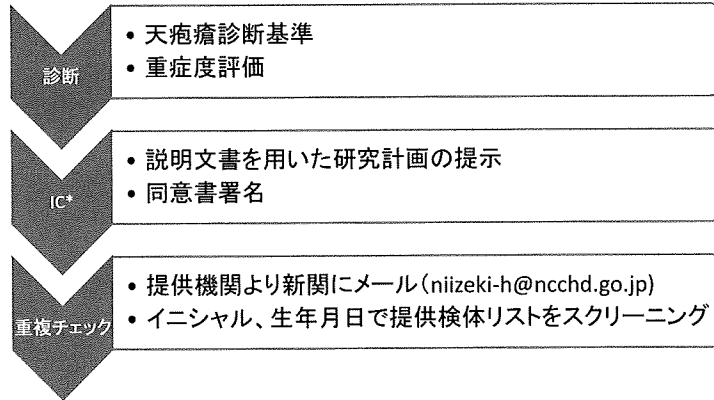


図1 重複チェック手順(1)

診断から重複チェックまでの流れ図。個人情報/new関に通知する。このときnew関には臨床情報を送付しない。



*Informed consent

図2 重複チェックの手順(2)

重複チェックがすんだら、new関は直接に試料提供機関に連絡しない。new関は個人情報の入ったメールはただちに破棄。個人情報は外部と接続していないPCIに保存し、新たな重複チェックに備える。

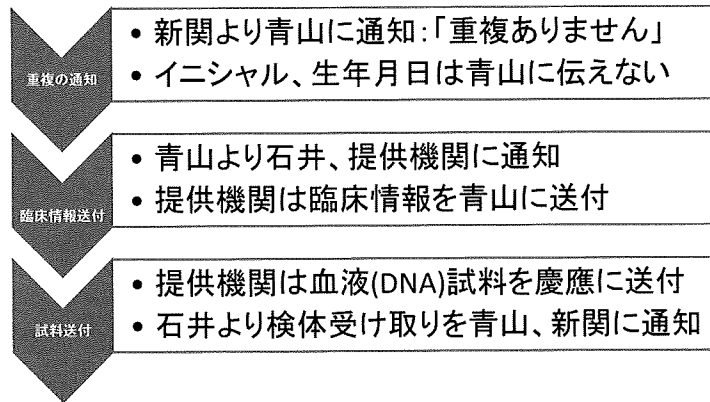
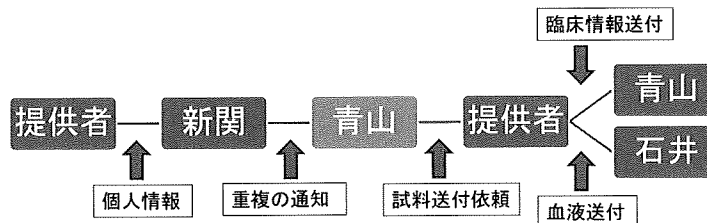


図3 ひとと試料の流れ

図1、図2を流れ図にまとめた。



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

本邦の家族性発症天疱瘡のHLA-DR解析と病型および抗体プロフィール

研究代表者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨 集積された天疱瘡症例から、独立した2家系の家族発症性天疱瘡4症例を抽出した。1家系は尋常性および落葉状天疱瘡の母娘例、他の1家系は尋常性および落葉状天疱瘡で初発した姉妹例で、経過中にそれぞれ落葉状と尋常性へ病型移行が認められた。HLA-DR解析にて4症例すべてにおいて、DRB1*1405が共通して検出され、本邦の天疱瘡発症にDRB1*1405が関与している可能性が示唆された。このハプロタイプは天疱瘡発症の遺伝的要因として重要ではあるが、それ単独では抗体産生や病型を決定するものではない。DRB1*1405がPV・PFどちらの発症にも関与していると考えられることから、Dsg1、Dsg3のどちらのepitopeも、DRB1*1405アレルを持つMHC class IIのmolecular pocketに結合するのではないかと考えられた。

共同研究者

新関 寛徳 国立成育医療センター皮膚科
大野 貴司 岡山大学皮膚科
青山 裕美 岡山労災病院皮膚科
池田佳寿子 岡山大学皮膚科
山本 哲也 岡山大学皮膚科
藤本 亘 川崎医科大学皮膚科
笹岡 俊輔 川崎医科大学皮膚科

A. 研究目的

天疱瘡発症には遺伝的背景が重要であり、世界的にHLA解析がDNAレベルで進められデータが集積されている。わが国においても天疱瘡のHLA解析が実施され、尋常性天疱瘡と関連のあるHLA-DR型が明らかにされてきた[1-4]。しかし、これらのデータは天疱瘡集団と、全人口の比較で実施された研究であり、家族発症例についてのデータは少ない。

本研究班では、家族発症の天疱瘡症例を選び出し、HLA-DRのDNA解析と、その臨床型や自己抗体産生パターンの比較を目的に研究を実施した。

B. 研究方法

家族発症の天疱瘡症例は世界的に見ても稀であるが、本研究班の症例から独立した2家系の家族発症天疱瘡の4症例を抽出して検討することができた。遺伝背景とともに、病型と抗体産生パターンを解析した。

C. 研究結果

1. 天疱瘡集団のHLA-DRB1解析

本研究班の新関らは、尋常性天疱瘡に関連したHLA-DRB1アレルとして、HLA-DRB1*0406、0802、1401、1405、1408を見出した。

2. 家族発症天疱瘡例の解析

第1の家族は、母娘例であり、娘（症例1）は落葉状天疱瘡、母（症例2）は尋常性天疱瘡であった。症例1は抗Dsg1抗体のみが陽性で、症例2は抗Dsg1抗体と抗Dsg3抗体の両方が陽性であった。両症例ともHLA-DRB1*1405を有していた。

第2の家族は、姉妹例であり、姉（症例3）は落葉状天疱瘡で初発し、経過中に尋常性天疱瘡へ病型移行した。妹（症

例4)は、尋常性天疱瘡で初発し、経過中に落葉状天疱瘡へ移行した。移行したときの抗体は、症例3では抗Dsg1抗体と抗Dsg3抗体の両方を保有し、症例4では抗Dsg3抗体だけが陽性であった。症例3、4ともHLA-DRB1*1405-DQB1*0503を共有していた。

D. 考察

DRB1*1405は尋常性および落葉状天疱瘡のいずれの発症にも関与していることが示唆される。また、DRB1*1405アレルを持つ同一患者においては、これまでの報告[4]のように経過中に尋常性から落葉状、あるいはその逆の病型移行が多くみられる。今回の症例においても4例中2例に病型移行が認められた。すなわち、Dsg1、Dsg3抗原のいずれのepitopeも、DRB1*1405アレルを持つMHC class IIのmolecular pocketに結合する可能性が考えられる。さらに、HLAハプロタイプは、天疱瘡の発症に関与しているがそれ単独では抗体産生や病型を決定するものではないと考えられる。

E. 結論

独立した2家系の家族発症天疱瘡4症例において、HLA-DRB1*1405を共有していた。臨床病型は尋常性と落葉状天疱瘡のいずれも認められ、自己抗体は、抗Dsg1抗体および抗Dsg3抗体のいずれも産生し得る。今回検索した4例中2例では病型移行が認められた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成21年度)

論文発表

1. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S, Kaneko F, Izaki S, Tamaki K, Ikezawa Z, Takigawa M, Seishima M, Tanaka T, Miyachi Y, Kaytayama I, Horiguchi Y,

Miyagawa S, Furukawa F, Iwatsuki K, Hide M, Tokura Y, Frue M, Hashimoto T, Ihn H, Fujiwara S, Nishikawa T, Ogawa H, Kitajima Y, Hashimoto K: A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 60: 595-603, 2009.

2. Morizane S, Setsu N, Yamamoto T, Hamada T, Nakanishi G, Asagoe K, Iwatsuki K: Ichthyosiform eruptions in association with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Brit J Dermatol* 161: 115-120, 2009.

3. Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y: Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infectious Diseases* 200: 1078-1087, 2009.

4. Suzuki R, Suzumiya J, Yamaguchi M, Nakamura S, Kameoka J, Kojima H, Abe M, Kinoshita T, Yoshino T, Iwatsuki K, Kagami Y, Tsuzuki T, Kurokawa M, Ito K, Kawa K, Oshimi K for the NK-cell Tumor Study Group: Prognostic factors for mature natural killer (NK) cell neoplasms: aggressive NK cell leukemia and extranodal NK cell lymphoma, nasal type. *Annals of Oncology, Epub*, 2009.

5. Tanaka N, Dainichi T, Ohyama B, Yasumoto S, Oono T, Iwatsuki K, Elfert S, Fritsch A, Brunckner-Tuderman L, Hashimoto T: A case of epidermolysis bullosa acquisita with clinical features of Brunsting-Perry pemphigoid showing an excellent response to colchicine. *J Am Acad Der-*

matol 61:715-719, 2009.

6. Senoh A, Tokuyama Y, Nakayama Y, Fujii K, Iwatsuki K.: Erythema multiforme-like contact reaction due to liquid-formulated 2,2-dibromo-3-nitropropionamide: involvement of cytotoxic. Clin Exp Dermatol 34:e732-736, 2009.
7. Sugiyama-Fukamatsu H, Suzuki N, Nakanishi G, Iwatsuki K.: Epidermolysis bullosa nevus arising in a patient with Dowling-Meara type epidermolysis bullosa simplex with a novel K5 mutation. J Dermatol 36: 447-452, 2009.
8. Nakanishi G, Fujii K, Asagoe K, Iwatsuki K.: Human papillomavirus genome integration in multifocal vulvar Bowen's disease and squamous cell carcinoma. Clin Exp Dermatol 34: e965-967, 2009.
9. 岩月啓氏、照井 正、小澤 明、小宮根真弓、梅澤慶紀、中西 元、原弘之、馬淵智生、青山裕美、北島康雄。膿疱性乾癬（汎発型）診療ガイドライン2009年度版。http://www.dermatol.or.jp/medical/guideline/pdf/nouhou_kansen.pdf
簡易版日皮会誌掲載予定。

学会発表

1. Iwatsuki K.: Internaional Society for Cutaneous Lymphomas Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., March 5, 2009.
2. Iwatsuki K.: Cutaneous disorders associated with Epstein-Barr virus-associated NK/T lymphoproliferative disorders: Cellular and molecular events. (Symposia) The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College

of Dermatologists, Sapporo, Japan, July 10-12, 2009.

3. Iwatsuki K.: Mucocutaneous manifestations due to Epstein-Barr virus-associated T/NK lymphoproliferative disorders: Cellular and molecular events. Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, November 20, 2009.
4. Iwatsuki K.: Cutaneous disorders associated with Epstein-Barr virus infections. 35th Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association, Taipei, Taiwan, November 21-22, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし。

I. 引用文献

1. Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, et al: HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus: Tissue Antigens 1999;54:333-40.
2. 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 1994;44:248
3. Yamashina Y, Miyagawa S, Kawatsu T, et al; Polymorphisms of HLA class II genes in Japanese patients with pemphigus vulgaris; Tissue Antigens 1998;52:74.
4. 新関寛徳：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. 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 2008, pp61-69.

表 1. 家族発症天疱瘡 4 症例のまとめ

症例	発症年齢	臨床亜型	Dsg1	Dsg3	HLA-DRB1 allele	HLA-DQB1 allele
1(娘)	48	PF	91.6	1.0	*1405 *1302	ND
2(母)	56	PV (皮膚、粘膜)	30.4	205.8	*1405 *0405	ND
3(姉)	59	PF→PV	52.5	28.2	*1405 *0104	*0503 *0301
4(妹)	62	PV→PF (粘膜)	6.9	157.9	*1405 *1406	*0503 *0301

図 2 本邦の天疱瘡症例に集積の見られる HLA-DR 型

	allele							
DRB1		*0402	*0406	*0802	*1401	*1404	*1405	*1408
	non-Jewish Caucasian							
	Japanese							
DQA1		*0104	*0301	*0505				
	non-Jewish Caucasian							
	Japanese							
DQB1		*0503	*0302					
	non-Jewish Caucasian							
	Japanese							

(Reference: Lee E, et al: Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris; Human Immunology 67, 125-139, 2006)

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

病因性抗体をより高感度に検出する改良ELISA法の開発

研究分担者 青山裕美 岡山労災病院皮膚科 医長

研究要旨 寛解期でも高い抗体価し治療に迷う天疱瘡症例は多い。デスマグレインのCa²⁺依存性立体構造に結合する抗体は病原性が高く、直線構造に結合する抗体は病原性が低いが、従来のELISA値は抗体結合部位を区別せず非病原性抗体を含む。この問題点を改善する改良ELISA法を開発した。Dsg抗原ELISAプレートをEDTA処理しCa²⁺依存性立体構造を変換（EDTA処理ELISA法）しモノクローナル抗体で検討した。本法は非立体構造に対する抗体価を検出した。通常ELISA値-EDTA処理ELISA値がCa²⁺依存性立体構造に対する抗体価を反映すると考え、さらに患者血清で、通常ELISA値-EDTA処理ELISA値を算出し、臨床経過と比較したところ、重症度を反映した。本法でCa²⁺依存性立体構造を認識する患者IgGとCa²⁺非依存性直線構造を認識する患者IgGを選択し細胞接着阻害能を比較したところ、Ca²⁺非依存性直線構造を認識する患者IgGは病因性がなかった。本法を用いて得られる改良ELISA値は病因性抗体価を推定し、より鋭敏な検査法として患者診断治療に有用である。

共同研究者

岩月 啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

神谷 浩二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

藤井 一恭 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

臨床応用の可能性を検討した。通常ELISA法とEDTA-ELISA法で患者血清中の抗デスマグレイン抗体価を測定し、[通常ELISA値-EDTA-ELISA値]を算出し、立体構造を認識する抗体価として使用できるか検討した。

B. 研究方法

a) モノクローナル抗体の作製

ハイブリドーマを大量培養しHiTrap rProtein A FF column (Amersham Bioscience,Piscataway,NJ)にて精製後、desulting column (Amersham Bioscience)にて脱塩しPBSに置換したものを使用した。

b) PV患者血清

尋常性天疱瘡患者のなかで、寛解期にDsg3 ELISA indexが100以上であった5例を対象とし、それぞれの活動期と寛解期の血清を用いた。またDsg ELISA indexと病勢の関係を調べるため、4例の尋常性天疱瘡患者において活動期から寛

A. 研究目的

背景：本研究の最終目的は天疱瘡の病因シグナル解析である。天疱瘡患者由来の病因抗体と非病因抗体を用いて、病態シグナル伝達系を検討するために病因性を区別する検査法を開発する必要がある。また、病因性を区別する検査法は、臨床診断治療に非常に有用である。

目的：本研究では抗体の病因性を規定する複数因子のひとつであるエピトープを区別する方法としてEDTA処理後ELISA法(EDTA-ELISA)を開発した。個々の症例で抗体値と病勢を反映する抗体検出法として

解期にかけて定期的に採取された血清を用いた。

c) EDTA処理ELISA法

リコンビナント蛋白を固層化したELISAプレートのマイクロカップを0.5mM EDTAにて室温30分処理をし、その後、従来のELISA法を用いてindex valueを測定した。

d) 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 minimum essential medium (MEM)、0.4 μ g/ml ハイドロコルチゾン、20ng/ml EGF、10% FCSを含む培地中で培養した。実験には12 well dishに播種し、コンフルエントの細胞を用いた。

e) 天疱瘡患者IgG

天疱瘡患者血清からProtein-A-columnにより精製したIgGを用いた。

f) 精製IgG刺激と細胞間接着力の測定

濃度依存性の反応をみるためPV-IgGを0.032, 0.16, 0.8, 4, 100, 500, 1000 μ g/mlとなるよう加え37°CでovernightさせたものにDispaseを加え、37°C 15分反応させディッシュから細胞を剥がした。回収した細胞をピペットマンで5回ピペティングを繰り返して物理的的刺激を加えた。その後、最終濃度3%ホルムアルデヒドで固定しcrystal violetで染色し、各細胞コロニーの数を測定した。

C. 研究結果

a) EDTA処理リコンビナントDsg3に対するモノクローナル抗体の反応

OD₄₅₀はEDTA処理により病原性抗体のAK23 mAb、AK19 mAbではそれぞれ65.5%~84.4%、74.8%~87.4%の低下がみられた。AK18 mAb、AK15 mAbでは72.3~79.1%、11.8~43.9%の低下がみられたが、AK20 mAbでは全く結合に差がみられなかった(図1)。

b) EDTA処理リコンビナントDsg3に対

する患者血清の反応

寛解期にDsg3 ELISA indexが100以上であった5例で、活動期と寛解期の血清で通常法による抗Dsg3抗体価に対する立体構造認識抗体価の割合を比較した。活動期では47.8%~85.0%、寛解期では22.8%~65.6%で、すべての症例において活動期は寛解期よりも立体構造を認識する抗体の割合が高かった(図2)。

c) Dsg ELISA indexと病勢の関係

Dsg3と病勢が相関しない2例では、寛解期でDsg3 ELISA indexが100以上まで上昇することがあったが、プレドニンは5~10mgの維持量のまま無症状であった。そこで通常ELISA値とEDTA-ELISA値の差を算出し、病勢と比較した。従来のELISA値より病勢と相関していた。また2例はDsg1 ELISA indexが高値であったが、病勢と相関していた。立体構造を認識する抗体価が50インデックス前後であった。

d) Ca²⁺依存性立体構造を認識する抗体とCa²⁺非依存性立体構造を認識する抗体の病原性の違い

[通常ELISA値-EDTA-ELISA値]が立体構造を認識する抗体値を反映すると仮定し、従来法によるDsg3 ELISA indexは同等で、EDTA処理後のDsg3 ELISA indexが異なる2例のPV-IgGを用いて、病因性の違いを異なる濃度で評価した。

Case1は[通常ELISA値-EDTA-ELISA値]が23.9で、およそ73.5%が立体構造を認識する抗体であった。Case2は19.1%が立体構造を認識する抗体で、大半が線状構造を認識する抗体であった。In vitroで、抗体の細胞間接着力低下能を定量する方法(pipetting assay)で2つの抗体の病原性を比較した。Case1では4~1000 μ g/mlにおいて濃度依存性に病原性がみられたが、Case2では回収された細胞がほとんど断片化されず病

因性に乏しい抗体であることがわかった。

D. 考察

天疱瘡における抗Dsg抗体価は、個々の症例で病勢と相関するが、時に抗体価が重症度と一致しない症例があり、なかでも、臨床的に寛解しているが高い抗体価を有する症例では免疫抑制療法を漸減するタイミングに苦慮する。本研究では抗体の病因性を規定する複数因子のひとつであるエピトープを区別する簡便な検査法としてEDTA-ELISAを開発した。

異なるエピトープを有する5種類のAK mAbでEDTA処理によるOD₄₅₀の変化を比較すると、AK23 mAb、AK19 mAbの認識領域がCa²⁺依存性立体構造であることを支持する結果となった。AK18 mAbの認識部位や結合性はCa²⁺非依存性と報告されているが、今回、AK23 mAb、AK19 mAbと同等の反応がみられたことからEDTA-ELISA法では、Ca²⁺依存性を示唆する結果となった。AK20 mAbではEDTA処理による影響を全く受けず認識領域がCa²⁺非依存性であることを支持する結果となった。この結果より、EDTA処理ELISA法により抗体のエピトープを区別することができる。

EDTA処理ELISA法を用いて患者血清で検討すると、病因性の低い寛解期の患者血清中の抗Dsg3抗体は、Ca²⁺非依存性立体構造を認識する割合が高く、同一症例で比較すると、臨床症状があるときにはCa²⁺依存性立体構造認識する抗体の割合が、高い症例が多いと考える。

個々の症例で[通常ELISA値-EDTA処理ELISA値]を算出すると、従来のELISA値より病勢と相関しており、Ca²⁺依存性立体構造を認識する抗体値として有用であると考える。

この実験結果をもとにPV-IgG刺激による細胞間接着障害能を検討した。[通常ELISA値-EDTA処理ELISA値]から病因性抗体値を算出すると、その割合が多いものでは濃

度依存性に細胞接着障害能を示し、低いものでは細胞接着障害をきたさなかった。このことから[通常ELISA値-EDTA処理ELISA値]は病勢を反映するELISA値として有用であった。(図3)

E. 結論

以上の結果から、[通常ELISA値-EDTA処理ELISA値]は病因性抗体価の推定に有用であることがわかった。今後、この方法が従来のELISA法に変わるモニタリングの指標として臨床応用されることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表(平成21年度)

1. 学会発表

神谷浩二、青山裕美、久田恭子、藤井一恭、山本哲也、岩月啓氏:EDTA処理ELISAプレートを用いたデスマグレイン3のCa²⁺依存性立体構造に対する抗体検出法による患者血清のエピトープ解析結果と病原性の検討、第31回水疱症研究会

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

16. 特許事項

特になし

17. 実用新案登録

特になし

18. その他

特になし

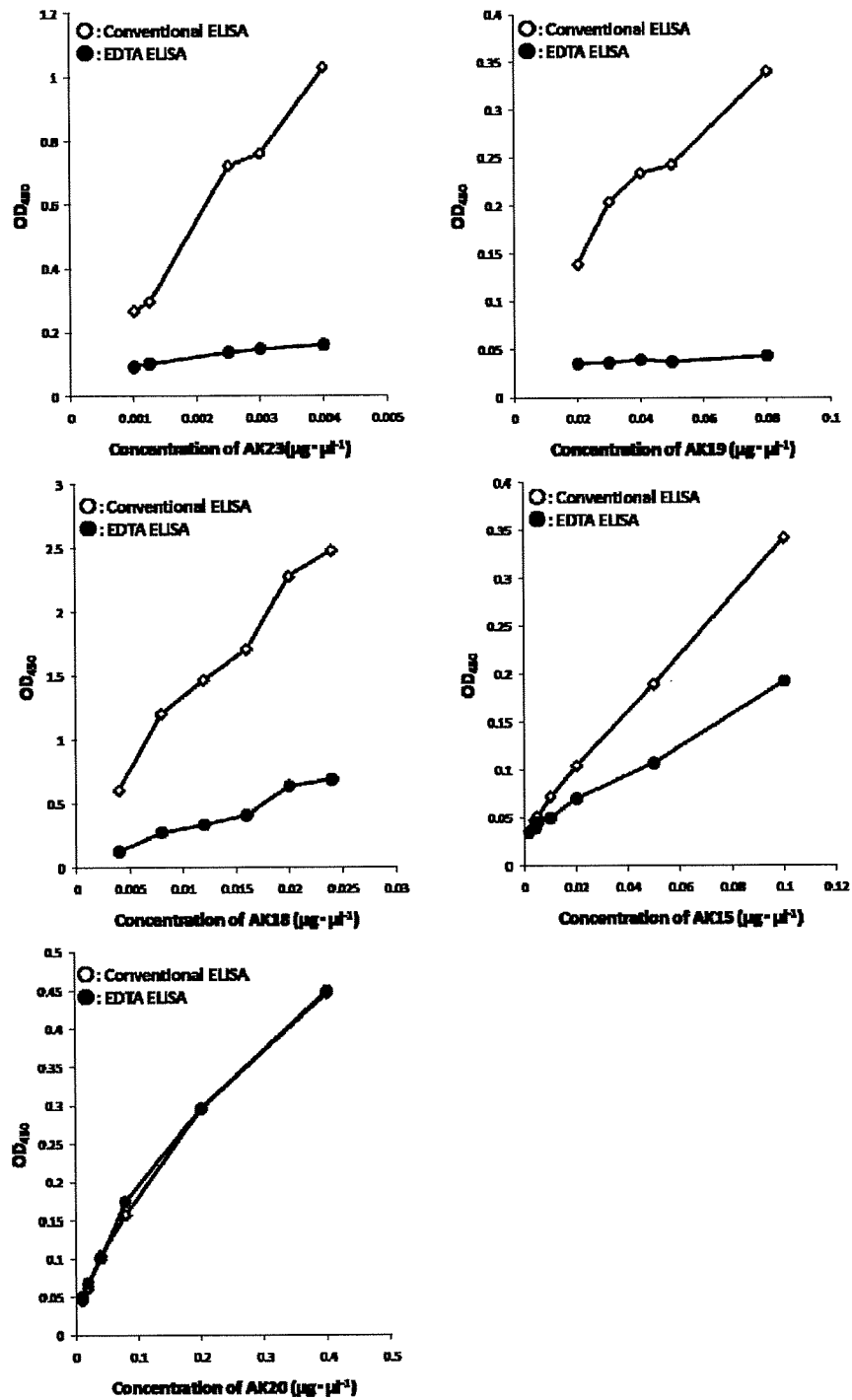


図1 各モノクローナル抗体における0.5 mM EDTA処理後のOD₄₅₀の変化
 AK23 mAb、AK19 mAb、AK18 mAbでは著大な低下がみられた。AK15 mAbにおいても低下がみられたが、AK20 mAbではEDTA処理による変化がみられなかった。

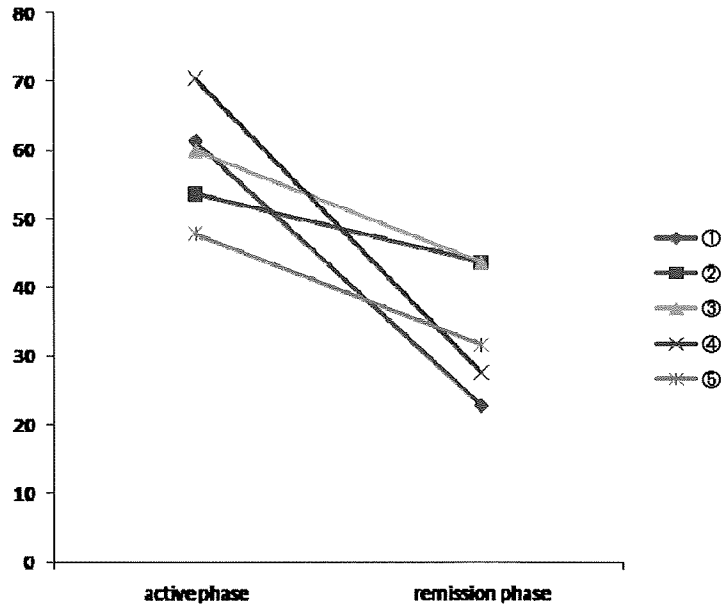


図2 活動期と寛解期におけるCa²⁺依存性立体構造に対する抗体価の割合の比較
 すべての症例においてCa²⁺依存性立体構造に対する抗体価の割合が天疱瘡の活動期に高く、臨床的に水疱を認めない非活動期に低下する傾向があった。

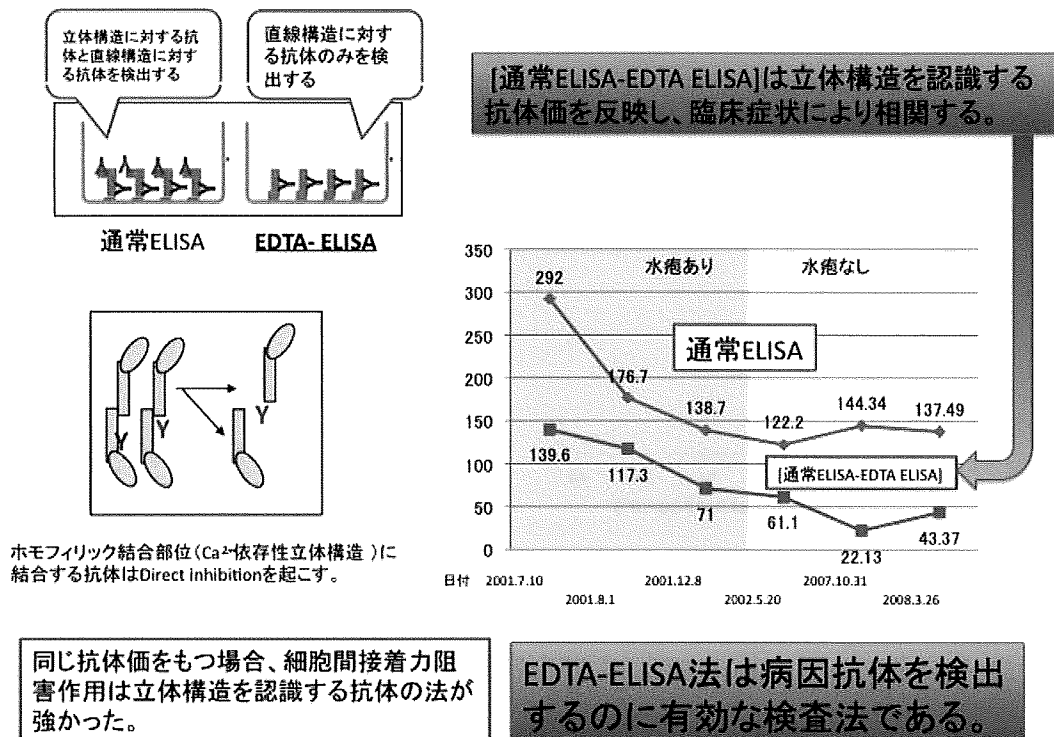


図3 研究成果の概略図

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

天疱瘡発症の分子機構の解析

研究分担者 青山裕美 岡山労災病院皮膚科 医長

研究要旨 デスモグレイン（Dsg）3に自己抗体が結合すると膜分画に含まれるDsg3の発現量が減少する。これは抗体とDsg3がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ分解されるため生じる反応である。最近われわれはDsg3の細胞内ドメインにp120ctnが結合し、Dsg3を膜で安定化することを見いだした。天疱瘡においてDsg3が不安定化し膜に取り込まれるステップにp120ctnが関与しているという仮説を立て、天疱瘡抗体刺激によりDsg3とp120ctnとの結合性の変化について検討した。エピトープと病原性が異なる4種類のDsg3mAbを用いて刺激を行ったときに、病因性抗体ではDsg3結合型p120ctnの量が減少し両者の結合性の低下が示唆された。また、病院性抗体と非病因性抗体のよってDsg3結合型p120ctnのリン酸化profileは明らかに異なっていた。

P120ctnのリン酸化部位を多く有するRegulatory domainのDsg3安定化に対する機能を観察するため、DN2（D 29-233）p120ctn（regulatory domain29-233を欠く）変異体を発現した細胞は天疱瘡抗体によりDsg3の減少が阻害された。おそらくこの領域に結合するキナーゼがP120ctnのDsg3に対する結合性を調節し、Dsg3の膜での安定化を阻害し天疱瘡抗体によるDsg3の分解を促進し、天疱瘡における水疱形成に極めて重要な役割をしている可能性が高い。

共同研究者
岩月 啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学
神谷 浩二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

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。

本研究では、異なるエピトープと病因性を持つ抗デスモグレイン（Dsg）3モノクロナル抗体（mAb）によって誘導される細胞内病態シグナル伝達系の中で特にDsg3の分解を誘導するシグナル（活性化されるキナーゼ分子）を解析することを最終目的とし、その足がかりとしてDsg3の細胞内ドメインに結合してDsg3を膜に安定化させ、Dsg3から解離すると膜からDsg3が消失する作用をもつp120ctnに着目した。

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、材料が枯渇することにより、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。

本研究の目的は、Dsg3分解メカニズムを

B. 研究方法

- a) モノクローナル抗体の作製
ハイブリドーマを大量培養しHiTrap rProtein A FF column（Amersham

Bioscience, Piscataway, NJ) にて精製後、desulting column (Amersham Bioscience) にて脱塩しPBSに置換したものを使用した。

b) 天疱瘡患者IgG

天疱瘡患者血清からProtein-G-columnにより精製したIgGを用いた。

c) Dsg3とp120ctnの結合性の検討

有棘細胞癌由来細胞(DJM-1)を病原性が高いAK23,低いAK20,18で刺激し一定時間後に細胞を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で免疫沈降し、7.5%のゲルで分離転写し、抗p120ctn抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。

d) Dsg3結合型p120ctnのリン酸化状態の検討

c)と同様に免疫沈降法でDsg3結合型p120ctnを電気泳動し、抗リン酸化チロシン抗体、p120ctn特異的リン酸化抗体で検出した。

e) 細胞トランスフェクション

p120ctn(野生型、変異体)をDJM-1細胞にアmaksヌクレオフェクターを用いて遺伝子導入し、48時間後に天疱瘡患者IgGで刺激を加えた。24時間後、細胞を4%パラフォルムアルデヒド固定し、抗Dsg3抗体(ラビットポリクロ)と、抗HA抗体(マウスモノクロ)で2重染色し、遺伝子導入されている細胞のDsg3の発現を検討した。

C. 研究結果

a) 培養細胞の培地中に刺激用のAK-23mAbを加えた系では、1-3分培養し、細胞を可溶化した。蛋白抽出液をprotein A ビーズで回収し、膜表面に発現しているAK23mAbが結合しているDsg3を免疫沈降法で回収した。コントロール実験では、細胞を氷上で冷却し、細胞膜が流動性を失いシグナル伝達系が動かない状態

で同様に細胞外にAK23mAbを加え、膜表面に発現しているDsg3の細胞外ドメインにAk23mAbを結合させた。その後細胞を可溶化し同様にprotein A ビーズで回収した。未刺激時にDsg3にはp120ctnが結合しているが、刺激後3分で減少した。(図1)。

b) エピトープが異なる抗Dsg3mAbによる、Dsg3結合型p120ctnのリン酸化の検討

それぞれmAbによって、Dsg3結合型p120ctnのゲル内移動度が異なった。病原性のあるAK23,19mAb処理により主に95kDのp120ctnが検出された。一方非病原性抗体であるAK20,18mAbは105,110kDであった。特異的リン酸化抗体を使ってこれらの蛋白のリン酸化部位を検討してみたところ、96,228,280はすべての分子量のp120ctnでリン酸化されていた。考察p120ctnには4つのアイソフォーム、3つのオルタネイティブスプライス部位がある。レギュラトリードメインを中心に、リン酸化部位が数カ所ある。結合するisoformが変化する可能性もあるが、リン酸化される部位の数により立体構造が変化し移動度が変わる可能性がより高いと予測される。(図2)。

c) p120ctnのリン酸化部位を多く含むドメインを欠失した変異体の発現した表皮細胞は天疱瘡抗体によるDsg3の分解にどのような影響を与えるか?

図3に示すようにレギュラトリードメインにはリン酸化部位が多数含まれ、キナーゼが結合することがわかっている。リン酸化によるキナーゼと結合が明らかになっているリン酸化部位もあるが詳細は不明である。まず、われわれはキナーゼとの結合に必要でリン酸化部位を多く含むレギュラトリードメインの大半を欠失した変異p120ctnを表皮細胞に発現させ、天疱瘡抗体によるDsg3の分解過程に対する影響を検討した。

10%程度のトランスフェクション効率の培養細胞に天疱瘡IgGを作用させ、膜分画、細胞骨格分画のDsg3の発現量を検討した。変異体を発現させた系ではDsg3の消失がコントロールに比べて遅かった。

また導入細胞の免疫染色でもDsg3の消失が抑制された (data not shown)。

D. 考察

これまでに、天疱瘡抗体がDsg3の細胞外ドメインに結合した後に活性化される様々なシグナルが報告されている。患者由来のIgGには抗Dsg3抗体はポリクローナルに産生され、異なるエピトープと病因性を持つ。本研究では単一刺激によるシグナル伝達経路を詳細に検出するためにはmAbを用い、それらのシグナルが患者由来IgGでも見いだされるかどうか確認する手法を用い、より臨床的に即した病態を検討することを心がけた。

これまでに報告されているシグナル伝達系路のうち、複数施設で追試され再現性があり、mAbでも誘導されることがわかっているのは、Dsg3のリン酸化、RhoAの非活性化、p38MAPKの二峰性の活性化、c-mycの核への移行である。RhoA,p38MAPKの活性化は、細胞骨格の構造変化に関与するシグナルであるが、抗体が抗原に結合し、複数の分子を介した後の下流に位置するシグナルであり、さまざまな細胞生物学的シグナルで活性化されるため水疱形成に特異的であるとはいえない。そのため、自己抗体が結合後1-3分後に自己抗原の細胞内ドメインで生じているDsg3とp120ctnの調節機構は病態に直結した重要な研究対象であるといえる。

本研究で解明された特に重要なことは、異なるエピトープを持ち、病原性のあるmAbと非病原性のmAbでDsg3結合性p120ctnに異なるリン酸化反応が生じたという点である。これまでmAbのエピトープは立体構造を阻害する作用において意義が見いだされていたが、細胞内シグナル伝達機構がエピトープの

違いと病原性の有無によって異なる反応を生じていることは、エピトープの違いがシグナル伝達機構の開始シグナルに関与することと、シグナル伝達機構が水疱形成の病態に関与する点を新たに示唆することができた。今後細胞外に結合する抗体のエピトープの違いが細胞内にシグナルを伝える機構の解明と、シグナル伝達系に関与するキナーゼの同定が必要である。

p120ctnのレギュラトリドメインの欠失変異体がDsg3の分解を抑制したことからこの部位に結合するキナーゼ(ホスファターゼ)が重要な役割をしている可能性がある。今後の研究課題としたい。

E. 結論

天疱瘡抗体の病因性シグナル伝達経路にDsg3とp120ctnの結合調節機構が関与している。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成21年度)

1. 学会発表

1. Aoyama Y, Isa Y, Murase K, Kitajima Y: p120catenin stabilize desmoglein 3 (Dsg3) on the plasma membrane in keratinocytes and its stabilizing function is impaired by anti-Dsg3 antibody, leading to Dsg3 degradation./抗デスモグレイン (Dsg) 3抗体によるp120cateninおよびDsg 3関連細胞接着調節機構と天疱瘡病原性シグナル伝達の解析 第61回日本細胞生物学会シンポジウム 名古屋, 2009

2. 青山裕美, 北島康雄: 天疱瘡抗体による水疱形成機序の解明. 第73回日本皮膚科学会東部支部学術大会 シンポジウム 甲府, 2009

3. Aoyama Y, Isa Y, Murase K, Kitajima Y: P120catenin plays a critical role in stable maintenance of desmoglein 3 (Dsg3) in keratinocytes and is an initial player for the Dsg3-degradation caused by pathogenic anti-Dsg3 pemphigus vulgaris antibody. International pemphigus meeting Berne, Switzerland 2009
4. Aoyama Y, Moriya C, Nagai M, Kitajima Y: Excessive immunoglobulin molecules catabolized pathogenic autoantibodies: A case study of a patient with steroid-resistant pemphigus foliaceus during intravenous high-dose immunoglobulin therapy. American Academy of Dermatology Boston
5. Aoyama Y, Isa Y, Murase K, Kawasaki Y, Kitajima Y, Iwatsuki K: Possible involvement of p120catenin to regulate Desmoglein 3 stability in pemphigus. Plenary session Japanese society investigative dermatology (日本研究皮膚科学会 博多) 2009

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

16. 特許事項
特になし
17. 実用新案登録
特になし
18. その他
特になし

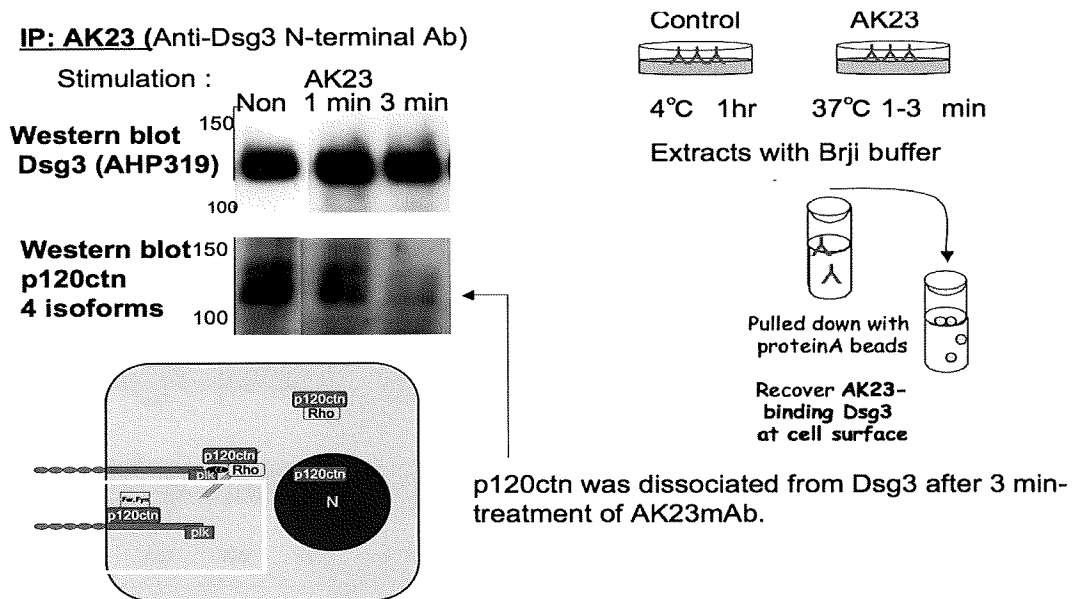
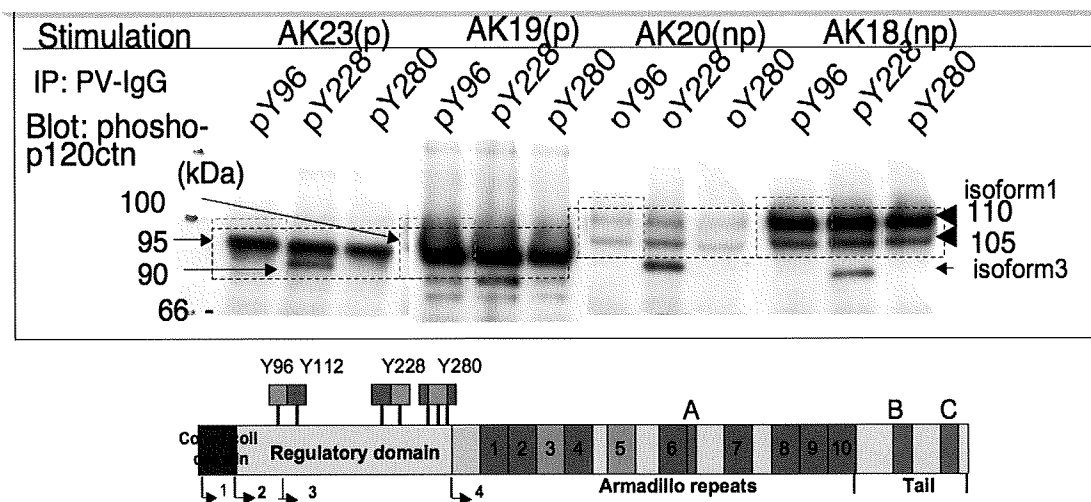


図1 病原性のある抗Dsg3モノクロナル抗体刺激によるDsg3とp120ctnの結合性の検討
病原性AK23mAb刺激によりDsg3に結合していたp120ctnの量が減少した。



- Phosphorylated p120ctn on Y96 is isoform 1 or 2.
- These three isoforms (95, 105 and 110 kDa) have regulatory domain.
- Phosphorylated isoforms 105 & 110 kDa, which are caused non-pathogenic AK 20 and 18 treatment, may prevent Dsg3 degradation.
- These isoforms might be different in phosphorylation sites.

図2 エピトープが異なる抗Dsg3mAbによる、Dsg3結合型p120ctnのリン酸化の検討

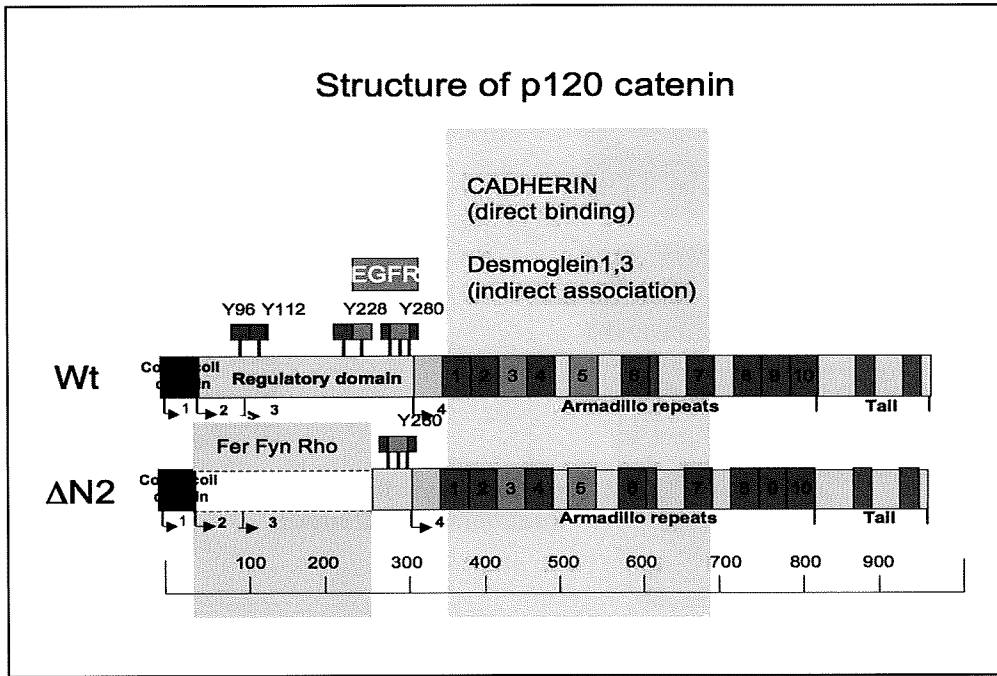
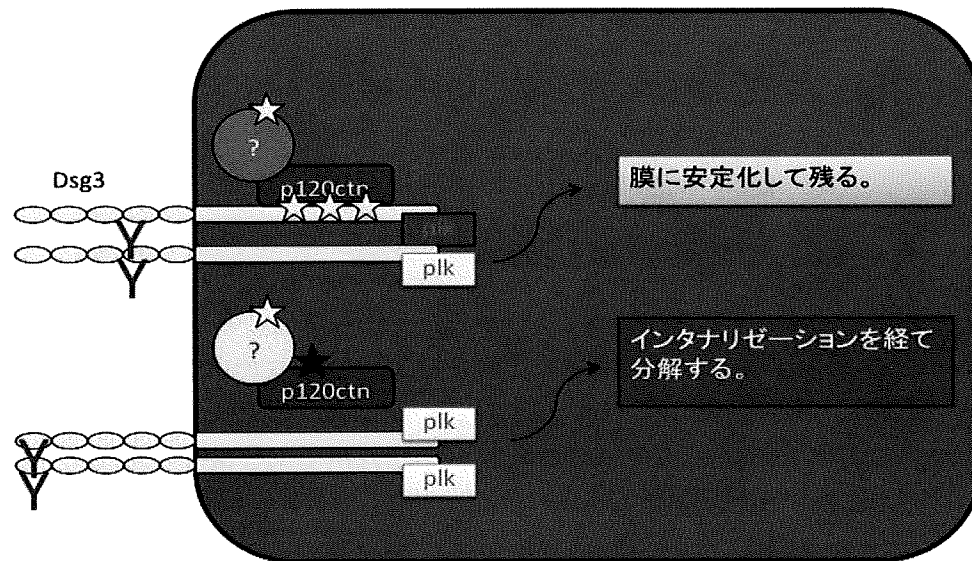


図3 p120ctnとΔN2の分子構造



仮説
 抗体の種類によって細胞内で活性化する経路が異なるのではないか？

図4 病理性抗体と非病理性抗体の反応性の違いを説明するモデル図

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

抗ラミニン γ 1類天疱瘡疾患モデルマウスの作製

研究分担者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授

研究要旨 水疱性類天疱瘡と類似した臨床像を呈する抗p200類天疱瘡において、その名前の由来である、患者血清と反応するヒト真皮抽出物中の200kDタンパク質は今まで同定されていなかった。近年我々はこのタンパク質がラミニン γ 1である事を報告し、新たに“抗ラミニン γ 1類天疱瘡”の呼称を提唱した（Dainichi et al. *PNAS*, 2009）。しかしラミニン γ 1に対する自己抗体の産生が水疱形成に関与しているかは未だ解明されていない。現在我々は本疾患の病態を解明するために、抗ラミニン γ 1類天疱瘡疾患モデルマウスの作製に取り組んでいる。

共同研究者

古賀 浩嗣 久留米大学 皮膚科
石井 文人 久留米大学 皮膚科
大日 輝記 久留米大学 皮膚科
辛島 正志 久留米大学 皮膚科

A. 研究目的

我々は、本疾患はラミニン γ 1に対する自己抗体が産生される事で、表皮真皮接合部の接着が障害されて水疱が形成されていると仮説を立て、マウスラミニン γ 1リコンビナント蛋白（C末端の107アミノ酸）を大腸菌を用いて作製し、それを種々の方法でマウスへ投与することで、水疱が形成されるかを検討した。

B. 研究方法

今までに水疱性類天疱瘡や後天性表皮水疱症で行われたモデルマウス作製に倣い、2種の方法で水疱形成を試みた。一つはpassive modelと呼ばれる、リコンビナント蛋白をウサギに投与する事で得られたウサギ抗血清からIgG分画を精製し、マウスへ投与する方法である。もう一つは、active modelと呼ばれる、リコンビナント蛋白をアジュバントと共に直接マウスへ投与する方法である。また尋

常性天疱瘡や後天性表皮水疱症では患者血清をマウスに投与する事で水疱形成を生じさせることが出来るが、これはヒトとマウスにおいてエピトープの相同性が高い事で可能となっている。ラミニン γ 1C末端では両者間の相同性は高く、本患者血清の一部ではマウス表皮基底膜部への反応がみられた。そこで、わずか一症例ではあるが当科で保存していた血漿交換時の廃液からIgGを精製してマウスへ投与を行った。投与プロトコールについては図1に詳細を示す。それぞれ、組織学および蛍光抗体法にて評価を行った。

C. 研究結果

いずれのmodelでも肉眼的、組織学的に明らかな水疱形成は観察されなかった。蛍光抗体法に関しては、passive modelでは直接法で表皮基底膜部へのIgG沈着が観察されたものの、補体の沈着は観察されなかった。間接法ではx10,240までIgGの沈着が確認できた。しかし、患者IgGを投与したマウスでは直接法でIgG、補体のいずれも沈着は確認できなかった。Active modelではIgG、補体のいずれも沈着は観察されなかった。（図2）

D. 考察

先に確立された後天性表皮水疱症疾患モデ

ルマウスでは、水疱が形成されたマウスにおいて補体の沈着が観察された割合が、水疱形成がみられなかったマウス群に比べて有意に高かったと報告されている。今回行ったプロトコールでは補体の表皮基底膜部への沈着は観察されておらず、補体の活性化が誘導できなかった為、水疱形成が生じなかった可能性は否定できない。また、患者血漿から精製したIgGを投与したマウスではIgG、補体の沈着のいずれも観察できなかったが、わずか一症例のみでの検討であり、この評価には今後の症例の蓄積が必要である。

E. 結論

今回の投与プロトコールでは水疱形成はみられなかったが、ラミニン γ 1抗体の病原性を評価するにはまだ十分ではないと考える。今後さらに投与プロトコールを検討する事で、水疱症モデルマウスの作製に取り組んでいく。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成21年度）

論文発表

1. Dainichi T, Kurono S, Ohyama B, Ishii N, Sanzen N, Hayashi M, Shimono C, Taniguchi Y, Koga H, Karashima T, Yasumoto S, Zillikens Z, Sekiguchi K, Hashimoto T. Anti-laminin gamma-1 pemphigoid. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106 (8) :2800-2805.
2. Nakama T, Hashikawa K, Higuchi M, Ishii N, Miyasato M, Hamada T, Hashimoto T. Pigmentary demarcation lines associated with pregnancy. Clin Exp Dermatol. 2009;34: e573-576.
3. Hamada T, Fukuda S, Ishii N, Abe T, Nagata K, Koro O, Hatano Y, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. A Japanese family with dominant pretibial dystrophic epidermolysis bullosa:

Identification of a new glycine substitution in the triple-helical collagenous domain of type VII collagen. J Dermatol Sci. 2009;54: 212-214.

4. Tanaka N, Dainichi T, Ohyama B, Yasumoto S, Oono T, Iwatsuki K, Elfert S, Bruckner-Tuderman L, Hashimoto T. A case of epidermolysis bullosa acquisita with clinical features of Brunsting-Perry pemphigoid showing an excellent response to colchicines. J Am Acad Dermatol. 2009;61 (4) :715-719.
5. Dainichi T, Ohyama B, Ishii N, Yamaguchi Z, Yasumoto S, Hashimoto T. Refractory oral ulcers with multiple IgG/IgA autoantibodies without skin lesions. J Am Acad Dermatol; in press.
6. Imada K, Dainichi T, Yokomizo A, Tsunoda T, Song YH, Nagasaki A, Sawamura D, Nishie W, Shimizu H, Fukagawa S, Urabe K, Furue M, Hashimoto T, Naito S. Birt-Hogg-Dube syndrome with clear-cell and oncocytic renal tumour and trichoblastoma associated with a novel FLCN mutation. Br J Dermatol. 2009;160: 1350-1353.
7. Miyakura T, Yamamoto T, Okubo Y, Ishii N, Oyama B, Hashimoto T, Tsuboi R. Pemphigus foliaceus with prominent neutrophilic pustules initially presenting as erythroderma. Clin Exp Dermatol. 2009;34 (5) : e46 - e49.
8. Muller R, Heber B, Hashimoto T, Messer G, Mullegger R, Niedermeier A, Hertl M. Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus. Clin Exp Dermatol. 2009;34: 898-903.

9. Toyama T, Nakamura K, Kuramochi A, Ohyama B, Hashimoto T, Tsuchida T. Two cases of childhood bullous pemphigoid. *Eur J Dermatol.* 2009;19 (4) :368-71.
10. Takeichi S, Kubo Y, Arase S, Hashimoto T, Ansai S. Brunsting-Perry type localized bullous pemphigoid, possibly induced by furosemide administration and sun exposure. *Eur J Dermatol.* 2009;19: 500-503.
11. Ishii N, Hashimoto T, Zillikens D, Ludwig RJ. High-Dose Intravenous Immunoglobulin (IVIg) Therapy in Autoimmune Skin Blistering Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009.
12. Abreu-Velez AM, Howard MS, Hashimoto K, Hashimoto T. Autoantibodies to sweat glands detected by different methods in serum and in tissue from patients affected by a new variant of endemic pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol Res.* 2009; 301: 711-718.
13. Akin MA, Gunes T, Akýn L, Ohyama B, Kontas O, Hashimoto T. A newborn with bullous pemphigoid associated with linear IgA bullous dermatosis. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2009;18 (2) :66-70.
14. Howard MS, Yepes MM, Maldonado-Estrada JG, Villa-Robles E, Jaramillo A, Botero JH, Patiño PJ, Hashimoto T, Abreu-Velez AM. Broad histopathologic patterns of non-glabrous skin and glabrous skin from patients with a new variant of endemic pemphigus foliaceus-part 1. *J Cutan Pathol.* 2009 Jul 13. [Epub ahead of print]
15. Hashikawa K, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Kuroki R, Nakama T, Yasumoto S, Tamai K, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. The compound heterozygote for new/recurrent COL7A1 mutations in a Japanese patient with bullous dermolysis of the newborn. *J Dermatol Sci.* 2009; 56:66-68.
16. Grover RK, Stites PC, Helm TN, Hashimoto T, Beutner EH. A case of bullous disease limited to the skin illustrates the spectrum of neoplasia induced autoimmunity. *Dermatol Online J.* 2009;15 (7) :5.
17. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S, Kaneko F, Izaki S, Tamaki K, Ikezawa Z, Takigawa M, Seishima M, Tanaka T, Miyachi Y, Katayama I, Horiguchi Y, Miyagawa S, Furukawa F, Iwatsuki K, Hide M, Tokura Y, Furue M, Ihn H, Fujiwara S, Nishikawa T, Ogawa H, Kitajima Y, Hashimoto K, Hashimoto T. Pemphigus Study Group. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60 (4) :595-603.
18. Hashimoto T, Tokura Y, Shimizu H. Editorial: Welcome all international dermatology researchers to the 34th Annual Meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology (JSID) and the JSID-Asia-Oceania-Forum on "Hair Research and Stem Cells" December 4-6, in Fukuoka City, Kyushu, Japan. *J Dermatol Sci.* 2009; 55:143.
19. Probst C, Schlumberger W, Stocker W, Recke A, Schmidt E, Hashimoto T, Zhu XJ, Zillikens D, Komorowski L. Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies

- against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus. *Clin Chim Acta*. 2009;410: 13-18.
20. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Shibata M, Nishimura M, Hashimoto T, Shimizu H: Clinical and laboratory investigations Circulating IgA and IgE autoantibodies in anti-laminin-332 mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2009 Sep 14. [Epub ahead of print]
 21. Kobayashi K, Tanaka M, Nakajima S, Ito H, Harada T, Hashimoto T. Simultaneous occurrence of anti-BP180 mucous membrane pemphigoid and mucosal-dominant pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34: e785-788.
 22. Takahara M, Tsuji G, Ishii N, Dainichi T, Hashimoto T, Kohno K, Kamezaki K, Nagafuji K, Takeuchi S, Moroi Y, Furue M. Mucous membrane pemphigoid with antibodies to the beta (3) subunit of Laminin 332 in a patient with acute myeloblastic leukemia and graft-versus-host disease. *Dermatology*. 2009;219: 361-364.
 23. Furukita K, Ansai S, Hida Y, Kubo Y, Arase S, Hashimoto T. A case of epidermolysis bullosa acquisita with unusual clinical features. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34: e702-704.
 24. Demitsu T, Yoneda K, Iida E, Sasaki K, Umemoto N, Kakurai M, Wakatabi K, Yamada T, Ohyama B, Hashimoto T. A case of mucous membrane pemphigoid with IgG antibodies against all the alpha3, beta3 and gamma2 subunits of laminin-332 and BP180 C-terminal domain, associated with pancreatic cancer. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34 (8) : e992-994.
 25. Matsuo A, Tanaka R, Shiotani A, Haruma K, Ishii N, Hashimoto T, Fujimoto W. Remission of sublamina densa-type linear IgA bullous dermatosis after *Helicobacter pylori* eradication. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34: e988-989.
 26. Düker I, Schaller J, Rose C, Zillikens D, Hashimoto T, Kunze J. Subcorneal pustular dermatosis-type IgA pemphigus with autoantibodies to desmogleins 1, 2, and 3. *Arch Dermatol*. 2009;145 (10) :1159-62.
 27. Abreu Velez AM, Howard MS, Hashimoto T. Palm tissue displaying a polyclonal autoimmune response in patients affected by a new variant of endemic pemphigus foliaceus in Colombia, South America. *Eur J Dermatol*. 2009 Nov 4[Epub ahead of print]
 28. Dainichi T, Kawaguchi A, Ueda S, Tajiri R, Fumimori T, Kakuma T, Hashimoto T. Skin Tightening Effect Using Fractional Laser Treatment: I. A Randomized Half-Side Pilot Study on Faces of Patients with Acne. *Dermatol Surg*. 2009 Nov 3. [Epub ahead of print]
 29. Koga H, Hamada T, Ohyama B, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. An association of idiopathic chronic eosinophilic pneumonia with pemphigoid nodularis: a rare variant of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*. 2009;145:1339-1340.
 30. Ando S, Sato-Matsumura KC, Kasai M, Nemoto-Hasebe I, Hoshina D, Ohyama B, Hashimoto T, Shimizu H. Desmoglein1 and BP 180 ELISA indexes correlating with disease activity in a patient with coexisting pemphigus foliaceus and bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol*.