

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏 名 前田 貞俊

指導教官名 辻本 元

論文題目 **Studies on pathophysiological roles of chemokine in canine allergic diseases**
(イヌのアレルギー性疾患の病態におけるケモカインに関する研究)

伴侶動物において、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などのアレルギー性疾患の症例は、ヒトと同様、近年増加の一途をたどっている。しかしながら、臨床現場において行われている治療は、ほとんどの場合副腎皮質ステロイド剤等を用いた対症療法に限られており、その病態解析に基づいた根治的治療が望まれている。アレルギー性疾患における唯一の根治療法として、古くから減感作療法が用いられているが、その作用機序が未だ明確でないこと、治療によって誘発されるアナフィラキシーの危険があること、また治療に要する労力と時間がかかることが問題となっている。最近の研究から、炎症性ケモカインがアトピー性皮膚炎や気管支喘息等のアレルギー性疾患の病態においてきわめて重要な役割を担っていることが明らかになってきた。とくに、Th2 型リンパ球に発現している CC chemokine receptor 4 (CCR4) とその特異的リガンドである Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) を介して誘導されるケモタキシスはアレルギー反応の初期における Th2 型リンパ球の遊走を引き起こす主要な機構であることが示唆されている。実際に、ヒトのアレルギー病変部においては、TARC の発現の増強が認められており、同時に病変部に多数の Th2 型リンパ球の浸潤が示されている。さらに、ケモカインに対する中和抗体が急性肝障害や喘息などの疾患モデルマウスにおいて治療効果を有することが示されており、ケモカインによって誘導されるリンパ球や好酸球などの遊走活性を制御する治療法がアレルギー性疾患における新しい治療法として注目されている。そこで本研究においては、イヌのアレルギー性疾患においてケモカインを標的分子として用いた新規診断法および治療法を開発するための基礎的知見を得るため、アトピー性皮膚炎の病態におけるケモカインの関与に関する一連の検討を行った。

第1章 イヌの **Thymus and Activation-Regulated Chemokine (TARC)** 遺伝子のクローニングおよびそのアトピー性皮膚炎病変部における発現

イヌの胸腺から reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法および 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によってイヌの TARC cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定した。クローニングしたイヌの TARC cDNA は、99 残基のアミノ酸をコードしており、CC chemokine に特徴的な 4 つのシステイン残基を含んでいた。TARC cDNA は、ヒト、マウス、ラットのそれらとアミノ酸レベルでそれぞれ 77.5%、67.4%、68.5% の相同性を示した。TARC mRNA の発現は、イヌの各種組織のうち、胸腺ばかりではなく、脾臓、リンパ節、肺および心臓にも認められた。さらに、TARC mRNA は、イヌのアトピー性皮膚炎病変部において選択的に発現しており、これらイヌの非病変部および健常なイヌの正常皮膚においては検出されなかった。また、アトピー性皮膚炎病変部における炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-4、TNF- α および IFN- γ) の mRNA 発現量を real-time sequence detection system を用いて定量した。その結果、病変部における IL-1 β 、TNF- α および IFN- γ mRNA の発現量は、その非病変部および正常なイヌの皮膚における発現量よりも有意に高いことが示されたが、IL-4 mRNA に関してはすべての皮膚において発現は認められなかった。このことから、イヌのアトピー性皮膚炎の病変部においては、TARC mRNA が選択的に発現しており、またその発現には炎症性サイトカインが関与している可能性が示された。

第2章 イヌの **CC chemokine receptor 4 (CCR4)** 遺伝子のクローニングおよびそのアトピー性皮膚炎病変部における発現

イヌの胸腺から RT-PCR 法および RACE 法によってイヌの CCR4 cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定した。クローニングしたイヌの CCR4 cDNA は、360 残基のアミノ酸をコードしており、3 つの N 型糖鎖付加部位を有していた。イヌ CCR4 cDNA は、ヒト、マウス、モルモットのそれらとアミノ酸レベルでそれぞれ 91.9%、85.3%、84.5% の高い相同性を示した。CCR4 mRNA の発現は、イヌの各種組織のうち、胸腺、脾臓、心臓、小腸およびリンパ節において認められた。さらに、イヌのアトピー性皮膚炎においては、その病変部において CCR4 mRNA が TARC mRNA とともに選択的に発現しており、これらイヌの非病変部および健常なイヌの正常皮膚においては CCR4 mRNA の発現は認められなかった。このことから、アトピー性皮膚炎病変部においては、TARC によって誘引された CCR4 陽性細胞が浸潤していることが示唆された。

第 3 章 アトピー性皮膚炎症例および実験的スギ花粉抗原感作犬の末梢血 CD4 陽性細胞における CCR4 陽性細胞の増加

アトピー性皮膚炎に罹患したイヌおよび実験的スギ花粉抗原感作を行ったイヌの末梢血 CD4 陽性細胞における CCR4 陽性細胞数の変化について検討した。まず、イヌ CCR4 mRNA を発現しているイヌリンパ系細胞株 (CL-1) および発現していないイヌリンパ系細胞株 (GL-1) を用い、イヌ CCR4 に対する抗ヒト CCR4 モノクローナル抗体の交差反応性を検討した。フローサイトメーターを用いた検討の結果、本抗体は、イヌ CCR4 に対する交差反応性を有することが明らかとなった。次に本抗体を用い、アトピー性皮膚炎に罹患したイヌの末梢血 CD4 陽性細胞における CCR4 陽性細胞の割合 (CCR4/CD4 比) をフローサイトメーターを用いて算出し、正常なイヌにおける CCR4/CD4 比と比較した。その結果、アトピー性皮膚炎に罹患したイヌの末梢血における CCR4/CD4 比は正常なイヌにおけるものよりも有意に高いことが明らかとなった。次に、実験用のイヌにスギ花粉抗原とアラムを皮下注射することによって作出したスギ花粉実験感作犬において、感作前および感作後の CCR4/CD4 比の変動について検討した。その結果、感作後における CCR4/CD4 比は感作前のものに比べて有意に高いことが明らかとなった。以上の結果から、イヌのアレルギー反応においては、ヒト同様に、末梢血 CD4 陽性細胞における CCR4 陽性細胞数が増加していることが明らかとなり、CCR4/CD4 比が全身的なアレルギー反応を反映していることが示唆された。

第 4 章 抗イヌ TARC モノクローナル抗体の作成およびそれを用いたイヌのアトピー性皮膚炎病変部における TARC タンパクの発現解析

アトピー性皮膚炎におけるケモカインの関与をさらに明らかにする目的で、イヌ TARC に対するモノクローナル抗体を作成し、イヌのアトピー性皮膚炎病変部における TARC 産生細胞の同定を行った。まず、TARC 成熟タンパクをコードする cDNA を大腸菌発現ベクターに挿入し、リコンビナントイヌ TARC を発現させ、精製した。その結果、分子量約 10 kDa のタンパクが得られた。得られたタンパクの生物活性を CCR4 発現細胞株であるヒトリンパ系細胞株 (Hut 102) およびイヌリンパ系細胞株 (CL-1) を用いたケモタキシスアッセイによって評価した。その結果、今回作成したリコンビナントイヌ TARC は Hut 102 および CL-1 細胞に対して高い遊走活性を示したが、CCR4 非発現細胞株であるイヌリンパ系細胞株 (GL-1) に対しては遊走活性を示さなかった。作成したリコンビナントイヌ TARC をマウスに免疫し、イヌ TARC に対するモノクローナル抗体の作成を行った。得られたモノクローナル抗体は、ELISA において 0.12-7.5 $\mu\text{g/ml}$ のリコンビナントイヌ TARC を検出し得ることが明らかとなった。次いで、本抗体が細胞に発現しているイヌ TARC と反応することを確認するため、TARC mRNA の発現細胞株である CL-1 および非発現細胞株である GL-1 を用いて検討を行った。フローサイトメーターを用いた解析

の結果、本抗体はイヌのリンパ系細胞株に発現している TARC を特異的に認識することが明らかとなった。さらに、アトピー性皮膚炎病変部から生検によって得た皮膚凍結切片において、抗イヌ TARC モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色を行ったところ、表皮ケラチノサイトの細胞質内における TARC タンパクの発現が示された。一方、健常なイヌから採取した皮膚組織においては、TARC タンパクの発現は認められなかった。このことから、イヌのアトピー性皮膚炎においては、病変部皮膚のケラチノサイトで産生された TARC が CCR4 陽性細胞の病変局所への選択的遊走に重要な役割を担っていることが示された。

本研究における成果はイヌのアトピー性皮膚炎の病態におけるケモカインの関与を明らかにしたものである。これまでの報告では、イヌのアトピー性皮膚炎の病変部における CD4 陽性細胞の浸潤および IL-4 の発現亢進が示されており、Th2 型の免疫反応がその病態に関与している可能性が示唆されていた。本研究においては、Th2 型ケモカインである TARC およびそのレセプターである CCR4 のアトピー性皮膚炎病変部における選択的発現を明らかにしたが、このことはこれまでの知見を支持するものであり、イヌのアトピー性皮膚炎の病変局所においてはヒト同様に Th2 型の免疫反応が優位であることを特徴づける結果であるものと考えられる。

今回の研究結果から、アトピー性皮膚炎に罹患したイヌおよび実験的スギ花粉感作犬の末梢血 CD4 陽性細胞において CCR4 陽性細胞数が増加していることが示され、病変局所だけでなく全身的にも Th2 型の免疫反応が優位になっていることが明らかとなった。また、今回の結果はヒトのアトピー性皮膚炎患者における結果と類似していることが示され、末梢血における CCR4 発現パターンの解析がイヌのアトピー性皮膚炎における診断および病態解析に有用であることを示唆している。

今回の研究において、イヌのアトピー性皮膚炎病変部のケラチノサイトが TARC の主要産生細胞であることが明らかになったことから、病変局所で産生された TARC が末梢血中で増加した CCR4 陽性細胞の病変局所への遊走に関して重要な役割を担っているものと考えられた。また、TARC と CCR4 の相互反応によって生じる遊走を制御することにより、アトピー性皮膚炎に対する新しい治療法を開発できる可能性が示された。

本研究はこれまで不明であったイヌのアトピー性皮膚炎におけるアレルギー反応の免疫学的背景に関する知見を提供するものである。また、本研究の成果は、イヌのアトピー性皮膚炎の発症機序の解明に向けての礎を築いたばかりではなく、アレルギー性疾患全般の病態解明を目指した研究に寄与するとともに、今後のアレルギー性疾患に対する新規診断法および治療法の開発に向けて、イヌのアトピー性皮膚炎がきわめて有用な疾患モデル系であることを示唆するものである。