

表9 Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析結果 (落葉状・紅斑性) (1)

変数名	発生数/標本数	ハザード比	95%CI (下限~上限)
性 男	7/19	1.00	
女	6/23	1.08	(0.26 - 4.47)
年 齢		1.19	(1.09 - 1.29)
皮疹の部位/頭部なし	4/16	1.00	
あり	9/26	1.82	(0.37 - 9.00)
皮疹の部位/顔面なし	4/11	1.00	
あり	9/31	0.20	(0.04 - 1.02)
皮疹の部位/間擦部なし	7/25	1.00	
あり	6/17	1.64	(0.42 - 6.45)
ステロイドの全身投与あり	9/31	1.00	
なし	4/11	1.33	(0.29 - 6.22)

表10 Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析結果 (落葉状・紅斑性) (2)

性 男	6/11	1.00	
女	6/18	2.02	(0.22 - 18.25)
年 齢		1.24	(1.07 - 1.44)
IgG/正常	9/26	1.00	
異常	3/3	2.85	(0.22 - 36.90)
IgA/正常	10/25	1.00	
異常	2/4	6.15	(0.37 - 102.09)
IgM/正常	8/23	1.00	
異常	4/6	2.06	(0.35 - 12.07)
抗核抗体/陰性	6/20	1.00	
陽性	6/9	2.20	(0.33 - 14.90)
合併症/なし	5/17	1.00	
あり	7/12	1.27	(0.24 - 6.66)

表 11 追跡例と不明例の特徴(1)

項目	追跡例 (%)	不明例 (%)	
全体	195 (82.3)	42 (17.7)	
性：男	92 (47.2)	20 (47.6)	
女	103 (52.8)	22 (52.4)	
年齢：-39	32 (16.4)	6 (14.3)	
40-49	35 (17.9)	5 (11.9)	
50-59	56 (28.7)	10 (23.8)	
60-69	42 (21.5)	3 (7.1)	
70+	30 (15.4)	18 (42.9)	p<0.01
平均年齢	54.8歳	61.0歳	p<0.05
病型：尋常性	118 (60.5)	19 (45.2)	
増殖性	5 (2.6)	1 (2.4)	
落葉性	38 (19.5)	12 (28.6)	
紅斑性	20 (10.3)	3 (7.1)	
その他	14 (9.2)	7 (16.7)	
治療費：老保	19 (9.7)	8 (19.0)	
国保	49 (25.1)	10 (23.8)	
社保	72 (36.9)	9 (21.4)	
生保	8 (4.1)	1 (2.4)	
生保以外の公費	31 (15.9)	8 (19.0)	
全額自費	2 (1.0)	2 (4.8)	
不明	14 (7.2)	4 (9.5)	
発疹／全身汎発性	153 (78.5)	28 (66.7)	
限局性	40 (20.5)	10 (23.8)	
無回答	2 (1.0)	4 (9.5)	p<0.01
皮疹の部位／頭皮部あり	105 (54.4)	21 (50.0)	
なし	79 (42.1)	19 (45.2)	
不明	7 (3.6)	0 (4.8)	
皮疹の部位／顔面あり	127 (65.1)	24 (57.1)	
なし	60 (30.8)	16 (38.1)	
不明	8 (4.1)	2 (4.8)	
皮疹の部位／頸部あり	102 (52.3)	22 (52.4)	
なし	81 (41.5)	17 (40.5)	
不明	12 (6.2)	3 (7.2)	
発疹の部位／水疱あり	169 (86.7)	34 (81.0)	
なし	17 (8.7)	4 (9.5)	
不明	9 (4.6)	4 (9.5)	
発疹の性状／紅斑あり	173 (88.7)	34 (81.0)	
なし	17 (8.7)	5 (11.9)	
不明	5 (2.6)	3 (7.2)	
発疹の性状／びらんあり	189 (96.9)	37 (88.1)	
なし	3 (1.5)	2 (4.8)	
不明	3 (1.5)	3 (7.2)	p<0.05
発疹の性状／痂皮あり	165 (84.6)	33 (78.6)	
なし	28 (14.4)	4 (9.5)	
不明	5 (1.0)	5 (11.9)	p<0.01

表 11 追跡例と不明例の特徴(2)

項目	追跡例 (%)	不明例 (%)
発疹の性状/萎縮あり	7 (3.6)	0 (0.0)
なし	173 (88.7)	36 (85.7)
不明	15 (7.7)	6 (14.3)
口腔の粘膜疹あり	114 (58.5)	18 (42.9)
なし	77 (39.5)	36 (85.7)
不明	4 (2.1)	6 (14.3)
口腔の粘膜疹あり	114 (58.5)	18 (42.9)
なし	77 (39.5)	22 (52.4)
不明	4 (2.1)	2 (4.8)
眼の粘膜疹あり	13 (6.7)	4 (9.5)
なし	165 (84.6)	34 (81.0)
不明	17 (8.7)	4 (9.5)
外陰部の粘膜疹あり	34 (17.4)	8 (19.0)
なし	146 (74.9)	29 (69.0)
不明	15 (7.7)	5 (11.9)
赤血球数/異常	11 (5.6)	4 (9.5)
正常	178 (91.3)	34 (81.0)
不明	6 (2.6)	4 (9.5)
白血球数/異常	57 (29.2)	9 (21.4)
正常	133 (68.2)	29 (69.0)
不明	5 (2.6)	4 (9.5)
血小板数/異常	9 (4.6)	2 (4.8)
正常	172 (90.3)	35 (69.0)
不明	10 (5.1)	5 (11.9)
好酸球数/増多	35 (17.9)	4 (9.5)
正常	150 (76.9)	34 (81.0)
不明	10 (5.1)	4 (9.5)
IgG/異常	22 (11.3)	9 (21.4)
正常	116 (59.5)	18 (42.9)
不明	57 (29.2)	15 (28.6)
IgA/異常	18 (9.2)	8 (19.0)
正常	120 (61.5)	19 (45.2)
不明	57 (29.2)	15 (35.7)
Na/異常	4 (2.1)	4 (9.5)
正常	159 (81.5)	32 (76.2)
不明	32 (16.5)	6 (14.3)
合併症/あり	80 (41.0)	21 (50.0)
なし	107 (54.9)	17 (40.5)
不明	8 (4.1)	4 (9.5)
ステロイドの全身投与あり	170 (87.2)	35 (83.3)
なし	24 (12.3)	5 (11.9)
不明	8 (4.1)	4 (9.5)
血漿交換療法あり	11 (5.6)	0 (0.0)
なし	162 (83.1)	39 (92.9)
不明	22 (11.3)	3 (7.1)

図1 性別生命表

累積生存率

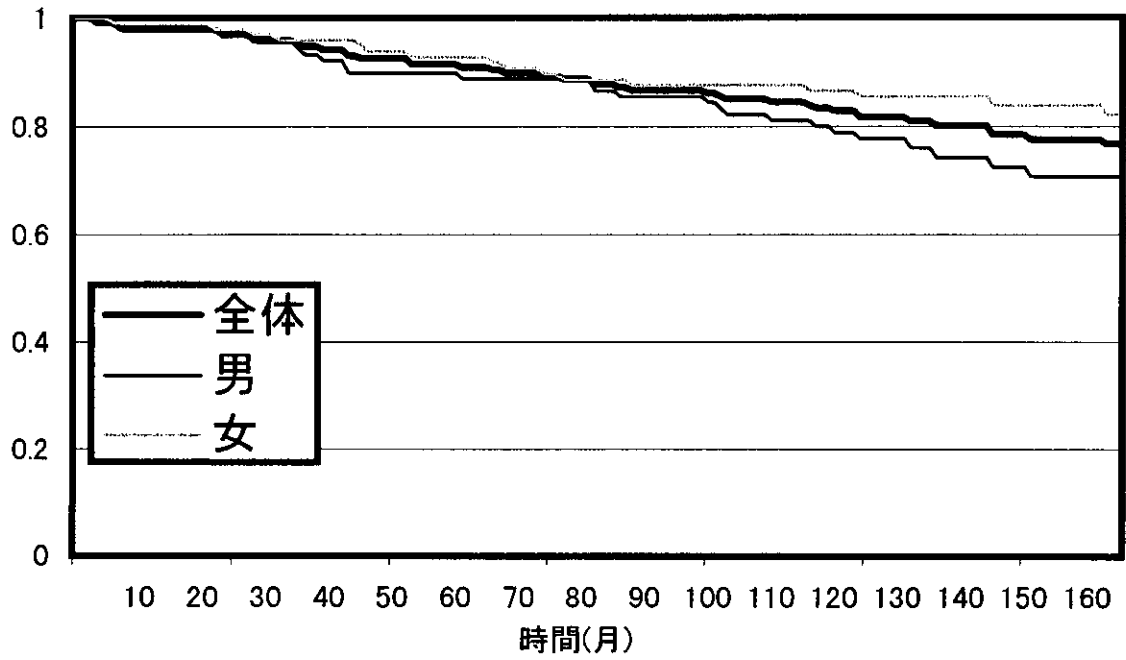


図2 年齢別生命表

累積生存率

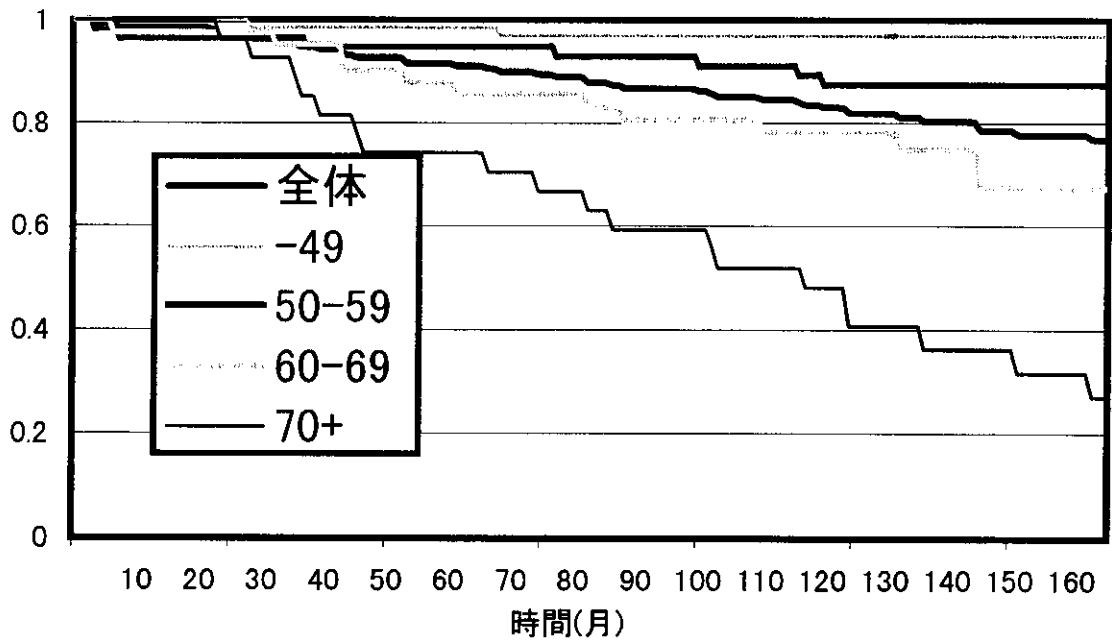


図3 病型別生命表

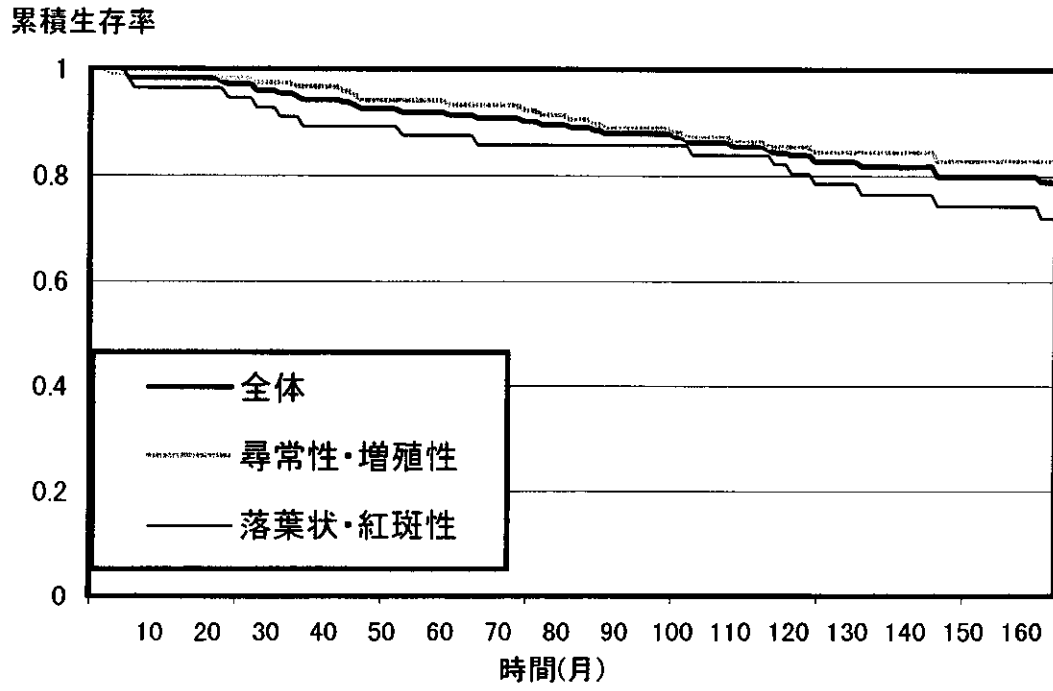


図4 合併症の有無別生命表（尋常性・増殖性）

累積生存率

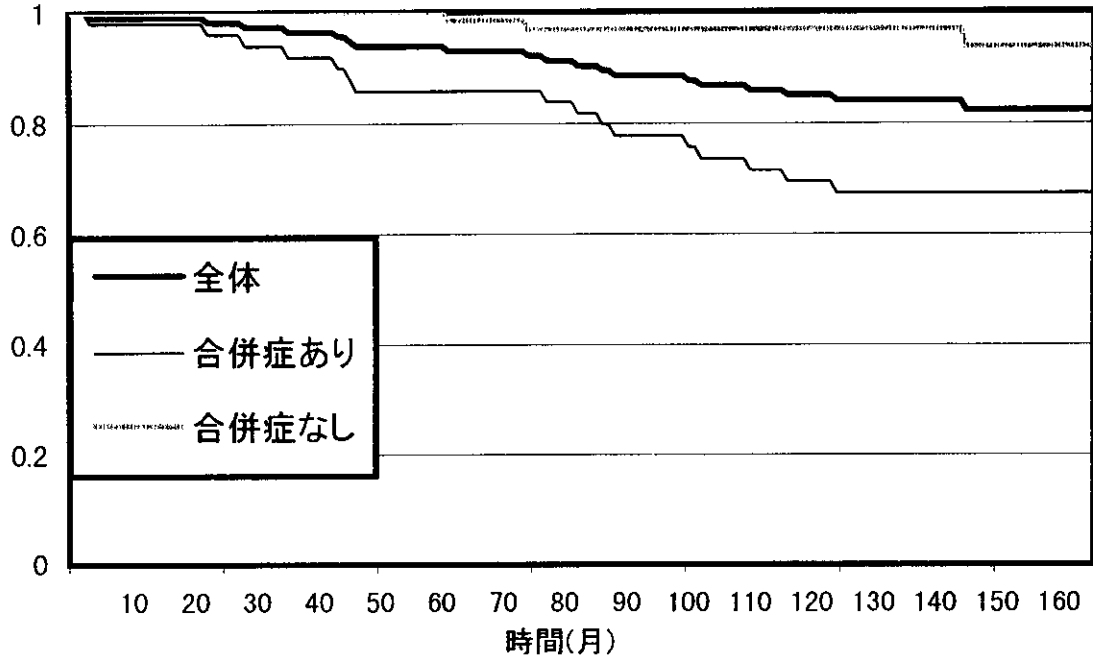


図5 合併症の有無別生命表（落葉状・紅斑性）

累積生存率

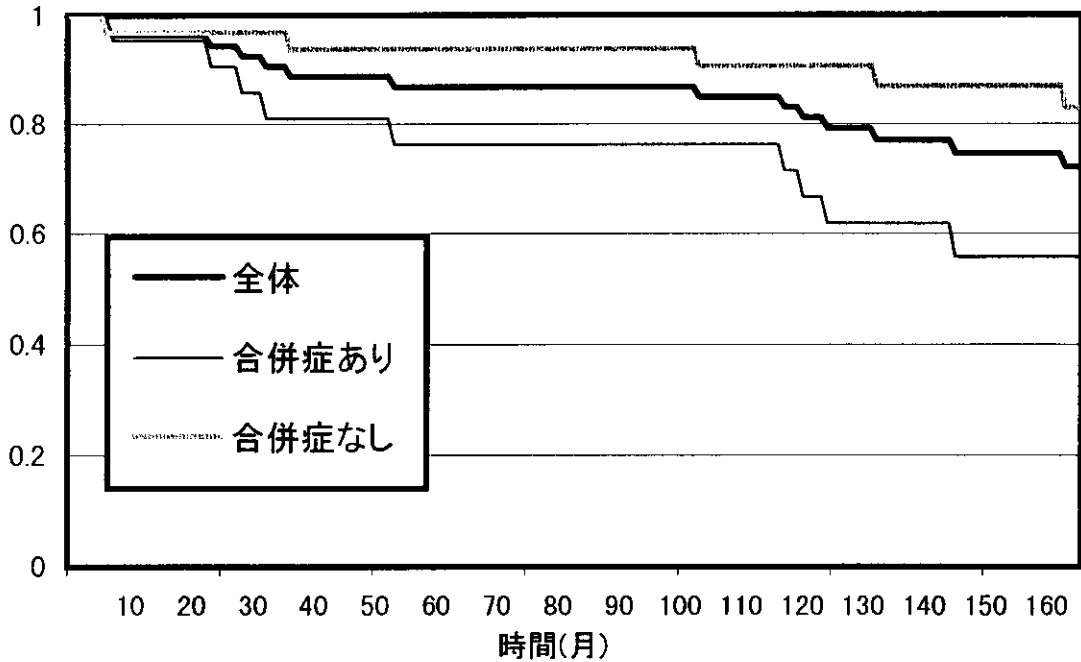


図6 生命表 (IgG 値正常値/異常値)

累積生存率

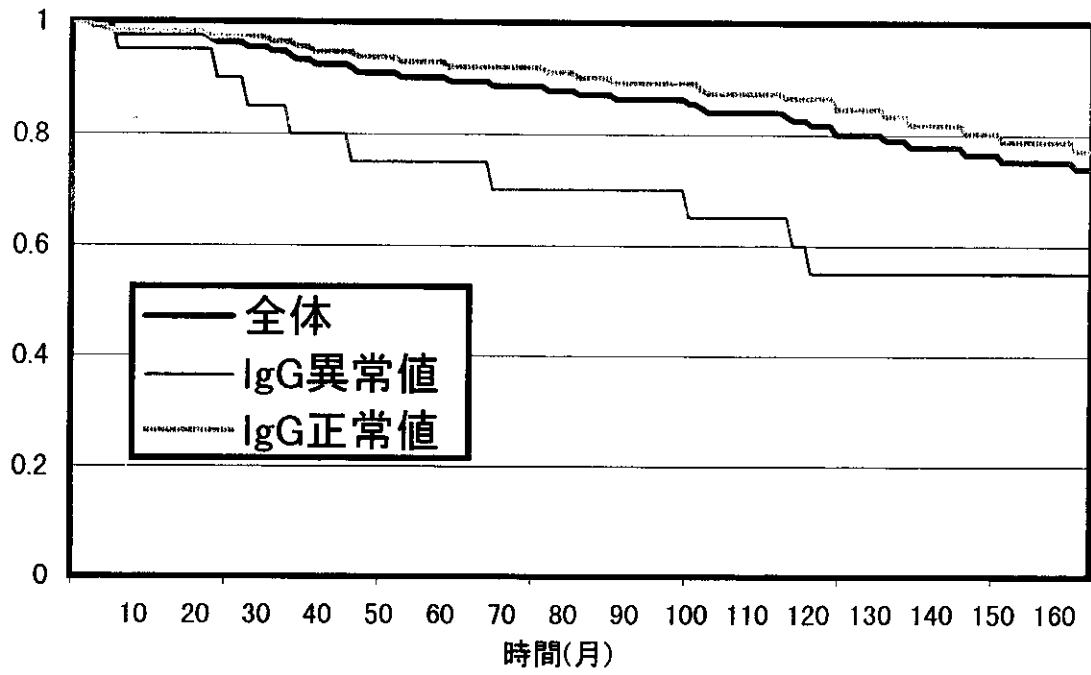


図7 IgG 正常値/異常値

累積生存率

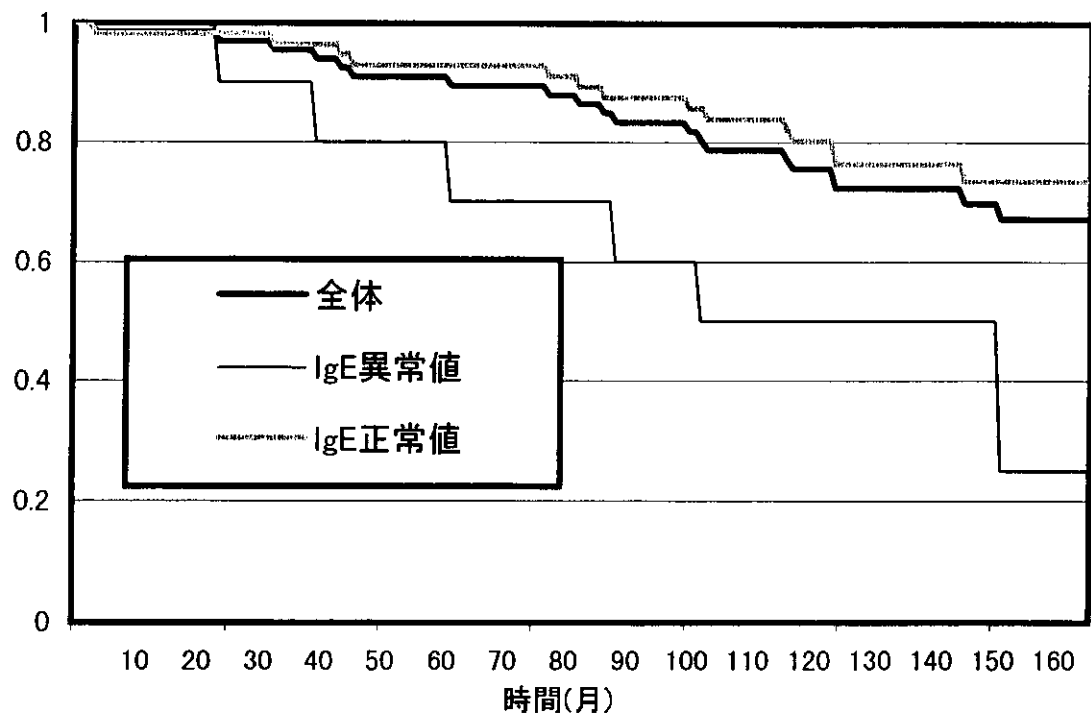


図8 抗核抗体陽性／陰性生命表（落葉状・紅斑性）

累積生存率

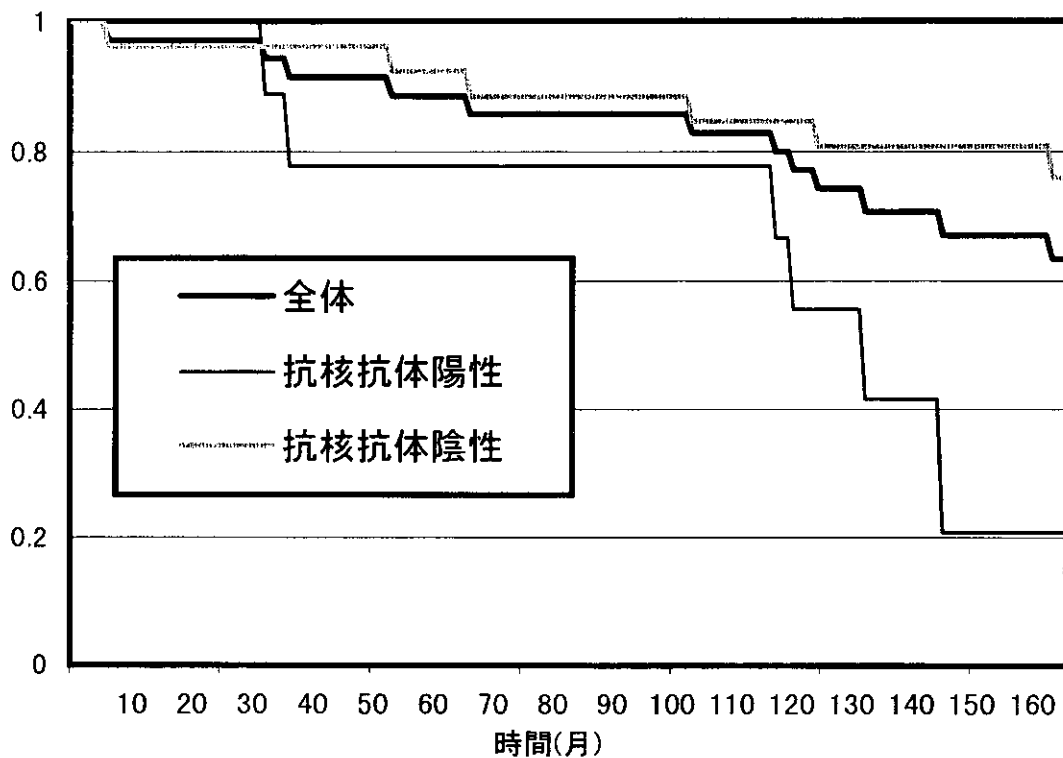


図9 ステロイド投与の有無別生命表

累積生存率

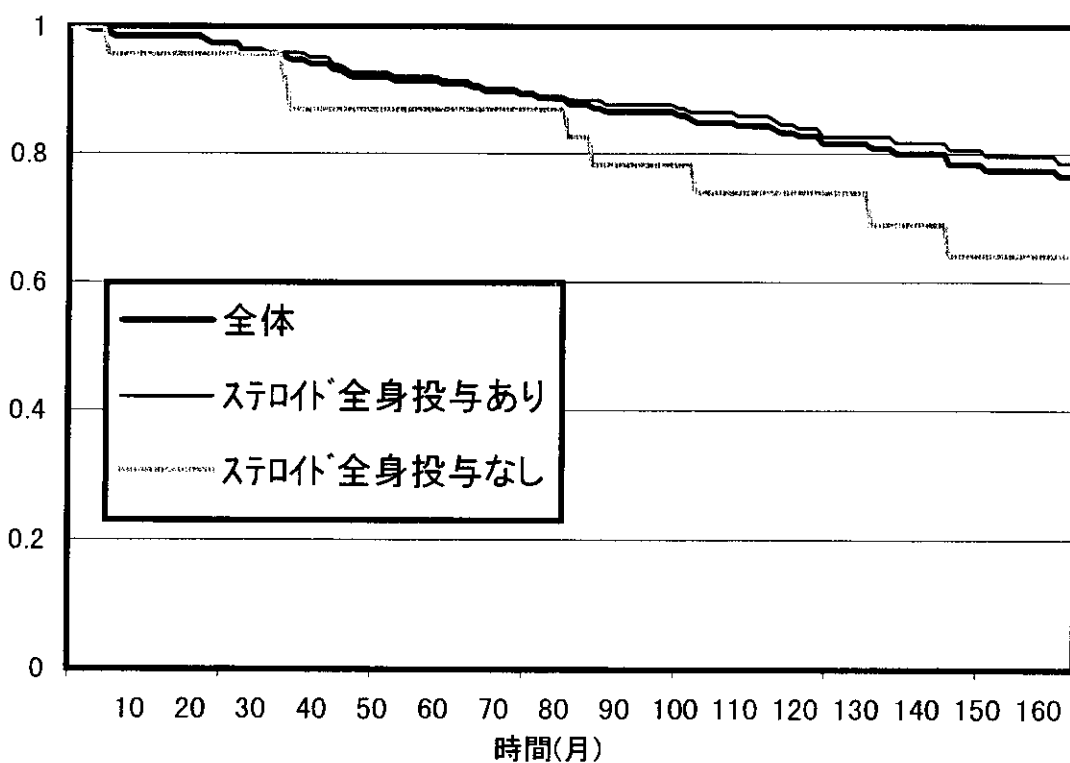
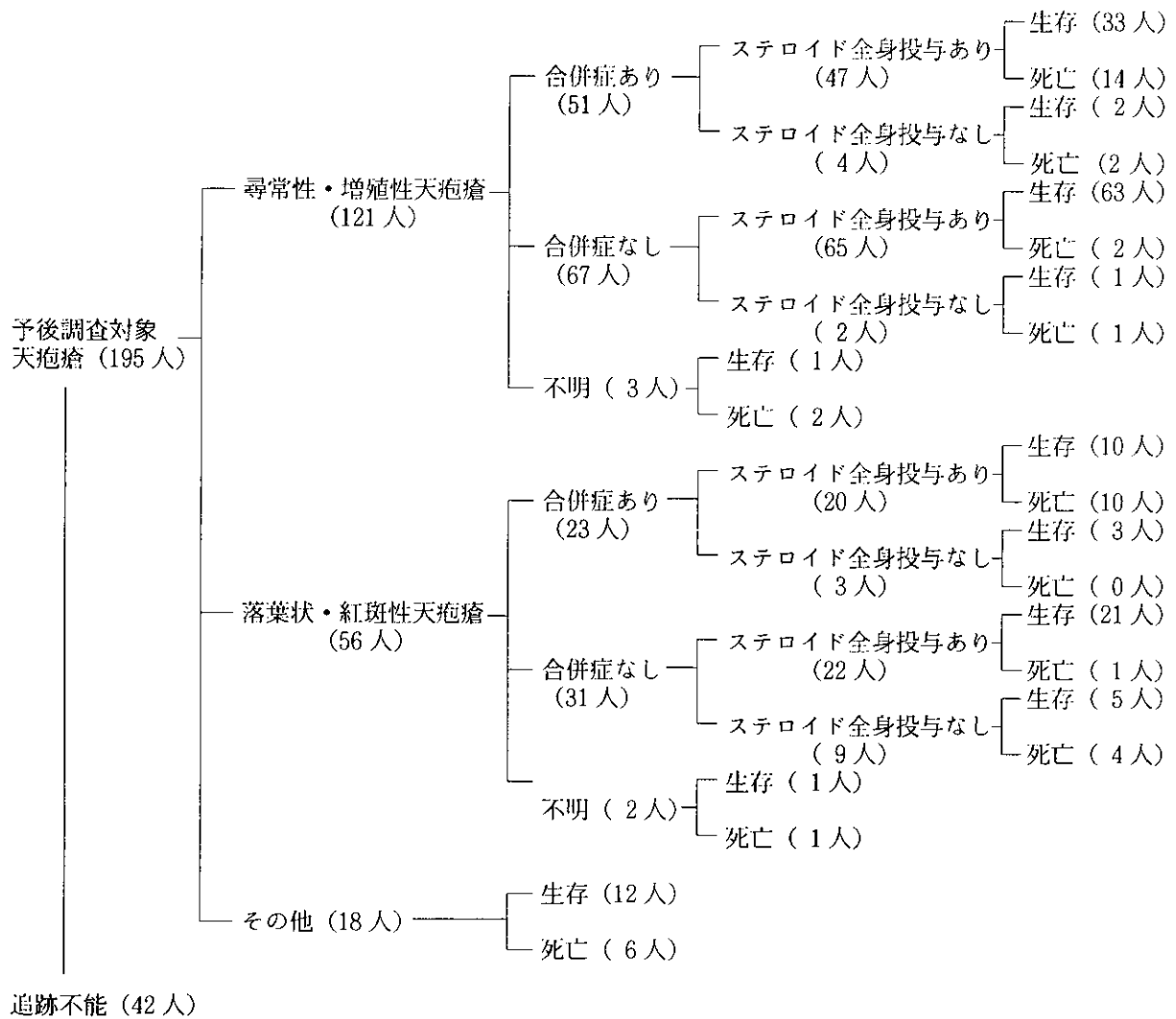


図 10 天疱瘡の病型、合併症、ステロイド使用と生命予後



2) 天疱瘡の分類：最新の知見

分担研究者：橋 本 隆（久留米大学医学部皮膚科）
共同研究者：天 谷 雅 行（慶応義塾大学医学部皮膚科）
池 田 志 学（順天堂大学医学部皮膚科）

要 約

多くの天疱瘡はデスマogleイン（desmoglein: Dsg）に反応する。最近開発された Dsg1 および Dsg3 のバキュロウイルス発現リコンビナント蛋白を用いた ELISA 法は天疱瘡の診断と分類に大きな進歩をもたらした。患者血清中の IgG 抗 Dsg1/Dsg3 自己抗体の検索により、尋常性天疱瘡は、粘膜優位型と皮膚粘膜型に分けられることが証明された。さらに、各種の抗原解析から疱疹状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、IgA 天疱瘡の位置づけもよりはっきりしてきた。

一方、先天的に表皮細胞間接着異常を示す疾患、デスモソーム蛋白の遺伝子異常に伴う皮膚疾患も明確に分類されるようになってきた。このように、主として天疱瘡を中心に進められてきた表皮細胞接着障害性皮膚疾患の研究は、先天的皮膚疾患の分類のための研究にも拡大してきており、今後さらに大きな発展を示すことが期待される。

は じ め に

分子生物学的手法の進歩により、自己免疫性水疱症の研究も急速な発展を遂げ、天疱瘡の検索法もここ数年で急速に変化してきた¹⁻⁴⁾。特に、最近開発されたデスマogleイン 1（desmoglein 1: Dsg1）および Dsg3 のバキュロウイルス発現リコンビナント蛋白を用いた ELISA 法は天疱瘡の診断と分類に大きな進歩をもたらした^{5, 6)}。これらの検索法を用いて天疱瘡群疾患の確実な診断をつけることは、的確な治療を行うために必須である。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。

さらに、主として天疱瘡を中心に進められてきた表皮細胞接着障害性皮膚疾患の研究は、現在、先天性皮膚疾患にも拡大してきており、今後さらに大きな発展を示すことが期待される。

本項では、各種天疱瘡における生化学的・分子生物学的方法による新しい分類を紹介する。さらに、その過程で発展してきたデスモソームないしケラチノサイト細胞接着障害による先天性皮膚疾患の分類における最近の知見についても述べたい。

天疱瘡群疾患の分類（表 1）

IgG 抗表皮細胞間抗体を有する代表疾患は、尋常性天疱瘡（pemphigus vulgaris: PV）および落葉状天疱瘡（pemphigus foliaceus: PF）である¹⁻⁴⁾。以前から、免疫沈降法および免疫ブロット法で、PV 血清は 130kD PV 抗原（Dsg3）と、PF 血清は 160kD PF 抗原（Dsg1）と反応することが知られていた。その自己抗原の類似性から、増殖性天疱瘡は PV の亜型、紅斑性天疱瘡は PF の亜型と考えられる。

Dsg1/Dsg3 のリコンビナント蛋白を用いた ELISA 法は天疱瘡の診断と分類に大きな進歩をもたらした^{5, 6)}。IgG 抗 Dsg1/Dsg3 自己抗体の検索により、尋常性天疱瘡は、粘膜優位型

(Dsg3 のみに反応) と粘膜皮膚型 (Dsg3/Dsg1 の両方に反応) に分けられることが明らかとなった^{7, 8)}。また、以前より、PV と PF の間で移行する症例が報告されていたが、その移行に伴って自己抗原が変化することが証明され、自己抗体の種類によって個々の症例のそれぞれの時期の病態が説明可能であることが明らかとなった^{9, 10)}。

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 (herpetiform pemphigus) がある。この血清の約 80% は Dsg1 に反応するが、約 20% は Dsg3 に反応することが判明した¹¹⁾。これに対して、薬剤誘発性天疱瘡の抗原は未だ確定していない。

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。免疫沈降法では、この血清中の IgG 抗表皮細胞間自己抗体は 250kD, 230kD, 210kD, 190kD, 170kD の蛋白群と反応する。表皮抽出液・各種リコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法あるいは免疫沈降法・免疫ブロット法コンビネーション法などにより、250kD 蛋白は desmoplakin I、230kD 蛋白は BP230、210kD の蛋白は desmoplakin II と envoplakin、190kD 蛋白は periplakin 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^{12, 13)}。さらに、腫瘍随伴性天疱瘡血清は古典的天疱瘡抗原である Dsg1/Dsg3 にも反応することが明らかとなった¹⁴⁾。

IgA 抗表皮細胞間抗体を有する IgA 天疱瘡には、intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型と subcorneal pustular dermatosis (SPD) 型がある。SPD 型の IgA 天疱瘡の抗原がデスモコリン 1 (desmocollin 1: Dsc1) であることが明らかとなっている¹⁵⁾。しかし、IEN 型の自己抗原は未だ不明である。さらに、最近、少数ではあるが、一部の IgA 天疱瘡血清には IgA 抗 Dsg 抗体が存在することも示された¹⁶⁾。また最近 IgG と IgA の抗表皮細胞間抗体を示す症例 (IgG/IgA 天疱瘡) で Dse と反応する症例が示された (永田ほか: 論文準備中)。

また、最近、地域に風土病的にみられる天疱瘡も報告されている。ブラジル天疱瘡が最もよく知られているが、チュニジアやコロンビアにも同様の報告があり、主に、Dsg1 を抗原とするが、通常の PF より複雑な抗原パターンを示すことが示唆されており、今後の研究が待たれる。

自己免疫性水疱症の検査法と診断システム

表 2 に現在私ども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。典型的な症例ではこれらのすべての検索を用いなくても診断は可能であるが、診断に困難な症例ではこれらの診断法を用いて確実な診断をすることが必要である。最近ほとんどの自己抗原の cDNA が単離され各種の発現系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 3 にあげる。

その他の手技として、免疫電顕、新生マウス動物モデル、バキュロウイルス発現蛋白吸収アッセイ、IgG affinity-purification 法などが適宜使われている。また、将来の検査法として、私どもは、BP180 NC16a のリコンビナント蛋白を用いた ELISA、Dsc1-3 のバキュロウイルス発現リコンビナント蛋白を用いた ELISA、デスモプラキンやプレクチンに対する自己抗体を検出するための免疫沈降法・免疫ブロット法コンビネーション法などを検討中である。

表皮細胞間接着障害およびデスモソーム構成蛋白の異常を示す先天性水疱症の分類 (表 4)

一方、先天的に表皮細胞間接着異常をおこす家族性良性慢性天疱瘡 (ヘイリーヘイリー病) と

その類似疾患であるダリエー病の原因としてデスモソーム蛋白が考えられ、長い間検討が進められたが結論はでなかった。最近になり、両疾患とも細胞内 Ca ポンプ蛋白遺伝子異常によって生じることが判明した^{17, 18)}。すなわち、両疾患とも Ca ポンプの異常により細胞内の Ca が上昇することにより、細胞接着の障害と異常角化が生じると考えられる。

また、デスモソーム蛋白の遺伝子異常に伴う皮膚疾患も解明されてきた。すなわち、まず、デスモソーム接着板の細胞内蛋白であるプラコフィリン1の欠損により ectodermal dysplasia / skin fragility syndrome と名付けられた疾患がおこることが報告され、これはデスモソーム構成蛋白の遺伝子異常がはじめて発見された疾患である¹⁹⁾。さらに、最も主要なデスモソーム接着板蛋白であるデスモプラキンおよび細胞膜通過カドヘリン型蛋白である Dsg1 の遺伝子異常による haplo-insufficiency のため掌蹠角化症が生じることが明らかとなった²⁰⁻²²⁾。また、最近、右室心筋症、掌蹠角化症、woolly hair を 3 徴候とする Naxos 病が、もう一つのデスモソーム接着板蛋白であるプラコグロビンの欠損によっておこることも報告された²³⁾。

お わ り に

以上のように、主として天疱瘡を中心に進められてきた表皮細胞接着障害者性皮膚疾患の研究は、最近は先天性皮膚疾患にも拡大してきており、今後さらに大きな発展を示すことが期待される。

参考文献

- 1) 橋本 隆：総説：水疱瘡—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、西日本皮膚 59: 257-265,1997
- 3) Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS: Continuing Medical Education: The new pemphigus variants. J Am Acad Dermatol 40: 649-671,1999
- 4) Hashimoto T: Skin diseases related to abnormality in desmosomes and hemidesmosomes-editorial review-; Special issue of review articles in Journal of Dermatological Science. J Dermatol Sci 20: 81-84,1999
- 5) Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins, J Immunol 159: 2010-2017, 1997
- 6) Amagai M, Hashimoto T, Komai A, Hashimoto K, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. Br J Dermatol 140: 351-357, 1999
- 7) Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR: Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J Clin Invest 103: 461-468,1999
- 8) Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. J Am Acad Dermatol 40: 167-170,1999
- 9) Ishii K, Amagai M, Ohata Y, Shimizu H, Hashimoto T, Ohya K, Nishikawa T: Development of pemphigus vulgaris in a patient with pemphigus foliaceus: anti-desmoglein antibody profile shift by enzyme-linked immunosorbent assay, J Am Acad Dermatol 42: 859-861,2000

- 10) Komai A, Amagai M, Ishii K, Nishikawa T, Chorzelski T, Matsuo I, Hashimoto T: The clinical transition between pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris correlates well with the changes in autoantibody profile assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Dermatol*, 144: 1177-1182, 2001
- 11) Ishii K, Amagai M, Komai A, Ebihara T, Chorzelski TP, Ohya K, Nishikawa T, Hashimoto T: Desmoglein 1 and desmoglein 3 are the target autoantigens in herpetiform pemphigus, *Arch Dermatol* 135: 943-947,1999
- 12) 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: 1236-1238, 1998
- 13) Nagata Y, Karashima T, Watt FM, Salmhofer W, Kanzaki T, Hashimoto T: Paraneoplastic pemphigus sera react strongly with multiple epitopes on the various regions of envoplakin and periplakin, except for C-terminal homologous domain of periplakin. *J Invest Dermatol*, 116: 556-563, 2001
- 14) Amagai M, Nishikawa T, Anhalt GJ, Hashimoto T: Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. *J Clin Invest*, 102: 775-782,1998
- 15) Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MAJ, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T: Human desocollin 1 (Dsc1) in an autoantigen for subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 109: 127-131,1997
- 16) Hashimoto T, Komai A, Futei Y, Nishikawa T, Amagai M: Desmogleins are targeted by IgA autoantibodies of a few IgA pemphigus patients, *Arch Dermatol*, 137: 735-738, 2001
- 17) Sakuntabhai A, Ruiz-Perz V, Simon C, Jacobsen N, Burge S, Monk S, Smith M, Munro C, O'Donovan M, Craddock N, Kuchelapati R, Rees JL, Owen M, Lathrop GM, Monaco AP, Strachan T, Hovnanian A: Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease. *Nat Genet* 21: 271-277,1999
- 18) Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T, Epstein EH Jr: Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* 24: 61-65,2000
- 19) McGrath JA, McMillan JR, Shemanko CS, Runswick SK, Leigh IM, Lane EB, Garrod DR, Eady RAJ. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet* 17: 140-4,1997
- 20) Armstrong DK, McKenna KE, Purkes PE, Gree KJ, Eady RA, Leigh IM, Hughes AE: Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* 8: 143-148,1999
- 21) Whittock NV, Ashton GH, Dopping-Hepenstal PJ, Gratian MJ, Keane FM, Eady RA, McGrath JA: Striated palmoplantar keratoderma resulting from desmoplakin haploinsufficiency. *J Invest Dermatol* 113: 940-946,1999
- 22) Rickman L, Simrak D, Stevens HP, Hunt DM, King IA, Bryant SP, Eady RA, Leigh IM, Arnemann J, Magee AI, Kelsell DP, Buxton RS: N-terminal deletion in a desmosomal canhern causes the autosomal deominant skin disease striated palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* 8: 971-976,1999
- 23) McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tastsopoulou A, Anastakakis A, Coonar A, Normal M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ: Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair. *Lancet* 17: 355 (9221): 2119-2124,2000

英 文 抄 録

Classification of pemphigus: The recent advances.

Takashi Hashimoto (Department of Dermatology, Kurume University School of Medicine)

Masayuki Amagai (Department of Dermatology, Keio University School of Medicine)

Shigaku Ikeda (Department of Dermatology, Juntendo University School of Medicine)

A recently developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for desmogleins 1 and 3 (Dsg1 and Dsg3), antigens for pemphigus foliaceus (PF) and pemphigus vulgaris (PV), respectively, has made a great progress in diagnosis and classification of pemphigus. The study for the anti-Dsg1 and Dsg3 antibodies indicated the presence of two different types of PV; i.e., mucosal dominant type and muco-cutaneous type. The antigens in pemphigus herpetiformis have been identified by the same ELISA. In addition, a complicated profile of autoantigens in paraneoplastic pemphigus was suggested, and IgA anti-Dsg1 and Dsg3 antibodies were detected in only a few cases of IgA pemphigus. On the other hand, the responsible genes in Darier's disease and familial benign chronic pemphigus (Hailey-Hailey disease) have been identified as genes for different types of calcium pump proteins. Recently, the diseases which are really developed by mutations in the genes of desmosomal proteins have been identified. These include striated palmplantar keratoderma caused by haploinsufficiency of either desmoplakin or Dsg1, epidermodysplasia/skin fragility syndrome caused by deficiency of plakophilin 1 and Noxas disease caused by plakoglobin knockout. These recent advances in the studies of keratinocyte cell adhesion, which were initiated mainly by investigation for pemphigus, will progress greatly the future studies in this field.

表1 抗表皮細胞間抗体を示す自己免疫性水疱症の分類とその抗原

病名	イムノグロブリン	抗原
尋常性天疱瘡 粘膜型	IgG	Dsg3
尋常性天疱瘡 粘膜皮膚型	IgG	Dsg1+Dsg3
増殖性天疱瘡	IgG	Dsg1+Dsg3
落葉状天疱瘡	IgG	Dsg1
紅斑性天疱瘡	IgG	Dsg1
疱疹状天疱瘡	IgG	Dsg1 (Dsg3)
薬剤誘発性天疱瘡	IgG	多様
PV・PF 移行型	IgG	Dsg1 and/or Dsg3
腫瘍随伴性天疱瘡	IgG	Plectin,DPKI/II,BP230,EPL, PPL,p170,Dsg3,Dsg1, (Dsc?)
IgA 天疱瘡 SPD 型	IgA	Dsc1
IgA 天疱瘡 IEN 型	IgA	未知
IgA 天疱瘡 IgA PV	IgA	Dsg3
IgA 天疱瘡 IgA PF	IgA	Dsg1
IgA/IgG 天疱瘡	IgA/IgG	Dsc1 (Dsc2/Dec3)
Endemic pemphigus		
Brazilian pemphigus	IgG	Dsg1 (Dsg3,Dsc1-3) ?
Tunisia pemphigus	IgG	Dsg1 (Dsg3)
Colombia pemphigus	IgG	Dsg1+ α

表2 自己免疫性水疱症診断システム

(1)蛍光抗体間接法	正常ヒト皮膚切片 1M 食塩水剥離ヒト皮膚切片 ラット膀胱切片 補体法
(2)ELISA	Dsg1/Dsg3 リコンビナント蛋白
(3)免疫ブロット法	正常表皮抽出液 正常真皮抽出液 濃縮角化細胞培養液 リコンビナント蛋白
(4)免疫沈降法	培養角化細胞
(5)cDNAtransfection 法	Desmocollin 1-3 cDNA to COS-7 細胞

表3 自己免疫性水疱症の診断に用いられているリコンビナント蛋白

(1)BP180	NC16a domain C末端 C15 domain
(2)Type VII collagen	NC1 (NC2)
(3)BP230	N末端、中央部、C末端
(4)Laminin α 3 subunit	G-domain
(5)Envoplakin (EPL) Periplakin (PPL)	各種 domain

表4 表皮細胞間接着障害をおこす先天性皮膚疾患

疾患名	原因蛋白 (遺伝子)
(1)Darier 病 (グリエー病)	小胞体 Ca ポンプ蛋白 ATPase SERCA2 (ATP2A2) (染色体 12q23-q24.1)
(2)Hailey-Hailey 病 (家族性慢性良性天疱瘡)	ゴルジ装置 Ca ポンプ蛋白 P-type ATPase (ATP2C1) (染色体 3q)
(3)Epidermal dysplasia/ skin fragility syndrome	プラコフィリン 1
(4)線状掌蹠角化症	デスモプラキン (Haplo-insufficiency)
(5)線状掌蹠角化症	デスモグレイン 1 (Haplo-insufficiency)
(6)Naxos disease (cardiomyopathy, palmoplantar keratoderma, Woolly hair)	プラコグロビン

3) バキュロウイルス発現系を用いたヒトデスモコリン (Dsc) 1,2,3 リコンビナント蛋白の作製

分担研究者：橋 本 隆 (久留米大学医学部皮膚科)
共同研究者：永 田 祥 子 (久留米大学医学部皮膚科)
天 谷 雅 行 (慶應義塾大学医学部皮膚科)

要 約

現在、バキュロウイルス発現系を用いたリコンビナント蛋白として、デスモグレイン (Dsg) 1, Dsg3 があり、それを用いた ELISA は感度・特異性ともに高く、既に天疱瘡の診断に実用化されている。今回、我々は、同様の手技を用いて、もう一種のデスモゾームカドヘリンであるデスモコリン (Dsc) 1,2,3 のリコンビナント蛋白作製を試みた。バキュロウイルス発現ベクターにヒト Dsc1,2,3 の細胞外部位の cDNA を組み込み、更にその C 末端部に E-tag、His-tag を組み込んだ。このクローンを昆虫細胞にトランスフェクトし、リコンビナント蛋白を作成し、TALON resin を用いて、培養上清からリコンビナント蛋白を精製した。DNA sequencing により、それぞれのクローン DNA 配列を確認し、精製された 3 種の蛋白は抗 E-tag 抗体を用いた免疫ブロット法で予測された大きさの蛋白バンドを示したことから、これらのクローンは相当するリコンビナント蛋白を正しく発現していると考えられた。特に、Dsc1,3 リコンビナント蛋白はそれぞれ 2 種の Dsc1,3 特異的ポリクローナル抗体と反応した。この 3 つの中でも Dsc1 は subcorneal pustular dermatosis (SPD) 型の IgA 天疱瘡の抗原としても知られているため、典型的な 4 例の上疾患の患者血清で、Dsc1 リコンビナント蛋白を用いて吸収試験を行ったが、4 例とも全く吸収されなかった。しかし、Dsc1 に対して IgG/IgA の自己抗体を持つ、ある特殊な天疱瘡患者血清においては、この Dsc1 リコンビナント蛋白で、IgG/IgA ともに吸収された。今後これらの蛋白を用いた ELISA を確立し、各種天疱瘡における、特に IgG 抗 Dsc1 自己抗体の存在を検討していく予定である。

目 的

現在、各種天疱瘡の抗原物質はカドヘリン型デスモゾーム膜蛋白の一種であるデスモグレイン (Dsg) 1,3 であることが知られている^{1), 2)}。しかしながら、もう一種のデスモゾーム膜蛋白であるデスモコリン (Dsc) 1,2,3 の自己抗原としての役割はまだ確認されていない。これまでの研究で、ウシ鼻から単離したデスモゾームを用いた免疫ブロット法で一部の患者血清が Dsc と反応することが示され³⁾、また、ウシ Dsc の cDNA を用いて大腸菌発見リコンビナント蛋白を作製し、各種天疱瘡血清がリコンビナント蛋白と反応することが示された³⁾。さらに、最近、ヒト Dsc の cDNA を有核細胞 (COS7 cell) にトランスフェクトし、その反応性を検討することにより、SPD 型の IgA 天疱瘡が Dsc1 と反応することが示された⁴⁾。以上の結果から、Dsc1 の自己抗原として存在が明らかとなったが、その多くは Dsc 蛋白上の高次元エピトープを認識すると考えられ、手技上そのようなエピトープが壊れてしまう免疫ブロット法では、抗 Dsc 自己抗体の検出は困難である。また、cDNA トランスフェクト法はその手技が煩雑で、多数の血清サンプルの検索には不適である。最近、バキュロウイルス発現系が導入され、高次構造を持ったリコ

ンビナント蛋白が比較的多量に得られることが判明した。天疱瘡の自己抗原である Dsg1,3 の検索にもバキュロウイルス発現系を用いた ELISA 法が開発され、臨床にも応用されている⁵⁾。以上から、今後更に抗 Dsc1,2,3 自己抗体を詳細に解析するためには、このバキュロウイルス蛋白を用いた ELISA 法の開発が必要と考え、今回の研究に至った。

方 法

4) ヒト Dsc1,2,3 細胞外部位 cDNA のバキュロウイルスを発現ベクターへのサブクローニング：まず、ヒト Dsc1,2,3 の全長 cDNA クローンを template として、ヒト Dsc1,2,3 の細胞外部位を PCR にて増幅する。そして既に構築されているバキュロウイルス発現ベクターにヒト Dsg3 の細胞外部位が組み込まれたプラスミド (pEVmod-Dsg3-His) と、Dsc の PCR 産物をそれぞれ同じ制限酵素で処理し、サブクローニングした。

5) 組み換え体ウイルスの作製：セルフェクチンを用いて、作製した 3 種のコンストラクトを BrculoGold™ Baculovirus DNA と同時に昆虫細胞である Sf9 細胞にトランスフェクトし、相同組み換えにより、Dsc の cDNA をもったリコンビナントバキュロウイルスを作製し、さらに同様のサイクルを 4～5 回繰り返して、ウイルスを増幅した。

6) リコンビナントバキュロウイルス蛋白の産生：増幅した組み換え体ウイルス液を最終的に同じく昆虫細胞である High-Five 細胞に加え、リコンビナントバキュロウイルス蛋白を多量に作成した。

7) リコンビナント蛋白の精製：リコンビナントバキュロウイルス蛋白が含まれている High-Five 細胞培養上清から His-tag を利用して TALON-Resin column を用い、各種リコンビナント蛋白を精製した。

8) 免疫ブロット法：まず、抗 E-tag 抗体を用いた免疫ブロット法でそれぞれのリコンビナントバキュロウイルス蛋白が正しく発現されていることを確認した。さらに、Dsc1,3 に対する 2 種の特異的ポリクローナル抗体を用いてその特異性を確認した。

9) 吸収試験：作製したリコンビナントバキュロウイルス蛋白と 4 例の SPD 型 IgA 天疱瘡血清、1 例の異型な IgG/IgA 天疱瘡血清を一晩、4℃で incubation し、その incubation したものを 1 次抗体として翌日、正常皮膚を用いた蛍光抗体間接法を行った。全くバキュロウイルス蛋白が含まれていない High-Five 細胞だけの培養上清とそれぞれの血清と incubation したものをコントロールとして用いた。

結 果

バキュロウイルス発現系を用いて作製したヒト Dsc1,2,3 リコンビナント蛋白は抗 E-tag 抗体を用いた免疫ブロット法において予想された大きさの蛋白バンドを示した (図 1 左)。更に Dsc1,3 に関してはそれぞれに特異的な 2 種ポリクローナル抗体と反応した (図 1 右)。

今回、作製した Dsc1 バキュロ蛋白を用いて、吸収試験を行ったが、Dsc1 が自己抗原であると判明している典型的な SPD 型 IgA 天疱瘡 4 例の血清ではその反応は全く、吸収されなかった。しかし、Dsc1 に対して IgG/IgA の自己抗体をもつ、ある特殊な天疱瘡患者血清においては、この Dsc1 リコンビナント蛋白で、IgG/IgA とともに吸収された (図 2、図 3)。

考 案

今回の研究において、我々はバキュロウイルス発現系を用いて、ヒト Dsc1,2,3 リコンビナント蛋白を作製した。更に、既に自己抗原として知られている Dsc1 に関して、作製したリコンビナント蛋白を用いた吸収試験によって、4例の SPD 型 IgA 天疱瘡と、1例の Dsc1 に対して IgG/IgA の自己抗体をもつ、ある特殊な天疱瘡患者血清の反応性を検討した。その結果、SPD 型 IgA 天疱瘡の 4例の血清は全く、吸収されなかったが、Dsc1 に対して IgG/IgA の自己抗体をもつ患者血清においては、IgG/IgA とともにその反応が吸収された。以上のことから、SPD 型 IgA 天疱瘡患者自己抗体が反応するエピトープは、バキュロウイルス発現系においては発現されていないことが示唆された。しかし、一部の天疱瘡においては、自己抗体が反応するエピトープが、バキュロウイルス発現系でも作ることができるということが示された。今後、作製した Dsc のバキュロ蛋白を用いた ELISA 法を確立し、各種天疱瘡における、IgA、IgG 抗 Dsc の存在を検討していく予定である。

参考文献

- 1) Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67: 869-877, 1991
- 2) Amagai M: Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 11: 319-352, 1996
- 3) Dmochowski M, Hashimoto T, Chidgey MAJ, Yue KKM, Wilkinson RW, Nishikawa T, Garrod DR: Demonstration of antibodies to bovine desmoglein isoforms in certain pemphigus sera. *Br J Dermatol* 133: 519-525, 1995
- 4) Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MAJ, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T: Human desmoglein 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 109: 127-131, 1997
- 5) Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakawa Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140: 351-357, 1999

Production of baculoproteins of desmogleins 1,2 and 3

Takashi Hashimoto¹, Yoshiko Nagata¹, Masayuki Amagai²

¹Department of Dermatology, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan,

²Department of Dermatology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

ELISA using baculoproteins of desmogleins (Dsg) 1 and 3 has been proved to be a useful method for detecting antibodies in pemphigus. In this study, we attempted to produce recombinant baculoproteins of desmogleins (Dsc) 1, 2 and 3, another desmosomal

cadherin. The extracellular domains of human Dsc1-3 cDNA with E-tag and His-tag in their C-terminus were inserted into a baculovirus expression vector, and were transfected to insect cells. The induced baculoproteins, which were purified from culture supernatants by Talon resin, were confirmed by immunoblotting using anti-E-tag and anti-Dsc polyclonal antibodies to have expected sizes. IgG and IgA anti Dsc1 antibodies in a particular pemphigus case was absorbed by the Dsc1 baculoprotein, although IgA antibodies of 4 SPD type IgA pemphigus were not absorbed. ELISA using these baculoproteins of Dsc1-3 should be useful to identify anti-Dsc autoantibodies in various cases of pemphigus.