氏名（本（国）籍）	木　村　　　剛（山口県）
主指導教員名	岐阜大学　教授　前　田　貞　俊
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第４１２号
学位授与年月日	平成２６年３月１３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	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
審査委員	主査　岐阜大学　准教授　高島康弘 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　准教授　西藤公司 副査　岐阜大学　教授　前田貞俊

学位論文の内容の要旨

イヌアトピー性皮膚炎（CAD）は，反復する炎症性，瘙痒性のアレルギー性皮膚疾患であり，症例の約70%においてハウスダストマイト（HDM）に対する特異的IgEが認められる。IgEの産生には，抗原暴露が必要であるが，抗原暴露経路として呼吸器および消化管粘膜が重要であると考えられてきた。しかしながら，HDMの経皮的侵入に伴い，HDM特異的IgEの産生およびCAD様の臨床症状の発現が明らかとなり，さらに，CAD症例においては，皮膚バリア機能に関与する分子群の異常が認められた。したがって，皮膚は重要な暴露経路であり，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る。皮膚の最外層である表皮は，主にケラチノサイトによって構成され，さらにケラチノサイトの産生する細胞間隙脂質は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。また，ケラチノサイトは，様々な刺激により活性化され，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を果たしている可能性がある。以上のことから，抗原によって活性化されたケラチノサイトが，CADの病態に関わる物理的および免疫的バリア機能に関与し，免疫応答を促進している可能性があると考えた。すなわち，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た。そこで，以下の研究を行った。

第1章では，HDMによって活性化されたケラチノサイトにおける網羅的な遺伝子転写解析を行った。解析においては，ADの病態，自然免疫および獲得免疫に関与する分子に着目し，それらの遺伝子転写量の変動について評価した。HDMによる活性化によって，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認められた。AD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-*

*β2*の転写亢進が認められた。また，自然免疫および獲得免疫に関与する分子群では，*IL-8, IL-15, CCL2, CCL20, TGF-β2*および*GM-CSF*の転写亢進が明らかとなった。転写亢進が認められた*IL-15, CCL2, CCL20, TGF-β2*および*GM-CSF*は，表皮における抗原提示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をコードする遺伝子であることから，CAD においては HDM で刺激されたケラチノサイトがランゲルハンス細胞の活性化を通じて獲得免疫への移行を促進させている可能性が示された。

第2章では，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 GM-CSF に着目し，HDM の刺激によるケラチノサイトからの GM-CSF タンパク産生の誘導について評価した。その結果，HDM によって活性化されたケラチノサイトにおける GM-CSF タンパクの産生は，HDM 濃度に依存して増加した。さらに，この GM-CSF タンパクの産生は，システインプロテアーゼ阻害剤の濃度依存的に低下することが明らかとなった。したがって，HDM を介したケラチノサイトにおける GM-CSF タンパクの産生は，HDM 抗原のプロテアーゼ活性に依存することが示された。

第3章では，HDM によって活性化されたケラチノサイトにおける GM-CSF の産生メカニズムを明らかにすることを目的に実験を行った。システインプロテアーゼであるパパインがケラチノサイトにおける GM-CSF タンパクの産生を誘導することを確認した後，NFAT の核内移行について検討した。その結果，NFAT の核内移行はパパイン濃度依存的に促進した。さらに，シクロスポリンを用いて NFAT の核内移行を阻害したところ，GM-CSF の産生が部分的に抑制されることが明らかとなった。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。

以上の結果より，ケラチノサイトにおいては，HDM の抗原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 病態の極めて初期の段階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 の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。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では，ハウスダストマイト（HDM）の刺激によってケラチノサイト（KC）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について検討した。

第1章では，HDM によって活性化された KC における遺伝子転写を網羅的に解析した。その結果，KC においては約 22,000 個の遺伝子の転写が確認され，1,916 個の遺伝子において 2 倍以上の転写量の増加，2,702 個の遺伝子において 1/2 倍以下の転写量の低下を認めた。AD 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。また，自然免疫および獲得免疫に関与する分子群では，IL-8，IL-15，CCL2，CCL20，TGF-β2 および GM-CSF の転写亢進が明らかとなった。その中でも IL-15，CCL2，CCL20，TGF-β2 および GM-CSF は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 で刺激された KC がランゲルハンス細胞の活性化を通じて獲得免疫への移行を促進させている可能性が示された。

第2章では，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 GM-CSF

に着目し，HDM の刺激による KC からの GM-CSF タンパクの産生誘導について評価した。その結果，HDM を介した KC における GM-CSF タンパクの産生は，HDM のプロテアーゼ活性に依存することを明らかにした。

第３章では，プロテアーゼによって活性化された KC における GM-CSF の産生メカニズムを明らかにすることを目的に実験を行った。その結果，HDM に含まれるシステインプロテアーゼと同等の酵素活性を有するパパインを介した KC における GM-CSF タンパクの産生は，NFAT のみならず，それ以外の転写因子によって誘導されている可能性が示された。

以上の結果より，KC においては，HDM の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，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 の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が示された。したがって，CAD の治療においては，リンパ球のみならず，KC 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。

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：Production of GM-CSF mediated by cysteine protease of Der fin canine keratinocytes
　　著　者　名：Kimura, T., Sekido, M., Chimura, N., Shibata, S., Kondo, N., Kamishina, H., Kamishina, H. and Maeda, S.
　　学術雑誌名：The Journal of Veterinary Medical Science
　　巻・号・頁・発行年：74 (8)：1033-1036, 2012

２）題　　　目：Involvement of nuclear factor of activated T cells in guranulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in canine keratinocytes stimulated with a cysteine protease
　　著　者　名：Kimura, T., Sekido, M., Iio, A., Chimura, N., Shibata, S., Kamishina, H., Kamishina, H. and Maeda, S.
　　学術雑誌名：Veterinary Dermatology
　　巻・号・頁・発行年：24 (3)：310-314, 2013

既発表学術論文

１）題　　　目：Suitable reference genes for quantitative real-time RT-PCR in total RNA extracted from canine whole blood using the PAXgene™ system
　　著　者　名：Chimura, N., Shibata, S., Kimura, T., Kondo, N., Mori, T., Hoshino, Y., Kamishina, H. and Maeda, S.
　　学術雑誌名：The Journal of Veterinary Medical Science
　　巻・号・頁・発行年：73 (8)：1101-1104, 2011

２）題　　　目：Gene transcription analysis in lesional skin of canine epitheliotropic cutaneous lymphoma using quantitative real-time RT-PCR
　　著　者　名：Chimura, N., Kondo, N., Shibata, S., Kimura, T., Mori, T., Hoshino, Y., Murayama, N., Nagata, M., Ide, K., Nishifuji, K.,

Kamishina, H. and Maeda, S.
学術雑誌名：Veterinary Immunology and Immunopathology
巻・号・頁・発行年：144 (3-4)：329-336, 2011