

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09695

研究課題名(和文) CD147による細胞内輸送・代謝機構の解明と糖鎖修飾調整を介した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of intracellular import and metabolic circuits involving CD147/Basigin and development of novel therapeutics through regulation of sugar chain modification

研究代表者

小杉 智規 (Kosugi, Tomoki)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：90584681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肥満症に伴うCKD・脂肪性肝疾患のより詳細な機序解明を目的として、野生型およびCD147/Basigin遺伝子欠損(BSGKO)マウスに高脂肪負荷を与え、細胞内エネルギー代謝機構におけるBSGの役割を検証した。BSGKOマウスの腎臓において、尿細管の空胞変性とリポフスチン様物質の蓄積は著明に抑制されていた。この結果は細胞内への乳酸・ピルビン酸取り込みがBSG欠損により抑制され、TCA回路における中間代謝産物の減少と脂肪酸ベータ酸化を促進し、ケトン再生経路の亢進を示したことによると考えられた。一連の過程におけるBSGタンパクの増加はオートファジー障害の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、乳酸やピルビン酸の代謝やケトン体合成経路に関する研究は脳神経細胞や心遅筋線維のエネルギー源としての研究から内因性代謝物の細胞内蓄積・臓器障害に至るまで多岐におよぶ。BSGもまた、乳酸やピルビン酸、ケトン体のミトコンドリア取り込みに関与しエネルギー恒常性の維持に寄与するLactate Shuttle理論(未検証)が提唱されている。そのため、糖尿病による腎臓・肝臓障害に対して、細胞内のエネルギー恒常性の変化を俯瞰することは新たな治療戦略の構築となり、BSGを治療標的とする事はエネルギー恒常性を制御し、現在医療経済上負担となっている多彩な糖尿病関連疾患の抑止につながる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to elucidate the underlying mechanisms of chronic kidney disease (CKD) and hepatic steatosis caused by nutritional overburden more in details. Therefore, we investigated the role of CD147/Basigin (BSG) to maintain intracellular energy homeostasis, using high fat diet (HFD)-induced wild-type and BSG gene-deficient (BSGKO) mice. In the kidneys of BSGKO mice, vacuolar degeneration of tubular epithelial cells and accumulation of lipofuscin-like substances were remarkably suppressed. These findings might be due to the phenomena that transport of the substrates such as pyruvate and lactate in the cells was suppressed by BSG deficits subsequently leading to the the reduction of TCA cycle intermediates and enhanced ketogenesis through activation of free fatty acid beta oxidation. In the setting, augmented BSG protein might be due to the promotion of autophagy, but not translocation to nuclei.

研究分野：Nephrology

キーワード：CD147/Basigin 乳酸 ピルビン酸 高脂肪食 エネルギー恒常性 脂肪性肝疾患 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満症・メタボリック症候群・糖尿病やネフローゼ症候群は、大量の脂質・タンパク質・糖質を尿細管腔へ濾過し、尿細管細胞(TECs)・血管内皮細胞障害を経て、慢性腎臓病(CKD)を増悪する(Osborn, Nature Med, 2012)。特に、尿細管腔でタンパク質と脂質から生じる過酸化脂質は酸化ストレスを誘導し、細胞障害に寄与する。そのため、TECsのエンドサイトーシス機構を制御する事は酸化ストレス産生や炎症関連サイトカインを抑制すると考える(Remuzzi, NDT, 2015)。

今回、過剰な脂質・タンパク質・糖質のTECsへの吸収を直接的に制御する重要な因子として、臓器特異的な糖鎖を有する膜1回貫通型糖タンパク質・CD147(Basigin)に着目する。CD147の細胞外ドメインは細胞内への物質のSortingや輸送に関与し、腫瘍細胞の生存や浸潤を促進する(Lymarie, JCB 2013)。しかし、潜在的に多臓器障害リスクを有する腎臓・代謝領域においてCD147による直接的な腎疾患治療応用に関する知見はない。

我々は、これまでにCD147が炎症細胞の遊走能亢進や脾臓由来Tリンパ球の分化・誘導を介して腎障害進展に寄与する事を示した(JASN 2009, AJP 2010, Arthritis Rheumatol 2015)。更に、高脂肪食をCD147遺伝子欠損マウス(CD147KO)に負荷した際、野生型でみられる尿細管障害や脂肪性肝障害が抑制される事を見出した。また、血糖・尿酸・遊離脂肪酸値はCD147KOで有意に抑制された。申請者らは、これらの現象は酸化ストレスにより誘導されるCD147の細胞外ドメインに存在する臓器特異的な糖鎖構造が刺激に応じて変化し、エンドサイトーシス・レセプターとして働く事に起因すると考える。実際、生体高分子の中で糖鎖は核酸、タンパク質について“第三の鎖”と称され、糖鎖の進化は生物の進化を反映すると称される。結果として、CD147は細胞内ATP産生亢進を伴い過剰な糖・過酸化脂質・タンパク質の細胞内蓄積を誘導し、TECsにてオートファゴソーム障害を呈する。過剰な取り込みは酸化ストレスを誘導し、CD147の誘導と共にTリンパ球を中心とした慢性炎症によって相乗的な多臓器障害を惹起する可能性を示唆した。

本研究では現在までの知見を更に進め、これまでのCD147KOマウスに加えてCD147過剰発現マウス(CD147Tg)を使用し、「CD147による細胞内輸送・代謝機構の解明と糖鎖修飾調整を介した新規治療法の開発」を主眼とする。

2. 研究の目的

慢性腎臓病(CKD)進展の独立危険因子である肥満症は大量の脂質・タンパク質・糖質を糸球体より濾過し、血管内皮・尿細管細胞障害を惹起する。

我々は、1)臓器特異的な糖鎖構造を有する膜貫通型糖タンパク質・CD147は細胞内への過酸化脂質・タンパク質の取り込みに関与し、オートファゴソーム障害による尿細管細胞障害を誘導する、2)糖・脂質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し、相乗的な多臓器障害を惹起する、という知見を得ている。これはCD147の臓器特異的な糖鎖構造がエンドサイトーシス・レセプターの役割を果たす事に起因すると推測する。

本研究では、CD147の糖鎖修飾制御を介した細胞内への物質Sorting・エンドサイトーシス機構の網羅的解明を行い、CKD進展の抑止とそれに関連する臓器障害を含めた新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

高脂肪食負荷時のCKD増悪に対するCD147の意義を解明するため、CD147TgやCD147KOを用いて、糖質・尿酸に関する各種チャネル動態、ミトコンドリア機能異常、オートファゴソーム障害について比較検証を行う。更に、腎尿細管・肝細胞初代培養細胞を用いて、CD147による糖質・過酸化脂質・タンパク質に対する細胞内代謝や酸化ストレス・慢性炎症の誘導について分子生物・免疫学的に解明。

尿細管初代培養細胞にて、糖質・脂質・タンパク質負荷をした際のCD147の糖鎖構造変化N結合型糖鎖付加部位の同定を糖鎖プロテオミクスとレクチン・マイクロアレイ法を用いて網羅的・動的解析。

CRISPR/Cas9技術を用いてで同定した部位を機能しないアミノ酸で置換し、高脂肪食負荷時のCKDや脂肪性肝障害の増悪の抑止を確認、免疫能低下等の副作用について検証を加える。

4. 研究成果

高脂肪食負荷時のCKD増悪過程におけるCD147の意義について

60%脂肪含有の高脂肪食負荷CD147KOにおいて、病理学的に脂肪性肝疾患の抑制を野生型に比して認めた。病理学的所見に一致して、空腹時血糖、ASTやALTの肝細胞系酵素、肝臓重量と中性脂肪含有量も低下を示し、その値はほぼ10%脂肪含有の正常餌群と比して同程度であった。この際、炎症系マーカーである肝臓Nrf2値も改善を示していた。腎機能について、血清学的な腎機能の抑制はCD147KOに認められたが、病理学な有意な所見は示さなかった。

インスリン抵抗性に関する指標(HOMA-IR、経口および経静脈的グルコース負荷試験)は、野生型においてCD147KO比して有意な悪化を示した。糖新生の重要な基質であるピルビン酸と乳酸を上記動物モデルに負荷した際、血糖の上昇はCD147KOで有意に抑制されていた。これらから、CD147の欠損はインスリン抵抗性を改善することが示唆される。

CD147 は乳酸やピルビン酸、ケトンといった細胞エネルギー恒常性維持に必須の有機酸の取り込みに関与する monocarboxylate transporters (MCTs)の細胞膜上への Translocation に必須なタンパクであり、CD147 の欠損は MCT の Degradation を示す。MCT は CD147 に非依存性にミトコンドリア内膜上にも存在し、細胞膜上の複合体と同様の役目を果たしていた。しかし、細胞内へ流入の最初の関門である細胞膜上の複合体に乳酸やピルビン酸といった有機酸利用の代謝経路は機能的に依存している形態を示していた。つまり、細胞膜上の CD147 と MCT の複合体は乳酸やピルビン酸を基質とした糖新生系の亢進を呈し血糖を含めた生体恒常性の維持に大きく関与していた。この複合体の欠損時には、遊離脂肪酸 酸化からケトン合成を示す経路の活性化や糖原性アミノ酸の TCA 回路への流入により恒常性の維持をはかっていることが推測される。

CD147KO マウス由来の尿細管初代培養細胞に Bovine serum albumin(BSA)を大量に負荷した際、細胞膜上の CD147 発現は mRNA およびタンパクレベルで影響を受けなかった。BSA 負荷によって生じた細胞膜上で糖鎖構造変化を呈した CD147 は細胞内へ取り込まれ、ライソゾームやゴルジ体などを經由して再利用されることが想定された。しかし、BSA の大量負荷によって尿細管細胞障害を呈した際、オートファジー障害も呈し、CD147 発現や機能も低下する可能性が認められた。そのため、定常状態と BSA 大量負荷時の CD147 の細胞内動態をさらに検証した上で、糖鎖プロテオミクスとレクチン・マイクロアレイ法を用いた網羅的・動的解析を行うこととした。それ故に、 も N 結合型糖鎖付加部位の同定を行った後に行うこととした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mori Y, Masuda T, Kosugi T, Yoshioka T, Hori M, Nagaya H, Maeda K, Sato Y, Kojima H, Kato N, Ishimoto T, Katsuno T, Yuzawa Y, Kadomatsu K, Maruyama S.	4. 巻 22
2. 論文標題 The clinical relevance of plasma CD147/basigin in biopsy-proven kidney diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 815-824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-017-1518-2.	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiro Ryuge, Tomoki Kosugi, Yuka Sato, Shoichi Maruyama
2. 発表標題 CD147/Basigin is involved in the pathogenesis of hepato-renal disease under the status of satiation and starvation.
3. 学会等名 American society of nephrology annual meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 龍華章裕、佐藤由香、小杉智規、森佳子、吉岡知輝、丸山彰一、門松健治
2. 発表標題 CD147/Basiginの栄養/代謝における役割の解明
3. 学会等名 第5回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2019
4. 発表年 2019年

〔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	丸山 彰一 (MARUYAMA Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	門松 健治 (KADOMATSU Kenji) (80204519)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	