

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

腫瘍随伴性天疱瘡（PNP）における抗 $\alpha 2$ macroglobuline-like-1（A 2 ML 1）抗体についての検討

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 腫瘍随伴性天疱瘡（PNP）は、悪性または良性の新生物（主に血液系増殖性疾患）に伴い、びらん形成を主体とした重篤な粘膜病変と多彩な皮膚病変を認め、デスマグレインおよびプラキン分子に対するIgG自己抗体を有する、自己免疫性疾患であるとされている。また液性免疫のみならず、細胞性免疫による粘膜上皮、皮膚への障害も特徴的である。最近、本症において未同定であったp170抗原に関して、A 2 ML 1であるという発表がなされたことを受け、PNP患者血清中のA 2 ML 1抗体の有無を調べ、抗体保有と臨床症状との関連性について検討した。

共同研究者

沼田 早苗 久留米大学医学部皮膚科学教室、
特別研究員

Kwesi Tey 久留米大学医学部皮膚科学教室、
特別研究員

夏秋 洋平 久留米大学医学部皮膚科学教室、
助教

十亀 良介 久留米大学医学部皮膚科学教室、
助教

石井 文人 久留米大学医学部皮膚科学教室、
助教

辛島 正志 久留米大学医学部皮膚科学教室、
講師

A. 研究目的

腫瘍随伴性天疱瘡（PNP）においては、多くの抗原蛋白に対する自己抗体を有することが特徴的とされ、免疫沈降法により250kDa、230kDa、210kDa、190kDa、170kDaの蛋白群とさまざまなパターンで反応することが知られている。

最近フランスのグループによって、これまで未同定であった170kDaの抗原タンパクがA 2 ML 1であることが示唆された。今回我々は、PNP患者血清中のA 2 ML 1抗体の有無を調べ、抗体保有と臨床症状との関連性について検討した。

B. 研究方法

A 2 ML 1のcDNAを組み込み、C末端にc-myc tagを付けたプラスミドベクターを大腸菌で増殖させ、COS 7細胞にtransfectionして発現させた。

発現の確認は抗c-myc抗体によるウエスタンブロットで行った。

その後、回収したcell lysateを用い、免疫沈降とウエスタンブロットにて患者血清中の抗A 2 ML 1抗体の有無を検出した。

対象は久留米大学皮膚科学教室に保存されているPNP患者血清68サンプルである。

C. 研究結果

68サンプル中39サンプル（57.4%）からA 2 ML 1抗体が検出され、健常人の血清では検出されなかった（表1）。

随伴腫瘍の検討では、Castleman disease、胸腺腫、sarcoma、固形腫瘍などで抗体保有率が高かった。

間接蛍光免疫染色においては、患者血清を用いても同様の発現パターンを示した（図1）。

D. 考察

A 2 ML 1は、A 2 Mプロテナーゼインヒビターファミリーに属し、上皮、胸腺、精巣など多くの組織において発現している。一

方、腎上皮や肺などでは発現が認められないとされている。

A 2ML1 の詳しい機能はまだ定義されていないが、おそらく生体防御機構に関連しており、上皮においては恒常性の修復や角化に直接関与していると考えられている。

随伴腫瘍に関しては、Castleman disease が抗p170抗体保有患者に多くみられるという報告があるが、今回の検討でもこれと一致する結果となった。

また、間接蛍光抗体染色においては、患者血清を用いても同様の発現パターンを示し、p170がA 2ML1であることを強く示唆する結果となった。

さらに、A 2ML1 は様々な組織で発現していることから、PNP患者における抗A 2ML1 自己抗体は、本症の発症や重症化に関連している可能性があると考えられる。

E. 結論

PNPにおける抗A 2ML1 抗体の検索は、病態把握に有用となる可能性があり、今後も詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

1. Rafel D, Mueller R, Ishii N, Llamazares Prada M, Hashimoto T, Hertl M, Eming R. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *Am J Pathol*, in press.
2. Mao X, Nagler AR, Farber SA, Choi EJ, Jackson LH, Leiferman KM, Ishii N, Hashimoto T, Amagai M, Zone JJ, Payne AS. Autoimmunity to Desmocollin 3 in Pemphigus Vulgaris. *Am J Pathol*. 2010 Oct 15. [Epub ahead of print]
3. 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* 36 (1) : 66-70,2010.
4. Dainichi T, Ueda S, Fumimori T, Kiryu H, Hashimoto T. Skin Tightening Effect Using Fractional Laser Treatment II : A Pilot Animal Study on Skin Remodeling. *Dermatol Surg* 36 (1) : 71-75,2010.
5. Abreu-Velez AM, Howard MS, Hashimoto T, Grossniklaus HE. Human eyelid meibomian glands and tarsal muscle are recognized by autoantibodies from patients affected by a new variant of endemic pemphigus foliaceus in El-Bagre, Colombia, South America. *J Am Acad Dermatol* 62(3) : 437-447,2010.
6. Csorba K, Sesarman A, Oswald E, Feldrihan V, Fritsch A, Hashimoto T, Sitaru C. Cross-reactivity of autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita with murine collagen VII. *Cell Mol Life Sci* 67(8) : 1343-1351,2010.
7. Masu T, Okuyama R, Tsunoda T, Hashimoto T, Aiba S. Paraneoplastic pemphigus associated with malignant gastrointestinal stromal tumour. *Acta Derm Venereol* 90 (1) : 89-90,2010.
8. Groves RW, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Markus HS, Lovell PA, Ozoemena L, Lai-Cheong JE, Gawler J, Owaribe K, Hashimoto T, Mellerio JE, Mee JB, McGrath JA. A Homozygous Nonsense Mutation within the Dystonin Gene Coding for the Coiled-Coil Domain of the Epithelial Isoform of BPAG1 Underlies a New Subtype of Autosomal Recessive Epidermolysis Bullosa Sim-

- plex. *J Invest Dermatol* 130 (6) : 1551-1557,2010.
9. Schmidt E, Dahnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stocker W, Hashimoto T, Brocker EB, Recke A, Rose C, Zillikens D. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3 : correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol*. 2010 Feb 16. [Epub ahead of print] PMID : 20163452.
 10. Chan PT, Ohyama B, Nishifuji K, Yoshida K, Ishii K, Hashimoto T, Amagai M. Immune response towards amino-terminus of desmoglein 1 prevails across different activity stages in non-endemic pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol*. 2010 Feb 15. [Epub ahead of print]
 11. Miura T, Kawakami Y, Oyama N, Ohtsuka M, Suzuki Y, Ohyama B, Hashimoto T, Motoki Y, Yamamoto T. A case of pemphigus herpetiformis with absence of antibodies to desmogleins 1 and 3. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24 (1) : 101-103, 2010.
 12. Hashimoto T, Dainichi T, Ohyama B, Hamada T, Ishii N, Sato N, Tanigawa O, Nakayama J, Amano S, Nishiyama T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S. A case of antilaminin 332 mucous membrane pemphigoid showing a blister on the bulbar conjunctiva and a unique epitope on the alpha 3 subunit. *Br J Dermatol* 162 (4) : 898-899,2010.
 13. Hashimoto T, Hamada T, Dainichi T, Ishii N, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S. How Does Intramolecular Epitope Spreading Occur in BPAG2 (BP180) ? *J Invest Dermatol* 130 (4) : 924-926,2010.
 14. Dainichi T, Ohyama B, Ishii N, Yamaguchi Z, Yasumoto S, Hashimoto T. Refractory oral ulcers with multiple immunoglobulin G/immunoglobulin A autoantibodies without skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 62 (4) : 712-715,2010.
 15. Dainichi T, Ueda S, Fumimori T, Kiryu H, Hashimoto T. Skin Tightening Effect Using Fractional Laser Treatment II : A Pilot Animal Study on Skin Remodeling. *Dermatol Surg* 36 (1) : 71-75,2010.
 16. Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T. Epidermolysis bullosa acquisita : What's new ? *J Dermatol* 37 : 220-230,2010.
 17. Dainichi T, Koga H, Tsuji T, Ishii N, Ohyama B, Ueda A, Natsuaki Y, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T. From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin-1 pemphigoid. *J Dermatol* 37 : 231-238,2010.
 18. Yamaki F, Mayuzumi N, Ikeda S, Hashimoto T. Immunoglobulin A antibodies against desmoglein 1, envoplakin, periplakin and BP230 in a patient with atypical bullous pemphigoid. *J Dermatol* 37 : 255-258,2010.
 19. Nakashima H, Fumimoto M, Watanabe R, Ishiura N, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T, Tamaki K. Herpetiform pemphigus without anti-desmoglein 1/3 autoantibodies. *J Dermatol* 37 : 264-68,2010.
 20. Kaminaka C, Kanazawa N, Furukawa F, Hashimoto T. Case of anti-laminin-1 pemphigoid associated with psoriatic erythroderma. *J Dermatol* 37 : 272-275,2010.
 21. Jin K, Nakano H, Akasaka E, Rokunohé D, Minagawa S, Ishii N, Hashimoto

- T, Sawamura D. Linear immunoglobulin A bullous dermatosis possibly induced by mefenamic acid. *J Dermatol* 37 : 269-271,2010.
22. Koga H, Ishii N, Hamada T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. Successful treatment with mycophenolate mofetil of four Japanese patients with pemphigus vulgaris. *Eur J Dermatol*. 2010 Apr 20. [Epub ahead of print]
 23. Nagy N, Wedgeworth E, Hamada T, White JM, Hashimoto T, McGrath JA. Schopf-Schulz-Passarge syndrome resulting from a homozygous nonsense mutation in WNT10A. *J Dermatol Sci*. 2010 Mar 23. [Epub ahead of print]
 24. Santiago-Et-Sánchez-Mateos D, Juárez Martín A, González De Arriba A, Delgado Jiménez Y, Fraga J, Hashimoto T, García-Diez A. IgG/IgA pemphigus with IgA and IgG antidesmoglein 1 antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay : presentation of two cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 May 7. [Epub ahead of print]
 25. Kabashima R, Hino R, Bito T, Kabashima K, Nakamura M, Bungo O, Hashimoto T, Tokura Y. Epidermolysis bullosa acquisita associated with psoriasis. *Acta Derm Venereol* 90 (3) : 314-316,2010.
 26. Tateishi C, Tsuruta D, Nakanishi T, Uehara S, Kobayashi H, Ishii M, Hashimoto T. Antidesmocollin- 1 antibody-positive, antidesmoglein antibody-negative pemphigus herpetiformis. *J Am Acad Dermatol* 63 (1) : e8-e10,2010.
 27. Endo Y, Kato M, Kitoh A, Kore-Eda S, Fukuda S, Hashimoto T, Toda K, Miyachi Y, Utani A. Pemphigoid without Mucous Involvement Showing Autoantibodies against Laminin-332 Gamma 2 Subunit. *Br J Dermatol*. 2010 Jun 25. [Epub ahead of print]
 28. Oji V, Tadini G, Akiyama M, Bardou CB, Bodemer C, Bourrat E, Coudiere P, Digiovanna JJ, Elias P, Fischer J, Fleckman P, Gina M, Harper J, Hashimoto T, Hausser I, Hennies HC, Hohl D, Hovnanian A, Ishida-Yamamoto A, Jacyk WK, Leachman S, Leigh I, Mazereeuw-Hautier J, Milstone L, Morice-Picard F, Paller AS, Richard G, Schmuth M, Shimizu H, Sprecher E, Van Steensel M, Taïeb A, Toro JR, Vabres P, Vahlquist A, Williams M, Traupe H. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses : Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Jul 17. [Epub ahead of print]
 29. Morimoto K, Fukumoto T, Kobayashi N, Nagashima C, Tateishi C, Tsuruta D, Hashimoto T, Asada H. Pruritic reddish-brown papules and plaques as initial skin lesions in a case of anti-laminin gamma 1 pemphigoid without psoriasis. *Br J Dermatol*. 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
 30. Schepens I, Jaunin F, Begre N, Laderach U, Marcus K, Hashimoto T, Favre B, Borradori L. The Protease Inhibitor Alpha-2-Macroglobuline-Like-1 Is the p170 Antigen Recognized by Paraneoplastic Pemphigus Autoantibodies in Human. *PLoS One*. 2010 Aug 18 ; 5 (8) : e12250.
 31. Groth S, Recke A, Vafia K, Ludwig RJ, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Development of a simple ELISA for the detection of autoantibodies in an-

- ti-p200 pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2010 Sep 21 .doi : 10.1111/j. 1365-2133.2010.10056.x. [Epub ahead of print]
32. Hashimoto T, Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S. Effects of olopatadine hydrochloride, a histamine h (1) receptor antagonist, on histamine-induced skin responses. *Dermatol Res Pract*. 2010 ; 2010. pii : 638051 .Epub 2010 Sep 16.
 33. Dainichi T, Hirakawa Y, Ishii N, Ohyama B, Kohda F, Takahara M, Moroi Y, Furue M, Yasumoto S, Hashimoto T. Mucous membrane pemphigoid with autoantibodies to all the laminin 332 subunits and fatal outcome caused by liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Am Acad Dermatol*, in press.
 34. Ishii N, Hashimoto T, Zillikens D, Ludwig RJ. High-Dose Intravenous Immunoglobulin (IVIg) Therapy in Autoimmune Skin Blistering Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 38 (2-3) : 186-195,2010.
- ies to human desmocollins 1-3, particularly desmocollin 3. The 70th annual Society for Investigative Dermatology meeting , Atlanta, May 5 -8, 2010.
3. Natsuaki Y, Koga H, Fukuda S, Ishii N, Dainichi T, Hamada T, Karashima T, Ishikawa T, Yasumoto S, Goto M, Fujiwara S, Hashimoto T. Anti-epiplakin autoantibodies are present in paraneoplastic pemphigus. The 70th annual Society for Investigative Dermatology meeting , Atlanta, May5-8, 2010.
 4. Hashimoto T. Recent progress in classification, diagnostic methods, treatments and autoantigen detection in autoimmune bullous skin diseases. 7th Annual Scientific Meeting Australasian Society for Dermatology Research, Australia, June 20, 2010.
 5. Ishii N, Teye K, Hamada T, Ishikawa T, Sakaguchi S, Fukuda S, Saruta H, Karashima T, Yasumoto S, Hashimoto T. Anti-desmocollin autoantibodies in pemphigus herpetiformis and pemphigus vegetans : IgG antibodies to desmocollin 1-3 are the key factor for their characteristic phenotypes. The 40th annual European Society for Dermatological Research meeting, Helsinki, Finland, September8-11, 2010.
 6. Hamada T, Ishii N, Oyama N, Yasumoto S, McGrath J, Hashimoto T. Regulation of epidermal differentiation evidenced by gene silencing of extracellular matrix protein 1 .The 40th annual European Society for Dermatological Research meeting, Helsinki, Finland, September8-11, 2010.
 7. Koga H, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Sakaguchi S, Nakano H, Tamai K, Sawamura D, Hashimoto T. Exon 87 skipping of the COLA71 gene in domi-

学会発表

1. Teye K, Hamada T, Sakaguchi S, Fukuda S, Ishii N, Yasumoto S, Hashimoto T. Filaggrin mutation study and clinical characterization of patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis in Kyushu area, the most southern part of Japan. The 70th annual Society for Investigative Dermatology meeting, Atlanta, May 5 -8, 2010.
2. Ishii N, Hamada T, Fukuda S, Koga H, Teye K, Ishikawa T, Sakaguchi S, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. The majority of patients with Neumann type pemphigus vegetans show IgG autoantibod-

nant dystrophic epidermolysis bullosa. The 40th annual European Society for Dermatological Research meeting, Helsinki, Finland, September 8-11, 2010.

8. Koga H, Ohyama B, Ishii N, Hamada T, Chan P, Amagai M, Yasumoto S, Hashimoto T. Three Japanese Cases of Pemphigus with Oral Lesions Detecting Anti-Dsg 1 Antibodies but not Anti-Dsg3 Antibodies. JC Bystryn Pemphigus & Pemphigoid Meeting, Bethesda, November 5-6, 2010.
9. Hashimoto T. Attempts to identify many mysterious antigens by proteomics techniques. JC Bystryn Pemphigus & Pemphigoid Meeting, Bethesda, November 5-6, 2010.
10. Lin J, Marinovic B, Fivenson D, Murrell D, Borradori L, Hashimoto T, Cianchini G, Caux F, Iranzo P, Venugopal S, Martin L, Taylor L, Werth V. Photovalidation of Two Outcome Measure Instruments for Pemphigus. JC Bystryn Pemphigus & Pemphigoid Meeting, Bethesda, November 5-6, 2010.
11. Hashimoto T. Role of pemphigus & pemphigoid foundations in uniting physicians and patients. JC Bystryn Pemphigus & Pemphigoid Meeting, Bethesda, November 5-6, 2010.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし。

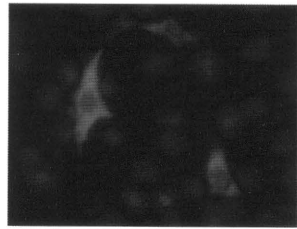
随伴腫瘍

腫瘍	抗体(+)	抗体(-)	合計
non Hodgkinリンパ腫	12(48%)	13(52%)	25
Castleman disease	8(80%)	2(20%)	10
CLL	2(33%)	4(67%)	6
胸腺腫	5(83%)	1(17%)	6
sarcoma	3(75%)	1(25%)	4
固形腫瘍	9(69%)	4(31%)	13

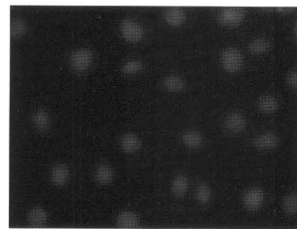
表 1 : 随伴腫瘍の検討

患者血清を用いた発現パターン

PNP serum



Normal serum



1st Ab : anti-c-myc Ab
 2nd Ab : FITC-anti-human IgG (mouse)
 Nucleus staining : DAPI

図 1 : A 2ML1 リコンビナントタンパクの発現 (COS7 細胞)

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

天疱瘡の病勢を反映する病因性抗体測定法と臨床的応用

研究分担者 青山裕美 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野 講師

研究要旨 天疱瘡は、表皮細胞間接着分子デスモグレイン（Dsg）に対する抗体により発症する自己免疫性水疱症である。Dsg ELISA法はDsg全長の抗体価を検出し、病因性を区別しない。我々はDsgをプレート上で修飾変換し抗体のエピトープをより詳細に検討する画期的な方法を開発した。Dsg 3をEDTA処理し立体構造が変化することを利用して尋常性天疱瘡の立体構造抗体を測定可能にした。本法の疾患活動性（PDAI）との相関は従来法よりも高く、病因性をより鋭敏に反映する。

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

A. 研究目的

背景：これまでにわれわれはDsg抗原ELISAプレートをEDTA処理しカルシウム依存性立体構造を変換（EDTA処理ELISA法）し、本法で算出される補正ELISA値が病因性を反映することを報告してきた。従来のELISA法はカルシウム依存性立体構造と非立体構造を認識する抗体を検出し、EDTA処理ELISA法は非立体構造に対する抗体を検出する。これらの抗体値の差（補正ELISA値）が立体構造を認識する抗体値を反映すると考えられる。

目的：Dsg 3の非立体構造を認識する抗体が非病因性抗体であることを示すため、EDTA処理をしたDsg 3リコンビナントタンパクに結合する抗体の病因性を検討した。補正ELISA値が立体構造を認識する病因性抗体値を反映し、より鋭敏な検査法として臨床応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

a) EDTA処理ELISA法

リコンビナントタンパクを固層化した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。

b) 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。

c) 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。

d) Dsg 3リコンビナント蛋白の作製

組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞High Five (invitrogen社製)に感染させ、培養液中より組み換え蛋白ヒトDsg 3-Hisを回収しPBS-Caで透析したものを使用した。またDsg 3-Hisを含むsupernatantに5 mM EDTAで室温60分処理をし、PBS (-)で透析したものを使用した。

e) 精製IgG刺激と細胞間接着力の測定

それぞれDsg 3リコンビナントタンパクで室温30分間で吸収させたPV-IgGを加え、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回ピペッティングを繰り返して物理的刺激を加えた。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。

f) 尋常性天疱瘡患者血清

岡山大学病院において平成22年4月1日から9月30日までの期間に保存された尋常性天疱瘡患者血清、11症例34検体を対象とした。

C. 研究結果

a) EDTA 処理後の Dsg 3 リコンビナントタンパクに結合する抗体の病因性

それぞれの Dsg 3 リコンビナントタンパクで吸収後の精製 IgG をシート状に培養した DJM-1 細胞に加え 37°C、24 時間刺激後に物理的刺激を加え定量化し比較した。定量化すると EDTA 処理後の Dsg 3 リコンビナントタンパクでは細胞の断片数が positive control と同等であったが、Dsg 3 リコンビナントタンパクでは断片数が negative control と同等であった (図 1)。

b) 補正 ELISA 値と疾患活動性 (PDAI) との相関

従来法の ELISA 値に比べ、補正 ELISA 値ではより重症度との相関がみられた (図 2)。PDAI score 0 点の寛解期で比較すると、従来法の ELISA 値は平均値 81.0、中央値 86.0 で補正 ELISA 値は平均値 26.3、中央値 17.7 であった (図 3)。

D. 考察

天疱瘡患者には臨床的に寛解しているが高い抗体値 (ELISA 法) を有する症例をしばしば経験すし、免疫抑制療法を漸減するタイミングに迷う例がある。ステロイド投与中の症例では急性期に抗体価が高く水疱形成のない時期があり、この時期には抗体価が増加すると容易に水疱が再発するので、抗体は病因性がありステロイド剤により水疱形成が抑えられていると考えられる。寛解期では低容量ステロイド (10mg/day 以下) 投与下で、水

疱形成がなく抗体価が高い症例があり、この場合病因性のない抗体が検出されていると予測されるが、その病原性を測定する方法がない。

これまでにわれわれは尋常性天疱瘡患者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方法として EDTA 処理 ELISA 法を開発し、その性質を検討してきた。本研究では、EDTA 処理 ELISA 法が病因性抗体値の推定に有用であることを示した。

尋常性天疱瘡患者抗体のなかで、Dsg のカルシウム依存性立体構造を認識する抗体は病因性が高い。従来法の ELISA 値は Dsg のカルシウム依存性立体構造を認識する抗体値と非立体構造を認識する抗体値を反映する。一方で、EDTA 処理 ELISA 法は Dsg の非立体構造を認識する抗体を検出し、本法で算出される補正 ELISA 値は Dsg のカルシウム依存性立体構造を反映する抗体値を反映する。そこで Dsg の非立体構造を認識する抗体が非病因性であることを示すため、EDTA 処理後の Dsg 3 リコンビナントタンパクに結合する抗体の病因性を調べた。In vitro で細胞間接着能力低下能を定量化して比較すると、尋常性天疱瘡患者抗体に EDTA 処理をした Dsg 3 リコンビナントタンパクを加え、Dsg の非立体構造を認識する抗体を吸収した精製 IgG は、吸収前の精製 IgG と同等の病因性を示した。このことより、Dsg の非立体構造を認識する抗体の病因性は低いことがわかった。

尋常性天疱瘡患者血清中には病因性抗体と非病因性抗体が含まれており、個々の症例で病期によりそれぞれの割合が異なる。そこで Dsg のカルシウム依存性立体構造を認識する抗体値を反映する補正 ELISA 値が従来法の ELISA 値よりも病因性を反映していることを示すため、それぞれの ELISA 値と臨床症状の重症度 (PDAI) の相関を調べると、従来法の ELISA 値に比べ補正 ELISA 値でより相関がみられた。また PDAI score 0 点の時を比較すると、補正 ELISA 値のほうがより病

勢を反映していると考えられた。

E. 結論

以上の結果より、EDTA処理ELISA法は尋常性天疱瘡患者の非立体構造を認識する非病理性抗体を検出し、本法を用いて算出される補正ELISA値は病理性を反映し、従来のELISA法と比べて、より病勢を反映することがわかった。今後、本法が従来のELISA法に変わるモニタリングの指標として臨床応用するため、多施設で例数を増やして臨床症状とELISA値の相関を検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

1. 神谷浩二、青山裕美、久田恭子、藤井一恭、山本哲也、岩月啓氏. 天疱瘡の病勢を反映する病理性抗体測定法と臨床的応用. 第109回日本皮膚科学会総会・学術大会. 2010年4月16-18日、大阪
2. 神谷浩二、青山裕美、白藤宜紀、濱田利久、森実真、藤井一恭、岩月啓氏. 天疱瘡患者の病理性抗体をより高感度に検出するEDTA処理ELISA法の検討. 第32

回水疱症研究会. 2010年10月30-31日、京都

3. Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, Iwatsuki K. A simple method to detect pathogenic pemphigus antibodies directed against calcium-dependent epitopes of desmoglein 3. 第35回日本研究皮膚科学会学術大会・総会. 2010年12月3-5日、和歌山
4. Aoyama Y, Kamiya K, Hisada K, Fujii K, Yamamoto T, Iwatsuki K. Comparison of index values of Dsg3-ELISA and those of EDTA-treated Dsg3-ELISA is a reliable monitor for pathogenic autoantibody in pemphigus. Society for Investigative Dermatology, Atlanta, 2010.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

16. 特許事項
発明名称：EDTA処理ELISA法（出願中）
17. 実用新案登録
特になし
18. その他
特になし

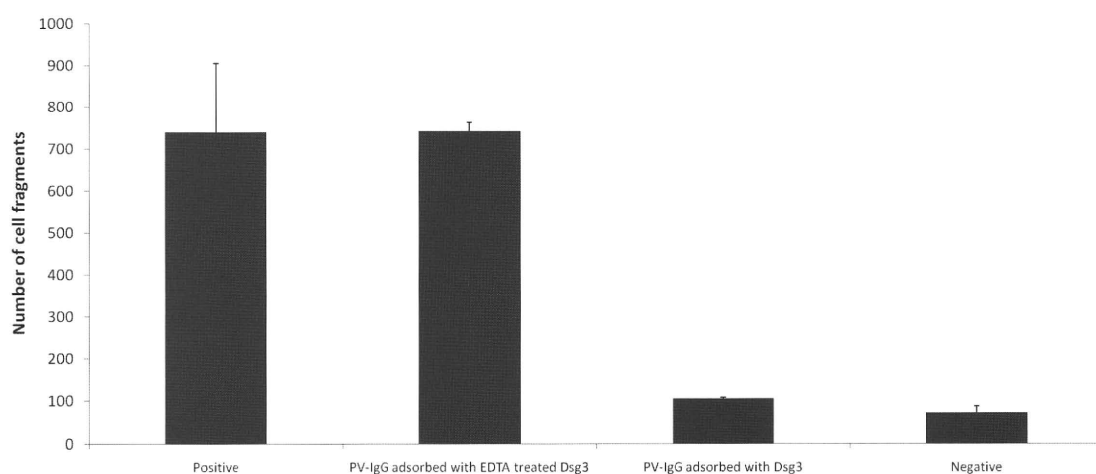
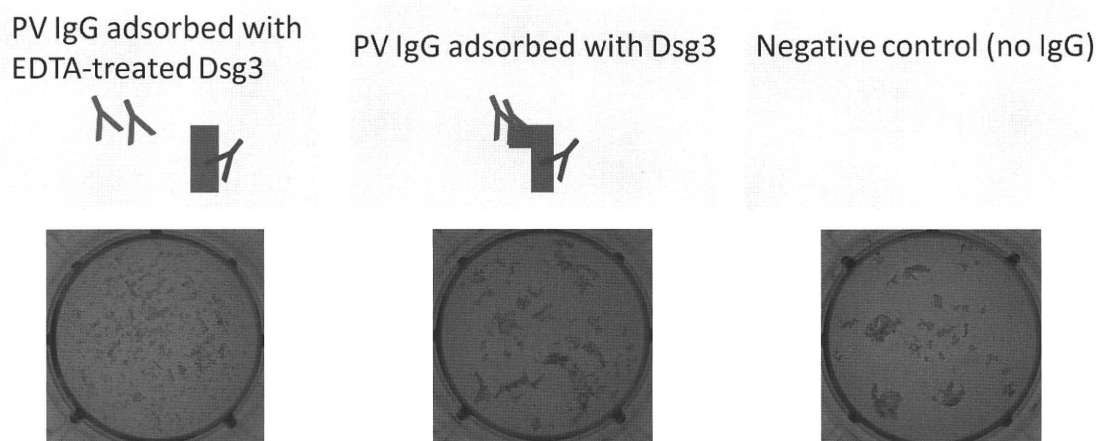


図1 それぞれのDsg3リコンビナントタンパクで吸収後の細胞間接着力低下力能の比較
 EDTA処理後のDsg3リコンビナントタンパクでは細胞の断片化が著明であったが、Dsg3
 リコンビナントタンパクでは断片化が目立たなかった。

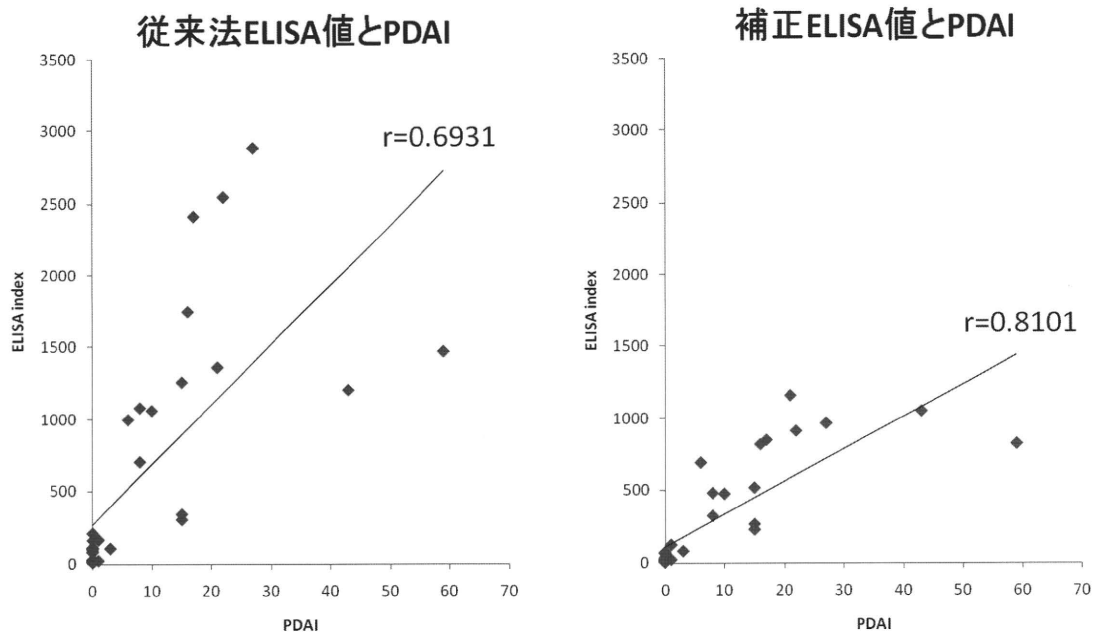


図2 補正ELISA値とPemphigus disease area index (PDAI)との相関
従来法のELISAに比べ、補正ELISA値ではより重症度との相関がみられた。

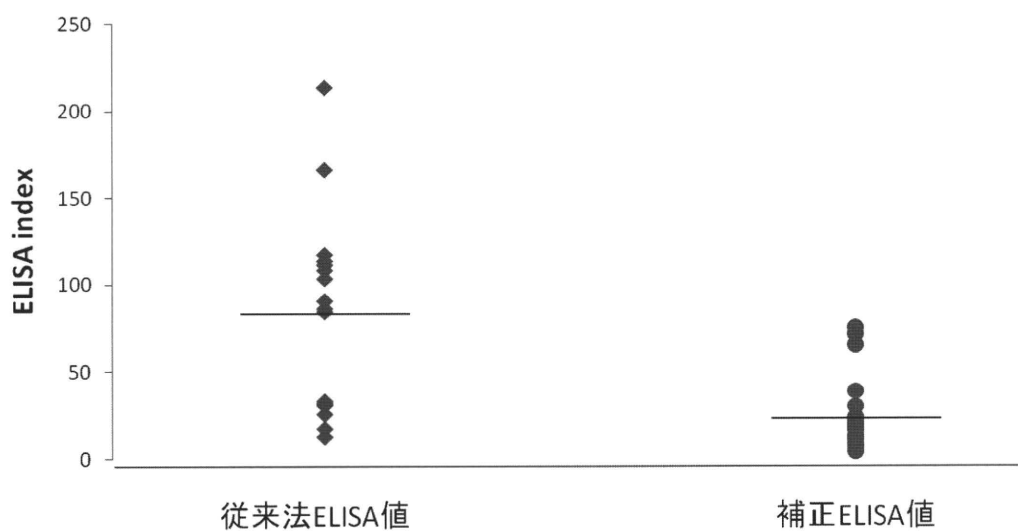


図3 PDAI score 0点での従来法ELISA値と補正ELISA値の比較
補正ELISA値のほうがより病勢を反映していた。

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

改良ELISA法による落葉状天疱瘡抗体のエピトープ解析

研究分担者 青山裕美 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野 講師

研究要旨 天疱瘡は、表皮細胞間接着分子デスマogleイン（Dsg）に対する抗体により発症する自己免疫性水疱症である。我々はDsg 1 リコンビナントタンパクをプレート上で修飾変換し抗体のエピトープをより詳細に検討する方法を開発した。EDTA処理ELISA法はDsgのカルシウム依存性立体構造を認識する抗体と非立体構造を認識する抗体を区別する。また、表皮剥脱酵素（ET）で処理をしたDsg 1 プレートは、ET切断部位よりN末端が完全に切断されEC4,5ドメインの固相化として使用可能であった。EDTA、ET処理Dsg 1 ELISA法で落葉状天疱瘡患者抗体を検討したところ、活動期、寛解期ともに落葉状天疱瘡患者血清に含まれる抗Dsg 1抗体は、約90%がDsg 1立体構造（EC 1-3）を認識し直線構造（EC 4-5）に結合する抗体は少なかった。落葉状天疱瘡では尋常性天疱瘡と異なり、非活動期の非病理性抗体のエピトープはカルシウム依存性立体構造に結合する。立体構造の中に病理性、非病理性エピトープが存在することが示唆される。

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

A. 研究目的

背景：これまでにわれわれは、Dsg 3 抗原ELISA プレートでEDTA処理し、カルシウム依存性立体構造を変換（EDTA処理ELISA法）することで、尋常性天疱瘡患者の抗体のエピトープを区別し、病理性を区別できることを報告してきた。同様に、落葉状天疱瘡患者抗体においても病態解析を行う。

目的：本研究では落葉状天疱瘡患者の抗体のエピトープを区別するためにEDTA処理ELISA法がDsg 1 抗原ELISA プレートでも応用できるか検討した。また、ELISA プレートを表皮剥脱酵素（ET）処理後に抗体結合性を検討することでDsg 1 ELISA プレートがET切断部位よりC末端のEC4,5ドメインの固相化した基質として使用可能か検討し

た。

B. 研究方法

a) EDTA処理ELISA法

Dsg 1 リコンビナントタンパクを固相化した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。

b) ET処理ELISA法

Dsg 1 リコンビナントタンパクを固相化したELISAプレートのマイクロカップを0.25 μ g/mlのETA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。

c) モノクローナル抗体

Dsg 1 のEC2,3,4ドメインで免疫されたマウスモノクローナル抗体（Dsg 1 -P23, LifeSpan Biosciences, Seattle, America）を使用した。

d) 落葉性天疱瘡患者血清

落葉性天疱瘡患者のなかで、寛解期にDsg

1 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。

C. 研究結果

a) EDTA, ET処理リコンビナントDsg 1に対するモノクローナル抗体の反応

Dsg 1-P23抗体のEDTA処理およびET処理後のDsg 1に対する結合性に与える影響を検討した。抗体の濃度と結合性(OD₄₅₀)はコントロール、EDTA処理、ET処理間で、差が見られなかった(図1)。

b) EDTA, ET処理リコンビナントDsg 1に対する患者血清の反応

落葉状天疱瘡患者の抗体値は、EDTA処理ELISA値は従来法のELISA値に対して平均で活動期が11.7%、寛解期が15.0%であった。ET処理ELISA値は従来法のELISA値に対して活動期が8.3%、寛解期が11.0%であった(図2)。活動期の中央値は従来のELISA値216.4、EDTA処理ELISA値24.4、ET処理ELISA値15.7であり、平均値は従来のELISA値226.3、EDTA処理ELISA値26.5、ET処理ELISA値18.8であった。(図3)。また、活動期も寛解期も立体構造を認識する抗体の割合が高かった(図4)。

D. 考察

病理性規定因子のひとつにエピトープがあり、尋常性天疱瘡患者ではカルシウム依存性立体構造を認識する抗体は病理性が高い。これまでにわれわれはEDTA処理ELISA法を用いて尋常性天疱瘡患者抗Dsg 3抗体において、カルシウム依存性立体構造を認識する抗体と非立体構造を認識する抗体を区別する方法を検討してきた。さらにEDTA処理ELISA法を用いて落葉状天疱瘡抗体における抗Dsg 1抗体のエピトープが立体構造か、直線構造のいずれを認識するか解析を行った。また、ETによりDsg 1の細胞外ドメインが切断されることを利用し、Dsg 1のEC4,5ドメインを固相化して使用する方法をみいだした。

Dsg 1のEC2,3,4ドメインで免疫されたマウスモノクローナル抗体のDsg 1-P23抗体を用いてEDTA処理ELISA法とET処理ELISA法を行い吸光度を比較すると、EDTAおよびETによる影響を全く受けなかった。ETは、EC 3ドメインとEC 4ドメインの間でDsg 1を切断するので、Dsg 1-P23抗体のエピトープはEC 4ドメインであることがわかった。またEDTA処理したDsg 1 ELISA法では、EC 3ドメインよりN末端が修飾される可能性が高い。この条件で、落葉状天疱瘡患者血清を用いてELISA値を測定し、EDTA処理とET処理Dsg 1(EC 4-5 Dsg 1を基質にした)ELISA値と比較した。5例の患者血清に含まれるEDTA処理後とET処理後のそれぞれのELISAプレートに結合する抗体の割合は活動期では平均で11.7%と8.3%であり、寛解期では15.0%と11.0%で比較的近い値であった。おそらくEDTA処理ELISA法で検出できるエピトープはET処理ELISA法とほぼ同等と考えることができる。さらにELISAプレートに固相化したDsg 1は、酵素による分解アッセイに使用可能であることがわかった。

落葉状天疱瘡患者の活動期と寛解期で比較すると、寛解期非病理性抗体も含め、Dsg 1立体構造を認識し、直線構造に結合する抗体は少なかった。このことより落葉状天疱瘡抗体は病理性に関わらず、EC1,2,3ドメインを認識する抗体の割合が高いことがわかった。さらにEC1,2,3ドメインのエピトープの中に病理性と非病理性を区別するエピトープがあるかもしれない。抗Dsg 1抗体は抗Dsg 3抗体とは異なる機序で、水疱を誘導する可能性がある。

E. 結論

ET処理ELISA法はDsg 1のEC4, 5ドメインの固相化として使用可能である。また、落葉状天疱瘡患者では寛解期非病理性抗体も含め、Dsg 1立体構造を認識し、直線構造に結合する抗体は少ない。今後さらに落葉状天

疱瘡の病因性規定因子の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

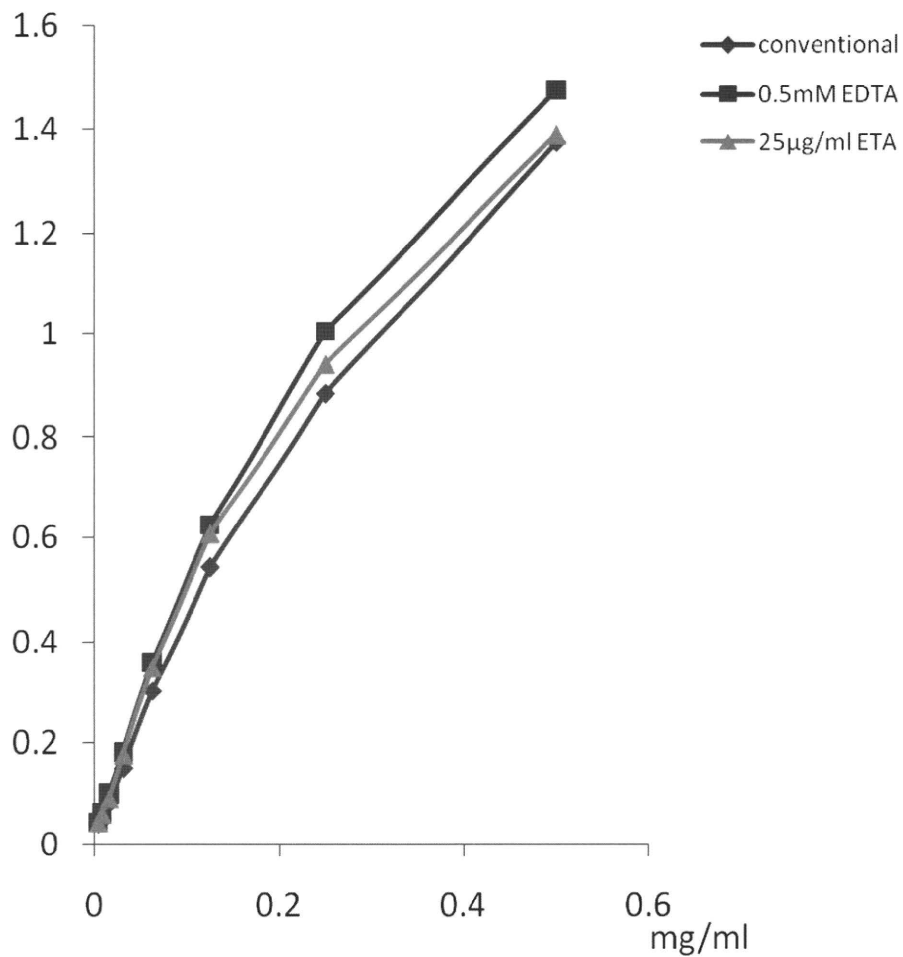


図1 モノクローナル抗体におけるEDTA処理、ET処理によるOD₄₅₀の変化
Dsg 1-P23はEDTA処理、ET処理による結合性の変化が見られなかった。

Patient	Clinical entity	Histological acantholysis	Blister		Active phase						
			Skin	Mucous	Dsg1 ELISA index					Dsg3 ELISA index	
					Conventional ELISA (A)	EDTA ELISA (B)	Conformational ELISA (C)	(C/A)	ETA ELISA		
1	57y,F	PF	unclear	+	-	216.4	24.8	191.6	88.5	15.7	2.4
2	55y,M	PF	unclear	+	-	212.4	21.9	190.5	89.7	14.2	1.3
3	53y,F	PF	upper epidermis	+	+	280.1	57.2	222.9	79.6	41.9	29.2
4	67y,F	PF	upper epidermis	+	-	183.4	4.0	179.4	97.8	4.4	0.1
5	45y,F	PF	upper epidermis	+	-	239.3	24.4	214.9	89.8	17.9	2.8

Patient	Inactive phase						
		Conventional ELISA (A)	EDTA ELISA (B)	Conformational ELISA (C)	(C/A)	ETA ELISA	Dsg3 ELISA index
1	57y,F	152.5	20.8	131.7	86.4	13.5	2.7
2	55y,M	161.2	17.7	143.5	89.0	12.0	1.9
3	53y,F	376.7	86.7	290.0	77.0	63.4	17.7
4	67y,F	223.7	1.5	222.2	99.3	2.9	0.1
5	45y,F	217.1	42.6	174.5	80.4	32.4	3.1

図2 落葉状天疱瘡患者における活動期と寛解期のELISA値の比較

EDTA処理ELISA値とET処理ELISA値はほぼ同等であった。また、活動期と寛解期ともにEDTA処理ELISA値とET処理ELISA値は低値であった。

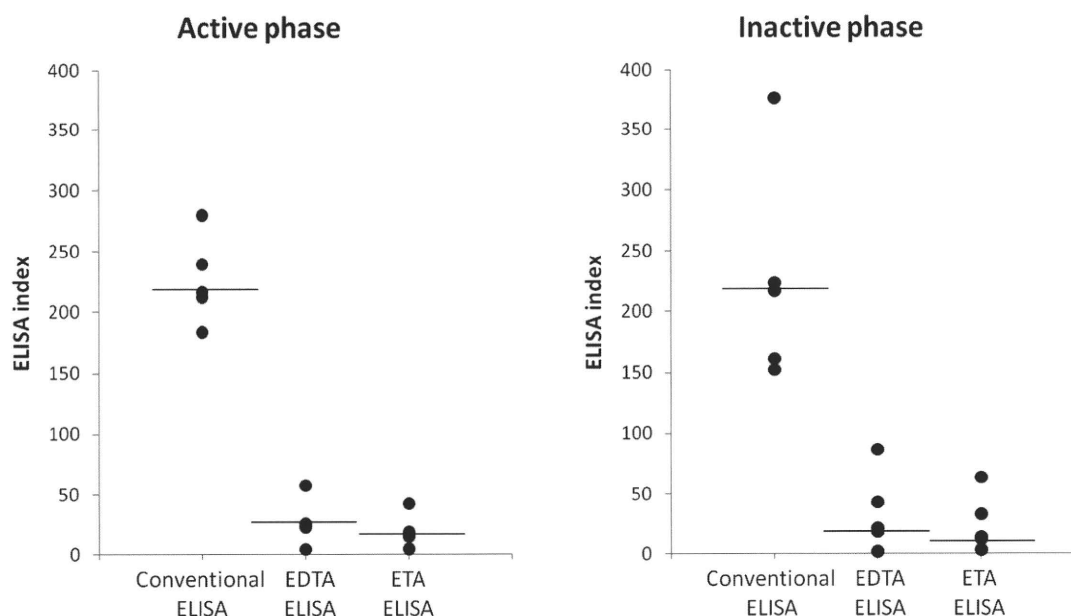


図3 落葉状天疱瘡患者5例の活動期と寛解期のELISA値の比較

落葉状天疱瘡患者抗体では、EDTA処理およびET処理後のELISAプレートへの結合性は著明に低下していた。活動期の中央値は従来のELISA値216.4、EDTA処理ELISA値24.4、ET処理ELISA値15.7であり、平均値は従来のELISA値226.3、EDTA処理ELISA値26.5、ET処理ELISA値18.8であった。活動期と寛解期で差はみられなかった。

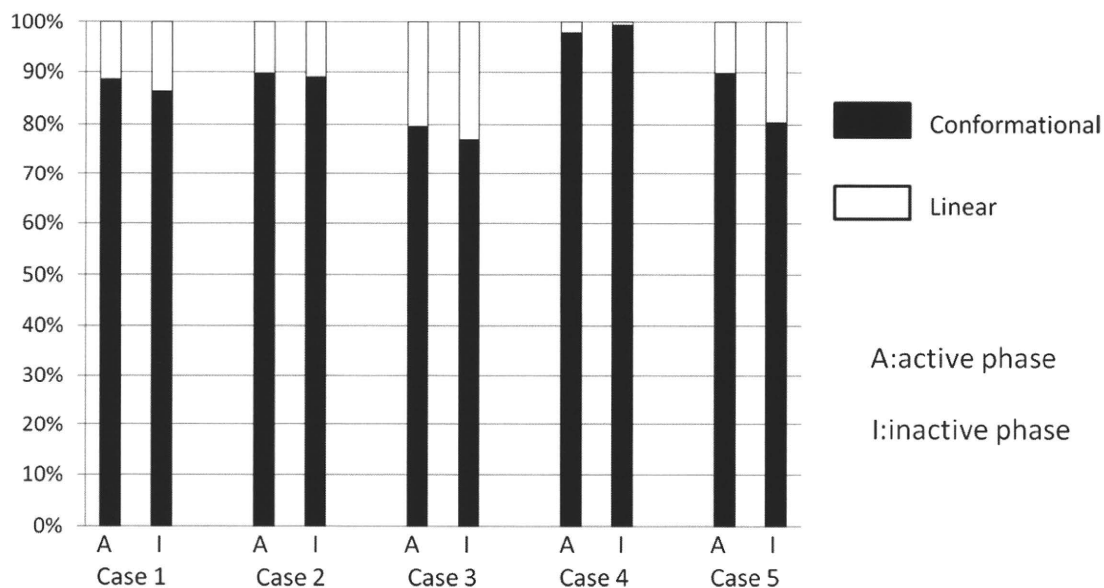


図4 落葉状天疱瘡患者における活動期と寛解期におけるカルシウム依存性立体構造を認識する抗体の割合の比較

落葉状天疱瘡患者では寛解期非病理性抗体も含め、Dsg 1 立体構造を認識し、直線構造に結合する抗体の割合は少ない。

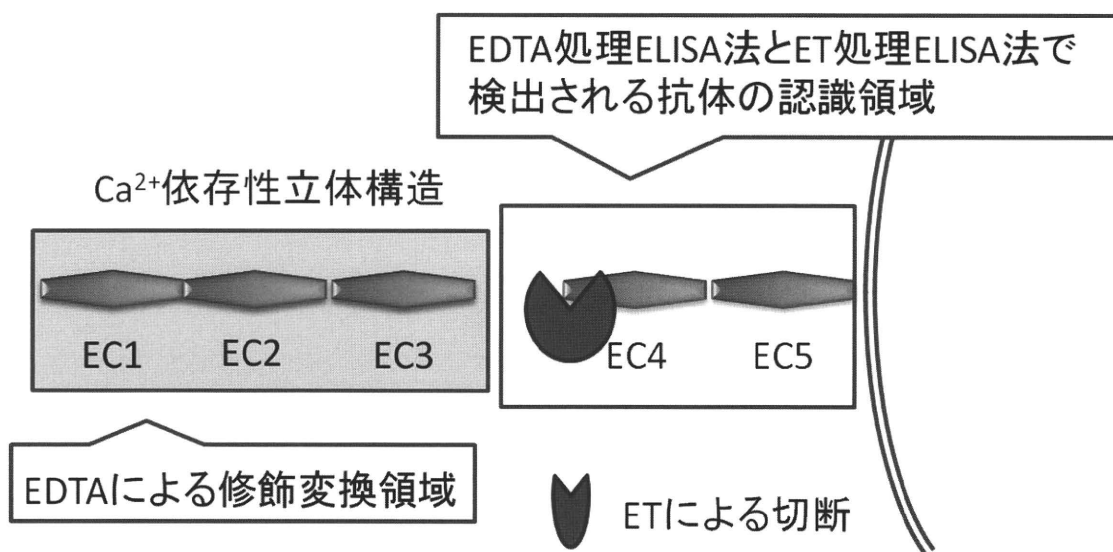


図5 研究成果の概略図

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

天疱瘡における遺伝的素因の解明

研究協力者 下村 裕 新潟大学大学院医歯学総合研究科遺伝性皮膚疾患研究室
テニユアトラック准教授

研究要旨 以前から、天疱瘡の発症に何らかの遺伝的素因が関与していることが示唆されているが、本症に対するゲノムワイドな解析は皆無である。本研究では、天疱瘡についてゲノムワイド関連解析を施行し、本症の新たな疾患感受性遺伝子の同定を目指す。

共同研究者

新関 寛徳（成育医療研究センター）

橋本 隆（久留米大学）

天谷 雅行（慶應義塾大学）

A. 研究目的

天疱瘡の発症に関与する遺伝的素因を明らかにすること。

B. 研究方法

天疱瘡患者および健常人コントロールのゲノムDNAを用いてゲノムワイドSNPアレイを行い、染色体上の疾患感受性領域・感受性遺伝子を同定する。

C. 研究結果

現在、研究実施に必要な患者試料を収集しており、これまでに200名以上の試料を収集済みである。

D. 考察

本解析にはできる限り多くの患者試料が必要であり、今後、今まで以上に円滑に試料収集を進めていくことが重要と考える。

E. 結論

来年度中に、最低300名の患者試料を収集し、解析の開始を目指す。

F. 健康危険情報

解析開始前のため、該当なし。

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

なし。

学会発表

なし。

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。

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（汎発型）ガイドラインの作成経緯と特徴

研究分担者 照井 正 日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野皮膚科学 教授

研究要旨 「膿疱性乾癬（汎発型）診療ガイドライン」は「稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班」と日本皮膚科学会の共同で作成された。GPPの定義、診断基準、重症度分類、本邦における疫学調査、治療アルゴリズム、本邦で使用できる薬剤のエビデンスレベル、ならびに関連する論文が記載されている。この「膿疱性乾癬（汎発型）診療ガイドライン」について作成までの経緯と特徴についてまとめた。

A. 研究目的

「膿疱性乾癬（汎発型）診療ガイドライン」の理解と普及を円滑にする目的で当ガイドラインの作成までの経緯と特徴についてまとめた。

B. 研究方法

学会報告、論文報告などを参考にまとめた。

C. 研究結果

「稀少難治性皮膚疾患に関する研究班」について

医学のめざましい進歩にも関わらず、また、たくさんの原因が不明で治療が確立されていない難病がある。わが国では、難病対策として5つの事業が進められています：1) 調査研究の推進（難治性疾患克服研究事業）、2) 医療費の自己負担の軽減（特定疾患治療研究事業）、3) 地域における保健・医療福祉の充実・連携、4) QOLの向上を目指した福祉施策推進、5) 医療施設等の整備。

上記5つに事業の一つである「1) 調査研究を推進」を達成するための事業の一つに難治性疾患克服研究事業がある。この事業には5つの分野がある：I 臨床調査研究分野、II 横断的研究分野、III 重点研究分野、IV 研究奨励分野。その1分野である臨床調査研究分野の中に、14の難治性疾患克服研究班が

設立され、合計155の疾患が研究されている。その研究班の中に、皮膚・結合組織疾患調査研究班があり、5つの疾患あるいは疾患群を扱う研究班が含まれる：1) 稀少難治性皮膚疾患、2) 強皮症、3) 混合性結合組織病、4) 神経皮膚症候群、5) 重症多形滲出性紅斑（急性期）。「稀少難治性皮膚疾患に関する研究班」で膿疱性乾癬が取り扱われている。

「稀少難治性皮膚疾患に関する研究班」と「膿疱性乾癬（GPP）診療ガイドライン」

1974年、坂本班長のもと天疱瘡研究班が発足し1976年まで続けられた。1983年、対象疾患に先天性表皮水疱症とGPPが加えられ、「稀少難治性皮膚疾患研究班」が発足され、現在まで続いている。歴代の班長は、笹井陽一郎先生、今村貞雄先生、橋本 功先生、小川秀興先生、北島康夫先生、そして、現在の班長は岩月啓氏先生である。今村班と橋本班で北海道大学大河原 章先生らの研究によってGPPの「定義」、「診断基準」、「重症度分類」が発表された。小川班で、東海大学小澤明先生を中心にガイドライン作成チームが発足され、1983年、大河原 章先生の研究成果に全国疫学調査結果や文献データが加えられて、世界で類例のないGPP診療ガイドライン（2001）が作成された。その内容はUmezawa Yらにより Arch Dermatol Res に報告された