

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461220

研究課題名(和文) CD147による腎エネルギー代謝機構の解明と臓器相関に対する治療法の探究

研究課題名(英文) Elucidation of CD147-mediated mechanism in renal energy metabolism

研究代表者

小杉 智規 (Kosugi, Tomoki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90584681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通型糖蛋白質・CD147/Basiginは、細胞の生存や浸潤・転移に重要な役割を果たす。しかし、糖尿病や肝・腎機能障害を呈するメタボリック症候群についてCD147を含む分子機構は明確に解明されていない。CD147はMonocarboxylate transporterのシャペロンとして乳酸代謝に促進し、細胞内エネルギー代謝・ATP産生に大きな影響を及ぼす。今回の動物実験において、過剰な糖・脂質・尿酸の細胞内蓄積による酸化ストレスはCD147を誘導・負のサイクルを形成する事によって相乗的な臓器障害を惹起する事が示された。CD147を治療標的とする応用は肥満関連性腎・肝機能障害に広がる。

研究成果の概要(英文)：CD147/Basigin, a glycosylated transmembrane protein, plays important roles of cell survival, invasion and metastasis. With regard to metabolic syndrome involving diabetes mellitus, kidney and liver dysfunction, however, the molecular mechanism involving CD147 remains unknown. CD 147 promotes lactate metabolism as a chaperone of Monocarboxylate transporter, and exerts a great influence on intracellular energy metabolism/ATP production. Oxidative stress caused by excessive intracellular accumulation of sugar, lipid and uric acid induces synergistic organ dysfunction by inducing CD 147 leading to the formation of a negative cycle. Therefore, the attention has become extended to obesity-related renal and liver dysfunction.

研究分野：腎臓領域

キーワード：CD147 メタボリック症候群 ATP産生 高脂肪食 脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

近年、過食に伴う肥満症は慢性腎臓病 (CKD) の進展に関連する有意な危険因子であり、高血圧や糖尿病と独立し CKD と関連を示す。一連の過程では、糖・脂質・尿酸代謝障害を示すメタボリック症候群 (MetS) から糖尿病、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、CKD 等の多臓器障害を段階的に示す。これまで、インスリン抵抗性やアディポサイトカイン分泌異常の関与が指摘されているが、炎症細胞やサイトカインによる慢性炎症の関与も強く提唱されている。今後も CKD と肥満症の増加は予想され、複雑なその機序解明は急務である。

Immunoglobulin superfamily に属し、Basigin や EMMPRIN という別称を持つ CD147 は、心臓・赤血球・炎症細胞等に臓器特異的な糖鎖を持つ糖タンパク質として存在し、血管新生・腫瘍臓器の浸潤と転移への関与は広く報告されている。また、CD147 は Monocarboxylate transporter (MCT) のシャペロンとして乳酸代謝に促進し、細胞内エネルギー代謝・ATP 産生に大きな影響を及ぼす。

2. 研究の目的

これまでに、我々は CD147 が腎臓では腎皮髄境界より皮質の尿細管間質細胞に豊富に存在し、炎症細胞の遊走や T リンパ球の分化制御を介して腎炎の進展に寄与する事を証明してきたが、腎・代謝領域における CD147 の知見は極めて少ない。我々は、1) 腎尿細管に豊富に発現する CD147 が ATP 産生亢進により糖・脂質・尿酸代謝の再吸収・輸送を促進する、2) 酸化ストレスにより尿細管細胞の CD147 発現は増加し、慢性炎症機構を活性化する、という知見を得ている。以上から過剰な糖・脂質・尿酸の細胞内蓄積による酸化ストレスは CD147 を誘導・負のサイクルを形成する事によって相乗的な臓器障害を惹起する事が推測される。本研究では現在までの知見を更に進め、「CD147 による腎エネルギー

代謝機構の解明と臓器相関に対する治療法の探究」を主眼とする。

3. 研究の方法

本研究では、先の研究目的を達成するために CD147 遺伝子改変マウス (CD147KO) に高脂肪・糖質負荷モデルを作製し、CD147 の役割について検証をおこなう。

- (1) CD147 KO マウスと野生型マウスを利用して、ヒト・メタボリック症候群と類似する病態と推測される高脂肪・糖質負荷モデルを作成する。CD147 が糸球体・尿細管病変、血管内皮障害を誘導する事を病理学的、生化学的手法を用いて証明し、ATP 産生能や Glucose・脂質・尿酸代謝との関連を含めて検討する。
- (2) メタボローム解析により CD147 は心・腎・肝臓において G6P や F6P など解糖系の主要代謝産物やグルタミンやセリンなどアミノ酸に著明な変化を与える Preliminary data を有している。心・腎・肝臓はそれぞれ、その働きや特色に応じて解糖系を始めとする生化学反応経路からの代謝産物や ATP 産生の形態が異なる。CD147KO や野生型マウスの両者について糖質・脂質・尿酸・エネルギー中間産物の動的解析を網羅的におこなう。これらの知見を更に統計学的に動的な追跡調査を行う事により糖質・脂質・尿酸・エネルギー代謝における CD147 の関与を分子生物学的に検証する。血清・内臓脂肪に対する各種アディポサイトカインの検索では、Protein array により慢性炎症に関連する Leptin・IL6・TNF- α ・IFN- γ などの発現を検討し、仮説の検証につなげる。
- (3) 乳酸代謝・ATP 産生亢進や尿細管での乳酸を介した尿酸の再吸収機構への CD147 の関与を検証するために、CD147KO や野生型マウス由来の初代尿

細管培養細胞を用いて詳細な分子機構の解明を目指す。

- (4) 細胞内過剰蓄積に伴う CD147 産生機序と慢性炎症機構の解明を目的として、CD147 が調整する慢性炎症を介した臓器障害に T リンパ球を中心とした免疫恒常性の維持について検討を行う。

4. 研究成果

- (1) 高脂肪食を負荷した野生型マウスと CD147KO を比較検討したところ、CD147KO において遊離脂肪酸・尿酸・血糖の上昇が有意に抑制されており、腎機能についても保護的に作用していることが判明した。更に、肝細胞における脂肪滴の蓄積は CD147KO で抑制されており、腎機能と同様に肝機能も CD147 欠損が保護的に働いていた。病理組織学的にも以上の結果を支持する結果を示しており、炎症系細胞の組織浸潤も CD147KO において抑止されていた。電子顕微鏡にて尿細管細胞を精査したところ、リポフスチン様物質の蓄積を示す wheel-like な物質が野生型マウスに有意に増加していた。これらは脂質・過酸化物質の再吸収によって生じたものであり、尿細管細胞障害を誘導する原因物質である可能性が示唆された。
- (2) メタボローム解析を施行し、CD147 は心・腎・肝臓において G6P や F6P など解糖系の主要代謝産物やグルタミンやセリンなどアミノ酸に有意な変化を与えていた。しかし、生体内で大きな ATP 産生能を有する TCA サイクルについては中間代謝産物へ影響を与えていなかった。電子伝達系については NADH⁺等の評価は本手法では不十分であり、さらなる検証のためにミトコンドリア機能や脂肪負荷についての障害を検証する

ために、後の初代培養細胞を用いた検証への課題とした。

更に、Protein array を用いた検証を In vivo 研究で施行し、慢性炎症に関与する Leptin・IL6・TNF- α ・IFN- γ などの発現は CD147KO で有意に抑制もしくはその傾向を認めた。併せて、糖代謝に強く関与し、抑制により血糖コントロールの薬剤としても汎用されている DPP4 にも影響があることが判明した。尿細管における糖質の再吸収機構や肝臓における糖の取り込みについて更に検討を加える必要性が生じ、次年度より採用された新たな基盤研究における課題となった。

- (3) 以前より採取・培養可能であった尿細管細胞に加え、新たに肝細胞における初代培養細胞手法をえた。野生型由来及び CD147KO マウス由来の尿細管及び肝細胞を用いて、アルブミンと結合させた過酸化脂質、あるいは影響を与えると報告されているパルミチン酸を用いた負荷実験を行なった。

実験動物を用いた腎臓における結果は CD147 が過酸化脂質をはじめとした過剰物質を尿細管に再吸収促進したにより生じた Autophagy 機構の破綻が原因と考えられた。p62, Sirt1をはじめとした Autophagy 障害を示すマーカーの結果はいずれも野生型における Autophagy 障害を指し示した。今後、更に肝細胞初代培養細胞を用いて、CD147 関連の Autophagy 機構、ミトコンドリア機能障害に伴う ATP depletion の分子メカニズムの解明を目指し検証を進める。また、CD147 のアポトーシスへの関与についても検証を行ったが、現時点では直接的な関与を示す証拠を得ていない。

- (4) 実験動物において、CD147KO における

脾臓は野生型マウスに比して、健全な状態でも腫大し、脾臓細胞数の増加が確認された。また、B細胞・T細胞とその分画について健全状態では有意な変化を認めなかった。しかし、高脂肪食を負荷した CD147KO では CD3⁺CD4⁺細胞分画の増加が抑制されており、T細胞系の免疫恒常性に影響を与え、慢性炎症を呈する可能性が示唆されている。今後更に、検証を加え、脂肪肝形成にも関与する多様な STAT 経路の活性化について検証を加えることとする。

以上より、CD147 の制御は糖尿病や脂質代謝異常症に伴う腎臓・肝臓を中心とした多臓器障害を抑止しうる可能性が示唆される。さらなる検証を進めることによって選択的な抑止機構の解明を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) CD147/Basigin limits lupus nephritis and TH 17 cell differentiation by inhibiting the IL-6/STAT3 pathway.

Maeda K, Kosugi T, Sato W, Kojima H, Sato Y, Kamimura D, Kato N, Tsuboi N, Yuzawa Y, Matsuo S, Murakami M, Maruyama S,

Arthritis Rheum 2015, 67(8); 2185-95 (査読有)

(2) CD147 (EMMPRIN/Basigin) in kidney diseases: from an inflammation and immune system viewpoint.

Kosugi T, Maeda K, Sato W, Maruyama S, Kadomatsu K.

Nephrol Dial Transplant 2015, 30(7),1097-1103 (査読有)

(3) Plasma CD147 reflects histological features in patients with lupus nephritis.

Maeda-Hori M, Kosugi T, Kojima H, Sato W, Inaba S, Maeda K, Nagaya H, Sato Y, Ishimoto T, Ozaki T, Tsuboi N, Muro Y, Yuzawa Y, Imai E, Johnson RJ, Matsuo S, Kadomatsu K, Maruyama S.

Lupus 2014, 23(4); 342-52 (査読有)

〔学会発表〕(計10件)

(1) CD147/Basigin Deficiency Prevents the Development of Podocyte Injury Through the Integrin/FAK Signaling Pathway.

Tomoki Yoshioka, Tomoki Kosugi, Kayaho Maeda, Tomohiro Masuda, Yuka Sato, Hiroshi Kojima, Noritoshi Kato, Takuji Ishimoto, Shoichi Maruyama. American Society of Nephrology Annual Meeting 2016 (Chicago, USA) 2016/11/17-20

(2) 尿蛋白出現機序における

CD147/Basigin の役割

吉岡知輝、小杉智規、森佳子、前田佳哉輔、門松健治、松尾清一、丸山彰一 第59回日本腎臓学会学術総会(パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市))

2016/6/17~19

(3) The role of basigin in the development of proteinuria.

Tomoki Yoshioka, Tomoki Kosugi, Yoshiko Mori, Kayaho Maeda, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama

53RD ERA-EDTA CONGRESS, 2016 (Vienna, Austria) 2016/5/21-24

(4) CD147 accelerates

tubulointerstitial injury and liver dysfunction in high-fat diet.

Yoshiko Mori, Tomoki Kosugi, Tomoki Yoshioka, Takahiro Hayasaki, Kayaho Maeda, Noritoshi Kato, Takuji Ishimoto, Seiichi Matsuo, Shoichi

- Maruyama.
53RD ERA-EDTA CONGRESS, 2016 (Vienna, Austria) 2016/5/21-24
- (5) 腎疾患活動性マーカーとしての CD147 の有用性の検討
小杉智規、吉岡知輝、増田智広、前田佳哉輔、加藤規利、石本卓嗣、坪井直毅、松尾清一、丸山彰一
第 60 回日本透析医学会学術総会・集会
第 59 回日本腎臓学会学術総会(パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市))
2015/6/26 ~ 28
- (6) CD147/basigin は急性期の腎機能障害を反映する
小杉智規、長屋啓、前田佳哉輔、増田智広、加藤規利、石本卓嗣、坪井直毅、松尾清一、丸山彰一
第 60 回日本透析医学会学術総会・集会
第 59 回日本腎臓学会学術総会(パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市))
2015/6/26 ~ 28
- (7) 腎疾患活動性マーカーとしての CD147 の有用性の検討
吉岡知輝、小杉智規、森佳子、増田智広、前田佳哉輔、松尾清一、丸山彰一
第 58 回日本腎臓学会学術総会(名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市))
2015/6/5 ~ 7
- (8) CD147 は IL-17 産生 T 細胞の分化を制御し、実験ループス腎炎の病勢を抑制する
前田佳哉輔、小杉智規、増田智広、佐藤由香、坪井直毅、佐藤和一、松尾清一、丸山 彰一
第 58 回日本腎臓学会学術総会(名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市))
2015/6/5 ~ 7
- (9) Plasma CD147/Basigin as a Promising Biomarker of the Kidney Diseases
Kayaho Maeda, Tomoki Kosugi, Hiroshi

- Kojima, Tomohiro Masuda, Noritoshi Kato, Waichi Sato
American Society of Nephrology Annual Meeting (Philadelphia, USA)
2014/11/11-16
- (10) CD147/basigin は急性期の腎機能障害を反映する
長屋 啓、小杉 智規、小島 博、前田 佳哉輔、加藤 規利、石本 卓嗣、飯田 喜康、佐藤 和一、松尾 清一、丸山 彰一
第 57 回日本腎臓学会学術総会第 59 回日本腎臓学会学術総会 (パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)) 2014/7/4 ~ 6

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小杉 智規 (Kosugi, Tomoki)
名古屋大学・医学府附属病院・講師
研究者番号 : 90584681

(2)研究分担者

丸山 彰一 (Maruyama, Shoichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 10362253

林 宏樹 (Hayashi, Hiroki)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号 : 10378086

佐藤 和一 (Sato, Waichi)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号 : 90508920