

E. 結論

以上から、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(ポリクローナリティ効果)に規定されると推察される。

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. **J Invest Dermatol Symp Proc** 4:137-144, 1999
- 2) Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y, A pathogenic autoantibody, pemphigus IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. **Eur J Immunol** 29:2233-2240, 1999
- 3) Aoyama Y, Kitajima Y. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. **J Invest Dermatol** 112:67-71, 1999
- 4) Tsunoda K, Amagai M., Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol.** 170:2170-8, 2003.

- 5) 北島康雄、厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)平成16年度分担研究報告書
- 6) Sato M, Aoyama Y, Kitajima Y. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. **Lab Invest** 80:1583-1592, 2000

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表(平成16年度)

1. 論文発表
英語論文
 1. 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
 2. 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** 294:534-549, 2004
 3. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Pittelkow MR, Kitajima Y, Grand SA Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists **Arch Dermatol** 140:327-334, 2004
 4. Nagao-Watanabe M, Fukao T, Matsui E, Kaneko H, Inoue R,

Kawamoto N, Kasahara Nagai M, Ichiki Y, Kitajima Y, Kondo N Nagao-Watanabe M, Fukao T, Matsui E, Kaneko H, Inoue R, Kawamoto N, Kasahara Nagai M, Ichiki Y, Kitajima Y, Kondo N Identification of somatic and germline mosaicism for a keratin 5 mutation in epidermolysis bullosa simplex in a family of which the proband was previously regarded as sporadic case *Clin Genet* 66:236-238, 2004

5. Izumi T, Ichiki Y, Esaki C, Kitajima Y Monitoring of ELISA for anti-BP180 antibodies : Clinical and therapeutic analysis of steroid treated patients with Bullous pemphigoid *J Dermatol* 31:383-391, 2004

日本語論文

1. 北島康雄. 尋常性天疱瘡の棘融解はなぜおこる? マルホ皮膚科セミナー放送内容集 174:8-13, 2005

日本語著書

1. 北島康雄 (分担). デスモソームの機能と病態への関与; 皮膚の発生・機能と病態. 最新皮膚科学大系 19 (中山書店): 80-86, 2004
2. 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): 19-23, 2004
3. 北島康雄 (分担). 天疱瘡 a) 病態皮膚疾患の病態と治療 (改訂版): in press

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. Shu E, Yamamoto Y, Aoyama Y, Kitajima Y. Does desmoglein 3 decrease in a mouse model of passive transfer of pemphigus vulgaris-IgG *in vivo*? 第10回岐阜リサーチセミナー、11月20-21日, 2004, 岐阜
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、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
9. 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
10. 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
11. 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・第10回岐阜リサーチセミナー、11月20—21日, 2004, 岐阜
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

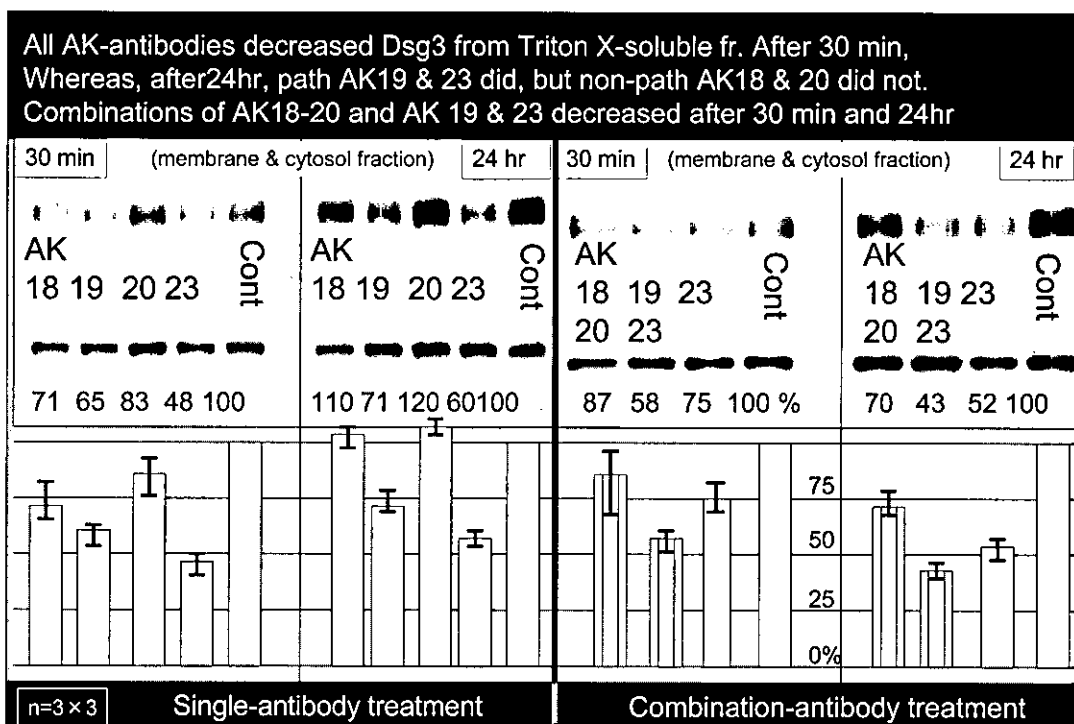


図1. 抗デスモグレイン3 AKモノクローナル抗体(AK18, AK19, AK20, AK23)単独刺激、混合刺激(30分、24時間)による細胞膜画分のプラログロビンに対するデスモグレイン3の減少率

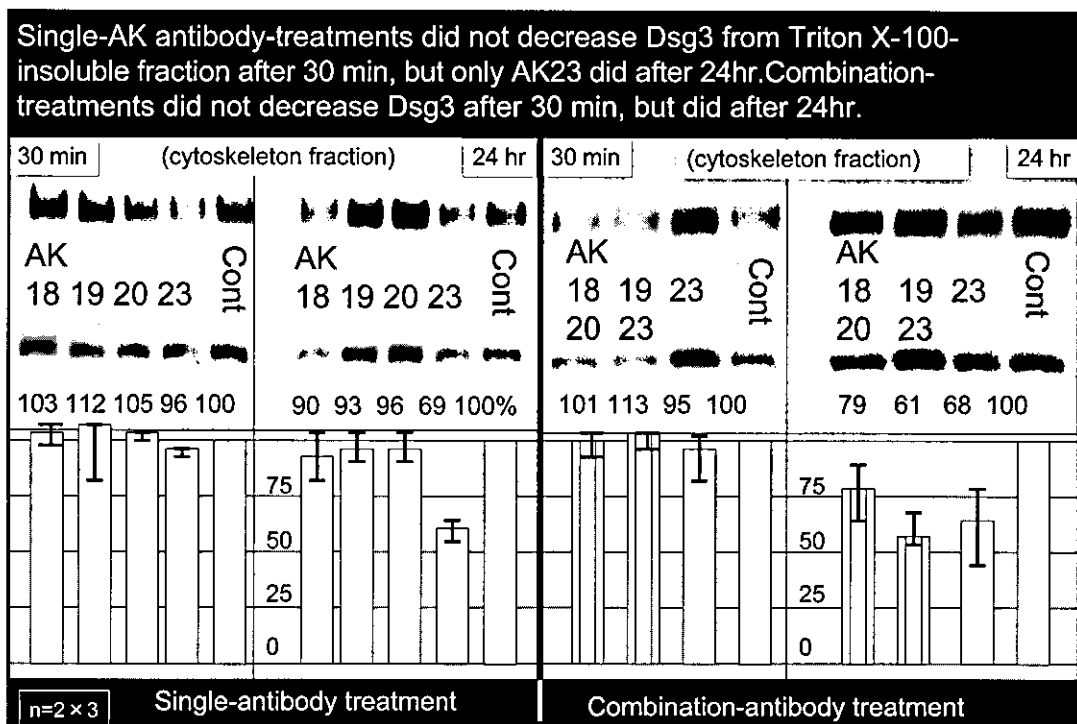


図2. 抗デスモグレイン3 AKモノクローナル抗体(AK18, AK19, AK20, AK23)単独刺激、混合刺激(30分、24時間)による細胞骨格画分のプラログロビンに対するデスモグレイン3の減少率

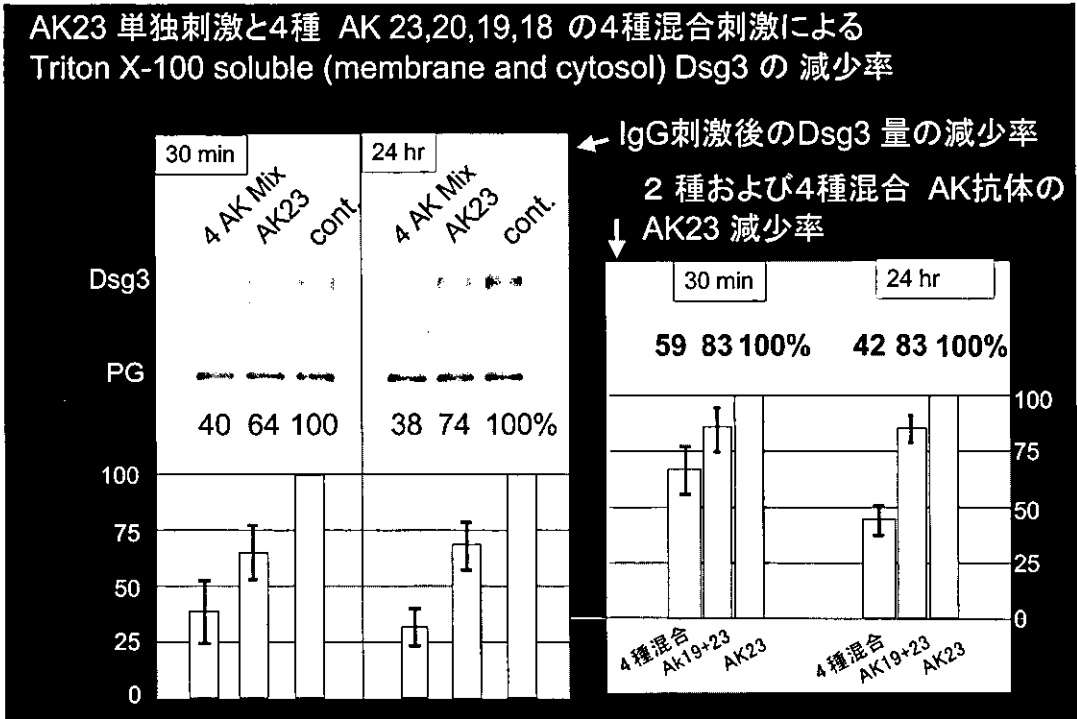


図 3. 4種の抗デスモグレイン3 AK モノクローナル抗体(AK18, AK19, AK20, AK23) 混合刺激(30 分、24 時間)と AK23 単独刺激による細胞膜画分のプラログロビンに対するデスモグレイン3の減少率の比較

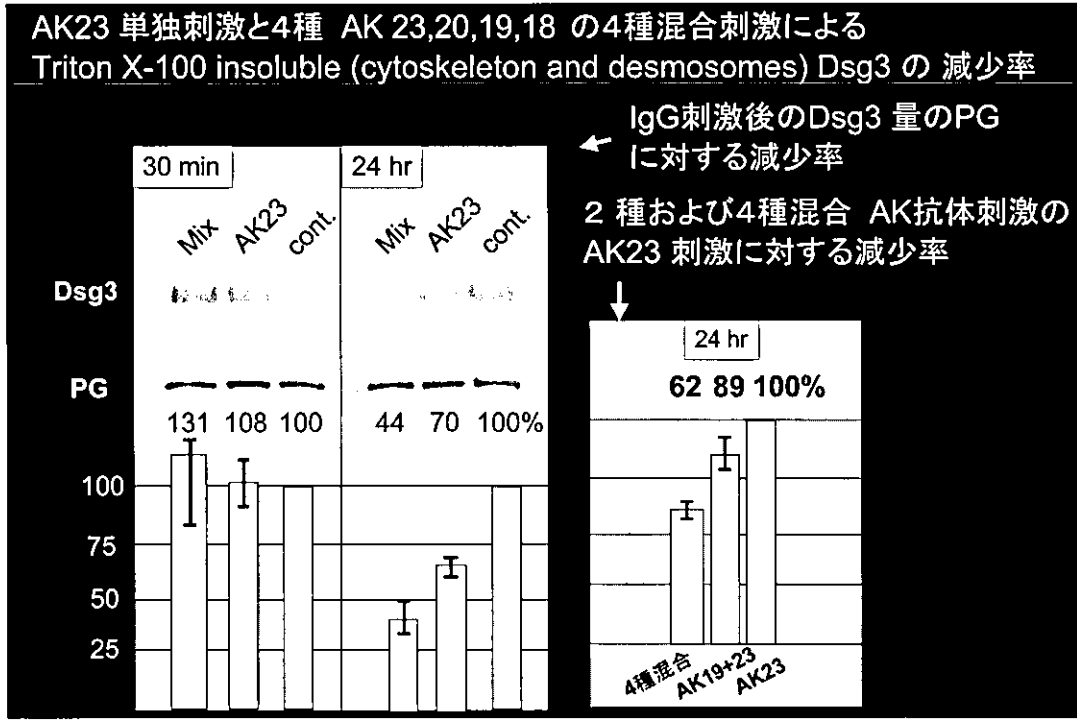


図 4. 4種の抗デスモグレイン3 AK モノクローナル抗体(AK18, AK19, AK20, AK23) 混合刺激(30 分、24 時間)と AK23 単独刺激による細胞膜画分のプラログロビンに対するデスモグレイン3の減少率の比較

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

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

分担研究者 橋本 隆 久留米大学皮膚科教授

研究要旨 デスモゾームは表皮における重要な細胞間接着機構の一つであり、天疱瘡ではデスモゾームの破壊が認められる。これまで、デスモグレイン、デスモプラキンなどを含む多くのデスモゾーム構成タンパクが発見され、その機能解析は天疱瘡の研究に貢献してきた。デスモヨーキンはウシ表皮デスモゾームより同定され、現在まで報告されているいくつかの *in vitro* での解析結果から、デスモゾーム関連タンパク質として表皮細胞間接着機構に関与していると考えられていた。さらにその後の研究報告から、デスモヨーキンは細胞の分化、増殖に関わる分子であることが予想されている。そこで我々は、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。マウス表皮を用いた解析の結果、遺伝子変異マウスでのタンパクの発現は認められなかった。遺伝子変異マウスの皮膚組織を解析したところ、表皮細胞の分化、増殖に異常は見られなかった。免疫電子顕微鏡による表皮細胞間の微細構造を解析したところ、デスモゾームの形態に異常はなく、デスモゾーム構成タンパクであるデスモコリンの局在にも変化は認められなかった。以上のことからデスモヨーキン単独欠損では細胞の分化、増殖、表皮細胞間接着に影響しないことが分かった。

共同研究者

竹田潤二

大阪大学医学部修士社会環境医学

河野通良

久留米大学医学部皮膚科

A. 研究目的

これまでに多くのデスモゾーム構成タンパクが同定され、その機能解析は天疱瘡の研究に役立ってきた。デスモヨーキンはウシ表皮デスモゾームよりデスモゾーム関連タンパクとして同定され、現在までにいくつかの *in vitro* での研究によりその機能解析が行われている。本研究ではノックアウトマウスを作製し、デスモヨーキンの *in vivo* での機能解析を行うことにより、生体内での皮膚におけるデスモヨーキンの役割を解明すること、さらには表皮細胞間接着に異常をきたす天疱瘡の発生機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

まず、遺伝子の全長 18kb のうち、プロモーター領域、転写開始点を含む 3.2kb の領域を破壊するターゲティングベクターを用いて遺伝子欠損マウスを作製した。変異マウスでのタンパクの欠損を確認するため、培養表皮細胞を用いた免疫沈降解析、皮膚組織の免疫組織学的解析を行った。表皮細胞の分化能の検定は、表皮分化マーカーによる免疫組織染色により行った。表皮細胞の増殖能の検定は、TPA を塗布したマウスに BrdU を投与して Labeling index を算定することにより行った。表皮細胞間の微細構造の解析は、デスモヨーキン、デスモコリンに対する抗体を用いた免疫電顕により行った。

マウスを用いた一連の実験操作は、安楽死、適切な麻酔使用などにより愛護的に行った。

C. 研究結果

表皮細胞を用いた免疫沈降解析、皮膚組織を用いた免疫組織染色を行ったところ、遺伝子変異マウスではデスモヨーキンの発現は認められなかった(図1)。表皮の分化マーカーを用いた免疫染色では、遺伝子変異マウスの表皮細胞の分化に異常は見られなかった(図2)。遺伝子変異マウスの表皮細胞での Labeling index を算定したところ、野生型との差は認められなかった(図3)。電顕による微細構造の解析においてデスモゾームを含む細胞間接着構造に異常は認められず、免疫電顕による解析では、デスモゾーム構成タンパクであるデスモコリンの局在にも異常は見られなかった(図4)。

D. 考察

本研究で作製したノックアウトマウスではデスモヨーキンタンパクは欠失していたが、デスモゾームを含む表皮細胞間の構造に異常は認められず、表皮細胞の分化、増殖にも異常が見られなかったことから、デスモヨーキン単独の欠損では表皮細胞間接着機構、細胞の分化、増殖に影響しないことが分かった。今回作製したノックアウトマウスでは明らかな表現型は見られなかったが、最近、他の研究グループから small interfering RNA (si RNA) を用いた研究報告があり、そのなかでは、MDCK 細胞へデスモヨーキンに対する si RNA を導入することによりアクチン細胞骨格の形成に異常をきたすことが示されている。このように gene targeting と si RNA との間で表現型の違いが見られた理由として以下のような可能性が考えられる。

- 1) これまでに、デスモヨーキンと類似の塩基配列を持つ遺伝子が報告されており、デザインされた si RNA がデスモヨーキンとともにその分子も抑制し、表現型が見られた可能性。
- 2) 胎生期から発現が欠損している gene targeting では何らかの代償機構が働く

が、それに比べて si RNA では急激な発現抑制が起こるため、代償機構が働かなかった可能性。

以上の理由から、1)、2) いずれにしても、デスモヨーキンの機能を代償する分子が存在する可能性が考えられ、それらの分子も含め、デスモヨーキンの機能を解明する上で、本研究で作製したノックアウトマウスは今後のさらなる研究に有用であると考えられた。

E. 結論

デスモヨーキンは、単独では表皮細胞間接着に関与していないことが分かった。また、デスモヨーキン欠損に対する代償機構を持つタンパクが存在している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成16年度)

1. 論文発表

英語論文

1. 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
2. Ishii N, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T: Immunolocalization of target autoantigens in IgA pemphigus. *Clin Exp Dermatol*. 29(1):62-66, 2004
3. 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
4. Mine T, Sato Y, Noguchi M, Sasatomi T, Gouhara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T, Shichijo S, Kamura T, Hashimoto T, Shirouzu K, Yamada A, Todo S, Itoh K, Yamana H: Humoral Responses to Peptides Correlate with Overall Survival in Advanced Cancer Patients Vaccinated with Peptides Based on Pre-existing, Peptide-Specific Cellular Responses. **Clin Cancer Res.** 10(3):929-937, 2004
 5. Fukumoto T, Umekawa T, Higuchi M, Hashimoto T, Shumann H, Bruckner-Tuderman L, Asada H, Miyagawa S: Childhood epidermolysis bullosa acquisita with autoantibodies against all 3 structural domains of type VII collagen. **J Am Acad Dermatol** 50(3):480-482, 2004
 6. Lanschuetzer CM, Pohla-Gubo G, Schafleitner B, Hametner R, Hashimoto T, Salmhofer W, Bauer JW, Hintner H: Telepathology using immunofluorescence/immunoperoxidase microscopy. **J Telemed Telecare** 10:39-43, 2004
 7. Izu K, Yamamoto O, Yasumoto S, Hashimoto T, Sata T, Tokura Y: Herpes zoster occurring as a solitary nodule on the index finger. **Br J Dermatol** 150(2):365-366, 2004
 8. Hamada T, Ishii N, Kawano Y, Takahashi Y, Inoue M, Yasumoto S, Hashimoto T: The P25L mutation in the KRT5 gene in a Japanese family with epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **Br J Dermatol** 150(3):609-611, 2004
 9. Uchino Y, Kanekura T, Takeda K, Shimada H, Inoue M, Hashimoto T, Kanzaki T: A case of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid with nephrotic syndrome. **J Dermatol** 31:228-231, 2004
 10. Mori O, Hashimoto T: Plexiform fibrohistiocytic tumor. **Eur J Dermatol** 14:118-120, 2004
 11. Preisz K, Horvath A, Sardy M, Somlai B, Harsing J, Amagai M, Hashimoto T, Nagata Y, Fekete S, Karpati S: Exacerbation of paraneoplastic pemphigus by cyclophosphamide treatment: detection of novel autoantigens and bronchial autoantibodies. **Br J Dermatol** 150(5):1018-1024, 2004
 12. Ishii N, Yoshida M, Hisamatsu Y, Ishida-Yamamoto A, Nakane H, Iizuka H, Tanaka T, Hashimoto T: Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. **Br J Dermatol** 150(5):843-851, 2004
 13. Kishida Y, Kameyama J, Nei M, Hashimoto T., Baba K: Linear IgA bullous dermatosis of the neonatal Onset: case report and review of the literature. **Acta Paediatrica** 93(6):850-852, 2004
 14. Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod

- DR, Kanzaki T, Hashimoto T: The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. **Br J Dermatol**. 151:73-83, 2004
15. Yasuda H, Tomita Y, Shibaki A, Hashimoto T: Two cases of subepidermal blistering disease with anti-p200 or 180-kD bullous pemphigoid antigen associated with psoriasis. **Dermatology** 209(2):149-155, 2004
16. Furukawa H, Miura T, Takahashi M, Nakamura K, Kaneko F, Ishii F, Komai R, Hashimoto T: A case of anti-p200 pemphigoid with autoantibodies against both a novel 200-kD dermal antigen and the 290-kD epidermolysis bullosa acquisita antigen. **Dermatology** 209(2):145-148, 2004
17. Ogawa Y, Adachi A, Okamoto M, Hashimoto T, Tomita Y: A case of refractory bullous pemphigoid with plasmapheresis-associated thrombopenia: Efficacy of pulsed intravenous cyclophosphamide therapy. **J Dermatol** 31(8):651-654, 2004
18. Lanschuetzer CM, Pohla-Gubo G, Schafleitner B, Hashimoto T, Salmhofer W, Argenziano G, Bauer JW, Hintner H: The TIGA project (Telemedical Immunofluorescence Diagnosis in a Global Alliance). **Exp Dermatol** 11:609-610, 2002
19. Kouno M, Kondoh G, Horie K, Komazawa N, Ishii N, Takahashi Y, Takeda J, Hashimoto T: Ahnak/desmoyokin Is dispensable for proliferation, differentiation, and maintenance of integrity in mouse epidermis. **J Invest Dermatol** 123(4):700-707, 2004
20. Nagano T, Tani M, Hiramatsu Y, Kohriyama K, Ishihara K, Nei M, Hashimoto T: A case of epidermolysis bullosa acquisita with bleeding tendency due to factor VIII inhibitor (acquired haemophilia). **Br J Dermatol** 151(3):716-717, 2004
- 日本語論文
特になし
2. 学会発表
1. 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クインのジーンターゲットングによる解析、第25回日本分子生物学会、横浜、2002年12月
2. M kouno, Y Takahashi, N Ishii, J Takeda and T Hashimoto Role of AHNAK/Desmoyokin in skin development and function International Investigative Dermatology 2003, Miami, Florida USA April 30-May 4, 2003
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

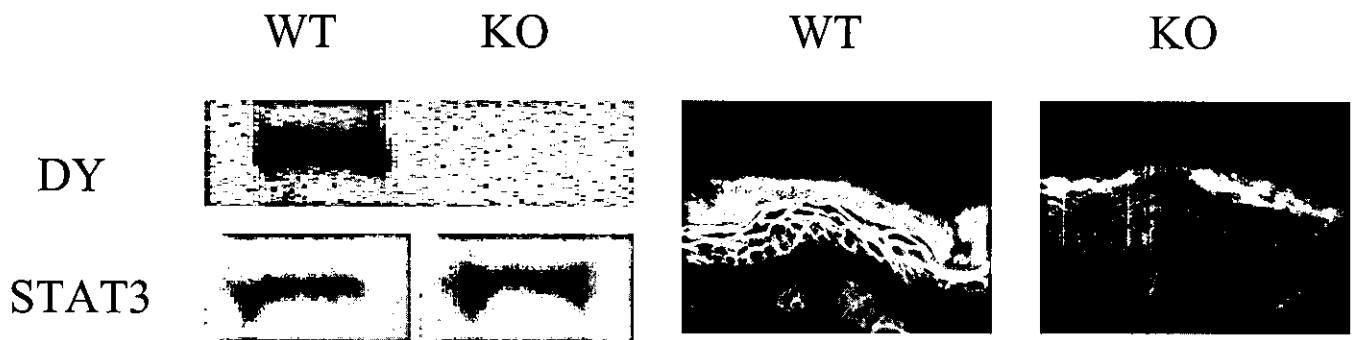


図1 左:野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の表皮細胞を用いた免疫沈降解析。DY:デスモヨーキン、STAT3:陽性コントロール
 右:デスモヨーキンに対する抗体を用いた野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の皮膚免疫染色像。

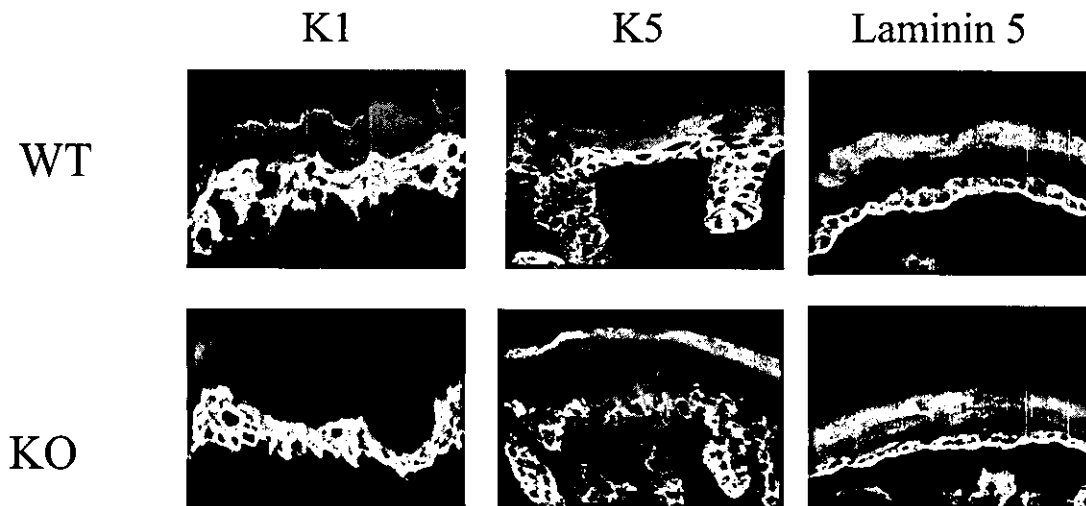


図2 K1, K5, Laminin 5 に対する抗体を用いた野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の皮膚組織免疫染色像。変異マウスの皮膚(KO)において各分化マーカーの染色部位に異常は見られなかった。

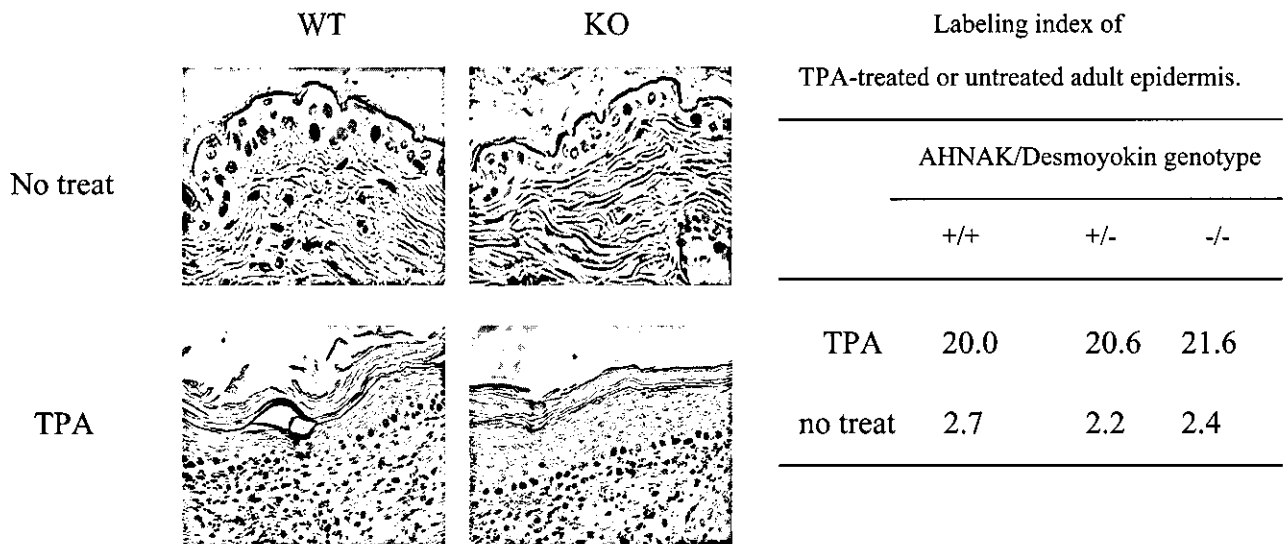


図3 左:TPA 塗布後に BrdU を投与した野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の皮膚組織の抗 BrdU 抗体による免疫染色像。TPA 処理したものでは WT, KO ともに表皮の肥厚および BrdU を取り込んだ基底細胞の増加が認められる。
右:各 genotype のマウス表皮における Labeling index。3000個の基底細胞を観察し、100個の基底細胞中で BrdU ラベルされた細胞数を算定したところ、いずれも差が認められなかった。

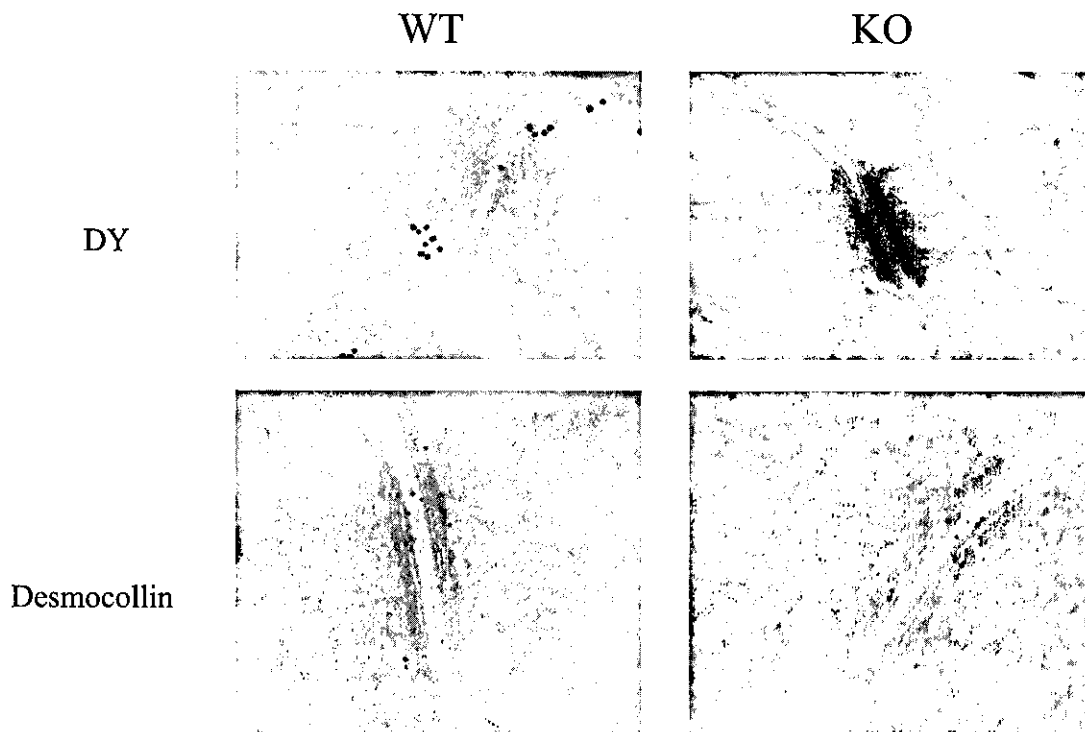


図4 デスモヨーキン(DY)、デスモコリン(Desmocollin)に対する抗体を用いた免疫電顕による野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の表皮デスモゾームの解析。変異マウス(KO)ではデスモヨーキンの発現は認められないが、デスモゾームの形態、デスモコリンの局在に異常は見られない。

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（PNP）と尋常性天疱瘡（PV）の関連に関する研究

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 以前より、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。

共同研究者

石井文人

久留米大学医学部皮膚科助手

A. 研究目的

以前より、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数例あり、主に尋常性天疱瘡（PV）一落葉状天疱瘡（PF）または PF-PV 間での臨床病型の移行の報告が多くなされている。その中で当科の駒井らの報告では臨床的に PV-PF 間で移行を示した 8 例につき、蛍光抗体間接法、免疫ブロット法、および ELISA 法を用いて自己抗体の反応する抗原を多角的に解析した結果、臨床病型の移行に伴って抗原も変化していたことを確認しており、特に ELISA 法が非常に有用であったとしている（A. Komai, T. Hashimoto *et al*: Br J Dermatol 2001; 144: 1177）。

今回、我々は腫瘍随伴性天疱瘡（PNP）の経過中に PV の臨床病型を示した症例について、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。

B. 研究方法

症例

55歳、女性。

非ホジキン性悪性リンパ腫のため約 1 年前より各化学療法にて加療中。初診 1 ヶ月前に腹腔内腫瘍に対して放射線治療を行った。

現病歴：初診約 2 週間前より放射線照射部に一致して皮疹出現、著明な水疱形成を認めた。同時に口腔内病変も生じた。その後、全身に水疱形成が拡大したため当科受診。

現症：腹部の放射線照射部にびまん性の浮腫性紅斑を認め、多数の緊満性水疱を認めた。その他に全身に小型の水疱、びらんが散在する。口腔粘膜病変が著明で、とくに頬粘膜、舌、口唇に高度のびらん、潰瘍を認めた。外陰部粘膜にもびらんを認めたが、眼粘膜に著変はなかった。臨床検査成績では白血球の軽度減少以外、異常所見なし。

病理組織学的所見では、表皮壊死、液状変性、表皮内水疱を認め、蛍光抗体直接法で表皮細胞間に IgG の沈着、蛍光抗体間接法で血中 IgG 抗表皮細胞間抗体陽性でラット膀胱上皮にも陽性反応を示した。正常ヒト表皮抽出液を用いた免疫ブロットで

は 210kD,190kD 抗原に対して反応がみられ、Dsg1・Dg3 リコンビナント蛋白を用いた ELISA 法では、抗 Dsg1,Dsg3 抗体が陽性であった。以上より悪性リンパ腫に生じた PNP と診断した。治療としてプレドニゾン 60mg/day より内服開始したが非常に難治であった。入院後血漿交換療法施行を併用により症状軽減とステロイド漸減することができた。約 2 年後にはプレドニゾン (PSL) 1 mg/day 内服で軽度の口腔・外陰部粘膜病変を認めるのみで、皮疹の経過は良好であった。しかし 2002 年 3 月頃より突然口腔粘膜のみびらの増悪を認め、ステロイドの増量 (最大 PSL 50mg/day) により症状は軽減し、以後病勢の消退傾向とともに徐々にステロイドの漸減することができた。現在 PSL 1mg/day で陰部粘膜にわずかに発赤がみられるのみで経過良好である。また非ホジキン性悪性リンパ腫も寛解状態である。

C. 研究結果

抗デスモグレイン抗体価 (ELISA) における検討 (図 1)

ELISA 法を用いて抗 Dsg1,Dsg3 抗体価を測定した。当初 PNP の病型時では抗 Dsg1 抗体、抗 Dsg3 抗体はともに陽性を示した。臨床症状・病勢の軽快に伴い、それぞれの抗体価は陰性となった。その後経時的に抗 Dsg 抗体を計測するが、陰性のままであった。約 4 年後に口腔内症状のみ増悪した際、抗 Dsg3 抗体価のみ上昇を認めた。その後再び皮疹の軽快とともに抗 Dsg3 抗体価は陰性を示した。

蛍光抗体法における検討 (図 2)

正常ヒト皮膚切片を用いた蛍光抗体間接法 (IIF) とラット膀胱切片を用いた蛍光抗体間接法 (rat-IIF) を施行した。初診時では IIF で抗表皮細胞間に IgG 自己抗体を認め、rat-IIF では移行上皮との反応を認めた。その後、皮疹の軽快とともに IIF, rat-IIF は陰性を示したが、2002 年の

皮疹増悪時には IIF のみ抗表皮細胞間に IgG 自己抗体を認め、rat-IIF とは反応を認めなかった。その後再び皮疹の軽快とともに IIF, rat-IIF は陰性を示した。

免疫ブロットにおける検討 (図 3)

正常ヒト表皮抽出液を用いた免疫ブロット法を施行した。初診時 ('97)、また難治であった PSL 60mg/day 内服開始時の患者血清 ('98-入院時) では、210kD,190kD 抗原に対して反応がみられた。血漿交換療法施行を併用した後より、ブロットでは反応を示さなかった。

D. 考察

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。特に口腔粘膜症状のみ増悪したとき ('02)、抗 Dsg 抗体価の変化に相関があることが確認された。

E. 結論

調べ得た限り、今まで天疱瘡の経過中に臨床病型が変化する報告の中で PNP が関与する症例はなく、自験例は非常に特異な経過をたどっている PNP だと考える。また他の天疱瘡にみられる病型移行が PNP にも同様にきたす可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成16年度)

1. 論文発表

英語論文

1. 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
2. Ishii N, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T: Immunolocalization of target autoantigens in IgA pemphigus. **Clin Exp Dermatol**. 29(1):62-66, 2004
 3. 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
 4. Mine T, Sato Y, Noguchi M, Sasatomi T, Gouhara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T, Shichijo S, Kamura T, Hashimoto T, Shirouzu K, Yamada A, Todo S, Itoh K, Yamana H: Humoral Responses to Peptides Correlate with Overall Survival in Advanced Cancer Patients Vaccinated with Peptides Based on Pre-existing, Peptide-Specific Cellular Responses. **Clin Cancer Res**. 10(3):929-937, 2004
 5. Fukumoto T, Umekawa T, Higuchi M, Hashimoto T, Shumann H, Bruckner-Tuderman L, Asada H, Miyagawa S: Childhood epidermolysis bullosa acquisita with autoantibodies against all 3 structural domains of type VII collagen. **J Am Acad Dermatol** 50(3):480- 482,2004
 6. Lanschuetzer CM, Pohla-Gubo G, Schafleitner B, Hametner R, Hashimoto T, Salmhofer W, Bauer JW, Hintner H: Telepathology using immunofluorescence/immunoperoxidase microscopy. **J Telemed Telecare** 10:39-43, 2004
 7. Izu K, Yamamoto O, Yasumoto S, Hashimoto T, Sata T, Tokura Y: Herpes zoster occurring as a solitary nodule on the index finger. **Br J Dermatol** 150(2):365-366,2004
 8. Hamada T, Ishii N, Kawano Y, Takahashi Y, Inoue M, Yasumoto S, Hashimoto T: The P25L mutation in the KRT5 gene in a Japanese family with epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **Br J Dermatol** 150(3): 609-611, 2004
 9. Uchino Y, Kanekura T, Takeda K, Shimada H, Inoue M, Hashimoto T, Kanzaki T: A case of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid with nephrotic syndrome. **J Dermatol** 31:228-231, 2004
 10. Mori O, Hashimoto T: Plexiform fibrohistiocytic tumor. **Eur J Dermatol** 14:118-120, 2004
 11. Preisz K, Horvath A, Sardy M, Somlai B, Harsing J, Amagai M, Hashimoto T, Nagata Y, Fekete S, Karpati S: Exacerbation of paraneoplastic pemphigus by cyclophosphamide treatment: detection of novel autoantigens and bronchial autoantibodies. **Br J Dermatol** 150(5):1018-1024, 2004
 12. Ishii N, Yoshida M, Hisamatsu Y, Ishida-Yamamoto A, Nakane H, Iizuka H, Tanaka T, Hashimoto T: Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immuno-

- blotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. **Br J Dermatol** 150(5):843-851, 2004
13. Kishida Y, Kameyama J, Nei M, Hashimoto T., Baba K: Linear IgA bullous dermatosis of the neonatal Onset: case report and review of the literature. **Acta Paediatrica** 93(6):850-852, 2004
 14. Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, Kanzaki T, Hashimoto T: The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. **Br J Dermatol.** 151:73-83, 2004
 15. Yasuda H, Tomita Y, Shibaki A, Hashimoto T: Two cases of subepidermal blistering disease with anti-p200 or 180-kD bullous pemphigoid antigen associated with psoriasis. **Dermatology** 209(2):149-155, 2004
 16. Furukawa H, Miura T, Takahashi M, Nakamura K, Kaneko F, Ishii F, Komai R, Hashimoto T: A case of anti-p200 pemphigoid with autoantibodies against both a novel 200-kD dermal antigen and the 290-kD epidermolysis bullosa acquisita antigen. **Dermatology** 209(2):145-148, 2004
 17. Ogawa Y, Adachi A, Okamoto M, Hashimoto T, Tomita Y: A case of refractory bullous pemphigoid with plasmapheresis-associated thrombopenia: Efficacy of pulsed intravenous cyclophosphamide therapy. **J Dermatol** 31(8):651-654, 2004
 18. Lanschuetzer CM, Pohla-Gubo G, Schafleitner B, Hashimoto T, Salmhofer W, Argenziano G, Bauer JW, Hintner H: The TIGA project (Telemedical Immunofluorescence Diagnosis in a Global Alliance). **Exp Dermatol** 11:609-610, 2002
 19. Kouno M, Kondoh G, Horie K, Komazawa N, Ishii N, Takahashi Y, Takeda J, Hashimoto T: Ahnak/desmoyokin Is dispensable for proliferation, differentiation, and maintenance of integrity in mouse epidermis. **J Invest Dermatol** 123(4):700-707, 2004
 20. Nagano T, Tani M, Hiramatsu Y, Kohriyama K, Ishihara K, Nei M, Hashimoto T: A case of epidermolysis bullosa acquisita with bleeding tendency due to factor VIII inhibitor (acquired haemophilia). **Br J Dermatol** 151(3):716-717, 2004
 21. Suzuki T, Ito S, Inagaki K, Suzuki N, Tomita Y, Yoshino M, Hashimoto T: Investigation on the IVS5 +5G --> A splice site mutation of HPS1 gene found in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome. **J Dermatol Sci.** 36(2):106-108, 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

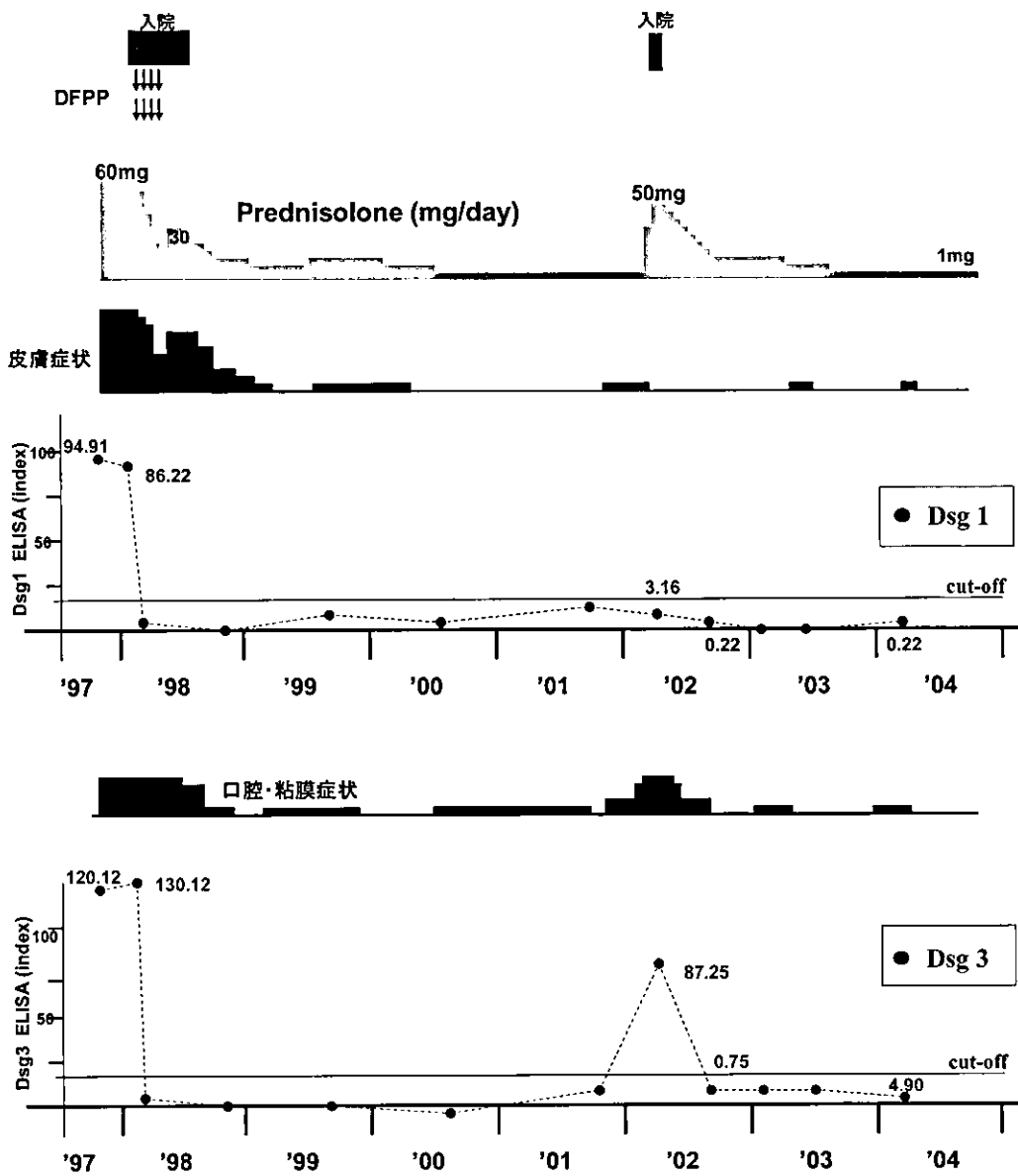


図1 臨床経過と抗 Dsg1/3 抗体価の推移

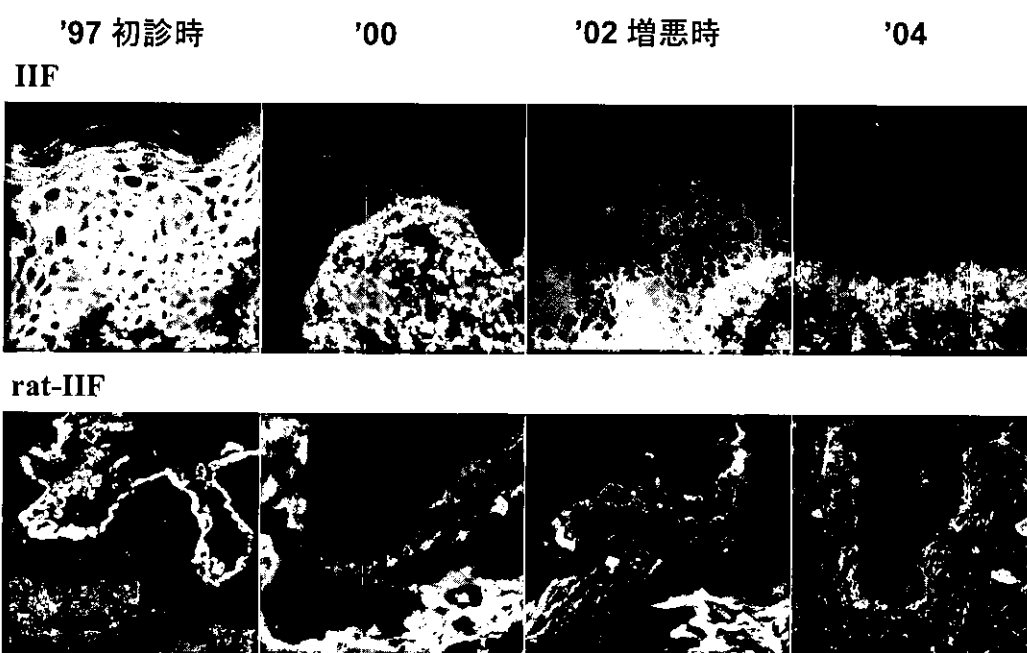


図2 蛍光抗体間接法とラット膀胱切片を用いた蛍光抗体法による推移

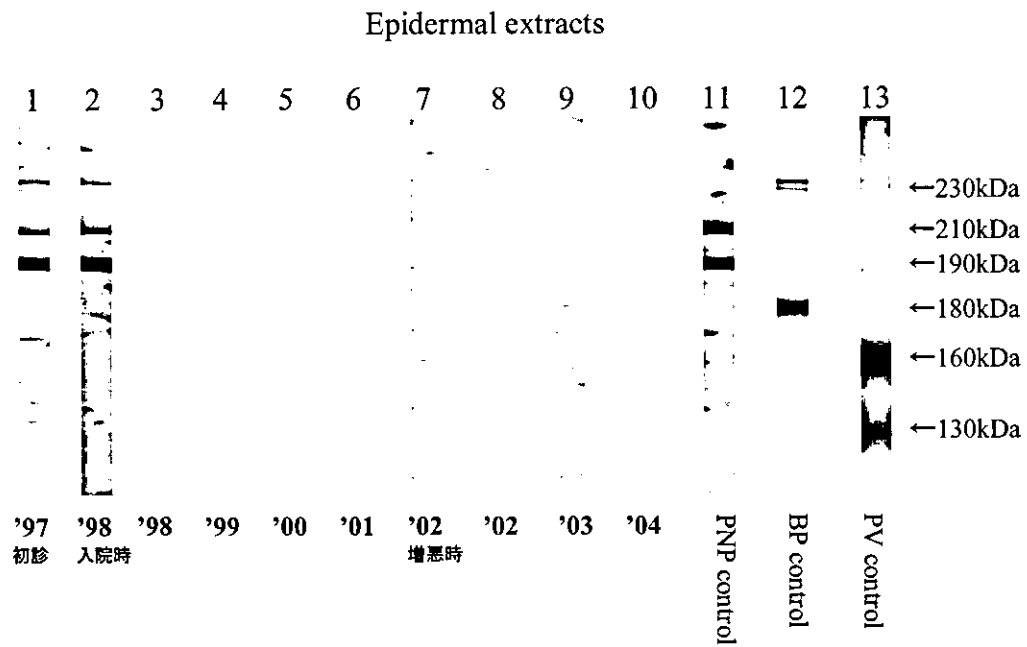


図3 ヒト表皮抽出液を用いた免疫ブロット法による患者血清の経時的推移

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

天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法の評価 I

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨 尋常性天疱瘡（PV）は、デスモグレイン 3（Dsg3）に対する IgG 自己抗体を原因とする自己免疫性水疱性疾患である。抗体産生においては TB 細胞間における CD40/CD40L などのアクセサリ分子間での相互作用の役割が注目されている。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 1 mg 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。

共同研究者

青木三代 慶應義塾大学医学部共同研究員
高江雄二郎 慶應義塾大学医学部助手
小安重夫 慶應義塾大学医学部教授
西川武二 慶應義塾大学医学部教授

および 14 日に繰り返し MR1 の腹腔内投与を行った。コントロールとして 500 μ g の Hamster IgG を同様にレシピエントマウスに腹腔内投与した。すべてのマウスは 28 日まで観察し、その時点で一部のマウスについては *in vivo* での IgG 沈着および ELISPOT 法により Dsg3 特異的 B 細胞数について検討を行った。さらに長期にわたる効果を検討するために残りのマウスは 70 日まで観察を継続し、抗体産生を ELISA 法により検討した。

A. 研究目的

MR1 による CD40/CD40L 相互作用阻害の予防的および治療的効果を天疱瘡モデルマウスを用いて検討する。

B. 研究方法

1. 予防的投与

MR1 投与により、レシピエントマウスにおいて PV の発症が抑制されるかを検討するために、500 μ g の MR1 を移植する 2 日前にレシピエントマウスに腹腔内投与した。さらに免疫した Dsg3^{-/-} マウス脾細胞を移植する 1 時間前、移植後 2、4、7

2. 治療的投与

抗 Dsg3 抗体産生および表現型を示した PV モデルマウスに対して MR1 を投与し、治療効果を検討した。免疫した脾細胞を移植したモデルマウスにおいては、移植 2 週間後、ナイーブな脾細胞を移植したモデルマウスにおいては移植 4 週間後に PV の表