

高齢者のH.pylori除菌後胃癌の発症リスク層別化と予防法探索

東京大学医学部附属病院 消化器内科

助教 早河 翼

はじめに

胃癌は我が国の患者数・死亡数の上位を占める罹患率・死亡率の高い疾患であり、多くは70歳以上の高齢者に発症する。胃癌は数十年の経過に渡る*Helicobacter pylori*感染に伴って生じる慢性胃炎・腸上皮化生を母地として発生するが、高齢者では*H. pylori*の感染率は50%を超える。近年、*H. pylori*の除菌療法が広く行われるようになり、その効果もあって胃癌の罹患数、死亡数は徐々に減少傾向にある。しかしながら、*H. pylori*除菌後においても一定の頻度で発癌する症例も存在するため⁽¹⁾、除菌後も長期に渡るサーベイランスが不可欠であり、また除菌後高齢者の中でどのような患者に胃癌が発生しやすいかといった胃癌高リスク群の絞り込みは困難なのが現状である。

長年にわたる慢性胃炎・腸上皮化生変化により、高齢者の除菌後胃粘膜では胃酸分泌が著明に低下している。そのため胃酸による殺菌効果が減弱し、高齢者除菌後胃粘膜には異常細菌叢が生着・増殖していることが近年報告されている⁽²⁾。実際、胃酸分泌抑制薬の長期内服を行っている除菌後患者では胃内細菌叢が変化するとともに胃発癌が増加することが分かってきた⁽³⁾。申請者らは予備的検討として、除菌後高齢者280例の胃粘膜検体を用いて16srDNAシーケンスを施行し、胃癌発生と細菌組成との相関を検討した。得られた結果からPCoA解析を施行したところ、ヒト除菌後胃炎患者の胃内細菌叢は大きく分けて3群に分類できることが示唆された(図1、Group1～3)。さらに、観察期間中の胃癌発生率を比較したところ、Group3 > Group 2 > Group1の順に胃癌発生リスクが増加した(図2)。実際の細菌叢の違いをOTUクラスタリングとLDA解析法によりGroup間で比較したところ、Group3では

図1

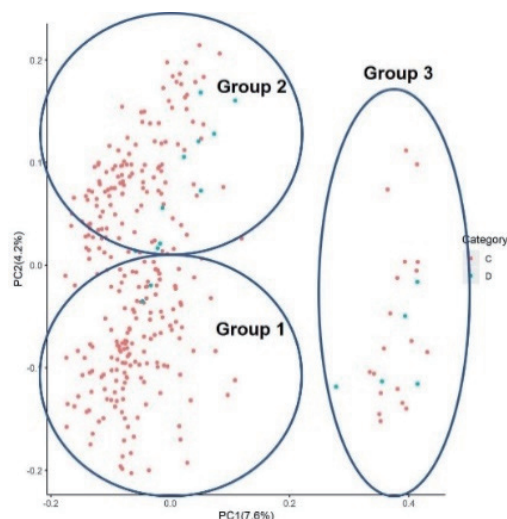
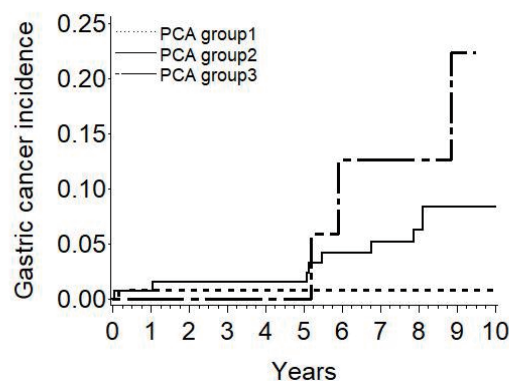


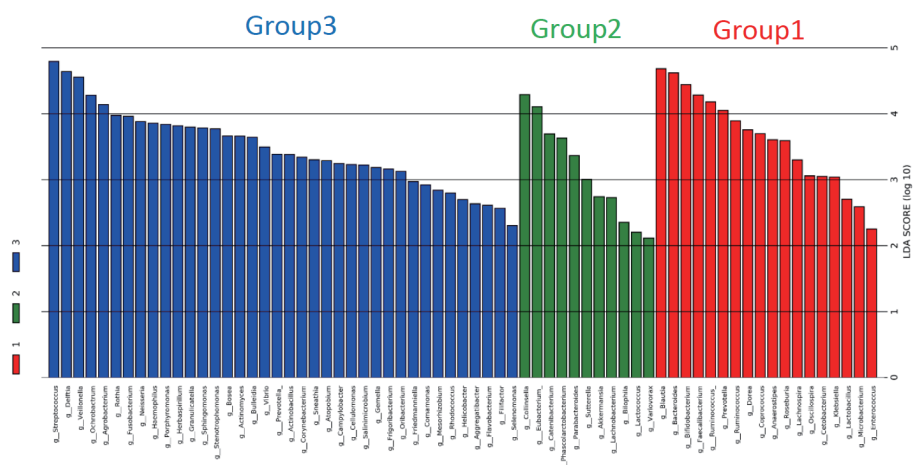
図2



Neisseria 属や、*Fusobacteria* 属等が特徴的に増加していた (図3)。

この成果をもとに、本研究では胃内細菌群が発癌を促進する機序を解明し、また胃癌高リスク群の層別化
法および高危険
集団における発
癌を抑止する方
法について、臨
床データベース・
マウスモデル・
培養細胞を用い
て多角的な検討
を行うことを目
的とした。

図3



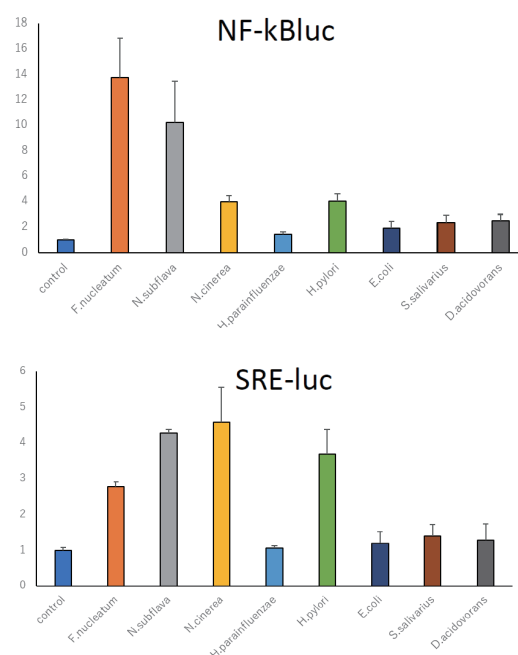
結 果

上記Group3で増加していた細菌種と胃癌細胞株を用いたin vitroの共培養実験を施行した。H.pyloriにより活性化される胃上皮内シグナル伝達経路の代表的経路であるNF-kB経路とMAPK/SRE経路について、その活性をルシフェラーゼアッセイにより検証した。胃癌細胞株AGSとGroupC細菌である*Fusobacterium nucleatum*・*Neisseria subflava*・*Neisseria cinerea*・*Streptococcus mitis*・*Haemophilus parainfluenzae*・*Delftia Acidovorans*、さらにH.pylori・E.coliをそれぞれ共培養したところ、*Fusobacterium nucleatum*・*Neisseria subflava*・*Neisseria cinerea*共培養時において、H.pylori共培養時と同等以上のNF-kB・SRE

活性化を認めた (図4)。一方、*Streptococcus mitis*・*Haemophilus parainfluenzae*・*Delftia Acidovorans*・E.coli培養時には両経路の活性化は認められなかった。以上より、*Fusobacterium*・*Neisseria*属細菌は、H.pylori除菌後胃粘膜において、上皮細胞の発癌シグナルを直接的に活性化することで除菌後胃癌の発生に関与している可能性が考えられた。

活性化シグナルにより誘導される具体的な遺伝子変化・リン酸化シグナルについて、

図4



H.pylori・Fusobacterium nucleatum・Neisseria subflavaと共培養後の上皮細胞RNAおよび蛋白質を用いてRNAseq・RTK arrayにより網羅的に解析した。RNAシーケンス後のPCA解析・クラスタリング解析の結果、各細菌はそれぞれ特徴的な遺伝子群を上皮細胞内に誘導していることが分かった(図5)。特に、Neisseriaは多彩なケモカイン・サイトカインの遺伝子発現の誘導を引き起こす一方、

FusobacteriumはDNA障害やp53経路の活性化作用がより顕著であった。RTK arrayにおいてもFusobacterium・NeisseriaはH.pyloriと同等以上のリン酸化経路活性化作用があることが示された。また、DNA障害機能について、dsDNA breakのマーカである γ H2AXの発現を観察したところ、FusobacteriumはH.pyloriと同様のDNA障害を上皮細胞に誘導したが、NeisseriaはdsDNA breakを誘導する作用は持たないことが分かった(図6)。

さらに、Fusobacterium・Neisseriaの炎症・発癌促進機構について、マウスモデルを用いた検討を行った。

H.pylori非依存的に慢性胃炎を生じるマウスモデルである胃特異的IL1b過剰発現マウスを用いた。抗生剤カクテル(A+V+N+M)投与後にFusobacterium nucleatum・Neisseria subflavaを週1回経口投与し、1か月後に胃組織の解析を行った。結果、両菌投与後の胃粘膜では炎症細胞数の増加が認められた(図7)。さらに

図5

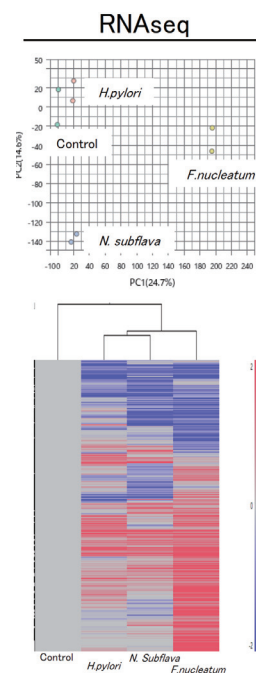


図6

γ H2AX (double strand DNA break)

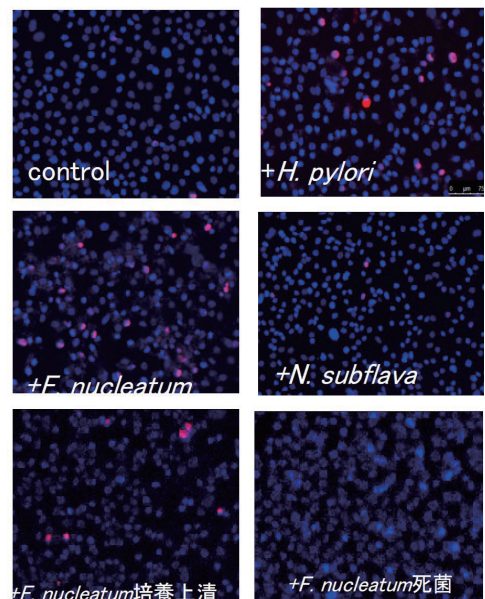
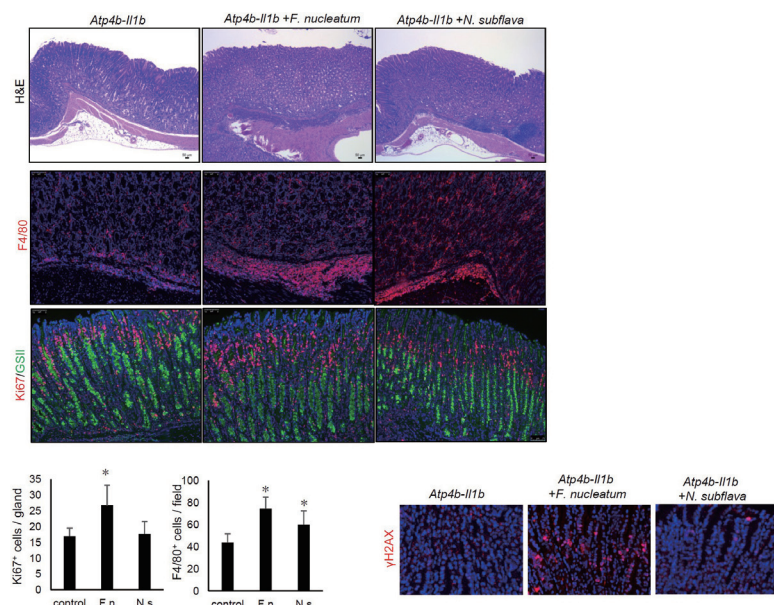


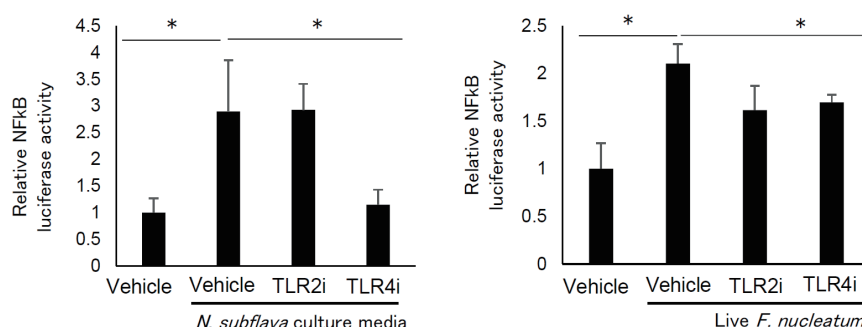
図7



Fusobacterium nucleatum 移植後のマウスでは、細胞増殖と dsDNA break のマーカーである γ H2AX の発現増加も認められた。以上の結果から、両菌種による生体内での胃炎・発癌促進効果が確認された。

Fusobacterium・*Neisseria* の炎症・発癌促進機序について、RNA シークエンスの結果などから当初は Cox 経路の関与を疑い、in vitro での Cox 阻害剤投与実験等を行ったが、阻害剤によるシグナル活性化抑制効果は認められなかった。一方、細菌などの微生物を認識する TLR4 の阻害剤を投与したところ両細菌による NF κ B 経路の活性化が減弱したことから、少なくとも一部の作用は TLR4 依存的である可能性が示唆されている (図8)。

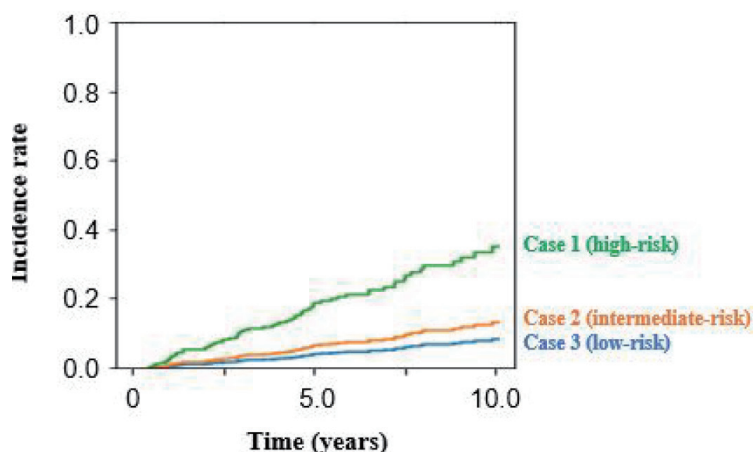
図8



最後に、Group3に属するヒト検体内で生じている変化について免疫染色法で解析を行った。Group1・2と比較して、Group3患者ではp53遺伝子の変異を示唆するp53蛋白発現量の増加および、炎症の増悪を示唆するCD68陽性単球の浸潤増加を認め、in vitro/in vivoの解析結果を支持する所見が認められた。これらの情報と年齢・性別・内服薬・既存疾患などの臨床情報を総合し、機械学習を用いた胃癌予測モデルの構築を試みた。予測モデルは、従来のCOXハザードモデルと三種の機械学習モデル (DeepSurv, gradient boosting decision tree (GBDT), naïve support vector machine) で構築した⁽⁴⁾。平均観察期間5.63年において、8.55% (94/1099) の胃癌発癌が見られ、GBDTを用いた予測モデルが最も精度が高かった (c-index:

0.84)。年齢、OLGA/OLGIM stage、内視鏡萎縮、多臓器癌既往が発癌予測に大きく寄与していた。細菌叢情報については解析した集団の一部の患者群のデータしかなかったため、予測への寄与は限定的であった。GBDTモデルを用い、胃癌の個別化予測を行うことが可能であった (図9)。

図9



考 察

本研究により、H.pylori除菌後胃炎粘膜には正常と異なる細菌叢が存在し、そのうちの一部とくにFusobacterium・Neisseriaについては、胃内に炎症・細胞増殖・DNA障害などを誘導して、その後の発癌リスクを増加させる働きがあることが示唆された。H.pylori除菌後に発生する胃癌のメカニズムや予防法については確立されておらず、本研究の成果はこれら未知の点を解明する一助となると考えられる。将来的には、H.pylori除菌後患者を対象としたFusobacterium・Neisseria検出キットの開発につながる可能性があり、さらに両細菌が検出された患者に対しては胃癌発生予防を目的として抗生剤による除菌療法も考慮される時代が訪れる可能性がある。さらに、細菌叢情報のみならず複合的な臨床情報を含めた機械学習モデルにより、個人の胃癌発生リスクを正確に予測することが可能となれば、より適切に胃癌サーベイランスを行っていくことが可能となるだろう。

要 約

本研究により、Fusobacterium・Neisseriaという新規の胃癌病原菌の同定とその機序解明に貢献することができた。

文 献

1. Shichijo S, Hirata Y, Niikura R, et al. Histologic intestinal metaplasia and endoscopic atrophy are predictors of gastric cancer development after Helicobacter pylori eradication. *Gastrointest Endosc* 2016;84:618-24.
2. Tsuboi M, Niikura R, Hayakawa Y, et al. Distinct Features of Autoimmune Gastritis in Patients with Open-Type Chronic Gastritis in Japan. *Biomedicines* 2020;8.
3. Niikura R, Hayakawa Y, Hirata Y, et al. Long-term proton pump inhibitor use is a risk factor of gastric cancer after treatment for Helicobacter pylori: a retrospective cohort analysis. *Gut* 2018;67:1908-1910.
4. Arai J, Aoki T, Hayakawa Y, et al. Letter: predictive model for gastric cancer after eradication of Helicobacter pylori-a survival analysis using a deep learning algorithm. *Aliment Pharmacol Ther* 2021;54:528-529.