

14-4 ヘリコバクター・ピロリ感染による胃発癌機序の解明と ワクチンの開発

主任研究者 大分大学医学部 藤岡利生

本研究の成績からは、十二指腸潰瘍、胃癌症例において CagA 蛋白のチロシンリン酸化モチーフ、CagA 結合 SHP-2 量に差は認めなかった。CagA 産生、CagA 結合 SHP-2 量は pH 依存的であり胃粘膜酸分泌動態が強く影響していた。日本、アジア各地の cagA 遺伝子を検討し、東アジア型 CagA は胃粘膜萎縮及び胃発癌に関与すると示唆された。除菌後の長期経過では胃粘膜萎縮および腸上皮化生の改善、Ki-67, p53, 8-OHdG などの発現減少を認めた。また除菌にて胃腺腫は消失する可能性が示唆された。胃癌罹患率の低い英国人と比較し日本人では萎縮、腸上皮化生、体部胃炎が強く、若年時からより強い胃炎が惹起されると示唆された。DNA microarray による解析で除菌前後に apoptosis および oncogene 関連遺伝子において増幅もしくは低下を見た。ワクチンの開発では、特に可溶性抗原蛋白で刺激した JAWS II 細胞で MHC クラス II 抗原等の発現、T 細胞の増殖を認め、SS1 株感染マウスへの投与で有意な生着菌数の減少と Th1 と Th2 系の誘導を認めた。SS-1 株の菌体成分を用いアジュバントを必要としないワクチンを作成した。これを用い日本ザル感染モデルにて菌の減少を見た。東アジア型 cagA は欧米型に比べ SHP-2 との結合が強いことを認めた。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
藤岡 利生	大分大学医学部 教授	胃発癌機序の解明と除菌による予防法の確立
後藤田 卓志	国立がんセンター中央病院 医員	胃炎および前癌病変と <i>H.pylori</i> との関連
東 健	*1福井医科大学 助教授 *2神戸大学医学部 教授	菌体-宿主相互反応
杉山 敏郎	*3北海道大学大学院医学研究科 助教授 *4富山医科薬科大学 教授	<i>H. pylori</i> 胃上皮細胞相互作用の分子機構
西園 晃	大分大学医学部 教授	抑制性 T 細胞の誘導とヘリコバクター胃炎の制御
福田 能啓	兵庫医科大学医学部 助教授	ヘリコバクター・ピロリ感染の治療および予防ワクチン開発

*1: 平成 16 年 4 月 1 日～平成 17 年 1 月 31 日

*2: 平成 17 年 2 月 1 日～平成 17 年 3 月 31 日

*3: 平成 16 年 4 月 1 日～平成 16 年 10 月 15 日

*4: 平成 16 年 10 月 16 日～平成 17 年 3 月 31 日

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は *H. pylori* 感染による胃発癌の機序を解明するための菌体側と宿主側因子の両面から基礎的、臨床的検討を行うとともにワクチンの開発を計ることである。研究計画として、①CagA と SHP-2 の結合が胃粘膜上皮の機能にどのような影響を及ぼすかを検討するために、カテプシン E 遺伝子のプロモーターを pBluescript に組み込みトランスジェニックマウスを作成し、両者の関係を in vivo で検討する。②IV型分泌機構を有する菌株と胃上皮細胞を co-culture し経時的に情報介在分子の関連を検討し、さらには *H. pylori* 蛋白あるいは転写因子との情報介在蛋白の存在を検討する。③*H. pylori* 陽性の前癌病変の除菌後経過を長期間観察し、除菌治療が胃癌の危険因子を減少させ、胃癌の予防的治療となる可能性を追求する。④胃癌発症率が4倍少ない英国と日本で、胃内視鏡所見と組織学的胃炎の程度を比較する。⑤樹状細胞やウレアーゼ被覆ナノ粒子を用いることによりアジュバントを必要としないワクチンの開発を目指す。本研究によって *H. pylori* 感染と胃発癌機序の関連が解明され、除菌治療による胃癌発症予防の強い evidence が示されることが目的とする。

2 研究成果

①*H. pylori* 除菌後に胃腺腫の4年以上の経過をみた24例において、肉眼的な変化が認められるものの組織学的には胃腺腫の残存が証明されていた5例中3例において組織学的消失を確認した。5年以上経過を見た16例では新たな消失例は認めないが、*H. pylori* 除菌がある種の胃腺腫に対して形態に影響を与えられた。②胃癌罹患率が約4倍の英国人と日本人との間における胃炎の程度と *H. pylori* 感染率および両国病理医の胃炎の判定基準の違いについて国立がんセンター中央病院および Leeds General Infirmary で内視鏡検査を受けた各120例を検討した。萎縮性変化、腸上皮化生、体部胃炎は日本人においてより強く、若年時からより強い胃炎が惹起されることが示唆された。両国における *H. pylori* 感染率に相違は認められなかった。腸上皮化生と慢性炎症は両国に判定の差を認めなかったが、萎縮評価では相違を認めた。③CagA 蛋白のチロシンリン酸化モチーフ、SHP-2 結合能の検討では、十二指腸潰瘍例8株中8株、胃癌例8株中7株は3個のチロシンリン酸化モチーフがあり、周辺遺伝子のシーケンスにも差は認めなかった。

抗 CagA 抗体および抗 SHP-2 抗体を用いたウエスタンブロット後の CagA 結合 SHP-2 量の比較では十二指腸潰瘍および胃癌 *H. pylori* と差はなかった。ウエスタンブロットによる検討から CagA 産生、CagA 結合 SHP-2 量は pH 依存적であり、胃粘膜酸分泌動態がそれらに強く影響していた。④樹状細胞株 JAWS II 細胞を用い *H. pylori* の生菌、ホルマリン死菌、可溶性抗原蛋白で刺激後に MHC クラス II 抗原、補助分子 B7-1, B7-2 抗原、PD-L1 抗原の発現が FACScan で確認された。これらの細胞を抗原提示細胞として純化した T 細胞と共培養したところ、特に可溶性抗原で刺激した JAWS II 細胞で T 細胞の増殖を認め (S.I.比で約 3.0)、充分な抗原提示が行われていた。これをワクチン源として、SS1 株持続感染 C57BL/6 マウスに経静脈的に投与したところ有意な生着菌数の減少および感染局所での Th1 と Th2 系両方の優位な誘導を認めた。⑤*H. pylori* SS-1 株の菌体を超音波破碎後 nanosphere にコーティングし、1ml 中に菌体成分を 46 µg/ConA62µg/NP 4mg/PBS 1ml 含むアジュバントを必要としないワクチンを作成した。これを *H. pylori* 感染日本ザル胃粘膜に局注したところ菌数は減少し、炎症所見の改善を見た。⑥cagA 遺伝子は SHP-2 結合部位に一致し多型性を示し、東アジア型に特異的な配列を認め、欧米型に比べ SHP-2 との結合が強いことを認めた。胃癌死亡率の異なるアジア地域にて CagA 多型を検討した。胃炎および胃癌症例における福井株、沖縄株、中国株、ベトナム株、タイ株にて cagA 遺伝子の塩基配列を決定。胃癌死亡率と東アジア型 CagA の頻度との間に相関が見られた。福井、中国、ベトナム株の全ては東アジア型であった。沖縄では胃炎株の 15.8% は CagA 陰性、15.8% が欧米型、68.4% が東アジア型であり、胃癌株は全て東アジア型であった。タイでは胃炎株の 86.7% が欧米型、13.3% が東アジア型で、胃癌株の 36.4% が欧米型、63.6% が東アジア型であった。沖縄およびタイの胃炎例では、東アジア型の CagA を有する株の感染例において、欧米型の CagA 感染例に比べ胃粘膜萎縮度が有意に高度であった。これより東アジア型 CagA は胃粘膜萎縮及び胃発癌に関与すると考えられた。⑦除菌後の胃粘膜の長期経過では、5 点生検の 8 年間にわたる長期観察において萎縮は胃角小弯、体中小弯、体上大弯に改善を認めた。最長 13 年の観察では体上大弯にて腸上皮化生の改善をも認めた。免疫組織化学では Ki-67, p53, 8-OHdG にて除菌半年以降の Labeling index の有意な低下を認めた。腸上皮化生部では免疫組織学的変化を認めなかった。胃粘膜から抽出した RNA を用いた DNA

microarray による解析で除菌前後に apoptosis および oncogene 関連のいくつかの遺伝子において増幅もしくは低下が認められた。

3 倫理面への配慮

ヒトから胃粘膜組織採取や遺伝子抽出を行う場合は、本研究の意義・目的・方法・合併症・個人情報保護・参加の任意性を十分に説明し、文章で同意を得る。検体は、特定個人の識別ができないようにする。動物を用いる場合は、当該施設の動物実験の指針に基づいて実験を行う。動物モデルを用いる場合は、該当する動物実験施設の指針に基づいて実験を行う。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Sato, R., Fujioka, T., et al., Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet recovery in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, 164, 1904-7, 2004
2. Watanabe K., Nishizono A., Fujioka T., et al. CTLA-4 blockade inhibits induction of *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice. Clin Exp Immunol 135(1): 29-34, 2004.
3. Kobayashi I, Fujioka T., et al. Micro-broth dilution method with air-dried microplate for determining MICs of clarithromycin and amoxycillin for *Helicobacter pylori* isolates. J Med Microbiol. 53: 403-6, 2004.
4. Kodama, M, Fujioka, T., et al., Eradication of *Helicobacter pylori* reduced immunohistochemical detection of p53 and MDM2 in gastric mucosa, J Gastroenterol Hepatol, (in press)
5. Kodama M., Fujioka T., et al. Evaluation of the *Helicobacter pylori* stool antigen (HpSA) assay for diagnosing infection and confirming eradication after treatment. J Gastroenterol. 39(12):1219-20, 2004.
6. Kodama M, Nishizono A., Fujioka T., et al. Animal models for the study of *Helicobacter*-induced gastric carcinoma. J Infect Chemother. 10(6):316-25, 2004.
7. Watanabe K., Fujioka T., et al. Effect of sucralfate on antibiotic therapy for *Helicobacter pylori* infection in mice. Antimicrob Agents Chemother. 48(12): 4582-8, 2004.
8. Ito H., Fujioka T., et al. Reversible cerebellar lesions induced by metronidazole therapy for *Helicobacter pylori*. J Neuroimaging. 14(4): 369-71, 2004.
9. Kondo, H., Gotoda, T., et al., Percutaneous traction-assisted EMR by using an insulation-tipped electrosurgical knife for early stage gastric cancer. Gastrointestinal Endoscopy, 59, 284-8, 2004
10. Owen R.J., Gotoda T., et al. Analysis of geospecific markers for *Helicobacter pylori* variants in patients from Japan and Nigeria by triple locus nucleotide sequence typing. Microbiology 150:151-161, 2004.
11. Oda I., Gotoda T., et al. Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: Technical feasibility, operation time and complication from a large consecutive series. Digestive Endoscopy 17:54-58, 2005
12. Gotoda T. Endoscopic diagnosis and treatment for early gastric cancer. Cancer Reviews 2:17-37, 2004
13. Azuma, T., et al., Meta-analysis of the relationship between CagA seropositivity and gastric cancer, Gastroenterology, 126, 1926-1927, 2004
14. Zhou, W., Azuma, T., et al., The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia, FEMS Immunol Med Microbiol, 40, 81-87, 2004
15. Azuma T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. J Gastroenterol 39:97-103, 2004.
16. Muramatsu A, Azuma T., et al. Evaluation of treatment for gastro-oesophageal reflux disease with a proton pump inhibitor, and relationship between gastro-oesophageal reflux disease and *Helicobacter pylori* infection in Japan. Aliment Pharmacol Ther 20 (suppl 1):102-106, 2004.
17. Azuma T., et al. Diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in Japanese children. Aliment Pharmacol Ther 20 (suppl 1):7-12, 2004.
18. Higashi, H., Azuma, T., et al., *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. J Biol Chem 279:17205-16, 2004
19. Azuma, T., et al., Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine

- phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer, J Infect Dis, 189, 820-7, 2004
20. Azuma T., et al. Variation in the SHP-2 binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein is associated with gastric atrophy and cancer. J Infect Dis 189:820-827, 2004.
 21. Azuma T., et al. Distinct diversity of the cag pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. J Clin Microbiol 42:2508-2517, 2004.
 22. Ito, H., Fukuda, Y., et al., A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease, Gastroenterology, 126, 989-996, 2004
 23. Fukuda, Y., et al., Validation of the accuracy of the *H. pylori* stool antigen test (HpSA) in the Japanese population, Dig Liver Dis, 35, 61-65, 2003
 24. Hori K, Fukuda Y., et al. Disappearance of rectal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma following antibiotic therapy. Dig Dis Sci. 49(3): 413-6, 2004.
 25. Tanaka J., Fukuda Y., et al. Influence of antimicrobial treatment for *Helicobacter pylori* infection on the intestinal microflora in Japanese macaques. J Med Microbiol. 54(Pt 3):309-14, 2005.
 26. Sugiyama, T., Development of Gastric Cancer associated with *H. pylori* infection, Cancer Chemotherapy Pharm, 54, 12-20, 2004
 27. Nobuta, A., Sugiyama, T., et al., *Helicobacter pylori* infection in two area in Japan with different risks for gastric cancer, Aliment Pharmacol Ther, 20, S1-6, 2004
 28. Hiramoto S., Sugiyama T., et al. Melanoidin, a food protein-derived advanced maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter*. 9(5):429-35, 2004.
 29. Takenaka R., Sugiyama T., et al. Serum antibodies to *Helicobacter pylori* and its heat-shock protein 60 correlate with the response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to eradication of *H. pylori*. *Helicobacter*. 9(3):194-200, 2004.
 30. Kato M., Sugiyama T., et al. Multi-Centre Study Group. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and the prevalence, site and histological type of gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 20 Suppl 1:85-9, 2004.
 31. Inagaki H, Sugiyama T., et al. Gastric MALT lymphomas are divided into three groups based on responsiveness to *Helicobacter pylori* eradication and detection of API2-MALT1 fusion. Am J Surg Pathol. 28(12):1560-7, 2004.
 32. Chiba S., Sugiyama T., et al. An antibody to VacA of *Helicobacter pylori* in the CSF of patients with Miller-Fisher syndrome. Neurology. 63(11):2184-6, 2004.
 33. Sugiyama T., et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Med Electron Microsc. 37(3):149-57, 2004.
 34. Suganuma M., Nishizono A., Fujioka T., et al. New tumor necrosis factor-alpha-inducing protein released from *Helicobacter pylori* for gastric cancer progression. J Cancer Res Clin Oncol. 2004
 35. Minoura T., Fujioka T., Nishizono A. Influence of age and duration of infection on bacterial load and immune responses to *Helicobacter pylori* infection in a murine model. Clinical and Experimental Immunology, 139,43-47,2005
- 書籍
外国語
1. Nishizono A, T. Fujioka: Animal models for the study of Helicobacter infection, in J. Hau and GV. Hoosier Eds, *Handbook of Laboratory Animal Science vol. III*, CRC Press LLC, Boca Raton, Fl., 151-167, 2004