

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590690

研究課題名（和文）胃マルトリンパ腫におけるヘリコバクター属の感染実態および分子標的薬の効果の解析

研究課題名（英文）Studies on *Helicobacter* species on gastric MALT lymphoma and effect of molecular target drugs

研究代表者

中村 正彦 (NAKAMURA MASAHIKO)

北里大学・薬学部臨床薬学研究・教育センター病態解析学・准教授

研究者番号：30155858

研究成果の概要（和文）：上部消化管内視鏡生検組織を用いた検討では、MALT リンパ腫では 39% (7/18)，その他の上部消化管疾患では合わせて 2% (5/250) の *H. heilmannii* 陽性率を認めた。また、*H. heilmannii* および *H. suis* に分類される菌であることが明らかとなった。さらに鳥肌胃炎症例 2 例が陽性であることから、胃癌との関連性が示唆された。感染モデルによる検討では、VEGF 関連抗原が腫瘍内で強陽性を示した。さらに c-Met, hepatocyte growth factor との関係について検討した結果、c-MET 活性が著明に亢進していることが示された。

研究成果の概要（英文）：By the investigation of the specimens obtained from the upper gastrointestinal endoscopy of the patients suffering from chronic gastritis, gastric ulcer, gastric polyp, gastric cancer and gastric MALT lymphoma, 7 MALT lymphoma cases out of 18 (38%) were found to be positive to *Helicobacter heilmannii*, while only 2% were positive in other gastric diseases. By the cluster analysis using GENENTYC-MAC UPGMA, these cases were found to be infected by *Helicobacter heilmannii* and *suis*. Among other gastric diseases, nodular gastritis patients were found to be highly positive to *H. heilmannii*, suggesting the possible interaction with the gastric cancer. In *H. heilmannii* positive cases, more than half cases were found to show the positivity to *H. pylori* as well.

By the in vivo study using the infection model using C57BL/6 mice, VEGF-related immunoreactivities were recognized in the MALT lymphoma, suggesting the VEGF-mediated angiogenesis was closely related to the expansion of the tumor. The administration of Flt-4 and Flt-1 antibody suppressed the tumor, supporting this hypothesis. c-Met immunoreactivity was found in the lymphocytes composing the MALT lymphoma, and HGF immunoreactivity was recognized mostly in the endothelial cells and macrophages. HGFA was localized on mesenchymal cells other than the lymphocytes. The administration of antibodies against c-Met to the infected mice induced the significant suppression of hepatic and pulmonary lesions as well as the gastric MALT lymphoma.

In conclusion, HGF and c-Met pathway were suggested to contribute to the lymphomagenesis in the liver and lung after *Helicobacter heilmannii* infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H.pylori*)が胃、十二指腸潰瘍、萎縮性胃炎の形成、胃癌、胃マルトリンパ腫の増大に関係することは、多くのエビデンスが蓄積されており、すでに定説と成ったと考えられる。*H.pylori*の除菌療法に関しても、ABPC, clarithromycin, PPIによる一次除菌に加え2007年8月にはABPC, metronidazole, PPIによる二次除菌も認可された。この除菌療法に加え衛生状態の改善により本邦でも若年層では*H. pylori*の感染率は欧米並に低下してきた。今後は潰瘍症を主体とした胃病変の罹患状況が変化してくることが想定される。そのなかで特に問題となるのが*H.pylori*の再感染および他の*Helicobacter*属の感染の問題である。この点に関しては、すでに*H.pylori*除菌後の再感染症例の中に*Helicobacter heilmannii* (*H.heilmannii*) および*Helicobacter suis* (*H. suis*)感染例があることが報告された。

また、これまでは、*H.pylori*にのみ関係すると考えられてきたMALTリンパ腫症例のなかに*H. heilmannii*あるいは*H.suis*陽性症例が含まれていることが明らかとなった。

このように新興感染症の一つとして今後の展開が危惧される*H. heilmannii*感染は、人獣共通感染症あるいは動物由来感染症のひとつであることは知られているが、その感染実態および疾患との関連の詳細は不明である。これは、*H. heilmannii*は純粋培養が2008年にはじめて報告されたが、colonyの形成まではいたらず、培養が可能な‘*H. pylori*とは異なり詳細な評価が不可能であったためである。しかし、近年*H. heilmannii*の16S rDNA配列が報告されたことから、PCRによる検討はある程度可能となった。そこで申請者らは過去3年間にわたり、MALTリンパ腫を含めた各種胃疾患症例における*H. heilmannii*の陽性率を検討し、約120例の検討では

MALTリンパ症例に*H.pylori*との混合管先例を含めて特に高率に陽性であることがわかった。

実験動物による検討に関しては、申請者らはカナクイザル由来の*H. heilmannii*を用いてC57BL/6 mouse感染モデルを作成し、3ヶ月で50%、6ヶ月以上で100%という高率で多数の胃MALTリンパ腫が形成されることを報告した(Nakamura, M., et al. Infect Immun 75, 1214-1222, 2007)。このモデルでの除菌の検討では従来の*H. pylori*に用いられるtriple therapyではeradicationには至らないことが明らかとなった。すなわち、今後増加することが想定される*H.heilmannii*による胃MALTリンパ腫の治療に関しては、通常*H.pylori*に対する一次除菌では不十分なものが含まれると考えられる。

現在、除菌無効例の胃MALTリンパ腫に対しては、悪性リンパ腫に対するCHOPをはじめとした化学療法、rituxan投与、放射線治療も試みられているが、この除菌無効例に対しては*H.heilmannii*によるものが含まれることも示唆されている。病態に対応したさらに副作用の少ない新たな治療法を開発する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

1. 上部消化管疾患（MALTリンパ腫、胃炎、特に鳥肌胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌、特に未分化型胃癌）症例における*H. heilmannii*の感染率、世代間の相違、地域差を明らかにする。

2. C57BL/6 マウス*H. heilmannii*長期感染モデルを用いて、MALTリンパ腫形成および増大

に対するVEGF受容体抗体、c-MET抗体などの分子標的薬の有効性について検討する。

3. 研究の方法

I. 症例による検討

1) 上部消化管内視鏡生検組織による検討

内視鏡的生検組織を用いて、慢性胃炎、胃潰瘍、早期胃癌、進行胃癌、胃MALTリンパ腫胃組織の採取および細菌学、病理組織化学、分子生物学および免疫学的検討を行う。特に、前回の検討で対象にしていなかった早期胃癌、進行胃癌、鳥肌胃炎症例に重点をおいて胃MALTリンパ腫症例とともに検討した。

2) パラフィンブロックを用いた検討

すでにMALTリンパ腫症例と診断された症例についてパラフィンブロックより未染色スライドを作成し、これからDNAを抽出して以下の検討を行った。

3) PCR, *in situ* hybridization法による検討

内視鏡生検組織をHelicoporterにて保存後、すでに確立してきた*H.pylori*に対する417 bp, *H.heilmannii*に対する112 bpのprobeを用いて*H.pylori*, *H.heilmannii*に対するPCRを施行し、胃粘膜病変、rapid urease testの結果と対比した。また、陽性者については、病理組織学的検討に用いた組織およびparaffin切片を用いて、microprobe法により*in situ* hybridization 方を施行した。胃MALTリンパ腫症例については、特に菌の分布と腫瘍組織、炎症性細胞浸潤の関連について検討した。さらに、UreA配列に基づいたPrimerにより

H.heilmannii, *H.suis*, *H.felis*, その他の同定を行った。

4) 病理組織学、免疫学的検討

胃粘膜内におけるHp属の局在を、それぞれに対するモノクローナル抗体を用いて検討した。すなわち、胃組織をZamboni固定し、cryostat切片を作成、蛍光抗体間接法を施行し、confocal laser microscopyを用いて観察した。*H.heilmannii*に関しては、われわれが作成した*H.pylori*のLPSに対する

ポリクローナル抗体の交叉反応性を用いて検討した。

II. 感染モデルによる検討

カニクイザルより分離、マウスに継代し、Hhとして同定、登録している菌を含んだ胃粘液を採取し、胃ゾンデによりC57BL/6マウスに感染させ、1, 2, 3, 6, 12ヶ月後の胃組織につき以下の検討を行った。

1) 病理学的検討

粘膜萎縮との関連を検討する目的で、H, K-ATPase a subunit, pepsinogenに対するmonoclonal抗体、Hpに対するpolyclonal抗体を用いた二重染色法により、壁細胞の変化とHhの分布の関連を検討した。また、腫瘍増大とVEGFの関連につきhypoxyprobe, HIF-1 α , VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, Flt-4, Flk-1, c-MET, hepatocyte growth factor (HGF)に対するmonoclonal抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

2) VEGF関連モノクローナル抗体を用いた検討

*H.heilmannii*感染3ヶ月後にVEGF-A, VEGF-C, Flt-1, Flt-3, Flk-1, c-MET抗体を単独あるいは混合投与し、その後1週間毎の腫瘍の肉眼的変化、caspase 3, 8, 9,によるapoptosisの変化および組織化学的变化を検討した。

次に、HGF, c-Met系とMALTリンパ腫との関係を明らかにする目的で、その組織におけるc-Met, hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator (HGFA)との関係について検討した。さらにc-Met抗体を腹腔内投与し、腫瘍の変化を検討した。

4. 研究成果

上部消化管内視鏡生検組織を用いた検討では、内視鏡的生検組織を用いて、慢性胃炎（化生性胃炎、萎縮性胃炎、鳥肌胃炎）、胃潰瘍、胃ポリープ、MALTリンパ腫胃組織の採取し、PCR法による検討

を行った結果、MALTリンパ腫では7/18、その他の上部消化管疾患では合わせて5/250の *H. heilmannii* 陽性率を認めた。また、細菌学的、分子生物学的検討として、16S rRNAおよびureaseのsequenceを検討しGENETYX-MAC:UPGMAによりcluster解析を施行した結果、*H. heilmannii*および*H. suis*に分類される菌であることが明らかとなった。病理組織学、免疫学的検討からは、生検組織を用いた検討でPCR法陽性者に陽性所見を認めた。さらに鳥肌胃炎症例2例が陽性であることから、胃癌との関連性が示唆されたが、胃癌症例の検討ではいまのところ陽性者はみつからなかった。また、*H. pylori*に対するPCRとの両者の陽性率がMALTリンパ腫症例できわめて高率であることが明らかとなった。

感染モデルによる検討では、カニクイザル由来の菌および鳥肌胃炎症例の胃組織を含んだ胃粘液を採取し、C57BL/6マウスに感染させ、1, 2, 3, 6, 12ヶ月後の胃組織を採取し、病理組織化学的検討、PCR, *in situ* hybridization法による検討を行った。その結果、感染6ヶ月以降のマウスでは全例に胃底腺粘膜内に隆起性病変を認めた。また壁細胞内への浸潤およびapoptosisの所見が観察された。組織化学的には、VEGF-A、Flt-1、Flk-1、Flt-4、COX-2、iNOSが腫瘍内および周辺部で強陽性所見を示したことから、虚血を引き金とする発現増殖が関与することが示唆された。さらにFlt-4、Flt-1受容体抗体投与が腫瘍縮小に極めて有効であることが明らかとなり、血管新生抑制療法のMALTリンパ腫に対する有効性が示唆された。

次に、HGF, c-Met系とMALTリンパ腫との関係を明らかにする目的で、その組織におけるc-Met, hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator (HGFA)との関係について検討した。さらにc-MET抗体を腹腔内投与し、腫瘍の変化を検討した。その結

果、胃MALTリンパ腫に比較し、肝、肺リンパ腫においては、MadCAM-1陽性high endothelial venuleの形成が亢進していることが明らかとなった。また、肝、肺病変では、c-Met活性が著明に亢進していることが示された。さらに抗体投与により腫瘍の有意の縮小が観察された。

以上より、*H. heilmannii*による胃MALTリンパ腫が、肝、肺に進展する際には、微小循環系が増生し、c-Metが関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文](計 7 件)

- ① 中村正彦、高橋哲史、横山展子、松田 唯、松井英則、土本寛二、胃、肝 MALT リンパ腫形成および進展における幹細胞の関与、*Prog Med*、査読無、32 巻、2012、553-555
- ② 横山展子、中村正彦、松田唯、馬庭優子、伊香萌菜、松井英則、高橋哲史、高橋信一、土本寛二、胃、肝、肺MALTリンパ腫形成におけるc-Met, Hepatocyte Growth Factorの関与：c-Met抗体による腫瘍縮小効果、*Prog Med*、査読無、33 巻、2012、397-400
- ③ 中村正彦、高橋哲史、松井英則、高橋信一、土本寛二、*Helicobacter heilmannii* 感染MALTリンパ腫における幹細胞の意義：CD44, CD133免疫活性との関連および除菌の効果、*Ulcer Research*、査読有、40巻、2013、9-11
- ④ 中村正彦、土本寛二：胃粘膜微小循環系—潰瘍、リンパ腫形成時の変化、脈管学、査読有、51巻、2011、139-144
- ⑤ 品川桂子、小松陽子、高橋哲史、中村正彦：*Helicobacter heilmannii*感染に対する宿主応答因子の網羅的解析、*Prog Med*、査読無、31巻、2011、814-816

- ⑥ Nakamura, M., Matsui, H., Takahashi, T., Ogawa, S., Tamura, R., Murayama, S.Y., Takahashi, T. and Tsuchimoto, K.: Suppression of lymphangiogenesis induced by Flt-4 antibody in gastric low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma by *Helicobacter heilmannii* infection. J. Gastroenterol. Hepatol. 査読有、25巻、 Suppl. 1、2010、S1-S6
- ⑦ Nobutani, K., Yoshida, M., Nishiumi, S., Nishitani, Y., Takagawa, T., Tanaka, H., Yamamoto, K., Miura, T., Bensuleiman, Y., Ota, H., Takahashi, S., Matsui, H., Nakamura, M. and Azuma, T.: *Helicobacter heilmannii* can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer's patch-independent pathway. FEMS Immunol Med Microbiol、査読有、60巻、2010、156-164
- [学会発表](計 12 件)
- ① 中村正彦、松井英則、高橋哲史、高橋信一、土本寛二、Helicobacter heilmanniiによる胃、肝、肺MALTリンパ腫形成および進展におけるc-MET抗体の効果、第18回日本ヘリコバクター学会学術集会(岡山) June 29-30, 2012.
- ② 横山展子、中村正彦、松田唯、高橋哲史、松井英則、土本寛二、胃、肝、肺 MALTリンパ腫形成におけるc-MET, Hepatocyte Growth Factorの関与:c-MET抗体による腫瘍縮小効果、第31回消化器病態生理勉強会(京王プラザホテル) July 28, 2012.
- ③ 中村正彦、松井英則、高橋哲史、高橋信一、土本寛二、胃および肝MALTリンパ腫形成および進展における幹細胞マーカーの変化:除菌時の変化、第9回日本消化管学会総会(京王プラザ) Jan.25-26, 2013.
- ④ Nakamura, M., Matsui, H., Takahashi, T. and Tsuchimoto, K.、MALT lymphoma stem cell and its niche are related to peculiar microcirculatory network in *Helicobacter heilmannii*-infected mice stomach. 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Microcirculation. Feb 8-9, 2013.
- ⑤ 高橋哲史、松井英則、瀧沢麻子、伊香萌菜、松田唯、土本寛二、中村正彦:
*Helicobacter heilmannii*感染惹起胃MALTリンパ腫病態形成時におけるCD86依存的シグナルの活性化。第31回Cytoprotection研究会。March 15, 2013.
- ⑥ 伊香萌菜、高橋哲史、松田唯、瀧沢麻子、松井英則、高橋信一、中村正彦、土本寛二:
*Helicobacter heilmannii*感染胃粘膜におけるCD86依存的シグナルの活性化。日本薬学会第133年会。March 27-30, 2013.
- ⑦ 馬庭優子、中村正彦、横山展子、高橋哲史、松井英則、土本寛二:
*Helicobacter heilmannii*感染MALTリンパ腫における幹祭簿と微小循環系:除菌の効果、日本薬学会第133年会。March 27-30, 2013.
- ⑧ 中村正彦、高橋哲史、松井英則、土本寛二:
*Helicobacter heilmannii*感染MALTリンパ腫における幹細胞と微小循環系の関連。第40回日本潰瘍学会(京王プラザ)、ミニワークショップ1.粘膜防御・微小循環・*Helicobacter pylori*. July 12-14, 2012.
- ⑨ 中村正彦、高橋哲史、松井英則、土本寛二:
*Helicobacter heilmannii*感染MALTリンパ腫における幹細胞の意義:除菌療法との関連。第44回日本臨床分子形態学会(高

知)シンポジウム2司会:中村正彦、寺田総一郎
Sept. 28-29, 2012。

⑩ Nakamura, M., Matsui, H., Takahashi, T.,
Murayama, S.Y., Takahashi, S., Hibi, T. and
Tsuchimoto, K., c-MET, HGF and HGFA are
closely related to the Liver and Lung Lesion in
Helicobacter heilmannii-induced MALT
lymphoma, DDW 2012 (San Diego, USA) May
19-22, 2012.

⑪ Nakamura, M., Takahashi, T., Matsui, H.,
Takahashi, S. and Tsuchimoto, K., c-MET
Antibody Administration Reduces *Helicobacter*
heilmannii-induced MALT Lymphoma in Fundus.
Liver and Lung, 14th Meeting of International
Conference on Ulcer Week (Tokyo) July 12-14,
2012.

⑫ Nakamura, M., Matsui, H., Takahashi, T.,
Takahashi, S., Hibi, T. and Tsuchimoto,
K., MALT Lymphoma Stem Cell
in *Helicobacter heilmannii*-infected Mice
Stomach: Effect of Eradication. 7th
International Symposium on Cell/Tissue Injury
and Cytoprotection/Organoprotection -Focus on
GT Tract- (Hawaii, USA). Sept. 9-11, 2012.

[図書](計1件)

① 中村正彦、土本寛二、学際企画。日本臨床分子形態学会編、*Helicobacter heilmannii*の超微形態および壁細胞への侵入性、モノグラフ 病気の分子形態学、2011、101

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 正彦 (NAKAMURA MASAHIKO)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 30219373

(2) 研究分担者

松井 英則 (MATSUI HIDENORI)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号 : 40449004

高橋 哲史 (TAKAHASHI TETSUFUMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号 : 30179808