

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月19日現在

機関番号：21591438
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591438
 研究課題名（和文）：CD147/Basiginを標的とした新たな皮膚癌治療戦略の構築
 研究課題名（英文）：Development of new therapeutic strategy for skin cancers targeting CD147/Basigin
 研究代表者：金蔵 拓郎 (KANEKURA TAKURO)
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：70177509

研究成果の概要（和文）：我々は本研究で細胞膜分子 CD147/basigin は悪性黒色腫細胞の解糖系を制御することで増殖、浸潤、転移を促進すること、また細胞膜上で integrin と共存し、その下流の focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を介して基質に対する接着更には局所浸潤を制御していることを明らかにした。これらの知見は CD147/basigin が皮膚癌治療の標的分子となり得ることを示している。

研究成果の概要（英文）：We revealed that CD147/basigin promotes proliferation, invasion, and metastasis of malignant melanoma through regulating tumor cell glycolysis and regulates tumor cell adhesion to matrix through phosphorylating the focal adhesion kinase (FAK), a downstream kinase of integrin that co-localizes with CD147 on the cell surface. These findings demonstrate that CD147/basigin could be a target molecule for new therapeutic strategy for skin cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：CD147/Basigin、皮膚癌、治療

1. 研究開始当初の背景

癌に共通する細胞生物学的特徴として、増殖能、浸潤・転移能の亢進、抗癌剤に対する耐性が挙げられる。特に、転移能と薬剤耐性は癌治療における大きな障壁であり、この克服のために多くの努力がなされている。増殖

能、浸潤・転移能は解糖系により制御されている。癌細胞では解糖系が亢進しており、グルコースが乳酸とピルビン酸に代謝され、細胞活動のエネルギー源である ATP が産生される一方、過剰に産生された乳酸は細胞外に輸送され細胞外微小環境を酸性に傾ける。酸性

の環境下で増殖、浸潤・転移能が促進される。

CD147/basigin は乳酸などのモノカルボン酸の細胞膜内外の輸送に与るモノカルボン酸トランスポーター (monocarboxylate transporter; MCT) と複合体を形成し乳酸のトランスポートに重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

一方、多剤耐性を示す乳癌細胞で CD147/basigin の発現が亢進していることが見出され多剤耐性における CD147/basigin の役割が示された。

以上のように CD147/basigin は浸潤・転移および薬剤耐性に密接に関与していることが明らかにされつつあった。

2. 研究の目的

癌細胞における CD147/basigin の多彩な作用が明らかにされつつあり、CD147 を標的とし、増殖、浸潤・転移と多剤耐性の制御を介する新たな癌治療戦略の構築を目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) CD147/basigin ノックダウン細胞株の樹立。

① CD147/basigin を発現している皮膚癌細胞株 (Bsg(+))細胞) を培養する。なお二年目以降に計画している転移マウスモデルによる研究のため転移能の高い細胞株を選択する。

② GenBank のデータを基に 60 ないし 70 塩基対の small interfering RNA (siRNA) をデザインしプラスミドベクターに組み込む。

③ siRNA が組み込まれたプラスミド、および対照として siRNA を含まないプラスミドのみを Bsg(+))細胞) にリポフェクション法で遺伝子導入する。

④ プラスミドが内包する抗生物質耐性遺伝

子を選択マーカーとして遺伝子導入された細胞を選択する。

⑤ 抗生物質耐性細胞をクローニングし CD147/basigin をノックダウンした皮膚癌細胞株 (Bsg(-))細胞) を樹立する。

(2) Bsg(+))細胞) と Bsg(-))細胞) における増殖能、浸潤能、多剤耐性形質の比較。

① 細胞増殖能は MTT アッセイ法で観察する。

② 浸潤能は、人工的基底膜モデルであるマトリジェルでコートしたマイクロポアフィルターで隔てたダブルチェンバーディッシュを用いて観察する。

③ Bsg(+))細胞) と Bsg(-))細胞) の抗癌剤に対する感受性を MTT アッセイ法で比較観察する。

④ Bsg(+))細胞) と Bsg(-))細胞) における MDR など多剤耐性関連遺伝子の発現を比較観察する。RNA は RT-PCR 法あるいはノーザンブロット法で、タンパクはウェスタンブロット法で測定する。

(3) Bsg(+))細胞) と Bsg(-))細胞) における解糖系の状態の比較。

① Bsg(+))細胞) と Bsg(-))細胞) それぞれの培養上清中の乳酸濃度を測定する。

② Bsg(+))細胞) と Bsg(-))細胞) における ATP 産生を比較する。ATP 産生量はルシフェリン-ルシフェラーゼ法で観察する。

③ Bsg(+))細胞) で CD147/basigin が MCT と colocalize しているかどうかを免疫蛍光法で観察する。Bsg(+))細胞) および対照として Bsg(-))細胞) をスライドチェンバー上で培養し、CD147/basigin、MCT 発現の局在を共焦点顕微鏡で観察する。

④ 同じく CD147/basigin と MCT の colocalization を酵素電顕法で観察する。

(4) 転移能を有する Bsg(+))細胞) をヌードマウスに移植し転移モデルを作製する。同じ条件で Bsg(-))細胞) を移植し転移能を比較する。また腫瘍細胞接種部位および転移巣周囲の

MMP の発現を免疫組織学的に観察する。以上の実験で CD147/basigin が皮膚癌の転移を促進していることを in vivo で明らかにする。

(5) Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞をヌードマウスに移植し腫瘍モデルを作製し、それぞれの抗癌剤に対する反応性を比較観察する。

4. 研究成果

ヒト悪性黒色腫細胞株である A375 細胞を用いて CD147/basigin-siRNA をトランスフェクトし、Bsg(-)A375 細胞株を樹立した。この細胞株と頭頸部扁平上皮癌細胞 KB と抗癌剤耐性株である KB/V この細胞を用いて以下の結果を得た。

- ① Bsg(+)A375 細胞では Bsg(-)A375 細胞と比較して増殖能が有意に高い。
- ② Bsg(+)A375 細胞では Bsg(-)A375 細胞と比較してマトリジェル中の浸潤能が有意に高い。
- ③ Bsg(-)A375 細胞では Bsg(+)A375 細胞と比較して細胞外乳酸濃度が有意に低く pH は高値である。
- ④ Bsg(-)A375 細胞では Bsg(+)A375 細胞と比較して ATP 産生能が有意に低下している。
- ⑤ Bsg(+)A375 細胞では乳酸の細胞内外への輸送を司る monocarboxylic acid transporter (MCT)-1, および 4 が細胞膜上に発現しているが、Bsg(-)A375 細胞では MCT-1, 4 の発現は著明に減弱している。
- ⑥ Bsg(+)A375 細胞では CD147/basigin は A375 細胞上で integrin と共存している。
- ⑦ Bsg(-)A375 細胞では integrin の下流のキナーゼである focal adhesion kinase (FAK) がリン酸化し、integrin が細胞質内に斑紋状に分布する。
- ⑧ Bsg(-)A375 細胞では I 型および IV 型コラーゲンに対する接着能が有意に低下する。
- ⑨ KB/V 細胞では KB 細胞と比較して

CD147/basigin が高発現している。

⑩ Bsg(-)KB/V 細胞では KB/V 細胞と比較してビンクリスチンと 5-Fu に対する感受性が亢進している。

以上の結果は、CD147/basigin が MCT の発現調節を介して黒色腫細胞の解糖系を制御し、癌の増殖と浸潤を制御していること、FAK のリン酸化を介して黒色腫細胞と基質の接着さらには局所浸潤を制御していること、および薬剤多剤耐性に関与していること、を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Lian X, Xiao R, Hu X, Kanekura T, Jiang H, Li Y, Wang Y, Yang Y, Zhao M, Lu Q. DNA demethylation of CD40L in CD4⁺ T-cells from women with systemic sclerosis - A possible explanation for female susceptibility. *Arthritis Rheum* (in press). (査読 有)
2. Jiang H, Xiao R, Lian X, Kanekura T, Luo Y, Yin Y, Zhang G, Ynag Y, Wang Y, Zhao M, Lu Q. Demethylation of TNFSF7 contributes to CD70 overexpression in CD4⁺ T cells from patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol* 2012; 143: 39-44. (査読 有)
3. Nishibaba R, Higashi Y, Su J, Furukawa T, Kawai K, Kanekura T. CD147-targeting siRNA inhibits cell-matrix adhesion of human malignant melanoma cells by phosphorylating focal adhesion kinase. *J Dermatol* 2012; 39: 63-7. (査読 有)
4. Uchida Y, Kawai K, Ibusuki A, Kanekura T. Role for E-cadherin as an inhibitory receptor on epidermal $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol* 2011; 186: 6945-54. (査読 有)
5. Mera K, Kawahara K, Tada K, Kawai K, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T. ER

signaling is activated to protect human HaCaT keratinocytes from ER stress induced by environmental doses of UVB. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397: 350-4. (査読 有)

6. Li J, Peng L, Wu L, Kuang Y, Su J, Yi M, Hu X, Li D, Xie H, Kanekura T, Chen X. Depletion of CD147 sensitizes human malignant melanoma cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *J Dermatol Sci* 2010; 58: 204-10. (査読 有)

7. Xiao R, Kanekura T, Yoshida N, Higashi Y, Lu QJ, Fukushima T, Kanzaki T. Retinoic acid exhibits anti-fibrotic activity via the inhibition of 5-lipoxygenase expression in scleroderma fibroblasts. *J Dermatol* 2011; 38: 345-53. (査読 有)

8. Lu H, Kuang Y, Su J, Chang J, Wu L, Kanekura T, Li D, Chen M, Chen X. CD147 is highly expressed on peripheral blood neutrophils from patients with psoriasis and induces neutrophil chemotaxis. *J Dermatol* 2010; 37: 1053-6. (査読 有)

9. Kanekura T, Xiang Chen. CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers. *J Dermatol Sci* 2010; 57: 149-154.

10. Kuang Y-H, Chen X, Su J, Wu L-S, Liao L-Q, Li-D, Chen Z-S, Kanekura T. RNA interference targeting the CD147 induces apoptosis of multi-drug resistant cancer cells related to XIAP depletion. *Cancer Lett* 2009; 276: 189-95. (査読 有)

[学会発表] (計 28 件)

1. Kanekura T.

Treatment of pustular psoriasis and neutrophilic dermatoses

The 15th Annual Meeting of the Korean Society for psoriasis, 24 September 2011, Seoul

2. Kanekura T.

The treatment of the neutrophilic dermatoses.

Symposium 44: Neutrophilic dermatoses

The 22nd World Congress of Dermatology, 24-29 May 2011, Seoul.

3. 金蔵拓郎

CD147/basigin と癌

日本皮膚科学会東北六県合同地方会学術大会第 353 回例会 2011 年 2 月 5 日 仙台市

4. Uchida Y, Kawai K, Kanekura T.

E-cadherin on epidermal $\gamma \delta$ T cells is an inhibitory receptor.

The 40th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, 8-11 September 2010, Helsinki, Finland.

5. Mera K, Kawahara K, Tada K, Kawai K, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T.

ER signaling is activated to protect human keratinocytes from ER stress provoked by the environmental dose UVB.

The 40th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, 8-11 September 2010, Helsinki, Finland.

6. Kamiwada R, Higashi Y, Kawai K, Kanekura T.

A CD-147-targeting siRNA enhances the cell adhesion of human malignant cells by phosphorylating focal adhesion kinase.

The 70th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. 5 - 8, May 2010, Atlanta, USA.

7. 金蔵拓郎

CD147/Basigin と皮膚癌

第 54 回日本皮膚科学会高知地方会 2009 年 9 月 19 日 高知市

8. 金蔵拓郎

好中球と皮膚疾患

平成 21 年度日本皮膚科学会西部支部主催生涯教育セミナー 2009 年 6 月 27 日 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金蔵 拓郎 (Kanekura Takuro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70177509