

氏名(本籍)	峰 重 隆 幸 (山口県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第 145 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	The Study on the Involvement of Periostin in the Pathophysiology of Atopic Canine Skin イヌのアトピーの皮膚におけるペリオスチンの病態への関与に関する研究
論文審査委員	(主査) 代 田 欣 二 (副査) 久 末 正 晴 上 家 潤 一

論 文 内 容 の 要 旨

アトピー性皮膚炎 (AD) は、ヒトや動物で発症する慢性アレルギー性掻痒性の皮膚疾患で、Th2 型免疫反応の増強や皮膚バリアの破綻を特徴とする。AD は一度発症するとアレルゲンの侵入がなくても炎症が持続・慢性化するが、この慢性化機序の詳細は不明であり、このメカニズムの解明は AD の根本的治療法開発のために重要である。

イヌの AD (cAD) は高い罹患率 (10-15%) を示し、激しい掻痒による生活の質 (QOL) の低下を引き起こすことから小動物临床上重要な疾患である。また、cAD はヒトの AD (hAD) と発症時期、病変分布および Th2 を主体とする免疫病態などの点で類似し、またイヌはヒトと生活環境を共にすることから、cAD はマウスモデルでは成しえない自然発症の hAD モデルとしても有用性が示されている。

ペリオスチン (PO) は細胞外マトリックスの一種である。PO は TGF- β や IL-13 により誘導され、細胞表面上の $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンに結合し、組織の発生、増殖および再構成に関与することが知られている。また、PO は細胞増殖やサイトカイン誘導を介してアレルギー性炎症の慢性化機序に関与していることが示唆されており、実験的には PO 欠損マウスは野生型と比較し AD や喘息といったアレルギー性の病態が軽減することが報告されている。これらは AD や喘息において PO を軸とした負の連鎖が皮膚の炎症の慢性化に大きく関わっている可能性を示唆している。しかしながら、自然発症 AD 症例においては、hAD 患者の皮膚組織を用いた PO 免疫染色と血清 PO 測定が PO と AD 慢性化に関する数少ない先行研究であり、cAD の病態における PO の関与については不明である。

そこで本研究では、PO に着目して cAD の慢性化機序を解明することを目的とし、第 1 章では健康犬および cAD を含めた皮膚疾患罹患犬の皮膚における PO のタンパク質の発現解析と PO 産生細胞の

同定を実施し、第2章ではcAD皮膚組織とイヌの培養細胞を用いてcADにおけるPO誘導因子をIL-13とTGF- β 1に着目して検索した。また、POの機能的役割について、特にケラチノサイトに対する細胞増殖およびサイトカイン産生誘導性に着目して解析した。

第1章：健常犬およびcADを含む皮膚疾患犬におけるPO発現解析

当研究室で病理検査を実施したイヌの皮膚疾患生検47例（cAD 9例、他の慢性皮膚炎32例、急性皮膚炎2例、非炎症性皮膚疾患4例）、並びに比較対象として健常犬5例について検索した。

1-1. 健常犬におけるPO発現解析

健常犬皮膚のPO発現パターンは、これまでの正常マウスやヒトの報告と類似していた。すなわち、免疫染色でPOタンパク質は表皮真皮境界部と毛包周囲に少量沈着し、*in situ*ハイブリダイゼーション法（ISH法）で、PO mRNAは表皮のケラチノサイト（角化細胞）、外毛根鞘細胞および真皮の線維芽細胞において発現しており、これらの細胞が健常犬におけるPO産生細胞と考えられた。また、健常犬皮膚組織を用いてPO遺伝子のTAクローニングを実施した。シーケンス解析の結果、predictedイヌPO mRNA（Accession number XM_003433308）との相同性が100%、predictedヒトPO mRNA（Accession number XM_005266231.2）との相同性が約92%であった（DDBJ accession number LC008358）。

1-2. cADを含む皮膚疾患罹患犬におけるPO発現解析

PO免疫染色の結果、慢性皮膚炎の真皮において線維化や炎症細胞浸潤などの炎症性病変部に一致してPOが強く沈着していた。例えば、POは脂腺の破壊を特徴とする脂腺炎では毛包周囲に強く沈着し、真皮深層～皮下組織での炎症を特徴とする無菌性脂肪織炎では同部位への沈着が認められた。一方、急性皮膚炎や非炎症性皮膚疾患では健常犬と比較してPOの発現上昇は認められなかった。またcADでは他の慢性皮膚炎と比較して、真皮により強いPO沈着があり、さらに真皮表皮境界部における強い沈着が特徴的であった。また、cADにおけるPO沈着量は表皮肥厚、真皮線維化およびCD3陽性細胞浸潤数の3項目において組織学的重症度と正相関が認められた。さらにISH法により、cAD病変部の真皮線維芽細胞およびケラチノサイトにPO mRNAの発現を認め、これらがcADにおける主要PO産生細胞であることを明らかにした。

以上、正常犬および皮膚疾患罹患犬の皮膚におけるPOの局在と産生細胞、並びにcADにおける特徴的な分布パターンを明らかにした。cAD罹患犬においてPOは真皮に強く発現しており、そのPO沈着パターンは既報のhADにおけるそれと類似していた。さらに、ISH法により自然発症ADの皮膚におけるPO mRNA発現を初めて明らかにした。これまで主に培養細胞を用いた先行研究から、hADにおけるPO産生細胞は線維芽細胞と考えられていたが、cAD罹患犬においてPO mRNAはケラチノ

サイトにも高発現しており、またその直下における PO 沈着が特徴的であった。これらの結果から、cAD においてはケラチノサイトが PO の主要な産生細胞の一つであり、AD 慢性化に中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

第 2 章：IL-13 の PO 誘導性および PO のケラチノサイトに対する効果に関する研究

2-1. PO 誘導因子同定

cAD の皮膚 5 検体を用いて、二重 ISH 法により PO と IL-13/TGF- β 1 mRNA 発現を評価した。全例においてケラチノサイトおよび線維芽細胞に PO mRNA 発現を認め、その近傍に IL-13 mRNA 陽性細胞の浸潤を認めた。この IL-13 mRNA 陽性細胞は真皮に浸潤する小型円形細胞であり、一部は表皮内にも浸潤していた。一方、TGF- β 1 mRNA 陽性細胞は cAD 皮膚組織中に認められなかった。

二重 ISH 法の結果から、cAD の皮膚病変における PO の誘導因子として IL-13 が想定されたため、健常犬皮膚から遊走法により採材し確立した培養線維芽細胞及びイヌケラチノサイト細胞株 (CPEK) を用い、IL-13 の PO mRNA 誘導性を評価した。Real time PCR 法により両細胞における rIL-13 (50ng/ μ L) 添加による PO mRNA 発現を評価したところ、CPEK では添加 6 および 24 時間後、培養線維芽細胞では 24 時間後に、PO mRNA の発現上昇が認められた。

2-2. PO の機能解析

PO のケラチノサイトに対する機能的役割について、特に増殖活性と遺伝子動態の変化に着目して検索した。

細胞増殖アッセイは CCK-8 (同仁化学研究所、熊本) を用いて実施し、CPEK への rPO (4 μ g/ml) 添加 24 時間後に細胞増殖活性の亢進を認めた。

DNA マイクロアレイ法は Canine (V2) Gene Expression Microarray (4x44k, two-color array)(Agilent Technologies)を用いて実施した。CPEK への rPO (4 μ g/ml) 添加により発現が増加した遺伝子を網羅的に解析し、その結果 IL-25 およびケラチノサイト分化関連タンパク質 (KDAP) を同定した(GEO Series accession number GSE77041)。マイクロアレイ法の結果を受けて、Real time PCR 法を実施したところ rPO (2 μ g/ml) 添加により、CPEK における IL-25 および KDAP mRNA 発現量は各々 36 および 2 時間で有意に上昇した。

以上より、cAD においては、炎症細胞が産生する IL-13 が引き金となりケラチノサイト及び線維芽細胞の PO 産生が亢進していることが示唆された。cAD の皮膚における IL-13 産生細胞はその形態から T 細胞、特に Th2 細胞と考えられた。IL-13 は AD モデルマウスにおける PO 誘導因子であると報告されているが、本研究では自然発症 AD の皮膚における IL-13 と PO の関連を初めて明らかにした。

IL-25 は Th2 誘導性サイトカインの一種であり、hAD 患者のケラチノサイトに高発現してフィラグリン遺伝子を減少させ、皮膚バリア機能を低下させることが知られている。本研究より、cAD におい

て IL-13 により誘導された PO がケラチノサイトに作用し、IL-25 を誘導することが示唆され、この IL-25 を介して Th2 型免疫反応増強および皮膚バリア破綻などを引き起こし、イヌ AD 皮膚病変を慢性化させていることが考えられた。

PO は細胞増殖と関連する因子であることが示唆されており、PO 欠損マウスはハウスダストマイトによるアレルギー刺激によっても表皮肥厚を呈さないことが報告されている。一方、KDAP は近年同定された分泌タンパク質であり、ヒトやイヌの慢性炎症の皮膚において高発現し、ケラチノサイトの分化に関連することが示唆されている。したがって本研究の結果から PO により誘導された KDAP が cAD の皮膚における表皮肥厚と関連している可能性が示唆された。

【総括】

本研究によりこれまで未知であった cAD の慢性化メカニズムの一端が解明された。すなわち、Th2 細胞より産生されたと考えられる IL-13 の刺激によりケラチノサイトと線維芽細胞による PO 産生が誘導され、この PO は IL-25 と KDAP という 2 つの因子を介して cAD の皮膚病変の増悪と慢性化を引き起こしているというカスケードが示唆された。

現在 AD 症例に対する治療はグルココルチコイドなどの免疫抑制剤が主体であるが、一部の hAD および cAD 症例はステロイド抵抗性を示すことが知られている。イヌは自然発症例、細胞培養、動物実験の 3 側面から AD の病態をとらえることができることから、AD 研究の発展には比較医学である獣医学が重要な役割を担うと考えられる。本研究の結果を基盤として、今後は AD モデル犬などの *in vivo* 実験系に発展させていくことで、PO や PO 関連分子として同定した IL-13 および IL-25 を標的とした AD の新規治療法の開発が期待できると考えられた。

第一章および第二章の一部は、以下の論文に公表した。

Mineshige T, Kamiie J, Sugahara G, Yasuno K, Aihara N, Kawarai S, Yamagishi K, Shirota M, Shirota K.: Expression of Periostin in Normal, Atopic, and Nonatopic Chronically Inflamed Canine Skin. *Veterinary Pathology*. 52: 1118-26. 2015.

論文審査の結果の要旨

アトピー性皮膚炎 (AD) は、ヒトや動物で発症する慢性アレルギー性掻痒性の皮膚疾患で、Th2 型免疫反応の増強や皮膚バリアの破綻を特徴とする。AD は一度発症するとアレルゲンの侵入がなくても炎症が持続・慢性化するが、この慢性化機序の詳細は不明であり、このメカニズムの解明は AD の新規治療法開発のために重要である。いっぽう、イヌの AD (cAD) は小動物臨床上重要な疾患であるが、ヒトの AD (hAD) と発症時期、病変分布および Th2 を主体とする免疫病態などの点で類似し、またイヌはヒトと生活環境を共にすることから、cAD は自然発症の hAD モデルとしても有用性が示されている。

ペリオスチン (PO) は細胞外マトリックスの一種であり、細胞表面上のインテグリンに結合し、組織の発生、増殖および再構成に関与することが知られているが、細胞増殖やサイトカイン誘導を介してアレルギー性炎症の慢性化機序に関与していることが示唆されている。すなわち、PO 欠損マウスでは実験的 AD や喘息といったアレルギー性の病態が軽減することが報告されており、これらは AD や喘息において、PO を軸とした負の連鎖が皮膚や気道の炎症の慢性化に大きく係わっている可能性を示唆している。しかしながら、現在までに PO と AD 慢性化に関する研究は少なく、cAD の病態における PO の関与については不明である。

そこで本研究では、PO に着目して cAD の慢性化機序の一端を解明することを目的とし、健常犬および cAD を含めた皮膚疾患罹患犬の皮膚における PO のタンパク質の発現解析と PO 産生細胞の同定を実施し、さらに cAD 皮膚組織とイヌの培養細胞を用い、cAD における PO 誘導因子の検討や PO のケラチノサイトに対する細胞増殖およびサイトカイン産生誘導性について解析している。

第 1 章では健常犬および cAD を含む皮膚疾患犬 47 例における PO 発現解析を行い、健常犬皮膚での PO 発現パターンは、これまでの正常マウスやヒトの報告と類似し、PO タンパク質は表皮真皮境界部と毛包周囲に少量沈着していること、*in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH 法) により、PO mRNA が表皮のケラチノサイト (角化細胞)、外毛根鞘細胞および真皮の線維芽細胞において発現しており、これらの細胞が健常犬における PO 産生細胞であることを初めて示した。また、健常犬皮膚組織を用いて PO 遺伝子のクローニングを実施し、シーケンス解析の結果、predicted イヌ PO mRNA との相同性が 100%、predicted ヒト PO mRNA との相同性が約 92%である事を示した。さらに、cAD を含む皮膚疾患罹患犬における PO 発現解析を行い、慢性皮膚炎の真皮において線維化や炎症細胞浸潤などの炎症性病変部に一致して PO が強く沈着しているが、急性皮膚炎や非炎症性皮膚疾患では健常犬と比較して PO の発現上昇は認められないこと、cAD では他の慢性皮膚炎と比較して、真皮により強い PO 沈着があり、さらに真皮表皮境界部における強い沈着が特徴的である事を示した。また、cAD では PO 沈着量が表皮肥厚、真皮線維化および CD3 陽性細胞浸潤数の 3 項目において病理組織学的重症度と正相関することを明らかにした。さらに ISH 法により、cAD 病変部の真皮線維芽細胞およびケラチノサイトに PO mRNA の発現を認め、自然発症 AD の皮膚における PO mRNA 発現を初めて明らかにした。また、これまでの先行研究から、hAD における PO 産生細胞は線維芽細胞と考えられていたが、本研究によって、cAD においてはケラチノサイトが PO の主要な産生細胞の一つであり、PO が AD 慢性化に中心的な役割を果たしている可能性を示した。

第 2 章では IL-13 の PO 誘導性および PO のケラチノサイトに対する影響に関する検討を行った。すなわち、cAD の皮膚 5 検体を用いて、二重 ISH 法により PO と IL-13/TGF- β 1 mRNA 発現細胞を観察し、全例においてケラチノサイトおよび線維芽細胞に PO mRNA 発現を、また、それらの近傍に IL-13 mRNA 陽性細胞が存在する事を明らかにした。いっぽう、TGF- β 1 mRNA 陽性細胞は cAD 皮膚組織中に認められなかった。これらの結果から、cAD の皮膚病変における PO の誘導因子として IL-13 が想定されたため、健常犬皮膚から確立した培養線維芽細胞及びイヌケラチノサイト細胞株

(CPEK) を用い、IL-13 がこれらの細胞に対して PO mRNA の発現上昇を誘導する事を明らかにした。さらに PO のケラチノサイトに対する機能的役割について解析したところ PO が CPEK の細胞増殖活性亢進を誘導する事を示した。また、PO の CPEK への影響を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析し、遺伝子発現が上昇するものとして IL-25 およびケラチノサイト分化関連タンパク質 (KDAP) を同定し、Real time PCR 法でもこの結果を再確認した。

以上、著者は *in vivo* および *in vitro* の研究によって、これまで未知であった cAD の慢性化メカニズムについて、Th2 細胞より産生されると考えられる IL-13 の刺激によりケラチノサイトと線維芽細胞による PO 産生が誘導され、この PO がケラチノサイトからの IL-25 と KDAP という 2 つの因子を介して cAD の皮膚病変の増悪と慢性化を引き起こしているというカスケードを提唱した。本研究は、cAD における PO の役割りを始めて示した研究で、PO を中心とした cAD の慢性化メカニズムにおいて役割りを演ずる PO や IL-13 や IL-25 といった PO 関連分子を標的とした AD の新規治療戦略の開発に貴重な知見を提供するものであり、博士 (獣医学) の学位を授与するのに値する業績と判定した。