

犬三次元培養表皮モデルの免疫バリア機能に関する研究

2018 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

寺本 圭志



# 犬三次元培養表皮モデルの免疫バリア機能に関する研究

寺本 圭志

## 目次

略語	4
緒論	7
第1章 犬三次元培養表皮モデルにおけるサイトカインの転写量 解析	
1.1. 序論	12
1.2. 材料と方法	16
1.3. 結果	20
1.4. 考察	21
1.5. 図表	23
第2章 犬三次元培養表皮モデルにおける ZO-1 および claudin-1 の 発現解析	
2.1. 序論	29
2.2. 材料と方法	32
2.3. 結果	35
2.4. 考察	36
2.5. 図	38
第3章 犬三次元培養表皮モデルにおける ZO-1 および claudin-1 に 対する TNF-alpha および IL-13 の影響	
3.1. 序論	42

3.2.	材料と方法	45
3.3.	結果	47
3.4.	考察	48
3.5.	図	51
総括		54
謝辞		57
参考文献		59

## 略語

AD: atopic dermatitis (アトピー性皮膚炎)

BSA: bovine serum albumin (牛血清アルブミン)

CAD: canine atopic dermatitis (犬アトピー性皮膚炎)

CCL: CC chemokine ligand

CCR: CC chemokine receptor

CPEK: canine progenitor epidermal keratinocyte

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline

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)

HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1

IL: Interleukin

Ig: immunoglobulin (免疫グロブリン)

LPS: lipopolysaccharide (リポ多糖)

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

RPL: ribosomal protein L

RPS18: ribosomal protein S18

RT-qPCR: quantitative reverse transcription PCR

TARC: thymus and activation regulated chemokine

TBS: Tris buffered saline

TER: transepithelial electrical resistance

TEWL: transepidermal water loss (経皮的水分蒸散量)

TGF: transforming growth factor

TNF: tumor necrosis factor

TSLP: thymic stromal lymphopoietin

Th2: 2型ヘルパーT細胞 (Type 2 helper T)

ZO: zonula occluden



## 緒論

犬アトピー性皮膚炎 (CAD) は、環境アレルゲンに対する特異的な Immunoglobulin (Ig) E 抗体を介した、慢性炎症性掻痒性皮膚疾患であり、遺伝的素因および環境要因が関与する[50]。体内に侵入したアレルゲンを捕捉した抗原提示細胞は、ナイーブヘルパーT細胞に抗原提示を行い、Th2細胞優位な分化を導く。また、活性化したB細胞は、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[53]。こうして産生された IgE は、その後真皮の肥満細胞に結合し、アレルゲンが IgE を架橋することにより肥満細胞からの脱顆粒が惹起され、CAD の発症に至る[53]。診断は、感染症の除外診断および主観による皮疹分布の評価が主体であり、客観的な診断法は存在しない[66]。また、治療においては、ステロイド療法をはじめとする非特異的な免疫抑制療法に頼っているのが現状である[65, 66]。これら診断と治療における問題点として、アレルゲン暴露から感作に至る詳細な機序が十分に解明されていないことがあげられる。

CAD 発症に至るアレルゲンの侵入は、呼吸器、消化器の粘膜および皮膚を介して起こることが知られている[53]。これまでに、パッチテストおよび皮内反応試験において、house dust mite (HDM) に対し陽性反応を示すビーグル犬に、HDM 溶液を塗布することにより、CAD モデル犬が作製されている。それを用いた、臨床スコア (modified Canine atopic dermatitis extent and severity index, mCADESI) [67]の評価から、経皮的な感作の重要性が明らかとなった[47]。

皮膚は体内と外界との境界を成し、その最外層には表皮が存在している。表皮はさらに外層より角層、顆粒層、有棘層および基底層に分類され、表皮の約 85% はケラチノサイトによって構成されている[55]。基底層ケラチノサイトは増殖し、分化しながら上層へ移行する。角層は、顆粒層のケラチノサイトが脱核した後に形成され、周辺帯と呼ばれる構造物が細胞膜を裏打ちしている。周辺帯は、有棘層および顆粒層で作られるインボルクリンやロリクリンを主な構成要素とし、

これらと顆粒細胞由来のフィラグリンが架橋結合している[36]。フィラグリンは後に角層上層で分解され[29]、顆粒層の層板顆粒に由来する主にセラミドをはじめとした角質細胞間脂質と共に、水分保持および皮膚バリア機能の維持に重要な役割を果たす[11, 14, 28, 33, 82, 93]。ヒトのアトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, AD) 症例において、フィラグリンの変異が報告され、先天的な皮膚バリア機能の欠損が AD 発症の重要な因子であることが明らかとなった[71]。また、CAD モデル犬において、フィラグリンが正常犬に比べて減少していることが報告されている[52]。さらに、ヒト AD および CAD 症例において、セラミドが正常群と比較して減少していることが報告されている[32, 101]。CAD 症例において、経皮的水分蒸散量 (Transepidermal water loss, TEWL) が増加し、皮膚バリア機能の低下が示されている[89]ことから、フィラグリンやセラミドなどの分子を産生するケラチノサイトの機能異常が CAD 病態に関与していることが示唆される。

ケラチノサイトは様々な液性因子を産生することが知られている[25, 93]。HDM によって刺激された犬ケラチノサイトにおいて、炎症性サイトカインであり、様々な細胞からのケモカインを誘導する tumor necrosis factor (TNF) -alpha や、顆粒球および単球の活性化因子である granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、また樹状細胞の遊走および活性化や、ナイーブ T 細胞から Th2 細胞への分化を促し、アレルギー性炎症に重要な役割を果たす Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の転写量の増加が明らかとなっている[41, 46]。さらに、CAD 症例の病変部においては、膿皮症の原因菌である *Staphylococcus pseudintermedius* の過剰増殖がしばしば認められる[19]。その細胞壁構成成分の刺激によって、犬ケラチノサイトにおいても TSLP の転写が認められることが報告されている[81]。これらの結果から、ケラチノサイトは表皮の物理的バリアのみならず、サイトカインおよびケモカインを介し、免疫学的にも CAD の病態に関与していると考えられる。

一方で、ケラチノサイトは、角層およびタイトジャンクションからなる皮膚バリアを形成することが知られている。CAD モデル犬においては、病変部および非病変部皮膚において、角層細胞間脂質の微細構造の変化が明らかとなっている[51]。

タイトジャンクションの発現変化に関する報告としては、CAD モデル犬において、タイトジャンクションの重要な構成タンパクである zonula occluden (ZO)-1 や claudin-1 における発現の低下が明らかとなっている[37, 79]。また、TNF-alpha や Interleukin (IL)-1beta あるいは Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 および IL-31 は、ケラチノサイトの培養細胞において、タイトジャンクションを構成するタンパクに発現変化を起こすことが示されている[2, 18, 26, 40, 98]。したがって、CAD 症例における皮膚バリア機能の低下には、CAD 症例の皮膚における Th2 型炎症を特徴とした環境と、タイトジャンクションの機能異常が関与している可能性がある[48]。しかし、タイトジャンクションに発現変化を起こす要因およびそれに起因するタイトジャンクションの機能障害と CAD 病態における関連は不明である。CAD 病態のさらなる解明に向け、ケラチノサイトが関与する皮膚免疫バリア機能の研究には、生体における反応に忠実な *in vitro* モデルが必要とされている。

これまでに、犬ケラチノサイト細胞株を用いた三次元培養表皮モデルが作製され、表皮に類似した形態の形成および各種の分化マーカーの発現が報告された[99]。そこで、本研究では、犬ケラチノサイト細胞株を用いた三次元培養表皮モデルを作製し、サイトカインの産生能およびタイトジャンクションの発現について評価することで、CAD の *in vitro* モデルとしての有用性を検討した。また、炎症性サイトカインおよび Th2 サイトカインがタイトジャンクションタンパクに及ぼす影響について評価を行った。

## 第1章

### 犬三次元培養表皮モデルにおけるサイトカインの転写量解析

## 1.1. 序論

CAD は、遺伝的な背景を有する抗原特異的な IgE を介したアレルギー性炎症性掻痒性皮膚疾患である[53]。CAD 発症に至るアレルゲンの侵入は、呼吸器および消化管の粘膜に加え、経皮的にも起こることが知られている[63]。HDM に感作した犬を用いた研究では、呼吸器および消化器に比べ、皮膚へのアレルゲン暴露が CAD の臨床スコアに最も重要であることが示され[47]、CAD 病態における経皮感作の重要性が明らかとなった。

これまでに、CAD モデル犬において皮膚バリア機能の低下が明らかになっている[89]。また、CAD モデル犬において、正常犬に比べてフィラグリンの減少が報告されている[52]ほか、ヒト AD および CAD 症例において、セラミドが正常群と比較して減少していることが報告されている[32, 101]。したがって、これらの分子を産生するケラチノサイトの機能異常が CAD 病態に関与していることが示唆される。

ケラチノサイトは、様々な液性因子を産生することが知られており[60]、CAD においては、アレルゲンの刺激により、それらの液性因子が抗原提示細胞の活性化や、2型ヘルパーT細胞（Th2細胞）優位の反応を誘導すると考えられている[3]。つまり、ケラチノサイトは、CAD の免疫病態において重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、ケラチノサイトに由来する液性因子と皮膚に存在する免疫細胞とのクロストークについては不明な点が多い[3, 53, 75]。現在、CAD の診断は、除外診断が主体であり、客観的な診断法が存在しない[68]。また、治療においては、主にステロイド療法をはじめとする非特異的な免疫抑制療法に頼っているのが現状である[65]。したがって、CAD 病態におけるケラチノサイトの免疫学的機能を明らかにすれば、CAD の診断および治療に大いに寄与するものと考えられる。このような研究にはケラチノサイトの生理学的反応を忠実

にモデル化することができる *in vitro* ツールが必要である。

三次元培養皮膚モデルは、1979年に Bell らによって初めて作製され、現在、組織工学の領域をはじめ広く用いられている[4]。三次元培養皮膚モデルにおいて、ケラチノサイトは真皮を模した基質上に播種され、増殖および分化した後、角層を含む多層構造を形成する。形態的および機能的に分化する表皮ケラチノサイトのモデルとしては、従来からより一般的に用いられている単層培養モデルに比べ、三次元培養皮膚モデルが形態的により生体を反映している。これまでに犬のケラチノサイト細胞株を用いた三次元培養表皮モデルが報告され、明瞭な角層、顆粒層および有棘層様の多層構造が認められている。しかし、そのモデルの免疫機能は分かっていない[99]。犬三次元培養表皮モデルの免疫機能を明らかにするには、本モデルにおけるサイトカイン産生能の評価が有効である。

TNF-alpha は、腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するほか、様々な細胞からのサイトカイン分泌を誘導することで、炎症反応および自然免疫の調節を担っている[85]。ヒトケラチノサイトにおいて CCL17 や、CCL20 の産生を誘導することが報告されている[1, 91, 97]ほか、ヒトケラチノサイトにおいて TNF-alpha は Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5 および IL-13) と共に、TSLP の産生を増加させることが報告されている[9]。さらに、犬ケラチノサイトにおいては、lipopolysaccharide (リポ多糖, LPS) や HDM の主要アレルゲンである Der fl により産生されることが知られている[31, 46]。CAD 症例の皮膚病変部において、TNF-alpha の転写量の増加が報告されている[61]。CAD においては、TSLP の産生を介して樹状細胞を活性化し、獲得免疫の開始を促す[41]ほか、アレルゲンの侵入に対し、炎症部位に免疫細胞を遊走させる一次シグナルの役割を果たすと考えられている[91]。

TGF-beta は抑制性サイトカインであり[1]、T 細胞および B 細胞の増殖を阻害するほか、好中球や内皮細胞の活性化を抑制することで、免疫調節を担ってい

[1]。ヒトにおいて、T細胞によるIL-4およびIL-5の産生を抑制することが明らかになっている[21]ほか、ナイーブT細胞から制御性T細胞への分化に重要な役割を果たすことが知られている[80]。CAD症例の皮膚において転写量の減少が報告されている[61]。したがって、CADにおいては、TGF-betaの発現低下が、TおよびB細胞ならびに樹状細胞の機能に対する抑制機構を低下させることで発症に関与する可能性がある。

CCL2 (monocyte chemotactic protein 1: MCP-1) は、単球やマクロファージ、樹状細胞において発現するCCケモカインレセプター2 (CCR2) に対するリガンドで、これらの細胞に対し走化因子として作用する[6]。ランゲルハンス細胞は、定常状態では表皮内の前駆細胞が細胞増殖を行い分化する[54]。しかし、炎症時には血液を介し、CCR2依存性に遊走した循環血液中の単球から分化することがマウスおよびヒトにおいて報告されている[54]。また、CAD症例およびCADモデル犬の皮膚病変部において、CCL2の転写量が増加していることが報告されている[72, 76]。したがって、CADにおいては、末梢血中の単球を表皮へ遊走させることでランゲルハンス細胞への分化を促し、獲得免疫反応を促進していると考えられる。

CCL20 (liver and activation-regulated chemokine: LARC/macrophage inflammatory protein-3: MIP-3  $\alpha$  /Exodus-1) は、リンパ球に対する走化因子として報告された[27]。CCR6に作用する唯一のケモカインとして知られており[86]、CCR6はヒトおよびマウスの未熟樹状細胞やランゲルハンス細胞での発現が報告されている[16, 44]。ヒトランゲルハンス細胞は、表皮モデルにおいてCCL20の作用により遊走することが報告されており[69]、さらに、CCL20はヒトの乾癬およびAD症例の皮膚病変部において、CCR6と共に発現が増加していることが知られている[57]。したがってCADにおいては、CCL20がランゲルハンス細胞を病変部へ遊走させることで、その後TSLPを介して産生されるCCL17などの液性因子の働



きにより、Th2 型反応を誘導している可能性が考えられる。

以上のことから、これらのサイトカインおよびケモカインは、CAD の免疫病態のなかでも、獲得免疫反応の促進においてそれぞれ重要な役割を果たすと考えられる。アレルゲンの経皮的な侵入から始まる初期の獲得免疫反応においては、ケラチノサイトと抗原提示細胞との相互作用が重要であると考えられる。そこで、第 1 章では、犬三次元培養表皮モデルを作製し、このモデルの免疫機能について、皮膚との類似性を単層培養と比較することを目的として、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、CCL2 および CCL20 の遺伝子転写量をリアルタイム RT-PCR を用いて評価した。

## 1.2. 材料と方法

### 1.2.1. 材料および動物

正常な犬の表皮から確立されたケラチノサイト細胞株である CPEK (canine progenitor epidermal keratinocyte) 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, USA) より入手した。Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) およびケラチノサイト刺激剤として用いたパパインは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から入手した。皮膚は健康なビーグル犬 (年齢 5-7 歳齢, 平均 6 歳齢, オス 1 頭, 去勢済みオス 1 頭および避妊済みメス 1 頭) の体幹腹側部より採取した。実験動物に関わるすべての手技は, 岐阜大学動物実験委員会の承認を得て行った。 (#15001)

### 1.2.2. 細胞培養

#### 単層培養

7回から9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 75cm<sup>2</sup> フラスコ (NUNC, Roskilde, Denmark) を用いて培養した。80-90% コンフルエントに達した段階で培養液を吸引除去し, 10 ml の DPBS を用いて細胞を洗浄した。TrypLE Express を 3 ml 添加した後, 37°C で 5-10 分間インキュベーションし, 細胞を剥離した。CnT-09 を 7 ml 加え, 剥離した細胞浮遊液を 15 ml centrifuge tube (NUNC) に回収し, 180 G, 5 分間遠心した。遠心後上清を吸引除去し, 細胞塊をタッピング後に CnT-09 に再懸濁した。再び 75 cm<sup>2</sup> フラスコにて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養し, 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。

### 三次元培養（図 1-1 および 1-2）

三次元培養に用いる CPEK は，単層培養と同様に 75cm<sup>2</sup> フラスコから細胞を剥離した後，レチノイン酸（10<sup>-8</sup> M），ヒドロコルチゾン（0.4 μg/ml），コレラトキシン（0.1 nM），トランスフェリン（5 μg/ml），3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩（2 nM），組換えヒト上皮増殖因子（10 ng/ml）および組換えヒトインスリン（5 μg/ml）（Sigma-Aldrich）を添加した CnT-09 に再懸濁した。6 ウェルコンパニオンプレート（BD Falcon, San Jose, CA, USA）に装着したインサートディッシュ（BD Falcon）に，1 ウェルあたり 2 ml となるようにタイプ I-A コラーゲン，10 倍濃縮 MEM ハンクス培地および再構成用緩衝液（クラボウ，大阪，日本）を用いて作製したコラーゲングルを注入した。コラーゲングル上に，細胞懸濁液を 0.5×10<sup>6</sup> cells/ml の密度で 1 ml ずつ分注した（培養 0 日目；図 1-1）。37°C，5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養し，培養 5 日目に，0.4 μg/ml のヒドロコルチゾンを添加した CnT-09 に培地を変更し，以降の実験にはこれを用いた。培養 8 日目にインサートディッシュから培地を除去して細胞表面を空気に暴露し，培地を 2 ml ずつ，液面がインサートディッシュの底部に接するようにコンパニオンプレートのウェル内に注入した。培地交換は培養 14 日目まで毎日 1 回行った[99]。培養 13 日目の培地は Opti-MEM I を用いた。

#### 1.2.3 皮膚および CPEK からのトータル RNA 抽出

トータル RNA の抽出には RNeasy Mini Kit（Qiagen, Valencia, CA, USA）を使用した。皮膚および三次元培養した CPEK は，採取後直ちに RNAlater (QIAGEN, Valencia, CA, USA) に浸漬し，トータル RNA 抽出時まで -30°C で保存した。回収したトータル RNA は TURBO DNA-Free Kit（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）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 定量リアルタイム RT-PCR (RT-qPCR)

トータル RNA は PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を合成した。TNF-alpha, TGF-beta, CCL2 および CCL20 を特異的に増幅するプライマー (表 1-1) を用いて, RT-PCR (Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 および SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ)) を行った。なお, RT-PCR は RT 反応を 42°C 5 分間および 95°C 10 秒間, PCR 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。解析に先立ち, 相対定量に用いるリファレンス遺伝子の検討を行った。Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Ribosomal protein S18 (RPS18), Ribosomal protein L (RPL) 13A および RPL32 を候補[84]とし, 単層培養および三次元培養した CPEK を用いて RT-qPCR を行った。得られたデータから GeNorm (<https://genorm.cmgg.be>), NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>) および BestKeeper (<http://www.genequantification.de/bestkeeper.html>) を用いて最適なリファレンス遺伝子の順位を決定し, 1 位から順に遺伝子ごとに配点をし, スコアを比較してリファレンス遺伝子の選出を行った。PCR 反応の増幅曲線と閾値が交差する点 (Ct 値) は, Thermal Cycler Dice Real Time System Multiplate RQ software, Version 3.00 (タカラバイオ) を用いて算出した。TNF-alpha, TGF-beta, CCL2 および CCL20 の転写レベルは, 比較 Ct 法 ( $\Delta\Delta Ct$  法) を用いてリファレンス遺伝子に対する相対定量値として算出した。全てのサンプルは 2 回重複して分析し, 平均値を算出した。全ての実験は独立して 3 回行った。

#### 1.2.5. 統計

単層培養, 三次元培養および皮膚における三群間の有意差を評価するために,

Bonferroni/Dunn 検定を用いて統計解析を行った。 $P < 0.05$  を有意差ありとした。  
解析には、統計ソフト JMP version 13.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用した。

## 1.3. 結果

### 1.3.1 犬三次元培養表皮モデルにおける組織像の変化

培養 4 日目までに培養細胞は 3 から 4 層の層構造を形成した (図 1-3 Day 4)。培養 8 日目までに培養細胞は 4 から 6 層の層構造を形成した (図 1-3 Day8)。培養 12 日目には 7 層から 8 層の層構造の形成が認められ、さらにそれらの上層には、脱核による角層様層の形成が認められた。また、角層様層の下層には、細胞内顆粒を含む顆粒層様層の形成が認められた (図 1-3 Day 12)。培養 17 日目においても 12 日目とほぼ同様の構造が認められた (図 1-3 Day 17)。

### 1.3.2 リファレンス遺伝子の選出

3 種類のアлゴリズムを用いて最適なリファレンス遺伝子を評価した結果、単層培養においては、RPL32, HPRT1, RPL13A, RPS18, GAPDH の順に、また、三次元培養においては、RPL32, HPRT1, RPS18, RPL13A, GAPDH の順に最適なリファレンス遺伝子が選出された。単層および三次元培養においてそれぞれの遺伝子で得られたスコアを比較し、最も高いスコアが得られた RPL32, HPRT1 および RPS18 をリファレンス遺伝子として選出した。

### 1.3.3 RT-qPCR

*TNF-alpha* は、単層培養においては転写量が検出限度以下となり、三次元培養および皮膚においてのみ、転写が認められた (図 1-4 a)。*TGF-beta*, *CCL2* および *CCL20* は、全てのサンプルにおいて転写が認められた (図 1-4 b, c, d)。*TGF-beta* は、サンプル間において転写量に有意差は認められなかった (図 1-4 b)。*CCL2* および *CCL20* は、単層培養および皮膚において転写量に有意差が認められた。

## 1.4. 考察

これまでに、ヒト AD の細胞モデルとして、ヒトケラチノサイト細胞株である HaCaT 細胞を用いた報告がある[97]。HaCaT 細胞は、基底層および基底上層に認められるケラチンを発現しており、表皮の各層への分化能を有している[8, 10]。単層培養した CPEK は、ケラチンの発現パターンや proliferating cell nuclear antigen (PCNA) および  $\alpha_6$  インテグリンの発現により、基底層ケラチノサイトの表現型を有することが明らかになっており[88]、さらに CPEK は HaCaT 細胞と同様のサイトカインおよびケモカインの産生能を有することが明らかになっている[46]。これらの事実は、液性因子の産生能において、CPEK がヒト AD の研究における HaCaT 細胞と同様に、CAD の細胞モデルとして有用であることを示唆する。しかし、表皮は基底層のケラチノサイトが形態的および機能的に分化することによって形成されており、より生体を反映したモデルとしては三次元培養の適用が望ましいと考えられる。しかし、本研究で用いた犬三次元培養表皮モデルの免疫学的機能は不明であった。

今回評価したサイトカインおよびケモカインは、いずれも CAD の病態において重要な役割を果たすと考えられる。転写量解析の結果、本モデルにおいて *TNF-alpha*, *CCL2* および *CCL20* はいずれも単層培養に比べ、皮膚に類似した転写パターンを示した。したがって、サイトカイン遺伝子の転写解析において、本モデルは従来の単層培養に比べ適切なモデルであることが示唆された。

本研究は、定常状態における本モデルのサイトカイン遺伝子の転写解析である。したがって、病的環境におけるケラチノサイトの生理学的機能の評価を行うにあたっては、今後、刺激時の本モデルの挙動を把握しておく必要があると考えられる。

本モデルではこれまでに、ロリクリン、Keratinocyte differentiation-associated

protein (Kdap), Ki-67 およびケラチン 14 といった分化および細胞増殖マーカーの発現が報告されているが，物理学的特性については不明な点も多い[99]。表皮が備える物理学的特性は，細胞を形成する各種の構成成分および細胞同士の接着分子によって維持される。それらはケラチノサイトのターンオーバーによる恒常性の維持や，皮膚バリア機能の形成に寄与している[90]。CAD 症例においては皮膚バリア機能の低下が認められており，病態との関連が示唆されている[48]。タイトジャンクションは，角層と共に皮膚バリア機能を構成する要素であり，顆粒層が形成される際にベルト状に細胞間をシールして，細胞内外からの物質の透過を制限している[34]。CAD モデル犬においてタイトジャンクションを構成するタンパクに発現変化が認められている[37, 79]ことから，本モデルの *in vitro* ツールとしての有用性を評価するにあたっては，本研究で明らかになった免疫学的特性に加え，物理学的特性に重要な役割を果たすタイトジャンクションの評価が必要と考えた。そこで，第二章では，本モデルにおけるタイトジャンクションの発現について評価することとした。



## 1.5 図表

表 1-1 RT-qPCR に用いたプライマー

分子名	Primer Sequence (5'-3')		Genebank Accession Number
	Forward primer	Reverse primer	
TNF-alpha	CCCAAGTGACAAGCCAGTAGCTC	ACAACCCATCTGACGGCACTATC	NM_001003244
TGF-beta	GGAGCAGCATGTGGAGCTGTA	GCCTCACGACTCCAGTGACATC	NM_001003309
CCL2	TCCTCTGCCTGCTGCTCATAG	GCAGCAGGTGACTGGAGAAATAA	NM_001003297
CCL20	CTCTTGCTGCTTTGATGATG	TGGCCAGCTGTTGTGTGAA	NM_001005254
HPRT1	CACTGGGAAAACAATGCAGA	ACAAAGTCAGGTTTATAGCCAACA	AY283372
RPS18	TGCTCATGTGGTATTGAGGAA	TCTTATACTGGCGTGGATTCTG	XM532106
RPL32	TGGTTACAGGAGCAACAAGAAA	GCACATCAGCAGCACTTCA	XM848016

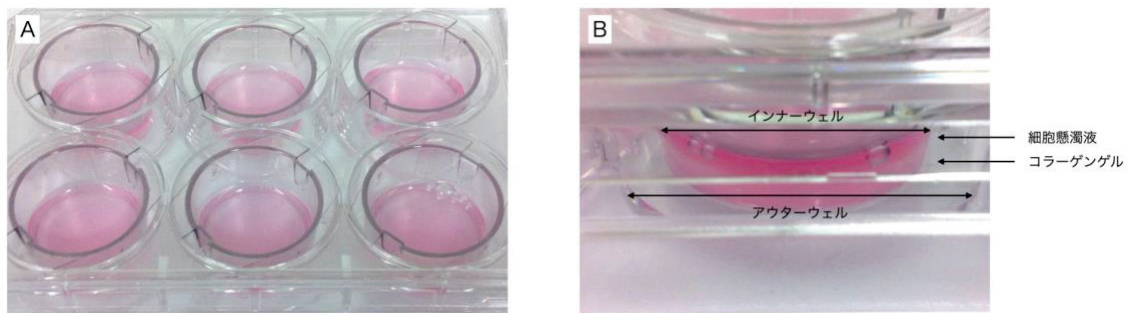


図 1-1 三次元培養に用いた培養皿および培養時の外観

- (A) インサートディッシュを6ウェルコンパニオンプレートに装着した状態,  
(B) コラーゲンゲル上に細胞懸濁液が注入された状態

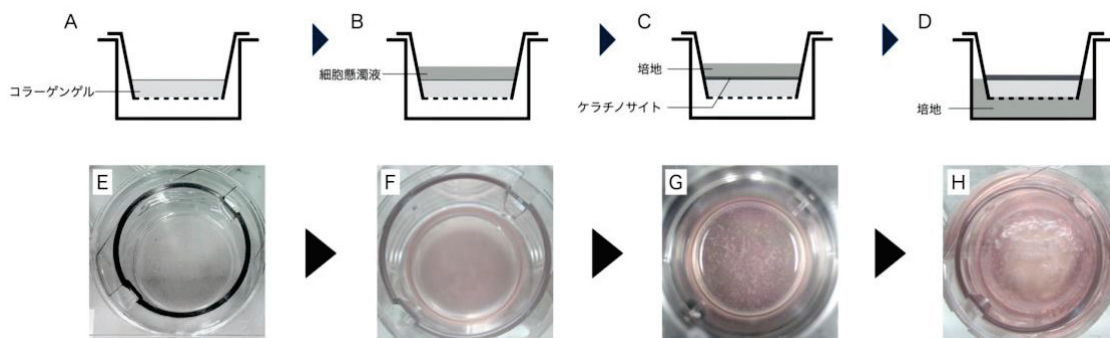


図 1-2 三次元培養のながれおよび培養細胞の外観の変化

(A, E) インサートディッシュにコラーゲンを作成した状態, (B, F) 細胞懸濁液を注入したところ (Day 0), (C, G) ケラチノサイトはコラーゲン上に接着する (Day 7 まで), (D) Day 8 以降は培地をインサートディッシュから除去し, 代わりにアウターウェルに注入, (H) 培養終了時

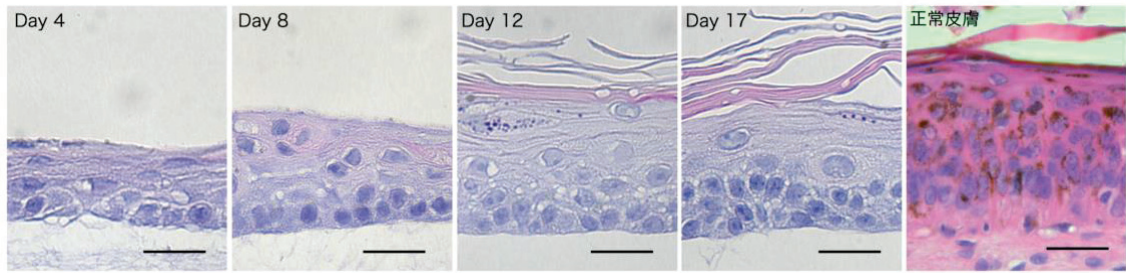


図 1-3 犬三次元培養表皮モデルにおける組織像の変化

(Day 4, Day 8) 培養 4 日目以降培養 8 日目までに、培養細胞は 4-6 層の層構造を形成した、(Day 12, Day 17) 脱核により、角層様層が形成された。また、角層様層の下層において、細胞内顆粒を含む顆粒層様層が形成された。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。

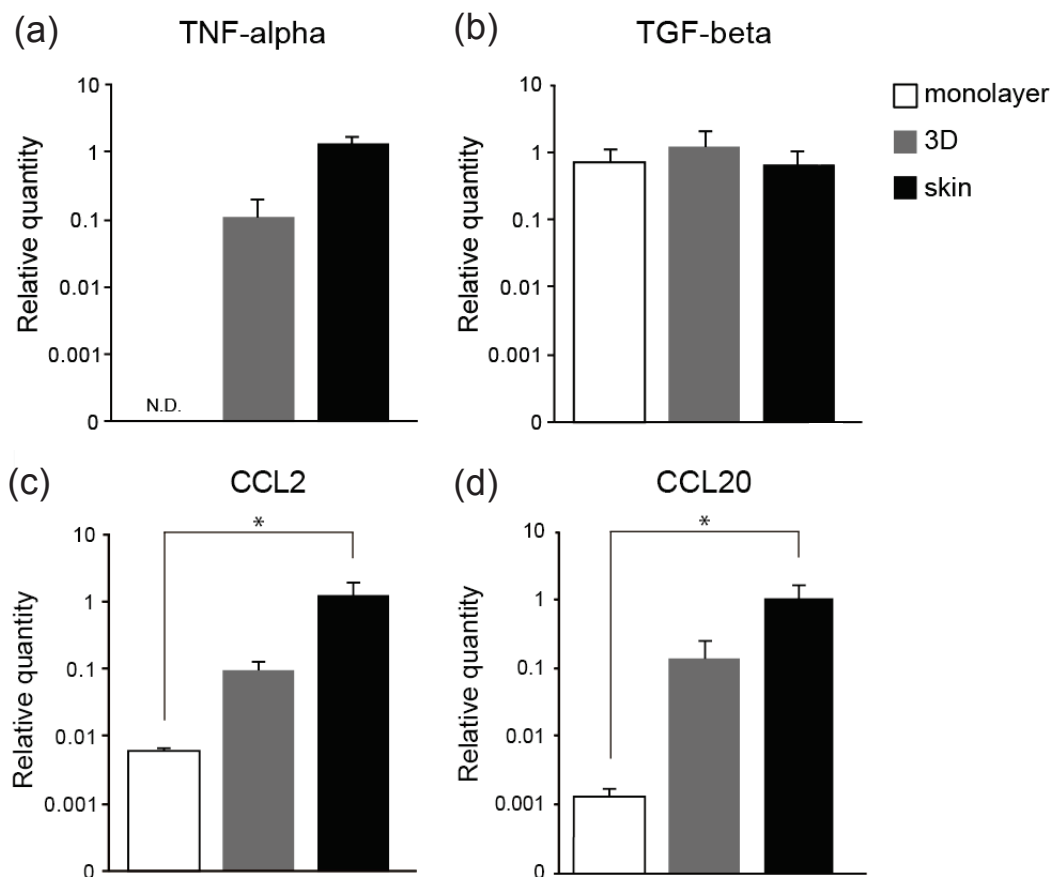


図 1-4 単層培養, 犬三次元培養表皮モデルおよび犬正常皮膚におけるサイトカイン遺伝子転写

(a) *TNF-alpha*, (b) *TGF-beta*, (c) *CCL2* および (d) *CCL20* の転写量。白, 灰, 黒色のバーはそれぞれ単層培養, 犬三次元培養表皮モデル, 犬正常皮膚サンプルを示す。リファレンス遺伝子として *RPL32*, *HPRT1* および *RPS18* を用いた。N.D.: 検出限界以下,  $n=3$ ,  $*P < 0.05$ , Bonferroni/Dunn 検定

## 第2章

### 犬三次元培養表皮モデルにおける ZO-1 および claudin-1 の 発現解析

## 2.1. 序論

皮膚はバリアを形成することによって、微生物、化学物質および物理的な刺激から生体を保護すると共に、体内からの水分や電解質およびタンパク質の漏出を防いでいる[43]。皮膚バリアは角層およびタイトジャンクションから構成されることが明らかとなっている[18, 38]。角層バリアは、角層細胞とその細胞膜を強靱に裏打ちする周辺帯および細胞間脂質により形成される[59]。さらに、顆粒層の細胞間接合部にはタイトジャンクションと呼ばれるタンパクが存在する。タイトジャンクションは、複数のタンパクの集合体であり、claudin や occludin などの細胞膜貫通型タンパク、ZO などのアクチンフィラメントの足場となるタンパクまたは ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB) などの細胞質内においてシグナル分子や転写因子として機能するタンパクに分類される[5, 70]。

ZO-1 は、1986 年に同定され[92]、細胞内においては claudin や occludin と共に複合体を形成している[58]。ZO-1 および ZO-2 をノックアウトしたマウスのケラチノサイトにおいては、タイトジャンクションの形成が著しく阻害されると共に経上皮電気抵抗 (Transepithelial electrical resistance; TER) の減少および細胞間における物質透過性が亢進する[95]。このことから、ZO-1 はタイトジャンクションの形成ならびにバリア機能の維持に重要な役割を担っていることが考えられた。

claudin は、1998 年に同定され[23]、現在ヒトおよびマウスにおいて 27 のアイソフォームが知られている[56]。単一の細胞には少なくとも 2 種類の claudin が発現しており、共重合して 1 本のタイトジャンクション鎖を形成し、さらに向かい合う細胞膜上のタイトジャンクション鎖が結合する[94]。claudin-1 をノックダウンさせたヒトケラチノサイトにおいては、TER の低下および細胞間における物質透過性の亢進が報告されている[18, 100]。さらに、claudin-1 をノックアウト

したマウスにおいては、経皮的水分蒸散量 (TEWL) の増加が認められ、細胞間の物質透過性の亢進とともにマウスは脱水により生後 1 日で死亡する[24]。これらの結果から、claudin-1 は、タイトジャンクションのバリア機能に重要な役割を果たしていると思われる。

これまでに、claudin-1 欠損マウスにおけるインボルクリンおよびフィラグリンの発現低下が報告されているほか、ヒトケラチノサイトにおいて claudin-1 のノックダウンにより、ケラチノサイトの増殖が認められることが示されている[18, 39]。また、ランゲルハンス細胞は樹状突起に claudin-1 を発現しており、活性化して抗原提示を行う際には、樹状突起を皮膚表層に向かって伸長し、顆粒層のケラチノサイトとの間にタイトジャンクションの再構築によるバリアを形成することがマウスにおいて明らかになっている[42]。つまり、タイトジャンクションは物理的なバリアの形成に加え、さらにケラチノサイトの分化への関与および免疫学的にもバリア機能の維持に関与していると考えられる。

タイトジャンクションの異常は、様々な皮膚疾患の病因と考えられており、ヒトではこれまでに尋常性乾癬、NISCH 症候群 (neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis)、扁平苔癬、AD との関連が報告されている[12]。これらの疾患においては、ZO-1, claudin-1, claudin-4, occludin などのタイトジャンクションタンパクの発現変化が認められている[18, 22, 40, 77]。一方、犬においては、CAD モデル犬の非病変部皮膚において、ZO-1 および claudin-1 の発現低下が報告されている[37, 79]。ヒト AD と同様に、CAD においてもタイトジャンクションの機能障害に起因する皮膚バリア機能の低下が病態に関与していることが示唆されるが、詳細はわかっていない。今後、個々のタイトジャンクションタンパクの役割を明らかにしていくにあたり、犬ケラチノサイトを用いた *in vitro* モデルが求められている。

前章において、CAD の細胞モデルとして、単層培養と比較した犬三次元培養



表皮モデルの優位性がサイトカインおよびケモカインの転写量解析から明らかとなった。しかし、本モデルにおけるタイトジャンクションタンパクの発現は不明である。そこで、本章では CAD において発現変化が報告されているものうち、特にタイトジャンクションのバリア機能に中心的な役割を果たす ZO-1 および claudin-1 を対象に、犬の表皮と本モデルにおける発現を比較した。

## 2.2. 材料と方法

### 2.2.1 材料および動物

犬三次元培養表皮モデルの作製には、CPEK (CELLnTEC advanced cell systems, Bern, Switzerland) およびその培養液である CnT-09 (CELLnTEC advanced cell systems) を用いた。皮膚は2頭の健康なビーグル犬（年齢4歳齢，オスおよび5歳齢，メス）の体幹腹側部より，8 mm 生検パンチを用いて採取し，10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。実験動物に関わるすべての手技は，岐阜大学動物実験委員会の承認を得て行った。（#15001）

### 2.2.2 三次元培養

三次元培養は1章で述べた方法と同様に行った。培養5日目から培養終了まで，培地に0.4 µg/ml のヒドロコルチゾン (Sigma-Aldrich) を添加した CnT-09 を使用した。培養14日目に，培地の入った外側の培養皿から培養細胞の入った内側の培養皿を取り出し，替刃メス (No.11; カイインダストリーズ，岐阜，日本) を用いて，コラーゲンゲルおよび内側の培養皿の底部のフィルターごと培養細胞を採取した。採取したサンプルは，10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ホルマリン固定後に，パラフィン包埋を行った皮膚および培養細胞を3 µm で薄切し，ヘマトキシリンエオジン染色および免疫組織化学に供した。

### 2.2.3 免疫組織化学

切片は，キシレンを用いて2度脱脂し，無水エタノールによる再水和を10分間ずつ2度行った後，蒸留水にて洗浄した。95–100°Cに予熱したエチレンジアミン四酢酸 (Tris-EDTA) 緩衝液 (pH 9.0; Dako, Santa Clara, CA, USA) に浸漬した切片を，家庭用電子レンジを用いて20分間加温し，抗原賦活化処理を行った。

20 分間流水で冷却した後，蒸留水で 10 分間洗浄した。0.1%牛血清アルブミン (BSA) および 0.1%Tween20 (Tween20; 和光純薬工業, 大阪, 日本) を添加した トリス塩酸緩衝液 (TBS) に 10 分間浸漬した後，内在性ペルオキシダーゼの不活化のため 0.3%過酸化水素水を含むメタノール液中で 10 分間反応させ，0.1%BSA 加 TBS に 10 分間浸漬し，これを 3 回繰り返して洗浄した。10%正常ヤギ血清を添加したリン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いて，室温にて 30 分間非特異的反応の抑制処理を行った。ネガティブコントロールとして，一次抗体の代わりに正常ウサギ血清由来イムノグロブリン (X0903; Dako) を同じタンパク濃度に希釈して使用した。また，犬正常皮膚をポジティブコントロールとした[78]。ZO-1 または claudin-1 の発現解析には，犬の ZO-1 および claudin-1 を認識するウサギポリクローナル抗ヒト ZO-1 抗体(#61-7300; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) またはウサギポリクローナル抗ヒト claudin-1 抗体 (#ab15098; Abcam, Cambridge, UK) をそれぞれ使用した[78]。一次抗体およびネガティブコントロールの希釈には 1.5%正常ヤギ血清加 PBS を用いた。一次抗体の希釈倍率はそれぞれの抗体について，これまでの報告[78]を参考に，3 段階の希釈倍率 (1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml) で行った。背景の非特異的反応が最も少なく，最も染色強度が高く得られたものを至適濃度として選択した。犬正常皮膚および犬三次元培養表皮モデルにおいて，至適な一次抗体濃度は ZO-1 および claudin-1 共に，1  $\mu$ g/ml であった (図 2-1 および 2-2)。一次抗体を 1 時間室温にて反応させ，0.1%BSA 加 TBS に 10 分間浸漬し，これを 3 回繰り返して洗浄した。次に二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ由来抗ウサギイムノグロブリン (EnVision+ system- HRP; Dako) を用いて，室温で 30 分間反応させた後，0.1%BSA 加 TBS に 10 分間浸漬し，これを 3 回繰り返して洗浄した。ジアミノベンジジン液で発色させた切片は，ヘマトキシリンで核染色を行った後，カバーガラスを用いて封入し，光学顕微鏡 (DM2500, Leica, Wetzlar, Germany) にて観察した。実験

は異なるサンプルを用いて3回行った。

## 2.3 結果

### 2.3.1 犬正常皮膚

ZO-1 および claudin-1 は、角層を除くすべての層において発現が認められた (図 2-3a, b)。claudin-1 における染色強度は、顆粒層において最も強く、蜂の巣状の染色パターンを示した。ネガティブコントロールにおいて、陽性染色は認められなかった (図 2-1a, 2-2a)

### 2.3.2 犬三次元培養表皮モデル

ZO-1 は角層様の層を除くすべての層で、主に細胞質において発現が認められた (図 2-3c)。claudin-1 は角層様の層を除く、主に顆粒層様層から有棘層様層の上層において発現が認められた (図 2-3d)。claudin-1 の染色強度は、顆粒層様の層において最も高く、犬正常皮膚と類似した蜂の巣状の染色パターンを示した (図 2-3d)。ネガティブコントロールにおいて、陽性染色は認められなかった (図 2-1e, 2-2e)

## 2.4. 考察

本章では、ZO-1 および claudin-1 の発現を評価することにより、タイトジャンクションのバリア機能研究ツールとしての犬三次元培養表皮モデルの有用性を検討した。

本モデルにおいて、ZO-1 は、角層様層を除く全ての層の細胞質を中心に発現が認められた。ZO-1 におけるこの染色パターンおよび局在は、本研究およびこれまでに報告されている犬の正常皮膚における発現結果と類似していた[78, 79]。CAD 症例では、非病変部皮膚において、免疫組織化学による ZO-1 の染色強度が正常皮膚と比較して低下していることが報告されており[37]、ヒト AD においても病変部および非病変部における発現量の低下が示されている[102]。また、ヒトケラチノサイトにおいて、IL-1beta もしくは IL-17 により ZO-1 の発現量が低下することが報告されており[40, 102]、本モデルは犬ケラチノサイトにおける ZO-1 の発現について、サイトカインの影響を検証するのに有用であると思われる。

本モデルにおいて、claudin-1 は蜂の巣状の染色パターンを示した。また、染色強度は基底層側に向かって減弱した。これは本研究およびこれまでに報告されている犬の正常皮膚における発現結果と同様であった[7, 37, 64, 78, 79]。本モデルにおける claudin-1 の発現は、主に顆粒層様層から有棘層様層の上層を中心に認められた。しかし、犬の表皮においては、角層を除く全ての層で claudin-1 の発現が認められている[7, 78]。ヒトケラチノサイトにおいて、claudin-1 の発現には培地中に高いCa<sup>2+</sup>濃度が必要であることが報告されている[18]。Yagihara らは、本モデルにおいてケラチン 10 の発現が認められないことを報告している[99]。ケラチン 10 はCa<sup>2+</sup>によってケラチノサイトが分化する際に発現するマーカーであり[20]、本モデルにおいて claudin-1 の発現が、有棘層の中間より下層の領域に

において認められなかった原因は、培地中の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の不足に起因する CPEK の不十分な分化であった可能性が考えられた。

前章において、ケラチノサイトの免疫学的機能研究における本モデルの有用性が示唆された。しかし、本モデルはケラチノサイトのみから構成されており、リンパ球や樹状細胞などの表皮を構成するその他の細胞を含まない。したがって、より適切なモデルに発展させるためには、今後ケラチノサイト以外の表皮構成細胞との共培養などが必要と考えられる。

本モデルにおいて、ZO-1 および claudin-1 の発現が明らかとなったことから、本モデルが顆粒層におけるタイトジャンクション研究において有用である可能性が示された。CAD 症例においては、皮膚バリア機能の低下が認められており [89]、また、CAD モデル犬において ZO-1 や claudin-1 の発現変化が報告されている [37, 79]。したがって、CAD においてタイトジャンクションの機能異常が病態に関与している可能性が考えられた。そこで、第 3 章では、ZO-1 および claudin-1 に対し、発現変化を誘導する因子について検討した。

## 2.5 図

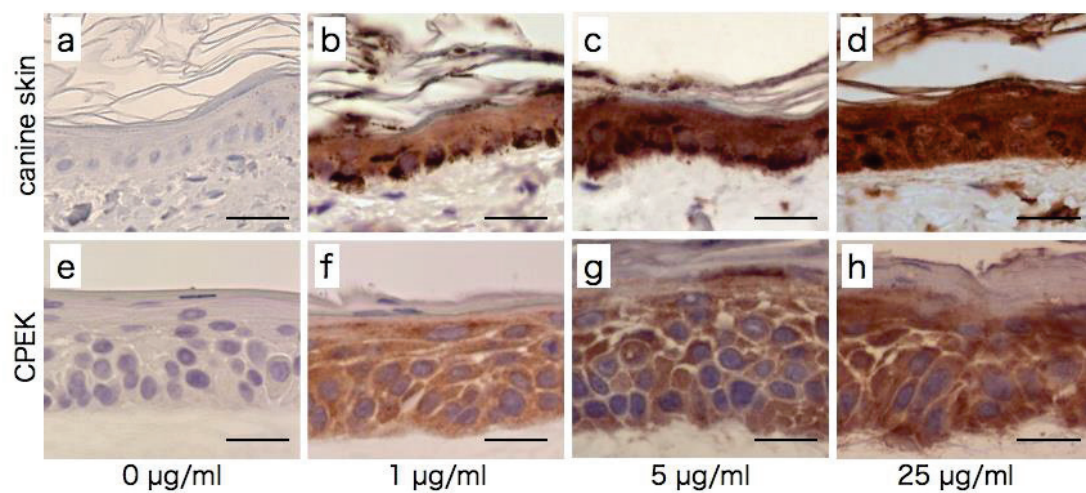


図 2-1 各一次抗体濃度における ZO-1 の染色性

(a, b, c, d) 犬正常皮膚, (e, f, g, h) 犬三次元培養表皮モデル, (a, e) 0 μg/ml, (b, f) 1 μg/ml, (c, g) 5 μg/ml, (d, h) 25 μg/ml。濃度は抗 ZO-1 抗体の濃度を示す。スケールバーは 20 μm を示す。



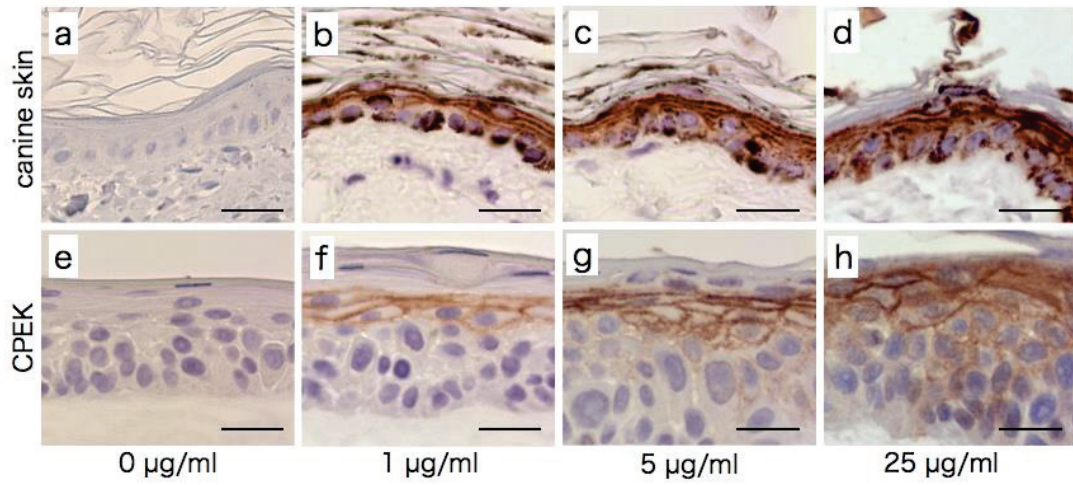


図 2-2 各一次抗体濃度における claudin-1 の染色性

(a, b, c, d) 犬正常皮膚, (e, f, g, h) 犬三次元培養表皮モデル, (a, e) 0 μg/ml, (b, f) 1 μg/ml, (c, g) 5 μg/ml, (d, h) 25 μg/ml。濃度は抗 claudin-1 抗体の濃度を示す。スケールバーは 20 μm を示す。

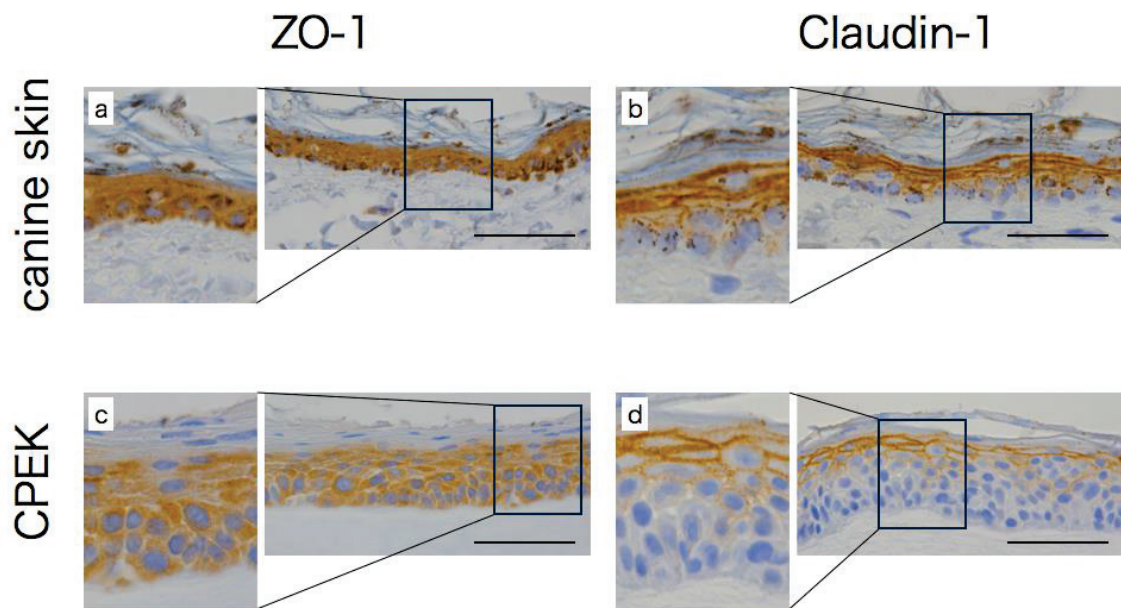


図 2-3 犬正常皮膚および犬三次元培養表皮モデルにおける免疫組織化学

(a, b) 犬正常皮膚, (c, d) 犬三次元培養表皮モデル, (a, c) ZO-1, (b, d) claudin-1。弱拡大は 400 倍, 強拡大は 800 倍を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

## 第3章

犬三次元培養表皮モデルにおける ZO-1 および claudin-1 に対する  
TNF-alpha および IL-13 の影響

### 3.1. 序論

CAD の病因は、環境要因および遺伝的素因による複合的なものであり、これらが皮膚バリア機能および患者の免疫反応に影響を及ぼすと考えられている[53]。角層の水分保持に重要な役割を果たすフィラグリンの遺伝子変異およびそれに起因する皮膚バリア機能の障害は、AD の最も重要な因子であると考えられている[17, 50]。しかしながら、AD 患者におけるフィラグリン遺伝子変異の割合は、集団によって明らかな差が認められている[13, 15]。また、限られた数の報告ながら、CAD におけるフィラグリンの発現に関する研究では、CAD とフィラグリン遺伝子の変異との間に有意な関連性は認められていない[74]。したがって、AD および CAD における皮膚バリア機能障害には、フィラグリン遺伝子の変異以外の要因が存在することが示唆される。

これまでに、AD 患者の皮膚病変部および非病変部における claudin-1 の発現低下のほか、claudin-1 の転写量は、血清総 IgE および総好酸球数と負の相関を示すことが報告されている[18]。さらに、AD 患者の皮膚病変部における ZO-1 の発現、非病変部における ZO-1 ならびに claudin-4 の発現は正常皮膚より低下していることも明らかになっている[102]。また、犬においては、CAD モデル犬の非病変部皮膚における claudin-1 の発現は健常犬の皮膚に比べて低下しており、ZO-1 および occludin の発現には変化が認められなかったことが示されている[79]。CAD モデル犬を用いた別の報告では、非病変部皮膚における ZO-1 の発現は健常犬の皮膚と比較して低下しており、claudin-1 および occludin の発現には差が認められなかったことが示されている[37]。これらの結果は、タイトジャンクションタンパクが AD および CAD の病態に関与していることを示唆するものである。

これまでに、タイトジャンクションタンパクの発現変化に関連する因子が幾

つか報告されている。培養ヒトケラチノサイトにおいて、IL-1betaにより claudin-1のタンパク発現量の低下が認められた[98]。また、組織培養したヒトおよびブタの皮膚において、IL-1betaの皮内投与により、免疫蛍光染色によるZO-1の局在の変化ならびに、タンパク発現量の低下が認められている[40]。さらに、ヒト腸上皮細胞株であるHT-29/B6において、TNF-alphaによる claudin-1のタンパク発現量の増加が認められている[2]。また、IL-4やIL-13により、培養ヒトケラチノサイトにおいて、claudin-1のタンパク発現量が増加した[18]。さらに別の報告では、ヒトケラチノサイトを用いた三次元培養において、IL-4、IL-13およびIL-31により claudin-1の細胞辺縁における免疫蛍光染色強度の低下が示されている[26]。これらの結果から、炎症性サイトカインおよびTh2サイトカインがタイトジャンクションタンパクの発現変化を起こしている可能性が考えられる。

CADの病変部および非病変部皮膚においては、炎症性サイトカインであるIL-1beta、TNF-alphaのほか、IL-4、IL-5、IL-13をはじめとしたTh2サイトカインの転写量の増加が報告されている[45, 61, 62, 83]。したがって、CADにおいて炎症性サイトカインもしくはTh2サイトカインがタイトジャンクションタンパクの発現に影響を与え、皮膚バリア機能の低下を招来している可能性が考えられる。なかでも、TNF-alphaは、ヒトケラチノサイトにおけるThymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17の産生を増加させることが示されており[96]、犬ケラチノサイトにおいては、TNF-alphaによりTARC/CCL17の転写量が増加することが報告されている[87]。一方、IL-1betaはTARC/CCL17の転写量に変化を及ぼさなかった[87]。つまり、TNF-alphaは、CADにおいて皮膚病変部へのTh2細胞の遊走を促進していると考えられる。また、IL-13は、経皮的なHDM刺激を行った犬の皮膚において、IL-4、IL-5、IL-10よりも早期に、より高い転写活性を示すことが報告されている[49]。したがって、TNF-alphaおよびIL-13は、CADにおけるTh2型の反応の促進に重要な役割を果たすと考えられる。そこで、本

研究では炎症性サイトカインおよびTh2サイトカインとしてそれぞれTNF-alpha および IL-13 に着目した。

これらのサイトカインが、タイトジャンクションに及ぼす影響が明らかになれば、CADにおける皮膚バリア機能の異常について、さらなる病態の解明が期待できると思われるが、現在詳細は不明である。

前章までにおいて、従来の単層培養と比較した犬三次元培養表皮モデルの有用性が明らかとなった。そこで、本章ではタイトジャンクションの形成およびバリア機能にそれぞれ重要な役割を果たす ZO-1 および claudin-1 について、TNF-alpha および IL-13 が及ぼす影響を評価した。

## 3.2. 材料と方法

### 3.2.1 材料および動物

犬三次元培養表皮モデルの作製には、CPEK (CELLnTEC advanced cell systems, Bern, Switzerland) およびその培養液である CnT-09 (CELLnTEC advanced cell systems) を用いた。組換え犬 TNF-alpha および犬 IL-13 は、それぞれ Sino Biological (北京, 中国) および Kingfisher Biotech (Saint Paul, MN, USA) より入手した。皮膚は2頭の健康なビーグル犬 (年齢 2 歳齢, オスおよび 4 歳齢, メス) の体幹腹側部より, 8 mm 生検パンチを用いて採取し, 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

### 3.2.2 TNF-alpha および IL-13 の調製

組換え犬 TNF-alpha および組換え犬 IL-13 は, それぞれ RNase フリー水および 0.1%BSA を添加した PBS を用いて溶解および希釈を行った。

### 3.2.3 三次元培養

三次元培養は1章で述べた方法と同様に行い, 培養5日目から培養終了まで, 培養液に 0.4  $\mu\text{g/ml}$  のヒドロコルチゾン (Sigma-Aldrich) を添加した。培養8日目からはヒドロコルチゾンに加え, 培養液に対し 5  $\text{ng/ml}$  または 50  $\text{ng/ml}$  となるように調製した組換え犬 TNF-alpha および組換え犬 IL-13 を添加した。また, 対照サンプルの培養液には CnT-09 もしくは 0.1%の BSA を添加した。

培養 14 日目に, 培地の入った外側の培養皿から培養細胞の入った内側の培養皿を取り出し, 替刃メス (No.11; カイインダストリーズ) を用いて, コラーゲンゲルおよび内側の培養皿の底部のフィルターごと培養細胞を採取した。採取したサンプルは, 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ホルマリン固定後に,

パラフィン包埋を行った皮膚および培養細胞を 3  $\mu\text{m}$  で薄切し、ヘマトキシリン  
エオジン染色および免疫組織化学に供した。

#### 3.2.4 免疫組織化学

免疫組織化学は 2 章で述べた方法と同様に行った。用いた一次抗体は、2 章の  
結果に基づき、ZO-1 および claudin-1 共に 1  $\mu\text{g/ml}$  で使用した。実験は異なるサ  
ンプルを用いて 3 回行った。



## 3.3 結果

### 3.3.1 培養細胞の形態における TNF-alpha および IL-13 の影響

TNF-alpha または IL-13 の存在下においても，培養細胞は角層様の層を形成した。有棘層様の層から基底層様の層において海綿状変化および異常角化を認めた（図 3-1B, C, E, F）。

### 3.3.2 コントロールにおける ZO-1 および claudin-1 の発現

ネガティブコントロールとして用いた正常犬皮膚および培養細胞においては，どちらも陽性所見は認められなかった。

### 3.3.2 ZO-1 および claudin-1 の発現における TNF-alpha の影響

ZO-1 の発現にコントロールとの差は認められなかった（図 3-2B, C）。一方，claudin-1 の発現は，5 ng/ml の TNF-alpha 添加により，染色性の部分的な消失が認められた（図 3-2E）。また，それは 50 ng/ml の添加においてより顕著であった（図 3-3F）。

### 3.3.3 ZO-1 および claudin-1 の発現における IL-13 の影響

ZO-1 の発現にコントロールとの差は認められなかった（図 3-3B, C）。一方，claudin-1 の発現は，5 ng/ml の IL-13 添加により，染色性の部分的な消失が認められた（図 3-3E）。IL-13 の濃度による差は認められなかった（図 3-4E, F）。

### 3.4. 考察

本章では、ZO-1 および claudin-1 における TNF-alpha および IL-13 の及ぼす影響について、犬三次元培養表皮モデルを用いて評価した。TNF-alpha は、ZO-1 の発現に影響を与えなかった。また、claudin-1 においては、用量依存性に染色性の部分的な消失が認められた。

これまでに、ヒト腸管癌細胞株 (T84 および Caco-2) において、TNF-alpha は、ZO-1 の局在に変化を生じさせなかったことが示されており、一方で claudin-1 においては TNF-alpha により発現分布に変化が認められている。さらにそれらの変化に伴って、細胞間における物質透過性の増加が認められている[35]。また、犬腎臓尿細管上皮由来細胞株 (MDCK 細胞) において、TNF-alpha は ZO-1 の発現量に影響を与えず、claudin-1 の発現量を低下させた[73]。さらに免疫蛍光染色像においてタイトジャンクションの形態は TNF-alpha の添加により破壊されており、タイトジャンクションの形成が障害されたことが示唆された[73]。これらの結果は、本研究における結果を支持するものである。

AD 患者の病変部皮膚において、ZO-1 の発現量が低下しており[102]、また、乾癬患者の皮膚において ZO-1 の局在の変化および転写量の増加が認められることが報告されている[40]ことから、ZO-1 の発現調節には、TNF-alpha 以外の因子が関与していると思われる。

一方、AD 患者の病変部皮膚において claudin-1 の発現量が低下しており[102]、また、乾癬患者の皮膚において、claudin-1 における転写量および免疫組織化学による染色強度が低下していることが報告されている[40]。したがって、本研究の結果より、CAD のような炎症性皮膚疾患の病変部において、TNF-alpha は claudin-1 の発現調節に直接関与している可能性が考えられた。

IL-13 は、ZO-1 の発現に影響を与えなかった。また、claudin-1 においては、染

色性の部分的な消失が認められた。

これまでに、カルシウムにより分化誘導したヒトケラチノサイトにおいて、IL-13の刺激により、ZO-1の発現量は変化しなかったことが報告されている[18]。また、CADモデル犬の非病変部皮膚において、ZO-1の発現は健常犬と比較して変化が認められなかった[79]。さらに、AD患者およびCADモデル犬の非病変部皮膚において、健常皮膚と比較し、免疫組織化学による claudin-1 の染色強度の低下が認められている[18, 79]。これらの事実を鑑みると、本研究で得られた結果より、IL-13は、ZO-1の発現調節に直接的な関与をしていない一方、claudin-1の発現調節に関与している可能性が考えられる。

しかし、カルシウムにより分化誘導したヒトケラチノサイトにおいて、IL-13の添加により、claudin-1の発現量が増加することが示されている[18]。また、ヒトケラチノサイトを用いた三次元培養皮膚モデルにおいて、IL-13による刺激に対し、claudin-1の転写量および発現量は変化を示さなかった[30]。これらの矛盾する事実は、用いた細胞や培養条件、ならびに刺激条件（濃度および刺激時間）などに起因する可能性が考えられ、解釈には注意を要すると思われる。また、TNF-alpha または IL-13 の添加により、本モデルでは一部の培養細胞に変性が認められた。したがって、本研究で用いた実験条件についても、今後タンパク量の定量や刺激条件の検討が必要と考えられた。

本研究では、TNF-alpha および IL-13 それぞれについて、タイトジャンクションにおける影響を評価した。組織培養したヒトの皮膚において、Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) および TNF-alpha による TSLP の産生は、Th2 サイトカイン (IL-4 もしくは IL-13 または、IL-4 および IL-13) および TNF-alpha を混合して刺激した場合においてのみ認められた[9]。つまり、Th2 サイトカインおよび TNF-alpha は CAD における皮膚免疫病態に、相加的な作用を有する可能性が考えられる。したがって、今後の *in vitro* における皮膚バリア機能研究には、刺激

条件のさらなる検討が必要と思われる。

本研究の結果から、TNF-alpha および IL-13 は claudin-1 の発現調節に関与し、CAD におけるタイトジャンクションのバリア機能に影響を与えている可能性が高まった。ZO-1 および claudin-1 と CAD の病態との関係を明らかにするには、より生体における変化を反映できる様な *in vitro* モデルの開発を含め、さらなる研究が必要と思われる。

### 3.5 図

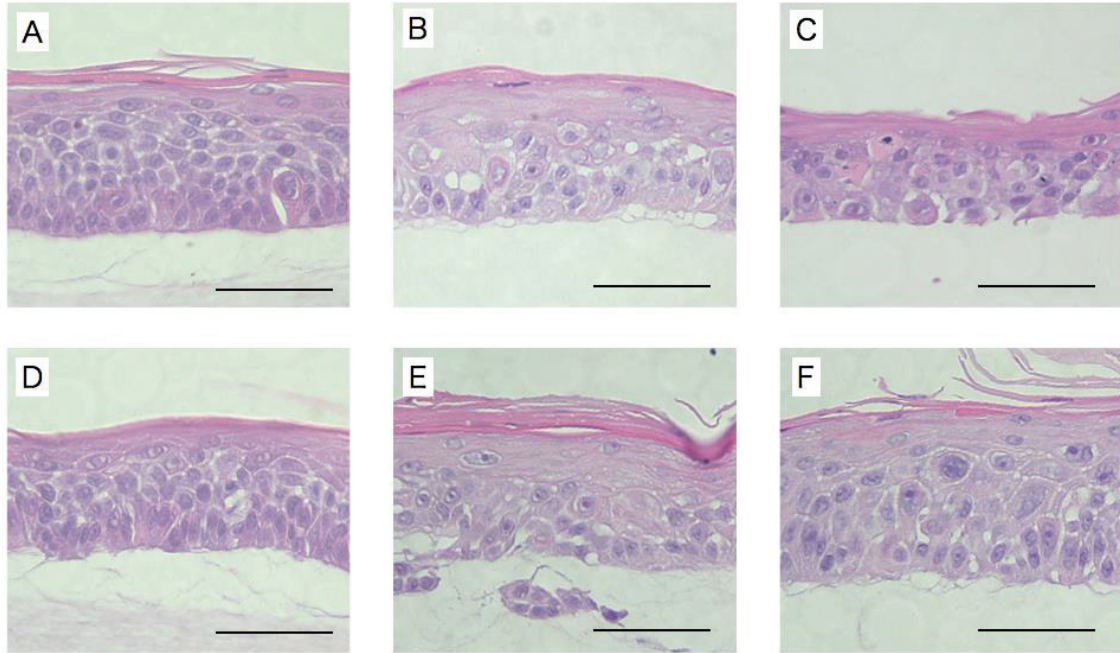


図3-1 TNF-alphaおよびIL-13による培養細胞の形態変化

(A) 培地のみ, (B) TNF-alpha 5 ng/ml, (C) TNF-alpha 50 ng/ml, (D) 培地+0.1%BSA, (E) IL-13 5 ng/ml, (F) IL-13 50 ng/ml。ヘマトキシリンエオジン染色。スケールバーは50  $\mu\text{m}$ を示す。

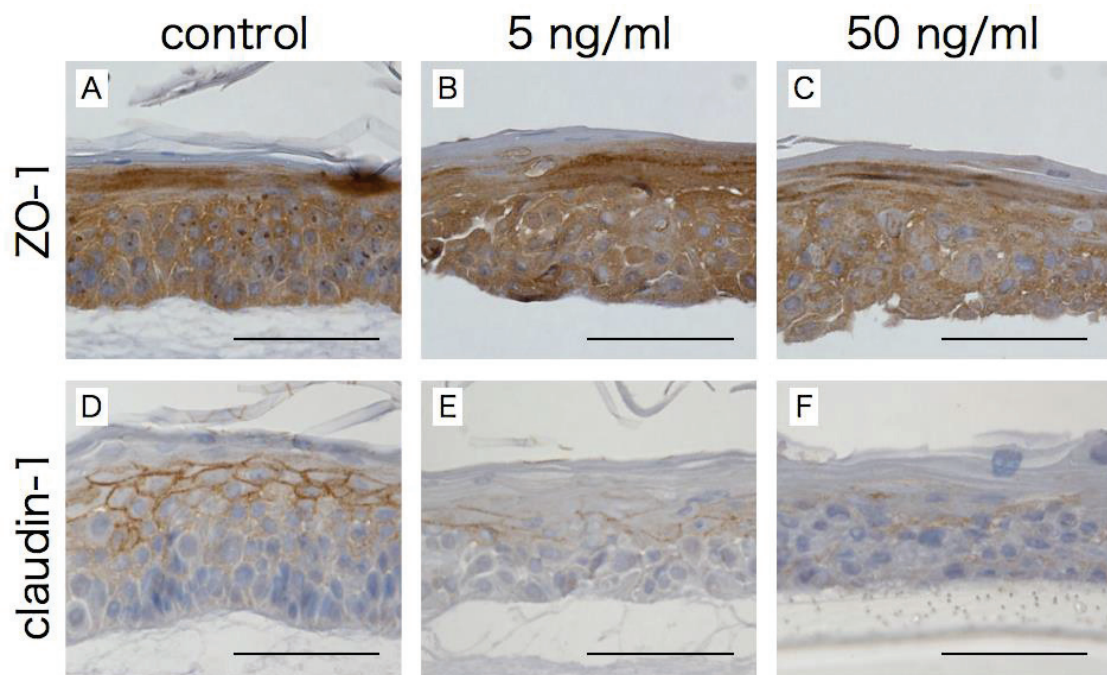


図 3-2 培養細胞の ZO-1 および claudin-1 の発現における TNF-alpha の影響

(A, B, C) ZO-1, (D, E, F) claudin-1, (B, E) TNF-alpha 5 ng/ml, (C, F) TNF-alpha 50 ng/ml。スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。

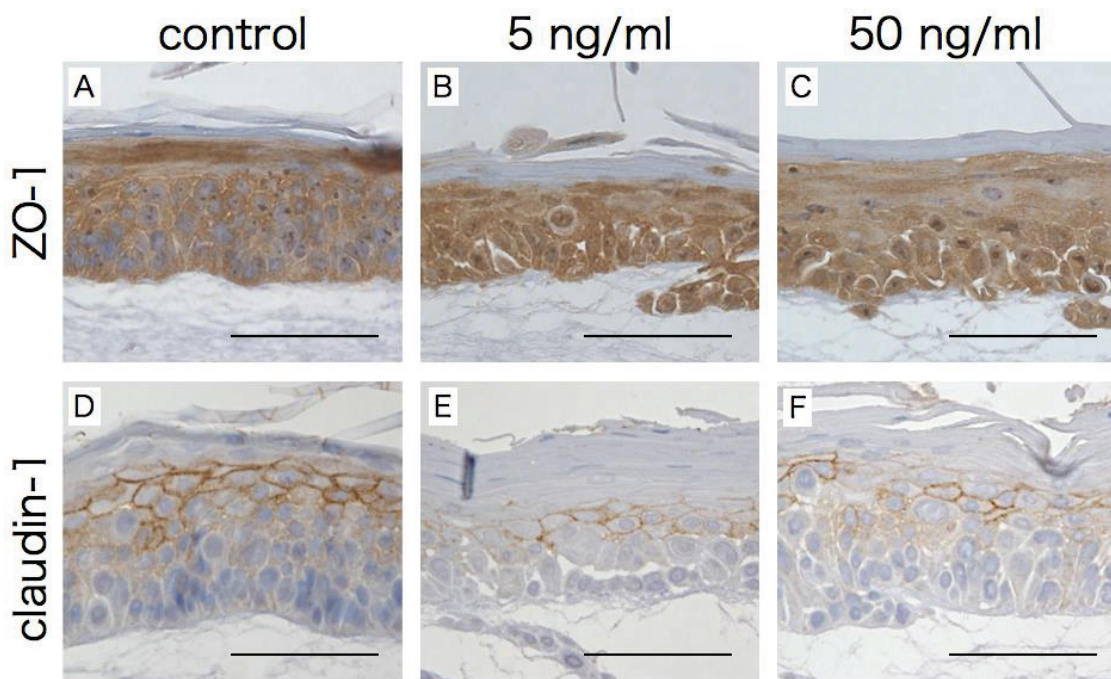


図 3-3 培養細胞の ZO-1 および claudin-1 の発現における IL-13 の影響

(A, B, C) ZO-1, (D, E, F) claudin-1, (B, E) IL-13 5 ng/ml, (C, F) IL-13 50 ng/ml。

スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。

## 総括



CAD は、ヒト AD と同様に、Th2 細胞とそれより産生される Th2 型サイトカイン存在下で、環境アレルゲンに対し特異的に産生された IgE 抗体が肥満細胞に結合し、脱顆粒を起こすことで発症に至ると考えられている[53]。Th2 細胞の分化過程において、ケラチノサイトの産生する液性因子ならびに、角層およびタイトジャンクションからなる皮膚バリアは、重要な役割を果たしていると考えられているが、詳細については不明な点も多い[3, 50]。そのため、CAD の病態における皮膚免疫バリア機能のさらなる解明に向けた *in vitro* ツールとして、本研究では犬ケラチノサイト細胞株より作製された三次元培養表皮モデルに注目した。

第 1 章では、犬三次元培養表皮モデルを作製し、TNF-alpha, TGF-beta, CCL2 および CCL20 について遺伝子転写解析を行い、犬の正常皮膚との類似性を単層培養と比較した。三次元培養および皮膚においては、全てのサイトカイン遺伝子の転写が認められた。また、TNF-alpha, CCL2 および CCL20 は、いずれも単層培養に比べ、皮膚に類似した転写パターンを示した。これにより、本モデルを用いたサイトカインの転写解析は、単層培養に対し優位性を持つことが示唆された。

第 2 章では、本モデルにおける ZO-1 および claudin-1 の発現について、免疫組織化学を行い、犬の正常皮膚との比較を行った。本モデルにおいて ZO-1 は、皮膚に類似した染色パターンおよび局在を示し、細胞質を中心とした発現と、角層様層を除く全ての層における発現が認められた。claudin-1 は、皮膚に類似した蜂の巣状の染色パターンを示した。また、皮膚において角層を除く全ての層で発現が認められたのに対し、本モデルでは顆粒層様層から有棘層様層の上層に限局して発現が認められた。これらの結果より、顆粒層におけるタイトジャンクション研究において、本モデルが有用なツールとなる可能性が示された。

第 3 章では、本モデルを用いて ZO-1 および claudin-1 における TNF-alpha および IL-13 の及ぼす影響を評価した。TNF-alpha または IL-13 の刺激により、

claudin-1 の発現強度の低下が認められた。一方、ZO-1 の発現に変化は認められなかった。したがって、TNF-alpha および IL-13 は、claudin-1 の発現調節に関与し、タイトジャンクションのバリア機能に影響を与えていることが示唆された。

本研究の結果から、犬ケラチノサイト細胞株を用いて作製した三次元培養表皮モデルの持つ免疫バリア機能は、皮膚に類似した性質を有していることが明らかとなった。したがって、本モデルは犬ケラチノサイトにおける、被験対象の生理学的機能研究やタイトジャンクションへの影響評価に、有用なツールとなる可能性を持つと考えられる。また、CAD における皮膚バリア機能障害につながる原因として、TNF-alpha および IL-13 による claudin-1 の発現調節が関与していることが示唆された。今後は、関連分子についてさらに広範な多角的研究が必要と思われる。また、獲得免疫反応の初期においては、ケラチノサイトと抗原提示細胞との相互作用が重要であると考えられる。したがって、様々な液性因子を介して複雑に病態に関与しているケラチノサイトと抗原提示細胞とのクロストークを直接評価できるモデルとして、本モデルは将来的に、抗原提示細胞との共培養による表皮モデルへの発展が期待される。

## 謝辭

本研究を行うに際して、終始懇篤なる御指導を受け賜りました岐阜大学応用生物科学部獣医臨床放射線学研究室の前田貞俊教授，神志那弘明准教授，西田英高助教（現 大阪府立大学生命環境学研究科准教授）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 柴田早苗准教授，副査の帯広畜産大学 猪熊壽教授，岩手大学 山崎真大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。

本研究遂行にあたり、実験器具を快く使用させて頂きました獣医病理学研究室の柳井徳磨教授，酒井洋樹准教授ならびに同研究室の皆様へ深謝いたします。

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技術補佐員の皆様および学生の皆様へ心より感謝いたします。

大学院での研究に対して、ご理解と日々の業務において多大なるご協力を賜りました寺本動物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 AHH, Pillai S (2011) Cellular and Molecular Immunology E-Book. Elsevier Health Sciences
2. Amasheh M, Fromm A, Krug SM, Amasheh S, Andres S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J-D (2010) TNFalpha-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkappaB signaling. *Journal of Cell Science* 123(Pt 23):4145–4155
3. Asahina R, Maeda S (2016) A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. *Vet Dermatol* 1–11
4. Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, Braye F, Auger FA, Damour O (2009) Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur J Dermatol* 19(2):107–113
5. Balda MS, Matter K (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1788(4):761–767
6. Behfar S, Hassanshahi G, Nazari A, Khorramdelazad H (2017) A brief look at the role of monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in the pathophysiology of psoriasis. *Cytokine* 1–0
7. Bizikova P, Linder KE, Olivry T (2011) Immunomapping of desmosomal and nondesmosomal adhesion molecules in healthy canine footpad, haired skin and

- buccal mucosal epithelia: comparison with canine pemphigus foliaceus serum immunoglobulin G staining patterns. *Vet Dermatol* 22(2):132–142
8. Boelsma E, Verhoeven MCH, Ponc M (1999) Reconstruction of a Human Skin Equivalent Using a Spontaneously Transformed Keratinocyte Cell Line (HaCaT). *J Invest Dermatol* 112(4):489–498
  9. Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC (2007) Cutting edge: proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* 178(6):3373–3377
  10. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106(3):761–771
  11. Bouwstra JA, Ponc M (2006) The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta* 1758(12):2080–2095
  12. Brandner JM, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, Moll I, Beck LA, De Benedetto A (2015) Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers* 3(1-2):e974451
  13. Brown SJ, McLean WHI (2012) One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol* 132(3 Pt 2):751–762
  14. Candi E, Schmidt R, Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4):328–340
  15. Cascella R, Foti Cuzzola V, Lepre T, Galli E, Moschese V, Chini L, Mazzanti

- C, Fortugno P, Novelli G, Giardina E (2011) Full sequencing of the FLG gene in Italian patients with atopic eczema: evidence of new mutations, but lack of an association. *J Invest Dermatol* 131(4):982–984
16. Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D (1999) Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 190(12):1755–1768
  17. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, Guy RH, MacGowan AL, Tazi-Ahnini R, Ward SJ (2009) Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129(8):1892–1908
  18. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, et al (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 127(3):773–86.e1–7
  19. DeBoer DJ, 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. *Vet Immunol Immunopathol* 81(3-4):239–249
  20. Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K (2014) Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol* 24(6):650–661
  21. Fargeas C, Wu CY, Nakajima T, Cox D, Nutman T, Delespesse G (1992) Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 22(8):2173–2176



22. Feldmeyer L, Huber M, Fellmann F, Beckmann JS, Frenk E, Hohl D (2006) Confirmation of the origin of NISCH syndrome. *Hum Mutat* 27(5):408–410
23. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141(7):1539–1550
24. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156(6):1099–1111
25. GRONE A (2002) Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 88(1-2):1–12
26. Gruber R, Börnchen C, Rose K, et al (2015) Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol* 185(10):2777–2789
27. Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, et al (1997) Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 272(9):5846–5853
28. Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, McKinney CE, Elias PM, Sidransky E (1994) Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *J Clin Invest* 93(4):1756–1764
29. Hoste E, Kemperman P, Devos M, et al (2011) Caspase-14 Is Required for

- Filaggrin Degradation to Natural Moisturizing Factors in the Skin. *J Invest Dermatol* 131(11):2233–2241
30. Hönzke S, Wallmeyer L, Ostrowski A, Radbruch M, Mundhenk L, Schäfer-Korting M, Hedtrich S (2016) Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and  $\beta$ -Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. *J Invest Dermatol* 136(3):631–639
  31. Ibisch C, Bourdeau P, Cadiot C, Viac J, Gatto H (2007) Upregulation of TNF- $\alpha$  Production by IFN- $\gamma$  and LPS in Cultured Canine Keratinocytes: Application to Monosaccharides Effects. *Vet Res Commun* 31(7):835–846
  32. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 96(4):523–526
  33. Irvine AD, McLean WHI (2006) Breaking the (Un)Sound Barrier: Filaggrin Is a Major Gene for Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 126(6):1200–1202
  34. Johanna M. Brandner (2009) Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(2):289–294
  35. Juuti-Uusitalo K, Klunder LJ, Sjollema KA, Mackovicova K, Ohgaki R, Hoekstra D, Dekker J, van IJendoorn SCD (2011) Differential Effects of TNF (TNFSF2) and IFN- $\gamma$  on Intestinal Epithelial Cell Morphogenesis and Barrier Function in Three-Dimensional Culture. *PLoS ONE* 6(8):e22967
  36. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM (2001) Assembly of the epidermal

- cornified cell envelope. *Journal of Cell Science* 114(Pt 17):3069–3070
37. Kim H-J, Cronin M, Ahrens K, Papastavros V, Santoro D, Marsella R (2016) A comparative study of epidermal tight junction proteins in a dog model of atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 27(1):40–e11
  38. Kirschner N, Brandner JM (2012) Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257(1):158–166
  39. Kirschner N, Haftek M, Niessen CM, Behne MJ, Furuse M, Moll I, Brandner JM (2011) CD44 Regulates Tight-Junction Assembly and Barrier Function. *J Invest Dermatol* 131(4):932–943
  40. Kirschner N, Poetzl C, den Driesch von P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, Brandner JM (2009) Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol* 175(3):1095–1106
  41. Klukowska-Rötzler J, Chervet L, Müller EJ, Roosje P, Marti E, Janda J (2013) Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 24(1):54–9.e13–4
  42. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M (2009) External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med* 206(13):2937–2946
  43. Kubo A (2011) [Dynamic cooperation between epidermal barriers and Langerhans cells]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 34(2):76–84

44. Kucharzik T, Hudson JT, Waikel RL, Martin WD, Williams IR (2002) CCR6 expression distinguishes mouse myeloid and lymphoid dendritic cell subsets: demonstration using a CCR6 EGFP knock-in mouse. *Eur J Immunol* 32(1):104–112
45. Maeda S, Fujiwara S, Omori K, Kawano K, Kurata K, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H (2002) Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 88(1-2):79–87
46. Maeda S, Maeda S, Shibata S, Chimura N, 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(3-4):298–302
47. Marsella R, Nicklin C, Lopez J (2006) Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol* 17(5):306–312
48. Marsella R, De Benedetto A (2017) Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. *Veterinary Sciences* 4(4):37–19
49. Marsella R, Olivry T, Maeda S (2006) Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet Dermatol* 17(2):111–120
50. Marsella R, Olivry T, Carlotti D-N, International Task Force on Canine Atopic Dermatitis (2011) Current evidence of skin barrier dysfunction in human and

- canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 22(3):239–248
51. Marsella R, Samuelson D, Doerr K (2010) Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 21(1):81–88
  52. Marsella R, Samuelson D, Harrington L (2009) Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Vet Dermatol* 20(5-6):547–554
  53. Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ, Fadok VA (2012) Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 241(2):194–207
  54. Merad M, Ginhoux F, Collin M (2008) Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 8(12):935–947
  55. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL (2013) *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology - E-BOOK*. Elsevier Health Sciences
  56. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, et al (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 585(4):606–612
  57. Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, Horikawa T, Kawasaki H, Hieshima K, Izawa D, Fujiie S, Tezuka T, 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. *Int Immunol* 13(1):95–103

58. Niessen CM (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127(11):2525–2532
59. Nishifuji K, Yoon JS (2013) The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol* 24(1):60–72.e15–6
60. Noske K (2018) Secreted immunoregulatory proteins in the skin. *J Dermatol Sci* 89(1):3–10
61. Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB (2002) Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 32(5):789–795
62. Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, Dow JL, Moore PF (1999) Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Exp Dermatol* 8(3):204–211
63. Olivry T, Moore PF, Affolter VK, Naydan DK (1996) Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 288(10):579–585
64. Olivry T, Dunston SM (2015) Expression patterns of superficial epidermal adhesion molecules in an experimental dog model of acute atopic dermatitis skin lesions. *Vet Dermatol* 26(1):53–6– e–17–8
65. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélaud P, International Committee on Allergic Diseases of Animals (2015) Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Vet Res*

11(1):210

66. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélaud P, International Task Force on Canine Atopic Dermatitis (2010) Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 21(3):233–248
67. Olivry T, Rivierre C, Jackson HA, Murphy KM, Davidson G, Sousa CA (2002) Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: a blinded randomized prednisolone-controlled trial. *Vet Dermatol* 13(2):77–87
68. Olivry T, International Task Force of Canine Atopic Dermatitis (2010) New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 21(1):123–126
69. Ouwehand K, Spiekstra SW, Waaijman T, Breetveld M, Scheper RJ, de Gruijl TD, Gibbs S (2012) European Journal of Cell Biology. *Eur J Cell Biol* 91(10):765–773
70. O’Neill CA, Garrod D (2011) Tight junction proteins and the epidermis. *Exp Dermatol* 20(2):88–91
71. Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38(4):441–446
72. Plager DA, Torres SMF, Koch SN, Kita H (2012) Gene transcription abnormalities in canine atopic dermatitis and related human eosinophilic allergic diseases. *Vet Immunol Immunopathol* 149(1-2):136–142

73. Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA (2004) Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Poster presentation at the annual meeting of the Association for Academic Surgery, Boston, MA., November 4–7, 2002. <sup>2</sup>This work was partially supported by a grant from the American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Journal of Surgical Research* 116(1):14–18
74. Pucheu-Haston CM (2016) Atopic dermatitis in the domestic dog. *Clin Dermatol* 34(2):299–303
75. Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MNC (2015) Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 26(2):124–e32
76. Pucheu-Haston CM, Shuster D, Olivry T, Brianceau P, Lockwood P, McClanahan T, Waal Malefyt R, Mattson JD, Hammerberg B (2006) A canine model of cutaneous late-phase reactions: prednisolone inhibition of cellular and cytokine responses. *Immunology* 117(2):177–187
77. Pummi K, Malminen M, Aho H, Karvonen SL, Peltonen J, Peltonen S (2001) Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* 117(5):1050–1058
78. Roussel AJJ, Knol AC, Bourdeau PJ, Bruet V (2014) Optimization of an immunohistochemical method to assess distribution of tight junction proteins in canine epidermis and adnexae. *Journal of Comparative Pathology* 150(1):35–46



79. Roussel AJJ, Bruet V, Marsella R, Knol AC, Bourdeau PJ (2015) Tight junction proteins in the canine epidermis: a pilot study on their distribution in normal and in high IgE-producing canines. *Can J Vet Res* 79(1):46–51
80. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133(5):775–787
81. Sakamoto M, Asahina R, Kamishina H, Maeda S (2016) Transcription of thymic stromal lymphopoietin via Toll-like receptor 2 in canine keratinocytes: a possible association of *Staphylococcus* spp. in the deterioration of allergic inflammation in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 27(3):184–e46
82. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WHI (2009) Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science* 122(Pt 9):1285–1294
83. Schlotter YM, Rutten VPMG, Riemers FM, Knol EF, Willemse T (2011) Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Vet Immunol Immunopathol* 143(1-2):20–26
84. Schlotter YM, Veenhof EZ, Brinkhof B, Rutten VPMG, Spee B, Willemse T, Penning LC (2009) A GeNorm algorithm-based selection of reference genes for quantitative real-time PCR in skin biopsies of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 129(1-2):115–118
85. Schottelius AJG, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK (2004) Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for

- psoriasis. *Exp Dermatol* 13(4):193–222
86. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J (2003) The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14(5):409–426
  87. Shibata S, Maeda S, Maeda S, Chimura N, Kondo N, Fukata T (2010) Augmentation of CCL17 and CCL28 gene expression by TNF-alpha, IL-1beta, or IFN-gamma in cultured canine keratinocytes. *Res Vet Sci* 88(3):422–426
  88. Shibata S, Maeda S, Tsuchida H, Fukata T (2008) Phenotypic Analysis for a Cell Line of Canine Epidermal Keratinocytes. *The Journal of Veterinary Medical Science* 70(8):853–855
  89. Shimada K, Yoon JS, Yoshihara T, Iwasaki T, Nishifuji K (2009) Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 20(5-6):541–546
  90. Simpson CL, Patel DM, Green KJ (2011) Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(9):565–580
  91. Spiekstra SW, Toebak MJ, Sampat-Sardjoepersad S, et al (2005) Induction of cytokine (interleukin-1a and tumor necrosis factor-a) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Exp Dermatol* 109–116
  92. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*

103(3):755–766

93. Suter MM, Schulze K, Bergman W, Welle M, Roosje P, Müller EJ (2009) The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol* 20(5-6):515–532
94. Tsukita S, Furuse M (2002) Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 14(5):531–536
95. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126(4):741–754
96. Vestergaard C, Kirstejn N, Gesser B, Mortensen JT, Matsushima K, Larsen CG (2001) IL-10 augments the IFN-gamma and TNF-alpha induced TARC production in HaCaT cells: a possible mechanism in the inflammatory reaction of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 26(1):46–54
97. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG (2000) A Th2 Chemokine, TARC, Produced by Keratinocytes May Recruit CLA+CCR4+ Lymphocytes into Lesional Atopic Dermatitis Skin. *J Invest Dermatol* 115(4):640–646
98. Watson R, Poddar R, Walker JM, McGuill I, Hoare LM, Griffiths C, O'Neill CA (2007) Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *J Pathol* 212(4):450–458
99. Yagihara H, Okumura T, Shiomi E, Shinozaki N, Kuroki S, Sasaki Y, Ito K, Ono K, Washizu T, Bonkobara M (2011) Reconstruction of stratum corneum in

organotypically cultured canine keratinocyte-derived CPEK cells. *Vet Res Commun* 35(7):433–437

100. Yamamoto T, Saeki Y, Kurasawa M, Kuroda S, Arase S, Sasaki H (2008) Effect of RNA interference of tight junction-related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 300(9):517–524
101. Yoon JS, Nishifuji K, Sasaki A, Ide K, Ishikawa J, Yoshihara T, Iwasaki T (2011) Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 20(9):732–736
102. Yuki T, Tobiishi M, Kusaka-Kikushima A, Ota Y, Tokura Y (2016) Impaired Tight Junctions in Atopic Dermatitis Skin and in a Skin-Equivalent Model Treated with Interleukin-17. *PLoS ONE* 11(9):e0161759