

E. 結論

天疱瘡の臨床調査個人票電子化データ平成13～17年度全国分のデータベースを用いて天疱瘡患者の予後の検討が可能かどうか試行した。H15、16年度が良好に輸入されていると思われる7県の217例のデータについて1年間の重症度の変化について検討した。H15年度の重症度の分布は軽症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・中等度から悪化に転ずる割合は1.8%、5.3%と僅かで、中等度・重症から軽快に転ずる割合は47.4%、73.3%と高かった。非継続率は中等度で低く7.9%、軽症者と重症者で約2割と高かった。天疱瘡の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検討する予定である。

文献

- 1) 厚生統計協会：国民衛生の動向. 厚生
生の指標、2003;50(9):148.
- 2) 厚生統計協会：国民衛生の動向. 厚生
生の指標、2004;51(9):153.

3) 厚生統計協会：国民衛生の動向. 厚生
生の指標、2005;52(9):150.

4) 厚生統計協会：国民衛生の動向. 厚生
生の指標、2006;53(9):149.

5) [http://www.dbtk.mhlw.go.jp/toukei/
cgi/sse_kensaku](http://www.dbtk.mhlw.go.jp/toukei/cgi/sse_kensaku)

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表(平成17年度)

1. 論文発表

英語論文

なし

日本語論文

なし

2. 学会発表

黒沢美智子、稲葉裕、永井正規. 天疱瘡
(稀少難治性皮膚疾患)の臨床調査個人票
電子化データの分析、第17回日本疫学会総
会、2007年1月、広島.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を 含む)

全てなし

表1 天疱瘡のH13-17年度全国分臨床調査個人票入力率と各年の受給者数

年度	電子化データ数(入力率)		受給者数
	H17年入手分	H18年入手分	
H13	123(3.6%)	123(3.6%)	3,388 ¹⁾
H14	551(15.8%)	551(15.8%)	3,481 ²⁾
H15	1,899(55.9%) (旧式20)	2,165(63.7%) (旧式20)	3,399 ³⁾
H16	1,907(55.4%)	2,254(64.3%)	3,504 ⁴⁾
H17	—	1,670(45.2%)	3,695

表2 H15年度の重症度別に見たH16年度の予後

H15年度	重症度 人数	H16年度				
		軽快	変化なし	悪化	不明	非継続
軽症	164	—	125(76.2%)	3(1.8%)	5(3.0%)	31(18.9%)
中等度	38	18(47.4%)	15(39.5%)	2(5.3%)	0	3(7.9%)
重症	15	11(73.3%)	1(6.7%)	—	0	3(20.0%)
計	217	29(13.4%)	141(65.0%)	5(2.3%)	5(2.3%)	37(17.1%)

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

分担研究者 氏名 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なった。

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=15）のTrがCD4⁺T細胞のうち3.0±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±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。

D. 考察

これまでの報告に健常群、PV及び落葉状天疱瘡患者症例数を各々追加して解析を行ったが、前回までの報告と同様にPV患者末梢血に存在する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（図1、2）。

また本年度は新たに、Trに特異的に発現するFOXP3分子に関する解析を行ったが、患者群におけるCD4⁺ CD25⁺T細胞分画中のFOXP3陽性細胞の割合は健常群の

それと比較して圧倒的に低く (図3)、これまでの結果を裏付けることができた。

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細胞の数的な現象が病的ヘルパー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18年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A et al. CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. Dermatology: in press

2. 学会発表

1. 尋常性天疱瘡患者における末梢血CD4⁺ CD25^{high} 制御性T細胞の解析 (梶山秀昭、松江弘之、長阪晶子、中村悠美、塚本克彦、柴垣直孝、川村龍吉、北村玲子、安藤典子、島田眞路) 第54回日本皮膚科学会山梨地方会、2006年4月8日
2. 乾癬及び天疱瘡におけるCD4⁺ CD25^{high} 制御性T細胞の解析 (梶山秀昭、松江弘之、柴垣直孝、川村龍吉、島田眞路) 第56回日本皮膚科学会山梨地方会、2006年11月18日

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

10. 特許取得

なし

11. 実用新案登録

なし

12. その他

なし

図とその説明

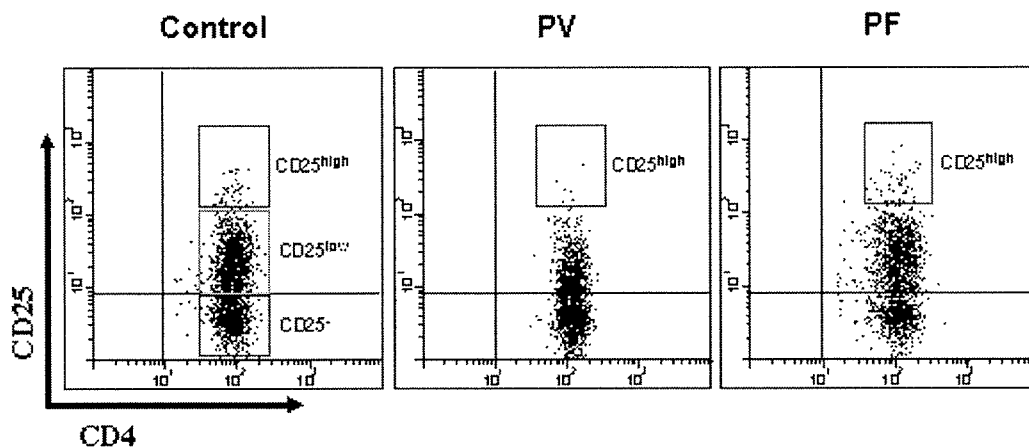


図1 健常者 (Control)、尋常性天疱瘡患者 (PV)、落葉状天疱瘡患者 (PF) 各々の末梢血における CD4⁺CD25^{high} 制御性 T 細胞。フローサイトメトリーを用いた全 CD4⁺T 細胞中の CD25^{high}、CD25^{low} and CD25⁻ 細胞の様子を示す。各パネルは対照群、各疾患群における代表例。

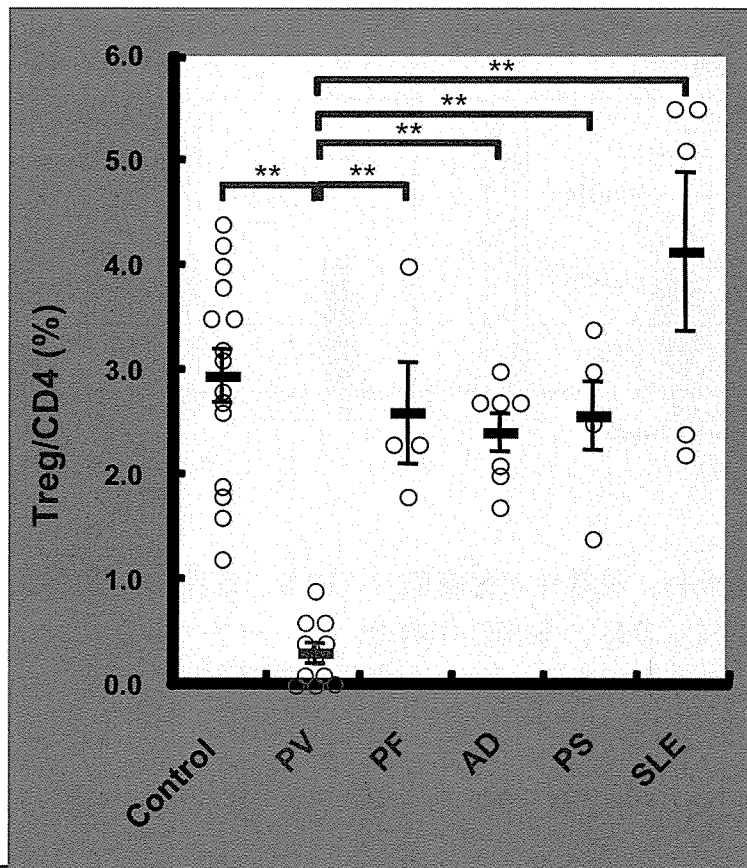


図2 尋常性天疱瘡と対照群および疾患対照群における末梢血 CD4⁺ T 細胞中の CD4⁺ CD25^{high} 制御性 T 細胞の割合の比較。フローサイトメトリーによる健常群 (Control; n=15)、尋常性天疱瘡 (PV; n=11)、落葉状天疱瘡 (PF; n=4)、アトピー性皮膚炎 (AD; n=7)、尋常性乾癬 (PS; n=4)、SLE (n=5) 各患者における CD4⁺ CD25^{high}/CD4⁺ 比を示す (**P<0.05)。

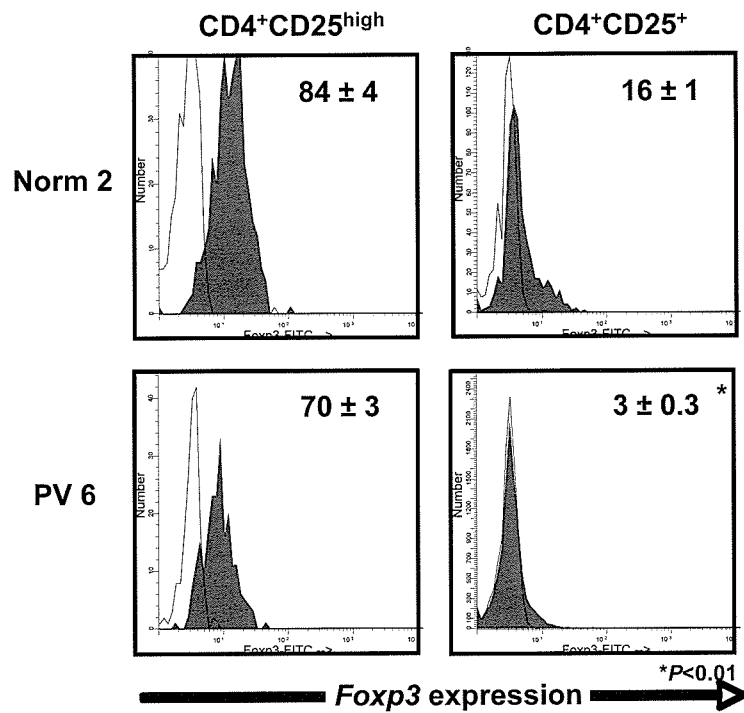


図3 尋常性天疱瘡と対照群における末梢血 CD4⁺CD25^{high} および CD4⁺CD25⁺T 細胞中に占める FOXP3 陽性細胞の割合の比較。フローサイトメトリーによる健常群と疾患群の解析の結果、CD4⁺CD25^{high} 制御性 T 細胞分画中の FOXP3 の陽性細胞の割合に統計学的差異は認めないが、CD4⁺CD25^{high} T 細胞分画中では有意な差が認められた (*P < 0.01)。各パネル右肩に FOXP3 陽性細胞の各分画に占める割合を示す (mean ± SD; 健常群、疾患群とも n = 3)。図は健常群 (Norm2)、疾患群 (PV 6) の代表例。

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

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）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例および健常人コントロール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。患者群100例は国内8施設より提供された。

最初に各SNP（5'側よりSNP001-006）ごと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。

共同研究者	富山大学医学部皮膚科教授
浅田 秀夫	橋本 隆
奈良県立医科大学皮膚科学助教授	久留米大学医学部皮膚科教授
宮川 幸子	池田 志孝
奈良県立医科大学皮膚科学教授	順天堂大学医学部皮膚科教授
青山 裕美	高橋 勇人
岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座	慶應義塾大学医学部皮膚科
皮膚病態学講師	天谷 雅行
市來 善郎	慶應義塾大学医学部皮膚科教授
岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座	桑名 正隆
皮膚病態学助教授	慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師
北島 康雄	白方 裕司
岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座	愛媛大学医学部皮膚科学
皮膚病態学教授	橋本 公二
清水 宏	愛媛大学医学部皮膚科学教授
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野	山本哲也
教授	岡山大学大学院医歯学総合研究科皮膚粘膜
清水 忠道	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) 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。

B. 研究方法

1. 患者および対照群検体

今回対象とした尋常性天疱瘡患者は、昨年度塩基配列決定した 8 名に 92 名を加え、100 名とした。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患者である。検体提供は奈良県立医科大学、北海道大学、順天堂大学、慶應義塾大学、岐阜大学、岡山大

学、愛媛大学、久留米大学 (順不同) の 8 施設の各皮膚科にて収集された。患者の平均年齢 (採血時) は、54.8 歳、女性は 61 例であった。健常人コントロール 100 例は東海大分子生命科学 (猪子英俊教授) より供与された。(採血時) 平均年齢は 39.7 歳、女性は 44 例であった。

2. DNA 抽出および遺伝子多型の検出

昨年度同様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。得られた DNA の吸光度を測定し、10-20ng/ml の濃度に調整した。

DSG3 遺伝子多型は、Bannai ら¹⁾ による 1 分子蛍光分析法 (SSP 法) を一部改変して用いた。第一ステップとして、1st primer 2 本で目的の SNP を含む範囲を PCR (増幅) した (プライマーリストは投稿準備中のため省略)。第二ステップとして、上記増幅した PCR 産物と 2 種の蛍光物質付いたアレル特異的 SSP primer のみで PCR を行った。1st step の PCR 産物は 2nd step のアレル特異的 primer とのみ hybridize して塩基の伸張が行われるため (但し、従来の PCR のように倍々で増幅はしない)、増幅した PCR 産物に結合した primer についた蛍光物質を発光させ、2 種の発光強度の比率を測定することにより増幅された塩基数を推定することによりアレルのホモ、ヘテロの判定を行った。

1 昨年度報告した通り患者群、コントロール群とも HLA-DRB1 遺伝子のタイピングは PCR-SSOP-Luminex 法により行った²⁾。

3. 統計処理

2 群間の頻度の比較には 2x2 表を用いた Chi-square test または Fisher の直接法を用いて P 値 5% 以下を有意差ありとした。ハプロタイプ予測には Haploview³⁾ および fastPhase⁴⁾ を用いた。補正 P 値には

Haploview (v3.32) の association test における Permutation P value (10000 permutation) を用いた³⁾。

C. 研究結果

今回我々が検索に選んだ6つの DSG3 SNP は5つまでが、Caponら⁵⁾により尋常性天疱瘡との関連が報告されている SNP であり、この5つに今回初めて exon 11 のアミノ酸置換のある SNP を加えた。他の5つはすべて non-coding である。

表1に今回の検体200例を用いた連鎖解析の結果を示す。統計値 $D > 0.9$ を示すのは5'側より3つの SNP であり、Haploviewにより連鎖不平衡ブロックであることが予測された。各々の SNP について case-control study により2群間の頻度差を求めたところ、この3つの SNP (rs8085532, rs3944655, rs3848485) において患者群のアレル頻度が上昇していた(表2)。P値が最も低い SNP 近傍に候補領域が存在することが示唆された。

次に、この3つの SNP よりなるハプロタイプを Haploview に予測させたところ5つのハプロタイプが予測され、各々の頻度を2群間で比較したところ、major haplotype である CTT の頻度が患者群で減少しており、TCC の頻度が上昇していた。以上より個々の SNP 頻度の比較と同様に、5'側の3つの SNP からなる領域に感受性領域が存在することが示唆された。

最後に既に報告⁵⁾のある英国人、インド人における5つの DSG3 遺伝子領域内の SNP からなるハプロタイプ頻度を日本人のデータと比較した。日本人データを基に Phase program によりハプロタイプ予測を行ったところ10種のハプロタイプが予測された。そのうちの1つのハプロタイプ TCCTT において患者、コントロール2群間で頻度差を得た。表4に英国人、インド人、日本人で2群間に差が認められたハプロタイプを比較した。英国人では TCCTC、

インド人では TCCCC、日本人では TCCTT において患者、コントロールの2群間で頻度差があることを示す。3つの人種間で頻度差のある共通のハプロタイプは見出せなかったが、3種のハプロタイプは共通して最初の3つの SNP が TCC であり、日本人においては TCC ハプロタイプ自体に2群間で頻度差があることから、人種を超えてこの領域に疾患感受性領域が存在することが示唆された。

D. 考察

今回選択した6つの SNP は、DSG3 遺伝子全域にまたがるとはいえ、最初の3つはエクソン1よりイントロン1にかけての DSG3 分子先端部分であり、残りの3つはエクソン11より細胞内ドメインにあたるエクソン16という末端の部分であり、遺伝子領域に均等に配置したとはいえないが、過去のデータと同一の SNP を用いたことにより人種間の比較をすることが可能であった。人種間で共通の SNP が疾患と関連していることが示唆されたことより、この領域に疾患感受性がある可能性が高いと考えられる。この領域はエクソン1よりイントロン1にまたがる8キロベースもの領域であるが、今後この領域内の tag SNP を用いて詳細に相関解析を行うことにより、候補領域をさらに狭小化できると考えられる。この領域が発症に関わる機能的意義については仮説の域をでないが、2つの可能性が考えられる。1) イントロン1付近のエクソン(おそらくエクソン2)に未知のアミノ酸置換を伴う SNP が存在し、SNP に生じるアミノ酸配列を含むペプチド断片が特定の HLA と結合することにより自己反応性 T 細胞を活性化することを介して自己抗体産生を促進する。2) イントロン1付近に転写調節領域が存在し、感受性 SNP により DSG3 遺伝子の転写量に影響を及ぼす。特定の臓器、細胞での不十分な自己抗原発現量が clonal deletion を介した自己

反応性T、Bリンパ球の除去に障害を及ぼし、自己抗原反応性クローンが残存する。あるいは調節性T細胞の減少を来たす。

まず1)については preliminary data であるが、前半の3つのSNPについてはこの仮説を裏付ける HLA-DRB1 アレルは存在しなかった。ところが後半3つのSNPの存在と相関を示す HLA-DRB1 アレルが存在することが明らかになった。症例数が不十分なため、統計値が低いが、4番目のSNPがアミノ酸置換を伴うため、機能的意義が十分考えられる候補領域である。

最後に2)の仮説は既に1型糖尿病においてある程度証明されている仮説であり⁶⁾⁻⁹⁾、今後候補領域を狭小化することにより、転写調節が可能な配列を有するかどうかを検討可能である。10キロベース程度の範囲であるので、1キロベースに1か所のSNPを検索しても100か所程度である。さらに tag SNP をうまく活用すれば効率よく検索できると期待され、来年度の課題としたい。

E. 結論

尋常性天疱瘡患者において DSG3 遺伝子多型を検討し、疾患感受性領域を見出した。今後さらに領域を狭小化し、病因的意義が明らかになることが期待される。

<引用文献、URL>

- 1) Bannai M, Higuchi K, Akasaka T, Furukawa M, Yamaoka M, Sato K, Tokunaga K: Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole-genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy. **Anal Biochem** 327:215-21, 2004
- 2) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, Azuma F, Itakura M, Kashiwase K, Kikkawa E, Kulski JK, Satake M, Inoko H: High-throughput

DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. **Immunogenetics** 57:717-29, 2005

- 3) <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>
- 4) <http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>
- 5) 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
- 6) Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI: Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. **Nat Genet** 4:305-10, 1993
- 7) 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
- 8) Jaeckel E, Lipes MA, von Boehmer H. Recessive tolerance to preproinsulin 2 reduces but does not abolish type 1 diabetes. **Nat Immunol** 5:1028-35, 2004

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表（平成18年度）

1. 論文発表

英語論文

1. Sawamura D, Niizeki H, Miyagawa S, Shinkuma S, Shimizu H. A novel indel *COL7A1* mutation 8068del17insGA causes dominant dystrophic epidermolysis bullosa. **Br J Dermatol** 154 (5):995-997, 2006
2. 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** 126 (7):1518-23, 2006

日本語論文

新関寛徳、横山真紀、橋口一弘 掌蹠膿疱症、扁桃病巣感染、特集 ここまでわか

った遺伝子異常、**JOHNS** 22 (12):1753-6, 2006

2. 学会発表

1. 中野さち子、牧之段恵里、新関寛徳、桑原理充、浅田秀夫、宮川幸子、安原肇、高橋幸博、秋山真志、清水宏：道化師様魚鱗癬の1例、第105回日本皮膚科学会総会、京都市、2006.05
2. 白山純実、福本隆也、小林信彦、新関寛徳、浅田秀夫、宮川幸子、石井文人、橋本 隆：紅皮症を呈した腫瘍随伴性天疱瘡、第28回水疱症研究会、久留米市、2006.11

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

13. 特許取得
なし
14. 実用新案登録
なし
15. その他
なし

DSG3 SNP SNP001-003	Haplotype frequencies		P value
	PV	Control	
CTT	149 (0.745)	172 (0.86)	0.0039*
CTC	1 (0.005)	0 (0.000)	ns**
CCT	1 (0.005)	0 (0.000)	ns
CCC	9 (0.045)	4 (0.020)	ns
TCC	40 (0.200)	24 (0.120)	0.0291
Total	200 (1.000)	200 (1.000)	

表3 尋常性天疱瘡患者 (PV)、コントロールにおける DSG3 ハプロタイプ頻度
gray box に P 値が 5 %以下のハプロタイプを示す。ハプロタイプ (rs8085532, rs3944655, rs3848485) は Haploview にて予測した。括弧内に頻度を示す。*Permutation P value =0.0145, **not significant

	No. of the observed	Haplotype frequencies		
		TCCTC	TCCCC	TGCTT
British controls	308	1 (0.003)	10 (0.03)	45 (0.15)
British PV	124	6 (0.05)*	1 (0.02)	26 (0.21)
Indian controls	196	ND**	12 (0.06)	50 (0.25)
Indian PV	56	ND	11 (0.20)***	10 (0.18)
日本人 controls	200	0	10 (0.05)	14 (0.07)
日本人 PV	200	0	11 (0.055)	29 (0.145)#

表4 3人種 (英国人、インド人、日本人) の尋常性天疱瘡患者 (PV)、コントロールに
おける5つのSNPからなるハプロタイプ頻度

rs16961975を除く5つのSNPからなるハプロタイプ頻度について比較した。括弧内に頻度を示す。英国人、インド人のデータは Capon ら (文献5) による。p=0.002 (Fisher), **Not described, ***p=0.002 (Chi-square=9.54), #p=0.0098 (Chi-square=6.66)

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

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機構の検討

研究協力者 青山裕美 岐阜大学医学部皮膚病態学講師

研究要旨 本研究では、天疱瘡患者皮膚で生じている抗 Dsg3 抗体由来シグナル伝達系の解析をすることが目的である。さまざまな病原性をもつ抗 Dsg3 mAb 4 種を用いて、Dsg3 結合後に生じる Dsg3 と p120-catenin (p120-ctn) の結合性と Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化反応を解析した。4 種類の AkmAb は、すべて Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化を亢進したが、リン酸化を受けた Dsg3 結合型 p120-ctn の分子量が各抗体間で異なっていた。もっともチロシンリン酸化を誘導した AK18 による Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化は PP1 によって阻害された。Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化の程度と抗体の結合した Dsg3 の分解速度には明確な差を検出できていない。抗 Dsg3 抗体が Dsg3 に結合後に誘導される新しいシグナル伝達系を見いだした。

共同研究者

北島康雄

岐阜大学医学部皮膚病態学・教授

河崎優希

岐阜大学医学部皮膚科

A. 研究目的

さまざまな病原性をもつ抗 Dsg3 mAb 4 種を用いて、Dsg3 結合後に生じる細胞内シグナル伝達機構の検討をした。本研究では、Dsg3 と p120-catenin (p120-ctn) の結合性と Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化反応を解析した。

B. 研究方法

a) Dsg3 と p120-ctn の結合性と Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化の検討

ヒト有棘細胞癌細胞株 (DJM-1細胞) の培養上清に Dsg3 mAb 4 種を添加培養し、10分後細胞を回収し、RIPA buffer で可溶化した。抗 Dsg3 抗体のみを持つ天疱瘡患者抗体で Dsg3 とその関連蛋白質を免疫沈降した。免疫沈降物をウェスタンブ

ロットィングして、免疫沈降物中に含まれる Dsg3、p120-ctn の量と、Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化をリン酸化チロシン抗体とリン酸化型 p120-ctn 特異抗体を用いて検討した。

b) Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化に対するチロシンキナーゼ阻害剤の作用

チロシンキナーゼと Src 阻害剤である Genestein と PP1 を培養液中に添加し30分作用させた後、Dsg3 mAb AK18で刺激し、a)に記載した実験法で Dsg3 結合型 p120-ctnのリン酸化を検討した。

c) 膜表面に発現している Dsg3 の分解速度の検討

DJM-1 細胞をビオチンでラベルし、Dsg3 mAb (AK23、AK18) を添加培養10分後 RIPA buffer で可溶化しストレプトアビジン抗体ビーズで免疫沈降し、免疫沈降物中の Dsg3 の量を検討する。

C. 研究結果

a) Dsg3 と p120-ctn の結合性と Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化の検討

1) カルシウム濃度1.8mM 培地で DJM-1 細胞をサブコンフレントで培養したこの条件では、デスモソーム結合があり分解と産生が起きている。未刺激状態では Dsg3 は p120-ctn と結合している。

PV-IgG は Dsg3 と p120-ctn の結合を低下させた。未刺激時に、Dsg3 に結合していた p120-ctn は 90kD 一種類で、チロシンリン酸化は受けていない。AK23 と AK18 は 90kD の p120-ctn がチロシン化された。一方で、AK20 では 90kD と 100kD、AK18 では 90kD が消失し 100kD と 110kD がチロシンリン酸化されている。

抗 Dsg3 mAb 4 種は刺激後10分で Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化をさまざまな程度に誘導した。抗 Dsg3 mAb の病原性は強い順に AK23、19、18、20 であるが、病原性の強い23、19に対して病原性の低い18、20は Dsg3 に結合する p120-ctn の量が多く、リン酸化していることがわかった。(図1)

2) 抗 Dsg3 mAb 4 種の刺激後に誘導される Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化サイトの検討結果

リン酸化型 p120-ctn 特異抗体 (96, 228, 280) を用いて Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化部位を検討した。それぞれの AkmAb によってリン酸化された Dsg3 結合型 p120-ctn は 100kD、110kD はどちらも96番目のリン酸化チロシン残基を有するアイソフォーム 1 か 2 である。P120-ctn のアイソフォーム特異抗体がないので、1 か 2 かの確定はできない。4 種類の抗 Dsg3 mAb によってリン酸化された 90kD、100kDa、110kDa の Dsg3- 結合型 p120-ctn は、96、228、280番目のチロシン残基を同様にリン酸化されていた。すなわち抗体間にリン酸化部位の違いはなかった。サイズの違う Dsg3- 結合型 p120-ctn が検出された理由は、1) 今回確認したリン酸化部位以外のリン酸化サイトがリン酸化を受けて移動度が変わったか、2) 異なるアイ

ソフォームが結合している可能性があるが、今後検討をする必要がある。

b) Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化に対するチロシンキナーゼ阻害剤の作用

Genestein (チロシンキナーゼ阻害剤) と PP1 (Srcキナーゼ阻害剤) は 10 μ M で Dsg3 結合型 p120-ctn を阻害した (図3)。

c) 膜表面に発現している Dsg3 の分解速度の検討

Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化を弱く誘導した AK23 と強く誘導した AK18 で、ビオチンラベルした Dsg3 の消失の早さに差があるかどうか、検討した。

AK23 のほうが早く消失するが、AK18 でも24時間後には同様に消失した (図4)。

D. 考察

これまでに、天疱瘡抗体による細胞内シグナル伝達機構の解析を行ってきたが、その過程で、天疱瘡患者由来の IgG には、抗 Dsg3 抗体以外の抗原に結合する抗体も含まれているため、刺激後に生じたシグナル伝達系の評価には、抗 Dsg3 抗体由来のシグナル系か、その他の抗体由来のシグナルなのかを区別する必要があった。本研究では、天疱瘡患者皮膚で生じている抗 Dsg3 抗体由来シグナル伝達系の解析をすることが目的である。

異なる病原性と異なるエピトープを持つ 4 種類の AkmAb は、すべて Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化を亢進した。病原性のある抗 Dsg3 抗体である AK23 で生じているので、この反応は抗体が抗原に刺激後に生じていることは確実である。また Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化は、PVIgG で刺激をしたときには、見られなかった。この違いを説明する理由として① PV-IgG による刺激でも早い段階で Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化が生じている可能性がある。② PV-IgG では、抗 Dsg3 抗体以外の抗体によって異なる反応が生じているため違っ

た結果になっている可能性がある。といったことが考えられる。この疑問を解決するために PV-IgG による Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化を経時的に観察する必要がある。

4 種類の AkmAb によって生じた Dsg3 結合型 p120-ctn のチロシンリン酸化はどの抗体でも 96, 228, 280 番目のチロシン残基がリン酸化していることがわかった。検出された Dsg3 結合型 p120-ctn の分子量が異なる理由は①リン酸化されるチロシン残基の数が異なり移動度が変わる②リン酸化を受けるアイソフォームの違いなどが挙げられる。このチロシンリン酸化の意義を含めて今後検討を要する。

また AK18 による 100kD, 110kD の p120-ctn のリン酸化は Src kinase 阻害剤で阻害されたので、抗 Dsg3 抗体による p120-ctn のリン酸化にはこれらの阻害剤で阻害されるキナーゼが関与していることが予測される。これを補助する実験として活性化されるキナーゼを Src キナーゼを含めて検討したが、明らかな活性化を検出することができなかった。

今後、AkmAb で活性化されるキナーゼを同定する必要がある。(Fyn, Lyn など) 90kD の p120-ctn をリン酸化した AK23 と 100kD と 110kD の p120-ctn をリン酸化した AK18 で明らかな Dsg3 の分解速度に違いがあるか確認した。どちらの抗体も 24 時間経過すれば Dsg3 が同様に分解しているので長期的には、差はなかったが、分解度に差を見ることが予測される 30 分から 1 時間の実験結果についてさらに繰り返し検討が必要である。

E. 結論

これまでの研究成果より抗 Dsg3 抗体が Dsg3 に結合後に Dsg3 に結合する p120-ctn のチロシン残基をリン酸化するキナーゼ反応を活性化することがわかった。今後、これらのリン酸化反応と水疱形成との関連

性を確実に証明し、水疱形成を阻害する方法を見いだす予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Kawasaki Y, Aoyama Y, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. *Autoimmunity* 2006;39(7):587-90.

日本語論文

特になし

2. 学会発表

1. 河崎優希、青山裕美、角田和之、北島康雄：抗デスモグレイン3モノクローナル抗体による Dsg3 結合型 p120-ctn のリン酸化と結合性の検討、第31回日本皮膚科学会総会
2. Kawasaki Y, Aoyama Y, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Different anti-desmoglein3 monoclonal antibodies exert epitope-specific regulation of p120-catenin binding to desmoglein3 in human squamous cell line, DJM-1 cell. Annual Meeting of the society for Investigative Dermatology.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

16. 特許取得

特になし

17. 実用新案登録

特になし

18. その他

特になし

図とその説明

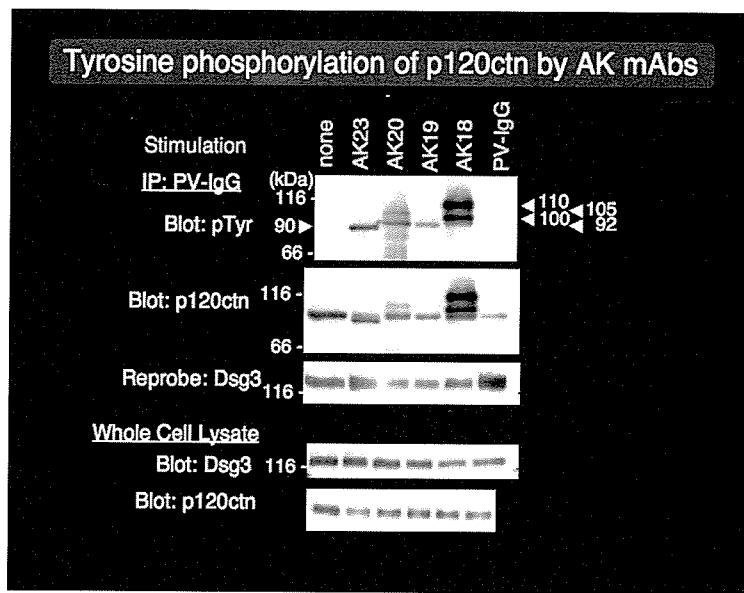


図1 天疱瘡 IgG, Dsg3mAb 4 種類で刺激後10分の Dsg3 結合性 p120-ctn とそのチロシンリン酸化

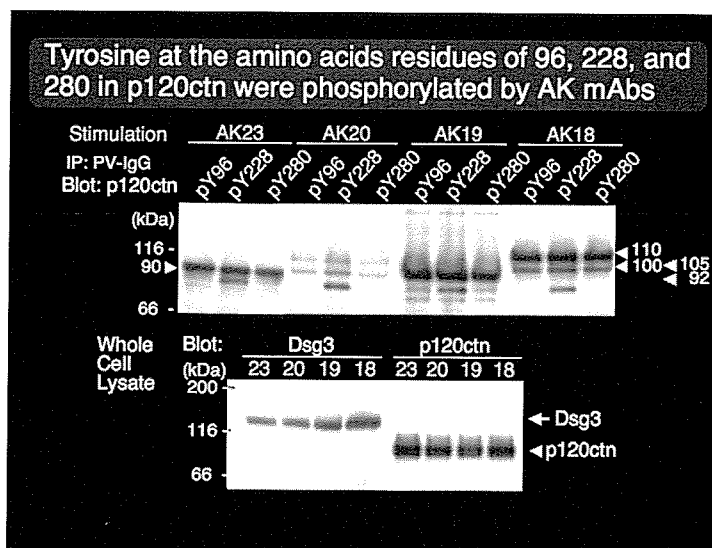


図2 Dsg3mAb 4 種類で刺激後10分の Dsg3 結合性 p120-ctn のリン酸化部位の検討

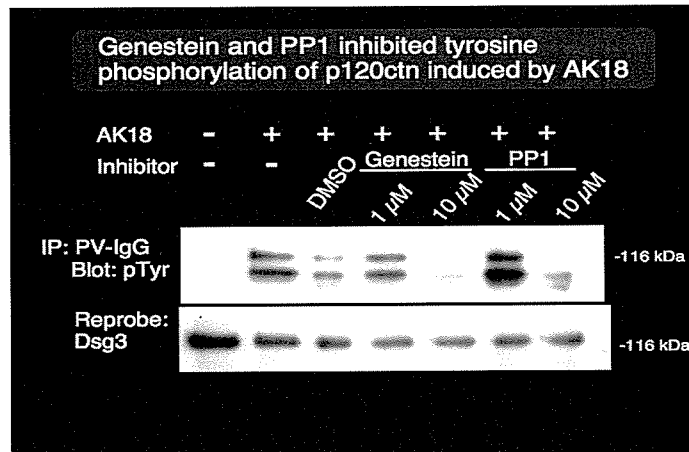


図3 チロシンキナーゼ阻害剤による Dsg3 結合性 p120-ctn のリン酸化の阻害

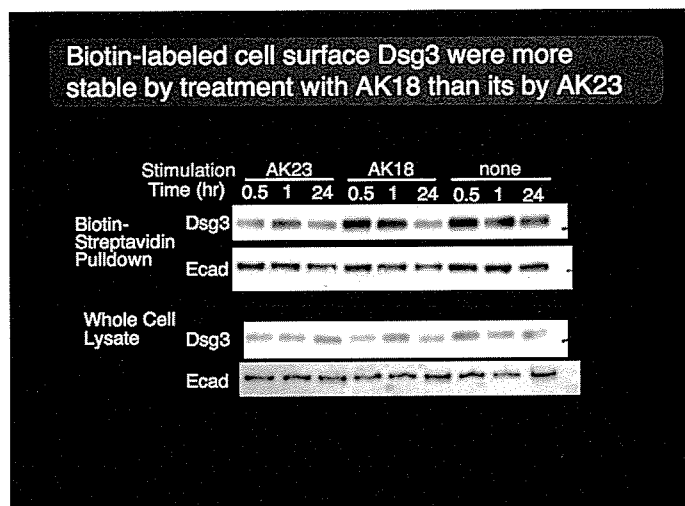


図4 AK23 と AK18 刺激後の膜に発現していた Dsg3 の量の変化

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
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

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 稀少難治性皮膚疾患調査研究班（厚労省）において、汎発性膿疱性乾癬の診断基準、重症、治療ガイドラインが発表されているが、十分に活用されているとは言えない。また、診断に必要なとされている検査項目に未実施が多く、検査異常値の鋭敏度が低い。より有用な診断基準を検討する必要があると考えられた。前回の班会議では、協力していただいた5施設の汎発性膿疱性乾癬の特定疾患申請の個人票からのデータをもとに、主要症候や検査異常について、鋭敏度、特異度、尤度比を算定した。今回は、前回の検討に引き続き、疑い例の項を診断基準に加えると同時に、重症度スコアに血清アルブミン値を加えて再検討した。

共同研究者
小澤 明
東海大学医学部医学科専門診療学系
（皮膚科学）
松浦浩徳
川崎医科大学皮膚科
梅澤慶紀
東海大学医学部医学科専門診療学系
（皮膚科学）
馬淵智生
東海大学医学部医学科専門診療学系
（皮膚科学）
小宮根真弓
東京大学医学部附属病院皮膚科
照井 正
日本大学医学部皮膚科
中西 元
岡山大学医学部・歯学部附属病院皮膚科

A. 研究目的

汎発性膿疱性乾癬（GPP）は急激な発熱とともに全身の皮膚が潮紅し、無菌性膿疱が多発する稀な疾患である¹⁾。これまでGPPでは、その臨床的特徴、重症度の評価、治療法とその効果の調査を目的に全国疫学調査が実施されてきた。この調査結果

は、汎発性膿疱性乾癬治療ガイドライン²⁾として実を結んでいる。しかしながら、臨床上重症度に必要な検査項目などについて統計的に詳細に検討されているわけではなく、未だ十分にガイドラインが活用されているとは言い難い。より臨床に活用されやすい重症度分類、また、より適切なガイドラインを検討するために、主要症候や検査異常について再検討した。

B. 研究方法

第3回全国調査（北島班）のデータベース及び厚生労働省特定疾患治療研究事業における膿疱性乾癬、臨床調査個人票データをもとに、主要症候や検査異常について、それらの分布、鋭敏度、特異度、尤度比を算定した。

C. 研究結果

今回協力して頂いた5施設からのデータからは汎発性膿疱性乾癬の成人型に関しては41症例集まったが、小児に関しては3例のみであった。そのため、汎発性膿疱性乾癬の小児型に関しては、今回は診断基準の主症状及び重症度スコアの分布、敏感度、感度などを解析することはできなかった。