

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成28年4月4日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学医学部附属病院皮膚科
職 名 講師
研究代表者 清水 晶

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 15013)

1. 共同研究課題名	前脛骨型先天性表皮水疱症の発症メカニズム			
2. 共同研究目的	研究期間の短縮とレベルアップのため			
3. 共同研究期間	平成27年4月1日 ～ 平成28年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 清水 晶	附属病院皮膚科	講師	研究立案 遂行	
(分担研究者) 服部麻衣	皮膚科大学院	大学院3年生	研究立案 遂行	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	分子細胞制御	氏 名	徳永文稔

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

1. 293T 細胞に野生型、変異型 VII 型コラーゲンを発現させ、安定発現細胞株を樹立する。
2. 変異型 VII 型コラーゲンの沈着部位を、VII 型コラーゲンと抗 calnexin 抗体(小胞体)、抗 RCAS1 抗体(ゴルジ体)、抗 γ チューブリン抗体(アグリソーム)などと共染色を行い共焦点顕微鏡で同定する。
3. VII 型コラーゲンは 3 量体を形成することから、Native PAGE による検出系を確立する。
4. 変異型 VII 型コラーゲンの産生・分泌をパルスチェイスアッセイで検討する。
5. 培養細胞を温熱などで刺激し、変異型コラーゲン産生に及ぼす影響を明らかにする。

7. 共同研究の成果

1. HEK293 細胞に VII 型コラーゲンをトランスフェクションした後、cell lysate、上清から蛋白を回収し、Western blot で検出する系を確立した。
2. 患者皮膚および培養細胞における VII 型コラーゲン沈着部位の確認。患者皮膚における VII 型コラーゲンと小胞体マーカーであるカルネキシンの免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察したところ、変異型 VII 型コラーゲンの小胞体沈着が確認された。
3. 変異型 VII 型コラーゲン脆弱性の確認。HEK293 細胞に野生型と変異型 VII 型コラーゲンを導入し、細胞内と分泌型 VII 型コラーゲンをペプシンで分解したのち Western blot を行い比較した(limited pepsin digestion)。通常のグリシン置換では 3 量体の形成能が障害されるため、健常に比べより少量のペプシンで消化される。興味深いことに変異体のほうがペプシン分解に抵抗性であった。
4. 変異型 VII 型コラーゲンによる ER stress 応答の証明。変異型 VII 型コラーゲンを HEK293 細胞に導入し、分子シャペロン GRP78/BiP の発現増強を Western blot, RT-PCR で確認した。
5. 外的誘因による変異型 VII 型コラーゲンの細胞質内沈着の誘導。予備実験では、39℃の培養条件で変異型 VII 型コラーゲンの沈着と分泌障害を見出した。変異型 VII 型コラーゲンの輸送小胞への取り込みが障害されている可能性が示唆された。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

分子皮膚科学フォーラム 高知 H27 4

VII型コラーゲン沈着が見られた

優性栄養障害型表皮水疱症(前脛骨型)の1例

服部麻衣¹、清水 晶¹、加藤円香¹、天野博雄¹、山本明美²、中野 創³、澤村大輔³、

亀井 希代子⁴、徳永文稔⁴、石川 治¹

¹群馬大学皮膚科、²旭川医科大学皮膚科、³弘前大学皮膚科、⁴群馬大学生体調節研究所

(太字:本申請に関連する研究者)

An autosomal recessive mutation of DSG4 causes monilethrix through the ER stress response.

Kato M, Shimizu A, Yokoyama Y, Kaira K, Shimomura Y, Ishida-Yamamoto A, Kamei K, Tokunaga F, Ishikawa O.

J Invest Dermatol. 135:1253-60. 2015