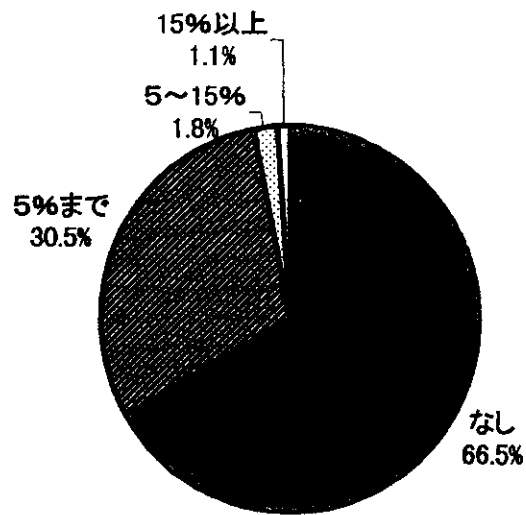


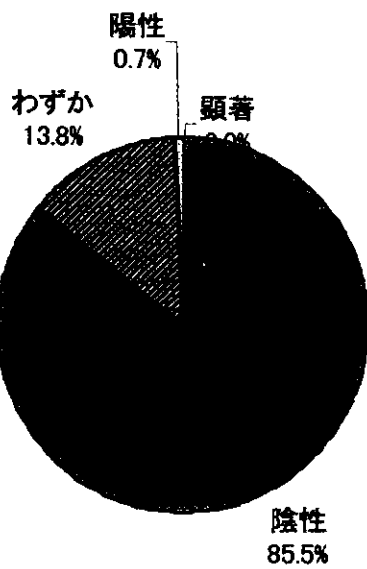
### 皮膚病変部の面積



■なし ■5%まで ■5~15% □15%以上

図 3

### ニコルスキー現象



■陰性 ■わずか □陽性 □顕著

図 4

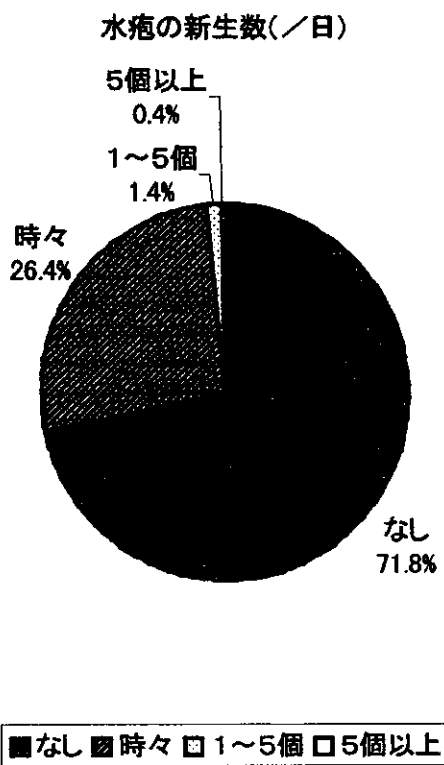


図 5

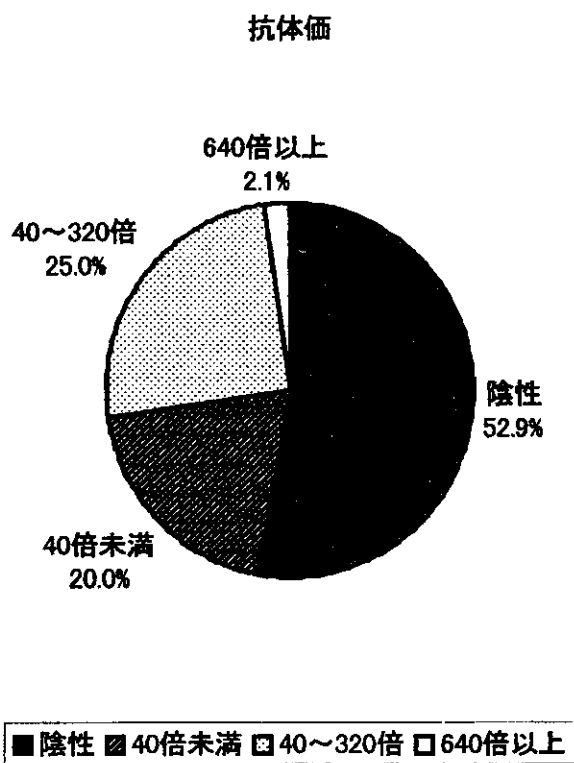


図 6

口腔粘膜疹

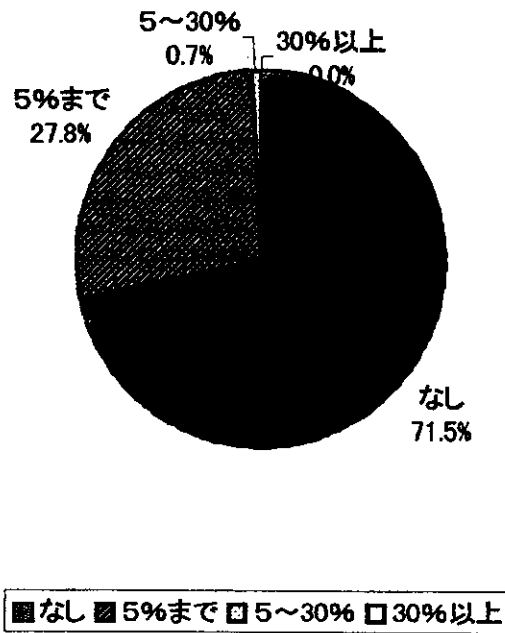


図7

寛解例の治療法

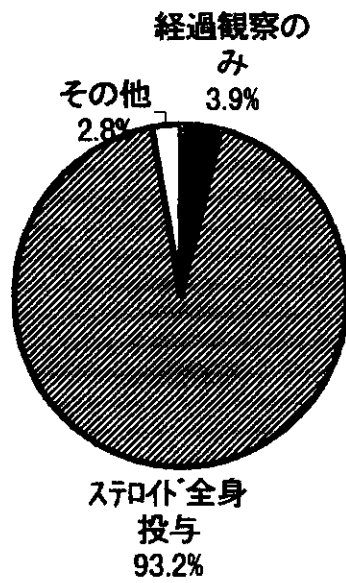


図8

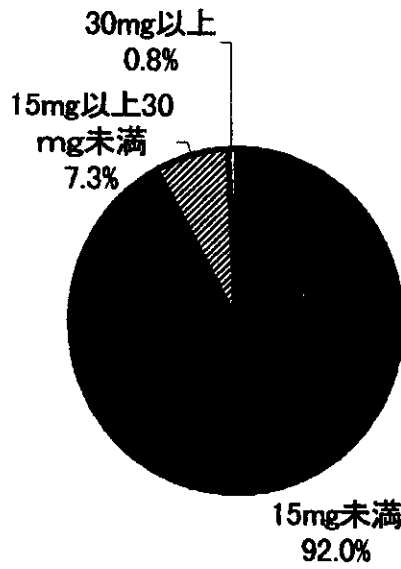
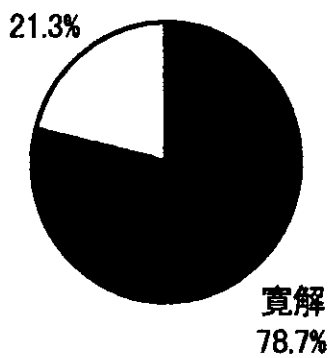


図9 ステロイド全身投与量 (PSL換算: mg/day)

調査票回答  
(対象368例)



提言に基づいた寛解症例  
(対象204例)

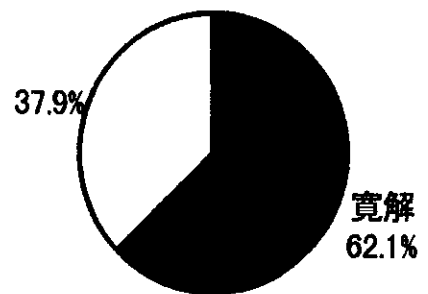


図10

(表1)

寛解とは 提言

●PSL 投与量 10mg/day 以下で  
重症度判定基準において軽症と判定され

かつ

- 1) 皮膚病変部の面積：紅斑、水疱などの active な皮疹なし
- 2) ニコルスキー現象：陰性
- 3) 水疱の新生           ：なし または 稀に少数
- 4) 抗体価                ：40～320 倍以下
- 5) 口腔粘膜疹           ：なし または 5%以下

### 3) 天疱瘡を含む各種自己免疫性水疱症の診断システムの確立

分担研究者：橋 本 隆（久留米大学皮膚科）

#### 要 約

私共は今まで天疱瘡を含む各種自己免疫性水疱症の診断に、正常のヒト皮膚切片・1M 食塩水剥離ヒト皮膚切片、ラット膀胱切片を用いた蛍光抗体間接法、Dsg1/Dsg3 のバキュロウイルス蛋白を用いた ELISA（慶応義塾大学医学部皮膚科、天谷雅行講師、西川武二教授により作成）、正常ヒト表皮抽出液・正常ヒト真皮抽出液・各種リコンビナント蛋白（BP230C 末端、BP180 NC16a）を用いた免疫ブロット法、放射線ラベル培養ケラチノサイト（ライセートならびに培養上清）を用いた免疫沈降法、免疫沈降・免疫ブロット混合法（IP-IB 法）（エンボプラキン、ペリプラキン）を用いてその抗原を解析し、診断の確定に寄与してきた。今後、さらに新しい抗原を検出し、自己免疫性水疱症の診断システムを完全なものにするために、BP180 NC16a リコンビナント蛋白を用いた ELISA、精製ラミニン5・濃縮ケラチノサイト培養上清・各種リコンビナント蛋白（BP180C 末端、エンボプラキン、ペリプラキン）を用いた免疫ブロット法、IP-IB 法（プレクチン、デスマプラキン）を開発する予定である。同時に、まだその抗原蛋白が明らかとなっていない疾患である、薬剤誘発性天疱瘡、IEN 型の IgA 天疱瘡、Sublamina densa 型の線状 IgA 水疱性皮膚症、眼型癬痕性類天疱瘡に関して、その抗原解析を行う。また、IgG 抗デスマコリン抗体が存在するか否か、腫瘍随伴性天疱瘡以外の血清におけるプレクチン、デスマプラキン、エンボプラキン、ペリプラキンに対する抗体の存在についても検討する。また、いまだその性質の明らかとなっていない 168-kDa 癬痕性類天疱瘡粘膜抗原、170-kDa 腫瘍随伴性天疱瘡抗原、200-kDa 真皮抗原について解析したい。さらに最近開発された IgA の単離手法を用いて IgA 天疱瘡の抗体を精製し、新生マウスを用いた IgA 天疱瘡の動物モデルを作成したい。

#### 過去3年間のまとめ

過去3年間に久留米大学皮膚科を受診した自己免疫性水疱症症例数は、尋常性天疱瘡 17 例、落葉状天疱瘡 12 例、水疱性類天疱瘡 76 例（60%）、癬痕性類天疱瘡 10 例、線状 IgA 水疱性皮膚症 3 例、後天性表皮水疱症 3 例、その他 5 例の合計 126 例であった。正常皮膚、1M 食塩水剥離皮膚、ラット膀胱を用いた蛍光抗体法、Dsg バキュロ蛋白を用いた ELISA、表皮抽出液、真皮抽出液、リコンビナント蛋白（BP230C 末端、BP180 NC16a）を用いた免疫ブロット法、放射線ラベル培養細胞を用いた免疫沈降法、IP-IB 法（エンボプラキン、ペリプラキン）、cDNA トランスフェクション法でその抗原を解析した。今後、自己免疫性水疱症診断システムを確立するため、BP180 リコンビナント蛋白を用いた ELISA、精製ラミニン5、ケラチノサイト濃縮培養上清、リコンビナント蛋白（BP180C 末端、エンボプラキン、ペリプラキン）を用いた免疫ブロット法、IP-IB 法（プレクチン、デスマプラキン）を開発する予定である。

#### 目 的

最近の分子生物学的手法の驚異的な進歩により、自己免疫性水疱症の研究も急速な進歩を遂げ、

天疱瘡を中心とした各種の自己免疫性水疱症の検索法に格段の進歩が見られる。これらの検索法を用いて確実な診断をつけることが、その患者の的確な治療を行うことにつながることを期待する。さらに将来的には、これらの研究が新しい治療法の進歩にも貢献することが期待される。本研究では、天疱瘡を中心とした全ての自己免疫性水疱症の新しい生化学的・分子生物学的診断法を確立することを目的とする。

## 現在の状況

### (1) デスモソーム構成蛋白の異常に基づく自己免疫性水疱症(表1)

IgG 抗表皮細胞間抗体を有する疾患としては、尋常性天疱瘡(PV)および落葉状天疱瘡(PF)がある。いずれの疾患でも生検皮膚を用いた蛍光抗体直接法で病変皮膚表皮細胞間にIgGの沈着を認め、蛍光抗体間接法で血中IgG抗表皮細胞間抗体を検出する。免疫ブロット法で、尋常性天疱瘡血清は130-kD PV抗原(desmoglein 3: Dsg3)と、落葉状天疱瘡血清は160k-D PF抗原(desmoglein 1: Dsg1)と反応する。臨床的に疱疹状皮膚炎様の症状を呈し、免疫学的に抗表皮細胞間抗体を示す疾患として疱疹状天疱瘡がある。

腫瘍随伴性天疱瘡(paraneoplastic pemphigus: PNP)は、臨床的に重篤な口腔・眼粘膜病変を呈し、血液系の悪性腫瘍を伴い、一般に予後不良である。免疫ブロット法、免疫沈降法により、この血清中のIgG抗表皮細胞間自己抗体は250-kD、230-kD、210-kD、190-kD、170-kDの蛋白群と反応する。250-kD蛋白はデスモプラキンI、230-kD蛋白はBP230、210-kD蛋白はデスモプラキンIIとエンボプラキン、190kD蛋白はペリプラキンであることが判明しているが、170kD蛋白の性質は不明である。

IgA 抗表皮細胞間抗体を有するIgA天疱瘡症例には、intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN)型とsubcorneal pustular dermatosis (SPD)型がある。SPD型のIgA天疱瘡の抗原がdesmocollin 1 (Dsc1)である。

### (2) ヘミデスモソーム構成蛋白の異常に基づく自己免疫性水疱症(表2)

水疱性類天疱瘡(BP)は、蛍光抗体法で、病変皮膚基底膜部へのIgGおよび補体成分の沈着および血中IgG抗表皮基底膜部自己抗体の存在を示す。ヒト表皮抽出液を用いた免疫ブロット法で、BP患者血清はBP230とBP180に様々なパターンで反応する。BP180のNC16a部位のリコンビナント蛋白の免疫ブロット法で、ほとんどのBP血清がこの蛋白と反応する。また、lichen planus pemphigoidesなどの報告がある。

妊娠性疱疹(HG)の血中には補体結合能の高いIgG抗表皮基底膜部抗体がある。この抗体は表皮抽出液を用いた免疫ブロット法で主としてBP180と反応する。

癬痕性類天疱瘡(CP)には多様性があり、多くの癬痕性類天疱瘡血清はIgGとIgAクラスの抗表皮基底膜部抗体を有し、免疫ブロット法でBP180と反応する。抗エピリグリン癬痕性類天疱瘡血清は1M食塩水剥離皮膚の真皮側に反応し、免疫沈降法でエピリグリンと反応する。眼症状のみを呈する癬痕性類天疱瘡は、その血清中には未知の45kD蛋白と反応するIgA抗表皮基底膜部抗体が存在する。

後天性表皮水疱症血中にIgG抗表皮基底膜部抗体を認め水疱性類天疱瘡との鑑別が問題となるが、1M食塩水剥離皮膚を基質とした蛍光抗体間接法で水疱性類天疱瘡血清が表皮側に反応するのに対して、後天性表皮水疱症血清は真皮側に反応することにより鑑別できる。また、免疫ブ

ロット法で係留線維の主成分であるⅦ型コラーゲンと反応する。著明な水疱形成を伴う水疱性 SLE の患者血清も後天性表皮水疱症と同じⅦ型コラーゲンと反応する。

線状 IgA 水疱性皮膚症には、その IgA 抗基底膜部抗体が 1M 食塩水剥離皮膚の表皮側と真皮側に反応するものが知られており、それぞれ lamina lucida 型および sublamina densa 型と呼ばれる。免疫ブロット法で、前者の血清は未知の 97kD 蛋白と反応する。また、一部の sublamina densa 型の血清には、後天性表皮水疱症と同じⅦ型コラーゲンに対する IgA 抗体が存在する。

### (3) 自己免疫性水疱症の検査法

表 3 に現在用いられる種々の自己免疫性水疱症の検索法をまとめた。これらの検索結果を総合して最終的な診断をください。特に最近、ほとんどの自己抗原の cDNA が単離され、各種の発現形を用いたリコンビナント蛋白が作成されている。このうち、実際の検索に用いられているリコンビナント蛋白を表 4 にあげる。

表 5 および表 6 に、現在私共が実際に行っている自己免疫性水疱症の診断システムをまとめた。もちろん、典型的な症例ではこれらのすべての検索を用いるまでもなく、診断は可能である。しかし、診断に困難な症例では積極的に、これらの診断技術をもつ施設に依頼して、確実な診断をすることが必要です。

### (4) 自己免疫性水疱症の診断システム

以上の自己免疫性水疱症の検査法を組み合わせることで実際の診断を行っている。その実際の診断システムを表 5、表 6 にまとめた。

## 今後の進め方

今後、さらに新しい抗原を検出し、自己免疫性水疱症の診断システムを完全なものにするために、BP180 NC16a リコンビナント蛋白を用いた ELISA、精製ラミニン 5・濃縮ケラチノサイト培養上清・各種リコンビナント蛋白 (BP180C 末端、エンボプラキン、ペリプラキン) を用いた免疫ブロット法、IP-IB 法 (プレクチン、デスモプラキン) を開発する予定である。同時に、まだその抗原蛋白が明らかとなっていない疾患である薬剤誘発性天疱瘡、IEN 型の IgA 天疱瘡、sublamina densa 型の線状 IgA 水疱性皮膚症、眼型癩痕性類天疱瘡に関して、その抗原解析を行う。また、IgG 抗デスモコリン抗体が存在するか否か、腫瘍随伴性天疱瘡以外の血清におけるプレクチン、デスモプラキン、エンボプラキン、ペリプラキンに対する抗体の存在についても検討する。また、いまだその性質の明らかとなっていない 168-kDa 癩痕性類天疱瘡粘膜抗原、170-kDa 腫瘍随伴性天疱瘡抗原、200-kDa 真皮抗原について解析したい。さらに最近開発された IgA の単離手技を用いて IgA 天疱瘡の抗体を生成し、新生マウスを用いた IgA 天疱瘡の動物モデルを作成したい。

### 参考文献

- 1) 橋本 隆：総説：水疱症—最近の知見—、日皮会誌 106：1-6, 1996.
- 2) 橋本 隆：表皮ケラチノサイトの細胞接着分子と膜裏打ち蛋白(2)：細胞接着における役割とその制御、西日



## **The establishment of a system for diagnoses of various types of pemphigus and other autoimmune bullous diseases.**

Takashi Hashimoto

Department of Dermatology, Kurume University School of Medicine

For diagnoses of various types of pemphigus and other autoimmune bullous diseases, we have used various methods, including immunofluorescence of normal human skin sections, 1M NaCl-split skin sections and rat bladder sections, ELISA of Dsg1 and Dsg3, immunoblotting of epidermal extracts, dermal extracts and recombinant proteins of BP230 C-terminal domain and BP180 NC16a domain, immunoprecipitation of radio-labeled keratinocyte lysate, and combination of immunoprecipitation and immunoblotting for envoplakin and periplakin. In the next step, to establish a complete system for the diagnoses of all the autoimmune bullous diseases, we would like to establish a ELISA of BP180 NC16a, detection of LAD1 and laminin 5 by immunoblotting of concentrated supernatant of keratinocyte cultures, immunoblotting of recombinant proteins of BP180 C-terminal domain, envoplakin and periplakin, combination method of immunoprecipitation and immunoblotting for plectin and desmoplakin. In addition, we would like to identify the autoantigens for drug-induced pemphigus, IEN type IgA pemphigus, sublamina lucida type LAD, and ocular cicatricial pemphigoid, which have not been identified yet. We would also like to examine the presence of antibodies to envoplakin and periplakin in non-PNP sera, and the presence of IgG antibodies against Dsc.

Furthermore, we may start to work in the project of identification of 168-kDa cicatricial pemphigoid antigen, 170-kDa PNP antigen and the 200-kDa dermal antigen for some BP-like cases. Finally, we would like to examine the pathogenicity of IgA anti-Dscl antibodies in SPD type IgA pemphigus using newborn mouse model.

表1 デスモソーム構成蛋白の異常に基づく自己免疫性水疱症

構成蛋白	後天性水疱症
デスモグレイン1 (Dsg1)	落葉状天疱瘡(PF) 疱疹状天疱瘡 (尋常性天疱瘡(PV)) (Paraneoplastic pemphigus) (IgA 天疱瘡)
デスモグレイン3 (Dsg3)	尋常性天疱瘡(PV) Paraneoplastic pemphigus (疱疹状天疱瘡) (IgA 天疱瘡)
デスモコリン1 170-kD PNP 抗原	(SPD型 IgA 天疱瘡) Paraneoplastic pemphigus
デスモプラキン I / II	Paraneoplastic pemphigus, 重症多形滲出性紅斑
エンボプラキン	Paraneoplastic pemphigus
ペリプラキン	Paraneoplastic pemphigus

カッコ内の疾患は不確定ないし一部の症例に陽性であることを示す。

表2 ヘミデスモソーム構成蛋白の異常に基づく自己免疫性水疱症

構成蛋白	後天性水疱症
プレクチン (HD1)	Paraneoplastic pemphigus
プレクチン様蛋白 BP230	水疱性類天疱瘡(BP) 水疱性類天疱瘡(BP) Paraneoplastic pemphigus (妊娠性疱疹) (癩痕性類天疱瘡)
BP180	水疱性類天疱瘡(BP) 妊娠性疱疹 癩痕性類天疱瘡 Lichen planus pemphigoides 線状 IgA 水疱性皮膚症 (透明層型)
$\beta$ 4 インテグリン	眼型癩痕性類天疱瘡
45-kD 蛋白	眼型癩痕性類天疱瘡
168-kD 粘膜上皮抗原	癩痕性類天疱瘡
120-kD/97kD LAD1	線状 IgA 水疱性皮膚症 (透明層型)
125-kD 蛋白	水疱性類天疱瘡 (BP)
Uncein (19-DEJ-1 抗原)	接合部型後天性表皮水疱症
ラミニン5	
$\alpha$ 3 サブユニット	抗エビリグリン癩痕性類天疱瘡
$\beta$ 3 サブユニット	抗エビリグリン癩痕性類天疱瘡
$\gamma$ 2 サブユニット	抗エビリグリン癩痕性類天疱瘡
ラミニン6	
$\alpha$ 3 サブユニット	抗エビリグリン癩痕性類天疱瘡
200kD 真皮側蛋白	乾癬に伴う水疱症 小水疱型類天疱瘡
105kD 蛋白	TEN 様水疱症 水疱性類天疱瘡 (BP)
VII型コラーゲン	後天性表皮水疱症 水疱性 SLE 線状 IgA 水疱性皮膚症 (基板下部型) (癩痕性類天疱瘡)

カッコ内の疾患は不確定ないし一部の症例に陽性であることを示す。

表 3 自己免疫性水疱症の検査

Tzanck 試験  
病理組織学検査  
蛍光抗体直接法  
蛍光抗体間接法  
正常ヒト皮膚・1M 食塩水剥離皮膚・ラット膀胱  
蛍光抗体補体法  
免疫沈降法  
免疫ブロット法  
表皮抽出液・真皮抽出液・リコンビナント蛋白  
免疫電顕  
ELISA  
cDNA トランスフェクション法  
バキュロ蛋白吸収アッセイ  
IgG affinity-purification by blotted membrane  
新生マウス動物モデル

表 4 : リコンビナント抗原蛋白

- (1) 大腸菌発現蛋白
  - ヒト BP230 C 末端部位
  - ヒト BP180 NC16a 部位
  - ヒト BP180 C 末端部位
  - ヒト VII 型コラーゲン NC1 部位
- (2) バキュロウィルス発現蛋白
  - ヒト Dsg1 細胞外部位
  - ヒト Dsg3 細胞外部位
- (3) 有核細胞発現蛋白
  - 全長ヒト Dsc1

表5 抗表皮細胞間抗体 (IC) を有する疾患の診断システム

直接法	蛍光抗体法 間接法 ヒト 皮膚	ラット 膀胱	免疫プロット法 表皮抽出液	ELISA Dsg Baculo protein	免疫沈降法	免疫電顕	診断
IgG IC	IgG IC		Dsg3/(Dsg1)	Dsg3/(Dsg1)	Dsg3/(Dsg1)/PG	DM	PV/PVeg
IgG IC	IgG IC		Dsg1	Dsg1	Dsg1/PG	DM	PF, PE, EPF
IgG IC	IgG IC	上皮 +	ENV/PER	Dsg3/(Dsg1)	DPI/DPII/ENV/ PER/170 蛋白	?	PNP
IgA IC	IgA IC		-	- (cDNA transfection method: Dscl+)	-	DM	IgA 天疱瘡 (SPD 型)
IgA IC	IgA IC		-	(Dsg1/Dsg3)	-	?	IgA 天疱瘡 (IEN 型)

IC : 表皮細胞間、PG : プラコグロビン、DM : デスモソーム、PV : 尋常性天疱瘡、PVeg : 増殖性天疱瘡、  
PF : 落葉状天疱瘡、PE : 紅斑性天疱瘡、BPF : ブラジル PF、ENV : エンボプラキン、PER : ペリプラキン、  
DP : デスマプラキン、PNP : paraneoplastic pemphigus、Dscl : デスモコリン1、  
SPD : subcorneal pustular dermatosis、IEN : intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis  
( ) 内は時に陽性所見を示す項目

表6 抗表皮基底膜部 (BMZ) 抗体を有する疾患の診断システム

直接法	蛍光抗体法 間接法 ヒト 皮膚	1M 食塩水 剥離皮膚	免疫プロット法		リコンビ ナント 蛋白	免疫沈降法	免疫電顕	診断
			表皮抽出液	真皮抽出液				
IgG BMZ	IgG BMZ	表皮側	BP230/BP180	-	BP180 NC16A	BP230 (BP180)	HD	BP/HG
IgG BMZ	IgG BMZ	真皮側	-	-		エビリグリン	LL	抗エビリグリン CP
IgG BMZ	IgG BMZ	真皮側	-	Col VII	Col VII NC1	Col VII	LD? AF	EBA/ Bullous SLE
IgG BMZ	IgG BMZ	真皮側	-	200kD		-	LL	抗 200kD 抗体
IgG BMZ/	IgG BMZ/	表皮側/	BP180	-	BP180-CT	?	LL	CP(BP180 型)
IgA BMZ	IgA BMZ	表皮側	BP180	-	BP180-CT	?		
IgA BMZ	IgA BMZ	表皮側	45kD	-		-	?	Ocular CP
IgA BMZ	IgA BMZ	表皮側	120kD/97kD	(Col VII)		-	LL	LABD(LL 型)
IgA BMZ	IgA BMZ	真皮側	-			-	(AF)	LABD(sub-LD 型)

BMZ : 表皮基底膜部、HD : ヘミデスモソーム、BP : 水疱性類天疱瘡、HG : 妊娠性疱疹、LL : lamina lucida、  
CP : 癬痕性類天疱瘡、Col VII : VII型コラーゲン、EBA : 後天性表皮水疱症、LD : lamina densa、AF : 係留線維、BP180-  
CT : BP180C 末端、LABD : 線状 IgA 水疱性皮膚症、  
( ) 内は時に陽性所見を示す項目

## 4) 腫瘍随伴性天疱瘡におけるエンボプラキンとペリプラキン 分子上のエピトープの研究

分担研究者：橋 本 隆 (久留米大学皮膚科)

共同研究者：永 田 祥 子 (久留米大学皮膚科)

### 要 約

腫瘍随伴性天疱瘡 (以下 PNP) の主要な抗原はデスモゾームないしヘミデスモゾームの細胞内接着板に存在するプラキンファミリー蛋白であることが現在までに示されている。プレクチン、デスモプラキン、BP230、エンボプラキン、ペリプラキンといったプラキンファミリーは同様な分子構造を持っており、N末端部、中心部線状部位、C末端部の3つから成り立っている。免疫ブロットにおいて、PNP 血清は中でも一番小型のエンボプラキンとペリプラキンに強く反応する。本研究では、pGEX 発現系を用いてエンボプラキンとペリプラキンの全長を含む各種リコンビナント蛋白を作製し、それぞれの分子上のエピトープを詳細に解析した。エンボプラキンに対してはN末端 (ENV-N; 907aa)、中心部 (ENV-M; 766aa)、C末端 (ENV-C; 360aa)、ペリプラキンに対してはN末端 (PPK-N; 944aa)、中心部 (PPK-M; 701aa) さらにそれぞれのC末端相同部位 (ENV-H; 111aa、PPK-H; 111aa) の蛋白を作製した。26 例の PNP のうち、19 例が ENV-N と、16 例が ENV-M と、15 例が ENV-C と反応したのに対して、16 例が PPK-N と、15 例が PPK-M と反応した。また、18 例が ENV-H に反応したのに対して、3 例のみが PPK-H と反応した。10 例の正常血清は全て陰性であった。以上より、PNP においてペリプラキンのC末端相同部位は別として、エンボプラキンとペリプラキン分子上には複数のエピトープが存在し、更に PNP においてそれぞれの蛋白に対する抗体産生機序に若干の差異が存在することが示された。

### は じ め に

腫瘍随伴性天疱瘡 (paraneoplastic pemphigus; PNP) は最近、提唱された新しい疾患概念で<sup>1)</sup>、臨床的に、主としてリンパ球系の悪性腫瘍を伴い、重篤な粘膜病変、多彩な皮膚病変を伴う疾患である。また免疫沈降法では 250kD、230kD、210kD、190kD、170kD といった複数の蛋白と反応することが報告されている。このうち 250kD、210kD 蛋白はデスモプラキン、230kD 蛋白は BP230、190kD、170kD 蛋白については明らかではなかった。これまでに我々は、ヒト表皮抽出液を用いた免疫ブロットにおいて、すべての PNP 患者血清で 210kD、190kD の 2 本のバンドが検出されることを報告し<sup>2)</sup>、その後の他の研究者によって、これら 2 つは PNP の抗原の一部とされるエンボプラキンとペリプラキンであることが判明した<sup>3)</sup>。Ruhrberg らによって、この 2 つの蛋白はデスモプラキン、BP230、プレクチンと類似の構造を持ち、プラキンファミリーの蛋白であることが明らかにされた<sup>4, 5)</sup>。以上のことから我々は、リコンビナント蛋白を使ってエンボプラキンとペリプラキンの 2 つの分子上のエピトープを更に詳細に解析し、検討した。

### 材 料 と 方 法

1) リコンビナント蛋白の作製：pGEX 発現系を用いてエンボプラキンとペリプラキンの各部

位を含む各種リコンビナント蛋白を作製した。エンボプラキンの全長を3つの部位に分けて、それぞれをN末端を ENV-N、中心部を ENV-M、C末端を ENV-C、更にC末端のなかに含まれるC末端相同部位を ENV-H とした。一方、ペリプラキンはN末端を PPK-N、中心部を PPK-M、C末端全体に相当するC末端相同部位を PPK-H とした。これらのリコンビナント蛋白とエンボプラキンとペリプラキンの関係を図1に示した。

エンボプラキンの各部位のリコンビナント蛋白を作製するために、使用したテンプレートは p210-23、p210-141、p210-21 の cDNA clones (イギリスの Watt 博士らより分与) と KU8 細胞 (SCC 細胞株) から作製した cDNA ライブラリーを使用した。ENV-N は p210-23 と p210-141 を合成したものを、ENV-M と ENV-C は p210-21 を、ENV-H は KU8 cDNA ライブラリーをテンプレートとして PCR 法で cDNA を増幅した。一方、ペリプラキンに関しては、PPK-N は p195-5 (ともに watt 博士らより分与) を、PPK-H は KU8 cDNA ライブラリーをテンプレートとして増幅した。そして以上7つの cDNA を大腸菌発現ベクターである pGEX4T-1 に挿入した。それぞれの cDNA clones をトランスフェクトした大腸菌を大量培養し、IPTG 添加により蛋白誘導を行った。これを遠心し、できた pellet を 1% Triton X-100-PBS で抽出し、この buffer に可溶性である ENV-C,H,PPK-H に関しては、上清の方をグルタチオンセファロース 4B カラムで精製した。一方、不溶性の ENV-N, M, PPK-N, M に関しては、pellet を更に 2M の Urea で抽出し、粗抗原とした。

2) 血清: 26 例の PNP 患者血清と 10 例の正常人のコントロールを使用した。

3) 免疫ブロット法: ENV-N, M, PPK-N, M の fusion protein に関しては 9% の SDS-PAGE ゲルに、ENV-C, H, PPK-H の fusion protein に関しては 12% のゲルに泳動し、それぞれニトロセルロースメンブレンに転写した。カラム精製できなかった ENV-N, M, PPK-H, M においてはバックグランド反応を減少させるため、血清を反応させる前に、その血清を室温 1 時間、大腸菌ライセートと反応させて抗大腸菌抗体を吸収し、1 次抗体として使用した。一方、ENV-C, H, PPK-H においては血清をそのまま 1 次抗体として使用した。4°C にて over night で反応させ、2 次抗体と室温 3 時間、反応させた後、4-chloro-1-naphthol で発色した。

## 結 果

エンボプラキンの免疫ブロット法の結果を図2に、ペリプラキンの免疫ブロット法の結果を図3に示し、表1に全ての結果をまとめた。

エンボプラキンに関しては、26 例の PNP のうち、19 例 (73%) が ENV-N と、16 例 (62%) が ENV-M と、15 例 (58%) が ENV-C と、そして 18 例 (69%) が ENV-H と反応する IgG 抗体を示した。11 例 (42%) の PNP 血清は4つの全部位のリコンビナント蛋白と反応した。5 例 (19%) はどのリコンビナント蛋白とも反応しなかった。そして 21 例 (81%) は、少なくとも1つの蛋白に対して反応する IgG 抗体を示した。

ペリプラキンに関しては、26 例の PNP のうち、16 例 (62%) が PPK-N と、15 例 (58%) が PPK-M と、3 例 (12%) が PPK-H と反応する IgG 抗体を示した。3 例 (12%) の PNP 血清は3つ全てのリコンビナント蛋白と反応した。6 例 (23%) はどのリコンビナント蛋白とも反応しなかった。そして 20 例 (77%) は、少なくとも1つの蛋白と反応した。

以上のように、ほとんど PNP 血清はエンボプラキンとペリプラキンの各部位に高率に反応したが、正常血清は全く陰性であった。また大多数の PNP 血清がエンボプラキンの主要なエピトー

プとされるC末端相同位部に反応したのに対してペリプラキンのC末端相同位部にはほとんど反応しなかった。

## 考 案

今回の研究において、我々はエンボプラキンとペリプラキン、それぞれの全長を含む7つの各種リコンビナント蛋白を作製し、免疫プロットを用いて、これら蛋白に対するPNP患者血清の反応を検討した。そして、大多数のPNP血清はエンボプラキンとペリプラキンの各部位に高率に(58%~73%)反応することが示された。しかしペリプラキンのC末端相同部位に関しては例外で、わずか3例(12%)のみの陽性率であった。Mahoneyら<sup>6)</sup>はPNPにおいては、すべてのプラキンファミリー蛋白のC末端相同部位が主要なエピトープであると提唱しているが、今回の結果において、少なくとも、エンボプラキンとペリプラキンに関しては複数のエピトープがあるという結果から、一致しないと思われた。また、C末端相同部位に対する反応性の極端な違いから、PNPにおいてエンボプラキンとペリプラキンに対する抗体産生機序に若干の差異が存在することが示唆された。今後、更にこれらのリコンビナント蛋白に対するPNP以外の各種自己免疫性水疱症血清の反応を検討していく。

## 参考文献

- 1) Anhalt GJ, Kim S-C, Stanley Jr, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, Izumi H, Rattie H, Mutasim D, Ariss-Abdo L, Labib RS: An Autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 323: 1729-1735, 1990
- 2) Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Chorzelski PT, Bhogal BS, Black MM, Stevens HP, Boosma DM, Korman NJ, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T: Characterization of paraneoplastic pemphigus Autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 104: 829-834, 1995
- 3) Kiyokawa C, Ruhrberg C, Karashima T, Mori O, Nishikawa T, Green KJ, Anhalt GJ, Watt FM, Hashimoto T: Envoplakin and periplakin are Components of the paraneoplastic pemphigus antigen complex. *J Invest Dermatol* 111(12): 1236-1998
- 4) Ruhrberg C, Hajibagheri N, Simon M, Dooley TP, Watt FM: Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *J Cell Biol* 134: 715-729, 1996
- 5) Ruhrberg C, Hajibagheri N, Parry DAD, Watt FM: Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *J Cell Biol* 135: 1835-1849, 1997
- 6) Mahoney MG, Aho S, Uitto J, Stanley JR: The members of the plakin family of proteins recognized by paraneoplastic pemphigus antibodies include periplakin. *J Invest Dermatol* 111: 308-313, 1998

**Paraneoplastic pemphigus sera react with multiple epitopes on the entire molecules of envoplakin and periplakin, except for C-terminal domain of periplakin.**

T Hashimoto, Y Nagata.

Department of Dermatology, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan

Envoplakin and periplakin, members of plakin family, have been identified as major autoantigens in paraneoplastic pemphigus (PNP). In order to characterize the immunopathologic mechanism in PHP, we prepared recombinant proteins for envoplakin and periplakin, and examined the reactivity of PNP sera. Using pGEX bacterial expression vectors, we prepared truncated recombinant proteins, covering N-terminal domains (907aa ENV-N, 944aa PPK-N), central rod domains (766aa ENV-M, 701aa PPK-M) and C-terminal domain (360aa ENV-C) each for envoplakin and periplakin, as well as recombinant proteins for C-terminal homologous domains (111aa ENV-H, 111aaa PPK-H). PPK-H covers entire C-terminal domain of periplakin. We examined 26 sera from clinically and immunologically typical PNP patients and 10 control sera for the reactivity with these recombinant proteins. Out of 26 PNP sera, 19 sera reacted with ENV-N, 16 sera with ENV-M, and 15 sera with ENV-C, whereas 16 PNP sera reacted with PPK-N and 15 sera with PPK-M. Surprisingly, while as many as 18 PNP sera reacted strongly with ENV-H, only 3 sera reacted with PPK-H. None of the 10 normal sera reacted with any recombinant proteins. These results suggest that the multiple epitopes for the PNP sera are present on the entire molecules of envoplakin and periplakin, probably via epitope-spreading phenomenon. Like BP230, the C-terminal homologous domain of envoplakin harbors major epitopes. However, that very few PNP sera reacted with the corresponding region of small C-terminal domain of periplakin might indicate that the mechanism of autoantibody production in periplakin is different from those in other plakin family autoantigens.



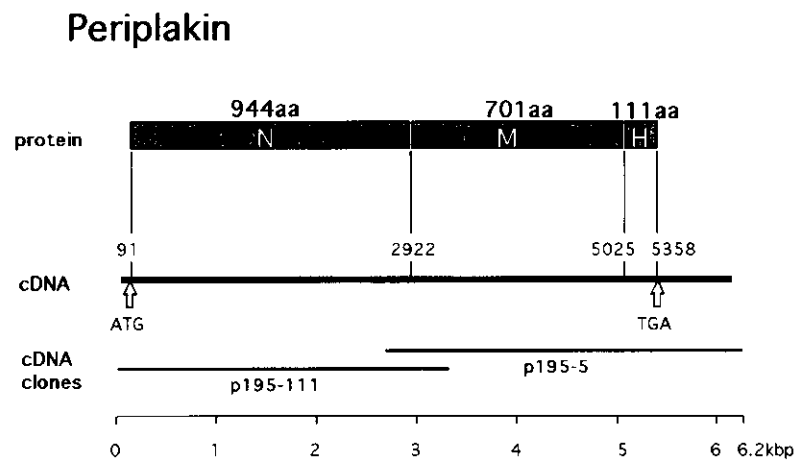
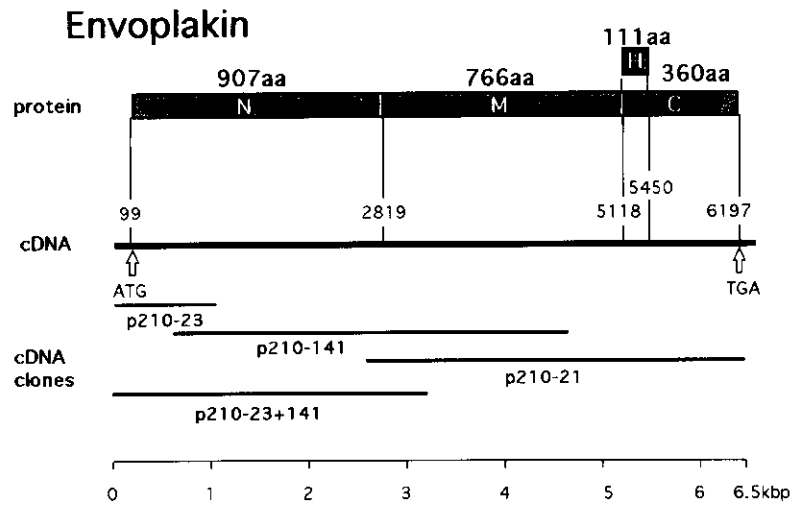


図1 エンボプラキンとペリプラキンと各種リコンビナント蛋白との関係

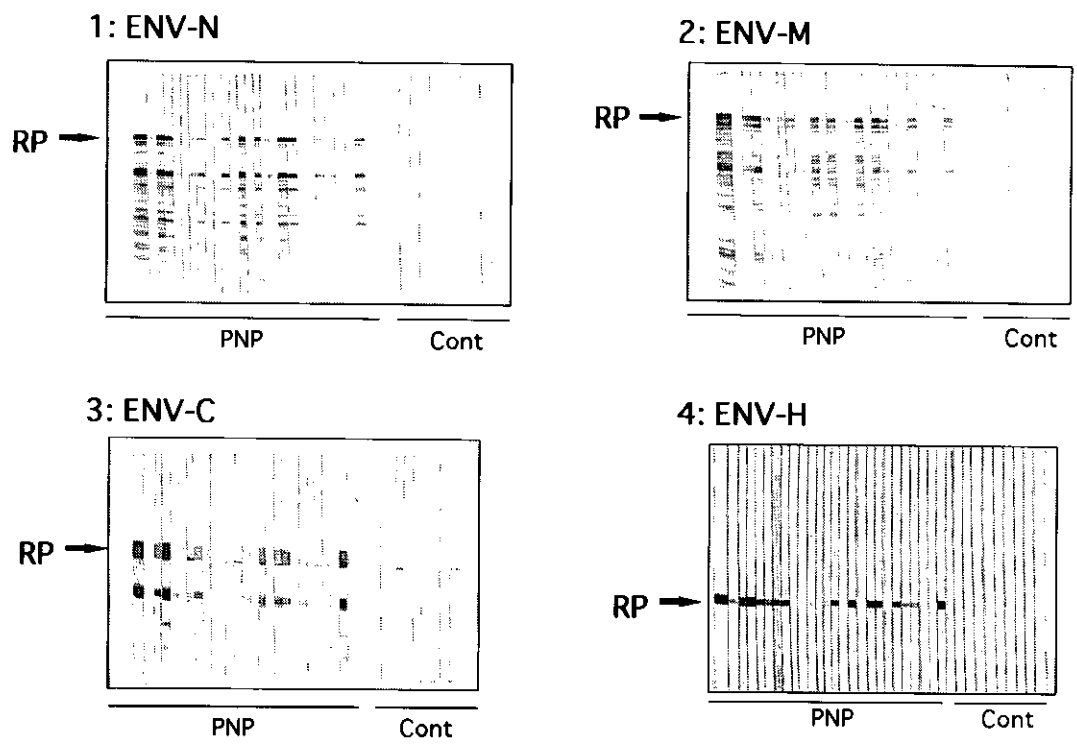
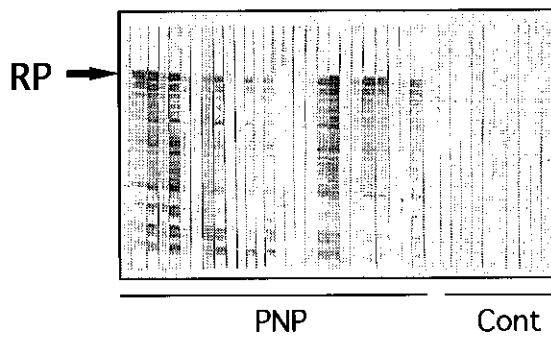
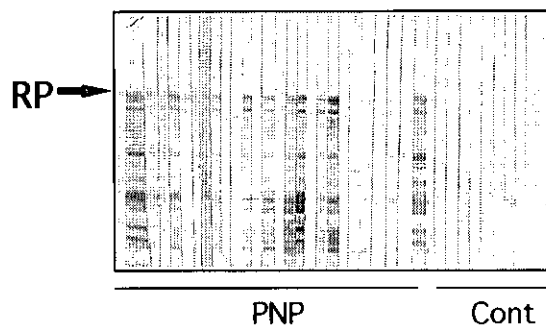


図2 エンボプラキンの免疫プロット法の結果

1: PPK-N



2: PPK-M



3: PPK-H

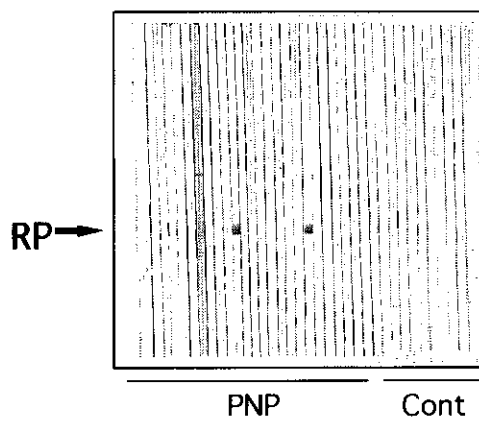


図3 ペリプラキンの免疫プロット法の結果

表1 免疫ブロット法結果

	PNP 26	Normal 10
ENV-N	19 73%	0
ENV-M	16 62%	0
ENV-C	15 58%	0
ENV-H	18 69%	0
PPK-N	16 62%	0
PPK-M	15 58%	0
PPK-H	3 12%	0