

氏名(本(国)籍)	寺本圭志(岐阜県)			
主指導教員氏名	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515号			
学位授与年月日	平成30年9月21日			
学位授与の要件	学位規則第4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	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			
審査委員	主査	岐阜大学	准教授	柴田早苗
	副査	帯広畜産大学	教授	猪熊壽
	副査	岩手大学	教授	山崎真大
	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

犬アトピー性皮膚炎(CAD)は、アレルゲンの暴露により誘導されるTh2型の炎症を特徴とする。CAD症例の皮膚においては、バリア機能に重要な役割を果たすタイトジャンクションの機能異常が認められており、バリア機能の低下が経皮的なアレルゲンの侵入を促進している。これまでの報告から、ケラチノサイトは様々な液性因子を産生し、CADの病態に関与することが明らかになっている。また、これらの液性因子はタイトジャンクションの機能異常に影響を及ぼしている可能性があるが、詳細は不明である。このメカニズムの解明には、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が有用である可能性がある。しかし、本モデルのサイトカインおよびタイトジャンクションタンパクの発現は明らかになっていない。そこで、本研究では、皮膚免疫バリア機能の研究における*in vitro*ツールとしての有用性を評価する目的で、本モデルにおけるサイトカイン遺伝子の転写およびタイトジャンクションタンパクの発現について検討した。

第1章では、皮膚免疫において中心的な役割を担うTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、CCL2およびCCL20に着目し、本モデルにおける遺伝子転写量をRT-qPCRにより定量した。単層培養および犬の正常皮膚における転写量とそれぞれ比較した結果、本モデルにおける*tnf- $\alpha$* 、*ccl2*および*ccl20*の転写パターンは皮膚におけるものに類似していた。したがって、本モデルはサイトカイン遺伝子転写解析に有用であることが示唆された。

第2章では、表皮のタイトジャンクションにおいて中心的な役割を担うZO-1およびclaudin-1に着目し、本モデルにおける発現を免疫組織化学により評価した。その結果、ZO-1の発現は角層様層以外の全ての層の細胞質において認められた。また、claudin-1は蜂の巣状の発現が認められ、その染色性は顆粒層様層から基底側に向かって減弱した。claudin-1の発現は顆粒層様層および有棘層様層の上層においてのみ認められたのに対し、皮膚では角層を除く全ての層において発現が認められた。したがって、本モデルは顆粒層様層に

おけるタイトジャンクションの研究において有用である可能性が示された。

第3章では、本モデルを用いて Th2 型炎症を促進する TNF- $\alpha$  および IL-13 の ZO-1 および claudin-1 発現に与える影響を免疫組織化学的に評価した。その結果、いずれのサイトカイン添加時においても claudin-1 の発現低下が認められたが、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 の発現低下を介してバリア機能を低下させている可能性が示された。

以上の結果から、本モデルは免疫バリア機能において皮膚と類似した性質を有することが明らかとなった。この結果は、本モデルが CAD などの炎症性皮膚疾患の病態解明に向けた研究に有用である可能性を示している。

## 審査結果の要旨

犬アトピー性皮膚炎 (CAD) の病態には、Th2 型の炎症およびタイトジャンクションの異常が関与している。ケラチノサイトは様々な液性因子を産生し、タイトジャンクションの機能異常を引き起こす可能性があるが、詳細は明らかになっていない。このメカニズムの解明には、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が有用と考えたが、本モデルにおける免疫バリア機能については不明であった。そこで、本モデルにおけるサイトカイン遺伝子転写およびタイトジャンクションタンパクの発現を明らかにすることを目的として、以下の実験を行っている。

第1章では、犬三次元培養表皮モデルを作製し、RT-qPCR を用いて本モデルにおける TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、CCL2 および CCL20 の遺伝子転写パターンが皮膚におけるものに類似していることを明らかにした。この結果より、サイトカインの遺伝子転写解析においては、本モデルが単層培養よりも適切な実験系であることが示唆された。

第2章では、本モデルにおける ZO-1 の発現は正常皮膚と同様であったが、claudin-1 の発現は顆粒層様層および有棘層様層の上層において限局していることを明らかにした。この結果より、本モデルは顆粒層様層におけるタイトジャンクションの研究に有用であることが示された。

第3章では、TNF- $\alpha$  または IL-13 の添加が本モデルにおける claudin-1 の発現を低下させ、ZO-1 の発現に影響を与えないことを明らかにした。この結果より、TNF- $\alpha$  または IL-13 は claudin-1 の発現低下を介して皮膚バリア機能を低下させている可能性が示された。

以上の結果から、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の免疫バリア機能は皮膚に類似することが明らかとなった。したがって、本モデルが CAD などの炎症性皮膚疾患の病態解明に向けた研究に有用な実験系であることが示された。

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 : Expression of ZO-1 and claudin-1 in a 3D epidermal equivalent using canine progenitor epidermal keratinocytes

著 者 名 : Teramoto, K., Asahina, R., Nishida, H., Kamishina, H. and Maeda, S.

学術雑誌名 : Veterinary Dermatology

巻・号・頁・発行年 : In Press