

氏名(本(国)籍)	柴田早苗(岐阜県)		
主指導教員名	岐阜大学 教授 深田恒夫		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第312号		
学位授与年月日	平成22年3月15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	岐阜大学		
学位論文題目	Studies on Regulatory Mechanism of CCL17/TARC Transcription on Canine Keratinocytes (イヌケラチノサイトにおける CCL17/TARC 転写メカニズムに関する研究)		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	鬼頭克也
	副査	帯広畜産大学 教授	猪熊 壽
	副査	岩手大学 教授	安田 準
	副査	東京農工大学 教授	岩崎 利郎
	副査	岐阜大学 教授	深田恒夫

論文の内容の要旨

ケモカインはさまざまな細胞から産生され、組織への白血球の遊走を特異的あるいは選択的に制御している。ケモカイン受容体は、ヘルパーT細胞のサブセットである Th1 細胞および Th2 細胞に特異的に発現している。Th1 細胞は CXCR3 および CCR5 を、Th2 細胞は CCR3 および CCR4 をそれぞれ発現しているが、これらのケモカイン受容体の中でも、CCR4 はアトピー性皮膚炎 (AD) 病変部における Th2 細胞の選択的浸潤に重要な役割を果たしていると考えられている。AD 患者の末梢血および皮膚病変部では、CD4 陽性細胞における CCR4 発現が増加しており、病勢に相関していることが報告されている。また、CCR4 陽性細胞の遊走は、CC ケモカインのひとつである CCL17/TARC によって誘導されることが明らかになっている。Kakinuma らは、血漿中の CCL17 レベルがヒト AD において増加していることに加え、病勢に相関していることを報告した。これらの結果から、CCR4 および CCL17 がヒト AD の病因として不可欠な役割を果たしていることが示唆された。

イヌにおいて、CCR4 および CCL17 遺伝子はそれぞれ 2001 年と 2002 年にクローニングされた。これらは主に AD 罹患イヌの皮膚病変部で発現していることが報告されている。加えて、イヌ AD における末梢血 CD4 陽性細胞中の CCR4 陽性細胞数は、健康なイヌより有意に高値を示した。これらの結果は、CCR4 および CCL17 はヒトだけでなくイヌにおいても AD の病因となることを示唆している。過去の研究により、イヌにおける CCL17 の主要産生細胞はケラチノサイトであることが報告されている。しかしながら、イヌケラチノサイトにおける CCL17 の発現誘導メカニズムは不明なままである。したがって本研究では、イヌケラチノサイトにおける CCL17 mRNA 転写の制御メカニズムを明らかにするために一連の研究を行った。

第2章では、イヌケラチノサイト細胞株であるCPEKの表現型解析を実施した。ケラチノサイトには、皮膚疾患において重要な役割を果たすと考えられる炎症性メディエーターを産生する能力がある。したがって、イヌケラチノサイト細胞株は *in vitro* でのケラチノサイト研究に有用であると考えられる。しかしながら、イヌケラチノサイト細胞株の表現型を適切に解析した報告はない。本章では、ケラチノサイトとの表現型の類似性を評価するために、成犬の表皮から分離された細胞株であるCPEKの表現型解析を行った。その結果、CPEKはサイトケラチン14、 α_6 インテグリンおよびPCNAといった基底層ケラチノサイトマーカーを発現していることが示された。今回の知見から、CPEKはADの病因に果たすケラチノサイトの役割を研究する上で有用な細胞株であることが示唆された。

第3章では、イヌケラチノサイトによるCCL17およびCCL28の誘導因子を同定するために、TNF- α 、IL-1 β あるいはIFN- γ による刺激後、CPEKにおけるCCL17およびCCL28 mRNA発現変化を検証した。ケラチノサイトは、さまざまな炎症性メディエーターを産生する。その中でもCCL17およびCCL28は、イヌADにおけるリンパ球の病変への遊走に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、イヌケラチノサイトにおいてCCL17およびCCL28転写の制御メカニズムは報告されていない。本章では、イヌケラチノサイトにおけるCCL17およびCCL28転写がTNF- α 、IL-1 β あるいはIFN- γ によって誘導されるかどうかを検証した。その結果、CCL17 mRNA転写はTNF- α のみによって誘導され、CCL28 mRNAレベルは全てのサイトカインによって増強されることが明らかになった。TNF- α 、IL-1 β あるいはIFN- γ といった炎症性サイトカインが、AD罹患イヌの皮膚病変部におけるCCL17およびCCL28産生にとっての重要な誘導因子であることが示唆された。

第4章では、CPEKにおけるTNF- α 介在性CCL17 mRNAの伝達経路を解明した。イヌケラチノサイトにおいて、CCL17 mRNA転写は主にTNF- α によって誘導される。しかしながら、その制御メカニズムは明らかにされていない。本章における研究目的は、イヌADのケモカインをターゲットとした治療法の開発を導くための、ケラチノサイトにおけるTNF- α 誘導性CCL17 mRNA転写の制御メカニズムを明らかにすることであった。CPEKにおいて、TNF- α による刺激はNF- κ Bの活性化のみならず、p38およびJNKのリン酸化を誘導した。ERKはTNF- α に影響されなかったが、恒常的なリン酸化を認めた。CCL17 mRNA転写レベルはp38阻害剤によって有意に減少し、JNK阻害剤やNF- κ B阻害剤には影響されなかった。驚いたことに、ERK阻害剤はCCL17 mRNAの転写レベルを増加させた。加えて、ERKの活性化を誘導するEGFは、CCL17 mRNA転写を抑制した。これらの結果は、CPEKにおけるTNF- α 誘導性CCL17 mRNA転写はp38によって正に、ERKによって負に調節されていることが示唆された。

本研究より、イヌケラチノサイトにおけるCCL17 mRNA転写は主にTNF- α によって誘導され、p38によって正に、ERKによって負に調節されると結論付けられる。今回の結果は、p38およびERKがイヌAD治療の標的分子となりうることを示唆している

審 査 結 果 の 要 旨

申請者はイヌケラチノサイトにおけるCCL17 mRNA転写の制御メカニズムを明らかにすることを目的に、一連の研究を実施した。まず初めに、*in vitro* 実験系を確立するために、イヌケラチノサイト細胞株であるCPEKの表現型解析を実施した。CPEKはサイトケラチン14、 α_6 インテグリンおよびPCNAといった基底層ケラチノサイトマーカーを発現していることが示された。今回の知見から、CPEKはADの病因に果たすケラチノサイトの役割を研究する上で有用な細胞株であることが示唆された。

次に、イヌケラチノサイトによるCCL17およびCCL28の誘導因子を同定するために、TNF- α 、IL-1 β あるいはIFN- γ による刺激後、CPEKにおけるCCL17およびCCL28 mRNA発現変化を検証した。CCL17 mRNA転写はTNF- α のみによって誘導され、CCL28 mRNAレベルは3種全てのサイトカインによって増強されることが明らかになった。以上より、TNF- α 、IL-1 β あるいはIFN- γ といった炎症性サイトカインが、AD罹患イヌの皮膚病変部

における CCL17 および CCL28 産生にとっての重要な誘導因子であることが示唆された。

最後に、CPEK における TNF- α 介在性 CCL17 mRNA のシグナル伝達経路を解明した。CPEK において、TNF- α による刺激は NF- κ B の活性化のみならず、p38 および JNK のリン酸化を誘導した。ERK は TNF- α に影響されなかったが、恒常的なリン酸化が認められた。CCL17 mRNA 転写レベルは p38 阻害剤によって有意に減少し、JNK 阻害剤や NF- κ B 阻害剤には影響されなかった。また、ERK 阻害剤は CCL17 mRNA の転写レベルを増加させた。加えて、ERK の活性化を誘導する EGF は、CCL17 mRNA 転写を抑制した。これらの結果から、CPEK における TNF- α 誘導性 CCL17 mRNA 転写は p38 によって正に、ERK によって負に調節されていることが示唆された。

以上の成績は、イヌケラチノサイトにおける CCL17 mRNA 転写は主に TNF- α によって誘導され、p38 によって正に、ERK によって負に調節されると結論付けられる。今回の結果は、p38 および ERK がイヌ AD 治療の標的分子となりうることを示唆している。

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と認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Phenotypic analysis for a cell line of canine epidermal keratinocytes

著 者 名 : Shibata, S., Maeda, S., Tsuchida, H., and Fukata, T.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 70(8): 853-855, 2008

2) 題 目 : Augmentation of CCL17 and CCL28 gene expression by TNF- α , IL-1 β , or IFN- γ in cultured canine keratinocytes

著 者 名 : Shibata, S., Maeda, S., Maeda, S., Chimura, N., Kondo, N. and Fukata, T.

学術雑誌名 : Research in Veterinary Science

巻・号・頁・発行年 : 2010(発表予定)

既発表学術論文

1) 題 目 : A new synbiotic consisting of *Lactobacillus casei subsp. casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cows

著 者 名 : Yasuda, K., Hashikawa, S., Sakamoto, H., Tomita, Y., Shibata, S. and Fukata, T.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 69(2):205-208, 2007

2) 題 目 : Expression analysis of CCL27 and CCL28 mRNA in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis

著 者 名 : Maeda, S., Tsuchida, H., Shibata, S., Kawakami, T., Tsukui, T., Ohba, Y., Fukata, T. and Kitagawa, H.

学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年： 70(1):51-55, 2008

3) 題 目： Acute renal insufficiency in cats after fosfomycin administration
著 者 名： Fukata, T., Imai, N. and Shibata, S.
学術雑誌名： Veterinary Record
卷・号・頁・発行年： 163(11):337-338, 2008

4) 題 目： Molecular cloning of canine protease-activated receptor-2 and its
expression in normal dog tissues and atopic skin lesion
著 者 名： Maeda, S., Maeda, S., Shibata, S., Chimura, N. and Fukata, T.
学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年： 71(5), 577-582, 2009

5) 題 目： House dust mite major allergen Der f 1 enhances proinflammatory
cytokine and chemokine gene expression in a cell line of canine
epidermal keratinocytes
著 者 名： Maeda, S., Maeda, S., Shibata, S., Chimura, N. and Fukata, T.
学術雑誌名： Veterinary Immunology and Immunopathology
卷・号・頁・発行年： 131(3-4), 298-302, 2009