

犬の炎症性角化異常における  
T細胞サブセットに関する研究

2019 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

秋山 智



犬の炎症性角化異常における  
T細胞サブセットに関する研究

秋山 智

## 目次

略語	6
緒論	9
第 1 章 犬の炎症性角化異常の臨床および病理学的特徴	
1.1. 序論	13
1.2. 材料と方法	15
1.3. 結果	21
1.4. 考察	24
1.5. 図表	26
第 2 章 犬の炎症性角化異常の病変部における サイトカイン, ケモカイン受容体およびケモカインの 転写量解析	
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. 図表	49
第 3 章 犬の炎症性角化異常における末梢血 Th17 細胞 の割合のフローサイトメトリー解析	
3.1. 序論	61

3.2.	材料と方法	63
3.3.	結果	67
3.4.	考察	68
3.5.	図表	70
総括		76
謝辞		79
参考文献		81

略語

ACTH: adrenocorticotrophic hormone (副腎皮質ホルモン)

AD: atopic dermatitis (アトピー性皮膚炎)

B<sub>2</sub>M: beta-2-microglobulin

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

CBC: complete blood count (全血球計算)

CCL: CC chemokine ligand

CCR: CC chemokine receptor

Ct: cycle threshold

CXCL: C-X-C motif ligand

CXCR: C-X-C chemokine receptor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ダルベッコ改変イーグル培地)

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline (ダルベッコリン酸緩衝食塩水)

ELISpot: Enzyme-Linked ImmunoSpot

FBS: fetal bovine serum (牛胎仔血清)

FITC: fluorescein isothiocyanate

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HEK: human embryonic kidney (人胎児腎)

His: histidine (ヒスチジン)

HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1

IFN: interferon

IL: Interleukin

NFAT: nuclear factor of activated T-cells

PBMCs: peripheral blood mononuclear cells (末梢血単核細胞)

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

PE: phycoerythrin

qRT-PCR: quantitative reverse transcription PCR

RPL13A: ribosomal protein L13a

RPS18: ribosomal protein S18

S100A8: S100 calcium-binding protein A8

SDHA: succinate dehydrogenase complex subunit A

STAT: signal transducer and activator of transcription

TBP: TATA box binding protein

TGF: transforming growth factor

TNF: tumor necrosis factor

Th: ヘルパーT (Helper T)

Th1: 1 型ヘルパーT (Type 1 helper T)

Th2: 2 型ヘルパーT (Type 2 helper T)

Th17: 17 型ヘルパーT (Type 17 helper T)



## 緒論

犬の角化異常は鱗屑および落屑を特徴とする皮膚疾患である[48, 78]。犬の角化異常は感染性疾患, 内分泌性疾患, 代謝性疾患, 栄養障害性疾患, アレルギー性疾患, 免疫介在性疾患および腫瘍性疾患に続発する角化異常と上記の原因に起因しない原発性の角化異常に分類される。原発性の角化異常はさらに, 炎症細胞の浸潤を特徴とする炎症性角化異常と胼胝および鼻・趾端の角化亢進症などの非炎症性角化異常に分けられる[48, 77]。犬の炎症性角化異常はその免疫病態および臨床的特徴に関する報告がないため, 続発性角化異常の除外により診断されている。さらに, 治療に関しても外用療法, 抗炎症剤および免疫抑制剤などの対症療法が実施されているものの[48], その効果に関する詳細な報告もないため, 難治性皮膚疾患として認識されている。

人における炎症性角化異常として人の乾癬がある。人の乾癬は特徴的な白色の鱗屑を伴う慢性炎症性皮膚疾患であり, 病理組織学的には病変部への炎症細胞の浸潤および重度の表皮肥厚, 錯角化および角化亢進が認められる[10, 20]。人の乾癬では, 角層内および角層下に特徴的な好中球の集塊が認められ, それらはマンロー微小膿瘍またはコゴイ海綿状膿疱と呼ばれている[10, 20]。また, 皮膚病変部において血管周囲性にリンパ球が浸潤しており[10, 20], これらは17型ヘルパーT (Th17) 細胞を多く含むことが明らかとなっている[4, 53]。Th17細胞はInterleukin (IL) -17A および IL-22 を産生するヘルパーT (Th) 細胞である。IL-17A は, ケラチノサイトを介してC-X-C motif ligand (CXCL) 1, CXCL3 および IL-8 などの好中球遊走因子を産生し, 病変部に好中球などの炎症細胞を遊走させる[53, 80]。また, IL-22 はケラチノサイトの signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 を活性化して増殖を亢進させ[6, 67, 69], フィラグリン, ケラチン1 およびケラチン10などの発現を抑制することで分化の異常を起こす[67, 83]。これらのサイトカインの作用により, 人の乾癬の特徴的な皮疹が形成されると考えられている[40, 51]。

犬の炎症性角化異常と人の乾癬は、ともに鱗屑および落屑を特徴とし、炎症を伴う皮膚疾患である。犬の炎症性角化異常は多くは瘙痒を伴うが、犬アトピー性皮膚炎（canine atopic dermatitis, CAD）と異なり瘙痒を伴わない症例が存在する。また、中年齢以降に発症することも多く、完治することは稀で、生涯治療を必要とすることが多い。免疫病態は明らかになっていないが、T細胞における転写因子である nuclear factor of activated T-cells（NFAT）の核内移行を阻害するシクロスポリン A が有効な症例が存在する[48]。人の乾癬では、瘙痒を伴う症例は約 80%と報告されている[33, 87]。また、75%が 40 歳までに発症するが、20-30 歳、または 50-60 歳の間で発症することが多いと報告されている[20, 33]。皮疹は数日から数年認められ、完治することは稀であり、寛解後も一般的に再発する[20, 33]。また、人の乾癬の病態には Th17 細胞が関与しているため、シクロスポリン A により高い治癒効果が得られている[12]。

上記のように人の乾癬と臨床上的類似点が多いにも関わらず、犬の炎症性角化異常の病態が全く明らかになっていないことが、臨床の現場における問題点が解決しない原因であると考えられる。そのため、本研究では犬の炎症性角化異常の病態を明らかにすることを目的として解析を行った。本研究は以下の三章で構成されている。

第 1 章では、犬の炎症性角化異常の臨床および病理学的特徴を解析した。第 2 章では、犬の炎症性角化異常の病態に関与する T 細胞サブセットを明らかにするため、病変部におけるサイトカイン、ケモカイン受容体およびケモカインの遺伝子転写量を解析した。第 3 章では、健常犬における末梢血 Th17 細胞の年齢による変化を明らかにした後に、犬の炎症性角化異常の症例と比較した。

## 第 1 章

### 犬の炎症性角化異常の臨床および病理学的特徴

## 1.1. 序論

角化異常は角質肥厚、鱗屑および落屑を主徴とする皮膚疾患の総称である[48, 78]。遺伝的要因、免疫学的要因または物理的要因により、角化細胞の過剰増殖および分化障害が生じることで、上記の皮疹を呈する[48, 77, 78]。人においては遺伝性角化異常および後天性角化異常に分類されており、後天性角化異常はさらに胼胝などの非炎症性角化異常および人の乾癬などの炎症性角化異常に分類される[51, 78, 79]。

犬においては感染性疾患、内分泌性疾患、代謝性疾患、栄養障害性疾患、アレルギー性疾患、免疫介在性疾患および腫瘍性疾患に起因する続発性角化異常とこれらの原因に依らない原発性角化異常がある。犬における原発性角化異常も遺伝性角化異常と後天性角化異常に分類されるが、後天性の角化異常は人と異なり、明確に分類されていない。これまでに遺伝性角化異常として本態性脂漏症、魚鱗癬、ウェストハイランド・ホワイト・テリアの表皮形成異常およびシュナウザーの面皰症候群などが報告されている[9, 22, 47, 48, 52, 78]。胼胝、鼻・趾端の角化亢進症および耳輪皮膚症などは一般的に炎症細胞の浸潤を特徴としないため、非炎症性の後天性角化異常と考えられている[48, 77]。一方、我々が臨床の現場で日常的に遭遇する角化異常の多くは瘙痒と炎症を伴う非定型的な炎症性の角化異常であるが、犬の炎症性角化異常については成書にも記載されておらず、報告も脂腺炎および苔癬型角化症などに限定されており[2, 5, 15, 77]、臨床的特徴については明らかになっていない。したがって、犬の炎症性角化異常の診断は続発性炎症性角化異常の除外に頼らざるを得ない。

犬の炎症性角化異常に対しては、シャンプー療法のほか、ビタミン A 誘導体の内服が行われることもあるが、いずれも効果は限定的である[48]。また、グルココルチコイドおよびシクロスポリン A などの免疫抑制剤が経験的に使用され

ており、症状の改善が認められる症例が存在するが[48]、その効果の詳細は不明である。

本章では、犬の炎症性角化異常の臨床像を明らかにすることを目的として、症例情報、皮疹分布および皮疹形態の発現頻度、痒みの重症度および治療内容について回顧的に検討した。また、病理組織学的変化の出現頻度、表皮変化の半定量的評価および炎症細胞の出現頻度については、これまでに報告されている膿皮症およびアレルギー性皮膚疾患のデータを基に比較検討した[55, 63]。

## 1.2. 材料と方法

### 1.2.1. 対象症例

2010 年 4 月から 2017 年 10 月の期間に岐阜大学附属動物病院を受診し、鱗屑、痂皮または脂漏を主体とする皮疹を有する症例を用いて後ろ向き研究を行った。除外すべき続発性角化異常の原因疾患（表 1-1）を下記の方法により除外した。

#### 感染性疾患

押捺検査、テープストリップ検査、毛検査および掻爬検査により評価した。球菌（*Staphylococcus pseudintermedius* など）の存在および好中球による球菌の貪食像が認められた症例を膿皮症と診断した。必要に応じて細菌培養・薬剤感受性試験を実施し、抗菌薬内服、抗菌薬外用または抗菌シャンプーによる洗浄のみで改善した症例は除外した[26]。*Malassezia pachydermatis* の増殖が認められ、抗真菌シャンプーによる洗浄のみで完全寛解が得られた症例を除外した[50]。皮膚糸状菌症が疑われた症例は、ウッド灯による被毛の観察、Dermatophyte Test Medium（DTM）培地を用いた検査を行い、*Microsporum canis* の存在が明らかとなった症例を除外した。*Demodex canis* の増殖が認められた症例およびヒゼンダニの存在が明らかとなった症例または駆虫薬の試験的投与のみで症状が改善した症例を外部寄生虫症と診断し、除外した[48]。

#### アレルギー性疾患

瘙痒が認められる症例のうち、若齢または食事の変更歴と症状の発現が一致する症例に対しては、除去食試験および食物負荷試験を実施した。除去食により皮膚症状の改善が認められ、食物負荷試験実施後に再発した症例は皮膚食物有害反応と診断し、除外した。また、皮膚食物有害反応を除外した症例の中で

Favrot の診断基準に一致し、かつ初期病変が鱗屑、痂皮および脂漏を伴わない症例を CAD と診断し、除外した[14, 25, 48]。

#### 栄養性疾患

角化異常が発症した 1 年以内に食事の変更または体重減少が認められた症例は、栄養性角化異常を疑い、食事の変更および給餌法の指導を行った。アメリカン・コッカー・スパニエルのビタミン A 反応性皮膚症が疑われた症例はビタミン A の内服を行った。また、若齢の大型犬で頭部および肢端を含む部位に鱗屑が認められた症例は亜鉛反応性皮膚症を疑い亜鉛の内服を行った。食事の変更、ビタミン A または亜鉛の内服のみで皮膚症状の完全寛解が得られた症例は除外した[24, 48]。

#### 内分泌性疾患

左右対称性脱毛などの皮疹分布および無気力または多飲多尿などの臨床症状から内分泌性疾患が疑われた症例は全血球計算（CBC）、血液生化学検査、腹部超音波検査およびホルモン検査を実施した。遊離サイロキシン（FT4）の低値（ $<0.5 \text{ ng/dL}$ ）および甲状腺刺激ホルモン（TSH）の高値（ $>0.32 \text{ ng/ml}$ ）を認めた症例を甲状腺機能低下症と診断し、除外した。肝酵素値の高値および副腎の腫大が認められた症例はさらに副腎皮質ホルモン（ACTH）刺激試験または低用量デキサメサゾン抑制試験を実施した。血中コルチゾール値の高値（ACTH 刺激 1 時間後： $>20 \mu \text{g/dL}$ 、デキサメサゾン投与 8 時間後： $>1.5 \mu \text{g/dL}$ ）であった症例を副腎皮質機能亢進症と診断し、除外した[13]。

#### 免疫介在性疾患

眼瞼、鼻梁および耳介などの皮膚粘膜境界部に膿疱、痂皮およびびらんが認



められ、押捺検査により棘融解細胞が明らかとなった症例、またはスタンダード・プードルの混血種および秋田犬で全身に脱毛、鱗屑、毛包円柱が認められた症例に対しては病理組織学的検査を実施し、落葉状天疱瘡または脂腺炎と診断された場合、それぞれを除外した[48]。

#### 腫瘍性疾患

鱗屑および痂皮と同時に局面、びらん、潰瘍および色素脱失が全身または皮膚粘膜境界部に認められた症例、または皮疹の出現に伴って明らかなリンパ節の腫大および一般状態の低下を認めた症例は CBC、血液生化学検査、腹部超音波検査および病理組織学的検査を実施した。病理組織学的検査により皮膚リンパ腫と診断された症例は除外した[48]。

#### 代謝性疾患

肉球、陰囊、包皮、眼周囲および鼻梁などの皮膚粘膜境界部に痂皮、紅斑およびびらんが認められ、血液生化学検査において肝酵素値の上昇が認められた症例は、腹部超音波検査を実施し、さらに皮膚および肝臓の病理組織学的検査を行った。肝不全および表皮の壊死が認められた症例を表在性壊死性皮膚炎と診断し、除外した[19, 48]。

なお、膿皮症およびマラセチア皮膚炎など、一部の続発性角化異常で原因疾患を治療した後に、依然として角化異常の症状が認められた症例は原発性角化異常と診断し、対象症例に組み入れた。臨床症状の解析を全症例で行い、そのうち診断を目的に病理組織学的検査を実施した症例については皮膚病変部の病理組織学的解析を行った。

### 1.2.2. 解析方法

角化異常の臨床的特徴を明らかにするために、症例概要、皮疹形状と分布、病理組織学的所見および治療についてそれぞれ情報を収集した。

#### 1.2.2.1. 症例概要

診療記録から症例の犬種、性別および発症年齢に関する情報を収集した。

#### 1.2.2.2. 皮疹および痒みの重症度

診療記録から皮疹および痒みの重症度に関する情報を収集した。なお、膿皮症またはマラセチア皮膚炎を併発していた症例は二次感染の治療後における情報を収集した。皮疹形状については、全症例に対しそれぞれ皮疹が認められた症例数の割合を出現頻度として算出した。皮疹の分布は身体を頭部、外耳道、頸部、胸部、腹部、背部、前肢、後肢および肢端に分類し、全症例に対しそれぞれ皮疹が認められた症例数の割合を出現頻度として算出した。また、身体の各部位における皮疹の出現頻度を CAD の報告[7, 14, 32, 58, 75, 91]と比較した。痒みの重症度は過去の報告における評価基準を参考に、なし、軽度、中程度および重度の 4 段階に簡略化したものを用いて評価した[8]。

#### 1.2.2.3. 病理組織学的評価

病理組織学的変化とその出現頻度

岐阜大学獣医病理学研究室に保存されていた病理組織切片標本を観察し、表皮（角層、角層下、有棘層および基底層）、真皮、毛包および付属器における病理組織学的変化とその出現頻度について、下記に示す基準に基づいて評価した。なお、結果は全症例に対して各所見が認められた症例数の割合で示した。

## 表皮変化の半定量的評価

犬の炎症性角化異常の病変部における表皮変化の特徴を明らかにするために、表皮の肥厚はマルピギー層を観察倍率 100 倍、角化亢進および錯角化については角層を観察倍率 400 倍で観察した。表皮肥厚、角化亢進および錯角化のスコアは表 1-3 に示すように Rojko らの報告[63]に合わせて行い、半定量的に評価した。これにより、各スコアの平均および標準誤差を Rojko らが報告したアレルギー性皮膚疾患および膿皮症の報告[63]と比較した。

## 炎症細胞の検出頻度

犬の炎症性角化異常の病変部における好中球、リンパ球、好酸球および肥満細胞の有無について評価した。各症例の異なる 2 つの病変部から作製された標本を、表皮および真皮の各部位において観察倍率 400 倍で観察した。Olivry らが報告した方法[55]に合わせて各炎症細胞が存在した切片数の全切片数 ( $n = 42$ ) に対する割合を検出頻度として算出し、さらに犬の炎症性角化異常の病変部に浸潤する炎症細胞の特徴を明らかにするために Olivry らの報告[55]における健康犬および CAD と比較した。

### 1.2.2.4. 治療

犬の炎症性角化異常と診断した後に追跡調査が可能であった症例の治療に関する情報を収集した。一つ以上の皮疹の改善または瘙痒の軽減が認められたが、皮膚症状が残存する症例を部分寛解とし、皮疹および瘙痒が完全に消失した症例を完全寛解とした。寛解維持に必要であった内服薬、注射薬、外用薬および洗浄に用いられた薬剤の情報を収集し、使用頻度の高かった薬剤については使用回数および併用時の組み合わせを記録した。記録した時期については、飼い主が治療効果に満足しそれ以上の治療を必要としなかった時、治療中明らかに皮膚

症状が残存するにもかかわらず飼い主が追加治療を希望しなかった時、飼い主の事情により治療の継続が困難になった時、併発疾患または症例の死亡により犬の炎症性角化異常に対する治療の継続が困難になった時とした。

## 1.3. 結果

### 1.3.1. 症例概要

組み入れ基準を満たした犬の炎症性角化異常の症例 31 頭を解析に用いた。犬種の内訳を図 1-1 a に示した。トイ・プードルおよびチワワが全症例の 29.0% (9/31 頭) を占めた。症例の性別は去勢雄が全症例の 51.6% (16/31 頭) を占めており (図 1-1 b) , 発症年齢の平均は 3.8 歳 (範囲 6 ヶ月-9 歳) であった。

### 1.3.2. 皮疹および痒みの重症度

皮疹の出現頻度を図 1-2 に, 皮疹の出現部位を図 1-3 に示した。皮疹形状の内訳は全症例 31 頭中紅斑 (87.1%, 27/31 頭) , 鱗屑 (83.9%, 26/31 頭) , 脱毛 (71.0%, 22/31 頭) , 痂皮 (48.4%, 15/31 頭) であった。皮疹の出現部位は腹部 (83.9%, 26/31 頭) で最も頻度が高く, 全ての症例において複数部位に皮疹が認められた。また, 腹部に次いで背部 (77.4%, 24/31 頭) に皮疹が認められた頻度が高かった (表 1-2)。犬の炎症性角化異常症例の 90.3% (28/31 頭) は中程度以上の瘙痒を伴っていた (図 1-4)。

### 1.3.3. 病理組織学的評価

#### 病理組織学的変化とその出現頻度

病理組織学的評価は組み入れ基準を満たした 31 症例のうち病理組織学的検査を実施した 21 例を用いて行った。表皮または真皮, 毛包および付属器において認められた病理組織学的所見を図 1-5 または図 1-6 にそれぞれ示した。全ての症例において角層の角化亢進が認められ, その内訳は正角化性角化亢進が 81.0% (17/21 頭) , 錯角化性角化亢進が 61.9% (13/21 頭) であった。表皮の肥厚は全症例 (100%, 21/21 頭) で有棘層または基底層に認められた。炎症細胞の浸潤に

関する所見は、角層において膿痂皮（57.1%, 12/21 頭）、膿疱（9.5%, 2/21 頭）および膿瘍（4.8%, 1/21 頭）が観察され、9.5%（2/21 頭）の症例においては角層下においても膿疱が認められた。真皮においては、95.2%（20/21 頭）の症例で血管周囲性浸潤が認められた。一方、付属器では 4.8%（1/21 頭）の症例において毛包内に膿疱が認められたのみであった。

#### 表皮変化の半定量的評価

表皮肥厚、角化亢進および錯角化の半定量的評価の結果を表 1-3 に示すとともに、アレルギー性皮膚疾患および膿皮症との比較について表 1-4 に示した。犬の炎症性角化異常では全症例 21 頭の表皮肥厚スコアが 4 を示し、重度であることが明らかとなった。また、角化亢進、錯角化および錯角化スコアもいずれも重度であった。

#### 炎症細胞の検出頻度

表皮または真皮における炎症細胞の検出頻度をそれぞれ表 1-5 および表 1-6 に示した。犬の炎症性角化異常では CAD と比較して表皮におけるリンパ球の検出頻度に差はなかったが、好中球および好酸球の検出頻度は高かった。真皮においてはリンパ球および好中球の検出頻度に差はなかったが、好酸球の検出頻度は CAD と比較して低かった。

#### 1.3.4. 治療

全ての症例で改善が認められ、12.9%（4/31 頭）で完全寛解の維持が可能であった（うち 1 頭は完全寛解中に別の疾患で死亡した）。完全寛解が維持されていた症例の性別は全て未去勢雄であり、発症年齢はそれぞれ 6 ヶ月（n = 1）、3 歳（n = 2）および 6 歳（n = 1）であった。また、瘙痒の重症度はそれぞれ軽度（n =

1) , 中程度 (n = 2) および重度 (n = 1) であった。87.1% (27/31 頭) の症例で部分寛解が得られた。16.1% (5/31 頭) は追跡調査が不可能であった。

追跡調査が可能であった 26 頭において寛解維持に複数の薬剤が併用されていた。使用頻度が高かった薬剤はグルココルチコイドの内服 (92.3%, 24/26 頭) , グルココルチコイドの外用 (65.4%, 17/26 頭) およびシクロスポリン A の内服 (53.8%, 14/26 頭) であり, 全ての症例で上記のいずれかが単剤投与, または併用されていた (図 1-7)。その他に使用した薬剤は抗真菌剤の内服 (11.5%, 3/26 頭) , ビタミン A 製剤の内服 (11.5%, 3/26 頭) , 抗生剤の内服 (3.8%, 1/26 頭) , 抗菌剤の外用 (15.4%, 4/26 頭) , 保湿剤の外用 (7.7%, 2/26 頭) , 抗真菌シャンプー (50.0%, 13/26 頭) , 保湿シャンプー (23.1%, 6/26 頭) , 角質溶解シャンプー (15.4%, 4/26 頭) および抗菌シャンプー (11.5%, 3/26 頭) であった。

## 1.4. 考察

犬における炎症性角化異常は脂腺炎および苔癬型角化症などの稀な疾患の報告があるのみ[2, 5, 15, 77]である。脂腺炎および苔癬型角化症の病態は不明だが、臨床症状および病理組織学検査により診断が可能であり、脂腺炎の病理組織像ではリンパ球形質細胞の浸潤および脂腺の消失が特徴であると報告されている[5, 15]。しかしながら、日常的に遭遇する機会が多い犬の炎症性角化異常の臨床像および病理組織学的特徴に関する報告はこれまでなかった。そのため、第1章では犬の炎症性角化異常の臨床症状、病理組織学的特徴および治療内容に関して回顧的に検討した。

本研究の結果から、犬の炎症性角化異常の皮疹分布は CAD と異なることが明らかになった[25]。特に CAD においては瘙痒部位に一致した皮疹分布を呈するのに対し[7, 25]、犬の炎症性角化異常は瘙痒部位とは一致しない背部において好発する傾向が明らかとなった。これは、CAD の病態に重要である itch-scratch cycle [46]が本疾患では病態形成に重要でない可能性を示唆している。

犬の炎症性角化異常の病理組織像は CAD または膿皮症と比較して重度の表皮肥厚、正角化性または錯角化性の角化亢進を伴い、リンパ球および好中球を主体とした炎症細胞の浸潤を認めることが明らかとなった。人のアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) では錯角化は認められず、表皮における好中球の浸潤も認められないが、人の乾癬では錯角化が顕著に認められ、血管周囲性のリンパ球浸潤および表皮内に好中球の集塊が認められる[20]。人の乾癬では Th17 細胞が病態の形成に重要であると考えられており[51]、Th17 細胞が産生する IL-17A はケラチノサイトに作用して IL-8 および S100 calcium-binding protein A8 (S100A8) などの好中球遊走因子の産生を誘導する[41, 65, 76]。また、Th17 細胞が産生する IL-22 はケラチノサイトの増殖および分化の異常を引き起こすこと



が明らかになっている[89]。犬の炎症性角化異常の皮疹および病理組織学的特徴に人の乾癬と類似する点が認められることから、犬においても、リンパ球、好中球およびケラチノサイトが相互に影響する病態が存在している可能性が考えられる。

本研究の結果から、犬の炎症性角化異常の寛解維持にはグルココルチコイドの内服、外用およびシクロスポリン A のいずれかまたは併用が必要であることが明らかとなった。人の乾癬では T 細胞からのサイトカイン産生の抑制を目的としてシクロスポリン A が用いられており、高い効果が得られている[12]。T 細胞における転写因子である NFAT の核内移行を阻害することにより、サイトカインの産生を抑制するシクロスポリン A が犬の炎症性角化異常においても有効であることは、T 細胞が本疾患の病態に関与している可能性を示唆する。

以上のことから、犬の炎症性角化異常の病態解明には病変部の分子生物学的解析が必要であると考えた。そこで第 2 章では、犬の炎症性角化異常の病変部におけるサイトカイン、ケモカイン受容体およびケモカインの遺伝子転写量を解析した。

## 1.5 図表

表 1-1 続発性角化異常の原因疾患[48]

分類	疾患名
感染性疾患	膿皮症
	マラセチア皮膚炎
	皮膚糸状菌症
	毛包虫症
	疥癬
アレルギー性疾患	皮膚食物有害反応 CAD
栄養性疾患	ビタミンA反応性皮膚症
	亜鉛反応性皮膚症
内分泌性疾患	甲状腺機能低下症
	副腎皮質機能亢進症
免疫介在性疾患	落葉状天疱瘡
	脂腺炎
腫瘍性疾患	皮膚リンパ腫
代謝性疾患	表在性壊死性皮膚炎

表 1-2 各部位における皮疹出現の頻度

	犬の 炎症性 角化異常	CAD					
		Zur 2002	Picco 2008	Jaeger 2010	Favrot 2010	Terada 2011	Bruet 2012
腹部	83.9% (26頭)		65%	51%	67.3%	16%	38.5%
背部	77.4% (24頭)		15%		19.2%	4%	4.4%
頭部	67.7% (21頭)			39%			
後肢	67.7% (21頭)		69%				
前肢	64.5% (20頭)		75%				
頸部	58.1% (18頭)					24%	
胸部	54.8% (17頭)				31.5%		29.7%
肢端	51.6% (16頭)	76%		62%			81.3%
外耳道	45.2% (14頭)	60%	44%	48%	59.3%	63%	48.4%

犬の炎症性角化異常における皮疹の出現頻度を身体の部位ごとに示し、CADの報告[7, 14, 32, 58, 75, 91]と比較した。皮疹の出現頻度は各部位において皮疹が認められた症例数を全症例 31 頭に対する割合で示した。

表 1-3 表皮肥厚，角化亢進および錯角化の半定量的評価[63]

スコア	症例数		
	表皮肥厚	角化亢進	錯角化
0	0	0	8
1	0	0	2
2	0	2	0
3	0	6	11
4	21	13	-

#### 表皮肥厚

#### 角化亢進

0 : 10 – 20  $\mu\text{m}$

0 : 6.6 – 8.8  $\mu\text{m}$

1 : 20 – 30  $\mu\text{m}$

1 : 8.8 – 13.2  $\mu\text{m}$

2 : 30 – 40  $\mu\text{m}$

2 : 13.2 – 22.0  $\mu\text{m}$

3 : 40 – 60  $\mu\text{m}$

3 : 22.0 – 33.2  $\mu\text{m}$

4 : >60  $\mu\text{m}$

4 : >33.2  $\mu\text{m}$

#### 錯角化

0 : 角層内に有核角層細胞が存在しない

1 : 有核角層細胞が 1 層存在する

2 : 有核角層細胞が 2 層存在する

3 : 有核角層細胞が 2 層以上存在し，かつ表皮内に好中球の集塊が存在する

表 1-4 表皮肥厚，角化亢進および錯角化の比較

	健常犬	犬の炎症性 角化異常	アレルギー性 皮膚疾患	膿皮症
表皮肥厚	0	$4.00 \pm 0$	$2.02 \pm 0.82$	$2.38 \pm 0.66$
角化亢進	0	$3.52 \pm 0.15$	$0.36 \pm 2.03$	$0.26 \pm 1.90$
錯角化	0	$1.67 \pm 0.36$	$0.64 \pm 0.93$	$1.14 \pm 0.91$

著者の犬の炎症性角化異常の各スコアを Rojko ら[63]が報告した健常犬，アレルギー性皮膚疾患および膿皮症と比較した。数値は表皮肥厚スコア（0－4），角化亢進スコア（0－4）および錯角化スコア（0－3）の平均および標準誤差を示す。

表 1-5 健常犬, 犬の炎症性角化異常および CAD の表皮における炎症細胞の検出頻度

	健常犬	犬の炎症性 角化異常	CAD
リンパ球	6.2% (1/16)	100.0% (42/42)	100.0% (14/14)
好中球	0.0% (0/16)	81.0% (34/42)	42.8% (6/14)
好酸球	0.0% (0/16)	35.7% (15/42)	28.6% (4/14)
肥満細胞	0.0% (0/16)	0.0% (0/42)	0.0% (0/14)

犬の炎症性角化異常の病変部の表皮における炎症細胞の検出頻度を Olivry らが報告[55]した健常犬 (n = 16) および CAD (n = 14) と比較した。検出頻度は各炎症細胞が存在した切片の全切片 (n = 42) に対する割合として算出した。炎症細胞は観察倍率 400 倍で観察を行い評価した。

表 1-6 健常犬, 犬の炎症性角化異常およびCADの真皮における炎症細胞の検出頻度

	健常犬	犬の炎症性 角化異常	CAD
リンパ球	-	100.0% (42/42)	-
好中球	43.8% (7/16)	97.6% (41/42)	100.0% (14/14)
好酸球	0.0% (0/16)	71.4% (30/42)	92.9% (13/14)
肥満細胞	-	45.2% (19/42)	-

犬の炎症性角化異常の病変部の真皮における炎症細胞の検出頻度を健常犬 (n = 16) および CAD (n = 14) の報告[55]と比較した。検出頻度は各炎症細胞が存在した切片の全切片 (n = 42) に対する割合として算出した。炎症細胞は観察倍率 400 倍で観察を行い評価した。

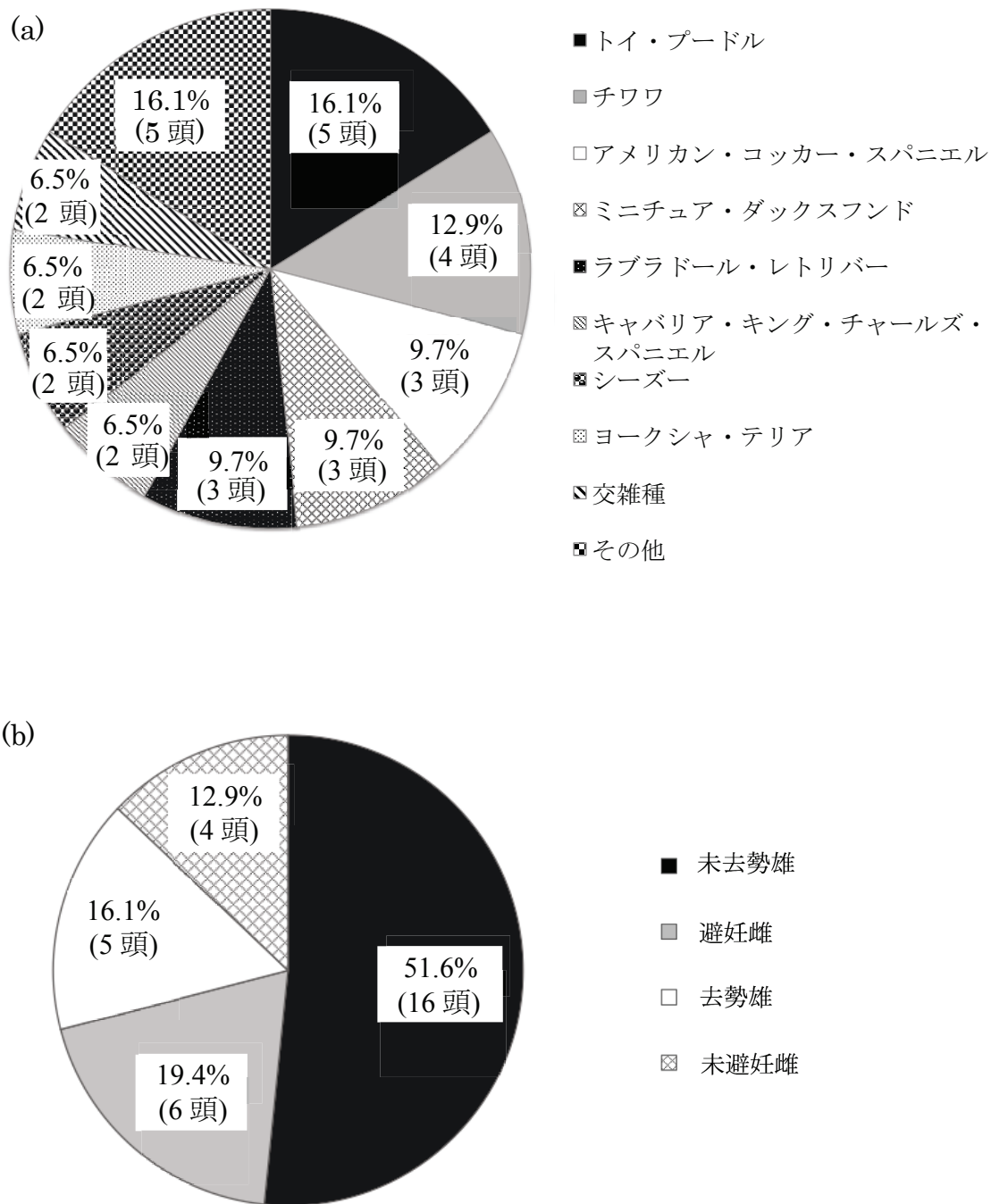


図 1-1 症例概要

(a) 組み入れた症例 31 頭の犬種およびその頭数。その他はシェットランド・シープドッグ、柴犬、バーニーズ・マウンテン・ドッグ、パピヨンおよびミニチュア・ピンシャー各 1 頭の合計。(b) 雌雄の内訳。



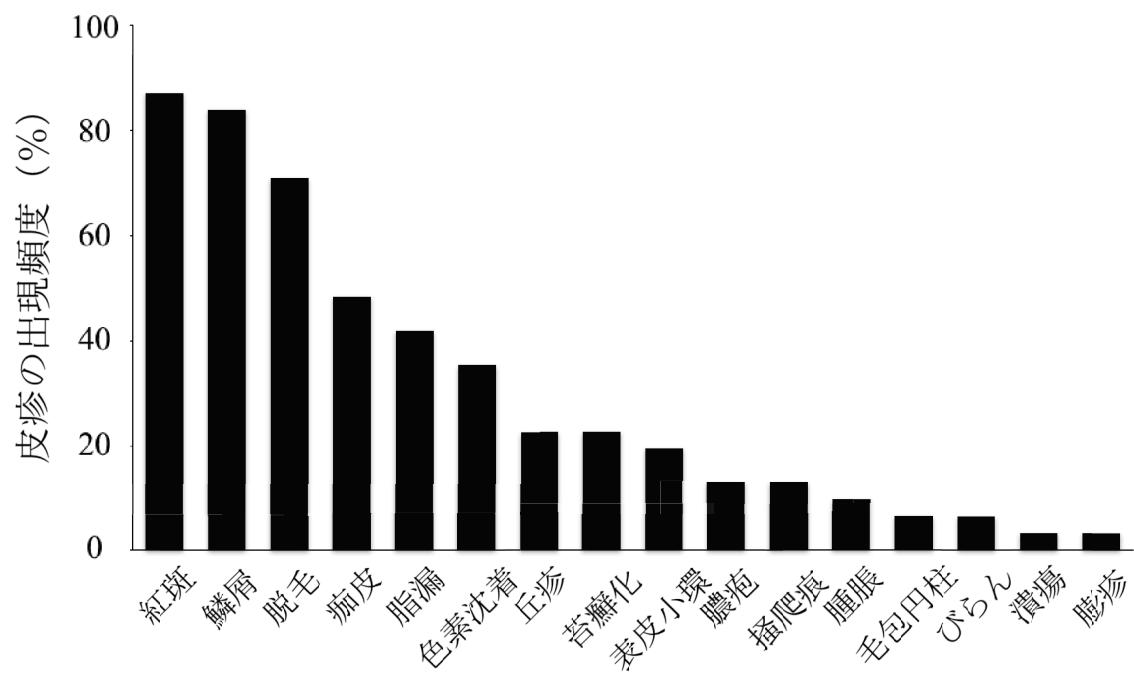


図 1-2 各種皮膚の出現頻度

犬の炎症性角化異常における皮膚の出現頻度を形状ごとに示した。皮膚の出現頻度は全症例数 (31 頭) に対して各皮膚が認められた症例数の割合で示した。

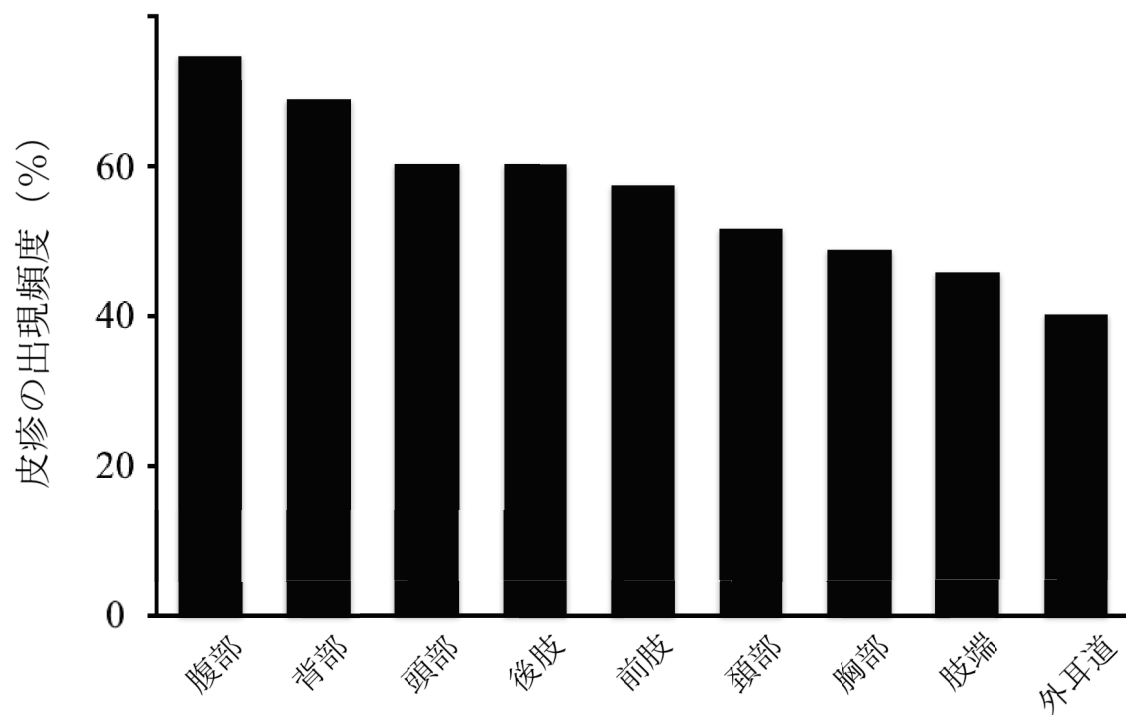


図 1-3 各部位における皮疹出現の頻度

犬の炎症性角化異常における皮疹の出現頻度を身体部位ごとに示した。皮疹の出現頻度は各部位において皮疹が認められた症例数を全症例数（31 頭）に対する割合で示した。

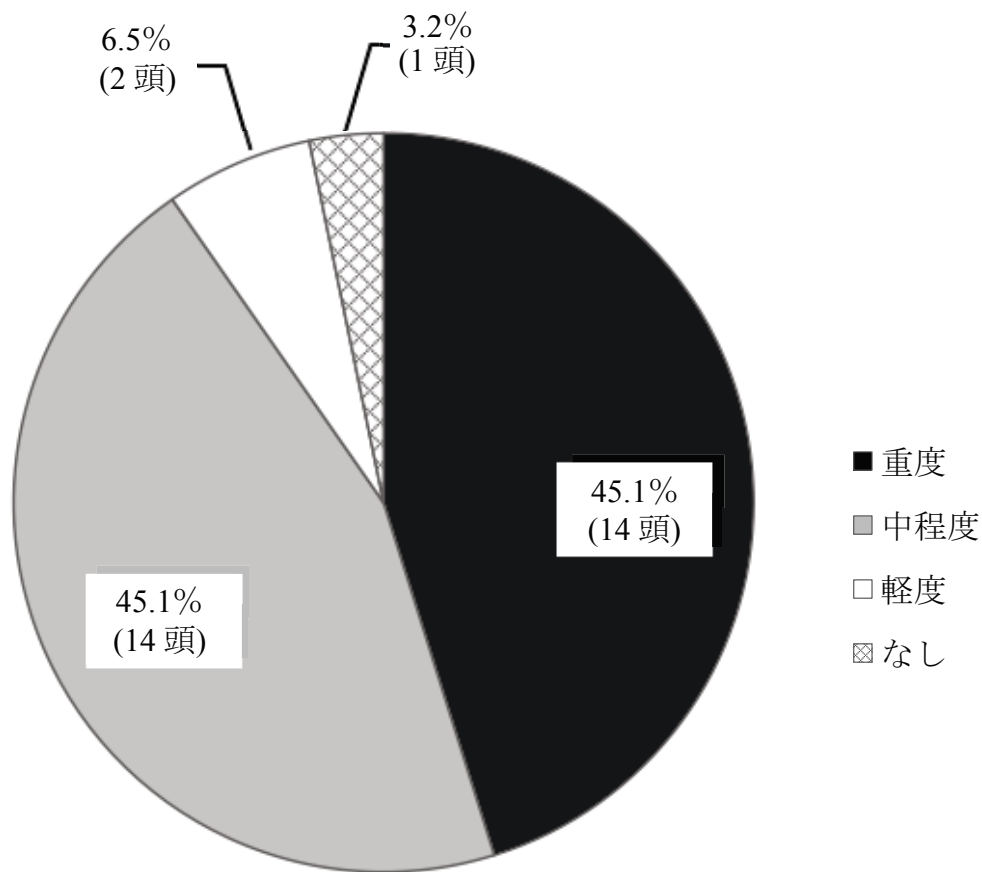


図 1-4 痒みの重症度[8]

痒みの重症度およびそれぞれの頭数を示した。

重度：食事中や散歩中なども含め常に掻痒行動がみられる

中程度：掻痒行動は頻繁に見られるが食事中や散歩中など他に注意が向いている時にはみられない

軽度：掻痒行動が時々みられる

なし：掻痒行動がみられない

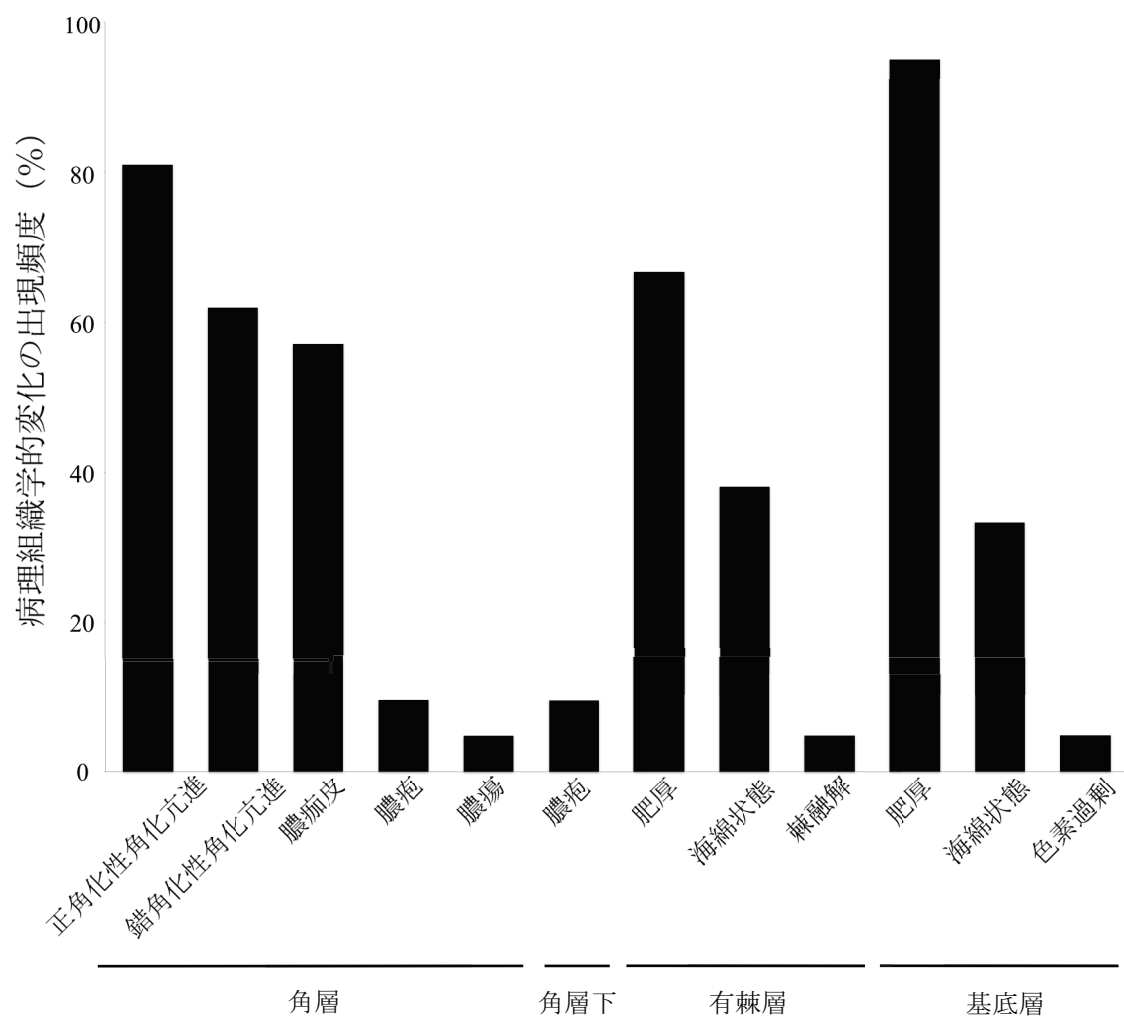


図 1-5 表皮に認められた病理組織学的変化とその出現頻度

表皮における病理組織学的変化とその出現頻度を示した。出現頻度は全検索症例数（21 頭）に対して各所見が認められた症例数の割合で示した。

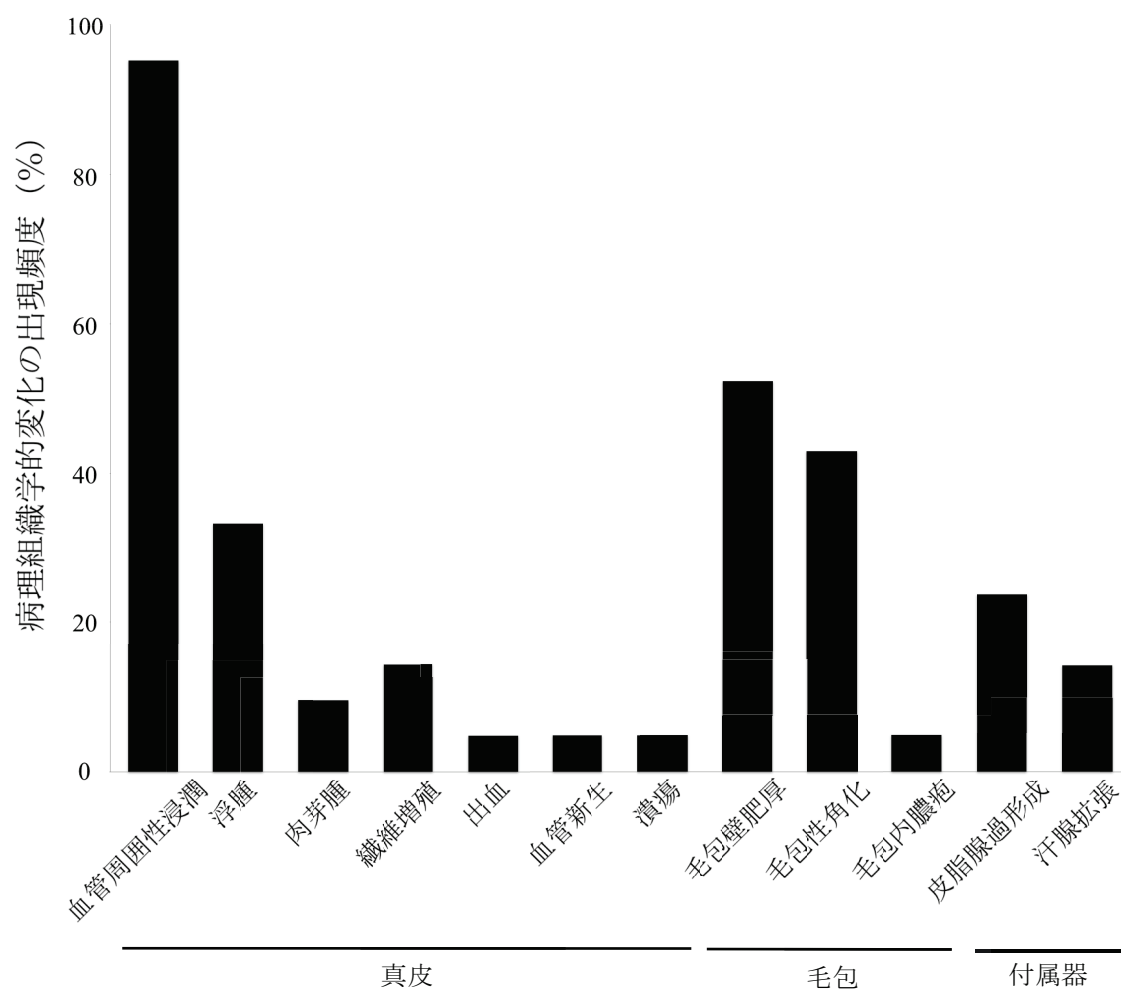


図 1-6 真皮，毛包および付属器に認められた病理組織学的変化とその出現頻度

真皮，毛包および付属器における病理組織学的変化とその出現頻度を示した。出現頻度は全検索症例数（21 頭）に対して各所見が認められた症例数の割合で示した。

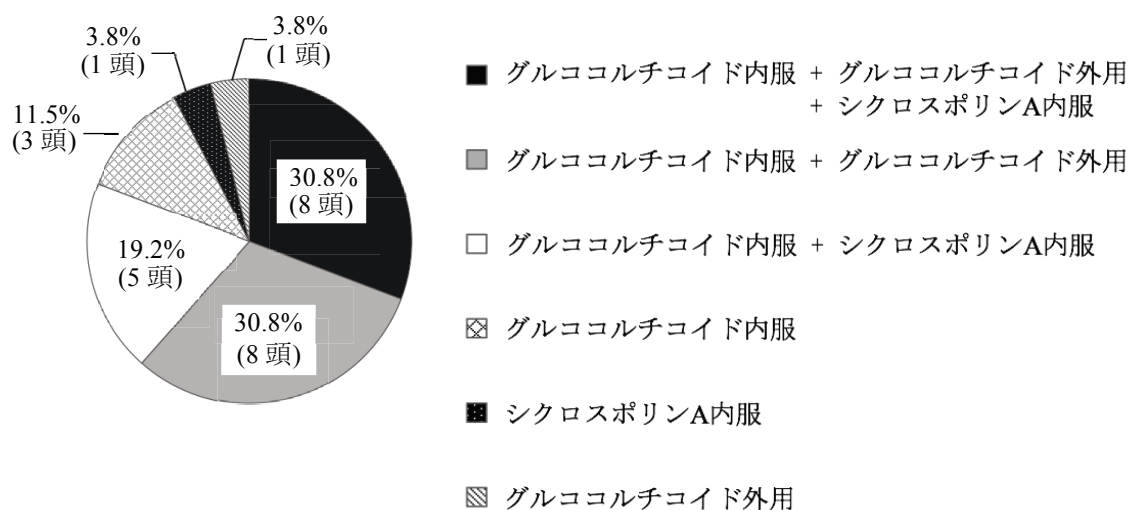


図 1-7 寛解維持に用いたグルココルチコイドおよびシクロスポリン A の使用頭数

追跡調査が可能であった症例（26 頭）の寛解維持に用いたグルココルチコイドおよびシクロスポリン A の組み合わせおよび各薬剤の使用頭数を示した。

## 第 2 章

犬の炎症性角化異常の病変部におけるサイトカイン，  
ケモカイン受容体およびケモカインの転写量解析

## 2.1. 序論

第 1 章の結果から、犬の炎症性角化異常は、リンパ球および好中球を主体とした炎症細胞の浸潤を伴う、重度の表皮肥厚、正角化性または錯角化性の角化亢進を特徴とし、これらの所見は人の炎症性角化異常の代表的な疾患である人の乾癬[10, 20]と類似していることが明らかとなった。

人の乾癬の病態においては Th 細胞のサブセットの一つである Th17 細胞が重要であると考えられている[40, 51]。Th17 細胞はケモカイン受容体である CC chemokine receptor (CCR) 6 を発現しており[44]、その病変部への遊走はケラチノサイトが産生するケモカイン CC chemokine ligand (CCL) 20 により制御されている[44, 70]。CCL20 により皮膚に遊走した Th17 細胞は IL-17A および IL-22 を産生する[4]。IL-17A は樹状細胞、マクロファージ、線維芽細胞およびケラチノサイトを介して IL-1beta および IL-6 などの炎症性サイトカインを産生し、局所の炎症を誘導する[17, 21, 45, 61, 80, 86]。さらに IL-17A はケラチノサイトを介して CXCL1, CXCL3 および IL-8 などの好中球遊走因子の産生を誘導することで病変部に好中球を集積させる[53, 80]。一方、IL-22 はケラチノサイトの STAT3 を活性化して増殖を亢進させると考えられている[6, 66, 67, 69]。また、フィラグリン、ケラチン 1 およびケラチン 10 などの発現を抑制することでケラチノサイトの終末分化に異常を起こす[67, 83]。さらに IL-22 は IL-17A と協調して beta-ディフェンシン 2 および 3 などの抗菌ペプチドの発現を誘導することが報告されている[67, 82, 83]。人の乾癬においては Th17 細胞が病変部に浸潤していることが明らかとなっており[4]、これらのサイトカインの作用により、マンロー微小膿瘍およびコゴイ海綿状膿疱といった好中球集塊の形成、表皮肥厚、錯角化および角化亢進などの特徴的な組織学的変化が生じると考えられている[51, 72, 88]。

犬の炎症性角化異常の病変部において認められるリンパ球の生物学的役割は



不明だが、主に Th 細胞の活性化を抑制するシクロスポリン A が有効であったことから、人の乾癬同様に Th 細胞が病態に関与している可能性が考えられる。そこで、本章では犬の炎症性角化異常の病態に関与する Th 細胞サブセットを明らかにすることを目的として、皮膚病変部におけるサイトカイン、ケモカイン受容体およびケモカインの遺伝子転写量を解析した。

## 2.2. 材料と方法

### 2.2.1. 組み入れ症例および材料

第1章の基準に基づいて診断した犬の炎症性角化異常の症例のうち、2012年8月から2014年5月の期間に岐阜大学附属動物病院および個人病院において病理組織学的検査を目的として皮膚組織を採取した犬9頭を本研究に用いた(表2-1)。対照症例として健常ビーグル6頭を用いた。健常犬の内訳は未去勢雄3頭、避妊雌2頭および未避妊雌1頭であり、年齢は2歳9ヶ月-7歳(平均5.6歳)であった。動物実験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。(#16092)

症例の皮膚病変部を採取後、直ちに RNeasy Lysis Buffer (QIAGEN, Valencia, CA, USA) に浸漬し、RNA を抽出するまで -30°C で保存した。

### 2.2.2. 皮膚からのトータル RNA 抽出

トータル RNA の抽出には RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用した。採取したトータル RNA は TURBO DNA-Free Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用してゲノム DNA を除去した後、-80°C で保存した。逆転写反応は PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いて行い、cDNA を合成した。各 T 細胞サブセットが産生するサイトカイン (*il-2*, *il-4*, *il-6*, *il-10*, *il-12p35*, *il-13*, *il-17a*, *il-17f*, *il-22*, *il-23p19*, *interferon (ifn) -gamma*, *transforming growth factor (tgf) -beta* および *tumor necrosis factor (tnf) -alpha*) , ケラチノサイトにおいて産生される好中球遊走因子およびこれらの因子を誘導するサイトカイン (*il-8*, *il-19*, *il-20*, *il-24* および *s100a8*) , 1 型ヘルパー T (Th1) , 2 型ヘルパー T (Th2) および Th17 細胞に発現しているケモカイン受容体 (*ccr4*, *ccr6*, *ccr8* および *C-X-C chemokine receptor (cxcr) 3*) およびそれぞれの

ケモカイン受容体に特異的なケモカイン (*ccl8*, *ccl17* および *ccl20*) の遺伝子を特異的に増幅するプライマー (表 2-2) を用いて, quantitative reverse transcription PCR (qRT-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, qRT-PCR は RT 反応を 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を検討した。Beta-2-microglobulin (B<sub>2</sub>M), CG14980, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ( GAPDH ) , Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 (HPRT1) , Ribosomal protein S18 (RPS18) , Ribosomal protein L 13a (RPL13A) , Succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA) および TATA box binding protein (TBP) を候補とし, 症例および健常犬の皮膚サンプルを用いて qRT-PCR を行った。GeNorm (<https://genorm.cmgg.be>), NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>) および BestKeeper (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>) を用いて得られたデータを解析し, 最適ナリファレンス遺伝子として HPRT1, RPL13A および RPS18 を選出した。PCR 反応の増幅曲線と閾値が交差する点 (cycle threshold, Ct 値) は, Thermal Cycler Dice Real Time System software, Version 3.00 (タカラバイオ) を用いて算出した。サイトカイン, ケモカイン受容体およびケモカインの遺伝子転写量は比較 Ct 法 ( $2^{-\Delta Ct}$  法) を用いて三種類のリファレンス遺伝子の平均値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。

ワードクラウドでは, 遺伝子転写量の有意な増加が認められた各 Th サブセットのサイトカイン, ケモカイン受容体およびケモカインを以下の式を用いて可視化した; 文字の大きさ =  $\log$  (症例サンプルの相対定量値の平均値/健常サンプルの相対定量値の平均値)。

### 2.2.3. 統計

犬の炎症性角化異常の犬の病変部および健常犬の皮膚における二群間の有意差を評価するために、Mann-Whitney's U 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 10.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用した。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. サイトカイン

病変部において Th1 サイトカイン (*ifn-gamma* および *il-12p35*) (図 2-1 a, b, 2-9), Th2 サイトカイン (*il-13*) (図 2-2 b, 2-9), Th17 サイトカイン (*il-17a*, *il-17f*, *il-22*, および *il-23p19*) (図 2-3 a, b, c, d, 2-9) および炎症性サイトカイン (*il-2* および *il-6*) (図 2-4 a, b) の遺伝子転写量が有意に高値を示した。制御性サイトカインは二群間において転写量に有意差は認められなかった (図 2-5 a,b)。

### 2.3.2. 好中球遊走因子およびこれらの因子の転写を誘導するサイトカイン

病変部において *il-8*, *il-19*, *il-20*, *il-24* および *s100a8* の遺伝子転写量が有意に高値を示した (図 2-6 a, b, c, d, e)。

### 2.3.3. ケモカイン受容体およびケモカイン

病変部において *ccr4*, *ccr6* および *cxcr3* の遺伝子転写量は健常犬と比較して有意に高値を示したが, *ccr8* は低値を示した (図 2-7 a, b, c, d, 2-9)。ケモカインに関しては *ccl8* および *ccl20* の遺伝子転写量が有意に高値を示した (図 2-8 a, c, 2-9)。

## 2.4. 考察

第 1 章の結果から病変部においてリンパ球が浸潤していることが明らかになったが、その生物学的役割は不明であった。人の慢性炎症性皮膚疾患にはアトピー性皮膚炎、乾癬および全身性エリテマトーデスなどがあり、いずれも Th 細胞が関与していることが報告されている[60]。中でも犬の炎症性角化異常に類似した人の乾癬では、特に Th17 細胞が重要な役割を果たしていると考えられている[51]。そのため、犬の炎症性角化異常においても Th 細胞が病態の形成に関与している可能性が考えられた。本章では犬の炎症性角化異常の病態に関与する Th 細胞サブセットを明らかにすることを目的として、皮膚病変部のサイトカイン、ケモカイン受容体およびケモカインの遺伝子転写量を解析した。

本研究における解析結果から、Th17 および Th1 細胞が病変を形成している可能性が示唆された。遺伝子転写量が増加していた *il-17a*, *il-17f* および *il-22* はいずれも Th17 細胞が産生するサイトカインである[74]。IL-17A と IL-17F はジスルフィド結合したホモダイマーまたはヘテロダイマーとして分泌され、これらは同様の生理活性を示すと考えられている[84]。IL-17A はイヌケラチノサイトにおいて好中球遊走因子である *il-8* および *s100a8*, 転写誘導因子である *il-19* の遺伝子転写を誘導することが報告されている[3]。また、S100A8 は抗菌ペプチドとしても知られており、人の乾癬において IL-17A は IL-22 と協調してケラチノサイトから S100A8 および beta-ディフェンシン 2 などの抗菌ペプチドの産生を誘導することが報告されている[39]。本研究においても *il-8* および *s100a8* の遺伝子転写量が増加していたことから、Th17 細胞が産生する IL-17A がケラチノサイトを介してこれらを産生し、好中球を遊走させている可能性が示唆された。IL-22 はヒトケラチノサイト細胞株およびマウスにおいてケラチノサイトの終末分化異常と表皮肥厚を引き起こすが[6, 66, 67, 69, 83], 今回遺伝子転写量の増加

が認められた *il-19*, *il-20* および *il-24* もヒトケラチノサイトにおいて IL-22 と同様に STAT3 を活性化し、表皮の肥厚を引き起こすことが報告されている[35, 66]。また, IL-17A と比較するとその作用は弱い, IL-19, IL-20, IL-22 および IL-24 もケラチノサイトを介して IL-8 などの好中球遊走因子を産生することが報告されている[66]。本研究においても病変部において *il-22* の遺伝子転写量が増加しているため, IL-22 により表皮の角化異常が引き起こされている可能性が高い。また, 人の乾癬と同様, IL-19, IL-20 および IL-24 は病変部において表皮の肥厚および炎症の増悪因子になっていると考えられる。これまで, 犬において Th17 細胞は IL-1beta, IL-6 および TGF-beta により分化誘導されることが報告されている[36]。また, 人の乾癬において IL-23 は病変部の樹状細胞から産生され, Th17 細胞の増殖および生存の維持に関与していると考えられている[42]。本研究の結果から, 病変部に遊走した Th17 細胞は, 病変部の樹状細胞から産生された IL-6 および IL-23 により分化が誘導され, 増殖および生存を維持している可能性が考えられた。さらに本研究では, Th1 サイトカインである *il-12p35*, *ifn-gamma* および Th1 細胞に特異的に発現する *cxc3* の遺伝子転写量が増加していた。IL-12 により分化誘導される Th1 細胞が産生する IFN-gamma は, 人の皮膚において炎症性樹状細胞を誘導することが報告されており[34], 人の乾癬ではこの炎症性樹状細胞が IL-23 を産生することで Th17 細胞の反応を増強させていると考えられている[23, 43]。そのため, 犬の病変部においても人の乾癬と同様, Th1 細胞が Th17 細胞の反応を増強させている可能性が考えられた。

本研究で遺伝子転写量が増加していた *ccr6* および *ccl20* は, Th17 細胞に特異的に発現しているケモカイン受容体および受容体に特異的なリガンドであり, CCR6 を発現する Th17 細胞が病変部のケラチノサイトおよび炎症性樹状細胞から産生された CCL20 により病変部に遊走していると考えられた。活性化した T 細胞は主に血管を介して末梢の組織に移動するため, 本研究で推測された病変

部の Th17 細胞は末梢血から遊走してきていると考えられた。人の乾癬においては病変部だけでなく、末梢血中の Th17 細胞が健常と比較して増加していることが明らかになっている[4]。本章の結果から、犬の炎症性角化異常の病変形成には Th17 細胞が重要な役割を果たしている可能性が示されたため、犬においても末梢血中の Th17 細胞を解析する必要があると考えた。そこで、第 3 章では犬の炎症性角化異常の症例における末梢血中の Th17 細胞の割合を健常犬と比較することとした。



## 2.5 図表

表 2-1 組み入れ症例（n = 9）

症例番号	品種	性別	年齢	発症年齢	痒みの重症度
1	チワワ	未去勢雄	3歳8ヵ月	10ヵ月	重度
2	ミニチュア・ピンシャー	未避妊雌	5歳9ヵ月	6ヵ月	中程度
3	キャバリア	避妊雌	6歳3ヵ月	不明	中程度
4	チワワ	未去勢雄	8歳6ヵ月	4歳	中程度
5	チワワ	未去勢雄	8歳6ヵ月	5歳10ヵ月	中程度
6	柴	未去勢雄	8歳9ヵ月	7歳	中程度
7	アメリカン・コッカー・スパニエル	未去勢雄	10歳10ヵ月	6歳	中程度
8	アメリカン・コッカー・スパニエル	去勢雄	11歳3ヵ月	不明	重度
9	シーズー	未去勢雄	11歳6ヵ月	不明	中程度

痒みの重症度[8]

中程度：掻痒行動が頻繁に見られるが食事中や散歩中など他に注意が向いている時にはみられない

重度：食事中や散歩中なども含め常に掻痒行動がみられる

表 2-2 qRT-PCR に用いたプライマー

分子名	Primer Sequence (5'-3')	
	Forward primer	Reverse primer
<i>ccl8</i>	GCCAGCTTCAGCACCTTTG	ATGGGGATCTTCCTTTTGACC
<i>ccl17</i>	GGCTGACAAGGTGGTACAAGACTTC	CAGATGGACTTGCCTTGGACAG
<i>ccl20</i>	CTCTTGGCTGCTTTGATGATG	TGGCCAGCTGTTGTGTGAA
<i>ccr4</i>	CCCTAAGCCTTGACCAAAAGA	TGTACTTGAACAGGACCACAACCA
<i>ccr6</i>	TTGAGCGACCACCCACTTC	TGCTATTACCCGACCCCAGA
<i>ccr8</i>	CCAAAACCACAACAAAACCAAG	GAACAGGGAAAGTGAGGAAGAGG
<i>cxcr3</i>	CTACGACTATGCCGAGAATGAGAG	GGCACGGTCAAAGTTCAGG
<i>ifn-gamma</i>	CTTGGCAAGTTCTTAAATAGCAGCA	TCCTTAGGTTGGATCTTGGTGAGA
<i>il-2</i>	GGAAACAGAGCAACAGATGGAG	CATTGAAGGTGTGTAAATTCTGTG
<i>il-4</i>	TCTGCTTACTAGCACTCACCAGCAC	GACAGTCAGCTCCATGCACGA
<i>il-6</i>	TCTGTGCACATGAGTACCAAGATCC	TCCTGCGACTGCAAGATAGCC
<i>il-8</i>	CTTCCAAGCTGGCTGTTGCTC	TGGGCCACTGTCAATCACTCTC
<i>il-10</i>	CATCAAGAACCACGTGAATCC	CGCCTTGCTCTTATTCTCACAG
<i>il-12p35</i>	AGAGTTGCCTGGCTTCCAGAGA	CCTCATAGATGCTGCTAAGGCACA
<i>il-13</i>	CTGGTCAACATCACCAGAATCA	GCACAGTGCTTTCAGCATCCTC
<i>il-17a</i>	CTCCAGAAGGCCCTCAGATTAC	CTTCGCCTCCCAGATCACA
<i>il-17f</i>	TGATTTCCAGAATCGCTCCA	GAGCTGTCTTCCTGCCCTTC
<i>il-19</i>	CACCAGAATCATCCACGACAA	GGCAACCAGAGTTCCTTGATG
<i>il-20</i>	CAGATCAGTGCTGCCTCCTTC	CGGAGGATATGGTGGTCAGG
<i>il-22</i>	CATATTGAGAACGATGACCAGCA	TCAGGGCCATAAACAGCAGA
<i>il-23p19</i>	GATGGCTGTGATCCCCAAG	AAGGCTCCCCTGTGAAAATG
<i>il-24</i>	CCAGCCAGGAAGATGAGATG	TCTGGGCTGCTTGTATGTCC
<i>s100a8</i>	ACCATGCTGACGGAAGTGGAG	CTTGGAACCAGGTGTCTGCATC
<i>tgf-beta</i>	GGAGCAGCATGTGGAGCTGTA	GCCTCACGACTCCAGTGACATC
<i>tnf-alpha</i>	CCCAAGTGACAAGCCAGTAGCTC	ACAACCCATCTGACGGCACTATC
<i>hprt1</i>	CACTGGGAAAACAATGCAGA	ACAAAGTCAGGTTTATAGCCAAC
<i>rpl13a</i>	GCCGGAAGGTTGTAGTCGT	GGAGGAAGGCCAGGTAATTC
<i>rps18</i>	TGCTCATGTGGTATTGAGGAA	TCTTATACTGGCGTGGATTCTG

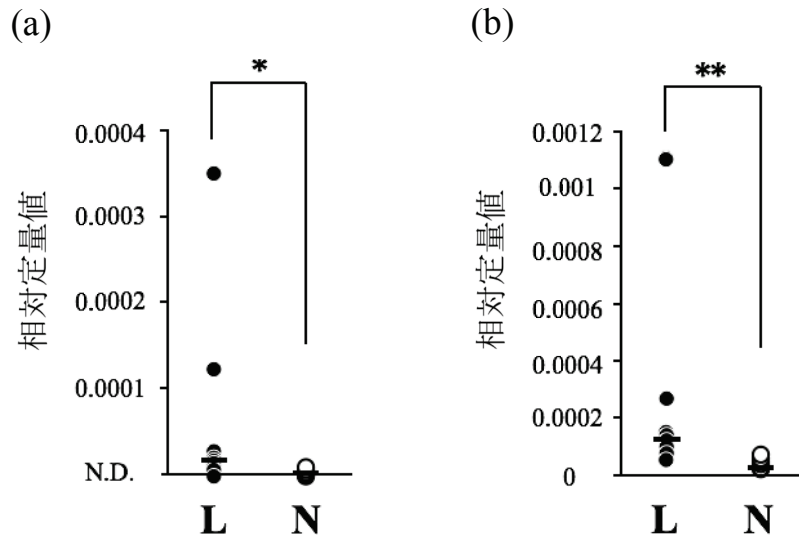


図 2-1 病変部における Th1 サイトカインの遺伝子転写量

(a) *ifn-gamma* および (b) *il-12p35* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9), N は健常犬の皮膚 (n = 6) を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。N.D.: 検出限界以下, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U 検定

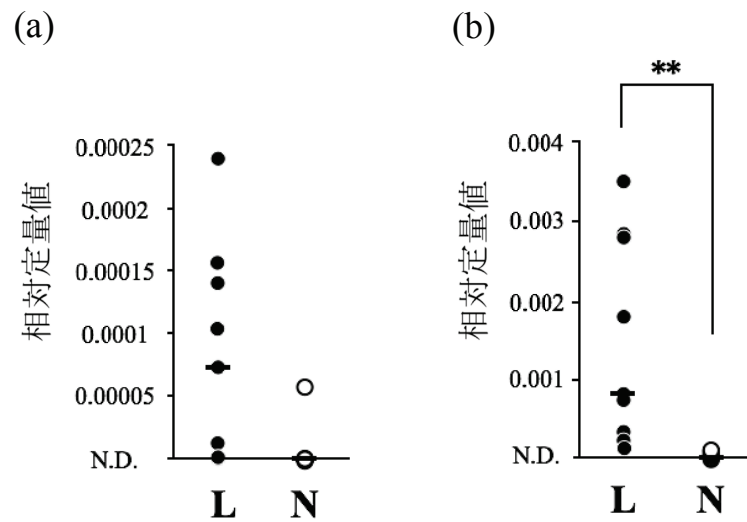


図 2-2 病変部における Th2 サイトカインの遺伝子転写量

(a) *il-4* および (b) *il-13* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9), N は健常犬の皮膚 (n = 6) を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。N.D.: 検出限界以下,

\*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U 検定

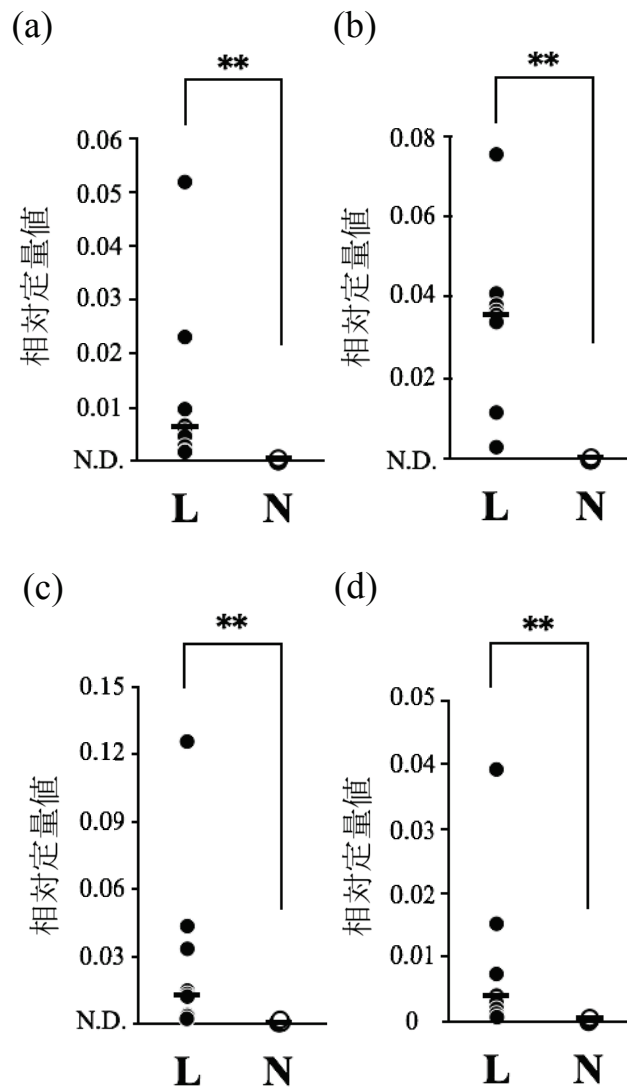


図 2-3 病変部における Th17 サイトカインの遺伝子転写量

(a) *il-17a*, (b) *il-17f*, (c) *il-22* および (d) *il-23p19* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9), N は健常犬の皮膚 (n = 6) を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。

N.D.: 検出限界以下, \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U 検定

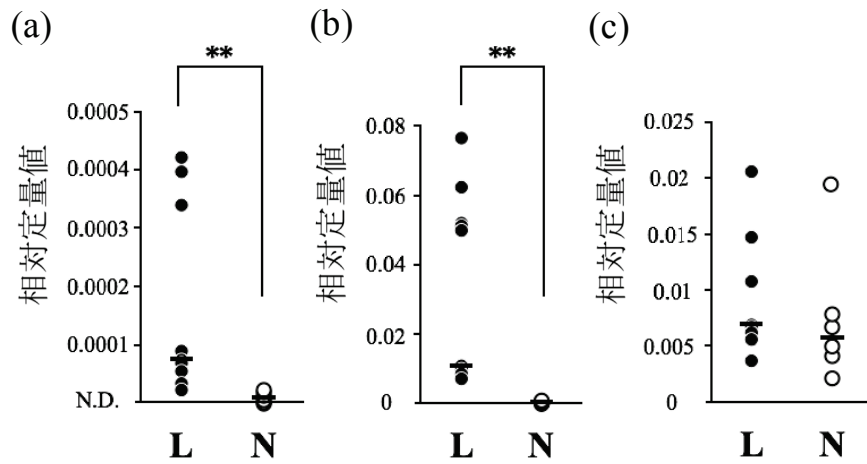


図 2-4 病変部における炎症性サイトカインの遺伝子転写量

(a) *il-2*, (b) *il-6* および (c) *tnf-alpha* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9), N は健常犬の皮膚 (n = 6) を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。N.D.: 検出限界以下, \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U 検定

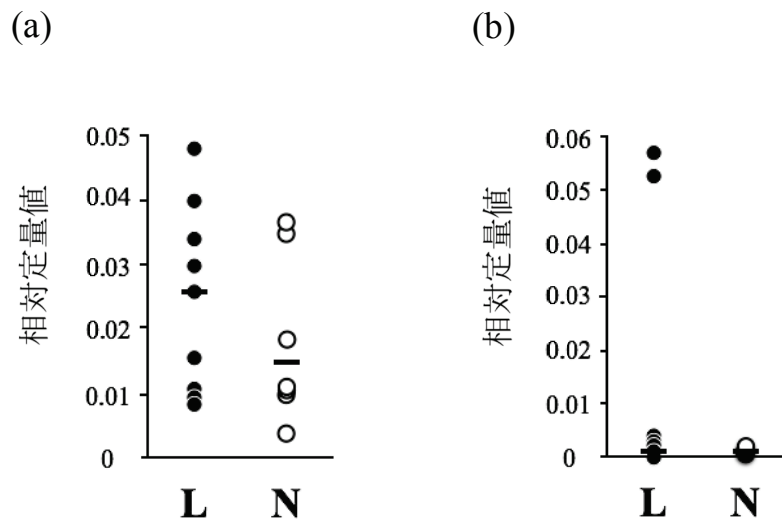


図 2-5 病変部における制御性サイトカインの遺伝子転写量

(a) *il-10* および (b) *tgf-beta* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9) , N は健康犬の皮膚 (n = 6)を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。

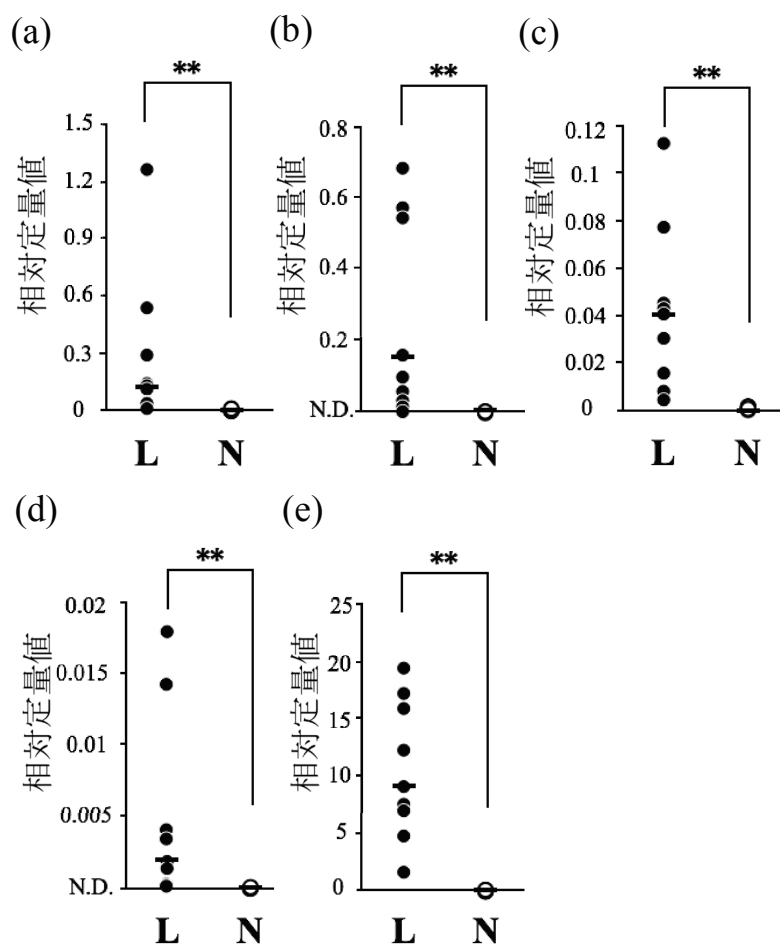


図 2-6 病変部における好中球遊走因子の遺伝子転写量

(a) *il-8*, (b) *il-19*, (c) *il-20*, (d) *il-24* および (e) *s100a8* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9), N は健常犬の皮膚 (n = 6) を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。N.D.: 検出限界以下, \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U 検定



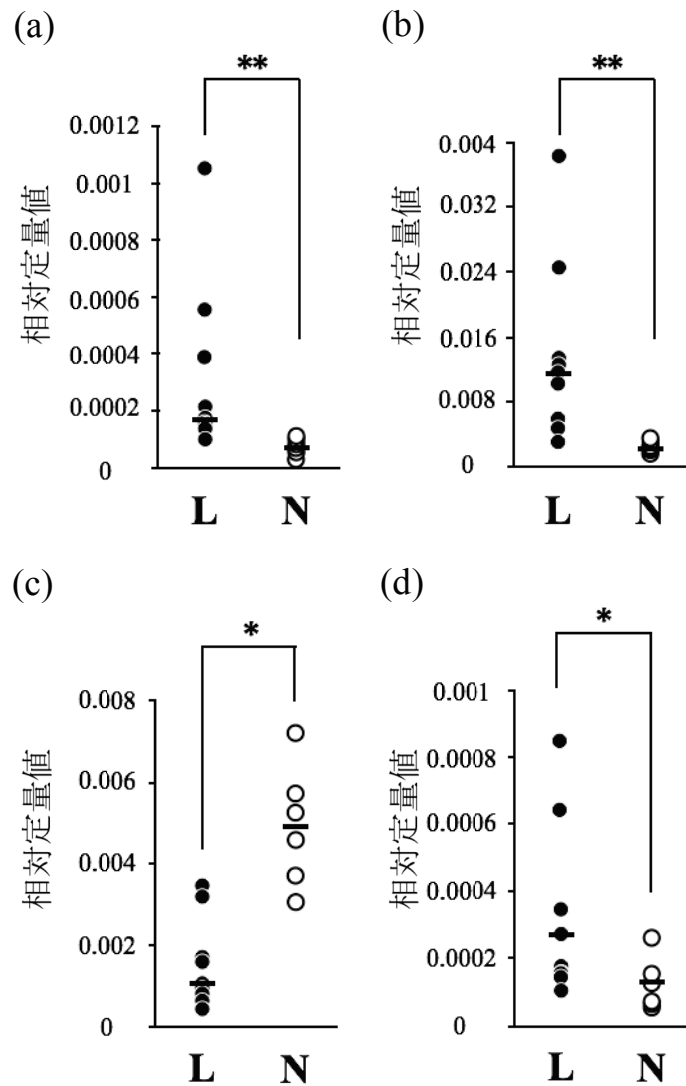


図 2-7 病変部におけるケモカイン受容体の遺伝子転写量

(a) *ccr4*, (b) *ccr6*, (c) *ccr8* および (d) *cxcr3* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9), N は健常犬の皮膚 (n = 6) を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U 検定

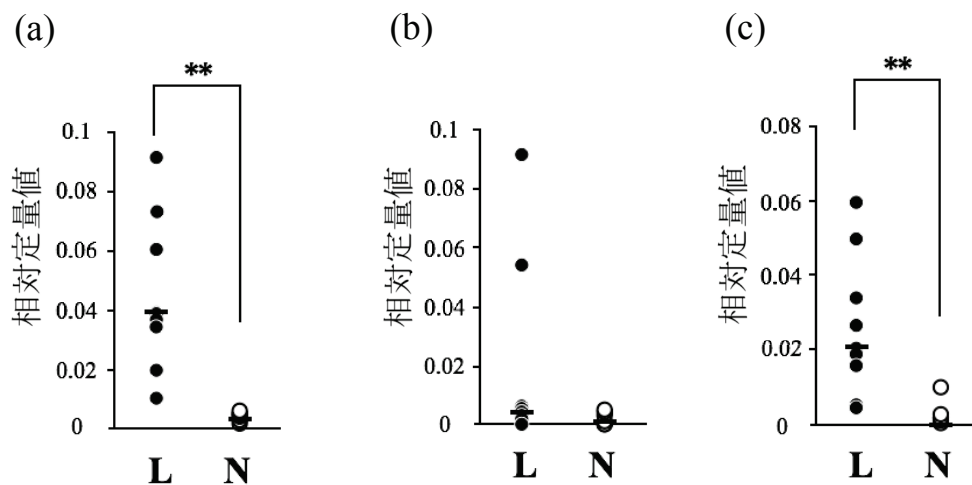


図 2-8 病変部におけるケモカインの遺伝子転写量

(a) *ccl8*, (b) *ccl17* および (c) *ccl20* の転写量。L は症例の皮膚病変部 (n = 9), N は健常犬の皮膚 (n = 6) を示す。水平線はそれぞれ中央値を示す。\*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U 検定



図 2-9 各 Th サブセットにおけるサイトカイン，ケモカイン受容体およびケモカインの遺伝子転写量のワードクラウドによる可視化

病変部において健常犬の皮膚と比較して遺伝子転写量の有意な増加が認められたサイトカイン，ケモカイン受容体およびケモカインをワードクラウドで可視化した。遺伝子転写量を文字の大きさで表し，各 Th サブセットを対応した文字の色で表した。

## 第 3 章

### 犬の炎症性角化異常における末梢血 Th17 細胞の割合のフロー サイトメトリー解析

### 3.1. 序論

第2章の結果から、犬の炎症性角化異常の病態においてTh17細胞が重要である可能性が示唆された。人の乾癬においては、Th17細胞が産生するIL-17AおよびIL-22が、病変部への炎症細胞の誘導や表皮肥厚および正角化性または錯角化性の角化亢進を引き起こす[51, 53, 64, 76, 89]。また、人の乾癬においては、病変部にTh17細胞が浸潤しているだけでなく、末梢血Th17細胞の割合が健常と比較して有意に増加していることが報告されている[4]。Th17細胞はおもに腸管粘膜に存在しているため、腸内細菌の刺激により腸管膜リンパ節でTh17細胞に分化すると考えられている[30, 31]。また、人のTh17細胞の分化には、TGF-betaの非存在下で樹状細胞およびマクロファージから産生されるIL-6, IL-23およびIL-1betaの刺激が必要であることが報告されている[81]。Th17細胞はCCR6を発現しており[44]、人の乾癬ではケラチノサイトおよび樹状細胞が産生するCCL20の存在により血管を介して皮膚にTh17細胞が遊走すると考えられている[44, 51, 70]。

2010年に、ビーグル犬の末梢血から犬のIL-17Aがクローニングされた。2015年には犬の末梢血において、抗ヒトIL-17Aモノクローナル抗体または抗マウスIL-17Aモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法によってIL-17A産生細胞が検出された[49, 62]。しかしながら、イヌIL-17Aに対するこれらの抗体の交差性は証明されていない。

犬の炎症性直腸ポリープの病変部においては、IL-17Aの遺伝子転写量が増加していることが報告されている[54]。また、免疫組織化学を用いた解析により、慢性潰瘍性歯肉炎、炎症性腸疾患（IBD）、慢性皮膚炎および慢性鼻炎において病変部のIL-17A産生細胞が増加していることが報告されている[1, 36]。Enzyme-Linked ImmunoSpot（ELISpot）を用いた研究においては、ステロイド反応性髄膜炎-動脈炎の症例が健常犬と比較して、末梢血中のIL-17A産生細胞およ

びTh細胞の割合が有意に増加していることが明らかとなっている[16]。上記の研究から、犬の免疫介在性炎症性疾患においても末梢血Th17細胞が増加している可能性が示唆されている。

人においては、Th1、Th2およびTh17細胞を含むTh細胞が加齢と共に増加することが報告されている[27, 38]。犬においても、Th1およびTh2細胞の割合が加齢と共に増加することが報告されているが[28, 85]、Th17細胞の年齢による変化は不明である。そのため、犬の炎症性角化異常における末梢血Th17細胞の挙動を明らかにするためには、健常犬における末梢血Th17細胞と年齢による変化を明らかにする必要がある。

本章では、イヌ IL-17A に交差性を示す抗体を用いたフローサイトメトリー解析により、各年齢の健常犬における末梢血 Th17 細胞の割合を明らかにした後、犬の炎症性角化異常の犬における末梢血 Th17 細胞の割合の変化を解析した。

## 3.2. 材料と方法

### 3.2.1. 組み入れ症例および材料

第 1 章の基準に基づいて診断した犬の炎症性角化異常の症例のうち、2012 年 11 月から 2016 年 6 月の期間に岐阜大学附属動物病院を受診した犬 10 頭を本研究に用いた（表 3-1）。末梢血 Th17 細胞の年齢別解析には健常犬 60 頭を用いた（表 3-2-1, 3-2-2）。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（#16083）。健常犬の内訳は未去勢雄 7 頭、去勢雄 13 頭、未避妊雌 17 頭および避妊雌 23 頭であり、年齢は 3 ヶ月-9 歳 11 ヶ月であった。犬種の内訳はビーグル（n = 23）、トイ・プードル（n = 7）、チワワ（n = 5）、ボーダー・コリー（n = 3）、ミニチュア・ダックスフンド（n = 3）、ポメラニアン（n = 3）、ウェルシュ・コーギー・ペンブローク（n = 2）、ゴールデン・レトリバー（n = 2）、柴犬（n = 2）、マルチーズ（n = 2）、ラブラドル・レトリバー（n = 2）およびアメリカン・スタフォードシェア・テリア、グレート・ピレニーズ・マウンテン・ドッグ、ミニチュア・シュナウザー、シーズー、ヨークシャ・テリアおよび交雑種が各 1 頭であった。健常犬は年齢ごとにさらにグループ A（1 歳未満）、グループ B（1-5 歳）およびグループ C（6 歳-9 歳）の 3 グループに分類した。症例との比較解析においては同年齢の対照群として、上記の健常犬のうち 4 歳-9 歳 11 ヶ月の犬 27 頭を用いた。5-10 ml の血液を採取後、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（DPBS; コージンバイオ, 埼玉, 日本）を用いて血液を希釈し、ジアトリゾ酸ナトリウム-ポリサッカライド溶液（Lymphoprep<sup>TM</sup>; AXIS-SHIELD, Oslo, Norway）に重層した。室温, 580 g で 30 分遠心した後末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells, PBMCs）を回収し、DPBS で洗浄した。回収した細胞は、細胞凍結保存用培地（TC-Protector; DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本および CELLBANKER<sup>TM</sup>; タカラバイオ, 滋賀, 日本）を

用いて-80℃で保存した。

### 3.2.2. イヌ IL-17A プラスミド導入

ヘキサヒスチジン (6 × His) タグをエンコードしたイヌ IL-17A 完全長 cDNA を pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に挿入した。加熱不活性化した 10%牛胎仔血清 (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; ナカライテスク, 京都, 日本) を用いて人胎児腎 (HEK) 293A 細胞 (Invitrogen) を 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。HEK293A 細胞を 6 穴細胞培養用プレート (NUNK multidish 6; Thermo Fisher Scientific) で  $1 \times 10^6$  cells/well の密度になるように培養し, 製品プロトコールに従い, 遺伝子導入試薬 (Lipofectamine™ 2000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて 4  $\mu$ g の IL-17A 遺伝子を挿入した pcDNA3.1 プラスミドを導入した。遺伝子導入前に培地を無血清培地 (Opti-MEM; life technologies corporation, CA, USA) に交換し, 遺伝子導入 4 時間後に 10%FBS 加 DMEM に交換した。また, プラスミドを添加していない HEK293A 細胞をコントロールとして使用した。

### 3.2.3. フローサイトメトリー

ブレフェルディン-A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 10  $\mu$ g/ml を添加した培養液でイヌ IL-17A 遺伝子を導入した HEK293A 細胞を 4 時間培養した。1%FBS 加 DPBS を用いて細胞を洗浄した後, 100  $\mu$ l の 1%正常ラット血清加 DPBS に再懸濁した。細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し, 0.2%ポリエチレングリコールモノ-p-イソオクチルフェニルエーテル (トリトン-X 100; Sigma-Aldrich) 加 DPBS で透過処理した。抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体 (eBio64DEC17; eBioscience, San Diego, CA, USA, 希釈 1:200) および抗 His タグモノクローナル抗体 (3D5; Invitrogen, 希釈 1:100) を用いて, 細胞を室温で 30



分反応させた。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マウスイムノグロブリン 1 モノクローナル抗体 (MOPC-31C; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) および正常マウスイムノグロブリン 2b モノクローナル抗体 (MPC-11; BD Pharmingen) を同じタンパク濃度に希釈して使用した。細胞を洗浄後、二次抗体として phycoerythrin (PE) 標識抗マウスイムノグロブリン 1 モノクローナル抗体 (RMG1-1; BioLegend, San Diego, CA, USA, 希釈 1:100) および fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスイムノグロブリン 2a/2b モノクローナル抗体 (R2-40; BD Pharmingen, 希釈 1:100) を用いて室温、遮光下で 30 分反応させた後、洗浄した。一次抗体および二次抗体の希釈には 1%FBS 加 DPBS を用いた。イヌ IL-17A に対する抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体の交差性解析にはイヌ IL-17A 遺伝子導入細胞を使用した。

症例および健常犬のPBMCsを用いたフローサイトメトリーによるTh17細胞解析の手技はKolらの報告を参考にした[36]。PBMCsを最終濃度が $2 \times 10^6$  cells/mlとなるよう10%FBS加Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640培地; Sigma-Aldrich) を用いて調整した。PBMCsに25 ng/mlのホルボール12-ミリストート13-アセテート(PMA; Sigma-Aldrich)および500 ng/mlのA23187(Sigma-Aldrich)を添加し、3時間反応させた後、1  $\mu$ g/mlのブレフェルディン-Aを加え、さらに3時間培養した。PBMCsを洗浄後、100  $\mu$ lの0.02%アジ化ナトリウム/1%正常ラット血清/1%正常マウス血清加DPBSに再懸濁した。PBMCsをリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄後に遮光下で20分間死細胞の染色を行った。1%FBS加DPBSで洗浄後、250  $\mu$ lの固定および透過処理用試薬(BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution; BD Biosciences)を用いて、4℃で20分間PBMCsを固定した。その後、PBMCsを透過処理用バッファーで2回洗浄した。PBMCsは以下の一次抗体および対応する同じ蛋白濃度に希釈したネガティブコントロールを用いて室温、遮光下で30分間反応させた; 抗イヌCD3 FITC標識モノクロー

ナル抗体 (CA17.2A12; Bio-Rad, Hercules, USA, 希釈1:20), 抗イヌCD4 Alexa Fluor 647標識モノクローナル抗体 (YKIX302.9; Bio-Rad, 希釈1:500), 抗ヒトIL-17A PE標識モノクローナル抗体 (eBio64DEC17; eBioscience, 希釈1:20), FITC標識マウスイムノグロブリン1モノクローナル抗体 (MCA928F; Bio-Rad), Alexa Fluor 647標識ラットイムノグロブリン2aモノクローナル抗体 (RTK2758; Abcam, Cambridge, UK) およびPE標識マウスイムノグロブリン1モノクローナル抗体 (MOPC-21; BioLegend)。PBMCsはFACSCanto™ II (BD Biosciences) を用いて測定し, FlowJo™ 解析用ソフトウェア (version 9.9.6; Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

#### 3.2.4. 統計解析

年齢と  $CD3^+CD4^+IL-17A^+$  リンパ球の割合の関連性は Spearman の順位相関係数を用いて解析した。グループ A, グループ B およびグループ C における三群間の有意差を評価するために Steel-Dwass 検定を用いて解析した。症例および健常犬における二群間の有意差を評価するために Mann-Whitney's U 検定を用いて解析した。  $P < 0.05$  を有意差ありとした。解析には, 統計ソフト JMP version 10.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用した。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 抗体交差性

抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体 (eBio64DEC17) はイヌ IL-17A 遺伝子を導入した HEK293A 細胞と反応し、プラスミドを添加していない HEK293A 細胞とは反応しなかった (図 3-1a, b)。

#### 3.3.2. 健常犬における末梢血 $CD3^+CD4^+IL-17A^+$ リンパ球の割合の加齢性変化

年齢により分類した健常犬 3 群の内訳は、グループ A ( $n = 16$ ; 未避妊雌 9 頭, 未去勢雄 6 頭, 避妊雌 1 頭; 3-11 ヶ月), グループ B ( $n = 25$ ; 避妊雌 12 頭, 未避妊雌 7 頭, 去勢雄 6 頭; 1 歳 2 ヶ月-5 歳 8 ヶ月) およびグループ C ( $n = 19$ ; 避妊雌 10 頭, 去勢雄 7 頭, 未去勢雄 1 頭, 未避妊雌 1 頭; 6 歳 6 ヶ月-9 歳 11 ヶ月) であった。末梢血  $CD3^+CD4^+$ リンパ球中の  $IL-17A^+$ リンパ球の割合は年齢と正の相関を示した (図 3-2a)。グループ A (平均  $\pm$  標準偏差:  $1.52 \pm 1.18\%$ ), グループ B (平均  $\pm$  標準偏差:  $3.81 \pm 1.94\%$ ) およびグループ C (平均  $\pm$  標準偏差:  $7.49 \pm 2.54\%$ ) の全ての群間で有意差が認められた (図 3-2b)。

#### 3.3.3. 症例における末梢血 $CD3^+CD4^+IL-17A^+$ リンパ球の割合

症例の末梢血  $CD3^+CD4^+IL-17A^+$ リンパ球の割合は健常犬の同年齢対照群と比較して有意に減少していた (図 3-3)。

### 3.4. 考察

本研究の結果から、抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体（eBio64DEC17）はイヌ IL-17A に交差性を示すことが明らかになった。また、上記の抗体を用いた健常犬における年齢別解析の結果から、犬の末梢血 Th 細胞中の Th17 細胞の割合は加齢とともに増加することが明らかとなった。骨髄で産生された T リンパ球前駆細胞は、胸腺において自己抗原の認識が弱い細胞と強い細胞に選別され、自己抗原を全く認識しない、または強く認識する細胞はアポトーシスにより除去される。胸腺において Th 細胞に分化したリンパ球は、末梢のリンパ組織で抗原提示細胞により活性化されて Th1, Th2 および Th17 細胞などのエフェクター T 細胞に分化する[18, 90]。人の胸腺は加齢とともに萎縮し、大部分が脂肪組織に置換されるため、胸腺における新生 Th 細胞への分化が減少する[11, 56]。一方、末梢において活性化されるエフェクター T 細胞は外界からの抗原刺激を受ける度に分化し、増殖する[90]。その結果、人では Th1, Th2 および Th17 細胞の割合が加齢とともに増加すると考えられている。犬においては Th1 細胞および Th2 細胞など他のメモリー T 細胞も Th17 細胞と同様に加齢とともに増加することが報告されているが[28, 85]、そのメカニズムは不明である。犬の Th17 細胞の加齢性変化の原因を明らかにするには、今後さらなる研究が必要である。

犬の炎症性角化異常においては末梢血 Th17 細胞の割合が健常犬に比較して減少していた。皮膚疾患においては皮膚に存在する樹状細胞およびケラチノサイトなどが産生するケモカインの存在により、ケモカインに特異的なケモカイン受容体を有する細胞が病変部に遊走する[57]。一方、糖質コルチコイドを投与した場合、ケモカインおよびケモカイン受容体の発現低下により、炎症局所に浸潤するリンパ球は減少する[29, 37, 59]。上記の現象は再分布と呼ばれ、疾患の病期または治療により炎症細胞の体内分布が変化することが明らかになっている。

CAD モデルでは、症状が最も強く発現する時に一時的に末梢血 Th2 細胞の減少が認められることが報告されている[71]。人の原発性シェーグレン症候群は、乾燥性角膜炎および口腔乾燥症などを臨床症状とし、Th17 細胞が病態に関与していると考えられている自己免疫疾患だが、病変のある唾液腺に Th17 細胞が浸潤しているにも関わらず、末梢血 Th17 細胞は減少していることが報告されている[68, 73]。犬の炎症性角化異常では、病変部に Th17 細胞が遊走する結果、末梢血 Th17 細胞が減少する再分布が起こっている可能性が考えられる。

本章の結果から、末梢血 Th17 細胞の解析時には加齢に伴う変化を考慮する必要があることが示された。また、犬の炎症性角化異常においては、病期により末梢血 Th17 細胞数の減少が生じている可能性があることから、多光子顕微鏡などを用いた蛍光生体イメージング解析による Th17 細胞の経時的かつ空間的な変化を明らかにする必要があると考えられる。

### 3.5 図表

表 3-1 組み入れ症例（n = 10）

症例番号	犬種	性別	年齢	発症年齢
1	トイ・プードル	未避妊雌	4歳10ヵ月	1歳
2	ヨークシャ・テリア	避妊雌	5歳1ヵ月	2歳
3	交雑種	去勢雄	5歳5ヵ月	2歳
4	トイ・プードル	去勢雄	5歳10ヵ月	1歳
5	チワワ	未去勢雄	7歳9ヵ月	6歳
6	バーニーズ・マウンテン・ドッグ	未去勢雄	7歳10ヵ月	3歳
7	アメリカン・コッカー・ スパニエル	避妊雌	8歳	1歳
8	シェットランド・ シープドッグ	去勢雄	9歳10ヵ月	9歳
9	ミニチュア・ダックスフンド	去勢雄	10歳6ヵ月	5歳
10	トイ・プードル	未去勢雄	10歳8ヵ月	7歳

表 3-2-1 健常犬 (n = 60)

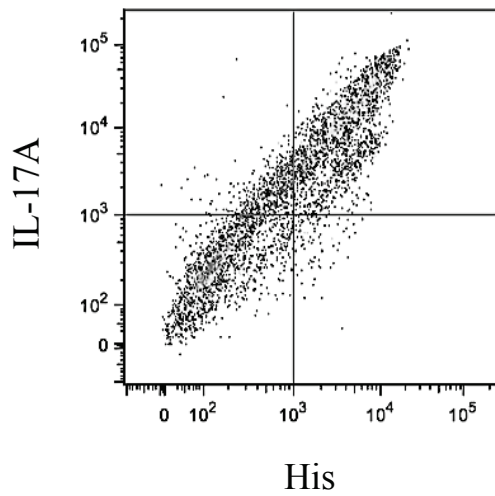
症例番号	犬種	性別	年齢
1	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	未去勢雄	3ヵ月
2	ゴールデン・レトリバー	未避妊雌	6ヵ月
3	トイ・プードル	未去勢雄	6ヵ月
4	トイ・プードル	未避妊雌	6ヵ月
5	シーズー	未避妊雌	7ヵ月
6	ポメラニアン	未去勢雄	7ヵ月
7	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	避妊雌	8ヵ月
8	グレート・ピレニーズ・マウンテン・ドッグ	未去勢雄	8ヵ月
9	チワワ	未避妊雌	8ヵ月
10	トイ・プードル	未去勢雄	8ヵ月
11	トイ・プードル	未避妊雌	8ヵ月
12	ポメラニアン	未避妊雌	8ヵ月
13	マルチーズ	未避妊雌	8ヵ月
14	ミニチュア・シュナウザー	未避妊雌	8ヵ月
15	ボーダー・コリー	未去勢雄	9ヵ月
16	ポメラニアン	未避妊雌	11ヵ月
17	ビーグル	未避妊雌	1歳
18	ビーグル	未避妊雌	1歳
19	ビーグル	避妊雌	1歳
20	ゴールデン・レトリバー	未避妊雌	1歳2ヵ月
21	柴犬	未避妊雌	1歳7ヵ月
22	トイ・プードル	避妊雌	2歳
23	ビーグル	避妊雌	2歳
24	ビーグル	去勢雄	2歳
25	ビーグル	去勢雄	2歳
26	ビーグル	避妊雌	2歳
27	トイ・プードル	未避妊雌	3歳
28	ビーグル	避妊雌	3歳
29	ビーグル	避妊雌	3歳
30	ビーグル	避妊雌	3歳

表 3-2-2 健常犬 (n = 60)

症例番号	犬種	性別	年齢
31	チワワ	避妊雌	3歳3ヵ月
32	ビーグル	避妊雌	4歳
33	マルチーズ	去勢雄	4歳
34	ラブラドル・レトリバー	去勢雄	4歳1ヵ月
35	交雑種	避妊雌	4歳8ヵ月
36	ボーダー・コリー	去勢雄	4歳11ヵ月
37	ボーダー・コリー	未避妊雌	5歳3ヵ月
38	ビーグル	避妊雌	5歳4ヵ月
39	トイ・プードル	避妊雌	5歳6ヵ月
40	チワワ	未避妊雌	5歳8ヵ月
41	ミニチュア・ダックスフンド	去勢雄	5歳8ヵ月
42	ビーグル	去勢雄	6歳
43	ビーグル	去勢雄	6歳
44	ビーグル	去勢雄	6歳
45	ビーグル	避妊雌	6歳
46	ビーグル	避妊雌	6歳6ヵ月
47	アメリカン・スタッフォードシャー・テリア	避妊雌	7歳
48	柴犬	未去勢雄	7歳
49	チワワ	避妊雌	7歳
50	ビーグル	去勢雄	7歳
51	チワワ	未避妊雌	7歳3ヵ月
52	ビーグル	避妊雌	8歳
53	ビーグル	避妊雌	8歳
54	ビーグル	去勢雄	8歳
55	ビーグル	避妊雌	8歳
56	ビーグル	去勢雄	8歳7ヵ月
57	ヨークシャー・テリア	避妊雌	9歳3ヵ月
58	ゴールデン・レトリバー	避妊雌	9歳6ヵ月
59	ラブラドル・レトリバー	避妊雌	9歳6ヵ月
60	ミニチュア・ダックスフンド	去勢雄	9歳11ヵ月



(a)



(b)

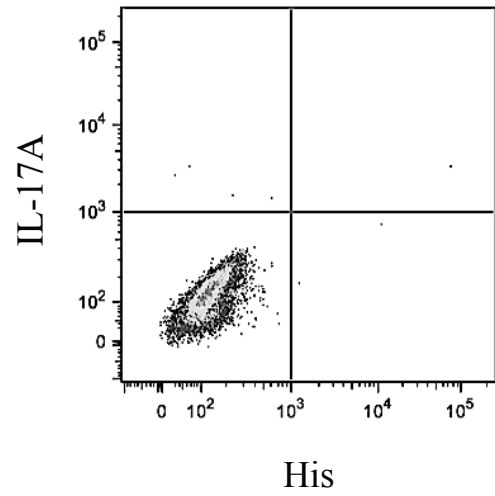


図 3-1 イヌ IL-17A 遺伝子を組み込んだプラスミドを導入した HEK293A 細胞におけるイヌ IL-17A の発現

(a) イヌIL-17A-His-taggedプラスミドを導入したHEK293A細胞, (b) プラスミドを導入していないHEK293A細胞。縦軸にIL-17Aを, 横軸にHisの発現を示す。

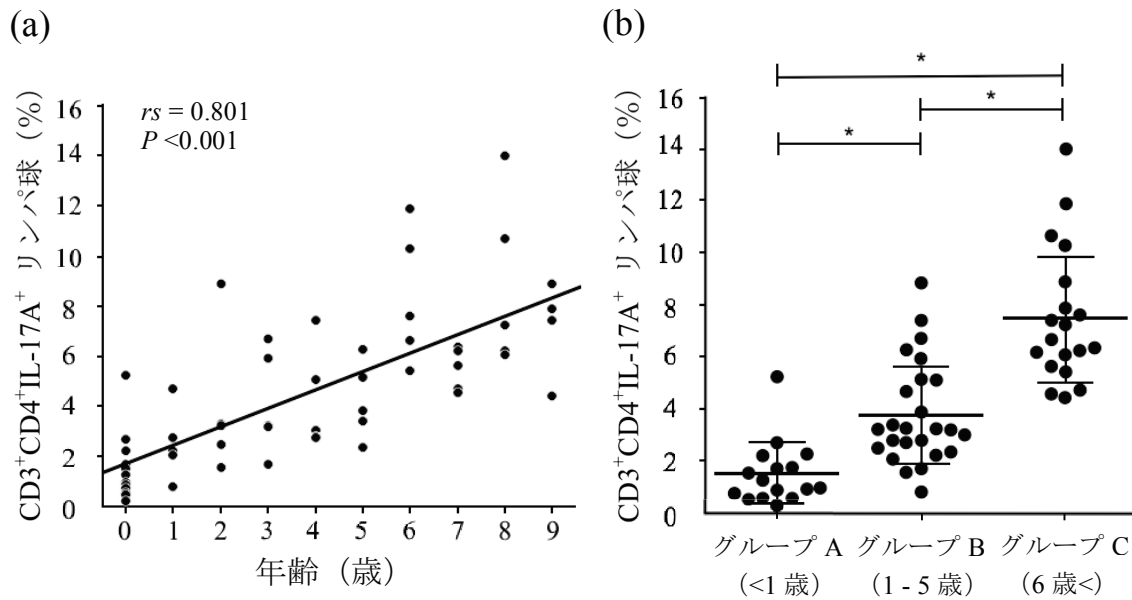


図 3-2 各年齢における CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>リンパ球の割合

縦軸は CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>リンパ球の割合を、横軸はそれぞれ 1 歳未満-9 歳までの各年齢 (n = 60) (a) または異なる年齢のグループ A (n = 16) , B (n = 25) および C (n = 19) (b) を示す。水平線は平均値 ± 標準偏差を示す。\* $P < 0.001$ , Steel-Dwass 法

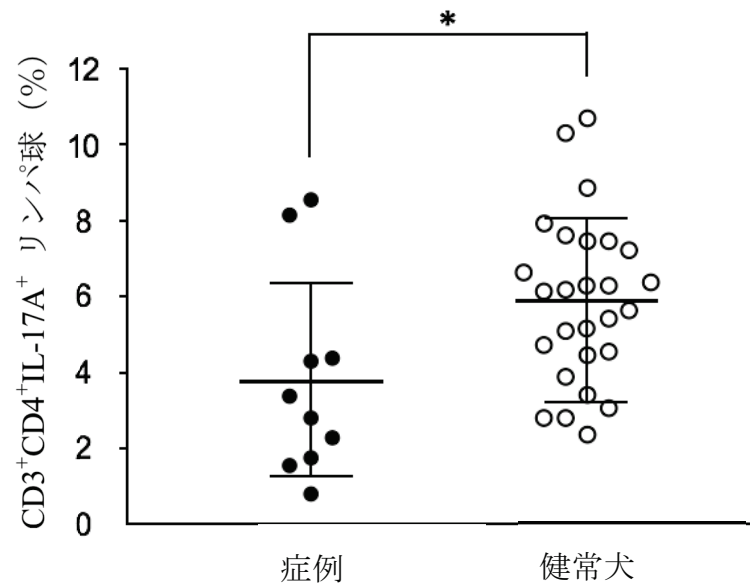


図 3-3 症例 (n = 10) および同年齢対照群の健常犬 (n = 27) の末梢血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>リンパ球の割合

縦軸は CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>リンパ球の割合を示す。水平線はそれぞれ平均値 ± 標準偏差を示す。\**P* < 0.05, Mann-Whitney's U 検定

## 総括

犬の炎症性角化異常は鱗屑および落屑を特徴とする慢性の皮膚疾患である[48, 78]。これまで、犬の炎症性角化異常に関しては脂腺炎および苔癬型角化症などの報告があるのみで[2, 5, 15], 我々が日常的に遭遇する犬の炎症性角化異常の臨床および病理学的特徴を解析した報告はなく、病態は不明であった。診断は続発性角化異常の除外に頼らざるを得なく、治療も経験に基づいた対症療法が行われていた。そのため、診断に長時間を要し、病態に基づいた治療も困難であったため、臨床の現場では難治性の皮膚疾患と考えられていた。しかしながら、Th17細胞が病態に関与する人の乾癬と臨床上の類似点が存在すること[10, 12, 20, 87], T細胞における転写因子であるNFATの核内移行を阻害するシクロスポリンAが有効な症例が存在することから[48], T細胞が免疫病態に関与すると考えた。本研究では犬の炎症性角化異常の病態を明らかにすることを目的として、特にT細胞サブセットに着目し、解析を行った。

第1章では犬の炎症性角化異常の臨床症状および病理組織学的特徴を明らかにした。犬の炎症性角化異常は重度の表皮肥厚、正角化性および錯角化性の角化亢進を伴い、リンパ球および好中球を主体とした炎症細胞が浸潤していることが明らかとなった。また、治療にはグルココルチコイドおよびシクロスポリンAのいずれかまたは併用が必要であったことが明らかとなった。シクロスポリンAが有効であったことから、犬の炎症性角化異常ではT細胞サブセットが病態に関与している可能性が示唆された。

第2章では、犬の炎症性角化異常の病変部におけるサイトカイン、ケモカイン受容体およびケモカインの遺伝子転写量を解析した。Th17サイトカインおよび好中球遊走因子の遺伝子転写量が増加していた。また、Th17細胞に発現しているケモカイン受容体である*ccr6*および*ccr6*のリガンドである*ccl20*の遺伝子転写量が増加していた。したがって、犬の炎症性角化異常の病変部においては、Th17細胞が浸潤している可能性が示唆された。

第3章では、健常犬の末梢血Th17細胞の割合の加齢性変化を明らかにした後に、犬の炎症性角化異常の末梢血Th17細胞の割合と比較した。健常犬の末梢血Th17細胞の割合は加齢とともに増加した。犬の炎症性角化異常の末梢血Th17細胞の割合は同年齢の健常犬と比較して減少していたことから、末梢血から皮膚病変部への再分布が生じている可能性が示された。

本研究の結果から、犬の炎症性角化異常の皮膚病変部にはリンパ球が浸潤しており、シクロスポリンAが有効な症例が多数存在したことから、T細胞の関与が考えられた。病変部の遺伝子転写量の解析結果から、犬の炎症性角化異常ではTh17細胞が病変部に遊走している可能性が示唆された。また、Th17細胞が産生するIL-17Aがケラチノサイトを介して好中球を遊走させ、IL-22がケラチノサイトに作用することで重度の表皮肥厚および角化異常を引き起こしていると推測された。犬の炎症性角化異常の病態にはTh17細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆されたが、末梢血のTh17細胞が減少していたことから、犬の炎症性角化異常におけるTh17細胞の体内分布は経時的に変化している可能性が示されたため、今後はTh17細胞の経時的かつ空間的な解析が必要と思われる。本研究は犬の炎症性角化異常の病態に関して解析した初めての研究である。今後、さらなる研究により、将来的に犬の炎症性角化異常においてTh17細胞が有効な診断指標または治療の標的となることが期待される。

## 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、御精読いただき、御指導ご鞭撻を賜りました主査の岐阜大学 西飯直仁准教授，副査の帯広畜産大学 宮原和郎教授，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、標本を快く拝借させて頂きました岐阜大学獣医病理学研究室の柳井徳磨教授（現 岡山理科大学獣医学部野性動物学・法医学研究室教授），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に心より感謝いたします。

大学院での研究に対して、御理解と日々の業務において多大なる御協力を賜りました草津犬猫病院のスタッフの皆様に深く感謝いたします。

最後に、進学にあたっての両親および家族の理解，助言および惜しめない支援に心より感謝いたします。



## 参考文献

1. Anderson JG, S Peralta, A Kol, PH Kass and B Murphy (2017) Clinical and Histopathologic Characterization of Canine Chronic Ulcerative Stomatitis. *Vet Pathol* 54(3): 511-519
2. Anderson WI, DW Scott and PB Luther (1989) Idiopathic benign lichenoid keratosis on the pinna of the ear in four dogs. *Cornell Vet* 79(2): 179-184
3. Asahina R, H Kamishina, H Kamishina and S Maeda (2015) Gene transcription of pro-inflammatory cytokines and chemokines induced by IL-17A in canine keratinocytes. *Vet Dermatol* 26(6): 426-431, e100
4. Benham H, P Norris, J Goodall, MD Wechalekar, O FitzGerald, A Szentpetery, M Smith, R Thomas and H Gaston (2013) Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Res Ther* 15(5): R136
5. Bond R and H Brooks (2013) Transverse sectioning for histological assessment of sebaceous glands in healthy dogs and canine sebaceous adenitis. *J Small Anim Pract* 54(6): 299-303
6. Boniface K, FX Bernard, M Garcia, AL Gurney, JC Lecron and F Morel (2005) IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174(6): 3695-3702
7. Bruet V, PJ Bourdeau, A Roussel, L Imparato and JC Desfontis (2012) Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. *Vet Dermatol* 23(6): 487-e493
8. Cosgrove SB, JA Wren, DM Cleaver, DD Martin, KF Walsh, JA Harfst, SL Follis, VL King, JF Boucher and MR Stegemann (2013) Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. *Vet Dermatol* 24(5): 479-e114
9. Credille KM, JS Minor, KF Barnhart, E Lee, ML Cox, KA Tucker, KL Diegel,

- PJ Venta, D Hohl, M Huber and RW Dunstan (2009) Transglutaminase 1-deficient recessive lamellar ichthyosis associated with a LINE-1 insertion in Jack Russell terrier dogs. *Br J Dermatol* 161(2): 265-272
10. De Rosa G and C Mignogna (2007) The histopathology of psoriasis. *Reumatismo* 59 Suppl 1: 46-48
  11. den Braber I, T Mugwagwa, N Vrisekoop, L Westera, R Mogling, AB de Boer, N Willems, EH Schrijver, G Spierenburg, K Gaiser, E Mul, SA Otto, AF Ruiter, MT Ackermans, F Miedema, JA Borghans, RJ de Boer and K Tesselaar (2012) Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity* 36(2): 288-297
  12. Ellis CN, DC Gorsulowsky, TA Hamilton, JK Billings, MD Brown, JT Headington, KD Cooper, O Baadsgaard, EA Duell, TM Annesley and et al. (1986) Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA* 256(22): 3110-3116
  13. Ettinger SJ, EC Feldman and E Côté (2017) Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and the cat. St. Louis, Missouri, Elsevier.
  14. Favrot C, J Steffan, W Seewald and F Picco (2010) A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 21(1): 23-31
  15. Frazer MM, AE Schick, TP Lewis and E Jazic (2011) Sebaceous adenitis in Havanese dogs: a retrospective study of the clinical presentation and incidence. *Vet Dermatol* 22(3): 267-274
  16. Freundt-Revilla J, A Maiolini, R Carlson, M Beyerbach, K Rentmeister, T Flegel, A Fischer and A Tipold (2017) Th17-skewed immune response and cluster of differentiation 40 ligand expression in canine steroid-responsive

- meningitis-arteritis, a large animal model for neutrophilic meningitis. *J Neuroinflammation* 14(1): 20
17. Fujishima S, H Watanabe, M Kawaguchi, T Suzuki, S Matsukura, T Homma, BG Howell, N Hizawa, T Mitsuya, SK Huang and M Iijima (2010) Involvement of IL-17F via the induction of IL-6 in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 302(7): 499-505
  18. Gagliani N and S Huber (2017) Basic Aspects of T Helper Cell Differentiation. *Methods Mol Biol* 1514: 19-30
  19. Gross TL, MD Song, PJ Havel and PJ Ihrke (1993) Superficial necrolytic dermatitis (necrolytic migratory erythema) in dogs. *Vet Pathol* 30(1): 75-81
  20. Guttman-Yassky E, KE Nogales and JG Krueger (2011) Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol* 127(5): 1110-1118
  21. Haider AS, MA Lowes, M Suarez-Farinas, LC Zaba, I Cardinale, A Khatcherian, I Novitskaya, KM Wittkowski and JG Krueger (2008) Identification of cellular pathways of "type 1," Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J Immunol* 180(3): 1913-1920
  22. Hannigan MM (1997) A refractory case of schnauzer comedo syndrome. *Can Vet J* 38(4): 238-239
  23. Hansel A, C Gunther, J Ingwersen, J Starke, M Schmitz, M Bachmann, M Meurer, EP Rieber and K Schakel (2011) Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 127(3): 787-794

e781-789

24. Hensel P (2010) Nutrition and skin diseases in veterinary medicine. *Clin Dermatol* 28(6): 686-693
25. Hensel P, D Santoro, C Favrot, P Hill and C Griffin (2015) Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 11: 196
26. Hillier A, DH Lloyd, JS Weese, JM Blondeau, D Boothe, E Breitschwerdt, L Guardabassi, MG Papich, S Rankin, JD Turnidge and JE Sykes (2014) Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Vet Dermatol* 25(3): 163-e143
27. Holcar M, A Goropevšek, A Ihan and T Avčin (2015) Age-Related Differences in Percentages of Regulatory and Effector T Lymphocytes and Their Subsets in Healthy Individuals and Characteristic STAT1/STAT5 Signalling Response in Helper T Lymphocytes. *J Immunol Res* 2015: 352934
28. Horiuchi Y, Y Nakajima, Y Nariai, H Asanuma, M Kuwabara and M Yukawa (2007) Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes--a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol* 118(3-4): 179-185
29. Hoshino M, T Nakagawa, Y Sano and K Hirai (2005) Effect of inhaled corticosteroid on an immunoreactive thymus and activation-regulated chemokine expression in the bronchial biopsies from asthmatics. *Allergy* 60(3): 317-322
30. Ivanov, II, K Atarashi, N Manel, EL Brodie, T Shima, U Karaoz, D Wei, KC Goldfarb, CA Santee, SV Lynch, T Tanoue, A Imaoka, K Itoh, K Takeda, Y

- Umesaki, K Honda and DR Littman (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139(3): 485-498
31. Ivanov, II, L Frutos Rde, N Manel, K Yoshinaga, DB Rifkin, RB Sartor, BB Finlay and DR Littman (2008) Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4(4): 337-349
  32. Jaeger K, M Linek, HT Power, SV Bettenay, S Zabel, RA Rosychuk and RS Mueller (2010) Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet Dermatol* 21(1): 118-122
  33. Johnson MA and AW Armstrong (2013) Clinical and histologic diagnostic guidelines for psoriasis: a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol* 44(2): 166-172
  34. Johnson-Huang LM, M Suarez-Farinas, KC Pierson, J Fuentes-Duculan, I Cueto, T Lentini, M Sullivan-Whalen, P Gilleaudeau, JG Krueger, AS Haider and MA Lowes (2012) A single intradermal injection of IFN-gamma induces an inflammatory state in both non-lesional psoriatic and healthy skin. *J Invest Dermatol* 132(4): 1177-1187
  35. Koks S, K Kingo, K Vabrit, R Ratsep, M Karelson, H Silm and E Vasar (2005) Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes Immun* 6(5): 407-415
  36. Kol A, NJ Walker, M Nordstrom and DL Borjesson (2016) Th17 Pathway As a Target for Multipotent Stromal Cell Therapy in Dogs: Implications for Translational Research. *PLoS One* 11(2): e0148568
  37. Kurashima K, M Fujimura, S Myou, K Kasahara, H Tachibana, N Amemiya, Y Ishiura, N Onai, K Matsushima and S Nakao (2001) Effects of oral steroids on

- blood CXCR3<sup>+</sup> and CCR4<sup>+</sup> T cells in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164(5): 754-758
38. Li Q, S Ding, YM Wang, X Xu, Z Shen, R Fu, M Liu, C Hu, C Zhang, Q Cao and Y Wang (2017) Age-associated alteration in Th17 cell response is related to endothelial cell senescence and atherosclerotic cerebral infarction. *Am J Transl Res* 9(11): 5160-5168
  39. Liang SC, XY Tan, DP Luxenberg, R Karim, K Dunussi-Joannopoulos, M Collins and LA Fouser (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203(10): 2271-2279
  40. Lowes MA, AM Bowcock and JG Krueger (2007) Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445(7130): 866-873
  41. Lowes MA, T Kikuchi, J Fuentes-Duculan, I Cardinale, LC Zaba, AS Haider, EP Bowman and JG Krueger (2008) Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 128(5): 1207-1211
  42. Lowes MA, CB Russell, DA Martin, JE Towne and JG Krueger (2013) The IL-23/Th17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. *Trends Immunol* 34(4): 174-181
  43. Lowes MA, M Suarez-Farinas and JG Krueger (2014) Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 32: 227-255
  44. Mabuchi T, TW Chang, S Quinter and ST Hwang (2012) Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *J Dermatol Sci* 65(1): 4-11
  45. Maddur MS, P Miossec, SV Kaveri and J Bayry (2012) Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 181(1): 8-18

46. Marsella R, CA Sousa, AJ Gonzales and VA Fadok (2012) Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 241(2): 194-207
47. Mauldin EA, KM Credille, RW Dunstan and ML Casal (2008) The clinical and morphologic features of nonepidermolytic ichthyosis in the golden retriever. *Vet Pathol* 45(2): 174-180
48. Miller WH, CE Griffin, KL Campbell, GH Muller and DW Scott (2013) *Muller & Kirk's small animal dermatology*. St. Louis, Mo., Elsevier.
49. Moreira ML, EM Dorneles, RP Soares, CP Magalhaes, C Costa-Pereira, AP Lage, A Teixeira-Carvalho, OA Martins-Filho and MS Araujo (2015) Cross-reactivity of commercially available anti-human monoclonal antibodies with canine cytokines: establishment of a reliable panel to detect the functional profile of peripheral blood lymphocytes by intracytoplasmic staining. *Acta Vet Scand* 57: 51
50. Negre A, E Bensignor and J Guillot (2009) Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Vet Dermatol* 20(1): 1-12
51. Nestle FO, DH Kaplan and J Barker (2009) Psoriasis. *N Engl J Med* 361(5): 496-509
52. Nett CS, I Reichler, P Grest, B Hauser and CE Reusch (2001) Epidermal dysplasia and *Malassezia* infection in two West Highland White Terrier siblings: an inherited skin disorder or reaction to severe *Malassezia* infection? *Vet Dermatol* 12(5): 285-290
53. Nograles KE, LC Zaba, E Guttman-Yassky, J Fuentes-Duculan, M Suarez-Farinas, I Cardinale, A Khatcherian, J Gonzalez, KC Pierson, TR White,



- C Pensabene, I Coats, I Novitskaya, MA Lowes and JG Krueger (2008) Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 159(5): 1092-1102
54. Ohta H, K Takada, S Torisu, M Yuki, Y Tamura, N Yokoyama, T Osuga, SY Lim, M Murakami, N Sasaki, K Nakamura, M Yamasaki and M Takiguchi (2013) Expression of CD4+ T cell cytokine genes in the colorectal mucosa of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds. *Vet Immunol Immunopathol* 155(4): 259-263
  55. Olivry T, DK Naydan and PF Moore (1997) Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol* 19(5): 477-486
  56. Palmer DB (2013) The effect of age on thymic function. *Front Immunol* 4: 316
  57. Palomino DC and LC Marti (2015) Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 13(3): 469-473
  58. Picco F, E Zini, C Nett, C Naegeli, B Bigler, S Rüfenacht, P Roosje, MER Gutzwiller, S Wilhelm, J Pfister, E Meng and C Favrot (2008) A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary Dermatology* 19(3): 150-155
  59. Pignatti P, G Brunetti, D Moretto, MR Yacoub, M Fiori, B Balbi, A Balestrino, G Cervio, S Nava and G Moscato (2006) Role of the chemokine receptors CXCR3 and CCR4 in human pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 173(3): 310-317
  60. Raphael I, S Nalawade, TN Eagar and TG Forsthuber (2015) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74(1): 5-17

61. Raychaudhuri SK and SP Raychaudhuri (2010) Scid mouse model of psoriasis: a unique tool for drug development of autoreactive T-cell and th-17 cell-mediated autoimmune diseases. *Indian J Dermatol* 55(2): 157-160
62. Ritt M, B Lindborg, T O'Brien, J Bisignano and J Modiano (2015) Stimulation with Concanavalin-A Induces IL-17 Production by Canine Peripheral T Cells. *Veterinary Sciences* 2(2): 43-51
63. Rojko JL, EA Hoover and SL Martin (1978) Histologic interpretation of cutaneous biopsies from dogs with dermatologic disorders. *Vet Pathol* 15(5): 579-589
64. Ryckman C, K Vandal, P Rouleau, M Talbot and PA Tessier (2003) Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *The Journal of Immunology* 170(6): 3233-3242
65. Ryckman C, K Vandal, P Rouleau, M Talbot and PA Tessier (2003) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 170(6): 3233-3242
66. Sa SM, PA Valdez, J Wu, K Jung, F Zhong, L Hall, I Kasman, J Winer, Z Modrusan, DM Danilenko and W Ouyang (2007) The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 178(4): 2229-2240
67. Sabat R and K Wolk (2011) Research in practice: IL-22 and IL-20: significance for epithelial homeostasis and psoriasis pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges* 9(7): 518-523
68. Sakai A, Y Sugawara, T Kuroishi, T Sasano and S Sugawara (2008)

- Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol* 181(4): 2898-2906
69. Sano S, KS Chan, S Carbajal, J Clifford, M Peavey, K Kiguchi, S Itami, BJ Nickoloff and J DiGiovanni (2005) Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 11(1): 43-49
  70. Schutyser E, S Struyf and J Van Damme (2003) The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(5): 409-426
  71. Simpson A, S Maeda and R Marsella (2009) Temporal dynamic changes of phenotypic expression of peripheral CD4 cells during environmental allergen challenge in an experimental model of canine atopic dermatitis: a pilot study. *J Vet Med Sci* 71(9): 1177-1181
  72. Speeckaert R, J Lambert, L Grine, M Van Gele, S De Schepper and N van Geel (2016) The many faces of interleukin-17 in inflammatory skin diseases. *Br J Dermatol* 175(5): 892-901
  73. Sudzius G, D Mieliauskaite, A Siaurys, R Viliene, I Butrimiene, D Characiejus and I Dumalakiene (2015) Distribution of Peripheral Lymphocyte Populations in Primary Sjogren's Syndrome Patients. *J Immunol Res* 2015: 854706
  74. Sundrud MS and C Trivigno (2013) Identity crisis of Th17 cells: Many forms, many functions, many questions. *Seminars in Immunology* 25(4): 263-272
  75. Terada Y, M Nagata, N Murayama, H Nanko and M Furue (2011) Clinical comparison of human and canine atopic dermatitis using human diagnostic criteria (Japanese Dermatological Association, 2009): proposal of provisional

- diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *J Dermatol* 38(8): 784-790
76. Teunissen MB, CW Koomen, R de Waal Malefyt, EA Wierenga and JD Bos (1998) Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111(4): 645-649
  77. Thelma LG, JI Peter, JW Emily and KA Verena (2005) *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*, Blackwell Science Ltd.
  78. Tony B, B Stephen, C Neil and G Christopher (2004) *Rook's Textbook of Dermatology*, Blackwell Science Ltd.
  79. Vahlquist A, J Fischer and H Torma (2018) Inherited Nonsyndromic Ichthyoses: An Update on Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. *Am J Clin Dermatol* 19(1): 51-66
  80. Veldhoen M (2017) Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol* 18(6): 612-621
  81. Wilson NJ, K Boniface, JR Chan, BS McKenzie, WM Blumenschein, JD Mattson, B Basham, K Smith, T Chen, F Morel, JC Lecron, RA Kastelein, DJ Cua, TK McClanahan, EP Bowman and R de Waal Malefyt (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8(9): 950-957
  82. Wolk K, S Kunz, E Witte, M Friedrich, K Asadullah and R Sabat (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21(2): 241-254
  83. Wolk K, E Witte, E Wallace, WD Docke, S Kunz, K Asadullah, HD Volk, W Sterry and R Sabat (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 36(5): 1309-1323

84. Wright JF, Y Guo, A Quazi, DP Luxenberg, F Bennett, JF Ross, Y Qiu, MJ Whitters, KN Tomkinson, K Dunussi-Joannopoulos, BM Carreno, M Collins and NM Wolfman (2007) Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Biol Chem* 282(18): 13447-13455
85. Yasuda N, K Masuda and S Maeda (2008) CC chemokine receptor 4-positive CD4(+) lymphocytes in peripheral blood increases during maturation in healthy beagles. *J Vet Med Sci* 70(9): 989-992
86. Yin L, Y Hu, J Xu, J Guo, J Tu and Z Yin (2017) Ultraviolet B Inhibits IL-17A/TNF-alpha-Stimulated Activation of Human Dermal Fibroblasts by Decreasing the Expression of IL-17RA and IL-17RC on Fibroblasts. *Front Immunol* 8: 91
87. Yosipovitch G, A Goon, J Wee, YH Chan and CL Goh (2000) The prevalence and clinical characteristics of pruritus among patients with extensive psoriasis. *Br J Dermatol* 143(5): 969-973
88. Zeichner JA and A Armstrong (2016) The Role of IL-17 in the Pathogenesis and Treatment of Psoriasis. *J Clin Aesthet Dermatol* 9(6 Suppl 1): S3-S6
89. Zheng Y, DM Danilenko, P Valdez, I Kasman, J Eastham-Anderson, J Wu and W Ouyang (2007) Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445(7128): 648-651
90. Zhu J and WE Paul (2010) Peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 238(1): 247-262
91. Zur G, PJ Ihrke, SD White and PH Kass (2002) Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol* 13(2): 89-102

