

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成18 (2006) 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系研究科病態制御学講座・皮膚病態学教授	
III	分担研究報告・協力研究報告	
	[天疱瘡]	
	天疱瘡抗体、抗デスモグレイン (Dsg) 3 モノクローナル抗体刺激による DJM-1 細胞における Dsg3 分子の減少率と細胞間結合力の減弱	15
	主任研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学系研究科病態制御学講座・皮膚病態学教授	
	IgG/IgA天疱瘡における自己抗原の微小局在の検討	21
	分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
	尋常性天疱瘡患者におけるプレドニゾロンとミゾリビン併用療法の治療経験の検討	28
	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病原性を有する自己反応性 T細胞の同定および解析	37
	分担研究者 天谷雅行 慶応義塾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学的解析	42
	分担研究者 天谷雅行 慶応義塾大学医学部皮膚科学教室 教授	
	天疱瘡の臨床調査個人票電子化データの分析(1)概要、判定基準、重症度	45
	分担研究者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学助手	
	天疱瘡の臨床調査個人票電子化データの分析(2)病型別分布と特徴	52
	分担研究者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学助手	
	尋常性天疱瘡患者における CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> 制御性 T細胞の解析	57
	研究協力者 島田眞路 山梨大学医学部 皮膚科 教授	
	天疱瘡患者の遺伝的背景 第3報 天疱瘡患者のデスモグレイン遺伝子多型解析	60
	研究協力者 新関寛徳 奈良県立医科大学皮膚科学 講師	
	抗デスモグレイン 3モノクローナル抗体による細胞内シグナル伝達経路の解析	67
	研究協力者 青山裕美 岐阜大学医学部附属病院皮膚病態学 講師	
	[膿疱性乾癬]	
	膿疱性乾癬の病因と治療—乾癬表皮における Glis1 の発現と機能—	72
	分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚・粘膜・結合織学分野 教授	
	汎発性膿疱性乾癬患者群の QOL について	79
	分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚・粘膜・結合織学分野 教授	
	膿疱性乾癬の発生機序の解析	87
	分担研究者 許 南浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授	

乾癬局面および膿疱性乾癬病変部における樹状細胞についての免疫組織学的検討	91
分担研究者 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	96
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	
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—	99
研究協力者 照井 正 日本大学医学部皮膚科 教授	
[表皮水疱症]	
Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation—遺伝子解析と電頭的検索—	103
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	
プレクチン変異による表皮水疱症の新病型：幽門閉鎖合併単純型	109
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	
新しい三次元皮膚の開発	115
分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授	
マウス胎仔循環系への低侵襲性細胞移植法の確立と遺伝子治療への応用	121
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	
遺伝子導入骨髄細胞移植による表皮水疱症治療の可能性検討	124
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	
ケラチン病モデル細胞の樹立に関する研究	126
研究協力者 米田耕造 香川大学医学部皮膚科学講座 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（BCIE）の臨床疫学研究	128
—genotype phenotype 解析を中心に—	
分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授	
先天性魚鱗癬様紅皮症における皮疹形成機序と治療に関する研究	133
分担研究者 小宮根真弓 東京大学医学部附属病院皮膚科・講師	
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症における過角化機構の解析 新規層板顆粒分子の同定	142
分担研究者 山本明美 旭川医科大学皮膚科 講師	
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症における過角化機構の解析 市販の皮膚モデルの有用性の検討	147
分担研究者 山本明美 旭川医科大学皮膚科 講師	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	153
V 平成17年度総会プログラム	
平成17年度第1回総会プログラム	165
平成17年度第2回総会プログラム	169

[ 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系研究科病態制御学講座・皮膚病態学	教授	総括、天疱瘡、先天性表皮水疱症
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	教授	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皮膚・粘膜・結合織学分野	教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
許 南浩	岡山大学大学院医歯学総合研究科細胞生物学	教授	膿疱性乾癬（発症機序）
小宮根真弓	東京大学医学部附属病院皮膚科	講師	膿疱性乾癬（発症機序）、先天性魚鱗癬様紅皮症
清水 宏	北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野	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	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	旭川医科大学皮膚科	講師	先天性魚鱗癬様紅皮症、（発症機序）
黒沢美智子	順天堂大学医学部衛生学	助手	天疱瘡、膿疱性乾癬 先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬様紅皮症（統計学、疫学）

研究協力者 島田 眞路	山梨大学医学部皮膚科	教授	天疱瘡（免疫学的発症機序）
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）
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	日本大学医学部皮膚科	教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
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	香川大学医学部皮膚科学講座	講師	先天性魚鱗癬様紅皮症、ケラチン病の病態
青山 裕美	岐阜大学医学部附属病院皮膚病態学	講師	天疱瘡（発症機序）

[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系研究科  
病態制御学講座・皮膚病態学 教授

**研究要旨** 本研究は、平成17年度からの3年計画によって、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（①②③は難病指定）について診断基準の見直し、疫学的（特定治療研究対象疾患臨床調査個人票データベース利用）研究による患者数と治療状態の実体の把握、さらに原因遺伝子と臨床表現型との相関の解析、原因遺伝子、自己抗体産生から発症までの機序の分子生物学的解明、よって重症度判定、治療法、治療指針の改良と開発を研究目標とする。これはその1年目の報告書である。1. 進捗状況と未解決問題点、①天疱瘡：病原性抗 Dsg3 モノクローナル抗体、病原性T細胞株の樹立、抗体結合による Dsg3 の消失を証明したが、抗体発生と水疱形成機序が不明。治療指針が不十分。患者 QOL 実態が不明。②膿疱性乾癬：病因、発症機序、QOL 実態は不明（一部解析）。治療指針の再評価必要。③表皮水疱症：病因遺伝子VII型コラーゲン変異による臨床分類の見直し、治療法の開発、出生前診断法の確立とその指針、倫理規定の基礎を17年度に確立したが、本格的な研究必要。④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：病因ケラチン遺伝子変異と臨床型の関係、診断基準、疫学、治療法については全く不明で研究を開始した。2. 特定治療研究対象疾患臨床調査個人票データベースを用いた解析、①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症について平成17年9月末に平成13～16年度全国の個人調査票の利用許可とデータを入手した。18年度に解析を行う。

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・教授）  
岩月啓氏（岡山大学・教授）  
許 南浩（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・教授）  
山本明美（旭川医科大学・講師）  
小宮根真弓（東京大学・講師）  
黒沢美智子（順天堂大学・助手）

研究協力者名（所属機関名）  
小澤 明（東海大学・教授）  
照井 正（日本大学・教授）  
島田眞路（山梨大学・教授）  
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（香川大学・講師）  
青山裕美（岐阜大学・講師）

#### A. 研究目的

本研究は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（①②③は難病指定）について診断基準の見直し、疫学的（特定治療研究対象疾患臨床調査個人票データベース利用）研究による患者数と治療状態の実体の把握、さらに原因遺伝子と臨床表現型との相関の解析、原因遺伝子、自己抗体産生から発症までの機序の分子生物学的解明、よって重症度判定、治療法、治療指針の改良と開発を研究目標とする

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、難治性で未だ1

割は死に至る非常に悲惨な疾患である。自己抗体抗原分子と病原性モノクローナル抗体は確立されたが、抗体発生と水疱形成機序は不明である。病原性抗体 ELISA 値は保険適応まで開発したがこれに基づく確かな治療指針はない。本研究は天疱瘡モデルマウスを用いた分子医学的天疱瘡水疱形成機序および病的抗体産生の免疫学的機序の解明から治療法に迫る。難病受給者票データベースを利用し、疫学特性を明らかにする。

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原因発症機序不明の疾患である。過去に疫学と一応の治療指針を作成したが不完全である。1) 膿疱の形成機序を炎症制御機構異常とケラチノサイト機能との関係を明らかにし、治療法を開発する。2) EBM 診断・治療指針の再評価し改訂する。3) 難病受給者票データベースで疫学特性を明らかにする。

③表皮水疱症は、重症例では全身の水疱と瘢痕により合指、四肢の運動制限のため極めて QOL の悲惨な状態になる。1) 病因 VII 型コラーゲン遺伝子の変異点 genotype /phenotype 解析し発症機序を解明する。2) 出生前診断指針の確立、3) 修復または欠損遺伝子導入再生表皮および幹細胞を用いた遺伝子治療法を細胞、動物レベルで解析する。4) 難病受給者票データベースを利用し、疫学特性を明らかにする。

④水疱型先天性魚鱗癬紅皮症は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。1) 病因ケラチン遺伝子の変異点 genotype/phenotype 解析に基づく発症機序を解析する。2) 基本的治療は③と同様な研究が必須である。3) 前期 3 年間で全国規模の疫学解析を本邦で初めて行い受診患者は年間 55 人と推計されたが、QOL 調査は行われていないので行う。

なお、これら 4 疾患は患者数が少なく疫学と治療研究を行うには班研究としてでし

か十分な情報が得られないため、①②では副作用のない良い治療法の開発、③④は遺伝子治療、皮膚再生治療の開発の視点から厚労省主導の班会議研究は厚生行政に貢献し、稀少難治性皮膚疾患患者の保険・医療・福祉に大きく貢献する。

## B. 研究方法

### ①天疱瘡

1) 病原性モノクローナル抗体産生特異的 B 細胞トランスジェニックマウスにおける B 細胞の運命を詳細に検討する (天谷)。抑制 T 細胞の関与を検討する (天谷、橋本隆、研究協力者：島田)。

2) 通常致死的である腫瘍随伴性天疱瘡を含め各種天疱瘡抗原と病因を解析と治療研究をする (橋本隆)。

3) 患者天疱瘡抗体で活性化される細胞内シグナル伝達経路を AK23 抗体でも活性化されるか検討し、その違いも解析する (北島、研究協力者：青山)。

4) ELISA 法による病因抗体価をモニターし、EBM による新しい治療指針の開発作成する (橋本隆、北島、天谷、池田、研究協力者：青山)。

5) 天疱瘡発症関連遺伝子同定 (研究協力者：新関)。

6) 厚労省難病受給者票データベースを利用するための承認申請と臨床医学的特性を示す (池田、黒沢)。

### ②膿疱性乾癬

1) 特定疾患個人票と乾癬登録データを用いた疫学的調査と、QOL 二次調査解析で膿疱性乾癬患者群の特徴を明らかにする (岩月、池田、黒沢、研究協力者：小澤)。小児型の解析と治療ガイドライン作成する (岩月、池田、黒沢、研究協力者：小澤)。

2) microarray system で乾癬特異遺伝子を検索する (研究協力者：小澤)。

3) 本症の表皮細胞増殖異常について最近発見された Gli-similar protein 1, および Ca<sup>2+</sup> 結合蛋白の S100C/A11、さらに

Hornerin を中心に炎症との関連性を分子レベルで解析する（岩月、許）。

4) 症例データをもとに診断・重症度基準の見直しを行う。シクロスポリンなどもふまえて年齢層に適した治療指針を作成する（岩月、北島、研究協力者：小澤）。

5) 皮膚難病支援ネットワークを利用して患者の希望する支援内容を把握し、研究班参加施設を中心にした患者支援ネットワークを各地域に形成する（岩月）。

### ③表皮水疱症

1) 出生診断法とその施行指針を確立する（清水）。

2) 表皮水疱症患者の病変や DNA から遺伝子変異を同定し臨床と比較検討する（清水）。

3) 三次元培養皮膚を用いた治療法の改良と遺伝子導入再生皮膚療法を行う（橋本公二）。

4) 患者組織から皮膚になる幹細胞を単離、培養する方法を確立し遺伝子導入する（金田、研究協力者：玉井）。

5) 厚労省難病受給者票データベースを利用するための承認申請と臨床医学的特性を示す（池田、黒沢）。

### ④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

1) 症例の遺伝子解析を行い genotype/phenotype 解析をする（池田）。

2) ケラチン遺伝子変異のパーマメント導入株を作り、細胞レベルの研究を行う（小宮根、研究協力者：米田）。

3) 角化制御酵素の KLK5, KLK7, inhibitor LEKTI の患者皮膚における分布解析から臨床形成機序を解明する（山本）。

## C. 研究結果と D. 考察

### ①天疱瘡

1) 病原性モノクローナルの特性に関する研究（天谷）：天疱瘡は皮膚粘膜に発症する難治性の臓器特異的自己免疫疾患である。尋常性天疱瘡（PV）モデルマウスより数種類の抗デスマogleイン（Dsg）3 モ

ノクローナル抗体（AK mAb）を単離し解析を行ったところ、mAb の病原性を左右する因子として、そのエピトープが重要であることが示された。本研究では、エピトープ以外の新たな病原性を左右する因子を探索する目的で表面プラズモン共鳴装置（Biacore）を用い、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。すべての AK mAb は Biacore の反応系においてマウス Dsg3 に結合性を示したが、その結合カイネティクスは mAb ごとに強弱が異なっていた。また病原性を有する AK mAb の結合カイネティクスは非病原性の AK mAb と比較して明らかに強くはなく、その病原性と結合カイネティクスの明らかな相関関係は認めなかった。今後、条件を詳細に設定し抗 Dsg3 抗体の結合カイネティクスを解析する事によって、天疱瘡の新たな病原強度判定法開発の糸口になるものと考えられた（到達度70%）。

2) 抑制T細胞の関与を検討する（天谷、橋本隆、研究協力者：島田）：本研究は Dsg3 反応性 T 細胞をクローニングするという技術的に極めて高度な手法を用いた研究である。特に、T 細胞クローニングの条件設定を最適化することが最も重要な課題であるが、すでにその段階は終了し、実際に T 細胞クローンの樹立に成功した。今後は最適化したクローニング条件を用いて、クローニング作業を繰り返すことにより、多数の T 細胞クローンを樹立することが可能である。最終目標までの研究過程は未だ長いですが、近い将来には達成可能である（到達度30%、天谷）。

本年度の研究では尋常性天疱瘡患者の末梢血中の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 制御性 T 細胞の割合が、健常群ならびに疾患対照群と比較して圧倒的に少ないことを見出した。本疾患は稀な疾患であり症例数の蓄積に時間を費やしたが、結果的に 9 例の患者検体を得ることが出来、当初の研究目的にほぼかなった解析を行うことが出来た（到達度70%、

島田)。

天疱瘡における regulatory T 細胞の検討を約20例の症例で行った(到達度50%、橋本 隆)。

これらの研究は自己免疫疾患のなぜ自己抗体が生じるかという疑問に対する答えを提供するものであり、根本的治療法の開発に迫るものである。

3) 通常致死的である腫瘍随伴性天疱瘡を含め各種天疱瘡抗原と病因を解析と治療研究をする(橋本隆):天疱瘡抗原の更なる解析について:IgG/IgA 天疱瘡の抗原としてデスモグレイン 1/3 およびデスモコリンを同定し、これらの抗体が、免疫電顕でデスモソーム部に反応することを示した(到達度40%)。

4) 患者天疱瘡抗体で活性化される細胞内シグナル伝達経路をAK23抗体でも活性化されるか検討し、その違いも解析する(北島):天疱瘡抗体、AKシリーズモノクローナル抗デスモグレイン3抗体によって、デスモグレイン3のデスモソームからの減少とその接着力の減弱、ならびに、デスモソーム関連蛋白の p120ctn のチロシンリン酸化がエピトープに特異的に多様性を生じることが明らかとなった。これは、シグナル伝達の面から治療法の開発の可能性を示唆する(到達度40%)。

5) ELISA 法による病因抗体価をモニターし、EBM による新しい治療指針の開発作成する(橋本隆、北島、天谷、池田):久留米大学皮膚科における天疱瘡患者の血清に対する各種の抗体・抗原の解析は一部の症例のみ行った(到達度20%)。今までに送られた他施設からの依頼血清の抗体・抗原の解析はすべて終了した(到達度100%)。各種の Steroid sparing drugs の検討として落葉状天疱瘡における DDS と尋常性天疱瘡におけ mizoribin の効果の検討を行った(到達度40%)。IEN 型 IgA 天疱瘡抗原の同定のために血清を渉猟した(到達度20%)。

6) 天疱瘡発症関連遺伝子同定(研究協力者:新関寛):DSG1、4、3 遺伝子全エクソンの塩基配列を決定した(到達度100%)。日本人における SNP を検出したことで、当該課題において集積したラージサンプル(平成18年1月現在167例、うち尋常性119例、落葉状37例)を用いて、デスモグレイン遺伝子クラスター内の天疱瘡感受性ハプロタイプの決定が可能となった(到達度40%)。

7) 厚労省難病受給者票を用いて疫学班と連携して臨床医学的特性を示す(池田、黒沢):研究目的の一つである厚労省が進めている臨床調査個人票データベースを用いて稀少難治性皮膚疾患受給者の疫学的特性、臨床医学的特性を明らかにし、患者の予後を把握するためのデータの利用について検討について、平成16年9月にデータの利用申請を行い、入手したデータで天疱瘡の分析を開始した。H16年度新規150例の内、判定基準を満たしていたのは121例、重症度は新規の方が更新者よりも高いことを確認した。引き続き詳細な分析を継続する。また、現在のデータの問題点を示し、改善を求めつつ、今後どのような利活用が可能で望ましいかを検討する(到達度40%)。

## ②膿疱性乾癬

1) 特定疾患個人票と乾癬登録データを用いた疫学的調査と、QOL 二次調査解析で膿疱性乾癬患者群の特徴を明らかにする。小児型の解析と治療ガイドライン作成する(岩月、池田、黒沢、北島、研究協力者:小澤):QOL 調査と同時に重症度/治療評価調査票を回収した。ガイドライン作成に必要な小児に関する疫学調査の準備として、岡山大学と岐阜大学で倫理審査を受けた。汎発性膿疱性乾癬患者群の QOL をあきらかにする目的で、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、包括的健康関連 QOL 尺度 MOS 36-Item Short-Form Health Survey version 2 を用いて疫学調査を実施した。

最終的に 106 症例のデータを回収し、このうち 104 症例を解析することができた。汎発性膿疱性乾癬患者群の QOL の特徴として、① SF-36v2 の 8 種類の下位尺度すべての得点が低下した症例が存在する。②下位尺度のうち全体的健康観、社会生活機能、日常役割機能・精神の項目では、患者群の過半数の得点が低下している。③身体機能、日常役割機能・身体、社会生活機能、全体的健康観において、標準偏差 2 倍以上に得点が低下している症例の割合が多い。ことが認められた (到達度50%)。

2) microarray system で乾癬特異遺伝子を検索する (研究協力者：小澤)：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、すべての解析 (Pooled DNA typingでの 1～3 次スクリーニングと Individual typing) を完了した。最終的に37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。これら37個のマーカーについて、SNPをマーカーとした遺伝的相関解析を行い、連鎖不平衡を示す領域の絞り込み、発現遺伝子解析を行っている。現在、相関の強い16領域を解析しており、今年度中に数個の感受性遺伝子を同定できると考えている (到達度65%)。

3) 本症の表皮細胞増殖異常について最近発見された Gli-similar protein 1, および  $Ca^{2+}$  結合蛋白の S100C/A11、さらに Hornerin を中心に炎症との関連性を分子レベルで解析する (岩月、許)：乾癬表皮における Glis1 の発現と機能について研究した。Glis1 の全長を高発現させた細胞ではコントロールと比し形態的に違いを生じなかったが、C末端を欠失させた Glis1 を高発現させた細胞では形態的に違いを生じ、cDNA マイクロアレイにて乾癬表皮で発現しているいくつかの遺伝子の発現が亢進していることがわかった。また、C末端を欠失させた Glis1 を高発現させた細胞

で抑制された遺伝子の一つである Notch ligand の Jagged1 が乾癬の表皮ではきわめて発現が減弱していることが分かった。我々の結果より、Glis1 は乾癬表皮における遺伝子の発現の調節に関連している可能性が示唆された。本年度は、基本的に研究推進の基盤となるツールの作成により多くのエネルギーを注いだ (到達度70%)。

4) 症例データをもとに診断・重症度基準の見直しを行う (岩月、北島、研究協力者：小澤)。シクロスポリンなどもふまえて年齢層に適した治療指針を作成する (到達度10%)。

5) 皮膚難病支援ネットワークを利用して患者の希望する支援内容を把握し、研究班参加施設を中心とした患者支援ネットワークを各地域に形成する (岩月)：H17年10月8日に膿疱性乾癬患者の集いを実施。疾患についての情報提供を行った。H18年2月26日に表皮水疱症患者の集いを予定している (到達度70%)。

6) 膿疱性乾癬の炎症と発症機序解明 (小宮根)：膿疱性乾癬と尋常性乾癬の相違について、樹状細胞の側面より、免疫組織学的に検討した。今回は症例数が少ないためプレリミナリーな結果として報告した。尋常性乾癬では、多数の CD11c 陽性樹状細胞の表皮内への浸潤が認められたが、膿疱性乾癬では少数しか認められなかった。表皮内 CD1a 陽性細胞数も、膿疱性乾癬では少ない傾向にあった。CD83陽性樹状細胞の浸潤も、尋常性乾癬に比べ膿疱性乾癬では少数であった。しかしながら HLA-DR 陽性表皮細胞は、同程度に認められた。膿疱性乾癬では尋常性乾癬に比べると表皮内の樹状細胞の浸潤が少なく、尋常性乾癬での著明な表皮肥厚に樹状細胞の浸潤が何らかの関与をしている可能性が考慮された。また、尋常性乾癬と膿疱性乾癬でのケモカイン、サイトカインプロファイルの相違が、浸潤樹状細胞の差として現れている可能性も考えられた (到達度30%)。

### ③表皮水疱症

1) 出生診断法とその施行指針を確立する(清水):この分野の基礎データを得るために文献状の検索が行われた(到達度10%)。

2) 表皮水疱症患者の病変やDNAから遺伝子変異を同定し臨床と比較検討する(清水):表皮水疱症の原因遺伝子として、10の遺伝子が報告されている。今回、幽門閉鎖を合併した表皮水疱症患者を解析した。現在までに、幽門閉鎖を合併するタイプは、 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンの変異で起こる接合部型のみであった。症例の電顕検索では、水疱が表皮内に形成され、蛍光抗体では $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンに異常がなく、プレクチン発現の著しい低下を認めた。さらに、プレクチン遺伝子の変異検索を行ったところ、症例1では、Q305Xと1395G→Aの変異が、症例2ではR1189XとQ2538Xの変異が同定された。本症例は、表皮水疱症の新病型、プレクチン遺伝子の変異で起こる幽門閉鎖合併単純型と考えられた(到達度50%)。

ケラチン病モデル細胞樹立の試み(米田):単純型表皮水疱症は、基底細胞においてケラチン中間径線維を構築するケラチン分子をコードする遺伝子に点突然変異あるいは欠失が生じ、結果的にケラチン線維構築が破綻し基底細胞が脆弱となることが発症原因と考えられてきた。かってわれわれは、一時的トランスフェクションの系を用いて、ケラチン病の細胞では、角化細胞内に変異ケラチン凝集塊が生じるとTNF- $\alpha$ 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を見つけた。そして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だと報告してきた。しかしこの系では、トランスフェクションの効率が低いため、上記以上の詳細な解析が困難であった。今回われわれは、この問題を回避する目的で、

エクジソン誘導発現系を用いて、ケラチン病モデル細胞の樹立を試みた(到達度30%)。

3) 三次元培養皮膚を用いた治療法の改良と遺伝子導入再生皮膚療法を行う(橋本公二):表皮水疱症の再生治療を改善する目的で、三次元培養皮膚の改良を行った。これまでの研究成果により、培養表皮シートは角層を欠き、基底膜構成タンパクが欠除しており生着性に問題があった。三次元培養皮膚は、基底膜構成成分は存在するが不完全であることが明らかとなった。本研究では形態的に優れた、より正常皮膚に近い新しい三次元培養皮膚の作製法を開発した(到達度65%)。

4) 患者組織から皮膚になる幹細胞を単離、培養する方法を確立し遺伝子導入する(金田、研究協力者:玉井):表皮水疱症の遺伝子治療を成功させるためには、皮膚基底膜領域で長期安定的に治療用導入遺伝子の発現を維持しなくてはならない。これまで我々は、皮膚創傷治癒過程において表皮細胞をはじめとする皮膚構成細胞が骨髄細胞により再生される可能性を報告してきた。今回我々は、遺伝子導入自家骨髄細胞移植による表皮水疱症治療の可能性を検討した(到達度40%)。

免疫寛容の誘導(金田、研究協力者:玉井):遺伝性皮膚疾患に対する有効かつ安全な遺伝子治療法を確立するためには、治療用遺伝子産物に対する拒絶免疫反応を回避しつつ、治療用遺伝子を長期安定的に目的組織で発現させる必要がある。今回我々は、マウス胎仔循環系への低浸襲性細胞移植法を確立し、この方法を利用した胎生期マウスへの外来性遺伝子(GFP遺伝子)導入骨髄細胞移植により、出生後のマウス各種組織におけるGFP発現細胞の長期生着を確認した(到達度60%)。

5) 厚労省難病受給者票データベースを利用するための承認申請と臨床医学的特性を示す(池田、黒沢):天疱瘡について厚労省難病受給者票データベースの利用法

を検討し始めたが、表皮水疱症には取りかかることができていない（到達度10%）。

#### ④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）

1) 症例の遺伝子解析を行い genotype/phenotype 解析をする（池田）：当科において施行し得た BCIE 患者における遺伝子変異同定に加え、2003年から2005年にかけて報告された症例における genotype/phenotype 相関解析を行った。その結果、従来と異なった genotype-phenotype 関係があることが更に明らかとなった。今後は本邦の全国調査において把握され、遺伝子変異の同定が未了例につき、genotype-phenotype の相関解析を進める（到達度60%）。

2) ケラチン遺伝子変異のパーマメント導入株を作り、細胞レベルの研究を行う。（小宮根）：先天性水疱型魚鱗癬様紅皮症は、ケラチン K1 あるいはケラチン K10 遺伝子の異常により発症することが知られているが、その皮疹の形成メカニズムについては、未知の部分が多い。我々は、機械的刺激がこの疾患における皮疹の形成に深く関与しているのではないかと考えた。まず、正常ヒト表皮角化細胞に伸展刺激を加えた時の MAP キナーゼのリン酸化、およびそのシグナル伝達について検討したところ、伸展刺激により ERK、p38が活性化し、ERK のリン酸化には EGF 受容体とカルシウムチャンネルが関与することが明らかとなった。次に、DNA マイクロアレイを用いて、伸展刺激により発現の変動する遺伝子群について検討した結果、細胞骨格関連遺伝子群、特に Rho Cdc42 関連遺伝子およびアクチン関連蛋白遺伝子群の発現誘導が特徴的と考えられた。さらに、正常ヒト表皮角化細胞に正常および変異ケラチン K1 を強制発現させ伸展刺激を加えたところ、変異ケラチン K1 導入細胞ではケラチン K1 線維が波状の異常な形状をとることが明らかとなった（到達度30%）。

3) 角化制御酵素の KLK5, KLK7, inhibi-

tor LEKTI の患者皮膚における分布解析から臨床形成機序を解明する（山本）。水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症において角層が著しく肥厚している機序として、角層剥離を調節する層板顆粒の分泌が異常であることが考えられている。角層デスモゾームの分解に関与が推定される分子としてカテプシン群のなかで、カテプシン D、カテプシン V に着目し、これらが層板顆粒分子であることを明らかにした。これらを含む層板顆粒が十分に放出されないことが本症における角層剥離の遅延につながっていると考えられる（到達度50%）。

#### 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, 045113, 056114」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」。東海大学医学部倫理委員会「尋常性乾癬感受性領域の全ゲノム高解像度マッピング；受付番号01-11」。

以下は「天疱瘡における遺伝的背景の検索」：奈良県立医科大学倫理委員会承認（承認番号20）、奈良県立奈良病院（承認番号42）、岐阜大学倫理委員会承認（承認番号15-97）、久留米大学医学部倫理委員会承認（承認番号10）、慶應義塾大学医学部倫理委員会承認（承認番号14-74-1）、愛媛大学医学部倫理委員会承認（承認番号30）、岡山大学倫理委員会承認（承認番号16-1）、順天堂大学医学部承認（承認番号193）、川崎大学医学部（小児番号66）、東北大学医学部（承認番号2004-156）。

## E. 結論

1) ①天疱瘡：病原性抗 Dsg3 モノクローナル抗体、病原性T細胞株の樹立、抗体結合による Dsg3 の消失を証明したが、抗体発生と水疱形成機序が不明。治療指針が不十分。患者 QOL 実態が不明。②膿疱性乾癬：病因、発症機序、QOL 実態は不明（一部解析）。治療指針の再評価必要。③表皮水疱症：病因遺伝子VII型コラーゲン変異による臨床分類の見直し、治療法の開発、出生前診断法の確立とその指針、倫理規定の基礎を17年度に確立したが、本格的な研究必要。④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：病因ケラチン遺伝子変異と臨床型の関係、診断基準、疫学、治療法については全く不明で研究を開始した。

2) 特定治療研究対象疾患臨床調査個人票データベースを用いた解析については、①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症について平成17年9月末に平成13～16年度全国の個人調査票の利用許可とデータを入手した。18年度に解析を行う。

## 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17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. Yasuo Kitajima, Cell signaling and desmosome assembly/disassembly linked to the generation of Dsg3-depleted desmosomes. pemphigus Jun16-17, 2005, NIH, USA,
2. En Shu, Yukari Yamamoto, Yumi Aoyama, Yasuo Kitajima. Intra-peritoneal injection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes desmoglein 3 from epidermal keratinocytes as examined by western blotting, associated with suprabasal blistering. Annual Meeting of SID, 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>, May, 2005, St. Luis, USA
3. Yukari Yamamoto\*, Yumi Aoyama\*, Kazuyuki Tsunoda\*\*, Masayuki Amagai\*\*, Yasuo Kitajima\*. Antidesmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete Dsg3 from desmosomes in cultured keratinocytes and their activities differ in sites of epitopes. Annual Meeting of SID, 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>, May, 2005, St. Luis, USA
4. 高橋勇人、天谷雅行、河上裕、桑名正隆. 天疱瘡モデルマウスを用いた自己反応性T細胞クローン株の in vivo 病原性のスクリーニング法、第35回日本免疫学会、横浜、2005. 12.
5. 新関寛徳. シンポジウム：自己免疫性水疱症—最近の話題2005 天疱瘡発症の遺伝的背景 第56回日本皮膚科学会中部支部学術大会、平成17年9月23日
6. 新熊 悟、新関寛徳、榎原直樹、浅田

- 秀夫、宮川幸子. Prurigo variantと  
考えられた水疱性類天疱瘡の1例 第  
27回水疱症研究会、平成17年10月16日、  
東京都
7. Hideaki Sugiyama, Hiroyuki  
Matsue, Yuumi Nakamura, and  
Shinji Shimada, Markedly de-  
creased numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>  
regulatory T cells in blood of pa-  
tients with pemphigus vulgaris 第  
30回日本研究皮膚科学会年次学術大会・  
総会、2005年4月20日
  8. Sugiyama, Hiroyuki Matsue,  
Yuumi Nakamura, and Shinji  
Shimada, Markedly decreased  
numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regula-  
tory T cells in blood of patients  
with pemphigus vulgaris (Hideaki  
The 66<sup>th</sup> Annual Meeting of The  
Society for Investigative Dermatol-  
ogy, 2005年5月5日
  9. 小宮根真弓. 第104回日本皮膚科学会  
総会 横浜：モーニングセミナー：活  
性型ビタミンD3：乾癬治療における  
作用機転とその応用
  10. 小宮根真弓. 竹腰知紀、桜井直樹、南  
谷洋策、佐伯秀久、朝比奈昭彦、玉置  
邦彦
  11. 第20回日本乾癬学会：乾癬局面周辺部  
の免疫組織学的検討(2) 中西 元、  
岩月啓氏、Anton Jetten、Yong-Sik  
Kim. 表皮角化細胞における Glis1 の  
発現と機能. 第18回角化症研究会、20  
05.
  12. Gen Nakanishi, Yong-Sik Kim,  
Takeshi Nakajima, Keiji Iwatsuki,  
Anton Jetten. The Krüppel zinc-  
finger protein Gli-similar protein 1:  
its expression and function in  
skin. 第30回日本研究皮膚科学会、  
2005
  13. 松浦浩徳、岩月啓氏、梅澤慶紀、小澤  
明、市來善郎、北島康雄、中村晃一郎、  
金子史男. 膿疱性乾癬の疫学解析. 第  
20回日本乾癬学会、2005
  14. 松浦浩徳、岩月啓氏、臼井仁美、大森  
昌子、槇野博史、長宅芳男. Sec-  
ondary systemic amyloidosis を伴っ  
た関節症性乾癬の一例. 第20回日本乾  
癬学会、2005
  15. 太田幸則、岩下賢一、梅澤慶紀、松山  
孝、小澤 明、塚本秀雄. 分化誘導刺  
激に伴う表皮細胞 c-Myc/Mad fam-  
ily 遺伝子発現の検討 Altered ex-  
pression of c-Myc/Mad gene  
family mRNA on keratinocyte by  
differentiation-promoting factor,  
日本研究皮膚科学会第30回年次学術大  
会・総会、平成17年4月20~22日、横  
浜
  16. T. Mabuchi, A. Oka, M. Iizuka, K.  
Iwashita, Y. Umezawa, Y. Ohata,  
T. Matsuyama, H. Inoko, Y. Kubota,  
J. Nakayama, M. Ozawa, T. Terui,  
S. Yasumoto, T. Hashimoto, S.  
Ikeda, Y. Matsumoto, H. Sueki, M.  
Iijima and A. Ozawa. Genome-wide  
association study of psoriasis  
using polymorphic microsatellite  
markers, 66<sup>th</sup> Annual Meeting of  
the Society for Investigative Der-  
matology, 平成17年5月4~7日、  
St. Louis, USA
  17. Umezawa Y, Akasaka E, Mabuchi  
T, Ohata Y, Matsuyama T and  
Ozawa A. An attempt at new  
regimen of systemic therapy with  
cyclosporine based on pharmaco-  
kinetics in psoriasis. The 9<sup>th</sup> An-  
nual Meeting The Korean Society  
for Psoriasis, The Korean Society  
for Psoriasis, 平成17年5月14日、  
Seoul, Korea
  18. 松浦浩徳、岩月啓氏、梅澤慶紀、小澤

- 明、市來善郎、北島康雄、中村晃一郎、金子史男. 膿疱性乾癬の疫学解析、第20回日本乾癬学会、平成17年9月9～10日、軽井沢
19. Sakaguchi M, Sonogawa H, Miyazaki M, Namba M, Huh N: Bifurcated converging pathways for high  $Ca^{++}$ - and TGF $\beta$ -induced inhibition of growth of normal human keratinocytes, The American Society for Cell Biology (ASCB) annual meeting (45th), San Francisco, USA, December 12, 2005.
  20. Huh N, Makino E, Sakaguchi M: S100C/A11, an essential element of the signal transduction of TGF $\beta$ -induced growth suppression and a potential target for therapy against hyper-proliferative human diseases. Cell Signaling World 2006, Signal Transduction Pathways as Therapeutic Targets, Luxembourg, Luxembourg, January 26, 2006.
  21. Sakaguchi M, Abarzua F, Takaishi M, Nasu Y, Kumon H, Huh N: Adenovirusmediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of JNK, The 11<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, Phitsanulok, Thailand, January 26, 2006.
  22. Y. Yahata, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, T. Mochizuki, S. Hirakawa and K. Hashimoto: The MyD88-dependent signaling pathway of the *Sporothrix schenckii* antigen-induced TLR2 natural immune response in HDMEC. 35<sup>th</sup> Annual ESDR Meeting. Sep 22, 2005, Tübingen, Germany.
  23. K. Sayama, S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, X. Dai, M. Tohyama, H. Komatsuzawa, S. Higashiyama, M. Sugai, and K. Hashimoto: The innate antimicrobial peptide LL-37 induces keratinocyte migration via HB-EGF-mediated transactivation of EGF Receptor and STAT3 phosphorylation. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  24. X. Dai, K. Sayama, Y. Shirakata, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, M. Tohyama, Y. Yahata, S. Tokumaru, and K. Hashimoto: STAT5a-PPAR $\gamma$  is a novel differentiation-regulating pathway in human keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  25. Y. Hanakawa, M. Amagai, K. Y. Shirakata, Y. Yahata, S. Tokumaru, M. Tohyama, K. Sayama, and K. Hashimoto: Differential effects of dominant negative mutants of desmocollin 3a and 3b on cell-cell adhesion of keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  26. S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, K. Kameda, K. Sayama, and K. Hashimoto: Endothelin-induced keratinocyte migration requires Arc activation and EGFR transactivation via the ETB recep-

- tor. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA
26. J. Kishimoto, Y. Ishimatsu-Tsuji, R. Ehama, T. Soma, S. Suzuki, Y. Shirakata and K. Hashimoto: Characterization of human hair generated by cellular grafting. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  28. M. Tohyama, Y. Shirakata, K. Sayama, Y. Hanakawa, X. Dai, Y. Yahata, S. Tokumaru, H. Komatsuzawa, M. Sugai and K. Hashimoto: CCL16, a member of ELR-CXC chemokine, is an endogenous antimicrobial agent derived from keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  29. Y. Shirakata and K. Hashimoto: Successful treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with autologous cultured skin. 7<sup>th</sup> Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, June 4<sup>th</sup>, 2005, Dresden, Germany.
  30. 美馬秀俊、金田安史: 生体適合性ポリマーを用いた遺伝子導入増強法の開発 (平成17年9月14日; 第64回日本癌学会学術総会; 札幌)
  31. 金田安史: 遺伝子治療と Translational research (平成17年6月2日; 第22回日本呼吸器外科学会総会; 京都)
  32. 美馬秀俊、金田安史: Development of polymer-conjugated HVJ envelope vector to enhance the transfection efficiency in vitro and in vivo (平成17年7月30日; 第12回日本遺伝子治療学会; 東京)
  33. 河地正子、玉井克人、金田安史: 表皮細胞高親和性 HVJ-E ベクターの開発 (平成17年12月8日; 第28回日本分子生物学会; 博多)
  34. 佐賀公太郎、玉井克人、金田安史: siRNAの利用による HN 低含有 HVJ ウイルス粒子の生産 (平成17年12月8日; 第28回日本分子生物学会; 博多)
  35. Mayumi Komine, Shoichiro Yano, Hitoshi Okochi, Miroslav Blumenberg, Kunihiko Tamaki: Mechanical stretch causes shift to basal and proliferating phenotype in normal human keratinocytes. 第66回米国研究皮膚科学会 (Society for Investigative Dermatology) セントルイス
  36. 小宮根真弓、矢野正一郎、南谷洋策、常深祐一郎、大河内仁志、Miroslav Blumenberg、玉置邦彦: 表皮細胞における機械的伸展刺激の作用 第20回角化症研究 東京
  37. Mayumi Komine, Shoichiro Yano, Hitoshi Okochi, Miroslav Blumenberg, Kunihiko Tamaki: The effects of mechanical stretch on epidermal keratinocytes. Stanley Seminar Series, National Institute of Health, Bethesda
  38. Mayumi Komine, Shoichiro Yano, Hitoshi Okochi, Miroslav Blumenberg, Kunihiko Tamaki: The effects of mechanical stretch on epidermal keratinocytes. Dermatology Grand Rounds, New York University Medical Center, New York
  39. 小宮根真弓、玉置邦彦: 表皮細胞における Cyclic Stretch の作用 第19回表皮細胞研究会 蔵王
  40. Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Hovnanian A, Richard G, Iizuka H. Mutation in SPINK5 and

desmosomal abnormalities in a patient with Netherton syndrome who was considered to have congenital ichthyosiform erythroderma for 17 years. The 14<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Meeting of Dermatology. 2005.11.4-5, Kumamoto

41. 山本明美. 角化に関する新知見. 層板顆粒を中心として、第56回日本皮膚科学会中部支部学術大会（ミニレクチャー）2005. 9. 24、大阪市
42. 山本明美. 臨床診断をくつがえした分子皮膚病理. 角化症における実際例. 分子皮膚病理講習会 Update 2005 in Sapporo. 2005. 9. 18、札幌市
43. 山本明美. はじめの診断を訂正した症例に学ぶ角化症. 第6回東海皮膚科EBM構築研究会（特別講演）2005. 5. 19、名古屋市
44. 山本明美. 高橋英俊、橋本喜夫、飯塚一、John McGrath, Gabriele Richard, Alain Hovnanian. LEKTIは基質となる KLK5 および KLK7 とは独立して層板顆粒に含まれ、顆粒層上層において分泌される. 第30回日本研究皮膚科学会学術大会. 2005. 4. 20-22、横浜市
45. 岸部麻里、坂東良雄、山本明美、高橋英俊、吉田成孝、飯塚一. KLK8/Neuropilinノックアウトマウスの表皮は

増殖刺激への反応性が低下している. 第30回日本研究皮膚科学会学術大会. 2005. 4. 20-22、横浜市

46. 青山裕美. 天疱瘡水疱形成機序における細胞内シグナル伝達の解明. 平成17年9月24日第56回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 大阪

## H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

1) 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法

（発明者：佐賀公太郎、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学）2005年11月24日出願、特願2005-338449

2) ターゲッティングウイルスおよびその作製方法（発明者：河地正子、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学）2005年11月24日出願、特願2005-339474

### 2. 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

天疱瘡抗体、抗デスマグレイン (Dsg) 3 モノクローナル抗体刺激による  
DJM-1 細胞における Dsg3 分子の減少率と細胞間結合力の減弱

主任研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学系研究科  
病態制御学講座・皮膚病態学 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 (Dsg) 3 N末接着機能部位に対する抗体）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 減少デスマソームを形成することを示した。この時 Dsg3 の量は PV-IgG 刺激時ではデスマソームを含む細胞内プールから約90%消失し、AK23 では約40%減少した。そこで、この Dsg3 減少は細胞間接着力の減少を引き起こすか、あるいは、Dsg3 の減少量は細胞間接着力の減少と相関関係があるかどうかを検討した。培養 DJM-1 細胞に PV-IgG (0.3mg/ml)、AK23 (0.5mg/ml)、control mouse IgG (0.5mg/ml) を培地中に添加し、24時間後 Dispase で 37°C30min 反応させてディッシュから細胞を剥がし、2.0ml のエッペンドルフチューブに集めた。P1000ピペットマンで5回ピペッティングを繰り返して物理的刺激を加えた後に50%エタノールで5分間固定し、最終濃度 1 $\mu$ g/ml DAPI を加えて15分核染色を行った。2000rpm で5分間の遠心により細胞コロニーを沈殿として集め、Fluor Save で浮遊させ、スライドガラスに滴下、伸展した。蛍光顕微鏡を用いて、核の集まりとして観察される各細胞コロニーの蛍光強度を Image-J により測定した。細胞数と蛍光強度には比例の関係にあったため、蛍光強度を細胞数の指標とした。画像1枚中の30個以上のコロニーの総細胞数/30個以下のコロニーの総細胞数の比を求め、抗体刺激の有無で小細胞コロニーの割合がどの程度増えるかを検討した。この方法による測定では、PV-IgG、AK23 刺激共に細胞接着力が63%まで減弱した。デスマグレイン 3 量の減少は細胞間接着力を減弱することが示唆された。

共同研究者

山本ゆかり 岐阜大学大学院医学系研究科  
皮膚病態学研究室

青山裕美 岐阜大学医学部附属病院講師

#### A. 研究目的

我々はこれまでに、Dsg3 に対する自己抗体 (PV-IgG) がデスマ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<sup>1)</sup>、Dsg3 のリン酸化、それに伴う PG の解離<sup>2)</sup>により細胞内に取り込まれて分解される結果、Dsg3 減少デスマソームを形成することを報告してきた<sup>3)</sup>。さらに、Dsg3 N末接着機能ドメ

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 AK23<sup>4)</sup> を用いても、24時間の刺激後、同様に Dsg3 減少デスマ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<sup>5)</sup>。この時の Dsg3 の量は PV-IgG 刺激時では約90%、AK23 では抗体濃度、刺激時間に関わらず約40%程度まで減少した。そこで、この Dsg3 減少量の程度と細胞間接着力の減少との関連性について培養 DJM-1 細胞 (ヒト扁平上皮癌細胞株) に PV-IgG AK23 抗体で刺激を行い検討した。