

図5. DJM-1細胞におけるAK23モノクローナル抗体（抗デスモグレイン3のN末ドメインに対する抗体）と尋常性疱疹患者のIgG刺激のトリトンX-100可溶性画分と不溶性画分におけるデスモグレイン3蛋白量に対する影響（30分刺激と24時間刺激）。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

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 落葉状天疱瘡、尋常性天疱瘡、類天疱瘡の病因自己抗体の抗原であるリコンビナントデスマグレイン（Dsg）1, 3およびBP180-NC16a領域を用いたELISA法によって患者における病因抗体価を測定できるようになり、今後より多くの医師がこれを用いて診断治療に当たることが予想される。これまでに我々は、治療の基本を、病因抗体自体の減量・消失と、病因抗体により惹起される水疱形成反応の抑制の2点におき、抗体価と臨床症状の両者を指標として論理的な治療法の確立に努めてきた。今回は寛解期の症例について、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差異を検討した。抗体価の上昇を確認した際は、抗体価の安定を確認するまで治療薬の減量を行わず、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有効であった。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る。

共同研究者
江崎 智香子
岐阜大学医学部皮膚科 助手

A. 研究目的

天疱瘡および類天疱瘡は口腔粘膜および全身の皮膚に水疱とびらんを生ずる自己免疫性水疱症である。前者は落葉状天疱瘡と尋常性天疱瘡に大別され、それぞれの自己抗体の標的抗原としてデスマゾーム構成分子のデスマグレイン1（Dsg1：分子量160 kDa）、Dsg3（分子量130 kDa）が、一方、後者はヘミデスマゾーム構成分子の類天疱瘡抗原2（BP180またはBPAG2：分子量180 kDa）が同定されている^{1)~3)}。これらの抗原のエピトープを含む部分のリコンビナント蛋白を用いたELISA法が天谷らによって開発され、病因抗体価の測定が可能となり^{4),5)}、さらにH15年には保険適応化され、診断治療の現場において、現在広く普及しつつある。我々の施設では水疱症の

治療を、臨床症状と抗体価の両者を指標とし、原因抗体により惹起される反応の抑制と、抗体自体の減量・消失という観点に基づいて行ってきた^{6),7)}。これまでに病状極期の抗体価と臨床症状の推移に関しての検討を報告してきたが、今回は、個々の患者において長期に及ぶ寛解期について、特に抗体価の再上昇をきたした際の、臨床症状およびELISA法抗体価の推移と治療法の関連性を検討した。

B. 研究方法

症例

病状極期から治療を継続し、H16年に入ってから状態が確認できている外来通院の尋常性天疱瘡（PV）、落葉状天疱瘡（PF）、類天疱瘡（BP）患者で、臨床症状の消失が3ヶ月以上持続した後に途中抗体価の再上昇がみられた症例9例（PV：2、PF：1、BP：6例）について、ELISA法による抗体価と臨床経過を検討した。

ELISA に関する方法

Dsg1、Dsg3、BP180 ELISA kit (MBL, Nagoya, Japan) を用いた。リコンビナント Dsg1、Dsg3、BP180NC16a を固相化したマイクロカップに、目的に応じて反应用緩衝液で希釈した血清を添加し、室温で一時間静置反応させた。洗浄後、酵素標識抗体を添加し、室温で一時間静置反応させた。再び洗浄後、酵素基質液を添加し、室温で30分静置反応させた。反応停止液を添加後、直ちに自動分光光度計 (Multisca MS) を用い、波長 450nm (副波長 620 nm) で吸光度を測定した。測定値を基に、次式よりインデックス値を算出した⁹⁾。

$$\text{Index Value} = (A_{450} \text{ Sample} - A_{450} \text{ Negative Control}) / (A_{450} \text{ Positive Control} - A_{450} \text{ Negative Control}) \times 100$$

C. 研究結果

経過中抗体価の再上昇がみられた 9 症例において、症状消失から抗体価再上昇までの期間は 4～12ヶ月であった。9 例中 3 例で自己による治療中断があり、いずれも BP の症例であった。抗体価の再上昇がみられたものの、臨床症状の再発なく経過している症例は BP の 4 例であった。抗体価の陰性化がみれた後に抗体価の再上昇と症状の再発をきたした症例が 2 例あった (表 1)。

抗体価の再上昇がみられたものの、臨床症状の再発なく経過している症例 1～3 は、DDS の併用の差はあるが、いずれも極期はステロイドで治療し、免疫抑制剤の使用はない。抗体価の再上昇がみれたのはプレドニゾロンが 10～12.5mg/day の時期であった (表 1, 図 1)。3 例の BP180 ELISA Index の推移を臨床症状消失時を基準にそろえて示すと、極期に比べればその変化の幅は僅かである。抗体価の上昇を確認した 3～6ヶ月後に治療の変更を開始した。症例 1 ではプレドニゾロンの 10 から

15mg/day への増量、症例 2 ではプレドニゾロンは同量で継続しミゾリビン 50mg/day の追加を行った。どちらも抗体価の上昇は抑制されたが、期間は長期を要した。症例 3 は同じくミゾリビンの追加を行い、抗体価の上昇は抑制された。12ヶ月後からは見かけ上プレドニゾロンが増量されているが、これは結核のためリファンピシン (RFP) を投与されたことで、プレドニゾロンの生物活性が半減していると換算すると、実際は 10mg/day となり、抗体価上昇を確認した当初の 12.5mg/day より減量していることとなる。この時期のさらなる上昇はその影響と考え、RFP 投与終了後 2ヶ月となる現在は、今後同量の 10mg/day での生物活性が上がる可能性を加味し増減をせず、経過観察している (図 1)。

自己による治療中断のため抗体価が再上昇したとみられる症例 4～6 を比較した。症例 4 は極期にステロイドパルス、DFPP も要した重症例で、水疱症の症状消失後に呼吸器内科的にさらにもう一度ステロイドパルスを受けた。抗体が陰性化した状態が 8ヶ月持続し、ベタメタゾン 0.75-0.5mg/day 隔日投与の段階で治療を中断した。3ヶ月後再来し、症状の再発はないが、抗体価が 26.5 と極期に比べれば僅かなものの、カットオフ値としてみれば陽性を示した。その後は本人の希望で未治療で経過観察を続け 1ヶ月経過しているが、ELISA 抗体価は 26.5 と横ばいで、症状の再発もない。症例 5 と 6 は、症例 4 に比べて、極期の抗体価も低く、要したプレドニゾロンの最高量も少なかった。抗体価が陰性化に至った時期にプレドニゾロン 5～12.5mg/day 内服の状態中断した。中断後 3ヶ月と 5ヶ月で再発した (表 1, 図 2)。

治療中断なく抗体価の再上昇と症状の再発がみられた症例 7～9 を比較したところ、抗体価の再上昇から症状再発までの期間は PF の症例 7 では 8.5ヶ月で、PV の症例 8、9 では 1～3ヶ月であった。症例 7

は、抗体価の陰性化が10ヶ月持続した後の抗体価の再上昇で、アザチオプリンの中止から7ヶ月後の症状再発あった。いずれの症例も抗体価の再上昇が確認されてから、症状の再発がないことを確認の上、極めてゆっくり治療薬の少量の減量を行っている。症例7プレドニゾロンの増量とアザチオプリンの追加を行い、再度症状消失し、抗体価も陰性化し16ヶ月経過している。症例8は途中Dsg3のみ陽性のPVがDsg1/3陽性に変化して上昇し、口腔粘膜病変の再発はなく皮膚病変が新生した症例で、プレドニゾロンの増量で症状は消失した。症例9は免疫抑制剤の併用をしていた症例で、抗体価の上昇の程度は症例7、8に対して少ないが、口腔粘膜病変の再発がみられ、プレドニゾロン7.5から15mg/dayまでの増量で抗体価と臨床症状ともに消失した(図3)。

D. 考察

臨床症状の消失が3ヶ月以上持続している寛解期のPV、PF、BPの患者のうち、その後抗体価の再上昇をきたした症例の、臨床症状およびELISA法抗体価の推移と治療法の関連性を検討した。

抗体価再上昇にもかかわらず、症状の再発がなかった症例では、いずれもBPの症例であったが、プレドニゾロン5mg/dayやミゾリピン50mg/dayという少量の増量・追加で抗体価の抑制効果が得られた。ELISA法抗体価のモニタリングにより、多量のステロイドの再投与を回避できたと考える。ただし、少量とはいえ長期にわたる増量の継続が必要であった経過は、高齢者が多いBPにおいて副作用の発現のリスクに対して一考を要する。

治療中断例がBP症例に偏ったのは高齢者というコンプライアンスの悪さも要因として挙げられる。臨床症状も抗体価も比較的軽度であった症例5、6では、3～5ヶ月の中断で症状の再発をきたした。これら

2例と照らし合わせると、中断から4ヶ月になる症例4は症状の再発が心配される時期と言えるが、頻回のパルス療法、抗体価陰性期の持続などの因子が今後の経過にいかに関与するか注目される。

抗体価の再上昇に症状の再発がみられたPF、PVの症例では、抗体価の再上昇を確認してから臨床症状の再発がないことを確認の上、わずかながら減量を試みており、抗体価の上昇抑制をはかれず、症状の再発につながったと考えられる。これは、抗体価の測定が不可能で、臨床症状のみでモニタリングし、減量スケジュールを計画していた頃の再発例に相当するものと考えられ、ELISA法抗体価の測定が、以前なら避けられなかった再発症例を未然に防ぐ可能性を提供するといえる。ここで、BPとPV/PF群の病型の差はあるものの、プレドニゾロン5mg/dayやミゾリピン50mg/dayという少量の増量・追加で抗体価の抑制効果が得られ症状の再発を阻止できたことは、治療の副作用を減ずる目的でもELISA法抗体価の測定が有用であったと考えられる。PVの症例8と9はPFの症例7と比べ、抗体価の再上昇から症状の再発までの期間が短く、口腔粘膜症状の再発がみられたDsg3抗体価にくらべ皮膚症状の再発がみられたDsg1抗体価が高値であることから、これがPFとPVの病型の差、あるいはDsg1とDsg3の抗原の差によるものなのか、さらなる症例の蓄積で興味深い結果が得られることが期待されると考え、今後の課題としたい。

以上の検討より、寛解期において抗体価の上昇がみられたら少なくとも同量の治療の持続により経過観察を行うのを治療の原則とし、上昇傾向が続けばステロイドの増量、免疫抑制剤の追加を検討すべきと考えた。

E. 結論

今回は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る。

参考文献

1. Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M: Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: Involvement of protein kinase C. **JID Symposium Proceedings** 4:137-144, 1999
 2. Kitajima Y: Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous disease. **Eur J Dermatol** 6:399,1996
 3. 北島康雄:細胞骨格と細胞接着の構造・機能とその異常としての皮膚疾患. 分子医科学シリーズ2、細胞:構造と機能、月田承一郎編、メディカルビュー社、東京、1995、p.116.
 4. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata 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
 5. Ishii K, Amagai M, Hall R.P, et al.: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. **J Immunol** 159:2010, 1997
 6. Aoyama Y, Tsujimura Y, Funabashi, M, Sato M, Kamiya H, Kitajima Y: An experience for ELISA for desmoglein 1, suggesting a possible diagnostic help to determine the initial therapy for pemphigus foliaceus. **Eur J Dermatol** 10:18-21, 2000
 7. 北島康雄: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. 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:45-53, 2003
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表 (平成15年度)
1. 論文発表
英語論文
 1. Kitajima Y, Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus. **Arch Dermatol Res** 295:S17-S23, 2003
 2. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Grand SA. Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. **Life Sciences** 72:2081-2085, 2003
 3. Siegel DH, Ashton GHS, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, South AP, Smith FJD, Prescott AR, Wessagowit V, Oyama N, Akiyama

- M, Aboud DA, Aboud KA, Githami AA, Hawsawi KA, Ismaily AA, Suwaid RA, Atherton DJ, Caputo R, Fine JD, Frieden IJ, Fuchs E, Haber RM, Harada T, Kitajima Y, Mallory SB, Ogawa H, Sahin S, Shimizu H, Suga Y, Tadini G, Tsuchiya K, Wiebe CB, Wojnarowska F, Zaghoul AB, Hamada T, Mallipeddi R, Eady RAJ, McLean WHI, McGrath JA, Epstein, Jr EH. Loss of kindlin-1, a human homolog of *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes kindler syndrome. **Am J Hum Genet** 73:174-187, 2003
4. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grand SA. Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. **J Biol Chem** 279(3):2135-2146, 2004
 5. Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Vetter DE, Wess J, Beaudet AL, Kitajima Y, Grand SA. Synergistic control of epithelial cell adhesion through muscarinic and nicotinic subtypes of cholinergic receptors. **Exp Cell Res** : in press
 6. Gu LH, Kim SC, Ichiki Y, Park J, Nagai M, Kitajima Y. An unusual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 cause a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. **J Invest Dermatol** 121:482-485, 2003

日本語論文

1. 北島康雄. 先天性表皮水疱症. 小児科診療 66(増刊) 特集小児の皮膚疾患: 123-127, 2003
2. 北島康雄. 乾癬(角化異常とT細胞). 毎日ライフ 10 特集皮膚病の最新治療: 16-18, 2003
3. 北島康雄. 角化過程におけるケラチノサイトの上方移行・Positioning Differentiationと細胞間接着制御とその異常. 第17回角化症研究会記録集: 56-60, 2003

日本語著書

1. 北島康雄(分担). 角層下膿疱症. 皮膚疾患最新の治療 2003-2004: 新村真人・瀧川雅浩編集(南江堂): 106, 2003
2. 北島康雄(分担). 炎症のない角化性病変の種類. 皮膚を診ると全身が見える:(診断と治療社): in press
3. 北島康雄(分担). 角化の生化学・分子生物学. 図解・皮膚科学テキスト 2. 皮膚の生物学(中外医学社): in press
4. 北島康雄(分担). 炎症性角化症. New 皮膚科学(改訂第2版)(南江堂): in press

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-May 4, 2003
2. Tosaki H, Kim SC, Gu LH, Ichiki Y, Park J, Nagai M, Kitajima Y. A novel 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 antibodies 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、9月6日、2003, 和歌山
 6. 江崎智香子、和泉智子、市来善郎、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、11月23日、2003, 橿原
 7. 和泉智子、市来善郎、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、5月23-25日、2003, 舞浜
 8. 戸崎裕子、市来善郎、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、11月21-22日、2003, 京都
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

症例	年齢・性	病型	病勢初期		症状消失時		期間a	治療中新期	期間aにおける 抗体価PS陽性期	症状再発
			ELISA	治療	ELISA	治療				
1. SX	77 F	BP	388.4	PSL 40 DDS 50	180.9	PSL 27.5 DDS 50	8M	-	-	-
2. MS	70 F	BP	679.4	PSL 30	194	PSL 17.5 MIND 200	4.5M	-	-	-
3. SG	74 M	BP	439	PSL 50 DDS 50	91.6	PSL 15 DDS 50	4M	-	-	-
4. HK	70 F	BP	2427.1	PSL 60 Pulse,DFPP MIND 200,NA 1500	21.7	Betamethasone 2.5 NA 1500	12M	3M	+(8M)	-
5. ME	53 F	BP	49.9	PSL20	10.8	PSL15	5M	3M	+/-	+
6. HD	91 M	BP	45.9	PSL10	28.2	PSL10	6M	6M	-	+
7. SX	41 M	PF	196.9	PSL 40 Pulse Azathioprine 100	81.2	PSL 30 Azathioprine 50	12M	-	+(10M)	+
8. KH	48 M	PV	203.8	PSL 50	28.5	PSL 17.5	4M	-	-	+
9. TK	54 F	PV	242.2	PSL 60 Pulse,DFPP 免疫抑制剤多剤	6	PSL12.5/10 Mizoribine 150	7M	-	+(5M)	+

表 1 抗体価の再上昇がみられた 9 症例。期間 a: 症状消失～抗体価再上昇。

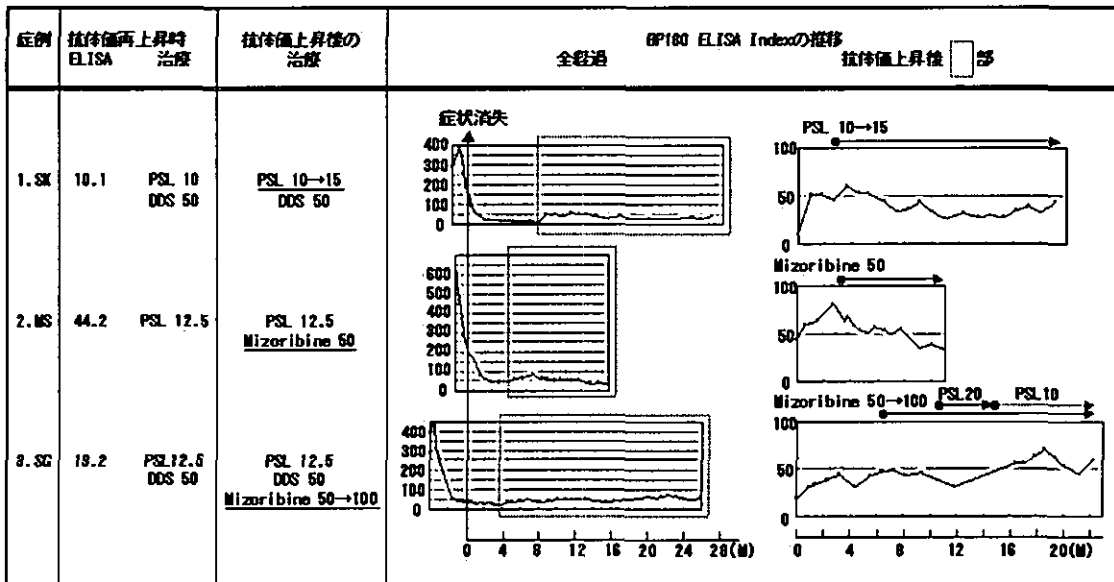


図 1 抗体価の再上昇がみられたが症状の再発がなかった症例。

症例	治療中断前最終診察時 ELISA	治療 治療中断前最終診察時	治療中断前 症状消失確認期間	ELISA	再来時 症状	治療
4.HK	7.4	Detamethasone 0.75/0.5, NA 1500	9M	26.5	-	-(1M)
5.NE	7.6	PSL 12.5	2M	49.4	+	PSL 20
6.HD	10.2	PSL 5	1M	45.4	+	PSL 15

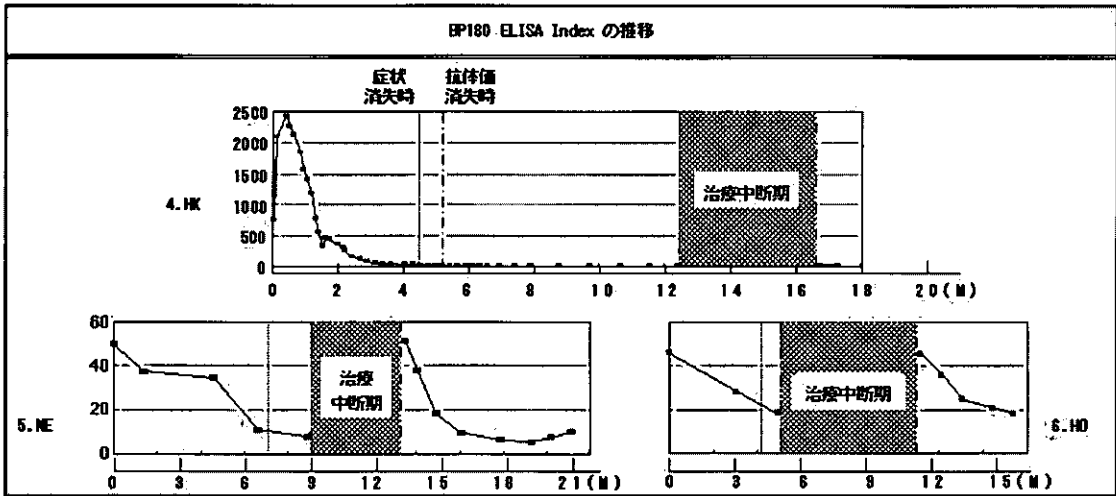


図2 治療を中断し抗体価の再上昇がみられた症例。

症例	抗体価再上昇時 ELISA	治療	症状再発時 ELISA	治療	期間	症状再発時の 治療	抗体価
7.SK	11.9	PSL 5-50/W	172.4	PSL 5-30/W Azathioprine 0(7M)	8.5M	PSL 5→15-22.5 Azathioprine 50-75	抗体価再上昇時
8.KH	Dsg1:12.6 Dsg3:39.4	PSL 14.5 PSL 15	Dsg1:55.3 Dsg3:89.1	PSL 14	2M 3M	PSL 14→25-40	抗体価再上昇時
9.TK	0.2	PSL 10/5 Mizoribine 150	28.4	PSL 7.5 Mizoribine 150	1M	PSL 7.5→15 Mizoribine 150	抗体価再上昇時

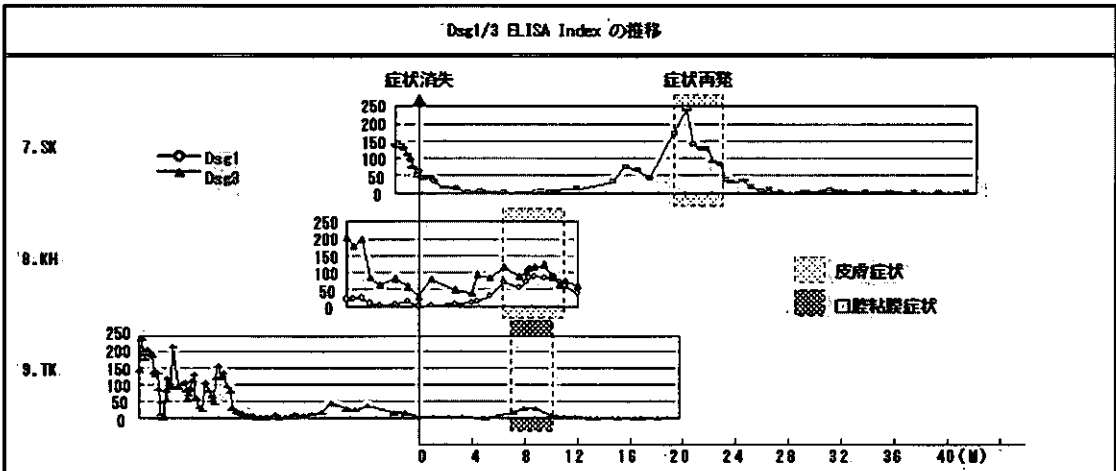


図3 抗体価の再上昇に症状の再発を伴った症例。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授

研究要旨 Paraneoplastic pemphigus (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。患者血清中に存在する自己抗体は、250kD, 230kD, 210kD, 190kD, 170kDa の蛋白とさまざまなパターンで反応することが知られており、表皮抽出液を用いた免疫ブロット法では PNP 血清が 210kD エンボプラキン、190kD ペリプラキンと特異的に反応することが明らかにされている。今回我々は 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。多くの PNP 血清は細胞内に、その主体は intermediate filaments に一致して金粒子の沈着を認めた。

共同研究者

石井文人

久留米大学医学部皮膚科助手

山本明美

旭川医科大学皮膚科講師

A. 研究目的

Paraneoplastic pemphigus (PNP) は、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り、患者血清中に存在する自己抗体は、250kD, 230kD, 210kD, 190kD, 170kDa の蛋白とさまざまなパターンで反応することが知られている。また最近、我々は主要な PNP 抗原である 210kD エンボプラキン、190kD ペリプラキンの蛋白を作成し、免疫ブロット法で検討した結果、多くの PNP 血清がこれらのリコンビナント蛋白に強く反応した。今回、我々は post-embedding 免疫電顕法を用いて PNP のエピトープの微細局在部位を検討した。

B. 研究方法

当院を含め日本国内および海外より当科に抗原抗体解析の依頼があった血清中に

PNP と診断した患者血清を対象とし、免疫電顕を行った。

- 1) 臨床所見、正常ヒト皮膚切片・ラット膀胱切片を基質とした蛍光抗体間接法、表皮抽出液を用いた免疫ブロット法および Dsg1/Dsg3 の ELISA 法を用いて PNP と診断し得た患者血清を抽出した。
- 2) 免疫電顕は post-embedding 法を用いた。

C. 研究結果

ほとんどの PNP 血清は有棘細胞、基底細胞内の intermediate filaments を主体に IgG の金粒子の沈着を認めた。同時にデスモゾームの細胞外領域にも金粒子の沈着を認めたが、その程度はさまざまであった。

D. 考察

ほとんどの PNP 血清は細胞内の intermediate filament に IgG の沈着を認めた。またデスモグレインが存在するデスモゾーム領域に IgG が結合する症例と結合しない症例があり、免疫ブロット、ELISA 法にて Dsg1 または Dsg3 が検出された症例ではデスモゾーム細胞間領域に IgG が結

合する傾向があり、Dsg1 または Dsg3 が検出されない症例では明らかにデスモゾームでの細胞間領域を避けて IgG の結合を認めた。今回行った免疫電顕の結果は免疫ブロット、ELISA 法の結果を裏付けるものであった。

E. 結論

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 IgG が結合することは PNP の病理組織にて棘融解に加えて表皮細胞壊死がおこるメカニズムの一端を担っているのではないかと推測される。

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

英語論文

1. Umemoto N, Demitsu T, Toda S, Noguchi T, Suzuki SI, Kakurai M, Yamada T, Suzuki M, Nakagawa H, Komai A, Hashimoto T. A case of anti-p200 pemphigoid clinically mimicking inflammatory epidermolysis bullosa acquisita. **Br J Dermatol** 148(5):1058-1060, 2003
2. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, Amagai M, Nagata Y, Strasz Z, 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
3. Hamada T, Wessagowit V, South AP, Ashton GH, Chan I, Oyama N, Siri wattana A, Jewhasuchin P, Lenane S, Krafchik B, Kulthanan K, Shimizu H, Kaya TI, Erdal ME, Paradisi M, Paller AS, Hashimoto T, McGrath JA: Extracellular Matrix protein 1 gene (ECM1) mutation in lipid proteinosis and genotype-phenotype correlation. **J Invest Dermatol** 120(3):345-350, 2003
4. Hashimoto T: Recent advances in the study of pathophysiology in pemphigus (Review article). **Arch Dermatol Res** 295:S2-S11, 2003
5. Lee JB, Fumimori T, Kurose K, Mori O, Hashimoto T: A case of bullous pemphigoid successfully treated by plasmapheresis: Assessment of the change in titers of circulating antibodies by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. **J Dermatol** 30(4):326-31, 2003
6. Niimi Y, Kawana S, Hashimoto T, Kusunoki T: Paraneoplastic pemphigus associated with uterine carcinoma, **J Am Acad Dermatol** 48(5 Suppl):S69-72, 2003
7. Kawamoto N, Yamada A, Ohkouchi S, Maeda T, Tanata S, Hashimoto T, Sijo Y, Saijo S, Nukiwa T, Shichijo S, Aizawa H, Itoh K: IgG reactivity to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. **Tissue Antigens** 61:352-361, 2003
8. Hisamatsu Y, Abreu Velez AM, Amagai M, Ogawa MM, Kanzaki T, Hashimoto T: Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **J Dermatol**

- Sci 32(1):33-41, 2004
9. Lee JB, Liu Y, Hashimoto T: Cicatricial pemphigoid sera specifically react with the most C-terminal portion of BP180. **J Dermatol Sci** 32(1):59-64, 2003
 10. McMillan JR, Matsumura T, Hashimoto T, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H: Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII: further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa. **Exp Dermatol** 12(3):261-7, 2003
 11. Umemoto N, Demitsu T, Toda S, Ohsawa M, Noguchi T, Kakurai M, Yamada T, Suzuki M, Nakagawa H, Komai A, Hashimoto T: A case of non-scarring subepidermal blistering disease associated with autoantibodies reactive with both type VII collagen and laminin 5. **Dermatology** 207(1):61-64, 2003
 12. Liu Y, Shimizu H, Hashimoto T: Immunofluorescence studies using skin section of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients indicated that the antigen of anti-p200 pemphigoid is not a fragment of type VII collagen, **J Dermatol Sci** 32(2):125-129, 2003
 13. Tsukada Y, Kawase MK, Murashima A, Kitahora T, Hashimoto T, Komai A: Bullous pemphigoid associated with dermatomyositis successfully controlled with minocycline. **Clin Exp Dermatol** 28(5):563-564, 2003
 14. Abreu-Velez AM, Beutner EH, Montoya F, Bollag WB, Hashimoto T: Analyses of autoantigens in a new form of endemic pemphigus foliaceus in Colombia. **J Am Acad Dermatol** 49(4):609-14, 2003
 15. Abreu-Velez AM, Hashimoto T, Bollag WB, Tobon Arroyave S, Abreu-Velez CE, Londono ML, Montoya F, Beutner EH: A unique form of endemic pemphigus in northern Colombia. **J Am Acad Dermatol** 49(4):599-608, 2003
 16. Hisamatsu Y, Nishiyama T, Amano S, Matsui C, Ghohestani R, Hashimoto T: Usefulness of immunoblotting using purified laminin 5 in the diagnosis of anti-laminin 5 cicatricial pemphigoid. **J Dermatol Sci** 33(2):113-9, 2003
 17. Futei Y, Amagai M, Hashimoto T, Nishikawa T: Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 49(6):1023-8, 2003
 18. Shimanovich I, Hirako Y, Sitaru C, Hashimoto T, Brocker EB, Butt E, Zillikens D: The autoantigen of anti-p200 pemphigoid is an acidic noncollagenous N-linked glycoprotein of the cutaneous basement membrane. **J Invest Dermatol** 121(6):1402-1408, 2003
 19. Ohshima Y, Tamada Y, Matsumoto Y, Hashimoto T: Dermatitis herpetiformis Duhring with palmoplantar keratosis. **Br J Dermatol** 149(6):1300-1302, 2003
 20. Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M, Pieczkowski F, Foedinger D, Kirnbauer R, 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(5):646-654, 2003

21. Ishii N, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T: Immunolocalization of target autoantigens in IgA pemphigus. **Clin Exp Dermatol** 29(1):62-66, 2004
22. Matsushima S, Horiguchi Y, Honda T, Fujii S, Okano T, Tanabe M, Wakayama T, Hashimoto T, Yancey KB: A case

of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid associated with lung carcinoma and severe laryngeal stenosis: review of Japanese cases and evaluation of risk for internal malignancy. **J Dermatol** 31(1):10-5, 2004

日本語論文
特になし

2. 学会発表
特になし

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

図とその説明

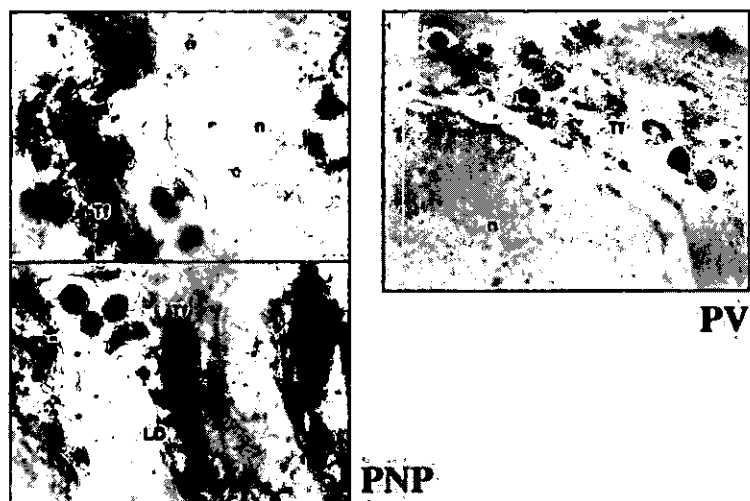


図1 PNPの免疫電顕 (PVと比較)

PNP血清は細胞内のintermediate filamentにIgGの沈着を認める。

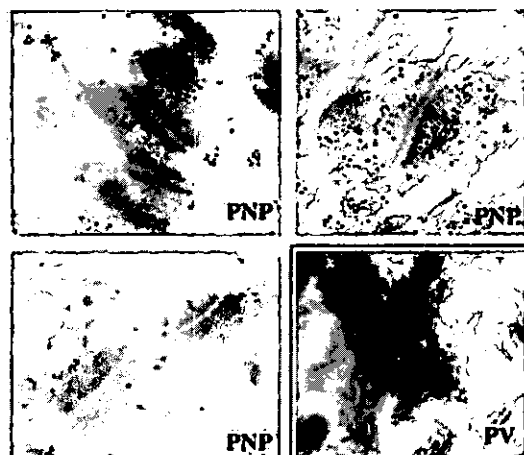


図2 PNPの免疫電顕-デスモゾーム領域 (PVと比較)

デスモゾームの細胞外領域にIgGの沈着を認めるが、その程度はさまざまである。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

腫瘍随伴性天疱瘡の病態解明のための基礎的研究
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

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 腫瘍随伴性天疱瘡 (PNP) は悪性腫瘍を伴い重篤な口腔・眼粘膜病変と多彩な皮膚病変を呈する予後不良な疾患である。PNP 患者血清中には抗デスマグレイン抗体の他にプラキン・ファミリーに対する自己抗体が検出される。しかし PNP における抗プラキン抗体の病的意義は不明である。一方、エンボプラキンとペリプラキンはプラキン・ファミリーに属する蛋白質であるが、その機能の詳細は不明である。今回エンボプラキン・ペリプラキンと中間径線維との相互作用を検討した。その結果、ペリプラキンの C-末端部が、中間径線維と直接に結合すること、エンボプラキンの中間径線維への結合はペリプラキンのそれと比べて弱いこと、さらにエンボプラキンとペリプラキンの両者がヘテロダイマーを形成して中間径線維と強く結合しうることが示唆された。

共同研究者
辛島正志
久留米大学医学部皮膚科学講師

ペリプラキンの局在をケラチンとの二重染色蛍光抗体法をおこない検討した。また、ペリプラキンと中間径線維とが直接結合しうるかどうかを明らかにするために、蛋白オーバーレイ法を用いて検討した。

A. 研究目的

腫瘍随伴性天疱瘡 (PNP) 患者血清中にはプラキン・ファミリーに対する自己抗体が検出される。PNP における抗プラキン抗体の病的意義は不明であるが、PNP の病態形成に関与している可能性がある。プラキン・ファミリーに属するエンボプラキンとペリプラキンはデスマグレインの裏打ち蛋白であり、中間径線維と結合しうることが示唆されているが、直接的な証明はなされていない。今回、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検討した。

B. 研究方法

エンボプラキン、ペリプラキン cDNA を COS-7 細胞に遺伝子導入をおこなった。遺伝子導入後、発現したエンボプラキン、

C. 研究結果

エンボプラキン・ペリプラキンの C-末端ドメインの特定の領域が中間径線維との結合に必要であること、中間径線維に対するエンボプラキンの結合はペリプラキンのそれと比べて弱いことが示された。また、エンボプラキンとペリプラキンの C-末端ドメインの共発現実験により、両者がヘテロダイマーを形成し中間径線維と強く結合した。各種培養細胞から抽出した中間径線維とペリプラキンの C-末端ドメインを用いた蛋白オーバーレイ法の結果、ペリプラキンの C-末端ドメインは直接ケラチン、ビメンチンなどの中間径線維と結合した。

D. 考察

PNP における皮膚症状として水疱、びらんその他多彩な病変があり、重篤である。

病変部の表皮細胞には棘融解の他、空胞変性や壊死も認められる。また肺胞上皮の障害もみられ、致命的になりうる。これらの病理組織像や臨床症状は尋常性天疱瘡とは異なる一面を示す。PNP患者血清中には、他の自己免疫性水疱症患者にはみられないプラキン・ファミリーに対する自己抗体が検出される。そしてこれらの自己抗体がPNPにおける多彩な皮膚症状や肺病変に関与している可能性がある。PNPの病態を理解するには、PNPにおける自己抗原であるプラキン・ファミリーに属するエンポプラキンとペリプラキンの細胞生物学的な機能を解明する必要があると思われる。今回、エンポプラキン・ペリプラキンと中間径線維との細胞生物学的相互作用について検討した。その結果、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がPNP抗体によってその機能障害をきたし、多彩な病像の形成に関与している可能性があると思われる。

E. 結論

ペリプラキンのC-末端部は、ケラチン・ビメンチン中間径線維と直接に結合する。エンポプラキンの中間径線維への結合はペリプラキンのそれに比べて弱い。エンポプラキンはペリプラキンとヘテロダイマーを形成して中間径線維と強く結合しうる。

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

1. Umemoto N, Demitsu T, Toda S, Noguchi T, Suzuki SI, Kakurai M, Yamada T, Suzuki M, Nakagawa H, Komai A, Hashimoto T. A case of anti-p200 pemphigoid clinically

- mimicking inflammatory epidermolysis bullosa acquisita. **Br J Dermatol** 148(5):1058-1060, 2003
2. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, Amagai M, Nagata Y, Strasz Z, 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
3. Hamada T, Wessagowit V, South AP, Ashton GH, Chan I, Oyama N, Siri wattana A, Jewhasuchin P, Lenane S, Krafchik B, Kulthanan K, Shimizu H, Kaya TI, Erdal ME, Paradisi M, Paller AS, Hashimoto T, McGrath JA: Extracellular Matrix protein 1 gene (ECM1) mutation in lipid proteinosis and genotype-phenotype correlation. **J Invest Dermatol** 120(3):345-350, 2003
4. Hashimoto T: Recent advances in the study of pathophysiology in pemphigus (Review article). **Arch Dermatol Res** 295:S2-S11, 2003
5. Lee JB, Fumimori T, Kurose K, Mori O, Hashimoto T: A case of bullous pemphigoid successfully treated by plasmapheresis: Assessment of the change in titers of circulating antibodies by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. **J Dermatol** 30(4):326-31, 2003
6. Niimi Y, Kawana S, Hashimoto T, Kusunoki T: Paraneoplastic pemphigus associated with uterine carcinoma, **J Am Acad Dermatol** 48 (5 Suppl):S69-72, 2003
7. Kawamoto N, Yamada A,

- Ohkouchi S, Maeda T, Tanata S, Hashimoto T, Sijo Y, Saijo S, Nukiwa T, Shichijo S, Aizawa H, Itoh K: IgG reactivity to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. **Tissue Antigens** 61:352-361, 2003
8. Hisamatsu Y, Abreu Velez AM, Amagai M, Ogawa MM, Kanzaki T, Hashimoto T: Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **J Dermatol Sci** 32(1):33-41, 2004
 9. Lee JB, Liu Y, Hashimoto T: Cicatricial pemphigoid sera specifically react with the most C-terminal portion of BP180. **J Dermatol Sci** 32(1):59-64, 2003
 10. McMillan JR, Matsumura T, Hashimoto T, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H: Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII: further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa. **Exp Dermatol** 12(3):261-7, 2003
 11. Umemoto N, Demitsu T, Toda S, Ohsawa M, Noguchi T, Kakurai M, Yamada T, Suzuki M, Nakagawa H, Komai A, Hashimoto T: A case of nonscarring subepidermal blistering disease associated with autoantibodies reactive with both type VII collagen and laminin 5. **Dermatology** 207(1):61-64, 2003
 12. Liu Y, Shimizu H, Hashimoto T: Immunofluorescence studies using skin section of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients indicated that the antigen of anti-p200 pemphigoid is not a fragment of type VII collagen, **J Dermatol Sci** 32(2):125-129, 2003
 13. Tsukada Y, Kawase MK, Murashima A, Kitahora T, Hashimoto T, Komai A: Bullous pemphigoid associated with dermatomyositis successfully controlled with minocycline. **Clin Exp Dermatol** 28(5):563-564, 2003
 14. Abreu-Velez AM, Beutner EH, Montoya F, Bollag WB, Hashimoto T: Analyses of autoantigens in a new form of endemic pemphigus foliaceus in Colombia. **J Am Acad Dermatol** 49(4):609-14, 2003
 15. Abreu-Velez AM, Hashimoto T, Bollag WB, Tobon Arroyave S, Abreu-Velez CE, Londono ML, Montoya F, Beutner EH: A unique form of endemic pemphigus in northern Colombia. **J Am Acad Dermatol** 49(4):599-608, 2003
 16. Hisamatsu Y, Nishiyama T, Amano S, Matsui C, Ghohestani R, Hashimoto T: Usefulness of immunoblotting using purified laminin 5 in the diagnosis of anti-laminin 5 cicatricial pemphigoid. **J Dermatol Sci** 33(2):113-9, 2003
 17. Futei Y, Amagai M, Hashimoto T, Nishikawa T: Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 49(6):1023-8, 2003
 18. Shimanovich I, Hirako Y, Sitaru

- C, Hashimoto T, Brocker EB, Butt E, Zillikens D: The autoantigen of anti-p200 pemphigoid is an acidic noncollagenous N-linked glycoprotein of the cutaneous basement membrane. **J Invest Dermatol** 121(6):1402-1408, 2003
19. Ohshima Y, Tamada Y, Matsumoto Y, Hashimoto T: Dermatitis herpetiformis Duhring with palmoplantar keratosis. **Br J Dermatol** 149(6):1300-1302, 2003
20. Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M, Pieczkowski F, Foedinger D, Kirnbauer R, 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(5):646-654, 2003
21. Ishii N, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T: Immunolocalization of target autoantigens in IgA pemphigus. **Clin Exp Dermatol** 29(1):62-66, 2004
22. Matsushima S, Horiguchi Y, Honda T, Fujii S, Okano T, Tanabe M, Wakayama T, Hashimoto T, Yancey KB: A case of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid associated with lung carcinoma and severe laryngeal stenosis: review of Japanese cases and evaluation of risk for internal malignancy. **J Dermatol** 31(1):10-5, 2004
- 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
なし。
 3. その他
なし。

図とその説明

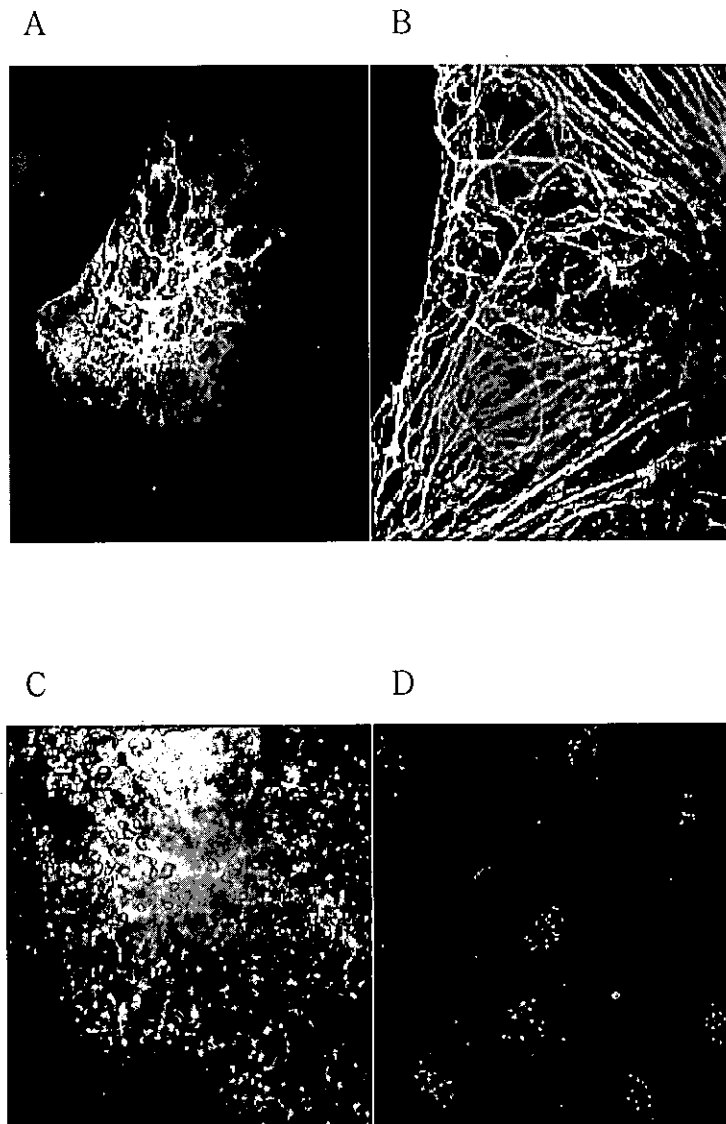


図1 COS-7細胞におけるペリプラキンC-末端部の強制発現。ペリプラキンのC-末端部は中間径線維と局在が一致する(A.B)。C-末端部の一部欠失変異体は中間径線維と局在が一致せず(C)、界面活性剤処理により、消失する(D)。

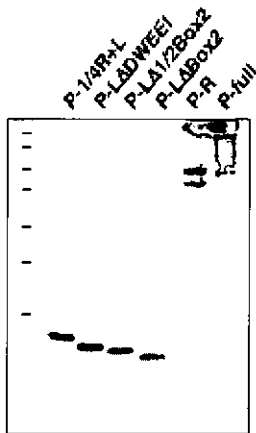
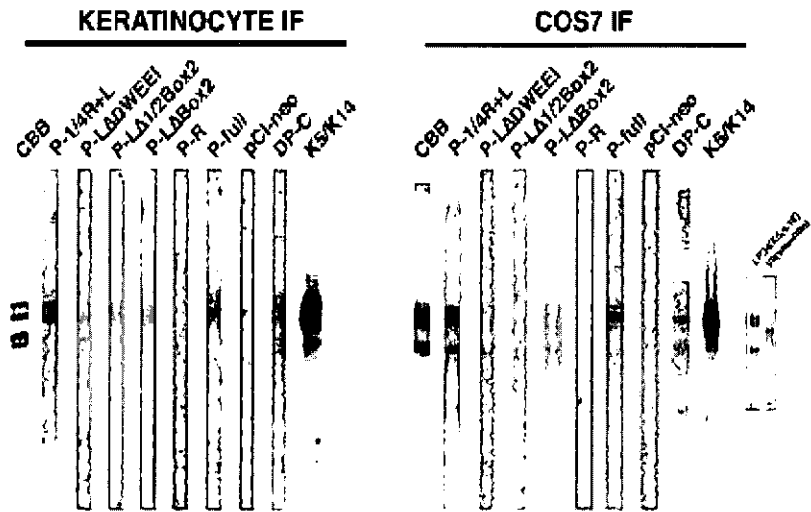
A**B**

図2 蛋白オーバーレイ法によるペリプラキンC-末端部のケラチン・ビメンチン中間径線維への結合。