

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成17(2005)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 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻病態制御学講座 皮膚病態学分野 教授	
III 分担研究報告・協力研究報告	
[天疱瘡]	
各種抗 Dsg3 モノクローナル抗体刺激による DJM-1 細胞における Dsg3 分子の減少率と病原性	15
主任研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻病態制御学講座 皮膚病態学分野 教授	
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	24
分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
腫瘍随伴性天疱瘡 (PNP) と尋常性天疱瘡 (PV) の関連に関する研究	31
分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法の評価 I	38
分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 講師	
天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法の評価 II	44
分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 講師	
天疱瘡における二重濾過血漿交換療法の有用性	49
分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授	
天疱瘡におけるステロイドパルス療法の ELISA 抗体価の推移解析による 2 週間隔 2 回反復 施行の有効性の提示	51
主任研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻病態制御学講座 皮膚病態学分野 教授	
天疱瘡患者の遺伝的背景 第 2 報 天疱瘡患者の HLA 遺伝子多型解析	59
研究協力者 新関寛徳 奈良県立医科大学皮膚科学 講師	
天疱瘡の QOL 調査 (第 2 報)	74
分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授	
[膿疱性乾癬]	
膿疱性乾癬の病態と治療に関する研究	78
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	
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	86
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	89
研究協力者 本間 好 福島県立医科大学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—膿疱性乾癬における Kogoj 海綿状膿疱の形成メカニズムの解析—	92
研究協力者 照井 正 日本大学医学部皮膚科 教授	
膿疱性乾癬の病因と診断・重症度ガイドラインおよび疫学データに関する研究	96
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	
小児膿疱性乾癬患者の疫学解析	115
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—二次調査進捗状況—	125
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	
[表皮水疱症]	
出生前診断：施行ガイドラインの設定に向けて	141
分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 教授	
Muta mouse を用いたキメラオリゴ核酸導入による In vivo 変異挿入率の検討	147
分担研究者 金田安史 大阪大学医学系研究科遺伝子治療学 教授	
超音波とマイクロバブルを用いた三次元皮膚への遺伝子導入	150
分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授	
栄養障害型先天性表皮水疱症の遺伝子治療	154
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（第2報）	157
研究協力者 市來善郎 岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座皮膚病態学分野 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（BCIE）における表皮層板顆粒系の解析	163
分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学 講師	
表皮細胞における機械的刺激の作用：先天性魚鱗癬様紅皮症への応用を考える	172
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	
ロリクリン角皮症の発症機構に関する研究	186
研究協力者 米田耕造 香川大学医学部皮膚科学 講師	
本邦における先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）の疫学研究—genotype phenotype 解析を中心—	188
分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授	
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	192
研究協力者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 助手	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	199
V 平成16年度総会プログラム	
平成16年度第1回総会プログラム	209
平成16年度第2回総会プログラム	212

[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	岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座皮膚病態学分野	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科	教授	膿疱性乾癬（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） 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 旭川医科大学皮膚科学	教授 講師	先天性魚鱗癬様紅皮症、角化症、天疱瘡（発症機序と統計） 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 照井 正 小宮根真弓	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 東海大学医学部皮膚科 日本大学医学部皮膚科 東京大学医学部皮膚科	教授 教授 教授 講師	膿疱性乾癬（発症機序） 膿疱性乾癬（病因遺伝子と治療） 膿疱性乾癬（発症機序と治療） 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	講師	天疱瘡（病因遺伝子と治療）
玉井 克人	大阪大学医学系研究科分子治療学遺伝子治療学	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	香川大学医学部皮膚科	講師	ケラチン病の病態
市來 善郎	岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座皮膚病態学	助教授	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（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 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻
病態制御学講座皮膚病態学分野 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3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：天疱瘡モデルマウスにおいて抗CD40L抗体はCD40/CD40L相互作用阻害により発症抑制に有効であり、新しい治療薬としての可能性が示唆された。また、天疱瘡モデルマウスは各種免疫抑制剤で検討したところ有意な症状抑制効果を認め、種々の免疫抑制療法の前臨床試験として、有用な評価系であった。天疱瘡モノクローナル抗体単独および混合実験から、ポリクローナル抗体であるPV-IgG刺激による強いDsg3減少効果は多数のDsg3ポリクローナル抗体の相加的効果の総和であると推察された。PCR-Luminex法により140名の検体はゲノムワイドスキャンに提供可能であること、天疱瘡関連HLA対立遺伝子陰性例は102例中4例（3.9%）と低頻度であることが示された。②膿疱性乾癬：日本乾癬学会のデータ1995年から2002年の期間127名の膿疱性乾癬患者の登録のうち小児例は13名（男性1名、女性12名）で、再発の頻度と登録時の重症度は別にして経過に関しては、小児の方が有意に悪化、不変の頻度が高かった。治療では、小児例では有意にシクロスポリン内服、抗炎症剤内服を選択しており、成人とは異なる小児膿疱性乾癬治療ガイドライン作成の必要があると思われた。H16年9月よりSF-36v2と重症度・治療評価調査票による二次調査を開始した。平成16年度は、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完了し、最終的に40個のマーカーに有意な相関が認められた。三次元培養ヒト皮膚を用いた膿疱形成機序モデルを開発した。③表皮水疱症：我々は本邦において既に34例の出生前診断を施行してきたところ、出生前診断の新しいガイドラインの設定が必要であることが明らかとなった。三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクター、超音波を用いた新たな遺伝子導入法を確立した。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：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55人（95%信頼区間35-75人）と推計された。二次調査票は28例で、男女各14例、年齢は2～65歳、地域集積性は認められず、家族歴を有するのは3例（10.7%）であった。臨床症状は全身性の皮疹27例（96.4%）、紅皮症19例（67.9%）、全身の水疱15例（57.7%）、手指拘縮あり3例（10.7%）、姿勢異常1例（3.6%）、歩行障害有り4例（14.3%）等であった。患者のDNA配列をしらべ遺伝子変異を同定し、genotype/phenotypeの解析をしたところ、ほぼ全例のK1、K10変異症例に全身の紅皮症と水疱形成が見られ、多くは新生児期以降も水疱を生じる。また、従来K1変異症例にのみ生じると言われていた掌蹠角化がK10変異症例にも生じ得る。さらに、コロジオン児は、K1、K10変異症例ともに生じ得ると推察された。一方、角化細胞内に変異ケラチン凝集塊が生じるとTNF- α の産生が亢進、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。

た(金田)。

4) GFP 遺伝子トランスジェニックマウスより骨髓を採取し、野生型同系マウスに移植した。6週間後に背部皮膚を切除して潰瘍モデルを作成し、その創傷治癒過程で潰瘍部皮膚を生検、GFP 陽性表皮細胞の有無を検討した。さらに、GFP 遺伝子トランスジェニックマウス骨髓を移植した野生型同系マウス背部に GFP トランスジェニックマウス皮膚を移植、移植片の拒絶の有無を経時的に観察した(研究協力者:玉井)。

④ 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症

1) 本調査は全国の多施設を対象に患者数の推定と臨床疫学像を明らかにすることを目的に実施する。先に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の診断基準が作成し、対象を2002年1年間の受療患者とし、全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した皮膚科計802科に2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施する。水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者ありと回答のあった施設を二次調査対象とする(池田、研究協力者:黒澤)。

2) 類似疾患のロリクリン角化症における角化異常の機序を異常ロリクリン遺伝子を培養細胞に導入することによって検討した(研究協力者:米田)。

3) 患者皮膚の免疫電顕観察によるケラチン遺伝子変異と臨床形成機序をコルネオデスモシンの観点から解明する(山本)。

4) 層板顆粒は正常では表皮の顆粒細胞が角層細胞に分化する際に細胞外に分泌されるが、BCIE患者の角層内においては一部の顆粒が分泌されずに残っていることが確認されたので、層板顆粒内のタンパク分解酵素(KLK5, KLK7)とそのインヒビター(LEKTI)がどのように発現、分泌されるか、正常表皮をもちいて検討した(山本)。

5) 患者のDNA配列をしらべ遺伝子変異を同定し、genotype/phenotypeの解析

をした(池田)。

C. 研究結果とD. 考察

①天疱瘡

1) 抗CD40L抗体であるMR1は、CD40/CD40L相互作用を阻害することでB細胞の分化増殖および抗体産生を抑制する。本研究ではPVモデルマウスを用いて抗CD40L抗体の予防および治療効果を検討した。Dsg3^{-/-}マウス脾細胞移植の-2、0、2、4、7日に500 μ gのMR1を投与したところ、コントロール群においては移植後14日において明らかな抗体産生を認めたのに対し、抗CD40L抗体投与群ではELISA法により明らかな抗Dsg3抗体産生を認めず、ELISPOT法においても脾臓およびリンパ節において抗Dsg3抗体産生B細胞を検出しなかった。抗CD40L抗体投与群では、PVに特徴的な体重減少および脱毛などの表現型を認めなかった。治療効果の検討として、安定した抗Dsg3抗体産生を示すPVモデルマウスに対して1mgのMR1を週2回計12回投与した。投与開始後から抗体価は低下傾向を示し、一部のマウスにおいて表現型の改善を認めたが、コントロール群との間に統計学的有意差を認めなかった。以上の結果より、CD40/CD40L相互作用阻害がPVモデルマウスにおいて発症抑制には有効であることが示され、抗CD40L抗体の新しい治療薬としての可能性が示唆された(天谷)。

2) Pemphigus vulgaris (PV) の治療は、各施設の経験に依存しているところが大きく、客観的な治療評価系の確立が望まれている。PVモデルマウスは、デスモグレイン3(Dsg3)に対する自己抗体の産生が6カ月以上に渡って持続的に認められ、PVに特徴的な病理所見を有する水疱、びらんを形成する。本研究では、現在ヒトPVの治療に用いられている薬剤の効果をPVモデルマウスを用いて評価した。薬剤は、dexamethasone (DEX)、methylpre-

dnisolone (m-PSL)、azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate (FK506) and mycophenolate mofetil (MMF) の7種類を選択した。検討した薬剤の中では、CPA は最も強い抗体産生抑制効果を認め、また他薬剤も有意な抑制効果を認めた。天疱瘡モデルマウスは、種々の免疫抑制療法の前臨床試験として、有用な評価系であることが示された(天谷)。

3) desmoglein3 (Dsg3) に対するマウスモノクローナル抗体 AK23、AK20、AK19、AK18 の Dsg3 への結合は尋常性天疱瘡抗体 (PV-IgG) より効果は弱いものの同様に30分刺激においてすでに膜+細胞質画分(トリトン X100 可溶性画分)から、および24時間では細胞骨格(デスモソーム含有)画分から一定量減少することを蛍光抗体法と免疫ブロット法によって示した。今回は、AK23 の Dsg3 減少効果最小必要濃度を30分、120分刺激で求めたところ、0.064~500 ug/ml の範囲で Dsg3 減少効果はほぼプラトー(40~50%減)に達していた。そこで、今回は4種の AK 抗体を 100ug/ml の濃度で混合し30分間、24時間処理したところ、AK23 単独刺激の Dsg3 減少率よりまた2種の抗体の混合刺激より4種混合刺激ではより大きな減少率を示した。これは AK23 抗体が ng/ml オーダーで生物活性を発揮し、AK 抗体の混合は相加的に Dsg3 減少率の増加を生じること示唆する。また、このことからポリクローナル抗体である PV-IgG 刺激による強い Dsg3 減少効果は多数の Dsg3 抗体の相加的効果の総和であると推察される(北島)。

4) 天疱瘡の QOL につき既存の資料を詳細に検討した。その結果、①天疱瘡の予後は改善されたとはいえ、多くの患者にとって治療面における副作用や、突然の増悪などへの強い不安感を抱いていることがうかがえた。②今後とも精神面、社会制度面

からも、患者支援が重要である。③新規の QOL 調査を行い、予後と QOL の調査を推進する必要があることが明らかとなった(池田)。

5) 天疱瘡の経過中に臨床病型の移行を示したと考えられる症例の報告は国内外といくつかなされている。臨床病型の移行に伴って抗原も変化することは既知のことであるが、その有用な方法として ELISA 法が挙げられる。今回、われわれは腫瘍随伴性天疱瘡 (PNP)/尋常性天疱瘡 (PV) の病型間で移行を示したと考えられる症例について、患者血清を用いて蛍光抗体間接法、ELISA 法、免疫ブロット法を行い、抗 Dsg 抗体価の推移を多角的に解析し検討・考察を行った。各種検索において、臨床病型、病勢に相関して抗原の変化が確認できた(橋本)。

6) 8例の患者の ELISA 法解析から、天疱瘡のステロイドパルス療法は2週間ごとに効果判定し、臨床症状に明らかな改善がない場合は2回連続で施行することが有効で、また判定の補助に ELISA 値の推移が有用であると考えられた(北島)。

7) 144名の患者 DNA を収集し得た。DNA の質および量を確認するため HLA typing を行った。PCR-Luminex 法により HLA-A、HLA-B、HLA-DR の3ローカスのタイピングを施行したところ、1) 140名の検体においてタイピングが可能であり、ゲノムワイドスキャンに提供可能であることが証明された。2) 既報告どおり尋常性天疱瘡 (PV) と HLA-DR 遺伝子との強い相関が認められ、PV 関連 HLA 対立遺伝子が同定できた。3) PV 関連 HLA 対立遺伝子陰性例は 102 例中 4 例 (3.9%) と低頻度であることから、これらの臨床的特徴を検討することにより HLA-DR タイピングが PV の診断に有用である可能性が示唆された(研究協力者:新関)。

②膿疱性乾癬

1) 膿疱性乾癬の診断基準と重症度基準

を見直し、現状に即した鑑別診断や検査項目を取捨選択し、認定指針と個人調査票を全国統一様式に改訂し、今後の疫学調査を可能にした。日本乾癬学会登録データから膿疱性乾癬症例を抽出し疫学的検討を行い、重症度の層別化と年齢による層別化解析を施行した。特に小児膿疱性乾癬の臨床的特徴について明らかにした。膿疱性乾癬 QOL を中心とした一次全国調査を完了し、現在、二次調査を実施中であり、第1回中間報告を行った。この二次調査結果をもとに診断および重症度判定に必要な診断項目の見直しを行っている。山陽地区に岡山皮膚難病支援ネットワークを設立し、行政とともに支援を実践する難病医療拠点のプロトタイプを形成した（岩月、研究協力者：小澤）。

2) 日本乾癬学会のデータ1995年から2002年の期間127名の膿疱性乾癬患者の登録のうち小児例は13名（男性1名、女性12名）で、再発の頻度と登録時の重症度は別にして経過に関しては、小児の方が有意に悪化、不変の頻度が高かった。治療では、小児例では有意にシクロスポリン内服、抗炎症剤内服を選択しており、成人とは異なる小児膿疱性乾癬治療ガイドライン作成の必要があると思われた（岩月、研究協力者：小澤）。

3) 汎発性膿疱性乾癬 QOL 調査をH16年1月より開始した。日本皮膚科学会認定専門医研修指定施設561施設の皮膚科を対象として一次調査を実施し、H16年8月までに415施設から回答を得た。症例を有していた191施設のうち146施設が二次調査に参加可能であった。二次調査実施計画の倫理審査を主任研究者および分担研究者の所属大学で受けたのち、H16年9月よりSF-36v2と重症度・治療評価調査票による二次調査を開始した。現時点で回収された25例の解析では、SF-36v2の8つの下位尺度の大部分が低下している症例が存在すること、下位尺度の項目のうち身体機能、日

常役割機能（身体）、日常役割機能（精神）において、標準偏差2倍以上に相当する値に低下している症例の割合が多いことが認められた。H18年3月まで二次調査を継続し、患者群のQOLの特徴と重症度・治療評価の相関などを明らかにする予定である（岩月、研究協力者：小澤、市来）。

4) 膿疱性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、両者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（岩月、研究協力者：本間）。

5) 三次元培養ヒト皮膚（Testskin Matrex）に低容量のIFN γ と非動化していないFBSを加え一晩培養した後、好中球と共培養したところ角層内～角層下への好中球集積像が再現できた。今後、このモデルは膿疱形成機序の解析と治療の開発に役立つと考える（研究協力者：照井）。

6) マイクロサテライトをマーカーとしたゲノムワイドな遺伝的相関解析は、Pooled DNA typing法を用いた解析の1～3次スクリーニングを完了した。最終的に40個のマーカーに有意な相関が認められ、これらの領域に、乾癬の疾患感受性遺伝子が存在しているものと確信している（研究協力者：小澤）。

7) 当科乾癬外来に通院する乾癬患者279名の血清IgE値を調べたところ、120名で高値であった。特にIgE値1000以上の患者32名中10例で膿疱化の既往が確認された。これらの患者のうち同意の得られた34名で血清中sEselectin、sCD40L、TARC、CTACK、IP-10、IL-4、GM-CSFについてELISA法で検討したところ、乾癬患者のIgE値高値群の血清TARC値は、IgE正常群および健常人に比べ有意に高値であり、sE-selectin、CTACK、IP-10ではこれまでの報告どおり乾癬患者で健常人に比べ有意に高値であったが、乾癬患者のIgE高値群とIgE正常群で差はなかった。

sCD40L、IL-4、GM-CSF においては、乾癬と健常人、乾癬患者の IgE 高値群と IgE 正常群で有意な差はなかった（研究協力者：小宮根）。

③表皮水疱症

1) 我々は本邦において既に34例の出生前診断を施行してきたところ、出生前診断の新しいガイドラインの設定が必要不可欠であることが明らかとなった（清水）。

2) 三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクター、超音波を用いた新たな遺伝子導入法を確立した（橋本公二）。

3) 皮膚疾患の遺伝子治療を実現するために（1）遺伝子導入効率の増強、（2）導入遺伝子の長期発現の実現、（3）治療効果を増強できる遺伝子の分離などを行った。（4）ラムダファージの *lacZ* 遺伝子をもつ Muta mouse の肝臓にこれらのキメラオリゴ核酸を HVJ-liposome を用いて導入し、1週間後に肝臓から DNA を抽出し、 $\lambda::lacZ$ 粒子を *in vitro* packaging によって作成した。これを *E.coli delta lac gale* に感染させ p-gal agar 上での *lacZ*-plaque 数をカウントした。この方法による変異頻度は 1/20000 以下であり、非導入群のコントロールと比較して優位さが無いことが判明した（金田）。

4) GFP 陽性骨髄細胞を移植したマウス背部皮膚の潰瘍治癒過程で経時的に皮膚生検し、GFP 陽性表皮細胞の有無を検討した。その結果、潰瘍閉鎖前、及び閉鎖後の再生表皮中に GFP 陽性表皮細胞がキメラ状態で存在すること、毛包内に GFP 陽性表皮細胞が集簇していることが確認された。また、GFP 陽性骨髄細胞移植マウス背部皮膚に GFP 陽性マウス皮膚を移植し、拒絶反応の有無を検討した。その結果、GFP 陽性骨髄細胞の移植によって GFP に対する免疫寛容が誘導されることが明らかとなった（研究協力者：玉井）。

5) 皮膚疾患の遺伝子治療を実現するために（1）遺伝子導入効率の増強、（2）導

入遺伝子の長期発現の実現、（3）治療効果を増強できる遺伝子の分離などを行った。（1）については chemical peeling を行い超音波造影法による遺伝子導入の条件を検討し、マウス皮膚へのルシフェラーゼ遺伝子発現を直接注入の場合の約 100 倍高めることに成功した。（2）については魚類のトランスポゾンとトランスポゼースの共導入条件を検討した結果、遺伝子の挿入をおこさず転写効率を高めることにより骨格筋での 200 日以上遺伝子発現の持続を可能にした。しかしキメラオリゴ核酸を用いた遺伝子変異修正法は生体組織では現状法では機能しないことがわかった。（3）については HB-EGF, HGF, prostacyclin synthase の皮膚病変に対する機能を明らかにするとともに、HVJ envelope vector を用いた keratinocyte 増殖遺伝子の分離を試みた（金田、研究協力者：玉井）。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (BCIE)

1) 本調査は全国の多施設を対象に患者数の推定と臨床疫学像を明らかにすることを目的に実施した。先に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の診断基準が作成され、対象を 2002 年 1 年間の受療患者とし、全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した皮膚科計 802 科に 2003 年 1 月に患者数推計のための一次調査を実施した。水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者ありと回答のあった施設を二次調査対象とした。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から対象期間外の不適格例を考慮し、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 55 人（95% 信頼区間 35-75 人）と推計された。対象外を除く二次調査票は 28 例で、男女各 14 例、年齢は 2 ~ 65 歳、地域集積性は認められず、家族歴を有するのは 3 例（10.7%）であった。臨床症状は全身性の皮疹 27 例（96.4%）、紅皮症 19 例（67.9%）、全身の水疱 15 例（57.7%）、手指拘縮あり 3 例（10.7%）、姿勢異常 1 例

(3.6%)、歩行障害有り 4 例 (14.3%) 等であった。鱗屑の性状や歩行障害の有無に性差が認められた。診断時と比較した現在の病状は改善と不変が同割合 (42.9%) であった (研究協力者：黒澤、池田)。

2) 角化細胞内にロリクリン凝集塊が生じると FADD を介する経路により角化細胞がアポトーシスにおちいることを示すものである。変異ロリクリンをトランスフェクションした角化細胞 (ロリクリン角皮症のモデル細胞) では、アポトーシスは生じていなかった (研究協力者：米田)。

3) BCIE 4 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 (山本)。

4) 層板顆粒内のタンパク分解酵素 (KLK5, KLK7) とそのインヒビター (LEKTI) がどのように発現、分泌されるか、正常表皮をもちいて検討したところ、BCIE においてはケラチン線維の異常によって角化細胞の形態変化にともなう層板顆粒の分泌過程が 2 次的に障害され、特にその後半に分泌されるタンパク分解酵素の供給が不十分となり、角層細胞間のコルネオデスモゾームの分解過程が遅延すると推定された (山本)。

5) 変異遺伝子とその変異のまとめ：計 10 名 (内 2 例は母子例) の患者において、計 8 の変異が同定された。以上から、(1) ほぼ全例の K1, K10 変異症例に全身の紅皮症と水疱形成が見られ、多くは新生児期以降も水疱を生じる。(2) 従来 K1 変異症例にのみ生じると言われていた掌蹠角化が K10 変異症例にも生じ得る。(3) コロジョン児は、K1, K10 変異症例ともに生じ得る (池田)。

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した。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た。

北海道大学大学院医学研究科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」岡山大学倫理委員会承認；「乾癬における遺伝的背景と遺伝子転写制御異常の検索；受付番号29」「汎発性膿疱性乾癬における重症度評価と Quality of Life (QOL) の相関に関する研究；受付番号40」。奈良県立医科大学倫理委員会承認 (承認番号20) 平成15年11月7日、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会承認 平成16年1月21日、岐阜大学倫理委員会承認 (承認番号15-97) 平成15年12月19日、久留米大学医学部倫理委員会承認 (承認番号10) 平成15年11月28日、慶應義塾大学医学部倫理委員会承認 (承認番号14-74-1) 平成16年4月13日、愛媛大学医学部倫理委員会承認 (承認番号30) 平成16年4月27日岡山大学倫理委員会承認 (承認番号16-1)；平成16年6月23日：「天疱瘡患者の遺伝的背景」。

E. 結論

①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症、④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症に関する上記の結果および考案から本研究の3年計画の第3年度の目標はほぼ達せられたと考える。

さらに、3年間の総括をまとめると以下のようなになる。すなわち、①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症、④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の4疾患についての診断基

準の見直し、それに基づく疫学的研究による患者数と治療状態の実体の把握を行った。発症分子病態の解明、原因遺伝子の解析と臨床表現型との相関、原因遺伝子から発症までの機序、これらによる EBM に基づく治療法の開発という大きな目的に対して、上述した結果から本研究の段階的目的である 3 年計画の目標は 70~80% は達せられたと考える。しかしながら、病因抗体や病因遺伝子が解明されたが、この過程からさらに新たな問題が提起され、発症機序は解決できていないこと、また、いずれのこれら稀少難治性皮膚疾患に関しても満足すべき根本的治療は未だ確立していないことから、この研究班の存続の必要性は極めて高い。一方、膿疱性乾癬では、病因も不明であり特異的治療法も開発されていない。今後、稀少難治性皮膚疾患の病態解明と治療成績等の向上を図り、患者の医療、福祉改善に寄与するためには本研究班の継続が必要であると考える。

F. 健康危険情報

栄養障害型表皮水疱症は、若年から有棘細胞癌を発症することで知られている。栄養障害型表皮水疱症自体を完治させうる治療がまだ開発されていない現状では、表皮水疱症自体の臨床症状が重症でなくとも有棘細胞癌の早期発見早期治療のため定期的な専門施設への受診を十分に啓蒙する必要がある。

G. 研究発表（平成16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. 北島康雄：デスモソームの形成・分解制御と天疱瘡の発症機序. 第 8 回旭川皮膚科リサーチセミナー 2 月 1 日, 2004 旭川
2. 北島康雄：自己免疫性水疱症の発症機序と治療. 第 3 回香川皮膚免疫研究会 11 月 27 日, 2004 高松
3. 北島康雄：尋常性天疱瘡の棘融解はなぜ起こる？ マルホ皮膚科セミナー ラジオたんぱ 8 月 12 日, 2004 大阪
4. 江崎智香子、長谷川優佳、永井美貴、高木 肇、北島康雄、小林 敦、柴田敏之. ロキシスロマイシン・トラニラスト併用療法により症状が消退した粘膜型 PV と BP の合併例. 第 103 回日本皮膚科学会総会 4 月 16~18 日, 2004 京都
5. 江崎智香子、市來善郎、高木 肇、北島康雄. 自己免疫性水疱症におけるステロイドパルス療法 8 例の毎週測定 ELISA 値からの示唆. 第 26 回水疱症研究会 10 月 17 日, 2004 岡山
6. Zhou Y, Yamamoto Y, Nagai M, Kitajima Y. Distribution of desmoglein 3 and desmocollin 3 in DJM-1 cell after treatment with pemphigus vulgaris-IgG. 第 29 回日本研究皮膚科学会 4 月 14~16 日, 2004 京都
7. 高塚智子、江崎智香子、和泉智子、青山裕美、市來善郎、高木 肇、北島康雄、楊 美雪、樋口実穂、遠渡 舞、米田和史. 治療に工夫を要した難治性の類天疱瘡の 1 例. 第 26 回水疱症研究会 10 月 17 日, 2004 岡山
8. 高塚智子、江崎智香子、和泉智子、青山裕美、市來善郎、高木 肇、北島康雄、横井繁明、出口 隆、楊 美雪、樋口実穂、遠渡舞、米田和史. ステロイドパルスと γ グロブリン大量療法が有効であった類天疱瘡の 1 例. 第 230 回日本皮膚科学会東海地方会 12 月 5 日, 2004 名古屋
9. 山本ゆかり、角田和之、天谷雅行、北島康雄. 尋常性天疱瘡病原性抗 Dsg3 モノクロナール抗体は、デスモソーム形成阻害をしないが、Dsg3 欠損デスモソームを作る. 第 29 回日本研究皮膚

- 科学会 4月14~16日, 2004 京都
10. 山本ゆかり、青山裕美、角田和之、天谷雅行、北島康雄. Formation of Dsg3-deficient desmosome by pemphigus monoclonal antibodies. 第18回表皮細胞研究会 10月30日, 2004 東京
 11. 松浦浩徳、岩月啓氏、大藤玲子、梅澤慶紀、小澤 明、中村晃一郎、金子史男. 小児膿疱性乾癬患者の疫学解析. 第19回日本乾癬学会, 2004
 12. 松浦浩徳、岩月啓氏. 乾癬性関節炎 皮膚病変とその治療. 第14回日本脊椎関節炎 (AS) 研究会, 2004
 13. Yuji Shirakata, Sho Tokumaru, Yoko Yahata, Mikiko Tohyama, Yasushi Hanakawa, Koji Sayama, Koji Hashimoto: HB-EGF shedding is essential for UV-induced EGFR phosphorylation and epidermal hyperplasia. 34th annual meeting of European Society for Dermatological Research 2004.09.07 Vienna Austria
 14. Lujun Yang, Yuji Shirakata, Xiuju Dai, Yoko Yahata, Koji Sayama, Koji Hashimoto: Microbubble-Enhanced Ultrasound for Gene Transfer into Living Skin Equivalent. 8th China-Japan Joint Meeting of Dermatology 2004.11.12 Kuming China
 15. Yasufumi Kaneda: The 12th European Society Gene Therapy (Invited lecture) "Development of novel non-viral gene delivery system" November 5, 2004, Tampere, Finland
 16. 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, 東京都
 17. 山本明美. 角化過程の理解と角化異常症、最近の到達点、第103回日本皮膚科学会学術大会 (Physician Scientistsに聞く) 2004.4.16, 京都市
 18. 山本明美、高橋英俊、飯塚 一. 表皮層板顆粒は TGN に由来する管状構造をとり、段階的に合成された分泌タンパクを凝集塊として輸送する、第29回日本研究皮膚科学会学術大会 2004.4.14. 京都市
 19. 山本明美、Alain Hovnanian. Netherton 症候群原因タンパク LEKTI は層板顆粒によって運ばれる、第31回日本電顕皮膚生物学会学術大会2004.10.8, 鹿児島県牧園町
 20. 山本明美. マクロからミクロまで。角化と角化症を解説する。第56回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (教育講演) 2004.11.7, 久留米市
 21. 馬淵智生、岡 晃、田宮 元、猪子英俊、飯塚万利子、梅澤慶紀、太田幸則、松山 孝、小澤 明. 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—第6染色体—、The 29th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology、平成16年4月14-16日、京都
 22. 梅澤慶紀、馬淵智生、赤坂江美子、太田幸則、飯塚万利子、松山 孝、小澤明. 汎発性膿疱性乾癬 (GPP) の6例—厚生労働省の「GPP 治療ガイドライン」に基づいた—、第103回日本皮膚科学会総会・学術大会、平成16年4月16-18日、京都
 23. 馬淵智生、赤坂江美子、岩下賢一、梅澤慶紀、飯塚万利子、太田幸則、松山孝、小澤 明、岡 晃、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、小川秀興、松本義也、末木博彦、飯島正文. 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—3次スクリーニングにおける解

- 析一、第19回日本乾癬学会、平成16年9月3～4日、山形
24. 新関寛徳、榎本美生、北村華奈、古林郁乃、横井祥子、浅田秀夫、宮川幸子、石井文人、橋本隆. Zillikens Detlef BP180のNC16A 部位に対する抗体が欠如した水疱性類天疱瘡の2例 第26回水疱症研究会、平成16年10月17日、岡山市
 25. 新関寛徳、榎本美生、古林郁乃、横井祥子、浅田秀夫、宮川幸子、石井文人、Zillikens Detlef BP180 の NC16A 部位に対する抗体が欠如した水疱性類天疱瘡の1例 第56日本皮膚科学会西部支部学術大会、平成16年11月6日、久留米市
 26. 新関寛徳、宮川幸子、猪子英俊（シンポジウム）水疱症発症の遺伝的背景 第56日本皮膚科学会西部支部学術大会、平成16年11月6日、久留米市
 27. Homma M, Homma Y: Nuclear localization of CK2 associated with the progression of cell cycle. 第77回生化学会大会, 2004
 28. Sekimata M, Homma Y: DNA methylation downregulates vimentin gene expression in rat C6 glioma cells. 第77回生化学会大会, 2004
 29. Kamataki A, Kikuchi M, Yamaki J, Homma Y: Identification of genes whose methylation status is altered in psoriasis. 第77回生化学会大会, 2004
 30. Homma Y: Microarray-based detection of methylated CpG islands. 10th Int Charles Heidelberger Sympo, 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
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）
分担研究報告書

各種抗 Dsg3 モノクローナル抗体刺激による DJM-1 細胞における
Dsg3 分子の減少率と病原性

主任研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻
病態制御学講座皮膚病態学分野 教授

研究要旨 我々はこれまでに、病原性マウスモノクローナル抗体 AK23（デスマグレイン3：Dsg3 N末接着機能部位に対する）の Dsg3 への結合は尋常性天疱瘡抗体（PV-IgG）と同様に24時間刺激により Dsg3 減少デスモソームを形成することを示した。しかし、この時 Dsg3 の量は PV-IgG 刺激時ではデスモソームを含む細胞内プールから約90%消失するのに比べ、AK23 では約40%程度しか減少しなかった。そこで、この反応性の差は PV-IgG のエピトープの数すなわちポリクロナリティ効果によるという仮説を立て、病原活性およびエピトープの異なった4種の抗 Dsg3 モノクローナル抗体を用いて、エピトープ、及び病原活性依存性に Dsg3 減少率はどの程度の違いがあるのか、また、それらの抗体を混合することにより、単独刺激以上の効果が得られるのかどうか解析することによってポリクロナリティ効果を検討した。4種類の抗 Dsg3 モノクローナル抗体（AK18、19、20、23）をそれぞれ各種濃度で単独、及び2種、4種類の混合で有棘細胞癌株 DJM-1 細胞に刺激を行った。30分、24時間後、1% Triton-X 100 による分画抽出を行い、免疫ブロット法にて検出、バンドを数値化し、プラコグロビン（PG）をコントロールとした時の Dsg3 の減少率を算出した。その結果、エピトープの異なる抗 Dsg3 モノクローナル抗体はそれぞれ異なる Dsg3 最大減少量を示しプラトーに達した。その減少率の強さは病原活性の強さに比例した。また、それらを混合することによって、その Dsg3 減少率は相加的に増加した。このことは病原性の強度は抗 Dsg3 抗体のエピトープ部位の差異のみならず、1分子の Dsg3 に結合している抗体数が多い（すなわちポリクローナルである）ほど活性が強い可能性が示唆された。すなわち、患者天疱瘡抗体の病原活性はエピトープの部位とエピトープの数の多さ（ポリクロナリティ効果）に規定されると推察される。

共同研究者
山本ゆかり 岐阜大学医学部皮膚科研究員

A. 研究目的

我々はこれまでに、Dsg3 に対する自己抗体（PV-IgG）がデスモソームに組み込まれる前の Dsg3 に結合することによってシグナル伝達を引き起こし¹⁾、Dsg3 のリン酸化、それに伴う PG の解離²⁾により細胞内に取り込まれて分解される結果、Dsg3 減少デスモソームを形成することを報告してきた³⁾。さらに、Dsg3 N末接着

機能部ドメインに対する抗体で、かつ *in vivo* で病原活性のあるマウスモノクローナル抗体 AK23⁴⁾を用いても、24時間の刺激後、同様に Dsg3 減少デスモソームを形成したことから、これらの反応は Dsg3 に対する抗体特異的反応であったことが示された⁵⁾。しかし、この時の Dsg3 の量は PV-IgG 刺激時では約90%消失するのに対して、AK23 では抗体濃度、刺激時間に関わらず約40%程度までにしか減少しなかった。そこで、この反応性の差は PV-IgG のエピトープの数すなわちポリク

ロナリティ効果によるという仮説を立て、病原活性およびエピトープの異なった4種の抗 Dsg3 モノクローナル抗体を用いて、エピトープ、及び病原活性依存的には Dsg3 減少率ほどの程度の違いがあるのか、また、それらの抗体を混合することにより、単独刺激以上の効果が得られるのかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 細胞の培養；

ヒト扁平上皮癌細胞から分離した DJM-1 細胞を、Eagle's essential medium (MEM), 0.4ug/ml ハイドロコルチゾン、10ng/ml EGF, 84ng/ml コレラトキシン、10%FCS を含む培地中で培養した。実験には 5×10^4 個の細胞を 35mm シャーレに播種し、50 時間培養後の 40~50% コンフルエントの細胞を用いた。

2) 抗 Dsg3 モノクローナル抗体の調製

尋常性天疱瘡モデルマウスから作成された数種の抗 Dsg3 モノクローナル抗体のうち、in vivoでのPassive transfer assay, Ascites formation assay により強い病原活性が示された AK23、やや強い AK19、病原活性が検出されなかった AK18、AK 20の4種類を用いた。これらの抗体を産生する各ハイブリドーマを無タンパク培地 (Gibco CD Hybridoma) にて大量培養を行い、その培養上清から Protein G column により IgG を精製し、刺激用抗体液とした。

単独刺激を行う場合は、各 AK モノクローナル抗体濃度は 0.5mg/ml で行い、4 種混合刺激の場合はそれぞれの AK モノクローナル抗体が終濃度 0.5mg/ml になるように調製した (総抗体濃度 2.0mg/ml)。また、2 種混合刺激では、病原活性が強いとされる AK23 と AK19、病原性が弱いとされる AK18、AK20 とを混合し、抗体終濃度はそれぞれ 0.5mg/ml とした (総抗体濃度 1.0mg/ml)。なお、AK23 で

は、0.5mg/ml、1.0mg/ml、2.0mg/ml の濃度で 24 時間、48 時間刺激いずれにおいても Dsg3 減少率は約 40% で平衡状態 (プラトー) に達することは前に報告している⁹⁾。

3) AK モノクローナル抗体刺激

4 種類の抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK18, 19, 20, 23) をそれぞれ上記の方法によって予め調製した抗体液を 1ml の条件でヒト有棘細胞癌株 DJM-1 細胞に添加し、30分、24時間刺激を行った。刺激後、1% Triton X 100 (Tx100) にて抽出、超音波破碎処理、100,000×g で超遠心を行い、上清 (可溶性) の細胞膜及び細胞質画分と、沈澱 (不溶性) のデスモソームを含む細胞骨格画分とに分画した。6% SDS-PAGE 後、免疫ブロット法を用いて PG と Dsg3 を検出 (anti-PG mAb; PG5.1、anti-Dsg3 pAb; AHP319 使用) した。ペプチドバンドを ATTO Lane Analyzer によって数値化し、PG、及び β カテニンをコントロールとした時の Dsg3 の減少率を算出した。PG、及び β カテニンのいずれをコントロールにしても、同じ結果であった (結果図表提示無し) ので、以後、PG をコントロールとして解析した。

C. 研究結果

1) 各 AK 抗体単独刺激における Dsg3 の減少量

AK モノクローナル抗体は DJM-1 細胞への刺激でそれぞれ単独ではどの程度の Dsg3 減少活性を有するかを解析した。細胞膜画分においては、AK 各抗体単独の 30 分刺激で、病原活性の強い AK23 は 52%、次いで病原活性の強い AK19 では 35% の Dsg3 減少が見られた。また、病原活性の検出されない AK18、AK20 はそれぞれ 29%、17% であり、エピトープの異なる抗 Dsg3 モノクローナル抗体はそれぞれ異なる Dsg3 減少率を示していた。しかし、刺激後 24 時間では、病原活性の検出されない AK18、AK20 刺激では Dsg3 の減少はコ

ントロールと比して変化が認められなかった。病原活性のある AK23 と AK19 のみが Dsg3 減少の活性を維持し、それぞれ30分と類値の29%、40%であった(図1)。一方、デスモソームを含む細胞骨格画分では、30分の段階では AK 抗体単独刺激では全て Dsg3 量に変化は見られなかった。刺激後24時間では、病原活性の強い AK23 刺激のみで31%の減少が見られたものの、他の抗体刺激では変化が見られなかった(図2)。

2) エピトープの異なる AK 抗体の混合による Dsg3 減少量の変化

AK 抗体を混合することにより単独刺激以上の効果があるかどうかを検討するため、病原活性がある AK23 と AK19 を混合することで、単独よりもさらに Dsg3 減少活性が上がるのか、また病原活性がない AK18 と AK20 を混合することで Dsg3 減少率に変化があるかを分析した。

病原活性のある AK23 と AK19 とを混合すると、細胞膜画分では刺激後30分で42%、24時間後で57%と AK23 単独刺激による量(それぞれ25%、48%)よりも強く Dsg3 減少が見られた。また24時間後には単独では Dsg3 量減少効果の見られなかった AK18 と AK20 も混合することによって30%の Dsg3 量減少効果が見られた(図1)。細胞骨格画分では30分刺激の段階では変化が無かったが、24時間後では、病原活性のある AK23 と AK19 を混合すると39%と、AK23 単独刺激の32%より Dsg3 の減少が強くなり、また病原活性のない AK18、AK20 でも21%となり、2種の抗体の混合により、Dsg3 減少量が増加することが示された。

さらに、抗体を混合することによるポリクロナリティ効果を検討するため、全4種の抗体混合でも同様の実験を行った。結果、細胞膜画分では30分、24時間刺激後にそれぞれ60%、62%(図3)、細胞骨格画分では58%と最も Dsg3 の減少率が顕著であっ

た(図4)。そこで、単独、2種混合との減少率とを比較するため、各実験ポジティブコントロールとしておいていた AK23 単独刺激時の Dsg3 の減少率を100%と置き換え、2種混合、4種混合時の各減少率を算出した。単独刺激時(100%)に比べ、24時間刺激後の細胞膜画分では AK19 と AK23 の2種混合刺激で17%に、4種混合刺激ではさらに低い58%にまで減少し、一方で細胞骨格画分でも2種混合の11%に比べ、4種混合では38%と強い減少し、抗体の混合種が多い程 Dsg3 の減少も強く見られた(図3、4)。

以上のことから、エピトープの異なる抗体刺激はそれぞれ異なる減少率を示し、また各抗体による30分、24時間刺激後の細胞膜画分、24時間後の細胞骨格画分ではそれぞれ一定の減少率を超えることなく変化が見られなかった。各モノクローナル抗体間の減少率との比較によりその強弱は、病原活性に比例した傾向を示していた。さらに、4種類の抗体を混合することによって、単独、または2種混合刺激時に比べ、より大きな減少率を示していた。

D. 考察

我々はこれまでに病原性マウスモノクローナル抗体 AK23 の Dsg3 への結合は、尋常性天疱瘡抗体と同様に24時間刺激により Dsg3 減少デスモソームを形成し、抗 Dsg3 抗体の結合による特異的な反応であることを示した。しかし、AK23 抗体刺激時には PV-IgG 刺激程の顕著な Dsg3 減少は見られなかった。一方、AK23 の長時間刺激では、抗体濃度に関わらず PV-IgG 刺激減少率約90%の半分程度の約40%のままプラトーに達し、変化が見られなかった。このことから、抗体の結合により引き起こされる Dsg3 の減少は、全か無かの法則のような一義的な反応ではなく、エピトープやアフィニティなど異なる抗体がそれぞれに異なる Dsg3 減少活性を持ち、それらの

相加的な反応として観察されるのではないかと推測した。

そこで、この Dsg3 減少量を規定している要因を探るため、本研究ではエピトープの異なる 4 種の AK 抗体を用いて検討を行った。始めに、エピトープ依存的には Dsg3 減少率はどの程度の違いがあるのか、各 AK モノクローナル抗体を単独で刺激を行ったところ、膜画分では30分、及び24時間刺激後に、細胞骨格画分では24時間刺激後にそれぞれの抗体に対応した異なる一定の減少率を示した。以上から、24時間後にはデスモソームに組み込まれる前の Dsg3 量（1%Tx100 可溶性画分）もデスモソーム中の Dsg3 量（1%Tx100 不溶性画分）も同じ Dsg3 含有量になっていた。これは 4 種どの抗体においても共通してみられた（図 1、2）。

ここで検出されている Dsg3 の量というのは、抗体の結合により膜中の Dsg3 が分解されていく一方で、新しく合成された Dsg3 量との差と考えられる。よって、刺激中、合成がある一定の速度で行われていたとすると、Dsg3 の量は抗体の結合による分解の速度が律速段階となり、両者つりあうところで、みかけ上、量変化がなくなる“平衡”状態に達することが推察される。各 AK 抗体の単独刺激で各一定の減少率でプラトーに達したことは、その時点においてそれぞれ分解と合成のつり合う平衡状態に達しており、またエピトープにより平衡に達する程度が異なることを示している。今回の結果では、4 種の抗体とも細胞膜画分では既に30分の段階で、また細胞骨格画分では24時間以上の刺激で平衡状態に達していることが示された。

ところで、この 2 画分における平衡に達するまでの時間差は、デスモソームの形成過程によると考えられる。我々の免疫電顕像によるこれまでのデータから、まず Dsg3 は合成後に細胞膜上で側方に会合凝集し、次いでアタッチメントプラークとの

結合により半デスモソーム構造をとり、最後にそれらが互いにカップリングすることによりデスモソームを形成することを示唆してきた⁶⁾。

1%Tx100 に可溶性である細胞膜画分中にはケラチン線維やアタッチメントプラークとの結合のない Dsg3 が、一方の細胞骨格画分ではケラチン線維をつないだデスモソームに組み込まれている Tx100 不溶性の Dsg3 分子を含むことを考えると、今回の結果のように、抗体刺激により、まず先に細胞膜中の Dsg3 から一定の割合で減少したまま平衡状態に達しているということは、その後、デスモソームへと組み込まれていく過程での Dsg3 供給もその割合でしか存在しないと考えられる。結果として、Dsg3 の少ないデスモソームが形成され、細胞骨格画分に見られる Dsg3 量も、膜で見られる割合と徐々に同じ平衡状態に達することが推測される。これらのことから、細胞骨格画分における30分刺激時、コントロールと変化がなかったことについては、この段階ではまだ平衡には達しておらず、抗体が結合する前にできていたデスモソーム中の Dsg3 が検出されていたと考えられる。なお、各抗体間の減少率との比較によりその強弱は、in vivo での病原活性に比例した傾向を示していたことは興味深い。

さらに AK モノクローナル抗体の混合刺激は、単独刺激よりも減少率が強くなり、全 4 種混合では最大になった。AK23 を 0.5 mg/ml、1.0mg/ml、2.0mg/ml の濃度で、24時間、48時間刺激でも、いずれにおいても単独刺激の最大減少量は約40%でそれより下がることはなかった。このことから減少量の増加は抗体量の増加によるのではなく、抗体の種類つまり結合部位の増加によると推察された。このことは病原性の無いとされる AK18, 20 抗体でも、混合することによって24時間刺激後には検出できるほどの Dsg3 減少効果を発現するようになったことから示唆している（図 1-4）。