

氏名(本籍)	藪添敦史(和歌山県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第264号		
学位授与年月日	平成20年9月12日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	東京農工大学		
学位論文題目	表皮細胞接着蛋白デスモグレインに関する研究		
審査委員	主査	東京農工大学	教授 岩崎利郎
	副査	帯広畜産大学	教授 松井高峯
	副査	岩手大学	教授 安田 準
	副査	東京農工大学	教授 白井淳資
	副査	岐阜大学	教授 深田恒夫

論文の内容の要旨

デスモグレインは表皮ケラチノサイト表面に発現する、デスモゾームを構成するカドヘリン型の細胞膜貫通型接着蛋白である。犬やヒトではデスモグレインを標的とする自己免疫性疾患が存在し、きわめて難治性であるためにヒトおよび犬で研究が進められているが、その詳細はいまだによく知られていない。

落葉状天疱瘡(PF)はヒトや動物で発生する自己免疫性皮膚疾患である。病理組織学的には角層下あるいは表皮上層での水疱形成が特徴的で、水疱内への炎症細胞浸潤は乏しい。犬PFはヒトと類似しているが、臨床および病理学的に膿疱を形成することが特徴であり、膿疱内容物は好中球が中心である。ヒトPFの自己抗原はデスモソーム蛋白であるデスモグレイン(Dsg)1であることが証明されているが、犬PFでは自己抗原は完全に解明されていない。また、ヒトおよび犬PF患者抗体は新生仔マウスの表皮細胞間接着を障害し、天疱瘡と同様の水疱形成を誘導することが過去に報告されている。しかし、犬PFの好中球浸潤の病態関与に関する報告は為されていない。また、ヒトPF病変部の電子顕微鏡学的所見は報告されているが、犬PFに関しては報告されていない。本研究の目的は犬PFの形態学的変化および自己抗原の微細局在を電子顕微鏡学的に検索することであった。

最初の章では犬PF病変部の微細変化を観察するために病変部を電子顕微鏡的に観察している。その結果、棘融解細胞周囲に好中球が接着し、棘融解細胞に形成された半割デスモソーム構造が好中球と接触していた。半割デスモソーム構造は好中球との接触部位においてのみ観察されたことや、遊離する途中の棘融解細胞と隣接する表皮角化細胞の接点に好中球が浸潤し、半割デスモソーム構造が形成されていた。また、有棘層において、表皮角化細胞のトノフィラメントがデスモソームのアタッチメントプラークから解離し核周囲に凝集し、デスモソームが減少している像が全ての症例で観察され、この部位には好中球は接着していな

かった。以上の結果から、両者の所見は異なる現象を示していることと考え、犬 PF の病態形成には好中球浸潤と他の要素の 2 種類以上の作用が関わっていることを示唆している。

次に、犬 PF 血清中抗体を特異的に検出できる MCA-B1 細胞を基質に包埋前染色を実施している。犬 PF 血清中に抗 Dsg1 抗体が含まれるかどうかを確認する目的で、組換えイヌ Dsg1 蛋白を用いて免疫沈降・免疫プロット法を実施した。成熟した組換えイヌ Dsg1 蛋白に対する抗体は検出されなかった。この犬 PF 血清を使用して包埋前染色法を行い、犬 PF 血清中抗体を隣り合う MCA-B1 細胞の細胞突起接触部位に検出した。完全に形成されたデスモソーム構造の細胞間領域には抗体結合は観察していないが、抗体が狭い細胞間へ浸透しにくいという包埋前染色法の短所を原因と考えた。そこで、デスモソーム蛋白を標的とするヒト PF 血清中抗体を指標として、ヒトおよび犬 PF 抗体の二重染色を実施したところ、犬 PF 抗体結合部位はヒト PF 抗体結合部位と同じ部位に局在した。使用したヒト PF 血清中抗体は免疫沈降・免疫プロット法にて組換えイヌ Dsg1 と反応することから、犬 PF 抗体はデスモソーム蛋白に結合している可能性を示唆した。

最後に、犬 PF 血清中抗体の正常皮膚組織中の抗体結合部位の微細局在を包埋後染色法を用いて検討した。犬 PF3 例を反応させたところ 1 例のみでデスモソーム領域に対する特異的な反応を認めている。その抗体はデスモソームに特異的に結合し、細胞外領域および細胞内領域の両方と結合した。以上の結果より本症例の血清中抗体は Dsg1 以外のデスモソーム蛋白を標的としている可能性を推察している。

本研究では、犬 PF 病変部を電子顕微鏡的に観察することにより、犬 PF の病態には好中球浸潤と他の要素の 2 種類以上の作用が関わっている可能性を示唆し、免疫電顕法を行うことにより、犬 PF 抗体結合部位の微細局在はヒト PF 抗体と同じであることを発見している。また、1 例のみではあるが、正常犬皮膚組織のデスモソームに特異的に結合する抗体が検出されたことから、犬 PF にはデスモソーム蛋白を認識する抗体が含まれることも併せて報告した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は犬の落葉状天疱瘡 (PF) の病態をはじめて微細構造学的に観察し、さらにヒトで自己抗体の標的疾患とされている表皮細胞接着蛋白デスモグレイン (Dsg) の関与について免疫電子顕微鏡学的に研究したものである。

PF は表皮に水疱、膿疱やびらんなどを形成する自己免疫性皮膚疾患であり、犬 PF は臨床および病理学的に好中球性膿疱を形成することが特徴であるが、好中球が病態形成に影響があるかどうかは不明であるため、犬 PF 病変部の微細構造学的変化を確認する目的で膿疱形成部位を電子顕微鏡にて観察している。棘融解細胞周囲に好中球が接着し、棘融解細胞に形成された半割デスモソーム構造が好中球と接触していたのを観察した。また有棘層に表皮角化細胞のトノフィラメントがデスモソームのアタッチメントプラークから解離し核周囲に凝集し、デスモソームが減少している像が全ての症例で観察されている。以上の結果から、犬 PF の病態形成には好中球浸潤と他の要素の 2 種類以上の作用が関わっている可能性を示した。

ヒト PF では自己抗原はデスモソーム蛋白であるデスモグレイン (Dsg) 1 であることが明らかにされているが、犬 PF の自己抗原は完全に解明されていない。そこで、犬 PF 抗原の微細局在を決定する目的で、2 種類の免疫電顕法を用いて

研究を行っている。犬 PF 血清中抗体を特異的に検出できる MCA-B1 細胞を基質に包埋前染色を実施している。使用した犬 PF 患者血清と組換えイヌ Dsg1 蛋白を用いた免疫沈降・免疫ブロット法では成熟イヌ Dsg1 に対する抗体は検出されていない。この犬 PF 血清を使用して包埋前染色法を行ったところ、犬 PF 血清中抗体は隣り合う MCA-B1 細胞の細胞突起接触部位に結合した。また、ヒト PF 血清と犬 PF 血清との二重染色では犬 PF 抗体結合部位はヒト PF 抗体結合部位と同じ局在を示した。さらに犬 PF 血清中抗体の正常皮膚組織中の抗体結合部位の微細局在を包埋後染色法を用いて検討している。犬 PF3 例中 1 例のみでデスモソーム領域に対する特異的な反応が認められている。

以上の結果から犬 PF の病態形成には好中球浸潤と他の要素の 2 種類以上の作用が関わっている可能性を示した。また、犬 PF 抗体結合部位はヒト PF と共局在し、1 例でデスモソーム領域に結合する抗体が検出されたことから、犬 PF 抗体結合部位はデスモソームであることを示した。本研究の知見は犬 PF の病態解明および犬 PF 抗原同定に不可欠な基盤になると認めた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があるものと認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 Neutrophils contact to plasma membrane of keratinocytes including desmosomal structures in canine pemphigus foliaceus
著 者 名 Yabuzoe, A., Nishifuji, K., Sekiguchi, M., Shimizu, A., Momoi, Y., Ishiko, A. and Iwasaki, T.
学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年：印刷中

既発表学術論文

- 1) 題 目 Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals
著 者 名 Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M. and Sata, T.
学術雑誌名 Acta Neuropathologica
巻・号・頁・発行年：109(3): 263-271, 2005
- 2) 題 目 Species-specificity of a panel of prion protein antibodies for the immunohistochemical study of animal and human prion diseases
著 者 名 Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M. and Sata, T.
学術雑誌名 Journal of Comparative Pathology
巻・号・頁・発行年：136(1): 9-17, 2007

- 3) 題 目 多形紅斑の犬の3例
著 者 名 小林哲郎, 小林由美子, 直井昌之, 藪添敦史, 関口麻衣子,
桃井康行, 岩崎利郎
学術雑誌名 獣医臨床皮膚科
卷・号・頁・発行年 : 13(1): 27-31, 2007
- 4) 題 目 ミニチュア・ダックスフントにみられた角層下膿疱症の1
例
著 者 名 藪添敦史, 竹田浩一, 小林由美子, 小林哲郎, 関口麻衣子,
岩崎利郎
学術雑誌名 獣医臨床皮膚科
卷・号・頁・発行年 : 13(3):149-152, 2007