

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成19 (2007) 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]	
各種抗 Dsg3 モノクローナル抗体混合刺激によるケラチノサイトにおける Dsg3 分子の減少率と細胞間接着力減少 (Dissociation assay)	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	
抗デスマグレイン 3 モノクローナル抗体による病原性相乗効果	24
分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 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	32
分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授	
久留米大学皮膚科における最近11年間の天疱瘡患者の統計学的検討	38
分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
久留米大学皮膚科における本年度の腫瘍随伴性天疱瘡患者の抗原抗体解析	47
分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
天疱瘡の臨床調査個人票データを用いた予後評価の検討	55
分担研究者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 講師	
尋常性天疱瘡における CD4 ⁺ CD25 ^{high} 制御性 T 細胞の解析	59
分担研究者 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 4 報尋常性天疱瘡におけるデスマグレイン 3 遺伝子多型	64
研究協力者 新関寛徳 奈良県立医科大学皮膚科学 講師	
抗デスマグレイン 3 モノクローナル抗体による細胞内シグナル伝達機構の検討	71
研究協力者 青山裕美 岐阜大学医学部皮膚病態学 講師	
[膿疱性乾癬]	
汎発性膿疱性乾癬の認定診断基準の鋭敏度・特異度の再検討	76
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	
汎発性膿疱性乾癬における QOL と重症度の関係について	83
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」	88
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	98
分担研究者 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—脂質代謝に関する解析—	101
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]	
栄養障害型表皮水疱症のエクソスキップ誘導による新規遺伝子治療	107
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	
日本と韓国における単純型表皮水疱症変異の傾向—19例の遺伝子検索—	114
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	
羊膜付き三次元培養皮膚の有用性に関する研究	120
分担研究者 橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授	
栄養障害型表皮水疱症に対する羊膜付き三次元培養皮膚の有用性の検討	125
分担研究者 橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授	
表皮水疱症の医療受給者の特徴—臨床調査個人票データを用いて	130
分担研究者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 講師	
胎生期骨髄移植による外来遺伝子発現皮膚の長期生着の検討	136
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	
マウス胎仔循環系への低侵襲性細胞移植による免疫寛容誘導の試み	139
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	
骨髄細胞移植を利用した栄養障害型先天性表皮水疱症の根治的治療法開発	142
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	
[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—軽症例における遺伝子変異の同定—	145
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における皮疹形成機序と治療に関する研究	151
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 3次元培養皮膚モデルを用いた細胞骨格障害の影響の検討	160
分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科 助教授	
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 細胞の扁平化障害と層板顆粒分子の発現と細胞内局在の変化	165
分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科 助教授	
角化異常症モデル細胞の樹立に関する研究	172
研究協力者 米田耕造 香川大学医学部皮膚科学講座 講師	
IV 2006年度診断基準と治療指針案	177
V 研究成果の刊行に関する一覧表	207
VI 平成18年度総会プログラム	
平成18年度第1回総会プログラム	221
平成18年度第2回総会プログラム	226

[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	助教授	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

研究要旨 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。これは平成17年度からの3年計画の2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：今回新たな病原性抗 Dsg3 モノクローナル抗体（NAKmAAb シリーズ）と Dsg3 反応性 T 細胞株を病原性・非病原性10株樹立。さらに、抑 T 細胞（Tr）が健常群では CD4⁺T 細胞のうち 3.0±0.3%、患者群では 0.3±0.1%と圧倒的な低頻度あることを発見。自己反応性ヘルパー T 細胞と Tr の活性化と自己抗体産生の機序は未だ不明である。また、Dsg3 の消失と細胞間接着力減少とが抗 Dsg3mAb でも生じることを証明したが、水疱形成細胞内シグナルが不明。尋常性天疱瘡における Dsg3 遺伝子多型を解析中。②膿疱性乾癬：病因、発症機序不明。今回、包括的健康関連 QOL 尺度 MOS 36-Item SF-36 v2 によって膿疱性乾癬患者群の QOL と臨床的な重症度の関係について89例を解析した結果、紅斑と日常役割機能・精神、粘膜疹と体の痛み、活力、社会生活機能、心の健康さらに、発熱と体の痛み、全体的健康観、社会生活機能の症状と QOL 低下との相関を発見、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中。③表皮水疱症：栄養障害型表皮水疱症のエクソンスキップ誘導による新規遺伝子治療開発中。羊膜付き三次元培養皮膚の有用性に関する研究一部成功。胎生期骨髄移植による外来遺伝子発現皮膚の長期生着の検討中。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、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）の臨床疫学研究一部解析。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、1年で軽症・中等度から悪化する割合は1.8%、5.3%と僅かで、中等度・重症から軽快する割合は47.4%、73.3%と高かった。今後は2～3年間の予後、症状や治療法と予後の関係などを検討する予定。②膿疱性乾癬、19年度に解析予定。③表皮水疱症、H16年度新規（11例）・更新（186例）、計197例を用いて、申請時の性・年齢分布、発症年齢分布、病型、社会生活状況、日常生活、経過、有症状割合を示した。また、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。19年度に解析を行う。3. 診断・治療指針、4疾患ならびに関連疾患の類天疱瘡について、診断治療指針2006を作成した。19年度はEBM-consensus guide lineに改訂する。

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・助教授）

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（埼玉医大・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（秋田大学・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(Dsg1,3)抗体による非常に悲惨な全身性水疱症である。我々は平成17年度までに自己抗体モデル（病原性抗Dsg3モノクローナル抗体）および病原性T細胞株の樹立、抗体結合によるDsg3の消失はあきらかにしたが、抗体発生の原因と水疱形成機序が不明。本年度はこの天疱瘡モデルマウス、病原性T細胞株を用いてリンパ球の病原性決定因子、各種治療薬の効果および抗体を用いて天疱瘡水疱形成(Dsg3消失)機序を解明することを目的とする。さらに我々が開発した抗体価測定法（健保採択）による治療経過を活用した治療指針を作成する。臨床調査個人票データベースを利用し、疫学特性を明らかにする。科学的根拠に基づいた治療法の指針作成と新治療法の開発および患者のQOLを把握することは社会的・医療上の高い貢献度が期待される。

②膿疱性乾癬は発熱と全身の無菌性膿疱症で原因発症機序不明の重症疾患である。

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) 全国的疫学およびQOL調査による実態把握の継続、2) 膿疱性乾癬、乾癬の遺伝子解析と発現異常の解析、3) 病態に関わる表皮細胞増殖・角化異常、炎症と自然免疫の関与の解析、4) 診断・重症度・治療ガイドラインの再評価と、小児・成人例に適した修正ガイドラインの提唱、5) 地域拠点形成による情報普及と患者支援、を目的としている。昨年度GPP患者におけるQOLの解析—94症例が回収でき、指標となる8項目を示した。疫学的調査の倫理審査を受けた。18年度に実行する。とくに4) 5) は社会的貢献が高い。

③表皮水疱症は重症例では全身の水疱と癬痕により合指、四肢の運動制限のため極めてQOLが低い。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) 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。3) 3次元培養皮膚移植治療法を用いて実際に治療し、改良する。4) 難病受給者票を利用し、疫学特性を解析する。17年度までに2) 3) の基礎を確立した。遺伝子導入治療の基礎を確立した。これは他分野へのインパクトも高い。

④水疱型先天性魚鱗癬紅皮症は最も悲惨な魚鱗癬でQOLは劣悪である。1) 病因ケラチン遺伝子の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) 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によって治療法開発の基本的情報を与える。

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は十分な経験が得られないため、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。

⑤ 3. 診断・治療指針の作成：4疾患ならびに関連疾患の類天疱瘡について、診断治療指針2006を作成し、19年度はEBM-consensus guide lineに改訂するための出発点とする。

B. 研究方法

①天疱瘡

1) Dsg3 反応性T細胞クローン株を樹立し、それらの特性および病原性を検討する(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：島田眞路)。

2) 未免疫のDsg3^{-/-} 脾細胞を移植して作製したPVモデルマウスより複数の抗Dsg3 mAbを複数単離し、その詳細について検討する(天谷)。

3) 初診天疱瘡群患者について、統計学的に検討する(橋本隆)。

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のDsg3モノクローナル抗体による活性化と細胞間接着力減少効果を検討し、Dsg3消失機序を解析する(北島、研究協力者：青山裕美)。

5) ELISA法病因抗体価に基づいた新治療指針の開発作成する(天谷、橋本、池田)。

6) 天疱瘡発症関連遺伝子同定(北島、研究協力者：新関寛徳)。

7) 抑制T細胞の関与を検討する(島田)。

8) 厚労省臨床調査個人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)。

②膿疱性乾癬

1) 特定疾患個人票データをもとに診断・重症度基準の見直しを行い、新治療指針を作成する。QOLと重症度、治療法の相関解析をする(岩月、池田、黒沢、研究協力者：小澤)。

2) 汎発性膿疱性乾癬の認定診断基準の鋭敏度・特異度の再検討を行う(岩月)。

3) 乾癬表皮細胞増殖異常について脂質

面から解析する(研究協力者、照井)。

4) 膿疱性乾癬発症機序：S100A8, A9からの解析(許)。

5) 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(小宮根)。

6) 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(研究協力者、小澤)。

③表皮水疱症

E. 遺伝子治療の開発(清水)：栄養障害型表皮水疱症は、常染色体性劣性遺伝を示し、両方のalleleに早期終止コドン変異を有すると、全くVII型コラーゲンの発現が認められず、症状が重篤化する。そこで、この早期終止コドン変異を有するエクソンのスキッピングを誘導し、flameを保たせ、タンパクの翻訳を継続させる新規治療法を開発を検討する。

F. 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)。

G. 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)。

H. 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) 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(山本)。

3) 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(小宮根)。

⑤ 3. 診断・治療指針の作成：4疾患ならびに関連疾患の類天疱瘡について、診断治療指針2006を作成するための作業部会を組織し、個々で原案を作成し、半全体でコンセンサスガイドラインを作成する。これを土台に、19年度はEBM-consensus guide lineに改訂するための方法論を確立する。

C. 研究結果とD. 考察

①天疱瘡

1) 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(天谷): 尋常性天疱瘡(PV)において抗デスマグレイン(Dsg)3抗体の産生にDsg3を認識する自己反応性T細胞の関与が推測されている。昨年度までに自己反応性T細胞のin vivoにおける病原性を評価するシステムを確立し、これを用いたT細胞株の解析から、病原性を規定する因子の同定を目指している。今年度はDsg3^{-/-}マウスからDsg3反応性T細胞株を新たに10株樹立し、計15株(病原性あり5株、なし10株)とした。個々のT細胞株のサイトカイン発現パターン、T細胞受容体V β 遺伝子の発現、T細胞エピトープを解析し統計学的に病原性との関連性を解析した結果、IL-4とIL-10が病原性と関連した(P=0.04)。今後は今回抽出されたIL-4とIL-10に焦点をあてて、PVフェノタイプの誘導におけるサイトカインの役割について検討していく予定である(達成度70%)。

2) 未免疫のDsg3^{-/-}脾細胞を移植して作製したPVモデルマウスより複数の抗Dsg3 mAbを複数単離と解析(天谷)。天疱瘡は自己免疫性の水疱形成疾患でその自己抗原はデスマグレイン3(Dsg3)である。これまでに我々はDsg3^{-/-}をDsg3蛋白で免疫し、その脾細胞を免疫不全マウスに移植する方法で尋常性天疱瘡(PV)モデルマウスを作製した。今回このPVモデルマウスより複数の抗Dsg3モノクローナル抗体(NAKmAb)を単離し、その病原性は抗体の認識するエピトープが重要である事を示した(達成度80%)。

3) 初診天疱瘡群患者について、統計学的な検討(橋本隆)。久留米大学皮膚科における過去11年間の初診天疱瘡群患者55例について、統計学的に検討した。疾患分類としてその内訳は尋常性天疱瘡28例(男性9例、女性19例)、落葉状天疱瘡15例(男性5例、

女性10例)、増殖性天疱瘡2例(女性2例)、紅斑性天疱瘡3例(男性3例)、腫瘍随伴性天疱瘡4例(男性1例、女性3例)、疱疹状天疱瘡3例(女性3例)であった。また各疾患において抗原抗体解析(蛍光抗体法、免疫ブロット法、ELISA法)の特徴と臨床経過(重症度分類、治療法)を示した(達成度80%)。

4) 各種抗Dsg3モノクローナル抗体混合刺激によるケラチノサイトにおけるDsg3分子の減少率と細胞間接着力減少(Dissociation assay)(北島): 4種類の抗Dsg3モノクローナル抗体(AK18, 19, 20, 23 mAbs)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(30分、24時間)後、Dsg3減少活性と細胞間接着力減少活性を測定した。単独では病原性の強さによってDsg3減少が相応して見られたが一定のところではプラトーに達した。しかし、混合では相乗(相加)効果がみられたが、AK20は単独および添加によってほとんど効果を示さなかった。一方、接着力はDsg3の50%減少まではDsg3残量に相応して減少したが、PV-IgGとAK4種混合によってはそれぞれDsg3減少は90%、75%で有意差があったが、細胞間接着力減少(約50%)には差がなかった。他のデスマグソームカドヘリンが代償していると推察された(達成度80%)。

5) 尋常性天疱瘡におけるデスマグレイン3遺伝子多型(研究協力者、新関): 尋常性天疱瘡とデスマグレイン(DSG)3遺伝子多型との関連を検討することを目的とした。昨年度行った全エクソンの塩基配列決定データを基に、日本人患者およびコントロール群における単一塩基多型(SNP)を行い、case-control studyによる相関解析により候補領域同定を試みた。尋常性天疱瘡患者100例および健康人コントロール100例についてDSG3遺伝子多型6か所について1分子蛍光測定法を用いてSNP typingを施行した(達成度100%)。

最初に各 SNP (5'側より SNP001-006) ほどのアレル頻度を患者群、コントロール群で比較したところ、DSG3 遺伝子イントロン 1 付近の 3 つの SNP において P 値が 5%以下 (カイ二乗検定) を示した。次に HaploView (v3.32) を用いてハプロタイプ予測を施行したところ、前述の 3 つの SNP が連鎖不平衡ブロックを形成していた。このブロックについて 5 つの haplotype が予想され、各々の頻度を検討したところ major haplotype の頻度がコントロール群に比べ減少しており、逆に 2 群間で軽度の頻度差のある haplotype を見出した。この haplotype は、英国人、インド人で PV 患者との関連が報告された DSG3 遺伝子 haplotype と同一であることから人種を超えた候補領域と考えられる (達成度 100%)。

6) 抑制 T 細胞の関与を検討する (研究協力者: 島田): 健常群 (n=15) 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=11) 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=4) 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 (達成度 80%)。

7) 厚生労働省臨床調査個人票を用いて疫学班と連携して臨床医学的特性を示す (黒沢)。現在厚生労働省の主導で進められている臨床調査個人票データベースを用いて、天疱瘡患者の予後を把握するための累積データの利用について検討することを目的とした。今回天疱瘡の臨床調査個人票 H13~17 年度全国分の利用申請を行い、電子化データを入手した。各県の入力状況を把握し、予後の分析方法について検討した。厚生労働省の H16 年度都道府県別特定疾患治療研究医療受給証所持者数 (HP) を参照し、天疱瘡の H15、16 年の両年が良好に入力されていると思われる 7 県 (青森県、山形県、栃木

県、富山県、福井県、高知県、長崎県) のデータを抽出した。そして H15 年度新規 H16 年度更新連結データ (19 例)、H15 年度更新 H16 年度更新連結データ (198 例)、計 217 例を分析に用いた。H15 年度の重症度分布は軽症 164 例 (75.6%)、中等度 38 例 (17.5%)、重症 15 例 (6.9%) であった。

1 年間で軽症・中等度から悪化する割合は 1.8%、5.3% と僅かで、中等度・重症から軽快する割合は 47.4%、73.3% と高かった。非継続率は中等度で低く、軽症者と重症者では約 2 割と高かった。天疱瘡の正確な予後を検討するためには受給継続した患者の変化を捉えるだけでなく、非継続の理由 (治癒、死亡等) を確認することが重要である。今後は 2~3 年間の予後、また症状や治療法によって予後が異なるかどうか等、検討する予定である (達成度 80%)。

② 膿疱性乾癬

1) 汎発性膿疱性乾癬患者における QOL と重症度の関係について (岩月、北島、研究協力者: 小澤、松浦、山西、梅沢): 汎発性膿疱性乾癬において、どのような症状が患者の QOL に影響を与えるのかを知ることは重要と考えられる。今回、包括的健康関連 QOL 尺度 MOS 36-Item Short-Form Health Survey version 2 (SF-36 v2) を用いて評価した汎発性膿疱性乾癬患者群の QOL と臨床的な重症度の関係について解析をおこなった。最終的に 89 症例を解析することができた。この結果、調査をした時点での臨床症状と SF-36 v2 の下位尺度に統計的な有意差が認められた。紅斑と日常役割機能・精神、粘膜疹と体の痛み、活力、社会生活機能、心の健康、さらに、発熱と体の痛み、全体的健康観、社会生活機能の間で有意差が認められ、これらの症状と QOL 低下に相関が示唆された。

2) 汎発性膿疱性乾癬の認定診断基準の鋭敏度・特異度の再検討 (岩月): 従来の稀少難治性皮膚疾患調査研究班 (厚生省) の汎発性膿疱性乾癬の診断基準、重症、治

療ガイドライン診断基準それぞれの主症状の感度については、発熱あるいは全身倦怠感等の全身症状を伴う、の項目が感度が低く、結果として、確定診断例の感度も低下した。診断基準として同項目を今後どのように扱うかが課題と思われる（達成度80%）。

皮疹による重症度スコアは、膿疱を伴う紅斑、浮腫性紅斑のそれぞれの体表面積に対する割合は現在の区分でおおよそ中等度の多く分布しており、適切と考えられたが、紅斑の面積に関しては、高度と区分されている群に偏っているため、紅斑の面積に関しては、体表面積に対する割合をより多い場合を高度とする方が適切ではないかと考えられた。

検査所見による重症度スコアは、中等度にもっとも多く分布が示されかつ皮疹による重症度スコアに似た分布を示す検査値はCRPのみであり、他の検査値の重症度とて有用性については明らかにできなかった。CRPに関しては、2005年の新規患者全体についてもほぼ同様の結果をえることができた。今後は、臨床調査個人票データの新規及び更新患者全体について症状及び検査値について解析し、今回の結果の確認及びより有用な検査などにつき検討する必要がある（達成度40%）。

3) 乾癬表皮細胞増殖異常について脂質面から解析する（研究協力者、照井）。尋常性乾癬や膿疱性乾癬の治療に汎用されているステロイドやレチノイド、活性型ビタミンD3は核内レセプターを介して治療効果を発揮する。それらと同じファミリーに属する核内レセプターの一つである liver X receptor (LXR) は脂質代謝に重要な働きをしており、LXR agonist で刺激すると培養表皮角化細胞 (EK) の分化が誘導されることが報告されている。一方、脂質が重要な働きをする皮膚バリア機能が乾癬で異常であること、また、in vitro の実験で、セラミドやその代謝産物が細胞の増殖や apoptosis に関連することも明らかに

されている。本研究の結果、LXR を刺激すると HaCaT 細胞の分化の誘導と共に脂肪酸代謝に関連する酵素の mRNA が亢進することが分かった。また、HaCaT 細胞は SREBP-1c を発現しており、脂肪酸合成酵素の誘導と相関し、一方で、SREBP-2 の発現量はコレステロール合成酵素の発現量に平行した。SREBP の発現は分化と連動していること、その制御により EK の増殖や分化をコントロールできる可能性があること、乾癬の治療標的となり得ることを示唆すると考える（達成度30%）。

4) 膿疱性乾癬発症機序：S100A8, A9 からの解析（許）：S100A8, A9 が乾癬病態に関与していることを示唆する幾つかの事実に基づき、S100A8/A9 タンパク質のヒト正常表皮角化細胞 (NHK) における意義を検討して以下の結果を得た。1. S100A8, A9 は NHK で産生され分泌される。2. S100A8/A9 を NHK に作用させると、乾癬病変部で発現が亢進することが知られているサイトカイン類 (IL-8/CXCL8、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CCL20、IL-1F9、IL-6、SPRRs、TNF α) の発現が誘導された。3. 逆にこれらのサイトカインを NHK に作用させると S100A8, A9 の産生、分泌が増加した。4. S100A8/A9 は 1 ng/ml の低濃度でも NHK の DNA 合成を促進した。以上の結果は、ヒト表皮角化細胞で S100A8/A9 を基軸とする増殖の positive feedback 機構が働いていることを示唆する。S100A8/A9 が好中球で大量に産生・分泌され、同時に自らの chemotactic factor であることを考慮すると、膿疱性乾癬の病態解明にもつながる知見であると考える（達成度100%）。

5) 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（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。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。また、膿疱性乾癬膿疱部表皮では、尋常性乾癬にくらべ、iNOS 発現が強く認められた。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。NO は樹状細胞の分化を誘導し遊走を亢進させることから、表皮内からの樹状細胞の減少に、膿疱部 iNOS 発現とそれに伴う NO 産生が関与している可能性が示唆された（達成度70%）。

6) 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（研究協力者：小澤）：相関の強い16領域のうちの1領域である Candidate Region 1（仮称）について、57個の SNP をマーカーとして遺伝的相関解析を行ったが、有意な頻度差を示す SNP は認められなかった。そこで Clark 法によるハプロタイプ推定を行ったが、有意な頻度差を示すハプロタイプも認められなかった。しかしながら、陽性マイクロサテライトマーカーの相関は強いので、この領域に存在する4つの遺伝子、とくに陽性マイクロサテライトの最も近傍に位置する gene 3（仮称）について解析を行った。この遺伝子は、塩基配列ならびに推定アミノ酸配列より G タンパク連結型受容体のスーパーファミリーの1つと考えられた。また、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析にむけてサンプリングを継続した（達成度20～100%）。

③表皮水疱症

1) 遺伝子治療（清水）：栄養障害型表皮水疱症は重篤な遺伝性皮膚疾患の1つであり、原因遺伝子は VII 型コラーゲン遺伝子であることは既に同定されている。VII

型コラーゲン遺伝子がコードしている VII 型コラーゲンは、表皮と真皮の境界部にあたる基底膜に存在する。そのため、栄養障害型表皮水疱症は、生後まもなくから軽微な外的機械刺激により皮膚に容易に水疱をきたし、びらん、潰瘍を形成する。現在、本症の有効な治療法は見つかっておらず、新しい治療法の開発が期待されている。栄養障害型表皮水疱症は、常染色体性劣性遺伝を示し、両方の allele に早期終止コドン変異を有すると、全く VII 型コラーゲンの発現が認められず、症状が重篤化する。そこで、この早期終止コドン変異を有するエクソンのスキッピングを誘導し、frame を保たせ、タンパクの翻訳を継続させる新規治療法を開発今回、日本人の栄養障害型表皮水疱症患者に多く認められる VII 型コラーゲン遺伝子の 5818delC の変異を有するエクソン70のスキップを誘導させるために、変異を有するエクソンにアンチオリゴヌクレオチド（AONs）を作成、変異を有するエクソンのスキッピングにより、タンパクを発現させるシステムを確立させた（達成度70%）。

2) 胎生期骨髄移植による外来遺伝子発現皮膚の長期生着の検討（金田、研究協力者、玉井）：遺伝性皮膚疾患に対する究極的な治療法は遺伝子治療であるが、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て治療細胞が長期に個体内に保持される必要がある。骨髄移植によりドナー由来細胞に対する免疫寛容が生じることが知られており、治療用遺伝子を導入した自家骨髄細胞移植による免疫寛容誘導の可能性が示唆される。今回我々は、外来性遺伝子（GFP 遺伝子）導入骨髄細胞を胎生期に移植したマウスに GFP 発現皮膚を移植することにより、出生後長期間にわたる皮膚生着に成功した（達成度90%）。

3) マウス胎仔循環系への低侵襲性細胞移植による免疫寛容誘導の試み（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。昨年度我々は、マウス胎仔循環系への低浸襲性細胞移植法を報告したが、この方法により外来性遺伝子 (GFP 遺伝子) 導入骨髄細胞移植を行ったマウスに出生後 GFP 発現皮膚の移植を施行し、長期生着に成功した (達成度90%)。

4) 骨髄細胞移植を利用した栄養障害型先天性表皮水疱症の根治的治療法開発 (金田、研究協力者、玉井)：栄養障害型先天性表皮水疱症の根治的治療を可能にするため、骨髄細胞による表皮再生の可能性を検討した。その結果、骨髄由来表皮細胞が、マウス背部に移植した皮膚において毛包および表皮ケラチノサイトに多数存在することを明らかにした。さらに、これら骨髄由来表皮細胞がVII型コラーゲンを産生し、表皮剥離を抑制することを確認した。これらの結果は、骨髄移植による表皮水疱症の根治的治療の可能性を示すと同時に、自己骨髄細胞への欠損遺伝子導入後、局所あるいは全身的に移植する、骨髄幹細胞遺伝子治療法開発への道を開くと考える (達成度90%)。

5) 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。昨年度形態的に優れた、より正常皮膚に近い新しい三次元培養皮膚として羊膜付き三次元培養皮膚の作製法を開発した。この羊膜付き三次元培養皮膚を獣皮様母斑患者へ臨床応用し、その有用性について検討した。

さらに、劣性栄養障害型表皮水疱症 (RDEB) に対する再生医療法を確立する目的で培養皮膚の改良・開発を行い、昨年度までの研究成果として羊膜付き三次元培養皮膚を開発した。この新たな培養皮膚は基底膜を十分保持し、形態的には正常皮膚に最も近いもので、獣皮様母斑の切除部への臨床応用にて非常に有用であることを示した。そこで、今回我々は RDEB に対する羊膜付き三次元培養皮膚の有用性を検討した。手指の棍棒状癒着と手掌の瘢痕拘縮を解除し、皮膚欠損部に羊膜付き自己三次元皮膚を移植固定した。羊膜付き自己三次元皮膚は良好に生着し、手指の機能は著しく改善し、患者 QOL の向上も得られた。羊膜付き自己三次元皮膚は RDEB に対する再生医療として有用であると思われる (達成度80%)。

6) 厚労省難病受給者票データベースを利用した承認申請と臨床医学的特性 (黒沢)：現在厚労省の主導で進められている臨床調査個人票データベースを用いて、表皮水疱症の臨床疫学特性を把握することを目的とする。今回、表皮水疱症の臨床調査個人票H13~17年度全国分の利用申請を行い、電子化データを入手した。各年の入力率を確認したところ、H16年度データが61.2%と最も高かった。H16年度新規 (11例)・更新 (186例)、計 197 例を用いて、申請時の性・年齢分布、発症年齢分布、病型、社会生活状況、日常生活、経過、有症状割合を示した。年齢分布は男の10—19歳にピーク、女は 1—9 歳と40歳代に次のピークが認められ、二峰性を示した。発症年齢は0歳が81%、1—9 歳が10%であった。10歳代や20歳代以上での発症も僅かに認められ、これらの症例については確認の必要があると思われる。病型は接合部型が15%、栄養障害型が79%、その他5%であった。病型別に臨床症状を確認したところ、「水疱・びらん治癒後の瘢痕」、「爪変形・爪脱落」、「稗粒腫」、「粘膜の水疱・びらん」、

「指（趾）間癒着」、「脱毛」、「食道狭窄」を有する割合は栄養障害型に多く、「掌蹠角化」は接合部型に多かった。歯牙形成不全は両型に30%強認められた。筋ジストロフィーや幽門狭窄の合併症は栄養障害型のみ数%、皮膚悪性腫瘍は両型に数%認められた（達成度100%）。

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）：BCIE はケラチン1またはケラチン10の変異により生じる稀少遺伝性疾患であり、生直後より生じる水疱と全身皮膚の潮紅・落屑を特徴とする。遺伝子変異と臨床症状との相関解析は患者の予後を推測するうえで重要となる。今回は前回の全国調査で臨床情報が得られたが遺伝子検索について返答の無かった12例に加え、遅れて臨床情報の報告があった4例の、計16例について遺伝子情報あるいは遺伝子検索の可能性について調査を行った。その結果遺伝子情報が得られた3例は、比較的典型的な genotype-phenotype 関係を示す症例であった。今後更に本邦症例における情報を集積し、遺伝子治療などのより特異的治療法開発に備えたい（達成度60%）。

2) 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（山本）：(1)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；水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 BCIE は細胞骨格のひとつであるケラチンタンパクの異常による疾患であるが、角質肥厚の病態は不明である。これまで本研究班では BCIE においては層板顆粒の分泌が不十分であること、BCIE の病態、治療法を研究するにあたり、生体に替わって使用可能な実験系として、市販の皮膚モデルのうち MatTek 606X® が正常表皮に近い分化をしていることを確認した。今回はこのモデルを用いて、細胞骨格タンパクである tubulin の重合阻害が層板顆粒の輸送、分泌に及ぼす影響を検討した。各種層板顆

粒分子の局在を蛍光抗体法によって観察したが、どの分子の局在も nocodazol 処理群と対照群では明らかな差を認めなかった。また電顕的にも層板顆粒の形態や分布に差はみられなかった。今回の実験では細胞骨格の異常が層板顆粒の輸送と分泌を直接障害するという結果は得られなかった。層板顆粒の輸送系は、微小管によって輸送される他の細胞内顆粒とは異なるのかもしれない。(2)細胞の扁平化障害と層板顆粒分子の発現と細胞内局在の変化；水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 BCIE は細胞骨格のひとつであるケラチンタンパクの異常による疾患であるが、角質肥厚の病態は不明である。これまで本研究班では BCIE においては層板顆粒の分泌が不十分であることを確認した。今回は層板顆粒分子の細胞内輸送に及ぼす影響を検討した。層板顆粒分子である LEKTI とコルネオデスモシンの局在を免疫組織化学法によって観察した。その結果、BCIE の限局型皮疹および、これと同様に顆粒層での細胞の扁平化が障害されている Verruca vulgaris においてこれらの発現が顆粒細胞で減弱していたり、極性が消失していたりすることがわかった（達成度70%）。

3) 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（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。これまでに我々は、機械的刺激が正常ヒト表皮角化細胞に与える影響について報告してきたが、今回は、正常ヒト表皮角化細胞に正常および変異ケラチン K1 を強制発現させることにより、炎症性サイトカインや細胞成長因子の発現に与える影響について検討した。その結果、変異ケラチン K1 導入により、basic FGF 産生が亢進することが認められ、これが、BCIE におけるマスト細胞の増数、表皮肥厚、血

管増生に關与している可能性が考えられた(達成度70%)。

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「天疱瘡における院での背景の検索」: 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: 今回新たな病原性抗Dsg3モノクローナル抗体(NAKmAAbシリーズ)とDsg3反応性T細胞株を病原性・非病原性10株樹立。さらに、抑T細胞(Tr)が健常群ではCD4⁺T細胞のうち3.0±0.3%、患者群では0.3±0.1%と圧倒的な低頻度あることを発見。自己反応性ヘルパーT細胞とTrの活性化と自己抗体産生の機序は未だ不明である。また、Dsg3の消失と細胞間接着力減少とが抗Dsg3mAbでも生じることを証明したが、水疱形成細胞内シグナルが不明。尋常性天疱瘡におけるDsg3遺伝子多型を解析中。②膿疱性乾癬: 病因、発症機序不明。今回、包括的健康関連QOL尺度MOS 36-Item SF-36 v2によって膿疱性乾癬患者群のQOLと臨床的な重症度の関係について89例を解析した結果、紅斑と日常役割機能・精神、粘膜疹と体の痛み、活力、社会生活機能、心の健康さらに、発熱と体の痛み、全体的健康観、社会生活機能の症状とQOL低下との相関を発見。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中。③表皮水疱症: 栄養障害型表皮水疱症のエクソスキップ誘導による新規遺伝子治療開発中。羊膜付き三次元培養皮膚の有用性に関する研究一部成功。胎生期骨髄移植による外来遺伝子発現皮膚の長期生着の検討中。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、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(BCIE)の臨床疫学研究一部解析。

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、1年で軽症・中等度から悪化する割合は1.8%、5.3%と僅かで、中等度・重症から軽快する割合は47.4%、73.3%と高かった。今後は2~3年間の予後、また症状や治療法によって予後が異なるかどうか等、検討

する予定。②膿疱性乾癬、③表皮水疱症、H16年度新規（11例）・更新（186例）、計197例を用いて、申請時の性・年齢分布、発症年齢分布、病型、社会生活状況、日常生活、経過、有症状割合を示した。また、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。19年度に解析を行う。

3) 診断・治療指針、4 疾患ならびに関連疾患の類天疱瘡について、診断治療指針2006を作成した。19年度はEBM-consensus guide line に改訂する。

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る治療がい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18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

個別報告で記載した。

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) 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、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）2006年11月24日出願、PCT/JP2006/3240489

3) 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

各種抗Dsg3モノクローナル抗体混合刺激によるケラチノサイトにおける
Dsg3分子の減少率と細胞間接着力減少 (Dissociation assay)

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

研究要旨 我々はこれまでに、病原性抗デスモグレイン3マウスモノクローナル抗体 AK23 mAb 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、4種類の抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK18、19、20、23 mAbs) 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 (30分、24時間) 後、免疫ブロット法でプラコグロビン (PG) を内部標準とした時の Dsg3 の減少率を算出したところ、Dsg3 最大減少量は病原活性の強さに比例すること、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することを報告した。さらに、細胞解離測定法 (Cell dissociation assay) 法による測定では、PV-IgG、AK23刺激共に細胞接着力が63%まで減弱することを報告した。今回は、免疫ブロット法による内部標準の妥当性についてβカテニン、αチューブリンと比較検討し、プラコグロビンが最適であることを示した。一方、前回報告したピペッティング細胞解離測定法による測定法により、DJM-1 と正常人角化細胞を用いて、病原性の強い AK23、病原性のある AK19、病原性の極めて弱いかほとんど無い KA18、AK20を用いて、(AK それぞれ単独)、(AK23+AK19、+AK18 or +AK20)、(AK23+AK19+AK18、+AK19+AK20 or +AK18+AK20)、(AK23+AK19+AK18+AK20) の混合と PV-IgG 処理後の細胞間接着力の減少をそれぞれ比較した。その結果、単独では病原性の強さによって Dsg3 減少が相応して見られたが一定のところまでプラトーに達した。しかし、混合では相乗 (相加) 効果がみられたが、AK20は単独および添加によってほとんど効果を示さなかった。一方、接着力は Dsg3 の50%減少までは Dsg3 残量に相応して減少したが、PV-IgG と AK 4種混合によってはそれぞれ Dsg3 減少は90%、75%で有意差があったが、細胞間接着力減少 (約50%) には差がなかった。他のデスモソームカドヘリンが代償していると推察された。

共同研究者

山本ゆかり 岐阜大学大学院医学系研究科
皮膚病態学研究員

青山裕美 岐阜大学大学院医学系研究科
講師

天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科教
授

角田和之 慶応大学医学部皮膚科

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、それに伴った解離⁽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⁽⁴⁾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

A. 研究目的

我々はこれまでに、Dsg3 に対する自己

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⁾。さらに、4 種類の抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK18、19、20、23 mAbs) 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 (30分、24時間) 後、免疫プロット法でプラコグロビン (PG) を内部標準とした時の Dsg3 の減少率を算出したところ、Dsg3 最大減少量は病原活性の強さに比例すること、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することを報告した。また、我々が改良した細胞間接着力測定 (Cell dissociation assay) 法による測定では、PV-IgG、AK23 刺激共に細胞接着力が 63% まで減弱することを報告した。

今回は、免疫プロット法による内部標準の妥当性について β カテニン、 α チュブリンと比較検討すること、かつ、最も病原性の強い AK23 を基準に、これに他の 3 種の AK mAb の 1 種、2 種、3 種添加のすべての組み合わせによる Dsg3 減少率と、接着力の減少との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2. 細胞の培養；

ヒト扁平上皮癌細胞から分離した DJM-1 細胞、および正常人角化細胞を、Eagle's minimum essential medium (MEM), 0.4 ug/ml ハイドロコルチゾン、20ng/ml EGF、84 ng/ml コレラトキシシン、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。

3. 天疱瘡患者 IgG (PV-IgG)

ELISA で抗 Dsg3 抗体陽性、抗 Dsg1 抗体陰性であることを確認した治療前の患者血清から Protein-G-column により精製した IgG を用いた。

3) 抗 Dsg3 モノクローナル抗体の調製と刺激

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、AK20 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 (Invitrogen 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 AK モノクローナル抗体の総濃度が 0.5mg/ml になるように調製した (総抗体濃度 2.0mg/ml)。

本編では、DJM-1 と正常人角化細胞を用いて、病原性の強い AK23、病原性のある AK19、病原性の極めて弱いかほとんど無い KA18、AK20 を用いて、(AK それぞれ単独)、(AK23+AK19、+AK18 or +AK20)、(AK23+AK19+AK18、+AK19+AK20 or +AK18+AK20) (AK23+AK19+AK18+AK20) の混合と PV-IgG 処理によってそれぞれ比較した。なお、AK23 では、0.16 ug/ml から 2.0mg/ml の間の濃度で 24 時間、48 時間刺激いずれにおいても Dsg3 減少率は約 40~50% で平衡状態 (プラトー) に達することは前に報告している⁶⁾。

3) 抗体刺激後 Dsg3 の免疫プロットによる内部標準の決定と半定量

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 1 ml の条件でヒト有棘細胞癌株 DJM-1 細胞に添加し、0 分、30 分、6 時間、24 時間刺激を行った。刺激後、1% Triton X 100 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