

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 前田貞俊

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の役割に関する研究)

申請者はイヌのアレルギー性疾患に対する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。

第一章ではイヌ Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) 遺伝子のクローニングを行った。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。

第二章ではイヌ CC chemokine receptor 4 (CCR4) 遺伝子のクローニングを行った。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。

第三章では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。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。

第四章ではイヌ TARC に対するモノクローナル抗体を作製し、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。モノクローナル抗体作製に先立ち、リコンビナントのイヌ TARC を大腸菌発現系で作製し、その生物活性を 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) を用いたケモキシスアッセイによって評価した。その結果、今回作製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。作製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製を行った。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。以上のことを考慮し、審査委員は申請者を博士（獣医学）の学位を受けるに必要な学識を有するものと認め、合格と判定した。