

氏名(本(国)籍)	神田 聡子(静岡県)				
主指導教員名	東京農工大学 准教授 西藤 公 司				
学位の種類	博士(獣医)				
学位記番号	獣医博甲第400号				
学位授与年月日	平成25年9月24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	正常犬とアトピー性皮膚炎罹患犬におけるフィラグリ ン遺伝子に関する研究				
審査委員	主査	東京農工大学	教授	渋谷	淳
	副査	帯広畜産大学	教授	猪熊	壽
	副査	岩手大学	教授	古濱	和久
	副査	東京農工大学	准教授	西藤	公 司
	副査	岐阜大学	教授	鬼頭	克也

#### 学位論文の内容の要旨

フィラグリ(FLG)は角質細胞内に存在するタンパクの1つで、表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒にて前駆体タンパクのプロフィラグリ( proFLG)として産生される。proFLGは皮膚の分化とともにFLGに分解され、角質細胞内でケラチンを凝集する。その後、FLGは角層上部で分解され、天然保湿因子となり皮膚の保湿に関与する。

アトピー性皮膚炎(AD)は慢性かつ反復性の癢痒性皮膚疾患である。ヒトAD患者の約25-47%ではFLG遺伝子にナンセンス変異が認められ、この変異遺伝子の保有率が健常人(7%)と比較して高いことが報告されている。実験的にはFlgノックアウトマウスにおいて角層の透過性が亢進したとともに、抗原による経皮感作後の血清IgE抗体価が野生型マウスよりも高値を示したことや、ハプテンの塗布によりアレルギー性接触性皮膚炎様の皮膚症状が認められたことが報告されている。以上の事実から、FLG遺伝子変異によるFLGの発現低下または欠損により角層のバリア機構が傷害されると、ヒトADにおける経皮感作が成立するという仮説が立てられている。一方でイヌAD(CAD)の病態はヒトADと類似しており、皮膚バリア機能に異常が認められる事実も報告されているにも関わらず、イヌFLGのアミノ酸配列やタンパク発現に関する報告は少なく、またFLG遺伝子変異とCADの発症との関係も報告されていない。そこで本研究ではイヌFLG遺伝子の詳細な塩基配列や翻訳アミノ酸配列上のドメイン構造の解析、ならびに皮膚における組織内分布の解明を試みた。さらに、CAD症例においてFLG遺伝子に変異が認められるかを検索した。

はじめに、ゲノムデータベースに掲載されているイヌFLG遺伝子の塩基配列からproFLGのアミノ酸配列を予想し、報告されているマウスやヒトの相同配列におけるドメイン構造およびアミノ酸配列と比較した。その結果イヌproFLGはN末端領域、C末端領域ならびにそれらの間に相同性の高い反復配列であるFLGが複数存在するという点において、マウスやヒトの相同配列と共通していた。またFLGの機能上重要と考えられている5種のアミノ酸の構成比については、マウスやヒトの相同配列と同様であった。さらにサザンブロット法を用いた解析により、イヌFLG遺伝子中におけるFLG反復配列数は5-7回であることが推測された。またマウスやヒトの相同配列と異

なり、イヌでは *FLG* の配列内に小さな反復配列が含まれることが示された。

次に、イヌ *FLG* の皮膚における正しい局在を解明するための材料として、イヌ *FLG* の部分アミノ酸配列を再現したペプチドをウサギに免疫して抗イヌ *FLG* 抗血清を作製した。イヌ皮膚を用いた免疫組織化学染色により、抗イヌ *FLG* 抗血清は表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒や角層に一致した染色性を示していた。またイヌ表皮から抽出した蛋白質を基質としてウェスタンブロット法を実施したところ、翻訳アミノ酸配列から計算した *FLG* の分子量と一致する 59 kDa および 54 kDa の 2 本のバンドが認められたことから、作製した抗イヌ抗血清はイヌ *FLG* を認識していると考えられた。一方で CAD の皮膚病変部における *FLG* の発現を免疫組織化学染色により解析したが、今回検索した症例のいずれにおいても健常犬と同様の発現パターンを示した。

最後に、CAD 症例の中に変異 *FLG* 遺伝子を保有する個体が存在するかを解析した。イヌ *FLG* 遺伝子について詳細な塩基配列解析を行ったところ、3'末端領域および 5'末端領域内に 12 ヶ所の一塩基多型 (SNP) が存在し、それらの SNPs の相互関係からイヌ *FLG* 遺伝子には 3 種類のハプロタイプが存在することを発見した。一方で *FLG* 遺伝子ハプロタイプの保有率と、犬種または CAD との関連について解析を試みたが特定の関連性は認められなかった。また CAD に罹患した 5 症例と健常犬 3 頭における *FLG* 遺伝子の変異について次世代シーケンサーを用いて解析を行ったが、今回検討した症例では変異遺伝子を同定することはできなかった。

以上の一連の結果から、イヌ *FLG* はマウスやヒトの相同配列と共通点はあるものの、これらの相同配列よりも複雑な反復配列を構造内に有することを初めて発見した。また本研究で開発した抗イヌ *FLG* 抗血清は、今後イヌの様々な皮膚疾患における *FLG* の発現異常を解析する上で有用となると考えられた。また本研究で用いた分子生物学的手法はイヌ *FLG* 遺伝子の大半の塩基配列を効率よく解析できる手法であるため、前述の疾患における *FLG* 遺伝子変異を解析する上で有用であると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

プロフィラグリンは顆粒細胞の細胞内小器官であるケラトヒアリン顆粒内で産生され、角化と共にフィラグリン (*FLG*) へと加水分解される。*FLG* は角質細胞内におけるケラチ線維の凝集や皮膚の保湿など、皮膚バリア機能に重要な役割を有すると考えられている。また医学領域ではプロフィラグリンをコードする *FLG* 遺伝子のナンセンス変異が、ヒト尋常性魚鱗癬やアトピー性皮膚炎 (AD) の発症に関与することが報告されている。一方でイヌ *FLG* 遺伝子についてはデータベース上に塩基配列情報が公開されているものの、この配列がイヌプロフィラグリンをコードする真の配列であることを証明した報告はこれまでに存在せず、また翻訳アミノ酸配列上の詳細なドメイン構造について解析した既報告も存在しない。さらに同遺伝子の変異とイヌの魚鱗癬や AD との関与についても未だ解明されていない。本論文はイヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列および翻訳アミノ酸配列、ならびにイヌ *FLG* の皮膚における組織内分布について詳細な解析を行ったと共に、同遺伝子の異常とイヌ AD との関連について解析を試みたものである。

最初にイヌ *FLG* 遺伝子の翻訳アミノ酸配列における反復配列について、データベース上の配列を用いた Dot Matrix 法、ならびにイヌゲノム DNA を用いたサザンブロット法による解析を行った。その結果、同配列では *FLG* リピートと呼ばれる反復配列数が、マウスやヒトの相同蛋白よりも少ないことを発見した。また前述の *FLG* リピート内には少数のアミノ酸残基から構成される反復配列が存在し、ヒトやマウスの相同配列よりも複雑なアミノ酸配列を有することを初めて証明した。またホモロジー解析の結果、イヌプロフィラグリンのアミノ末端に存在する非反復配列はマウスやヒトの相同配列と高い相同性を示すも

の、FLG リピートを構成するアミノ酸配列についてはマウスやヒトの相同配列との相同性が著しく低いことを発見した。しかしながら FLG が機能を発揮する上で重要と考えられている FLG リピート内の 5 種のアミノ酸の構成比については、ヒトやマウスの相同蛋白と同様であることを発見した。さらに同蛋白のアミノ酸配列の一部を再現した合成ペプチドを家兔に免疫して抗血清を作成し、抗血清を用いた免疫染色の所見がヒトやマウスの相同蛋白の組織内分布と同様であること、また抗血清が認識する蛋白の分子量が翻訳アミノ酸配列から推定されるイヌ FLG の分子量と同等であることを証明した。これらの結果から、データベース上のイヌ *FLG* 遺伝子は、真のプロフィラグリンをコードする遺伝子であると結論づけた。

続いて様々なイヌの皮膚疾患における同蛋白遺伝子の変異を解析するための手法を確立するため、イヌ AD の症例および正常犬から抽出したゲノム DNA を用いて塩基配列特異的な遺伝子ショットガン法や次世代シーケンズ解析などを行ったとともに、同遺伝子のハプロタイプと疾患との関連について association study による解析を行った。その結果、イヌ *FLG* 遺伝子には 12 箇所の 1 塩基多型の組み合わせに基づく 3 種類のハプロタイプが存在することを証明した。一方でイヌ AD の発症に関連する特定のハプロタイプや、*FLG* 遺伝子上のナンセンス変異については証明できなかった。

上述の成績は、イヌ *FLG* 遺伝子の詳細な塩基配列および翻訳アミノ酸配列、ならびに蛋白発現パターンに関する新たな知見を付与するものであったと共に、同遺伝子には複数のハプロタイプが存在することを初めて証明したものであった。さらに上述の成績は、今後イヌ *FLG* 遺伝子と様々な皮膚疾患との関連を解析する上で有用となる分子生物学的手法を提唱するものであった。

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な価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

1) 題 目 : Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin

著 者 名 : Kanda, S., Sasaki, T., Shiohama, A., Nishifuji, K., Amagai, M., Iwasaki, T. and Kudoh, J.

学術雑誌名 : Veterinary Dermatology

巻・号・頁・発行年 : 24 (1) : 25-31, 2013