

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860099

研究課題名(和文)ヘリコバクターハイルマニイ感染惹起胃MALTリンパ腫の治療法と診断法に関する研究

研究課題名(英文)Development of therapeutic and diagnostic methods for gastric MALT lymphoma by infection with *Helicobacter heilmannii*

研究代表者

高橋 哲史 (Takahashi, Tetsufumi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：40449004

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)：H. heilmannii感染惹起性の胃MALTリンパ腫の病態悪性化因子の同定を目的とし、長期感染マウスの血清および肝臓組織における遺伝子発現について、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、血清および肝臓組織両方で発現上昇の認められる15遺伝子を同定した。また、本病態の治療法の探索を目的とし、本菌感染マウスで活性化が認められるCD86シグナルの阻害物質である変異型CTLA4-Igの病態改善効果を検討した。その結果、抗原投与マウスにおいて、組織化学的解析での病態改善効果、および胃MALTリンパ腫構成細胞であるB細胞のマーカー遺伝子B220のmRNA発現減少が認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, to determine the malignant factor of gastric MALT lymphoma by infection with *H. heilmannii*, gene expression profiling analysis in the serum and liver of chronic infected mice was performed using microarray method. The results revealed that 15 genes, which were upregulated in both serum and liver, were determined. In addition, we investigated the therapeutic effect of mutant CTLA4-Ig, which is strong blocker of CD86-CD28 interaction. Administration of mutant CTLA4-Ig antigen attenuated the gastric MALT lymphoma formation and the mRNA expression of the marker gene of the gastric MALT lymphoma component B cells.

研究分野：病態生理 消化器

キーワード：Helicobacter heilmannii MALTリンパ腫

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter heilmannii や *H. suis* は培養法が確立しておらず純粋培養が非常に困難であるため、これら細菌の病原性に関する解析は、これまで困難であった。そこで申請者らは、*H. heilmannii* の実験的感染モデル系を構築し、本感染モデル系で、臨床での胃 MALT リンパ腫症状と同様な B 細胞性のリンパ濾胞が形成されることを報告した (Infect. Immun., 2007, 75:1214-1222)。

実験動物を用いて胃 MALT リンパ腫を自然発症させるモデルはほとんど報告されておらず、本モデルは、これまで基礎的検討が行えず不明な点の多かった胃 MALT リンパ腫の病態解析に、非常に有用である。

申請者らのこれまでの検討により (科学費若手 B: 研究課題番号 23790155)、*H. heilmannii* 感染マウスの胃粘膜では、CD86 を上流とする B 細胞活性化シグナルの多くの因子の発現が上昇することを明らかとした。さらに、*H. heilmannii* 感染惹起胃 MALT リンパ腫病変において、B 細胞と共に T 細胞の増加も認めた。これら T 細胞を FACS により詳細に解析した結果、感染により増加した T 細胞の比較的多くが CD86 陽性を示し、これら CD86 陽性 T 細胞では、CD86 の抑制系リガンドである CD152 (CTLA-4) の発現が著明に低下していた。すなわち、抑制系シグナルの機能不全により、CD86 の下流の B 細胞活性化シグナルが異常亢進し、結果として胃 MALT リンパ腫の病態発症を惹起しているものと考えられ、CD152 刺激物質が、本病態の有力な治療となり得る可能性が示唆された。

また、申請者らの検討により、*H. heilmannii* 長期感染 (1 年程度) マウスでは、肺や肝臓への MALT リンパ腫細胞の転移が認められ、本病態が悪性化により転移能を獲得する事が明らかとなった。悪性化した MALT リンパ腫の病態解析から、臨床で問題となっている既存の MALT リンパ腫治療法に抵抗性を示す症例に対する新たな治療法の標的発見に繋がる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

H. heilmannii 感染惹起性の胃 MALT リンパ腫の病態悪性化因子の同定を試みる。また、菌感染時に活性化が認められる CD86 シグナルの阻害物質について、本病態に対する治療効果の評価を試みる。

3. 研究の方法

H. heilmannii 長期感染 (感染 1 年) および非感染 C57BL/6J マウスの血液および肝臓組織より総 RNA を抽出し、得られた RNA を用いてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

コントロール Ig、野生型 CTLA4-Ig (アバタ

セプト相当物質) および CTLA4-Ig 変異体 (4 アミノ酸置換体) (図 1) の発現ベクターを、回転培養した Expi293 培養に遺伝子導入し、更に 5 日間回転培養後に培養上清を回収した。得られた培養液を MabSelect SuRe Protein G カラムを用いて抗原精製を行った。得られた抗原物質を PD-10 カラムにて脱塩後、蛋白定量を行った後に動物実験に使用した。

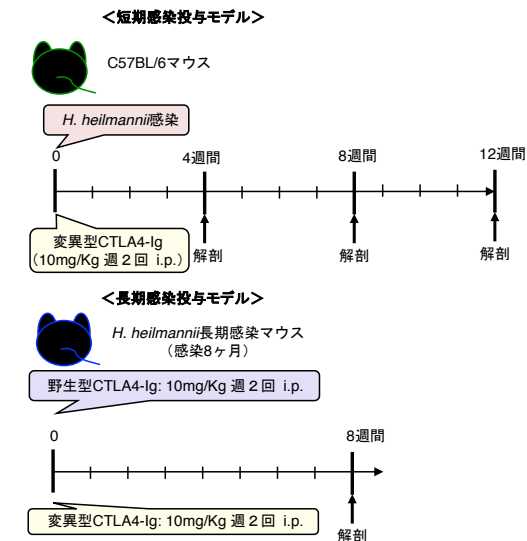


図 1. 野生型および変異型 CTLA4-Ig 抗原

C57BL/6 マウスに対し、*H. heilmannii* 感染時より変異型 CTLA4-Ig を 10 mg/Kg で週 2 回、4、8 および 12 週間腹腔内投与した。また、*H. heilmannii* 慢性感染 (感染 8 ヶ月) マウスに対し野生型および変異型 CTLA4-Ig を 10 mg/Kg で週 2 回、8 週間腹腔内投与した (図 2)。投与後、胃粘膜より RNA を抽出し、定量的 RT-PCR による mRNA 発現解析を行った。また、マウスの胃粘膜組織切片を HE 染色し、GELA 組織グレードシステムを用いて組織学的解析を行った。

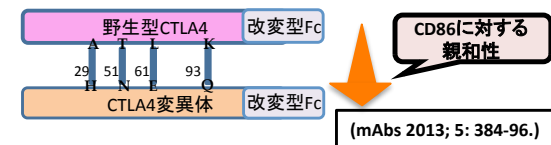


図 2. CD86 シグナル阻害物質の投与スキーム

4. 研究成果

肝臓と感染局所である胃粘膜でのマイクロアレイのデータを比較した結果、123 個の遺伝子について *H. heilmannii* 感染胃 MALT 腫病変組織で優位な発現上昇が認められず、*H. heilmannii* 長期感染マウスの肝臓において 2 倍以上の遺伝子発現上昇が認められた。これらの遺伝子のうち、CD300a や Tie1 など 9 個の遺伝子においては、悪性リンパ腫での遺伝子発現上昇が報告されていた。また、これらのうち、achaete-scute complex homolog 1

(Ascl1) や 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2 (Oasl2)を含む 15 の遺伝子については、血清 mRNA においても 2 倍以上の遺伝子発現上昇が認められた。

免疫組織学的解析の結果、CD86 に対して高い親和性を持つとされる変異型 CTLA4-Ig 抗原を *H. heilmannii* 感染時より 12 週間投与したマウスの胃粘膜において、HE 染色組織切片の病理解析により、胃 MALT リンパ腫の形成抑制傾向が認められた。また同時に、胃 MALT リンパ腫構成細胞である B 細胞のマーカー遺伝子 CD19、CD20 の mRNA 発現減少も認められた。さらに、*H. heilmannii* 慢性感染マウスに対し、野生型および変異型 CTLA4-Ig を 8 週間腹腔内投与した結果、変異型 CTLA4-Ig 抗原投与マウスにおいて、胃粘膜での B 細胞マーカー B220 の mRNA 発現減少が認められた (図 3)。さらに、組織学的解析の結果、変異型 CTLA4-Ig 投与マウスにおいてリンパ濾胞の形成抑制傾向が認められるとともに、炎症細胞が認められる個体についても、炎症細胞が粘膜下層に局限している観察像が得られた (図 4)。

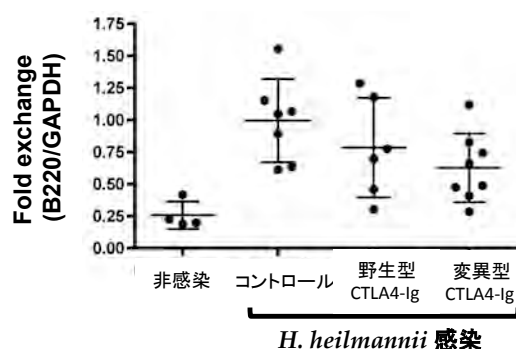


図 3. CTLA4-Ig 投与マウス胃粘膜における B220 mRNA 発現

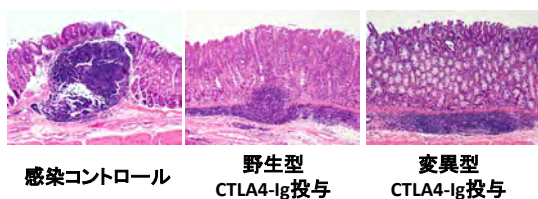


図 4. CD86 シグナル阻害物質投与マウスの胃粘膜

以上の結果より、*H. heilmannii* 感染マウスの胃粘膜で活性化が認められた CD86 シグナルに対して、本シグナル阻害物質である CTLA4-Ig 変異体が病態改善効果を有することが示唆された。この病態改善効果が予防効果に加え一定の治療効果を有することが明らかとなった。

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 5 件)

(1) Nakamura, M., Takahashi, T., Matsui, H., Baniwa, Y., Takahashi, S., Murayama, SY., Serizawa, H., Suzuki, H., Hibi, T. Alteration of angiogenesis in *Helicobacter heilmannii*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: interaction with c-Met and hepatocyte growth factor. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014; 29 Suppl 4:70-6. (査読有) doi: 10.1111/jgh.12776.

(2) Matsui, H., Takahashi, T., Murayama, SY., Uchiyama, I., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Matsumoto, T., Kawakubo, M., Horiuchi, K., Ota, H., Osaki, T., Kamiya, S., Smet, A., Flahou, B., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Takahashi, S., Nakamura, S., Nakamura, M. Development of new PCR primers by comparative genomics for the detection of *Helicobacter suis* in gastric biopsy specimens. *Helicobacter.* 2014; 19: 260-71. (査読有) doi: 10.1111/hel.12127.

(3) Nakamura, M., Takahashi, T., Matsui, H., Takahashi, S., Murayama, SY., Suzuki, H., Tsuchimoto, K. New pharmaceutical treatment of gastric MALT lymphoma: anti-angiogenesis treatment using VEGF receptor antibodies and celecoxib. *Curr Pharm Des.* 2014; 20: 1097-103. (査読有) doi: 10.2174/13816128113199990420.

(4) 馬庭 優子, 高橋 哲史, 松井 英則, 伊香 萌菜, 上原 安紀奈, 松永 佳誉子, 中村 正彦. *Helicobacter heilmannii* 感染 MALT リンパ腫における幹細胞と微小循環系 除菌の効果. *Progress in Medicine.* 2014; 34: 385-388. (査読無)

(5) 松井 英則, 高橋 哲史, 中村 正彦. 除菌適用拡大時代の *Helicobacter* 研究 *Helicobacter suis* 感染と MALT リンパ腫. *無菌生物.* 2014; 44 巻: 47-50 (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

(1) Anders Øverby, Tetsufumi Takahashi, and Hidenori Matsui. Chemoprevention of gastric MALT lymphoma by isothiocyanates from vegetables. 野菜のイソチオシアネートによるヘリコバクター・ハイルマニー感染の胃マルトリンパ腫の防御効果. 第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場 (岐阜)、3 月 28 日、2015.

(2) 川瀬 範子, 高橋 哲史, 上原安紀奈, 鈴木 幸男, Anders Øverby, 高橋 信一, 松井 英則, 中村 正彦. *Helicobacter heilmannii* 感染惹起胃 MALT リンパ腫に対する CD86 シグナル阻害物質の効果. デザイン・クリエイティブセンター神戸 (神戸)、3 月 28 日、2015.

(3) 中村正彦、高橋哲史、Anders Overby, 松井英則. 胃および肝臓 MALT リンパ腫形成における substance P, NK1R の関与 : substance P 拮抗剤の効果. 第 11 回日本消化管学会、京王プラザ (東京) 2 月 13 日、2015.

(4) 中村正彦、高橋哲史、Anders Overby, 松井英則. 胃 MALT リンパ腫形成における substance P の意義: spantide II の効果. 第 42 回日本潰瘍学会、慶應芝共立キャンパス (東京)、10 月 31 日、2014.

(5) 高橋哲史、松井英則、高橋信一、中村正彦. *H. heilmannii* 感染胃粘膜における IL-10 依存的な CD86-CD28 シグナル活性化. 第 20 回日本ヘリコバクター学会、ステーションコンファレンス東京 (東京)、6 月 28 日、2014.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : ヘリコバクター・スイス特異的配列、及び当該配列及び当該配列にコードされているタンパク質を標的とした診断方法

発明者 : 松井英則、高橋哲史、中村正彦、宮本真浩

権利者 : 学校法人北里研究所

種類 : 特許

番号 : 2014-132772

出願年月日 : 2014 年 6 月 27 日

国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 哲史 (Tetsufumi Takahashi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号 : 40449004