

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460498

研究課題名(和文) 癌微小環境因子としてのC5aの癌促進解析とC5a-C5a受容体標的治療法の確立

研究課題名(英文) Investigation of cancer promotion by a cancer microenvironment factor C5a and establishment of the therapy targeting the C5a-C5a receptor system.

研究代表者

今村 隆寿 (IMAMURA, TAKAHISA)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：20176499

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)：株化乳癌4種でアナフィラトキシンC5aの受容体(C5aR)mRNA発現がみられ、C5a刺激により増殖亢進がみられた。またC5aR発現腎癌細胞株RencaではC5aによる運動性形態変化が誘導され、ERKとPI3 kinase シグナル経路を介していた。さらに、アルザス反応による癌微小環境C5a産生誘導で癌浸潤亢進がみられた。C5aR発現胃癌細胞株でもC5aは浸潤を亢進した。この作用はsiRNAによるC5aR発現消失やC5aR拮抗剤W-54011で抑制され、RhoA活性化が関与していた。C5aは癌肺転移も促進した。これら癌進展効果からC5a-C5aR系標的治療法の有効性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Anaphylatoxin C5a receptor (C5aR) was expressed in cancer cells from all organs examined and at various rates in organs. Several cancer cell lines also expressed C5aR. C5a augmented C5aR-expressing cancer cell invasion in a MMP-6 dependent manner in Matrigel chambers and in implanted nude mouse skin. C5a also enhanced cancer cell lung metastasis in a C5aR-dependent manner. By cell membrane-bound furin-like serine protease cancer cells generated C5a from C5, even in plasma, augmenting their invasiveness. These C5a effects on cancer cells were inhibited by antibodies against either C5a or C5aR, and by a C5aR antagonist. These results indicate presence of a cancer cell autoactivation pathway via C5a generation and suggest availability of a new cancer therapy targeting the C5a-C5aR axis or the cancer protease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：C5a 癌 浸潤 増殖 転移 プロテアーゼ 阻害剤 受容体拮抗剤

1. 研究開始当初の背景

炎症と癌との cross-talk は古くから知られており、炎症メディエーターケモカインの癌での受容体発現や産生能が示され、増殖や浸潤・転移への関与が解明されてきている (*Nature* 454: 436, 2008)。アナフィラトキシン C5a はケモカインと同様に受容体 (C5aR) を介して白血球を活性化し遊走や活性酸素放出などを引き起こすが、癌に対する作用は未だ不明であった。申請者は、これまでにヒトの癌組織で様々な癌細胞が種々の頻度で C5aR を発現すること、特に大腸癌、胆管癌、腎癌、前立腺癌では 50% 以上が陽性であることを明らかにしてきた。また、胆管癌細胞株を使って、C5aR 陽性癌は C5a 刺激により運動性が活発化して浸潤活性が亢進すること、これには癌細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ放出が関与していることを証明した (Nitta et al, *Clin. Cancer Res.* 19: 2004-2013, 2013)。癌組織での補体系活性化は、癌細胞破壊を誘導しないながら、ヒトや実験動物で報告されていた。申請者らは、さらに癌細胞の furin 様プロテアーゼによる血漿中 C5 から C5a 産生、これによる浸潤亢進を示した。

以上より、C5a-C5aR は癌微小環境因子として癌促進に働いていることが推定される。そこで、この系の癌促進作用をさらに解析し、標的治療への応用を計画した。

2. 研究の目的

C5a の癌促進作用を増殖、浸潤、転移について解析する。特に、免疫系が働く野生型マウスの系で同種癌 C5a-C5aR 系の浸潤・転移への効果を検討する。さらに、アルサス反応によって癌組織での C5a 産生を誘導し癌進展への効果を調べる。また、この系を標的として、抗 C5a 抗体、抗 C5aR 抗体および C5aR 拮抗剤の癌進展への抑制作用を検討する。

3. 研究の方法

1) ヒト株化乳癌細胞 C5aR 発現の解析:

数種の株化ヒト乳癌細胞の C5aR 発現を定量的 real-time polymerase chain reaction (quantitative RT-PCR) と抗 C5aR 抗体による flow cytometry で測定する。

2) C5a の癌細胞増殖亢進作用の測定:

株化ヒト癌細胞を C5a 存在下で 24 時間培養し、Cell counting Kit-8 で細胞数を測定し、培養前と比較する。さらに、C5a 受容体拮抗剤 W-54011 を癌細胞培養内に添加し、C5a の増殖亢進作用に対する抑制効果を調べる。対象: 乳癌、胃癌。

3) C5a の癌細胞転移促進作用の解析:

ヒト胆管癌細胞株 HuCCT1 に遺伝子導入によって C5aR を発現させた HuCCT1/C5aR とコントロール HuCCT1/mock を C5a で 12 時

間刺激し、ヌードマウスの尾静脈から注射して 6 週間後に肺を採取する。パラフィン組織標本を作成し、薄切切片を HE 染色と抗 Ki-67 抗体による免疫染色で癌細胞巣を同定する。切片あたりの癌細胞巣を数えて、C5a 刺激、癌細胞の C5aR 発現に関して比較する。

4) アルサス反応の誘導:

抗卵白アルブミンマウス抗体を癌細胞液に添加して皮膚接種し、直後に尾静脈から卵白アルブミンを注射して、受身アルサス反応を癌接種部皮膚に惹起する。

5) C5a 受容体発現マウス癌細胞作製:

マウス腎癌細胞株 Renca に CMV plasmid に挿入したマウス C5a 受容体遺伝子を Pro Fection Mammalian Transfection System を使って感染させた。48 時間後、G418 添加培養液中で 2 週間培養し、残存細胞を増殖させて flow cytometry で C5aR 発現を確認した。

6) C5a の癌細胞形態変化誘導の解析:

C5a 刺激による癌細胞形態変化を Alexa 488-phalloidin で蛍光ラベルした F-actin の変化を蛍光顕微鏡で観察する。

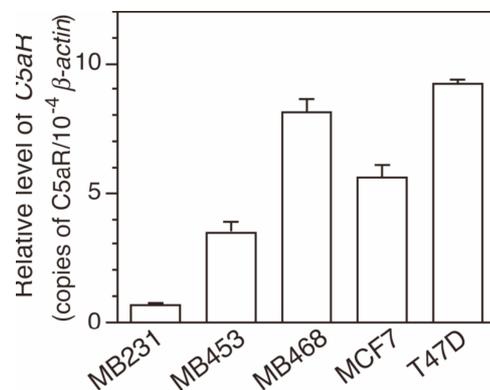
7) C5a の癌浸潤能亢進作用の測定:

C5a の癌細胞浸潤能亢進効果をマトリゲルインバージョンチャンパーアッセイで調べた。

4. 研究成果

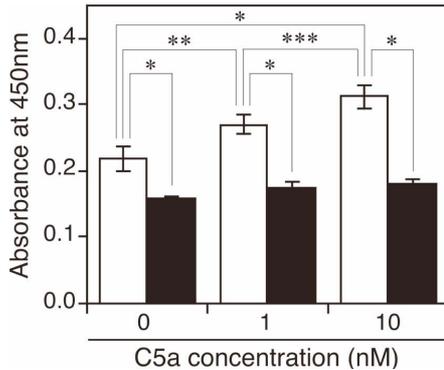
1) 株化ヒト乳癌細胞の C5aR 発現:

定量的 RT-PCR で C5aR mRNA の発現を調べると、コントロールの β アクチン mRNA コピー数の 1000 分の 1 以下のレベルであったが、T47D が最も多く、MDA-MB468、MCF-7、MDA-MB453、MDA-MB231 の順であった。細胞膜上の発現を flow cytometry で解析すると、MDA-MB-468 が最も強く、MCF-7、ZR75-1、MCF-7 と続き、MDA-MB-231、MDA-MB-453、T47D では発現がほとんど見られなかった。



2) C5a の癌細胞増殖亢進作用 :

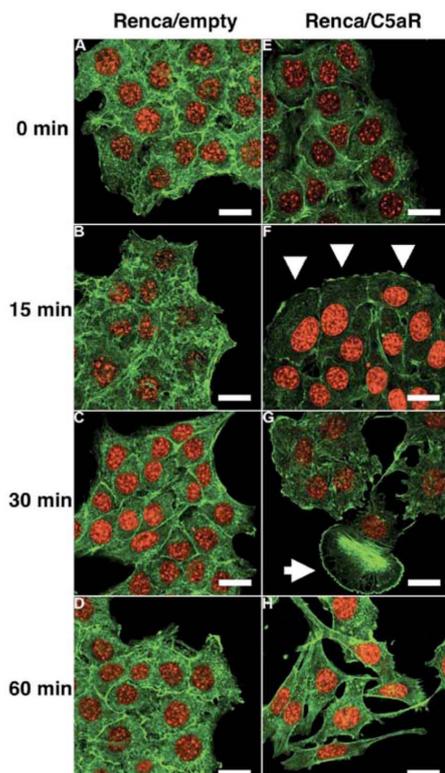
乳癌細胞 MDA-MB-468 は C5a 共存下で 24 時間培養すると、C5a 濃度 1nM、10nM と濃度に相関して増殖が約 40% 亢進し、この効果は C5aR 拮抗剤 W-54011(1 μM) で完全に抑制された。一方、C5aR 発現胃癌細胞株 MKN 1 と MKN7 では C5a による増殖亢進作用は見られなかった。



3) C5a による癌細胞の形態変化 :

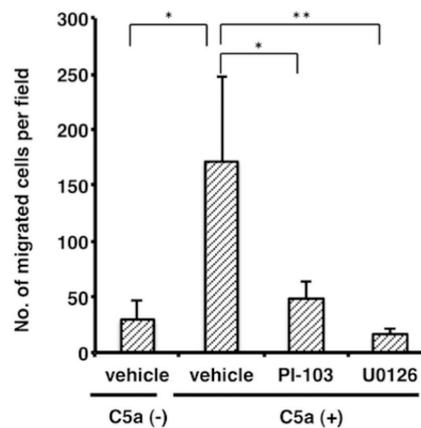
Renca/C5aR 細胞は C5a 刺激後 15 分以内に集簇した周辺の細胞で細胞膜の ruffling が出現し、F-アクチン束は細胞接着領域で減少した。15 分以後、細胞間の結合は緩くなり、いくつかの細胞では lamellipodia が形成されて細胞が伸長した形態に変化し、ストレスファイバー形成を伴って細胞集簇から遊離した。

一方、Renca/mock 細胞ではこのような細胞骨格や形態変化は見られなかった。



4) C5a による癌細胞浸潤亢進 *in vitro* :

C5a は 10 nM で Renca/C5aR 細胞の浸潤を約 6 倍亢進した。この C5a 作用は U0126(20 μM)、PI-103(0.5 μM) で各々ほぼ完全に抑制された。これは C5a-C5aR 系によって ERK と PI3K kinase シグナル経路が活性化されて浸潤が亢進したことを明らかにした。C5aR 発現胃癌細胞株 MKN 1 と MKN7 でも C5a は浸潤を亢進した。この作用は siRNA による C5aR 発現消失や C5aR 拮抗剤 W-54011 で抑制された。さらに、C5a 刺激により RhoA-GDP から RhoA-GTP への変換が亢進したことから、胃癌での C5a による浸潤亢進作用は RhoA 活性化を介していることが解った。



5) C5a の癌細胞転移促進 :

ヌードマウスに尾静脈から注射された胆管癌細胞 HuCCT1 による肺転移巣を 6 週間後に調べた。C5a 100nM で 1 時間刺激した HuCCT1/C5aR 細胞は HuCCT1/mock 細胞より 5 倍、C5a 無刺激 HuCCT1/C5aR 細胞より 3 倍、肺転移巣が増加した。C5a 刺激 HuCCT1/mock 細胞と C5a 無刺激 HuCCT1/mock 細胞間に肺転移の差は認められなかった。以上より、C5a で活性化された C5aR 発現癌細胞は肺での colonization が促進されることが示された。

6) 内因性 C5a による癌細胞浸潤亢進 *in vivo* :

C5a による癌細胞浸潤亢進作用を動物実験で調べた。Renca/C5aR と Renca/mock を赤色と緑色で別々に蛍光ラベルした後混合し、抗卵白アルブミン抗体と共に野生マウスの皮内注射した。直後に卵白アルブミンを尾静脈から注射して癌微小環境に補体活性化による C5a を産生させた。1、2 日後に皮膚を採取して癌細胞の浸潤範囲を組織切片で計測した。Renca/C5aR が Renca/moc より有意に広く浸潤したが、アレルギー反応なしでは両細胞の広がりには差はみられなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Imamura, T., Murakami, Y., Nitta, H. : *Aeromonas sobria* serine protease (ASP): A subtilisin family endopeptidase with multiple virulence activities.
Biol. Chem. in press 2017. 査読有
2. Kariu, T., Nakao, R., Ikeda, T., Nakashima, K., Potempa, J., Imamura, T. : Inhibition of gingipains and *Porphyromonas gingivalis* growth and biofilm formation by prenyl flavonoids.
J. Periodont. Res. 52: 89-96, 2017. 査読有
3. Imamura, T., Yamamoto-Ibusuki, M., Sueta, A., Kubo, T., Irie, A., Kikuchi, K., Kariu, T., Iwase, H. : Influence of the C5a-C5a receptor system on breast cancer progression and patient prognosis.
Breast Cancer 23: 876-885, 2016. 査読有
4. Wada, Y., Maeda, Y., Kawano, Y., Kubo, T., Kikuchi, K., Eto, M., Imamura, T. : Relation of anaphylatoxin C5a receptor (CD88) expression of urothelial cancer to poor prognosis of patients treated by radical cystectomy or nephroureterectomy.
Oncol. Lett. 12: 3995-4000, 2016. 査読有
5. Tanaka, T., Imamura, T., Yoneda, M., Irie, A., Ogi, H., Nagata, M., Yoshida, R., Fukuma, D., Kawahara, K., Shinohara, M., Nakayama, H. : Enhancement of active MMP release and invasive activity of lymph node metastatic tongue cancer cells by elevated signaling via the TNF- α -TNFR1-NF- κ B pathway and a possible involvement of angiopoietin-like 4 in lung metastasis.
Int. J. Oncol. 49: 1377-1384, 2016. 査読有
6. 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. : Expression of anaphylatoxin C5a receptor in gastric cancer; Implications with vascular invasion and patient outcome.
Med. Oncol. 33: 118, 2016. 査読有
7. 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 51:84798- 84809, 2016. 査読有
8. Kitamoto, Y., Arizono, K., Fukui, H., Tomita, K., Kitamura, H., Taguma, Y., Imamura, T. : Urinary thrombin: A novel marker of glomerular inflammation for the diagnosis of crescentic glomerulonephritis.
PLOS ONE 10(3): e0118704, 2015, 査読有
9. Tancharoen, S., Matsuyama, T., Kawahara, K., Tanaka, K., Lee, L-J, Machigashira, M., Noguchi, K., Ito, T., Imamura, T., Potempa, J., Kikuchi, K., Maruyama, I.: Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients.
PLOS ONE 10(2): e0117775, 2015, 査読有
10. Maeda, Y., Kawano, Y., Wada, Y., Yatsuda, J., Motoshima, T., Murakami, Y., Kikuchi, K., Imamura, T., Eto, M.: C5aR is frequently expressed in metastatic renal cell carcinoma and plays a crucial role in cell invasion via the ERK and PI3 kinase pathways.
Oncol. Rep. 33: 1844-1850, 2015, 査読有
11. Nitta, H., Murakami, Y., Wada, Y., Eto, M., Baba, H., Imamura, T.: Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness.
Oncol. Rep. 32: 1715-1719, 2014, 査読有
12. Imamura, T.: Staphopains in *Staphylococcus aureus* bacteremia: Virulence activities related to the onset of septic shock, coagulation disorders, and infectious endocarditis.
J. Oral Biosc. 56: 81-85, 2014, 査読有
13. Nakamura, H., Murakami, T., Imamura, T., Toriba, M., Chijiwa, T., Ohno, M., Oda-Ueda, N. : Discovery of a novel vascular endothelial growth factor (VEGF) with no affinity to heparin in *Gloydius tsushimaensis* venom.
Toxicon 86: 104-115, 2014, 査読有
14. Akiyama, T., Miyamoto, Y., Yoshimura, K., Yamada, A., Takami, M., Suzawa, T., Hoshino, M., Imamura, T., Akiyama, C., Yasuhara, R., Misima, K., Maruyama, T., Kohda, C., Tanaka, K., Potempa, J., Yasuda, H., Baba, K., Kamijo, R. : *Porphyromonas gingivalis*-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , but suppresses that by interleukin-17A. Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain.
J. Biol. Chem. 289: 15621-15630, 2014, 査読有
15. Nitta, H., Wada, Y., Kawano, Y., Murakami, Y., Irie, A., Taniguchi, K., Kikuchi, K., Yamada, G., Suzuki, K., Honda, J., Wilson-Morifuji, M., Araki, N., Eto, M., Baba, H., Imamura, T. : Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor(CD88).
Clin. Cancer Res. 19: 2004-2013, 2013, 査読有

[学会発表] (計 27 件)

1. 今村隆寿 : 去勢不応型前立腺癌特異的プロテアーゼの探索 .
第 102 回日本病理学会総会 . 平成 25 年 6 月 6-8 日 , 札幌 .
2. Irie, A. : Novel HLA-DR transgenic mice that

- spontaneously develop colitis with serious defects in lymphoid organs.
- 6th International workshop of Kyoto T Cell Conference.** June 4-7, 2013, Kyoto, Japan.
- Irie, A.: Novel HLA-DR transgenic mice that spontaneously develop colitis with serious defects in lymphoid organs.
15th International Congress of Immunology. August 22-27, 2013, Milan, Italy.
 - 入江 厚: リンパ組織の重症不全と炎症性大腸炎を自然発症する HLA-DR4 トランスジェニックマウスの解析.
第 22 回日本組織適合性学会大会. 平成 25 年 9 月 13-15 日, 福島.
 - 今村隆寿: Anaphylatoxin C5a activities favorable to cancer development(アナフィラトキシン C5a の癌進展に有利な活性).
第 72 回日本癌学会学術総会. 平成 25 年 10 月 3-5 日, 横浜.
 - 前田喜寛: Frequent expression of C5aR in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) and the biological role of C5a-C5aR system in mRCC (転移性腎細胞癌における C5a 受容体の発現及び生物学的意義について).
第 72 回日本癌学会学術総会. 平成 25 年 10 月 3-5 日, 横浜.
 - 新田英利: 胃癌における C5a 受容体発現の臨床的意義.
第 21 回日本消化器関連学会週間. 平成 25 年 10 月 9-12 日, 東京.
 - Irie, A.: Novel HLA-DR4 transgenic mice that spontaneously develop colitis with serious defects in lymphoid organs.
第 42 回日本免疫学会学術総会. 平成 25 年 12 月 11-13 日, 千葉.
 - Imamura, T.: Anaphylatoxin C5a release by cancer cell membrane serine protease: Cancer cell auto-activation via C5a-receptor and formation of the microenvironment favorable for cancer progression. **4th International Symposium on Carcinogenic Spiral.** February 10-11, Sapporo, Japan.
 - 今村隆寿: 胃癌細胞アナフィラトキシン C5a 受容体発現と癌進展との関係.
第 103 回日本病理学会総会. 平成 26 年 4 月 25-27 日, 広島.
 - 北本康則: 副腎皮質ステロイドによる糸球体腎炎治療効果の尿トロンビン測定によるモニタリング.
第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 平成 26 年 5 月 29-31 日, 大阪.
 - 入江 厚: HLA-DR4 トランスジェニックマウスのホモ接合体のリンパ組織形成不全と大腸および肺炎の発症.
第 23 回日本組織適合性学会大会. 平成 26 年 9 月 13-15 日, 長崎.
 - 今村隆寿: Positive-relation of breast cancer cell anaphylatoxin C5a-receptor expression to cancer progression(乳癌アナフィラトキシン C5a 受容体発現の癌進展への正の関連性).
第 73 回日本癌学会学術総会. 平成 26 年 9 月 25-27 日, 横浜.
 - 河野吉昭: Wnt/ β -catenin signaling pathway is a potential target for castrate-resistant prostate cancer therapy (去勢抵抗性前立腺癌における Wnt/ β -catenin シグナルの意義).
第 73 回日本癌学会学術総会. 平成 26 年 9 月 25-27 日, 横浜.
 - Irie, A.: Novel HLA-DR4 transgenic mice that develop severe colitis and pneumonia with serious defects in lymphoid organs.
第 42 回日本免疫学会学術総会. 平成 26 年 12 月 10-12 日, 京都.
 - 今村隆寿: 乳癌アナフィラトキシン C5a 受容体発現と癌進展・患者低生存率との関係.
第 104 回日本病理学会総会. 平成 27 年 4 月 30 日-5 月 1 日, 名古屋.
 - 北本康則: 糸球体腎炎における尿トロンビン濃度と血漿 thrombin-antithrombin 複合体濃度の乖離.
第 58 回日本腎臓学会学術総会. 平成 27 年 6 月 5-7 日, 名古屋.
 - 米田雅一: 癌治療標的分子的探索-C5a 受容体とプロテアーゼ.
日本プロテオーム学会 2015 年会. 平成 27 年 7 月 23-24 日, 熊本.
 - 入江 厚: 大腸上皮細胞の小胞体ストレスが HLA-DR4 トランスジェニックマウスのホモ接合体に発症する大腸炎の原因である.
第 24 回日本組織適合性学会大会. 平成 27 年 9 月 10-12 日, 水戸.
 - 今村隆寿: C5a 受容体は根治手術を受けた侵襲性尿上皮癌患者の補助療法の必要性を示唆する.
第 74 回日本癌学会学術総会. 平成 27 年 10 月 8-10 日, 名古屋.
 - 河野吉昭: 前立腺癌細胞における Wnt/ β -catenin-Survivin axis の生物学的意義.
第 74 回日本癌学会学術総会. 平成 27 年 10 月 8-10 日, 名古屋.
 - 今村隆寿: 尿上皮癌アナフィラトキシン C5a 受容体発現は根治手術後患者の予後不良を示唆する. UCC C5a-receptor expression suggests poor prognosis of the patients received radical surgeries.
第 105 回日本病理学会総会. 平成 28 年 5 月 12 日-14 日, 仙台.
 - 北本康則: 糖尿病性腎症進行期におけるトロンビン尿増加は糸球体炎症の腎傷害進行への関与を示唆する.
第 59 回日本腎臓学会学術総会. 平成 28 年 6 月 17-19 日, 横浜.

24. Irie, A.: Aberrant accumulation of HLA-DR and reduced mucin production in colonic epithelial cells of HLA-DR4 transgenic mice and ulcerative colitis patients.

16th International Congress of Immunology.
August 21-26, 2016. Melbourne, Australia.

25. 今村隆寿: The C5a-C5a receptor system promotes cancer metastasis and C5a in the cancer microenvironment enhances cancer invasion. C5a-C5a 受容体は癌転移を促進し、癌微小環境 C5a は癌浸潤を亢進する。

第 75 回日本癌学会学術総会 .平成 28 年 10 月 6-8 日, 横浜 .

26. 入江 厚: 大腸上皮細胞の小胞体ストレスが HLA-DR4 トランスジェニックマウスのホモ接合体に発症する大腸炎の病因である。

第 25 回日本組織適合性学会大会 .平成 28 年 10 月 22-24 日, 札幌 .

27. Irie, A.: Endoplasmic reticulum causes ulcerative colitis-like severe colitis in the homozygotes of HLA-DR4 transgenic mice.

第 45 回日本免疫学会学術集会 .平成 28 年 12 月 22-24 日, 宜野湾 .

[図書] (計 1 件)

1. 今村隆寿:

特集: 徹底ガイド DIC のすべて 2014-15 .
救急・集中治療 . 26 巻 5-6 号, 編集: 丸藤哲, p696-701, 2014 総合医学社 .

[総説] (計 2 件)

1. 今村隆寿: 凝固炎症反応の病理組織.

Thrombosis Medicine 3: 48-52, 2013 .

2. 和田孝浩, 今村隆寿, 内場光浩, 江藤正俊: 凝固系検査(特集: なぜ必要? どこに注目? 泌尿器科病棟で必要な検査値を理解しよう).

泌尿器ケア . 18, 722-728. 2013.

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

特許第 548166 号 (P5481662)

登録日 平成 26 年 2 月 28 日

発明者: 今村隆寿

腎臓・泌尿器疾患の診断法.

特許権者: 504159235

国立大学法人 熊本大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.kumamoto-u.ac.jp/seeds/seeds/61580016/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

今村 隆寿 (IMAMURA TAKAHISA)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・

分子病理学分野・准教授

研究者番号: 20176499

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

入江 厚 (IRIE ATSUSHI)

熊本大学・生命科学研究部・講師

研究者番号: 30250343