

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430132

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ除菌後胃がんの発生機序におけるDNA損傷・修復経路の役割

研究課題名(英文) Roles of DNA damage and repair pathway in gastric carcinogenesis after eradication of *Helicobacter pylori*

研究代表者

豊田 武士 (Toyoda, Takeshi)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長

研究者番号：50443453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ピロリ菌除菌後における胃がんの発生機序解明を目的として、スナネズミを用いた解析を実施した。胃腫瘍の発生率は早期除菌群0%、後期除菌群14%、非除菌群71%と、除菌時期が早いほど抑制効果が高かった。一方、慢性胃炎の程度は除菌によって著しく減退するものの、単核細胞浸潤などの所見は、除菌後にも長期間残存することが明らかとなった。胃粘膜での各種炎症関連因子のmRNA発現は、Il-1・Tnf- は除菌後速やかに低下するのに対し、Il-6・Ifn- の低下は緩やかであった。以上より、特定の炎症性サイトカイン発現を伴う慢性胃炎は除菌後にも長期間持続し、胃がんに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the possible mechanisms in gastric carcinogenesis after eradication of *Helicobacter pylori* using a Mongolian gerbil model. The incidences of gastric adenocarcinoma in MNU-treated gerbils at week 52 were 0% in early eradication, 14% in late eradication, and 71% in non-eradication group. Although the degree of chronic gastritis was attenuated, inflammatory findings were still observed in the gastric mucosa after eradication. mRNA expression of Il-1 and Tnf- in the antrum and corpus rapidly reduced by eradication, while Il-6 and Ifn- expression tended to decrease gradually. At week 52, Il-6 expressions in MNU-treated and eradicated groups were higher than those in MNU-untreated and eradicated groups. These results suggest that chronic gastritis with expression of inflammatory cytokines such as Il-6 can persist for a long period even after eradication and may be involved in the development of stomach cancer after eradication.

研究分野：総合生物

キーワード：胃がん 除菌 慢性胃炎 ヘリコバクター・ピロリ スナネズミ

1. 研究開始当初の背景

胃がんは日本で最も発生頻度の高いがんの一つである。多くの疫学的知見と実験動物学的研究により、ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)感染による慢性胃炎が重要なリスク要因であることが明らかになっている。わが国における対応として、プロトンポンプ阻害剤と抗生物質二剤の併用による除菌治療が行われている。ピロリ菌除菌は胃がんの予防に一定の効果を示す一方、除菌後胃がんの発生を完全に抑制することはできないことも示され(1)、その対応が新たな問題となっている。保険適応による除菌の拡大に伴い、除菌後胃がんの発生も増加が見込まれることから、その予防実現に向けた発生機序の解明、およびハイリスク群を高感度に検出するためのバイオマーカー探索が急務となっている。

胃がんの発症リスクはピロリ菌感染に伴う慢性胃炎の程度に密接に関連していることから、除菌治療を含めたこれまでの胃がん予防は炎症反応の抑制に主眼が置かれてきた。また、除菌後における胃がんの発生には、ピロリ菌の存在、またそれによって引き起こされる炎症は直接的に関与しないと考えられている。このため、除菌後の胃発がんには、炎症細胞が産生する各種サイトカインや活性酸素といった外的要因とは異なる、胃粘膜上皮細胞内部でのがん化プロセス、特に遺伝子変異に直結するDNA修復機構が重要な役割を果たすと考えられるが、その具体的な関与の程度は明らかになっていない。

スナネズミ胃発がんモデル、ならびに同モデルにおける除菌プロトコルは、研究代表者の所属した研究グループによって開発された(2)。スナネズミにはピロリ菌感染が安定的に成立し、ヒトに極めて類似した病態が再現されるなど、ヒト除菌後胃がんの発生機序解明を目指す本研究に適した動物モデルと考えられる。

研究代表者はこれまでに同モデルを用いて、胃発がん機序の解明および化学予防法の開発に関して報告してきた(3)。多数の因子が交絡するヒト検体を用いた解析に先立ち、動物モデルを用いた検討を実施することで、除菌後胃がんの発生機序の一端を明らかにするとともに、ヒト除菌後胃がんの高リスク群検出や経路特異的な予防・治療法確立に向けての基礎データが得られるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、除菌後胃がんの発生機序解明およびハイリスク群検出に応用可能なマーカーの探索を目的として、スナネズミモデル

を用いた解析を実施した。

3. 研究の方法

5週齢、雄のSPFスナネズミ(系統:MON/Jms)にピロリ菌(菌株:ATCC43504、 1×10^8 colony forming unit)を胃内接種した。感染後2週目から20週間、胃発がん物質として10 ppmメチルニトロソウレア(MNU)を飲水投与した。MNU非投与群を非発がん対照群として設置した。実験開始後27週(早期除菌)あるいは37週(後期除菌)の時点で、ランソプラゾール、アモキシシリン、クラリスロマイシンの三剤併用による除菌を実施した。MNU投与・非投与群ともに、非除菌群を陽性対照群として設定した。

実験開始から22週、32週、42週および52週の各時点で動物を解剖し、胃粘膜を採材した。採取した胃粘膜の病理組織標本を作製し、各群における胃腫瘍の発生頻度を検索した。また、背景胃粘膜の病理組織学的解析により、慢性炎症の程度について評価を実施した。好中球浸潤、単核細胞浸潤、腸上皮化生および異所性増殖性腺管をそれぞれ4段階(0:正常、1:軽度、2:中等度、3:重度)にスコアリングし、合計スコアを評価した。

採取した幽門腺・胃底腺組織の凍結材料からRNAを抽出し、各種炎症関連因子(*Il-1*、*Tnf-*、*IL-6*、*KC*、*iNos*、*Ifn-*、*Il-2*、*Il-10*)のmRNA発現を解析した。

4. 研究成果

各個体における除菌の成否を、胃粘膜組織を用いたヘリコバクター選択培地(ニッスイ)によるコロニー形成能、およびRT-PCR法によるピロリ菌特異的*UreA*遺伝子発現の有無によって確認した。コロニー形成能、*UreA*発現のいずれかに陽性を示した個体は除菌不成立とみなし、以降の解析から除外した。全体の除菌成功率は88.9%であった。

腺胃における腫瘍の発生率はピロリ菌+MNU群で71.4%であったのに対し、後期除菌群14.3%、早期除菌群0%で、除菌によって低下すること、除菌の時期が早いほど予防効果が高いことが確かめられた(表1、図1)。

背景胃粘膜の経時的解析により、炎症性病変の程度は除菌によって著しく減退するものの、慢性胃炎は除菌後にも長期間残存することが明らかとなった(表2)。好中球浸潤は速やかに減少するのに対し、単核細胞浸潤および異所性増殖性腺管の消失は緩やかで、除菌から25週が経過した後も、一定のレベルで認められた(図2)。

残存する炎症と除菌後胃がんとの関連を検討するため、胃粘膜(幽門腺・胃底腺)における各種炎症関連因子のmRNA発現解析を

実施した(図 3-6)。その結果、*Il-1*・*Tnf*-等の発現は除菌後速やかに低下するのに対し、*Il-6*・*lfn*-の低下は比較的緩やかであった。また、52 週の時点で、*Il-6*は MNU 投与群での発現が非投与群よりも高いことが示唆された。

これまで、除菌後には慢性胃炎がほぼ消失し、種々の炎症性サイトカインや活性酸素といった外的因子は、除菌後胃癌の発生に直接的には関与しないと考えられてきた。本研究によって、ピロリ菌が除去された後においても、一定レベルの慢性胃炎が長期間持続することが明らかとなった。ピロリ菌が消失した後も、炎症を持続させるメカニズムの解明が今後必要になると考えられる。以上の結果から、残存する慢性炎症が除菌後胃癌の発生に関与すること、特定の炎症性サイトカインがハイリスク群検出のためのバイオマーカーとして応用できる可能性が示唆された。

表 1. 胃腫瘍発生率

	22 w	32 w	42 w	52 w
Control	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)
<i>Hp</i> + E		0/6 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)
<i>Hp</i> + L			0/6 (0)	0/5 (0)
<i>Hp</i>	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/3 (0)

<i>Hp</i> + MNU + E		0/5 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
<i>Hp</i> + MNU + L			1/7 (14.3)	1/7 (14.3)
<i>Hp</i> + MNU	0/4 (0)	0/4 (0)	0/7 (0)	5/7 (71.4)

E, early eradication; L, late eradication. * $P < 0.05$ (Fisher's exact test).

表 2. 慢性胃炎のスコア

	22 w	32 w	42 w	52 w
Control	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>Hp</i> + E		4.2 ± 2.6	5.3 ± 1.7	3.5 ± 1.3
<i>Hp</i> + L			6.3 ± 3.0	4.8 ± 1.6
<i>Hp</i>	6.8 ± 1.7	8.3 ± 1.0	10.0 ± 0.8	11.3 ± 1.2

<i>Hp</i> + MNU + E		4.8 ± 2.0	3.8 ± 1.7	4.0 ± 2.8
<i>Hp</i> + MNU + L			8.1 ± 2.3	5.7 ± 1.4
<i>Hp</i> + MNU	6.0 ± 1.6	9.0 ± 2.0	8.9 ± 1.6	11.4 ± 1.1

E, early eradication; L, late eradication. * and **: $P < 0.05$ and < 0.01 , respectively (Tukey).

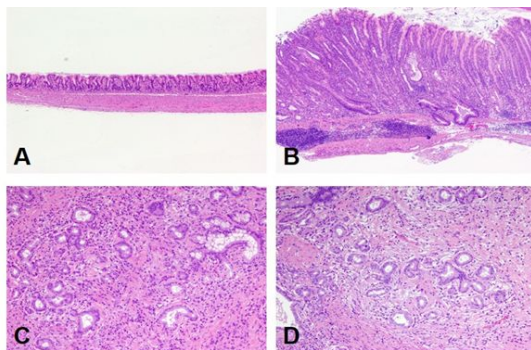


図 1. スナネズミ胃粘膜の 52 週時点における病理組織学的所見。A: 対照群、B: ピロリ菌感染群の典型的な慢性胃炎、C: MNU + ピロリ菌群に認められた腺癌、D: MNU + ピロリ菌 +

後期除菌群にみられた除菌後がん。

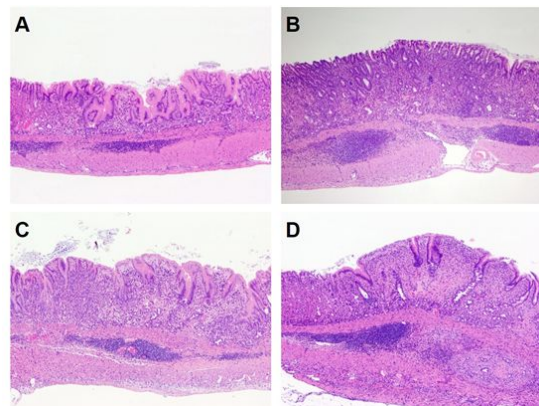


図 2 除菌群における 52 週時点での慢性胃炎。A: ピロリ菌 + 早期除菌群、B: ピロリ菌 + 後期除菌群、C: MNU + ピロリ菌 + 早期除菌群、D: MNU + ピロリ菌 + 後期除菌群。単核細胞浸潤が長期にわたって持続している。

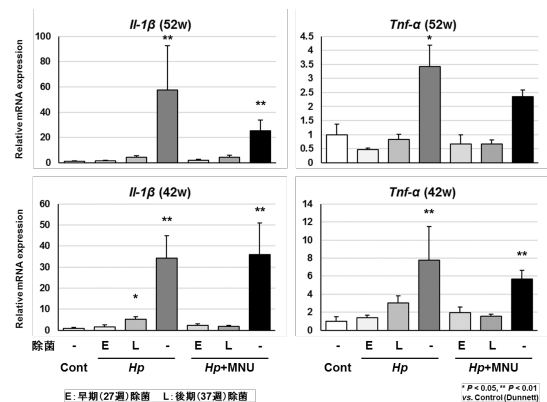


図 3. 幽門腺における炎症関連因子 (*Il-1*・*Tnf*-) の mRNA 発現。

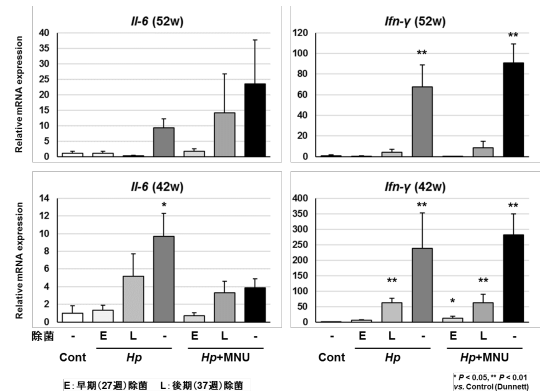


図 4. 幽門腺における炎症関連因子 (*Il-6*・*lfn*-) の mRNA 発現。

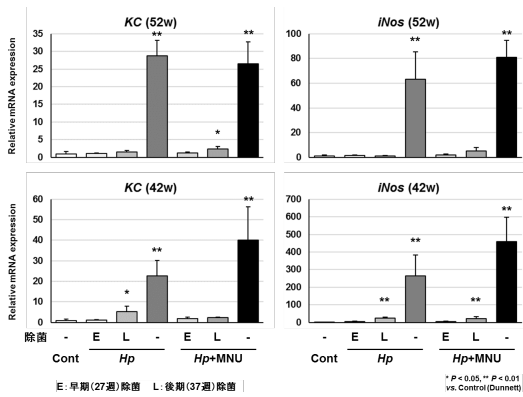


図5 幽門腺における炎症関連因子(KC・iNos)のmRNA発現。

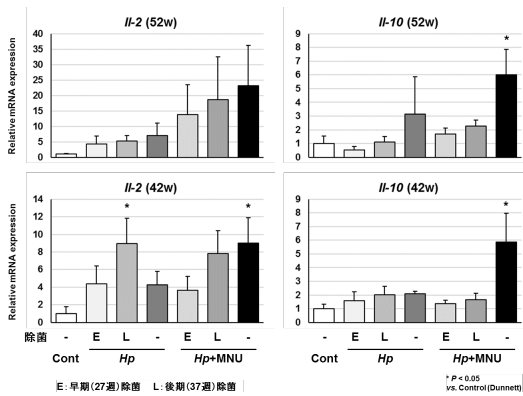


図6 幽門腺における炎症関連因子(IL-2・IL-10)のmRNA発現。

<引用文献>

1. Fukase K, et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 372: 392-7, 2008
2. Tatematsu M, et al. Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-sensitive Mongolian gerbils treated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in drinking water. *Jpn J Cancer Res*, 89: 97-104, 1998
3. Toyoda T, et al. Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Cancer*, 125: 1786-95, 2009

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

1. Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1,2-diol. *J Toxicol Sci* (査読有), 42: 1-11, 2017 DOI: 10.1293/tox.2016-0042
2. Hirata T, Cho YM, Toyoda T, Akagi J, Suzuki I, Nishikawa A, Ogawa K. Lack of *in vivo* mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of *gpt* delta rats administered singly or in combination. *J Appl Toxicol* (査読有), 37: 683-91, 2017 DOI: 10.1002/jat.3416
3. Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci* (査読有), 108: 316-21, 2017 DOI: 10.1111/cas.13136
4. Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shiota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K. Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. *J Appl Toxicol* (査読有), 37: 485-94, 2017 DOI: 10.1002/jat.3384
5. Matsushita K, Toyoda T, Inoue K, Morikawa T, Sone M, Ogawa K. Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat. *J Toxicol Pathol* (査読有), 30: 57-62, 2017 DOI: 10.1293/tox.2016-0042
6. Toyoda T, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriya Y, Nishikawa A, Ogawa K, Tatematsu M, Tsukamoto T. Anti-inflammatory effects of capsaicin and piperine on *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis in Mongolian gerbils. *Helicobacter* (査読有), 21: 131-42, 2016 DOI: 10.1111/hel.12243
7. Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Park EY, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shiota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K.

- 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol* (査読有), 29: 237-46, 2016
DOI: 10.1293/tox.2016-0037
8. Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Hirata T, Nishikawa A, Ogawa K. Early detection of genotoxic urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for -H2AX. *Toxicol Sci* (査読有), 148: 400-8, 2015
DOI: 10.1093/toxsci/kfv192
9. Onami S, Cho YM, Toyoda T, Akagi J, Fujiwara S, Ochiai R, Tsujino K, Nishikawa A, Ogawa K. Orally administered glycidol and its fatty acid esters as well as 3-MCPD fatty acid esters are metabolized to 3-MCPD in the F344 rat. *Regul Toxicol Pharmacol* (査読有), 73: 726-31, 2015
DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.10.020
10. Akagi J, Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Validation study of the combined repeated-dose toxicity and genotoxicity assay using *gpt* delta rats. *Cancer Sci* (査読有), 106: 529-41, 2015
DOI: 10.1111/cas.12634
11. Toyoda T, Yamamoto M, Takasu S, Ogawa K, Tatematsu M, Tsukamoto T. Molecular mechanism of gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected rodent models. *Diseases* (査読有), 2: 168-86, 2014
DOI: 10.3390/diseases2020168
12. Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats. *Food Chem Toxicol* (査読有), 74: 68-75, 2014
DOI: 10.1016/j.fct.2014.09.005
13. Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Nishikawa A, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. *J Toxicol Sci* (査読有), 39: 109-19, 2014
DOI: 10.2131/jts.39.109
14. Yamada T, Wei M, Toyoda T, Yamano S, Wanibuchi H. Inhibitory effect of raphanobrassica on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Food Chem Toxicol* (査読有), 70: 107-13, 2014
DOI: 10.1016/j.fct.2014.04.037
15. Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Absence of *in vivo* genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4 week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Mutagenesis* (査読有), 29: 295-302, 2014
DOI: 10.1093/mutage/geu018
16. Onami S, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yoshida M, Nishikawa A, Ogawa K. A 13-week repeated dose study of three 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters in F344 rats. *Arch Toxicol* (査読有), 88: 871-80, 2014
DOI: 10.1007/s00204-013-1190-6
- [学会発表](計20件)
1. Toyoda T, Sone M, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. H2AX expression is a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rodents. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (USA), 2017.3.14
2. Sone M, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. Detection of *in vivo* genotoxicity in rat liver and kidney using H2AX expression. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (USA), 2017.3.14
3. 豊田武士、鈴木周五、加藤寛之、曾根瑞季、松下幸平、曹永晩、赤木純一、井上薫、高橋智、西川秋佳、小川久美子. 遺伝毒性膀胱発がん物質によるラット膀胱粘膜における H2AX 発現. 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪、2017.1.26
4. 曾根瑞季、豊田武士、松下幸平、森川朋美、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子. H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット腎臓における検討 -. 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪、2017.1.26
5. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、松下幸平、塚本徹哉、立松正衛、小川久美子. ヘリコバクター・ピロリ除菌後胃がんの発生機序における炎症関連因子の役割. 第75回日本癌学会学術総会、横浜、2016.10.7
6. 桐山諭和、豊田武士、小川久美子、塚本徹哉. ヒト胃癌における -H2AX と p53 の免疫組織学的解析. 第75回日本癌学会学

- 術総会、横浜、2016.10.6
7. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、松下幸平、西川秋佳、小川久美子．化学物質の膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性および発がん性の短期評価系開発．第 2 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京、2016.9.17
 8. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子．個体差に対する不確実係数の妥当性評価 - 高脂血症モデルラットによる検討．第 43 回日本毒性学会学術年会、名古屋、2016.6.30
 9. 曾根瑞季、豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子． H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット肝臓における検討 - ．第 43 回日本毒性学会学術年会、名古屋、2016.6.29
 10. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子．高脂血症ラットを用いた不確実係数の妥当性の検証．第 32 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、高松、2016.1.29
 11. 曾根瑞季、豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、平田直、西川秋佳、小川久美子． H2AX を用いた遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出系構築 - マウスでの検討．第 32 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、高松、2016.1.29
 12. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、平田直、西川秋佳、小川久美子． H2AX 免疫染色による遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出．第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015.10.8
 13. 野村幸世、豊田武士、長田梨比人、市田晃彦、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之．胃癌、膀胱癌、乳がん早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明．第 70 回日本消化器外科学会総会、浜松、2015.7.15
 14. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、平田直、西川秋佳、小川久美子．DNA 二重鎖切断マーカー (H2AX) を指標とした遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出．第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、2015.6.30
 15. Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of H2AX as a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rats. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015, Philadelphia (USA), 2015.4.21
 16. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、小川久美子．ラット膀胱に対する遺伝毒性および発がん性評価指標としての H2AX ．第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2015.1.30
 17. 塚本徹哉、豊田武士、桐山諭和、立松正衛．*Helicobacter pylori* 感染と高食塩食による遺伝子発現変動：MNU 誘発マウス腺胃発癌モデルによる解析．第 25 回日本消化器癌発生学会総会、福岡、2014.11.14
 18. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、小川久美子．ラット膀胱に対する遺伝毒性発がん物質検出指標としての H2AX 発現．第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014.9.26
 19. 野村幸世、豊田武士、大本安一、石橋祐子、大津洋、垣見和宏、瀬戸泰之．胃癌モデル動物における高血漿 TFF3 の起源の同定とその担癌免疫状態との関連．第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014.9.25
 20. 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、鈴木勇、平田直、小川久美子．ラット膀胱上皮細胞における H2AX 発現の検討．第 41 回日本毒性学会学術年会、神戸、2014.7.4
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 豊田武士、塚本徹哉、小川久美子、立松正衛：食塩と胃癌 - *H. pylori* 感染との関連も含めて．臨牀消化器内科，日本メディカルセンター，30：1395-400，2015
 2. 豊田武士、小川久美子、塚本徹哉、立松正衛：除菌後胃癌の発生機序．*G.I. Research*，先端医学社，22：487-93，2014
- 〔産業財産権〕
なし
- 6．研究組織
- (1)研究代表者
豊田 武士 (TOYODA, Takeshi)
国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長
研究者番号：50443453
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
なし