

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460935

研究課題名(和文) マルトリンパ腫幹細胞ニッチと微小循環系の関連の解析

研究課題名(英文) Relation of stem cell niche and microcirculation in MALT lymphoma

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：30155858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胃MALTリンパ腫と幹細胞、微小循環系、自律神経系の関連をサブスタンスPから検討した。ハイルマニイ菌感染マウスを用い、サブスタンスP陽性神経、受容体が、豊富に細動脈、細静脈周囲に認められ、幹細胞を含むMALTリンパ腫細胞上にも分布した。拮抗剤抑制効果からも、サブスタンスPの重要性が明らかとなった。また、MALTリンパ腫内にはVEGF、Vasohibin2が分布し、陽性細胞は一致せず、VEGF拮抗剤投与時にはVasohibin2が代償的に増加することが明らかとなった。臨床例の検討からサブスタンスP関与が示唆された。また、VEGF拮抗剤効果減弱にVasohibinが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The relation of stem cells, microcirculatory system and autonomic nervous system to the formation and progress of the gastric MALT lymphoma has been investigated mainly from the viewpoint of substance P and angiogenesis. In the *Helicobacter heilmannii*-infected mouse model, substance P containing nerves and its receptors has been found to be richly distributed in the MALT lymphoma tissues, especially near the afferent arterioles, efferent venules and lymphocytes including the stem cells of the lymphoma. The effect of the substance P antagonists also support the significance of autonomic nerves in the regulation of MALT lymphoma. In the clinical cases, the similar distribution of the nerves and the receptors has been detected. In addition, the administration of axitinib, one of the multiple tyrosine kinase inhibitors, revealed the reciprocal regulation of vasohibin 2 and VEGF in the progress of the gastric MALT lymphoma.

研究分野：消化器内科、胃MALTリンパ腫、*Helicobacter*属感染

キーワード：胃MALTリンパ腫 幹細胞 微小循環系 自律神経 ハイルマニイ菌

## 1. 研究開始当初の背景

非上皮性腫瘍の幹細胞のニッチ、微小循環系、自律神経に関しては、上皮性腫瘍に比較し不明な点が多く、その病態、治療を考える上で大きな課題となってきた。

## 2. 研究の目的

我々が確立した*Helicobacter heilmannii* (以下ハイルマニ菌)感染胃、肝MALTリンパ腫モデルを用いて、リンパ腫内微小循環系およびリンパ腫形成における幹細胞およびその周辺に形成されるニッチの組織化学的、電顕細胞化学的特徴を明らかにする。さらに、VEGF 受容体抗体、c-Met 抗体投与時の腫瘍の変化について検討し、微小環境変化の腫瘍に及ぼす影響について検討し、臨床応用への展開も考えることである。

## 3. 研究の方法

(1)動物実験による検討—ハイルマニ菌の長期感染モデルを用いて  
2001年よりカニクイザルおよび人由来ハイルマニ菌長期感染 C57BL/6 マウスを用いた胃、肝臓、肺 MALT リンパ腫形成に関して検討を続けており、その組織化学的特徴、VEGF 受容体抗体に対する反応性について報告している。そこで、この系を用いて各種幹細胞マーカー、血管新生因子の vascular endothelial growth factor (VEGF)、vasohibin-2 (VASH-2)、c-Met、substance P、calcitonin gene-related peptide (CGRP)の関与を PCR、共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡を用いて検討した。さらに各種拮抗剤の効果を検討した。MALT リンパ腫における substance P、c-Met などの関与を検討するため、substance P、その受容体の NK1R の局在および substance P 拮抗剤の aprepitant および spantide II、c-Met 拮抗剤の axitinib 投与後の変化を検討した。さらに calcitonin gene-related peptide (CGRP)を検討し、微小循環系のマーカーとして毛細血管内皮細胞の局在を CD31、32 抗体、リ

ンパ管を podoplanin 抗体で、幹細胞は DCAMKL-1、PCNA、Musashi-1 の局在により比較検討した。

### (2)臨床検体を用いた検討

臨床例の検討としては、慢性胃炎、鳥肌胃炎、胃 MALT リンパ腫症例におけるハイルマニ菌の関与につき解析し、陽性症例について感染マウスと同様の指標について検討した。

## 4. 研究成果

胃MALTリンパ腫と幹細胞、微小循環系、自律神経系の関連をサブスタンスPから検討した。ハイルマニ菌感染マウスを用い、サブスタンスP陽性神経、受容体が、豊富に細動脈、細静脈周囲に認められ、幹細胞を含むリンパ腫細胞上にも分布した。拮抗剤抑制効果からも、サブスタンスPの重要性、VEGF、Vasohibin2の関与も明らかとなった。臨床例の検討からも、サブスタンスPの関与を示唆する所見が得られた。

### (1)感染実験による検討

MALTリンパ腫動物実験に関して、ハイルマニ菌感染C57BL/6マウスを用いてMALTリンパ腫形成に関連するmediatorについての検討を行ってきた。特にsubstance Pを中心とした自律神経系、微小循環系、幹細胞とMALTリンパ腫との関連に注目した検討も行った。その結果、胃、肝リンパ腫では、substance P免疫活性は、腫瘍内に散在性に観察され、NK1R免疫活性は腫瘍全体に認められ、特に腫瘍内の微小循環系内皮細胞上に分布した。spantide IIあるいはaprepitant投与後には、腫瘍の大きさは有意に縮小し、apoptosis陽性細胞が特に胚中心周辺に認められた。陽性細胞には微小循環系内皮細胞が多く含まれていることも明らかとなり、胚中心周辺に分布する幹細胞にも関係することが示唆された。以上より、Hhによる胃、肝MALTリンパ腫の増大には、substance Pなどを介した微小循環系の増生および幹細胞に対する直接作用が関与することが示唆された。さらに、VEGFに加え、VASH2が胃MALTリンパ腫内に分布し、VEGF拮抗剤

投与によりVASH2陽性細胞がapoptosisに陥った細胞の周囲に代償的に増加することも明らかとなり、臨床的に認められるVEGF拮抗剤の長期投与時の効果減弱作用の機序の一つにこのVASH2が関与する可能性が示された。

## (2) 臨床例における検討

症例による検討に関しては、ハイルマニイ菌陽性症例がかなり集積してきた。その疾患としては、MALTリンパ腫に加え慢性胃炎、鳥肌胃炎が主であり、ピロリ菌陰性例に限れば、その半数近くがハイルマニイ菌陽性例であることが明らかとなった。そこで、臨床例を用いて、substance P, NK-1R, CD31, Musashi-1陽性細胞の局在を検討した結果、マウスで得られた結果とほぼ同様の所見が得られた。以上より、ヒトMALTリンパ腫においても、substance P拮抗剤が、ピロリ菌除菌療法や抗がん剤無効例において有意義であることが示唆された。

## (3) その他の解析結果

さらに、感染マウスの全身的な検討から、当初の予想とは異なり、涙腺、唾液腺における Sjogren症候群に類似したリンパ球集族を認めた。この病変は、胃と同様にMALTリンパ腫への進展が想定され、その点も人のSjogren syndromeに近いと考えられる。Sjogren症候群は、自己免疫性機序が想定されているが、Helicobacter属を含めたさまざまな感染症がその病因の一つの可能性もあり、少なくともその実験モデルになると考えられた。さらに、Sjogren syndromeの診断に必須と考えられるSSA, SSB抗体、自己免疫疾患に関連するCD70陽性リンパ球の関与について検討し、ELISA法によりSSA抗体が感染長期化に伴い陽性化し、さらにCD70陽性細胞も増加することが明らかとなった点も上記の考え方を支持すると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 18 件)

1) Yoshida H Takahashi T, Nakamura M, Overby A,

Takahashi T, Ubukata K, Matsui H: A highly susceptible CD46 transgenic mouse model of subcutaneous infection with Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis. J Infection Chemother 22:229-234, 2016 (査読有).

2) 中村正彦, Anders Overby, 高橋哲史, 松井英則, 高橋信一, 村山琮明:ピロリ菌陰性でも要注意!? —ヘリコバクター・ハイルマニイ(Helicobacter heilmannii)—. 検査と技術, 44 (4): 278-284, 2016(査読無).

3) 川瀬範子, 高橋哲史, 石田友規, 上原安紀奈, Anders Overby, 高橋信一, 松井英則, 中村正彦: Helicobacter heilmannii感染惹起胃MALTリンパ腫に対する変異型CTA4-Igの効果.Prog Med, 36: 322-324, 2016(査読無).

4) Yang L, Yamamoto K, Nishimura S, Nakamura M, Matsui H, Takahashi S, Dohi T, Okada T, Kakimoto K, Hoshi N, Yoshida M, and Azuma T: Interferon- $\gamma$ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after Helicobacter suis infection. Mucosal Immunology 8: 279–295, 2015 (査読有).

5) Sasaki M, Goji S, Tamura Y, Nakamura M, Matsui H, Murayama SY, Ebi M, Ogasawara N, Funai Y and Kasugai K: Helicobacter suis-Infected Nodular Gastritis and a Review of Diagnostic Sensitivity for Helicobacter heilmannii-Like Organisms. Case Rep Gastroenterol 9: 179-187, 2015(査読有).

6) 上原安紀奈, 川瀬範子, 松下涼輔, Anders Overby, 高橋哲史, 松井英則, 中村正彦: 胃MALTリンパ腫形成におけるbrain-gut peptideの関与:特にsubstance P, NK1Rとの関連性. Prog Med, 35: 434-436, 2015(査読無).

7) 中村正彦, 上原安紀奈, 高橋哲史, Anders Overby, 松井英則: 悪性リンパ腫、特に胃MALTリンパ腫形成におけるbrain-gut peptideの関与—特にsubstance Pおよびその受容体のNK1Rとの関連から—。自律神経, 5: 140-144, 2015(査読有).

8) 中村正彦, Anders Overby, 松井英則: 非ピロリ胃炎の陰にハイルマニイ 除菌治療の普及で浮上する

新たなヘリコバクター属細菌。Nikkei Medical, 10: 14-15, 2015(査読無).

9) 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. Current Pharmaceutical Design. 20:1097-103, 2014(査読有).

10) Nakamura M, Takahashi T, Matsui H, Baniwa Y, Takahashi S, Murayama SY, et al.: Alteration of angiogenesis in Helicobacter heilmannii-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Interaction with c-Met and hepatocyte growth factor. J Gastroenterol Hepatol. 29 Suppl 4: 70-6, 2014(査読有).

11) 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 19: 260-271, 2014(査読有).

12) Yamamoto K, Yang L, Nishiumi S, Nakamura M, Matsui H, Takahashi S, Dohi T, Okada T, Kakimoto K, Yoshida M, Azuma T.: Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by Helicobacter infection. Mucosal Immunology 7:1244-1254, 2014(査読有).

13) 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. Prog. Med., 34: 385-388, 2014(査読無).

14) 中村正彦, 高橋哲史, 松井英則, 土本寛二: 胃 MALT リンパ腫形成における substance P, NK1R の関与. Ulcer Research, 41:51-53, 2014(査読有).

15) 中村正彦, 高橋哲史, 松井英則, 高橋信一, 村山そう明, 土本寛二: もうひとつの胃内の Helicobacter 属細菌 HHLO, H. heilmannii, H. suis —その発見史、

特徴、診断、治療について—。日本ヘリコバクター学会誌, 15: 45-52, 2013(査読無).

16) 松井英則, 高橋哲史, 中村正彦: Helicobacter suis 感染と MALT リンパ腫. Journal of Germfree Life and Gnotobiology, 44: 47-50, 2014(査読無).

17) 中村正彦, 高橋哲史, 松井英則, 土本寛二: 胃 MALT リンパ腫形成における substance P, NK1R の関与. Ulcer Research, 41: 51-53, 2014(査読有).

18) 高橋哲史, 鈴木秀和, 松永加誉子, 中村正彦, 土本寛二: 胃粘膜における前立腺幹細胞抗原 PSCA の発現調節機構の解析. Ulcer Research, 41: 47-50, 2014(査読有).

〔学会発表〕(計 41 件)

1) 中村正彦, 高橋哲史, Anders Overby, 松井英則, 芹沢宏: Hp 除菌と non-Helicobacter pylori Helicobacter の関連. Workshop 11 Helicobacter pylori 除菌後の諸問題. 司会: 春間賢, 城卓志. 第12回日本消化管学会(京王プラザ, 東京都) Feb 26-27, 2016.

2) 中村正彦, 高橋哲史, 松井英則: 胃および肝臓 MALT リンパ腫形成における VEGF と substance P の関与: aprepitant および axitinib の効果. 第68回日本自律神経学会総会(愛知県産業労働センター, 愛知県) Oct. 29-30, 2015.

3) Nakamura M, Overby A, Takahashi T, Matsui H: Angiogenesis and MALT lymphoma in stomach, liver and lacrimal gland: interaction with VASH2 as well as VEGF. The 15<sup>th</sup> International Conference on Ulcer Research (Ottawa, Canada) Oct 1-3, 2015.

4) Overby A, Chen D, Matsui H, Takahashi T, Zhao C-M, Nakamura M: Prevention of Helicobacter heilmannii-induced gastric MALT lymphoma and resulting tumors in mice by plant phytochemical isothiocyanate. The 15<sup>th</sup> International Conference on Ulcer Research (Ottawa, Canada) Oct 1-3, 2015.

5) Nakamura M, Overby A, Takahashi T and Matsui H: Angiogenesis and Lymphangiogenesis in MALT Lymphoma in Stomach, Liver: Significance of VASH2. World Congress for Microcirculation (京都国際会館, 京都府) Sept. 25-27, 2015.

6) Overby A, Zhao C-M, Matsui H, Takahashi T, Chen

D and Nakamura M: Capillary- and lymphatic density in mice with *Helicobacter heilmannii*-induced gastric MALT lymphoma and fed with naturally occurring isothiocyanate. World Congress for Microcirculation (京都国際会館、京都府) Sept. 25-27, 2015.

7) 中村正彦, Anders Overby, 高橋哲史, 松井英則: *Helicobacter heilmannii*感染マウスにおける胃、肝臓、肺リンパ腫および涙腺lymph follicleの形成: アキシチニブの効果. 第47回日本臨床分子形態学会総会(長崎大学医学部良順会館、長崎県) Sept. 18-19, 2015.

8) 川瀬範子, 高橋哲史, 上原安紀奈, 鈴木幸男, Anders Overby, 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. 第35回病態生理勉強会(京王プラザ、東京都) Aug 8, 2015.

9) Overby A, Murayama SY, Matsui H, Takahashi T, Takahashi S, Suzuki H, Mabe T, Araki H, Sato Y, Nakamura M: Unexpected high prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms in *H. pylori* negative patients with gastric diseases in Japan. 3<sup>rd</sup> International consensus symposium on *Helicobacter heilmannii*/suis (2015 AKPS Joint Symposium, 北里大学薬学部) June 29, 2015.

10) Matsui H, Takahashi T, Overby A, Murayama SY, Nakano H, Mukai T and Nakamura M: Mouse models for assessing the protective efficacy of probiotics and narrow-spectrum antibacterial compounds in the suppression of *Helicobacter* infection. 3<sup>rd</sup> International consensus symposium on *Helicobacter heilmannii*/suis (2015 AKPS Joint Symposium, 北里大学薬学部) June 29, 2015.

11) Takahashi T, Matsui H, Kawase N, Ishida Y, Overby A, Takizawa A, Takahashi S and Nakamura M: Gene expression profiling of mouse host response to *Helicobacter suis* infection. 3<sup>rd</sup> International consensus symposium on *Helicobacter heilmannii*/suis (2015 AKPS Joint Symposium, 北里大学薬学部) June 29, 2015.

12) Anders Overby, 村山そう明, 松井英則, 高橋哲史, 高橋信一, 鈴木秀和, 間部克裕, 荒木寛司, 佐藤祐

一, 中村正彦: 本邦胃疾患患者Hp陰性症例における高率なHHLO感染について. 第21回日本ヘリコバクター学会学術集会(ポートピアホテル、兵庫県) June 26, 27, 2015.

13) 中村正彦: 本邦胃疾患患者Hp陰性症例における高率なHHLO感染ヘリコバクター学会が行う臨床研究推進委員会報告. 第21回日本ヘリコバクター学会学術集会(ポートピアホテル、兵庫県) June 26, 27, 2015.

14) 中村正彦, Anders Overby, 高橋哲史, 高橋信一, 松井英則: 胃マルトリンパ腫におけるVASH2の関与—その局在およびVEGF拮抗剤投与時の変化—. 第44回日本潰瘍学会(沖縄科学技術大学院大学、沖縄県) June 19-20, 2015.

15) Nakamura M, Matsui H, Takahashi T: *Helicobacter heilmannii* sensu lato-induced MALT Lymphoma Formation in lacrimal gland as well as stomach in C57BL/6 mouse: effect of Aprepitant. EB2015 (Boston, USA) March 29, 2015.

16) Nakamura M: The research findings from my lab that I'm most proud of. 3<sup>rd</sup> Global GI Club (Boston, USA) March 29, 2015.

17) 間部克裕, 白鳥里佳, 吉井新二, 中村正彦, 加藤元嗣: *Helicobacter suis*胃炎が疑われた2例. 第47回胃病態機能研究会。(京王プラザ、東京都) Feb 15, 2015.

18) 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、東京都) Feb 13-14, 2015.

19) 中村正彦, 芹沢宏, 土本寛二: 胃MALTリンパ腫増大機序における幹細胞とHGF, c-Metの関連. Research Forum 7 座長: 武藤弘行, 辻井正彦. 第100回日本消化器病学会総会(東京国際フォーラム、東京都) April 23-26, 2014.

20) 川瀬範子, 高橋哲史, 上原安紀奈, 鈴木幸男, Anders Overby, 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. 日本薬学会

第135年会(ポートピアホテル、兵庫県)March 25-28, 2015.

21) Overby A, Rabben H-L, Takahashi T, Zhao C-M, Matsui H, Nakamura M, Chen D: Chemoprevention and adjuvant chemotherapy for gastric cancer by naturally occurring isothiocyanates. 第34回 Cytoprotection研究会(メルパルク京都, 京都府) March 20, 2015.

22) 中村正彦, 松井英則, 高橋哲史: Helicobacter heilmannii感染マウスにおける唾液腺リンパ腫形成について(メルパルク京都, 京都府)March 20, 2015.

23) 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, 東京都) Oct 31-Nov 01, 2014.

24) 中村正彦, 高橋哲史, 松井英則: 胃および肝臓MALTリンパ腫形成におけるsubstance P, NK1RおよびCGRPの関与: spantide IIの効果. 第67回日本自律神経学会総会(ラフレさいたま, 埼玉県)Oct 30-31, 2014

25) Nakamura M, Matsui H, Overby A, Takahashi T: Significance of substance P in gastric, hepatic and pulmonary MALT lymphoma induced by Helicobacter heilmannii infection. 8th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Budapest, Hungary) September24-26, 2014.

26) 中村正彦, 高橋哲史, Anders Overby, 松井英則: Helicobacter heilmannii感染胃粘膜におけるType IV分泌機構関与: MALTリンパ腫形成との関連. 第46回日本臨床分子形態学会総会(TPK市ヶ谷, 東京都) Oct. 17-18, 2014.

27) 芹澤宏, 斉藤義正, 加藤裕佳子, 中野雅, 中村正彦, 鈴木秀和, 金井隆典: 当院における「ピロリ菌外来」の将来的意義. 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, 東京都)June 28-29, 2014.

他

〔図書〕(計 3 件)

1) 中村正彦, 芹澤宏: 胃液検査、胃分泌能検査 自律

神経機能検査 第5版 文光堂 2015 pp365-367.

2) Nakamura M, Overby A, Murayama SY, Suzuki H, Takahashi T, Takahashi S, Matsui H: Gastric Non-Helicobacter pylori Helicobacter: its significance in human gastric diseases. In: Helicobacter pylori, Edited by H. Suzuki, R. Warren and B. Marshall. Springer, 2016, 他

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 抗ヘリコバクター・ハイルマニー剤

発明者: 松井英則、中村正彦、向井孝夫、山本裕司、西山啓太

権利者: 学校法人北里研究所、雪印メグミルク株式会社

種類: 特許

出願番号: 特願2013-263165

出願年月日: 平成26年12月20日

国内外の別: 国内(北里大学整理番号552)

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、JNC株式会社

出願番号: 特願2014-132772

出願年月日: 平成26年6月27日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/pathophys/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: 30155858

(3)連携研究者

松井英則 (MATSUI, Hidenori)

北里大学・北里生命科学研究所・講師

研究者番号: 30219373

高橋哲史 (TAKAHASHI, Tetsufumi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号: 40449004