

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08329

研究課題名（和文）CD147/basiginを標的とした乾癬の新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment for psoriasis targeting CD147/basigin

研究代表者

金蔵 拓郎（kanekura, takuro）

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70177509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：CD147/basiginが解糖系を介して癌細胞の増殖・浸潤を制御している。さらにTリンパ球の分化と活性化もエネルギーを解糖系に依存しており、我々はT細胞のTh17への分化と増殖の亢進による免疫疾患である乾癬にCD147が関与していることをマウスモデルで明らかにした。CD147はCD4+ T細胞のTh17細胞への分化を促進しており、CD147遺伝子欠損マウスでは乾癬の発症が抑制された。これらの成果をもとにCD147をターゲットとした乾癬の新規治療の開発を目的に本研究を計画した。バーチャルスクリーニングにより解糖系とTh17細胞への分化を抑制しかつ細胞毒性のない化合物を数種類同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬はCD4+ T細胞が種々の因子の刺激によりTh17細胞へ分化しIL-17の産生が亢進することにより発症する。近年使用される生物学的製剤はサイトカインを標的とし、JAK阻害薬やPDE4阻害薬はサイトカイン産生を抑制する。CD147/basiginを標的とする治療はCD4+ T細胞のサイトカイン産生細胞への分化を抑制することを目的としており、従来の治療とは全く異なるより根本的な治療である。乾癬の治療は日進月歩の観を呈している。しかし本症は難治性皮膚疾患であり未だに完治しない症例が少なくない。この研究成果は新たな治療法の開発に結びつく可能性が高く社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that CD147/basigin regulates cancer cell proliferation and invasion through the glycolytic pathway. Recent studies showed that differentiation and activation of T lymphocytes also depend on glycolysis for energy. We revealed that CD147 is involved in the development of psoriasis, an immunological disease caused by abnormal differentiation and proliferation of T cells. CD147 promotes the differentiation of naive T cells into Th17 cells which play the pivotal role in psoriasis. The development of experimental psoriasis was suppressed in the mice deficient in CD147 gene. Based on these findings, we planned this research with the aim of developing a new treatment for psoriasis that inhibits glycolysis targeting CD147. In silico virtual screening resulted in a list of 183 candidate compounds. Among these compounds, we identified several compounds that inhibit the differentiation of CD4+ T cells into Th17 cells through suppression of glycolysis and are not cytotoxic.

研究分野：皮膚科学

キーワード：CD147/Basigin 乾癬 T細胞分化 Th17細胞 モノカルボン酸トランスポータ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の細胞は生理的環境下ではミトコンドリアによる酸化的リン酸化により ATP を産生するが、有酸素下でも代謝系が酸化的リン酸化から解糖系にシフトする場合がある。解糖系に依存する主な細胞は、急速な増殖などの細胞活動のためエネルギーを要する腫瘍細胞と、外来抗原に対して迅速に活性化して反応することが求められる T 細胞などの免疫細胞である。解糖系では細胞膜トランスポーターであるグルコーストランスポーター (glucose transporter; GLUT) ファミリーの分子により取り込まれたグルコースを基質として ATP とピルビン酸が産生され、ピルビン酸は乳酸 (lactate) に代謝される。産生された乳酸はモノカルボン酸トランスポーター (monocarboxylate transporter; MCT) により細胞外に輸送される。

がん細胞では解糖系により細胞外の乳酸濃度が上昇する結果、微小環境は酸性に傾き細胞の増殖、浸潤、腫瘍血管新生が促される。この現象は癌細胞の代謝に関するセントラルドグマであり、Warburg らが 1950 年代に解明し好氣的解糖 (Warburg 効果) と称される。

T 細胞は主に Th 細胞と Tc 細胞より成る。それぞれ抗原提示細胞の MHC クラス II 分子、標的細胞の MHC クラス I 分子に提示される抗原を認識すると活性化し、エフェクター T 細胞へと分化し増殖する。このように T 細胞が活性化する際にはエネルギーを補充するため代謝系は酸化的リン酸化の状態から解糖系にシフトし、MCT1/4 の発現が誘導される。

CD147/basigin は、細胞の分化や浸潤に重要な役割を果たす糖鎖抗原である Lewis X の担体タンパクをコードする遺伝子として申請者がクローニングした分子である。CD147/basigin は MCT と複合体を形成し MCT の細胞膜への正常な発現を介して乳酸の輸送に重要な役割を果たしていることが報告された。申請者らはこれらの報告をもとに皮膚悪性黒色腫において CD147/basigin が Warburg 効果に深く関与していることを解明し報告した。

次いで乾癬の病態形成における CD147/basigin の関与を検討し以下の事実を明らかにした。

- ・乾癬患者の血清 CD147/basigin レベルが有意に亢進している。
- ・乾癬患者の病変部の真皮 CD3⁺T 細胞と CD4⁺ROR γ ⁺ Th17 細胞における CD147/basigin の発現が亢進している。
- ・病変部 CD4⁺ROR γ ⁺ Th17 細胞における CD147/basigin と MCT1 の発現量は有意に相関する。
- ・CD147/basigin ノックアウトマウスから分離した naïve CD4⁺T 細胞は、IL-6 と TGF- β による Th17 への分化能が低下している。
- ・CD147/basigin ノックアウトマウスではイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の症状が野生型マウスと比較して有意に軽微である。

これらの事実は CD147/basigin が MCT1 と共働して Th17 細胞の分化を促進し乾癬の病態形成に関与していることを示しており、CD147/basigin を標的とした新たな乾癬治療の可能性を期待させるものである。以上の背景を踏まえて本研究を計画した。

2. 研究の目的

申請者らは CD147/basigin が解糖系の制御を介して CD4⁺T 細胞の Th17 細胞への分化を誘導し、乾癬の病態形成に関与していることを明らかにした。本研究では CD147/basigin の機能を阻害する物質を探索し、候補物質が乾癬発症に対する抑制効果を有するかを明らかにする。

CD147/basigin は MCT と複合体を形成し MCT を細胞膜に正常に発現させることで解糖系を制御している。申請者らは腫瘍細胞では細胞膜に MCT が発現しており、siRNA を用いて CD147/basigin をノックダウンすると MCT の膜発現も消失し、解糖系が抑制され ATP 産生が低下することを示

した。従って本研究では CD147/basigin と MCT の複合体の活性を阻害する化合物を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

CD147/basigin と MCT の複合体の活性を阻害する物質を探索し、候補物質のイミキモドによる乾癬様皮膚炎に対する抑制効果を評価する。

初年度は CD147/basigin の結晶構造解析データと MCT1, 4 のタンパク質の CD147/basigin と結合しない MCT2 の構造の特異性について特に過去のデータから結合に重要と考えられる細胞膜と細胞質内部にいて結合部位を予想する。次に両者の複合体構造モデルを複数構築し結合阻害に適した相互作用部位を絞り込む。さらに、予想される双方の結合部位について、それぞれのタンパク質について *in silico* バーチャルスクリーニングで候補を探索し、結合部位の情報と低分子の構造から双方に結合する可能性の低分子化合物を絞り込むまた複合的低分子のデザインを試行する。

In silico バーチャルスクリーニングは AMED 生命科学・創薬研究支援基盤事業である創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援を受けた。ここで得られた化合物から以下の方法で創薬の可能性のある化合物をスクリーニングする。

1 次スクリーニング

Human Jurkat T リンパ腫細胞を用いて、Lactate Assay Kit-WST (同仁化学研究所) でスクリーニングする。申請者らは過去に Jurkat 細胞では CD147 の発現が亢進していること、CD147 の発現を siRNA でノックダウンすると増殖・浸潤能が抑制されることを報告している。

Jurkat 細胞を培養し培養上清中の lactate 濃度を抑制する物質をスクリーニングする。Jurkat 細胞は申請者らの研究室で保有している。

ヒットした化合物の細胞毒性を正常ケラチノサイトである HaCaT 細胞を用いて MTT 法でアッセイする。

2 次スクリーニング

1 次スクリーニングのヒット化合物の優先順位をつける。ヒット化合物の希釈系列を作成し lactate assay で IC50 値を求める。

In vitro の培養系で CD4⁺T 細胞を IL-6 と TGF- β で Th17 へ分化誘導し、候補化合物の分化抑制能をモニターする。

マウスの皮膚にイミキモドを外用すると乾癬様の皮疹が誘発される。この皮膚炎は乾癬のマウスモデルとして受容されている。イミキモド誘発乾癬モデルを用いて in vivo で皮膚炎の発症抑制効果を評価する。

1) 乾癬モデルの作製

イミキモド塗布により得られる乾癬モデルを作製して検討する。C57BL/6 マウスの背部を剃毛し、62.5g の 5% イミキモドクリームを 5 ないし 6 日連日塗布し乾癬様皮疹を誘発する。この病変は乾癬の動物モデルとして受容されている。

2) 乾癬モデルにおける候補化合物の有効性の検討

マウスを治療群と対照群の 2 群に分け、治療群にはイミキモドクリームと同時に候補化合物

を外用し、両群間で以下の項目を比較検討する。

- ・ PASI (psoriasis area and severity index)スコア
- ・ 病理所見
- ・ 真皮に浸潤している炎症細胞数、および Th17 細胞数
- ・ 末梢血 Th 細胞における IL-17 の発現量。FACS, フローサイトメトリーで測定する。

3) 被験薬の全身に及ぼす影響の検討

被験薬を外用したマウスの薬剤の血中濃度をモニターする。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を利用する予定である。

以上の実験系の結果を総合し、CD147/basigin と MCT の複合体の活性を阻害する物質の治療薬としての可能性を検討する。

4. 研究の成果

(1) *In silico* パーチャルスクリーニング

BINDS から 183 種類の化合物の提供を受けた。BINDS を共同運営している理研から 10 種類の化合物の提供を受けた。

(2) 1次スクリーニング

上記の 193 種類の化合物について lactate の細胞外への輸送の阻害率と、正常ケラチノサイトに対する細胞毒性を検討した。その結果阻害率が高く細胞毒性の低い化合物 8 種類が同定された (図 1)。

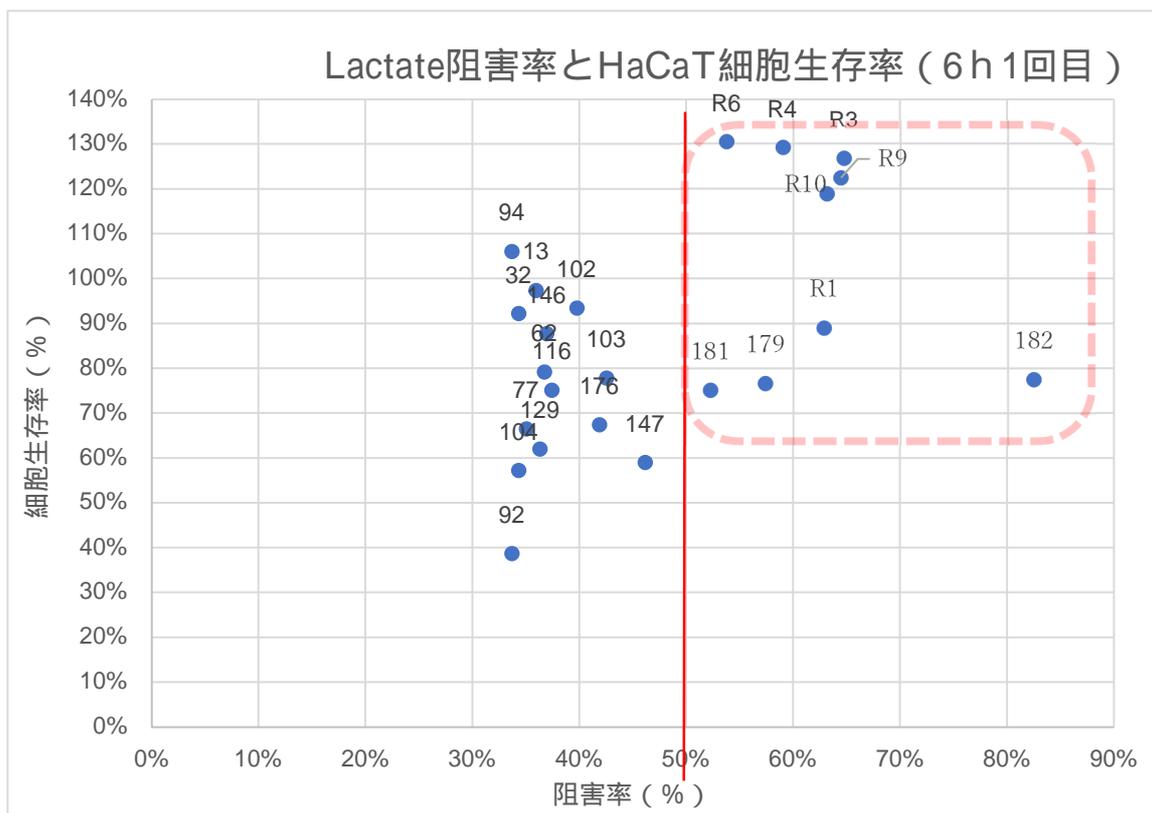


図 1

(3) 2次スクリーニング

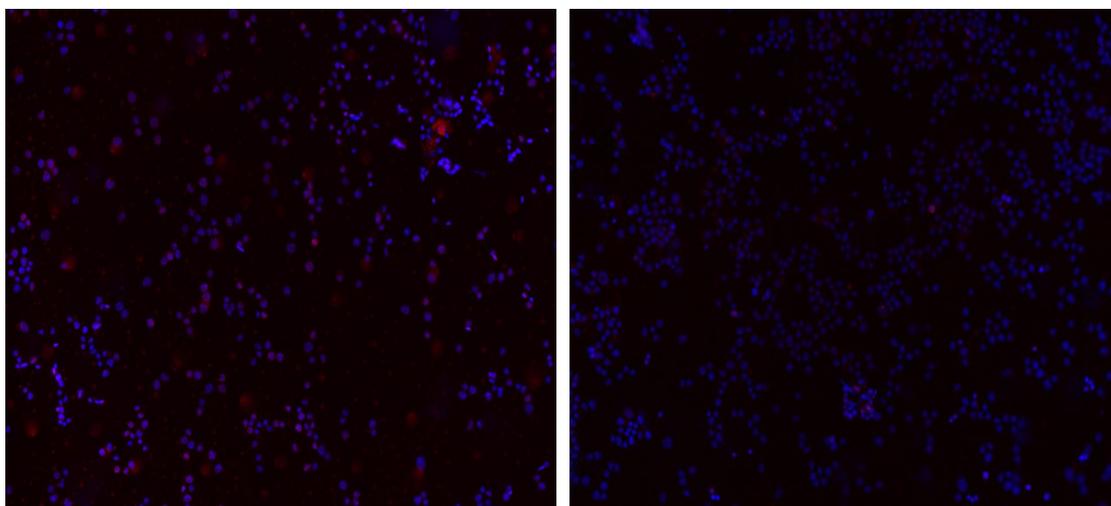
上記8種類の化合物のうち5種類について *in vitro* の2次スクリーニングを行なった。提供された試料が少量であった3種類については今後検討する。5種類のうち3種類が Th17 細胞への分化を抑制した(図2)。

マウスモデルを用いたスクリーニングを試みたが化合物が基剤に溶解しなかった。現在、皮膚に効果的に浸透する外用剤にするため調整法を検討中である。

本研究で193種類の化合物から解糖系の抑制を介して CD4⁺ T 細胞の Th17 細胞への分化を阻害し、かつ細胞毒性のない化合物を3種類同定した。今後マウスを用いたスクリーニングを進める予定である。

Control

R10



Red: ROR γ t

図2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Higashi Y, Ibusuki A, Baba N, Hatanaka M, Tada KI, Kanekura T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis for Pyoderma Gangrenosum.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ther Apher Dial	6. 最初と最後の頁 450-455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1744-9987.13720.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kondo K, Harada Y, Nakano M, Suzuki T, Fukushige T, Hanzawa K, Yagi H, Takagi K, Mizuno K, Miyamoto Y, Taniguchi N, Kato K, Kanekura T, Dohmae N, Machida K, Maruyama I, Inoue H.	4. 巻 298
2. 論文標題 Identification of distinct N-glycosylation patterns on extracellular vesicles from small-cell and non-small-cell lung cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 101950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101950.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 4.Yamasuji-Maeda Y, Nishimori H, Seike K, Yamamoto A, Fujiwara H, Kuroi T, Saeki K, Fujinaga H, Okamoto S, Matsuoka K, Fujii N, Tanaka T, Fujii M, Mominoki K, Kanekura T, Maeda Y.	4. 巻 17
2. 論文標題 Prevention of non-infectious pulmonary complications after intra-bone marrow stem cell transplantation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0273749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0273749.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Uchida Y, Gherardini J, Pappelbaum K, Cheret J, Schulte-Mecklenbeck A, Gross C, Strbo N, Gilhar A, Kanekura T,	4. 巻 124
2. 論文標題 Resident human dermal T-cells operate as stress-sentinels: Lessons from the hair follicle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Autoimmun	6. 最初と最後の頁 102711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaut.2021.102711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okubo A, Uchida Y, Higashi Y, Sato T, Ogawa Y, Ryuge A, Kadomatsu K, Kanekura T.	4. 巻 23
2. 論文標題 CD147 is essential for the development of psoriasis via the induction of Th17 cells differentiation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii K, Idogawa M, Suzuki N, Iwatsuki K, Kanekura T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Functional depletion of HSP72 by siRNA and quercetin enhances vorinostat-induced apoptosis in HSP72-overexpressing cutaneous T-cell lymphoma cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 11258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222011258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Deng Q, Zou P, Shi Y, Chen P, Pi Z, Xiao Y, Kanekura T, Zeng Q, Zhan Y, Xiao R.	4. 巻 114
2. 論文標題 Overexpressed perforin contributes to the melanocyte destruction via epigenetic regulation in patients with vitiligo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol .	6. 最初と最後の頁 109574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2022.109574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashi Y, Yamakuchi M, Ibusuki A, Okubo A, Fukushige T, Hashiguchi T, Kanekura T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Neutrophil-Derived MicroRNA-1290 Promotes Keratinocyte Proliferation in Psoriasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol .	6. 最初と最後の頁 3209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2023.10.042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanekura T.	4. 巻 24
2. 論文標題 CD147/Basigin is involved in the development of malignant tumors and T cell-mediated immunological disorders via regulation of glycolysis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 17344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242417344.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawabata Y, Fukushige T, Indo HP, Matsumoto K, Ueno M, Nakanishi I, Chatatikun M, Klangbud WK, Surinkaew S, Tangpong J, Kanekura T, Majima H.	4. 巻 201
2. 論文標題 Hair follicle damage by 100-mGy low-dose fractionated X-irradiation and protective effects of TEMPOL, a stable nitroxide radical, against irradiation.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Radiat Res .	6. 最初と最後の頁 115-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-23-00167.1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko T, Oura A, Kusumoto-Yoshida I, Kanekura T, Okuno H, Kuwaki T, Kashiwadani H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Orexin neurons play contrasting roles in itch and pain neural processing via projecting to the periaqueductal gray.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Commun Biol .	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-05997-x.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古川 龍彦 (Furukawa Tatsuhiko) (40219100)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------