

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461702

研究課題名(和文) 腫瘍細胞の生存調節因子としてのCD147/basiginの機能解析

研究課題名(英文) Functional examination of CD147/Basigin as a regulator of tumor cell survival.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CD147/basiginを高発現している悪性黒色腫細胞株を用い、野生型細胞とCD147/basiginをノックダウンした細胞で生存調節機構を比較した。CD147/basiginと主たる細胞生存調節機構であるERシグナルおよびオートファジーとの関連は認められなかった。しかしCD147/basiginは細胞増殖に重要なEGFRの活性化を抑制していることを見出し、さらにCD147/basiginとEGFRの双方を抑制することでより効果的に腫瘍細胞の増殖を抑制できることを示した。これらの知見は将来的に治療成績の向上につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：We examined the function of CD147/Basigin as a regulator of tumor cell survival using a malignant melanoma cell line that expresses high level of CD147/Basigin. CD147/Basigin had no functional relation with ER signaling and autophagy which are the main defense systems against cellular stress. We found that CD147 activates EGFR which plays an important role in the cell proliferation and showed that cell growth was inhibited by the EGFR inhibitor and CD147 silencing, and additive growth inhibition was observed when these treatments were combined. These results would yield a improvement of therapeutic outcome in clinical settings.

研究分野：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

(1) 我々は過去に CD147/basigin は細胞膜タンパクである monocarboxylate transporter (MCT) の正常な発現をサポートするシャペロンとして機能することを明らかにした。CD147/basigin によって発現をサポートされる分子は MCT 以外にも integrin 1, cyclophilin A, p-glycoprotein 等数多く報告されている。このような複数の分子に対するシャペロン様機能が CD147/basigin の機能の多様性を説明する機序の一つであると考えられる。従って、CD147/basigin が正しく機能しなければ、多くのタンパク分子が正常な細胞内 processing を受けず異常タンパクが蓄積することが予想される。一方で我々は CD147/basigin がアポトーシスから腫瘍細胞を保護する作用があることを報告してきた。

(2) 細胞が飢餓、感染、酸化、紫外線等の刺激に曝されると異常タンパクあるいは変性タンパクが生じ、これらの異常タンパクが細胞内に蓄積すると変性疾患、腫瘍などを生ずる。異常タンパクから細胞を保護する機構としてアポトーシス、ER シグナルおよびオートファジーが解明されている。CD147/basigin は細胞膜分子の正常な発現をサポートするシャペロン様の機能を有すること、アポトーシスから腫瘍細胞を保護する作用を有することから、更に ER シグナルおよびオートファジーに関与し腫瘍細胞の生存調節因子として機能している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

癌細胞におけるアポトーシス、ER シグナル、オートファジーなど細胞の生存を調節する機構の解明は癌治療の戦略を構築する上で極めて重要である。上述の背景を踏まえ、CD147/basigin が悪性黒色腫をはじめとする皮膚癌細胞のアポトーシス、ER シグナル、オートファジーなど細胞生存を調節する機構において果たす役割を解明し、皮膚癌の新たな治療戦略の構築に関わる重要な知見を得ることを目的に本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) CD147/basigin とアポトーシス、ER シグナル、オートファジーとの関連に関する解析

1) CD147/basigin ノックダウン細胞株の樹立
CD147/basigin を発現している皮膚癌細胞株 (Bsg(+)) 細胞) を培養する。

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 pSUPER プラスミドベクターに組み込む。

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。

pSUPER プラスミドが内包する抗生物質 (puromycin) 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。

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(-)) 細胞の viability の比較

細胞の viability を MTT アッセイ法で観察する。

3) Bsg(+)) 細胞と Bsg(-)) 細胞におけるアポトーシスの比較

アポトーシスを、細胞形態、propidium iodide (PI) および annexin V を用いたフローサイトメトリーで観察する。

4) Bsg(+)) 細胞と Bsg(-)) 細胞における ER シグナルの比較

ER シグナルは unfolded protein response (UPR), ER-associated degradation (ERAD), ER stress-induced apoptosis (ERSIA) の三段階よりなる反応系で、多くの分子により制御されるが、主要な因子は activating transcription factor 6 (ATF6), inositol requiring enzyme 1 (IRE-1), PKR-like kinase (PERK) の三つである。

Bsg(+)) 細胞と Bsg(-)) 細胞における ATF6 の発現と核内への移行を比較する。

Bsg(+)) 細胞と Bsg(-)) 細胞における IRE-1 およびその下流の分子である X-box binding protein (XBP)-1 の発現を比較する。

ERAD には異常タンパクのポリユビキチン化が必要であるので、ユビキチン化抗体を用いた Western blot でユビキチン化の状態を比較する。

ERSIA が誘導されると発現が亢進する C/EBP homologous protein (CHOP) の発現を比較する。

5) Bsg(+)) 細胞と Bsg(-)) 細胞におけるオートファジーの比較

オートファジーは異常タンパクを取りこむように細胞質の一部が隔離膜に囲まれオートファゴソームを形成し、これがリソソームと融合しリソソーム加水分解酵素によって内容物が分解される反応である。オートファゴソームの構成タンパクとして microtubule-associated protein light chain-3 (LC3) が同定されておりオートファジーが惹起されると LC3-I が LC3-II に変換される。分解される異常タンパクはユビキチン化されアダプタータンパク p62 によってオートファゴソームの LC3 と結合する。酸化など一時的刺激によるオートファジーが起ると LC3-II の発現は亢進し、p62 はオートファゴソームと一緒に分解され発現が低下する。一方腫瘍など恒常的に異常タンパクが蓄積

している状態では基底レベルのオートファジーが活性化しており LC3-II, p62 ともに発現が亢進している。

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞における LC3-II の発現を比較する。

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞における p62 の発現を比較する。

(2) CD147/basigin と EGFR とのクロストークに関する解析

ER シグナルとオートファジーにおいて有意の差異は認められなかったため、視点を変えて細胞増殖で重要な役割を果たすチロシンキナーゼ群の分子との関連を検討した。CD147/basigin と結合するチロシンキナーゼを検索したところ、悪性黒色腫の増殖に関与することが知られている ERBB3 (human EGFR) が結合することがわかった。

1) Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞における EGFR のリン酸化の比較

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞における EGFR のリン酸化をウェスタンブロット法で比較する。

2) Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞における MAP キナーゼ (MEK) と cdc25C キナーゼのリン酸化の比較

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞における MEK と cdc25C キナーゼのリン酸化をウェスタンブロット法で比較する。

3) CD147/basigin と EGFR の抑制の細胞増殖に及ぼす効果の検討

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞に EGFR 抑制剤を加え細胞増殖を MTT アッセイ法で観察する。

(3) CD147/basigin を発現している腫瘍細胞と線維芽細胞間の細胞間情報伝達機構の解析

腫瘍細胞の生存に関わる重要な因子として浸潤と転移もあげられる。腫瘍細胞は増殖と同時に浸潤・転移することで生存環境を強化する。悪性黒色腫細胞上に発現する CD147/basigin は近傍の線維芽細胞によるマトリックスメタロプロテアーゼの発現を促進することで腫瘍細胞自身の浸潤を促す。この際、腫瘍細胞と線維芽細胞は接していない。CD147/basigin の伝達機構について shed form, microvesicle, および exosome を介する三つの経路について検討した。

1) Shed form, microvesicle, および exosome の分離

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞を 20,000g, 20 分間超遠心し microvesicle を、更に 100,000g, 70 分間超遠心し exosome をペレットとして分離する。上澄中に shed form が

含まれる。

2) Shed form, microvesicle, および exosome の確認

Shed form は上澄中タンパクのウェスタンブロット法で、microvesicle, および exosome は電子顕微鏡で確認する。

3) Shed form, microvesicle, および exosome の線維芽細胞におけるゼラチナーゼ活性誘導能の検討。

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞細胞の存在下および非存在下で培養線維芽細胞に、shed form, microvesicle, exosome を加えゼラチナーゼの活性をゼラチンザイモグラフィーで観察する。

4. 研究成果

(1) CD147/basigin と ER シグナル

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞の間で ATF6 の核内移行、IRE-1, XBP-1 および CHOP の発現に有意差はみられなかった。ユビキチン化にも差がなかった。以上より悪性黒色腫細胞では CD147/basigin は ER シグナルとの関連がないと考えられた。

(2) CD147/basigin とオートファジー

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞の間で LC3-II と p62 の発現に有意差はみられなかった。悪性黒色腫細胞では CD147/basigin はオートファジーとの関連がないと考えられた。

(3) CD147/basigin と EGFR

細胞生存に重要な分子としてチロシンキナーゼ群が知られている。CD147/basigin は悪性黒色腫細胞において ER シグナル、オートファジーとの関連が認められなかったため、チロシンキナーゼ群の分子との関連を検討した。中南大学(中華人民共和国長沙市)の共同研究者らは、CD147/basigin がチロシンキナーゼである EGFR と結合することを見出していた。悪性黒色腫の約 70%では EGFR の下流の分子である BRAF に遺伝子変異がみられ、EGFR-BRRF-MAPK の経路が恒常的に活性化しており、新たな分子標的薬 vemurafenib は変異 BRAF を標的としている。

そこで、Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞において EGFR のリン酸化状態を比較したところ、Bsg(-)細胞で EGFR のリン酸化が亢進していた。

(4) CD147/basigin と MEK, cdc25C キナーゼ

EGFR を抑制的に制御している細胞内キナーゼとして cdc25C が報告されている。また cdc25C は悪性黒色腫で活性化している MAPK である MEK によって活性化される。これらの知見を踏まえ、

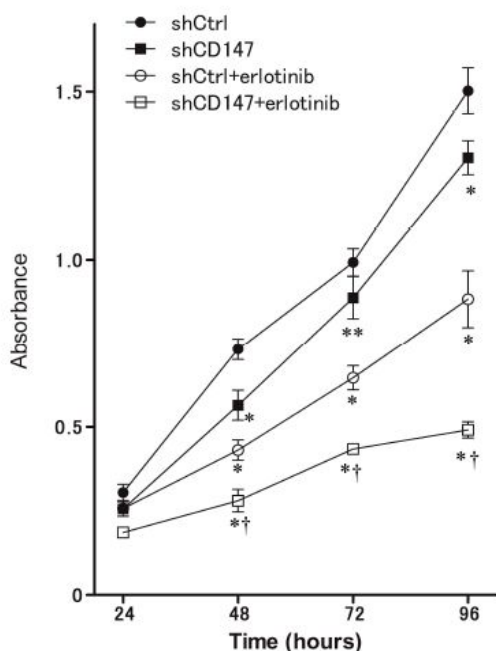
Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞において MEK, cdc25C のリン酸化状態を検討したところ、

Bsg(-)細胞で MEK と cdc25C のリン酸化状態が低下していた。これらの結果は、CD147/basigin をノックダウンすると MEK とその下流にあり EGFR を抑止している cdc25C が不活化することで EGFR が活性化していることを示している。

CD147/basigin も EGFR もともに悪性黒色腫細胞の増殖を促進するので、上記の結果から両者を同時に抑制することで、より大きな腫瘍細胞の増殖抑制果的が得られる可能性が示唆される。

(5) CD147/basigin ノックダウンと EGFR inhibitor による腫瘍細胞増殖抑制効果

CD147/basigin をノックダウンすると悪性黒色腫細胞の増殖は有意に抑制された。EGFR inhibitor である erlotinib も増殖を有意に抑制した。Bsg(-)細胞に erlotinib を加えると細胞増殖は相加的に抑制された(図)。この結果は将来的に治療成績の向上につながる成果と期待される。



(6) CD147/basigin と線維芽細胞間の細胞間情報伝達機構

Bsg(+)細胞と Bsg(-)細胞細胞の存在下および非存在下で培養線維芽細胞に、shed form, microvesicle, exosome を加えたところ、shed form の CD147/basigin が線維芽細胞のゼラチナーゼ活性を誘導していた。この結果は悪性黒色腫細胞状の CD147/basigin は細胞外ドメインで切断され shed form として近傍の線維芽細胞に到達することを示している。これは浸潤・転移に対する新たな治療法の開発に結び付く成果である。

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 21 件)

Hatanaka M, Higashi Y, Kawai K, Su J, Zeng W, Vhen X, Kanekura T. CD147-targeting siRNA induces the phosphorylation of EGFR by down-regulation of cdc25c. *Oncol Lett*. 査読有, 2016, in press.

DOI: 10.3892/o1.2016.4267.

Okamura K, Araki Y, Abe Y, Shigyou A, Fujiyama T, Baba A, Kanekura T, Chinen Y, Kono M, Niizeki H, Tsubota A, Konno T, Hozumi Y, Suzuki T. Genetic analyses of oculocutaneous albinism types 2 and 4 with eight novel mutations. *J Dermatol Sci*. 査読有, 81, 2016, 140-142.

DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.10.014.

Mitoma C, Mine Y, Utani A, Imafuku S, Akimoto T, Kanekura T, Furue M, Uchi H. Current skin symptoms of Yusho patients exposed to high levels of 2,3,4,7,8-pentachlorinated dibenzofuran and polychlorinated biphenyls in 1968. *Chemosphere*. 査読有, 137, 2015, 45-51.

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.070.

Yonekura K, Utsunomiya A, Takatsuka Y, Takeuchi S, Tokunaga M, Kubota A, Takeda K, Kanzaki T, Uchida Y, Kawai K, Kanekura T. Human T-lymphotropic virus type 1 proviral loads in patients with adult T-cell leukemia-lymphoma: comparison between cutaneous type and other subtypes. *J Dermatol*. 査読有, 42, 2015, 1143-1148.

DOI: 10.1111/1346-8138.13004.

Wang Y, Shu Y, Xiao Y, Wang Q, Kanekura T, Li YP, Wang JC, Zhao M, Lu QJ, Xiao R. Hypomethylation and overexpression of ITGAL (CD11a) in CD4⁺ T cells in systemic sclerosis. *Clin Epigenetics*. 査読有, 6, 2014, 25-36.

DOI: 10.1186/1868-7083-6-25.

Hatanaka M, Higashi Y, Fukushima T, Baba N, Kawai K, Hashiguchi T, Su J, Zeng W, Chen X, Kanekura T. Cleaved CD147 shed from the surface of malignant melanoma cells activates MMP-2 produced by fibroblasts. *Anticancer Res*. 査読有, 34, 2014, 7091-7096.

DOI: なし

Wang YY, Wang Q, Sun XH, Liu RZ, Shu Y, Kanekura T, Huang JH, Li YP, Wang JC, Zhao M, Lu QJ, Xiao R. DNA hypermethylation of the forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4⁺ T cells of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 査読有, 171, 2014, 39-47.

DOI: 10.1111/bjd.12913.

Kubo H, Hayashi T, Ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Forensic diagnosis of ante- and postmortem burn based on aquaporin-3 gene expression in the skin. *Legal Med.* 査読有, 16, 2014, 128-134.

Yamamoto M, Arimura H, Fukushima T, Tanimoto A, Kanekura T, Nakagawa M, Akiyama S, Furukawa T. Abcb 10 knockout mice causes anemia with protoporphyrin IX and iron accumulation: Abcb 10 is essential for heme biosynthesis. *Mol Cell Biol.* 査読有, 34, 2014, 1077-1084.
DOI: 10.1128/MCB.00865-13.

Yonekura K, Kanzaki T, Gunshin K, Kawkami N, Takatsuka Y, Nakano N, Tokunaga M, Kubota A, Takeuchi S, Kanekura T, Utsunomiya A. Effect of anti-CCR4 monoclonal antibody (Mogamulizumab) on adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL): Cutaneous adverse reactions may predict the prognosis. *J Dermatol.* 査読有, 41, 2014, 239-244.
DOI: 10.1111/1346-8138.12419.

Ibusuki A, Kawai K, Yoshida S, Uchida Y, Nitahara-Takeuchi A, Kuroki K, Kajiwara M, Ose T, Maenaka K, Kasahara M, Kanekura T. NKG2D triggers cytotoxicity in murine epidermal $\gamma\delta$ T cells via PI3K-dependent, Syk/ZAP70-independent signaling pathway. *J Invest Dermatol.* 査読有, 134, 2014, 396-404.
DOI: 10.1038/jid.2013.353.

Kubo H, Hayashi T, ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Legal Med.* 査読有, 16, 2014, 8-13.
DOI: 10.1016/j.legalmed.2013.10.002.

Uchida Y, Kawai K, Kubo H, Takeda K, Shimokawa M, Yoshii N, Kanekura T. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carrier: a coincidental association? *Eur J Dermatol.* 査読有, 23, 2013, 250-251.
DOI: 10.1684/ejd.2013.1989.

Kloepper JE, Kawai K, Bertolini M, Kanekura T, Paus R. Loss of T-cells results in hair cycle defects. *J Invest Dermatol.* 査読有, 133, 2013, 1666-1669.
DOI: 10.1038/jid.2013.17.

Shimokawa M, Haraguchi M, Kobayashi W, Higashi Y, Matsushita S, Kawai K, Kanekura T, Ozawa M. The transcription factor Snail expressed in cutaneous squamous cell carcinoma induces epithelial-mesenchymal transition and down-regulates COX-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 430, 2013, 1078-1082.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.035.

Ogawa Y, Tanaka M, Tanabe M, Suzuki T, Togawa T, Fukushima T, Kanekura T, Sakuraba H, Oishi K. Impaired neural differentiation of induced pluripotent stem cells generated from a mouse model of Sandhoff disease. *PLoS One.* 査読有, 8, 2013, e55856.

DOI: 10.1371/journal.pone.0055856.

Haraguchi M, Indo HP, Iwasaki Y, Fukushima T, Majima HJ, Izumo K, Horiuchi M, Kanekura T, Furukawa T, Ozawa M. Snail modulates cell metabolism in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 432, 2013, 618-625.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.035.

Wang Y, Yang Y, Luo Y, Yin Y, Wang Q, Li Y, Kanekura T, Wang J, Liang G, Zhao M, Lu Q, Xiao R. Aberrant histone modification in peripheral blood B cells from patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol.* 査読有, 149, 2013, 46-54.

DOI: 10.1016/j.clim.2013.06.006.

Baba N, Higashi Y, Kanekura T. Japanese black vinegar "Izumi" inhibits the proliferation of human squamous cell carcinoma cells via necroptosis. *Nutr Cancer.* 査読有, 65, 2013, 1093-1097.

DOI: 10.1080/01635581.2013.815234.

Tamai M, Matsushita S, Miyano H, Imuta N, Ikeda R, Kawai K, Nishi J, Sakamoto A, Shigihara T, Kanekura T. Antimicrobial effect of an ultrasonic levitation washer disinfectant with silver electrolysis and ozone oxidation on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Dermatol.* 査読有, 40, 2013, 1020-1026.

DOI: 10.1111/1346-8138.12327.

21 Do HTT, Koriyama C, Khan NA, Higashi M, Kato T, Le NT, Matsushita S, Kanekura T, Akiba S. The etiologic role of human papillomavirus in penile cancers — A study in Vietnam. *Br J Cancer.* 査読有, 108, 2013, 229-233.

DOI: 10.1038/bjc.2012.583.

[学会発表](計6件)

畠中美帆、東 裕子、福重智子、馬場直子、河井一浩、金蔵拓郎. 悪性黒色腫の浸潤・転移における CD147/Basigin の役割 細胞間伝達機構についての検討 . 第 165 回日本皮膚科学会鹿児島地方会. 2013.4.14. 鹿児島県鹿児島市 (鹿児島大学医学部).

金蔵拓郎. CD147/Basigin と癌. 第 31 回岡山研究皮膚科フォーラム. 2013.5.18. 岡山県岡山市 (岡山コンベンションセンター).

畠中美帆、東 裕子、金蔵拓郎. CD147

ノックダウンと EGFR 阻害剤の併用による悪性黒色腫細胞の増殖抑制効果について. 第 167 回日本皮膚科学会鹿児島地方会. 2013.12.15. 鹿児島県鹿児島市 (城山観光ホテル).

畠中美帆、東 裕子、福重智子、馬場直子、河井一浩、金蔵拓郎. 悪性黒色腫の浸潤・転移における CD147/Basigin の役割 細胞間伝達機構についての検討 . 第 2 回ケラチノサイトと免疫を勉強する会. 2014.3.29. 東京都千代田区 (ホテルモントレ半蔵門).

金蔵拓郎. CD147/Basigin と癌. 愛媛大学大学院分子病態医学セミナー. 2015.9.18. 愛媛県松山市(愛媛大学医学部).

Hatanaka M, Higashi Y, Kawai K, Su J, Zeng W, Chen X, Kanekura T. CD147-targeted siRNA in A375 malignant melanoma cells induces the phosphorylation of EGFR by down-regulation of MEK and cdc25C. 第 29 回表皮細胞研究会. 2015.11.14. 佐賀県佐賀市 (ホテルニューオータニ佐賀).

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

金蔵 拓郎 (Kanekura, Takuro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号 : 70177509

(2)研究分担者

()