

出生時には全身が厚い板状の角質に覆われ、眼瞼外反、口唇突出開口、耳介変形が見られる。

⑤魚鱗癬症候群 (IS)

魚鱗癬に加え、皮膚以外の症状を持つ

4) 鑑別診断—以下の疾患を除外出来ること

尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、紅斑角皮症、表皮水疱症、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、掌蹠角化症

5) 遺伝子診断

①BCIEはケラチン1、ケラチン10、ケラチン2e

②NBCIE, LI, HIではtransglutaminase 1, ATP-binding cassette transporter subfamily A member 12(ABCA12), ichthyin, arachidonate 12-lipoxygenase R type(ALOX 12B), arachidonate lipoxygenase 3(ALOXE3), CYP4F22など

③ISではSPINK5, FALDH, PHYH, connexin 26, ABHD5など

重症先天性魚鱗癬を伴う魚鱗癬症候群一覧 (平成21年7月)

(厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 稀少難治性皮膚疾患に関する研究班版)

1) Netherton症候群

- a) 曲折線状魚鱗癬または魚鱗癬様紅皮症様の皮疹
- b) 結節性裂毛
- c) アトピー素因

2) Sjogren-Larsson症候群

- a) 先天性魚鱗癬
- b) 四肢痙性麻痺
- c) 知的障害

3) Rud症候群

- a) 先天性魚鱗癬
- b) てんかん
- c) 精神遅滞
- d) 性腺機能低下
- e) その他

4) Refsum症候群

- a) 魚鱗癬
- b) 色素性網膜炎
- c) 末梢神経炎
- d) 小脳失調
- e) その他

5) KID症候群

- a) 乳頭腫状角化 (顔面、頭部、掌蹠、肘膝)

- b) 聴覚障害
- c) 角膜炎

6) Dorfman-Chanarin 症候群

- a) 魚鱗癬
- b) 肝、筋肉、眼、耳、中枢神経などへの neutral lipid 沈着

7) その他

診断書 (案：平成21年7月)

先天性魚鱗癬様紅皮症 (Congenital Ichthyosiform Erythroderma : CIE)

(厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 稀少難治性皮膚疾患に関する研究班版)

臨床的項目

- a) 全身の鱗屑、魚鱗癬
- b) 生下時より生じる全身性びまん性潮紅
- c) 機械的刺激を受ける部位の弛緩性水疱と浅いびらん
- d) 全身の潮紅は明らかでなく、粗大・暗褐色・板状の鱗屑を伴う
- e) 出生時には全身が厚い板状の角質に覆われ、眼瞼外反、口唇突出開口、耳介変形が見られる
- f) 皮膚以外の症状を持つ

組織学的項目

- a) 著明な過角化と表皮肥厚、顆粒変性 (有棘層上層から顆粒層にかけて表皮細胞の核周囲の空胞と粗大なケラトヒアリン顆粒がみられ、細胞内浮腫が顕著) がみられる
- b) 著明な過角化と表皮肥厚、不全角化などがみられる

診断

- ①組織学的項目 a) を満たし、かつ臨床的項目の a)～c) に該当する症例を BCIE と診断する。
- ②組織学的項目 b) を満たし、かつ臨床的項目の a) b) に該当する症例を NBCIE と診断する。
- ③組織学的項目 b) を満たし、かつ臨床的項目の a) d) に該当する症例を LI と診断する。
- ④組織学的項目 b) を満たし、かつ臨床的項目の a) e) に該当する症例を HI と診断する。
- ⑤組織学的項目 b) を満たし、かつ臨床的項目の a) f) に該当する症例を IS と診断する。

除外診断

尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、紅斑角皮症、表皮水疱症、
ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、掌蹠角化症

遺伝子診断

- ①BCIEは、ケラチン1、ケラチン10、ケラチン2e
- ②NBCIE, LI, HIでは、transglutaminase 1, ATP-binding cassette transporter subfamily A member 12 (ABCA12), ichthyin, arachidonate 12-lipoxygenase R type (ALOX 12B), arachidonate lipoxygenase 3 (ALOXE3), CYP4F22など
- ③ISでは、SPINK5, FALDH, PHYH, connexin 26, ABHD5など

資料 2

先天性魚鱗癬様紅皮症（水疱型除く）・魚鱗癬症候群 2次調査個人票

施設 ID : _____

施設住所: _____

施設名: _____

記載日 2010 年 月 日 記載医師名 _____

*貴院の患者コード:		**病型:	
性 別	1. 男 2. 女	生年月日:	年 月 日
現在の年齢	歳	発症年月:	年 月
***家族歴(同症) 1. なし 2. あり ()			
診断した医療機関	1. 貴施設 2. 他施設() 3. 不明		
確定診断年月	年 月 日 不明		
受療状況: 1. 主に入院 2. 主に通院 3. 入院と通院 4. 転院(転院先:) 5. 死亡			

* 貴院で無作為にコードを作成し、御記入下さい (例、J-1 など)

**非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症: NBCIE、葉状魚鱗癬: LI、道化師様魚鱗癬: HI、
魚鱗癬症候群: IS のいずれかをご記入下さい。

***家族例の場合には、「J-1 の弟」の様に御記載ください。また家族図を添付戴ければ幸いです。
症状については下記に○またはご記入下さい。

皮疹の分布	1. 全身性 2. 限局性 (部位:)		
紅皮症	1. あり 2. なし		
鱗屑の性状	1. 鱗状 2. 豪猪皮状 3. 大型 4. 細かい		
鱗屑の色	1. 褐色 2. 白色	鱗屑の剥脱	1. あり 2. なし
眼瞼外反	1. あり 2. なし	口唇突出	1. あり 2. なし
掌蹠角化	1. なし 2. あり		
手指の拘攣	1. なし 2. あり (部位:)		
姿勢の異常	1. なし 2. あり (状態:)		
歩行障害	1. なし 2. あり		
コロジオンベイビーであったか: 1. あった 2. ない			
病理組織学検査: 1. なし 2. あり			
# 病名と皮膚以外の症状:			
## 遺伝子診断など:			
最終受診日 : 年 月 日			

魚鱗癬症候群: IS の場合は、病名と皮膚以外の症状を御記入下さい。

遺伝子診断やタンパクレベルの検索がされている場合に、結果を御記入下さい。

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

稀少難治性皮膚疾患新規レジストリとコホート調査の成果と展望

研究分担者 秋山真志 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学分野 教授

研究要旨 今回の稀少難治性皮膚疾患新規レジストリでは、実際の患者数を十分に反映した登録症例数を実現することを第一の目的として、新たな2段構えのレジストリシステム（研究対象患者数を把握するための簡易レジストリと詳しい臨床情報を含んだ患者詳細情報レジストリ）を、新規に構築した。このシステムにより、本邦における実際の患者数、診療実態を十分把握できるだけの登録症例数を本年度中に集積することが出来た。これらの登録症例を対象とした、診療実態、治療実績についての来年度以降の詳細な検討は、稀少難治性皮膚疾患の治療法の開発、予後因子の解明に大きく役立つものと期待される。

共同研究者

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准教授

黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学准教授

池田 志孝 順天堂大学大学院医学研究科皮膚科学アレルギー学教授

小宮根真弓 自治医科大学皮膚科学准教授

玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学寄付講座教授

試料レポジトリとの有機的なリンクにより、どのような遺伝子変異の場合にどのような治療法、予防法の選択が可能か（骨髄移植、骨髄間葉系幹細胞移植の適応など）を分析し、新規治療戦略、新規予防戦略の開発へとつなげるのが、最終目的である。

B. 研究方法

本レジストリ参加施設は、以下の18施設である。

A. 研究目的

本レジストリで目的とする疫学研究は、具体的には、予後因子調査（患者登録・追跡、他）、頻度分布調査（全国疫学調査、定点モニタリング、臨床調査個人票他）などである。本研究では、簡易レジストリ、詳細レジストリの2段構えのレジストリにより、多数の調査対象症例を登録することにより、4分野の稀少難治性皮膚疾患について、治療法開発、予防法開発へとつながる情報を収集する。遺伝性疾患、あるいは、遺伝的背景が発症に重要な役割を果たす疾患については、遺伝子変異の種類とその頻度分布（地域性）を整理し、さらに、遺伝子変異と臨床症状の関係（genotype/phenotype correlations）に関する詳細な検討を目指す。それらの結果から、生体

参加施設：旭川医科大学、北海道大学、新潟大学、自治医科大学、日本大学、順天堂大学、順天堂大学浦安病院、慶應義塾大学、東海大学、名古屋大学、大阪大学、兵庫医科大学、岡山大学、山口大学、愛媛大学、高知大学、久留米大学、鹿児島大学

今回の稀少難治性皮膚疾患新規レジストリでは、実際の患者数を十分に反映した登録症例数を実現することを第一の目的として、新たな2段構えのレジストリ・システム（研究対象患者数を把握するための簡易レジストリと詳しい臨床情報を含んだ患者詳細情報レジストリ）を、新規に構築した。

簡易レジストリ用のフォームとしては、登

録の簡便性に焦点を定め、登録項目の絞りこみを行った。具体的な登録項目は、年齢、性別以外には、天疱瘡では、病型、重症度と行われた治療法；表皮水疱症では、病型と遺伝子検索の有無；先天性魚鱗癬様紅皮症では、病型、水疱形成の有無と掌蹠角化の有無；膿疱性乾癬では、家族歴の有無、尋常性乾癬、および、掌蹠膿疱症の合併の有無に絞り込んだ。

本年度の段階では、簡易レジストリについては、研究班事務局に情報を収集し、詳細レジストリの情報は、参加各施設内に留めることとした。なお、簡易レジストリについても、研究班事務局レベルでは、連結不可能匿名化された情報である。

C. 研究結果

今回の新規レジストリ・システムにより、簡易レジストリには、短期間で、多数の症例の登録を達成できた。具体的には、下記、16施設からの登録があった。

本年度新規レジストリ登録施設：

北海道大学、旭川医科大学
自治医科大学、慶應義塾大学
日本大学、順天堂浦安病院
名古屋大学、大阪大学
兵庫医科大学、岡山大学
山口大学、愛媛大学
高知大学、鹿児島大学
東海大学、新潟大学

合計登録数は、各疾患・分科会毎に、以下であった。

天疱瘡 404件
表皮水疱症 84件
魚鱗癬様紅皮症 27件
膿疱性乾癬 112件

以上の登録症例数を達成したことから、今年度新規レジストリは、本邦における患者集団を反映するに十分な症例数の調査対象を把握

しつつあると言えるであろう。

D. 考察

文献的検討を行った結果、本研究の対象である稀少難治性皮膚疾患、4疾患について、過去に行われた疫学研究は非常に少ないことが明らかとなった。特に、先天性魚鱗癬様紅皮症や膿疱性乾癬に関しては、症例対照研究、コホート研究は、世界的にも、ほとんど皆無であると言える。

当班が実施する調査によって、多数の対象症例を集積することにより、稀少難治性皮膚疾患についての症例対照研究が可能となる。

表皮水疱症、先天性魚鱗癬様紅皮症等の遺伝性疾患については、本レジストリにより、遺伝子変異パターンと臨床症状の比較が可能な家系、特に一卵性双生児や多数の兄弟例、大家系等の収集が期待できる。それらにおいて、病院遺伝子の同一変異間での臨床症状と疫学的パラメータ比較を行う等の、更に詳細な臨床遺伝学的検討が行われることにより、病態の解明が飛躍的に進むことが期待できる。

本年度のレジストリにより、多数の稀少難治性疾患患者を把握することが出来たが、来年度以降、さらに登録症例数が伸びると予想される。今後は、本症例レジストリを利用した症例対照研究を施行する予定である。具体的方法としては、対象症例は症例レジストリを利用し、対照は症例と性・年齢を一致させた健常人集団等を用いる。

皮膚科カルテの記録と調査票（喫煙習慣や食生活等）より得られる患者詳細情報を、遺伝子解析情報と組合わせて施行する症例対照研究結果から、発症リスク、発症要因についての情報が得られ、新規予防法、新規治療戦略へとつながる手がかりが得られることが期待される。

次年度以降のレジストリ、コホート研究は、上記の目標を目指して、疫学調査の専門家である共同研究者、黒沢美智子順天堂大学医学部衛生学准教授にさらに助言を頂きつつ、単なる思いつきではない、より効率的な疫学研

究を進める予定である。

E. 結論

本年度の新規レジストリ・システムにより、多数の症例の登録が得られ、実際の患者数を反映した統計調査が行える調査対象の把握が可能となった。次年度以降、詳細な臨床情報を解析し、最終的には、生体試料収集システムとリンクした研究が期待できる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

1. Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Shimoyama Y, Muro Y, Akiyama M. A novel IL36RN/IL1F5 homozygous nonsense mutation, p. Arg10X, in a Japanese patient with adult - onset generalized pustular psoriasis. Br J Dermatol 167 : 699 - 701, 2012.
2. Takeichi T, Sugiura K, Arai H, Ishii K, Kono M, Akiyama M. Sporadic VACTERL association in a Japanese family of Sjogren - Larsson syndrome with *ALDH3A2* heterozygous mutations. Acta Dermato - Venereol (in press)

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
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

天疱瘡における遺伝的背景の検索

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
テニュアトラック准教授

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 国立成育医療研究センター
橋本 隆 久留米大学
青山 裕美 岡山大学
山上 淳 慶応義塾大学
天谷 雅行 慶応義塾大学

状態になる。

E. 結論

平成25年度前期までに、患者試料96名分についてSNPアレイで解析を行い、本症の発症に関与する疾患感受性遺伝子や疾患感受性領域を同定することを目指す。

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。

F. 健康危険情報

解析開始前のため、該当なし。

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。

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表
該当なし。

学会発表
該当なし。

C. 研究結果

現在までに、約200名の患者試料を収集済みであり、慶応義塾大学で保管されている。各試料提供施設での遺伝子倫理書類の書き換え（新潟大学を新たな遺伝子解析機関として追加）も進み、慶応義塾大学から新潟大学へ試料が送付されるようになった。

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。

D. 考察

平成24年度終了時までに、約100名分の患者試料が新潟大学に集まる見込みであり、その時点でSNPアレイを用いた解析を行える

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

ポリクローナル抗Dsg3抗体による細胞内シグナル依存性の尋常性天疱瘡発症機序

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 尋常性天疱瘡（PV）における自己抗体による水疱形成機序はよく分かっていない。本研究では、PV患者血清（PV IgG）とマウスモノクローナル抗デスマogleイン（Dsg）3抗体であるAK23によってケラチノサイトの細胞膜上で引き起こされる形態学的ならびに生化学的変化を比較検討した。PV IgGはポリクローナル抗体であるため複数のDsg3分子をクロスリンクしクラスターを形成させ、Dsg3のエンドサイトーシスを引き起こした。チロシンキナーゼやp38 MAPK阻害剤によってこれらの変化はブロックされ、PV IgGの病原性も著明に低下したのに対して、AK23の病原性は不変であった。以上より、AK23は細胞内シグナル非依存性にDsg3分子の接着を直接阻害するものと考えられた。一方で、PV IgGにはAK23のような直接阻害を引き起こす抗体も含まれていると考えられるが、Dsg3分子のクラスター形成に端を発してデスマゾームが分解される細胞内シグナル依存性機序が病原性に寄与すると考えられた。

研究協力者
齋藤 昌孝 慶應義塾大学医学部皮膚科 助教
Kowalczyk, AP エモリー大学細胞生物学
准教授

A. 研究目的

尋常性天疱瘡（PV）において、自己抗体がどのようにして水疱を生じさせるか、すなわちデスマゾームにおける細胞接着阻害機序として、自己抗体によるデスマogleイン（Dsg）3分子の接着の直接阻害（steric hindrance）や、細胞内シグナルを介するDsg3のエンドサイトーシスとその結果として生じるDsg3の細胞膜上からの枯渇によるとする説などが提唱されているが、いまだによく分かっていない。

PVの研究では、PV患者血清より抽出したIgG自己抗体（PV IgG）が用いられることが多いが、近年ではAK23をはじめとした病原性抗Dsg3モノクローナル抗体もしばしば

使用されている。一方で、培養ケラチノサイトに抗体を加えた際にみられるDsg3やデスマogleイン（DP）の挙動といった形態学的な変化は、PV IgGとAK23の両者で大きく異なる。したがって、細胞接着阻害機序はPV IgGとAK23では異なる可能性が示唆される。そこで本研究では、PV IgGとAK23によって引き起こされる形態学的ならびに生化学的変化をより詳細に比較検討することで、PVにおける細胞接着阻害機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

免疫蛍光抗体法を用いて、PV IgGまたはAK23添加後に培養ケラチノサイトでみられる形態学的変化をデスマゾーム構成蛋白であるDsg3やDPに着目して比較する。PV IgGがポリクローナル抗体であることから、Dsg3の異なるエピトープに対するマウスモノクローナル抗Dsg3抗体を数種類混合して加えた場合に、PV IgGと同様の変化を生じさせ

るかどうかを検討する。また、PV IgGとAK23ではDsg 3のエンドサイトーシスを引き起こす程度に差があるかどうかを免疫蛍光抗体法ならびに細胞表面ビオチン化アッセイを用いて検討する。さらに、抗体を加えた際にみられる形態学的変化に細胞内シグナルの関与があるかどうかを検討する。また、細胞接着機能の評価のためには、デイスパーゼアッセイ (dissociation assay) を用いる。

C. 研究結果

培養ケラチノサイトにPV IgGを添加した際に免疫蛍光抗体法でみられる細胞間の小球状パターンは、AK23を添加した際にはほとんど認められなかった。また、PV IgGは細胞間のDPの染色性も著明に低下させ、デスマゾームの分解を示唆する所見を呈したが、AK23はこのような変化を引き起こさなかった (図1)。さらに、異なるエピトープに対するマウスモノクローナル抗Dsg 3抗体を2種類組み合わせることで添加したところ、PV IgGと同様な小球状パターンが認められた。そして、細胞膜上のDsg 3はPV IgGによってエンドサイトーシスされ、細胞表面から枯渇するのに対して、AK23の場合にはほとんどエンドサイトーシスはみられないことが示された。

以上の形態学的ならびに生化学的な変化は、チロシンキナーゼ阻害剤やp38 MAPK阻害剤の存在下ではほぼ完全にブロックされ (図2)、さらに驚いたことに、デイスパーゼアッセイにおいて、これらの阻害剤はそれぞれPV IgGの病原性を著明に低下させたのに対して、AK23のそれにはまったく影響しなかった。

D. 考察

今回の研究で、PV IgGとAK23によって引き起こされる形態学的ならびに生化学的な変化には著しい違いがあることが判明した。その理由として、PV IgGがポリクローナル抗体であることにより複数のDsg 3分子のクロ

スリンク、すなわちクラスター形成作用を有するからではないかと考えた。PV IgGを添加した際に細胞間にみられる小球状の変化はDsg 3分子のクラスターに相当するものと考えられ、さらにクラスター形成の結果としてエンドサイトーシスが引き起こされることが示唆された。そして、クラスター形成とエンドサイトーシスはシグナル依存性であり、チロシンキナーゼやp38 MAPKを阻害することで、PV IgGの病原性は著明に低下したのに対して、AK23の病原性はまったく低下しなかった。したがって、PV IgGとAK23では主としてはたらく細胞接着阻害機序が異なることが示唆された。

E. 結論

以上より、AK23のようなモノクローナル抗体はp38 MAPKといった細胞内シグナルに依存することなく、デスマゾームにおけるDsg 3分子の接着を直接的に阻害することで水疱形成を引き起こしているものと考えられる。一方で、PV IgGにはAK23のような直接阻害を引き起こす抗体も含まれていると考えられるものの、ポリクローナル抗体であるがゆえにDsg 3分子のクラスター形成を生じさせ、エンドサイトーシスの結果、Dsg 3が細胞膜上から枯渇し、デスマゾームが分解されていくという機序で水疱が形成されるものと考えられ、この経路には細胞内シグナルの関与が不可欠であると考えられた (図3)。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成24年度)

論文発表

“Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation”

(*PLoS One* 7 (12), e50696, 2012)

学会発表

“A key role for the polyclonal nature of pemphigus vulgaris IgG in p38 MAPK – dependent loss of keratinocyte adhesion”

(第75回米国研究皮膚科学会 平成24年5月10日 ローリー)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

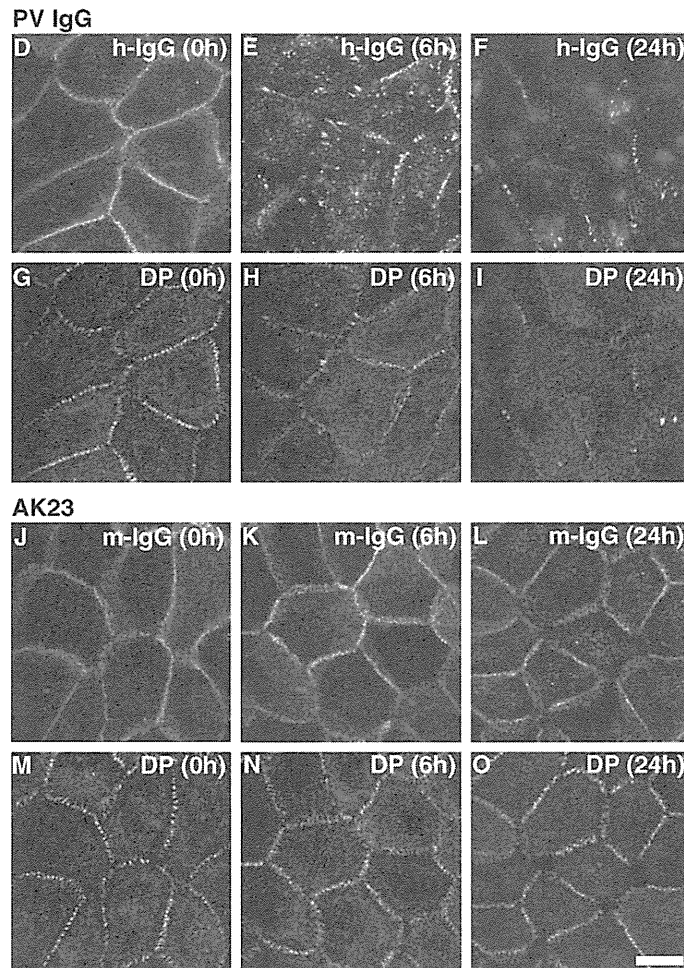


図1 培養ケラチノサイトにPV IgGを添加すると細胞間に小球状パターンがみられるが、AK23の場合にはほとんど認められない。また、PV IgGは細胞間のDPの染色性も著明に低下させるが、AK23はこのような変化を引き起こさない。(Saito M. et al. PLoS One 2012より転載)

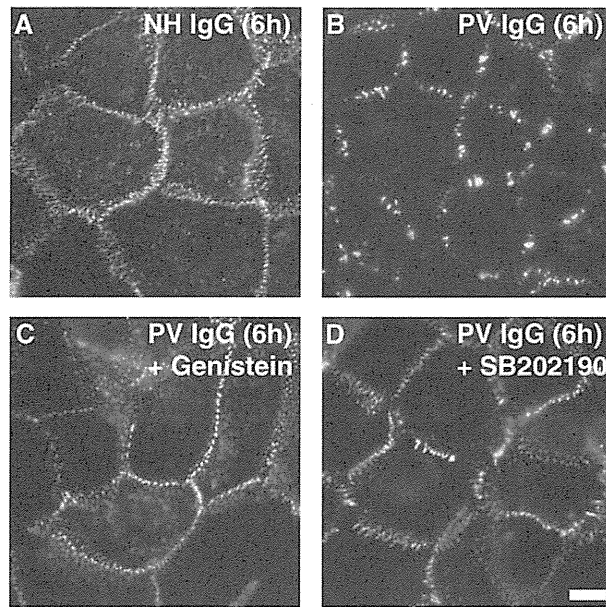


図2 PV IgGによって細胞間にみられるクラスター形成は、チロシンキナーゼ阻害剤 (Genistein) や p38 MAPK 阻害剤 (SB202190) の存在下ではブロックされる。(Saito M. et al. PLoS One 2012より転載)

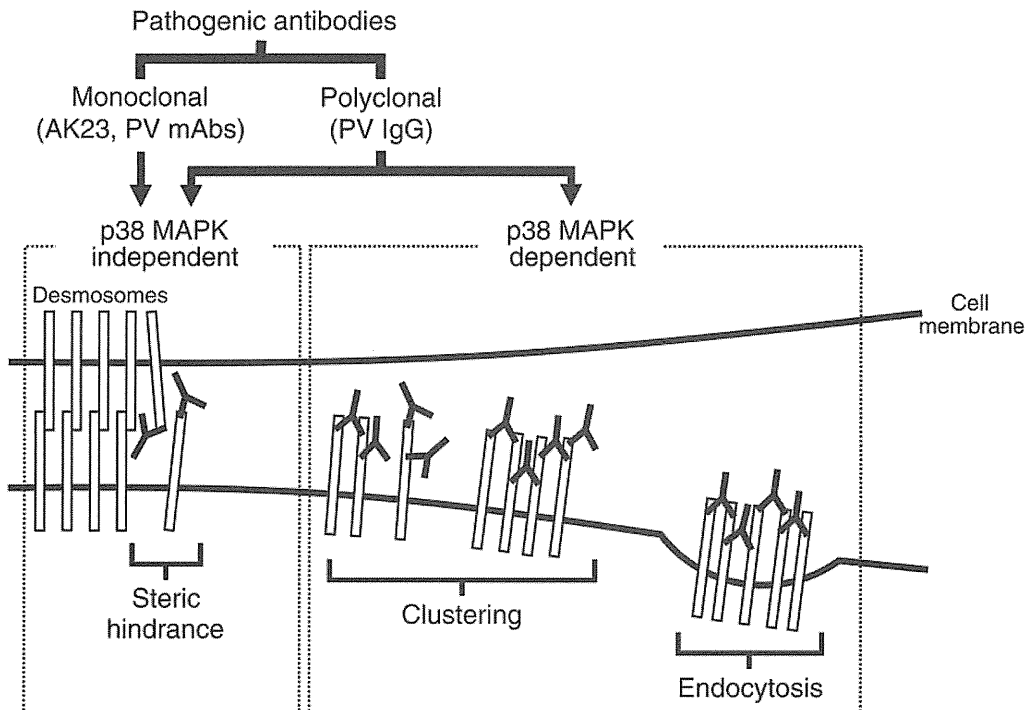


図3 PV水疱形成における病態モデル。ポリクローナル抗体ではシグナル依存性の水疱形成機序が存在する。(Saito M. et al. PLoS One 2012より転載)

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

風土病型落葉状天疱瘡におけるデスマグレイン1前駆体に対する
自己抗体の解析

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 落葉状天疱瘡（PF）を風土病とするチュニジアの一部では、しばしば健常人からデスマグレイン1（Dsg1）に対する抗体がELISAで検出される。蛍光抗体法で表皮細胞間染色を示さないことから、この抗体は細胞内の前駆体（preDsg1）に反応すると考えられた。チュニジアの健常人および風土病型PF患者、日本人の通常型PF患者血清を、CHO細胞で作製した組み替えタンパクを用いた免疫沈降法で評価すると、チュニジア健常人血清（n=16）は、preDsg1のみに反応するか、preDsg1に成熟タンパク（matDsg1）よりも強く反応した。一方、チュニジア人（n=9）と日本人（n=9）のPF血清は、matDsg1にpreDsg1と同等以上に反応した。この結果は、チュニジアにおける風土病発生地域においてpreDsg1特異的B細胞を保持している健常人が存在し、条件によってpreDsg1に対する自己抗体が産生されうることを示している。

研究協力者

山上 淳 慶應義塾大学医学部皮膚科助教

A. 研究目的

DsgはpreDsgとして表皮細胞内で産生され、細胞表面に運ばれる過程でプロ配列が切断されてmatDsgとなり、デスマゾームを形成して細胞間接着に関与する。細胞表面のmatDsgに対しては免疫寛容が働くが、細胞内のみ存在し免疫系に暴露されないpreDsgに対しては、天疱瘡患者のみならず健常人においても自己抗体を生じる可能性があると考えられる。

チュニジアには風土病型PFが見られ、その地域では健常人血清からもDsg1に対する抗体が検出される。この研究では、風土病型PF患者および同じ地域の健常人血清に含まれるpreDsg1に対する抗体の解析を行い、天疱瘡の発症におけるpreDsg1に対する自己抗体の臨床的意義の解明を目的としている。

B. 研究方法

今までのELISAで用いられてきたバキュロウイルス発現系で作製した組み替えタンパクと異なり、翻訳後修飾効率の高いCHO細胞ではmatDsgのみを作製することができる。また、プロ配列の切断部に変異を加えることで、preDsgのみを含む組み替えタンパクを作製する。これらのCHO細胞発現系による組み替えタンパクを用いて、チュニジアの風土病型PF患者9例、同じ地域の健常人血清（患者と血縁のある者7例、血縁のない者9例）、日本人の通常型PF患者9例の血清の免疫沈降法における反応性を検討する。またDsg2の骨格上にDsg1細胞外領域を置換した組み替えタンパクを用いて、エピトープ解析を行う。

C. 研究結果

ELISAでDsg1に対する抗体が検出されたチュニジア健常人血清は、正常ヒト皮膚を基質とした蛍光抗体間接法で表皮細胞間にIgGの沈着を認めず、細胞内のpreDsg1に

に対する抗体であると考えられた。免疫沈降法では、健常人16血清中8血清でpreDsg 1のみに反応し、preDsg 1とmatDsg 1の両方に反応した残りの8血清も、1例を除いたすべての血清でmatDsg 1よりもpreDsg 1に強い反応を示した。一方で、チュニジア人PF患者からの9血清のうち3例、日本人PF患者からの9血清のうち6例は、preDsg 1よりもmatDsg 1と強く反応することを含めて、すべてのPF患者血清（チュニジア人、日本人とも）はpreDsg 1と同等以上にmatDsg 1に結合した（表1、図1）。

またエピトープ解析の結果、日本人PF血清が主にDsg 1のN末端に反応する一方で、チュニジア人PF血清はDsg 1細胞外領域のN末端からC末端までの広範囲に、また健常人血清はDsg 1細胞外領域のC末端側に結合する割合が高いことが示された（図2）。

D. 考察

チュニジアの風土病型PFが見られる地域のように、状況によっては健常人血清からpreDsg 1に対する抗体が検出されることが、この研究によって初めて示された。今までの研究から、preDsg特異的B細胞は健常人にも存在し、自己抗体を産生している可能性が考えられていたが、その仮説を裏づける結果である。またエピトープ解析では、日本人をはじめとする通常型PFではDsg 1のN末端に反応する自己抗体が発症と同時に出現するのに対して、チュニジアなどで見られる風土病型PFは、発症前にDsg 1細胞外領域のC末端側に反応する抗体が産生され、N末端にもエピトープが拡大することで発症する可能性が示唆され、通常型と風土病型PFの発症機序の違いが考えられた。

E. 結論

PF発症前の健常人からpreDsg 1に対する抗体が検出された。今後、preDsgに特異的なB細胞および自己抗体をより詳細に解析することで、発症前段階における治療や予防な

ど、天疱瘡研究の新たな分野を開拓できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（平成24年度）

学会発表

1. 「風土病型落葉状天疱瘡の発症前におけるデスマoglein 1前駆体に対する抗体」
（第19回分子皮膚科学フォーラム 平成24年4月13日 青森）
2. “Antibodies against desmoglein 1 in healthy Tunisians in the area of endemic pemphigus foliaceus are mostly against the precursor molecule.”
（The 75th Annual meeting of Society for Investigative Dermatology, 平成24年5月9日 ノースカロライナ州ローリー）

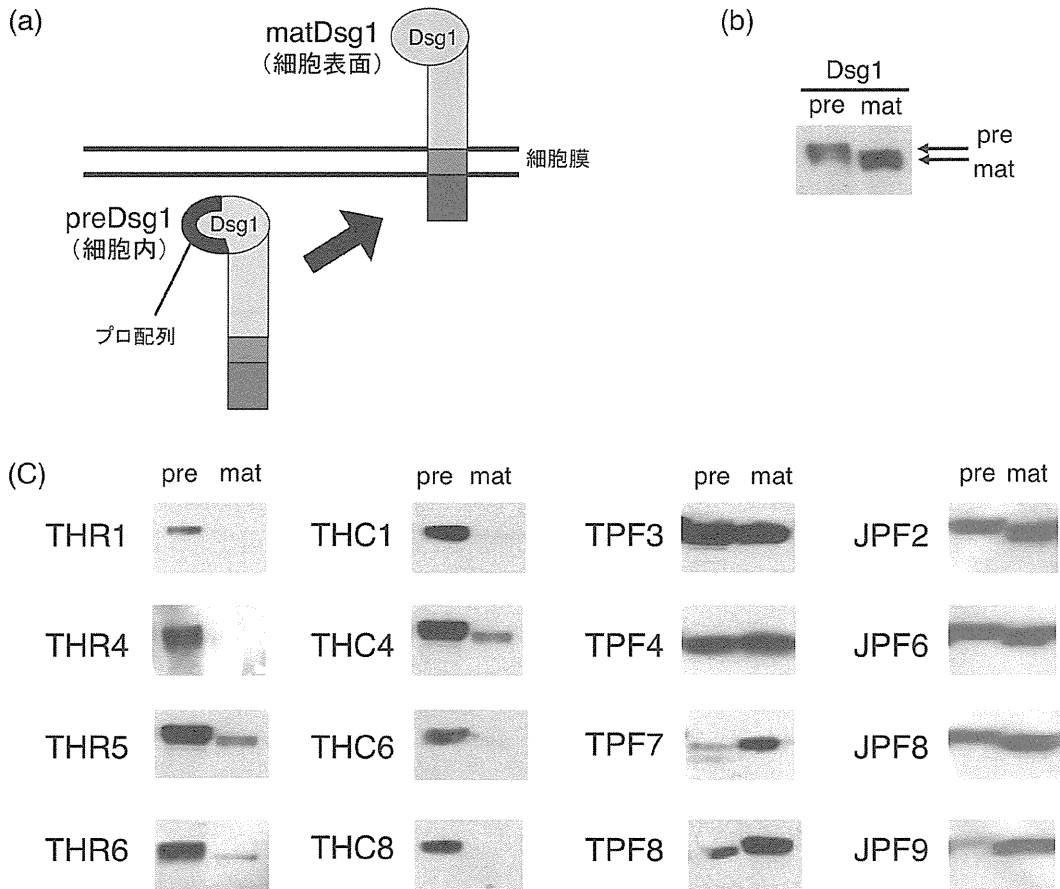
H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1 preDsg 1 および matDsg 1 に対する反応とエピトープ解析の結果

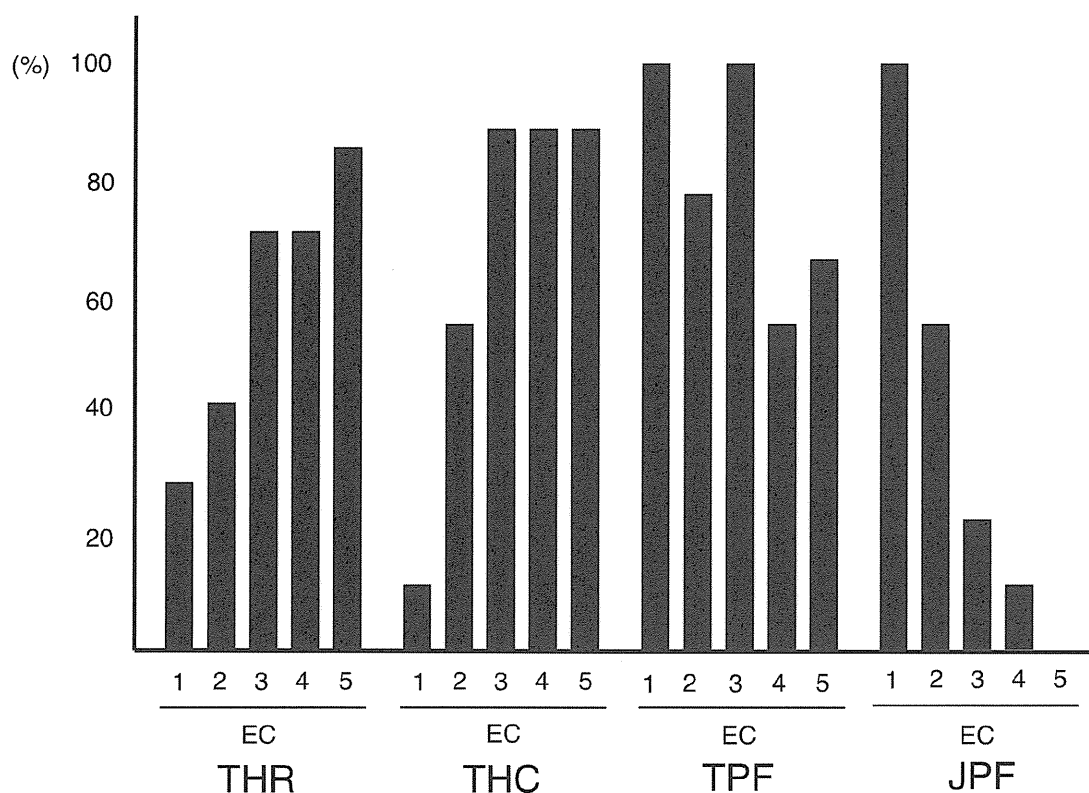
	血清数	preDsg 1 / matDsg 1						エピトープ				
		pre	mat	pre > mat	pre = mat	pre < mat	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5	
チュニジア	患者と血縁のある健常人 (THR)	7	4	6	1	0	2	2	4	3	4	
	患者と血縁のない健常人 (THC)	9	4	9	0	0	1	2	5	6	8	
	風土病型PF患者 (TPF)	9	9	0	6	3	9	7	9	4	6	
日本	通常型PF患者 (JPF)	9	8	9	0	3	6	9	5	2	1	0

図1 チュニジア健常人血清は preDsg 1 により強い反応を示す



(a)細胞内のpreDsg 1 は、プロ配列がはずれてmatDsg 1 となり、細胞表面に発現する。(b) CHO細胞により、preDsg 1、matDsg 1 (やや分子量が小さい) それぞれのみを含む組み替えタンパクを作製した。(c) チュニジアの健常人血清 (THR, THC) は、preDsg 1 により強い反応を示したのに対して、チュニジア人PF血清 (TPF)、日本人PF血清 (JPF) は、matDsg 1 にpreDsg 1 と同等以上の反応を示した。

図2 健常人およびPF患者におけるDsg1抗体エпитオプの比較



チュニジアの健常人血清 (THR, THC) は、Dsg1 細胞外領域のC末端側であるEC3からEC5に結合する割合が高かった。チュニジアの風土病型PFの血清 (TPF) は、EC1からEC5の広範囲に反応した。対照的に、日本人PF血清 (JPF) はDsg1 細胞外領域のN末端であるEC1とEC2を主要なエпитオプとする。

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

GeLC - MS法を用いた天疱瘡の病因抗体によるシグナル経路の解析

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 准教授

研究要旨 天疱瘡抗体には病因性抗体と非病因性抗体があり、天疱瘡抗体刺激により p38MAPK や RhoA などを経たシグナル経路を介して細胞骨格に変化が生じること、同時に Dsg3 欠損デスモソームが形成され棘融解することが明らかにされている。われわれは、病因シグナルをさらに解析する目的で、プロテオーム解析を行う。方法：培養表皮細胞を病因性モノクロナル抗体 (mAb) AK23 と非病因性 mAb AK20 で刺激後可溶化し、1Dゲルで分離後分子量ごとにゲルを切り出し、消化後 LC - MS/MS でプロテオーム解析を行う。この新規プロテオーム解析法で、天疱瘡の病因シグナルを解析した報告はないので、新しい知見を得ることができる可能性が高い。また、既知の経路についても、あらためて確認することができる。問題なく解析できれば、AK23IgGmAb と IgMmAb の比較、mAb 一種と 4 種の比較も行いたい。

共同研究者

藤井 一恭、吉岡 愛育、神谷 浩二、
岩月 啓氏（岡山大学）、
近藤 格（国立がん研究センター研究所）

精製プロトコール (AK23)

精製カラム：Hitrap proteinA HP 5 mL,
Wash Buffer : 3M NaCl, 10mM Tris - Cl
pH8.0, Elution Buffer : 50mM NaOAc
pH5.0, カラムを Wash buffer 50mL で洗浄後、
ハイブリドーマ上清を 200~300mL 程度カラムに流し、Wash buffer 50mL で洗浄後 10~20mL の Elution Buffer で溶出した。OD280 で濃度測定し濃度の高いフラクションを得た。収量は 500mL で 0.25 (mg/mL) × 12 (mL) = 3 (mg) 程度であった。ELISA で抗体価を確認した。

A. 研究目的

天疱瘡の病因シグナルを解析する。特に新規の経路を見いだしたい。

B. 研究方法

1. 細胞培養

正常ヒト表皮細胞を無血清培地 Epilife (Ca²⁺ 0.06mM) を用いて 70% コンフレントに培養した。Ca²⁺ 濃度を 1.2mM に変更し 9 時間後より、実験に用いた。

2. 抗体

病因性のある抗デスモグレイン 3 抗体マウスモノクロナル抗体 AK23 と非病因性抗体 AK20、ウシの VII 型コラーゲンとのみ反応するマウスモノクロ抗体 BM034 をコントロール IgG として用いた。ハイブリドーマ細胞を無血清培地に馴化し、培養上清をプールして、IgG 分画を精製した。

3. サンプル調製

培養した表皮細胞に AK20, AK23, コントロールとして BM034 を 0.3mg/ml 添加し 24 時間刺激した。

サンプル調整 10% TCA で固定後、Urea 含有バッファーでタンパク抽出を行った。

コントロール、AK20, AK23 刺激後の抽出サンプルを、3 通りの組み合わせで 1Dゲル 2 レーンに泳動し、16 のゲルに分割し、分子量ごとに解析した。(図 1)

トリプシンで消化し質量分析を行った。プ

ロトマップ法で解析を行った。(図2)

C. 研究結果

得られたタンパクのデータは1500種に及び、これらのデータを今後解析していく。

代表的なデータを図2に示す。病因性が低いAK20抗体(赤左で上)と病因性が高いAK23抗体処理サンプル(青右で下)を各々比較していく。1に示すように発現量に差があるものは、刺激により産生量に差がある可能性があり、分子量に差があるものは、刺激後に分解経路が活性化されている可能性があるため、今後1500あまりの各分子のデータについて解析をしていく。

D. 考察

プロテアーゼは様々な生体反応に関与しており、プロテアーゼと基質の関連性を検討することは、生体反応の新しい経路を検討することに繋がる可能性がある。天疱瘡の病因シグナルに、Caspaseやプラスミノーゲンアクティベータを含むプロテアーゼの関与については、議論があり関連性が疑問視されている。これまでに報告されている経路の信憑性について再確認する意味でも、標準的な抗体を用いて刺激した表皮細胞のタンパクを、異なる検討法で解析することは意味があると考えられる。解析データの中には、明らかに分子量と発現量に差のある分子が散見され、今後、解析を2回繰り返して統計処理や再現性を確認し、興味ある変化を示した分子については、ウエスタンブロットティングで検討し、機能解析につなげたい。

E. 結論

天疱瘡培養モデル系で、質量分析法を用いて、分子の分解系に着目したプロトマップ法による解析を開始し、順調に進捗していることを報告する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(平成24年度)

論文発表

該当なし。

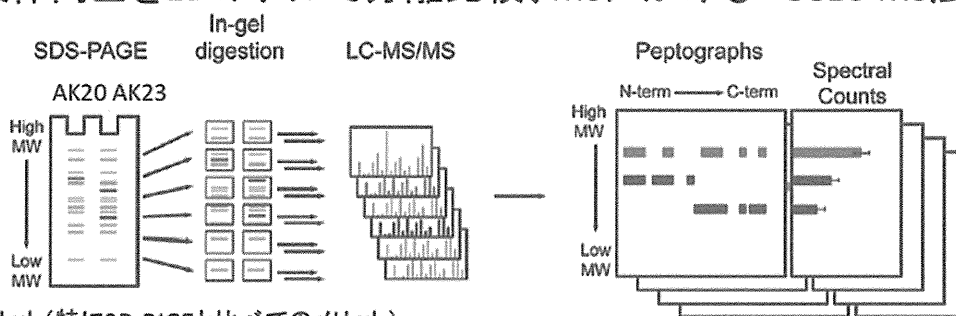
学会発表

該当なし。

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし。

検体同士を1Dのゲルで分離比較、MSにかける GeLC-MS法



メリット(特に2D-DIGEと比べてのメリット)

- ・2D-DIGEに比べて、同定されるタンパク質の数が多い点です。
- ・分子量の異なる位置にタンパク質が同定されるので、予想していないタンパク質の状態が観察されること。

・2D-DIGEでは、1D(等電点分離ゲル)に入りやすいタンパク質(水溶性のタンパク質)を観察しやすいが、GeLC-MSは、難溶性のタンパク質でもゲルに入って分離できるメリットがある。

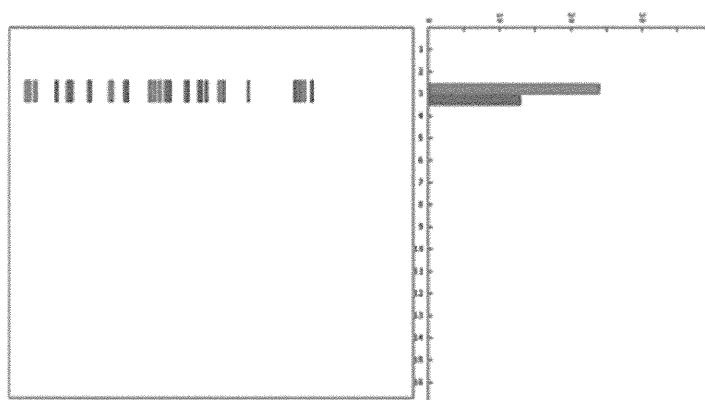
・定量比較は、一応できる。・糖鎖修飾、タンパク分解経路の検討に適している。

刺激に用いた抗体は、

病因性モノクロー抗体AK23(IgG) vs 非病因性AK20 vs Normal IgG

図1 方法の概略

1. AK20 vs AK23 刺激時で発現が異なる分子



2. AK20 vs AK23 刺激時で発現量と分子量が異なる分子

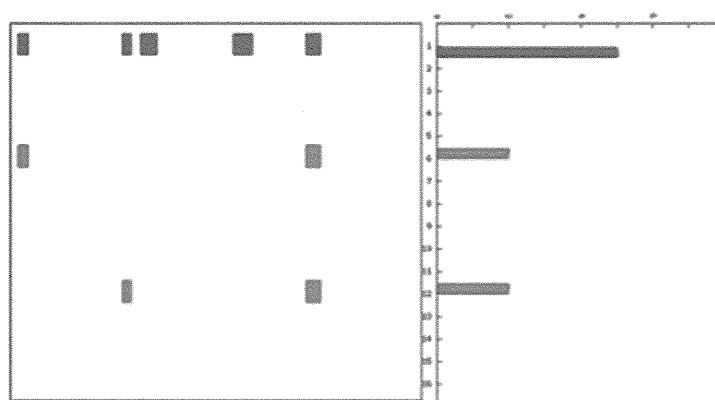


図2 解析データの1例

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

天疱瘡に対する二重膜濾過血漿交換療法と
全血漿交換療法施行時の血清IL-10濃度の検討

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 准教授

研究要旨 二重膜濾過血漿交換療法（DFPP）や全血漿交換療法（PE）は天疱瘡を含む重症自己免疫性水疱症の治療に用いられる。その作用機序として、自己抗体の除去に加え、抗体産生と炎症性サイトカインの正常化が考えられる。血漿交換後にリバウンド現象が生じ抗体産生が亢進する症例や、リバウンド現象なく施行後抗体産生抑制できる症例もあり両者の違いを説明する機序は明らかにされていない。我々はDFPPやPEを施行した天疱瘡（4例）と類天疱瘡患者（1例）血清を用いて施行前後の血清サイトカインをMILLIPLEXアッセイキットを用いて網羅的に測定した。結果、DFPPやPE後に血清IL-10が増加していることが観察された。またIVIGやステロイドパルス療法前後では変化しなかった。IL-10は、主にT細胞や単球系細胞に直接的、間接的に作用して炎症性サイトカインの産生を始めとする免疫機能を抑制的に制御するため、炎症性疾患における産生の増加は、予後の良いサインと見なされている。血清IL-10値がDFPPやPE後に増加することは、治療が奏効している事を示唆する所見と捉えることができる。IL-10の増加は血漿交換療法の作用機序の1つと考えられた。

共同研究者

神谷 浩二、濱田 利久、岩月 啓氏（岡山大学）

林 宏明、藤本 亘（川崎医科大学）

塩原 哲夫（杏林大学）

IL-3 IL-4 IL-5 IL-6 IL-7 IL-8 IL-10
IL-12p40 IL-12p70 IL-13 IL-15 IL-17 IP-10
MCP-1 MIP-1a MIP-1b TNF-a TNF-b
である。測定結果を解析し、IL10が直後に増加していたため、今回はIL10に着目して解析した。

A. 研究目的

天疱瘡や類天疱瘡における二重膜濾過血漿交換療法（DFPP）や全血漿交換療法（PE）の効果機序を明らかにする。

B. 研究方法

自己免疫性水疱症として我々はDFPPやPEを施行した天疱瘡（4例）と類天疱瘡患者（1例）の施行前後の血清（DFPP 22回、PE 11回）サイトカインをMILLIPLEXアッセイキットを用いて網羅的に測定した。測定したサイトカインは、Eotaxin G-CSF GM-CSF IFN-a 2 IFN-g IL-1 a IL-1 b IL-2

C. 研究結果

自己免疫性水疱症に対するDFPP（15回）の前後では、IL-10の変化率（前値を1として）は、増加13回、不変1回、減少（0.8）1回であった。PE（7回）前後では、すべての症例で増加したが、その増加率は2倍以上であった（図1）。一方SJS/TENでは、DFPP（2回）PE（2回）のうちIL-10が増加したのはDFPPの1回だけで、不変DFPP 1回、減少したのはPEで2回であった。

IVIG療法を施行した2例の自己免疫性水疱症とSJS症例では前後で大きな変化はな

かった。ステロイドパルス療法では、明らかに減少した症例が4例あり、ほとんど変わらない症例が3例あった。明らかに血漿交換療法は、IVIgやステロイドパルス療法と異なりIL-10濃度に作用していることが推察できた。

実際の症例で、DFPPならびにPE前後でのIL-10の変化率を示す。多くの症例で、DFPPとPEの翌日にIL-10は増加し2日後には低下した。その上がり幅は同一症例でも様々である。自己免疫性水疱症症例について自己抗体の推移を前後で検討した。抗体価に対する治療効果が高い際にIL-10の増加がかならず観察されるというわけではなかった。抗体価の変動は、抗体産生の速度と分解もしくは除去の速度によって規定されるが、IL-10値の変動が抗体産生に直接的に影響することはなく、サイトカインのバランスで免疫系が調整されていることが推察される結果であった(図3)。

D. 考察

我々は、自己免疫性水疱症症例に対して、自己抗体の除去のために血漿交換を施行している。治療の主な作用機序としては、病因抗体の除去は重要であることはいうまでもないが、症例によってはDFPPやPEの後に抗体産生の勢いが抑制され治療がスムーズに進められる症例と、逆に自己抗体の産生が急激に亢進し悪化することもあり、その機序は全く不明であった。今回、われわれは、抑制性サイトカインIL-10に着目し、血漿交換前後で一過性に増加していることを見いだした。産生細胞は今後の検討課題であるが、治療に関して、新しい機序を解明する可能性がありうる。IL10を生物製剤として臨床応用できる可能性や、IL10を産生する細胞が増えることが治療効果に結びつく可能性があり、今後の新規治療開発の糸口になり得る。症例数を増やすために血清を蓄積中である。

E. 結論

天疱瘡や類天疱瘡における二重膜濾過血漿交換療法(DFPP)や全血漿交換療法(PE)の直後にIL-10が増加していた。効果機序に抑制性サイトカインIL-10が関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表(平成24年度)

論文発表

該当なし。

学会発表

皮膚アレルギー学会 重症薬疹と自己免疫性水疱症患者における二重膜濾過血漿交換療法と全血漿交換療法前後の血清IL-10値の検討
2012年7月13日 軽井沢

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし。