

ハウスダストマイトによって活性化された

イヌケラチノサイトにおける GM-CSF の産生機序に関する研究

2013 年

岐阜大学大学院  
連合獣医学研究科  
(岐阜大学)

木村 剛

## 目次

略語	4
緒論	7
第1章 イヌケラチノサイトにおいてハウスダストマイトにより転写誘導される遺伝子群の網羅的解析	
1.1. 序論	11
1.2. 材料と方法	15
1.3. 結果	18
1.4. 考察	21
1.5. 表	30
第2章 ハウスダストマイトに含まれるシステインプロテアーゼを介したイヌケラチノサイトにおける GM-CSF 産生に関する検討	
2.1. 序論	40
2.2. 材料と方法	42
2.3. 結果	45
2.4. 考察	46
2.5. 図	49

### 第3章 システインプロテアーゼを介したイヌケラチノサイトにおける

#### GM-CSF の産生と NFAT の関与

3.1.	序論	55
3.2.	材料と方法	57
3.3.	結果	61
3.4.	考察	63
3.5.	図	65
	総括	72
	謝辞	76
	参考文献	78

## 略語

AD: Atopic dermatitis (アトピー性皮膚炎)

AP-1: Activator protein-1

AQP: Aquaporin

CAD: Canine atopic dermatitis (イヌアトピー性皮膚炎)

CCL: CC chemokine ligand

CCR: CC chemokine receptor

CsA: Ciclosporin A

Der f: *Dermatophagoides farinae* (コナヒョウヒダニ)

Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus* (ヤケヒョウヒダニ)

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline

E-64: Trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido- (4-Guanidino) Butane

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

GAPDH: Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HDM: House dust mite (ハウスダストマイト)

Ig: Immunoglobulin (免疫グロブリン)

IL: Interleukin

INPPL: Inositol polyphosphate phosphatase-like 1

LPS: Lipopolysaccharide (リポ多糖)

MHC: Major histocompatibility complex (主要組織適合抗原複合体)

MMP: Matrix metalloprotease (細胞外基質分解酵素)

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells (活性化 T 細胞核内因子)

NF- $\kappa$ B: Nuclear factor-kappa B

NK: Natural killer

NLR: Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor (NOD 様受容体)

PAR: Protease activated receptor (プロテアーゼ活性化受容体)

PCNA: Proliferation cell nuclear antigen

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

SAA: Serum amyloid A

SGPL: Sphingosine-1-phosphate lyase

SPINK: Serine protease inhibitor Kazal

SPL: Sphingosine 1-phosphate lyase

S1P: Sphingosine 1-phosphate

TEWL: Transepidermal water loss (経表皮水分蒸散量)

TGF: Transforming growth factor

Th: Helper T

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase

TLR: Toll like receptor (Toll 様受容体)

TNF: Tumor necrosis factor

TRIF: Toll/IL-1 receptor/resistance domain-containing adaptor-inducing  
IFN- $\beta$

TSLP: Thymic stromal lymphopietin

## 緒論

イヌアトピー性皮膚炎 (Canine atopic dermatitis, CAD) は炎症性、癢痒性のアレルギー性皮膚疾患であり、遺伝的な素因が関与しており、Immunoglobulin (Ig) E 抗体に関連した特徴的な臨床症状を呈する疾患であると定義されている[40]。特徴的な臨床症状とは、皮膚粘膜境界部である眼周囲、口唇および肛門周囲のほか、腋窩および内股といった間擦部、肘前面および趾間の皺や陥凹が形成される部位、そして腹部、耳介前面および外耳道に季節的な癢痒が若齢から反復して認められることである。CAD においては、症例の約 70% がハウスダストマイト (House dust mite, HDM) に対する特異的 IgE 抗体を保有していることから、HDM が病態において重要な役割を果たしていると思われる[46、75]。すなわち、HDM は体内に侵入した後、肥満細胞に結合した HDM 特異的 IgE を架橋することによって肥満細胞の活性化を引き起こす。活性化された肥満細胞からは炎症性メディエーターが放出され、即時型の過敏症を主体とする炎症反応が生じる。これまで、本疾患の免疫病態においては、これら HDM、HDM 特異的 IgE および肥満細胞を中心とした I 型過敏症の関与のみがクローズアップされてきた。

生体における IgE の産生には、抗原暴露が必要不可欠である。これまで、抗原に暴露される経路として呼吸器および消化管が重要であると考えられてきたが、新生仔犬においては、HDM の経皮的暴露によって CAD 様の臨床症状が発現することが明らかとなっている[95]。さらに、CAD 症例においては、皮膚バリア機能に関与するフィラグリンの mRNA の転写量の低下が認められることから[101]、バリア機能の低下が、抗原の経皮的暴露を促進させていると考えられている。すなわち、CAD の病態においては、抗原と表皮を構成する細胞群とのクロストークが重要な役割を果たしている可能性があるといえる。

ケラチノサイトは、表皮の約 95% を占める細胞である。これまで、物理的なバリアとしての機能のみが注目されてきたが、CC chemokine ligand 17



(CCL17)[123]、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)[13]および Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)[92]などのサイトカインも産生することがヒトおよびマウスにおいて示された。イヌのケラチノサイトにおいては、コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*, Der f) の主要アレルゲンである Der f 1 の刺激によって、Interleukin (IL)-8、GM-CSF および Tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  の mRNA 転写量が増加することが明らかとなっている[72]。このように、ケラチノサイトには様々なサイトカインを産生する能力があるが、CAD の病態における各因子の役割については明らかになっていない。そこで、本研究では、HDM の刺激によってケラチノサイトから産生される液性因子のうち、CAD の病態に関与する分子を同定し、その産生誘導のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

## 第 1 章

イヌケラチノサイトにおいて  
ハウスダストマイトにより転写誘導される  
遺伝子群の網羅的解析

## 1.1. 序論

CADは遺伝的背景を有するIgE介在性のアレルギー性炎症性癢痒性皮膚疾患である[40]。体内に侵入した抗原によって活性化されたB細胞は、ヘルパーT細胞から産生されたIL-4またはIL-13の存在下において、IgEを産生する形質細胞へと分化する[35]。これまで、CADにおける抗原の暴露は、呼吸器および消化管の粘膜を介しているものと考えられてきた[89]。しかしながら、新生仔犬に対するHDMの経皮的暴露によってHDM特異的IgEの産生が促進され、さらに皮膚へのHDMの再暴露によってCAD様の皮膚病変が生じることが明らかとなり[95]、皮膚はCADにおける抗原の重要な暴露経路であることが示された。

哺乳類の皮膚組織の最外層には表皮が存在している。表皮はケラチノサイトによって構成され、形態学的に顆粒層、有棘層および基底層に分類することができる。角層は顆粒層の細胞が脱核した後、細胞質内の成分を基に形成される。角層の細胞間隙は脂質を主成分とする物質によって占められており、ヒトおよびマウスにおいては分子量500ダルトン以上の物質は通過しないと考えられている[10, 68]。すなわち、角層は外来物質の侵入を防ぐ物理的バリアとしての役割を果たしている。皮膚バリア機能の評価法として、経皮的水分蒸散量(Transepidermal water loss, TEWL)の測定が知られている[94]。TEWLは、皮膚から蒸発する水分の割合を示しており、皮膚の透過性およびバリア機能を評価する手法の1つである。CAD症例ではTEWLが高値を示したことから、皮膚のバリア機能が低下している可能性が示された[23]。さらに、CAD症例においては、角層脂質であるセラミドの減少とTEWLの上昇が相関していたことから、セラミドがバリア機能に関与していると考えられる[32]。また、CADの実験犬において、角化において重要な役割を果たしているフィラグリンが、健康犬にくらべて減少していることが報告されている[74]。さらに、CADモデル

犬の病変部では、健常犬で均一に発現しているはずのフィラグリンが斑状かつ不均一な発現パターンを示したことが報告されている[104]。

バリア機能を維持する上で重要なセラミドおよびフィラグリンはケラチノサイトにより産生されることがヒトにおいて示された[6]。セラミドはケラチノサイトの角化の過程で産生される角層脂質であり、有棘層および顆粒層でセリンとパルミトイル-CoA から合成され、その後、グリコシルセラミドまたはスフィンゴミエリンとして蓄積され、角層細胞間でグルコセレプロシターゼまたはスフィンゴミエリナーゼにより再合成される[48, 80]。また、フィラグリンは顆粒層ケラチノサイトにおいて、細胞骨格となる細胞質内のケラチン線維を結合させ凝集させた後、角層上層ではカスパーゼ 14 などによって分解され天然保湿因子として働くタンパクであると考えられている[18]。フィラグリンは顆粒層ケラチノサイトの持つケラトヒアリン顆粒内において前駆体のプロフィラグリンとして生合成され、ペプジチルアルギニンデイミナーゼによって加水分解されてフィラグリンとなることがヒトにおいて報告されている[18]。バリア機能に関与する分子がケラチノサイトによって産生されることを鑑みると、ケラチノサイトの機能異常は CAD の病態において重要な役割を果たしていると考えられる。

表皮の 95% を構成するケラチノサイトは、外部からの刺激によって活性化され、様々な液性因子を産生する。CAD 症例の病変部においては、膿皮症の主な原因菌である *Staphylococcus pseudointermedius* のケラチノサイトへの付着性が増強していることが示されている[113]。また、CAD の慢性病変では、痒みによる自傷や表皮の脂質異常によって表皮環境が破綻し、細菌コロニーが形成されている場合が多い[26]。細菌の菌体成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) に刺激されたイヌの培養ケラチノサイトにおいてはプロスタグランディン E<sub>2</sub> が産生される[7]。さらに、HDM によって活性化されたイヌケラチノサイトの細胞株においては、好中球の遊走に関連する IL-8 および顆粒球系や単球系

の活性化因子である GM-CSF の mRNA 転写量の増加が明らかとなっている [72]。これらの結果から、表皮は、物理的バリアのみならず、ケラチノサイトから産生されたサイトカインを介した免疫的バリア機能の役割も果たしていると思われる。

Der f および Der p は環境中に存在する HDM の主要なアレルゲンである [64]。CAD 症例の 54.4% において、Der f および Der p に対する血清中の特異的 IgE 値の増加が報告されている [75]。特に Der f に対しては、皮内反応試験においても症例の 64.3 % で陽性反応が認められている [75]。Der f および Der p は、それぞれ約 20 種類のアレルゲンタンパクを含有し、これらのアレルゲンの中でも特に Der f 1 および Der p 1 は IgE との結合率が高いことがヒトおよびマウスにおいて示されている [45, 50, 110]。Der f 1 および Der p 1 はプロテアーゼであり、これらのプロテアーゼ活性による上皮細胞間結合の破壊や細胞表面の分子の切断が細胞の活性化を引き起こす [45]。Der f 1 および Der p 1 は上皮細胞の細胞膜上に発現するプロテアーゼ活性化受容体 (Protease activated receptor, PAR) -2 を介してヒトケラチノサイトを活性化し、IL-8 および GM-CSF を産生させる [60]。また、Der p 1 が PAR-2 シグナル経路とは別に、細胞内パターン認識受容体である NOD 様受容体 (Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor, NLR) ファミリーの 1 つである NLRP3 を介してヒトケラチノサイトを活性化し、IL-18 および IL-18 の産生を誘導したことが報告されている [25]。これらの結果は、生体内に侵入したアレルゲンは I 型過敏症を引き起こすばかりでなく、上皮細胞との相互作用を介した異常な細胞性免疫を誘導している可能性を示唆するものであるが、CAD の病態への関与は明確ではない。したがって、第一章では、CAD の病態におけるプロテアーゼ活性を有するアレルゲンと上皮細胞の相互作用を明らかにすることを目的として、HDM によって活性化されたヒトケラチノサイト細胞株における遺伝子の転写誘導を

DNA マイクロアレイによって網羅的に解析した。

## 1.2. 材料と方法

### 1.2.1. 材料

基底層ケラチノサイトとしての性状を持つことが既に示されており[112]、イヌの炎症性皮膚疾患の実験ツールとしての有用性が示されている CPEK[72, 112] およびその培養液である CnT-09 は CELLnTEC Advanced cell systems (Bern, Switzerland) より入手した。無血清培地である Opti-MEM I および継代培養時の細胞剥離の際に用いたトリプシン処理剤 (TrypLE Express) は Invitrogen (Carlsbad, CA) から入手した。Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) のものを使用した。Der f の主要アレルゲンである Der f 1 の精製物は生化学バイオビジネス株式会社 (東京) より購入した。

### 1.2.2. 細胞培養

5回から10回継代したCPEKを10 mLのCnT-09に浮遊させ、37°C、5% CO<sub>2</sub>の環境下で75 cm<sup>2</sup> フラスコ (NUNC, Roskilde, Denmark) を用いて培養した。80%コンフルエントに達した段階で、培養液を除去し、10 mLのDPBSで細胞を洗浄した。TrypLE Expressを3 mL加えた後、37°C下にて5-10分間静置し、細胞を剥離した。CnT-09を7 mL加え、約80%の細胞が剥離して、浮遊したことを確認した後、10 mLの細胞浮遊液を15 mL centrifuge tube (NUNC) に回収し、室温で180 G、5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞塊をCnT-09によって静かに再懸濁した。再懸濁した細胞浮遊液を、 $2 \times 10^4$  /mLの密度で24-well plates (NUNC) に1 mLずつ分注し、80%コンフルエントに達するまで37°C 5%CO<sub>2</sub>の環境下で培養した。その後、培養液をOpti-MEM Iに変更し、

無血清下で 24 時間培養した。24 時間後に Der f 1 (10 µg/mL) を添加した Opti-MEM I または Opti-MEM I のみに替えて、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 24 もしくは 48 時間、培養した。

### 1.2.3. CPEK からのトータル RNA 抽出

培養細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を使用してトータル RNA を抽出した。回収したトータル RNA は、TURBO DNA-Free Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用してゲノム DNA の除去を行った後、-80°C で保存した。

### 1.2.4. マイクロアレイ

Canine オリゴ DNA マイクロアレイ Ver.2.0 (4×44K) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用いた解析を株式会社バイオマトリックス研究所 (千葉) にて実施され、本解析は以下の手順で行われた。Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて、各サンプルのトータル RNA から 2 本鎖 cDNA を合成し、*in vitro* 転写により cRNA を合成した。この時、Cyanine 色素で標識された Cyanine 3-CTP を取り込ませ、蛍光標識を行った。Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を使用し、標識 cRNA をハイブリダイゼーションバッファーに加え、Canine オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 (4×44 K) 上で 17 時間マイクロアレイ上の DNA と反応させた。洗浄後、Agilent Microarray Scanner で DNA マイクロアレイのイメージを読み取り、Feature Extraction Software (v.9.5.3.1) を用いて各スポットの蛍光シグナルを数値化した。



### 1.2.5. 解析方法

Der f 1 の添加 24 時間後および 48 時間後において、HDM 添加群における転写量が無添加群と比較して、2 倍以上の発現増加または 1/2 以下の発現低下を示した遺伝子数の変動を評価した。さらに、ヒトの Atopic dermatitis (AD) 病変部において発現の変化が認められている 52 遺伝子[53, 85, 114](表 1-1)、CAD 病変部において発現変化が認められている 33 遺伝子[77, 126] (表 1-2) およびケラチノサイトで発現する自然免疫および獲得免疫に関連するサイトカインの 22 遺伝子[1, 21, 37] (表 1-3) の変動についても評価した。

### 1.2.6. 定量リアルタイム RT-PCR を用いた検証

マイクロアレイの解析結果は、1.2.5 によって選出した遺伝子を特異的に増幅するプライマー (表 1-4) を用いた定量リアルタイム Reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) によって検証した。定量リアルタイム RT-PCR はマイクロアレイ解析で用いたトータル RNA を鋳型とした 1 ステップ RT-PCR (One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II, タカラバイオ, 滋賀) によって行った。すべての反応は Thermal Cycle Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いて行い、逆転写反応を 42°C 5 分間および 95°C 10 秒間、ポリメラーゼ連鎖反応を 95°C 5 秒間および 60°C 30 秒間を 40 サイクル、解離は 95°C 15 秒間、60°C 30 秒間、95°C 15 秒間の条件で実施した。目的遺伝子の転写量は Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をリファレンス遺伝子とした相対定量値として算出した。得られた相対定量値をもとに、 $\Delta\Delta Ct$  法によって HDM 添加群と無添加群に対する相対定量値を算出した。この値が、2 倍以上の転写量増加または 1/2 以下の転写量低下であった場合をそれぞれ有意な増加または低下とした。

## 1.3 結果

### 1.3.1 CPEK において発現増加および発現低下を示した遺伝子数の変化 (表 1-5)

抗原存在下で培養した CPEK において、約 22,000 遺伝子（プローブ）の発現が確認された。抗原の添加によって発現が変動した遺伝子数の結果を表 1-5 に示す。発現増加および発現低下を示した遺伝子数は培養時間と共に増加する傾向にあった。

### 1.3.2 ヒト AD 病変部において発現量に変化している遺伝子群についての解析（表 1-6）

過去に実施されたヒト AD 病変部の網羅的解析において、発現変化が報告されている 52 個の遺伝子について評価した。52 遺伝子のうち、イヌ用オリゴ DNA マイクロアレイキットによって 27 遺伝子の解析が可能であった。この 27 遺伝子のうち、抗原の添加によって 20 遺伝子の発現が確認された。発現変動を示した遺伝子のうち、*AQP (Aquaporin) 3*、*IL-8*、*CD26/DPP (Dipeptidylpeptidase) 4* および *Keratin10* については 2 倍以上の発現増加が認められ、*CCL17*、*Keratin5*、*S100A2* および *S100A8* においては 1/2 倍以下の発現低下が認められた。*Keratin5* および *Keratin10* を除き、マイクロアレイで得られた結果を定量リアルタイム RT-PCR を用いて検証したところ、*AQP3*、*IL-8* および *S100A8* については抗原刺激 24 時間後に転写量の増加が認められ、*CCL17* および *S100A2* に関しては抗原刺激 48 時間後に転写量が低下した。*CD26/DPP4* については、転写量の変化は認められなかった。

### 1.3.3 CAD 病変部において発現変化している遺伝子群についての解析 (表 1-7)

マイクロアレイを用いた CAD の病変部解析において過去に発現変化が報告されている 33 個の遺伝子について評価した。33 遺伝子のうち、イヌ用オリゴ DNA マイクロアレイキットで解析が可能であった遺伝子は 23 遺伝子であった。このうち、抗原の添加によって 20 遺伝子の発現が確認された。発現が確認された遺伝子のうち、*FLIPL1* (*Down-regulated in ovarian cancer 1 isoform 2*)、*INPPL* (*Inositol polyphosphate phosphatase-like*) 1、*SAA* (*Serum amyloid A*) 1、*CD26/DPP4*、*SPINK* (*Serine protease inhibitor Kazal*) 5 および *SGPL* (*Sphingosine-1-phosphatase lyase*) 1 については 2 倍以上の発現増加が、*AKAP9* (*A-kinase anchor protein 9*) および *S100A8* については 1/2 倍以下の発現低下が認められた。定量リアルタイム RT-PCR を用いた検証では、*S100A8* (24 時間後)、*TIMP1* (24 時間後)、*SPINK5* (48 時間後) および *SGPL1* (24 時間後) において転写量の増加が認められた。*SPINK5* (24 時間後) の転写量の変動はその他の遺伝子と異なり、24 時間後に低下した後、48 時間後に無添加時の 172.02 倍にまで増加したことが明らかとなった。なお、*SAA1* においては、検出されず、*DPP4* においては、転写量の変化は認められなかった。

### 1.3.4 ケラチノサイトにおいて発現する自然免疫および獲得免疫に関連するサイトカイン (表 1-8)

ケラチノサイトにおいて発現が報告されている 22 遺伝子のうち、マイクロアレイにおいて解析可能であった遺伝子は 19 個であった。この 19 遺伝子のうち、12 遺伝子において抗原刺激後に発現が認められた。発現が認められた遺伝子のうち *IL-8*、*IL-15*、*CCL2*、*CCL20*、*TGF- $\beta$ 2* および *GM-CSF* は 2 倍以上の発現増加を示したが、*CCL17* (48 時間後) は 1/2 倍以下の発現低下を示し

た。定量リアルタイム RT-PCR によって検証した結果、*IL-8*、*CCL20*、*GM-CSF* および *IL-15* については抗原刺激 24 時間後に、また、*TGF (Transforming growth factor) - $\beta$ 2* については抗原刺激 48 時間後に転写量が増加した。特に、*IL-8*、*CCL20* および *GM-CSF* においては抗原刺激 48 時間後に 8 倍以上もの転写量増加が明らかとなった。

## 1.4 考察

ケラチノサイトは、表皮における物理的、化学的および生物学的バリアを構成する重要な細胞成分である。ケラチノサイトにおける遺伝子の転写量は紫外線や化学物質など、様々な刺激によって変動することがヒトやマウスにおいて示されている[39, 93, 98]。マイクロアレイを用いた解析では、N-アセチル-L-システインの添加によって 334 個の遺伝子、ヒ素添加によっては 121 個の遺伝子の発現変動がヒトにおいて認められた[39, 93]。今回の研究では、24 時間後に 1,344 個の遺伝子、さらに培養 48 時間後には 3,748 個の遺伝子の発現変動が認められたことから、Der f 1 には、N-アセチル-L-システインやヒ素などを上回るケラチノサイトに対する強力な転写誘導または活性抑制が存在することが示された。HDM の抗原タンパクである Der f 1 は、屋内の埃 1 g 中においては、平均  $2.45 \pm 4.97 \mu\text{g}$  存在しており、多いところでは  $30 \mu\text{g}$  以上存在する場合もある[99]。また、CAD 罹患イヌを飼育する屋内の埃に存在する Der f 1 は、飼育イヌが CAD に罹患していない家庭と比べて多いことが示されていることから[31]、本研究で用いた Der f 1 濃度 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) は、実際の環境中とほぼ同程度の濃度であると考えられる。

網羅的な遺伝子発現解析によって、これまで病態への関与が不明であった分子が明らかとなる場合がある。解析方法として、発現パターンの類似性に基づき系統樹を作成する階層的クラスタリングが最もよく使用されており、発現変化のパターンから、その機能を予測できる可能性がある[122]。また、抽出された遺伝子においては、既知の情報を基に、遺伝子の転写にいたる経路を予測することが可能となっている[122]。ヒト、マウスおよびラットの情報に基づいて、配列相同性遺伝子の発現パターンを網羅的に探索することがイヌにおいても可能であるが、今回の研究においてはこれらの解析を行うためのアプリケーション

ンソフトウェアが使用できなかった。そこで、本研究では、これまでに報告のあったヒトおよびイヌの AD 病変部のマイクロアレイ解析において発現変化の認められた遺伝子群およびケラチノサイトにおける発現が認められる免疫関連分子群に着目し解析を行った。

ヒトの AD 病変部において発現増強が認められている *AQP3* は水およびグリセロールの輸送体である Aquaporin3 をコードする遺伝子である[41, 71]。*AQP3* をノックアウトしたマウスでは、表皮組織における水およびグリセロールの透過性はいずれも低下することが示されている[71]。また、ヘアレスマウスの野生型と *AQP3* 欠損型における表皮に含有される水分量を比較したところ、*AQP3* 欠損型ヘアレスマウスでは野生型マウスよりも低下していることが明らかとなっている[71]。さらに、*AQP3* ノックアウトマウスに対してアレルゲンである ovalbumin を経皮的に塗布しても表皮の肥厚は認められず、細胞増殖の指標となる PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) 陽性のケラチノサイトは野生型に比べて有意に少ないことが示されている[81]。ハプテンである Oxazolone を塗布した *AQP3* ノックアウトマウスにおいては、血中の CCL17 および総 IgE が野生型マウスに比べて有意に増加していたことから、*AQP3* は表皮のバリア機能に関与することが明らかとなった[81]。イヌにおける詳細な検討は行われていないが、ヒトおよびマウスにおけるこれまでの報告と今回得られた結果から、HDM による刺激はケラチノサイトにおける *AQP3* mRNA の転写量を増加させることにより、表皮水分含有量の維持と表皮肥厚を介してバリア機能の回復を誘導している可能性が考えられた。

イヌおよびヒトの AD 病変部での発現増強が認められている *SGPL1* は Sphingosine 1-phosphate lyase (SPL) をコードする遺伝子である[108, 126]。SPL は表皮バリア脂質であるセラミドの代謝産物である Sphingosine 1-phosphate (S1P) を分解する[109]。S1P はアポトーシスを抑制することで

細胞増殖および分化を促進することが知られる[65]。一方、*SPL* 遺伝子ノックアウト F9 細胞を用いた研究において、*S1P* 自身ではなく、*SPL* が細胞の代謝を亢進し増殖を促進することが示された[57]。ヒトケラチノサイトにおいても、*SPL* が分化を間接的に促進することが示された[11, 44]。CAD 病変部における *S1P* の発現が低下していることを考慮すると[8]、HDM の経皮的な刺激がケラチノサイトにおける *SGPL1* の転写を誘導し、ケラチノサイトの増殖および分化を促進させている可能性が示された。

*Serine protease inhibitor Kazal-type (SPINK) 5* は、イヌおよびヒトの AD 病変部において発現増強することが示されている[84, 126]。*SPINK5* をノックアウトしたマウスの皮膚においては、鱗屑形成と角層剥離の亢進および毛の形成異常が認められた[27]。さらに、顆粒層の接着分子であるデスモグレイン1の発現低下のみならず、電子顕微鏡による観察では接着帯の崩壊も観察されている[27]。すなわち、*SPINK5* はデスモグレイン1の発現を維持することによって健全な角層を保持しているものと思われる[27]。さらに、野生型と比較すると *SPINK5* ノックアウトマウスでは *TEWL* が増加することから[27]、HDM 抗原の表皮への暴露は、生体に対する danger signal と認識され、*SPINK5* を介して表皮の細胞接着を維持することによる表皮バリア機能を促進する可能性があり、イヌにおいても同様の機能を有しているものと思われた。

抗原刺激 24 時間後に転写量増加が認められた *TIMP1* は、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 (Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) をコードする遺伝子であり、CAD 病変部において発現が増強されることが示されている[77]。*TIMP1* は組織コラーゲンの分解を抑制し、コラーゲン沈着による線維化を促進して創傷治癒に関与することが知られている[103]。また、AD の慢性病変部の特徴とされる線維化と苔癬化に *TIMP1* が関与している可能性が示されている[61, 117]。*TIMP* ファミリーには *TIMP1* から *TIMP4* までが存在し、いずれ

も活性型の細胞外基質分解酵素 (Matrix metalloprotease, MMP) と複合体を形成することによって、MMP の酵素活性を抑制する[61, 125]。MMP はタンパク分解酵素であり、MMP1 から MMP14 まで 14 種に分類されている[61]。TIMP1 はこれらいずれの MMP とも複合体を形成し阻害するが、特に MMP9 (ゼラチナーゼ B) との親和性が高い[103]。ヒトのアレルギー性湿疹様病変部において、MMP9 をはじめ[97]、MMP1 および MMP3 の mRNA 転写量の増加が認められていることや[42]、HDM の刺激によってケラチノサイトにおける MMPs mRNA の転写が誘導されることを鑑みると、イヌにおいて詳細な検討はされていないが、TIMP1 は MMP によって生じる組織傷害を抑制しているものと思われた。

Der f 1 添加 24 時間後において転写量の増加が認められた *S100A8* は細胞外に存在するカルシウムと結合し、好中球および単球の遊走活性と顆粒球放出能を上昇させるタンパクをコードする遺伝子である[22, 121]。ヒトおよびイヌの AD 病変部においては本分子の発現が増強していること[114, 126]、また、病変部には、リンパ球の他に好中球および単球も多数認められることを考慮すると[47]、Der f 1 を介したケラチノサイトからの *S100A8* によって週簇することが促されている可能性があり、HDM 活性化ケラチノサイトが CAD の病態において重要な役割を果たしているものと思われた。

CAD の免疫病態においては、IgE 産生を主体とする Th (Helper T) 2 型優位の免疫反応が中心的な役割を果たしている。これらの免疫反応を制御するサイトカインおよびケモカインは主に T 細胞から産生されと考えられてきたが、ケラチノサイトも T 細胞に匹敵するほど様々なサイトカインやケモカインを産生することがヒトおよびマウスにおいて示されている[21, 29]。つまり、CAD における Th2 型優位の免疫反応もケラチノサイトから産生されるサイトカインおよびケモカインによって制御されている可能性が高い。しかし、イヌにおいて



詳細に検討されていない。そこで、ケラチノサイトにおける産生が報告されているサイトカイン 31 分子に着目し、Der f 1 によって生じる転写変動について検討したところ、*IL-8*、*IL-15*、*CCL2*、*CCL20*、*TGF- $\beta$ 2* および *GM-CSF* の 6 分子をコードする遺伝子において転写量の増加が認められた。

Der f 1 添加後に転写量増加の認められた *IL-8* は、ヒトの AD 病変部において発現亢進が明らかとなっている [53]。IL-8 は好中球に対する走化因子であるほか [1]、好中球の脱顆粒と貪食作用を促進する働きがある [1, 14]。IL-8 の CAD の病態における役割については詳細に検討されていないが、好中球は CAD 病変部においても認められている [47]。好中球の遊走はバリア機能の破綻によって侵入した細菌などに対する反応であると推察されているが、本研究の結果から、HDM の刺激によっても好中球の遊走が引き起こされる可能性が示された。

Der f 1 添加 24 時間後に転写量増加が認められた *IL-15* はナチュラルキラー (Natural killer, NK) 細胞および T 細胞の分化、増殖および生存を促進する [1]。NK 細胞は、ヒトおよびイヌの AD 病変部において認められる炎症性細胞であり [15, 47]、ヒトでは病変部の NK 細胞数と AD 重症度との相関が認められ [19]、搔爬などによって破綻した表皮から侵入した抗原に対して反応していると推察されている [19]。一方、IL-15 が標的とする T 細胞は主に CD8<sup>+</sup> T 細胞であることが示されている [1, 52]。本細胞もヒトおよびイヌの AD 病変部において認められ [47, 91]、IL-15 によって病変部への遊走と活性化が制御される [63, 106]。本研究の結果およびこれまでの報告を鑑みると、HDM に刺激されたケラチノサイトは自然免疫系細胞である NK 細胞と獲得免疫系細胞である T 細胞を同時に活性化し、皮膚における炎症を誘導している可能性があると思われた。

Der f 1 添加 24 時間後および 48 時間後ともに転写量増加の認められた *CCL2* は、単球やマクロファージ、樹状細胞において発現する CCR2 のリガンドをコードする遺伝子であり [96]、ヒト AD および CAD モデル犬の皮膚病変部におい

で高発現していることが示されている[96, 124]。マクロファージは抗原特異性を有しないが、CAD およびヒト AD 病変部においても多数認められることから AD 病態においても何らかの役割を果たしているものと思われる[47, 124]。マクロファージは、細菌などの異物を捕捉すると、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1、好中球遊走因子である IL-8、Th1 細胞を活性化する IL-12などを産生することから、慢性期にある AD 病変部での Th1 反応を促進しているものと思われる[58, 105]。一方、CAD 病変部においては樹状細胞数の増加のみが報告されているが[105]、ヒト AD 病変部では、樹状細胞数の増加のみならず、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が高発現していることも示されている[86]。TSLP によって刺激された樹状細胞は、Th2 型細胞のケモカインである CCL17 を産生し、Th2 型細胞からの IL-4、IL-5 および IL-13 産生を誘導する[86]。したがって、HDM に刺激されたイヌケラチノサイトは CCL2 の産生を介して、マクロファージおよび樹状細胞を病変部へ遊走させ、CAD の病態に重要なサイトカインの産生を引き起こしている可能性がある。

*CCL20* は Der f 1 添加 24 時間後および 48 時間後ともに転写量増加の認められたケモカインをコードする遺伝子であり、CCR6 のリガンドである[107]。AD を含むアレルギー性皮膚疾患の病変部において増加が認められている CCR6 発現細胞は未成熟な樹状細胞およびランゲルハンス細胞であることが示されている[107]。*CCL20* はヒト AD 病変部で発現亢進しているほか、血清中の濃度と重症度とが相関することが示されている[82]。アトピーパッチテストにおいて陽性反応が認められたヒトの皮膚では、*CCL20* mRNA の転写量増加とともに、CCR6<sup>+</sup>ランゲルハンス細胞の増加が認められている[38]。ヒトおよびイヌの AD 病変部においては、増加したランゲルハンス細胞に IgE が結合していることが示されていることから、ランゲルハンス細胞は抗原特異的な IgE を介して特異的抗原を捕捉すると考えられている[9, 90]。抗原によって活性化したランゲルハ

ンス細胞は IL-18、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  およびインターフェロンを産生することがヒトおよびマウスにおいて示されていることから[5]、I型のみならずIV型アレルギー反応にも重要な役割を果たしていると思われる。今回の結果とこれまでの報告から、HDM 活性化ケラチノサイトは、CCL20 を産生することによって、ランゲルハンス細胞の病変部への遊走を促進させ、サイトカインの産生を介して獲得免疫への移行を促進していると考えられた。

Der f 1 添加 48 時間後に転写量の増加が認められた *TGF- $\beta$ 2* は抑制性サイトカインであり、そのほかにも 4 つのアイソフォームが存在することがヒトにおいて示されている[36]。TGF- $\beta$ 2 は TGF- $\beta$ 1 と約 70%の相同性を有し、機能も類似することがヒトおよびマウスにおいて示されている[36]。さらに、ヒトにおいては、T 細胞の IL-4 および IL-5 の産生と B 細胞の増殖を抑制することも明らかになっている[30, 62]。ヒトおよびイヌの AD 病態における TGF- $\beta$ 2 の役割については明らかになっていないが、CAD 病変部における TGF- $\beta$  の発現低下が示されていることから[87]、T 細胞機能の抑制機構の破綻が AD 病態に関与している可能性はあると思われる[73]。今回の研究結果から、HDM によって活性化されたケラチノサイトは、TGF- $\beta$ 2 を産生することにより、T および B 細胞の機能を抑制し、獲得免疫系の炎症反応を抑制している可能性が示された。

Der f 1 添加後に転写量増加が認められた *GM-CSF* は、多能性造血幹細胞を好中球、単球または好酸球にそれぞれ分化させる機能を持つサイトカインをコードする[1]。GM-CSF はヒト AD 病変部での発現増加が認められており[12]、病変部で増加の認められている好酸球の分化および活性化による脱顆粒に関与するほか[59]、慢性の病変部におけるマクロファージのアポトーシス阻害を介して、慢性炎症を維持していることが示されている[12]。また、GM-CSF はヒト AD 病変部におけるケラチノサイトからの産生増加が示されており、病変部におけるランゲルハンス細胞および樹状細胞の増加および活性化への関与が示唆さ

れている[92]。CAD 病変部における GM-CSF の役割に関する詳細な検討は行われていないが、GM-CSF の皮下投与は、用量依存的に好中球、単球および好酸球の増加を誘導することから[83]、CAD 病変部における炎症細胞の増加に本分子が関与していると考えられる[47]。さらに、イヌの末梢血単球を GM-CSF で刺激すると主要組織適合抗原複合体(Major histocompatibility complex、MHC) class II を発現する樹状細胞が増加することから[115]、本分子は樹状細胞への分化、成熟および活性化を介して、CAD 病変部におけるランゲルハンス細胞の増加に関与していると考えられている[91]。今回の研究の結果から、HDM によって刺激されたケラチノサイトは、GM-CSF を産生することによって、好中球、単球および好酸球の増加を誘導するとともに、ランゲルハンス細胞や樹状細胞の活性化を通じて獲得免疫への移行を促進していると考えられた。

CAD の病態においては、抗原特異的 IgE を中心とする I 型過敏症が重要な役割を果たす。プラズマ細胞における抗原特異的 IgE の産生は Th2 細胞からのサイトカインが必須であり、この Th2 細胞の分化および活性化にはランゲルハンス細胞による抗原提示が必要となる。したがって、CAD の発症機構の極めて初期の段階においては、ランゲルハンス細胞を中心とした獲得免疫系の異常な活性化が生じている可能性がある。ランゲルハンス細胞は未成熟な状態で表皮内に存在するが、抗原捕捉し分化するとリンパ節へ遊走し、ナイーブ T 細胞に抗原を提示する[66]。本研究において mRNA 転写量増加が認められた GM-CSF は、ランゲルハンス細胞の成熟、活性化および前駆細胞からの分化に重要なサイトカインであることを鑑みると[20]、HDM 活性化ケラチノサイトから産生された多量の GM-CSF が極めて初期の AD 免疫病態に関与していると考えられた。したがって、HDM 活性化イヌケラチノサイトにおける GM-CSF の産生機構が明らかになれば、CAD に対する新規治療法を開発できる可能性があると考えた。そこで、次の第二章ではイヌケラチノサイトにおける GM-CSF タンパクの産生

について評価することとした。

## 1.5. 表

表1-1 ヒトのAD 病変部において発現変化が認められている遺伝子

遺伝子名	機能	参考文献
AQP3	水チャネル	[82]
Carbonic anhydrase II	炭酸脱水酵素	[52, 82]
CCL13/MCP4	白血球遊走因子	[82]
CCL17/TARC	T 細胞および好塩基球の遊走因子	[52]
CCL18/PARC	リンパ球および樹状細胞の遊走因子	[82]
CCL27/CTACK	真皮細胞の遊走因子	[82]
CD1a	樹状細胞および B 細胞の膜蛋白	[82]
CD26 dipeptidylpeptidase IV	T 細胞表面抗原/セリンプロテアーゼ	[82]
CD45	白血球共通抗原	[52]
Chondroitin sulphate proteoglycan 2	細胞外基質、神経細胞軸索の伸長機能	[109]
Collagen VI a-1 C-terminal globular domain	VI 型コラーゲンをコードする C 末端球状ドメイン	[82]
CXCL8/IL-8	好中球遊走因子	[52]
CXCL10	エフェクター T 細胞遊走因子	[52]
Cysteine-rich protein 1	細胞外基質/細胞間シグナル分子	[82]
Cysteine-rich protein 2	細胞外基質/細胞間シグナル分子	[82]
Elafin	エラスターゼ阻害/抗微生物活性	[52, 109]
Fibronectin 1	細胞接着、細胞の成長、遊走、分化	[109]
Filaggrin	ケラチノサイトの分化、ケラチン線維の凝集	[109]
IL-1B	炎症性サイトカイン、リンパ球活性化因子	[52]
IL-1F9	IL-1 ファミリーの1種	[109]
Involucrin	角層および角層下周辺帯の構造蛋白	[109]
Keratin 1	有棘層ケラチノサイトの細胞骨格 (II型ケラチン)	[109]
Keratin 2A	上皮細胞に発現する II 型ケラチン	[109]
Keratin 5	基底層ケラチノサイトの細胞骨格 (II型ケラチン)	[109]
Keratin 6A	扁平上皮細胞の細胞骨格 (II型ケラチン)	[109]
Keratin 6B	扁平上皮細胞の細胞骨格 (II型ケラチン)	[109]
Keratin 10	有棘層ケラチノサイトの細胞骨格 (I 型ケラチン)	[109]
Keratin 14	基底層ケラチノサイトの細胞骨格 (I 型ケラチン)	[109]
Keratin 16	角層および爪に発現する I 型ケラチン	[109]
Keratin 17	単層腺上皮細胞に発現する I 型ケラチン	[109]
Loricrin	角層および角層下周辺帯の構造蛋白	[109]
Lymphocyte-specific protein 1	F-actin と結合、細胞骨格を形成	[60]
N-myc downstream regulated gene 1	細胞質と核の間のシグナルで増殖停止と細胞分化を調節	[60]
Nel-Like 2	上皮成長因子	[52, 109]
Osteoblast specific factor 2	上皮細胞の接着と遊走/Periostin/POSTN	[82]
Plasminogen activator inhibitor, type I	プラスミノゲン活性化阻害因子、線溶を抑制	[82]
PPP1R5	蛋白脱リン酸化酵素	[82]
S100A2	細胞周期進行、細胞分化	[109]
S100A7	CD4+ リンパ球および好中球の走化性因子/psoriasis	[109]
S100A8	好中球の活性化、アラキドン酸輸送	[109]
S100A9	S100A8とともに顆粒白血球および単球に発現	[109]
Serine protease inhibitor clade B, member 13	キモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害	[82]
Small proline-rich protein 1A	(不明)	[109]
Small proline-rich protein 1B	(不明)	[109]
Small proline-rich protein 2B	(不明)	[109]
Small proline-rich protein 2C	角層下周辺帯の構成成分、バリア機能に関与?	[109]
Small proline-rich protein 3	(不明)	[109]
Tenascin precursor	細胞接着、増殖等に関係し、組織再構築を促進	[82]
Trichohyalin	毛包に発現、毛髪分化増殖	[109]
VNN1	TNF- $\alpha$ , IL-1, IL6, IL-17 および IL-22 を誘導	[52]
VNN3	TNF- $\alpha$ , IL-1, IL6, IL-17 および IL-22 を誘導	[52]
$\beta$ -defensin 2	抗菌ペプチド	[52, 109]

表1-2 CAD 病変部において発現変化が認められている遺伝子

遺伝子名	機能	参考文献
ARTS-1	抗原性ペプチドやサイトカイン受容体を分断	[74]
POSTN	上皮細胞の接着と遊走/Periostin/POSTN	[74, 121]
Down-regulated in ovarian cancer 1 isoform 2	(不明)	[74]
eIF-5B	翻訳開始要因	[74]
Kinectin 1	モーター蛋白質であるキネシンの受容体	[74]
Myosin Va	モーター蛋白質	[74]
A-kinase anchor protein 9 isoform 2	(不明)	[74]
<i>Canis familiaris</i> ret proto-oncogene (RET)	(不明)	[74]
GOLGA4 subfamily a, 5	セラミドの輸送	[74]
GOLGA4 subfamily a, 4	セラミドの輸送	[74]
GOLGA4 subfamily a, 5	セラミドの輸送	[74]
EEA1	初期エンドソーム要素の繋ぎ止め	[74]
CG1574-PA	(不明)	[74]
chromosome 6 open reading frame 142	(不明)	[74]
sushi-repeat-	(不明)	[74]
Hypothetical protein LOC55086	(不明)	[74]
S100A8	好中球の活性化、アラキドン酸輸送	[74, 121]
INPPL1	B 細胞, 肥満細胞、ランゲルハンス細胞の活性化	[74, 121]
SCCA-2	キモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害	[74]
SAA3	急性反応性蛋白	[74]
Serum amyloid A protin ( <i>Canis familiaris</i> )	急性反応性蛋白	[74]
SAA	急性反応性蛋白	[74, 121]
TIMP1	細胞外基質分解を抑制	[74]
similar to RAD50 homologue isoform 1	(不明)	[74]
CIDE-3	脂肪細胞の分化	[74]
sperm-associated antigen 5 (Astrin)	染色体有糸分裂紡錘体関連蛋白質	[74]
Mucin-15	粘液の主成分	[74]
hypoxia-induced gene 1	(不明)	[74]
DPP4/CD26	T 細胞表面抗原/セリンプロテアーゼ	[121]
SPINK5	セリンプロテアーゼ阻害	[121]
SGPL1	細胞遊走や細胞分化に関与する S1P を切断により制御	[121]
PPAR $\gamma$	NF- $\kappa$ B 活性化抑制による抗炎症作用	[121]
Cullin4A	ユビキチンリガーゼ	[121]



表1-3 ケラチノサイトで発現する自然免疫および獲得免疫に関連するサイトカイン

分子名	機能	参考文献
TNF- $\alpha$	前炎症性サイトカイン、内皮細胞や好中球の活性化、細胞のアポトーシス誘導	[1,21,29,37]
IFN- $\gamma$	マクロファージおよび樹状細胞の活性化	[1,29]
IL-1	前炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化	[1,21,29,37]
IL-12	TH1 細胞への分化誘導、NK 細胞および T 細胞に対する IFN- $\gamma$ 合成誘導	[1,21,29,37]
IL-6	抗体産生細胞の増殖促進	[1,21,29,37]
IL-8/CXCL8	好中球遊走因子	[1,21,26]
IL-7	B 細胞の前駆細胞の増殖促進	[21,29,37]
IL-10	マクロファージおよび樹状細胞の IL-12 産生抑制、MHC II 発現促進	[1,21,29,37]
IL-15	NK 細胞および T 細胞の増殖促進	[1,21,29,37]
IL-18	NK 細胞および T 細胞の IFN- $\gamma$ 合成誘導	[1,21,29,37]
TGF- $\beta$	T 細胞の増殖および機能の抑制、形質細胞の IgA 産生抑制	[1,21,29,37]
CCL2/MIP-1	CCR2 を発現する単球の遊走因子	[29]
CCL5/RANTES	CCR1, CCR3, CCR5 を発現する白血球の遊走因子	[1,21,37]
CCL7/MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3 を発現する単球、好酸球および好塩基球の遊走因子	[29]
CCL8/MCP-2	CCR1, CCR2 を発現する肥満細胞、好酸球、好中球、単球、T細胞の遊走因子	[29]
CCL11/Eotaxin	CCR3 を発現する好酸球、好塩基球、T細胞の遊走因子	[29]
CCL12/MCP-5	CCR2 を発現する単球、好酸球の遊走因子	[29]
CCL13/MCP-4	CCR2, CCR3 を発現する単球、好酸球、好塩基球、T細胞の遊走因子	[29]
CCL17/TARC	CCR4 を発現する TH2 細胞および好塩基球の遊走因子	[1,21,29]
CCL20/MIP-3 $\alpha$	単球系細胞の遊走因子	[1,21,29]
CCL22/MDC	CCR4 を発現する単球やヘルパーT細胞の遊走因子	[29]
CCL27/CTACK	真皮細胞の遊走因子	[1,21,29]
CXCL9/Mig	エフェクター細胞の遊走因子	[1,21,29]
CXCL10/IP10	エフェクター細胞の遊走因子	[1,21,29]
CXCL11/IP9	エフェクター細胞の遊走因子	[1,21,29]
$\alpha$ -MSH	抗炎症作用	[21]
PGE2	炎症、発熱、発痛	[1,21,29]
GM-CSF	単球、顆粒球および樹状細胞の分化、活性化および増殖	[21,29]
SCF	幹細胞成長因子	[1,21,29]

表1-4 定量リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー

分子名	Primer Sequence (5'-3')		Genebank Accession Number
	Forward	Reverse	
<b>AQP3</b>	GGCTTCCTCACCATCAACC	CTCGCGTGCCAAGAAACA	XM_849503
<b>CCL17</b>	GGCTGACAAGGTGGTACAAGACTTC	CAGATGGACTTGCCTTGGACAG	NM_001003051
<b>DPP4/CD26</b>	AGTGGCGTGTTCAAGTGTGG	TCAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG	XM_535933
<b>IL-8</b>	CTTCCAAGCTGGCTGTTGCTC	TGGGCCACTGTCAATCACTCTC	NM_001003200
<b>S100A2</b>	TGATGGTCTCCACCTTCCAC	AAGTGICTTCATCTCCGCCTTG	XM_850065
<b>S100A8</b>	ACCATGCTGACGGAAGTGGAG	CTTGAACCAGGTGTCTGCATC	DR104918
<b>SAA1</b>	TTGTGCTCCCTGGTCCTG	GAGTAGGCTCTCCACATGICTCT	NM_001003050
<b>TIMP1</b>	GGACACTTGCAGATCAACACC	AGGGGATGGATGAACAGGTAAA	NM_001003182
<b>SPINK5</b>	GCTGAATCCAGAACAAGAGCTAA	TGTGCCCAGCAGCATTTC	NM_001025397
<b>SGPL1</b>	TGGAGAAGCTCAAGGAATACAGC	GCTCCAGGCAAAATCTCCA	XM_546150
<b>IL-15</b>	TCCATCCAGTGCTACTTGTGTTTA	ATTTGCCTCTGTTTTGGGAAG	XM_844053
<b>CCL2</b>	TCCTCTGCCTGCTGCTCATAG	GCAGCAGGTGACTGGAGAAATAA	NM_001003297
<b>CCL20</b>	CTCTTGGCTGCTTTGATGATG	TGGCCAGCTGTTGTGTGAA	NM_001005254
<b>TGF-<math>\beta</math>2</b>	GTGGGAAGACCCACATCTC	AAGTGGACGTAGACAGCAATTATCC	XM_853503
<b>GM-CSF</b>	GATGGCCAATCACTATAAGCAGCA	TGACTGGTTTCCAGCAGTCAAAG	NM_001003245
<b>GAPDH</b>	CATTGCCCTCAATGACCACT	TCCTTGAGGCCATGTAGAC	NM_001003142

表1-5 発現増加および発現低下を示した遺伝子数

発現変動比	24時間後	48時間後
8倍以上	26	65
増 4倍以上8倍未満	58	179
加 2倍以上4倍未満	603	1566
小計	687	1810
1/2以下1/4未満	623	1659
減 1/4以下1/8未満	29	247
少 1/8以下	5	32
小計	657	1938
合 計	1344	3748

表1-6 ヒトAD病変部において発現変化している遺伝子群についての解析

分子名	Genbank Accession Number	リアルタイムPCR			
		マイクロナレイ	24時間後	48時間後	24時間後
Aquaporin 3	PREDICTED AQP3 XM_849503	<b>8.725 **</b>	<b>2.263 **</b>	<b>14.152 **</b>	<b>2.168 **</b>
Carbonic anhydrase II	PREDICTED CA2 XM_535117	0.530	1.296	NA	NA
CCL17	CCL17 NM_001003051	0.547	0.127 *	<b>0.474 *</b>	<b>0.132 *</b>
CCL27	CCL27 NM_001003968	1.144	0.672	NA	NA
Dipeptidyl peptidase 4 / CD26 partial Collagen VI-alpha1	PREDICTED DPP4 XM_535933	ND	<b>4.882 **</b>	1.055	1.406
IL-8	COL6A1 A1388539	1.076	1.066	NA	NA
	IL8 NM_001003200	<b>2.143 **</b>	<b>11.486 **</b>	<b>3.084 **</b>	<b>19.973 **</b>
		<b>2.389 **</b>	<b>12.149 **</b>		
		<b>2.185 **</b>	<b>8.562 **</b>		
		<b>2.123 **</b>	<b>11.860 **</b>		
Cysteine-rich protein 1	CRIP1 DR104583	0.988	1.102	NA	NA
Fibronectin (Fragment)	U52105	0.836	0.964	NA	NA
	U16207	0.831	0.604		
	XM_536059	0.859	0.817		
Keratin, type II cytoskeletal 5	PREDICTED KRT5 XM_855013	1.157	0.800	NA	NA
		1.101	<b>0.375 *</b>		
		1.007	<b>0.288 *</b>		
		1.063	<b>0.373 *</b>		
keratin 10	KRT10 NM_001013425	<i>1.666</i>	<b>4.198 **</b>	NA	NA
Keratin, type I cytoskeletal 16	PREDICTED KRT16 XM_548101	0.919	0.771	NA	NA
Lymphocyte-specific protein 1 isoform 1	PREDICTED LSP1 XM_849236	0.795	0.627	NA	NA
N-myc downstream regulated gene 1	PREDICTED NDRG1 XM_539170	1.421	1.411	NA	NA
		1.388	1.321		
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	PREDICTED SERBP1 XM_536673	0.989	0.629	NA	NA
		0.657	0.567		
S100 calcium-binding protein A2	PREDICTED S100A2 XM_850065	0.751	<b>0.318 *</b>	0.831	<b>0.279 *</b>
		1.104	<b>0.462 *</b>		
S100 calcium binding protein A8	S100A8 DR104918	1.113	<b>0.468 *</b>	<b>2.223 **</b>	0.559
S100 calcium-binding protein A9	PREDICTED S100A9 XM_547585	1.102	0.766	NA	NA
		1.123	0.771		
Tenascin precursor, transcript variant 1	PREDICTED TNC XM_538811	ND	1.065	NA	NA
vanin 1	VNN1 NM_001003372	0.757	ND	NA	NA

\* : 1/2倍以下の発現低下 \*\* : 2倍以上の発現増加  
 ND: 検出されず NA: 実施せず 斜体: 抗原添加群のみ発現

表1-7 CAD 病変部において発現変化する遺伝子群についての解析

分子名	マイクロアレイ				リアルタイムART-PCR			
	Genbank Accession Number	遺伝子名	24時間後	48時間後	24時間後	48時間後	24時間後	48時間後
Downregulated in ovarian cancer 1 isoform 2	XM_535715	PREDICTED FILIPIL	<b>2.195</b> **	<b>15.024</b> **	NA	NA	NA	NA
Kinectin 1	XM_537455	PREDICTED KTN1	1.035	1.766	NA	NA	NA	NA
			1.493	1.621				
			1.141	1.655				
	1.165	1.209						
Myosin-5A (Myosin Va)	XM_535487	PREDICTED MYO5A	0.870	0.834	NA	NA	NA	NA
A-kinase anchor protein 9 isoform 2	XM_532456	PREDICTED AKAP9	<b>1.883</b>	<b>0.467</b> *	NA	NA	NA	NA
Early endosome antigen 1	XM_532649	PREDICTED EEA1	0.876	0.717	NA	NA	NA	NA
			1.113	1.203				
			1.030	1.019				
sushi-repeat-containing protein	XM_549134	PREDICTED SRPX2	0.633	0.512	NA	NA	NA	
Inositol polyphosphate phosphatase-like 1	XM_542327	PREDICTED INPPL1	1.782	<b>2.177</b> **	NA	NA	NA	NA
			1.155	1.216				
			<b>2.672</b> **	<b>2.446</b> **				
	0.537	<b>3.651</b>						
	1.609	<b>2.398</b> **						
Serum amyloid A protein	NM_001003050	SAA1	<b>3.679</b> **	<b>5.664</b> **	ND	ND	ND	ND
S100 calcium binding protein A8	DR104918	S100A8	1.113	<b>0.468</b> *	<b>2.223</b> **	<b>0.559</b>	<b>0.559</b>	
TIMP metalloproteinase inhibitor 1	NM_001003182	TIMP1	1.379	0.765	<b>3.178</b> **	<b>1.162</b>	<b>1.162</b>	
			1.236	0.841				
Dipeptidyl peptidase 4 / CD26	XM_535933	DPP4	ND	<b>4.882</b>	1.055	1.406	1.406	
Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	NM_001025397	SPINK5	1.992	<b>2.220</b> **	<b>0.166</b> *	<b>172.01</b> **	<b>172.01</b> **	
			1.719	<b>2.448</b> **				
			<b>3.890</b> **	<b>2.390</b> **				
	<b>2.017</b> **	<b>2.269</b> **						
Sphingosine-1-phosphate lyase 1	XM_546150	PREDICTED SGPL1	1.323	<b>3.407</b>	<b>2.075</b> **	<b>1.08</b>	<b>1.08</b>	
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001024632	PPARG	0.735	0.755	NA	NA	NA	
			0.880	1.083	NA	NA	NA	
cullin 4A isoform 1	XM_844449	PREDICTED CUL4A	0.916	1.023	NA	NA	NA	
			0.977	1.044	NA	NA	NA	

\* : 1/2倍以下の発現低下      \*\* : 2倍以上の発現増加  
 ND: 検出されず      NA: 実施せず      斜体: 抗原添加群のみ発現

表1-8 ケラチノサイトにおいて発現する自然免疫および獲得免疫に関するサイトカイン

分子名	遺伝子名	Genbank Accession Number	マイクロアレイ				リアルタイム RT-PCR			
			24時間後	48時間後	24時間後	48時間後	24時間後	48時間後		
Tumor necrosis factor	TNF	NM_001003244	ND	0.823	NA	NA	NA	0.823	NA	
			ND	1.890				1.890		
Interleukin 12A (IL-12, p35)	IL12A	NM_001003293	1.747	1.775	NA	NA	NA	1.747	1.775	
Interleukin 12B (IL-12, p40)	IL12B	NM_001003292	ND	ND	NA	NA	NA	ND	ND	
Interleukin 8	IL8	NM_001003200	<b>2.143</b> **	<b>11.486</b> **	<b>3.084</b> **	<b>3.084</b> **	<b>19.973</b> **	<b>2.389</b> **	<b>12.149</b> **	
			<b>2.185</b> **	<b>8.562</b> **				<b>2.185</b> **	<b>8.562</b> **	
			<b>2.123</b> **	<b>11.860</b> **				<b>2.123</b> **	<b>11.860</b> **	
Interleukin 7	IL7	NM_001048138	ND	ND	NA	NA	NA	ND	ND	
			1.144	0.870				1.144	0.870	
Interleukin-15 (Fragment)	IL15	AF479882	1.985	<b>2.025</b> **				1.985	<b>2.025</b> **	
Interleukin 15	PREDICTED IL15	XM_844053	1.642	1.751	<b>2.199</b> **	<b>2.199</b> **	1.096	1.642	1.751	
Interleukin 18	IL18	NM_001003169	0.835	0.622	NA	NA	NA	0.835	0.622	
			0.840	0.601				0.840	0.601	
CCL2	CCL2	NM_001003297	<b>3.755</b> **	<b>4.388</b> **	<b>6.376</b> **	<b>6.376</b> **	<b>28.470</b> **	<b>3.755</b> **	<b>4.388</b> **	
CCL17	CCL17	NM_001003051	0.547	<b>0.127</b> *	<b>0.474</b> *	<b>0.474</b> *	<b>0.132</b> *	0.547	<b>0.127</b> *	
CCL20	CCL20	NM_001003254	ND	<b>19.046</b> **	<b>9.530</b> **	<b>9.530</b> **	<b>12.424</b> **	ND	<b>19.046</b> **	
CCL27	CCL27	NM_001003968	1.144	0.672	NA	NA	NA	1.144	0.672	
Transforming growth factor, beta 1	TGFB1	NM_001003309	1.041	1.020	NA	NA	NA	1.041	1.020	
			1.043	1.028				1.043	1.028	
Transforming growth factor beta 2 (Fragment)	TGFB2	XM_853503	1.180	<b>2.050</b> **	1.806	1.806	<b>3.778</b> **	1.180	<b>2.050</b> **	
		DQ525400	1.530	<b>2.170</b> **				1.530	<b>2.170</b> **	
Granulocyte-macrophage colony stimulating factor	CSF2	NM_001003245	<b>2.474</b> **	<b>6.806</b> **	<b>2.278</b> **	<b>2.278</b> **	<b>9.996</b> **	<b>2.474</b> **	<b>6.806</b> **	
			ND	<b>4.213</b> **				ND	<b>4.213</b> **	

\*: 1/2倍以下の発現低下      \*\*: 2倍以上の発現増加

ND: 検出されず      NA: 実施せず      斜体: 抗原添加群のみ発現

## 第 2 章

ハウスダストマイトに含まれるシステインプロテアーゼを介した  
イヌケラチノサイトにおける GM-CSF 産生に関する検討

## 2.1. 序論

GM-CSFは、顆粒球、単球、樹状細胞およびランゲルハンス細胞などの分化および成熟を促進するサイトカインとして発見された[16]。現在では、ヒトにおいて好酸球の活性化を促進させることも明らかとなっており[116]、炎症性サイトカインとして様々な疾患の病態に関与しているものと考えられている。

本分子は、ヒトの関節リウマチ、炎症性腎疾患、喘息および慢性閉塞性肺疾患など、複数の炎症の素因に関与していると考えられている[76]。関節滑膜炎を主病変とする自己免疫性疾患であるヒトのリウマチにおいては、滑膜内血管周囲に抗原提示能を有する樹状細胞が出現し、B細胞およびT細胞の活性化が生じている[24]。リウマチに対する抗GM-CSF受容体抗体であるMavrilimumab (Medimmune、Gaithersburg、MD)の投与によって臨床症状が改善することから[17]、GM-CSFが本疾患の病態に深く関与しているものと思われる。アレルギー性疾患では、環境抗原に対するIgE抗体の産生に関わる樹状細胞、T細胞およびB細胞が関与している点でリウマチの病態に類似している。樹状細胞の分化、成熟および活性化による抗原提示能の賦活にGM-CSFが重要であることから[120]、これらの疾患において増加するGM-CSFは抗体産生にいたる極めて初期の病態に関与している可能性がある。GM-CSFの主要な産生細胞として、T細胞およびマクロファージが存在するが、ヒトAD患者から採取した表皮ケラチノサイトの初代培養においては、健常者由来のケラチノサイトに比べてPMAによって誘導されるGM-CSF産生量が有意に増加したことが示されていることから[92]、ケラチノサイトが産生するGM-CSFがADの病態に関与している可能性は高い。

Der fおよびDer pはヒトおよびイヌのADにおける主要な環境アレルゲンである。特にDer fは、イヌのADにおいて、最も多く感作が認められるHDMであることが示されている[46]。Der fの主要なアレルゲンタンパクであるDer f 1はパパイ



ン様システインプロテアーゼであり[28]、本分子の有するタンパク質分解活性は、HDMのアレルゲン性と関連することが示唆されている[75]。ヒトの正常皮膚のケラチノサイトにおいては、HDMアレルゲン刺激によってGM-CSF産生が促進され、その産生はプロテアーゼ阻害剤によって抑制されたことから[88]、HDMアレルゲンのタンパク質分解活性がGM-CSF産生に重要であると考えられている。第1章の結果より、犬においてもHDMアレルゲンによってケラチノサイトにおけるGM-CSF mRNAの転写が誘導されたことから、ケラチノサイトから産生されたGM-CSFが犬のアレルギー性炎症を誘導している可能性が考えられた。しかしながら、GM-CSFのタンパクレベルにおける発現については検討されていないため、本章では、Der fの添加によってケラチノサイトからGM-CSFタンパクが産生されるかについて検討した。

## 2.2. 材料と方法

### 2.2.1. 材料

イヌ表皮ケラチノサイトの細胞株であるCPEKとその培養液CnT-09は、CellnTEC advanced cell systemから購入した。また、無血清培地Opti-MEM I (Invitrogen) および継代培養時の細胞剥離にTrypLE Express (Invitrogen) を使用した。DPBS およびシステインプロテアーゼ阻害剤であるTrans-Epoxy succinyl- L-Leucylamido- (4-Guanidino) Butane (E-64) はSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手した。HDMとしてのDer fの抽出物は、Greer Laboratories (Lenoir, NC) から販売されているものを用いた。

### 2.2.2. 細胞培養

5回から10回継代したCPEKを10 mLのCnT-09に浮遊させ、37°C、5% CO<sub>2</sub>の環境下で75 cm<sup>2</sup>フラスコ (NUNC) を用いて培養した。80%コンフルエントに達した段階で、培養液を除去し、10 mLのDPBSで細胞を洗浄した。TrypLE Expressを3 mL加えた後、5-10分間 37°C下に静置して細胞を剥離した。CnT-09を7 mL加え、約80%の細胞が剥離し、浮遊したことを確認した後、細胞浮遊液を15 mL centrifuge tube (NUNC) に回収し、室温で 180 G、5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞塊をCnT-09を用いて再懸濁した。再懸濁した細胞浮遊液(2×10<sup>4</sup>/mL)を1 mLずつ24-well plates (NUNC) に分注し、80%コンフルエントに達するまで 37°C 5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。その後、培養液をOpti-MEM Iに変更し、無血清下で24時間培養し、Der fの添加実験を行った。

添加したDer fは主要アレルゲンであるDer f 1の含有量が明確な乾燥凍結品で、Der f 1として10 µg/dLとなるよう、DPBSで溶解した。Der f 1溶解液 (0.1, 1およ

び10 µg/mL) またはDPBSを10 µLずつ各ウェルに添加し、24または48時間培養した。

プロテアーゼ阻害剤の添加実験では、DPBSで溶解したE-64溶解液をDer f 1溶解液に加えて、37°Cで15分間処理した。CPEKから無血清培養液を除去し、Der f 1 (10 µg/mL) およびE-64 ( $10^{-7}$  ~  $10^{-9}$  M) を添加した培養液に変更し、37°C 5%CO<sub>2</sub>下で48時間培養した。

### 2.2.3. 細胞生存率

プロテアーゼ阻害剤およびDer fの添加が細胞の形態および生存率に与える影響を評価するために、CPEKにそれぞれを添加して48時間培養した後、細胞形態を倒立顕微鏡下で観察するとともに、Trypan blue 0.4% (Sigma-Aldrich) を用いて、細胞生存率を検討した。

### 2.2.4. 培養上清におけるGM-CSF濃度

CPEKをDer fまたはE-64およびDer fの存在下で24時間または48時間培養した後、培養上清を回収し、ただちに-80°Cで凍結保存した。培養上清中のGM-CSF濃度は DuoSet® Canine GM-CSF ELISA kit (R&D System, Minneapolis, MN) を用いて測定した。標準曲線は、Der fまたはE-64およびDer fを加えた培養上清にキットに付属のリコンビナントイヌGM-CSFを希釈して作成した。

### 2.2.5. 統計

独立した実験を3回実施し、培養上清におけるGM-CSF濃度の平均値を算出した。各Der f濃度におけるGM-CSF産生量の有意差を評価するためにTukey-KramerのHSD検定を用いた。プロテアーゼ阻害実験では、E-64を添加していないDer f添加群を対照としたDunnett 検定を用いた。統計学的有意差は  $P < 0.01$  と定義し

た。解析には、統計ソフト JMP version 5.1.2 (SAS institute, Cary, NC) を使用した。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. CPEKの細胞形態と生存率

Der fおよびE-64の存在下においても、細胞の形態は無添加群と相違なく紡錘形を示し、細胞間およびシャーレ底部への接着性も維持されていた(図2-1)。また、いずれの条件においても、細胞生存率は79.7~84.6%であり、Der fおよびE-64添加の影響は認められなかった(図2-2)。

### 2.3.2. Der f添加によるケラチノサイトのGM-CSF産生

培養24時間後における培養上清中のGM-CSF濃度は、無添加群が  $2.042 \pm 2.095$  pg/mL、Der f 1添加  $1 \mu\text{g/mL}$ 群が  $5.273 \pm 6.371$  pg/mL、Der f 1添加  $10 \mu\text{g/mL}$ 群では  $21.733 \pm 18.551$  pg/mLであった。培養48時間後において各群の培養上清中のGM-CSF濃度は増加傾向を示し、無添加群が  $5.214 \pm 3.985$  pg/mL、Der f 1添加  $1 \mu\text{g/mL}$ 群では  $40.156 \pm 11.131$  pg/mL、 $10 \mu\text{g/mL}$ 群では  $70.415 \pm 19.169$  pg/mLであった。統計解析の結果、CPEKのGM-CSF産生は、Der f 1の濃度および培養時間に依存して有意に増加することが明らかとなった(図2-3)。

### 2.3.3. システインプロテアーゼによるGM-CSF産生の抑制

Der f 1を介したケラチノサイトのGM-CSF産生は、E-64を $10^{-7}$  Mの濃度で添加した場合でのみ抑制され、 $10^{-8}$  M以下の濃度では対照群(Der f 1のみ)との有意差は認められなかった(図2-4)。

## 2.4. 考察

本研究の結果から、Der f はイヌのケラチノサイトに対しても GM-CSF の産生を誘導することが明らかとなった。また、GM-CSF の産生はシステインプロテアーゼ阻害剤によって抑制されたことから、産生機構には Der f のプロテアーゼ活性が関与していると思われた。Der f にはシステインプロテアーゼである Der f 1 が含まれており、CPEK における GM-CSF の産生において主要な役割を果たしていると考えられた。HDM の抗原タンパクである Der f 1 は、屋内の埃 1 g 中においては 平均  $2.25 \pm 4.97 \mu\text{g}$  存在しており、多いところでは  $30 \mu\text{g}$  以上存在する場合もある[99]。また、CAD 罹患犬を飼育する家屋内の埃に存在する Der f は、飼育犬が CAD に罹患していない家庭とくらべて多いことが示されていることから[31]、本研究で用いた Der f 1 濃度 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) は、実際の環境中とほぼ同程度の濃度であると考えられた。

HDM 特異的 IgE の産生に先立ち、抗原提示細胞による抗原捕捉とリンパ球への抗原提示が必要である。表皮における抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞は、未分化状態で表皮に存在し、刺激によって活性化し、MHC class II を発現して抗原を提示する[69]。活性化したランゲルハンス細胞は、表皮のタイトジャンクションを認識し、分枝を角層方向に伸長することによって抗原を捕捉することがマウスにおいて明らかにされている[69]。このように GM-CSF はランゲルハンス細胞の分化および抗原捕捉能の活性化に重要な分子である。GM-CSF の主要産生細胞は T 細胞やマクロファージなどであるが、本研究の結果から、抗原侵入の極めて早期の段階において隣接するケラチノサイトから産生される可能性が高まった。ヒトにおいては、PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 刺激に対する表皮ケラチノサイトの GM-CSF 産生の量が AD 患者と健常者において異なることが *in vitro* で示されている[92]。したがって、

GM-CSF 産生メカニズムを明らかにすると同時に、健常犬と CAD 罹患犬のケラチノサイトにおける GM-CSF 産生量または産生メカニズムの比較検討、ならびに遺伝子変異の有無について検討が、CAD の病態解明のみならずケラチノサイトを標的とした CAD に対する新規治療法の開発に有用であると思われた。

システインプロテアーゼを介した CPEK の活性化機序として、Protease activated receptor (PAR) の関与が考えられる。PAR は特定のプロテアーゼによって特異的に活性化される三量体 G タンパク共役の 7 回膜貫通型受容体である。現在までに 4 つの PAR ファミリーが同定されており、このファミリーの一つである PAR-2 は生体内に広く分布し、表皮基底層のケラチノサイトにおいても発現していることが示されている[49]。PAR-2 の細胞膜外に露出している N 末端側ペプチド鎖はトリプシン、トリプターゼまたは血液凝固第 VIIa、Xa 因子等のプロテアーゼによって切断される。切断された N 末端は Tethered ligand として PAR-2 分子の細胞外第 2 ループに結合し、シグナルが伝達される。PAR-2 は主にセリンプロテアーゼによって活性化されると考えられてきたが、近年、ヒトの細胞株においてシステインプロテアーゼによっても活性化されることが明らかとなったことから[100]、Der f 1 による CPEK の活性化に PAR-2 が関与している可能性が考えられた。

ヒトのケラチノサイトにおける GM-CSF の産生は、核内転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) を介して生じることが示されている[54]。NF- $\kappa$ B は PAR-2 を介しても活性化することが示されていることから[56]、Der f 刺激による GM-CSF 産生においても同様のメカニズムが関連している可能性があると考えられた。また、リンパ球における GM-CSF 産生には、転写因子 nuclear factor activated T-cell (NFAT) の核内移行および Activator protein-1 (AP-1) との結合が重要であることが報告されており[51]、ヒトケラチノサイトにおいては、NFAT を介したシグナル伝達経路が存在していることも示されている[2, 3]。

したがって、第三章では GM-CSF の産生におけるシグナル伝達経路を明らかにすることを目的として、PAR-2 を介した NFAT の活性化と GM-CSF の産生について検討することとした。



2.5. ☒

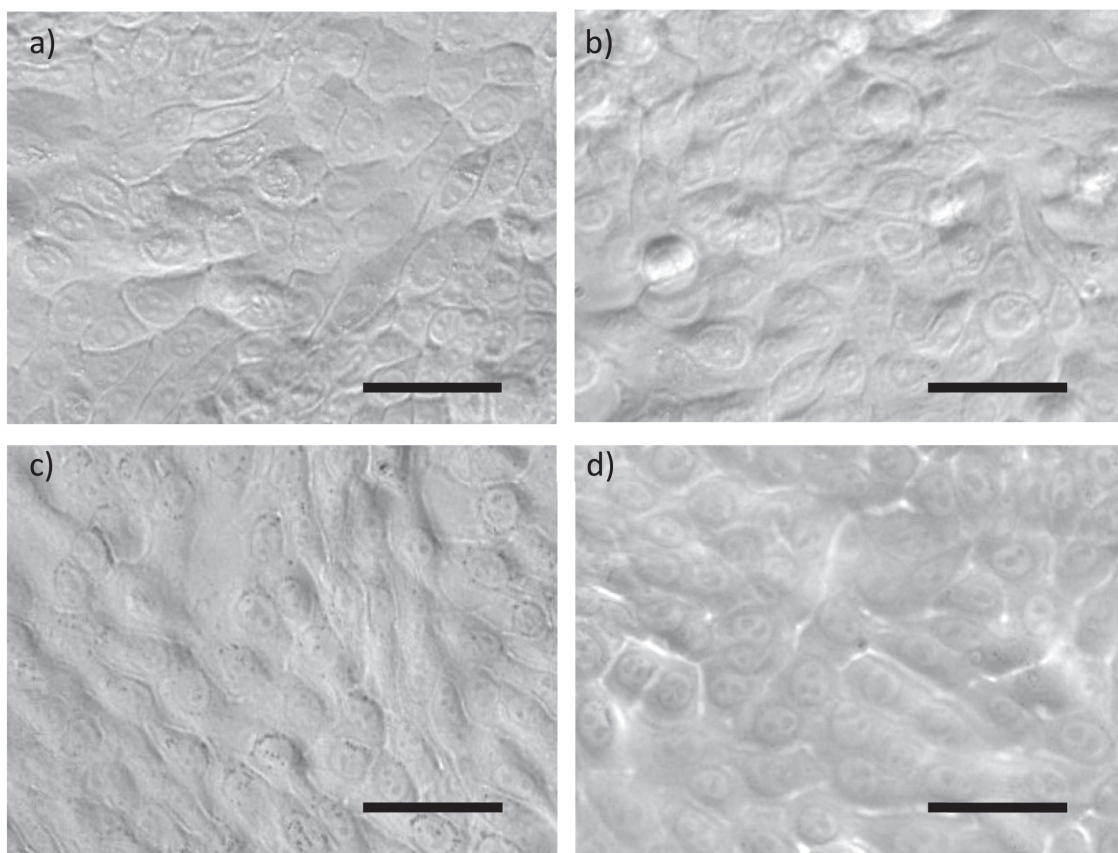


図 2-1 Der f および E-64 の添加培養における細胞形態 (48 時間後)

a) DPBS のみ、b) Der f 1 (10 $\mu$ g/mL)、c) E-64 (10 $^{-5}$  M)、d) Der f 1 (10 $\mu$ g/mL) および E-64 (10 $^{-5}$  M)。バーは 20 $\mu$ m を示す。

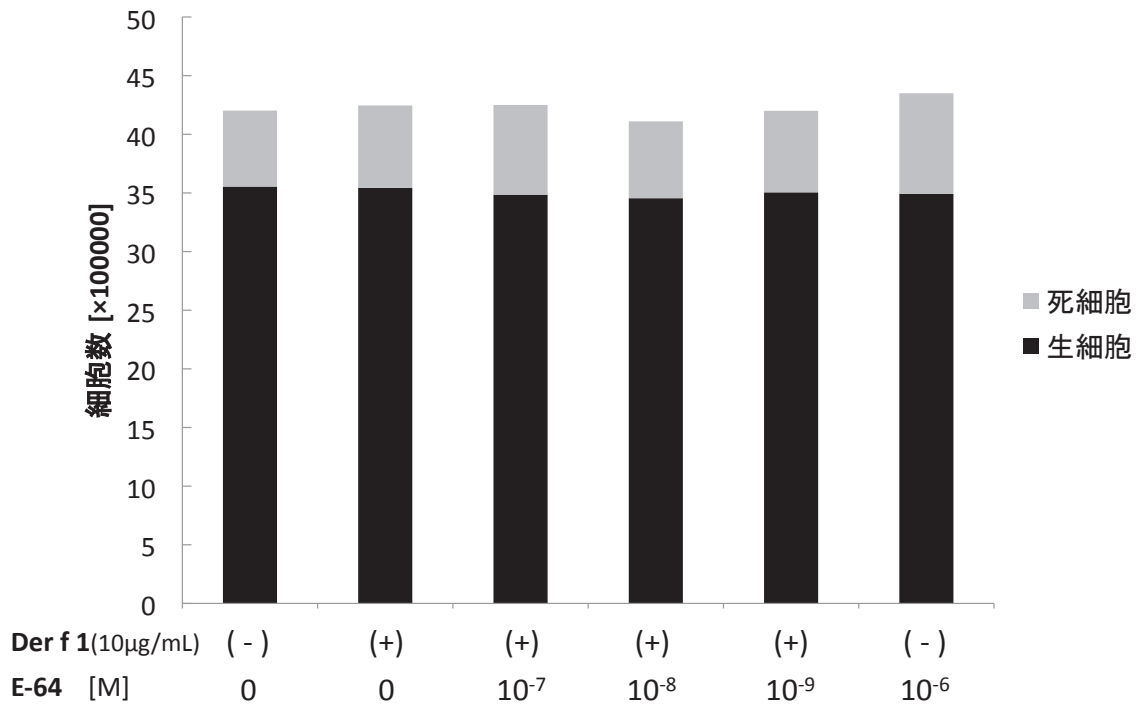


図 2-2 Der f および E-64 添加培養における細胞生存数 (48 時間後)

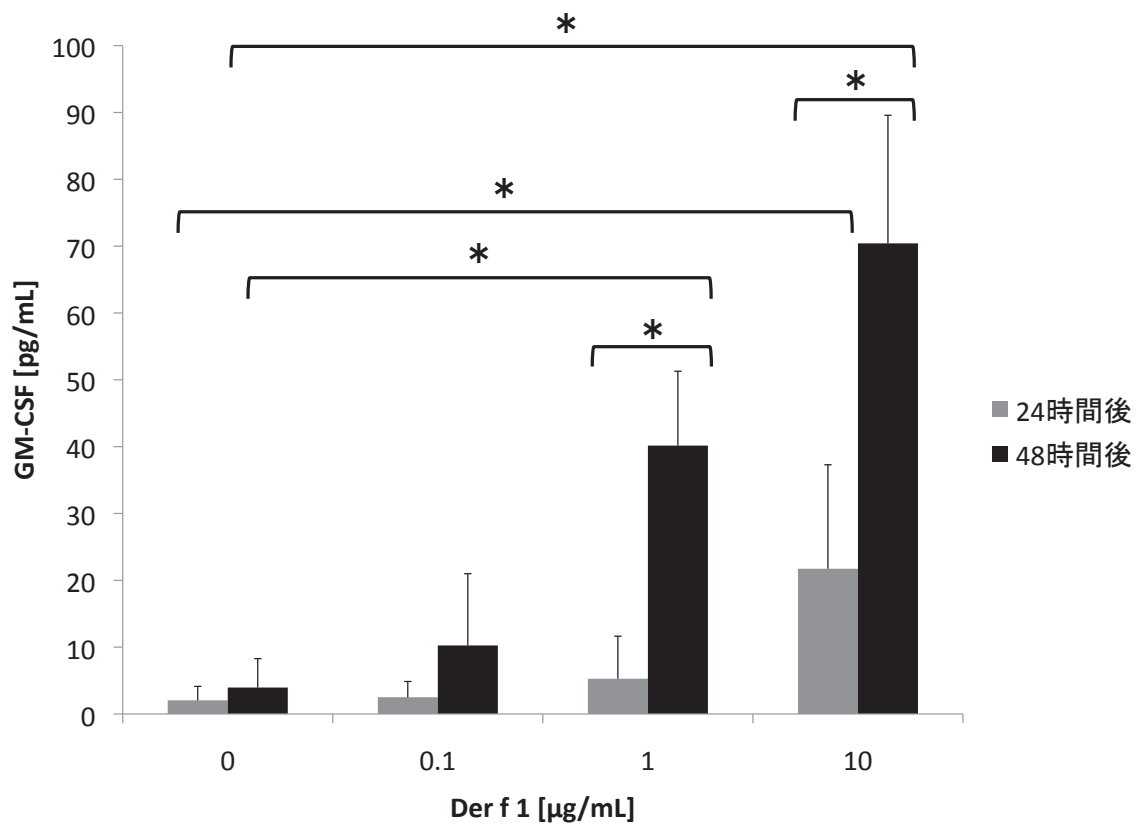


図 2-3 Der f 添加培養における CPEK の GM-CSF 産生

3 回の独立した実験の平均 +S.D.を示す。\* :  $P < 0.01$  (Tukey-Kramer's HSD Test)

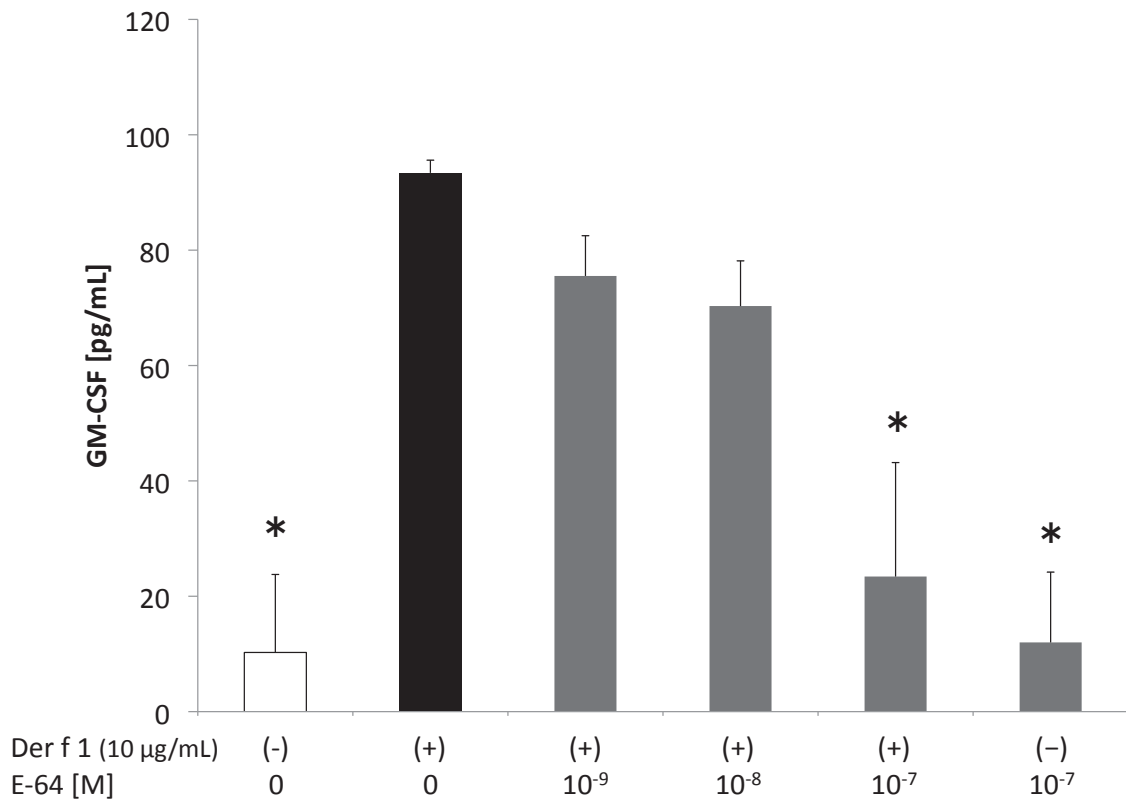


図 2-4 GM-CSF 産生におけるシステインプロテアーゼ阻害剤の抑制効果

3回の独立した実験の平均 + S.D.を示す。\* :  $P < 0.01$  (Der fのみを添加した群を対照とした Dunnet's Test)

## 第3章

### システインプロテアーゼを介したイヌケラチノサイトにおける GM-CSFの産生とNFATの関与

### 3.1. 序論

ケラチノサイトは表皮の95%以上を占める構成細胞であり、様々なサイトカインを産生することによって、皮膚の炎症や免疫反応に関与している[4, 29]。ケラチノサイトにおいて産生されるサイトカインの中でも、IL-1、IL-8、CCL17およびTSLPは、アレルギー性皮膚疾患の病態において重要なサイトカインである。LPSで活性化されたヒトのケラチノサイトはNF- $\kappa$ Bおよび extracellular signal-regulated kinase (ERK) を介してIL-1 $\beta$ およびIL-8を産生することが示された[70]。イヌの表皮ケラチノサイト細胞株であるCPEKにおいては、TNF- $\alpha$ の刺激によってp38がリン酸化され、CCL17 mRNAの転写が誘導される[111]。カリクレイン5を介したケラチノサイトからのTSLPの産生にはPAR-2とその下流に存在するNF- $\kappa$ Bの活性化に関与している[13]。このように、ケラチノサイトにおいては、外部からの様々な刺激に応じて、それぞれ異なるシグナル伝達経路が活性化され、サイトカインが産生される。

前章においてイヌケラチノサイトからの産生が明らかとなったGM-CSFもアレルギーの免疫病態に関与する分子である。ヒトのリンパ球においては、PMAを介したGM-CSFの産生にNFATの活性化に関与していることが示されている[51]。近年、ヒトケラチノサイトにおいても、NFATが存在し[2, 3]、シクロオキシゲナーゼ-2の産生に関連して活性化することが明らかにされている[34]。しかし、ケラチノサイトにおけるGM-CSFの産生とNFATの関連性は検討されていない。

そこで、本章では、システインプロテアーゼで活性化されたイヌのケラチノサイトの GM-CSF産生においてNFATが関与しているかを検討した。前章までHDMを用いてきたが、天然抽出物の入手が困難となったことから、本症ではHDM同様にシステインプロテアーゼ活性を有するパパインを用いた。パパインは、マウスのTh2細胞および樹状細胞の分化を促進するほか[118]、PAR-2 を介して、ヒ

トのケラチノサイトを直接活性化させることが示されている[100]。そこで、本章では、パパインを介したイヌケラチノサイト細胞株（CPEK）からのGM-CSFの産生をELISAによって確認後、ルシフェラーゼアッセイを用いて、NFATの核内移行について評価した。さらに、シクロスポリン（Ciclosporine, CsA）を用いた阻害実験によってCPEKのGM-CSF産生におけるNFATの関与の程度について検討した。



## 3.2. 材料と方法

### 3.2.1. 材料

イヌ表皮ケラチノサイトの細胞株であるCPEKとその培養液CnT-09は、CellnTEC advanced cell systemから購入した。また、無血清培地Opti-MEM I (Invitrogen) および継代培養時の細胞剥離にトリプシン処理剤TrypLE express (Invitrogen) を使用した。DPBS、システインプロテアーゼであるパパインおよびシステインプロテアーゼ阻害剤である Trans-Epoxy succinyl- L-Leucylamido-(4-Guanidino) Butane (E-64) はSigma-Aldrichから入手した。

### 3.2.2. 細胞培養

5回から10回継代したCPEKを10 mLのCnT-09に浮遊させ、37°C、5% CO<sub>2</sub>の環境下で75 cm<sup>2</sup>フラスコ (NUNC) を用いて培養した。80%コンフルエントに達した段階で、培養液を除去し、10 mLのDPBSで細胞を洗浄した。TrypLE Expressを3 mL加えた後、5-10分間 37°C下に静置し、細胞を剥離した。CnT-09を7mL加え、約80%の細胞が剥離し、浮遊したことを確認した後、細胞浮遊液を15 mL centrifuge tube (NUNC) に回収し、室温で 180 G、5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞塊をCnT-09で再懸濁した。再懸濁した細胞浮遊液(2×10<sup>4</sup>/mL)を1 mLずつ24-well plates (NUNC) に分注し、80%コンフルエントに達するまで 37°C 5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。その後、培養液をOpti-MEM Iに変更し、無血清下で24時間培養した後、パパインの添加を行った。DPBS を用いてパパインの希釈溶液を (10<sup>-8</sup> M ~ 10<sup>-3</sup> M) を作製し、10 μL を各ウェルに添加し、24時間培養した。プロテアーゼ阻害実験では、システインプロテアーゼ阻害剤であるE-64を用いた。DPBSで溶解したE-64溶解液をパパイン液に加えて、37°Cで30分間処理した。その後、パパインおよび E-64 溶解液 (10<sup>-8</sup> M ~ 10<sup>-3</sup> M) また

はDPBSを各ウェルの培養液量の1% (10  $\mu$ L) になるように加え、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で24時間培養した。

### 3.2.3. 細胞生存率

パパインおよびE-64の添加が細胞の形態および生存率に与える影響を評価するために、それぞれを添加して24時間培養した後、細胞形態を倒立顕微鏡下で観察するとともに、Trypan blue 0.4% (Sigma-Aldrich) を用いて、細胞生存率を検討した。

### 3.2.4. 培養上清におけるGM-CSF濃度

パパインまたはE-64とパパインの存在下で24時間培養後、培養上清を回収し、ただちに-80°Cで凍結保存した。培養上清中のGM-CSF濃度は DuoSet canine GM-CSF ELISA kit (R&D System) を用いて測定した。標準曲線は、パパインおよびE-64を含む無血清培養液によって希釈したリコンビナントイヌの吸光度を用いて作成した。測定対象となるサンプルには、パパインのタンパク分解活性による捕捉抗体の分解を阻害する目的でE-64 (10<sup>-3</sup> M) を用量比が1%となるように加えた。

### 3.2.5. NFATレポーター遺伝子ルシフェラーゼアッセイ

無血清培養液下で24時間培養したCPEKを用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した。50  $\mu$ L の Opti-MEM Iを用いて、pGL4-luc2P-NFAT-RE-Hygro (Promega, Madison, AL) およびpGL4-luc2P-Hygro (Promega) は0.25  $\mu$ g/wellとなるように、pGL4-hRluc-TK (Promega) は0.025  $\mu$ g/wellとなるようにそれぞれ希釈した。それぞれのベクターをOpti-MEM 50  $\mu$ Lで希釈した Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 2 $\mu$ L/wellと混合し、室温で20分間インキ

ューベートした後、これをトランスフェクション用反応液とした。24-well plate 内の培養液を吸引し、DPBSで洗浄したのちOpti-MEM I 0.5 mL/wellに交換して、トランスフェクション用反応液を100 $\mu$ L/well添加してベクターを導入した（37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、24時間培養）。パパイン、PMA（50  $\mu$ M）およびコントロールとして希釈したDMSOを添加して、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養した。各wellをDPBSで洗浄した後に、Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega）のプロトコルに準じて、Passive Lysis Buffer 100  $\mu$ L/wellを加えて、室温で15分間振盪した。回収した溶液はただちに-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。ルミノメーター用チューブ（Sarstedt）に、同 Assay SystemのLARIIを 50  $\mu$ Lずつ加え、回収した溶液を 10 $\mu$ Lを加えた後、ルミノメーター（BioOrbit）を用いてFirefly luciferaseの発光強度を測定した。また、Stop & Glo Reagent 50  $\mu$ Lも同様に添加し、Renilla luciferaseの発光強度を測定した。相対的ルシフェラーゼ活性は各サンプルの発光強度比（Firefly luciferaseの発光強度/Renilla luciferaseの発光強度）をmockコントロールの発光強度比（Firefly luciferaseの発光強度/Renilla luciferaseの発光強度）で補正して算出し、無添加群とPMAおよびパパイン添加群で比較した。

### 3.2.6. CsA によるケラチノサイトの GM-CSF 産生抑制の検討

飢餓培養後、培養液を除去し、CsA（10<sup>-6</sup> Mまたは10<sup>-7</sup> M）または DMSO を添加した培養液に交換し、30分間、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、パパインまたは PMA を 10  $\mu$ L(各ウェルの培養液量の 1%) 添加した。24時間培養後、直ちに培養上清を回収し、-80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。培養上清中の GM-CSF 濃度は上述した方法で測定した。

### 3.2.7. 統計

独立した実験を 3 回実施し、培養上清におけるGM-CSF濃度の平均値を算出した。統計解析として、パパイン添加実験においてはパパイン無添加群を、プロテアーゼ阻害実験では、E-64を添加していないパパイン添加群を、ルシフェラーゼアッセイについてはDMSOのみを添加した群をそれぞれ対照とした Dunnet検定を用いた。CsA添加によるGM-CSF産生抑制実験においては、パパインまたはPMAに誘導されるGM-CSF産生に対するNFAT核内移行阻害による抑制効果を検討するため、Tukey-KramerのHSD検定を用いて、全ての群間を比較した。統計学的有意差は  $P < 0.05$  と定義した。解析には、統計ソフト JMP version 5.1.2 (SAS institute) を使用した。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 細胞の形態と生存率

パパイン (0.1~20 nM) およびE-64の存在下においても、細胞の形態は無添加群と相違なく紡錘形を示し、細胞間およびシャーレ底への接着性も維持されていた。しかしながら、パパイン濃度が 50 nM 以上の場合においては、細胞は球形に変形し、多数の浮遊細胞も認められた (図3-1)。パパイン (0.1~20 nM) およびE-64のいずれを添加した場合においても、細胞生存率は 78.7~83.6% であった (図3-2)。

#### 3.3.2. パパインを介したケラチノサイトにおけるGM-CSF産生

培養24時間後における培養上清中の平均GM-CSF濃度は、無添加群が  $12.096 \pm 13.221$  pg/mLで、パパイン 1 nM群が  $55.101 \pm 12.918$  pg/mL、5 nM群が  $125.574 \pm 14.847$  pg/mL、10 nM群が  $123.603 \pm 21.033$  pg/mLおよび20 nM群が  $96.312 \pm 32.009$  pg/mLであった。パパイン5nMまでは用量依存性にGM-CSF産生量が有意に増加した (図3-3)。

#### 3.3.3. システインプロテアーゼ阻害による GM-CSF 産生の抑制

パパインを介したケラチノサイトのGM-CSF産生は、 $10^{-10}$  nM以上のE-64存在下において用量に依存して有意に抑制されることが明らかとなった (図3-4)。

#### 3.3.4. パパインによる NFAT の核内移行

パパイン (5 nM) およびPMA添加群における相対的ルシフェラーゼ活性は、コントロール群に対して、有意に高値を示した。パパイン添加群においては、陰性対照に対して約 3.4倍のNFATの核内移行が認められた (図3-5)。

### 3.3.5. CsAによる GM-CSF 産生の抑制

CsAの添加によってPMAを介したGM-CSFの産生は完全に抑制されたが、パパインを介したGM-CSF産生の有意な抑制でありながら、部分的なものであった(図3-6)。

### 3.4. 考察

パパインは、システインプロテアーゼ活性を有し、好酸球の脱顆粒[78]、リンパ球におけるサイトカイン産生[102]、およびヒト気道上皮細胞における TSLP の産生を促進することが示されている[67]。本研究では、入手が不可能となった天然抽出型 Der f 1 に代えて、パパインを用いたが、Der f 1 と同様に CPEK における GM-CSF の産生を誘導した。

転写因子である NFAT は、IL-2 および GM-CSF の転写制御に重要な役割を果たすことがヒトおよびマウスのリンパ球において示されている[119]。転写の活性化のためには、NFAT が細胞質から核内へ移行する必要があるが、PMA が NFAT の核内移行を促進し[79]、GM-CSF 産生を誘導することがヒトのリンパ球において報告されている[119]。NFAT の核内移行はカルシウム/カルモデュリン依存性リン酸化カルシニューリンによって制御されているので、NFAT を介した転写は、CsA などによって阻害される[33]。本研究の結果より、パパインが CPEK を活性化し、NFAT の核内移行を誘導することが明らかとなった。しかしながら、パパインによって誘導される GM-CSF の産生は、CsA では完全に抑制されず、部分的な抑制であった。したがって、GM-CSF mRNA の転写は、NFAT のみならず、NF- $\kappa$ B のようなほかのシグナル経路が関与している可能性が考えられる。近年、CsA が Toll-like receptor (TLR) 2 を介して TNF- $\alpha$  の転写を誘導したことが CPEK において示され[43]、これは NF- $\kappa$ B の活性化によるものと考えられた[55]。TLR を介した NF- $\kappa$ B の活性化は、カルシニューリンによって抑制されていると考えられている[55]。さらに、カルシニューリン阻害による NF- $\kappa$ B の活性化は、myeloid differentiation factor 88 および Toll/IL-1 receptor/resistance domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  (TRIF) に依存することが、マウスのマクロファージにおいて示されている[55]。ヒスタミン

を介したヒトのケラチノサイトにおける GM-CSF の産生に NF- $\kappa$ B が関与していることが示されている [54]。ヒトの胚腎細胞の細胞株である HEK293T 細胞においては、NF- $\kappa$ B は PAR-2 の下流に存在する TRIF を介して活性化されることが示された。PAR-2 はシステインプロテアーゼによって活性化されることがヒトのケラチノサイトにおいて示されているので [88]、本研究において認められた CsA による CPEK の GM-CSF 産生の部分抑制は、CsA が同時に TRIF を介して NF- $\kappa$ B を活性化したことに起因している可能性があると考えられた。この可能性を証明するためには、システインプロテアーゼを介した NF- $\kappa$ B の活性化を証明する必要がある。

CsA は初代培養におけるケラチノサイトの増殖を抑制させることなどが報告されているが [7]、本研究の結果から、NFAT に直接的に作用し、サイトカインの産生も抑制することが示された。



3.5. ☒

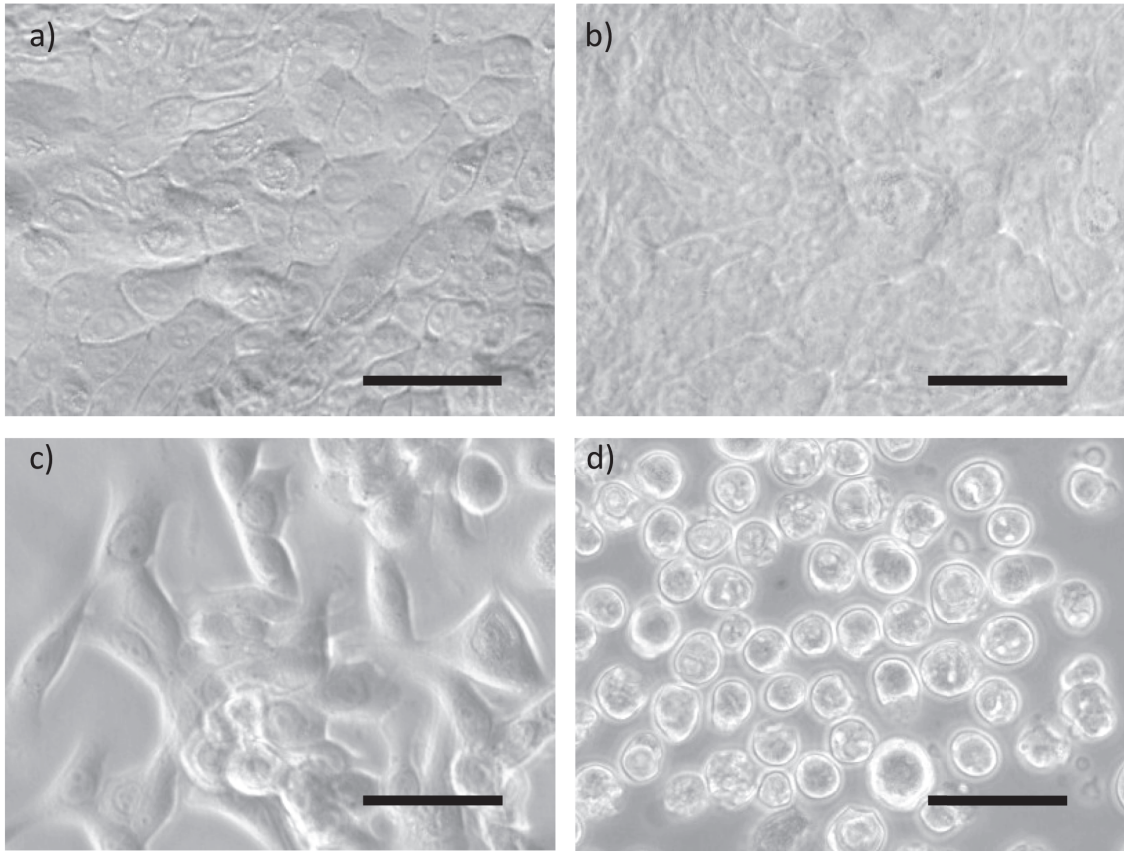


図 3-1 パパイン添加時における細胞形態の変化（24 時間後）

a) DPBS のみ、 b) papain (20 nM) 、 c) papain (50 nM) および d) papain (100 nM) 。 バーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。

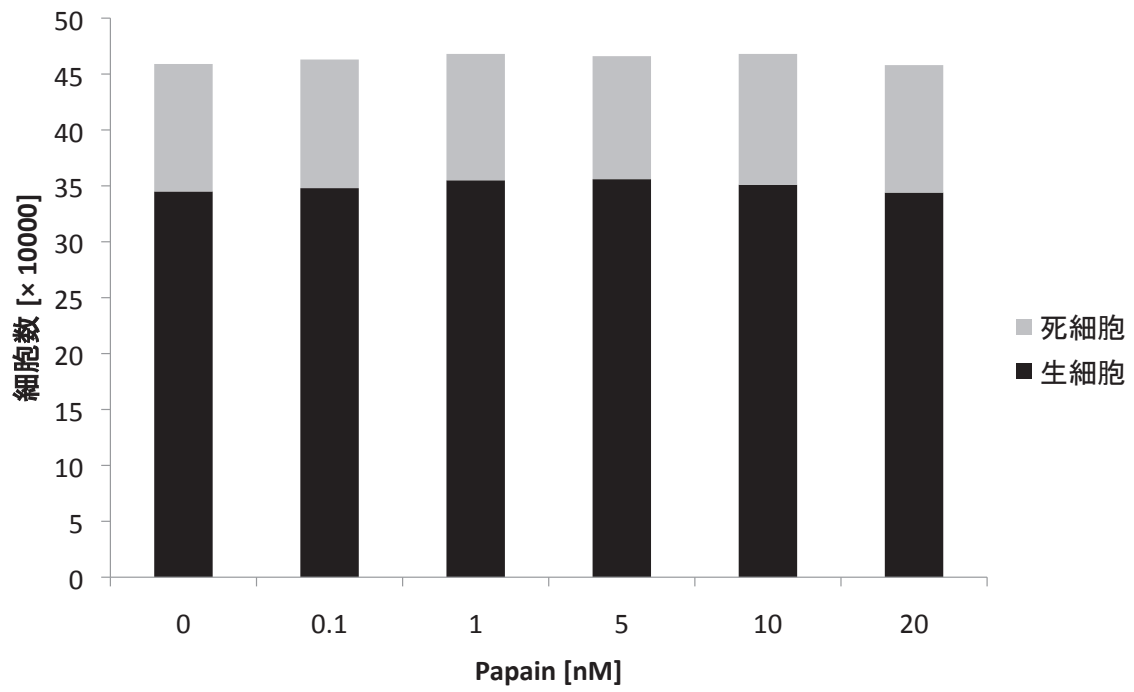


図 3-2 パパイン添加培養における細胞生存数 (24 時間後)

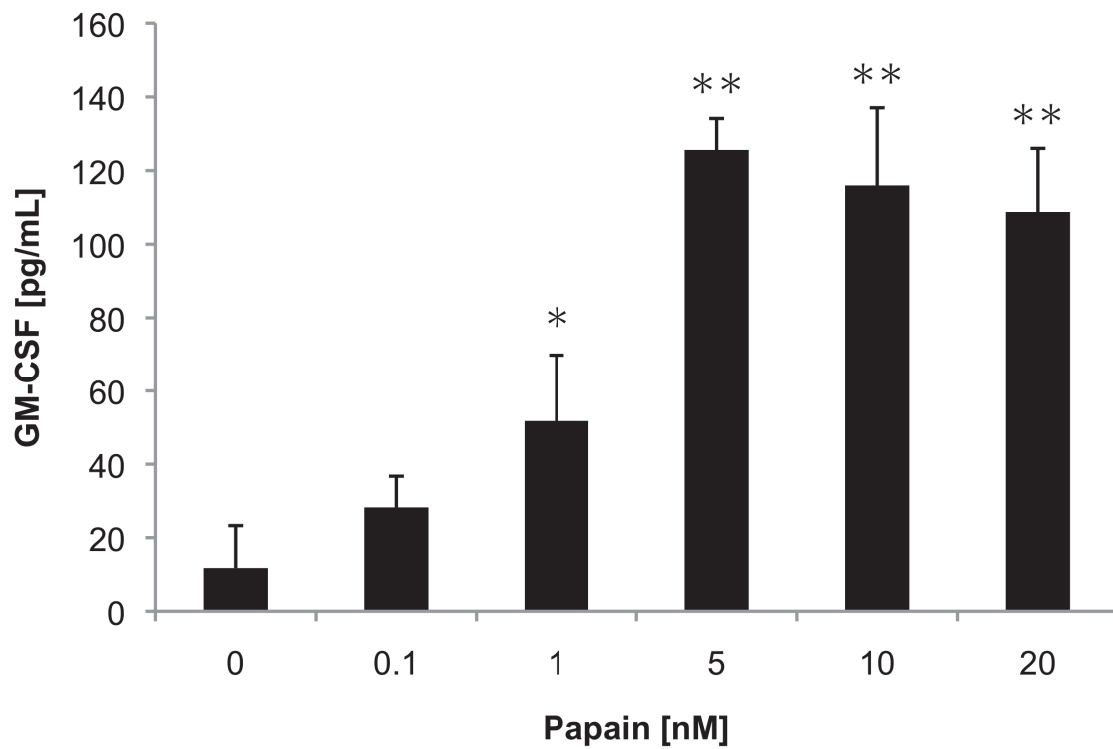


図 3-3 パパイン添加培養における CPEK の GM-CSF 産生

3回の独立した実験の平均 + S.D. を示す。\* :  $P < 0.05$ 、 \*\* :  $P < 0.01$

(パパイン無添加群を対照とした Dunnet's Test)

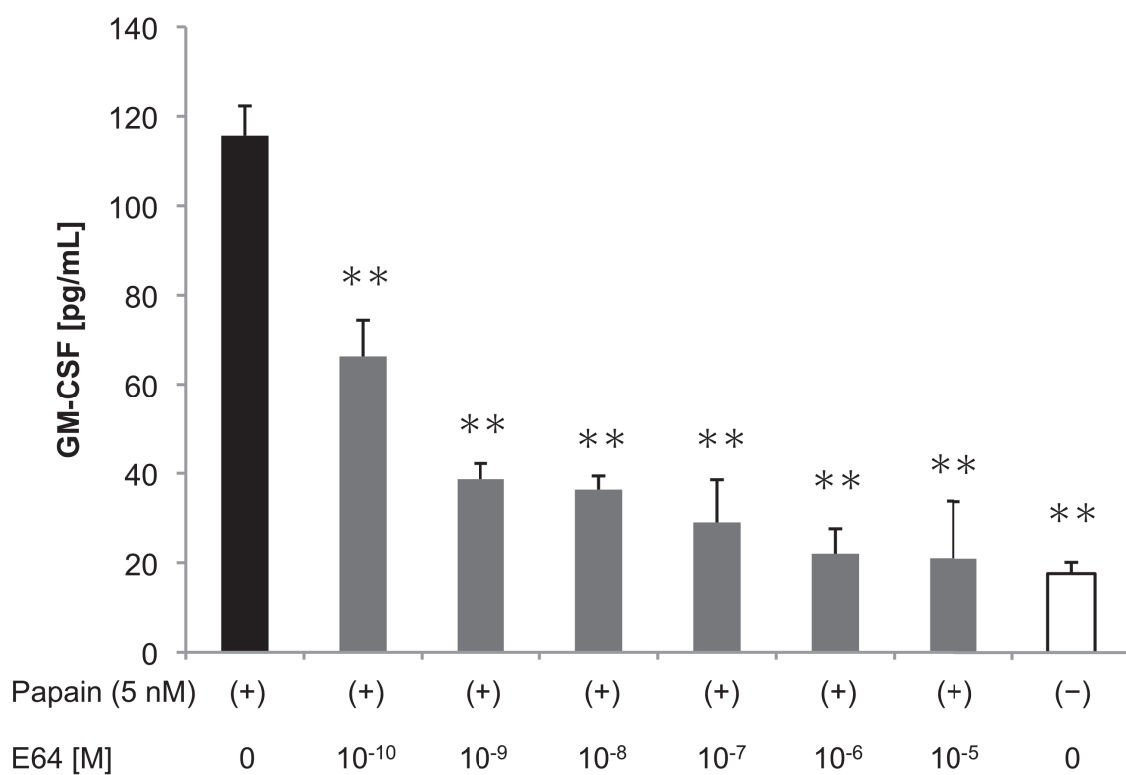


図 3-4 GM-CSF 産生に対するシステインプロテアーゼ阻害剤の抑制効果

3回の独立した実験の平均 + S.D.を示す。\* :  $P < 0.05$ 、 \*\* :  $P < 0.01$   
 (パパインのみを添加した群を対照とする Dunnet's Test)

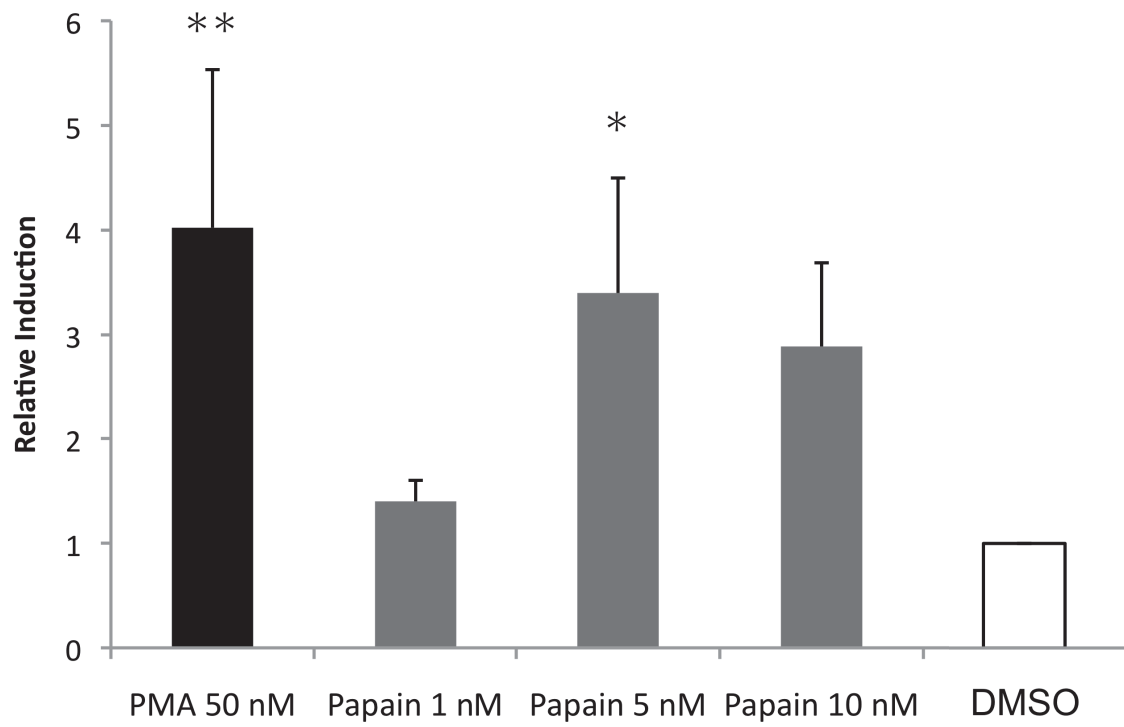


図 3-5 パパイン添加後の CPEK における NFAT 核内移行

3 回の独立した実験の平均+S.D.を示す。 \*:  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$

(Tukey-Kramer's HSD Test)

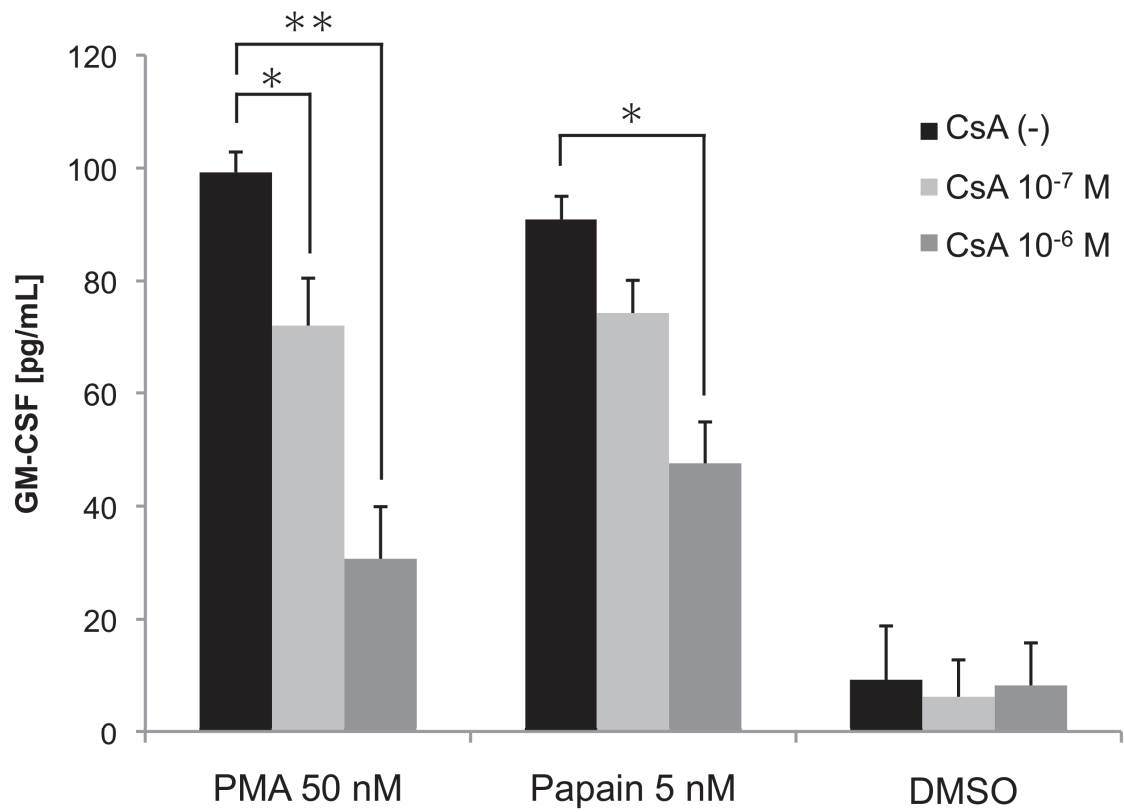


図 3-6 GM-CSF 産生における NFAT 核内移行阻害剤(CsA)の効果

3 回の独立した実験の平均 + S.D.を示す。

\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  (Tukey-Kramer's HSD Test)

## 総括



CAD は皮膚における炎症、経皮的な水分喪失の増加や表皮のセラミドなどの脂質減少およびタンパク機能不全を特徴とする。皮膚の最外層を占める表皮には、メラノサイトやランゲルハンス細胞も存在するが、約 95%はケラチノサイトで占められている。ケラチノサイトは角層、顆粒層、有棘層および基底層からなる重層構造を形成し、さらにセラミドなどの細胞間脂質を産生することによって外界からの抗原侵入を防ぐ物理的バリアとしての役割を果たしていると考えられている。また、ケラチノサイトは、様々な刺激によって活性化され、リンパ球に匹敵するサイトカインを産生することから、免疫的バリアとしての役割も果たしていると思われた。つまり、CAD の病態においては、アレルゲンである HDM がケラチノサイトを活性化させ、極めて初期の免疫反応を誘導している可能性が考えられる。そこで、本研究では、イヌケラチノサイト細胞株を HDM とともに培養し、転写誘導される分子および産生される液性因子について解析した。

本研究の結果から、Der f 1 によって活性化されたイヌケラチノサイトにおいては、約 22,000 個の遺伝子の転写が確認され、1,916 個の遺伝子で 2 倍以上の転写量増加、2,702 個の遺伝子で 1/2 倍以上の転写量低下が明らかとなった。CAD 病態への関与が示されている分子群では、*AQP3*、*S100A8*、*IL-8*、*TIMP1*、*SPINK5*、*SGPL1* および *TGF-β* の転写亢進が認められた。表皮水分含有量の維持に関与する *AQP3*、細胞間脂質であるセラミドの代謝およびケラチノサイトの増殖分化に関与する *SGPL1*、角層の構造を保持する *SPINK5*、そしてコラーゲン沈着を促進して創傷治癒に関与する *TIMP1* などは物理的バリアに関与する分子であることから、HDM の刺激に対する反応としてケラチノサイトは物理的バリア機能を促進させている可能性が示された。さらに、免疫的バリア機能に関する検討においては、*S100A8*、*IL-8*、*IL-15*、*CCL2*、*CCL20*、*TGF-β* 2 および *GM-CSF* の遺伝子の転写量増加が認められた。これらは好中球、単球、

樹状細胞およびリンパ球を遊走または活性化させる分子群であることから、ケラチノサイトは自然免疫および獲得免疫の発動に関しても重要な役割を果たしている可能性が示された。特に、CCL2、CCL20、TGF- $\beta$ 2 および GM-CSF は表皮樹状細胞であるランゲルハンス細胞を活性化または遊走させる分子であることから、HDM によって活性化されたケラチノサイトは、CAD 病態における極めて初期の獲得免疫への移行促進に関与していることが示唆された。

GM-CSF はランゲルハンス細胞の前駆細胞の増殖、分化および成熟に重要である。そこで、HDM によって活性化されたケラチノサイトにおける GM-CSF タンパク産生について評価した。その結果、GM-CSF の産生は HDM の濃度に依存して増加し、さらに、この産生は、システインプロテアーゼ阻害剤によって抑制されることが明らかとなった。システインプロテアーゼによるケラチノサイトの活性化は、細胞表面に発現する受容体 PAR-2 を介することがヒトにおいて示されていることから、イヌケラチノサイトにおいても同様な機序を介して GM-CSF タンパクの産生が誘導されている可能性が考えられた。

ヒトのリンパ球における GM-CSF の産生には、NFAT が関与していることが示されている。したがって、イヌケラチノサイトにおける GM-CSF の産生に関しても NFAT が関与している可能性があると思われる。天然精製型の Der f 1 が入手困難であったことから、Der f 1 同様にシステインプロテアーゼ活性を有するパパインを用いた。その結果、パパインは Der f 1 同様にケラチノサイトにおける GM-CSF タンパクの産生を誘導し、NFAT の核内移行はパパイン濃度依存的に増加した。しかしながら、シクロスポリンを用いた阻害実験において、GM-CSF の産生は部分的に抑制されるのみであった。これらの結果から、システインプロテアーゼを介したケラチノサイトにおける GM-CSF の産生には、NFAT のみならず、それ以外の転写因子も関与している可能性が示された。ヒスタミンを介したヒトケラチノサイトにおける GM-CSF の産生に NF- $\kappa$ B が関

与していることが示されている。また、ヒトの胚腎細胞の細胞株である HEK239T 細胞においては、NF- $\kappa$ B は PAR-2 の下流に存在する TRIF を介して活性化されることを鑑みると、イヌケラチノサイトにおいてもシステインプロテアーゼを介した GM-CSF の産生には NF- $\kappa$ B も関与している可能性が高いと思われた。

本研究の結果より、ケラチノサイトにおいては、HDM 刺激を介して様々な分子の遺伝子転写が誘導されることが明らかとなった。特に、CAD 病態の極めて初期である獲得免疫系の誘導に重要である GM-CSF のタンパク産生は、HDM 刺激によっても誘導され、その機構には NFAT が関与していることも示された。したがって、CAD の治療においては、リンパ球のみならず、ケラチノサイトの活性化を特異的に抑制する治療戦略も重要であると結論づけられた。

## 謝辭

本研究を行うに際して、終始懇篤たる御指導を受け賜りました岐阜大学獣医臨床放射線学研究室の前田貞俊教授に深甚なる感謝を申し上げます。

本稿の作成に際して、ご精読いただき、ご指導ご鞭撻を賜りました主査の岐阜大学 高島康弘准教授、副査の帯広畜産大学 猪熊壽教授、岩手大学 安田隼教授および東京農工大学 西藤公司准教授に心より感謝を申し上げます。

本研究遂行、実験器具を快く使用させて頂きました人獣共通感染症学研究室の杉山誠教授、伊藤直人准教授ならびに同研究室の皆様へ深謝いたします。

また、実験遂行上、終始丁寧な御指導と御助言を頂きました付属動物病院の柴田早苗先生と、終始御協力を惜しまれなかった獣医臨床放射線学研究室の関戸真知子様、近藤菜穂様、神志那春美様に深く感謝いたします。

日頃より有益なる御助言と多大なる御協力を頂きました獣医臨床放射線学研究室の神志那弘明准教授、千村直輝先生、寺本圭志先生、秋山智先生、朝比奈良太様、山田修平様、並木まり子様、飯尾亜樹様、中前早百合様に心より感謝いたします。

大学院での研究に対して、ご理解と多大なるご協力を賜りました木村獣医科病院のスタッフの皆様、進学に対してご理解、御助言および惜しみない御支援を賜りました両親および家族に心より深謝いたします。

## 参考文献

1. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S (2007) Cytokines. Cellular and Molecular Immunology, 6e:267-301
2. Al-Daraji WI, Afolayan J, Zelger BG, Abdellaoui A and Zelger B (2009) Modulation of NFAT-5, an outlying member of the NFAT family, in human keratinocytes and skin. American journal of translational research 1:184-202
3. Al-Daraji WI, Tugrul S, Dempsey E, Zelger B, Abdellaoui A, Prescott R and Zelger B (2010) A preliminary examination of the role of NFAT 3 in human skin, cultured keratinocytes and dermal fibroblasts. Journal of cutaneous pathology 37:e21-36
4. Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML and Girolomoni G (2005) Keratinocytes in inflammatory skin diseases. Current drug targets. Inflammation and allergy 4:329-334
5. Asahina A and Tamaki K (2006) Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary? Journal of dermatological science 44:1-9
6. Asselineau D, Dale BA and Bernard BA (1990) Filaggrin production by cultured human epidermal keratinocytes and its regulation by retinoic acid. Differentiation research in biological diversity 45:221-229
7. Baumer W and Kietzmann M (2007) Effects of cyclosporin A and cilomilast on activated canine, murine and human keratinocytes. Veterinary dermatology 18:107-114
8. Baumer W, Rossbach K, Mischke R, Reines I, Langbein-Detsch I, Luth A and Kleuser B (2011) Decreased concentration and enhanced metabolism of sphingosine-1-phosphate in lesional skin of dogs with atopic dermatitis: disturbed sphingosine-1-phosphate homeostasis in atopic dermatitis. The journal of investigative dermatology 131:266-268
9. Bieber T, Dannenberg B, Prinz JC, Rieber EP, Stolz W, Braun-Falco O and Ring J

- (1989) Occurrence of IgE-bearing epidermal Langerhans cells in atopic eczema: a study of the time course of the lesions and with regard to the IgE serum level. *The journal of investigative dermatology* 93:215-219
10. Bos JD and Meinardi MM (2000) The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental dermatology* 9:165-169
  11. Bourquin F, Riezman H, Capitani G and Grutter MG (2010) Structure and function of sphingosine-1-phosphate lyase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Structure* 18:1054-1065
  12. Bratton DL, Hamid Q, Boguniewicz M, Doherty DE, Kailey JM and Leung DY (1995) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis. *The journal of clinical investigation* 95:211-218
  13. Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, Dubus P and Hovnanian A (2009) Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *The journal of experimental medicine* 206:1135-1147
  14. Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T and Kolb-Bachofen V (1996) A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *The journal of experimental medicine* 184:2007-2012
  15. Buentke E, Heffler LC, Wilson JL, Wallin RP, Lofman C, Chambers BJ, Ljunggren HG and Scheynius A (2002) Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin--*Malassezia*-influenced cell interaction. *The journal of investigative dermatology* 119:850-857
  16. Burgess AW and Metcalf D (1980) The nature and action of granulocyte-macrophage



- colony stimulating factors. *Blood* 56:947-958
17. Burmester GR, Weinblatt ME, McInnes IB, Porter D, Barbarash O, Vatutin M, Szombati I, Esfandiari E, Sleeman MA, Kane CD, Cavet G, Wang B, Godwood A and Magrini F (2013) Efficacy and safety of mavrilimumab in subjects with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 72:1445-1452
  18. Chatterjea SM, Resing KA, Old W, Nirunsuksiri W and Fleckman P (2011) Optimization of filaggrin expression and processing in cultured rat keratinocytes. *Journal of dermatological science* 61:51-59
  19. Chiarelli F, Canfora G, Verrotti A, Amerio P and Morgese G (1988) Natural killer cell function in atopic dermatitis. *Acta paediatrica Scandinavica* 77:275-278
  20. Chorro L and Geissmann F (2010) Development and homeostasis of 'resident' myeloid cells: the case of the Langerhans cell. *Trends in immunology* 31:438-445
  21. Chu AC, Morris JF and Bos JD (2004) The Keratinocyte. *Skin Immune System. Cutaneous immunology and clinical immunodermatology*:77-100
  22. Chung TH, Oh JS, Lee YS, Kang KS, Jung JW, Youn HY and Hwang CY (2010) Elevated serum levels of S100 calcium binding protein A8 (S100A8) reflect disease severity in canine atopic dermatitis. *The journal of veterinary medical science* 72:693-700
  23. Corneigliani L, Vercelli A, Sala E and Marsella R (2012) Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: a comparative preliminary study. *Veterinary dermatology* 23:41-44, e49-10
  24. Cornish AL, Campbell IK, Mckenzie BS, Chatfield S and Wicks IP (2009) G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology* 5:554-559
  25. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L,

- Hirakawa S and Hashimoto K (2011) Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *The journal of allergy and clinical immunology* 127:806-814 e801-804
26. Deboer DJ and Marsella R (2001) The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 81:239-249
  27. Descargues P, Deraison C, Bonnart C, Kreft M, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Elias P, Barrandon Y, Zambruno G, Sonnenberg A and Hovnanian A (2005) Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nature genetics* 37:56-65
  28. Dilworth RJ, Chua KY and Thomas WR (1991) Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der f I. *Clinical and experimental allergy : Journal of the British society for allergy and clinical immunology* 21:25-32
  29. Esche C, De Benedetto A and Beck LA (2004) Keratinocytes in atopic dermatitis: inflammatory signals. *Current allergy and asthma reports* 4:276-284
  30. Fargeas C, Wu CY, Nakajima T, Cox D, Nutman T and Delespesse G (1992) Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *European journal of immunology* 22:2173-2176
  31. Farmaki R, Saridomichelakis MN, Leontides L, Papazahariadou MG, Gioulekas D and Koutinas AF (2012) Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 23:222-e245
  32. Fartasch M, Bassukas ID and Diepgen TL (1992) Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *The British journal of*

dermatology 127:221-227

33. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ and Crabtree GR (1991) Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352:803-807
34. Flockhart RJ, Diffey BL, Farr PM, Lloyd J and Reynolds NJ (2008) NFAT regulates induction of COX-2 and apoptosis of keratinocytes in response to ultraviolet radiation exposure. *FASEB journal* 22:4218-4227
35. Goedert S, Schiessl B, Zunic M, Schiebl C, Mayer P, De Weck AL, Liehl E and Mudde GC (2000) In vitro IgE but not IgG production of canine peripheral blood B cells is inhibited by CD40 ligation. *Veterinary immunology and immunopathology* 75:135-149
36. Govinden R and Bhoola KD (2003) Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacology and therapeutics* 98:257-265
37. Grone A (2002) Keratinocytes and cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology* 88:1-12
38. Gros E, Bussmann C, Bieber T, Forster I and Novak N (2009) Expression of chemokines and chemokine receptors in lesional and nonlesional upper skin of patients with atopic dermatitis. *The journal of allergy and clinical immunology* 124:753-760 e751
39. Gustafsson AC, Kupersmidt I, Edlundh-Rose E, Greco G, Serafino A, Krasnowska EK, Lundeberg T, Bracci-Laudiero L, Romano MC, Parasassi T and Lundeberg J (2005) Global gene expression analysis in time series following N-acetyl L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells in vitro. *BMC cancer* 5:75
40. Halliwell R (2006) Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary*

- immunology and immunopathology 114:207-208
41. Hara-Chikuma M and Verkman AS (2008) Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *The journal of investigative dermatology* 128:2145-2151
  42. Harper JI, Godwin H, Green A, Wilkes LE, Holden NJ, Moffatt M, Cookson WO, Layton G and Chandler S (2010) A study of matrix metalloproteinase expression and activity in atopic dermatitis using a novel skin wash sampling assay for functional biomarker analysis. *The British journal of dermatology* 162:397-403
  43. Hendricks A, Elson-Riggins JG, Riddle AL, House AK, Varjonen K and Bond R (2012) Ciclosporin modulates the responses of canine progenitor epidermal keratinocytes (CPEK) to toll-like receptor agonists. *Veterinary immunology and immunopathology* 147:91-96
  44. Herzinger T, Kleuser B, Schafer-Korting M and Korting HC (2007) Sphingosine-1-phosphate signaling and the skin. *American journal of clinical dermatology* 8:329-336
  45. Heymann PW, Chapman MD and Platts-Mills TA (1986) Antigen Der f I from the dust mite *Dermatophagoides farinae*: structural comparison with Der p I from *Dermatophagoides pteronyssinus* and epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. *The journal of immunology* 137:2841-2847
  46. Hill PB and Deboer DJ (2001) The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary immunology and immunopathology* 81:169-186
  47. Hill PB and Olivry T (2001) The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Veterinary immunology and immunopathology* 81:187-198
  48. Holleran WM, Takagi Y and Uchida Y (2006) Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS letters* 580:5456-5466

49. Hou L, Kapas S, Cruchley AT, Macey MG, Harriott P, Chinni C, Stone SR and Howells GL (1998) Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology* 94:356-362
50. Jacquet A (2011) The role of innate immunity activation in house dust mite allergy. *Trends in molecular medicine* 17:604-611
51. Johnson BV, Bert AG, Ryan GR, Condina A and Cockerill PN (2004) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer activation requires cooperation between NFAT and AP-1 elements and is associated with extensive nucleosome reorganization. *Molecular and cellular biology* 24:7914-7930
52. Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD and Sprent J (2002) Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *The journal of experimental medicine* 196:935-946
53. Kamsteeg M, Jansen PA, Van Vlijmen-Willems IM, Van Erp PE, Rodijk-Olthuis D, Van Der Valk PG, Feuth T, Zeeuwen PL and Schalkwijk J (2010) Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis. *The British journal of dermatology* 162:568-578
54. Kanda N and Watanabe S (2004) Histamine enhances the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes. *The journal of investigative dermatology* 122:863-872
55. Kang YJ, Kusler B, Otsuka M, Hughes M, Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC, Akira S, Han J and Jones PP (2007) Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *The journal of immunology* 179:4598-4607
56. Kanke T, Macfarlane SR, Seatter MJ, Davenport E, Paul A, Mckenzie RC and Plevin

- R (2001) Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *The journal of biological chemistry* 276:31657-31666
57. Kariya Y, Kihara A, Ikeda M, Kikuchi F, Nakamura S, Hashimoto S, Choi CH, Lee YM and Igarashi Y (2005) Products by the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase pathway but not S1P stimulate mitogenesis. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 10:605-615
58. Kasraie S and Werfel T (2013) Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Mediators of inflammation* 2013:942375
59. Kato K (1995) Increased sensitivity of eosinophils for eosinophilopoietic cytokines in atopic dermatitis. *The Kurume medical journal* 42:187-198
60. Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, Ishii A, Ikeda S, Okumura K and Ogawa H (2009) Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy* 64:1366-1374
61. Katoh N, Hirano S, Suehiro M, Ikenaga K and Yasuno H (2002) Increased levels of serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 but not metalloproteinase-3 in atopic dermatitis. *Clinical and experimental immunology* 127:283-288
62. Kehrl JH, Taylor AS, Delsing GA, Roberts AB, Sporn MB and Fauci AS (1989) Further studies of the role of transforming growth factor-beta in human B cell function. *The journal of immunology* 143:1868-1874
63. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S and Peschon JJ (2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The journal of experimental*

medicine 191:771-780

64. Kikuchi Y, Takai T, Kuhara T, Ota M, Kato T, Hatanaka H, Ichikawa S, Tokura T, Akiba H, Mitsuishi K, Ikeda S, Okumura K and Ogawa H (2006) Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses. *The journal of immunology* 177:1609-1617
65. Kluk MJ and Hla T (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1582:72-80
66. Koch S, Kohl K, Klein E, Von Bubnoff D and Bieber T (2006) Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *The journal of allergy and clinical immunology* 117:163-168
67. Kouzaki H, O'grady SM, Lawrence CB and Kita H (2009) Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *The journal of immunology* 183:1427-1434
68. Krotscheck U, Boothe DM and Boothe HW (2004) Evaluation of transdermal morphine and fentanyl pluronic lecithin organogel administration in dogs. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine* 5:202-211
69. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H and Amagai M (2009) External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *The journal of experimental medicine* 206:2937-2946
70. Lee CS, Jang ER, Kim YJ, Lee MS, Seo SJ and Lee MW (2010) Hirsutenone inhibits lipopolysaccharide-activated NF-kappaB-induced inflammatory mediator production by suppressing Toll-like receptor 4 and ERK activation. *International immunopharmacology* 10:520-525

71. Ma T, Hara M, Sougrat R, Verbavatz JM and Verkman AS (2002) Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *The journal of biological chemistry* 277:17147-17153
72. Maeda S, Maeda S, Shibata S, Chimura N and Fukata T (2009) House dust mite major allergen Der f 1 enhances proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in a cell line of canine epidermal keratinocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* 131:298-302
73. Maeda S, Tsuchida H and Marsella R (2007) Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles. *Veterinary dermatology* 18:422-426
74. Marsella R, Samuelson D and Harrington L (2009) Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Veterinary dermatology* 20:547-554
75. Masuda K, Sakaguchi M, Fujiwara S, Kurata K, Yamashita K, Odagiri T, Nakao Y, Matsuki N, Ono K, Watari T, Hasegawa A and Tsujimoto H (2000) Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Veterinary immunology and immunopathology* 73:193-204
76. Mcqualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH and Bernard CC (2001) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 194:873-882
77. Merryman-Simpson AE, Wood SH, Fretwell N, Jones PG, McLaren WM, Mcewan NA, Clements DN, Carter SD, Ollier WE and Nuttall T (2008) Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Veterinary dermatology* 19:59-66
78. Miike S and Kita H (2003) Human eosinophils are activated by cysteine proteases



- and release inflammatory mediators. *The journal of allergy and clinical immunology* 111:704-713
79. Miyatake S, Shlomai J, Arai K and Arai N (1991) Characterization of the mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene promoter: nuclear factors that interact with an element shared by three lymphokine genes--those for GM-CSF, interleukin-4 (IL-4), and IL-5. *Molecular and cellular biology* 11:5894-5901
80. Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A and Igarashi Y (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* 91:784-790
81. Nakahigashi K, Kabashima K, Ikoma A, Verkman AS, Miyachi Y and Hara-Chikuma M (2011) Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *The journal of investigative dermatology* 131:865-873
82. Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, Horikawa T, Kawasaki H, Hieshima K, Izawa D, Fujiie S, Tezuka T and Yoshie O (2001) Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *International immunology* 13:95-103
83. Nash RA, Schuening F, Appelbaum F, Hammond WP, Boone T, Morris CF, Slichter SJ and Storb R (1991) Molecular cloning and in vivo evaluation of canine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 78:930-937
84. Nishio Y, Noguchi E, Shibasaki M, Kamioka M, Ichikawa E, Ichikawa K, Umebayashi Y, Otsuka F and Arinami T (2003) Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. *Genes and immunity* 4:515-517

85. Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB and Leung DY (2003) Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *The journal of allergy and clinical immunology* 112:1195-1202
86. Novak N (2012) An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *The journal of allergy and clinical immunology* 129:879-886
87. Nuttall TJ, Knight PA, Mcaleese SM, Lamb JR and Hill PB (2002) Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy* 32:789-795
88. Ogawa T, Takai T, Kato T, Kikuchi Y, Niyonsaba F, Ikeda S, Okumura K and Ogawa H (2008) Upregulation of the release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from keratinocytes stimulated with cysteine protease activity of recombinant major mite allergens, Der f 1 and Der p 1. *International archives of allergy and immunology* 146:27-35
89. Olivry T and Hill PB (2001) The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 81:219-225
90. Olivry T, Moore PF, Affolter VK and Naydan DK (1996) Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of dermatological research* 288:579-585
91. Olivry T, Naydan DK and Moore PF (1997) Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *The American journal of dermatopathology* 19:477-486
92. Pastore S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Chinni LM, Giannetti A and Girolomoni G (1997) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by

- keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *The journal of clinical investigation* 99:3009-3017
93. Perez DS, Handa RJ, Yang RS and Campain JA (2008) Gene expression changes associated with altered growth and differentiation in benzo[a]pyrene or arsenic exposed normal human epidermal keratinocytes. *Journal of applied toxicology* 28:491-508
  94. Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T and Serup J (1990) Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact dermatitis* 22:164-178
  95. Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T, Dunston SM and Hammerberg B (2008) Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy* 38:667-679
  96. Pucheu-Haston CM, Shuster D, Olivry T, Brianceau P, Lockwood P, Mcclanahan T, De Waal Malefyt R, Mattson JD and Hammerberg B (2006) A canine model of cutaneous late-phase reactions: prednisolone inhibition of cellular and cytokine responses. *Immunology* 117:177-187
  97. Purwar R, Kraus M, Werfel T and Wittmann M (2008) Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *The journal of investigative dermatology* 128:59-66
  98. Racz E, Prens EP, Kant M, Florencia E, Jaspers NG, Laman JD, De Ridder D and Van Der Fits L (2011) Narrowband ultraviolet B inhibits innate cytosolic double-stranded RNA receptors in psoriatic skin and keratinocytes. *The British journal of dermatology* 164:838-847
  99. Randall A, Hillier A, Cole LK, Kwochka KW, Needham G and Wassom DL (2003)

- Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. *American journal of veterinary research* 64:1580-1588
100. Reddy VB and Lerner EA (2010) Plant cysteine proteases that evoke itch activate protease-activated receptors. *The British journal of dermatology* 163:532-535
101. Roque JB, O'leary CA, Kyaw-Tanner M, Duffy DL and Shipstone M (2011) Real-time PCR quantification of the canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. *BMC research notes* 4:554
102. Rose B, Herder C, Loffler H, Meierhoff G, Schloot NC, Walz M and Martin S (2006) Dose-dependent induction of IL-6 by plant-derived proteases in vitro. *Clinical and experimental immunology* 143:85-92
103. Salonurmi T, Parikka M, Kontusaari S, Pirila E, Munaut C, Salo T and Tryggvason K (2004) Overexpression of TIMP-1 under the MMP-9 promoter interferes with wound healing in transgenic mice. *Cell and tissue research* 315:27-37
104. Santoro D, Marsella R and Bunick D (2010) Expression and distribution of canine filaggrin in the skin of healthy and atopic beagles. *Veterinary dermatology* 21:323
105. Schlotter YM, Rutten VP, Riemers FM, Knol EF and Willemsse T (2011) Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Veterinary immunology and immunopathology* 143:20-26
106. Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX and Lefrancois L (2002) Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *The journal of immunology* 168:4827-4831
107. Schutyser E, Struyf S and Van Damme J (2003) The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine and growth factor reviews* 14:409-426
108. Seo EY, Park GT, Lee KM, Kim JA, Lee JH and Yang JM (2006) Identification of the target genes of atopic dermatitis by real-time PCR. *The journal of investigative*

- dermatology 126:1187-1189
109. Serra M and Saba JD (2010) Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Advances in enzyme regulation* 50:349-362
  110. Shakib F, Ghaemmaghami AM and Sewell HF (2008) The molecular basis of allergenicity. *Trends in immunology* 29:633-642
  111. Shibata S, Maeda S, Kondo N, Chimura N, Inoue A and Fukata T (2011) Identification of the signaling pathway of TNF-alpha-induced CCL17/TARC transcription in a canine keratinocyte cell line. *Veterinary immunology and immunopathology* 139:90-98
  112. Shibata S, Maeda S, Tsuchida H and Fukata T (2008) Phenotypic analysis for a cell line of canine epidermal keratinocytes. *The journal of veterinary medical science* 70:853-855
  113. Simou C, Thoday KL, Forsythe PJ and Hill PB (2005) Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Veterinary dermatology* 16:385-391
  114. Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, Kikuchi K and Kimura T (2005) Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *The British journal of dermatology* 152:146-149
  115. Sugiura K, Wijewardana V, Fujimoto M, Akazawa T, Yahata M, Mito K, Hatoya S, Inoue N and Inaba T (2010) Effect of IL-12 on canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Veterinary immunology and immunopathology* 137:322-326

116. Tai PC and Spry CJ (1990) The effects of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-3 on the secretory capacity of human blood eosinophils. *Clinical and experimental immunology* 80:426-434
117. Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, Mckenzie AN, Nagai H, Hotokebuchi T and Izuhara K (2006) Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *The journal of allergy and clinical immunology* 118:98-104
118. Tang H, Cao W, Kasturi SP, Ravindran R, Nakaya HI, Kundu K, Murthy N, Kepler TB, Malissen B and Pulendran B (2010) The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nature immunology* 11:608-617
119. Tsuboi A, Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Arai K and Arai N (1994) Calcineurin potentiates activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in T cells: involvement of the conserved lymphokine element 0. *Molecular biology of the cell* 5:119-128
120. Van De Laar L, Coffey PJ and Woltman AM (2012) Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119:3383-3393
121. Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M and Tessier PA (2003) Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *The journal of immunology* 171:2602-2609
122. Verducci JS, Melfi VF, Lin S, Wang Z, Roy S and Sen CK (2006) Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiological genomics* 25:355-363
123. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K and Larsen CG

- (2000) A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *The journal of investigative dermatology* 115:640-646
124. Vestergaard C, Just H, Baumgartner Nielsen J, Thestrup-Pedersen K and Deleuran M (2004) Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta dermato-venereologica* 84:353-358
125. Woessner JF, Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB journal* 5:2145-2154
126. Wood SH, Clements DN, Ollier WE, Nuttall T, Mcewan NA and Carter SD (2009) Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of dermatological science* 55:27-33