

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。

軽症者81例は副腎皮質ステロイドのみの治療を56例(69%)が受けており、その内7例はレクチゾールやテトラサイクリン等、その他の治療も受けていた。56例中、36例(64.8%)が治療効果あり、効果なし1例、19例は効果不明であった。治療効果については新規受給者の申請時にはまだ結果がでていない人がいると思われる。4例は副腎皮質ステロイド+免疫抑制剤治療を受けており、副腎皮質ステロイド+パルス療法+免疫抑制剤治療は1例であった。全5例が治療効果ありであった。16例(19.8%)は副腎皮質ステロイドの治療がなくその他の治療(ミノマイシンやリンデロン等)のみであった。その内効果あり8例、効果なし1例、不明7例であった。軽症者の内4例(5%)は治療の情報なかった。

中等度144例の内、107例(74.3%)は副腎皮質ステロイドのみの治療で、その内の62例(57.9%)が治療効果あり、2例が効果なし、43例が効果不明であった。副腎皮質ステロイド+パルス療法は9例に行われており、ステロイドの効果あり7例、パルスの効果ありが6例であった。副腎皮質ステロイド+パルス療法+血漿交換療法が行われていたのは1例で効果ありだった。副腎皮質ステロイド+パルス療法+免疫抑制剤+血漿交換は1例で、血漿交換のみ効果ありだった。副腎皮質ステロイド+免疫抑制剤治療は11例に行われており、4例が効果あり、5例はステロイドのみ効果ありだった。副腎皮質ステロイド+免疫抑制剤+血漿交換療法が行われていたのは2例で、1例は副腎皮質ステロイドの効果ありだった。副腎皮質ステロイド+血漿交換療法を行った1例は治療効果ありだった。免疫抑制剤のみの治療を行った2例の内、1例は効果ありだった。その他の治療(ミノマイシン、リンデロン等)のみ10例の内、8例は効果ありだった。

重症者58例の内、副腎皮質ステロイドのみの治療は37例(63.8%)に行われており、その内23例は効果あり、13例は効果不明であった。副腎皮質ステロイド+パルス療法が行われた5例と副腎皮質ステロイド+パルス療法+血漿交換療法が行われた2例はいずれも治療効果ありだった。副腎皮質ステロイド+パルス療法+免疫抑制剤+血漿交換療法が行われた2例の効果は不明であった。副腎皮質ステロイド+パルス療法+免疫抑制剤治療を受けた2例は1例が副腎皮質ステロイドとパルス療法の効果ありだった。副腎皮質ステロイド+免疫抑制剤治療を受けた2例はステロイドのみ効果ありだった。副腎皮質ステロイド+血漿交換療法を行った5例の内、1例は血漿交換の効果あり、1例はステロイドの効果あり、他は不明であった。血漿交換のみの治療を受けた1例は効果あり、その他の治療のみを受けた1例は効果なしであった。重症者の1例は治療の情報なかった。

今回は初期の治療に着目し、新規データのみを分析した。治療の現状はある程度把握できる可能性はあるが、治療の効果については新規データでは結果が出ていない場合もあり、はっきりしなかった。

## E. 結論

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、治療の効果については新規データでは困難であると思われる。

#### 文献

- 1) 厚生統計協会：国民衛生の動向.厚生  
の指標, 2003; 50(9):148.
- 2) 厚生統計協会：国民衛生の動向.厚生  
の指標, 2004; 51(9):153.
- 3) 厚生統計協会：国民衛生の動向.厚生  
の指標, 2005; 52(9):150.
- 4) 厚生統計協会：国民衛生の動向.厚生  
の指標, 2006; 53(9):149.
- 5) 厚生統計協会：国民衛生の動向.厚生  
の指標, 2007; 54(9):154.
- 6) [http://www.dbtk.mhlw.go.jp/toukei/  
data/130/2006/toukeihyou/0006097/](http://www.dbtk.mhlw.go.jp/toukei/data/130/2006/toukeihyou/0006097/)

t0135963/HAR0650\_001.html

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表（平成19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：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回日本疫学会学  
術総会講演集, p195, 2007

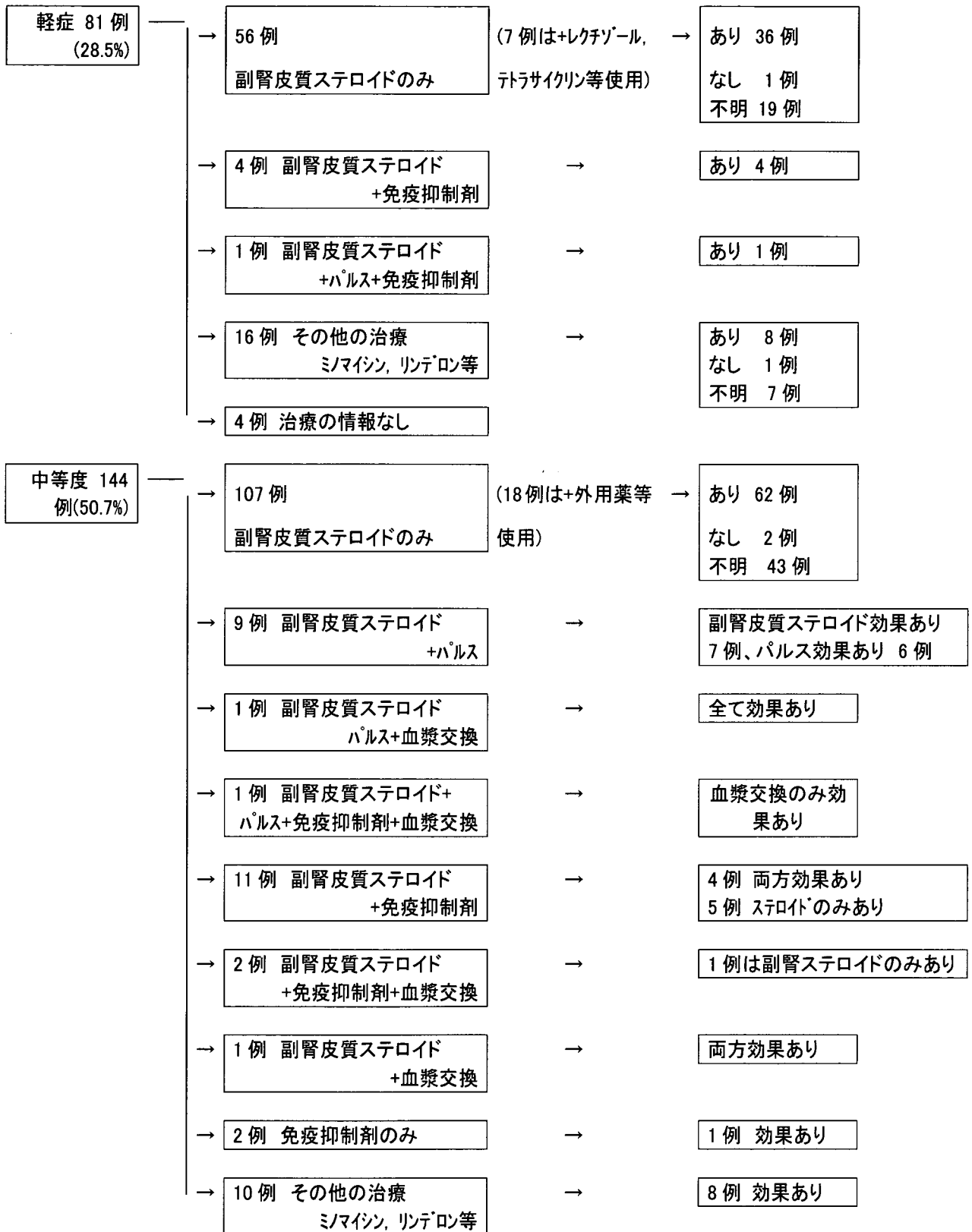
#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を 含む）

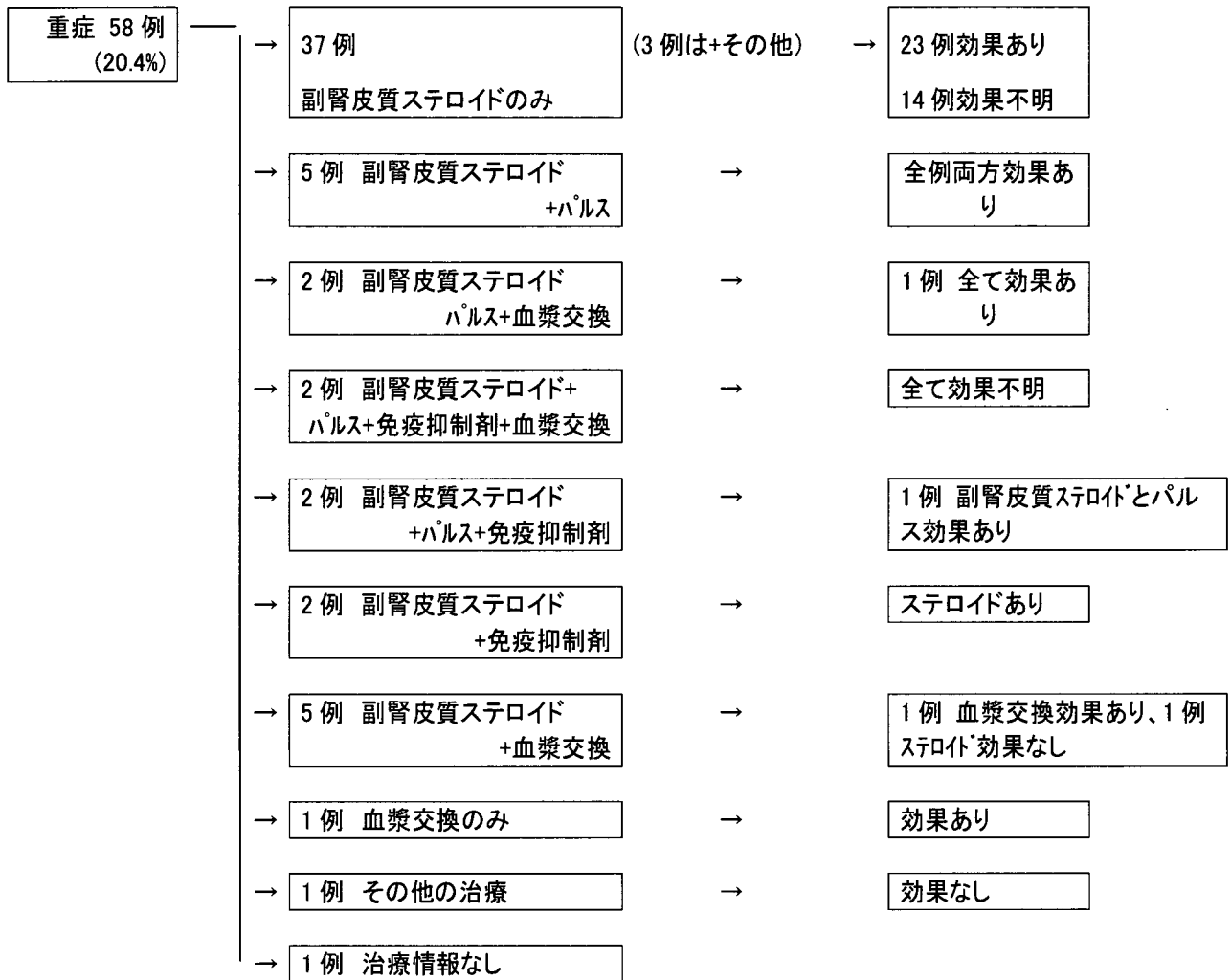
全てなし

表1 天疱瘡のH13-18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			受給者数
	新規	更新	計(入力率)	
H13	46	77	123 ( 3.6 %)	3,388 <sup>1)</sup>
H14	152	399	551 (15.8 %)	3,481 <sup>2)</sup>
H15	182	1,963	2,165 (63.7 %) (旧式 20)	3,399 <sup>3)</sup>
H16	272	2,231	2,503 (71.4 %)	3,504 <sup>4)</sup>
H17	284	1,863	2,147 (58.1 %)	3,695 <sup>5)</sup>
H18	188	1,236	1,424 (37.1 %)	3,843 <sup>6)</sup>

図1 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





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5報  
日本人天疱瘡患者 195 名の HLA-DRB1 遺伝子タイピング

分担研究者 新関寛徳 奈良県立医科大学皮膚科 准教授

**研究要旨** 平成20年1月までに収集した天疱瘡症例 195 例（尋常性 132 例、落葉状 49 例、臨床亜型移行例 7 例、疱疹状 1 例、増殖性 1 例、腫瘍随伴性 1 例、薬剤性 1 例）すべての症例について HLA-DRB1 タイピングを施行した。尋常性の集計では前回同様 4 つのアレル(\*0406, \*1401, \*1405, \*1406) の頻度の上昇がみられ、この 4 つのいずれかが陽性の症例は 97.0% であった。一方落葉状では 4 つのうちでは \*0406, \*1405 のみの頻度が高く、従って尋常性単独関連アレルと落葉状と共通関連アレルに分けられた。落葉状では 4 つのアレル以外では \*0101 の頻度の軽度上昇がみられた。臨床亜型移行例では尋常性落葉状共通アレルの頻度が 7 例中 6 例であった。腫瘍随伴性では抗デスマグレイン抗体陽性であっても必ずしも尋常性、落葉状関連アレルは検出されず、増殖性、薬剤性では抗デスマグレイン抗体陽性、尋常性関連アレルも陽性であった。天疱瘡関連、抵抗性アレルにおける HLA-DR ベータ鎖のアミノ酸配列の比較では 67 位、71 位アミノ酸が天疱瘡特異性、70, 74, 86 位が臨床亜型特異性を担っている可能性を示唆しているが、例外もあり、いくつかのアミノ酸の組み合わせに依存している可能性も否定できなかった。以上のごとく天疱瘡では若干の例外はあるものの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。

共同研究者

山本純照	奈良県立医科大学皮膚科学	高橋勇人	慶應義塾大学医学部皮膚科
浅田秀夫	奈良県立医科大学皮膚科学、 教授	天谷雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科、 教授
宮川幸子	奈良県立医科大学皮膚科学、 名誉教授	桑名正隆	慶應義塾大学医学部内科、 准教授
青山裕美	岐阜大学大学院医学研究科病態 制御学講座皮膚病態学、講師	白方裕司	愛媛大学医学部皮膚科学、講師
市來善郎	岐阜大学大学院医学研究科病態 制御学講座皮膚病態学、准教授	橋本公二	愛媛大学医学部皮膚科学、教授
北島康雄	岐阜大学大学院医学研究科病態 制御学講座皮膚病態学、教授	山本哲也	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
清水 宏	北海道大学大学院医学研究科皮 膚科学分野、教授	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
清水忠道	富山大学医学部皮膚科、教授	稲沖 真	国立病院機構金沢医療センター 皮膚科、医長
橋本 隆	久留米大学医学部皮膚科、教授	藤本 亘	川崎医科大学皮膚科、教授
池田志孝	順天堂大学医学部皮膚科、教授	中村晃一郎	埼玉医科大学医学部皮膚科、 教授
		岸本和裕	福島県立医科大学皮膚科

金子史男 福島県立医科大学皮膚科、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  
照井 正 日本大学医学部皮膚科、教授  
岡 晃 東海大学医学部分子生命科学系、  
講師  
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

これまで私どもは当該研究班において尋常性天疱瘡 (PV) 102 例、落葉状天疱瘡 (PF) 30 例の HLA-DRB1 タイピング結果を報告した (平成16年度報告書)。PV では HLA-DR4 (\*0406)、-DR14 (\*1401, \*1405, \*1406) の頻度が高く、PF では PV と共通の \*1405 の頻度が高かった。2 つの臨床亜型において共通の HLA アレル (共通関連アレル) の頻度が高いことは、偶然ではなく、PV においても抗 Desmoglein (Dsg)1 抗体が高率に検出されることで説明可能である。しかし PF において PV と共通関連アレル頻度はコントロールとの間に差はあるもののわずか12%足らずであり、PF のみで頻度が高い HLA アレルの存在が予想されていた。

そこで今回は PF 症例数が約 1.5 倍に達したので集計を行ったところ PF のみで頻度が高い HLA アレルを見出したので、臨床亜型移行例などとの結果を含めて検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

今回対象とした症例は、平成20年1月20日までに収集した195例である (表1)。臨床像、病理像、および免疫組織学的検査を含む天疱瘡診断基準<sup>1)</sup>を満たしている。検体は奈良県立医科大学、北海道大学、岐阜

大学、久留米大学、順天堂大学、慶應義塾大学、愛媛大学、岡山大学、川崎医科大学、福島医科大学、東北大学 (順不同) の12施設皮膚科にて収集された。イニシャルと生年月日により重複症例のチェックを行っている。これまで、1例の重複があったが、同一施設による提供であり、採血前に未然に重複を防ぐことが出来た。家族歴は1例あったが、天疱瘡患者同胞の検体は含まれていない。

### 2) HLA-DRB1 タイピング

昨年度同様供与を受けた血液より、スマイテスト ExR&D (G&G 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。

患者群の HLA-DRB1 遺伝子のタイピングは PCR-SSOP-Luminex 法により行った<sup>2)</sup>。

### 3) 統計処理

各対立遺伝子頻度につき、患者群、健常人コントロール<sup>3)</sup>の2群間においてカイ2乗検定を行ない、P値5%以下を有意差ありとした。さらに5%以下が得られたP値に検出可能な対立遺伝子数 (HLA-DR:34) を乗じて補正を行ない、補正P値 (P<sub>c</sub>) とした。

## C. 研究結果

### 1) 尋常性天疱瘡患者 132 例の集計

以前当該課題の第2報 (平成16年度) において102例の集計結果を示したが、今回も前回とまったく同様に4つのアレル頻度が有意に高かった (HLA-DRB1\*0406, \*1401, \*1405, \*1406: 表2)。PV 患者で頻度の高いこの4つのアレルを本稿では PV アレルと仮称する。

今回の検索で新たに補正P値が5%以下であったアレルが5つ見出された。まずコントロール群に比べ頻度の増加があったのは\*0802である。また頻度の減少があったのは\*1501, \*1502, \*0405, \*0901であった。

PV アレルの陽性率は 132 例中 128 例 (97.0%) であった。陰性であった 4 例の詳細を表 3 に示す。活動期の詳細不明な 1 例を除いて粘膜のみの症例であり、生検も口腔内から採取されている。1 例を除いて低抗体価であった (複数回採血にて確認) が、4 例とも直接法はいずれも陽性で抗表皮細胞間抗体の存在は確認されており、かつ天疱瘡診断基準を満たしていた。

## 2) 落葉状天疱瘡45例の集計

前回の30例の報告で補正P値が5%以下であったアレルは\*1405のみであったが、今回新たに\*0406も同様であった。しかしPV アレルのうち\*1401, \*1406の頻度はまったく増加していなかった。

また今回新たに僅かながら\*0101の頻度が高いことも明らかになった ( $P < 0.05$ : 表 2)。PF における頻度はPV との比較においても補正P値5%以下の有意差があった。

## 3) 臨床亜型移行例の検討

臨床亜型移行例は7例あり、いずれも尋常性から落葉状への移行であった。HLA-DRB1 アレルは全例がPV アレル陽性であり、しかも1例を除いてPV、PF 共通アレル (\*0406, 1405) 陽性である。特に1405の頻度は7例中5例 (71%) であり、PV の3倍近く高いことが明らかになった。

## 4) その他の臨床亜型の検討

疱疹状天疱瘡1例、増殖性天疱瘡2例、腫瘍随伴性天疱瘡3例、薬剤性1例を収集した (表 1)。そのHLA-DRB1 アレルと抗 Dsg 抗体 ELISA のプロフィールを表 4 に示す。

## D. 考察

PV の集計では前回見出されたPV アレルに加え、\*0802の頻度が高かった。このアレルは既報告においては弱い相関しか見出されておらず<sup>4, 5)</sup>、DR4、DR14とのアミノ酸配列比較でもあまり共通の配列を有していないために疾患特異性については疑

問が残る (表 5)。しかし、表 3 の如くPV アレル陰性例の1例でも検出されており、PV アレルに\*0802を含めるとPV アレル陰性例は3例ということになる。

また、今回はコントロール群に比べ頻度の低いアレルが4つ検出された (\*0405, \*0901, \*1501, \*1502)。この中で過去の国内外のPV に関する報告と一致したのは、\*1501, \*1502のみである<sup>4, 6-8)</sup>。海外ではインド人<sup>9)</sup>、モロッコ人<sup>10)</sup>において同様の報告が見られる。\*0405, \*0901の減少については諸外国においては報告がなく、日本人での common allele の相対的減少の可能性 (neutral allele) も否定できないものの日本人においては2報の報告がある<sup>4, 5)</sup>。

PF45例の集計では、PV アレルのほかに\*0101との関連が明らかになった。しかし補正P値では未だP値が5%を越えており、今回の集計は未だ preliminary と言わざるをえない。しかし日本人PF ではじめてPV と共通ではないアレルの頻度の増加がみられたことは特筆すべきである。このアレルは\*0102とともに諸外国のPV、PF において頻度の上昇が報告されていることは興味深い。

またPF において頻度が高いPV アレル (\*0406, 1405) とそうでないアレル (\*1401, \*1406) が存在することからPV 単独感受性アレルが存在することが明らかになった。

以上の結果を踏まえてPV からPF へ移行した症例を検討すると、全例がPV アレル陽性であるだけでなく、PVPF 共通アレルである\*1405が7例中5例であることは、共通アレルの意義を裏付ける結果であった。しかし、PV における\*1405の頻度19%と比べ有意に高いかどうかについては今後の症例の集積を待たなくてはならない。

疱疹状天疱瘡では主にDsg1抗体が検出され、増殖性では尋常性の亜型と考えられている。増殖性では抗Dsg3抗体陽性、PV アレル陽性でありPV での集計結果と矛盾しない結果であった。疱疹状のELISA 値



は非活動期の測定であることが確認されているもののPVアレルは陰性であり、落葉状天疱瘡のパターンを示した。

腫瘍随伴性天疱瘡については、これまでフランス人<sup>11)</sup>、中国人<sup>12)</sup>についてHLA-DRに関する報告があり、いずれもPVアレル(報告された人種の尋常性天疱瘡で頻度の高いアレル)の頻度は高くなかった。このことは抗Dsg抗体産生が本症ではHLAと関連していないことを示している一方で、抗Dsg抗体陽性例のみでの集計がされていないという問題点を残しているものの、この疾患における免疫異常の特殊性を裏付ける結果であった。今後、抗Dsg抗体陽性例において、通常为天疱瘡で検出される病的エピトープの確認が待たれる。

増殖性2例、薬剤性1例では、抗Dsg3抗体が検出され、PVアレルも検出された。

以上のごとくPV、PF以外の臨床亜型でも若干の例外はあるものの概ね抗Dsg抗体と相関したHLA-DRB1アレルが臨床亜型を越えて見出されることが明らかとなった。

最後に天疱瘡関連アレル、抵抗性アレルのHLA-DRベータ鎖(HLA-DRB1遺伝子産物)のアミノ酸配列を比較した(表5)。67位、71位アミノ酸为天疱瘡特異性、70、74、86位が臨床亜型特異性を担っている可能性を示唆しているが、例外もあり、いくつかのアミノ酸の組み合わせに依存している可能性も否定できなかった。

## E. 結論

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。

## 参考文献

- (7) Ikeda S, Imamura S, Hashimoto I, Morioka S, Sakuma M, Ogawa H. History of the establishment and revision of diagnostic criteria, severity index and therapeutic guidelines for pemphigus in Japan. Arch Dermatol Res 295 Suppl 1: S12-6, 2003.
- (8) 吉川枝里、宮原詞子、成瀬妙子、島田和典、東文啓、原啓高、猪子英俊 PCR-Luminex法を用いた、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRB1遺伝子の日本人対応4桁DNAタイピング方法の検討 MHC 10:21-31, 2003.
- (9) 中島文明、中村淳子、横田敏和 日本人の4桁レベルのHLAハプロタイプ分布 MHC 8:1-32, 2002.
- (10) Niizeki H, Inoko H, Mizuki N, et al. HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR-RFLP method. Tissue Antigens 44:248-51, 1994.
- (11) Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, et al. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. Tissue Antigens 54:333-40, 1999.
- (12) Sakurai M, Takigawa M, Terasaki PI, Imamura S, Sakurami T, Ueno Y, Park MS. Absence of HLA-DRW2 in Japanese pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol 76:70-1, 1981.
- (13) Matsuyama M, Hashimoto K, Yamasaki Y, et al. HLA-DR antigens in pemphigus among Japanese. Tissue Antigens 17:238-

9, 1981.

- (14) Niizeki H, Inoko H, Narimatsu H, et al. HLA class II antigens are associated with Japanese pemphigus patients. *Hum Immunol* 31:246-50, 1991.
- (15) Wilson C, Wojnarowska F, Mehra NK, Pasricha JS. Pemphigus in Oxford, UK, and New Delhi, India: a comparative study of disease characteristics and HLA antigens. *Dermatology* 189 Suppl 1:108-10, 1994.
- (16) Brick C, Belgnaoui FZ, Atouf O, et al. Pemphigus and HLA in Morocco. *Transfus Clin Biol* 14:402-6, 2007.
- (17) Martel P, Loiseau P, Joly P, et al. Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1\*03 allele. *J Autoimmun* 20:91-5, 2003.
- (18) Liu Q, Bu DF, Li D, Zhu XJ. Genotyping of HLA-I and HLA-II alleles in Chinese patients with paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 2007 Dec 6; [Epub ahead of print]

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表 (平成19年度)

論文発表

英語論文

1. Fukumoto T, Shiroyama Y, Niizeki H, et al. Paraneoplastic pemphigus presenting as erythrodermic lichenoid dermatitis with concomitant features of pemphigus foliaceus. *J Dermatol* 34:645-9, 2007.
2. Saito-Katsuragi M, Asada H,

Niizeki H, et al. Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26 *Cancer* 110: 1162-72, 2007.

日本語論文

1. 宮川幸子、新関寛徳、榎本美生、吉田さやか：特集「小児の膠原病」 新生児エリテマトーデス 皮膚病診療 29: 538-542, 2007
2. 北村華奈、新関寛徳、古林郁乃、福本隆也、浅田秀夫、宮川幸子、村上伸介、玉置伸二、木村弘：間質性肺炎を伴った Amyopathic Dermatomyositis の 1 例 皮膚の科学 6:255-260, 2007.06
3. 新関寛徳：水疱症の診断と治療 自己免疫性水疱症 2) 炎症の強い天疱瘡：疱疹状天疱瘡、増殖性天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡の診断と治療 Monthly Derma 137:33-39, 2008.03

日本語著書

1. 新関寛徳、宮川幸子：皮膚筋炎、皮膚科診療カラーアトラス、第8巻 内臓疾患と皮膚、講談社、印刷中
2. 新関寛徳：乾癬性紅皮症、皮膚科診療カラーアトラス、第2巻 角化異常症(非遺伝性)、講談社、印刷中

学会発表

1. 森戸啓統、泉敦子、井本恭子、福本隆也、小林信彦、新関寛徳、浅田秀夫、宮川幸子：Duhring 疱疹状皮膚炎の 1 例。第 400 回日本皮膚科学会大阪地方会 大阪市 2007.3.17
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：紅皮症化した腫瘍随伴性天疱瘡の一例。第 106 回日本皮膚科学会総会 横浜市 2007.4.20

3. 森戸啓統、井本恭子、飯岡敦子、北村華奈、福本隆也、小林信彦、新関寛徳、浅田秀夫、宮川幸子、今西麻衣子、村上国久、櫻井正樹、塚口信彦、大山文悟、橋本 隆：抗 CD20 抗体にて悪性リンパ腫の治療後約 4 年を経て発症した腫瘍随伴性天疱瘡の 1 例。第 29 回水疱症研究会 倉敷市 2007.10.14

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

10. 特許取得  
特になし
11. 実用新案登録  
特になし
12. その他  
特になし

表 1 日本人天疱瘡患者 195 例の臨床亜型の内訳

臨床 亜型	尋常性	落葉状	移行例	疱疹状	増殖性	腫瘍 随伴性	薬剤性	合計
例数	132	49	7	1	2	3	1	195

表 2 日本人尋常性、落葉状天疱瘡患者の HLA-DRB1 アレル頻度

DRB1 alleles	PV		PF		Control		PV		PF	
	N=264	%	N=98	%	N=1032	p value	Pc*	P value	Pc	
*0101	5	1.9	9	9.2	3.88	0.116483		0.0137**		
*1501	5	1.9	3	3.1	11.63	1.75E-06	5.95E-05			
*1502	6	2.3	4	4.1	8.91	0.00027	0.00918			
*1602	1	0.4	2	2.04	0.78					
*0401	2	0.8	1	1.02	1.36					
*0403	6	2.3	2	2.04	3.88					
*0404	1	0.4	2	2.04	0.34					
*0410	6	2.3	2	2.04	2.13					
*0405	13	4.9	9	9.2	13.18	0.000176	0.00598			
*0406	33	12.5	11	11.2	3.49	5.9E-09	2.01E-07	0.000113	0.00383	
*1101	5	1.9	2	2.04	3.68					
*1201	6	2.3	1	1.02	2.52					
*1202	3	1.1	3	3.1	2.13					
*1301	1	0.4	1	1.02	0.39					
*1302	2	0.8	9	9.2	5.62					
*1401	38	14.4	5	5.1	4.26	1.61E-09	5.47E-08	0.697		
*1403	2	0.8	1	1.02	0.78					
*1405	51	19.3	12	12.2	3.1	7.68E-22	2.60E-20	7.75E-06	2.64E-04	
*1406	33	12.5	2	2.04	2.13	8.83E-14	3.00E-12	0.952		
*1429	1	0.4	0	0	0					
*0701	1	0.4	0	0	0.78					
*0802	27	10.2	3	3.1	3.49	5.54E-06	1.88E-04			
*0803	9	3.4	6	6.1	6.4					
*0809	1	0.4	0	0	0.05					
*0901	6	2.3	8	8.2	13.76	1.64E-07	5.58E-06			
Total	264	100	98	100						

\*corrected P, \*\*Pc=0.047 (Vs PV)

表3 PV アレル陰性例の臨床、検査所見と HLA プロフィール

年齢	発症		臨床所見	病理所見	蛍光抗体		Dsg1	Dsg3	重症度 <sup>1)</sup>	HLA-DRB1 allele	
	性別	年齢			直接法	間接法					
22	M	18	粘膜皮膚型	基底層直上	+	不明	<5*	<5*	1	*0101	*1501
52	F	52	粘膜のみ	基底層直上	+	陰性	1	14	1	*1502	*1502
41	F	40	粘膜のみ	基底層直上	+	20	1	609	6	*1202	*1501
70	F	70	粘膜のみ	基底層直上	+	陰性	40	<5	3	*0802	*0802

\*非活動期の結果（活動期の血清は保存されていなかった）。

表4 その他の天疱瘡症例の抗 Dsg 抗体 ELISA 値と HLA プロフィール

年齢	性別	phenotype	Dsg1	Dsg3	HLA-DRB1 allele	
79	F	HP	<5	10	*1101	*1502
81	F	Pveg	7	91	*0701	*1405
47	F	Pveg	48	272	*1403	*1405
47	M	PVPF	103	<5	*1302	*1405
75	M	PVPF	299	189	*0405	*1406
63	M	PVPF	150	<5	*0405	*1405
62	M	PVPF	1191	<5	*0101	*0406
61	M	PVPF	215	71	*0901	*1405
42	F	PVPF	>150	41	*0405	*1405
57	M	PVPF	90	<5	*1302	*1405
60	F	PNP	94	120	*1406	*1407
79	F	PNP	<5	54	*0405	*0901
34	F	PNP	5	15	*0405	*0901

HP: herpetiform pemphigus, Pveg: pemphigus vegetans, PVPF: PV→PF 移行例、PNP: paraneoplastic pemphigus

Dsg3 ELISA 値のボックスは陽性例を示す。HLA-DRB1 allele のボックスは PV アレルを示す。

表5 天疱瘡関連アレル、抵抗性アレルの HLA-DR ベータ鎖アミノ酸配列

			Amino acid residues of the DRbeta chain				
HLA-DR 特異性	HLA-DRB1		67	70	71	74	86
PF 単独アレル	DR1	*0101	L	Q	R	A	G
PVPF 共通アレル	DR4	*0406	L	Q	R	E	V
	DR14	*1405	L	R	R	E	V
PV 単独アレル	DR14	*1401	L	R	R	E	V
	DR14	*1406	L	Q	R	A	V
	DR8	*0802	F	D	R	L	V
PV 抵抗性アレル	DR4	*0405	L	Q	R	A	G
	DR9	*0901	F	R	R	E	G
	DR15	*1501	I	Q	A	A	V
	DR15	*1502	I	Q	A	A	G
	DR15	B5*0101	F	D	R	A	G
	DR15	B5*0102	F	D	R	A	G

PV 抵抗性アレルを薄い灰色のボックスで示す。濃い灰色は \*1405 と共通のアミノ酸配列を示す。67位、71位アミノ酸が天疱瘡特異性、70、74、86位が臨床亜型特異性を担っている可能性を示唆しているが、例外もあり、いくつかのアミノ酸の組み合わせに依存している可能性も否定できない。

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

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

分担研究者 青山裕美 岐阜大学医学部皮膚科病態学教室 講師

**研究要旨** エピトープの異なる抗デスモグレイン (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。

共同研究者

北島康雄 岐阜大学医学部  
皮膚病態学教室、教授

伊佐保香 岐阜大学医学部  
皮膚病態学教室、研究員

**A. 研究目的**

天疱瘡 (PV) IgG を培養表皮細胞に作用させると、PVIgG の標的分子である Dsg3 が細胞内に取り込まれ分解することが分かっている。また、作用後30分以内に細胞膜表面に分布する Dsg3 が消失し、24時間後に細胞骨格分画の Dsg3 が消失し、結果的に細胞間接着力の弱い Dsg3 欠損デスモソームが形成される。Dsg3 の分解は天疱瘡における細胞接着障害に大きく関与している<sup>1,2</sup>。

本研究の目的は、Dsg3 分解メカニズムを明らかにし、その分解メカニズムを阻害する方法を見だし、天疱瘡の新しい治療法を開発することである。

**B. 研究方法**

1) Dsg3 の分解産物の検出 有棘細胞癌由来細胞 (DJM-1) を病原性が高い AK 23, 低い AK20, 18 で刺激し 0—30 分後に細胞を 1% Brji buffer で可溶化し、可溶

成分を Dsg3 細胞内ドメイン C 末を認識する AHP319 抗体で免疫沈降し、7.5% のゲルで分離転写し、AHP319 で検出した。

2) 分解部位の検出 様々な細胞外ドメインを認識する抗体 (図 2) AK23, AK19, AK18, AK15, BOS6 を用いて、AK23 刺激 10 分後の DJM-1 細胞の 1% Brij 可溶成分を AHP319 で免疫沈降したサンプルを検出した。

3) キナーゼ阻害剤の検討 Genistein および PP1 を培養液中に加えて 30 分後に AK23 刺激をし、2) の方法にて検討した。

**C. 研究結果**

1) 病原性の高い AK23 抗体は Dsg3 を分解した。DJM-1 細胞を病原性が高い AK 23, 低い AK20, 18 で刺激後、Dsg3 の分解産物の産生を検討した。結果、AK23 とコントロール PV IgG は 110kDa の分解を誘導した。一方で病原性の低い AK18, 20 は 110kDa の分解を誘導しなかった。AK 23 刺激を 0, 1, 3, 10, 30 分行った。刺激後 1 分から 110kDa 分解が誘導され、全長 130kDa が減少した。

2) Dsg3 の分解は EC2-3 付近で生じた。1-161AA を認識する AK23, 19 は 130kDa のみを認識した。200-229AA を認識する

ポリクロナル抗体 BOS6 は 130, 110KDa 両方を認識した。このことより 110KDa の断片は 200-229AA 付近を含むことがわかった。Dsg3 の分解は細胞外ドメイン EC 2-3 の付近で生じている。また、AK15 は 110KDa のみを認識した。

3) チロシンキナーゼ阻害剤 (Genistein, PP1) は 110kDa の精製を部分的に抑制した。細胞内で活性化したチロシンキナーゼが細胞外で酵素を誘導している可能性がある。

4) MMP 1, 2, 3, 8, 9 は Dsg3 の細胞外ドメインの分解に関与していない。

MMP 1, 2, 3, 8, 9 の阻害剤である MMPi(G6001) を培養液中に加えて AK23 刺激を行った。AK23 による 110kDa の産生は阻害されなかった。

#### D. 考察

これまでにさまざまな天疱瘡抗体による細胞生物学的な変化が研究報告されている (Dsg3 の分解、ケラチンのリトラクション<sup>3</sup>、p38 のリン酸化<sup>4</sup>、Rho kinase<sup>5</sup> の活性化阻害、など)。これらの中で、Dsg3 の分解消失反応は、変化が明瞭で、かつ複数の研究施設によって再現性を証明されている。さらに、われわれがこれまでに、Dsg3 の減少が細胞接着低下と密接に関連があることを見いだしているので、病気の主体である細胞接着障害に直接的に関与している細胞生物学的反応であるといえる。本研究の大きな目的に、天疱瘡抗体によって生じるシグナル伝達機構の解明があるが、変化率が大きく、普遍的に生じている反応系を指標に伝達系を解析することが、病態に重要な経路を解析することにつながると考え、Dsg3 の分解機構を詳細に検討し、それに関与するキナーゼの同定を計画した。

110KDa の分解産物の検出は、これまで一連の実験系 (トータルセルライセートを基質にした、10%ゲル泳動) では見られない現象であった。今回 AHP319 の免疫沈

降物を 7.5%のゲルを使用して 150-110KDa 付近の分離を良くすることによって、初めて検出可能になった。これまでに、Dsg3 のバンドが幅広く検出されることは良くあったが、これは、おそらく分解産物を反映していたと考えられる。また、トータルセルライセートを泳動した場合は、150-110KDa 付近には、様々なタンパク質が存在するが、AHP319 の免疫沈降物を基質にしたばあい、150-110KDa 付近に共に泳動されるタンパクがないので、130KDa と 110KDa が良く分離されたと考える。

Dsg3 の細胞外ドメインに結合する mAb のうち、病原性が高い AK23 と陽性コントロールに用いた PVIgG は共に 110KDa を産生した。一方病原性があるが、弱い AK18, 20 はほとんど 110KDa を産生しなかった。細胞間接着力阻害能の強い抗体が Dsg3 の分解誘導力が強いといえるので、我々の検出した 110KDa が病態に直接関与していることを示唆する。

AKmAb による 110KDa を産生は刺激後 1 分ですでに生じている。AK23 mAb は細胞膜表面のデスモソームに組み込まれていないフリー Dsg3 に結合し、素早く (数秒程度) 膜表面で凝集塊を形成する。その後ピットを形成して、徐々に細胞内に取り込まれてエンドサイトーシスされ、分解すると考えられていた。今回の実験では、刺激後 1 分で分解が見られているので、エンドサイトーシスされながら、細胞外ドメインがエンドソームの中で分解を受ける可能性と、細胞膜の表面で、分解する可能性の二つがあると考えている。AK23 で細胞外ドメインをラベルしながら、Dsg3 の行方をトレースしていくと、AK23 は確実にエンドサイトーシスされる Dsg3 の細胞外ドメインに結合した状態で細胞内に取り込まれていく像が観察されるので、おそらくある割合の Dsg3 はエンドソーム内で分解反応が起きていると考えられる。

110KDa の生成は 2 種類のチロシンキナ



ーゼ阻害剤で阻害されたので、この反応系に直接的間接的にチロシンキナーゼが関与していることは確実である。関与している反応系の候補としては、仮説として細胞外で作用するプロテアーゼの活性化に関与している可能性がある。今後、活性型 Src を導入した場合 Dsg3 の分解が生じるか確認したい。

AK15mAb は細胞外ドメインの EC3-5 Dsg3 のスワッピング分子に結合することがわかっている。興味深いことにこの抗体は、110KDa の Dsg3 にのみ反応することがわかった。Dsg3 の細胞外ドメインの露出している部位に結合するならば、全長と分解産物の両者に結合することが予測されるが、110KDa にのみ結合するということは、この分解産物の N 末端の構造が全長にはない構造であることを示唆する。この特徴を利用して、現在 AK15 による免疫沈降物をアミノ酸シーケンスで分解部位を同定中である。このユニークな AK15mAb を用いて 110KDa の産生過程や局在を検討し、Dsg3 の分解反応が天疱瘡のみならず、生理的に生じていることも解析していく予定である。

## E. 結論

結果的に、病原性のある抗体による 110 KDa Dsg 生成により、Dsg3 の減少が細胞外ドメインの分解から始まること、細胞外でのタンパク分解が細胞内のチロシンキナーゼ阻害により抑制されたことから、自己抗体が Dsg3 に結合後細胞内にシグナル伝達を活性化し、細胞外でタンパク分解が生じていることが明らかになった。

## F. 参考文献

1. Aoyama Y, Kitajima Y. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-

depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. **J Invest Dermatol** 1999;112:67-71.

2. 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** 2007; 282:17866-76.
3. Muller EJ, Hunziker T, Suter MM. Keratin intermediate filament retraction is linked to plakoglobin-dependent signaling in pemphigus vulgaris. **J Am Acad Dermatol** 2007;56:890-1; author reply 891-2.
4. Berkowitz P, Hu P, Liu Z, Diaz LA, Enghild JJ, Chua MP, Rubenstein DS. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. **J Biol Chem** 2005;280:23778-84.
5. Waschke J, Spindler V, Bruggeman P, Zillikens D, Schmidt G, Drenckhahn D. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. **J Cell Biol** 2006;175:721-7.

## G. 健康危険情報

該当なし。

## H. 研究発表 (平成19年度)

4. 論文発表 2, 6-9
41. 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 of the enzyme-linked immunosorbent assay index of a bullous pemphigoid antigen noncollagenous domain. **Arch Dermatol** 2007;143:1168-72.
2. Iwata H, Aoyama Y, Esaki C, Kitajima Y. Cicatricial pemphigoid with prominent alopecia. **Eur J Dermatol** 2007;17:338-9.
  3. 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** 2007;299:165-7.
  4. 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** 2007;47:119-25.
  5. 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** 2007;282:17866-76.
2. 学会発表  
なし
  - I. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
  13. 特許取得  
特になし
  14. 実用新案登録  
特になし
  15. その他  
特になし

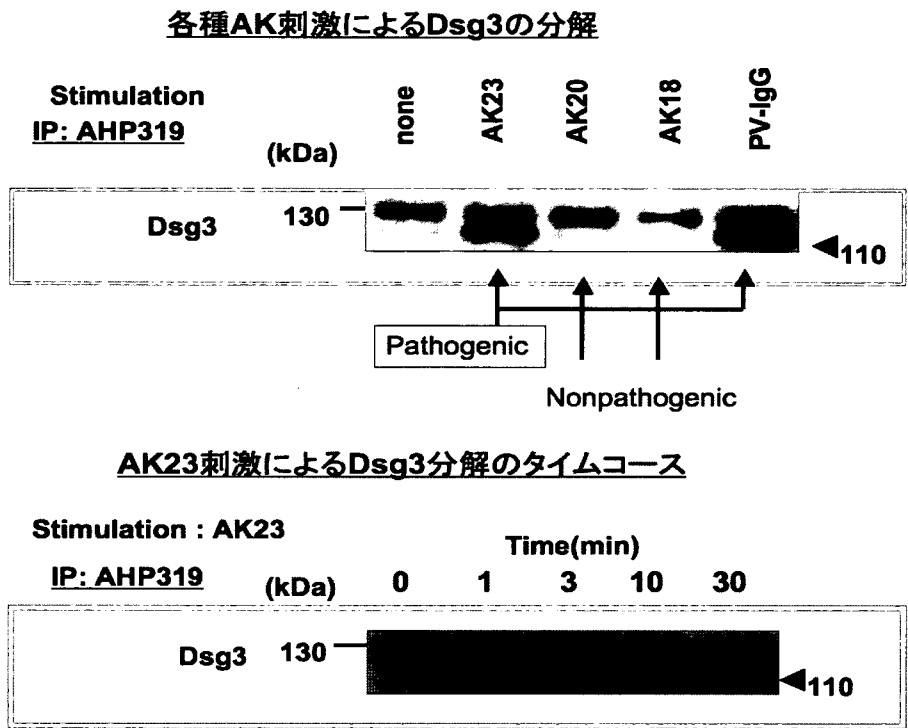
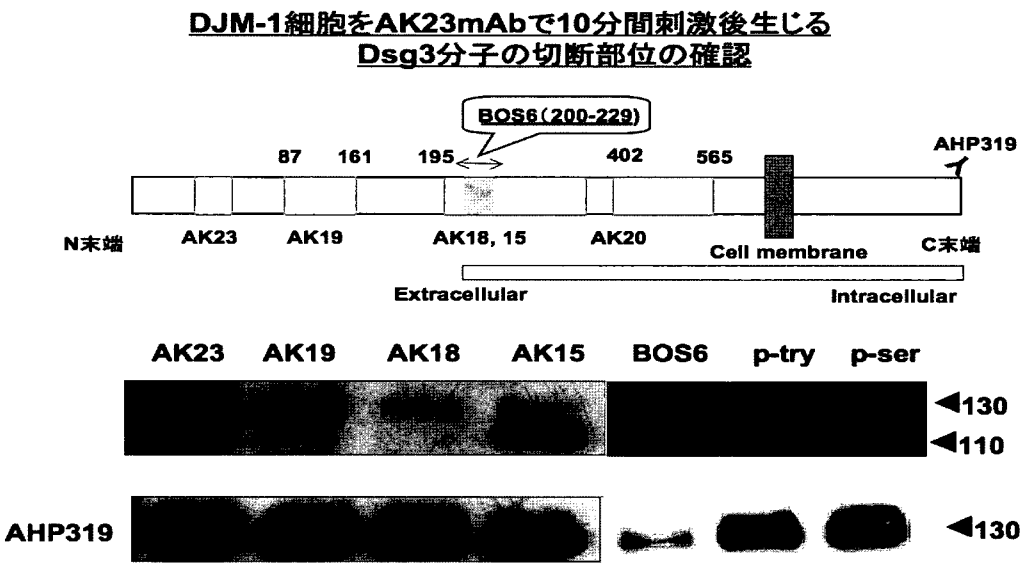


図1 各種 AKmAb による Dsg3 の分解と、AK23mAb による Dsg3 分解時間的経過



- ・110kDa Dsg3はBOS6で認識される部位 (AA200-229 EC2とEC3にかけて) をふくむ。
- ・AK15のエピトープはフルレングスDsg3になると消失する。

2

図2 分解部位の解析 AK23, 19, 18 は 130kDa を認識し AK15 は 110kDa を認識。

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

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

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** S100A8/A9 は Ca 結合性蛋白で、主に、表皮ケラチノサイト、好中球、単球から分泌される proinflammatory mediator である。膿疱性乾癬における炎症反応を反映するバイオマーカーとしての意義を検討するために、血清 S100A8/A9 濃度を測定し、乾癬病型間で比較した。また、白血球数、好中球数、CRP との相関を検定し活動性との関連を検討した。さらに、免疫組織学的に膿疱性乾癬病変部での S100A8/A9 蛋白の発現を検討した。その結果、血清中 S100A8/A9 濃度は尋常性乾癬で健常人より高値を示すだけでなく、膿疱性乾癬ではさらに尋常性乾癬より高値をとることを明らかにした。また、血清 S100A8/A9 値は白血球数、好中球数と正の相関をしめし、膿疱性乾癬の病勢のバイオマーカーとして有用であることを示した。免疫組織学的には膿疱性乾癬病変部の表皮細胞、浸潤好中球に S100A8/A9 蛋白の発現を認め、これらの蛋白が膿疱性乾癬病変形成に重要であることを明らかにした。

共同研究者

大野貴司 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚・粘膜・結合織学

アトピー性皮膚炎14例（サンプル数14例）、健常人21例（サンプル数21例）について血清 S100A8/A9 値を ELISA 法で測定した。臨床症状および臨床検査との相関をみた。

### A. 研究目的

膿疱性乾癬（汎発型）は、通常は発熱と全身の潮紅皮膚上に多発する無菌性膿疱で発症し、病理組織学的に Kogoj 海綿状膿疱を特徴とする角層下膿疱を形成する。しかし、膿疱性乾癬（汎発型）は、全身炎症反応症候群（SIRS）としてとらえるべき病態であり、末梢血白血球数、好中球数、CRP などを指標として病勢の把握が治療方針決定には不可欠である。今回は Ca 結合蛋白である S100A8/A9 の血清濃度を測定し、膿疱性乾癬のバイオマーカーとしての重要性を検討した。

### B. 研究方法

膿疱性乾癬24症例（サンプル数67例）の血清と、関節症性乾癬14症例（サンプル数22例）、尋常性乾癬30例（サンプル数46例）、

（倫理面への配慮）

プールされた血清および、インフォームドコンセントを得たうえで、一般検査検体の残りをご提供頂いた。

### C. 研究結果

1. 血清中 S100A8/A9 値：尋常性乾癬で健常人に比べ有意に上昇がみられ、膿疱性乾癬ではさらに尋常性乾癬より高値であった（図1）。
2. 臨床検査値との関連：血清 S100A8/A9 蛋白濃度は膿疱性乾癬、尋常性乾癬、関節症性乾癬で、末梢血白血球数、好中球数と正の相関を認めた（図2, 3）。CRP との相関は明らかでなかった（データ未掲載）。
3. 膿疱性乾癬病変部での S100A8/A9 蛋