

表5 天疱瘡の病型別検査所見

検査		尋常性	(%)	増殖性	(%)	落葉状	(%)	紅斑性	(%)	その他・不明	(%)
免疫組織学的診断	表皮細胞間のIgG（ときに補体）の沈着	317	25.7	13	33.3	139	32.3	31	27.7	16	31.4
(流血中の抗表皮細胞間抗体)	間接蛍光抗体価(倍) ≥ 1	142	11.5	6	15.4	70	16.2	16	14.3	7	13.7
	ELISA法抗デスマogleイン1インデックス値 ≥ 14	227	18.4	4	10.3	217	50.3	35	31.3	10	19.6
	ELISA法抗デスマogleイン3インデックス値 ≥ 7	484	39.2	17	43.6	28	6.5	4	3.6	7	13.7

表6 天疱瘡の病型別重症度（合計スコアより）

重症度	尋常性	(%)	増殖性	(%)	落葉状	(%)	紅斑性	(%)	その他・不明	(%)
軽症 (5点以下)	871	70.5	29	74.4	307	71.2	90	80.4	51	83.6
中等症 (6~9点)	231	18.7	7	17.9	92	21.3	18	16.1	6	9.8
重症 (10点以上)	59	4.8	1	2.6	16	3.7	2	1.8	1	1.6
不明	74	6.0	2	5.1	16	3.7	2	1.8	3	4.9
計	1235	100	39	100	431	100	112	100	61	100

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

尋常性天疱瘡患者における CD4⁺ CD25^{high} 制御性T細胞の解析

研究協力者 島田眞路 山梨大学医学部 皮膚科 教授

研究要旨 近年CD4⁺T細胞サブセットに属し IL-2 レセプター α 鎖として知られるCD25を恒常的に強発現する、CD4⁺ CD25^{high} 制御性T細胞が自己免疫をコントロールする上での鍵的要素であると考えられている。事実、本細胞の機能的異常が種々のヒト自己免疫性疾患において報告されており、これまでに筆者らも自己免疫性疾患である尋常性乾癬患者の末梢血ならびに炎症局所に存在する制御性T細胞の機能異常を見出し、それが乾癬の疾患病態に関わることを報告した。一方、尋常性天疱瘡も皮膚科領域における代表的な自己免疫性水疱性疾患であるが、発症に関わる自己抗体の産生を引き起こす根元的なメカニズムは不明のままである。そこで今回我々は、制御性T細胞細胞が天疱瘡の病因に関与する可能性につき検討を加えるべく、天疱瘡患者の末梢血・皮疹部に存在する本細胞の解析を行う。

共同研究者

梶山秀昭 山梨大学医学部 皮膚科 助手

A. 研究目的

尋常性天疱瘡（PV）の病因に関わる自己抗体の産生及び制御には自己反応性のヘルパーT（Th）細胞が必要であると考えられているが、生体内におけるこの病的Th細胞の活性化機序は未だ不明のままである。近年、CD4⁺ CD25^{high} 制御性T（Tr）細胞はこれらの病的T細胞の活性化を抑制するのみならず、抗体産生にあずかるB細胞の活性化も制御し得ることが報告された。本研究では、PV患者の末梢血における量的・質的なTr細胞の解析を行い、本細胞の異常が病因に関わるか否かの検討を行った。

B. 研究方法

PV患者末梢血中に存在するTr細胞のCD4⁺T細胞に占める割合をフローサイトメトリーを用いて定量的に解析し、健常群や他の水疱症を含む種々の皮膚疾患患者群の各々と比較する。

C. 研究結果

健常群（n=10）のTrがCD4⁺T細胞のうち $3.0 \pm 0.3\%$ の頻度で認められたのに対して、患者群（n=9）では $0.3 \pm 0.1\%$ と圧倒的な低頻度であった（ $P < 0.001$ ）。落葉状天疱瘡患者（n=3）をはじめとする各疾患対照群（SLE（n=5）、アトピー性皮膚炎（n=7）、乾癬（n=4））のTrは健常群と同等の頻度で認められた。

D. 考察

PV患者末梢血中に存在するTrの割合は健常群のそれと比較して約1/10と低頻度であった。この現象は他の疾患対照群においては認められず、疾患特異的な現象である。

E. 結論

尋常性天疱瘡における自己反応性のヘルパーT細胞の活性化とそれに続く自己抗体産生の機序は未だ不明のままである。今回我々が見いだした患者末梢血中におけるCD4⁺ CD25^{high} 制御性T細胞の数的な減少が病的ヘルパーT細胞活性化の引き金であ

る可能性があり、今後のさらなる研究が求められる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成17年度）

1. 論文発表

英語論文

1. Hideaki Sugiyama, Rolland Gyulai, Eiko Toichi, Edina Garaczi, Shinji Shimada, Seth R. Stevens, Thomas S.McCormick, and Kevin D.Cooper
 2. Hiroyuki Matsue, Jian Yao, Keiko Mstsue, Akiko Nagasaka, Hideaki Sugiyama, Rui Aoki, Masanori Kitamura, and Shinji Shimada
 3. H. Sugiyama, H. Matsue, A. Nagasaka, Y. Nakamura, K. Tsukamoto, N. Shibagaki, T. Kawamura, R. Kitamura, N. Ando and S. Shimada
2. 学会発表
1. Markedly decreased numbers of

CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in blood of patients with pemphigus vulgaris (Hideaki Sugiyama, Hiroyuki Matsue, Yuumi Nakamura, and Shinji Shimada, 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

2. Markedly decreased numbers of CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in blood of patients with pemphigus vulgaris (Hideaki Sugiyama, Hiroyuki Matsue, Yuumi Nakamura, and Shinji Shimada, The 66th Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, 2005年5月5日

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

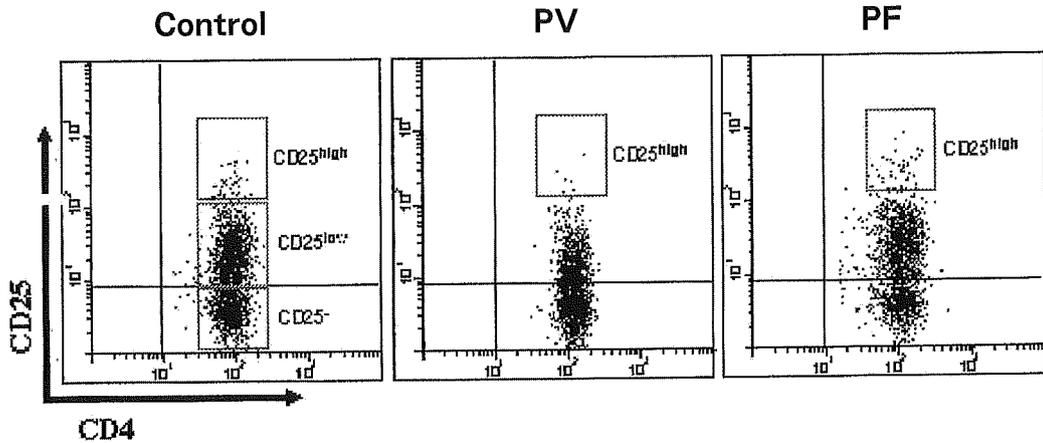


図1 健常者 (Control)、尋常性天疱瘡患者 (PV)、落葉状天疱瘡患者 (PF) 各々の末梢血における $CD4^+ CD25^{high}$ 制御性T細胞。フローサイトメトリーを用いた全 $CD4^+$ T細胞中の $CD25^{high}$, $CD25^{low}$ and $CD25^-$ 細胞の様子を示す。各パネルは対照群、各疾患群における代表例。

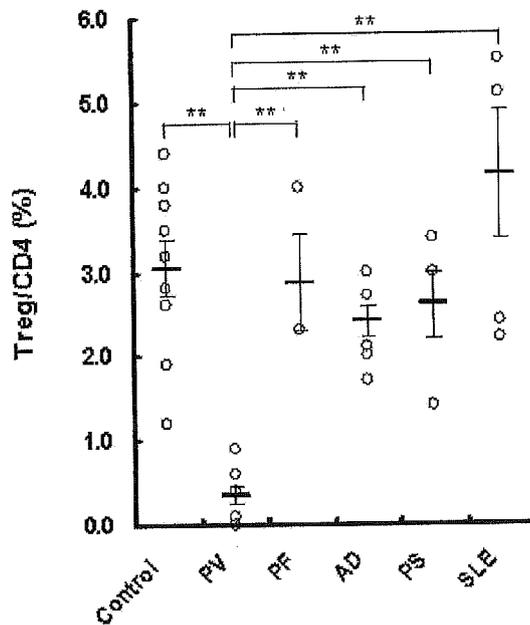


図2 尋常性天疱瘡と対照群および疾患対照群における末梢血 $CD4^+$ T細胞中の $CD4^+ CD25^{high}$ 制御性T細胞の割合の比較。フローサイトメトリーによる健常群 (Control; n=10)、尋常性天疱瘡 (PV; n=9)、落葉状天疱瘡、アトピー性皮膚炎 (AD; n=7)、尋常性乾癬 (PS; n=4)、SLE (n=5) 各患者における $CD4^+ CD25^{high}/CD4^+$ 比を示す (** $P < 0.05$)。

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

天疱瘡患者の遺伝的背景 第3報 天疱瘡患者のデスマグレイン遺伝子多型解析

研究協力者 新関寛徳 奈良県立医科大学皮膚科学 講師

研究要旨 尋常性天疱瘡とデスマグレイン（DSG）遺伝子多型との関連を検討することを目的として患者8例、健常コントロール8例においてDSG1、4、3遺伝子全エクソンの塩基配列決定を行い、日本人患者における単一塩基多型（SNP）を検出した。3種の遺伝子に共通してエクソン1、16（DSG1ではエクソン15に相当）に多型が見出された。さらにDSDG1、3においては細胞外ドメインとしてエクソン11にアミノ酸置換を伴うSNPが見出された。諸外国の報告との比較では、落葉状天疱瘡関連DSG1多型（エクソン7）および尋常性天疱瘡関連ハプロタイプのいずれもが日本人患者においても検出された。

SNP情報が得られたことにより、今後日本人患者のラージサンプルでの患者-対照研究を行い、ハプロタイプの決定、感受性領域の同定が可能となった。

共同研究者

浅田 秀夫

奈良県立医科大学皮膚科学助教授

宮川 幸子

奈良県立医科大学皮膚科学教授

青山 裕美

岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座

皮膚病態学講師

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

北島 康雄

岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座

皮膚病態学教授

清水 宏

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野

教授

清水 忠道

富山大学医学部皮膚科教授

橋本 隆

久留米大学医学部皮膚科教授

池田 志孝

順天堂大学医学部皮膚科教授

高橋 勇人

慶應義塾大学医学部皮膚科

天谷 雅行

慶應義塾大学医学部皮膚科教授

桑名 正隆

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師

白方 裕司

愛媛大学医学部皮膚科学

橋本 公二

愛媛大学医学部皮膚科学教授

山本 哲也

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

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

稲沖 真

川崎医科大学皮膚科助教授

藤本 亘

川崎医科大学皮膚科教授

中村晃一郎

福島県立医科大学助教授

金子 史男

福島県立医科大学教授

國井 隆英

東北大学大学院医学系研究科内科病態学講

座皮膚科学分野

相場 節也
東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座皮膚科学分野教授

岡 晃
東海大学医学部分子生命科学系助手
成瀬 妙子
東海大学医学部分子生命科学系助手
猪子 英俊
東海大学医学部分子生命科学系教授

A. 研究目的

尋常性天疱瘡とデスマグレイン (DSG) 遺伝子多型との関連を検討することを目的とする。今年度はその基礎データとしてスモールサンプルにおいて全エクソンの塩基配列決定を行い、日本人患者における単一塩基多型 (SNP) を検出することを目的とした。

B. 研究方法

1. 患者および対照群検体

今年度までのゲノムワイドスクランニングに向けて第1次、第2次検体収集施設として、新たに倫理審査承認が得られた施設は、東北大学、福島県立医科大学、川崎医科大学の3施設である。既に検体提供のあった9施設を加え、参加施設は12施設となった。

今後さらに施設数を追加する予定であり、収集期間も年余にわたるため、患者インシヤルと生年月日による重複チェックを続けている。なお、チェックを行うのは、検体収集を行う奈良医大以外の第3施設として岐阜大学において行った。重複がないことのみ奈良医大へ通知された後に、患者登録を行った。平成18年1月31日までに患者重複は1回だけあった。ただちに登録施設に問い合わせが行われ、以前登録済みの検体の2重登録であることが判明した。

今回塩基配列決定の対象とした患者8名は、臨床像、病理像、および免疫組織学的検査を施行し、天疱瘡診断基準を満たす尋常性天疱瘡 (PV) 患者であり、いずれも

奈良県立医科大学通院中である。患者の平均年齢 (採血時) は、63.1歳、女性は6例であった。

一方、対照群8名のDNAは米国 Genomics Collaborative Inc. および Coriell Cell Repositories より販売された商品で全てコード番号により管理され、匿名化されたサンプルであることから、提供者の人権の確保につき会社の設置した倫理委員会による審査で承認が得られている。これらの検体が日本人により得られたものであることは、提供者に対する Interview (出生国、都市、現在の住居地、どのくらいの期間住んでいるのか、父親の出生国、都市 (不明の場合は不明と記載)、母親の出生国、都市 (不明の場合は不明と記載)、祖父母 (父方、母方) の出生国 (不明の場合は不明と記載)、本人、両親、祖父母の人種 (Ethnic Background) の確認) による。

以上の検体の使用につき、奈良県立医科大学の倫理審査に於いて承認が得られている (承認番号20:平成15年11月7日承認、承認番号24:平成16年3月17日承認、承認番号26:平成16年10月27日承認)。

2. DNA 抽出

供与を受けた血液より、スマイテスト ExR&D (ゲノムサイエンス研究所、福島) を用いてゲノムDNAを抽出、精製した。260nmと280nmの吸光度を測定することにより、DNAの定量と純度の測定を行い、10–20ng/ μ lの濃度に調整した。

3. 遺伝子多型スクリーニング

DSG1、3、4 遺伝子多型のスクリーニングは塩基配列決定により施行した。各遺伝子の全エクソンを増幅するプライマーセット (DSG1:24、DSG4:21、DSG3:24) は GenBank のデータベースとして公開された塩基配列 (GenBank accession No. NT_010966.13) を元にデザインした (論文投稿前のため省略)。DSG3 に関しては

既に報告のあるハプロタイプ決定するため、エクソン以外にイントロン1に1組のプライマーを設定した。

各サンプルは上記プライマーにより増幅後、SephadexR G-50 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を充填したMulti Screen-HV Plate (Millipore, Billerica, MA, USA) にて精製・濃縮を行い、ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

遺伝子多型の検出は、DNA Sequencing Analysis Software Version 3.7 (Applied Biosystems) および塩基配列検出ソフトウェア波平 (三井情報開発、東京) によりヘテロ接合体の検出と既存のデータベース (プライマーデザインと同じ) との比較を行い検出した。

C. 研究結果

1. DSG1 遺伝子多型

表1に検出されたSNPを示す。エクソン内に11個、イントロン内に3個多型を見出した。Martelら¹⁾が報告した落葉状天疱瘡関連多型が日本人においても存在することを確認した。

2. DSG4 遺伝子多型

表2に検出されたSNPを示す。エクソン内に11個、イントロン内に3個多型を見出した。

3. DSG3 遺伝子多型

表3に検出されたSNPを示す。エクソン内に3個、イントロン内に18個多型を見出した。

D. 考察

DSG1、4、3を通じてエクソン1、16 (DSG1ではエクソン15に相当) にSNPが発見されたが、これらはいずれも細胞外に発現している部分ではなかった。

細胞外ドメインにおいてアミノ酸置換を

伴うSNPはDSG1および3に認められ、いずれもエクソン11であった。DSG1では5か所検出されたが、これらのSNPは患者群では1例も検出されずコントロール群において1例のみ検出された (表1)。患者、コントロールとも8例ずつの少数サンプルの結果ではあるが、これらのSNPは既にMartelら¹⁾により落葉状天疱瘡 (PF) との関連が否定されている。

一方、DSG3においては細胞外ドメインにおいてアミノ酸置換を伴うSNPは1か所のみであった。すなわちエクソン11のSNPが、患者1例に対し、コントロール4例に検出された (表3)。天疱瘡との関連は、ラージサンプルにより結論されるべきであろう。

既にCaponら²⁾によりDSG3とPVとの関連が報告されているハプロタイプが、患者1名のみから検出された (表4)。Caponらの報告の特徴は、英国人、インド人という2種の人種から共通の領域との関連が認められた点である。解析には5つのSNPを用いているが、5つのうちTCCという3つのSNPが共通しており、これらはエクソン1からイントロン1にかけて存在する。一方人種間で異なった2つのSNP (英国人でTCCTC、インド人でTCCCC) はエクソン11および16であり、最初の3つのSNPとはかなり遺伝的距離があることから、今後疾患感受性領域はエクソン1周囲を詳細に検索することが妥当といえる。既に多施設の共同研究により100例以上の検体が当該研究班で集積されているため、来年度はこの領域を高解像度で検索する予定である。

デスマグレイン分子は細胞膜蛋白であり、ホモフィリックな結合ドメインを有する。そのため、細胞外ドメインにおいてアミノ酸置換を伴うSNPが天疱瘡の病態を説明しうる自己免疫のターゲットになることが予想された。結果は現在のところ否定的であるが、実際にこのような仮説が証明され

た疾患は未だない。一方アミノ酸コーディング領域の4キロも上流のVNTR多型が胸腺での発現量に影響を与えることがインスリン遺伝子において証明されている³⁾。インスリン遺伝子は現在ではタイプ1糖尿病(若年性糖尿病)の疾患感受性遺伝子(IDDM2)としてコンセンサスが得られている。おそらく胸腺での発現量が自己抗原(インスリン)反応性T細胞の除去効率と関連するのであろう。デスモグレインも胸腺で発現することが知られているので今後はアミノ酸置換にこだわらず、プロモーター領域多型などにも焦点をおいて検索していきたい。そういった観点ではDSG1、3で見出されたシグナルペプチドやプロモーター領域(エクソン1)で見出されたSNPの検索が期待される。

E. 結論

DSG1、4、3の全エクソンの塩基配列を、尋常性天疱瘡患者8例、健常コントロール8例において決定した。今回見出されたSNP、特にエクソン1多型をラージサンプルで検討することにより天疱瘡特異的ハプロタイプを決定することが可能となった。

引用文献

1. Martel P, Gilbert D, Drouot L, Prost C, Raux G, Delaporte E, Joly P, Tron F: A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. **Genes Immun** 2:41-3, 2001
2. Capon F, Bharkhada J, Cochrane NE, Mortimer NJ, Setterfield JF, Reynaert S, Black MM, Vaughan RW, Trembath RC, Harman KE: Evidence of an association between desmoglein 3 haplotypes and pemphigus vulgaris. **Br J**

Dermatol 154:67-71, 2006

3. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C: Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. **Nat Genet** 15:289-92, 1997

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(平成17年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Saito-Katsuragi M, Asada H, Yokoi S, Niizeki H, Miyagawa S: Ampicillin-induced cutaneous eruption associated with Epstein-Barr virus reactivation. **J Am Acad Dermatol** 52 (Suppl 1):S127-8, 2005
2. Okazaki A, Asada H, Niizeki H, Nonomura A, Miyagawa S: Intravascular histiocytosis associated with rheumatoid arthritis: report of a case with lymphatic endothelial proliferation. **Br J Dermatol** 152:1385-7, 2005
3. Asada H, Saito-Katsuragi M, Niizeki H, Yoshioka A, Suguri S, Isonokami M, Aoki T, Ishihara S, Tokura Y, Iwatsuki K, Miyagawa S: Mosquito salivary gland extracts induce EBV-infected NK cell oncogenesis via CD4 T cells in patients with hypersensitivity to mosquito bites. **J Invest Dermatol** 125:956-61, 2005
4. Sawamura D, Niizeki H, Miyagawa S, Shinkuma S, Shimizu H: A novel indel COL7A1 mutation

8068del17insGA causes dominant dystrophic epidermolysis bullosa. **Br J Dermatol**, in press

5. Akiyama M, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Yamanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Niizeki H, Miyagawa S, Shimizu H: Compound heterozygous mutations including a de novo missense mutation in ABCA12 led to a case of harlequin ichthyosis with moderate clinical severity. **J Invest Dermatol**, in press

日本語論文（著書）

新関寛徳. 先天性表皮水疱症、「今日の小児治療方針」第14版、医学書院、印刷中

2. 学会発表

1. 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
2. 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

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

表1 デスモグレイン1遺伝子多型と陽性率

Exon No	Allele	Amino acid substitution	患者頻度	コントロール頻度
1	A/G	silent	2/8	3/8
1	A/G	Ala/Thr	2/8	3/8
Intron	TG/CA	-	2/8	3/8
7	C/T	silent	2/8	3/8
11	A/C	Asn/Thr	0/8	1/8
11	C/A	Thr/Asn	0/8	1/8
11	A/C	Tyr/Ser	0/8	1/8
11	A/G	Lys/Arg	0/8	1/8
11	G/A	Asp/Asn	0/8	1/8
Intron	A/C	-	2/8	6/8
Intron	T/A	-	2/8	6/8
15	G/A	Val/Ile	0/8	1/8
15	A/T	Tyr/Phe	3/8	2/8
15	T/C	-	1/8	0/8

Gray box は Martelら¹⁾ が報告した落葉状天疱瘡関連多型を示す。

表2 デスモグレイン4 遺伝子多型と陽性率

Exon No	Allele	Amino acid substitution	患者頻度	コントロール頻度
1	C/T	Silent	2/8	5/8
16	A/G	Silent	3/8	7/8
16	A/C	Silent	2/8	3/8
16	C/T	-	2/8	1/8

表3 デスモグレイン3 遺伝子多型と陽性率

Exon No	SNP ID rs(NT_010966.13)	Allele	患者 頻度	コント ロール 頻度
intron	rs10084010	C/T	2/8	1/8
intron	rs8085523	C/T	2/8	1/8
1	rs8085532	C/T	2/8	1/8
intron	rs3911655	T/C	2/8	1/8
intron	rs3848485	T/C	2/8	1/8
intron	rs17660414	T/C	1/8	5/8
intron	rs3737365	T/C	1/8	5/8
intron	rs3737364	T/A	1/8	2/8
intron	rs7229490	T/A	1/8	4/8
intron	rs1460595	G/A	1/8	4/8
intron	rs2035042	G/A	2/8	5/8
intron		T/C	1/8	2/8
intron		T/G	1/8	2/8
11	rs16961975	G/A*	1/8	4/8
intron	rs3794925	T/C	1/8	4/8
intron		A/G	1/8	2/8
16	rs1466379	T/C	2/8	5/8
intron		C/T	1/8	4/8
intron		G/A	0/8	4/8
intron	rs8092800	G/A	2/8	1/8
intron	rs8092559	A/T	2/8	0/8

Gray box は Capon ら²⁾ により報告された尋常性天疱瘡関連ハプロタイプを示す。

*アミノ酸置換を伴う (Val/Met)

表4 Capon ら²⁾ により報告された尋常性天疱瘡関連ハプロタイプ

Exon No	SNP ID	Allele	患者								コントロール							
			1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
1	rs8085532	C/T	C/C	C/T	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C						
intron	rs3911655	T/C	T/T	T/C	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T						
intron	rs3848485	T/C	T/T	T/C	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T						
intron	rs3794925	T/C	T/T	T/C	T/T	T/T	T/C	T/T	T/C	T/C	T/T	T/C						
16	rs1466379	T/C	T/T	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	T/C	T/T	T/C

Gray box に多型の認められた SNP ID を示す。英国人において頻度の高かった TCCTC ハプロタイプ²⁾ は1例も認めない。インド人において頻度の高かった TCCCC ハプロタイプは患者1例で検出された (患者No. 2)。

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

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

研究要旨 天疱瘡 (PV) はデスモソーム構成分子であるデスモグレイン (Dsg) に対する自己抗体による自己免疫性水疱症である。これまでにわれわれは、天疱瘡患者由来 IgG を用いて Dsg 3 のリン酸化や細胞内のキナーゼの活性化が起きることを報告してきた。今回我々は、強い病原活性を持つ抗 Dsg 3 モノクローナル抗体 (AK23抗体) による細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。AK23抗体は、Dsg 3 のセリンリン酸化および p38 のリン酸化を誘導した。Dsg3 に特異的に結合するモノクローナル抗体が細胞内シグナル伝達系を活性化したことより、これまで報告されてきた PV-IgG による細胞内シグナル伝達系の活性化が抗 Dsg3 抗体に由来するものであることを強く示唆すると考えた。

研究協力者

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
河崎優希 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
天谷雅行 慶応大学皮膚科 教授
角田和之 慶応大学皮膚科・総合医科学研究センター

A. 研究目的

これまでに PVIgG で培養細胞を刺激すると Dsg3 のリン酸化が観察されることがわかっている。患者抗体により差があるものの、約30%の増加があると追試されている。また、2005年に Rubenstein らは PVIgG による p38 の活性化を阻害すると細胞骨格の再構成が阻害されると報告した。我々の研究目的は患者血清から精製された IgG が Dsg3 に結合後に細胞内で起きる反応が抗 Dsg3 抗体に由来するものであることを確認するために、病原性のある抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK23) によって Dsg3 のリン酸化や p38 の活性化が生じるかどうか確認した。

B. 研究方法

実験 1. DJM-1 細胞を P³² を含む培地で細胞をラベルし、DJM-1 細胞の培養液中に AK23抗体 (0.5mg/ml) および AK 18、19、20、23をそれぞれを 0.125mg/ml (total 0.5mg/ml、以下AKmix) 添加後、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液の PV-IgG (Dsg3 のみに結合することを確認済み) による免疫沈降産物をオートラジオグラフィにてリン酸化タンパク質を検討した (図 1 A)。

実験 2. DJM-1細胞の培養液中に AK23抗体および AKmix を添加後、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液の PV-IgG (Dsg3 のみに結合することを確認済み) による免疫沈降物を抗セリンリン酸化蛋白質抗体で検出した (図 1 B)。

実験 3. DJM-1細胞に mouse Dsg3 flag をトランジェントトランスフェクション後 48時間で抗 flag 抗体を用いて免疫沈降をし抗セリンリン酸化抗体で検出した (図 1 C)。

実験 4. DJM-1細胞の培養液中に AK23抗体を添加 0分から20分後、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液の PV-IgG による

免疫沈降産物を抗セリンリン酸化抗体で検出した(図2)。

実験5. DJM-1細胞の培養液中にAK23抗体を添加30分後、細胞抽出液を調製した。

また細胞抽出液を p38 抗体および活性化型 p38 抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した(図3)。

C. 研究結果

AK23抗体で刺激後10分で Dsg3 のセリンリン酸化が亢進していた。正常マウス IgG で刺激したコントロールに比べてAK23で刺激したサンプルではセリンリン酸化タンパク質の移動度が遅くなっていた(図1)。

また1分から20分のAK23抗体による刺激時の Dsg3 のセリンリン酸化の時間経過における変化を検討した。刺激後1分でセリンリン酸化が亢進した(図2)。

AK23抗体で刺激した DJM-1 細胞抽出液を p38 と活性化型 p38 でウエスタンブロッティングを行った。AK23抗体により p38 が活性化された(図3)。

D. 考察

Dsg3 のN末端によるホモフィリックな結合部位にエピトープを持つAK23抗体は、PV-IgG よりは弱いものの、Dsg3 のリン酸化を亢進させた。PV-IgG は proteinA セファロースビーズで精製された IgG フラクションであるため、PV-IgG 刺激後生じた生物学的反応が抗 Dsg3 抗体と Dsg3 の結合に基づくものであるかどうか不明であった。今回我々は、AK23モノクローナル抗体を刺激に用いることによって、単一の抗体が Dsg3 結合後に生じる反応を検討した。結果的に、AK23は PV-IgG 刺激後と同様に Dsg3 のセリンリン酸化および p38 の活性化を引き起こした。この結果より、われわれは、PV-IgG による Dsg3 のセリンリン酸化は抗 Dsg3 抗体によるものであろうと考える。

E. 結論

今回、病原性モノクローナル抗体である AK23が Dsg3 のリン酸化と p38 の活性化を起こすことを確認した。PV-IgG によって、細胞内シグナル伝達経路が生じていることが明らかになった。今後、水疱形成に直結するシグナル伝達経路を解明する必要がある。細胞内シグナル伝達経路を阻害することによって、水疱形成を抑制することができれば、新しい治療法の開発や、抗体の病原性の評価システムの開発につながる研究となる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表(平成17年度)

英文論文

1. Shu E, Yamamoto Y, Sato-Nagai M, Aoyama Y, Kitajima Y.: Pemphigus vulgaris-IgG reduces the desmoglein 3/desmocollin 3 ratio on the cell surface in cultured keratinocytes as revealed by double-staining immunoelectron microscopy. *J Dermatol Sci.* 40:209-11, 2005

学会発表

1. 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
2. 青山裕美、浅井かなこ、日置加奈、北島康雄、伊藤隆. 経過を通じて ELISA 値の推移を観察できた妊娠性疱疹の母子例. 平成17年9月23日第56回日本皮膚科学会中部支部学術大会、大阪
3. 青山裕美、浅井かなこ、日置加奈、北島康雄、伊藤隆. 経過を通じて ELISA 値の推移を観察できた妊娠性疱疹の母子例. 平成17年10月16日第27回水疱症

研究会、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

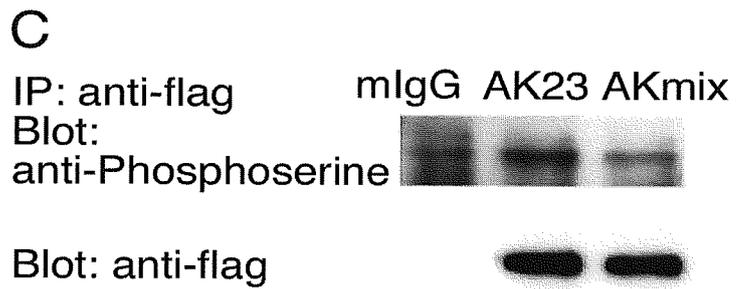
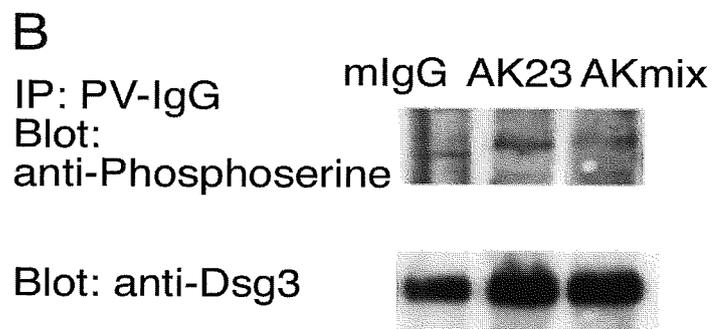
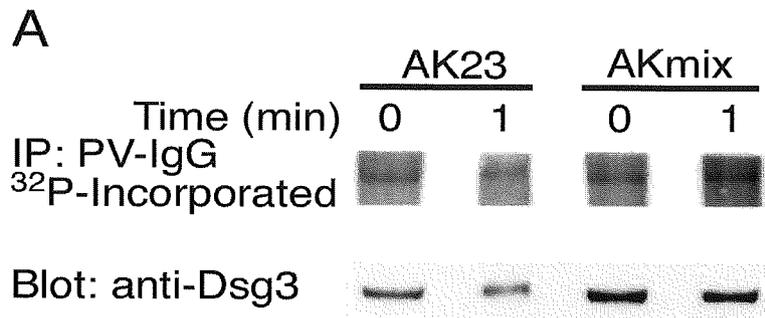
○なし。

2. 実用新案登録

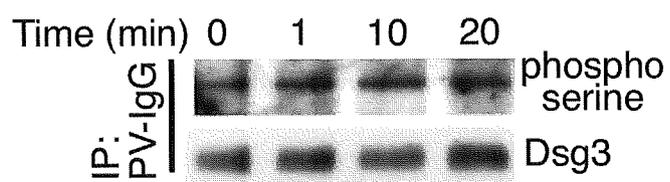
○なし。

3. その他

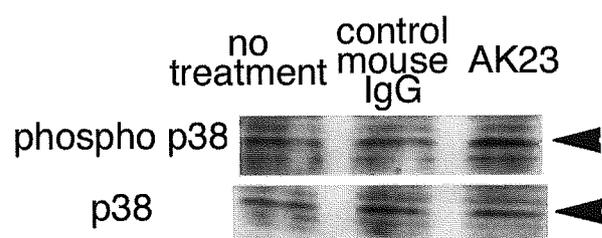
○なし。



☒ 2



☒ 3



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

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—

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

研究要旨 Sonic hedgehog-Patched-Gli シグナル伝達機構は皮膚の機能及び疾患にきわめて重要である。近年、我々は新規の Gli 関連 Krüppel タイプ zinc-finger タンパクを同定し、Gli-similar protein 1 (Glis1) と名付けた。我々は正常、及び炎症性皮膚疾患における Glis1 の発現を解析し、Glis1 の皮膚角化細胞の分化における機能について調べた。In situ hybridization では Glis1 は正常皮膚では発現されていないが、乾癬の表皮では基底細胞層より上層で発現されており、Glis1 の発現が表皮の肥厚ないし炎症と関連している可能性が示された。また、この結果は、正常のマウスの皮膚では発現が見られないが、TPA で処理したマウス皮膚では発現が見られたことから裏付けられた。これらの皮膚組織における Glis1 の発現に加えて、Glis1 mRNA は未分化の、あるいは分化したヒト正常皮膚角化細胞では検出できないが、TPA あるいはインターフェロンガンマを添加した時には著しく誘導された。同様の Glis1 の発現の誘導は、分化能を有した細胞である細胞株では認められたが、SCC の細胞株など、分化能がない細胞株では認められなかった。さらに、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。膿疱性乾癬にも同様の調節機構が存在するかどうか今後検討する予定である。

共同研究者

中西 元

岡山大学医学部・歯学部附属病院

皮膚科 助手

松浦浩徳

岡山大学医学部・歯学部附属病院

皮膚科 講師

A. 研究目的

乾癬の病変において、Gli と相同性のある新規転写因子 Glis1 の発現について明らかにする。また、培養皮膚角化細胞を用いて Glis1 の機能を解析し、乾癬皮膚におけ

る Glis1 の働きを明らかにする。

B. 研究方法

In situ hybridization (ISH) によって Glis1 の発現を正常ヒト皮膚、乾癬病変部の皮膚において確認した。12-phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)(TPA)を塗布したマウス皮膚で同様に Glis1 の発現を調べた。さらに正常ヒト培養角化細胞 (NHEK)、HPV によって不死化させた細胞株 (HPV-NHEK)、HaCaT 細胞、有棘細胞癌の細胞株 (SCCY1 と SCC13) のいくつかの種類ケラチノサイトにおいて

PMA による Glis1 の発現の変化を調べた。さらに retrovirus ベクターを用いて、全長の Glis1、C 末端に近い領域を欠損させた変異 Glis1 を高発現させた HPV-NHEK を樹立し、その形質の変化を調べた。

C. 研究結果

ISH では Glis1 は正常皮膚では発現していないが、乾癬病変部では基底層を除いて発現していた (図 1)。また、マウスの皮膚においては、PMA 塗布皮膚では Glis1 は発現していたが、コントロールのマウス皮膚では Glis1 の発現はみられなかった。培養細胞においては、NHEK、HPV-NHEK では Glis1 の発現は TPA によって誘導されたが、HaCaT 細胞及び SCCY1、SCC13 などの癌細胞では誘導されなかった (図 2)。全長の Glis1 を高発現させた細胞は変化がなかったが、変異 Glis1 を高発現させた細胞は細胞間が非常にせまいコロニーを形成し (図 3)、TPA による分化のマーカーの誘導が著しく増強された。また、さらに樹立した変異 Glis1 を高発現させた細胞における遺伝子発現プロファイルを cDNAmicroarray で調べると、乾癬で発現が増強されている遺伝子が誘導されていることが確認できた。さらに、変異 Glis1 を高発現させた細胞で発現が抑制された遺伝子の一つに Notch ligand の Jagged1 が見つかったが、その Jagged1 は乾癬の表皮では正常表皮に比べて著しく減弱していることが分かった (図 4)。

D. 考察

乾癬表皮では Glis1 が高発現していることより、乾癬の病態形成に Glis1 の関与が示唆された。培養細胞では、C 末端領域を欠損させた変異 Glis1 を高発現させた細胞のみ変化を生じ、全長の Glis1 が何も変化がなかったことから、Glis1 が機能するためには何らかの修飾が必要な可能性が考えられた。今後、細胞内の native の Glis1

について、タンパクレベルでの解析が必要と思われる。また、変化を生じた細胞を用いた cDNA microarray の解析から、乾癬で誘導されていることが報告されている遺伝子の増強が確認されたので、その細胞の形質と乾癬の表皮細胞の形質とに関連性があるのではないかと考えた。逆に、同細胞株において抑制された遺伝子の Jagged1 が乾癬表皮で発現が減弱していることが分かった。今後、Glis1-Jagged1-Notch の経路を明らかにすることによって乾癬の病態形成メカニズムを明らかにできるのではないかと考えた。

E. 結論

乾癬表皮においては Glis1 が高発現していることがわかった。Glis1 は表皮角化細胞において幾つかの乾癬で発現ないし抑制されている遺伝子を調節している可能性が考えられた。また、同様の調節機構が膿疱性乾癬にも存在するかどうかを、今後検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成17年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J, Narita S, Chiba J, Kamio Y and Iwatsuki K: The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clin Infect Dis* 40:381-385, 2005.
2. Nakanishi G, Kim YS, Nakajima T, Jetten AM: Regulatory role for Krüppel-like zinc-fingerprotein Gli-similar 1 (Glis 1) in PMA treated

- and psoriatic epidermis. **J Invest Dermatol** 126:40-60, 2006.
3. Fujii K, Tsuji K, Matsuura H, Okazaki F, Takahashi S, Arata J and Iwatsuki K: Effect of formaldehyde gas exposure in a murine allergic contact hypersensitivity model. **Immunopharmacol and Immunotoxicol** 27:163-175, 2005.
 4. Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K and Hirohashi S: Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. **Proteomics** 5:1411-1422, 2005.
 5. Morizane S, Suzuki D, Tsuji K, Oono T and Iwatsuki K: The role of CD4 and CD8 cytotoxic T lymphocytes in the formation of viral vesicles. **Br J Dermatol** 153:981-986, 2005.
 6. Nasimuzzaman Md, Kuroda M, Dohno S, Yamamoto T, Iwatsuki K, Matsuzaki S, Mohammad R, Kumita W, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakamura H, Taguchi T, Wakiguchi H and Imai S: Eradication of Epstein-Barr virus episome and associated inhibition of infected tumor cell growth by adenovirus vector-mediated transduction of dominant-negative EBNA1. **Mol Ther** 11:578, 2005.
 7. Oshimi K, Kawa K, Nakamura S, Suzuki R, Suzumiya J, Yamaguchi M, Kameoka J, Tagawa S, Imamura N, Ohshima K, Kojima S, Iwatsuki K, Tokura Y, Sato E and Sugimori H: NK-cell neoplasms in Japan. **Hematology** 10:237-245, 2005.
 8. Asada H, Saito-Katsuragi M, Niizeki H, Yoshioka A, Suguri S, Isonokami M, Aoki T, Ishihara S, Tokura Y, Iwatsuki K and Miyagawa S: Mosquito Salivary Gland Extracts Induce EBV-Infected NK Cell Oncogenesis Via CD4⁺ T Cells in Patients with Hypersensitivity to Mosquito Bites. **J Invest Dermatol** 125:956-961, 2005.
 9. Tsuji k, Suzuki D, Naito Y, Sato Y, Yoshino T and Iwatsuki K: Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. **Eur J Dermatol** 15:480-483, 2005.
 10. Yamasaki O, Morizane S, Akiyama H, Iwatsuki K, Kaneko J and Kamio Y: Tendon destruction induced by Panton-Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus in a patient with Süzary syndrome. **Br J Dermatol** 152: 586-587, 2005.
 11. Yamamoto T, Fujii K, Tsuji T, Akazai A, Oda M, Imai S and Iwatsuki K: Characterization of Epstein-Barr virus-infected natural killer lymphocytes in a patient with hypersensitivity to mosquito bites. **J Am Acad Dermatol** 53:912-914, 2005.
 12. Morizane S, Yamamoto T, Hisamatsu Y, Tsuji K, Oono T, Hashimoto T and Iwatsuki K: Pemphigus vegetans with IgG and IgA antidesmoglein 3 antibodies. **Br J Dermatol** 153:1236-1237, 2005.
 13. Fujimoto W, Hamada T, Yamada J, Matsuura H and Iwatsuki K: Bullous systemic lupus erythe-

- matosus as an initial manifestation of SLE. **J Dermatol** 32:1021-1027, 2005.
14. Nitta Y, Iwatsuki K, Kimura H, Kojima S, Morishima T, Tsuji K and Oono T: Fatal natural killer cell lymphoma arising in a patient with a crop of Epstein-Barr virus-associated disorders. **Eur J Dermatol** 15:503-506, 2005.
 15. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, Burg G, Cerroni L, Dreno B, Glusac E, Guitart J, Heald PW, Kempf W, Knobler R, Lessin S, Sander C, Smoller BS, Telang G, Whittaker S, Iwatsuki K, Obitz E, Takigawa M, Turner ML and Wood GS: Defining early mycosis fungoides. **J Am Acad Dermatol** 53:1053-1063, 2005.
- 日本語論文
1. 荒田次郎、清水 宏、渡辺晋一、宮地良樹、岩月啓氏、古江増隆、小野 真、佐藤智秀、岩崎 甫. 皮膚科領域感染症に対する telithromycin の臨床評価—cefdinir を対照薬とした第Ⅲ相二重盲検比較試験—. **日本化学療法学会雑誌** 53:183-205, 2005
 2. 荒田次郎、清水 宏、渡辺晋一、宮地良樹、岩月啓氏、古江増隆、小野 真、佐藤智秀、岩崎 甫. 皮膚科領域感染症患者における telithromycin の有効性、安全性および体内動態. **日本化学療法学会雑誌** 53:207-224, 2005
 3. 瀧川雅弘、川島 眞、古江増隆、飯塚一、伊藤雅章、中川秀己、塩原哲夫、島田眞路、竹原和彦、宮地良樹、片山一朗、古川福実、岩月啓氏、橋本公二. 小児アトピー性皮膚炎患者保護者アンケート調査. **臨床皮膚科** 59:323-329, 2005
 4. 大野貴司、松浦浩徳、浅越健治、山崎修、岩月啓氏. エトレチナート内服治療中乾癬患者でのステロイド軟膏単独外用治療と活性型ビタミン D3 軟膏併用外用療法の効果について. **新薬と臨床** 54:563-567, 2005
 5. 松浦浩徳、田端雅弘、岩月啓氏. 上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (Gefitinib) による皮膚症状. **アレルギーの臨床** 25:152-155, 2005
 6. 辻 和英、岩月啓氏. 種痘様水疱症. **Visual Dermatology** 4:910-911, 2005
 7. 濱田利久、浅越健治、郷原亜以子、森實 真、岩月啓氏、高村志保、片山治子. ステロイド内服療法が奏効した後頭部懸垂性蕁状血管腫の 1 例. **皮膚科の臨床** 47:1119-1122, 2005
 8. 森實 真、山崎 修、辻 和英、浅越健治、岩月啓氏. 血管腫を疑った aneurysmal fibrous histiocytoma の 2 例. **日本皮膚外科学会** 9:30-31, 2005
 9. 岩月啓氏. 皮膚 T 細胞リンパ腫. **医学のあゆみ** 212:485-490, 2005
 10. 岩月啓氏. 一シックハウス症候群—望まれる病態解明と疾患概念の整理. **Medical Tribune** 38:37, 2005
 11. 岩月啓氏. 種痘様水疱症. **Visual Dermatology** 4:910-911, 2005
 12. 岩月啓氏. 実践皮膚病変のみかた—皮膚の感染症—. **日本医師会雑誌** 134:S286, 2005
 13. 岩月啓氏. WHO 分類に基づく皮膚リンパ腫の臨床と病理—とくに皮膚 B 細胞性リンパ腫について—. **Seminaria Dermatologie** No.178:37446, 2005
 14. 岩月啓氏. 皮膚 NK/T 細胞リンパ腫 (1) —菌状息肉症・Sézary 症候群と EB ウイルス関連 NK/T 細胞リンパ腫—. **日本皮膚科学会雑誌** 115:2163-2171, 2005
 15. 岩月啓氏、大野貴司、松浦浩徳. 血液