

令和元年5月17日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10503

研究課題名(和文) 癌C5aR、C5a遊離プロテアーゼを標的とした治療法の確立

研究課題名(英文) establishment of cancer treatment targeting C5a receptor and proteinase released by cancer cells

研究代表者

新田 英利 (NITTA, Hidetoshi)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：90555749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Hepatic stellate cell (HSC)と大腸癌肝転移におけるC5a-C5aR機構を介した転移・浸潤メカニズムを解析し、tumor-stromal interactionにおけるC5aRの役割について解析した。ヒト大腸癌細胞株およびヒトHSCはC5aRの発現を認め、さらにC5aR発現を有するHSCをC5aで刺激したところ、時間依存的にSMAの発現亢進を認めた。C5aにより活性化されたHSCは癌細胞の浸潤能を亢進させた。

以上よりC5a-C5aRはHSCを活性化させ、癌細胞の浸潤能を亢進させることからC5a-C5aRが大腸癌肝転移巢の転移・増殖に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌肝転移は近年増加の一途をたどっており、新規抗癌剤・分子標的薬の導入で生存期間は延びてきているが治癒にいたることは稀であり、新たな治療法の確立が望まれる。今回の研究結果において肝星細胞(HSC)は免疫系を担う補体の一種であるC5aで活性化し、C5aにより活性化されたHSCは癌細胞の浸潤能を亢進させることが分かった。

よってC5a-C5aRをターゲットとすること(C5aR-antagonist等)により癌の進展を抑制させる可能性があり新しい大腸癌肝転移の治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate a tumor-stromal interaction via C5aR in colorectal liver metastasis. Several human colon cancer cell lines and HSC cell line (LX2) expressed C5a receptor. C5a increased SMA expression on HSC in time dependent manner, which suggested that C5a activated HSC via C5a receptor. Moreover, invasion assay analysis revealed that the activated HSC by C5a enhanced invasiveness of human cancer cells. These results illustrate a novel activity of the C5a-C5aR axis that promotes cancer cell invasion through activation of HSC. Targeting this signaling pathway may provide a useful therapeutic option for colorectal liver metastasis treatment.

研究分野：医歯薬学 腫瘍医学

キーワード：補体C5a C5a受容体 肝星細胞 大腸癌肝転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、補体C5aおよびその受容体であるC5areceptor(C5aR)はヒトの固形癌に発現し、癌細胞の浸潤能を亢進させることが明らかになってきた。さらに、癌の微小環境においてC5aRを介して自身の増殖、浸潤に有利な環境を作り出している可能性がある。例えば癌の微小環境において産生されたC5aは骨髄からMyeloidderived suppressor cellを動員し、CD8+T cellの抗腫瘍効果を抑制することで腫瘍増殖を促進させる。また肝stellate cell (HSC)はC5aR発現を有し、C5aにより活性化され、SMA発現やヒアルロン酸の産生を促進することで肝の線維化を誘導する。活性化したHSCは肝内胆管癌や大腸癌肝転移の浸潤を促進するとの報告もある。以上より、C5aRは癌細胞自身に発現し、自身の浸潤・転移能を獲得している以外にも、このような癌と間質はC5a-C5aR axisを介して浸潤・転移を促進させている可能性が考えられるがその効果・メカニズムは不明である。癌細胞自身にC5aRの発現がなくても間質のC5aRを治療標的とし、その相互作用を抑制することで癌の浸潤・転移を抑制できる可能性がある。

大腸癌肝転移は近年増加の一途をたどっており、新規抗癌剤・分子標的薬の導入で生存期間は延びてきているが治癒にいたることは稀であり、新たな治療法の確立が望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝HSCに着目してこれら間質細胞と肝癌、とくに大腸癌肝転移におけるC5a-C5aR機構を介した転移・浸潤メカニズムを解析し、tumor-stromal interactionにおけるC5aRの役割について解析する。さらに臨床応用につながることを目指しこれらをターゲットとした治療効果について検討する。

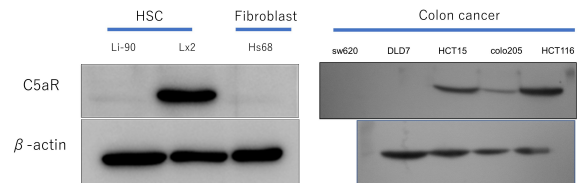
3. 研究の方法

- 1) ヒト大腸癌肝転移組織において HSC が活性化状態にあるか否かを同定
- 2) ヒト HSC が C5aR の発現を有することを Western Blotting で証明
- 3) ヒト HSC が C5a により活性化することを Western Blotting で証明
- 4) ヒト HSC が C5a-C5aR axis を介して癌の増殖能・浸潤能を増強するかどうかを proliferation assay・invasion assay で評価

4. 研究成果

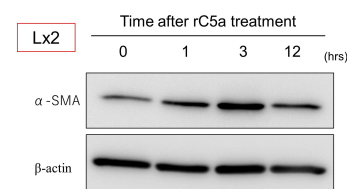
- 1) ヒト大腸癌肝転移切除標本の HSC における C5aR の発現について検討した。切除標本を抗 C5aR 抗体、抗 SMA 抗体でそれぞれ二重蛍光免疫染色、共焦点顕微鏡で確認したところ、SMA を発現している細胞に一致して C5aR を発現していることが確認された。

- 2) ヒト HSC 細胞株 LX2 において C5aR の発現を認めた。ヒト大腸癌細胞株では HCT15、HCT116、colo205 に高発現を認め、DLD1、SW620 には発現を認めなかった(右図)



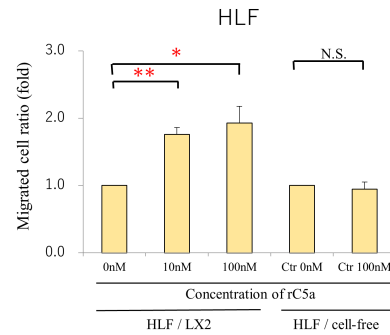
- 3) 次に、C5aR 発現を有する LX2 に recombinant C5a (rC5a)で刺激したところ、時間依存的に SMA の発現亢進を認めたことから、C5a-C5aR により HSC の活性化が起こっていることが示唆された(右図)。

Change of α SMA-expression after rC5a treatment



- 4) ヒト HSC が癌細胞の浸潤に与える影響について検討した。Invasion assay kit を用いて実

験を行った。Chamber の下層に LX2 を、上層に C5aR の発現のないヒト癌細胞株 (HLF) をアプライし、下層の LX2 を rC5a で刺激したところ、濃度依存的に HCC 細胞株の浸潤能が上昇することがわかった (右図)。



- 5) LX2 を C5aR antagonist (W-54011) と一定時間反応させ、C5a で刺激した後、癌細胞の浸潤能について検討した結果、W-54011 の存在下では癌細胞株の浸潤能は亢進しなかった。よって C5aR antagonist は HSC を介した癌細胞の浸潤能を抑制することがわかった。

以上の結果から、ヒト HSC は C5aR を介して活性化され、癌の浸潤能を増強させていることが分かった。C5a - C5aR は新たな大腸癌肝転移の治療ターゲットとなりうることが示唆された。

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 13 件)

1. Yoneda M, Imamura R, Nitta H, Taniguchi K, Saito F, Kikuchi K, Ogi H, Tanaka T, Katabuchi H, Nakayama H, Imamura T: Enhancement of cancer invasion and growth via the C5a-C5a receptor system: Implications for cancer promotion by autoimmune diseases and association with cervical cancer invasion. *Oncol Lett.* 17(1):913-920, 2019. 査読あり doi: 10.3892/ol.2018.9715
2. Arima K, Nitta H, Beppu T, Nakagawa S, Okabe H, Imai K, Chikamoto A, Yamashita YI, Yamashita Y, Baba H: Impact of Repeated Hepatectomy on Liver Regeneration in Hepatocellular Carcinoma: A Propensity Score-based Analysis. *Anticancer Res.* Feb;39(2):965-970, 2019 査読あり doi: 10.21873/anticancer.13200.
3. Imai K, Yamashita YI, Miyamoto Y, Nakao Y, Yusa T, Itoyama R, Nakagawa S, Okabe H, Hiyoshi Y, Nitta H, Chikamoto A, Baba H: Implication of primary tumor location for the indication of preoperative chemotherapy in patients with colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*. 21(4):405-412, 2019 査読あり doi: 10.1016/j.hpb.2018.08.012
4. Kurashige J, Yokobori T, Mima K, Sawada G, Takahashi Y, Ueo H, Takano Y, Matsumura T, Uchi R, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Mori M, Baba H, Mimori K: Plastin3 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in gastric cancer. *Oncol Lett.* 17(2):2393-2399, 2019 査読あり doi: 10.3892/ol.2018.9819
5. Saeki H, Oki E, Kashiwada T, Arigami T, Makiyama A, Iwatsuki M, Narita Y, Satake H, Matsuda Y, Sonoda H, Shimokawa M, Maehara Y: Re-evaluation of HER2 status in patients with HER2-positive advanced or recurrent gastric cancer refractory to trastuzumab (KSCC1604). *Eur J Cancer.* 105:41-49, 2018 査読あり doi: 10.1016/j.ejca.2018.09.024
6. Iwatsuki M, Harada K, Iwagami S, Eto K, Ishimoto T, Baba Y, Yoshida N, Ajani JA, Baba H: Neoadjuvant and adjuvant therapy for gastrointestinal stromal tumors. *Ann Gastroenterol Surg.* 27;3(1):43-49, 2018 査読あり doi: 10.1002/ags3.12211

7. Miyake K, Baba Y, Ishimoto T, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Ogata Y, Nagayama M, Silsirivanit A, Kobayashi D, Araki N, Baba H: Isocitrate dehydrogenase gene mutations and 2-hydroxyglutarate accumulation in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 30;36(1):11,2018 査読あり
doi: 10.1007/s12032-018-1229-x
8. Tsukamoto M, Nitta H, Imai K, Higashi T, Nakagawa S, Okabe H, Arima K, Kaida T, Taki K, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H: Clinical significance of half-lives of tumor markers -fetoprotein and des- -carboxy prothrombin after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2018;48:E183-E193. 査読あり
doi: 10.1111/hepr.12942
9. Kaida T, Nitta H, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Higashi T, Taki K, Nakagawa S, Okabe H, Hayashi H, Imai K, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H: Preoperative platelet-to-lymphocyte ratio can predict recurrence beyond the Milan criteria after hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2017;47(10):991-999. 査読あり doi: 10.1111/hepr.12835
10. Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P: Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rhomboid 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells. *Gastroenterology*. 153(1):191-204, 2017 査読あり
doi: 10.1053/j.gastro.2017.03.046
11. Nitta H, Nakagawa S, Kaida T, Arima K, Higashi T, Taki K, Okabe H, Hayashi H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H: Pre-treatment double- or triple-positive tumor markers are predictive of a poor outcome for patients undergoing radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Surg Today* 2017(47):375-84, 2017. 査読あり
doi: 10.1007/s00595-016-1385-6
12. Kaida T, Nitta H, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Izumi D, Higashi T, Kurashige J, Imai K, Hayashi H, Iwatsuki M, Ishimoto T, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Imamura T, Ishiko T, Beppu T, Baba H: C5a receptor (CD88) promotes motility and invasiveness of gastric cancer by activating RhoA. *Oncotarget* 7(51):84798-809, 2016. 査読あり doi: 10.18632/oncotarget.12656
13. Nitta H, Shimose T, Emi Y, Imamura T, Ohnishi K, Kusumoto T, Yamamoto M, Fukuzawa K, Takahashi I, Higashi H, Tsuji A, Akagi Y, Oki E, Maehara Y, Baba H, Kyushu Study Group of Clinical Cancer ancillary s: Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in gastric cancer: implications for vascular invasion and patient outcomes. *Med Oncol* 33(11):118, 2016. 査読あり doi: 10.1007/s12032-016-0834-9

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 新田英利、松村和季、東孝暁、清水健次、小川克大、増田稔郎、赤星慎一、松本克孝、生田義明、沖野哲也、高森啓史．腹腔鏡下肝切除術の conversion 例の検討 第 119 回日本外科学会総会 2019

2. Hidetoshi Nitta, Toshihiko Yusa, Yosuke Nakao, Rumi Itoyama, Yuki Kitano, Shigeki Nakagawa, Hirohisa Okabe, Katsunori Imai, Yo-ichi Yamashita, Akira Chikamoto, Hideo Baba. Assessment and validation of functional liver resection rate considering venous occlusive area after extended hepatectomy The 30th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary Pancreatic Surgery. 2018.
3. 新田英利、松村和季、東孝暁、清水健次、小川克大、増田稔郎、赤星慎一、松本克孝、生田義明、沖野哲也、高森啓史 腹腔鏡下肝切除術後疼痛が与える影響 第33回日本内視鏡外科学会総会 2018
4. 新田英利、木下翔太郎、松本嵩史、遊佐俊彦、中尾陽佑、伊東山瑠美、北野雄希、中川茂樹、岡部弘尚、今井克憲、山下洋市、近本亮、馬場秀夫 Treatment strategy for recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma 第73回日本消化器外科学会総会 2018

〔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 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)研究分担者

研究分担者名：岩槻 政晃
ローマ字氏名：IWATSUKI, masaaki
所属研究機関名：熊本大学
部局名：大学院生命科学研究部(医)
職名：助教
研究者番号(8桁): 50452777

研究分担者名：藏重 淳二
ローマ字氏名：KURASHIGE, junji
所属研究機関名：熊本大学
部局名：医学部附属病院
職名：非常勤診療医師
研究者番号(8桁): 90594474

研究分担者名：小澄 敬祐

ローマ字氏名：KOSUMI, keisuke
所属研究機関名：熊本大学
部局名：医学部附属病院
職名：非常勤診療医師
研究者番号（8桁）：50594884

研究分担者名：石本 崇胤
ローマ字氏名：ISHIMOTO, takatsugu
所属研究機関名：熊本大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任准教授
研究者番号（8桁）：00594889

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。