

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

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 尋常性天疱瘡（PV）において病態と関連する抗デスマグレイン3（Dsg3）抗体の産生には 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。そこで、我々は Dsg3^{-/-}マウスを用いた PV モデルマウスを利用することで PV の病態を誘導する病原性を持った Dsg3 反応性T細胞の特性を明らかにすることを目的としている。昨年度は、Dsg3 反応性T細胞15株を樹立し、Dsg3^{-/-}B細胞とともに Rag2^{-/-}マウスへ移植することにより、その *in vivo* における病原性を評価する系を確立した。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-4R α 、sIL-10R α 、sIFN- γ R1 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-4R α 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。

研究協力者

桑名正隆 慶應義塾大学医学部内科准教授
高橋勇人 慶應義塾大学医学部皮膚科准教授

A. 研究目的

尋常性天疱瘡（PV）は皮膚粘膜上皮細胞に対する自己免疫疾患で、デスマグレイン3（Dsg3）に対する自己抗体によりその病態が誘導される⁽¹⁾。抗 Dsg3 抗体のアイソタイプは主に IgG4 であり⁽²⁾、その塩基配列には突然変異の存在が確認されている⁽³⁾。また、抗 Dsg3 抗体産生と特定の HLA クラスIIアレルとの強い相関も報告されている⁽⁴⁾。これらの知見から、抗 Dsg3 抗体産生には抗原特異的な CD4⁺T細胞による

B細胞の活性化が不可欠と考えられる。これまで、PV 患者を対象とした Dsg3 反応性T細胞の解析が複数の研究グループにより行われてきたが、Dsg3 反応性T細胞が PV の病態に関与する“病原性”を有するかについてはいまだ明らかでない。最近、Amagai らは Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を免疫不全マウスに移植することで抗 Dsg3 抗体産生と PV 発現型を誘導できることを報告した⁽⁵⁾。そこで、我々は病原性を有する Dsg3 反応性T細胞の解析にこの PV モデルマウスの系を応用することを着想し、自己反応性T細胞の病原性を評価する系の確立を試みた。本研究は、1) Dsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスからの Dsg3 反応性T細胞クローンの樹立、2) T細胞クローン

の特性（抗原認識機構、サイトカイン産生能など）の解析、3) T細胞クローンを Dsg3^{-/-}マウス B細胞とともに Rag2^{-/-}マウスへ移入し、抗 Dsg3 抗体産生や PV 発現型による病原性の確認、の3段階から構成される。さらに、個々の Dsg3 反応性 T細胞クローンの特性と病原性を比較することで、病原性と関連する T細胞の因子（たとえば、特定の T細胞エピトープやサイトカイン産生能）が抽出できる。さらに本評価系を利用し、実際に抽出された因子の阻害効果を *in vivo* で評価し病原性規定因子を同定する。この病原性規定因子は PV に対する新しい治療標的となる可能性がある。本年度は、昨年度からさらに樹立 T細胞株を増やして20個とし、実際に病原性規定因子の同定を試みた。

B. 研究方法

1) コンビナントマウス (rm)Dsg3 の作成

2つの発現系でコンビナントマウス Dsg3 を作成した。バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞の培養系で mDsg3 の細胞外ドメインと E-tag、His-tag との融合タンパク (rmDsg3) を発現、精製した (図1)。高純度の抗原を得るため、His-tag と E-tag のアフィニティーによる精製を段階的に行った。また、大腸菌の発現系を用いて Dsg3 細胞外領域を10個以上のアミノ酸を重複した5つの mDsg3 断片 (rmDsg3-1~rmDsg3-5) に分割し、maltose-binding protein (MBP) との融合タンパクとして発現、精製した (図1)。それぞれの精製コンビナント蛋白の純度は SDS ポリアクリルアミド電気泳動後のクマシーブルー染色により評価した。

2) mDsg3 反応性 T細胞のクローニング

CFA 乳化した 10 μ g の rmDsg3 を Dsg3^{-/-}マウスの両足底に免疫した。1週間後に膝窩リンパ節と脾臓を摘出し、RPMI-1640内ですりつぶした。脾臓は ACK lysing buffer (BioWhittaker, Walkersville, ND)

を用いて溶血処理を行い、単核球を調製した。培地として1%の C56BL/6 由来血清を添加した RPMI-1640 を初回刺激時に用い、以後は10% FBS 添加 RPMI-1640 を用いた。まず Day0 に単核球 (3x10⁶cell/well) を24穴平底プレートにまき、5 μ g/ml の抗原 rmDsg3-1~5 を加えた。Day10 に凍結保存しておいた自己の脾細胞 (10⁶ cell/well) に X線照射 (40Gy) し、mDsg3-1~5 (各5 μ g/ml) とともに培養中に加えた。サイトカインとして Day3, 7, 10, 14, 17, に 1, 2, 5% T-STIMTM (Becton-Dickinson, Bedford, MA) を加えた。Day 21 に抗原特異的増殖反応を検討し、特異的な反応を示した株のみを限界希釈法に用いた。T細胞株は3~4日ごとのサイトカインの添加と10~14日ごとの抗原刺激により維持した。

3) TCRV β 遺伝子再構成の検出と各種サイトカインおよびケモカイン受容体遺伝子発現の解析

T細胞株を PMA (25ng/ml) とイオノマイシン (1 μ g/ml) 存在下で3日間培養後、CD4 および CD8 Dynabeads (DynaL biotech, Oslo, Norway) を用いて T細胞を回収した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA) を用いて total RNA を抽出し、AMV RTase XL (TAKARA, Japan) 存在下で cDNA を合成し、以下の PCR に用いた。TCRV β 遺伝子再構成の検出には23種の TCRV β 遺伝子特異的な5'側プライマーと共通する TCRC β 遺伝子に対応する3'側プライマーを用いた family PCR を行った。さらに PCR 産物の塩基配列を3100Genetic Analyzer (ABI PRISM) を用いて同定した。各種サイトカイン (IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TGF- β) およびケモカイン受容体 (CCR7、CCR4、CXCR5、CRTH2、CXCR3) の発現は特異的なプライマーを用いた PCR により解析した。

4) T細胞株の病原性の検討

培養T細胞株(1x10⁶個)をDsg3^{-/-}B細胞(5x10⁶個)とともにRag2^{-/-}マウスに移植し、抗Dsg3抗体産生と皮膚粘膜に生じるPV発現型により病原性を調べた。Dsg3^{-/-}B細胞はPVモデルマウス作成法に準じて免疫したDsg3^{-/-}マウス脾細胞からMACS CD4およびCD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany)を用いてT細胞を除去した後にMACS B220 MicroBeadsにより得た。培養T細胞株は移植前にリンホセパールII (IBL, Japan)を用いた比重遠心法により死細胞を除去して使用した。陽性コントロールとして、培養T細胞株の代わりに脾臓からCD4およびCD8 MicroBeadsを用いてT細胞をエンリッチした分画(10x10⁶個)を用いた。陰性コントロールにはDsg3^{-/-}B細胞のみを移植したマウスや、病原性を示さなかったDsg3反応性T細胞とDsg3^{-/-}B細胞を移植したマウスを作成した。移植後、経時的に採血し、血漿中のIgG抗Dsg3抗体価をELISA法で測定した。採血終了後、マウス口蓋粘膜を採取し病理組織学的検討とAlexa488標識抗マウスIgG抗体を用いた直接蛍光抗体法により口蓋に沈着するIgGの検討を行った。

5) T細胞株のホーミング能の検討

T細胞の病原性を検討した後にマウス脾臓を採取し、その凍結切片を抗CD19抗体(RM4-5; Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ)と抗TCRβ鎖抗体(H57-597; BD)で共染色した。リンパ濾胞中のTCRβ鎖陽性細胞数をCD19陽性細胞との接触の有無に分けて計測し、その比率を算出した。

6) 各種サイトカインがDsg3^{-/-}B細胞からの抗Dsg3抗体産生に与える影響の検討

Dsg3^{-/-}B細胞をd)と同様の方法で単離し、10%FBS添加RPMI-1640を用いて96穴平底プレートにまき(2x10⁵cell/well)、

500ng/mlのsCD40L(R&D, Minneapolis, MN)存在下で各種サイトカインIL-4, IL-10, IFN-γを濃度別(0, 1, 2, 4, 6, 8 pg/ml)に添加し、7日間培養した。培養後、培養上清を採取し、ELISA法で上清中のIgG抗Dsg3抗体価を測定した。

7) 組み換えアデノウイルスを用いたサイトカイン阻害効果がT細胞の病原性に与える影響の検討

AdEasyTM Adenoviral Vector System (Stratagene, La Jolla, CA)を用いてIL-4Rα、IL-10Rα、IFN-γR1の各細胞外領域を発現する組み換えアデノウイルスおよび対照組み換えアデノウイルス(mock)を作成した。ウイルスはCsCl₂密度勾配遠心法による濃縮およびPBSでの透析でマウス投与用に準備した。Rag2^{-/-}マウス尾静脈より1x10⁹ IFUの各組み換えアデノウイルスを投与し、5日後に培養T細胞株(1x10⁶個)とDsg3^{-/-}B細胞(5x10⁶個)をd)の方法に準じて尾静脈より投与し、IgG抗Dsg3抗体価の測定およびPV発現型の観察を経時的に行った。

(倫理面への配慮)

本研究は慶応義塾大学医学部動物実験委員会の承認のもと、同ガイドラインを遵守して行われた。

C. 研究結果

1) Dsg3反応性T細胞株の樹立

限界希釈法により本年度は新たに7つのDsg3反応性T細胞株(図2)を樹立し合計59株とし、病原性を検討できた株も5株追加し合計20株とした(表1)。その結果、病原性を有するT細胞株(図3)は7つとなった。

2) TCRVβ遺伝子再構成の検出

病原性を確認できたDsg3反応性T細胞株のVβ遺伝子をRT-PCRで検出した結果、病原性と再構成されたVβ遺伝子の間に関連性はみとめなかった。

3) サイトカイン発現解析

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株のサイトカイン mRNA 発現パターンを RT-PCR で検討した結果、7 株が Th1 型 (IFN- γ ⁺IL-4⁻)、13 株が Th0 型 (IFN- γ ⁺IL-4⁺) であった (表 1)。個々の発現サイトカインについて病原性との関連を検討したところ、IL-4 および IL-10 の発現と病原性との間に関連を認められた (P=0.04)。

4) ケモカイン受容体発現解析

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株のサイトカイン mRNA 発現パターンを RT-PCR で検討した結果、病原性と関連性を示すケモカイン受容体は認めなかった。

5) T 細胞株のホーミング能の検討

脾臓リンパ濾胞内に存在する T 細胞数を組織学的に T 細胞領域と B 細胞領域にわけて計測した結果、ホーミング能と病原性との間に関連性は認めなかった。

6) 各種サイトカインが Dsg3^{-/-}B 細胞からの抗 Dsg3 抗体産生に与える影響の検討

sCD40L 存在下で Dsg3^{-/-}B 細胞から産生される抗 Dsg3 抗体価は IL-4 の添加により増加した。一方、IL-10 あるいは IFN- γ の添加は抗 Dsg3 抗体産生に影響を与えなかった。

7) 組み換えアデノウイルスを用いたサイトカイン阻害効果が T 細胞の病原性に与える影響の検討

各種組み換えアデノウイルスを Rag2^{-/-}マウスに投与した後に、T 細胞株と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植し PV 発現型の誘導を試みた。sIL-4R α を発現させた Rag2^{-/-}マウスでは、PV 発現型が抑制された。一方、sIL-10R α や sINF- γ R1 の発現は抗 Dsg3 抗体産生、PV 発現型を抑制しなかった (図 4)。

D. 考察

我々は Dsg3 反応性 T 細胞クローン株を樹立し、PV モデルマウスの系を応用する

ことで、T 細胞株の *in vivo* での病原性の評価を行うことができた。またこの評価系を利用することで T 細胞の病原性規定因子を同定することができた。すなわち、T 細胞の特徴的な機能であるホーミング能、抗原認識能、エフェクター活性に関わる代表的因子について病原性との関連性を検討した結果、IL-4 と IL-10 のみが病原性と関連した。さらにこの 2 分子について抗 Dsg3 抗体産生に与える影響を検討した結果、IL-4 のみが実際に PV 発現系の誘導に重要であることを明らかにした。今回我々が同定した分子は PV 病態を誘導する T 細胞に高率に発現する分子であり、IL-4 を標的とした治療法がより効果の長く、選択性の高い新たな治療法となりうる可能性を示唆する。

本実験系は PV に限らず広く自己免疫疾患に応用可能で、自己免疫病態と関連する因子の同定、さらにはそれらに対する分子標的療法の開発に有用と考えられる。

E. 結論

PV モデルマウス作成法を応用することで Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の *in vivo* での病原性を評価する実験系を確立した。本スクリーニング法は T 細胞の病原性を規定する因子の同定と新たな治療法の開発に有用であると考えられた。

参考文献

- 1 Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67:869-877, 1991
- 2 Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T: Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Dermatol Sci* 26:55-61, 2001

- 3 Payne AS, Ishii K, Kacir S, Lin C, Li H, Hanakawa Y, Tsunoda K, Amagai M, Stanley JR, Siegel DL: Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *J Clin Invest* 115:888-899, 2005
- 4 Niizeki H, Inoko H, Mizuki N, Inamoto N, Watababe K, Hashimoto T, Nishikawa T: HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR-RFLP method. *Tissue Antigens* 44:248-251, 1994
- 5 Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T: Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest* 105:625-631, 2000
3. 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(24):17866-17876, 2007.04.
4. Nishifuji K, Olivry T, Ishii K, Iwasaki T, Amagai M: IgG autoantibodies directed against desmoglein 3 cause dissociation of keratinocytes in canine pemphigus vulgaris and paraneoplastic pemphigus. *Vet Immunol Immunopathol* 117(3-4):209-221, 2007.06.
5. Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, 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, 2007.08.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表（平成19年度）

3. 論文発表

英語論文

1. Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T, Kawakami Y, Kuwana M: T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 127(2):324-330, 2007.02.
2. Waschke J, Menendez-Castro C, Bruggeman P, Koob R, Amagai M, Gruber HJ, Drenckhahn D, Baumgartner W: Imaging and force spectroscopy on desmoglein 1 using atomic force microscopy reveal multivalent Ca(2⁺)-dependent, low-affinity trans-interaction. *J Membr Biol* 216 (2-3):83-92, 2007.04.
3. Kawachi M, Tamai K, Saga K, Yamazaki T, Fujita H, Shimbo T, Kikuchi Y, Nimura K, Nishifuji K, Amagai M, Uitto J, Kaneda Y: Development of tissue-targeting hemagglutinating virus of Japan envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin. *Hum Gene Ther* 18(10):881-894, 2007.10.
4. Nagasaka T, Fujii Y, Ishida A, Handa M, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T: Evaluating efficacy of plasmapheresis for patients with pemphigus using desmoglein

enzyme-linked immunosorbent assay. **Br J Dermatol**, 2008.01.

8. Nishifuji K, Sugai M, Amagai M: Staphylococcal exfoliative toxins: "Molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. **J Dermatol Sci** 49(1):21-31, 2008.01.
9. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, Bystryn J-C, Cianchini G, Diaz L, Fivenson D, Goldsmith LA, Hall R, Harman K, Hashimoto T, Hertl M, Hunzelmann N, Iranzo P, Joly P, Jonkman MF, Kitajima Y, Korman NJ, Martin LK, Mimouni D, Pandya AG, Payne AS, Rubenstein D, Shimizu H, Sinha AA, Sirois D, Zillikens D, Werth VP: Consensus Statement on Definitions of Disease, Endpoints, and Therapeutic Response for Pemphigus. **J Am Acad Dermatol**, in press.
10. Kwon EJ, Yamagami J, Nishikawa T, Amagai M: Anti-desmoglein IgG autoantibodies in patients with pemphigus in remission. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, in press.

日本語論文

1. 西藤公司、天谷雅行: ヒトの天疱瘡における水疱形成メカニズム、*Visual Veterinary Dermatology* 3 (1):7-12, 2007.01.
2. 天谷雅行: 自己免疫性皮膚疾患 基礎から臨床へ、*感染・炎症・免疫* 37(1): 18-27, 2007.03.
3. 天谷雅行: ブドウ球菌感染における皮膚病変とその機序—天疱瘡との類似点—。 *化学療法の領域* 23(7):1061-1066,

2007.06.

4. 角田和之、天谷雅行: 天疱瘡自己抗体のあらたな病原性評価法の開発 -In vitro dissociation assay: Development of novel assay for pathogenic activity of anti-desmoglein 3 autoantibody. *医学のあゆみ* 221(11): 921-925, 2007.06.
5. 天谷雅行: 自己免疫 最近の進歩、*日本皮膚科学会雑誌* 117(13):2093-2094, 2007.12.

日本語著書

1. 天谷雅行: 抗デスモグレイン1抗体、抗デスモグレイン3抗体、最新 臨床検査のABC、S313、医学書院、東京、2007.
2. 天谷雅行: 伝染性膿痂疹の病態: 最近の進歩、WHAT'S NEW in 臨床皮膚科学 2008-2009、74-75、メディカルレビュー社、東京、2008.
3. 天谷雅行: 血清中抗デスモグレイン1抗体. *臨床検査データブック2007-2008*, 425-426、医学書院、東京、2007.

2. 学会発表

1. Amagai M: Pemphigus mouse model as a window on unsolved autoimmune mystery. 2007 Shanghai International Academic Meeting on Bullous disease, Shanghai, China, 2007.3.13.
2. Nishifuji K, Shimizu A, Ishiko A, Amagai M: In vivo time course analyses of fate of desmosomal cadherins in the process of acantholysis caused by staphylococcal exfoliative toxin. 第32回日本研究皮膚科学会学術大会・総会、横浜、2007. 4.18-20.
3. Takae Y, Hamaguchi Y, Tedder TF, Amagai M: Effective B cell

- depletion therapy in a pemphigus mouse model. The 68th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, USA, 2007.5.9-12.
4. Amagai M: Pemphigus mouse model as a window on unsolved autoimmune mysteries. Luebeck University Seminar, Luebeck, Germany, 2007.6.6.
 5. Amagai M: Cadherins as autoimmune targets in pemphigus. International Symposium of the SFB 487 Membrane Proteins & Diseases, Wuerzburg, Germany, 2007.6.7-9.
 6. Shimizu A, Tanaka K, Amagai M, Ohyama M: Ebastine, a second-generation antihistamine, as a supportive medication for alopecia areata. 5th International Congress of Hair Research, Vancouver, Canada, 2007.6.13-16.
 7. Ishiko A, Kohta T, Kimura Y, Izumi K, Kosaki K, Takahashi T, Amagai M: A genetic and ultrastructural study of Tietz syndrome. The 34th Annual Meeting of Society for Cutaneous Ultrastructure Research (SCUR), Prague, Czech Republic, 2007.6.14-16.
 8. Amagai M: Pemphigus with a simple logic behind complex phenotype. Hong Kong Society of Dermatology and Venereology Annual Scientific Meeting 2007, Hong Kong, China, 2007.6.24.
 9. Takae Y, Nishikawa T, Amagai M: Evaluation of various immunosuppressive therapies using pemphigus mouse model. The 13th International Congress of Mucosal Immunity, Tokyo, Japan, 2007.7.9-12.
 10. Yokoyama T, Matsuda S, Takae Y, Amagai M, Koyasu S: Suppressive effects of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells on the development of phenotypes in a mouse model of pemphigus vulgaris. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, Japan, 2007.7.9-12.
 11. Yamagami J, Takahashi H, Ota T, Amagai M: Genetic characterization of human Dsg3-specific B cells isolated by flow cytometry from peripheral blood of patients with pemphigus vulgaris. The 37th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR), Zurich, Switzerland, 2007.9.5-8.
 12. Yokoyama T, Matsuda S, Takae Y, Amagai M, Koyasu S: Suppressive effects of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells on the development of phenotypes in a mouse model of pemphigus vulgaris. The 37th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR), Zurich, Switzerland, 2007.9.5-8.
 13. Amagai M: Animal models - Do they tell us about human disease? 21st World Congress of Dermatology, Buenos Aires, Argentina, 2007.10.1-5.
 14. Amagai M: Development of targeted therapies for autoimmune bullous diseases. 21st World Congress of Dermatology, Buenos Aires, Argentina, 2007.10.1-5.
 15. Saito M, Masunaga T, Amagai M,

Ishiko A: Analysis of phenotypic differences in Japanese patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa possessing the same recurrent mutation in one COL7A1 allele. 21st World Congress of Dermatology, Buenos Aires, Argentina, 2007.10.1-5.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

4. 特許取得
特になし
5. 実用新案登録
特になし
6. その他
特になし

表 1 Dsg3 反応性 T 細胞株の解析結果

Name	Cytokines	TH phenotype	Pathogenicity
129#30	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-
141#70	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-
145#27	IL-2, IFN- γ	TH1	-
146#25	IL-2, 10, IFN- γ	TH1	-
151#10	IFN- γ , TGF- β	TH1	-
159#11	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-
162#24	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-

140#27	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
145#28	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
146#13	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
147#48	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
147#27	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
152#25	IL-4, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
153#5	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
154#33	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
161#28	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
161#29	IL-4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
161#100	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
162#92	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
164#2	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+

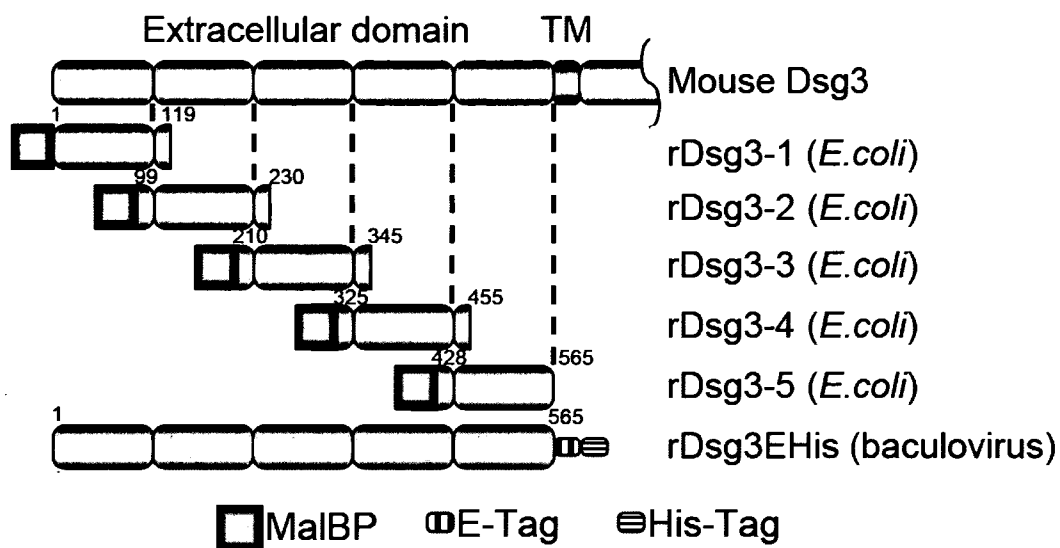


図1 組み換え Dsg3 の模式図。rDsg3-1~5 は大腸菌発現系で、rDsg3EHis はバキュロウイルス発現系を用いて作成した。

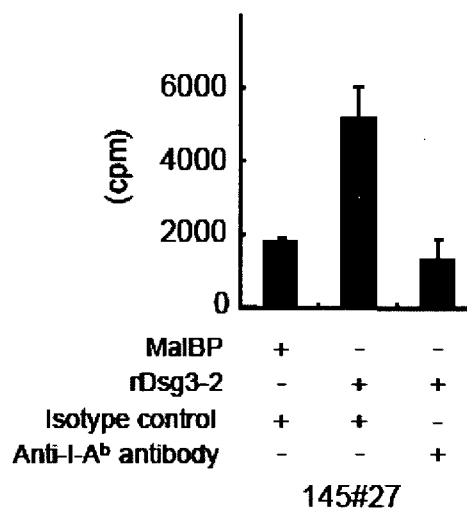


図2 T 細胞の Dsg3 反応性と MHC 拘束性。T 細胞の Dsg3 反応性は ^3H -thymidine の取り込みにより評価した。さらに MHC class II 阻害抗体添加により MHC 拘束性を評価した。

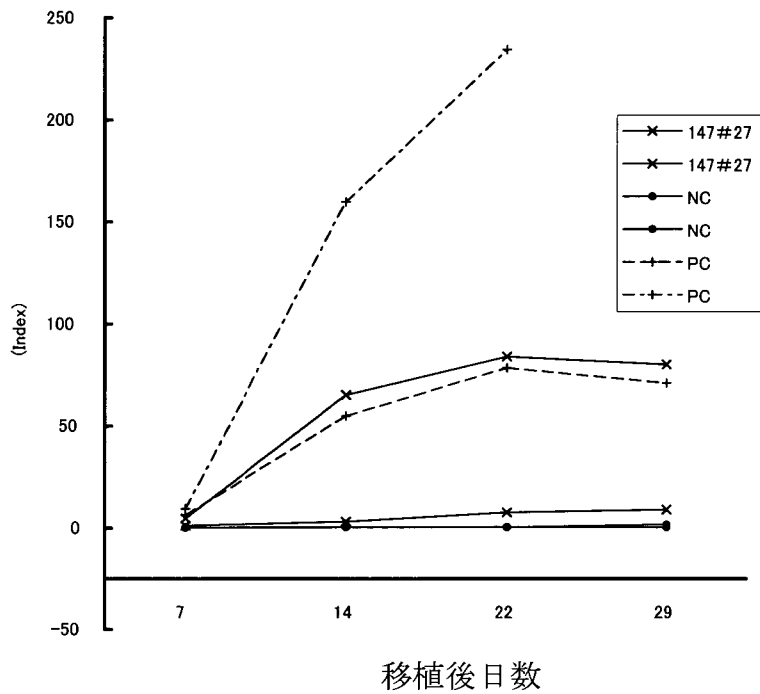


図3 Rag2^{-/-}マウスにおける Dsg3 反応性T細胞クローン(CE147#27)移植後の抗 Dsg3 抗体価の推移。T細胞クローン147#27を Dsg3^{-/-}B細胞とともに Rag2^{-/-}マウスに移植し、血漿中の抗 Dsg3 抗体価をELISAで経時的に調べた。陽性コントロールは脾T細胞と Dsg3^{-/-}B細胞を、陰性コントロールは Dsg3^{-/-}B細胞のみを移植した。

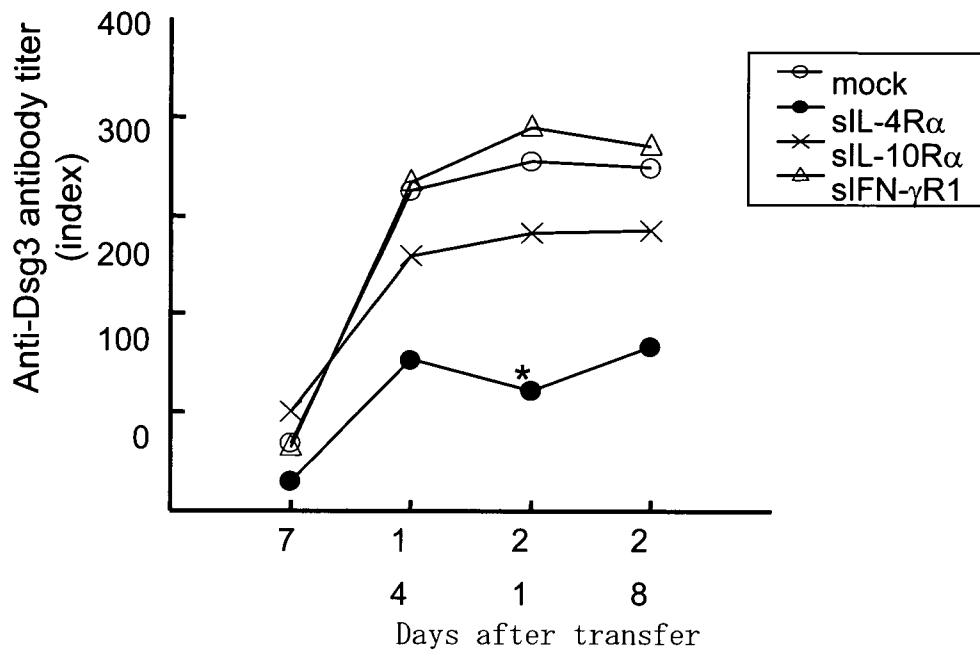


図4 可溶性サイトカイン受容体を発現させた $Rag2^{-/-}$ マウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞クローン (CE147#48) 移植後の抗 Dsg3 抗体価の推移。sIL-4R α 、sIL-10R α 、sIFN- γ R1 を発現する組み換えアデノウイルスおよび mock ウイルスを $Rag2^{-/-}$ マウスに投与 5 日後、T 細胞クローン 147#48 を Dsg3 $^{-/-}$ B 細胞とともに $Rag2^{-/-}$ マウスに移植し、血漿中の抗 Dsg3 抗体価を ELISA で経時的に調べた。各群 2 匹の平均を示す。* は $P=0.04$ 。

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

天疱瘡の予後調査：順天堂大学症例の検討

分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 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。

共同研究者
込山悦子
順天堂大学医学部皮膚科

A. 研究目的

天疱瘡の予後についてはあまり調査が行われておらず、そのうち死亡率についてはなんとか検索が可能であった。即ち、ステロイド出現前は57%、出現後は20.1%との報告がある¹⁾。以後1977年の広根らの調査では8.2%²⁾、1994年の佐久間らの調査では0.4%であり³⁾、死亡率については格段に改善されている。しかしながら、どの程度の例が「寛解」あるいは「治癒」の状態にあるかといった検討はなされていない。そこで今回は、我々が長期間診療している症例について検討を行った。我々は過去2度に渡って報告を行っているが^{4, 5)}、本稿では最近の追跡調査結果につき報告する。

B. 研究方法

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、2007年5月時点での状態を調べた。他疾患のためにステロイドを投与されてい

る例や、透析を受けている例は除外した。天疱瘡における「寛解」の基準を表1に示す。また「治癒」（私案）としては、“一切の治療無しで経過観察されている症例で、1年以上天疱瘡の症状が見られないもの”と定義した。

C. 研究結果

- ①病型別例数は、尋常性（PV）52例、落葉状（PF）17例の計69例で、年齢では、PVは40～96歳、PFは33～89歳であった。
- ②69例中「治癒」は26例（37.7%）、「寛解」は34例（49.3%）、その他の「active」は9例（13.0%）であった（Fig1）。
- ③PV、PFとも重症度スコアが高いものに血漿交換療法が施行されており、有効率はPVでは78.5%、PFでは75.0%であった（表2）。
- ④表3の如く、PVでは、apheresisを受けている例（28例）が受けていない例（24例）より多かった。また apheresis を受けた例では2例のみが「治癒」になっており、apheresis を受けていない（軽症例）の方が「治癒」に至った例が多かった（11例）。

2003年時点までの調査ではあるが、

「治癒」に至った apheresis を受けなかった例の総 PSL 量は、「治癒」に至った apheresis を受けた例のそれよりも、有意に少なかった。

「治癒」に至った apheresis を受けなかった例の総 PSL 量は、「寛解」「active」にある apheresis を受けなかった例のそれよりも、有意に少なかった。

- ⑤表4の如く、PFでは、apheresisを受けている例（8例）が受けていない例（9例）よりやや少なかった。また apheresis を受けた例では2例のみが「治癒」になっており、apheresis を受けていない（軽症例）の方が「治癒」に至った例が多かった（4例）。

2003年までの調査ではあるが、「治癒」に至った apheresis を受けなかった例の総 PSL 量は、「治癒」に至った apheresis を受けた例のそれよりも、かえって多かった。

「治癒」に至った apheresis を受けなかった例の総 PSL 量は、「寛解」「active」にある apheresis を受けなかった例のそれよりも、PV 同様に少なかった。

D. 考察

今回の解析では、天疱瘡37%以上の症例が「治癒」、さらに49%以上の症例が「寛解」に至っていることが明らかとなった。また端的に表現すると、aphersis を受けていない（比較的軽症の）症例で、総 PSL 投与量の少ない（軽症）例が「治癒」に至る例の多くを占めていると云えよう。

1991年の奈良医大の検討では12.9%の例が⁶⁾、2000年の全国調査では5.6%の症例が「治癒」の条件を満たしていることが報告されている⁷⁾。これまで我々が行った報告では、「治癒」はそれぞれ21.7%⁴⁾、24.6%⁵⁾であった。我々の調査と奈良医大および全国調査の差については、今後さらに詳細な比較検討が必要と考えられるが、理由の1つとして、天疱瘡患者のみならず医師

も天疱瘡研究班関係者ですら、天疱瘡は治らないとの認識が強く、そのため自己抗体が検出されずかつ臨床症状がなくてもただらと少量ステロイドが継続されている可能性が考えられる。今後は自己抗体が検出されずかつ臨床症状がない症例においては、ステロイドを徐々に減量し、drug free の状態に持ってゆくように努力する必要があると思われる。またそのために apheresis 等含め、如何なる併用療法が有用であるかなど、さらに「治癒」例を詳細に検討する必要があると考えられた。

E. 結語

天疱瘡においては、致死率は非常に低くなっており、多くの症例が「寛解」および「治癒」の状態にあることが明らかとなった。本症の発症機序解明、治療ガイドライン改訂、新治療法開発などのため、今後さらに「治癒」症例の詳細な解析を行う必要があると考えられる。

F. 参考文献

- 1) 大原一枝：シンポジウムⅢ、水疱症、特に天疱瘡類を中心として、5) 治療及び予後、日皮会誌76：558-559、1966.
- 2) 広根孝衛：天疱瘡の治療、厚生省特定疾患調査研究班（天疱瘡）昭和51年度研究報告書、p122-124.
- 3) 稲葉 裕、佐久間正寛、小川秀興、大野良之、河村 孝：天疱瘡の予後調査、厚生省特定疾患、稀少難治性皮膚疾患分科会平成9年度研究報告書、p110-114.
- 4) 池田志孝、込山悦子、小川秀興：天疱瘡の予後調査：順天堂大学皮膚科における症例の検討、厚生労働省特定疾患皮膚・結合組織疾患研究皮膚科における天疱瘡31例の予後調査、日皮会誌101:831-835, 1991.
- 7) 増谷 衛、稲葉 裕、小川秀興：寛解と判定された天疱瘡患者の検討、厚生

労働省特定疾患皮膚・子都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、p95-102. 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班、平成13年度研究報告書、p17-23.

- 5) Ikeda S, Komiyama E, Ogawa H: The prognosis of pemphigus patients will be significantly improved in the future. *Arch Dermatol Res.* 295:S69-70, 2003.
- 6) 中谷千恵、松岡愛子、村松 勉、宮川幸子、坂本邦樹、白井利彦：奈良県立医科大学

G. 健康危険情報

なし。

H. 研究発表（平成18年度）

1. 論文発表

- 1) Jayawardana ST, Ushio H, Niyonsaba F, Gondokaryono SP, Takenaka H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Monomeric IgE and lipopolysaccharide synergistically prevent mast-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Oct 30; [Epub ahead of print]
- 2) Hasegawa T, Suga Y, Mizoguchi M, Muramatsu S, Mizuno Y, Haruna K, Ikeda S, Kuroyanagi Y, Ogawa H: Intractable venous leg ulcer treated successfully with allogeneic cultured dermal substitute. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2007 Oct 19;1-3 [Epub ahead of print]
- 3) Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. *Br J Dermatol.* 2007 Oct 4; [Epub ahead of print]
- 4) Ng W, Nishiyama C, Mizoguchi M, Nakano N, Suga Y, Ikeda S, Itoh S, Kinoshita K, Okumura K, Ogawa H: Human umbilical cord epithelial cells express Notch1: Implications for its epidermal-like differentiation. *J Dermatol Sci.* 2007 Sep 10; [Epub ahead of print]
- 5) Okuma K, Mitsuishi K, Hasegawa T, Tsuchihashi H, Ogawa H, Ikeda S: A Case Report of Steroid and Immunosuppressant-resistant Pyoderma Gangrenosum Successfully Treated by Granulocytapheresis. *Ther Apher Dial.* 2007 Oct;11(5):387-90.
- 6) Hasegawa T, Matsukura T, Suga Y, Muramatsu S, Mizuno Y, Tsuchihashi H, Haruna K, Ogawa H, Ikeda S: Case of acne conglobata successfully treated by CO(2) laser combined with topical tretinoin therapy. *J Dermatol.* 2007 Aug;34(8):583-5.
- 7) Jiang J, Kuhara T, Ueki R, Zheng Y, Suto H, Ikeda S, Ogawa H: Inhibitory effects of paroxetine on the development of atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. *J Dermatol Sci.* 2007 Sep;47(3):244-7.
- 8) Takagi A, Nishiyama C, Maeda K, Tokura T, Kawada H, Kanada S, Niwa Y, Nakano N, Mayuzumi N, Nishiyama M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Role of Sp1 in Transcription of Human ATP2A2 Gene in Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007 Jun 28; [Epub ahead of print]

- 9) Hasegawa T, Suga Y, Ikejima A, Muramatsu S, Mizuno Y, Tsuchihashi H, Haruna K, Ogawa H, Ikeda S: Suction blister grafting with CO(2) laser resurfacing of the graft recipient site for vitiligo. **J Dermatol.** 2007 Jul;34(7):490-2.
- 10) Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, Jayawardana ST, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. **J Leukoc Biol.** 2007 Sep; 82(3):657-65.
- 11) Hasegawa T, Sumiyoshi K, Tsuchihashi H, Ikeda S, Nakao A, Ogawa H: FK506 inhibits the enhancing effects of TGF-beta on wound healing in a rabbit dermal ulcer model. **J Dermatol Sci.** 2007 Jul;47(1):37-40.
- 12) Hasegawa T, Mizoguchi M, Haruna K, Mizuno Y, Muramatsu S, Suga Y, Ogawa H, Ikeda S: Amnia for intractable skin ulcers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: report of three cases. **J Dermatol.** 2007 May;34(5): 328-32.
- 13) Ng W, Kikuchi Y, Chen X, Hira K, Ogawa H, Ikeda S: Pseudocysts of the auricle in a young adult with facial and ear atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol.** 2007 May;56(5):858-61.
- 14) Haruna K, Suga Y, Mizuno Y, Kourou K, Muramatsu S, Hasegawa T, Inoue A, Ogawa H, Ikeda S, Lakhmiri M, Seto A: A Moroccan patient with Sjogren-Larsson syndrome. **J Dermatol.** 2007 Feb;34(2):153-5.
- 15) Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Matsumoto K, Saito H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. **Eur J Immunol.** 2007 Feb;37(2):434-44.
- 16) Tsuchihashi H, Hasegawa T, Sumiyoshi K, Ogawa H, Ikeda S, Ando T, Nakao A, Okumura K: TWEAK inhibits TGF-beta-induced contraction of normal and keloid fibroblast-embedded collagen gel. **J Dermatol Sci.** 2007 Mar;45(3):216-8.
- 17) Haruna K, Suga Y, Mizuno Y, Hasegawa T, Kourou K, Matsuba S, Muramatsu S, Ikeda S: R156C mutation of keratin 10 causes mild form of epidermolytic hyperkeratosis. **J Dermatol.** 2007 Aug;34(8): 545-8.
- 18) 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.** 2007 Jul;34(7):482-5.

I. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

7. 特許取得
特になし
8. 実用新案登録
特になし
9. その他
特になし

表1 天疱瘡における「寛解」の基準（下記文献*より抜粋）

プレドニン換算投与量 10mg/日以下で、他に有効性が報告されている治療法を行っていない。

- ①皮膚病変の面積：紅斑、水疱などの active な皮疹なし
- ②ニコルスキー現象：陰性
- ③水疱の新生：なし または 稀に少数
- ④抗体価：40～320倍以下
- ⑤口腔粘膜疹：なし または 5%以下

* 増谷 衛ほか：厚生労働省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究稀少難治性皮膚疾患分科会、平成11年度研究報告書、95, 2000.

Tentative prognosis of pemphigus May.2007

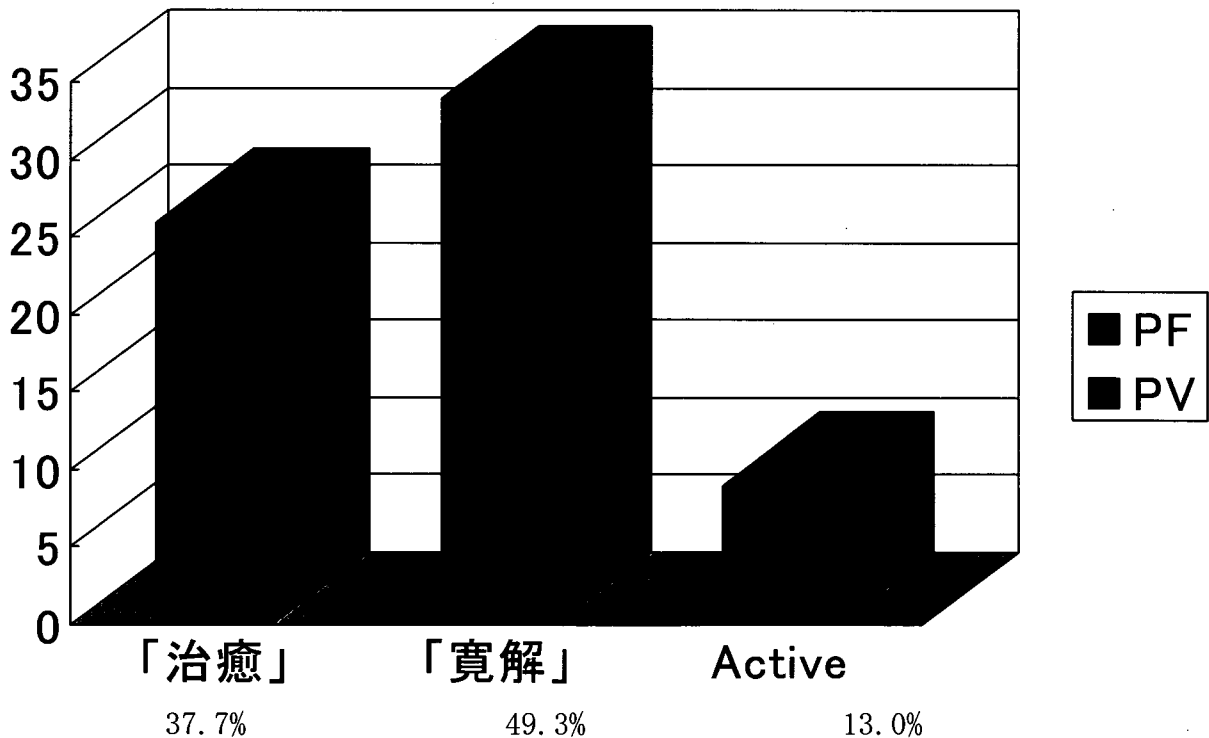


表2 Effect of apheresis therapy on pemphigus, and comparison of the severity index of apheresis-treated group and apheresis-untreated group

1) Percentage of the patients showed clinical improvement by apheresis therapy

PV	22/28 (78.5%)
PF	6/8 (75.0%)

2) Average of the severity index of the patients before apheresis therapy

	apheresis-treated	apheresis-untreated
PV	8.7	5.0
PF	6.8	4.0

表3 PV 症例まとめ 2003年5月

	apheresis (+)	apheresis (-)
「active」	42,755mg 8y9m 13 cases	124,000mg (総 PSL 量) 14y6m (罹患期間) 2 cases (患者数)
「寛解」	29,796mg 12y1m 13 cases	27,920mg 15y3m 11 cases
「治癒」	32,040mg 10y (8y4m) 2 cases	10,750mg 12y2m (9y10m) (治癒までの期間) 11 cases

表 4 PV 症例まとめ 2003年 5 月

	apheresis (+)	apheresis (-)
「active」	20,900mg 5y1m 3 cases	7,000mg (総 PSL 量) 7y (罹患期間) 1 case (患者数)
「寛解」	56,166mg 13y 3 cases	10,980mg 7y6m 4 cases
「治癒」	2,200mg 7y3m (5y3m) 2 cases	4,600mg 13y (6y9m) (治癒までの期間) 4 cases

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

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

分担研究者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 准教授

研究要旨 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。

共同研究者

池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科学教授
天谷雅行 慶応大学医学部皮膚科教授
谷川瑛子 慶応大学医学部皮膚科講師
北島康雄 岐阜大学大学院医学研究科教授
永井正規 埼玉医科大学公衆衛生学教授

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す。（倫理面への配慮）

電子化データは全て匿名で、個人を特定することはできない。また使用者は研究班の分担研究者、研究協力者に限定されている。

A. 研究目的

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療状況を分析する。

B. 研究方法

H19年10月、厚生労働省に稀少難治性皮膚疾患（天疱瘡、表皮水疱症、膿疱性乾癬）のH13～18年度全国分臨床調査個人票データの利用申請を行い、電子化データを入手した。

H13～18年度为天疱瘡臨床調査個人票の入力状況を把握し、最も入力数の多い年度の新規データを用いて、天疱瘡受給者の治療の現状を示すことができるかどうか試行した。天疱瘡治療アルゴリズム（案）に沿

C. 研究結果と D. 考察

表1到天疱瘡の臨床調査個人票H13～18年度分の電子化データ数と受給者数、入力率（%）を示す。入力率は年々上昇しており、H16年度は7割以上が入力されていた。新規データはH17年度の284例が最も多かったのでこれを分析対象とした。

図1にH17年度天疱瘡新規受給者の重症度別にみた治療内容とその効果を示す。対象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%）であった。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となっている。H17年度