

## 平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	AMAGAI MASAYUKI					
①研究代表者氏名	天谷 雅行			②所属研究機関・部局・職	慶應義塾大学・医学部・教授	
③研究課題名	和文	自己免疫性皮膚疾患・天疱瘡における発症機序の解明				
	英文	Clarification of pathophysiological mechanisms of autoimmune skin disease, pemphigus				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	30,300	21,600	14,000	14,000		79,900
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
天谷 雅行	慶應義塾大学・医学部・教授	皮膚科学	研究の総括、天疱瘡モデルマウスの解析、T細胞クローンの樹立			
西川 武二	慶應義塾大学・医学部・名誉教授	皮膚科学	症例の集積、モノクローナル抗体の解析			
田中 勝	東京女子医科大学・東医療センター・助教授	皮膚科学	天疱瘡モデルマウスのデジタル解析			
石河 晃	慶應義塾大学・医学部・講師	皮膚科学	マウスの病理学的・電顕的解析			
小安 重夫	慶應義塾大学・医学部・教授	免疫学	Dsg3特異的B細胞トランスジェニックマウスの作成			
岩崎 利郎	東京農工大学・獣医学部・教授	獣医学	黄色ブドウ球菌毒素の作成			
ジョン・R・スタンレー	米国・ペンシルバニア大学・皮膚科・主任教授	皮膚科学	ペプチド解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>天疱瘡は、表皮細胞間接着因子であるデスモグレイン（Dsg）に対するIgG自己抗体がDsgの機能阻害を誘導することにより、皮膚・粘膜に水疱、びらんを生じる致死的重篤な疾患である。本研究の目的は、天疱瘡をモデル疾患とし、自己免疫疾患の発症機序を解明することにある。</p> <p>我々は自己抗原ノックアウトマウスを用いた新しい方法により尋常性天疱瘡モデルマウスを作成している。このモデルマウスから、表皮細胞間接着障害を誘導できる抗Dsg3モノクローナル抗体を複数単離し、疾患誘導活性を持つ抗体と持たない抗体の相違を検討する。さらに、ハイブリドーマ細胞から、H鎖、L鎖のcDNAを単離し、抗Dsg3抗体をB細胞膜表面に発現するトランスジェニックマウスを作成する。B細胞トランスジェニックマウスにおけるB細胞の運命を検討することにより、Dsg3に対するB細胞免疫寛容獲得の機序を明らかにする。また、天疱瘡モデルマウスよりDsg3に特異的に反応するT細胞クローンを複数単離し、T細胞クローンとナイーブなB細胞をRag-2<sup>-/-</sup>マウスに移植することにより、病的抗体を誘導するT細胞を同定する。本研究の特徴のひとつは、人工的な抗原を過剰発現させた従来の実験系でなく、実際の自己免疫疾患の自己抗原に対するB細胞、T細胞の免疫寛容獲得の分子メカニズムを明らかにする点にある。</p> <p>また、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群（SSSS）において、黄色ブドウ球菌の産生する表皮剥奪性毒素（ETA）が、落葉状天疱瘡抗原であるDsg1を特異的に消化する蛋白分解酵素であることを明らかにした。このことにより、皮膚感染症と自己免疫疾患の接点がDsg1において認められたことになる。他の表皮剥奪性毒素（ETBなど）を含め、ETの作用機序を解明するとともに、ET作用後の生体におけるDsg1に対する免疫応答を検討する。</p>						

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

### 1. 天疱瘡モデルマウスより疾患誘導性抗 Dsg3 モノクローナル抗体の単離、およびそのエピトープ解析

尋常性天疱瘡は、表皮細胞間接着因子デスモグレイン 3 (Dsg3) を標的とした IgG 自己抗体により誘導される。天疱瘡モデルマウスより、合計 8 クローン以上の抗 Dsg3 mAb (AK シリーズ) を単離した。これらの抗体はすべて *in vivo* において Dsg3 と結合することができるが、ハイブリドーマ細胞をマウスの腹腔に接種したところ AK23 mAb のみ天疱瘡の表現型を誘導した。さらに、AK23 のエピトープは Dsg3 のアミノ酸 V3、K7、P8、D59 に存在することを明らかにした。特筆すべきことに AK23 のエピトープ (V3、K7、P8、D59) は、結晶構造から予想されるカドヘリン分子接着面を形成する Dsg3 特異的アミノ酸に一致していた。他の疾患誘導性のない AK mAb は、機能的にあまり重要と考えられない Dsg3 細胞外領域中央部あるいは C 末の膜に近い領域を認識していた。これらの事実により、天疱瘡患者間における重症度の違いがみられる分子的機序のひとつとして、抗体の認識するエピトープが関与することを初めて実証することができた。

### 2. Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニック (B Tr) マウスの作成および Dsg3 に対する B 細胞トランス獲得機序の解明

病原性を有さないモノクローナル抗体 AK7 mAb より作成した B Tr マウスでは、末梢に Dsg3 が存在するにもかかわらず、Dsg3 に反応する B 細胞が脾臓、リンパ節に存在し、不活化もされていないことが示され、Dsg3 反応性 B 細胞は、トランスによる除去、不活化から逃れることが明らかとなった。ところが、AK7 B Tr マウスに、病原性を有する AK23 mAb を投与し、皮膚、粘膜に水疱を誘導すると、Dsg3 反応性 B 細胞が、脾臓、リンパ節から消失するが、非病原性の AK7 mAb を投与しても B 細胞の消失は観察されなかった。AK7 B Tr- Rag2<sup>-/-</sup> マウスの解析により、AK7 B 細胞の消失には、CD4<sup>+</sup>T 細胞の存在が必要であることが示唆された。これらの事実により、標的抗原が機能障害をうけると、同一抗原に反応する B 細胞は、病原性を有さないものも含め、除去あるいは不活化されるという、末梢自己抗原に対する新しい免疫寛容機序の存在が示唆された。

### 3. 天疱瘡モデルマウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞の同定および解析

Dsg3<sup>-/-</sup> マウスからの Dsg3 特異的 T 細胞クローニング法を確立し、その手法を用いて現在までに Dsg3 反応性 T 細胞株を 5 株樹立した。このうち、Th0 型の T 細胞クローンは Dsg3<sup>-/-</sup> B 細胞と共に Rag2<sup>-/-</sup> マウスに移入すると IgG 抗 Dsg3 抗体産生とともに PV の発現型を誘導したが、Th1 型の T 細胞クローンは病原性を示さなかった。現時点で解析した Dsg3 反応性 T 細胞クローン数は少なく結論に至っていないが、今回確立した動物モデルを用いた手法により病原性を規定する因子を明らかにすることが可能で、他の自己免疫疾患の病態解析や治療標的の選択に有用と考えられた。

### 4. ブドウ球菌外毒素である表皮剥脱毒素 ETB、ETD の標的蛋白の検討

ETB 産生株より ETB 遺伝子を単離し、組換え ETB を作成した。ETB を新生仔マウスに投与後、皮膚において E-Cad および Dsg3 の染色性は変わらないものの、Dsg1 の染色性は消失していた。組換え Dsg1、Dsg3 蛋白と ETB を *in vitro* で反応させてみると、ETB は Dsg1 を特異的に、濃度依存性に切断することが確認された。さらに、皮膚感染症から分離培養された黄色ブドウ球菌の遺伝子から、ETA、ETB と相同性を示す ETD が単離された。ETD においても同様の検討を加えてみると、Dsg1 を特異的に消化することが明らかにされた。

### 5. ET の Dsg1 消化における分子メカニズムの解明

ETA、ETB の結晶構造の解析から、セリンを活性中心に持つセリンプロテアーゼの一種であることが予想されていた。そこで、ETA、ETB の活性中心であるセリンをアラニンに変異させると、変異 ET は Dsg1 に特異的に結合する結合活性は保っているものの、Dsg1 を切断する活性を完全に失っていた。さらに、Dsg1 の切断端の配列を解析してみると、ETA、ETB、および ETD のすべての ET が、EC3 と EC4 の結合部付近にある N 末から 381 番目のグルタミン酸の直後で切断していることが確認された。従って、ET は、Dsg1 特異的なセリンプロテアーゼであることが証明された。

### 6. ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) 感染後の Dsg1 に対する免疫応答

ET 産生黄色ブドウ球菌感染後に ET により Dsg1 が皮膚において分解され、血中に流出し、免疫系に曝露されることが考えられる。SSSS 罹患後の血清を経時的に検討すると、弱いながらも抗 Dsg1 IgG 抗体の産生が 30 例中 6 例 (20%) の患児で認められた。皮膚感染症と自己免疫疾患が Dsg1 において接点を作っていることが示された。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

### 1) 天疱瘡自己抗原分子上の病的ホットスポットの同定

天疱瘡に認められる自己抗体価は、同一患者では病勢と平行して推移する。しかし、異なる患者間で比較した場合、抗体価は重症度を表す絶対的な指標とならない。すなわち、抗体価が高くても軽症を示す例、抗体価が低くても重症を示す例が存在する。同じ自己抗原を認識する抗体間に、病的活性の違いがあるのであろうか。あるとすれば、その分子メカニズムは何であろうか。

本研究において、天疱瘡モデルマウスから、合計8種の抗Dsg3 IgGモノクローナル抗体 (AK mAb シリーズ) を単離し、病的活性とエピトープの関係につき解析した。これらの抗体はすべて *in vivo* においてDsg3 と結合することができるが、ハイブリドーマ細胞をマウスの腹腔に接種したところ AK23 mAb のみ天疱瘡の表現型を誘導した。AK23 のエピトープは、Dsg3 の接着機能上最も重要な、カドヘリン分子間が接着する接着面に存在することが明らかとなった。病的活性を認めない他の AK mAb は、機能的にあまり重要と考えられない領域を認識していた。これらの結果により、エピトープの違いにより自己抗体の病的活性が異なることを天疱瘡において初めて実証した (Tsunoda et al, J Immunol, 2003)。

今後、分子上の病的活性のホットスポットを同定することは、重症度の指標となりうる単一エピトープ ELISA 法の開発、あるいは重症な表現型を誘導する自己抗体のみを選択的に除去するエピトープ特異的自己抗体除去法の開発につながる。

### 2) Dsg3 特異的B細胞トレランスの解析

B細胞トレランスのドグマは、HEL (hen egg lysozyme) あるいは MHC class I 分子に対する抗体遺伝子より作成したB細胞トランスジェニックの解析をもとにしている。自己免疫疾患の実際の抗原に対するトレランスの成立機序を解析した例はない。今回、我々は、AK7 抗Dsg3 抗体の遺伝子より、Dsg3 特異的B細胞トランスジェニックマウスを作成し、Dsg3 反応性B細胞の運命を解析した。予想に反して、Dsg3 反応性B細胞は、抹消リンパ組織であるリンパ節、脾臓においても認められ、不活化もされていなかった (Ota et al, Int Immunol, 2004)。トレランスを逃れたDsg3 反応性B細胞が、AK23 mAb 投与により除去されることが明らかとなり、新しいB細胞トレランス機序が存在する可能性が示唆された。実際の自己免疫疾患の自己抗原に対するトレランスメカニズムの解析は、人工的な抗原を使用したトランスジェニックモデルにより得られた結果と異なる可能性が十分あり、自己免疫発症機序の解明に向けて新たな展開を生み出すことが期待される。

### 3) 新規Dsg4 に対する自己免疫応答の発見

18番染色体上に存在するDsg gene cluster の遺伝子解析の結果、既報告の3種のアイスotype (Dsg1, Dsg2, Dsg3) に加え、新たなDsg4 が同定された。天疱瘡患者血清中に、Dsg4 と反応性を示すものがあるが、Dsg4 のみを認識する自己抗体は存在せず、抗Dsg1 抗体の一部がDsg4 と交差反応することが示された。さらに、抗Dsg4/Dsg1 交叉抗体は、直接水疱形成に関与していないことが示された (Nagasaka et al, J Clin Invest 2004)。Dsg4 は主に毛嚢上皮に発現されており、Dsg4 に対する自己免疫応答の存在は、天疱瘡の発症機序を考える上のみならず、自己免疫性脱毛症の病態解明に新たな展開を生んだ。

### 4) 黄色ブドウ球菌・表皮剥奪性毒素 (Exfoliative Toxin, ET) の作用機序の解明

ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) 及び伝染性膿痂疹 (いわゆる“とびひ”) の基本的病態は、1970年に黄色ブドウ球菌の産生するETの同定により明らかにされた。しかし、その後30年間、ETが表皮に水疱を誘導する分子メカニズムは不明であった。我々は、2000年にETのうちETAが、表皮細胞間に重要な役割をするDsg1を特異的に分解するプロテアーゼであることを発見した (Amagai et al, Nature Medicine, 2000)。本研究により、もう一つの血清型であるETBもETAと全く同様の機序で、Dsg1を消化することを確認した (Amagai et al, J Invest Dermatol, 2002)。さらに遺伝子検索により、さらに多くのET遺伝子が存在することが確認され、ETDを同定し、Dsg1の分解活性を確認した。これらのETはすべて、Dsg1のN末より381番目のグルタミン酸の後を切断し、ETの活性中心であるセリンをアラニンに変異させると全く切断活性を失うことを確認した。従って、ETはすべてグルタミン酸特異的セリンプロテアーゼであることが明らかにされた (Hanakawa et al, J Clin Invest, 2002, Hanakawa et al, J Biol Chem, 2004)。

さらに、SSSS罹患後に一過性に抗Dsg1抗体が弱いながらも産生することが示された (Anzai et al, J Invest Dermatol, in press)。感染症により自己抗原が修飾を受け、その結果自己免疫反応が惹起される可能性が示唆され、感染症と自己免疫の新たな接点を提示することができた。これらの観察事項は、自己免疫発症機序を解明する上で有用な知見を供する。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

## 英語論文

- Ohyama M, Amagai M, T. H, Nousari HC, Anhalt GJ, and Nishikawa T: Clinical phenotype and anti-desmoglein autoantibody profile in paraneoplastic pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 44 (4), 593-598, 2001.
- Stanley JR, Nishikawa T, Diaz LA, and Amagai M: Pemphigus: Is there another half of the story? **J Invest Dermatol** 116 (4), 489-490, 2001.
- Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, and Nishikawa T: Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. **J Dermatol Sci** 26 (1), 55-61, 2001.
- Hashimoto T, Komai A, Futei Y, Nishikawa T, and Amagai M: Detection of IgA autoantibodies to desmogleins by an enzyme-linked immunosorbent assay: the presence of new minor subtypes of IgA pemphigus. **Arch Dermatol** 137 (6), 735-738, 2001.
- Komai A, Amagai M, Ishii K, Nishikawa T, Chorzelski T, Matsuo I, and Hashimoto T: The clinical transition between pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris correlates well with the changes in autoantibody profile assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Br J Dermatol** 144 (6), 1177-1182, 2001.
- Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, and Amagai M: Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. **J Immunol** 167 (9), 5439-5448, 2001.
- Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Hata J, Umezawa A, and Nishikawa T: Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 118 (1), 199-204, 2002.
- Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S: Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **Eur J Immunol** 32 (3), 627-633, 2002.
- Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, and Stanley JR: Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. **J Invest Dermatol** 118 (5), 845-850, 2002.
- Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, and Stanley JR: Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 110 (1), 53-60, 2002.
- Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, and Nishikawa T: Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. **Br J Dermatol** 147 (2), 261-265, 2002.
- Amagai M: Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. **Keio J Med** 51 (3), 133-139, 2002.
- Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T: Ultrastructural changes in mice actively producing antibodies to desmoglein 3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. **Arch Dermatol Res** 294 (7), 318-323, 2002.
- Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, and Sugai M: Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect Immun** 70 (10), 5835-5845, 2002.
- Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, and Hashimoto K: Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. **J Invest Dermatol** 119 (6), 1231-1236, 2002.
- Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, and Nishikawa T: BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30 (3), 224-232, 2002.
- Amagai M: Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. **J Am Acad Dermatol** 48 (2), 244-252, 2003.
- Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M: Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol** 170 (4), 2170-2178, 2003.
- Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M: Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: An implication for gene therapy. **J Invest Dermatol** 120 (4), 610-615, 2003.

## ⑨研究成果の発表状況 (続き)

- Hisamatsu Y, Abreu Velez AM, Amagai M, Ogawa MM, Kanzaki T, and Hashimoto T: Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **J Dermatol Sci** 32 (1), 33-41, 2003.
- Ota T, Amagai M, Watanabe M, and Nishikawa T: No involvement of IgG autoantibodies against extracellular domains of desmoglein 2 in paraneoplastic pemphigus or inflammatory bowel diseases. **J Dermatol Sci** 32 (2), 137-141, 2003.
- Nishifuji K, Amagai M, Ota T, Nishikawa T, and Iwasaki T: Cloning of canine desmoglein 3 and immunoreactivity of serum antibodies in human and canine pemphigus vulgaris with its extracellular domains. **J Dermatol Sci** 32 (3), 181-191, 2003.
- Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M, Pieczkowski F, Foedinger D, Kirnbauer R, and Stingl G: 230 kDa and 190 kDa proteins in addition to desmoglein 1 as immunological targets in a subset of pemphigus foliaceus with a combined cell surface and basement membrane zone immune staining pattern. **Exp Dermatol** 12 (5), 646-654, 2003.
- Nishifuji K, Amagai M, Nishikawa T, and Iwasaki T: Production of recombinant extracellular domains of canine desmoglein 1 (Dsg1) by baculovirus expression. **Vet Immunol Immunopathol** 95 (3-4), 177-182, 2003.
- Amagai M: A mouse with an active disease as a model for pemphigus. **Ann Dermatol Venereol** 130 (12), 1176-1179, 2003.
- Futei Y, Amagai M, Hashimoto T, and Nishikawa T: Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 49 (6), 1023-1028, 2003.
- Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Nishifuji K, Amagai M, and Stanley JR: Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. **J Biol Chem** 279 (7), 5268-5277, 2004.
- Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Amagai M, and Nishikawa T: IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. **J Invest Dermatol** 122 (5), 1145-1153, 2004.
- Anzai H, Fujii Y, Nishifuji K, Aoki-Ota M, Ota T, Amagai M, and Nishikawa T: Conformational epitope mapping of antibodies against desmoglein 3 in experimental murine pemphigus vulgaris. **J Dermatol Sci** 35 (2), 133-142, 2004.
- Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T: A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. **Br J Dermatol** 151 (2), 346-354, 2004.
- Ota T, Aoki-Ota M, Tsunoda K, Simoda K, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S: Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. **Int Immunol** 16 (10), 1487-1495, 2004.
- Nagasaka T, Nishifuji K, Ota T, Whittock NV, and Amagai M: Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 114 (10), 1484-1492, 2004.
- Niizeki H, Kumagai S, Kanagawa S, Amagai M, Yamashina Y, Asada H, Nishikawa T, and Miyagawa S: Exclusion of the TAP1 and TAP2 genes within the HLA class II region as candidate susceptibility genes to pemphigus in the Japanese population. **J Dermatol Sci** 36 (2), 122-124, 2004.
- Takahashi H, Anzai H, Suzuki Y, Tanikawa A, Amagai M, and Nishikawa T: Parallel fluctuation of anti-desmoglein 3 and anti-BP180 autoantibody titres in a patient with bullous pemphigoid. **Clin Exp Dermatol** 29 (6), 608-611, 2004.
- Payne AS, Ishii K, Kacir S, Lin C, Li H, Hanakawa Y, Tsunoda K, Amagai M, Stanley JR, and Siegel DL: Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. **J Clin Invest** 115 (4), 888-899, 2005.
- Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, and Amagai M: *In vitro* keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 124 (5), 939-946, 2005.
- Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Saito H, Oka H, Tsunoda K, Amagai M, and Nishikawa T: *In vivo* ultrastructural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosome mid-line. **J Invest Dermatol** 124 (5), 984-989, 2005.

## ⑨研究成果の発表状況（続き）

Yoshida K, Takae Y, Saito H, Oka H, Tanikawa A, Amagai M, and Nishikawa T: Cutaneous type pemphigus vulgaris: a rare clinical phenotype of pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 52 (5), 839-845, 2005.

Fudaba Y, Nishifuji K, Andresenc LO, Yamaguchia T, Komatsuzawa H, Amagai M, and Sugai M: *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein 1. **Microb Pathog** 39 (5), 171-176, 2005.

## 国際学会発表（別紙）

Amagai M: The pathogenic autoantibody response of animal models in pemphigus. **Pemphigus as a model of organ-specific humoral autoimmune diseases**, Bethesda, Maryland, 2001.

Aoki M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Tanaka S, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T: Blockade of CD40/CD40L interaction has therapeutic benefits in the pemphigus vulgaris mouse model. **Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, Los Angeles, USA, 2002.

Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Sugai M, Yamaguchi T, Fudaba Y, Nishifuji K, Amagai M, and Stanley JR: Molecular mechanisms for specific cleavage of desmoglein 1 by exfoliative toxins. **Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, Los Angeles, USA, 2002.

Tsunoda K, Aoki M, Ota T, Nagai T, Yamada T, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M: A pathogenic anti-desmoglein 3 monoclonal antibody recognizes the N-terminal adhesive region of desmoglein 3. **Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, Los Angeles, USA, 2002

Amagai M: Immune response in experimental murine pemphigus. **International Meeting on Bullous Diseases**, Groningen, the Netherlands, 2002.

Amagai M: New concept in acquired bullous diseases (Plenary Lecture). **World Congress of Dermatology**, Paris, France, 2002

Amagai M: Pemphigus: a simple logic behind a complex disease (**SID William Montagna Lecture**). **International Investigative Dermatology 2003**, Miami Beach, Florida, USA, 2003.

Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Shimoda K, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S: Tolerance escape of autoreactive B lymphocytes against desmoglein 3 in transgenic model mice. **International Investigative Dermatology 2003**, Miami Beach, Florida, USA, 2003

Hanakawa Y, Selwood T, Woo D, Lin C, Nishifuji K, Amagai M, Schechter NM, and Stanley JR: Lock and Key: calcium-stabilized conformation of desmoglein 1 is necessary for hydrolysis by staphylococcal exfoliative toxin. **International Investigative Dermatology 2003**, Miami Beach, Florida, USA, 2003.

Amagai M: Is desmoglein 4 an autoimmune target in pemphigus? **Gordon Research Conference : Epithelial Differentiation & Keratinization**, Tilton, NH, USA, 2003

## 特許（国際特許）

国際出願番号: PCT/JPO2/08987 (国際出願日: 2002年9月4日)

出願人: 学校法人慶應義塾

発明者: 角田和之、天谷雅行、西川武二、小安重夫

発明の名称: 天疱瘡モノクローナル抗体 (Pemphigus monoclonal antibody)

国際出願番号: PCT/JPO3/04219 (国際出願日: 2003年4月2日)

出願人: 学校法人 慶應義塾

発明者: 天谷雅行、西川武二

発明の名称: CD40Lアンタゴニストを有効成分とする天疱瘡治療剤 (Remedies for pemphigus containing CD40L antagonist as the active ingredient)

国際出願番号: PCT/JPO3/04765 (国際出願日: 2003年4月15日)

出願人: 学校法人 慶應義塾

発明者: 天谷雅行、西川武二、大山 学

発明の名称: 遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (Drugs to be used in gene therapy for recessively transmitted genetic diseases)