

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07553

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害剤を用いたH. suis感染胃リンパ腫抑制効果の検討

研究課題名(英文) Examination of the inhibitory effect of H. suis-infected gastric MALT lymphoma formation using an immune checkpoint inhibitor

研究代表者

山本 幸司 (Yamamoto, Koji)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：70608322

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)：ヘリコバクター・スイス(H. suis)は、人畜共通感染症の原因菌であり、胃MALTリンパ腫形成に関与している。近年、免疫チェックポイント阻害薬の使用が抗腫瘍効果を発揮することが知られている。本研究では、H. suis感染胃MALTリンパ腫発症マウスモデルを用いて、免疫チェックポイント阻害剤を投与したところ、胃MALTリンパ腫形成が有意に低下していることが明らかとなった。今後、これまで明らかにされていない胃MALTリンパ腫形成と免疫チェックポイント関連遺伝子発現との関連性が明らかになるばかりでなく、ヒトMALTリンパ腫患者に対する免疫チェックポイント阻害剤の有用性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

H. suis感染胃MALTリンパ腫形成メカニズムは未だ詳細に検討されておらず不明な点も多い。本研究結果では、免疫チェックポイント阻害薬の投与がH. suis感染胃MALTリンパ腫形成に有用な治療薬の候補であることが明らかとなった。今後、これまで明らかにされていない胃MALTリンパ腫形成と免疫チェックポイント関連遺伝子発現との関連性が明らかになるばかりでなく、ヒトMALTリンパ腫患者に対する免疫チェックポイント阻害剤の有用性が期待され、学術的独自性、ならびに、創造性の高い研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter suis (H. suis) is a causative agent of zoonotic infections and is implicated in gastric MALT lymphoma. Recently, the use of immune checkpoint inhibitors has been known to exert an antitumor effect. In this study, we found that treatment with an immune checkpoint inhibitor significantly reduced gastric MALT lymphoma formation in H. suis-infected mice. In the future, the relationship between gastric MALT lymphoma formation and immune check point-related gene expression will be clarified, and the utility of immune check point inhibitors for human MALT lymphoma patients is expected.

研究分野：感染症と粘膜免疫学

キーワード：H. suis感染症 胃MALTリンパ腫 免疫チェックポイント阻害剤 B細胞 T細胞

1. 研究開始当初の背景

H. suis は、グラム陰性細菌であり、イヌ、ネコ、ブタ、ならびに、ヒトの胃粘膜に感染していることが知られており、特に、ペットからヒトへの伝播が示唆されていることから、本菌は、人畜共通感染症の原因菌として想定されている (*Haesebrouck, F et al., Clin. Microbiol. Rev. 2009*)。これまでに、*H. suis* をマウスに経口感染させると、その 100% で胃 MALT リンパ腫が形成されることが知られているほか (*Yamamoto K et al., Microbes Infect. 2011*)、ヒト MALT リンパ腫患者の胃粘膜では 60% 以上と非常に高い感染率を有しており、ヘリコバクターピロリ菌に替わる新たな感染症として近年注目されている。しかしながら、*H. suis* 感染からどのようなメカニズムで胃 MALT リンパ腫形成を誘導しているのかの詳細は明らかにされていなかった。近年、申請者らは、*H. suis* をマウスに経口感染させると、胃粘膜に B 細胞、T 細胞、樹上細胞 (DCs)、ならびに、濾胞樹上細胞 (FDCs) が多数集積しており、胃 MALT リンパ腫を構成していることを明らかにしてきた (*Yamamoto K et al., Mucosal Immunol. 2014*)。また、*H. suis* 感染マウス胃粘膜で発現している遺伝子を詳細に解析した結果、IFN- γ の発現が著名に増加していることを明らかとなった (*Mimura T, Yamamoto K, et al., FEMS Immunol Med Microbiol. 2011*)。さらに、*H. suis* を IFN- γ 遺伝子欠損マウスに経口感染させたところ、これまで野生型マウス胃粘膜で 100% の確率で認められた胃 MALT リンパ腫形成が、IFN- γ 遺伝子欠損マウスの胃粘膜では、100% 抑制されていることが明らかとなった (*Lin Y & Yamamoto K et al., Mucosal Immunol. 2015*)。興味深いことに、野生型マウスから B 細胞、T 細胞、DCs、ならびに、FDCs を精製し、*H. suis* 感染 IFN- γ 欠損マウスに移入した結果、B 細胞を移入した群で、IFN- γ 欠損マウス胃粘膜における IFN- γ の発現が回復したほか、これまで 100% 抑制されていた胃 MALT リンパ腫形成が野生型マウス同様に観察されることが明らかとなった (*Lin Y & Yamamoto K et al., Mucosal Immunol. 2015*)。これにより、*H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫形成は、B 細胞から産生される IFN- γ が直接的に関与していることが明らかとなった。近年、(programmed cell death-1 ligand-1) PD-L1、ならびに、(programmed cell death-1) PD-1 に代表される免疫チェックポイント関連遺伝子が注目されている。これまでの報告で、PD-L1 の発現は、IFN- γ によって誘導され、特に、強い炎症反応を伴う腫瘍組織においては、PD-L1 が高発現しており、T 細胞上に発現している PD-1 と相互作用することで、T 細胞の活性化を著しく抑制させることが知られている (*Bellucci R et al., Oncoimmunology. 2015*)。一方で、抗 PD-L1 抗体、ならびに、抗 PD-1 抗体を用いた検討では、腫瘍組織上の PD-L1 と T 細胞上の PD-1 との相互作用が遮断された結果、T 細胞活性化による抗腫瘍効果が知られている (*Goodman A et al., Nat Rev Clin Oncol. 2017*)。申請者は、*H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫内に存在する PD-L1 陽性 B 細胞と PD-1 陽性 T 細胞が共に相互作用することで胃粘膜に浸潤した T 細胞の機能を抑制することで胃 MALT リンパ腫形成を促進していると想定している。本研究では、免疫チェックポイント阻害薬を用いることで *H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫形成が抑制されるかを検証した。

2. 研究の目的

ヘリコバクター *suis* (*H. suis*) は、人畜共通感染症の原因菌であり、感染後の胃粘膜に浸潤した B 細胞から産生されるインターフェロン γ (IFN- γ) によって、胃 MALT リンパ腫形成に関与している。近年、(programmed cell death-1 ligand-1) PD-L1、ならびに、(programmed cell death-1) PD-1 に代表される免疫チェックポイント関連遺伝子が注目されており、腫瘍組織においては、IFN- γ の刺激により高発現する PD-L1 遺伝子と T 細胞上に発現する PD-1 との相互作用により、T 細胞シグナルの抑制により腫瘍の形成維持に働いている。一方で、ヒトの癌患者を対象にした抗 PD-L1 抗体、ならびに、抗 PD-1 抗体の投与により、抗腫瘍効果が明らかにされている。申請者らは、PD-L1-PD-1 遺伝子の発現が胃 MALT リンパ腫の形成、維持に働いていると考え、*H. suis* 感染胃 MALT リンパ腫発症マウスモデルを用いて、胃 MALT リンパ腫に対する免疫チェックポイント阻害剤の新規腫瘍抑制効果の検討を目的とした。特に、本研究課題では、*H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫形成・維持における免疫チェックポイント関連遺伝子の発現と、その阻害剤を用いた抗腫瘍効果の探索を世界に先駆けて実施した。申請者は、***H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫形成に直接的に関与する B 細胞上には、PD-L1 が発現し、また、T 細胞上には、PD-1 が発現していると想定しており、それらの相互作用が T 細胞の機能喪失を導く結果、胃 MALT リンパ腫の形成・維持に関与している**と予想している。今後、これまで明らかにされていない胃 MALT リンパ腫形成と免疫チェックポイント関連遺伝子発現との関連性が明らかになるばかりでなく、ヒト MALT リンパ腫患者に対する免疫チェックポイント阻害剤の有用性が期待され、学術的独自性、ならびに、創造性の高い研究であると考えられる。

3. 研究の方法

本研究計画では、*H. suis* 感染後の免疫チェックポイント関連遺伝子の発現と胃 MALT リンパ腫形成メカニズムを解明するために、胃 MALT リンパ腫を形成する各々の細胞上の PD-L1、ならびに、PD-1 の発現を解析した。また、MALT リンパ腫細胞株を用いて組換え IFN- γ の細胞刺激実

験を行い、PD-L1 発現メカニズムの詳細を免疫学的観点から明らかにした。さらに、抗 PD-L1 抗体、ならびに、抗 PD-1 抗体を用いて、*H. suis* 感染マウスへの投与実験を行い、胃 MALT リンパ腫形成抑制効果の検討を行う。具体的には以下の方法で研究を実施した。

(1) *H. suis* 感染胃 MALT リンパ腫構成細胞上の PD-L1、ならびに、PD-1 発現解析

方法：*H. suis* を野生型マウスに経口感染させ、感染 6 か月後に マウス胃を摘出し、1 mM のジチオトレイトール、ならびに、1 mM EDTA で上皮組織を除去後、細胞培養液で 1 mg/ml に調製したコラゲナーゼを用いて、37 °C で 3 時間振盪・混和させる。その後、B 細胞特異的抗体、T 細胞特異的抗体、DC 特異的抗体、ならびに、FDC 特異的抗体と PD-L1 特異的抗体、または、PD-1 特異的抗体を用いて多重染色を行い、フローサイトメトリーにてマウス胃粘膜に浸潤した B 細胞、T 細胞、DCs、ならびに、FDCs 上の PD-L1、ならびに、PD-1 の発現解析を行った。

(2) 組換え IFN- γ 刺激後のリンパ腫細胞上の PD-L1 発現メカニズムの解析

方法：ヒト MALT リンパ腫細胞株を 1×10^6 個を培養皿にまき、コントロール群、組換え IFN- γ 処理群 (1 μ g/ml) で 24 時間、ならびに、48 時間で刺激実験を行い、細胞上の PD-L1 遺伝子の発現を定量的 PCR 法、ならびに、フローサイトメトリーで評価した。

(3) *H. suis* 感染マウス胃粘膜に浸潤した T 細胞内遺伝子の網羅的解析

方法：非感染野生型マウス、ならびに、*H. suis* 野生型感染マウスから胃を摘出し、1 mM のジチオトレイトール、ならびに、1 mM EDTA で上皮組織を除去後、細胞培養液で調製したコラゲナーゼを用いて、37 °C で 3 時間振盪・混和させた。回収される細胞に対して、T 細胞特異的抗体を用いて染色後、セルソーターにてマウス胃粘膜に浸潤した T 細胞を精製した。精製後、細胞から RNA 抽出を行い、T 細胞シグナルに關与する遺伝子について網羅的に解析した。

(4) 抗 PD-L1 抗体、ならびに、抗 PD-1 抗体を用いた *H. suis* 感染マウス胃 MALT リンパ腫形成抑制効果の検討

方法：*H. suis* をマウスに経口感染させ、2 週間後に 200 μ g の抗 PD-L1 抗体、または、抗 PD-1 抗体を週に 3 回マウスに腹腔内投与した。投与 3 か月、ならびに、6 か月後マウス胃を回収し、コントロール群と比較して胃 MALT リンパ腫抑制効果を病理学的手法で評価した。さらに、胃 MALT リンパ腫形成に關連した遺伝子発現を定量的 PCR 法にて検討した。

4. 研究成果

H. suis 感染後の免疫チェックポイント關連遺伝子の発現と胃 MALT リンパ腫形成メカニズムの詳細を明らかにするために、*H. suis* 感染胃 MALT リンパ腫構成細胞上の PD-L1、ならびに、PD-1 発現解析を以下の通り実施した。*H. suis* を野生型マウスに経口感染させ、感染 6 か月後にマウス胃を摘出し、1 mM のジチオトレイトール、ならびに、1 mM EDTA で上皮組織を除去後、細胞培養液で 1 mg/ml に調製したコラゲナーゼを用いて、37 °C で 3 時間振盪・混和させた。その後、B 細胞特異的抗体 (B220 ならびに CD19)、T 細胞特異的抗体 (CD4 ならびに TCR)、樹状細胞特異的抗体 (CD11c ならびに MHC II)、ならびに、濾胞樹状細胞特異的抗体 (FDC-M1) と PD-L1 特異的抗体、または、PD-1 特異的抗体を用いて多重染色を行い、フローサイトメトリーにてマウス胃粘膜に浸潤した B 細胞、T 細胞、樹状細胞、ならびに、濾胞樹状細胞上の PD-L1、ならびに、PD-1 の発現解析を行った。結果、*H. suis* 感染マウス胃粘膜に浸潤した B 細胞上では PD-L1 が高く発現しており、*H. suis* 感染マウス胃粘膜に浸潤した他の細胞上では PD-L1 の発現はほとんど認められなかった。また、同様な手法を用いて、*H. suis* 感染マウス胃粘膜に浸潤した細胞上の PD-1 発現細胞の解析を行ったところ、T 細胞上において PD-1 の発現が認められ、胃粘膜に浸潤した他の細胞ではその発現はほとんど認められなかった。これらのことから、*H. suis* 感染後の胃粘膜に浸潤した PD-L1 陽性細胞は B 細胞であり、また、PD-1 陽性細胞は T 細胞であることが初めて明らかとなった。

次に、*H. suis* 感染胃 MALT リンパ腫発症における免疫チェックポイント關連遺伝子の詳細を明らかにするために、組換え IFN- γ 刺激後のリンパ腫細胞上の PD-L1 発現メカニズムの解析を行った。ヒト MALT リンパ腫細胞株を用いて、コントロール群、組換え IFN- γ 処理群で 24 時間ならびに 48 時間で刺激実験を行い、細胞上の PD-L1 遺伝子の発現を定量的 PCR 法ならびにフローサイトメトリーで評価した。結果、組換え IFN- γ 処理群においては、ヒト MALT リンパ腫細胞株での PD-L1 の発現が時間依存的に亢進していたほか、フローサイトメトリーを用いた検討でもヒト MALT リンパ腫細胞株上の PD-L1 の発現が確認された。さらなる研究で、胃 MALT リンパ腫由来 T 細胞では PD-1 の発現が高いことが明らかとなった。*H. suis* 感染マウス胃粘膜に浸潤した T 細胞内遺伝子の網羅的解析を行った。非感染野生型マウスならびに *H. suis* 野生型感染マウスから胃を摘出し、T 細胞特異的抗体を用いて染色後、セルソーターにてマウス胃粘膜に浸潤した T 細胞を精製した。精製後、細胞から RNA 抽出を行い、T 細胞シグナルに關与する遺伝子について網羅的な解析を行った。結果、非感染マウス胃由来 T 細胞に比べて *H. suis* 感染マウス胃由来 T 細胞では、T 細胞の機能を破綻させるいくつかの遺伝子の発現が確認された。これらの結果、*H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫形成に直接的に關与する B 細胞上には、PD-L1 が発現し、また、T 細胞上には、PD-1 が発現していると想定しており、それらの相互作用が T 細胞の機能喪失を導く結果、胃 MALT リンパ腫の形成・維持に關与していることが示唆された。さらに、*H. suis* 感染胃 MALT リンパ腫発症マウスモデルを用いて、抗 PD-L1 抗体ならびに抗 PD-1 抗体の投与が胃 MALT リンパ腫形成を抑制されるか否かを確認した。*H. suis* 感染マウスに抗 PD-L1 抗体ならびに抗 PD-1 抗体を投与すると胃 MALT リンパ腫形成の数が有意に減少することが明

らかとなった。また、胃 MALT リンパ腫形成に関連した遺伝子発現についても抗 PD-L1 抗体ならびに抗 PD-1 抗体の投与により有意に減少していることが明らかとなった。これらのことから、今後、本研究成果を発展させ、ヒト悪性リンパ腫患者への新規免疫チェックポイント阻害薬の有用性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Koji, Kondo Yasuyuki, Ohnishi Shunsuke, Yoshida Masaru, Sugiyama Toshiro, Sakamoto Naoya	4. 巻 24
2. 論文標題 The TLR4-TRIF-type 1 IFN γ /IFN- pathway is crucial for gastric MALT lymphoma formation after Helicobacter suis infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103064 ~ 103064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Koji, Kondo Yasuyuki, Sugiyama Toshiro, Sakamoto Naoya	4. 巻 3
2. 論文標題 Protocol for generating a mouse model of gastric MALT lymphoma and the identification of MALT lymphoma cell populations by immunostaining	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101155 ~ 101155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院医学研究院内科学講座消化器内科学教室ホームページ https://halo.med.hokudai.ac.jp/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------