

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591188

研究課題名(和文)慢性腎臓病におけるCD147の機能解析と新たなCKD治療戦略の確立

研究課題名(英文)The new therapeutic strategy for Chronic Kidney Disease involving CD147/Basigin

研究代表者

小杉 智規 (KOSUGI, TOMOKI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90584681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000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、糖尿病や自己免疫性疾患にてCD147を含む分子機構は解明されていない。本研究においてCD147は活性化制御性T細胞(Treg)の誘導に関与する事を明らかにした。更に、IL17産生性T細胞(Th17)やTregはループス腎炎(LN)において重要な役割をはたしており、CD147の欠損はSTAT3活性化を介してTh17の分化を促進し、LNを増悪させる事を示した。一方、CD147は炎症細胞浸潤の促進を介して糖尿病性腎症による組織炎症にも関与していた。この検証は今後の腎疾患の抑止につながる。

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 diabetes and autoimmune diseases, however, the molecular mechanism involving CD147 remains unknown. As CD147 identifies activated regulatory T cell (Treg), the attention has become extended to the autoimmune diseases. Interleukin (IL)-17 producing T cell and Treg also serve important roles in the pathogenesis of SLE. In the present study, lack of CD147 promotes Th17 differentiation through the STAT3 activation, eventually leading to the development of lupus nephritis. On the other hand, CD147 play deleterious effects in renal inflammation caused by ischemia and renal fibrosis through the enhanced infiltration of inflammatory cells. Diabetes is also influenced by CD147 in renal inflammation. Our results may shed light on the mechanisms underlying the pathogenesis of diabetes nephropathy and lupus nephritis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：CD147/Basigin ループス腎炎 糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

近年、増加の一途をたどる透析導入患者の原疾患の中心は、糖尿病性腎症を始めとする慢性腎臓病 (CKD) であり、その増加と共に今後も末期腎不全患者数は大幅な増加が予想される。なかでも、多くの要因が複雑に関与する糖尿病や自己免疫疾患による腎症の発症、その進展起序解明は急務である。

両者は、炎症系細胞浸潤を伴う微小血管内皮障害を引き起こす特徴を持ち、その治療標的の探求は必須の課題である。

我々は、これまでに Anti-angiogenic therapy や既存の降圧療法を通して、進行性糖尿病性腎症や CKD の進行起序および新たな治療戦略の確立を目指してきた。

しかし、いずれも CKD の著明な改善もしくは進行阻止に至らず、更なる追求が不可欠であった。今回、CKD 増悪における重要な因子として CD147 に着目する。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。

2. 研究の目的

腎臓領域における知見や応用は極めて少ない。我々は、既に 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、炎症系細胞の遊走を誘導する事によって急性腎障害を呈する腎虚血再灌流モデルにおいて腎尿細管間質障害を引き起こす事、MMP Family を誘導し腎線維化を促進する事を証明している。現在、CD147 が制御すると考えられる VEGF receptor 2 の誘導が腎糸球体硬化、間質障害を促す結果を得ている。そこで、本研究では現在までの知見を更に進めて、CD147 の遺伝子改変マウスを利用し、「慢性腎臓病 (CKD) における CD147 の機能解析と新たな CKD 治療戦略の確立」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糖尿病モデルマウスと自己免疫性疾患・ループス腎炎モデルマウスを作製し、CD147 の役割について検証をおこなう。

(1) CD147 KO mice と膵・細胞特異的カルモジュリン過剰発現マウスを利用して、ヒト糖尿病性腎症類似病変を有するマウスモデルを作成する。CD147 が糸球体病変、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 代謝との関連を含めて検討する。

(2) 糖尿病性腎症実験 に関連して野生型および CD147 KO mice から膵細胞を単離し、それらを用いて CD147 と ATP 感受性 K チャンネルを中心としたインスリン分泌機構との関連を検証する。

(3) CD147 KO mice に Lupus 腎炎モデルを作製し、CD147 の存在が免疫機構の統制に関与し、炎症系細胞を誘導する事によって自己免疫性疾患における腎障害を引き起こす事を証明する。更に、抗 CD147 抗体を利用して、CD147 が治療標的となりうるか治療実験を行う。

4. 研究成果

(1) カルモジュリン過剰産生マウスと CD147 KO mice の自然交配をおこなうが、CD147 は雄性・雌性不妊であるため両者の遺伝子制御マウスを作製する事は極めて困難であった。eNOS 遺伝子欠損マウスとの交配についても同様に困難であったため、CD147 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに Streptozotocin (STZ) の腹腔内投与を計 5 回行い、人為的に膵臓細胞を破壊し、I 型インスリン依存性糖尿病モデルマウスを作製し、CD147 の役割について検証をおこなった。STZ 投与後 1 週間での糖尿病状態 (随時血糖 250mg/dl 以上) を CD147 遺伝子欠損マウスおよびその野生型マウスに確認し、その程度については両者に有意な差を認

めなかった。病理組織学的に、腎メサンギウム細胞の増加に有意な差を認めないもののメサンギウム細胞増殖には有意な差を認め、仮説のとおり野生型マウスにて腎障害の程度は強度であった。しかし、その誘因について、酸化ストレスやアポトーシスについて検索を重ねたが、間接的な関連は推定されるものの、直接的な誘因と考えられるものを特定できなかった。そのため、更に今後の検討として糖質だけでなく脂質や尿酸などの他のメタボリックシンドローム関連因子についても高脂質・高糖質負荷モデルを作製する事によって検証をおこなう事とし、次年度からの基盤研究Cの課題として開始した。

- (2) In vitro 研究として、膵臓 細胞を単離し、高血糖負荷時の事象に検証をおこなった。ATP 産生について野生型由来細胞はCD147 遺伝子欠損マウスに比して産生低下を認めており、現在も継続してその事象のメカニズムを検討中であるが、(1)についてのモデルマウス変更に伴い、更に In vitro 研究についても高脂質を追加した際の事象検証を次年度からの基盤研究Cの課題として継続している。
- (3) 自己免疫性疾患動物実験モデル・ループス腎炎をプリスタンによって作製し、CD147 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの腎炎障害度を検証した。両群共に、抗核抗体は上昇を認め両者に有意な差を認めなかった。当初はこれまでの知見によりマクロファージや好中球遊走・浸潤がセレクチンなどの分子を介し、野生型に有意にみられるため野生型マウスに組織障害度が強いと推定していた。しかし、予想に反し、CD147 遺伝子欠損マウスにおいて、特に糸球体における障害は免疫複合体の沈着や係締壁の Wire loop lesion などのループス腎炎に頻繁にみ

られる所見を PAS 染色に認めた。更に、蛍光抗体法を用いた免疫染色においても IgG や補体 C3・C1q の沈着は PAS 染色に一致して CD147 欠損マウスに有意に増加していた。腎機能を示す血清 Cre 値・血清補体 C3 値・尿タンパク量もまた、CD147 欠損マウスにて有意にループス腎炎進行に合致した所見を得ている。興味深い事に抗 DNA 抗体や抗 dsDNA 抗体は組織障害度に準じて傾向は認めるものの有意な差を認めず、B 細胞等などによる抗体産生経路に CD147 が影響を与える可能性は低いと考えた。

そのため、T リンパ球について検証をおこなった。プリスタン投与によって野生型における CD4 陽性 T リンパ球はループス腎炎非発症のコントロール群よりも著明に増加し、CD147 陽性細胞も同様に有意な増加を認めた。本研究におけるプリスタン投与に伴うループス腎炎マウスでは Th1・Th2・制御性 T 細胞 (Treg) はプリスタン非投与のコントロールマウスと比して有意な差を認めなかったが、IL17 産生性 T 細胞 (Th17) の Population は有意な増加を認めた。以上から、Th17 に注目して検証を進めた。ループス腎炎発症 6 ヶ月後の CD147 欠損マウスおよび野生型マウスにおいて Th17 の population は野生型マウスで有意に抑制されていた。Th1 や Treg といった他の分画に有意差は認めなかった。マクロファージや T リンパ球といった炎症細胞も組織障害と一致して野生型マウスにて抑制されていた。Th17 に関連する各種サイトカイン (IL6・IL17・CCL2・CCL3・CCL5・CCL20) 核内制御因子 RORC もまた、CD147 遺伝子欠損マウスにて有意な増加を認めており、Th17 の分化制御に CD147 が関与する可能性が示唆された。実際、野生型における CD4 陽性 CD147 陽性 T リンパ球

の Population は In vitro 研究においても増加が徐々に認められている。細胞実験においても CD147 遺伝子欠損マウス由来 T リンパ球の Population は Th17 の有意な増加を認めるものの、Th1 や Th2, Treg といった他の分画に有意な変化を認めなかった。Th17 由来と考えられるサイトカインについてもこの動向に一致した推移をみせた。この Th17 分化に関与する分子機構を解明するため T リンパ球内 STAT3 のリン酸化について注目した。抗 CD3・CD28 抗体により活性化させた T リンパ球において野生型マウスでは STAT3 のリン酸化・活性化は有意に CD147 遺伝子欠損マウス由来細胞に比して抑制されていた。

以上より、CD147 は STAT3 のリン酸化制御をおこなう事によって、Th17 分化を制御し、ループス腎炎の病勢抑制に関与していると考えられた。今後、抗 CD147 抗体を利用して、ループス腎炎における病勢制御につながるか検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

1. CD147 は CD4+ T 細胞を制御し、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、長屋 啓、前田 麻友子、佐藤 由香、小島 博、佐藤 和一、丸山 彰一、松尾 清一
第 56 回日本腎臓学会学術総会
東京都・東京国際フォーラム 2013/5/10 ~ 12
2. CD147 はループス腎炎の重症度を反映する。
前田 麻友子、小杉 智規、長屋 啓、前田 佳哉輔、佐藤 由香、小島 博、尾崎 武徳、佐藤 和一、丸山 彰一、松尾 清一
第 56 回日本腎臓学会学術総会
東京都・東京国際フォーラム 2013/5/10 ~ 12
3. CD147 Ameliorates Lupus Nephritis through the Regulation of Helper T Cell 17 Differentiation.

Kayaho Maeda, Tomoki Kosugi, Hiroshi Kojima, Mayuko Maeda, Yuka Sato, Waichi Sato, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama

American Society of Nephrology Annual Meeting 2013 / 2013/11/8, Atlanta, USA

4. CD147 は IL17 産生性ヘルパー T 細胞の制御を通じてループス腎炎の活動性を抑制する

前田佳哉輔 小杉智規 前田麻友子

佐藤和一 丸山彰一 松尾清一

分子腎臓フォーラム/2013/9/7/ 京都府、メルパルク京都

5. Lack of Basigin exacerbates Lupus Nephritis in experimental lupus model.

Kayaho Maeda, Tomoki Kosugi, Waichi Sato, Hiroshi Kojima, Yuka Sato, Hiroshi Nagaya, Mayuko Maeda, Tomohiro Masuda, Kenji Kadomatsu, Shoichi Maruyama, Seiichi Matsuo

45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology/2012/11/2, San Diego, USA.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 腎疾患のバイオマーカー及びその用途

発明者: 小杉智規

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2012-128588

出願年月日: 2012 年 6 月 6 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者 小杉智規 (KOSUGI TOMOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

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・准教授

研究者番号: 10362253

(3) 連携研究者 佐藤和一 (SATO WAICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90508920