

厚生労働科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成15(2003)年3月

目 次

I	班員構成	1
II	総括研究報告	
	稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究	3
	主任研究者 北島康雄 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌講座 皮膚病態学 教授	
III	分担研究報告・協力研究報告	
	[天疱瘡]	
	ナイーブ細胞移植を用いた天疱瘡モデルマウスの作製	11
	分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師	
	天疱瘡モデルマウスより作成した疾患誘導性モノクローナル抗体の解析	18
	分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師	
	デスモゾーム関連タンパクであるデスモヨーキンに関する研究	28
	分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学 教授	
	IgA 天疱瘡 (SPD 型, IEN 型) 自己抗体結合部位の免疫電顕的検討	33
	分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学 教授	
	Dsg1 ⁻ /Dsg3 ⁺ 尋常性天疱瘡抗体結合直後のデスモソーム構成分子の動態	37
	デスモグレイン3欠損デスモソーム形成過程に関する新しい実験的成績	
	主任研究者 北島康雄 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌講座 皮膚病態学 教授	
	血漿交換療法後の治療法による抗体価上昇抑制効果の検討	45
	主任研究者 北島康雄 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌講座 皮膚病態学 教授	
	[膿疱性乾癬]	
	重症度分類診断基準を用いた膿疱性乾癬患者の重症度階層化の試み	54
	分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯学総合研究科 皮膚・粘膜・結合織学分野 教授	
	膿疱性乾癬病変部における IL-8 mRNA 発現パターンの検討	59
	分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯学総合研究科 皮膚・粘膜・結合織学分野 教授	
	EGFR 過剰発現機構の解析	65
	研究協力者 本間 好 福島医科大学 生体情報伝達研究所・生体物質 教授	
	ゲノムワイドな遺伝的相関解析による乾癬感受性遺伝子の同定	68
	研究協力者 小澤 明 東海大学医学部皮膚科 教授	
	[表皮水疱症]	
	優性栄養障害型表皮水疱症の遺伝子解析	71
	—臨床症状と遺伝子変異の相関の検討—	
	分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚粘膜病学分野 教授	

Hallopeau-Siemens型栄養障害性表皮水疱症の遺伝子解析	75
— 4塩基挿入置換とナンセンス点変異 compound heterozygote の新規検証—	
分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚粘膜病学分野 教授	
遊走性環状紅斑を伴った単純型先天性表皮水疱症はケラチン5分子尾部の延長により生ずる	79
研究協力者 市來善郎 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌講座 皮膚病態学 講師	
遺伝子治療のための遺伝子導入効率増強に関する研究	85
分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授	
先天性表皮水疱症の遺伝子治療法開発	87
研究協力者 玉井克人 弘前大学医学部皮膚科学 助教授	
自己培養皮膚を用いた栄養障害型表皮水疱症の治療	90
分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授	
同種培養真皮を使用した先天性表皮水疱症（劣性栄養障害型）の治療	96
分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 助教授	
[水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症]	
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症及び参考疾患の全国疫学調査進捗状況	99
研究協力者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 助手	
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）におけるgenotype/phenotype相関の解析：	105
自験例および既報告例における検討	
分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 助教授	
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症に特徴的な過角化の形成機構の解析 第1報	108
分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学 講師	
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症に特徴的な過角化の形成機構の解析 第2報	111
分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学 講師	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	115
V 平成14年度総会プログラム	
平成14年度第1回総会プログラム	125
平成14年度第2回総会プログラム	128

[I]

班 員 構 成

班 員 構 成

研究者名	研究実施場所	職 名	主な研究分担
主任研究者 北島 康雄	岐阜大学医学部免疫 アレルギー内分泌 講座皮膚病態学	教授	天疱瘡、角化症、総括
分担研究者 橋本 隆 天谷 雅行	久留米大学医学部 皮膚科 慶應義塾大学医学部 皮膚科	教授 専任講師	天疱瘡（診断、発症 機序と治療） 天疱瘡（発症機序と 治療）
岩月 啓氏	岡山大学大学院医歯 学総合研究科 皮膚・粘膜・結合織 学分野	教授	膿疱性乾癬（疫学： 診断基準と治療指針、 発症機序と治療）
清水 宏 橋本 公二 金田 安史	北海道大学大学院医 学研究科皮膚粘膜病 学分野 愛媛大学医学部 皮膚科 大阪大学医学系研究 科分子治療学 遺伝子治療学	教授 教授 教授	先天性表皮水疱症 （遺伝子診断、発症 機序と治療） 先天性表皮水疱症 （再生医療治療） 難治性皮膚疾患の遺 伝子治療
池田 志孝 山本 明美	順天堂大学医学部 皮膚科 旭川医科大学医学部 皮膚科	助教授 講師	先天性魚鱗癬様紅皮 症、角化症、天疱瘡 （疫学と発症機序） 先天性魚鱗癬様紅皮 症、角化症（診断と 発症機序）

研究協力者 本間 好 小澤 明	福嶋県立医科大学 生体情報伝達研究所 生体物質研究部門 東海大学医学部 皮膚科	教授 教授	膿疱性乾癬（発症機 序） 膿疱性乾癬（病因遺 伝子と治療）
黒沢美智子	順天堂大学医学部 衛生学	助手	疫学（先天性魚鱗癬 様紅皮症、天疱瘡）
玉井 克人	弘前大学医学部 皮膚科	助教授	先天性表皮水疱症、 先天性魚鱗癬様紅皮 症（遺伝子治療）
市來 善郎	岐阜大学医学部免疫 アレルギー内分泌 講座皮膚病態学	講師	先天性表皮水疱症 （ケラチン病） 天疱瘡(治療)

[Ⅱ]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究（総括研究報告書）

主任研究者 北島康雄 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分分泌講座・皮膚病態学 教授

研究要旨 ①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症および④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症が調査研究対象である。それぞれの疾患について3年計画の第一年度として本編に述べるように研究目標、研究方法を設定し、主任研究者、分担研究者、研究協力者が協力し、あるいはそれぞれ個別に研究した。その結果、①天疱瘡においてはモデルマウスの作成、病原性を持つモノクローナル抗体の作成に成功した。また、抗体結合後の水疱形成過程とデスモソーム分子の動態、IgA水疱症の病態、血漿交換と大量免疫グロブリン併用療法について明らかにした。②膿疱性乾癬においては汎発性膿疱性乾癬治療ガイドライン中の重症度分類診断基準に準じた場合、過去の膿疱性乾癬患者がどのような頻度分布をとるのか検討し、汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインの内容を反映した改訂調査票で全国調査の必要性を明らかにした。膿疱性乾癬と尋常性乾癬のIL-8 mRNAの発現パターンを解析し、一方では、乾癬関連遺伝子の発現プロファイリング、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的相関解析を行い、これらの面の研究の重要性を示した。③表皮水疱症では、三次元培養皮膚の有用性を症例に用いて示した。遺伝子治療の基礎として長期遺伝子発現とマウス胎児皮膚で免疫寛容の誘導に成功した。④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症では、患者数推計のための一次調査を実施し、二次調査の基礎データを得た。遺伝子変異と臨床系の関連を症例について検討し、新しい知見を得た。電頭でも研究を開始した。

分担研究者名（所属機関名）

天谷雅行（慶應義塾大学医学部・専任講師）

橋本 隆（久留米大学医学部・教授）

岩月啓氏（岡山大学医学部・教授）

清水 宏（北海道大学医学部・教授）

橋本公二（愛媛大学医学部・教授）

金田安史（大阪大学医学部・教授）

池田志孝（順天堂大学医学部・助教授）

山本明美（旭川医科大学医学部・講師）

研究協力者名（所属機関名）

本間 好（福島県立医科大学医学部・教授）

小澤 明（東海大学医学部・教授）

黒沢美智子（順天堂大学医学部・助手）

玉井克人（弘前大学医学部・助教授）

市來善郎（岐阜大学医学部・講師）

A. 研究目的：

従来から難病指定疾患である①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症および本年度から研究対象に加えた④水疱型先天性魚鱗

癬様紅皮症が調査研究対象である。それぞれの疾患について3年計画の第一年度として以下に記述するような内容を研究目的とした。

①天疱瘡は抗自己表皮細胞接着分子抗体のため全身に水疱ができ、非常に悲惨な疾患である。自己抗体抗原分子の解明と抗体定量法は確立されたが、抗体発生の原因、抗体結合後の水疱形成機序は不明でこれら（EBM）に基づく的確な治療指針はない。また、一割ほどの極めて治療抵抗性難治性の患者群があり、ステロイドの副作用、敗血症などを併発し死に至る。現在は基礎研究成果を踏まえ特に難治性群に対する治療法指針を開発する時期にある。本年度は天疱瘡抗原 ELISA 法及び天疱瘡抗原ノックアウトマウス、天疱瘡モデルマウスを用いた天疱瘡水疱形成機序及び病的抗体産生の免疫学的機序の解明および症例解析から治療法に迫ることを目的とした。

②膿疱性乾癬は、発熱と全身の無菌性膿疱を特徴とする重症かつ希な再発性の疾患である。過去の特定疾患班研究によって疫学と臨床経験的な治療法を列挙し一応の治療指針を作成したが、病因、発症機序が不明であるため、不完全である。そこで、疫学的観点からさらに診断・治療指針の見直しと、あわせて基礎的に原因遺伝子の解明および膿疱の形成機序を炎症制御機構（サイトカイン、ケモカイン）異常の観点から明らかにすることを目的とした。

③表皮水疱症は、重症例では全身の水疱と瘢痕のために合指、四肢の運動制限を来し、極めてQOLの悲惨な状態になる。現在病因遺伝子の変異点は明らかになったので、その成果から病因遺伝子変異による臨床分類と遺伝子治療法と再生医学に基づく治療法の開発を行う。本年度は症例研究に基づく遺伝子解析と出生前診断法の確立、表皮再生法と臨床適応、および基礎的には変異遺伝子の修復、補填のための遺伝子導入法とその発現様態を細胞、動物レベルでの解析を目標とした。

④水疱型先天性魚鱗癬紅皮症（本邦推定患者数150～200名）では、生下時から発症し全身の角質層の強度な肥厚と剥奪のため悲惨な外観となりQOLは劣悪である。病因はケラチン遺伝子変異によるが、診断基準、疫学、治療法は不明であるので、これらの解明及び③と同様な研究が必須である。このような重症でかつ少数な患者救済のための治療研究は、上記①②③と同様に厚生労働省稀少難治性皮膚疾患調査研究班研究によってしか成し得ないので、この疾患の研究対象疾患として追加し、まず、3年間で診断基準を確立し、疫学的に本邦における実体を明らかにすることあわせてケラチン遺伝子異常と臨床症状の関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法（当該年度）：

①天疱瘡 1) 天疱瘡モデルマウスを作製

するためにナイーブ細胞移植を用いた。2) 病的活性モノクローナル抗体を単離するために、天疱瘡モデルマウスの脾細胞よりモノクローナル抗体を作成し、新生仔マウスを用いた受動免疫系及びハイブリドーマの腹腔播種法を用いた。3) 天疱瘡抗体結合後活性化されるデスモソーム分子群の動態変化を解析した。4) EBMによる新しい治療指針を開発を試みるために、リコンビナント天疱瘡抗原 ELISA 法による病因抗体価をモニターし、とくに血漿交換療法と大量免疫グロブリン療法を検討した。5) デスモコリンの天疱瘡抗原としての役割を検討した。6) 各種デスモソーム構成蛋白の天疱瘡水疱形成機序における関与を明らかにするために、まず、デスモヨーキンノックアウトマウスを作成した。

②膿疱性乾癬 1) 診断・治療ガイドラインの臨床的評価と予後解析を行うために、汎発性膿疱性乾癬治療ガイドライン中の重症度分類診断基準に準じた場合、過去の膿疱性乾癬患者がどのような頻度分布をとるのか検討した。2) 膿疱性乾癬の炎症反応を解析するために、膿疱性乾癬患者の生検標本を収集し、病変内における炎症性サイトカイン（IL-8, IL-6など）とエイコサノイド関連酵素（COX-1,2, LOX-1,2）の発現分析によって行った。3) 汎発性膿疱性乾癬の免疫遺伝学的背景、病態形成機序を解明することを目的とし、その前段階として、尋常性乾癬についてマイクロアレイを用いた乾癬関連遺伝子の発現プロファイリング、およびマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝的相関解析を行った。

③表皮水疱症 1) 出生前診断を含めた遺伝子カウンセリングを行うための基本的情報を得るために、COL7A1 遺伝子の変異検索を施行した。2) 栄養障害型表皮水疱症患者2例について自己三次元培養皮膚を作製し、移植を行い、自己三次元培養皮膚移植の有用性についての検討を行っ

た。3) 長期遺伝子発現のために魚類の transposon/transposase の共導入系を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を骨格筋に HVJ-liposome で導入実験、また Semliki forest virus のレプリケースを利用して RNA を増幅させる系を用い培養細胞や骨格筋で LacZ 遺伝子発現の増強実験を行った。4) 免疫反応回避方法の開発のために、マウス胎児皮膚に遺伝子導入することにより遺伝子産物に対する免疫寛容を誘導実験を行った。5) 真皮深層に達する難治性皮膚潰瘍に対して同種培養真皮による潰瘍治療を試みた。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 1) 参考疾患として非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (NBCIE)、葉状魚鱗癬 (LI)、Siemens 型水疱性魚鱗癬、家族性天疱瘡も含め、患者数について、特定疾患の疫学に関する研究班と共同で「全国疫学調査マニュアル」に基づいて実施した。2) 新症例の集積と既知あるいは文献発表症例におけるケラチン遺伝子変異と臨床像の関係解析を行った。

C. 結果と D. 考察:

①天疱瘡:

1) ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスから脾細胞を分離し、5x10⁷ 細胞を Rag2^{-/-}マウスへ移植した結果、移植後 2 週間で 20 匹中 16 匹の血中抗体価が上昇し、移植 3 週間で 15 匹に明らかな表現型を認めた。ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を自己抗原で免疫することなしに移植することで天疱瘡モデルマウスが作成されることを示せたことにより、自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫モデルマウスの作成法がより簡便により広く応用できることが示された。

2) 天疱瘡モデルマウスより 9 種のモノクローナル抗体 (AK mAb シリーズ) を作成し、そのうちの 1 種 AK23 は、ハイブリドーマ細胞をマウスに接種した際に天疱瘡の表現型を誘導した病的活性を持つものであった。さらに、詳細な 3 次元エピト-

プの解析により、AK23 は天疱瘡抗原である Dsg3 分子の接着面を認識していることが明らかとなった。他の明らかな病原性を示さない mAb は、接着面以外の部位を認識していた。以上の結果より、抗体による直接的な接着障害の誘導が、水疱形成を誘導する機序として少なくとも存在することが示唆された。

3) 培養表皮細胞を用いて 2 分間天疱瘡抗体で刺激し免疫複合体を形成させ、その後天疱瘡抗体フリーの培地で 30 分及び 5 時間培養し、天疱瘡抗体・Dsg3 免疫複合体の運命を抗ヒト IgG、抗 Dsg3 抗体、抗デスモプラキン抗体で観察したところ、30 分後には全ての分子が細胞間 (デスモソーム) に点線状と細胞表面または内部に点状に見られたが、5 時間後にはデスモソームはデスモプラキン、デスモコリン 3 抗体によって染色されるが、Dsg3 はほとんど消失し一部の細胞間のみ濃く残存していた。これは天疱瘡抗体結合によってデスモソームから Dsg3 がスクイズド・アウトされたことを示唆し、Dsg3 欠損デスモソームの形成過程の初期の変化である事を示唆する。

4) 免疫グロブリン大量療法の意義について ELISA 法による抗体価を指標として治療法を比較検討した。その結果、免疫グロブリン大量療法は血漿交換療法後の抗体価上昇を抑制することが明示された。

5) 免疫電顕法を用いて 6 例の IgA 天疱瘡 (SPD 型 3 例、IEN 型 3 例) 患者血清を使い、その抗原である desmocollin 1 の局在を検討した。3 例すべての SPD 型では主にデスモゾーム領域に金粒子の沈着を認め、対照的に IEN 型では主にデスモゾーム領域以外の細胞間に沈着を認めた。これらの疾患は異なった病理的機構がある推察される。

6) 免疫電顕法デスモヨーキンの生体内での機能を解明する目的でノックアウトマウスを作製した。遺伝子変異マウスの皮膚

組織像では表皮、真皮、付属器に異常なく、電子顕微鏡による微細構造の解析を行ったところ、デスモゾームを含む表皮細胞間接着構造の異常も認められなかった。

②膿疱性乾癬：

1) 重症度分類診断基準にあてはめた方法でスコア化する方法によると、登録された330症例のうち抽出できた症例は118例であった。第1の方法では、最高スコアを21点とした場合、(0-6点)；34例(28.8%)、(7-14点)；67例(56.8%)、(15-21点)；17例(14.4)のような得点分布が得られた。第2の方法で重症度分類基準にあてはめた場合、軽症(0-2点)；21例(17.8%)、中等症(3-6点)；79例(66.9%)、重症(7-10点)；18例(15.3%)の得点分布を得た。汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインの内容を反映した改訂調査票で全国調査の必要があると思われた。

2) 膿疱性乾癬と尋常性乾癬の IL-8 mRNA の発現パターンを解析したところ、その発現が異なることは、その病態が異なることを示唆するが、類似の膿疱性疾患と共通の病態があるのかさらに症例を増やして検討する必要があると思われた。

3) 乾癬患者由来角化細胞では恒常的に EGFR が過剰発現している。この原因として、転写因子 AP-2 の恒常性発現と EGFR 遺伝子の低メチル化が関与する可能性を見出した。

4) マイクロアレイを用いた大規模な発現遺伝子プロファイリングを行ったところ、約1,000の既知・未知遺伝子に病変部特異的な発現量の差異を認めた。また、マイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドに遺伝的相関解析を行ったところ、17番染色体については403個のマーカーのうち約60個に、19番染色体については274個のマーカーのうち約40個に相関が認められた。それらの中には、疾患感受性候補遺伝子領域に位置するマーカーも含まれていた。

③表皮水疱症：

1) 臨床的に爪甲萎縮が主体の DDEB の家系(4世代)について COL7A1 遺伝子検索を行ったところ、ミスセンス変異 G2028R を見出した。すでに全く無関係な2家系において報告されている臨床症状は、主症状が痒疹様結節と全く異なっていた。最重症型である Hallopeau-Siemens 型栄養障害性表皮水疱症(HS-RDEB)の COL7A1 遺伝子検索を行った結果、本症例が初めての新規4塩基挿入変異434ins GCAT ならびに新規ナンセンス点変異 R2261X を見いだした。臨床症状の相違は遺伝子多型もしくは遺伝子発現レベルにあると考えられた。

2) 患者2例について自己三次元培養皮膚を作製し、移植を行ったところ、機能的に著名な改善を認めた。三次元培養皮膚の新たな使用法として有用であると思われた。

3) 長期遺伝子発現のために魚類の transposon/transposase の共導入系を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を骨格筋に HVJ-liposome で導入し、6ヶ月以上にわたって発現させることに成功した。また Semliki forest virus のレプリケースを利用して RNA を増幅させる系を用い培養細胞や骨格筋で LacZ 遺伝子を通常のプラスミドと比較して10倍以上の発現増強を起こすことができた。

4) 免疫反応回避方法の開発：マウス胎児皮膚に GFP 発現プラスミドを導入することにより、GFP に対する免疫寛容を誘導し得た。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

1) 2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施した。調査対象科は皮膚科とし、全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した計807科を対象とした。結果は解析中で、これにより2時調査を来年度行う。

2) BCIE の genotype/phenotype 相関解析の結果、a) ケラチン1の変異が見られる例では掌蹠角化や手指拘扼を生じる例

があること、b) ケラチン10の変異例ではそれらが見られないこと、c) 両ケラチンの2Bドメインに変異が見られる例の一部は環状皮疹を生じること（よって cyclic ichthyosis や annular epidermolytic ichthyosis の病名で報告されている）、d) 家系内においても臨床症状に差異があること、などが示された。

3) 正常人および BCIE 患者の電子顕微鏡標本を観察し角質細胞間を接着している corneo-desmosome の形態の差異について検討した。BCIE 患者2名の観察では患者角層において corneodesmosome の細胞外領域の形態的異常が観察された。

4) corneodesmosome の細胞外部分に結合する蛋白、corneodesmosinの特異抗体を作成した。本抗体は Lowicryl K11M 樹脂包埋切片を用いた post-embedding immunoelectron microscopy 法にも使用可能であることが確認された。

倫理面への配慮

本研究において患者試料（生体組織、cDNA, 個人及び疫学情報）などの取り扱いについては患者に説明と同意を得た上でその管理には十分な配慮をする。また、実験動物使用時は動物実験指針に従い、動物に与える苦痛を最小とするため、接種時および淘汰時は麻酔下で実施し、また、使用動物数は必要最小限にとどめる。北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会運営委員会承認：「重症型遺伝性皮膚疾患の出生前診断、2000,4,25」、「委託供給された自家培養表皮を用いた先天性表皮水疱症治療に関する臨床研究、2000,10,2」、愛媛大学医学部附属病院臨床研究倫理委員会承認：「培養表皮シート自家移植；受付番号3、培養表皮シート他科移植；受付番号8-3、培養真皮移植；受付番号11-11、三次元培養皮膚移植；受付番号11-12」。慶應義塾大学医学部動物実験委員会承認：「承認番号012048」。

E. 結論

①天疱瘡においてはモデルマウスの作成、病原性を持つモノクローナル抗体の作成に成功した。また、抗体結合後の水疱形成過程とデスモソーム分子の動態、IgA 水疱症の病態、血漿交換と大量免疫グロブリン併用療法について明らかにした。②膿疱性乾癬においては汎発性膿疱性乾癬治療ガイドライン中の重症度分類診断基準に準じた場合、過去の膿疱性乾癬患者がどのような頻度分布をとるのか検討し、汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインの内容を反映した改訂調査票で全国調査の必要性を明らかにした。膿疱性乾癬と尋常性乾癬の IL-8 mRNA の発現パターンを解析し、一方では、乾癬関連遺伝子の発現プロファイリング、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的相関解析を行い、これらの面の研究の重要性を示した。③表皮水疱症では、三次元培養皮膚の有用性を症例に用いて示した。遺伝子治療の基礎として長期遺伝子発現とマウス胎児皮膚で免疫寛容の誘導に成功した。④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症では、患者数推計のための一次調査を実施し、2時調査の基礎データを得た。遺伝子変異と臨床系の関連を症例について検討し、新しい知見を得た。電頭でも研究を開始した。

以上の結果から本研究の3年計画の第一年度の目標はほぼ達せられたと考える。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表 本報告書巻末の別表に記載した。
2. 学会発表
 1. Grando SA, Arredondo J, Chernyavsky A, Kitajima Y, Nguyen VT. Mechanisms of pharmacologic regulation of keratinocyte adhesion by cholin-

- ergic drugs. 63rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2002
2. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky A, Pittelkow MR, Kitajima Y, Grando SA. Pemphigus vulgaris IgG and a corticosteroid exhibit reciprocal effects on keratinocyte adhesion molecules. 63rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2002
 3. Kitajima Y. Relationship between dermatology and industry. The 20th World Congress of Dermatology: Congress Mondial Dermatologie Paris, 2002
 4. Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. International Meeting on Bullous Diseases, 2002
 5. Ichiki Y, Gu LH, Kim SC, Park J, Sato M, Kitajima Y. A novel mutation, frameshift and delayed stop codon, in tail domain of keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. International Meeting on Bullous Diseases, 2002
 6. Nagai-Sato M, Yamamoto Y, Kitajima Y. Binding of bullous pemphigoid autoantibodies to BPAG2 causes internalization of $\alpha 6$ -integrin in cultured keratinocytes. 4th Joint Meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research and the Japanese Society for Ultrastructural Cutaneous Biology, 2002
 7. 北島康雄. シグナル伝達異常と細胞接着障害. 第92回日本麻酔科学会東海地方会, 2002
 8. 市來善郎, 江崎智香子, 和泉智子, 北島康雄. 水疱症: ELISA 値を参考にして—自己免疫疾患の治療指針—. 第53回日本皮膚科学会中部支部学会, 2002
 9. 河野通良, 外野善弘, 堀江恭二, 近藤玄, 竹田潤二, 橋本隆: 表皮デスモゾーム関連タンパク質デスモヨージンターゲットニングによる解析. 第25回日本分子生物学会, 横浜, 2002. 12
 10. 中村裕之, 澤村大輔, ラドゥカ ジェフ, リー ジェイ・ユ・ユン, 増永拓司, 清水宏: COL7A1 遺伝子に同じ G2028R 変異を有する優性栄養障害型表皮水疱症の臨床重症度は家系により大きく異なる. 日本研究皮膚科学会第27回年次学術大会・総会, 2002
 11. 松村和子, 澤村大輔, 中村秀樹, 清水宏: VII型コラーゲン遺伝子の4塩基挿入とナンセンス変異が検出された Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型表皮水疱症 (HS-RDEB). 日本研究皮膚科学会第27回年次学術大会・総会, 2002
 12. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K: Betacellulin is an autocrine growth factor for human epidermal keratinocytes, and its auto- and cross-induction are mediated via the JNK pathway. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, 2002. 5.15
 13. Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Efficient transgene expression in skin equivalent model using replication-deficient adenovirus vector system.

- 32nd annual meeting of the European Society for Dermatological Research, Geneva, 2002. 9.19
14. Hashimoto K, Shirakata Y, Yamasaki K: Cre-loxP adenovirus mediated foreign gene expression in skin equivalent keratinocytes. Symposia "GENE THERAPY" 20th World Congress of Dermatology, Paris, 2002. 6. 5
 15. Hashimoto K, Tohyama M: HHV-6 associated drug eruption (HADE). Symposia "CUTANEOUS DRUG ERUPTIONS & DRUG HYPERSENSITIVITY" 20th World Congress of Dermatology, Paris, 2002. 6.1
 16. 菊地夕子, 久保田恭子, 光石幸市, 池田志孝, 小川秀興: 大量 γ グロブリン療法が奏効した尋常性天疱瘡の1例. 日本皮膚科学会第775回東京地方会, 東京, 2002. 9. 21
 17. 篠塚暁子, 池田志孝, 橋本幸子, 三浦裕子, 小川秀興: 疱疹状天疱瘡の1例. 日本皮膚科学会第777回東京地方会, 東京, 2002. 11. 16
 18. 山本明美: 角化症の診断, 角化機構の解明における電顕の有用性. 第34回日本臨床電子顕微鏡学会, 札幌市, 2002. 9.27
 19. 関亦正幸, 本間好: MBD2 結合タンパク質 MIZF は塩基配列特異的転写制御因子である. 第25回分子生物学会年会, 2002
 20. 北村卓也, 関亦正幸, 佐藤弘一郎, 菊地臣一, 本間好: erbB2 発現調節機構における poly (ADP-ribose) polymerase の役割. 第25回分子生物学会年会, 2002
 21. 本間美和子, 本間好: CK2 による翻訳開始因子 eIF5 のリン酸化の役割. 第25回分子生物学会年会, 2002
 22. 本間美和子, 関亦正幸, 本間好: APC タンパクの CK2 活性制御ドメインによる増殖制御. 第75回生化学会大会, 2002
 23. 山鹿真幸, 関亦正幸, 藤井誠, 鎌田英明, 平田肇, 本間好, 八木澤仁: 新規 PLCd1 結合タンパク質 p122/RhoGAP は raft に存在する. 第75回生化学会大会, 2002
 24. Umezawa Y, Ozawa A, Kawashima M, Shimizu H, Terui T, Tagami H, Ikeda S, Ogawa H, Kawada A, Teduka T, Igarashi A, Harada S: A Guidelines for Generalized Pustular Psoriasis in Japan. The 6th Annual Meeting of the Korean Society for Psoriasis, Seoul, 2002, 5. 11
 25. Mabuchi T, Iizuka M, Umezawa Y, Matsuyama T, Kawakubo Y, Ozawa A, Okamoto K, Oka A, Tamiya G, Inoko H: Profiring Gene Expression in Psoriasis Vulgaris by Microarray Technology. The 6th Annual Meeting of the Korean Society for Psoriasis, Seoul, 2002. 5.11
 26. 梅澤慶紀, 生駒憲広, 塗木裕子, 飯塚万利子, 松山 孝, 川久保 洋, 小澤明: 小児膿疱性乾癬の1例. 第26回日本小児皮膚科学会学術大会, 東京, 2002. 5. 25-26
 27. Mabuchi T, Iizuka M, Umezawa Y, Matsuyama T, Kawakubo Y, Ozawa A, Okamoto K, Oka A, Tamiya G, Inoko H: Expression Profiring of Psoriasis Vulgaris Using Microarray Technology. 20th World Congress of Dermatology 2002, Paris, 2002. 7. 4-5
 28. Umezawa Y, Ozawa A, Kawashima M, Shimizu H, Terui T, Tagami H,

Ikeda S, Ogawa H, Kawada A, Teduka T, Igarashi A, Harada S: A Guideline for Treatment in Generalized Pustular Psoriasis. 20th World Congress of Dermatology 2002, Paris, 2002. 7. 4-5

29. 梅澤慶紀, 土井美果, 馬淵智生, 飯塚万利子, 松山 孝, 小澤 明: 汎発性膿疱性乾癬の2例. 第17日本乾癬学会, 鹿児島, 2002. 10. 11-13

H. 知的財産権の出願・登録状況 (平成14年度、予定も含む)

1. 特許取得

天疱瘡モノクローナル抗体

(特願2001-267653)

Pemphigus Monoclonal Antibody (PCT/JP02/08987)

炎症性皮膚疾患における *hRDH-E2* 遺伝子およびその応用

(2002年10月15日出願依頼票提出)

2. 実用新案登録

化学療法剤を封入した医薬製剤

(特願2002-320577)

3. その他

[Ⅲ]

分担研究報告・協力研究報告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ナイーブ細胞移植を用いた天疱瘡モデルマウスの作製

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師

研究要旨 以前我々は、rDsg3で免疫したDsg3^{-/-}マウス脾細胞をDsg3を発現するレシピエントマウス(Rag2^{-/-}マウス)へ移植することで、PVモデルマウスの作製に成功した。本研究では、rDsg3で免疫せずにDsg3^{-/-}マウスのナイーブな脾細胞がレシピエントマウス内において内在性のDsg3により刺激され、抗Dsg3 IgG抗体を産生し、天疱瘡の表現型を誘導するか検討した。ナイーブなDsg3^{-/-}マウスから脾細胞を分離し、5x10⁷細胞をRag2^{-/-}マウスへ移植した。移植後2週間で20匹中16匹の血中抗体価が上昇し、移植3週間で15匹に明らかな表現型を認めた。表現型を示したマウスの口蓋では粘膜上皮細胞間にIgGの沈着を認め、病理組織学的に基底膜直上での棘融解が確認された。免疫したDsg3^{-/-}マウスの脾細胞移植によるモデルマウスとの表現型の明らかな差は認めなかった。次に、移植する脾細胞の数を5x10⁷、4x10⁷、2x10⁷、1x10⁷、0.25x10⁷、0.06x10⁷個に希釈してRag2^{-/-}マウスへ移植した。移植6週間後において抗体産生陽性個体の割合は5x10⁷細胞を移植した群では80%、次いで4x10⁷細胞群では70%とその割合は用量依存的に減少した。ナイーブなDsg3^{-/-}マウスの脾細胞を自己抗原で免疫することなしに移植することで天疱瘡モデルマウスが作成されることを示せたことにより、自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫モデルマウスの作成法がより簡便により広く応用できることが示された。

共同研究者

西川武二 慶應義塾大学医学部教授
角田和之 慶應義塾大学医学部助手
大田孝幸 慶應義塾大学医学部大学院生
青木三代 慶應義塾大学医学部皮膚科

米国 Taconic 社より購入したマウスを使用した。

A. 研究目的

組み換えマウス Dsg3 で免疫せずに、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞が Rag2^{-/-}マウス内において内在性の Dsg3 により刺激され、抗 Dsg3 IgG 抗体を産生し、天疱瘡の表現型を誘導するか検討した。

B. 研究方法

a) Dsg3^{-/-}マウス

米国 Jackson laboratory より得られたマウスを使用した。

b) Rag2^{-/-}マウス

c) ナイーブ脾細胞の移植

以前の方法では、免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を 1 匹あたり 1x10⁷個ずつ移植していた。今回は、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスから脾細胞を分離し、マウス一匹あたり 5x10⁷細胞/500ul PBSになるように調整し Dsg3 を正常に発現する Rag2^{-/-}マウスに静脈内投与した(n=20)。また、コントロールとして、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスから分離した脾細胞をマウス一匹あたり 5x10⁷細胞/500ul PBSに調整し、Rag2^{-/-}マウスに静脈内投与した(n=10)。各群の抗体価の推移を観察するために、移植後14、28、42日目の血清を採取した。

d) Limiting dilution を用いたナイーブ脾細胞の移植

ナイーブな Dsg3^{-/-}マウス内における、Dsg3 に特異的なリンパ球の頻度を検討するために、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスから分離した脾細胞を 5x10⁷、4x10⁷、2x10⁷、1x10⁷、0.25x10⁷ および 0.06x10⁷ 個/mouse になるように 500ul の PBS で調整し、Rag2^{-/-}マウスに静脈内投与した。これらのマウスも同様に移植後 14、28、42 日目に血清を採取し、抗 Dsg3 抗体産生の検出に用いた。

e) ELISA

血中の抗 Dsg3 抗体価は、組み換えマウス Dsg3 を抗原として用いた ELISA 法にて測定した。同様に抗 Dsg1 抗体価は、組み換えマウス Dsg1 を抗原として用いた ELISA 法にて測定した。

f) 直接蛍光抗体法 (DIF)

抗 Dsg3 抗体の粘膜上皮細胞間への沈着は、42 日目に採取したマウス口蓋を基質とした直接蛍光抗体法により検討した。

g) 肉眼的表現型の検討

ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスおよび Dsg3^{+/-}マウスの脾細胞を移植したレシピエントマウスの肉眼的表現型について rDsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を移植した PV モデルマウスと比較検討した。

C. 研究結果

5x10⁷細胞を移植したマウスでは、移植後 2 週間で 20 匹中 16 匹の血中抗体価が上昇し、移植 3 週間で 15 匹に明らかな表現型を認めた。産生された抗体は、観察期間を通して Dsg1 に反応性を示すことはなく、Dsg3 特異的なものであった。また、Dsg3^{+/-}マウスの脾細胞を移植したマウスにおいては、Dsg3 に反応性を示す抗体は全く産生されなかった。

抗体産生を示したマウスの口蓋では、粘膜上皮細胞間に IgG の沈着を認め、病理

組織学的に、尋常生天疱瘡に特徴的な所見である基底層直上での裂隙形成が確認された (図1)。一部のモデルマウスでは、口腔内に広範囲に認められたびらんにより、摂食障害が生じたためと考えられる前歯の過長が認められた。また、一部のマウスでは、鼻および眼周囲などの通常搔爬する部位や、足底などの物理的刺激を受けやすい部位に一致して痂皮を伴うびらんを認めた。これらの所見において、免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞移植によるモデルマウスとの間に明らかな差は認めなかった。以上のことから、Dsg3^{-/-}マウス内の免疫寛容による除去あるいは不活化を逃れた Dsg3 特異的リンパ球 (T細胞、B細胞) は、レシピエントマウスへ移植後、*in vivo* の状態で内在性の Dsg3 に出会い、活性化され、抗 Dsg3 抗体を産生することが示された。

次に、Limiting dilution した細胞を移植後 42 日目に ELISA および DIF により抗 Dsg3 抗体産生を検出した結果、5x10⁷細胞移植したマウスでは 80% で抗 Dsg3 抗体の産生が認められたが、4x10⁷細胞では 70%、2x10⁷細胞では 60% と抗体産生陽性個体の割合は用量依存性に減少した。また、0.25x10⁷細胞を移植したマウスでは、12 匹中で抗体産生を示したのは 1 個体だけであったが、0.06x10⁷細胞移植したマウスでは、陽性個体は 1 匹も検出されなかった (図2)。抗体産生機序における T細胞と B細胞の相互機構については未知な部分が多く、この結果を Dsg3 に特異的な T細胞と B細胞の頻度に当てはめることはできないが、抗 Dsg3 抗体の産生が可能な脾細胞の組み合わせは、0.25x10⁷脾細胞あたり 1 個あるいは数個存在するのではないかと考えられた。

D. 考察

以前我々が報告した PV モデルマウスの作製法では、Dsg3^{-/-}マウスを rDsg3 で繰り返し刺激することで Dsg3 特異的な T細胞と B細胞の頻度を増加させ、レシピエン

トマウス 1 匹あたりに免疫した脾細胞を 1×10^7 個ずつ移植することで PV モデルマウスを作製していた。今回、Limiting dilution で移植した脾細胞の数に依存して抗体産生個体の割合が変化し、 5×10^7 個移植すれば免疫した場合と同程度の効率で PV モデルマウスの作製が可能であったことから、抗体産生を十分に起こすだけの Dsg3 反応性リンパ球の頻度があれば、未免疫の Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を移植するだけでもモデルマウスの作製が十分に可能であることを示唆している。そして、この方法においては、組み換え蛋白の作製および調整が不要であり、自己抗原ノックアウトマウスを免疫するステップも省略できることから、疾患モデル動物の作製を簡便に短期間でできる点で非常に有用であると考えられた。すなわち、組み換え蛋白の作製が困難な自己抗原に対する自己免疫疾患においても、ノックアウトマウスの脾細胞を移植することにより臓器特異的自己免疫性疾患モデルマウスを作製できる可能性を示唆している。

また、今回用いた Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞は、外来抗原である rDsg3 で免疫していないため、レシピエントマウス内の内在性の Dsg3 によって、初めて抗原刺激を受けるという点で以前のモデルマウスとは異なっていると考えられる。すなわち、生着したナイーブな Dsg3^{-/-}マウス由来の脾細胞はリンパ器官において、抗原提示細胞によって末梢抗原として Dsg3 を提示されることで分化すると考えられる。この、内在性の Dsg3 を認識して初めて抗体産生するという点では、免疫した脾細胞を用いた系よりもヒト PV における抗 Dsg3 抗体産生機序に近いと考えられ、今後 PV における水疱形成機序の解明に非常に有用であると考えられた。

E. 結論

ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を自

己抗原で免疫することなしに移植することで天疱瘡モデルマウスが作成されることを示せたことにより、自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫モデルマウスの作成法がより簡便により広く応用できることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表（平成14年度）

英語論文

1. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, and Nishikawa T. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmoglein 1 and 3. **Br J Dermatol** 147:261-265, 2002.
2. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **Eur J Immunol** 32:627-633, 2002.
3. Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, and Stanley JR. Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. **J Invest Dermatol** 118:845-850, 2002.
4. Campo-Voegeli A, Muniz F, Casals M, Mascaro JM, Garcia F, Arimany JL, Amagai M, and Camps A. Neonatal pemphigus vulgaris with extensive mucocutaneous lesions from a mother with oral pemphigus vulgaris. **Br J**

- Dermatol** 147:801-805, 2002.
5. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Umezawa A, Hata J, and Nishikawa T. Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 118:199-204, 2002.
 6. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Brocker E, and D. Z. Increased incidence of pemphigus vulgaris in Southern Europeans living in Germany compared to native Germans. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 16:68-71, 2002.
 7. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fubada Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, and Stanley JR. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 110:53-60, 2002.
 8. Amagai M. Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. **Keio J Med** 51:133-139, 2002.
 9. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, and Sugai M. Identification of *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect Immun** 70:5835-5845, 2002.
 10. Oiso N, Yamashita C, Yoshioka K, Amagai M, Komai A, Nagata Y, Hashimoto T, and Ishii M. IgG/IgA Pemphigus with IgG and IgA anti-desmoglein 1 antibodies detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Br J Dermatol** 147:1012-1017, 2002.
 11. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, and Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30:224-232, 2002.
 12. Fujimoto W, Kanehiro A, Kuwamoto-Hara K, Saitoh M, Nakakita T, Amagai M, Arata J, and Iwatsuki K. Paraneoplastic pemphigus associated with Castleman's disease and asymptomatic bronchiolitis obliterans. **Eur J Dermatol** 12:355-359, 2002.
 13. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. The ultrastructural changes of mice actively producing antibodies to desmoglein3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. **Arch Dermatol Res** 294:318-323, 2002.
 14. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, and Hashimoto K. Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. **J Invest Dermatol** 119:1224-1230, 2002.
 15. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the

- amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol** 170:2170-2178, 2003.
16. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. **J Am Acad Dermatol** 48:244-252, 2003.
 17. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska, Amagai M., Nagata Y, Strasz Z, and Jabłonska S. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. **J Am Acad Dermatol** 48:117-122, 2003.
 18. Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: An implication for gene therapy. **J Invest Dermatol** :in press, 2003.
 19. Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M., Pieczkowski F, F_dinger D, Kirnbauer R, and Stingl G. 230 kDa and 190 kDa proteins in addition to desmoglein 1 as immunological targets in a subset of pemphigus foliaceus with a combined cell surface and basement membrane zone immune staining pattern. **Exp Dermatol**:in press, 2003.
 20. Amagai M. Active disease mouse model for pemphigus. **Ann Dermatol Venereol**:in press, 2003.
 21. Nagata Y, Velez AMA, Amagai M., Ogawa MM, Kanzaki T, and Hashimoto T. Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **J Dermatol Sci**:in press, 2003.
- 英語著書**
1. Amagai M. Pemphigus. In Dermatology. Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, Siegfried E, Salasche S, Stingl G, Horn T, Mascaro J, and Saurat JHeditors. London: Harcourt Health Sciences. in press. 2003.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）**
- 特許出願 2 件
- 天疱瘡モノクローナル抗体
（特願2001-267653）
- Pemphigus Monoclonal Antibody
(PCT/JP02/08987)