

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成16(2004)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]	
	デスマグレイン4に対する天疱瘡自己抗体反応性の検討	15
	分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師	
	Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウスを用いた B 細胞トレランスの解析	21
	分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師	
	培養角化細胞 (DJM-1) における尋常性天疱瘡病原性抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK23) による Dsg3 分子欠損デスモソームの形成	28
	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・類天疱瘡寛解期における臨床症状と ELISA 抗体価の推移による維持療法の検討	38
	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	
	免疫電顕法を用いた腫瘍随伴性天疱瘡患者における自己抗体が認識するエピトープの検討	46
	分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学 教授	
	エンボプラキン・ペリプラキンと中間径線維の細胞生物学的相互作用の検討	51
	分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学 教授	
	天疱瘡の予後調査：順天堂大学症例の検討	58
	分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科学 助教授	
	天疱瘡患者の遺伝的背景 第1報 患者試料収集体制の確立	63
	研究協力者 新関寛徳 奈良県立医科大学皮膚科学 講師	
	[膿疱性乾癬]	
	日本乾癬学会登録データからの膿疱性乾癬症例の抽出・解析	70
	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	
	汎発性膿疱性乾癬 QOL 調査進捗状況	77
	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	
	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	87
	研究協力者 小澤 明 東海大学医学部専門診療学系皮膚科学 教授	
	汎発性膿疱性乾癬の治療に関する研究	89
	研究協力者 小澤 明 東海大学医学部専門診療学系皮膚科学 教授	
	乾癬ゲノムのエピジェネティック解析	91
	研究協力者 本間 好 福島県立医科大学・生体情報伝達研究所・生体物質 教授	

膿疱性乾癬の病因と治療—乾癬における IL-8 と補体成分 C3 の免疫組織学的検討—	94
研究協力者 照井 正 東北大学大学院医学系研究科皮膚科学分野 助教授	
膿疱性乾癬の病態と治療に関する研究	98
研究協力者 小宮根真弓 東京大学医学部附属病院皮膚科 講師	
[表皮水疱症]	
VII型コラーゲン遺伝子における alternative splicing	104
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	
劣性栄養障害性表皮水疱症患者に発症した多発有棘細胞癌—本症における易発癌性に関する研究—	111
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	
栄養障害型表皮水疱症患者由来角化細胞へのVII型コラーゲン遺伝子導入	118
分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授	
超音波造影法を用いた遺伝子導入による In vivo 遺伝子機能解析	125
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	
栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療法開発	127
研究協力者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 助教授	
遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症の発症機序の分子医学的解析	130
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秘講座皮膚病態学 講師	
[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	136
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) に特徴的な過角化の形成機構の解析	
コルネオデスモゾームの異常	142
分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学 講師	
ケラチン病の発症機構に関する研究	148
研究協力者 米田耕造 秋田大学医学部感覚器学講座皮膚科学形成外科学 講師	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	153
V 平成15年度総会プログラム	
平成15年度第1回総会プログラム	163
平成15年度第2回総会プログラム	166

[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	久留米大学医学部皮膚科	教授	天疱瘡（診断、発症機序と治療）
天谷 雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師	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（発症機序と治療、疫学、診断基準と治療指針）
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	先天性表皮水疱症（遺伝子診断）
橋本 公二	愛媛大学医学部皮膚科学	教授	先天性表皮水疱症（再生医療治療）
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	難治性皮膚疾患の遺伝子治療
池田 志孝	順天堂大学医学部皮膚科	助教授	先天性魚鱗癬様紅皮症、角化症、天疱瘡（発症機序と統計）
山本 明美	旭川医科大学医学部皮膚科学	講師	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	福島県立医科大学生体情報伝達研究所生体物質研究部門	教授	膿疱性乾癬（発症機序）
小澤 明	東海大学医学部専門診療学系皮膚科学	教授	膿疱性乾癬（病因遺伝子と治療）
照井 正	東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座皮膚科学分野	助教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
小宮根真弓	東京大学医学部皮膚科	講師	膿疱性乾癬（発症機序）、先天性魚鱗癬様紅皮症
黒沢美智子	順天堂大学医学部衛生学	助手	天疱瘡、先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬様紅皮症（統計学、疫学）
新関 寛徳	奈良県立医科大学皮膚科学	講師	天疱瘡（病因遺伝子と治療）
玉井 克人	大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学	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）
米田 耕造	秋田大学医学部感覚器学講座皮膚科学形成外科学	講師	ケラチン病の病態先天性魚鱗癬様紅皮症
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]

總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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年計画の第二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天疱瘡においては前年度作成したモデルマウスおよび病原性を持つモノクローナル抗体を用いてB細胞免疫寛容獲得の機序および抗体結合後の水疱形成過程とデスモソーム分子の動態を明らかにした。症例の解析から天疱瘡の長期予後や寛解期の治療方針を検討するとともに、遺伝的背景に関する調査を開始した。また腫瘍随伴性天疱瘡の病態も解明した。②膿疱性乾癬においては日本乾癬学会の登録データから111例を抽出解析し、さらに当研究班で全国561施設を対象にQOL調査を開始した。また膿疱性乾癬病変部における補体、ケモカイン、その抑制分子等を解析し、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、栄養障害型表皮水疱症における原因であるVII型コラーゲンの発現制御機構を解析するとともに、表皮細胞への遺伝子導入法や治療用発現ベクターのプロモーター開発に着手した。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票を全国507施設から回収し、二次調査を開始した。また電顕および免疫電顕でコルネオデスモゾームの異常を確認し角質肥厚の機序解明の端緒を得た。

分担研究者名（所属機関名）

橋本 隆（久留米大学・教授）

天谷雅行（慶應義塾大学・専任講師）

岩月啓氏（岡山大学・教授）

清水 宏（北海道大学・教授）

橋本公二（愛媛大学・教授）

金田安史（大阪大学・教授）

池田志孝（順天堂大学・助教授）

山本明美（旭川医科大学・講師）

研究協力者名（所属機関名）

本間 好（福島県立医科大学・教授）

小澤 明（東海大学・教授）

照井 正（東北大学・助教授）

小宮根真弓（東京大学・講師）

黒沢美智子（順天堂大学・助手）

新関寛徳（奈良県立医科大学・講師）

玉井克人（大阪大学・助教授）

米田耕造（秋田大学・講師）

市來善郎（岐阜大学・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表皮水疱症および昨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2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。そこで、昨年度までに天疱瘡モデルマウスを作成、病原性モノクローナル抗体 AK23 と非病原性 mAb から構造的特徴を示した。また、天疱瘡抗体・Dsg3 免疫複合体の運命を示した。本年度は天疱瘡モデルマウスを用いた天疱瘡水疱形成機序ならびに病的抗体産生の免疫学的機序の解明、また天疱瘡抗原 ELISA 法を用いた症例解析による治療法の提示さらに治療指針作成、および QOL の観点から予後調査開始を目的とした。

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、昨年度までに重症度分類診断基準でスコア化による解析の結果、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ので、その調査を行う。また、EBM に基づいて診断・治療のガイドライン、臨床調査個人票を改訂し（データベース化）、患者 QOL と予後調査を行う。また、基礎的には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し、炎症形成機序連鎖に対する治療目標点を追求する。あわせて基礎的に原因遺伝子の解明も図る。

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。そこで、昨年度、新しい遺伝子変異が見つかり、遺伝子型・臨床型の関係も明らかになりつつあること、また自家培養植皮法も良い結果を得つつあるので、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を継続して行う。また、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（K 1 または K10）遺伝子変異によるが、臨床診断基準、疫学、治療法は不明である。そこで、昨年度患者数推定の一次調査を行ったので、その二次調査を行う。診断基準を確立し、本邦における実体を疫学的に明らかにすること、さらにケラチン遺伝子異常と臨床症状発症の関係を解明することを目的とした。

B. 研究方法

①天疱瘡

1) ヒト Dsg4 組換え蛋白を用い、天疱瘡患者における血清の Dsg4 との反応性について免疫沈降法で検討した。

2) 天疱瘡モデルマウスより単離された抗 Dsg3 モノクローナル抗体 AK7（Dsg3 との反応性は示すが、水疱誘導はない）より、可変領域の cDNA を単離し、Dsg3 反応性 B 細胞トランスジェニックマウスを作成し B 細胞トレランスを解析した。

3) 天疱瘡における水疱形成機序を解明するために、病原性 Dsg3 モノクローナル抗体（AK23）結合後に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) 腫瘍随伴性天疱瘡（PNP）は、悪性または良性腫瘍に伴い発症する自己免疫性水疱症であり、多くの抗原蛋白に対する自己抗体を有することが特徴的である。PNP 患者血清を使い、そのエピトープの局在を post-embedding 法を用いた免疫電顕法にて検討した。

5) PNP の病態形成とエンボプラキンとペリプラキンの関与を明らかにするための基礎的研究として、エンボプラキン・ペリプラキンと中間径線維との相互作用を蛋白オーバーレイ法を用いて検討した。

6) 天疱瘡・類天疱瘡寛解期における臨床症状と ELISA 抗体価の推移による維持療法を検討した。

7) 天疱瘡の予後を明らかにする目的で、順天堂大学医学部皮膚科外来で1981年から2001年の間に少なくとも1年以上治療あるいは経過観察を行った天疱瘡患者69例につき予後調査を行った。

8) 天疱瘡発症における遺伝的背景の関与を明らかにするために、天疱瘡患者においてゲノムワイドにマイクロサテライト多型の検討を開始した。

②膿疱性乾癬

1) 膿疱性乾癬の病像は多彩であり、その病因もいまだ不明である。最近の膿疱性乾癬の動向を把握するために、1995年から2001年までに登録された日本乾癬学会のデータより膿疱性乾癬症例を抽出し解析を実施した。

2) 全国の多施設を対象に膿疱性乾癬患者の受診状況を調査し、さらに二次調査で Quality of life (QOL) 調査を計画した。対象は、2003年1年間の受診患者とし、調査対象科は皮膚科とした。2004年1月に受診状況把握のための一次調査を日本皮膚科学会認定専門医研修指定施設として登録されている561施設に対して実施した。

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、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。

4) 尋常性乾癬や膿疱性乾癬の病態形成にエピジェネティック因子が関与するかどうかを明らかにするために、ゲノム DNA のメチル化状態を簡便に検出できるゲノムアレイシステムを開発し、尋常性乾癬および膿疱性乾癬の血液から採取したゲノムの解析を開始した。

5) 膿疱性乾癬6例に対して2002年度研究班で作成された「GPP 治療ガイドライン2002」に基づいた治療を行い、「GPP 治療ガイドライン」の有用性について検討し

た。

6) 膿疱性乾癬の病因解明のために乾癬の病変部における好中球走化因子である IL-8 と補体成分 C3 の局在を免疫組織学的に調べ、さらに、補体に関しては C3a と C3b に対する二つの抗体を使い局所での補体の活性化の有無を検討した。

7) 表皮細胞から産生されるケモカインは、膿疱性乾癬をはじめとする炎症性皮膚疾患の成立に必要である。表皮細胞の細胞株である HaCaT 細胞から産生されるケモカイン TARC および CTACK を抑制する分子について検討した。

③表皮水疱症

1) 栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子である VII 型コラーゲンは、表皮と真皮の結合に重要であると考えられている。VII 型コラーゲン遺伝子における alternative splicing の存在とその意義を検討した。

2) 栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療の開発の目的で、VII 型コラーゲン遺伝子を角化細胞に導入し、その蛋白発現を共焦点レーザー顕微鏡、ウェスタンブロット法にて検討した。

3) 難治性皮膚疾患の遺伝子治療のためには安全で効率のよいベクターシステムばかりではなく、治療に適した遺伝子を選別する必要があり、そのためには生体組織での遺伝子機能を解析することが求められている。超音波造影法を用いて、マウス胎仔皮膚への HB-EGF 遺伝子導入による皮膚組織の変化について解析した。

4) 栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のために、水疱部皮膚への遺伝子導入方法の開発ならびに治療用発現ベクターの安全性を向上させるプロモーター開発を検討した。

5) 劣性栄養障害性表皮水疱症 (RDEB) 罹患患者に多数の有棘細胞癌が生じた症例を検討した。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症

1) 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。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)、家族性天疱瘡の一次調査も合わせて実施した。

2) K1, K10のロッドドメインの異常による疾患である水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(BCIE)における角質肥厚の機序を解明するために、患者表皮のコルネオデスマゾームを形態学的に検討した。またコルネオデスマシン抗体を作成した。

3) 表皮水疱症に代表されるケラチン病において、細胞が壊れる過程に至る分子メカニズムを明らかにすることを目的としてHaCaT細胞に変異K14をトランスフェクションしてTNF- α の産生およびアポトーシスの有無を観察した。

C. 研究結果と D. 考察

①天疱瘡

1) 天疱瘡患者血清中には新しいデスマグレインDsg4のみを認識する自己抗体は存在せず、抗Dsg1抗体の一部がDsg4と交差反応することが初めて明らかにされた。これは天疱瘡における自己抗体産生機序を考える上で、重要な知見であると考えられた。

2) AK7モノクローナル抗体から作成されたB細胞トランスジェニックマウスを用いた解析では、Dsg3反応性B細胞は、除去、不活化も受けずに末梢リンパ組織に存在することが明らかにされ、除去あるいは不活化による免疫寛容からエスケープしていることが示唆された。

3) Dsg3 N末接着機能ドメインに対する抗体で、かつ、病原活性のあるマウスモノクローナル抗体AK23のDsg3への結合は尋常性天疱瘡抗体(PV-IgG)と同様に、Dsg3欠損デスマゾームを形成することが示された。このことから尋常性天疱瘡発症にはDsg3が欠損した脆弱なデスマゾームが、深く関わっていることが示唆された。

4) 多くのPNP血清は細胞内、特にエンボプラキン、ペリプラキンが存在するといわれているintermediate filamentsに一致して金粒子の沈着を認めた。PNPの病理組織で表皮細胞壊死がおこるメカニズムとの関連性の解析が必要であると推測された。

5) ペリプラキンが直接、中間径線維に結合することが示された。ペリプラキンは表皮のみならず他の臓器の上皮細胞にも発現している。中間径線維と結合するペリプラキンとPNP抗体の結合が、多彩な病像の形成に関与している可能性が示唆された。

6) 寛解期の自己免疫性水疱症の症例について、ELISA法による抗体価の再上昇がみられた際の治療法による臨床経過の推移を検討した。抗体価の上昇がみられたら、抗体価の安定を確認するまで治療の減量は行わず、上昇傾向が続く場合は少量のステロイドや免疫抑制剤を追加することが症状再発の回避に導くと考えられた。治療の指標として抗体価と臨床症状の両者のモニタリングを行うことにより、より少ない副作用でより効果の高い治療を多くの医師が標準的に行う能力を養うことができると期待された。

7) 天疱瘡の27%以上の症例が「治癒」、さらに44%以上の症例が「寛解」に至っていることが明らかとなった。天疱瘡においては、致死率は非常に低くなっており、多くの症例が「寛解」および「治癒」の状態にあることが明らかとなった。本症の発症機序解明、治療ガイドライン改訂、新治療法開発などのため、今後さらに「治癒」症例の詳細な解析を行う必要があると考えられた。

8) 天疱瘡患者においてゲノムワイドにマイクロサテライト多型の検討を計画し、6施設において当該課題に関する倫理審査を申請し、承認された施設より順次患者の登録を開始した。50例の天疱瘡患者が登録され、登録の重複はなかった。

②膿疱性乾癬

1) 111名(男性42名、女性69名)の患者が登録されており、発症年齢分布では女性の若年者が多く、小児は13例(男児1例、女児12例)であった。111名のうち、37%が以前に膿疱性乾癬の既往があった。治療では、ステロイド、レチノイドを軸にPUVA、シクロスポリンが併用されることが多く、これまでの治療に不応性の難治例に対しては新しい治療法を導入する必要があると思われた。小児膿疱性乾癬の治療では、レチノイド・抗炎症剤が主体であったが、シクロスポリン内服が増加傾向を示していた。レチノイドの小児成長期に対する副作用の問題等、その投与に慎重であることを考慮すると、小児においては、シクロスポリンも一つの選択し得る治療の柱となる可能性があると思われた。

2) 2003年1年間に膿疱性乾癬患者が受診したと回答した施設は160施設あった。これら施設に受診した患者は計362名でその内訳は男性患者165名、女性患者197名(男女比1:1.19)で、男女比はこれまでの報告1:1.2とほぼ一致していた。

3) 解析を予定している27,158個のマイクロサテライトマーカーのうち90%以上にあたる25,555個の解析を終了し、2,395個に有意な相関が認められた。また、第6染色体HLA領域においては、1次スクリーニングで有意な相関を示したマーカーについて2次スクリーニングおよびIndividual typingを行った。その結果、既報告の疾患感受性候補遺伝子領域にも有意な相関が認められた。

4) 乾癬患者および正常由来のゲノムを用いて、600遺伝子のプロモーターCpG islandのメチル化状態をスクリーニングした。その結果、両方でメチル化状態の異なる遺伝子が存在することが明らかとなった。病態メカニズムの理解や新しい診断方法・治療法の確立へ応用が期待された。

5) GPP6例についてGPP治療ガイド

ライン2002で重症度判定を行いCYA治療を行った結果、6例中5例で有効性が認められた。また、CYAが無効であった症例についても重症度判定に基づきエトレチナート治療を行い、最終的に症状の改善を認めた。以上より本ガイドラインの臨床的有用性が示された。

6) 尋常性乾癬における角層下膿疱形成過程において、IL-8は好中球が表皮に浸潤する際に必要であるが、組織での濃度勾配を考慮すると、表皮に浸潤した好中球がさらに角層下に至る過程ではC3が補体の活性化を促進し、その結果生じる好中球遊走因子であるC5aが角層下への好中球集積に重要な働きをしていることが示された。

7) マクロライド系抗生物質であるロキシスロマイシン、NF κ B阻害剤であるParthenolide、Bay11-7085、p38阻害剤であるSB202190が表皮細胞によるケモカインTARC、CTACKが産生を抑制した。これらの物質およびこれらに類似の作用を持つ物質は、膿疱性乾癬の治療薬として有用である可能性が示唆された。

③表皮水疱症

1) 栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子であるVII型コラーゲン遺伝子に存在するalternative splicingを発見した。さらに、創傷治癒に関与するTGF- β を培養表皮細胞に加えるとそのalternative splicingが増加すること、また潰瘍周辺の表皮細胞ではそのalternative splicingが増強されていることが明らかになった。以上より、このalternative splicingは表皮真皮の結合に変化をもたらし、創傷治癒や皮膚のremodelingに関与すると推測された。

2) 角化細胞に導入したVII型コラーゲンは、共焦点レーザー顕微鏡所見で正常角化細胞、患者由来角化細胞ともに細胞質にその蛋白の発現を認めた。しかしウェスタンブロット法では160kD付近のバンドが認められたため、発現した蛋白は分解産物の可能性が示唆され、プロモーターの選択を

検討する必要があると考えられた。

3) 超音波造影法による遺伝子導入は遺伝子治療としてはさらに改善すべきところがあるが、In vivoでの遺伝子機能解析には非常に有効で、マウス胎仔から成育マウスに至るまで、また標的臓器にしぼって機能を解析することも可能であり、今後治療遺伝子の検索や評価に汎用されることが期待された。

4) 超音波および造影剤を用い、水疱部皮膚に対する低侵襲性遺伝子導入法を開発した。この方法を応用することにより、栄養障害型表皮水疱症の水疱部表皮細胞内にⅦ型コラーゲン発現ベクターを導入する遺伝子治療が可能になると考えられる。またCOL7A1プロモーターのクローニングを行った。4000塩基対のDNAはCOL7A1プロモーター領域全体をカバーするため、このプロモーターを用いてⅦ型コラーゲンcDNAを発現することによって、より生理的に近い状態での遺伝子治療の可能性が示唆された。

5) COL7A1遺伝子検索を行った結果、フレームシフトを生じ下流のexon73で停止コドンを生じる欠失5818delCならびにTriple helical domainのグリシンがアルギニンに変異するG1815Rを見いだした。このような劣性栄養障害性表皮水疱症患者では、たとえ臨床症状が軽少であっても有棘細胞癌を若年から高率に発症する可能性が高いため、患者への十分な啓蒙を行い定期的に専門施設を受診させる必要性を明らかにした。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (BCIE)

1) 一次調査の返送数は507科、回収率は63.2%であった。回収された二次調査票28例から対象期間外の不適格例を除き、2002年1年間に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症により全国の病院を受療した患者数は63人(95%信頼区間41-86人)と推計された。また、参考疾患について2002年1年間に全国の病院を受療した患者数の推計をした

ところ、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(NBCIE)113名(95%信頼区間46~179名)、葉状魚鱗癬(LI)33名(95%信頼区間23~43名)、家族性天疱瘡250名(95%信頼区間194~305名)であった。

2) BCIE4例において電顕的にコルネオデスモゾームの形態異常がみられた。また、コルネオデスモゾームに特異的なタンパクであるコルネオデスモシンの抗体の作成し、この特異性をイムノプロット法により確認し、BCIE表皮における分泌障害を示唆する所見が得られた。

3) 角化細胞内に変異ケラチン凝集塊が生じるとTNF- α が産生され、オートリン・パラクリン経路により角化細胞がアポトーシスにおちいることが示された。ケラチン病の原因として、変異ケラチン凝集塊を生じた角化細胞がアポトーシスにおちいるという現象も考慮すべきであると思われた。

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」。
岐阜大学医学部医学研究倫理審査委員会承認:「単純型先天性表皮

水疱症におけるケラチン遺伝子異常の解析、2002.6.10]、「厚生労働科学研究稀少難治性皮膚疾患（水疱性魚鱗癬様紅皮症）全国疫学調査；受付番号15-13、2003.5.15」「天疱瘡における遺伝的背景の検索；受付番号15-97、2003.12.19」。

E. 結論

①天疱瘡においては前年度作成したモデルマウスおよび病原性を持つモノクローナル抗体を用いてB細胞免疫寛容獲得の機序および抗体結合後の水疱形成過程とデスモソーム分子の動態を明らかにした。症例の解析から天疱瘡の長期予後や寛解期の治療方針を検討するとともに、遺伝的背景に関する調査を開始した。また腫瘍随伴性天疱瘡の病態も解明した。②膿疱性乾癬においては日本乾癬学会の登録データから111例を抽出解析するとともに、当研究班で全国561施設を対象にQOL調査を開始した。膿疱性乾癬病変部における補体、ケモカイン、その抑制分子等を解析し、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、栄養障害型表皮水疱症における原因であるⅦ型コラーゲンの発現制御機構を解析するとともに、表皮細胞への遺伝子導入法や治療用発現ベクターのプロモーター開発に着手した。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票を全国507施設から回収し、二次調査を開始した。また電顕および免疫電顕でコルネオデスモゾームの異常を確認し角質肥厚の機序解明の端緒を得た。以上の結果から本研究の3年計画の第二年度の目標はほぼ達せられ、最終年度である3年目にすべき研究目標が明示されたと考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表（平成15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, Pittelkow MR, Kitajima Y, Nguyen VT. Colinergic stimulation inhibits pemphigus IgG-induced acantholysis and ameliorates clinical disease in a patient with pemphigus vulgaris. 64th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, April 30-May4, 2003
2. Tosaki H, Kim SC, Gu LH, Ichiki Y, Park J, Nagai M, Kitajima Y. A norbel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema is due to elongated tail domain of keratin 5. 64th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, April 30-May4, 2003
3. Esaki C, Ichiki Y, Sato-Nagai M, Izumi T, Takagi H, Kitajima Y. Suppressive therapies for the abrupt rise in desmoglein auto-antibodies after plasmapheresis in 3 patients with pemphigus vulgaris. Australian Academy of Dermatology and Japanese Dermatology Association Joint Meeting. Ayers Rock Australia, Sep 18-21, 2003
4. Takagi H, Esaki C, Izumi T, Ichiki Y, Kitajima Y. An usual case of bullous pemphigoid associated with anti bodies to BP180, desmoglein1, desmoglein 3 and IgA to basement membrane Zone. Australian Academy of Dermatology and Japanese

- Dermatology Association Joint Meeting. Ayers Rock Australia, Sep 18-21, 2003
5. 北島康雄. 天疱瘡の水疱形成機序と治療法の実際：ステロイドと免疫抑制剤の使用のタイミング. 第379回日本皮膚科学会大阪地方会 2003.9.6. 和歌山
 6. 江崎智香子、和泉智子、市來善郎、高木 肇、北島康雄、楊 美雪. 多彩な公表費細胞蛋白抗体を呈した類天疱瘡の1例 第25回水疱症研究会、2003.11.23. 橿原
 7. 和泉智子、市來善郎、江崎智香子、高木 肇、北島康雄. BP180ELISA 値による類天疱瘡の理論的治療法. 第102回日本皮膚科学会総会. 2003.5.23-25. 舞浜
 8. 戸崎裕子、市來善郎、谷、麗紅、永井美貴、北島康雄、國定隆弘、Kim SC, Park J, 安川香奈、清水 宏. 遊走性環状紅斑を伴った単純型先天性表皮水疱症の分子生物学的解析. 第10回分子皮膚科学フォーラム、2003.11.22. 京都
 9. 松浦浩徳、大藤玲子、岩月啓氏. 岡山皮膚難病支援ネットワーク設立. 第230回日本皮膚科学会岡山地方会、2003. 京都
 10. 大藤玲子、松浦浩徳、岩月啓氏、梅澤慶紀、小澤 明、中村晃一郎、金子史男. 膿疱性乾癬の疫学と重症度階層化の試み. 第15回日本乾癬学会、2003. 高山
 11. Yamasaki K, Dai X, Nanba D, Shiraishi K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Higashiyama S, Hashimoto K. PLZF regulates and suppresses melanoma proliferation and tumor growth. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA
 12. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M. In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA
 13. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Hashimoto K. Novel role of angiotensin II in fibroblasts: induction of fibroblast migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA
 14. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Higashiyama S, Hashimoto K. Keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice show marked retardation of skin wound healing. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA
 15. Nanba D, Shirakata Y, Nakanishi Y, Hieda Y, Ishiguro H, Higashiyama S, Hashimoto K. Epidermal hyperplasia and impaired morphogenesis of hair follicles in mice overexpressing a soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA
 16. Dai X, Yamasaki K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. All trans-retinoic acid induces production of IL-8 in

- human keratinocytes via increased phosphorylation of I κ B α in the NF κ B pathway. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
17. Tohyama M, Shirakata Y, Yamasaki K, Sayama K, Tsuda T, Tan E, Hashimoto K. production of MIP-1 α /CCL3 is mediated via toll-like receptor 3 in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 18. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K. Epidermal differentiation regulates the production of innate antimicrobial peptides in the skin. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 19. Tokumaru S, Shirakata Y, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K. EGF receptor transactivation by UV-irradiation is mediated via HB-EGF shedding in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 20. Hashimoto K. Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS). 13th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Daejeon Oct 2003, Korea
 21. 松浦浩徳、大藤玲子、岩月啓氏. 岡山皮膚難病支援ネットワーク設立. 第230回日本皮膚科学会岡山地方会、2003
 22. 大藤玲子、松浦浩徳、岩月啓氏、梅澤慶紀、小澤 明、中村晃一朗、金子史男. 膿疱性乾癬の疫学と重症度階層化の試み. 第15回日本乾癬学会、2003, 高山
 23. 金田安史. 遺伝子治療の現状と将来展望. 第102回日本皮膚科学会総会 教育講演、2003, 浦安
 24. 池田志孝. 天疱瘡第102回日本皮膚科学会総会、2003, 浦安
 25. 山本明美. ロリクリン異常症 日本皮膚科学会第289回長崎地方会(特別講演) 2003.4.13, 長崎
 26. A Ishida-Yamamoto, S Yoshida, TJ O'Brien, G Serre, M Simon, H Iizuka. Lamellar granule proteins are sequentially synthesized and transported through the trans-Golgi network in keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003 2003.4.30-5.4, Miami Beach, Florida USA
 27. 山本明美、飯塚 一. 表皮層板顆粒形成機構の形態的解析 第18回角化症研究会、2003. 8. 9, 東京
 28. 山本明美. 電顕をつかって角化と角化症の謎をとく 第30回日本電顕皮膚生物学会(第30回記念企画)、2003.9. 12, 金沢
 29. 山本明美. 病理組織標本にみられる表皮文化の異常とその背景 平成15年度頭部支部企画前実績講習会 2003.9. 26, 旭川
 30. 山本明美、飯塚 一. 層板顆粒のcryoultramicrotomy法による研究 第17回表皮細胞研究会、2003. 10. 18, 角館
 31. 山本明美. 角化の常識の検証 第67回日本皮膚科学会東京支部学術大会(教育講演)、2004.2.15, 東京
 32. 関亦正幸、本間 好. エピジェネティック制御によるビメンチン遺伝子の転写調節機構の解析. 第26回分子生物学会年会、2003

33. 北村卓也、鎌滝章央、関亦正幸、菊地臣一、本間 好. MCA 法を用いた関節リウマチ患者における異常メチル化 CpG island 部位の特定. 第26回分子生物学会年会、2003
34. 本間美和子、本間 好. 細胞周期進行における CK2 機能の解析. 第26回分子生物学会年会、2003
35. Yamaga M, Sekimata M, Kawai K, Fujii M, Kamata H, Hirata H, Homma Y, Yagisawa H. A PLC δ -binding protein, P122/PhoGAP, is localized in Caveolae and regulates caveolar membrane traffic. 第76回生化学会大会、2003
36. Homma MK, Homma Y. Phosphorylation of eIF5 by CK2 is essential for the progression of cell cycle. 第76回生化学会大会、2003
37. Sekimata M, Homma Y. Sequence-specific transcriptional repression by an MBD2-interacting zinc finger protein MIZF. 第76回生化学会大会、2003
38. 馬淵智生、飯塚万利子、梅澤慶紀、松山 孝、小澤 明、岡 晃、徳保江里子、猪子英俊、久保田由美子、中山樹一郎、小澤麻紀、照井 正、安元慎一郎、橋本 隆、池田志孝、松本義也. 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—17, 19番染色体日本皮膚科学会第 780 回東京地方会、2003. 3. 15, 東京
39. Mabuchi T, Matsuzaka Y, Okamoto K, Tamiya G, Iizuka M, Umezawa Y, Matsuyama T, Inoko H, Ozawa A. Identification of the hRDH-E2 gene, a novel member of the SDR family, and its increased expression in psoriatic lesion. International Investigative Dermatology 2003 (IID 2003), April 29-May 4, 2003, Miami.
40. 馬淵智生、飯塚万利子、小澤 明、岡本浩一、松坂恭成、岡 晃、田宮 元、猪子英俊. マイクロアレイ解析の治療への展望. 第18回日本乾癬学会、2003.9.12-13, 高山
41. Mabuchi T, Iizuka M, Umezawa Y, Ohta Y, Matsuyama T, Kawakubo Y, Ozawa A, Okamoto K, Oka A, Tamiya G, Inoko H. Genome-wide Association Study of Psoriasis Using Polymorphic Microsatellite Markers. The Jeju Psoriasis Symposium 2003, December 21-22, 2003, Jeju Island
42. 小澤麻紀、照井 正、相場節也、田上八朗. 尋常性乾癬における好中球遊走因子の発現. 第18回日本乾癬学会総会、2003, 高山
43. 小宮根真弓、玉置邦彦. 表皮細胞に対する TNF α 、IFN γ によるシグナル伝達とマクロライドの作用. 第10回皮膚マクロライド研究会、2003
44. 小宮根真弓、玉置邦彦. マクロライドの表皮細胞における抗炎症作用のメカニズム. 第10回マクロライド新作用研究会、2003
45. 小宮根真弓. 乾癬の病態：角化と炎症. 第18回日本乾癬学会学術大会、2003
46. 小宮根真弓、矢野正一郎、大河内仁志、玉置邦彦. The effects of mechanical stretch on epidermal keratinocytes. 第6回皮膚免疫を考える会、2003
47. 小宮根真弓、竹腰知紀、玉置邦彦. 尋常性乾癬 systemic therapy と topical therapy: 光線療法と局所療法の併用. 第67回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2003
48. Komine M, Tamaki K. Pathophysiology of Psoriasis: Insights from the Epidermis. The Jeju Psoriasis Symposium 2003.

November 21-22, 2003. Jeju, Korea.
49. 北村華奈、新関寛徳、古林郁乃、浅田秀夫、宮川幸子、橋本隆、Detlef Zillikens. Oral pemphigoid の 1 例. 第25回水疱症研究会、2003.11.23, 檀原

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

所望の機能的性質を有する核酸の単離方法及びそのためのキット（発明者：金田安史、西川智之）（出願人：金田安史、西川智之、ジェノメディア株式会社）2003年11月20日出願 PCT/JP03/14857

[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（難治性疾患克服研究事業）
平成15年度分担研究報告書

デスモグレイン4に対する天疱瘡自己抗体反応性の検討

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師

研究要旨 最近、18番染色体上に存在するデスモグレイン遺伝子クラスターの遺伝子解析の結果、既報告の3種のアイソフォーム (Dsg1, Dsg2, Dsg3) に加え、新たなアイソフォーム Dsg4 が同定された。本研究ではヒト Dsg4 組換え蛋白 (hDsg4-His) を用い、天疱瘡における血清の Dsg4 との反応性および Dsg4 の水疱形成への関与について検討した。hDsg4-His を基質とした免疫沈降法の結果、抗 Dsg1 抗体を有する粘膜皮膚型 PV 血清ならびに PF 血清の大部分が hDsg4-His を認識した。一方、抗 Dsg1 抗体を持たない粘膜優位型 PV 血清は hDsg4-His を認識しなかった。興味深いことに、抗 Dsg1 抗体を組換え Dsg1 による免疫吸着法にて除去すると、血清の Dsg4 との反応性は完全に消失した。一方、抗 Dsg4 抗体を除去しても、血清の Dsg1 との反応性に著変はなかった。以上の結果より、天疱瘡患者血清中には Dsg4 のみを認識する自己抗体は存在せず、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応することにより Dsg4 と反応性を示すことが明らかにされた。

共同研究者

長坂 武 慶應義塾大学医学部皮膚科助手
西藤公司 慶應義塾大学医学部皮膚科特別
研究員

を用いた免疫吸着法にて自己抗体を除去後、血清と Dsg との反応性についても検討した。

A. 研究目的

本研究の目的はヒト Dsg4 組換え蛋白を用い、天疱瘡における血清の Dsg4 との反応性について検討することである。

B. 研究方法

免疫沈降法による患者血清と組換え Dsg4 の反応性を検討した。

ヒト頭皮から抽出した mRNA を鋳型として RT-PCR を行い、Dsg4 細胞外領域をコードする cDNA を単離した。この cDNA を用いてバキュロウイルス発現系で Dsg4 組換え蛋白 (hDsg4-His) を作成。血清と Dsg4 との反応性の有無に関して、落葉状天疱瘡 (PF) 血清20例、粘膜皮膚型尋常性天疱瘡 (PV-MC) 血清19例ならびに粘膜優位型尋常性天疱瘡 (PV-M) 血清16例を用いて検討した。また組換え Dsg 蛋白

C. 研究結果

hDsg4-His を基質とした免疫沈降法の結果、抗 Dsg1 抗体を有する粘膜皮膚型 PV 血清19例中13例 (68.4%) ならびに PF 血清20例中17例 (85.0%) が hDsg4-His を認識した。一方、抗 Dsg1 抗体を持たない粘膜優位型 PV 血清16例全て (0%) が hDsg4-His を認識しなかった (図 1)。さらに抗 Dsg1 抗体を組換え Dsg1 による免疫吸着法にて除去すると、全ての血清の Dsg4 との反応性は完全に消失した (n=30) (図 2a、c)。一方、抗 Dsg4 抗体を除去しても、血清の Dsg1 との反応性に著変はなかった (n=11) (図 2b、d)。

D. 考察

抗 Dsg1 抗体を有する PF、PV-MC 患者血清の大部分が Dsg4 を認識することが判明した。そして天疱瘡患者血清中に Dsg4

のみを特異的に認識する自己抗体は存在せず、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応することが示された。Dsg 分子のアミノ酸配列を比較すると、全体で Dsg4 は Dsg1 と41%の相同性がある。一方、抗原抗体反応に重要なエピトープが存在すると考えられるN末端側の EC1 領域に注目すると、Dsg4 は Dsg1 と82%の相同性を示す。特にデスモグレインの接着機能に重要と考えられている、トリプトファンの接着面のドナーであると予測されるアミノ酸は Dsg1 と Dsg4 とでは15中14アミノ酸と高率に保存されている。しかしながら本研究に示したように、患者血清中に Dsg4 のみを認識する自己抗体はなかった。よって我々は Dsg4 が天疱瘡の自己抗原ではなく、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応すると考えた。

E. 結論

本研究で天疱瘡患者血清中には新しいデスモグレインDsg4のみを認識する自己抗体は存在せず、抗Dsg1抗体の一部がDsg4と交差反応することが初めて明らかにされた。天疱瘡における自己抗体産生機序を考える上で、重要な知見である。

F. 研究発表

英文論文

1. 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** 120:610-615, 2003.
2. Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M, Pieczkowski F, Foedinger 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** 12:646-654, 2003.
3. 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.
4. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. **J Am Acad Dermatol** 48:244-252, 2003.
5. Amagai M. A mouse with an active disease as a model for pemphigus. **Ann Dermatol Venereol** 130:1176-1179, 2003.
6. Hisamatsu Y, Abreu Velez AM, 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** 32:33-41, 2003.
7. 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.