naive 群と Crp4 群では有意差がなかった。また、ストレス負荷前後で各群の腸内細菌叢を比較すると、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門、*Deferribacteres* 門において CSDS 負荷による特徴的な菌占有率の変化が α -defensin 投与によりキャンセルされた。さらに、 α -defensin 量と腸内細菌叢の相関解析を行ったところ、*Ruminococcaceae* 科 (属: unknown)、*Allobaculum* 属、*Sutterella* 属、*Akkermansia* 属は α -defensin と有意な正の相関を示し、*Erysipelotrichaceae* 科 (属: unknown) と有意な負の相関を示すことが明らかとなった。従って、CSDS 負荷に起因する α -defensin 分泌低下によって dysbiosis が起こり、 α -defensin の投与によって腸内細菌叢が正常群に近づくことが明らかとなった。

3. CSDS による α -defensin 分泌低下は腸内代謝物の構成異常を引き起こし、 α -defensin 投与により改善する

メタボローム解析により同定された 322 種類の腸内代謝物と α -defensin の相関解析を行ったところ、アミノ酸やビタミン類を含む 39 種類の代謝物が α -defensin と有意な正または負の相関を認めた。pyridoxamine を含む 22 種類の代謝物は α -defensin と相関のあった腸内細菌の少なくとも一つと有意な正または負の相関を認め、その内 pyridoxamine、pyridoxamine-5 phosphate、 β -alanine、3-aminobutyric acid、1H-imidazole propionic acid は CSDS 群と比較して Crp4 群で増加した。また、 α -defensin とは相関するが、 α -defensin と相関のある腸内細菌とは相関を認めない代謝物の内、lysine、pantothenic acid、thiamine phosphate は CSDS 群と比較して Crp4 群で増加し、Glutamic acid および uracil は naive 群と比較して CSDS 群で有意に低下し、CSDS 群と比較して Crp4 群で増加した。一方で、上記代謝物は naive 群と Crp4 群では有意な変化が認められなかった。以上より、CSDS による α -defensin 分泌低下は dysbiosis を介して腸内代謝物の構成異常を引き起こし、 α -defensin 投与によって一部正常群と同程度まで回復することが明らかとなった。

【結論】

本研究は心理ストレスによるうつ病モデルである CSDS モデルを用いた解析により、心理ストレスによる dysbiosis およびそれに伴う腸内代謝物の構成異常が α -defensin 低下に関連するものであることを示し、さらに α -defensin の投与により一部正常群と同程度まで改善することを初めて証明した。本新知見はうつ病発症メカニズムの解明に貢献し、予防や治療ターゲットの発見に大きく貢献する。