

もケラチノサイトは側方に移動し、損傷面積を埋める。このとき、創傷を受けた組織はコロニーの残りの細胞は創傷面へ側方移動するために、一旦、細胞間および細胞と基質との間の細胞接着を乖離させる必要がある。その第一ステップが、創傷後30分から24時間までに見られる各細胞間接着分子の細胞内からの減少である。しかる後、細胞は会合し新たな細胞間でデスモソームを形成する。このデスモソームのリモデリング過程はデスモソームが不安定化している都推察されている⁵⁾。

そこで、我々は、コンフルエントの培養ケラチノサイトに擦過傷を多数作りこれに天疱瘡抗体を添加し、その Dsg3 減少活性を比較したところ、

1) 創傷および PV-IgG 単独処理後いずれの時間でもそれぞれ Dsg3 の減少が見られた。

2) 創傷では全てのデスモソーム蛋白が減少する⁶⁾(我々が過去に報告)が、PV-IgG 刺激では Dsg3 のみ減少した。

3) 創傷+PV-IgG 複合処理ではさらに強く相乗/相加的に Dsg3 のみの減少が見られる。

これらの結果は、創傷時には天疱瘡抗体による Dsg3 の減少がより顕著に表れることを示している。すなわち、*in vivo* においては、炎症や物理的外的刺激(摩擦など)によって表皮細胞の分裂と上方移動が活性化される時にも同様に天疱瘡抗体刺激による Dsg3 の減少が加速されると推察される(図4)。

Dsg3 の減少が水疱形成に関与するかどうかは、抗デスモグレイン3モノクローナル抗体刺激による Dsg3 の減少は培養表皮ケラチノサイトの培養プレートとの接着力を減弱すること⁷⁾、Dsg3 ノックアウトマウスはニコルスキー減少を示すこと⁸⁾、天疱瘡抗体を注射したマウスでは約30%の d Dsg3 が減少し、それでも水疱が出来ること、尋常性天疱瘡患者の皮膚では30~35

%Dsg3 が減少していること⁹⁾から重要であると推察される。したがって、細胞分裂が高く細胞の上方移動活性が高い時はより水疱が出来やすいと推察される。

さて、コンフルエントの培養ケラチノサイトにエッペンドルフ・プラスチックで擦過傷を付けると細胞は4時間後には動き始め48時間までに元のように傷を埋め尽くす。この過程 Src 阻害剤で阻害されることを我々は報告した⁶⁾。そこで、今回は、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、同様に実験した。その結果、細胞骨格からの Dsg3 の減少を阻害した。このことはこれら創傷と PV-IgG 刺激によるデスモソームから Dsg3 減少作用には共に Scr 活性化が関与することを示唆している。

ところで、表皮におけるデスモソームのデスモソームカドヘリンは表皮が分化して上方に移動する際のデスモソームリモデリングによって、Dsg3、デスモコリン3(Dsc3)は減少し、Dsg1、Dsc1は減少する。したがって、基底層あたりのケラチノサイトと顆粒層あたりのケラチノサイトではデスモソームの組成がかなり異なっている^{4,5)}。この組成の変化が細胞外からの outside-in シグナル伝達に変化をもたらし、角化や表皮の機能を保持していると考えられる¹⁰⁻¹¹⁾。天疱瘡では抗 Dsg3 抗体活性によって Dsg3 が減少し、その組成が代わり、これ自体がまた新しい病的なシグナル伝達を惹起していると推察される。すなわち、デスモソームのリモデリング異常による新たな病態が現れ、天疱瘡をデスモソーム・リモデリング病としてとらえることは次なる研究の貼って人に寄与すると考えられる。

E. 結論

本研究から創傷などで表皮角化細胞のデスモソームリモデリングが活性化されてい

る時は、表皮角化細胞はより PV-IgG に感受性が高く、より Dsg3 減少効果を発揮し、病原性活性が強く表現されると推察される。また、Dsg3 のみが減少しデスモソーム構成分子比を変化させることは、創傷治癒時と異なって細胞内シグナル伝達異常を来し、疾患を増強あるいは修飾する可能性を示唆している。すなわち、天疱瘡がデスモソームリモデリング病とすることを提唱したい。この視点からの治療開発はこれまでにはない治療薬の開発に貢献すると考えられる。

引用文献

1. Kitajima Y, Aoyama Y. A perspective of pemphigus from bedside and laboratory-bench. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 33(1-2) : 57-66, 2007
2. Kitajima Y. Desmoglein3 as a crucial component for investigating the regulation of desmosome remodeling. *J Stomatol Invest* 1(1):3-5, 2008
3. Kitajima Y, Aoyama Y. Desmosome assembly, disassembly and signaling in keratinocytes : Lessons from pemphigus, a desmosome-remodeling disease. *Pathophysiology of Desmosome* : ed.Nicolla Cirillo (RESEACH SIGNPOST) : in press
4. Kitajima Y. 2002. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Dermatol.* 27:684-90
5. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug 9;[Epub ahead of print]
6. 北島康雄、培養表皮細胞層症モデルの治癒過程における天疱瘡抗体の影響。厚生省特定疾患：皮膚・結合組織疾患研究、稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班、平成11年度研究報告書。134-140、2000
7. Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *J Biol Chem* 282:17866-17876, 2007
8. Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitaker-Menezes D, Stanley JR. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 137:1091-110.1997
9. Shu E, Yamamoto Y, Aoyama Y, Kitajima Y. Intraperitoneal injection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes epidermal keratinocytes of desmoglein 3 associated with generation of acantholysis. *Arch Dermatol Res* 299:165-167. 2007
10. Merritt AJ, Berika MY, Zhai W, Kirk SE, Ji B, Hardman MJ, Garrod DR. 2002. Suprabasal desmoglein 3 expression in the epidermis of transgenic mice results in hyperproliferation and abnormal differentiation. *Mol Cell Biol* 22: 5846-5858.
11. Elias PM, Matsuyoshi N, Wu H, Lin C, Wang ZH, Brown BE, Stanley JR. 2001. Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and

function. *J. Cell Biol* 153: 243-249

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成19年度)

英語論文

1. Kitajima Y. Desmoglein3 as a crucial component for investigating the regulation of desmosome remodelling. **J Stomatol Invest** 1(1): 3-5, 2008
2. Chernyavsky AI, Arredondo J, Kitajima Y., Sato-Nagai M, Grando SA., Desmoglein vs non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis : characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. **J Biol Chem** 282(18):13804-11382, 2007
3. Kitajima Y., Aoyama Y. A perspective of pemphigus from bedside and laboratory-bench. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology** 33(1-2):57-66, 2007
4. Aoyama Y., Asai K, Hioki K, Funato M, Kondo N, Kitajima Y. Herpes gestationis in a mother and newborn : immunoclinical perspectives based on a weekly follow-up the enzyme-linked immunosorbent assay index of a bullous pemphigoid antigen noncollagenous domain. **Arch Dermatol** 143(9):1168-1172, 2007
5. Kanno M, Aoyama Y., Yamamoto Y, Kitajima Y. p120ctn is associated with desmogleins when desmosomes are assembled in high Ca^{2+} , but not when disassembled in low- Ca^{2+} medium in DJM-1 cells. **J Dermatol** : in press
6. Iwata H, Aoyama Y., Esaki C, Kitajima Y. Cicatricial pemphigoid with prominent alopecia. **Eur J Dermatol** 17(4):338-339, 2007
7. Shu E, Yamamoto Y, Aoyama Y., Kitajima Y. Intraperitoneal injection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes epidermal keratinocytes of desmoglein 3 associated with generation of acantholysis. **Arch Dermatol Res** 299(3):165-167, 2007
8. Yamamoto Y, Aoyama Y., Shu E, Tsunoda K, Amagai M., Kitajima Y. Anti-desmoglein3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. **J Biol Chem** 282 (24):17866-17876, 2007
9. Yamamoto Y, Aoyama Y., Shu E, Tsunoda Y, Amagai M., Kitajima Y. No activation of urokinase plasminogen activator by anti-desmoglein 3 monoclonal IgG. antibodies in cultured human keratinocytes. **J Dermatol Sci** 47 (2):119-125, 2007
10. Kanno M, Isa Y, Aoyama Y., Yamamoto Y, Nagai M, Ozawa M, Kitajima Y. p120-catenin is a novel-desmoglein 3 interacting partner: identification of p120-catenin association site of desmoglein 3. **Exp Cell Res** : in press

英語著書

1. Kitajima Y., Aoyama Y. Desmosome assembly, disassembly and signaling in keratinocytes : Lessons from pemphigus, a

desmosome-remodeling disease
Pathophysiology of Desmosome : e
d.Nicolla Cirillo (RESEACH SIGN-
POST) : in press

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を
含む）
特許出願 なし

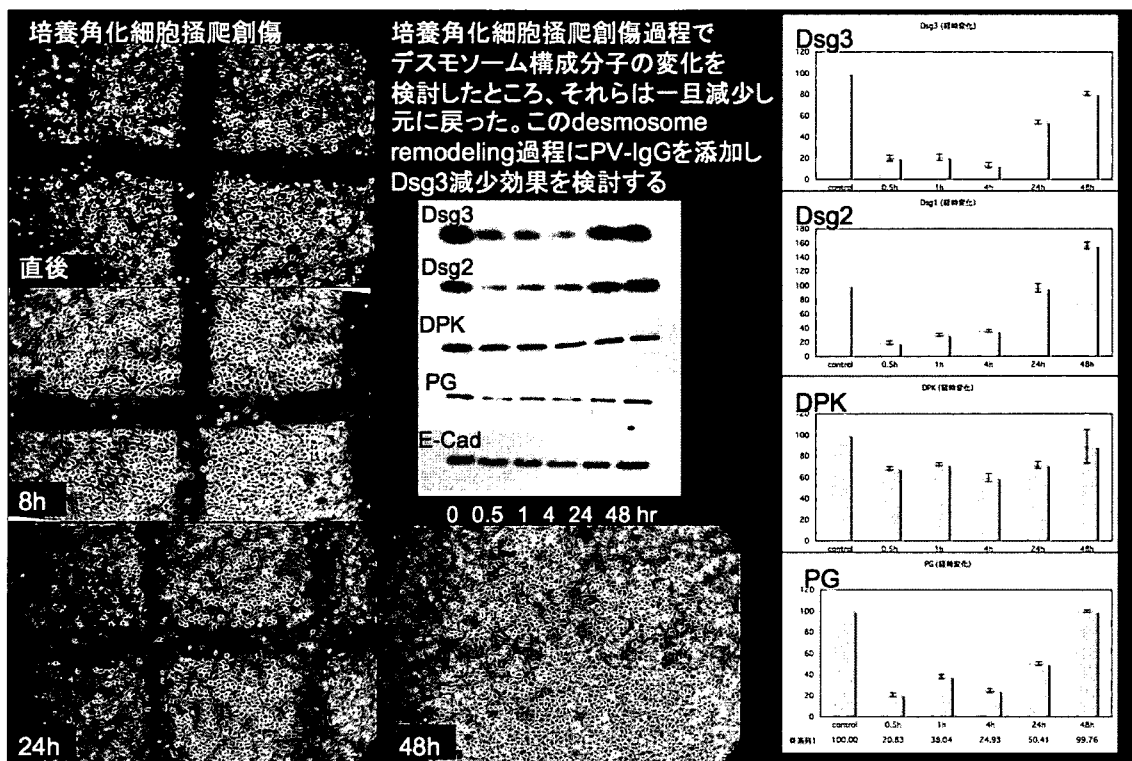


図1 培養表皮角化細胞 (DJM-1) に対する擦過創傷のデスモソーム構成分子の細胞内含有量に対する影響

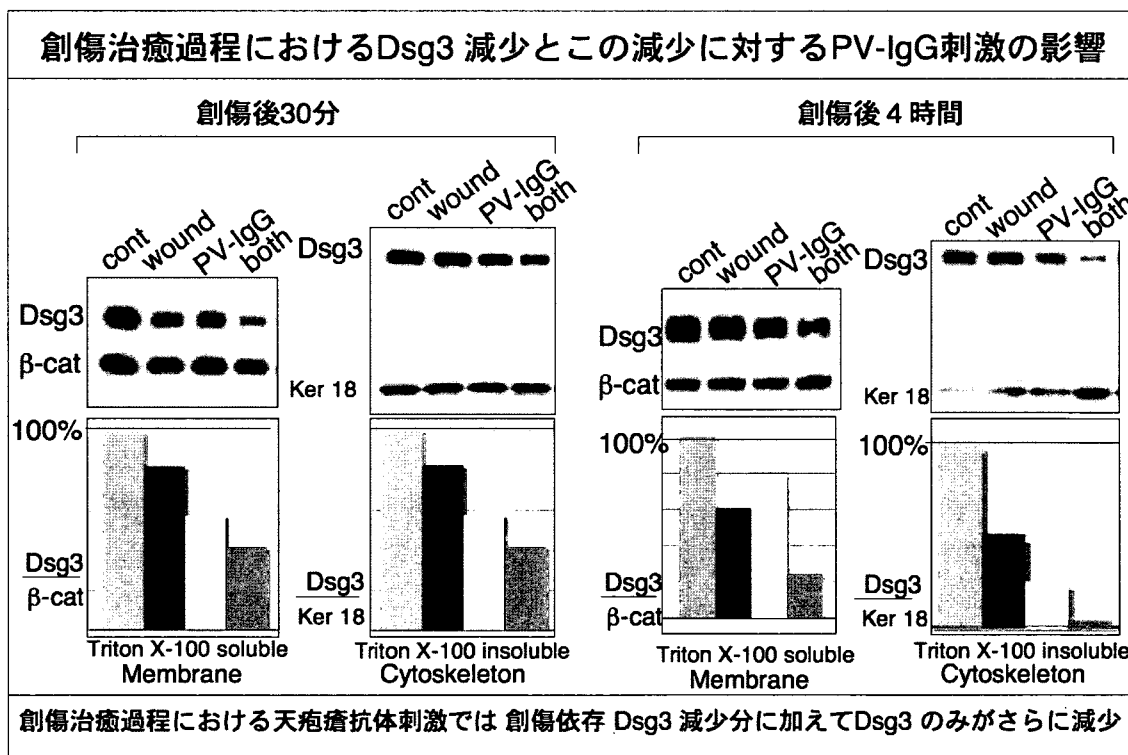


図2 培養表皮角化細胞 (DJM-1) に対する擦過創傷と尋常性天疱瘡抗体 (PV-IgG) のデスモグレイン3 (Dsg3) 含有量に対する影響。創傷および PV-IgG それぞれの単独刺激より、コンビネーション刺激の方がより顕著にDsg3減少効果を示した。

以上の結果は天疱瘡抗体は、Dsg3の減少が病原性に対応することと考え合わせると、テスモソームリモデリング時により病原性を発揮することを示唆している。

Pemphigus is a desmosome-remodeling disease.

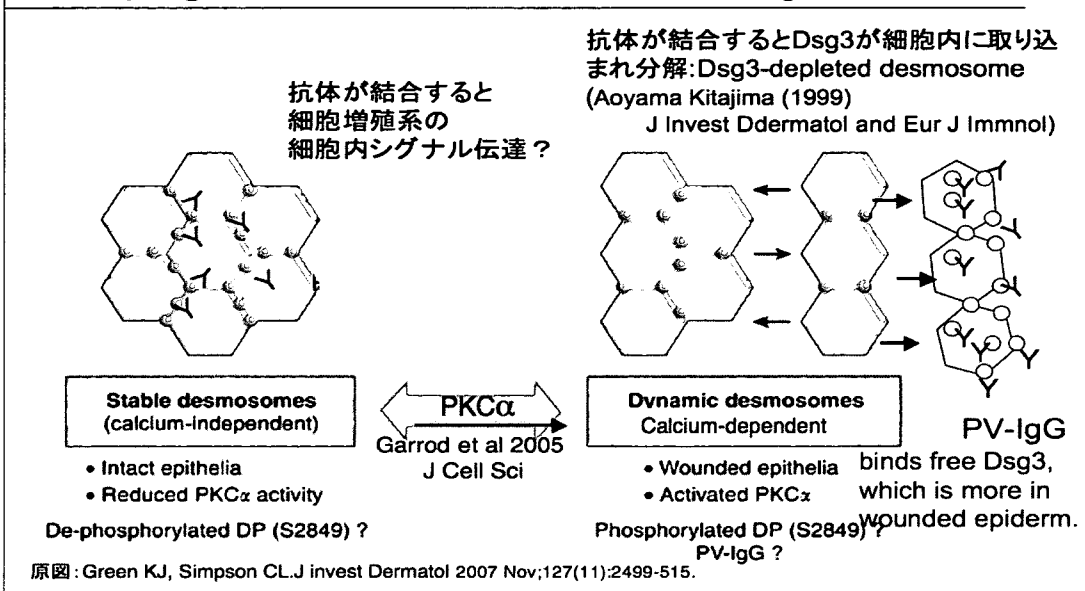


図3 天疱瘡抗体はCa⁺⁺依存性デスモソームにより感受性がある。長期コンフルエントケラチノサイト、インヒボでのケラチノサイトは低Ca⁺⁺培地に曝してもすぐにはデスモソームを乖離しないが、低Ca⁺⁺培地からシフト語数時間の細胞や、創傷治癒時のケラチノサイトのデスモソームはCa⁺⁺に感受性が高く低Ca⁺⁺培地で短時間で乖離する。この細胞葉より天疱瘡抗体に感受性がたかい。

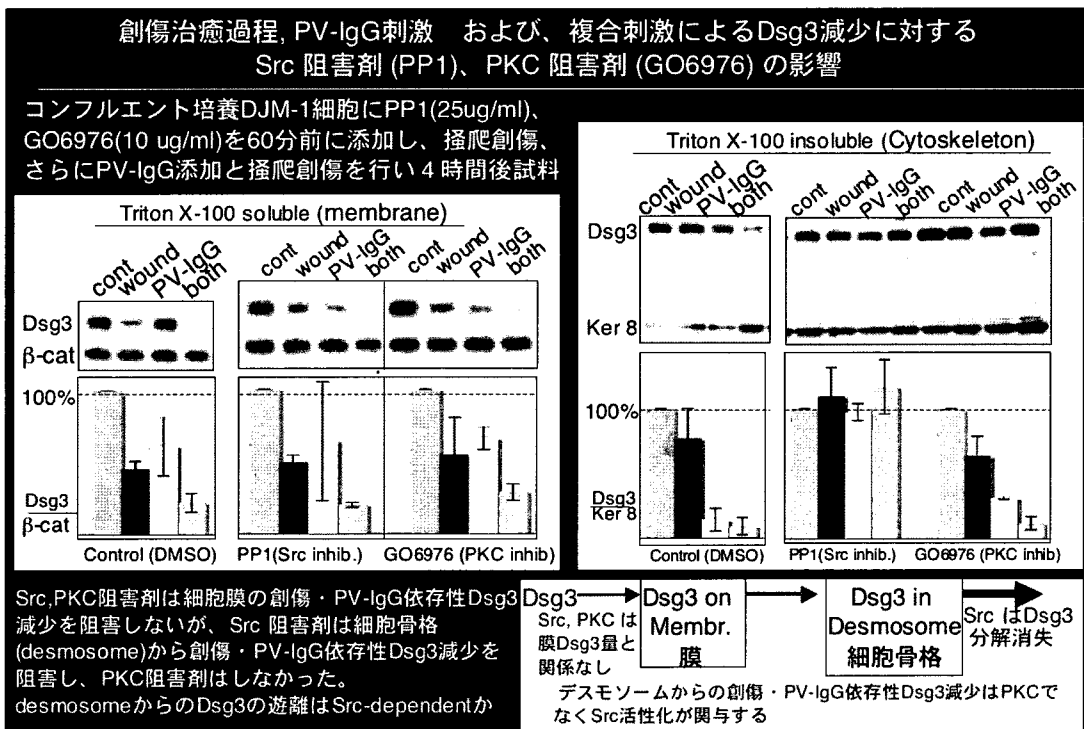


図2 培養表皮角化細胞 (DJM-1) に対する擦過創傷と尋常性天疱瘡抗体 (PV-IgG) のデスモグレイン 3 (Dsg3) 含有量に対する影響。創傷および PV-IgG それぞれの単独刺激より、コンビネーション刺激の方がより顕著に Dsg3 減少効果を示した。

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

天疱瘡における Th17 細胞の免疫組織化学的評価

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授

研究要旨 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関与するか、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。

共同研究者

大日輝記 久留米大学医学部
皮膚科学教室、講師
荒川正崇 久留米大学医学部
皮膚科学教室、助教

男性 8 例、女性 12 例
平均年齢 60 歳（30 歳～80 歳）
疾患の内訳は以下の通りであった。
尋常性天疱瘡 11 例
落葉状天疱瘡 7 例
落葉状天疱瘡と類天疱瘡の合併 1 例
腫瘍随伴性類天疱瘡 1 例
厚生労働省診断基準における重症度スコアによる分類は以下の通りであった。
軽症 8 例、中等症 2 例、重症 3 例、不明 7 例

A. 研究目的

2006 年、これまで Th1 型の免疫応答の結果だと考えられていた病態で、インターロイキン (IL)-17 が重要な役割を果たしていることが示され、Th17=自己免疫疾患の病態に関与する独立したヘルパー T リンパ球集団として提唱された⁽¹⁻⁶⁾。

一方、IL-17 は、Th2 型の病態とされる気管支喘息においても、病初期の反応に深く関わっていることが知られている^(7, 8)。

これまで、ヒトの自己免疫性水疱症の病態に Th17 が関与するかどうかを検討した報告はない。

今回、我々は、Th17 が自己免疫性水疱症の病態に関与するかどうかを明らかにする目的で、まず天疱瘡を対象に、病変部のサイトカイン環境を免疫組織化学で評価した。

B. 研究方法

1) 対象症例

天疱瘡 20 例を対象にした。
患者背景は以下の通りであった。

2) 検体の採取および保存

急性期かつ治療前の病態を評価する目的で、初診時に病変部より得られた患者保存凍結標本を用いた。標本は評価するまで -80°C で保存した。

3) 免疫組織化学

IL-17, Foxp3 (調節性 T リンパ球; Treg のマーカー) および CD4 の免疫組織化学染色を行った。

4) 評価

各々、2 枚の切片上の陽性リンパ球を算定し、CD4 陽性リンパ球に対する百分率で表した。有意差検定は unpaired t test で行った。相関の評価は Spearman's rank correlation coefficient で行った。

C. 研究結果

1) 免疫染色組織像

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。

2) Th17, Treg の定量的評価

CD4 陽性細胞に対する IL-17 陽性細胞の割合は、尋常性天疱瘡で 5.2%、落葉状天疱瘡で 1.8%であった。落葉状天疱瘡に比べ、尋常性天疱瘡で有意に高率に IL-17 陽性細胞を認めた (図 1、左)。

CD4 陽性細胞に対する Foxp3 陽性細胞の割合は、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡共約 20%で、両者の間に有意差はなかった (図 1、右)。

尋常性天疱瘡は落葉状天疱瘡より浸潤細胞が多い傾向にあった。Th17 細胞の差が、疾患の違いによるものか、単に浸潤細胞数に相関した結果なのか検証した。浸潤細胞数と Th17, Treg の割合に相関はなかった (図 2)。

落葉状天疱瘡と類天疱瘡の合併例、腫瘍随伴性天疱瘡の各 1 例で、Th17, Treg とも極めて高率に認めた。

3) 重症度との相関

Th17, Treg とも、それぞれの割合と重症度との間に相関はなかった (図 3)。また、抗デスマグレイン 1, デスマグレイン 3 抗体の抗体価との間にも相関はなかった (図 4)。

D. 考察

自己免疫性水疱症で IL-17 に注目した評価が行われたのは今回が初めてである。我々はすでに、類天疱瘡でも同様に、局所に IL-17 産生細胞が存在することを確認している (未発表)。

Th17 は、自己免疫性脳炎モデルマウスで病態の誘発に不可欠な T 細胞集団として提唱された^(1, 2)。さらに、多発性硬化症、炎症性腸疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患でも、病態形成に深く関与していることが次第に明らかになりつつある⁽³⁻⁶⁾。

IL-17 は、Th17 として認知される以前から、気管支喘息における顆粒球の遊走及び組織傷害にはたらくサイトカインとして報告されていた^(5, 7, 8)。その他、Citrobacter, Klebsiella 等の細胞外細菌や真菌に対する感染防御の局面における機能、粘膜保護の恒常性維持、創傷治癒における修復機能等が報告されている^(5, 6)。

制御性 T リンパ球 (Treg) は、末梢におけるトレランスの形成や免疫応答の終息等、免疫の恒常性維持に機能する細胞集団と考えられている⁽⁹⁾。特に、自己免疫疾患では、Treg の相対的機能低下が自己免疫を発症させるとの仮説がある。Treg と Th17 の誘導には、どちらも TGF- β が不可欠であり、IL-6 の存在下では Th17 に、非存在下では Treg に分化する^(5, 6)。Th1/Th2 のように、互いが抑制し合う働きは示されていないものの、少なくともある種の自己免疫状態で、Th17 が病気を悪化させ、Treg が病気を抑えるという、相反する作用を持つことは想定される。

過去に、尋常性天疱瘡では末梢血で CD4⁺ CD25^{high} 細胞 (Treg) が消失するとの報告がある⁽¹⁰⁾。しかし、今回の結果を見る限り、局所の Treg は消失しないので、血中の消失は末梢からの消失と等価ではなく、発症を一元的に説明できない。一方、尋常性天疱瘡の局所で Th17 が増えるのは、血中 Treg の消失と関係があるかもしれない。

今回の評価では、局所の Th17 の割合は病勢を反映しなかった。この結果を受け、天疱瘡の局所での Th17 の存在意義について、以下の 3 つを考える。

第 1 に、Th17 が病気のイニシエーターであり、量依存的ではないが疾患の発動に関与する可能性がある。天疱瘡は、これまで Th17 の関与が知られている多発性硬化症や炎症性腸疾患等の細胞性自己免疫疾患と異なり、液性自己免疫疾患である。細胞性自己免疫疾患においてさえ、Th17 がト

レランスの破綻に關与する機序は明らかではない。細胞性にせよ液性にせよ、自己免疫の発動には、ヘルパーTリンパ球のトレランスの破綻が不可欠である。ごく病初期の局所で、細胞性自己免疫と同じ未知の機序で、自己免疫のイニシエーターとして機能している可能性はある。Th17は、上皮の自然免疫と関連深いため、この方面での研究の進展が期待される。なおこの仮説では、病変形成後に浸潤してくるTh17は、表皮傷害には積極的に機能していないと予想される。

2番目は、Th17が局所でのエフェクターとして、病態形成に係わっている可能性である。自己抗体産生Bリンパ球の活性化の場は1次リンパ組織であり、皮膚に局在するヘルパーTリンパ球が、自己抗体産生に直接關与することはないと思われる。一方、自己抗体の存在が天疱瘡の誘導に必要十分であることは移入実験等で証明済みであるが、実際の疾患で、局所のヘルパーTリンパ球が、顆粒球などを介して病態形成に關与する可能性は否定できない。しかしながら、今回の結果を見る限り、皮膚に局在するTh17が直接のエフェクターである可能性は低いと思われる。

第3に、Th17が病氣のエフェクターではなく、表皮損傷に対する修復的反應を担っている可能性がある。局所での表皮の傷害に引き続いて起こった、比較的自然免疫に近い非特異的な修復的炎症の結果である可能性はある。

本研究はいくつかの課題を残している。①Th17が、落葉状天疱瘡より尋常性天疱瘡で高率にみられる理由は不明である。両疾患の違いは、自己抗体のリガンドとなる分子の表皮内での局在の違いで説明されてきたが、それ以外の違いを示唆する報告もみられ、検討の余地がある⁽¹⁰⁾。②局所のIL-17産生リンパ球が本当にCD4⁺ヘルパーTリンパ球であることを確認する必要がある。筆者らは免疫2重染色を試みたが十

分な評価ができなかった。③局所のTh17の出現時期と自己反応性は興味のあるところである。Th17が末梢トレランスの破綻に關与するか、またDsg1/Dsg3自己反応性Tリンパ球がIL-17を産生するかどうかは、天疱瘡モデルマウスの系で次第に明らかにできるだろう。

E. 結論

Th17は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可能性が示された。

F. 参考文献

1. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441:231-4.
2. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441:235-8
3. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116:1310-6
4. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116:1218-22.
5. Weaver CT, Hatton RD, Mangan

- PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821-52
6. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13:139-4
 7. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21:467-76
 8. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1265-73
 9. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-62
 10. Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N, Kawamura T, Kitamura R, Ando N, Shimada S. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. *Dermatology* 2007; 214:210-20.
- Yasumoto S, Hashimoto T: Psoriasis vulgaris and psoriasis pustulosa associated with palmoplantar pustulosis. Proceedings for the 15th Annual Meeting for the Japanese Society for Psoriasis Research, Fukushima, Japan, September 8-9, 2000, pp62-63
3. Maruyama H, Kawachi Y, Fujisawa Y, Itoh S, Furuta J, Ishii Y, Takahashi T, Hashimoto T, Otsuka F: IgA/IgG pemphigus positive for anti-desmoglein 1 autoantibody. **Eur J Dermatol.** 17(1):94-95, 2007
 4. Pastar Z, Rados J, Lipozencic J, Dobric I, Marinovic B, Ishii N, Hashimoto T: Case of concurrent epidermolysis bullosa acquisita and anti-p200 pemphigoid - how to treat it? **Int J Dermatol** 46(3):295-298, 2007
 5. Sugita K, Kabashima K, Nishio D, Hashimoto T, Tokura Y: Th2 cell fluctuation in association with reciprocal occurrence of bullous pemphigoid and psoriasis vulgaris, **J Eur Acad Dermatol Venereol** 21(4):569-570, 2007
 6. Yamane N, Sawamura D, Nishie W, Abe M, Kodama K, Adachi K, Nakamura H, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu H: Anti-p200 pemphigoid in a 17-year-old girl successfully treated with systemic corticosteroid and dapsone. **Br J Dermatol** 156(5):1075-1078, 2007
 7. Ishii N, Kusuhara M, Yasumoto S, Hashimoto T: Adenoma of the nipple in a Japanese man, **Clin Exp Dermatol** 32(4):448-449, 2007
 8. Yoneda K, Yokoi I, Demitsu T, Matsuda Y, Matsuoka Y, Miyamoto

G. 健康危険情報

該当なし。

H. 研究発表（平成19年度）

1. 論文発表
1. Dilling A, Rose C, Hashimoto T, Zillikens D, Shimanovich I: Anti-p200 pemphigoid: A novel autoimmune subepidermal blistering disease. **J Dermatol** 34(1):1-8, 2007
2. Ono F, Hirota K, Morita M,

- I, Moriue T, Nakai K, Nibu N, Hashimoto T, Kubota Y: Localized linear IgA disease showing contact dermatitis-like eruption **Eur J Dermatol** 17(4):340-341, 2007
9. Fukiwake N, Moroi Y, Urabe K, Ishii N, Hashimoto T, Furue M: Detection of autoantibodies to desmoplakin in a patient with oral erythema multiforme. **Eur J Dermatol** 17(3):238-241, 2007
 10. Izumi R, Fujimoto M, Yazawa N, Nakashima H, Asahina N, Watanabe R, Kuwano Y, Kurokawa M, Hashimoto T, Tamaki K: Bullous pemphigoid positive for anti-BP180 and anti-laminin 5 antibodies in a patient with graft-vs-host disease. **J Am Acad Dermatol** 56(5 Suppl):S94-97, 2007
 11. Taintor A, Leiferman KL, Hashimoto T, Zone JJ, Hull CM: A novel case of IgA paraneoplastic pemphigus associated with chronic lymphocytic leukemia, **J Am Acad Dermatol** 56(5 Suppl):S73-76, 2007
 12. Kowalewski C, Hamada T, Wozniak K, Kawano Y, Szczecinska W, Yasumoto S, Schwartz RA, Hashimoto T: A novel autosomal partially dominant mutation designated G476D in the keratin 5 gene causing epidermolysis bullosa simplex Weber-Cockayne type: A family study with a genetic twist. **Int J Mol Med** 20(1):75-8, 2007
 13. Hamada T, Kimura Y, Hayashi S, Nakama T, Hashimoto T: Hypereosinophilic syndrome with peripheral circulatory insufficiency and cutaneous microthrombi. **Arch Dermatol** 143(6):812-813, 2007
 14. Kohroh K, Suga Y, Mizuno Y, Ishii N, Hashimoto T, Ikeda S: Case of localized bullous pemphigoid with unique clinical manifestations in the lower legs. **J Dermatol** 34(7):482-5, 2007
 15. Hamada T, Yasumoto S, Karashima T, Ishii N, Shimada H, Kawano Y, Imayama S, McGrath JA, Hashimoto T: Recurrent p.N767S mutation in the ATP2A2 gene in a Japanese family with haemorrhagic Darier's disease clinically mimicking epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **Br J Dermatol** 157(3):605-608, 2007
 16. Fukumoto T, Shiroyama Y, Niizeki H, Kobayashi N, Asada H, Ishii N, Hashimoto T, Miyagawa S: Paraneoplastic pemphigus presenting as erythrodermic lichenoid dermatitis with concomitant features of pemphigus foliaceus. **J Dermatol** 34:645-649, 2007/09/16
 17. Kakurai M, Demitsu T, Azuma R, Yamada T, Suzuki M, Yoneda K, Ishii N, Hashimoto T: Localized pemphigoid (pretibial type) with IgG antibody to BP180 NC16a domain successfully treated with minocycline and topical corticosteroid. **Clin Exp Dermatol** 32(6):759-761, 2007
 18. Dainichi T, Ueda S, Furue M, Hashimoto T: By the grace of peeling: the brace function of the stratum corneum in the protection from photo-induced keratinocyte carcinogenesis. **Arch Dermatol Res**. 2007; [Epub ahead of print]
 19. Nakama T, Ishii N, Ono F,

- Hamada T, Yasumoto S, Hashimoto T: Efficacy of interferon-gamma in patients with refractory bullous pemphigoid. **J Dermatol** 34(11):737-45, 2007
20. Nakajima K, Hashimoto T, Nakajima H, Yokogawa M, Ikeda M, Kodama H: IgG/IgA pemphigus with dyskeratotic acantholysis and intraepidermal neutrophilic microabscesses. **J Dermatol** 34(11):757-60, 2007
21. Hamada T, Inoue Y, Nakama T, Hashimoto T: A case of zosteriform pigmented purpuric dermatosis. **Arch Dermatol** 143(12):1599-1600, 2007
22. Hamada T, Sandilands A, Fukuda S, Sakaguchi S, Ohyama B, Yasumoto S, McLean WH, Hashimoto T: De Novo Occurrence of the Filaggrin Mutation p.R501X with Prevalent Mutation c.3321 delA in a Japanese Family with Ichthyosis Vulgaris Complicated by Atopic Dermatitis. **J Invest Dermatol**. 2007 Nov 15; [Epub ahead of print]
23. Demitsu T, Hashimoto T et al: Localized pemphigoid (Brunsting-Perry type) with IgG antibody to BP180 NC16a domain resembling lupus erythematosus successfully treated with topical tacrolimus therapy, **J Eur Acad Dermatol venereal**, in press
24. Murrel D, Hashimoto T, Werth V et al: Consensus Statement on Definitions of Disease Endpoints and Therapeutic Response for Pemphigus, **J Am Acad Dermatol**, in press
2. 学会発表
 荒川正崇、大日輝記、橋本隆. 天疱瘡における Th17 の免疫組織化学的評価. 第11回九州基礎皮膚科研究会、2007年12月8日、福岡市.
- I. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
 特になし
2. 実用新案登録
 特になし
3. その他
 特になし

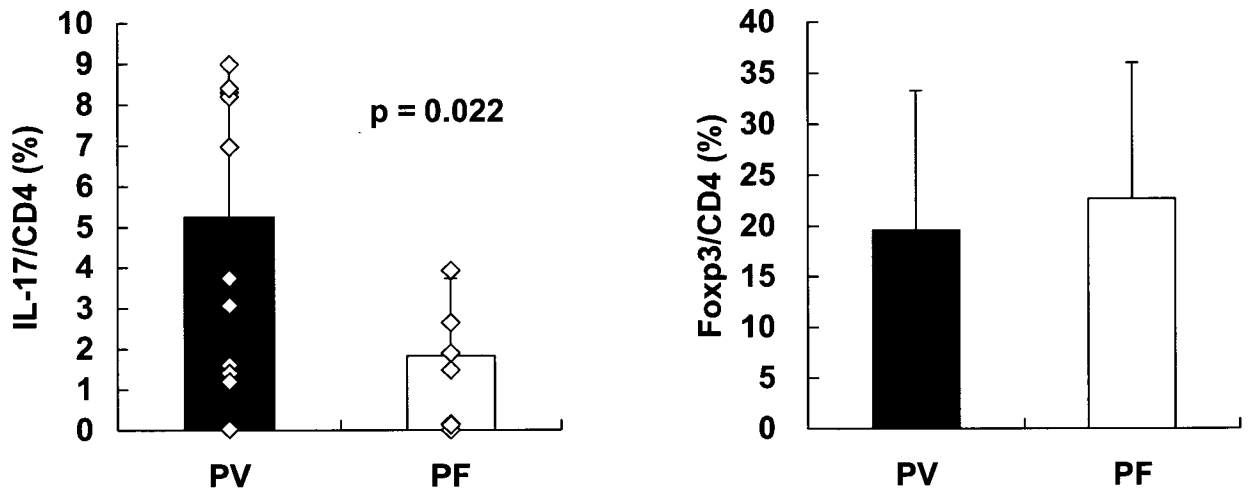


図1 尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡の局所での Th17, Treg の割合

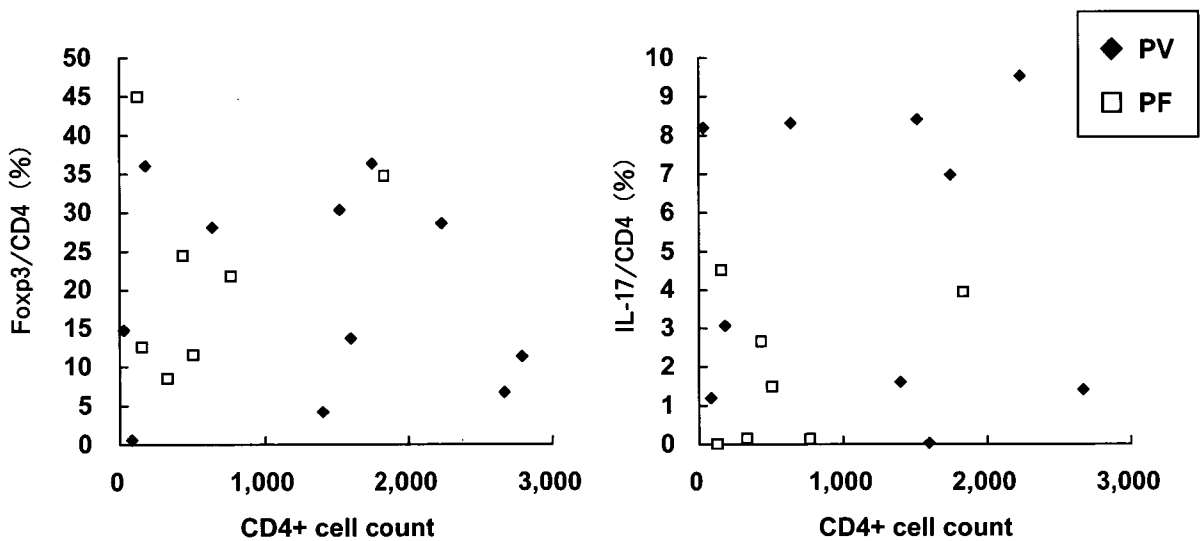


図2 IL-17, Foxp3 陽性率と浸潤細胞数との関係

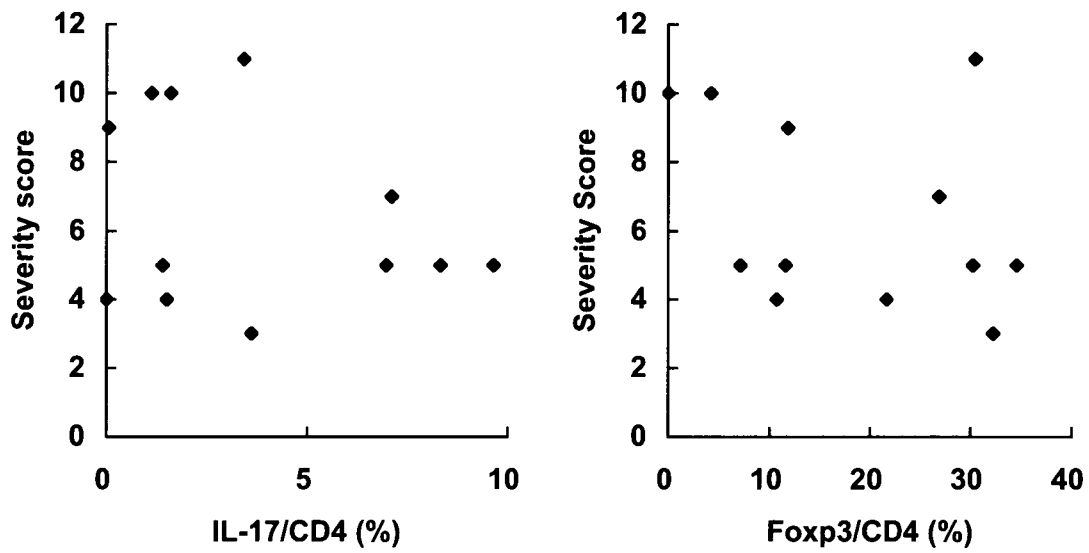


図3 IL-17, Foyp3 陽性率と重症度との関係

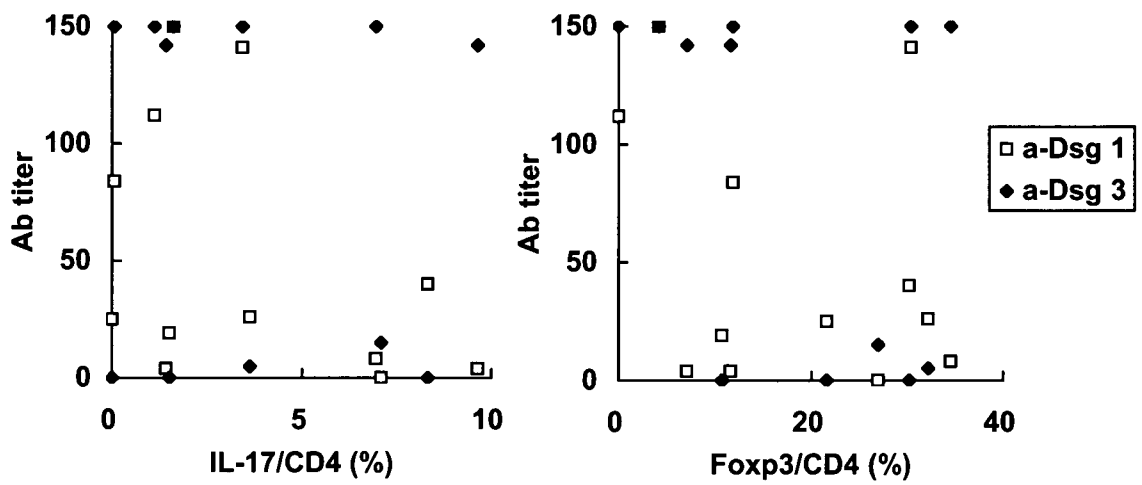


図4 IL-17, Foyp3 陽性率と自己抗体価との関係

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

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

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授

研究要旨 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。

共同研究者

大山 文悟 久留米大学医学部皮膚科学
教室 助教

安元慎一郎 久留米大学医学部皮膚科学教
室 准教授

天谷 雅行 慶応義塾大学皮膚科学教室
教授

A. 研究目的

天疱瘡の病勢のモニタリングには、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（以下 PV）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。

B. 研究方法

1. 患者内訳：

今回経験した 5 症例は、天疱瘡の重症度判定基準に当てはめると、抗体価が高いために判定スコアが 6 点以上となり中等症と判断される場合もあり、本研究では寛解期とは PSL 5mg/day 以下の内服で皮疹が出現していない、あるいは出てもごくまれ

である症例と定義した。

患者内訳は、粘膜皮膚型 PV4 例と、粘膜優位型 PV1 例である。

2. ELISA 法による true Dsg ELISA index の測定：

Dsg3 true index value を測定したところ、10 血清はすべて活動期、寛解期ともに高値であった。寛解期の Dsg3 ELISA の抗体価に注目すると、5 症例中 3 症例は病勢と Dsg3 ELISA は相関していた。一方、症例 4 と症例 5 においては、寛解期のほうが活動期よりも index 値が高値を示し、病勢との解離がみられた（図 1）。

3. 蛍光抗体間接法（IIF）：

IIF は 5 症例すべて IgG 抗表皮細胞抗体が陽性であった（図 1）。

4. ヒト表皮抽出液を用いた免疫ブロット法

ヒト表皮抽出液を用いた免疫ブロット法を施行した。5 症例すべてにおいて、活動期、寛解期に Dsg3 抗原蛋白に反応する IgG 抗体が検出された。粘膜皮膚型 PV に関しては、いずれの血清も Dsg1 抗原蛋白に反応する IgG 抗体は検出されなかった（図 2）。

5. 抗 Dsg3 IgG 抗体のエピトープ解析

5 症例について抗 Dsg3 IgG 抗体が認識するエピトープの解析を行った。われわ

これは、共同研究者の慶応義塾大学医学部皮膚科学教室の天谷らと共に、Dsg2 を認識する自己抗体が天疱瘡患者血清中には存在しないという事実を用いて新規スワッピング分子の作製を試みた。すなわち、Dsg2 の細胞外領域の各ドメインを Dsg3 の細胞外領域の各ドメインに置換した Dsg3/Dsg2 のスワッピング分子をバキュロウイルス発現系を用いて作製した。そのスワッピング分子を用いた免疫沈降法により抗 Dsg3 IgG 抗体を持つ PNP 患者のエピトープ解析を行った。

5 症例の患者血清10検体のすべてが、組み換え Dsg3 と反応したのに対し、組み換え Dsg2 と反応する血清は認められなかった。

次に、Dsg3 ELISA index が相関していた 3 症例、6 血清においては、その抗 Dsg3 IgG 自己抗体が認識するエピトープは活動期、寛解期ともに、Dsg3 の EC1 から EC3 領域に認められ、エピトープに変動はみられなかった (図 3)。

一方、病勢と Dsg3 ELISA index が分離していた、症例 4 と症例 5 についても同様に解析を行った。

症例 4 では、活動期には抗 Dsg3 IgG 抗体のエピトープが Dsg3 の EC1 と EC2 領域に局限していたのに対し、寛解期にはそのエピトープの分布が EC3、EC4 領域へと広がった。

症例 5 では活動期には、エピトープが EC1 と EC2 領域に局限していたが、寛解期には EC3、EC4 領域に広がった。

以上より、2 症例では活動期と寛解期における抗 Dsg3 IgG 抗体が認識するエピトープに変動がみられた (図 4)。

C. 結論

本研究より、PVの病勢とは抗体価だけでなく、抗Dsg3 IgG自己抗体が認識するエピトープ、またそのエピトープの組み合わせにより規定されるのではないかと推測

された。今後も症例の蓄積、解析が必要であると思われる。

参考文献

- (1) Cheng SW; Br J Dermatol 147(2): 261-265, 2002

D. 健康危険情報

該当なし。

E. 研究発表 (平成19年度)

2. 論文発表

英語論文

1. Dilling A, Rose C, Hashimoto T, Zillikens D, Shimanovich I: Anti-p200 pemphigoid: A novel autoimmune subepidermal blistering disease. **J Dermatol** 34(1):1-8, 2007
2. Ono F, Hirota K, Morita M, Yasumoto S, Hashimoto T: Psoriasis vulgaris and psoriasis pustulosa associated with palmoplantar pustulosis. Proceedings for the 15th Annual Meeting for the Japanese Society for Psoriasis Research, Fukushima, Japan, September 8-9, 2000, pp62-63
3. Maruyama H, Kawachi Y, Fujisawa Y, Itoh S, Furuta J, Ishii Y, Takahashi T, Hashimoto T, Otsuka F: IgA/IgG pemphigus positive for anti-desmoglein 1 autoantibody. **Eur J Dermatol**. 17(1):94-95, 2007
4. Pastar Z, Rados J, Lipozencic J, Dobric I, Marinovic B, Ishii N, Hashimoto T: Case of concurrent epidermolysis bullosa acquisita and anti-p200 pemphigoid - how to treat it? **Int J Dermatol** 46(3):295-298, 2007
5. Sugita K, Kabashima K, Nishio D, Hashimoto T, Tokura Y: Th2 cell

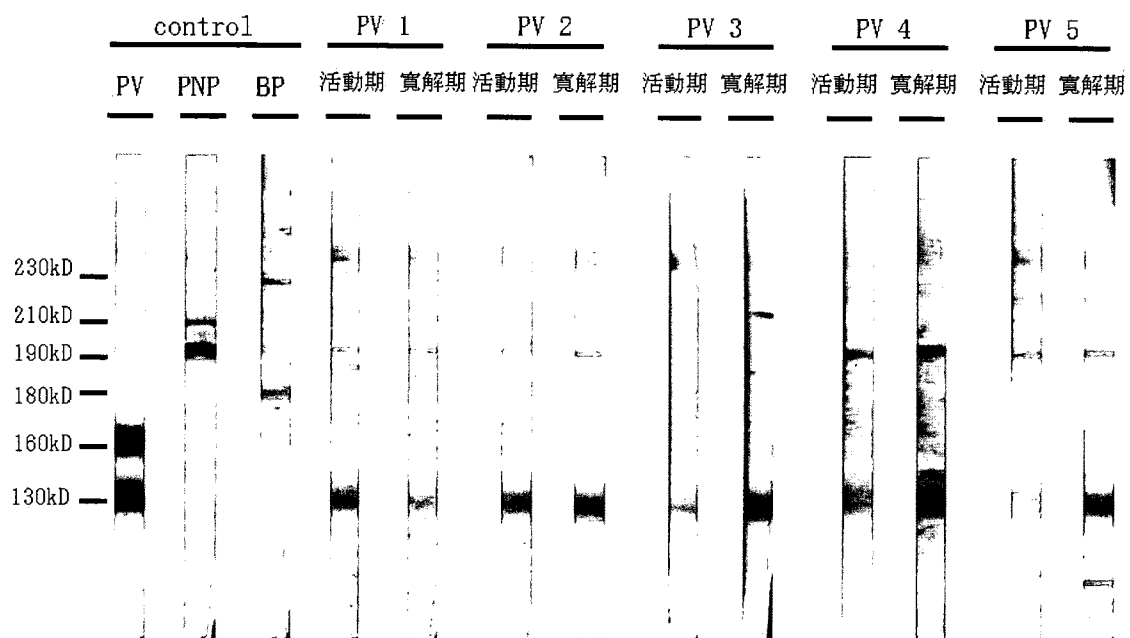
- fluctuation in association with reciprocal occurrence of bullous pemphigoid and psoriasis vulgaris, **J Eur Acad Dermatol Venereol** 21(4):569-570, 2007
6. Yamane N, Sawamura D, Nishie W, Abe M, Kodama K, Adachi K, Nakamura H, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu H: Anti-p200 pemphigoid in a 17-year-old girl successfully treated with systemic corticosteroid and dapsone. **Br J Dermatol** 156(5):1075-1078, 2007
 7. Ishii N, Kusahara M, Yasumoto S, Hashimoto T: Adenoma of the nipple in a Japanese man, **Clin Exp Dermatol** 32(4):448-449, 2007
 8. Yoneda K, Yokoi I, Demitsu T, Matsuda Y, Matsuoka Y, Miyamoto I, Moriue T, Nakai K, Nibu N, Hashimoto T, Kubota Y: Localized linear IgA disease showing contact dermatitis-like eruption **Eur J Dermatol** 17(4):340-341, 2007
 9. Fukiwake N, Moroi Y, Urabe K, Ishii N, Hashimoto T, Furue M: Detection of autoantibodies to desmoplakin in a patient with oral erythema multiforme. **Eur J Dermatol** 17(3):238-241, 2007
 10. Izumi R, Fujimoto M, Yazawa N, Nakashima H, Asahina N, Watanabe R, Kuwano Y, Kurokawa M, Hashimoto T, Tamaki K: Bullous pemphigoid positive for anti-BP180 and anti-laminin 5 antibodies in a patient with graft-vs-host disease. **J Am Acad Dermatol** 56(5 Suppl):S94-97, 2007
 11. Taintor A, Leiferman KL, Hashimoto T, Zone JJ, Hull CM: A novel case of IgA paraneoplastic pemphigus associated with chronic lymphocytic leukemia, **J Am Acad Dermatol** 56(5 Suppl):S73-76, 2007
 12. Kowalewski C, Hamada T, Wozniak K, Kawano Y, Szczecinska W, Yasumoto S, Schwartz RA, Hashimoto T: A novel autosomal partially dominant mutation designated G476D in the keratin 5 gene causing epidermolysis bullosa simplex Weber-Cockayne type: A family study with a genetic twist. **Int J Mol Med** 20(1):75-8, 2007
 13. Hamada T, Kimura Y, Hayashi S, Nakama T, Hashimoto T: Hypereosinophilic syndrome with peripheral circulatory insufficiency and cutaneous microthrombi. **Arch Dermatol** 143(6):812-813, 2007
 14. Kohroh K, Suga Y, Mizuno Y, Ishii N, Hashimoto T, Ikeda S: Case of localized bullous pemphigoid with unique clinical manifestations in the lower legs. **J Dermatol** 34(7):482-5, 2007
 15. Hamada T, Yasumoto S, Karashima T, Ishii N, Shimada H, Kawano Y, Imayama S, McGrath JA, Hashimoto T: Recurrent p.N767S mutation in the ATP2A2 gene in a Japanese family with haemorrhagic Darier's disease clinically mimicking epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **Br J Dermatol** 157(3):605-608, 2007
 16. Fukumoto T, Shiroyama Y, Niizeki H, Kobayashi N, Asada H, Ishii N, Hashimoto T, Miyagawa S: Paraneoplastic pemphigus presenting as erythrodermic lichenoid dermatitis with concomitant

- features of pemphigus foliaceus. **J Dermatol** 34:645-649, 2007/09/16
17. Kakurai M, Demitsu T, Azuma R, Yamada T, Suzuki M, Yoneda K, Ishii N, Hashimoto T: Localized pemphigoid (pretibial type) with IgG antibody to BP180 NC16a domain successfully treated with minocycline and topical corticosteroid. **Clin Exp Dermatol** 32(6):759-761, 2007
 18. Dainichi T, Ueda S, Furue M, Hashimoto T: By the grace of peeling: the brace function of the stratum corneum in the protection from photo-induced keratinocyte carcinogenesis. **Arch Dermatol Res**. 2007; [Epub ahead of print]
 19. Nakama T, Ishii N, Ono F, Hamada T, Yasumoto S, Hashimoto T: Efficacy of interferon-gamma in patients with refractory bullous pemphigoid. **J Dermatol** 34(11):737-45, 2007
 20. Nakajima K, Hashimoto T, Nakajima H, Yokogawa M, Ikeda M, Kodama H: IgG/IgA pemphigus with dyskeratotic acantholysis and intraepidermal neutrophilic microabscesses. **J Dermatol** 34(11):757-60, 2007
 21. Hamada T, Inoue Y, Nakama T, Hashimoto T: A case of zosteriform pigmented purpuric dermatosis. **Arch Dermatol** 143(12):1599-1600, 2007
 22. Hamada T, Sandilands A, Fukuda S, Sakaguchi S, Ohyama B, Yasumoto S, McLean WH, Hashimoto T: De Novo Occurrence of the Filaggrin Mutation p.R501X with Prevalent Mutation c.3321 delA in a Japanese Family with Ichthyosis Vulgaris Complicated by Atopic Dermatitis. **J Invest Dermatol**. 2007 Nov 15; [Epub ahead of print]
 23. Demitsu T, Hashimoto T et al: Localized pemphigoid (Brunsting-Perry type) with IgG antibody to BP180 NC16a domain resembling lupus erythematosus successfully treated with topical tacrolimus therapy, **J Eur Acad Dermatol venereal**, in press
 24. Murrel D, Hashimoto T, Werth V et al: Consensus Statement on Definitions of Disease Endpoints and Therapeutic Response for Pemphigus, **J Am Acad Dermatol**, in press
2. 学会発表
 1. 68th Annual meeting of the Society for Investigative Dermatology (9-12, May, 2007, Los Angeles, USA):Bungo Ohyama^{1)· 2)}, Norito Ishii²⁾, Koji Nishifuji¹⁾, Takashi Hashimoto²⁾, Masayuki Amagai¹⁾: “Desmocollin 1 immunoreactivity in IgA pemphigus.”
 2. 第29回水疱症研究会 (平成19 (2007) 年10月14日、岡山県倉敷市)

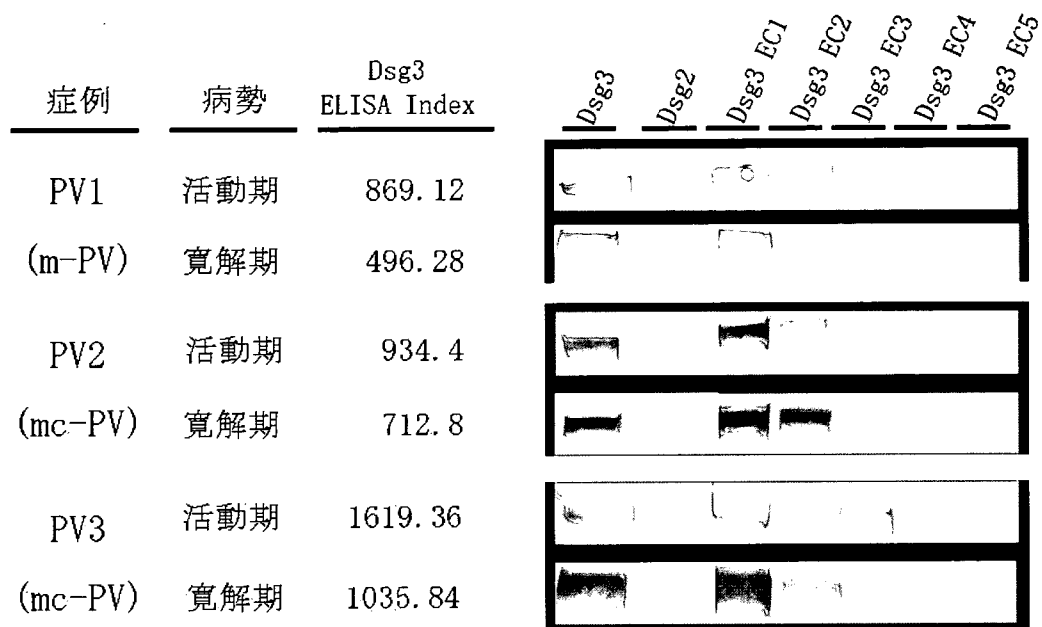
「寛解期に抗 Dsg3 IgG 自己抗体価が高値であった尋常性天疱瘡患者血清の抗原抗体解析」大山文悟、安元慎一郎、橋本 隆
- F. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当なし。

症例	Dsg index value			IIF
	Dsg3		Dsg1	抗表皮細胞膜抗体
	活動期	寛解期	寛解期	寛解期
PV 1 (m-PV)	869.12	496.28	-	40x
PV 2 (mc-PV)	934.4	712.8	<5	>160x
PV 3 (mc-PV)	1619.36	1035.84	7	>640x
PV 4 (mc-PV)	117.85	1568.64	未施行	40x
PV 5 (mc-PV)	348.96	1019.68	<5	>160x

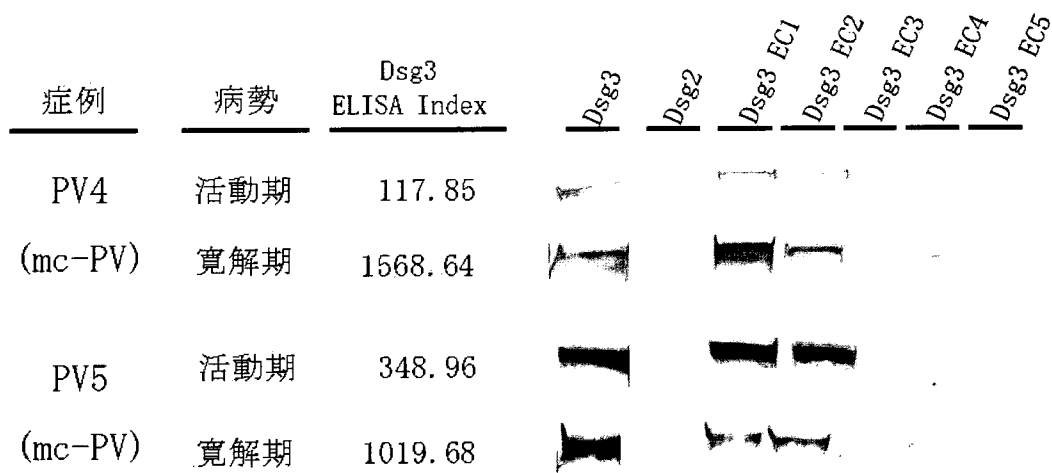
(図 1)



(図 2)



(図 3)



(図 4)