

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成20(2008)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]	
	尋常性天疱瘡はデスモソームリモデリング病という視点からの水疱形成機序の解明	13
	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	
	天疱瘡における Th17 細胞の免疫組織化学的評価	22
	分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
	寛解期に抗 Dsg3 IgG 自己抗体価が高値であった尋常性天疱瘡患者血清の抗原抗体解析	30
	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	36
	分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授	
	天疱瘡の予後調査：順天堂大学症例の検討	48
	分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授	
	H17年度天疱瘡新規受給者の治療状況—臨床調査個人票データを用いて	55
	分担研究者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 准教授	
	天疱瘡患者の遺伝的背景 第 5 報 日本人天疱瘡患者 195 名の HLA-DRB1 遺伝子タイピング	61
	研究協力者 新関寛徳 奈良県立医科大学皮膚科 准教授	
	病原性抗デスモグレイン 3 モノクロナル抗体によるデスモグレインの分解の検討	70
	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]	
	膿疱性乾癬における血清 S100A8/A9 蛋白のバイオマーカーとしての役割	75
	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	79
	分担研究者 許 南浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学 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	83
	分担研究者 小宮根真弓 自治医科大学皮膚科 准教授	
	膿疱性乾癬の臨床疫学像—臨床調査個人票データを用いて—	88
	分担研究者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 准教授	
	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—脂質代謝に関する解析—	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]

表皮水疱症原因遺伝子ヒト7型コラーゲントランスジェニックマウス作製	106
-----------------------------------	-----

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簡易作製法の開発	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

簡易作製羊膜付き三次元培養皮膚の有用性に関する研究	124
---------------------------	-----

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

表皮水疱症に対する遺伝子治療法の開発	128
--------------------	-----

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

表皮水疱症に対する細胞療法の可能性の検討	131
----------------------	-----

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

骨髄細胞による表皮形成機序解明と表皮水疱症治療への応用	133
-----------------------------	-----

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 准教授

[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における皮疹形成機序と治療に関する研究	137
----------------------------------	-----

分担研究者 小宮根真弓 自治医科大学皮膚科 准教授

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (BCIE) の臨床疫学研究 —追加疫学調査で得られた症例を含めて—	144
---	-----

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過角化機構の解析。Rab11 と層板顆粒の関係	148
--	-----

分担研究者 山本明美 旭川医科大学皮膚科 准教授

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、層板顆粒の輸送異常による角質肥厚	154
--	-----

分担研究者 山本明美 旭川医科大学皮膚科 准教授

角化異常症モデル細胞シグナル伝達に関する研究	159
------------------------	-----

研究協力者 米田耕造 香川大学医学部皮膚科学講座病院 准教授

IV 研究成果の刊行に関する一覧表	167
-------------------	-----

V 平成19年度総会プログラム

平成19年度第1回総会プログラム	191
------------------	-----

平成19年度第2回総会プログラム	195
------------------	-----

[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	自治医科大学皮膚科	准教授	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	准教授	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	准教授	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 新関 寛徳	奈良県立医科大学皮膚科学	准教授	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	准教授	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]

總括研究報告

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、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説明、よって重症度判定、治療法、治療指針の改良と開発および診療ガイドラインの策定を研究目標とする。これは平成17年度からの3年計画の3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 Dsg3 反応性T細胞株を作り、各T細胞株の特性（T細胞エピトープ、T細胞受容体遺伝子、発現サイトカイン、ホーミング能）を検討した結果、IL-4 および IL-10 のみに病原性との関連性をみとめた（ $P=0.04$ ）。IL-4 を標的とする治療法の可能性を示した。尋常性天疱瘡は落葉状天疱瘡に比べ IL-17 産生リンパ球を高率に認めた。天疱瘡の病勢のモニタリングには、臨床症状、蛍光抗体間接法の抗体価、Dsg ELISA index 値が有用であることを示した。天疱瘡抗体による Dsg3 の消失と細胞間接着力減少の感受性はデスモソームリモデリング時が顕著であること、この Dsg3 の減少は Src 依存性に細胞外ドメインの分解によることを示した。尋常性天疱瘡患者の 37.7% が「治療」の状態にあった。②膿疱性乾癬：病因、発症機序不明。今回、血清中 S100A8/A9 濃度は尋常性乾癬で健常人より高値を示し、血清 S100A8/A9 値は白血球数、好中球数と正の相関し、膿疱性乾癬の病勢のバイオマーカーであることを示した。乾癬表皮における樹枝状細胞の関与を示した。ゲノムワイドな遺伝的相関解析で候補遺伝子 2 個について発現遺伝子解析を完了した。③表皮水疱症：マウス表皮角化細胞および真皮線維芽細胞へヒト VII 型コラーゲン遺伝子をそれぞれ導入し、2 系統のトランスジェニックマウスを作製研究した。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。標的導入 HVJ-E に Type VII collagen 遺伝子を封入し、Type VII collagen 遺伝子欠損マウスの水疱内に導入し、Type VII collagen が基底膜上に産生された。マウス胎仔への細胞導入法を確立し、これにより欠損蛋白に対する免疫寛容を誘導することができた。これを用いて胎生期に骨髄細胞の導入を行い、移植した骨髄細胞由来線維芽細胞が、出生後皮膚において VII 型コラーゲンを基底膜部に供給し、その結果、平均生存期間を約 3 週間延長した。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、対分析象 284 例の重症度は軽症 81 例（28.5%）、中等度 144 例（50.7%）、重症 58 例（20.4%）、重症度不明が 1 例あった。治療は副腎皮質ステロイド、パルス療法、免疫抑制剤、血漿交換、その他となっており、免疫抑制剤の薬剤名は不明であった。治療の現状はある程度把握できると思われるが、治療の効果は新規データでは結果が出てなかった。②膿疱性乾癬、H13～18 年度全国分臨床調査個人票データの各年の入力状況は H16 年度 975 例の入力率 68.4% が最も高かったので、これを分析対象とした。対象 975 例（新規 90 例、更新 885 例）は男 499 例（51.2%）、女 476 例（48.8%）で、過去の疫学調査と比べてやや男が多かった。年

年齢分布は男の50歳代、女の40-69歳代にピークがあり、発症年齢は男の30-59歳、女の10-20歳代と50-60歳代にピークがあった。更新者の1年間の経過は新規の申請時と比べて悪化の割合（新規42.2%、更新9%）が少なかった。③表皮水疱症、前年度までに終えた。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2008を3年間の総まとめとしてevidence-based consensus guidelineに沿って作成した。これは、本報告書の別添えとしてまとめた。

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・准教授）
小宮根真弓（自治医大・准教授）
黒沢美智子（順天堂大学・准教授）

研究協力者名（所属機関名）

小澤 明（東海大学・教授）
照井 正（日本医大・教授）
新関寛徳（奈良県立医科大学・准教授）
玉井克人（大阪大学・准教授）
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。本研究の目的は、この3年間で一応のEBMに基づいた診断と治

療のガイドラインを作ることと以下に各疾患毎にまとめた病態解明と治療法の開発である。

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18年度までに病原性T細胞株の樹立し、これはTh0、非病原性T細胞クローンはTh1であること、また、抗体結合によるDsg3の消失と水疱形成機序の関係を示したが、免疫学的発症機序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、各種治療薬の評価および病原性モノクローナル抗体結合による細胞内シグナル伝達異常を解明することを目的とする。患者100名についてDSG3のエクソン11遺伝子解析により特徴ある患者亜型集団を見いだしたので、遺伝子多型に依存した臨床亜型を解析する。臨床調査個人票データベースを利用し、疫学・QOL特性を明らかにし、診断治療EBCG (evidence-based consensus guideline) 作成する。これは社会的・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) 関連遺伝子の病因的意義の解析を進める。2) 本症に特徴的な表皮細胞シグナルと皮膚・全身性炎症症状との関連を明らかにする。3) 臨床調査個人票データベースを利用し、疫学・QOL特性を明らかにし、診断治療のEBCG作成する。小児患者に適した治療も組み入れる。

5) 研究班参加施設や乾癬友の会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。

③表皮水疱症は重症例では全身の水疱と癒痕により合指、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) 出生前診断指針の確立、3) 修復・欠損遺伝子導入再生表皮および幹細胞による遺伝子治療法を細胞、動物レベルで解析する。4) 臨床調査個人票データベースを利用し、疫学・QOL 特性を明らかにし、診断治療の EBCG 作成する。

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) 疫学調査と文献的から診断治療の EBCG 作成する。

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しか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。

B. 研究方法

①天疱瘡

1) 樹立した天疱瘡病原性・非病原性T細胞のエピトープ、MHC 拘束性、T細胞リセプター可変領域、サイトカイン産生能を比較し、病原性に重要な因子を解析(天谷)。

2) 天疱瘡モデルマウスで種々の生物製剤(抗CD20など)の有効性を検討する(天谷)。

3) デスマグレイン各種のリコンビナント蛋白を用いて、各種の天疱瘡のエピトー

プを同定(橋本隆)。

4) Dsg3モノクローナル抗体活性化細胞内シグナル伝達経路を検討し、Dsg3消失機序を解析する(北島、研究協力者:青山裕美)。

5) 新治療指針を EBCG 形式で作成する(天谷、橋本隆、北島、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) 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 EBCG 形式で作成する。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) 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)。

3) 膿疱性乾癬について S100A8、S100A9 による NHK の増殖や樹状細胞のサイトカイン産生と細胞内シグナル伝達、受容体を含めて解析する(岩月、許、小宮根、研究協力者:照井)。

4) 皮膚難病支援ネットワークを利用して、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) 出生診断法の適応基準、変異遺伝子と正確な診断基準を確立する(清水)。

2) 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) 患者へ羊膜付き三次元皮膚を移植し、その有用性について検討する(橋本公二)。

4) 末梢血内表皮前駆細胞の培養技術を確立とこの末梢血表皮前駆細胞の安全かつ高効率遺伝子導入方法、特定遺伝子領域組み換え方法の開発(金田、研究協力者:玉井)。

5) 厚労省臨床調査個人票の解析とガイ

ドラインを EBCG 形式 で作成する (清水、池田、黒沢)

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

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

2) 変異ケラチン K1 導入細胞 RNA マイクロアレイ遺伝子発現検討で発症病理、アポトーシス解析する (小宮根、研究協力者：米田)。

3) 患者皮膚角化制御酵素異常解析から病態を解明する (山本)。

4) 疫学調査継続と EBCG 作成 で作成する (池田、黒沢)

C. 研究結果と D. 考察

①天疱瘡：

1) 昨年までに合計15個の Dsg3 反応性 CD4 陽性T細胞株を樹立し、そのうち13株は TCR 遺伝子解析によりクローンであることが確認された。本年度はさらに5株を樹立し、T細胞株を合計20株とした (病原性あり7株、なし13株)。各T細胞株の特性 (T細胞エピトープ、T細胞受容体遺伝子、発現サイトカイン、ホーミング能) を検討した結果、IL-4 および IL-10 のみに病原性との関連性をみとめた ($P=0.04$)。さらに、sCD40L 存在下での Dsg3^{-/-}B 細胞の培養系に、IL-4 を添加すると、IL-10 に比べて培養上清中に産生される IgG 抗 Dsg3 抗体価が高かった。また sIL-4Ra、sIL-10Ra、sIFN-gR1 を発現する組み換えアデノウイルスを Rag2^{-/-}マウスに投与後、Dsg3反応性T細胞株と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植すると、対照ウイルス投与群にくらべて、sIL-4Ra を発現させたマウスでのみ抗体価の上昇や PV フェノタイプの発現が抑制された。以上のことから、PV モデルマウス病態において IL-4 が重要なことが示され、IL-4 を標的とする治療法の可能性を示した。本評価系は他の自己免疫疾患にも広く応用可能であり、将来治療標的となりうるT細胞の病原性規定因子の同定

に有用であると考えられた。(天谷)

2) Th17 細胞が、天疱瘡をはじめとする自己免疫性水疱症の病態に關与するか、免疫組織化学的評価を行った。尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡のいずれの病変部にも IL-17 産生リンパ球、Foxp3 陽性リンパ球を認めた。尋常性天疱瘡は落葉状天疱瘡に比べ IL-17 産生リンパ球を高率に認めた。疾患の重症度や自己抗体の抗体価とは相関がなかった。(橋本隆)

3) 天疱瘡の病勢のモニタリングには、臨床症状だけでなく、蛍光抗体間接法の抗体価、Dsg ELISA index 値が有用である。当科では尋常性天疱瘡と診断し、加療している患者のうち寛解期においても依然として Dsg3 ELISA index が高値である症例を5例経験している。これらの患者血清について、蛍光抗体間接法、免疫ブロット法、ELISA 法、免疫沈降法を用いて抗原抗体解析を行った。(橋本隆)

4) コンフルエントに培養されたコロニーに多数の搔爬痕 (創傷) をつけ、その修復過程におけるケラチノサイトに対する天疱瘡抗体のデスマグレイン3減少効果を検討したところ、創傷のみによるデスマグレイン3減少および抗デスマグレイン3抗体刺激によるデスマグレイン3の減少より両者の同時刺激の方が数段にデスマグレイン3が減少した創傷治癒時の細胞側方移動活性が高くデスマソームリモデリングの盛んな細胞はより天疱瘡抗体に感受性が高いことが明らかにされた。さらにこの時再構築されたデスマソームはデスマグレイン3含有量が著減している異常なデスマソームであり、さらに二次的に新たなシグナル伝達を惹起する。このことは天疱瘡がデスマソームリモデリング障害性の疾患であると考えることが今後のこの研究の発展に寄与することを示した。(北島、研究協力者：青山)

5) エピトープの違う抗デスマグレイン

(Dsg)3モノクロナル抗体(mAb)を作用させると、病原性抗体(AK23mAb)はDsg3分解を誘導した。分解部位をさまざまな細胞外ドメインを持つDsg3抗体でウェスタンブロッティングにより検討したところ、細胞外ドメイン(EC)2-3付近で分解されていた。この分解は、Srcキナーゼ阻害剤にて部分的に抑制され、細胞内シグナル伝達経路の活性化が天疱瘡抗体の抗原の細胞外ドメインの分解に関与することがあきらかになった。(研究協力者：青山)

6) 天疱瘡の予後を明らかにする目的で、順天堂大学医学部皮膚科外来に1981年から2001年の間に少なくとも1年以上治療あるいは経過観察を行った天疱瘡患者69例につき調査を行った。その結果、26例(37.7%)が一切治療無しで経過観察されており、また1年以上症状が見られない、いわゆる「治癒」の状態にあることが明らかとなった。またこれら26例のうち、1例においてのみ、治療中止後5年後に頭部のびらんが生じた。天疱瘡では、致死率は非常に低くなっており、多くの症例が「寛解」または「治癒」の状態にあることが明らかになった。今後さらに「治癒」症例の解析を行う予定である。(池田)

7) 当研究班で作成中の天疱瘡治療ガイドラインの参考資料とするため、臨床調査個人票データを用いて、天疱瘡新規受給者の治天疱瘡治療アルゴリズム(案)に沿って、臨床調査個人票データで対応可能な項目について治療実施数とその効果を示した。対分析象284例の重症度は軽症81例(28.5%)、中等度144例(50.7%)、重症58例(20.4%)、重症度不明が1例あった。臨床調査個人票の治療に関する項目は副腎皮質ステロイド、パルス療法、免疫抑制剤、血漿交換、その他となっており、免疫抑制剤の薬剤名は不明であった。H17年度天疱瘡新規受給者は上記の治療法を1種類または様々な組み合わせで受けていた。治療の現状はある程度把握できると思われるが、治

療の効果は新規データでは結果が出ていない場合があり、はっきりしなかった。(黒沢)

8) 4つのPVアレルはPFと共通のアレルとPV単独アレルに分類された。その結果臨床症状移行例では共通アレルの頻度が高い可能性が示唆された。一方PFには共通アレルの他にPF単独アレルが存在する可能性が示唆された。その他の臨床亜型や移行例では臨床亜型を越えて共通する特定のHLA-DRB1アレルが疾患感受性を担っていることが示唆された。(研究協力者：新関)

②膿疱性乾癬：

1) 血清中S100A8/A9濃度は膿疱性乾癬では他の乾癬病型に比べ有意に上昇している。末梢血好中球、白血球数と正の相関があり、膿疱性乾癬のバイオマーカーとして有用であると考えられる。膿疱性乾癬病変ではこれらの蛋白の発現が増加しており病変部の形成に関与しておりその抑制は治療につながる可能性がある。(岩月)

2) 乾癬(特に膿疱性乾癬)病態を理解し、それを基盤とした治療法を開発することを目的として、Ca結合タンパク質であるS100ファミリーの表皮における機能を解析している。今年度は新たに、1) S100A11がannexin A1とphospholipase A2との相互作用を介し、アラキドン酸カスケードを阻害することで増殖を抑制する、2) 一方、S100A11は分泌され、細胞外からRAGEを介してEGFを誘導することによりNHKの増殖を促進する、ことを見出した。このようなS100A11のNHKの増殖制御における両面的作用は、乾癬病態を理解する上で重要な手がかりとなると考える。(許)

3) 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。これまでの検討から、尋常性乾癬では、多数のCD11c陽性樹状細胞の真皮上層から表皮内への浸潤が認められ、

表皮内 CD1a 陽性細胞も多数認められるが、膿疱性乾癬ではいずれも少数しか認められないことがわかっている。CD83 陽性、iNOS 陽性樹状細胞の浸潤も、尋常性乾癬では多数認められるが膿疱性乾癬では少数であった。また、Receptor activator NF kappa B ligand (RANKL)-RANK により刺激された樹状細胞は、制御性樹状細胞としての機能を発現するという報告から、膿疱性乾癬、尋常性乾癬における RANK、RANKL の発現を免疫組織学的に検討したが、表皮細胞での RANKL 発現は、尋常性乾癬、膿疱性乾癬ともに同程度に認められた。(小宮根)

4) 分化が誘導されていない、増殖のより盛んな細胞にある HaCat 細胞に対して、LXR リガンドが分化を促進し、細胞増殖を抑制する用に働くことから、LXR や SREBP-1c に関連するシグナル経路に関連する分子が乾癬や膿疱性乾癬の治療標的となることが推察された。(研究協力者：照井)

5) 4 個の乾癬関連遺伝子を絞り込んだ。1 個目の遺伝子は G タンパク連結型受容体のスーパーファミリーの 1 つで、感受性アレルはマイクロサテライト、そのマイクロサテライトは翻訳開始点の 5' 上流 995bp に存在していた。2 個目の遺伝子は HLA class I 領域 (6p21.3) に存在していた。以前われわれが乾癬感受性遺伝子の 1 つとして報告した新規遺伝子 SEEK1 遺伝子であると考えた。3 個目の遺伝子は Ca 非依存性細胞接着分子のスーパーファミリーの 1 つで、3 つの免疫グロブリンドメインで構成されていた。感受性アレルは SNP で、その SNP は第 1 イントロンに存在していた。4 個目の遺伝子は HLA class II 領域に存在する BTNL2 遺伝子であると考えた。この HLA class II 領域との相関は HLA class I 領域との相関とは独立したものであった。1 個目と 3 個目の遺伝子について、発現している組織の特異性を確認した。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。(研究協力者：小澤)

6) 膿疱性乾癬受給者の H13~18 年度全国分臨床調査個人票データを入手し、入力率が最も高かった H16 年度 975 例 (入力率 68.4%) について臨床疫学特性を示した。対象 975 例 (新規 90 例、更新 885 例) は男 499 例 (51.2%)、女 476 例 (48.8%) で、過去の疫学調査と比べてやや男が多かった。年齢分布は男の 50 歳代、女の 40-69 歳代にピークがあり、発症年齢は男の 30-59 歳、女の 10-20 歳代と 50-60 歳代にピークがあった。診断名は汎発性膿疱性乾癬 918 例 (94.2%)、疱疹状膿痂疹 17 例 (1.7%)、稽留性肢端皮膚炎の汎発化 16 例 (1.6%)、その他 17 例 (1.7%) であった。更新者の 1 年間の経過は新規の申請時と比べて悪化の割合 (新規 42.2%、更新 9%) が少なかった。(黒沢)

③表皮水疱症：

1) 重症型である劣性栄養障害型表皮水疱症 (RDEB) は VII 型コラーゲンの遺伝子変異により発症する。RDEB 患者の遺伝子治療を考えた場合、遺伝子導入される標的細胞として、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の 2 つが挙げられる。今回、マウス表皮角化細胞および真皮線維芽細胞へヒト VII 型コラーゲン遺伝子をそれぞれ導入し、ヒト VII 型コラーゲンが強制発現する 2 系統のトランスジェニックマウスを作製し、マウス表皮真皮境界部におけるヒト VII 型コラーゲンの発現について検討を行った。栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子である VII 型コラーゲン遺伝子に存在する alternative splicing を発見し、創傷治癒や皮膚の remodeling にとの関係を明らかにした。(清水)

2) 表皮水疱症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、平成 18 年度までに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、栄養障害型表皮水疱症患者の手指棍棒状癒着への臨床応用にて非常に有用であることを示した。羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンをういているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンをういない簡易作製法を開発した。簡易作製法で作製した羊膜付き三次元培養皮膚はゲルあり羊膜付き三次元皮膚とくらべて遜色ないことが明かとなった（橋本公二）。

3) 表皮水疱症の治療のために、遺伝子治療の可能性について検討した。そのために皮膚組織特異的な遺伝子導入ベクターの開発を行い、基底細胞抗原である desmoglein 3 に対する一本鎖抗体をもった HVJ envelope (HVJ-E) vector の構築に成功した。この標的導入 HVJ-E に Type VII collagen 遺伝子を封入し、Type VII collagen 遺伝子欠損マウスの水疱内に導入した。これにより Type VII collagen が基底膜上に産生された。（金田）

4) 表皮水疱症の治療のために、細胞治療の可能性について検討してきた。まずマウス胎仔への細胞導入法を確立し、これにより欠損蛋白に対する免疫寛容を誘導することができた。これを用いて胎生期に骨髓細胞の導入を行い、移植した骨髓細胞由来線維芽細胞が、出生後皮膚においてVII型コラーゲンを基底膜部に供給し、その結果、平均生存期間を約3週間延長することに成功した。（金田）

5) 超音波造影法による遺伝子導入は、In骨髓由来細胞が表皮水疱症における水疱部表皮再生に寄与している可能性を見出した。特に平成19年度は、骨髓由来表皮再生メカニズムの分子機構解明を目指して研究を進め、水疱内に骨髓由来表皮前駆細胞を誘導する活性 KOI2 が存在することを明らかにした。（研究協力者：玉井）

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

1) 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症は、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、ケラチン遺伝子の変異に加え、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ている。正常ヒト表皮細胞に伸展刺激を加えると、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認められるが、変異ケラチンを持つ表皮細胞ではその正常な反応が妨げられている可能性がある。DNA マイクロアレイにより変異ケラチン導入細胞と正常ケラチン導入細胞とで、伸展刺激に対する反応の違いを検討したところ、変異ケラチン導入細胞では正常ケラチン導入細胞にくらべ、非常に多くの遺伝子発現が影響を受けていることがわかった。変異ケラチン導入細胞では、正常ケラチン導入細胞では認められない、炎症にかかわる分子の発現が多く認められた。また酸化ストレスに対抗するためのミトコンドリア関連遺伝子多く誘導され、アポトーシス関連遺伝子、DNA 修復関連遺伝子の誘導も多く認められた。一方、正常表皮細胞で誘導が認められた細胞外マトリックスや細胞骨格関連遺伝子の多くが抑制されていた。（小宮根）

2) 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。(池田)

3) 今回はリサイクリングエンドソームに存在する GTP 結合タンパクである Rab11 が層板顆粒輸送に関係する可能性について検討した。正常表皮において Rab11 は有棘層中層から顆粒層にかけて発現し、細胞内の表層側に強く局在していた。核周囲においては TGN46 と共存していた。また各種層板顆粒分子とも顆粒層において共存しており、免疫電顕によってこれらを含む層板顆粒の周囲に Rab11 が局在しており、層板顆粒の輸送に関与することが示唆された。BCIE においては Rab11 が強発現していた。本症における層板顆粒の細胞内輸送の異常は Rab11 の異常とも関係しているかも知れない。(山本)

4) 疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (BCIE) は分化型ケラチンである K1 もしくは K10 の遺伝子異常による遺伝性疾患である。本症における角質肥厚の原因のひとつとして層板顆粒の分泌不全が指摘されてきた。層板顆粒の輸送や分泌に一次的な異常があるかどうかのような表原型がもたらされるかはこれまで知られていなかった。今回我々は層板顆粒の分泌が1次的に侵されている角化症、すなわち CEDNIK 症候群と ARC 症候群を報告する。この2疾患は BCIE と角質肥厚という点において共通していたが、その程度は BCIE よりも軽く、この理由として後者では層板顆粒分泌障害以外の要因が著しい角質肥厚に寄与していると考えられた。(山本)

5) エクジソン誘導発現の系を用いて、ボーウインケル症候群モデル細胞を樹立することに成功した。このモデル細胞において、種々のシグナル伝達の変化が観察され、この変化はボーウインケル症候群の病態に深く関与しているものと考えられた。今後このモデル細胞を用いてボーウインケル症候群の病態形成機序を disease control として BCIE の各界蒸発原機序に応用されると考える。(米田)

診断と治療ガイドライン作成について

別添えに示すごとく、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疾患に加えて類天疱瘡の診断と治療ガイドラインを evidence-based consensus guideline に沿って2008年度版として作成した。

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した。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た。

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」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」。奈良県立医科大学倫理委員会承認(承認番号20)平成15年11月7日、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会承認平成16年1月21日、岐阜大学倫理委員会承認(承認番号15-97)平成15年12月19日、久留米大学医学部倫理委員会承認(承認番号10)平成15年11月28日、慶應義塾大学医学部倫理委員会承認(承認番号14-74-1)平成16年4月13日、愛媛大学医学部倫理委

員会承認（承認番号30）平成16年4月27日
岡山大学倫理委員会承認（承認番号16-1）；
平成16年6月23日：「天疱瘡における遺伝的
背景の検索」。

E. 結論

1（1）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、および、この4疾患に加え類天疱瘡に関する診断と治療に関するガイドラインを、新しくEBMに基づいたガイドラインをほぼ完成に近い形で案としてまとめた（平成19年度発行予定、別添え2、ガイドライン参照）。

（2）学的研究による患者数と治療状態の実体の把握、発症分子病態の解明、原因遺伝子の解析と臨床系の相関、原因遺伝子から発症までの機序、これらに基づく培養皮膚移植治療法と遺伝子治療法の開発という大きな目的に対して、上述したように本研究の3年計画の目標はほぼ達せられ、次期研究班研究への研究指針が得られたと考える。

（3）遺伝子治療では、骨髄由来表皮ケラチノサイトの存在と、その細胞を利用した表皮水疱症の根治的治療法開発に道筋が得られた。また、HVJ-Eベクターに組織特異的な標的能を賦与する全く新しい方法を開発した。遺伝子発現の長期化のための技術と合体させれば、遺伝性皮膚疾患の治療にも貢献できることが予想される。

また、3年間、毎年臨床調査個人票データの利用申請を行い、入手したデータで稀少難治性皮膚疾患の受給者全体の疫学的特性（性・年齢分布等）、臨床医学的特性（病型別分布・重症度分布・症状・所見等）を示した。患者の予後（症状変化、治癒軽快、死亡等の把握）の分析方法を検討し、現在のデータの問題点を示した。治療ガイドライン作成に資するため、受給者の治療の実態を示した。

上述したこの3年間で集積された科学的

知見結果から本研究の段階的目的である3年計画の目標は70—80%は達せられたと考える。しかしながら、病因抗体や病因遺伝子が解明されたが、この過程からさらに新たな問題が提起され、発症機序は解決できていないこと、また、いずれのこれら稀少難治性皮膚疾患に関しても満足すべき根本的治療は未だ確立していないことから、この研究班の存続の必要性は極めて高い。一方、膿疱性乾癬では、病因も不明であり特異的治療法も開発されていない。今後、稀少難治性皮膚疾患の病態解明と治療成績等の向上を図り、患者の医療、福祉改善に寄与するためには本研究班の継続が必要であると考える。

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う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19年度）

1. 論文発表

本報告書巻末の別表に記載しており、重複するので、ここでは省略した。

2. 学会発表

各分担研究者、研究協力者が個別に記載しており、重複するので、ここでは省略した。

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

A) 特願2007—73696「ポリペプチドを有効成分とする自己免疫疾患性皮膚疾患治療薬」発明者：清水宏、芝木晃彦、王剛

B) 特願2007—73693「ポリペプチドを有効成分とする自己免疫疾患性皮膚疾患治療薬」発明者：清水宏、澤村大輔、西江渉

C) 特願2007—202319「XVII型コラーゲンに関する異所分化抑制剤」発明者：清水宏、西江渉、谷村心太郎、西村栄美、田所優子、澤村大輔

D) 特願2007—218702「XVII型コラーゲンに関する脱毛抑制剤及び毛髪の脱色素化抑制剤」発明者：清水宏、西江渉、谷村心太郎、西村栄美、澤村大輔

E) 特許第 3942362 号)

遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター 成立日：2007年7月11日、発明者：金田安史 出願人：アンジェスエムジー株式会社

2. 新案登録

改変パラミクソウイルス及びその作製法 (WO2007/061141)

出願日：2007年5月31日

発明者：河地正子、佐賀公太郎、玉井克人、金田安史

出願人：ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大

3. その他、なし

[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

尋常性天疱瘡はデスモソームリモデリング病という視点からの
水疱形成機序の解明

主任研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学系研究科皮膚病態学 教授

研究要旨 我々はこれまでに、培養表皮細胞において天疱瘡抗体および病原性モノクローナル抗デスモグレイン3抗体が細胞表面のデスモグレイン3に結合すると、細胞内シグナル伝達が活性化されデスモグレイン3分子のリン酸化、プラコグロビンのデスモグレイン3からの遊離とデスモグレイン3の分解が30分以内に生じ、30時間以内にデスモグレイン3欠損デスモソームが形成されることを報告してきた。これらの変化はケラチノサイトの培養条件が100%のコンフルエントでは効果が出にくく、40%コンフルエントの状態では顕著に現れることを報告してきた。また、抗デスモグレイン3とデスモプラキンの二重染色蛍光抗体法ではコロニーの辺縁の細胞でデスモグレイン3欠損デスモソームが検出され、中央部では検出されなかったことも報告した。これらのことは細胞が側方移動活性あるいは細胞接着と脱着の活性が高いときに天疱瘡抗体に感受性が高いと推察されたので、これを確認すべく今回実験を行った。コンフルエントに培養されたコロニーに多数の搔爬痕（創傷）をつけ、その修復過程におけるケラチノサイトに対する天疱瘡抗体のデスモグレイン3減少効果を検討したところ、創傷のみによるデスモグレイン3減少および抗デスモグレイン3抗体刺激によるデスモグレイン3の減少より両者の同時刺激の方が数段にデスモグレイン3が減少した。また、この減少に関して細胞骨格画分（Triton X-100 insoluble）からのデスモグレイン3の減少はPKC阻害剤では阻害されないがSrc阻害剤で阻害された。以上から創傷治癒時の細胞側方移動活性が高くデスモソームリモデリングの盛んな細胞はより天疱瘡抗体に感受性が高いことが明らかにされた。さらにこの時再構築されたデスモソームはデスモグレイン3含有量が著減している異常なデスモソームであり、さらに二次的に新たなシグナル伝達を惹起する。このことは天疱瘡がデスモソームリモデリング障害性の疾患であると考えることが今後のこの研究の発展に寄与すると推察される。

共同研究者

青山裕美 岐阜大学医学部附属病院
皮膚科講師
山本ゆかり 岐阜大学大学院医学系研究科
皮膚病態学
神尾尚子 岐阜大学大学院医学系研究科
皮膚病態学

A. 研究目的

天疱瘡は表皮角化細胞間接着構造であるデスモソームの膜貫通型接着分desmoglein

(Dsg) に対する自己抗体によって、細胞間接着融解（棘融解）が生じ、水疱に至る自己免疫性水疱症である¹⁻³⁾。天疱瘡特異抗原はDsg1, Dsg3と同定され、その抗体力価はおおむね病勢を決定することまで明らかにされたが、抗体結合後の水疱形成機序は未だ明らかではない。一方、デスモソームは角化に伴う表皮角化細胞の上方移動時あるいは表皮創傷治癒時にはリモデリングを繰り返す動的構造である⁴⁻⁵⁾。そこで、本研究は、病原性抗Dsg抗体によるデスモ

ソームのリモデリング制御障害（デスモソームリモデリング病と言う概念を提案する）という新視点から研究デザインを設定し、天疱瘡の水疱形成機序を動的分子細胞生物学的に解明し、新しい治療戦略の糸口を開発しようとするものである。

我々はこれまでに、培養表皮細胞において天疱瘡抗体および病原性モノクローナル抗デスモグレイン3抗体が細胞表面のデスモグレイン3に結合すると、細胞内シグナル伝達が活性化されデスモグレイン3分子のリン酸化、プラコグロビンのデスモグレイン3からの遊離とデスモグレイン3の分解が30分以内に生じ、30時間以内にデスモグレイン3欠損デスモソームが形成されることを報告してきた¹⁻⁴⁾。これらの変化はケラチノサイトの培養条件が100%のコンフルエントでは効果が出にくく、40%コンフルエントの状態では顕著に現れることを報告してきた。また、抗デスモグレイン3とデスモプラキンの二重染色蛍光抗体法ではコロニーの辺縁の細胞でデスモグレイン3欠損デスモソームが検出され、中央部では検出されなかったことも報告した。これらのことは細胞が側方移動活性あるいは細胞接着と脱着の活性が高いときに天疱瘡抗体に感受性が高いと推察されたので、これを確認すべく今回実験を行った。コンフルエントに培養されたコロニーに多数の搔爬痕（創傷）をつけ、その修復過程におけるケラチノサイトに対する天疱瘡抗体のデスモグレイン3減少効果を検討した。

一方、これまでに我々は、100%コンフルエントのケラチノサイト培養コロニーに擦過創傷を多数つけると30分後からデスモグレイン3、2、デスモプラキン、プラコグロビンが細胞から著減し、創傷が側方移動してきた細胞によって埋められる48時間後には元の含有量に復元している(図1)⁶⁾。すなわち、創傷によって出来た溝を埋めるためには細胞が側方移動する必要があるが、そのためにはそれまで密着していたデスモ

ソームを一旦離開させる必要がある。そのために全てのデスモソーム構成分子が細胞から消失すると推察される。また、細胞の側方移動反応はSrc依存性であった、

そこで、コンフルエント培養細胞コロニーに擦過傷を造り、加えて天疱瘡抗体刺激をおこない、創傷のみによるデスモグレイン3抗体減少および創傷と天疱瘡抗体両者による刺激後の抗デスモグレイン3抗体の減少効果とを比較検討した。また、これがsrc阻害剤、PKC阻害剤で阻害されるかどうか検討した。以上から創傷治癒時の細胞側方移動活性が高くデスモソームリモデリングの盛んな細胞はより天疱瘡抗体に感受性が高いかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 細胞の培養；

ヒト扁平上皮癌細胞から分離したDJM-1細胞を、Eagle's essential medium(MEM), 0.09mM Ca^{2+} , 0.4 μ g/ml ハイドロコチゾン、10ng/mlEGF, 84ng/ml コレラトキシン、100units/mlペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、10% FCS を含む培地中で10mmシャーレ内で培養した¹⁹⁾。継代後、コンフルエントになった細胞を低(0.05mM) Ca^{2+} 培地で120時間培養し、コンフルエントになった後実験に用いた。擦過創傷はプラスチックチップによって180本をカルチャー上に造った。また、同時に天疱瘡IgG (0.5mg/ml)、正常ヒトIgG (0.5mg/ml) を添加し、30分4時間48時間に細胞を回収し、全細胞抽出液、細胞膜(Triton X-100 soluble) 細胞骨格画分(Triton X-100 insoluble) と分けて検討した。

2) 患者天疱瘡抗体

尋常性天疱瘡抗体はデスモグレイン³⁺ (Dsg³⁺) デスモグレイン¹⁻ (Dsg¹⁻) であることをDsg3-ELISA、Dsg1-ELISAと表皮抽出液を基質にした免疫ブロット法によって確認した尋常性天疱瘡患者3名の血

清から (Dsg¹⁻/Dsg³⁺) PV-IgG を精製し、個別に用いた。

3) 創傷刺激天疱瘡抗体による刺激

コンフルエント培養 DJM-1 細胞に擦過傷を付けた直後に PV-IgG を 0.5mg/ml、および陰性コントロールとして正常マウス IgG を 0.5mg/ml で刺激を行った。また、擦過傷を付けないコロニーにも同様に刺激した。30分、4時間、24時間、48時間後、抗体液を除去し、500U/ml の Dispase で 37°C30分反応させてディッシュから細胞を剥がした。

阻害剤実験では細胞最終60分前に Src の特異的阻害剤である PP1 (10 μ M) および PKC の特異的阻害剤である GO6976 (1 μ M) を搔爬創傷および抗体添加前60分に添加し、同様に実験した。

全細胞抽出液を抗原とする時は培養シャーレに直接的に 2% SDS、10% 2- β メルカプトエタノール、20% グリセロール、62.5 mM トリス塩酸 (pH6.8) からなる SDS サンプルバッファーを添加し、超音波処理を行い、その試料を回収して 100°C、5分間処理で溶解したのち、6% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。検出は次項に記した方法で行った。

細胞分画を行う場合は、PBS で細胞を洗浄後、2% トリトン X100・PBS (各種蛋白分解酵素阻害剤含有) 液中で超音波処理によって細胞を破壊し、100,000 G、60分の遠心分離上清を可溶性画分 (実質的に細胞膜・細胞質画分) と沈さの不溶性画分 (細胞骨格画分) に分け、それぞれ電気泳動を行い上記と同様に免疫ブロットを行った。

C. 研究結果

1) 創傷治癒過程における Dsg3 減少とこれに対する PV-IgG の影響免疫

完全コンフルエントの培養ケラチノサイトに搔破創傷を多数 (180本) 付けた後、直ちに PV-IgG を培地に添加後、30分間

および 4 時間刺激後に細胞を方法の項に述べたように免疫ブロットを行い、定量化した。その結果、搔爬創傷単独刺激では 30 分後に細胞膜 (Triton X-100 可溶性) 画分、細胞骨格 (Triton X-100 不溶性) 画分から共に Dsg3 は 20% 減少し、PV-IgG 単独刺激では 57% までに、24 時間刺激では 40% 減少した。両者のコンビネーションではその減少量が増加し約 60% の減少となった。一方、4 時間刺激後においても 30 分間および 4 時間刺激後には細胞膜 (Triton X-100 可溶性) 画分からは創傷単独刺激では Dsg3 は 40%、PV-IgG 単独刺激では 20% 減少した。両者のコンビネーションではその減少量が増加し約 80% の減少となった。さらに、細胞骨格 (Triton X-100 不溶性) 画分からは創傷単独刺激では Dsg3 は 50%、PV-IgG 単独刺激では 75%、両者のコンビネーションでは 95% 減少した。(図 2)。

同様に 48 時間刺激によるその他のデスモソーム構成分子である Dsg3, Dsg1/2, DPK, PG ならびに E-cadherin への影響を検討したところ、Dsg3 のみ顕著に減少しており、他の分子の減少は見られなかった。

2) 創傷治癒過程、PV-IgG および両者のコンビネーション刺激における Dsg3 減少に対する Src 阻害剤、PKC 阻害剤の影響免疫

阻害剤実験では細胞最終 60 分前に Src の特異的阻害剤である PP1 (10 μ M) および PKC の得意テク阻害剤である GO6976 (1 μ M) を搔爬創傷および抗体添加前、60 分に添加し、同様に搔爬創傷作成と PV-IgG 添加を行い、4 時間インキュベーションし、同様に解析した。その結果、細胞膜画分では両阻害剤共に効果はなかったが、不思議なことに細胞骨格画分では PP1 ではほぼ 100% 阻害がかかっていた。(図 2)

D. 考察

創傷治癒時には *in vivo* でも *in vitro* で