

機関番号：82504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659406

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ除菌治療による胃MALTリンパ腫治癒機構の解明

研究課題名(英文)The immune responses in the MALT lymphoma following HP eradication.

研究代表者

山口 武人(Yamaguchi, Taketo)

千葉県がんセンター(研究所)・その他部局等・副病院長

研究者番号：00241969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：胃マルトリンパ腫は胃の粘膜下で増えるリンパ球の癌であり、ヘリコバクター・ピロリ(HP)感染による慢性胃炎を背景に発症することが多く、HPを除菌するだけで6-8割が治る。しかし、HP除菌がマルトリンパ腫の治癒に繋がる機構が分かっていない。HPはヒトの免疫から自分を守るために周囲の免疫反応を抑制するが、癌細胞も同様の機構を持つ。両者の類似点に注目し、HP除菌治療に伴い癌周囲の免疫反応の変化を検討したところ、免疫を抑制する制御性T細胞の数が、除菌前は高く除菌後に減少することを認めた。このことよりHP除菌治療は癌に対する免疫反応を改善させて癌細胞を排除することがその機構である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gastric MALT lymphoma is frequently accompanied by chronic infection with Helicobacter pylori (HP) in the gastric mucosa. Although most of MALT lymphoma could be cured following the eradication of HP, the mechanism has remained to be elucidated. HP protects itself from the surrounding immune system by suppressing the immune cells, making the persistence of the infection possible. On the other hand, many malignancies create immune-suppressive microenvironments for the evasion from the immune system. We focused on the similarities of these diseases. We evaluated the immune responses in the tumor following HP eradication, and found the number of regulatory T cells, which are major immune-suppressive effector cells, were decreased, which was correlated to the cure of the lymphoma. Our results suggest the amelioration of the immune-suppressive microenvironment is the possible mechanism for the cure of MALT lymphoma following HP eradication.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：MALT 胃 リンパ腫 免疫 ヘリコバクター・ピロリ

1. 研究開始当初の背景

胃の Mucosa-associated Lymphoid Tissue (MALT)リンパ腫は、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染による慢性胃炎を背景に発症する低悪性度 B 細胞性リンパ腫であるが、*H. pylori* の除菌により 60-80%が治癒するという特異な病態を持つ悪性腫瘍である。しかし、*H. pylori* 除菌が MALT リンパ腫の治癒をもたらす機構は不明である。

H. pylori 慢性胃炎においては、*H. pylori* による宿主免疫の抑制による免疫逃避が成立している (Gastroenterology 2007; 133: 288-308)。*H. pylori* 感染ヒト胃粘膜では、制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg) の浸潤が増強しているという報告や、*H. pylori* 感染マウスモデルで Treg の除去が *H. pylori* の生着を抑制するという報告が見られる (前出)。従って *H. pylori* は、マクロファージ、好中球等の免疫細胞の活性化により胃粘膜の慢性炎症を誘導する一方で、Treg などの免疫抑制性細胞の誘導を介して、自身の免疫逃避を誘導する結果、持続感染を成立させていると考えられる (Gastroenterology 2010; 138: 1046-54)。

一方、癌においては癌細胞が産生する種々の免疫抑制因子 (IL-10, TGF- β 等) による免疫細胞の直接抑制や、Treg、腫瘍浸潤性マクロファージ (Tumor-associated macrophage; TAM) などの抑制性細胞の誘導を介する免疫逃避が成立しており、*H. pylori* 感染と共通する免疫逃避機構が認められる。免疫逃避は多くの悪性腫瘍で認められ、腫瘍の発生過程で免疫学的排除という淘汰圧に対して獲得した一種の悪性形質であると考えられる。しかし、胃 MALT リンパ腫においては、先行した *H. pylori* 感染による免疫逃避がすでに成立しており、その発生過程において MALT リンパ腫が自律的に免疫逃避形質を獲得する淘汰圧が作用していない可能性がある。このような環境下では MALT リンパ腫は宿主免疫からの逃避を *H. pylori* 感染に依存しているため、除菌により *H. pylori* が排除された場合には、免疫学的排除が起こりやすい状況に陥ることが予想される。

2. 研究の目的

我々は、*H. pylori* 除菌が腫瘍の微小環境における免疫逃避機構からの回復をもたらす結果、MALT リンパ腫に対する抗腫瘍免疫応答が回復して免疫学的排除が生じるという仮説を立てた。この仮説の妥当性を検証する目的で、*H. pylori* 除菌前後における腫瘍微小環境の免疫応答の変化と MALT リンパ腫の排除の相関を経時的に定量的に測定し、これまで謎であった *H. pylori* 除菌による MALT リンパ腫の治癒機構の解明と治療反応性予測に有用な新規のバイオマーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

H. pylori 陽性の胃 MALT リンパ腫を対象に、*H. pylori* 除菌治療前・および治療後に定期的に内視鏡検査を施行して組織検体を採取する。組織検体より、(1)免疫組織染色による腫瘍浸潤性免疫細胞の定量的評価と、(2)RNA を抽出して免疫関連遺伝子発現の定量的評価を行い、MALT リンパ腫の内視鏡的・組織学的治療効果との相関を定量的に評価する。上記のデータ解析により、腫瘍微小環境における免疫抑制性環境から抗腫瘍免疫環境への変化を免疫組織学的反応性と遺伝子発現プロファイルの変化として経時的に捉えることが可能となり、治療反応性データとの相関を評価することにより、我々の仮説の妥当性を検証することが可能になる。

さらに、*H. pylori* 除菌治療後の経時的な免疫応答性変化の速度と MALT リンパ腫寛解までの期間の相関を解析し、両者の間に正の相関を認めるか否かを検証する。この解析により、免疫応答性の経時的・定量的評価が MALT リンパ腫寛解の新規バイオマーカーになる可能性を評価する。

4. 研究成果

(1)胃 MALT リンパ腫の *H. pylori* 除菌治療後における腫瘍浸潤 Foxp3 陽性細胞数の変動と治療効果との相関 ;

当初予定した解析症例は 3 年間で 30 症例であったが、途中から当院を含む 3 施設に症例の登録を依頼したにも関わらず症例数はわずかに 3 例のみの登録であったため解析の困難が予想された。そこで、当院で過去に胃 MALT リンパ腫と診断され治療を受けた症例の病理生検標本より 10 症例を追加して合計 13 例で解析した。

制御性 T 細胞 (Treg) のマーカーである Foxp3 核内蛋白を免疫染色し、400 倍視野中の核内染色陽性数を 1 標本につき 3 視野計測し、平均値を算出した。*H. pylori* 除菌治療前後で Foxp3 陽性数の変動を見たところ、Foxp3 陽性細胞数は、(i) *H. pylori* 陽性かつ除菌治療成功群 (n=7) で、除菌前 57.7 ± 30.3 、除菌後初回生検時 5.62 ± 5.76 ($p=0.0036$, t-検定) と有意に減少したのに対して、(ii) *H. pylori* 陰性群・除菌不成功群 (n=6; *H. pylori* 陰性 4 例、*H. pylori* 陽性・除菌失敗例 2 例) で、除菌前 77.9 ± 75.7 、除菌後初回生検時 69.4 ± 63.8 ($p=0.84$) で有意な変動を認めなかった。

治療効果との相関では、(i) 群で除菌終了後初回の胃内視鏡および病理診断で 7 例中 5 例の寛解を認め、初回に MALT リンパ腫の残存を認めた 2 症例も、それぞれ 2 回目、3 回目の評価で寛解を確認した。また、治癒が遷延したこれら 2 例においても寛解に伴い局所 Foxp3 陽性数は漸減する傾向を示した。(ii) においては、6 例中陽性(疑い) 1 例のみにおいて初回の生検評価で MALT リンパ腫の寛解を認めたが、他の 5 症例は最終的に局所放射線治療を追加することで寛解を達成したが、MALT の残存を認める経過中に Foxp3 陽性細胞

数の増加する症例を3例に認めた。

以上より、除菌治療成功・MALTリンパ腫寛解と局所Foxp3陽性細胞数の減少の間に有意な相関を認め、本結果はH.pylori除菌に伴い局所の免疫抑制性環境が改善した可能性を示唆する。さらに同時に局所で腫瘍免疫が亢進しているか否かを検索する必要があり、CD4T細胞、CD8T細胞、CD45RO陽性細胞などの増加の有無を今後検討する必要がある。

(2) 胃MALTリンパ腫のH.pylori除菌治療前後における免疫関連遺伝子の発現変動と治療効果の相関；

今回の検討ではH.pylori除菌治療前後で、経時的に生検材料よりRNAを抽出できた3例について36種類の免疫関連分子の発現変動を定量RT-PCRを用いて解析した。コントロールとして2例の脾臓摘出例より抽出したRNAをCalibratorとして用いた。各サンプルは1回の生検時に3検体を採取し、それぞれよりcDNAを合成後SYBR Green法またはTaqMan PCR法にて標的遺伝子を増幅し、 C_T 値の平均値を算出した。内在性コントロールとしてGAPDHの C_T 値をそれぞれ求め、各標的遺伝子の発現を C_T 値で補正した。上記Calibrator RNAである脾臓より合成したcDNAについても同様に C_T 値を求めて各標的遺伝子の C_T 値を補正し、 C_T 値を算出し、 2^{-C_T} にて遺伝子発現量を算出した。除菌治療前のサンプルの発現量を1として、除菌後のサンプルの値の相対値を計算することにより経時的な発現量の変動を算出した。

症例の内訳は、H.pylori陽性1例、陰性2例であり、いずれもH.pylori除菌治療を施行した。免疫関連遺伝子の変動については、陽性例において除菌後初回の生検で2倍以上の発現の増加を認めたのは12遺伝子(CD16, IL10, NOS2, OX40, OX40L, ICOS, PD-1, PD-2, B7-H4, IL-4, IL-5, IL-13)、2倍以上の発現低下を認めた3遺伝子(PTGES, CD83, CD40)、2倍未満の変動を示した12遺伝子、評価不能10遺伝子の内訳であった。本症例は除菌後初回の検査でMALTリンパ腫の寛解を認めた除菌成功例であるが、予想に反して免疫抑制性の分子(IL-10, NOS2, PD-1, PD-2, B7-H4)の上昇とTh2サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13)の上昇を認めた。免疫促進の遺伝子発現(CD16, OX40, OX40L, ICOS)も認めた。Foxp3発現に関しては免疫染色の結果とは異なりわずかな変動(発現比0.70)に留まったが、除菌後3回目の生検では除菌前の3.1%に低下を認めた。

免疫抑制性分子の発現上昇の意義に関しては、免疫学的排除と矛盾するような印象ではあるが、本症例は除菌後初回生検の時点(除菌後約2ヶ月)で既にMALTリンパ腫の寛解を認めており、免疫学的変化のピークを過ぎた時点での解析となっていたことが要因の可能性が考えられる。除菌治療によりMALTリンパ腫の寛解が早く得られる症例に

関しては、生検のタイミングを考慮する必要があると思われる。

H.pylori陰性の2例に関しては、除菌治療にてもMALTリンパ腫の寛解は得られず、2例とも最終的には局所放射線治療により寛解を得た。除菌後初回生検時のサンプルより一部の免疫関連遺伝子に関して定量RT-PCRで発現変動を解析したところ、1例は2倍以上の発現上昇を7遺伝子(TGF-1, VEGF, TSP-1, IL-10, Arg1, NOS2, CD83)に認め、2倍以上の発現低下を1遺伝子(GITR)に認めた。もう1例では、2倍以上の発現上昇を1遺伝子(CD3e)に、2倍以上の発現低下を10遺伝子(CD4, CTLA4, TSP-1, IL-10, NOS2, CD86, CD83, CD40L, PD-2, PD-L1)に認めた。前者で複数の免疫抑制性分子の発現上昇が認められたが、両者で共通に発現変動を示した遺伝子は無く、限られた症例数の中で結論を得るだけの傾向は認めなかった。

今回の生検は、各時点で3カ所の採取を行っておりそれぞれのサンプルで必ずしも発現レベルが一定せずばらつきが多い傾向を示したため、極端な値は外れ値として解析から除外する操作を行った。

経時的な免疫学的変動とMALTリンパ腫の寛解の相関を示すためにはより多数例での解析が必要である。胃MALTリンパ腫の頻度の低さのため、本研究期間中には予定症例数に及ばず不十分な解析に終わったが、少数例での解析ではあるが、当初の仮説を支持する結果も一部には得られたこと、解析の問題点など次回につながる反省点を得たことを不十分ながらも本研究の成果と考える。

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8件)

1. 胃スクリーニング検査におけるBLI(Blue Laser Imaging)の有効性
鈴木拓人 1), 原太郎 1), 稲垣千晶 2), 北川義康 2), 喜多絵美里 2), 中村奈海 2), 相馬寧 2), 須藤研太郎 2), 中村和貴 2), 三梨桂子 2), 廣中秀一 2), 傳田忠道 2), 山口武人 2)
1)千葉県がんセンター 内視鏡科, 2)千葉県がんセンター 消化器内科
Progress of Digestive Endoscopy 83(suppl): 5068-5068, 2013.
2. 早期胃癌診断に対するBlue LASER Imaging(BLI)の役割 ~病変発見から精密診断まで~
鈴木拓人 1), 原太郎 1), 杉田統 2), 新井裕之 2), 辻本彰子 2), 喜多絵美里 2), 中村奈海 2), 相馬寧 2), 須藤研太郎 2), 中村和貴 2), 三梨桂子 2), 廣中秀一 2), 傳田忠道 2), 滝口伸浩 3), 山口武人 2)
1)千葉県がんセンター内視鏡科, 2)千葉県が

んセンター消化器内科, 3)千葉県がんセンター消化器外科

Progress of Digestive Endoscopy 84(suppl): 5066-5066, 2013.

3. 胃癌ESD後病理結果にてガイドライン適応外病変と判定された例からみた転移・再発の危険因子に関する検討

北川善康 1), 鈴木拓人 2), 稲垣千晶 1), 喜多絵美里 1), 中村奈海 1), 相馬寧 1), 須藤研太郎 1), 中村和貴 1), 三梨桂子 1), 廣中秀一 1), 原太郎 2), 傳田忠道 1), 山口武人 1)

1)千葉県がんセンター 消化器内科, 2)千葉県がんセンター 内視鏡科

Progress of Digestive Endoscopy 82(suppl): 5079-5079, 2012.

4. 高画質経鼻内視鏡 FUJIFILM EG-580NW を用いた胃腫瘍診断

原太郎 1), 山口武人 2), 鈴木拓人 1)

1)千葉県がんセンター・内視鏡科, 2)千葉県がんセンター・消化器内科

日本消化器病学会雑誌 109(suppl-2): 693-693, 2012.

5. 早期胃癌ESD術前検査における細径内視鏡の有用性-負担の少ない精密検査の工夫-

相馬寧, 原太郎, 山口武人, 北川善康, 須藤研太郎, 中村和貴, 三梨桂子, 廣中秀一, 傳田忠道

千葉県がんセンター消化器内科

Progress of Digestive Endoscopy 81(1): 91-91, 2012.

6. 術後胃病変に対するESDの工夫

鈴木拓人 1), 田中武継 1), 峯村莊子 1), 原太郎 2), 山口武人 2), 新井誠人 3), 横須賀收 3)

1)千葉労災病院 内科, 2)千葉県がんセンター 内視鏡科, 3)千葉大学医学部附属病院 消化器内科

Progress of Digestive Endoscopy 79(1): 64-64, 2011.

7. 胃がんESD後地域連携パス運用状況の検討(2)~適用状況分析~

丹内智美 1), 浜野公明 1), 柳沢由香理 1), 山口武人 2)

1)千葉県がんセンター地域医療連携室, 2)千葉県がんセンター消化器内科

日本クリニカルパス学会誌 13(4): 364-364, 2011.

8. 胃がんESD後地域連携パス運用状況の検討(1)~パス改訂経緯~

浜野公明 1), 丹内智美 1), 柳沢由香理 1), 山口武人 2)

1)千葉県がんセンター地域医療連携室, 2)千

葉県がんセンター消化器内科

日本クリニカルパス学会誌 13(4): 364-364, 2011.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 極細径 FICE 内視鏡を用いた早期胃癌の精密検査

- がん専門病院における新しい経鼻内視鏡 FUJIFILM EG-530NW の評価 -

原 太郎、山口 武人・相馬 寧・須藤研太郎、中村 和貴・廣中 秀一・傳田 忠道

千葉県がんセンター 内視鏡科・同消化器内科

第1回 経鼻内視鏡研究会

平成23年8月19日(金) 名古屋国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口武人 (59)

研究者番号: 00241969

(2)研究分担者

住本秀敏 (52)

研究者番号: 00306838

(3)連携研究者

伊丹 真紀子 (54)

研究者番号: 20539150

横井 左奈 (45)

研究者番号: 30372452

大平 美紀 (47)

研究者番号: 20311384