

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462112

研究課題名(和文)胆汁耐性ヘリコバクター胆道感染の診断・治療システムの構築と胆道発癌予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis of enterohepatic Helicobacters infection for prophylaxis and treatment of biliary tract cancers

研究代表者

田島 義証 (Tajima, Yoshitsugu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20264228

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)：(1)胆汁耐性ヘリコバクター属菌ピリス菌およびヘパティクス菌に対する特異的な新規モノクローナル抗体をそれぞれ4種類および2種類作製しました。エピトープ解析のために、免疫に用いたピリス菌の全ゲノム解析をおこないました。

(2)ハムスターの胆道上皮細胞の分離・培養法を樹立しました。ハムスター胆道上皮分離培養細胞に、ピリス菌あるいはヘパティクス菌を各々感染させた後、DNAマイクロアレイ解析を行い、感染細胞に誘導される遺伝子群を網羅的に探索しました。

(3)5週齢雌ハムスターおよび6週齢マウスを用いたピリス菌・ヘパティクス菌の胆汁耐性ヘリコバクター属菌感染モデルを作製しました。

研究成果の概要(英文)：(1) We developed four or two monoclonal antibodies against Gram-negative enterohepatic Helicobacters, Helicobacter bilis or Helicobacter hepaticus, respectively. The Helicobacter hepaticus genome has been sequenced. For the epitope analysis the Helicobacter bilis genome was sequenced.

(2) We developed in vitro isolation and culture method of hamster bile duct epithelial cells. We performed a comprehensive analysis of upregulated or downregulated gene sets in these cells infected with Helicobacter bilis or Helicobacter hepaticus using DNA microarray.

(3) We developed two Helicobacter bilis or Helicobacter hepaticus infection models against hamster (5-week-old, female) and mouse (6-week-old, female).

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：胆道発がん 胆汁耐性ヘリコバクター属菌 ピリス菌 ヘパティクス菌 モノクローナル抗体

## 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ(以下、ピロリ菌)が胃発癌に強く関与していることは疫学的調査ならびにスナネズミを用いた実験で明らかになっています。その後、胃粘膜障害に関与する IL-8 過剰産生の責任遺伝子として cag 病原性アイランド (cagPAI) が、またピロリ菌が産生する細胞空胞化蛋白毒素 Vac A が同定され、現在ではピロリ菌は胃発癌の危険因子として広く認識されるようになりました。さらに 2000 年にはピロリ菌に対する除菌療法が保険適応になるなど、ピロリ菌の研究は胃癌を含む胃・十二指腸疾患の治療に革新的な進歩をもたらしました。

一方、胆汁中에서도生育可能な胆汁耐性ヘリコバクター属菌として 1994 年にヘリコバクター・ピリス(以下、ピリス菌)が、1995 年にはヘリコバクター・ヘパティクス(以下、ヘパティクス菌)がマウスより分離されました。これらのヘリコバクター属菌はヒトにおける炎症性腸疾患や炎症性肝疾患、さらには胆道発癌に関与することが示唆されています。申請者は世界に先駆けて、胆道癌ならびに胆道癌の高危険群である肝内結石症とヘリコバクター属菌感染との関連性を検討し、これらの疾患の胆汁および胆道組織から高頻度に胆汁耐性ヘリコバクター属菌 DNA が検出されることを報告しています。また、胆道癌の高危険群である膵胆管合流異常症ではピリス菌陽性率(59%)が合流異常のない症例(陽性率 29%)に比して有意に高率であることを示しています。さらに、膵胆管合流異常症例では乳幼児期からピリス菌陽性例が高率にみられ、小児期からのピリス菌の持続的な胆道感染が胆道発癌に関与している可能性を示しています。これら一連の臨床研究の結果から、申請者は、胆汁耐性ヘリコバクター属菌感染は胆道発癌に強く関与していると推察しています。

申請者はこれまでに様々な胆道発癌動物モデルを確立するとともに、胆道癌の発生機序の解明ならびにハムスターモデルを用いた胆道発癌予防実験を積み重ねてきました。同時に、正常胆管上皮細胞の分離培養技術も確立しています。

胆道癌は代表的な消化器癌のひとつであり、わが国における死亡者数は増加の一途をたどっています。積極的な外科切除や放射線化学療法による集学的治療が試みられていますが治療成績は悪く、極めて予後不良の疾患です。従って、これまでにない有効な治療戦略が求められています。その新たな戦略として申請者は、胆汁耐性ヘリコバクター属菌の感染スクリーニング、さらに感染者に対する除菌による胆道癌の発癌予防の可能性に着目しています。

## 2. 研究の目的

胆汁中에서도生育可能な胆汁耐性ヘリコバクター属菌感染と胆道発癌との関連が注目されて

います。本研究では、胆汁耐性ヘリコバクター属菌に対するモノクローナル抗体を作成することで感染のスクリーニングシステムを確立します。さらに同菌の胆道上皮細胞に対する病原性ならびに病原性の発現機序を解明し、除菌による胆道癌の発癌予防法を構築することを目的としています。

## 3. 研究の方法

(1) ピリス菌およびヘパティクス菌に対する特異的モノクローナル抗体を作成します。作成したモノクローナル抗体については、そのエピトープを質量解析法により同定します。これらの抗体を用いてヒト良・悪性胆道疾患症例の切除標本に免疫組織化学染色を行い、胆汁耐性ヘリコバクター属菌胆道感染診断におけるモノクローナル抗体の有用性と疾患別の感染率を検証します。さらにサンドイッチ酵素結合免疫吸着法に適した条件を検討し、迅速な感染スクリーニングシステムを構築します。

(2) ハムスターから正常胆道上皮細胞を分離培養し、胆汁耐性ヘリコバクター属菌を接種する。感染後に誘導される遺伝子群を DNA マイクロアレイ解析により網羅的に検索する。同時に、ピロリ菌接種で誘導されることが判明している病原性 CagA タンパク質、活性化誘導型シチジンデアミナーゼ(AID)、PAR1b/MARK2

(partitioning-defective1b/microtubule affinity-regulating kinase2) キナーゼ系の検討を行います。

(3) 併行して、胆汁耐性ヘリコバクター属菌の胆道感染ハムスターモデルを確立し、*in vivo*における病原性ならびに病原性の発現機序を解明します。

(4) 胆道感染動物モデルを用いて除菌療法とその効果について検討します。

## 4. 研究成果

(1) モノクローナル抗体の作製：臨床患者において胆汁耐性ヘリコバクター属菌感染の簡単な検出方法を確立するために、ホルマリン固定後のピリス菌およびヘパティクス菌をマウスに免疫し、ピリス菌およびヘパティクス菌に対する特異的な新規モノクローナル抗体をそれぞれ 4 種類および 2 種類作製しました。ピリス菌の全ゲノム解析の詳細が報告されていないため、モノクローナル抗体のエピトープ解析のために、免疫に用いたピリス菌の全ゲノム解析をおこないました。

(2) ハムスターの胆道上皮細胞の分離・培養法を樹立しました。ハムスター胆道上皮分離培養細胞に、ピリス菌あるいはヘパティクス菌を各々感染させた後、DNA マイクロアレイ解析を行い、感染細胞に誘導される遺伝子群を網羅的に探索しました。

(3) 5 週齢、雌ハムスターを用いた胆汁耐性ヘリコバクター属菌胆道感染ハムスターモデルの作製法を確立しました。

(4) 治療実験が単純・簡便になるように6週齢マウスを用いたピリス菌・ヘパティクス菌の胆汁耐性ヘリコバクター属菌感染モデルを作製しました。2種類のピリス菌(ATCC51630 および 43879)、1種類のヘパティクス菌(ATCC51448)およびコントロール群(PBS投与群)の4群を持ちいて、菌接種4週、8週、16週後に解析をおこないました。16週後の解析では、1種類のピリス菌(ATCC43879)で接種した3個体すべてにおいて便培養および便PCRによって菌の感染を認めました。一方、肝臓を用いた培養では3個体中1匹に感染を認めただけでした。他の菌体および個体では菌感染を認めませんでした。ピリス菌(ATCC43879)がマウスにおいては最もよい感染モデルになることを見出しました。なお、本研究は島根大学の動物実験専門委員会に実験申請を行い、許可を受けた上で施行しました。

#### 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31件)

1. Hirahara N, Matsubara T, Hayashi H, Takai K, Nakada S, Tajima Y.

Prognostic Importance of Controlling Nutritional Status in Patients Undergoing Curative Thoracoscopic Esophagectomy for Esophageal Cancer.

Am J Ther. 2016[Epub ahead of print]

DOI: 10.1097/MJT.0000000000000414

2. Kusunoki R, Ishihara S, Tada Y, Oka A, Sonoyama H, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Ansary MM, Tajima Y., Maruyama R, Nabika T, Kinoshita Y

Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in colonic inflammation and carcinogenesis.

J Gastroenterol. 50: 862-875, 2015

DOI: 10.1007/s00535-014-1036-x

3. Kawabata Y, Hayashi H, Takai K, Kidani A, Tajima Y.

Superior mesenteric artery-first approach in radical antegrade modular pancreatectomy for borderline resectable pancreatic cancer: a technique to obtain negative tangential margins.

J Am Coll Surg, 220:e49-54, 2015

DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2014.12.054

4. Kawabata Y, Nishi T, Kidani A, Tajima Y.

Prognostic Value of Excision Repair Cross-Complementing Gene 1, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, and Human Equilibrative Nucleotide Transporter 1 Expression and Their Implications for Adjuvant Treatment in Patients with Ampullary Carcinoma.

Pancreas, 44(6): 937-944, 2015

DOI: 10.1097/MPA.0000000000000348

5. Nishi T. Kawabata Y, Ishikawa N, Araki A, Yano S, Maruyama R, Tajima Y.

Intraductal papillary mucinous carcinoma of the pancreas associated with pancreas divisum: a case report and review of the literature.

BMC Gastroenterol 15:78, 2015

DOI: 10.1186/s12876-015-0313-3

6. Hirahara N, Matsubara T, Hayashi H, Takai K, Fujii Y, Tajima Y.

Significance of prophylactic intra-abdominal drain placement after laparoscopic distal gastrectomy for gastric cancer.

World J Surg Oncol, 13:181, 2015

DOI: 10.1186/s12957-015-0591-9.

7. Hirahara N, Matsubara T, Hayashi H, Takai K, Fujii Y, Tajima Y.

Impact of inflammation-based prognostic score on survival after curative thoracoscopic esophagectomy for esophageal cancer.

Eur J Surg Oncol, 41:1308-1315, 2015

DOI: 10.1016/j.ejso.2015.07.008

8. Hari Y, Harashima N, Tajima Y., Harada M.

Bcl-xL inhibition by molecular-targeting drugs sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL

Oncotarget, 6 : 41902-41915, 2015

DOI: 10.18632/oncotarget.5881

9. Hirahara N, Matsubara T, Hayashi H, Takai K, Fujii Y, Tajima Y.

Easy and secure closure of Petersen's defect after laparoscopic distal gastrectomy with Roux-en-Y reconstruction.

J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 25: 55-59, 2015

DOI: 10.1089/lap.2014.0402

10. Yoshida H, Park S-Y, Oda T, Akiyoshi T, Sato M, Shirouzu M, Tsuda K, Kuwasako K, Unzai S, Yutaka Muto Y, Urano T. and Obayashi E.

Novel 3' splice-site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit

Gene Dev., 29: 1649-1660, 2015

DOI: 10.1101/gad.267104.115

11. Sekine J, Nakatani E, Ohira K, Hideshima K, Kanno T, Kagimura T and Urano T.

Nucleus accumbens-associated protein 1 Expression Has Potential as a Marker for Distinguishing Oral Epithelial Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma

PLOS ONE, 10: e0131752, 2015

DOI: 10.1371/journal.pone.0131752

12. Verrier L, Tagliani F, Barrales RR, Webb S, Urano T. Braun S and Bayne EH: Global regulation of heterochromatin spreading by Leo1.

**Open Biol.** 5: 150045, 2015

DOI: 10.1098/rsob.150045

13. Miyake T, Honma Y, Urano T. Kato N and

- Suzumiya J.: Combined treatment with tamoxifen and a fusicoccin derivative (ISIR-042) to overcome resistance to therapy and to enhance the antitumor activity of 5-fluorouracil and gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 47: 315-324, 2015  
doi: 10.3892/ijo.2015.2979.
14. Kawabata Y, **Nishi T**, Harada Y, **Tajima Y**. Pancreaticoduodenectomy with total meso-pancreatoduodenum excision for periampullary carcinoma. *Shimane J. Med. Sci.* 30: 69-76, 2014  
<http://ir.lib.shimane-u.ac.jp/journal/M-SJM>
15. Kawabata Y, **Nishi T**, Tanaka T, **Tajima Y**. Safety and feasibility of a pancreaticoduodenectomy with total meso-pancreatoduodenum excision: analysis in various periampullary disorders. *Hepatogastroenterol.*, 61: 821-827, 2014  
DOI:10.5754/hge13987
16. Hirahara N, Matsubara T, Kidani A, Hyakudomi R, Fujii Y, **Tajima Y**. A novel technique to minimize deformation of the stomach in laparoscopic partial gastrectomy for intraluminal gastric GISTs. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2014 Oct;24(10):707-11.  
DOI:10.1089/lap.2014.0184
17. Hirahara N, Matsubara T, Hyakudomi R, Hari Y, Fujii Y, **Tajima Y**. Laparoscopic stomach-partitioning gastrojejunostomy with reduced-port techniques for unresectable distal gastric cancer. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 24: 177-182, 2014  
DOI:10.1089/lap.2013.0417
18. Mishima T, Kuroki T, **Tajima Y**, Adachi T, Hirabaru M, Tanaka T, Kitasato A, Takatsuki M, Eguchi S. Dietary zinc supplementation to the donor improves insulin secretion after islet transplantation in chemically induced diabetic rats. *Pancreas*, 43: 236-239, 2014.  
DOI:10.1097/MPA.0000000000000093
19. Kawabata Y, Ishikawa N, Moriyama I, **Tajima Y**. What is an adequate surgical management for pTis and pT1 early ampullary carcinoma? *Hepatogastroenterol.* 61:12-17, 2014  
DOI: 10.5754/hge13601
20. Kato T, Enomoto A, Watanabe T, Haga H, Ishida S, Kondo Y, Furukawa K, **Urano T**, Mii S, Weng L, Ishida-Takagishi M, Asai M, Asai N, Kaibuchi K, Murakumo Y and Takahashi M. TRIM27/MRTF-B-Dependent Integrin  $\beta$ 1 Expression Defines Leading Cells in Cancer Cell Collectives. *Cell Rep.*, 7: 1156-1167, 2014  
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.068
21. Moriyama T, Fujimitsu Y, Yoshikai Y, Sasano T, Yamada K, Murakami M, **Urano T**, Sugasawa K and Saitoh H. SUMO-modification and elimination of the active DNA demethylation enzyme TDG in cultured human cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 447: 419-424, 2014  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.004
22. Saito M, Fujimitsu Y, Sasano T, Yoshikai Y, Ban-Ishihara R, Nariai Y, **Urano T** and Saitoh H. The SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 localizes to etoposide-exposed mitotic chromosomes: Implication for a novel DNA damage response during mitosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 447: 83-88, 2014  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.106
23. Kamata K, Goswami G, Kashio S, **Urano T**, Nakagawa R, Uchida H and Oki M.: The N-terminus and Tudor domains of Sgf29 are important for its heterochromatin boundary formation function. *J Biochem.*, 155: 159-171, 2014  
DOI: 10.1093/jb/mvt108
24. Kawabata Y, **Nishi T**, Tanaka T, Yano S, **Tajima Y**. Distal Pancreatectomy Utilizing a Flexible Stapler Closure Eliminates the Risk of Pancreas-Related Factors for Postoperative Pancreatic Fistula. *Eur Surg Res.* 50: 71-79, 2013  
DOI: 10.1159/000349977
25. Hirahara N, Edamatsu T, Fujieda A, Fujioka M, Wada T, **Tajima Y**. Protein-bound polysaccharide-K induces apoptosis via mitochondria and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in HL-60 promyelomonocytic leukemia cells. *Oncol Rep.*, 30: 99-104, 2013  
DOI: 10.3892/or.2013.2412
26. Hirahara N, Matsubara T, Hira E, Yamamoto T, Kidani A, Hyakudomi R, Shimojo Y, **Tajima Y**. Safe and Simple Gastric Conduit Pull-through Procedure Through the Posterior Mediastinal Route Using Echo Probe Cover in Thoracoscopic Subtotal Esophagectomy. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 23: e141-4, 2013  
DOI:10.1097/SLE.0b013e31828b81a7
27. Kato H, Okazaki K and **Urano T**: Spt6: Two fundamentally distinct functions in the regulation of histone modification

Epigenetics, 8: 1249-1253, 2013.  
DOI: 10.4161/epi.26487

28. Kato H, Okazaki K, Iida T, Nakayama J-I, Murakami Y and **Urano T.**: Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3.  
Sci Rep, 3 : 2186, 2013  
DOI: 10.1038/srep02186

29. Kamata K, Hatanaka A, Goswami G, Shinmyozu K, Nakayama J-I, **Urano T.**, Hatashita M, Uchida H and Oki M.  
C-terminus of the Sgf73 subunit of SAGA and SLIK is important for retention in the larger complex and for heterochromatin boundary function.  
Genes Cells, 18: 823-837, 2013  
doi: 10.1111/gtc.12075

30. Kimura Y, Goi T, Hirano Y, Katayama K, **Urano T** and Yamaguchi.  
CD44 variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells.  
Oncotarget 4: 785-791, 2013  
DOI: 10.18632/oncotarget.1048

31. Nakashima K, Arai S, Suzuki A, Nariai Y, **Urano T.**, Nakayama M, Ohara O, Yamamura K, Yamamoto K and Miyazaki T.  
PAD4 regulates proliferation of hematopoietic multipotent cells by controlling c-myc expression.  
Nat Commun., 2013;4:1836.  
DOI: 10.1038/ncomms2862

〔学会発表〕(計6件)

1. Mizutani K, Kawabata Y, Hayashi H, Taniura T, **Tajima Y.**  
Septic shock related antibiotic-induced endotoxin release after major surgery for hepatobiliary and pancreatic malignancies. EPC meeting 2015 , Toledo ( Spain ), 2015/06/25

2. Kawabata Y, Mizutani K, **Tajima Y.**  
Surgical outcome of superior mesenteric artery-first approach with radical antegrade modular pancreatosplenectomy for borderline resectable pancreatic cancer . EPC meeting 2015, Toledo ( Spain ), 2015/06/25

3. Moriyama I, Fukuda N, Sonoyama H, Kawabata Y, Tada Y, Oka A, Ohshima N, Tobita H, Yuki T, Kawashima K, Miyake T, Ishimura N, Sato S, Ishihara S, Kinoshita Y, Hayashi H, **Tajima Y.**, Kumanomidou S, Ikejiri F, Kawakami K, Inoue M, Junji Suzumiya J.  
Chemotherapy for unresectable/recurrent pancreatic cancer: Aretrospective, single-center study . EPC meeting 2015 , Toledo ( Spain ), 2015/06/25

4. Kawabata Y, **Nishi T.**, Kidani A, **Tajima Y.**  
Surgical outcome of pancreaticoduodenectomy with a total meso-pancreatoduodenum excision

for pancreatic head cancer. Combined EPC & IAP Meeting 2014, Southampton (United Kingdom), 2014/06/26

5. Fujii Y, Matsubara T, Hirahara N, Yano S, **Tajima Y**  
Redeced port laparoscopic surgery cooperated with endoscopic intervention for gastric GIST  
The International College of Surgeons The 59th Annual Congress of Japan Section  
Big Heart Izumo ( Izumo, Japan ) 2013/06/15

6. Taniura T, Matsubara T, Hirahara N, Yano S, **Tajima Y**  
Early gastric cancer associated with gastric sarcoidosis  
The International College of Surgeons The 59th Annual Congress of Japan Section  
Big Heart Izumo ( Izumo, Japan ) 2013/06/15

〔産業財産権〕  
取得状況(計1件)

名称: 物質相互作用をリアルタイムに可視化する技術

発明者: 岡崎宏亮、成相裕子、加藤太陽、浦野 健

権利者: 国立大学法人島根大学

種類: 特許

番号: 第 5831867 号

取得年月日: 平成 27 年 11 月 6 日

国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.shimane-u-dgs.jp/>

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田島 義証 (TAJIMA, Yoshitsugu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 20264228

(2)研究分担者

浦野 健 (URANO, Takeshi)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 70293701

西 健 (NISHI, Takeshi)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号: 80538893