

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780330

研究課題名（和文）犬のアレルギー性皮膚炎における皮膚前駆細胞の同定と病態解析への応用

研究課題名（英文）Isolation of the skin progenitor cells in canine allergic dermatitis and their application for the pathogenesis

研究代表者

川原井 晋平（KAWARAI SHINPEI）

麻布大学・大学病院・助教

研究者番号：20533079

研究成果の概要（和文）：アレルギー性皮膚炎（AD）を自然発症する犬を対象に、AD の皮膚病変における皮膚前駆細胞の役割について基礎的研究を行った。まず、アレルギー性皮膚炎を発症した犬の病変部皮膚における CD34 陽性細胞の局在を明らかにした。これら陽性細胞の性状を *in vitro* で解析するために、犬の骨髄より CD34 陽性造血幹細胞の分離を行った。これらの成果は、アレルギー性炎症における皮膚前駆細胞の病態を解析するうえで有用である。

研究成果の概要（英文）：Role of the skin progenitor cells in the pathogenesis of allergic dermatitis (AD) was evaluated by using dogs, known to spontaneously develop the disease. We found CD34-positive skin progenitor cells were localized in the skin lesion of canine AD. An isolation method of CD34-positive hematopoietic progenitor cells was developed for the *in vitro* studies. Our results and established methods could be useful for the further research of the mechanisms of skin progenitor cells in the allergic inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産・獣医学、臨床獣医学

キーワード：皮膚前駆細胞、アレルギー性皮膚炎、犬、創傷治癒、骨髄造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我が国におけるアレルギー性皮膚炎（AD）は幼児から成人の 10% が罹患する解決すべき問題である。AD を自然発症する犬は人の動物モデルとして着目されている。小動物臨床においても AD の有病率は高く、飼い主を悩ませる問題となる。犬のアレルギー性皮膚炎の皮膚病変は、人と同様に抗原刺激と皮膚バリア機能の障害に伴うアレルギー炎症によって形成される。近年、創傷部位の皮膚再生に表皮幹細胞が関わる事が明らかにされ（Fuchs, E and Horsley, V. Gene Dev, 2008）、犬の毛包幹細胞の研究も行われている（Kobayashi T., et al. Vet Dermatol, 2009）。しかし、アレルギー炎症とこれら皮膚前駆細胞

の関係を検討した研究は少ない。

2. 研究の目的

犬のアレルギー性皮膚炎を対象に、病変部における皮膚前駆細胞（CD34 陽性細胞）の局在を明らかにすること。また、皮膚前駆細胞を *in vitro* にて解析する系を作成するため、まず CD34 陽性細胞を骨髄より分離する系を作成すること。

3. 研究の方法

1) 抗 CD34 抗体を用いた免疫染色

創傷治癒に表皮幹細胞が関わることから犬の正常皮膚と外科的創傷後 1 日目と 3 日目の治癒過程にある皮膚を用いて、CD34 陽性細胞

胞の局在を比較した。次に、アレルギー性皮膚炎に罹患した犬の病変部皮膚組織を用いて、同様に局在を調べた。

2) 犬の骨髄 CD34 陽性細胞の分離

全身麻酔下の犬から骨髄穿刺により骨髄液を採取した。骨髄液から密度勾配遠心分離法による単核球分離後、CD34 陽性造血幹細胞を、抗 CD34 抗体を用いた磁気カラム分離装置により採取した。陽性細胞の純度をフローサイトメトリーおよびサイトスピン塗抹を用いて評価した。

4. 研究成果

1) 抗 CD34 抗体を用いた免疫染色

健康犬の皮膚において CD34 は、HE 染色において血管内皮、汗腺、立毛筋、神経線維、外毛根鞘とみられる部位において陽性となり、表皮において弱陽性を示した。創傷治癒 1 日目および 3 日目の創傷部位周囲において、真皮浅層に浸潤する紡錘形～円形からなる細胞に陽性所見を認め、表皮において染色性の増強が示唆されたが、顕著となる違いは判別できなかった。アレルギー性皮膚炎病変部皮膚組織において、創傷治癒組織と同様に真皮浅層に浸潤する細胞に陽性所見を認めたが、創傷治癒組織と比べて顕著な違いを判別することはできなかった。

2) 犬の骨髄 CD34 陽性細胞の分離

骨髄液 10ml より、およそ 5×10^4 個の CD34 陽性細胞を分離した。この細胞の多くは単核の独立円形細胞であり(図 1)、フローサイトメトリーによって純度が 80% を超える細胞集団であった(図 2)。

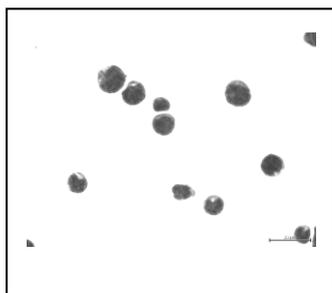


図 1 CD34 陽性細胞 (WG 染色 x1000)

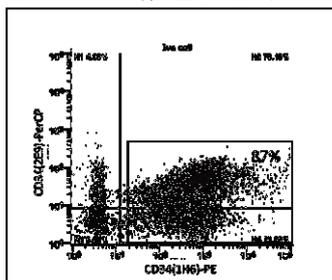


図 2 フローサイトメトリー

今回の成果をもとに、今後、真皮浅層に浸潤する CD34 陽性細胞の種類の同定および in-situ hybridization 法など、より特異性の高い方法を用いた皮膚前駆細胞の動態を解析する必要がある。本研究によって分離した骨髄由来 CD34 陽性細胞の表皮ケラチノサイトへの分化能を検討し、アレルギー炎症の皮膚前駆細胞に対する作用が解析できると考えている。

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 3 件)

(1) Maruo T, Nakamura S, Fukuyama Y, Kawarai S. Validation of New Bite-Block-Type Head-Immobilization Devices for Radiotherapy in Dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 2013 (in press) 査読あり

(2) Fujimoto A, Neo S, Ishizuka C, Kato T, Segawa K, Kawarai S, Ogihara K, Hisasue M, Tsuchiya R. Identification of Cell Surface Antigen Expression in Canine Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. 2013 (in press) 査読あり

(3) Kawarai S, Matsuura, S., Yamamoto, S., Kiuchi, A., Kanemaki, N., Madarame, H., Shiota, K. A case of cutaneous sterile pyogranuloma/granuloma syndrome in a Maltese. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2013 (in press) 査読あり.

[学会発表] (計 9 件)

① 川原井晋平. VT のための犬のアレルギー性皮膚炎をもつ飼い主さんへの豆知識. 日本臨床獣医学フォーラム九州地区大会 (招待講演). 2013 年 3 月. 福岡国際会議場 (福岡)

② 川原井晋平. 犬のアレルギー性皮膚炎の診断・治療 入門編. 第 9 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演). 2013 年 2 月. パシフィコ横浜 (神奈川)

③ 山本園子, 川原井晋平, 茅沼秀樹, 久末正晴, 土屋亮. 外因性グルココルチコイドの cortisol と甲状腺ホルモン分泌能に対する影響. 第 87 回麻布獣医学会. 2012 年 11 月. 麻布大学 (神奈川)

④ 細川聖矢, 川原井晋平, 津久井利広, 久末正晴, 印牧信行, 斑目広郎, 土屋亮, 小方宗次. 国産コナヒョウヒダニ抗原液の有用性に関する再考. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 9 月. 岩手大学 (岩手)

⑤ 佐藤穂高, 川原井晋平, 茅沼秀樹, 根尾

櫻子、伊藤哲郎、久末正晴、土屋亮. 外因性グルココルチコイドの副腎機能と甲状腺機能に対する影響（臨床と実験的検討）. 第 43 回日本比較臨床医学会. 2012 年 7 月. 専修大学（神奈川）

⑥ 印牧信行、川原井晋平、高橋弘樹、仁科有美子、市川陽一朗. 2 次元ポリアクリルミドゲル電気泳動法による犬血清中抗 β H-クリスタリン自己抗体の検出. 第 153 回獣医学会学術集会. 2012 年 3 月. 大宮ソニックシティ(埼玉)

⑦ 飯野瑞貴、西本優子、藤本あゆみ、野澤源太、川原井晋平、信田卓男、木内明男. 犬のアレルギー性皮膚炎の症状維持におけるマイクロバブルを用いたシャンプー療法の有効性の検討. 日本動物看護学会関西地区第 5 回例会. 2012 年 3 月. 大阪府立大学（大阪）

⑧ 松浦祐介、高橋亮二、川原井晋平、山口忠義、斑目広郎、代田欣二. 犬における無菌性肉芽腫性皮膚炎の一例. 関東・東京合同地区獣医師大会. 2011 年 9 月. 日本大学生物資源科学部(神奈川)

⑨ Kawarai S, Takahashi R, Madarame H, Shirota K. A case of granulomatous dermatitis in a dog. The Asian Meeting of Animal Medicine Specialties. 2011 年 5 月. IMPACT Convention Center (Thailand)

〔図書〕(計 1 件)

① 小方宗次監修, 斑目広郎, 川原井晋平, アレルギーわんこの暮らしとレシピ百科, 誠文堂新光社, 2011 年 9 月出版

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原井晋平 (KAWARAI SHINPEI)

麻布大学・大学病院・助教

研究者番号：23533079

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし