

論文要旨

Homeostatic Mass Control in Gastric Non-Neoplastic Epithelia under Infection of *Helicobacter pylori*: An immunohistochemical Analysis of Cell Growth, Stem Cells and Programmed Cell Death

〔 *ヘリコバクターピロリ* 菌感染下の胃底腺上皮の定常的成長：
細胞増殖，幹細胞，細胞死の免疫組織化学的検索 〕

加藤 健司

【序論および目的】

iPS 細胞(induced pluripotent stem cell)の作製方法の樹立により，幹細胞の再生医療への応用に関する研究が進んでいる。一方，*Helicobacter pylori* (HP)感染は胃癌発生の高危険因子であり，HP 除菌療法は臨床の標準治療として確立している。Houghton J (Science 306 (5701): 1568-1571,2004)らは，HP 感染を始めとする胃癌が骨髓細胞に由来するという仮説，つまり胃癌は胃の上皮幹細胞に由来するものではなく，骨髓由来細胞が胃粘膜で異常な細胞増殖を引き起こし，上皮癌を形成するという仮説を提唱した。しかしながら，ヒト成体の正常組織では定常的再生を行い，一定の組織構造を維持している。ヒト成体組織の幹細胞の動態と成熟細胞への組織中での分化はほぼ解明されている。しかし，アポトーシスおよびそれ以外の胃上皮における細胞死の詳細は分化との関係においてなお不明であり，HP 感染下の定常的再生の実態も十分に明らかにされていない。本研究では，胃癌の発生した切除胃の胃癌以外の正常部分の病理組織標本で，胃底腺上皮の細胞増殖，幹細胞分化，細胞死について免疫組織化学的に検索し，HP 菌感染下および非感染下の胃粘膜の定常的再生の動態を検討した。

【材料および方法】

胃癌切除標本 10 例を用い，非癌の正常部分から標本を作製し，HP 感染は HE 染色で感染を確認した。また，Ki67 で増殖細胞，CD34，CD117，CD133 で幹細胞，抗単鎖 DNA 抗体，cleaved caspase-3，beclin-1 でプログラム細胞死を免疫組織化学的に検出した。免疫染色方法は，熱ないし酵素による抗原回復処理と通常感度の酵素標識間接法(ポリマー法)ないし超高感度法(ポリマー法とシグナル増幅法を加え，非特異反応を抑制した方法)を用いた。幹細胞標識の対照染色標本として，骨髓穿刺病理標本ならびに末梢血液標本を用いた。

【結果】

- ①胃底腺粘膜の Ki67 陽性増殖細胞の分布は，胃の炎症が認められない正常粘膜では胃底腺頸部相当域に標識細胞がみられた。HP 感染慢性胃炎では頸部相当域から上方への連続的な標識細胞の分布と下方への散在性の標識細胞の分布がみられ，炎症が強く萎縮性の粘膜では胃底腺底部相当域にやや多くの標識細胞が認められた。
- ②幹細胞の染色に用いられた CD34，CD117，CD133 の染色で，CD34 と CD133 は，骨髓標本と末梢血液標本で造血幹細胞と末梢血幹細胞を標識した。しかし，CD133 は超高感度染色で胃底腺上皮を強く標識した。
- ③CD117 の通常感度の染色では峽部域に陽性細胞を認め，超高感度染色では峽部の細胞を染め，胃小窩相当域に向かって染色が減弱した。

- ④CD117 の通常感度の染色では、胃底腺上皮や腸上皮化生にも陽性細胞を認めた。
- ⑤抗単鎖 DNA 抗体の染色は、胃切除病理標本の胃粘膜上皮の DNA が炎症環境や標本作成過程で修飾を受けていることを示した。
- ⑥Cleaved caspase-3 染色では、正常の胃小窩上皮表層に cleaved caspase-3 陽性細胞を認め、HP 感染下の胃粘膜上皮では胃小窩表層と頸部に陽性細胞を認めた。
- ⑦胃底腺上皮のプログラム細胞死は、cleaved caspase-3 陽性細胞を示さなかった。
- ⑧beclin-1 の熱処理ないし酵素処理による抗原回復超高感度染色で、峽部相当域以下の胃底腺上皮は陽性像を示し、酵素処理抗原回復超高感度染色は、異常 beclin-1 の核内蓄積像と少数の胃底腺上皮を標識した。

【結論及び考察】

幹細胞の染色に用いられた CD34 と CD133 は、骨髓標本と末梢血液標本で造血幹細胞と末梢血幹細胞を標識した。しかし、CD133 は胃底腺上皮を超高感度染色で強く標識し、胃の幹細胞の標識には不適切であることが示唆された。CD117 は造血幹細胞を標識したが、末梢血幹細胞を標識しないことから、CD117 は前駆細胞 (progenitor cells) を標識することが示唆された。CD117 の通常感度染色では、峽部域に陽性細胞を認め、超高感度染色では峽部の細胞を染め、胃小窩相当域に向かって染色が減弱しており、胃粘膜上皮幹細胞の前駆細胞 (Progenitor) を標識していると考えられた。CD117 の通常感度染色では、胃底腺上皮や腸上皮化生にも陽性細胞を認めた。CD117 の免疫染色は、胃上皮幹細胞の動態を示す最適な染色であった。従来の電顕的検索による胃底腺粘膜の腺上皮のプログラム細胞死は、胃小窩では表層のアポトーシスであり、峽部以下の胃底腺上皮は二重膜で分画されたアポトーシス小体を示すアポトーシスと報告されてきた。抗単鎖 DNA 抗体の染色は、胃粘膜上皮 DNA が炎症環境や標本作成過程で修飾を受けていることを示し、従来の DNA 断端検出によるアポトーシス検出法が胃切除標本に導入できないことを示唆した。Cleaved caspase-3 染色では、正常の胃小窩上皮表層に陽性細胞を認めた。一方、HP 感染下の胃粘膜上皮では胃小窩表層と頸部に陽性細胞を認めた。これらの所見より HP 感染下の胃粘膜上皮表層部でのアポトーシス抑制による胃小窩表層直下でのアポトーシスと頸部に出現した異常増殖細胞のアポトーシスを示唆した。胃底腺上皮のプログラム細胞死は、cleaved caspase-3 陽性細胞を示さないことから、アポトーシス以外のプログラム細胞死が示唆された。beclin-1 の熱ないし酵素処理による抗原回復超高感度染色で、峽部相当域以下の胃底腺上皮は陽性像を示し、酵素処理抗原回復超高感度染色は、異常 beclin-1 の核内蓄積像と少数の胃底腺上皮を標識した。ヒト胃切除標本の正常部の HP 感染胃炎の胃底腺粘膜で、胃底腺上皮は beclin-1 陽性の自己食細胞死を示すプログラム細胞死であることが明らかになった。

以上、HP 感染下の胃において 1) 胃小窩表層だけでなく、表層でのアポトーシス抑制による胃小窩表層直下でのアポトーシスと増殖する細胞のある頸部でのアポトーシスを認めた。2) 胃底腺は beclin-1 の染色で細胞質と核への異常集積 (核排泄能の低下) を示した。3) CD117 で標識される始原細胞 (progenitor) レベルを通過する幹細胞が峽部に供給されに増殖分化することが示唆された。本研究の結果から、免疫染色の結果、HP 感染による胃癌の発生は、遺伝子異常のある幹細胞が供給されるのではなく、HP 感染下の微小環境で発生する遺伝子異常がその原因であることを支持した。

論文審査の要旨

報告番号	医論第1467号	氏名	加藤 健司
審査委員	主査	坪内 博仁	
	副査	松山 隆美	有馬 直道

Homeostatic Mass Control in Gastric Non-Neoplastic Epithelia under Infection of *Helicobacter pylori*: An immunohistochemical Analysis of Cell Growth, Stem Cells and Programmed Cell Death.

(ヘリコバクターピロリ菌感染下の胃底腺上皮の定常的成長:細胞増殖, 幹細胞, 細胞死の免疫組織化学的検索)

加藤 健司

ヒト成体の正常細胞は定常的に再生されて、組織構造を維持している。最近では iPS 細胞(induced pluripotent stem cell)の確立など幹細胞研究が進展し、再生医療への応用を目指した研究が進んでいる。胃癌の発癌機序に関して、癌細胞が胃上皮幹細胞に由来するのではなく、骨髄由来細胞が胃粘膜で異常な細胞増殖を引き起こし、上皮癌を形成するという仮説が提唱された。一方、胃上皮細胞のアポトーシスや他の細胞死の詳細は、分化との関係や *Helicobacter pylori* (HP)感染下の胃上皮の定常的再生の実態などの面で未だ十分に明らかにされていない。

今回、学位申請者は、切除された胃癌の非癌部の病理組織を用いて、胃底腺上皮の細胞増殖、幹細胞分化、細胞死について免疫組織化学的に検索し、HP 菌感染下および非感染下の胃粘膜の定常的再生の動態を検討した。なお、増殖細胞は Ki67 抗原、幹細胞は CD34, CD117, CD133, プログラム細胞死は抗単鎖 DNA 抗体、cleaved caspase-3 と beclin-1 の各抗体を用いた免疫組織化学により評価した。

その結果、本研究により以下の知見が得られた。

1. Ki67 抗原陽性増殖細胞は、HP非感染下の胃底腺では峽部に認められた。一方、HP 感染下の胃底腺では、炎症の進展と共に峽部は不明瞭となり、上方への連続した分布と下方への散在性の分布がみられた。

2. 胃底腺の上皮幹細胞は、CD117 染色でより良好に標識された。CD117 陽性細胞は、骨髄と胃組織に認められ、末梢血で認められないことから、幹細胞の中でも分化を始めた細胞と考えられた。また、胃上皮周囲の間質と胃上皮頸部に認められたことより、胃の間質から腺上皮に分布する組織幹細胞の progenitor cell であることが示唆された。

3. 胃上皮のプログラム細胞死に関して、胃小窩では cleaved caspase-3 染色陽性所見からアポトーシス、胃底腺上皮では beclin-1 染色陽性所見から自己食細胞死が考えられた。

4. HP 感染粘膜では、間質の炎症、胃小窩表層のアポトーシスの抑制、表層直下でのアポトーシスが認められた。さらに、増殖細胞の多い胃小窩深層でのアポトーシスと、頸部での beclin-1 の核内染色像の所見から異常が生じた細胞の生理的なプログラム細胞死による排除が示唆された。

胃粘膜に生じた異常細胞が2つの異なったプログラム細胞死で排除されるという結果は、HP 感染下の胃癌発生は、遺伝子異常のある幹細胞に由来するのではなく、HP 感染下の炎症性の微小環境中で発生する胃組織幹細胞の遺伝子異常によるという考えを支持している。

本研究は、正常と HP 感染下における胃炎での胃底腺上皮の細胞増殖、幹細胞、細胞死の動態を検討し、HP 感染に関連する胃癌の発生機序における組織肝細胞の重要性を明らかにしたものであり、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1467 号	氏名	加藤 健司
審査委員	主査	坪内 博仁	
	副査	松山 隆美	有馬 直道

主査および副査の3名は、平成21年12月10日、学位請求者 加藤 健司 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) この研究は胃癌と *Helicobacter pylori* (HP) の関係を直接的に検討したものか？

(回答) HP 感染下の胃の定常的再生と炎症に伴う変化を検討して、胃癌と HP との関係を示唆する知見が得られた。

質問2) 胃潰瘍に関しては今回検討していないのか？

(回答) 胃癌の発生した胃の正常部分で胃癌を中心に分析したため、潰瘍に関しては検討していない。

質問3) 胃癌が発生した後に HP が感染した可能性もあり、胃癌と HP の関係を示唆するのは難しくないか？

(回答) HP が胃癌の発生に関係していることは疫学的にも実験的にも証明されている。さらに胃癌発生初期段階に HP が関係し、プロモーターであることが報告されているため、HP 関連胃炎の検討は意義があると思われる。

質問4) 今回使用した Stem Cell のマーカーは胃の Stem Cell marker として適切か？

(回答) 胃の組織幹細胞だけを特異的に認識するマーカーは同定されていない。この研究では、一般的に幹細胞マーカーと知られている CD34, CD133, CD117 の発現を免疫組織化学的に検討した。

質問5) Apoptosis の評価として、Tunnel 法は行わなかったのか？

(回答) Tunnel 法は壁細胞の残留塩酸や胃炎など炎症の修飾をうけるため、適切な標識が困難である。単鎖 DNA の免疫染色でも、残留塩酸や固定処理過程で生じる蟻酸によって組織細胞の DNA が顕著な単鎖化が起こることを確認した。したがって、本研究では cleaved caspase-3 の免疫染色で apoptosis を検出した。

質問6) Beclin-1 で染色された胃細胞で autophagy が生じていることが報告されているか？また、他の染色で検討していないのか？

(回答) 胃腺上皮に関する autophagy の電子顕微鏡的報告がある。Beclin-1 が autophagy のシグナル分子として腫瘍抑制に働いているという最近の報告もある。研究開始時に、入手できる抗体は Beclin-1 のみであった。現在の知見では、beclin-1 は自己食空胞核形成に関わっており、LC3 が自己食空胞発達に関与することが知られており、現在は、この LC3 の染色も可能な状況になっている。

質問7) Caspase-3 は、caspase-3 と cleaved caspase-3 の割合で見るとよいのでは？

(回答) 超高感度染色では、caspase-3 の分解過程を cleaved caspase-3 の抗体で検出できる。通常の apoptosis における cleaved caspase-3 の細胞質での発現は論文に示したように超高感度法で検出できるので、cleaved caspase-3 の免疫染色による apoptosis の検出は分子生物学的な検討を必要ではなく、指摘された検討は本研究では行ってない。

質問8) HP 感染陽性で胃癌発生率 2.9% は生涯発生率か？

(回答) 生涯発生率ではない。2.9% は 8 年位の追跡による報告であり、1 年間に 0.4% という報告もある。

質問9) HP は胃粘膜の表層に存在するのか？(回答) 一般に HP は粘膜表層の mucous coat 下部に見られ、infestation (外寄生) と表現されている。

質問10) 今回の研究は胃癌患者の正常部分を使用したのだが、ピロリ菌感染はどのように確認したのか？

(回答) 生体ではウレアーゼ法や尿素呼気試験や抗体法等の検査があるが、切除標本では HE に頼らざるを得ない。切除前に HP を確認している症例はごく最近のもので、今回の症例では確認できていない。

質問11) フローサイトメトリーを用いた研究では、CD117 陽性細胞は骨髄には約 10%、末梢血には 1~3% 存

在すると報告されているが、本研究では骨髄では CD117 は強陽性、末梢血では CD117 は陰性の所見となっている。その違いの解釈は？

(回答) 方法論が違うため単純な比較はできないが、本研究では、CD117 の標識輝度が非常に低く、超高感度法により染色しているため、骨髄では多くの未熟な細胞が染色され、末梢血では骨髄で染色された細胞が分化して、CD117 の染色性が低下したのではないかと考えている。

質問 12) CD68 染色と autophagy の関係はどう解釈するのか？

(回答) 胃底腺上皮は、近接するマクロファージにより食食されるという電頭による報告があったため、胃底腺内の CD68 陽性マクロファージの分布を検討した。胃底腺上皮は lysosome の発現が亢進していても、マクロファージの分布はみられなかったため、beclin-1 で自己食食と自己食食細胞死を検討した。

質問 13) 胃癌 10 例で HP 陽性は何例か？

(回答) 5 例である。

質問 14) 正常粘膜標本では HP は陰性であったか？

(回答) HP は陰性であった。

質問 15) 胃癌の臨床的背景との関係は？

(回答) 正常部分での HP 感染を検討しているため、臨床病理学的検討は行っていない。

質問 16) 胃癌患者以外の検討は？

(回答) 最近では胃癌以外の切除は稀であり、潰瘍など他の疾患に関しては検討していない。

質問 17) 骨髄と末梢血は 1 人の検体で検討したものか？

(回答) 骨髄と末梢血の検体はそれぞれ 3 人からのもので、血液の悪性腫瘍がないことは確認している。

質問 18) 胃癌の患者の骨髄標本も検索すべきではないか？

(回答) 胃癌の患者さんから骨髄標本をとることは重要と考えられ、今後検討したい。

質問 19) 胃癌では apoptosis が抑制され、増殖が亢進することが、発癌の機序なのか？

(回答) HP 感染によって通常は表層でおきる apoptosis の抑制が発癌の一機序と考えられている。胃粘膜表層直下での増殖細胞部位で apoptosis が起こっていることを指摘した。HP による遺伝子レベルの異常が生じた増殖細胞に apoptosis が生じたものと考えている。

質問 20) 超々感度法を使ってまで発現が難しい抗原を組織上で検出する意義は何か？

(回答) 抗原量が少ないために超々感度法を使わなければ検出できない抗原の検出も重要であり、局在性が不明なものも多く、これを可視化して局在を突き止めることは意義あると考えられる。

質問 21) この標本は HP 感染後の炎症期を過ぎたものか？

(回答) HP がある限り持続炎症いわゆる慢性胃炎は続くと思われる。

質問 22) この研究だけでは、HP による胃癌の発生が HP 感染下の微小環境で発生する遺伝子異常がその原因であると断定できないのでは？

(回答) HP による胃癌の発生は、HP 感染下の微小環境で発生する遺伝子異常が一つの原因であることが示唆された。胃底腺の組織培養による研究でも、胃組織幹細胞が何らかの変化にて腸上皮化生を生じることが報告されており、直接的証明は組織培養された胃底腺の癌発生を確認する必要があると思われる。

質問 23) 抗 CD117 抗体がポリクローナル抗体であれば、非特異的反応がでる可能性があるため、ブロックして調べるべきだが、その検討は？

(回答) 使用した CD117 抗体はモノクローナル抗体である。合成抗原ペプチドでの抗体吸収試験の代わりに、陰性コントロールとして、抗体希釈液のみでの染色をおこなった。

質問 24) Beclin-1 が核に染まったというのは、mutant-beclin-1 ができたため核排泄できなかったと考えているのか？

(回答) Mutant beclin-1 蛋白質の核外移送の異常により、核内にとどまったため染色されたと思われる。すなわち、蛋白質の核外移送の障害が遺伝子レベルの異常を反映したのと考えている。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。