

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780321

研究課題名(和文)シグナル伝達関連分子に着目したイヌアトピー性皮膚炎の新規治療法開発に向けた研究

研究課題名(英文) Study for development of a novel therapy for canine atopic dermatitis focused on signaling proteins

研究代表者

柴田 早苗 (Shibata, Sanae)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20588917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イヌのアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発を目的として、EGFファミリーに着目した。本研究では、EGFファミリーの中でも特に、表皮において主に発現が認められるHB-EGFを中心に研究を展開した。本研究において、HB-EGF mRNAの部分的クローニングに成功した。また、イヌケラチノサイト細胞株に炎症性サイトカインを添加したところ、HB-EGF発現は変化しなかった。

研究成果の概要(英文)：We focused on EGF family in order to develop a novel therapy for canine atopic dermatitis. In this study, we studied about HB-EGF which mainly expresses in epidermis. We succeeded partial cloning of canine HB-EGF mRNA. In addition, the HB-EGF expression in canine keratinocytes cell line didn't change after stimulation with inflammatory cytokine.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：canine keratinocytes HB-EGF

1. 研究開始当初の背景

イヌの10頭に1頭が、ADに罹患しているといわれている。しかしながら、病態に基づいた信頼性の高い診断法や治療法は未だ確立していない。そのため応募者は、イヌADにおける免疫病態を解明することにより、新規治療法を確立することを最終目標としている。イヌAD病変部にはCD4+CCR4+細胞の浸潤が認められ[1, 3]、これらの細胞が病変部において炎症性サイトカインを産生することによって、アレルギー炎症が生じると考えられている。そのため、CD4+CCR4+細胞の病変部への浸潤を抑制することによって、ADの治療が可能となるものと考えられる。CD4+CCR4+細胞の選択的浸潤は、AD病変部において基底層ケラチノサイトから産生されるTARC/CCL17によって誘導されている[2]。したがって、CCL17の産生を制御することができれば、CD4+CCR4+細胞の皮膚への遊走の阻止が可能となるものと考えられる。これまでの研究から、①ハウスダストマイトが外界から表皮に侵入すると、②ケラチノサイトからTNF- α が産生され、③オートクライン機構によってケラチノサイトが活性化し、④ケモカインであるCCL17が産生され、⑤CCL17の受容体であるCCR4を発現するリンパ球が皮膚に遊走する。⑥CCR4陽性細胞からIL-4やIL-5などのTh2サイトカインが産生されると、⑦肥満細胞や好酸球が活性化され、アレルギー炎症が生じると考えられている(図1)。

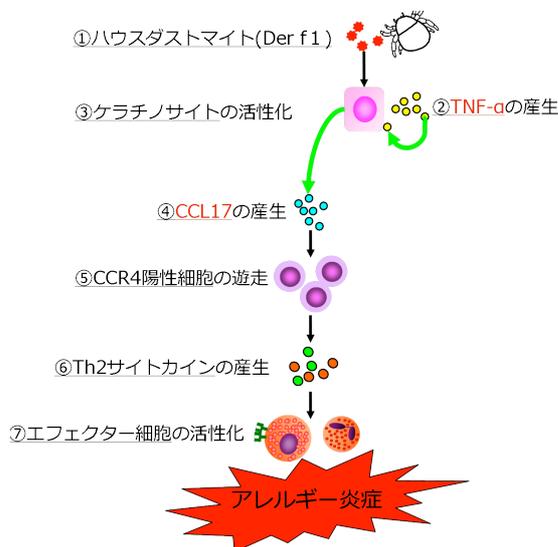


図1. アレルギー発症のメカニズム

これまでの研究から、イヌケラチノサイトにおけるCCL17転写はおもにTNF- α によって誘導され、p38によって正に、ERKによって負に調節されていることが明らかとなった。このことから、p38およびERKがイヌアトピー性皮膚炎治療のための標的分子となりうることが示唆された。具体的

には、p38阻害剤によってp38活性化を阻害あるいは、ERK活性化剤によってERK活性化を誘導することによって、ケラチノサイトからのCCL17産生を制御することができると考えた。

参考文献

1. Maeda, S., Okayama, T., Omori, K., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K. and Tsujimoto, H. 2002. Vet Immunol Immunopathol 90: 145-154.
2. Maeda, S., Tsukui, T., Saze, K., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. and Iwabuchi, S. 2005. Vet Immunol Immunopathol 103: 83-92.
3. Olivry, T., Naydan, D. K. and Moore, P. F. 1997. Am J Dermatopathol 19: 477-486.

2. 研究の目的

研究代表者は、ERK活性化剤として、EGFファミリーに着目した。EGFファミリーとしてはEGF, TGF- α , AmphiregulinおよびHB-EGFが挙げられるが、ケラチノサイトにおいて主に発現している分子はHB-EGFであるといわれている。そこで、HB-EGFを軸として、イヌアトピー性皮膚炎に対する新規治療法の確立に向けた基礎データを集積することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イヌHB-EGF mRNAのクローニング

イヌHB-EGF mRNAのクローニングを目的に、GenBankからイヌHB-EGF mRNAの予測配列であるXM_843521の塩基配列を入手し、これを基にオリゴヌクレオチドプライマーを設計した(表1)。このプライマーを用いて、イヌケラチノサイト細胞株であるCPEKから抽出したtotal RNAから逆転写して作製したcDNAから、イヌHB-EGF cDNAを増幅した。PCR条件は94°Cを2分、98°Cを10秒・62°Cを30秒・72°Cを1分として40サイクル、72°Cを8分、実施した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、検出されたバンドを切り出して精製し、シーケンサーにて塩基配列を解析した。

(2) イヌケラチノサイト細胞株CPEKにおけるHB-EGF発現

CPEKを80%コンフルエントになるまでの培養し、24時間、無血清培地にて気が培養をおこなった。その後、CPEKの培養上清中に炎症性サイトカインであるTNF- α

を添加して、0, 5, 15, 30, 60, 90 分後に細胞からタンパクを抽出した。抽出したタンパクを用いて SDS-PAGE を実施後、ヒト HB-EGF 抗体を用いて、ウエスタンブロットティングをおこなった。

4. 研究成果

(1) イヌ HB-EGF mRNA のクローニング

イヌ HB-EGF mRNA の予測配列である XM_843521 は全長 987bp であり、コーディングリージョン (CDS) はそのうち 627bp と予測されている。bases というヒト HB-EGF との CDS における一致率は塩基では 89%、アミノ酸では 88% であり、相同性はそれぞれ 89%、98% であった。このことから、イヌとヒトの HB-EGF の相同性は高かった。

表 1 に示すオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、RT-PCR を実施したところ、図 2 のようなバンドが得られた。これらを切り出して精製し、ダイレクトシーケンスを実施したところ、CDS における 250bp 分の部分塩基配列を決定することができた。

表 1. イヌ HB-EGF クローニングに用いたプライマー配列

HB-EGF	forward	GGTGCCTGAAGCTCTTTCTGG
	reverse	TTCCTCCTTACTGGGTGTGG
GAPDH	forward	CTCATGACCACAGTCCATGC
	reverse	TGAGCTTGACAAAGTGGTCA

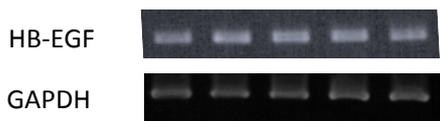


図 2. RT-PCR による HB-EGF mRNA の検出

(2) CPEK における HB-EGF 発現

CPEK における HB-EGF の経時的な発現量の変化を検討した結果、今回実施した刺激時管では、TNF- α による影響を受けないことが示された (図 3)。



図 3. HB-EGF 発現の経時的変化

本研究より、CPEK において、TNF- α による短期的な刺激では、HB-EGF の発現量は変化しないことが示された。今後、炎症性サイトカインによる長期的な刺激による

HB-EGF 発現量の変化を検討することにより、炎症状態が HB-EGF 発現に及ぼす影響を評価することができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kimura, T., Sekido, M., Iio, A., Chimura, N., Shibata, S., Kamishina, H., Kamishina, H. and Maeda, S.: Involvement of NFAT in GM-CSF production in canine keratinocytes stimulated with a cysteine protease. *Vet Dermatol.* 24(3):310-314, 2013. (査読あり) DOI: 10.1111/vde.12017
- ② Kimura, T., Sekido, M., Chimura, N., Shibata, S., Kondo, N., Kamishina, H., Kamishina, H. and Maeda, S.: Production of GM-CSF mediated by cysteine protease of Der f 1 in canine keratinocytes. *J Vet Med Sci.* 74(8): 1033-1036, 2012. (査読あり) DOI: 10.1292/jvms.11-0522
- ③ Shibata, S., Maeda, S., Kondo, N., Chimura, N., Inoue, A. and Fukata T.: Identification of the signaling pathway of TNF- α -induced CCL17/TARC transcription in a canine keratinocyte cell line. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139: 90-98, 2011. (査読あり) DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.08.008
- ④ Chimura, N., Kondo, N., Shibata, S., Kimura, T., Mori, T., Hoshino, Y., Murayama, N., Nagata, M., Ide, K., Nishifuji, K., Kamishina, H., Maeda, S.: Gene transcription analysis in lesional skin of canine epitheliotropic cutaneous lymphoma using quantitative real-time RT-PCR. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 329-336, 2011. (査読あり) DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.08.012
- ⑤ Chimura, N., Shibata, S., Kimura, T., Kondo, N., Mori, T., Hoshino, Y.,

Kamishina, H., Maeda, S.: Suitable reference genes for quantitative real-time rt-pcr in total RNA extracted from canine whole blood using the PAXgene system. J. Vet. Med. Sci. 73: 1101-1104, 2011. (査読あり) DOI: 10.1292/jvms.11-0050

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 早苗 (SHIBATA, Sanae)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：20588917