

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09081

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞におけるC5a受容体を標的とした膵癌幹細胞制御

研究課題名(英文) Targeting therapy of C5a receptor on cancer associated fibroblast control pancreatic cancer stemness

研究代表者

新田 英利(Nitta, Hidetoshi)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：90555749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌においてC5a-C5aRを治療ターゲットとすることで癌幹細胞を制御し膵癌治療につながる可能性がある。また癌関連線維芽細胞CAFs上に発現したC5aRをターゲットすることで新たな癌治療の道を切り開く可能性がある。今までの研究結果として、C5aR陽性の膵癌由来CAFsにおいてC5aと反応することでactivateされ、さらにC5aで刺激したCAFsと癌細胞を共培養することで癌細胞の浸潤能が高まることが明らかとなった。以上よりCAFsに発現したC5aRをブロックすることが膵癌細胞の進展を抑えることが示唆された。一方で今回の解析でC5aと膵癌幹細胞の関連性については示すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性癌の代表格である膵癌は腫瘍の増大に間質増生を伴うことが特徴的である。特に膵癌間質細胞の大部分をしめるCAFsは膵癌の浸潤、制癌剤耐性に重要な働きを示している。今回の研究結果からCAFsはC5aRを発現しており、これがC5aによって刺激されることが明らかとなった。さらにC5aで刺激されたCAFsは膵癌細胞の浸潤能を高めることが分かった。以上より膵癌においてC5aRをターゲットとした治療が有効であることが示唆されたため、膵癌の新たな治療として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Targeting C5a-C5aR therapeutically in pancreatic cancer may control cancer stem cells and lead to new pancreatic cancer treatments. In addition, targeting C5aR expressed on cancer-associated fibroblasts (CAF) may lead to new targeting therapy for pancreatic cancer. From the results of our research, we revealed that C5aR-positive CAFs are activated by C5a, and that co-culturing C5a-stimulated CAFs and pancreatic cancer cells enhances the invasion ability of cancer cells. From the above, it was suggested that blocking C5aR expressed in CAFs suppresses the progression of pancreatic cancer cells, so C5aR may become a new target in pancreatic cancer in the future. However, we examined the sphere-forming ability of C5a and pancreatic cancer stem cells, but could not demonstrate the relationship between C5a and cancer stem cells.

研究分野：Cancer cell biology

キーワード：C5a receptor C5a Pancreatic cancer CAFs cancer stemness

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞における補体 C5a 受容体 (C5aR) 発現の意義について

補体は抗原抗体反応を介して活性化することで、微生物に対するオプソニン効果、membrane attack complex による細胞壁の破壊、好中球遊走を惹起し免疫反応を助長する。補体経路活性化の過程で産生される C5a は補体系タンパクのなかで最も強力な炎症反応惹起作用を有している。近年、C5a およびその受容体である C5a 受容体 (C5aR) は細菌感染以外にも関節リウマチ、敗血症、肺炎、動脈硬化、白血病を増悪させる因子であることが明らかとなった。さらに肝星細胞・膵星細胞 (PSCs) の線維化を誘導し、慢性肝炎・慢性膵炎の原因として着目されつつある (Immunology 2013, Gastroenterology 2015)。われわれは以前、食道癌、胃癌、大腸癌、肝細胞癌、胆管癌、膵癌、腎癌などの固形癌に C5aR が発現しており、胆管癌において C5aR は C5a と結合することで MMPs を産生し癌の浸潤・転移を促進させることを明らかにした (H Nitta, et al. Clin Cancer Res, 2013)。また胃癌においては C5aR 高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良であり (H Nitta, et al. Med Oncol 2016) C5aR 高発現胃癌細胞は C5a と反応することで細胞形態を変化させ、RhoA の活性化が起こり浸潤能を獲得していることを報告した (T Kaida, H Nitta, et al. Oncotarget 2016)。以上より癌細胞に発現する C5aR はさまざまなメカニズムで癌細胞の浸潤・転移に関与していることが明らかになってきた。

(2) Cancer Associated Fibroblasts (CAFs) と C5aR

難治性癌の代表格である膵癌は腫瘍の増大に間質増生を伴うことが特徴的である。特に膵癌間質細胞の大部分をしめる CAFs は膵癌の浸潤、制癌剤耐性に重要な働きを示している (Nature Commun 2019)。最近、肺癌・乳癌の CAFs は自身の細胞膜に発現した C5aR (GPR77) とそのリガンドである C5a を細胞膜上で反応させることで p65 リン酸化、NF- κ B を活性化し炎症性サイトカイン (IL-6, 8) を分泌し癌幹細胞の機能維持や乳癌の制癌剤耐性に重要な役割を示していることが明らかとなった (Cell 2018)。

膵癌においても癌幹細胞は制癌剤耐性に寄与していることから (Sci Rep 2015)、C5a-C5aR を治療ターゲットとすることで癌幹細胞を制御し新たな膵癌治療につながる可能性がある。以上から癌組織から抽出した CAFs は C5aR を介してさまざまなサイトカインを分泌し癌の進展や制癌剤耐性あるいは癌幹細胞の機能維持を介して予後を悪化させている可能性があるが、果たして膵癌において CAFs が C5aR を介した癌進展・制癌剤耐性に寄与しているかは明らかではない。C5aR を発現した膵癌細胞をターゲットとするだけでなく、CAFs 上に発現した C5aR あるいは CAFs から分泌される C5a をターゲットすることで新たな癌治療の道を切り開く可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CAFs に着目してこれら間質細胞と膵癌における C5a-C5aR 機構を介した転移・浸潤メカニズムを解析する。さらに臨床応用を目指しこれらをターゲットとした新たな膵癌治療の効果について検討する。とくに C5aR antagonist である PMX53 は他分野で臨床応用されており、本実験結果から癌治療の臨床応用につながる可能性が高いと考える。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌組織から抽出したCAFのC5aR発現の確認、および臨床病理学的因子との関連性

まずヒト膵癌組織から CAFs を樹立し、C5aR 発現の程度を評価する。またヒト膵癌組織を用いて C5aR および SMA の蛍光二重免疫染色を行い CAFs の C5aR 発現を確認する。同時に共焦点顕微鏡にて SMA と C5aR が発現している CAFs の一致性を確認する。さらに CAFs における C5aR 発現が臨床病理学的因子および予後とどのような関連性を持つか検討する。

(2) C5aRを介したCAFの活性化が膵癌幹細胞に与える影響とその因子の特定

In vitro における CAFs の C5aR 発現を確認し、C5aR を介した膵癌の stemness に与える影響を検討。具体的には CAFs の condition medium (CM) を膵癌細胞株に加え sphere 形成能を解析する。次に si-RNA で C5aR を knock down した CAFs や C5aR-antagonist で treat した CAFs の CM が癌細胞の sphere 形成能を低下させるか否かを解析する。さらに CAFs と膵癌細胞株の共培養下での膵癌細胞株の幹細胞マーカー (CD44+, CD133+など) を評価し、C5aR-antagonist や si-RNA がマーカー発現の低下を促すか否かを評価する。サイトカインアレイを用いて stemness 獲得にどのようなサイトカインが関与しているかを解析する。

(3) In vivo による抗 C5aR 治療の治療可能性

最後にマウスを用いて CAFs と膵癌細胞を移植した patients derived xenograft を作成する。PMX53 の経口投与による腫瘍の縮小効果、制癌剤の感受性増加や予後との関連性について検討し、C5aR-antagonist の治療効果を検討する。

4. 研究成果

ヒト膵癌組織を用いて C5aR 抗体および SMA 抗体を用いて蛍光二重染色を用いた結果、CAF が C5aR を発現していることが確認できた。また臨床病理学的にも C5aR 陽性かつ SMA 陽性細胞を高率に発現する膵癌症例は低率に発現する症例にくらべ癌の進行度が高く、予後不良であることがわかった。

樹立した CAFs 細胞株を用いて RT-PCR および Western blotting を行い C5aR の発現を確認できた。CAFs に C5a を加えた際、SMA の発現の増加を認めたことから C5a 陽性 CAFs において C5a と反応することで activate されることが示唆された。さらに C5a で刺激した CAFs と Cancer cell を共培養することで Cancer cell の浸潤能が高まることが invasion assay で示された。一方で C5a で刺激した CAFs が膵癌幹細胞の sphere 形成能を有するかについて解析したが sphere 形成能については同定できなかった。

現在 C5a で刺激した CAFs がどのようなメカニズムで癌細胞の浸潤能を亢進させているかサイトカインアレイを用いて検討中である。さらにマウスを用いた PMX53 の抗腫瘍効果については現在準備段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Liu Zhao, Hayashi Hiromitsu, Matsumura Kazuki, Uemura Norio, Shiraishi Yuta, Sato Hiroki, Baba Hideo	4. 巻 15
2. 論文標題 Biological and Clinical Impacts of Glucose Metabolism in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 498 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15020498	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 -

1. 著者名 Liu Zhao, Hayashi Hiromitsu, Matsumura Kazuki, Ogata Yoko, Sato Hiroki, Shiraishi Yuta, Uemura Norio, Miyata Tatsunori, Higashi Takaaki, Nakagawa Shigeki, Mima Kosuke, Imai Katsunori, Baba Hideo	4. 巻 128
2. 論文標題 Hyperglycaemia induces metabolic reprogramming into a glycolytic phenotype and promotes epithelial-mesenchymal transitions via YAP/TAZ-Hedgehog signalling axis in pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 844 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-022-02106-9	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 -

1. 著者名 Nishiwada Satoshi, Shimura Tadanobu, Yamamura Kensuke, Nakagawa Kenji, Nagai Minako, Nakamura Kota, Terai Taichi, Yamada Suguru, Fujii Tsutomu, Kodera Yasuhiro, Sho Masayuki, Goel Ajay	4. 巻 128
2. 論文標題 Clinical significance and functional role of adhesion G-protein-coupled receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 321 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-022-02057-1	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 -

1. 著者名 Matsumura Kazuki, Hayashi Hiromitsu, Uemura Norio, Ogata Yoko, Zhao Liu, Sato Hiroki, Shiraishi Yuta, Kuroki Hideyuki, Kitamura Fumimasa, Kaida Takayoshi, Higashi Takaaki, Nakagawa Shigeki, Mima Kosuke, Imai Katsunori, Yamashita Yo-ichi, Baba Hideo	4. 巻 26
2. 論文標題 Thrombospondin-1 overexpression stimulates loss of Smad4 and accelerates malignant behavior via TGF- β signal activation in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101533 ~ 101533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2022.101533	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 -

1. 著者名 Lan Chuan, Yamashita Yo-ichi, Hayashi Hiromitsu, Nakagawa Shigeki, Imai Katsunori, Mima Kosuke, Kaida Takayoshi, Matsumoto Takashi, Maruno Masataka, Liu Zhao, Wu Xiyu, Wei Feng, Baba Hideo	4. 巻 29
2. 論文標題 High Expression of Bloom Syndrome Helicase is a Key Factor for Poor Prognosis and Advanced Malignancy in Patients with Pancreatic Cancer: A Retrospective Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 3551 ~ 3564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-11500-9	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北村文優、石本崇胤、木下翔太郎、松本嵩史、武末亨、松村和季、秋山貴彦、丸野正敬、甲斐田剛圭、中川茂樹、美馬浩介、今井克憲、林洋光、山下洋市、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌が産生する乳酸が腫瘍微小環境に与える影響に関する分子生物学的検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村和季、林洋光、北村文優、甲斐田剛圭、中川茂樹、美馬浩介、今井克憲、山下洋市、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌間質に由来する Thrombospondin-1 は膵癌の増殖・浸潤に寄与する
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石裕大、中川茂樹、湯本信成、小川大輔、佐藤寛紀、松本嵩史、武末亨、丸野正敬、塚本雅代、甲斐田剛圭、美馬浩介、林洋光、今井克憲、山下洋市、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌患者のグラスゴー予後スコア (GPS) におけるconditional borderlineresectable (C-BR) 症例と術後の合併症および長期予後の検討
3. 学会等名 第43回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Mima, Hiromitsu Hayashi, Shigeki Nakagawa, Takashi Matsumoto, Shotaro Kinoshita, Kazuki Matsumura, Fumimasa Kitamura, Norio Uemura, Yosuke Nakao, Rumi Itoyama, Takayoshi Kaida, Katsunori Imai, Yo-ichi Yamashita, Hideo Baba
2. 発表標題 Preoperative frailty is associated with poor prognosis after resection for pancreatic cancer
3. 学会等名 第34回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Matsumura, Hiromitsu Hayashi, Norio Uemura, Fumimasa Kitamura, Shigeki Nakagawa, Kosuke Mima, Katsunori Imai, Yo-ichi Yamashita, Hideo Baba
2. 発表標題 Cancer associated fibroblast promotes malignant behavior pancreatic cancer by expressing thrombospondin-1 according to tissue stiffness
3. 学会等名 第34回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2022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	今井 克憲 (Imai Katsunori) (60555746)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	
研究分担者	林 洋光 (Hayashi Hiromitsu) (80625773)	熊本大学・病院・講師 (17401)	
研究分担者	山村 謙介 (Yamamura Kensuke) (10816507)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------