

平成30年5月25日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10171

研究課題名(和文) 癌微小周囲環境における補体を介した間質細胞の増殖・転移促進効果に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of tumor-stromal interaction via complement C5a receptor in cancer microenvironment

研究代表者

中原 修 (NAKAHARA, Osamu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40583042

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)：本研究の目的は、肝hepatic stellate cell(HSC)と肝細胞癌(HCC)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ことである。  
ヒトHSC細胞株においてC5aRの発現を認めrecombinant C5a(rC5a)刺激により時間依存的に SMAの発現亢進を認めた。活性化したヒトHSCはHCC細胞株の浸潤能を増強させ、これはC5aR-antagonistにより抑制された。  
以上の結果からC5a-C5aRを介した活性化HSCはヒトHCC細胞株の浸潤能を高めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Aim of this study is to analyze tumor-stromal interaction via C5a-C5aR axis in hepatocellular carcinoma (HCC).

At first, we investigated whether human hepatic stellate cells (HSC) were in activated state or not in resected HCC specimen using confocal microscope. The result that SMA staining, which is marker of activation in HSC, was detected in HSC around HCC lesions, meant that HSC was in activated state around human HCCs. In vitro, western blotting analysis revealed C5aR expression at HSC in a time dependent manner. Moreover, HSC increased SMA expression by C5a stimulation. Therefore, HSC could be activated by C5a-C5aR axis. In addition, C5a stimulation increased HCC invasion and that was inhibited by C5aR-antagonist. From these results, C5a-C5aR could be a target therapy for HCC treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：C5a受容体 ヒト肝星細胞 肝細胞癌

### 1. 研究開始当初の背景

補体は近年、補体 C5a に対する受容体 C5a receptor (C5aR) は多核球以外にも血管内皮細胞、腎細胞、肺胞上皮細胞など非血液細胞自身にも発現しており、さまざまな機能を有していることが明らかになってきた。われわれは以前、胃癌や胆管細胞癌患者の癌細胞自身に C5aR が発現しており、C5a-C5aR を利用することで浸潤・増殖を促進していることから新たな癌治療ターゲットとなりうることを報告した。一方で、癌の微小環境において tumor-stromal interaction により癌自身の増殖、浸潤に有利な環境を作り出している可能性がある。Xu らは肝 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と報告している。また Okabe らは活性化した HSC は肝内胆管癌や大腸癌肝転移の浸潤を促進すると報告している。よって肝 HSC は C5aR を介して活性化することで、さまざまなケモカインを産生し、癌の浸潤を促進させている可能性がある。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ため、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。

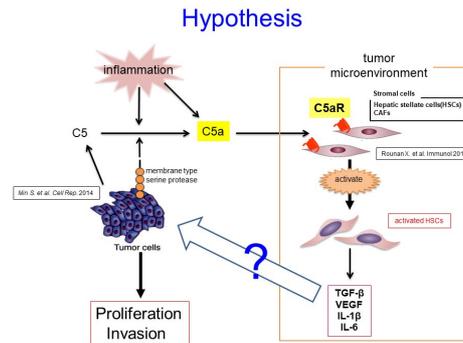
### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝 hepatic stellate cell (HSC) と癌周囲の線維芽細胞 cancer associated fibroblast (CAF) に着目してこれら間質細胞と肝細胞癌 (HCC) 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ことである。

### 3. 研究の方法

1) ヒト肝細胞癌組織において HSC が活性化状態にあるか否かを同定

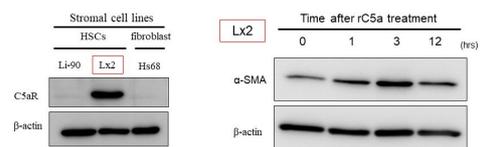
- 2) ヒト HSC が C5aR の発現を有することを Western Blotting で証明
- 3) ヒト HSC が C5a により活性化することを Western Blotting で証明
- 4) ヒト HSC が C5a-C5aR axis を介して HCC の増殖能・浸潤能を増強するかどうかを proliferation assay・invasion assay で評価



### 4. 研究成果

- 1) ヒト HCC 切除標本の HSC における C5aR の発現について検討した。HCC 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 HCC 細胞株では HuH1、HuH7 に高発現を認め、HLF、HLE には発現を認めなかった。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 (figure)。

Change of αSMA-expression after rC5a treatment



- 3) ヒト HSC が HCC 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 HCC 細胞株 (HLF、HLE) 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。

- 4) LX2 を C5aR antagonist (W-54011) と一定時間反応させ、C5a で刺激した後、HCC の浸潤能について検討した結果、W-54011 の存在下では HCC 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 HCC 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、HCC 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 HCC 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7件)

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.

Kaida T, Higashi T, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Taki K, Imai K, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Namimoto T, Nakahara O, Beppu T, Baba H: Degenerative hepatic hemangioma mimicking biliary

cystadenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 31(8):1385, 2016. 査読あり  
doi: 10.1111/jgh.13325

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

Nitta H, Baba H, Sugimori K, Furuse J, Ohkawa S, Yamamoto K, Minami H, Shimokawa M, Wakabayashi GO, Aiba K, Japan CSGo: Chemotherapy-induced Nausea and Vomiting in Patients with Hepatobiliary and Pancreatic Cancer Treated with Chemotherapy: A Prospective Observational Study by the CINV Study Group of Japan. *Anticancer Res* 36(4):1929-35, 2016. 査読あり  
<http://ar.iiarjournals.org/content/36/4/1929.long>

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  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00595-016-1385-6>

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.org/10.1111/hepr.12835

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

〔学会発表〕(計6件)

Hidetoshi Nitta, Marc-Antoine Allard, Gabriella Pittau, Oriana Ciaccio, Eric Vibert, Antonio Sa Cunha, Daniel Cherqui, Denis Castaing, Henri Bismuth, Hideo Baba, and René Adam. Prognostic value and prediction of extra-tumoral microvascular invasion among candidates for hepatectomy or liver transplantation for HCC. EASL2017. 2017.4.19. Amsterdam, Netherlands.

Hidetoshi Nitta, Marc-Antoine Allard, Mylène Sebah, Gabriella Pittau, Oriana Ciaccio, Eric Vibert, Antonio Sa Cunha, Daniel Cherqui, Denis Castaing, Henri Bismuth, Catherine Guettier, Didier Samuel, Hideo Baba, and René Adam.

Predictive model for microvascular invasion of hepatocellular carcinoma among candidates for either hepatectomy or liver transplantation. ASCO2017, 2017.6.3. Chicago, USA.

甲斐田剛圭、新田英利、北野雄希、山村謙介、有馬浩太、東孝暁、高城克暢、林洋光、橋本大輔、近本亮、石河隆敏、別府透、馬場秀夫「補体 C5a 受容体を介した胃癌浸潤能の亢進」第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8-10 日名古屋国際会場(愛知)

甲斐田剛圭、新田英利、東孝暁、高城克暢、岡部弘尚、林洋光、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫「胃癌における C5a 受容体高発現の予後因子としての意義」第 70 回日本消化器外科学会 2015 年 7 月 15-17 日アクトシティ浜松(愛知)

Takayoshi Kaida, Hidetoshi Nitta, Yuki Kitano, Kensuke Yamamura, Kota Arima, Takaaki Higashi, Katunobu Taki, Hiromitsu Hayashi, Katsunori Imai, Daisuke Hashimoto, Akira Chikamoto, Toru Beppu Hideo Baba. Gastric cancer obtains invasive ability via C5a receptor.AACR /JCA Joint Conference 2016 February 16-20, 2016 Hyatt Regency Maui (Hawaii)

Takayoshi Kaida, Hidetoshi Nitta, Yuki Kitano, Kensuke Yamamura, Risa Inoue, Kota Arima, Takaaki Higashi, Katunobu Taki, Hiromitsu Hayashi, Katsunori Imai, Daisuke Hashimoto, Akira Chikamoto, Toru Beppu, Hideo Baba. C5a receptor promotes invasive ability of gastric cancer」AACR 2016 April 16-20, 2016 Ernest N. Morial Convention Center New Orleans (USA)

〔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) 研究代表者

中原 修 (NAKAHARA, Osamu)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療 医  
師  
研究者番号：40583042

##### (2) 研究分担者

岡部 弘尚 (OKABE, Hirohisa)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40573621

橋本 大輔 (HASHIMOTO, Daisuke)  
熊本大学・医学部附属病院・その他  
研究者番号：80508507

新田 英利 (NITTA, Hidetoshi)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90555749

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )