

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

研究成果の要旨

本研究の成果については、*cagA*の多型性においてCagAのSHP-2結合部位に東アジア株に特異的な配列を認め、東アジア型は欧米型に比べSHP-2との結合が有意に強いことが示された。更に東アジア型のCagAの頻度と胃癌死亡率との相関が認められ、東アジア型CagA症例で炎症、萎縮が高度であった。CCケモカインの一つであるRANTES mRNAおよび蛋白はOipAおよびCag PAI両者に依存性に*H. pylori*感染により誘導され、*cag* PAIおよびOipAはともにISRE、CRE、NF-IL6およびNF- κ Bの活性化に関与していた。除菌後に胃腺腫は16例中10例で消失を見たが2cm以上の腺腫では消失せず、除菌は腺腫自体に組織学的な影響を与えなかった。日本人では体部胃炎、CagA陽性例が英国人より有意に高度であった。樹状細胞Jaws IIを用いたワクチン開発では、抗*H. pylori*抗体価は樹状細胞移入群で有意に上昇し全身免疫系の活性化を認め、樹状細胞免疫療法の有用性が示唆された。転写抑制因子であるEZH2を過剰発現する胃癌症例は組織型に関係なく有意に予後不良であった。早期胃癌72例の発癌経路の分類ではmutator type, suppressor/p53 type, unclassified type各発癌経路による上皮形質に有意な差は認めなかった。除菌後最長14年の長期観察で萎縮、腸上皮化生の改善、Ki67, p53, 8-OHdGの発現低下を見た。胃粘膜のRNA解析で除菌後apoptosisおよびoncogene関連遺伝子において増幅もしくは低下が認められた。

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	日本と英国における胃炎の比較に関する研究および <i>H. pylori</i> 除菌療法後の胃腺腫の長期経過観察
東 健	神戸大学医学部 教授	菌体-宿主の相互作用
杉山 敏郎	富山大学医学部 教授	Cag A 遺伝子変異と胃発癌の関連
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抑制
福田 能啓	兵庫医科大学医学部 助教授	熱感応性ゲルを用いた <i>H. pylori</i> ワクチンの開発

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。この研究の成果は胃癌多発国であるわが国にとって極めて重要な意義がある。

2 研究方法

本年度の研究方法は、①東アジア型と欧米型の *cagA* 遺伝子を胃上皮細胞内で発現させ胃粘膜上皮細胞内シグナル伝達系への作用の違いを検討する。またアジア5カ国において臨床分離株の *cagA* 塩基配列を決定し、東アジア型及び欧米型 *CagA* の分布と胃癌の関連を検討する。②十二指腸潰瘍および胃癌患者において *cagA* 遺伝子構造・*CagA* 結合 SHP-2 量を比較し、胃発癌の危険因子を検討する。③IV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。④胃癌由来株および十二指腸潰瘍株の *cagA* 遺伝子における EPIYA リピートの個数、構造の差異を検討する。⑤ *H. pylori* 陽性の前癌病変である慢性萎縮性胃炎、腸上皮化生および胃腺腫において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。⑥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。⑦ESD 切除された72例の早期胃癌を分子病理学的発癌経路を p53 染色性および *TP53* 領域ヘテロ接合性喪失、マイクロサテライト不安定性を基準に Mutator type, suppressor/p53 type, unclassified type に分類し、発癌経路と上皮形質の関連を検討する。⑧樹状細胞、また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。⑨ *H. pylori* SS-1 株を破碎後、nanosphere にコーティングし、1ml 中に菌体成分を 50 μ g/Con A 62 μ g/NP 4mg/PBS 1ml 含むワクチンを作製し、日本ザルを用いて、経腸投与を行い治療ワクチンとしての治療効果を検討する。

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。

3 研究成果

本年度の成果は、① *cagA* の多型性において *CagA* の SHP-2 結合部位はチロシンリン酸化部位下流のアミノ酸配列 pY-A-T-I-D-F であることを認め、同部位に東アジア株に特異的な配列を認めた。東アジア型の *CagA* は欧米型に比べ SHP-2 との結合が有意に強いことが示された。②胃癌死亡率の異なるアジア地域にて *CagA* 多型を検出した。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* 株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* 株は胃粘膜萎縮及び胃発癌に関与すると考えられた。③臨床分離株である十二指腸潰瘍株と胃癌株 16 株の検討では全てが *CagA* が陽性であった。十二指腸潰瘍 8 株と胃癌 7 株は 3 個の TPMs があり、そのすべてが同一の構造を持ち、1 株のみが 4 個の TPMs (Y-894, Y-913, Y-949, Y-1003) を持っていた。すなわち、チロシンリン酸化モチーフとその周辺遺伝子構造は十二指腸潰瘍株と胃癌株で完全に一致していた。胃癌株および十二指腸潰瘍株において、免疫沈降後の AGS 細胞内に挿入された *CagA* 蛋白および SHP-2 量を解析したところいずれも両群間に差はなかった。十二指腸潰瘍由来株と胃癌由来株の *cagA* 遺伝子構造、チロシンリン酸化モチーフ数、細胞内に挿入された *CagA* 蛋白量、それに結合する SHP-2 結合量の差異は認められず、しかしながら、分離された菌株に感染した胃粘膜での体部の萎縮、腸上皮化生には差異が認められた。④CC ケモカインの一つである RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) mRNA および蛋白は OipA および *Cag* PAI 両者に依存性に *H. pylori* 感染により誘導され、RANTES プロモーター領域が十分活性化されるには interferon-stimulated responsive element (ISRE), the cyclic AMP-responsive element (CRE), nuclear factor-interleukin-6 (NF-IL6) および 2 つの NF- κ B サ

イトのいずれの転写因子も必要であった。Cag PAI および OipA はともに ISRE、CRE、NF-IL6 および NF- κ B の活性化に関与していた。Cag PAI 陽性/OipA 陽性の *H. pylori* が感染した胃粘膜中の RANTES mRNA は、Cag PAI 陰性/OipA 陰性あるいは *H. pylori* 非感染者に比べ有意に高かった。

⑤胃腺腫の *H. pylori* 除菌による消失・縮小効果について、5年以上の長期経過観察を行った胃腺腫 16 症例のうち 2 例で肉眼的のみの消失、10 例で内視鏡的・組織学的消失を確認した。3年以上の観察を行った 2 cm 以上の胃腺腫を伴う 2 例では組織学的に胃腺腫消失は確認されず、*H. pylori* 除菌は胃粘膜の炎症を改善するが腺腫自体に組織学的な影響を与えなかった。

⑥日英両国における胃炎の頻度は 60% と 48% であった。しかし、組織学的検討によって、日本人 (60%) では体部胃炎が英国人 (20%) より有意に強い ($p < 0.001$) ことが判明した。*H. pylori* 感染は胃炎症例中それぞれ 88% と 90% で陽性であった。CagA 陽性例は日本人で有意に高かった (日本人 : 72; 57%、英国人 : 47; 37%)。両国における CagA 陽性例では前庭部に同程度の炎症を認めたが、萎縮性変化および胃体部の炎症・萎縮は日本人で有意に高かった ($p < 0.005$)。

⑦ *H. pylori* 除菌後最長 14 年の観察では、胃角小弯、体中小弯、体上大弯に萎縮改善、体上大弯にて腸上皮化生の改善も認めた。免疫組織化学では Ki-67, p53, 8-OHdG にて除菌後有意な発現低下を見た。非完全型腸上皮化生では変化を見なかったが前庭部の完全型腸上皮化生は除菌後 Ki-67, 8-OHdG の減少を認めた。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。

⑧ 転写抑制因子である Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) を用いた免疫組織学的検索では、EZH2 を過剰発現する胃癌症例は組織型に関係なく有意に予後不良であった。

⑨ ESD 切除された 72 例の早期胃癌において、上皮形質では、完全胃型 7 例 (7.8%)、胃型優位胃腸型 28 例 (42.2%)、混合型 9 例 (10.9%)、腸型優位胃腸型 19 例 (26.6%)、完全腸型 9 例 (12.5%) であった。発癌経路の分子病理学的分類では、mutator type 3 例 (4.1%)、suppressor/p53 type 34 例 (47.2%)、unclassified type 35 例 (48.6%) であり、各発癌経路の違いによる上皮形質に有意な差は認めなかった。胃癌と胃腺腫の比較で、癌では胃型形質の割合が有意に上昇していた。術後 18 ヶ月経過観察した胃癌 24 例で異時多発の頻度を検討すると、mutator type で有意に

その頻度が高かった。

⑩ 樹状細胞 Jaws II を用いたワクチン開発では、Jaws II 細胞を *H. pylori* 生菌、死菌、超音波破碎抗原 (WCS) で刺激し抗原提示分子の発現を評価した。T 細胞増殖反応、また抗原刺激後の Jaws II 細胞の培養上清中 TNF- α では、WCS を用いた時に最も高い反応を示した。naïve T 細胞を共培養した上清でも WCS で最も高い IFN- γ , IL-10 を検出した。胃の生着菌量は WCS にて刺激した Jaws II 細胞を移入した群で特に有意な低下を見た。抗 *H. pylori* 抗体価は樹状細胞移入群で有意に上昇し全身免疫系の活性化を認めた。胃組織のサイトカイン発現解析では、最も菌量の低下した群 (WCS) で IFN- γ と IL-10 の有意な上昇を認めた。樹状細胞免疫療法の有用性が示唆され、中でも WCS は最も免疫原性が高いことが示された。

⑪ Sydney strain の破碎抗原を用いたワクチンを日本ザル直腸内投与した所 7 頭中 4 頭 (57%) で胃粘膜における *H. pylori* の菌数は抑制される傾向にあり、炎症所見にも改善傾向がみられた。*H. pylori* 接種前に、本ワクチンの経腸接種を行った所、感染阻止は 7 頭中 5 頭 (71%) で認められた。

4 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、本研究における倫理面への配慮については、遺伝子解析等を行う場合、患者に本研究の意義、方法、合併症、個人情報保護の保護、参加の任意性について十分に説明し、文章で同意を得ている。動物モデルでは該当する動物実験施設の指針に基づいて実験を行っている。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Murakami K., Fujioka T., et al. Effectiveness of minocycline-based triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 21: 262-7, 2006.
2. Kodama M., Nishizono A., Fujioka T., et al. *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 11: 7063-71, 2005.
3. Murakami K., Fujioka T., et al. *Helicobacter pylori* eradication and associated changes in the

- gastric mucosa. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 3: 757-64, 2005.
4. Abe H., Fujioka T., et al. Influence of bile reflux and *Helicobacter pylori* infection on gastritis in the remnant gastric mucosa after distal gastrectomy. *J Gastroenterol*, 40: 563-9, 2005.
 5. Kodama M., Fujioka T., et al. Eradication of *Helicobacter pylori* reduced the immunohistochemical detection of p53 and MDM2 in gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol*, 20: 941-6, 2005.
 6. Suganuma M., Nishizono A., Fujioka T., et al. New tumor necrosis factor- α -inducing protein released from *Helicobacter pylori* for gastric cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131:305-13, 2005.
 7. Naylor G., Gotoda T., et al. Why does Japan have a high incidence of gastric cancer? -A Comparison of Gastritis between a UK and a Japanese Population-. *GUT* (In press)
 8. Yokoi C., Gotoda T., et al. Endoscopic submucosal Dissection (ESD) Allows Curative Resection Of Local Recurrent Early Gastric Cancer After Prior Endoscopic Mucosal Resection. *Gastrointest Endosc* (In press)
 9. Minami S., Gotoda T., et al. Complete endoscopic closure using endoclips for gastric perforation during endoscopic resection for early gastric cancer can avoid emergent surgery. *Gastrointest Endosc*, 63:596-601, 2006.
 10. Etoh T., Gotoda T., et al. Treatment of early gastric cancer in the elderly patient: results of EMR and gastrectomy at a national referral center in Japan. *Gastrointest Endosc*, 62:868-871, 2005.
 11. Nunobe S., Gotoda T., et al. Distribution of the deepest penetrating point of minute submucosal gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 35:587-590, 2005
 12. Gotoda T., et al. A learning curve for advanced endoscopic resection. *Gastrointest Endosc*, 62:866-867, 2005.
 13. Hamanaka H., Gotoda T.. Endoscopic Resection for Early Gastric Cancer and Future Expectations. *Digestive Endoscopy*, 17:275-285, 2005.
 14. Gotoda T. A large endoscopic resection by endoscopic submucosal dissection (ESD) procedure. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:S71-S73, 2005
 15. Soetikno R., Gotoda T. et al. Endoscopic Mucosal Resection for Early Cancers of the Upper Gastrointestinal Tract. *J Clin Oncol*, 23:4490-4498, 2005.
 16. 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.
 17. De Guzman BB., Azuma T., et al. Cytotoxicity and recognition of receptor-like protein tyrosine phosphatases, RPTPa and RPTPb, by *Helicobacter pylori* m2VacA. *Cell Microbiol*, 7: 1285-1293, 2005.
 18. Yamazaki S., Azuma T., et al. Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J Clin Microbiol*, 43:3906-3916, 2005.
 19. Yokoyama K., Azuma T., et al. Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:9661-9666, 2005.
 20. Higashi H., Azuma T., et al. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem*, 280:23130-23137, 2005.
 21. Nozaki K., Azuma T., et al. *Helicobacter pylori*-dependent NF- κ B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci*, 96:170-175, 2005.
 22. Yamazaki S., Azuma T., et al. Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44:261-268, 2005.

23. Nakayama Y., Sugiyama T., et al. CTLA-4 Ig suppresses liver injury by inhibiting acquired immune responses in a mouse model of fulminant hepatitis. *Hepatology*, 42:915-924, 2005.
24. Okuda M., Sugiyama T., et al. A strain-specific antigen in Japanese *Helicobacter pylori* recognized in sera of Japanese children. *Clin Diag Lab Immunol*, 12: 1280-1284, 2005.
25. Ohkawara T., Sugiyama T., et al. Geranylgeranylacetone protects mice from dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol*, 40: 1049-1057, 2005.
26. Nonome K., Sugiyama T., et al. Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289: G1091-1099, 2005.
27. Perez Aldana L., Sugiyama T., et al. In vitro induction of resistance to metronidazole and analysis of mutations in rdxA and frxA genes from *H. pylori* isolates. *J Infect Chemother*, 11:59-63, 2005.
28. Konno M., Sugiyama T., et al. Five-year follow-up study of mother-to-child transmission *H. pylori* infection detected by a random amplified polymerase DNA fingerprinting method. *J Clin Microbiol*, 43: 2246-2250, 2005.
29. Karita M., Sugiyama T., et al. Direct transmission of *H. pylori* from challenged to nonchallenged mice in a single cage. *Dig Dis Sci*, 50:1092-1096, 2005.
30. Otsu S., Fujioka T., Nishizono A., et al. Transfer of antigen-pulsed dendritic cells induces specific T cell proliferation and results in therapeutic vaccine effect against long-term *Helicobacter pylori* infection in mice. *Infect Immun*, 74: 984-993, 2006.
31. Hifumi E., Nishizono A., et al. Specific degradation of *H. pylori* urease by a catalytic antibody light chain. *FEBS J*, 272: 4497-505, 2005.
32. Minoura T., Fujioka T., Nishizono A., et al. Influence of age and duration of infection on bacterial load and immune responses to *Helicobacter pylori* infection in a murine model. *Clin Exp Immunol*, 139: 43-47, 2005.
33. Ohda Y., Fukuda Y., et al. Effects of hepatocyte growth factor on rat inflammatory bowel disease models. *Dig Dis Sci*. 50:914-21, 2005.
34. Tanaka J., Fukuda Y., et al. Influence of antimicrobial treatment for *Helicobacter pylori* infection on the intestinal microflora in Japanese macaques. *J Med Microbiol*. 54:309-14, 2005.
35. Ikehara N., Yokozaki H., et al. BRAF mutation associated with dysregulation of apoptosis in human colorectal neoplasms. *Int J Cancer*. 115:943-50, 2005.
36. Sakamoto N., Fukuda Y., et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease, A multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis*, 11: 154-163, 2005.
37. Takagawa T., Fukuda Y., et al. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Inflamm Bowel Dis*, 11:1038-1043, 2005