

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06404

研究課題名(和文)次世代シーケンシング技術を用いた東アジア地域の高悪性化ピロリ菌に関する研究

研究課題名(英文) Research for highly virulent *Helicobacter pylori* in East Asia with next-generation sequencing technologies

研究代表者

岩本 彰 (Akira, Iwamoto)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10757347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクターピロリ菌の保有するCagAは癌性蛋白質として知られており、そのC末端領域にはEPIYA配列という特徴的なアミノ酸変化が存在し、EPIYA-DとEPIYA-Cに大別される。次世代シーケンサーを用いて、cagA遺伝子に共通する一塩基多型やアミノ酸変化がないかを調べた。用いた菌株は24株で、参照標準菌株に対し、EPIYA-D群20株では57個の共通した一塩基多型と36個のアミノ酸変異を認めた。そのうち、18個のアミノ酸変化はヒト細胞内膜と電気的に結合するドメイン領域に多く存在した。2種の変化に関してはEPIYA-D群全てにおいて存在し、1種の変化は対象菌株全てにおいて認められた。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori CagA is known to have oncogenic activity, and the CagA C-terminal region carries the amino acid motif Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA), which occurs as two major subtypes. Using whole-genome sequencing (WGS), we examined H. pylori cagA full sequences and analyzed single nucleotide variants (SNVs) and amino acid changes (AACs) related to CagA. Clinical H. pylori isolates from 24 patients. Twenty strains with EPIYA-D and 4 strains with non EPIYA-D were subjected to WGS. Using ATCC26695 as a reference, there were 57 highly frequent SNVs and 36 AACs in 20 strains with EPIYA-D. Eighteen of these 36 AACs (50%) were found in Domain II, which is located in the core of the N-terminal region that binds to the acidic inner leaflet of host epithelial cell membrane. Two AACs, Ile1065Thr and Thr1151Met, were observed in all 20 isolates with EPIYA-D. Notably, Ile1065Thr occurred regardless of whether the EPIYA-D or non-EPIYA-D motif was present.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ヘリコバクターピロリ菌 CagA

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌の地域特異性と病原因子に関するメカニズムの解明は不十分である。とりわけ、東北アジア地域(日本および中国、韓国、モンゴル)で高胃癌発症率を呈する要因は不詳であり、これら地域のピロリ菌株に対して病原遺伝子群を解明する必要がある。

2. 研究の目的

ヘリコバクターピロリ菌は、世界の成人の約50%に感染しており、胃癌、リンパ腫などの悪性疾患の原因である。我が国を含めた東北アジア地域は、欧米諸国に比べ、胃癌の発症率ははるかに高い。その要因として、水平伝播された約30個(約40,000塩基)の外來性遺伝子群(*cytotoxin associated gene pathogenicity island: cagPAI*)を保有する悪性ピロリ菌の存在が挙げられる。

沖縄を除く日本では、分離されるピロリ菌のほぼ100%は、*cagPAI*領域を保有している。同領域を保有するピロリ菌は病原性が高く、悪性化能が強い。なかでも*cagPAI*領域の最下流に存在する*cagA*遺伝子は最も重要な癌関連遺伝子である。

*cagA*遺伝子からなるCagAタンパク質は、約1,200個のアミノ酸から構成され、C末端領域には特徴的なアミノ酸配列が存在し、EPIYA繰り返し配列と呼称される。

この配列は、欧米諸国に多い西欧型(EPIYA-C)と、我が国に多い東アジア型(EPIYA-D)に分類される。とりわけEPIYA-Dを持つ菌は、萎縮性胃炎の進展と胃癌の発生に密接に関与し、強い悪性化能を示す。

CagAタンパク質の三次構造解析から、構造的に安定したN末領域と天然変性タンパク質の特徴を有するC末領域を認める。N末領域は、3種類の機能を有する領域に分類される。天然変性タンパク質として、多方面への作用を有する*cagA*遺伝子のC末領域に関する研究は多いものの、*cagPAI*遺伝子群すべてと*cagA*遺伝子のN末領域に関する詳細な研究は、いまだ存在しない。次世代シーケンサーを用いたピロリ菌ゲノム解析経験をもとに、ピロリ菌の病原性に関与する*cagPAI*領域と*cagA*遺伝子の詳細なディープシーケンスにより、癌化タンパク質CagAに関わる未知な悪性遺伝子変異を解明する。

3. 研究の方法

当研究室に保存されている東アジアのピロリ菌(日本株17、ベトナム株5)22株と標準菌株であるATCC26695株とJ99株の計24株のDNAを用いて、次世代シーケンス用のサンプル調整を行う。全ゲノムシーケンス(イルミナ社MiSeq)を行う事で、ピロリ菌の全ゲノム160万塩基配列を解読する。同時にシーケンスデータのクオリティについても確

認する。

また、それら菌株はCagAタイピングPCR法(東洋紡社)を用いて、CagA分子多型別にEPIYA-D群(東アジア型)とnon-EPIYA-D群(非東アジア型)に分類をおこなう。

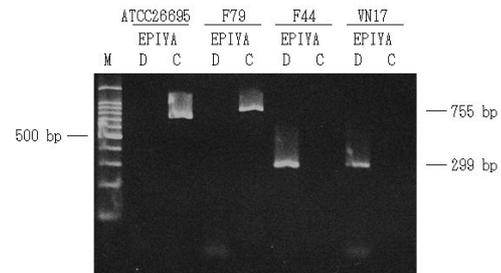
解析ソフト(CLC bio社Genomics Workbench)により、参照配列にマッピングを行った後、*cagPAI*遺伝子群ならびに*cagA*遺伝子に焦点をあて、菌株に共通の塩基変異、アミノ酸置換を決定し、ゲノム変化を解読する。さらに高悪性化ピロリ菌に共通し、癌病原性をきたすゲノム変化を検出する。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌24株の全ゲノムシーケンス

臨床分離ピロリ菌として、日本由来である神戸10株(S1、S2、S4、S8、S13、S16、S17、S22、S23、S26)、沖縄3株(174、177、179)、福井4株(F32、F44、F65、F79)とベトナム5株(VN8、VN17、VN19、VN24、VN27)ならびに標準菌株であるATCC26695とJ99の計24株のシーケンスを行った。

これら菌株は、CagAタイピングPCR法を用いてCagA分子多型別に、EPIYA-D群(東アジア型)20株とnon-EPIYA-D群(非東アジア型)4株に分類した。



CagAタイピングPCR例:

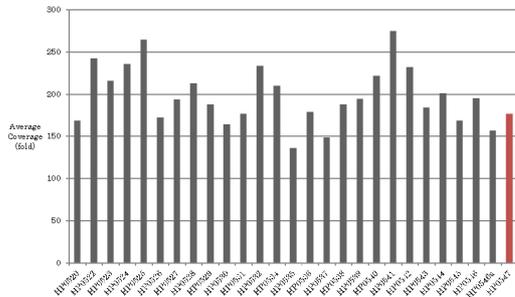
755 bpがEPIYA-C株に対応(ATCC26695株とF79株)
299 bpがEPIYA-D株に対応(F44株とVN17株)

バクテリアゲノムの変異解析には、最低でもゲノムデプス50以上が必要であり、取得したゲノムデプスは、すべての菌株において70以上であり、トリミング(シーケンス用語で、品質の悪いリードを除去する事)後のマッピングリード数は1,977,137から11,140,035で高い値を示した。これら取得終了データは、変異解析に十分であると考えられた。

(2) *cagPAI* 遺伝子群に関する解析

型分泌機構に関与する*cagPAI*遺伝子群の解析を行った。ATCC26695株では、*cagPAI*遺伝子群のコーディングシーケンス(CDS)は、それぞれHP0520からHP547(*cagA*遺伝子)が該当する。

臨床分離ピロリ菌と標準菌株の計 24 株の全ゲノムシーケンスで *cagPAI* 領域にマッピングリードの不均衡や欠損が無いことを、解析ソフトで確認を行った。また、同領域においても、解析に必要な十分なデプスが得られている。



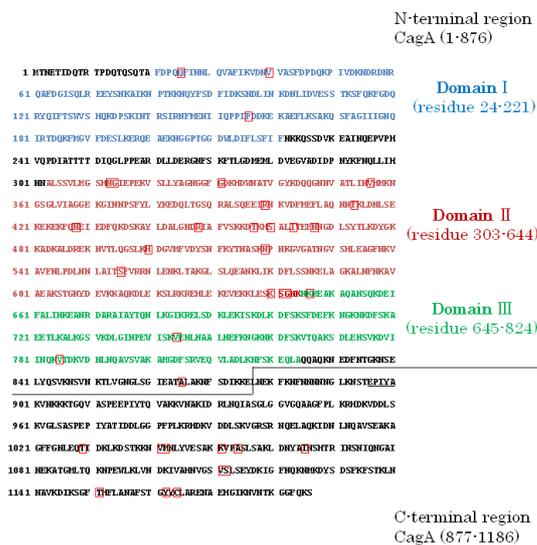
HP0521 (偽遺伝子) をのぞく *cagPAI* 遺伝子群の菌株平均デプスは100を超える
HP0547 (赤バールグラフ) が *cagPAI* 遺伝子に該当する

HP0521 (*cag* 遺伝子) は、いわゆる偽遺伝子とみなされており、その機能については不明な点が多い。ディープシーケンスによって、F32 株 (代表的な EPIYA-D 配列を持つ福井株) を含めた、多くの菌株のゲノムデプスは 40 未満であったものの ATCC26695 株、J99 株、S13 株においてはゲノムデプス 80 以上を認め、偽遺伝子が存在するものと考えられた。また、それらは既報のサンガーシーケンス結果とも一致していた。

(3) *cagA* 遺伝子に関する解析

EPIYA-D 群 (東アジア型) 20 株

上記で得られた結果をもとに、*cagA* 遺伝子の解析を行った。ATCC26695 株の CagA 蛋白は 1,186 個のアミノ酸配列で構成される。



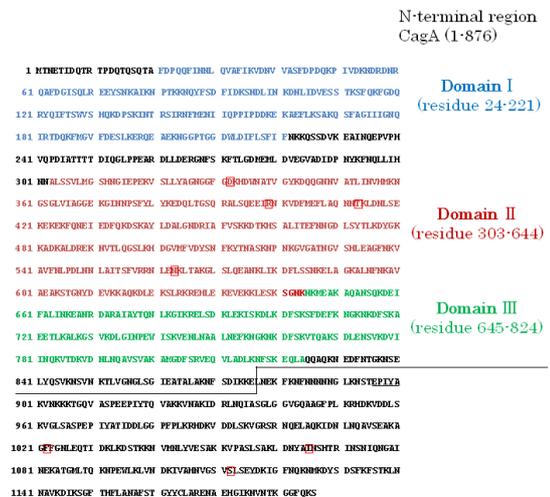
東アジア型 CagA (EPIYA-D 群) 計 20 株の共通アミノ酸変異 36 個の分布

この参照配列に対して、EPIYA-D 群 20 株において、57 個の共通した一塩基多型 (90%

以上の一一致率と定義した) と 36 個のアミノ酸変異を認めた。そのうち、18 個 (50%) のアミノ酸変化は、ヒト細胞内膜と静電的に結合するドメイン領域に多く存在する ($p < 0.05$) ことが判明した。また、EPIYA 繰り返し配列が存在する C 末領域には、11 個 (30.6%) の共通アミノ酸変異が存在し、2 種類の変異 (Ile1065Thr と Thr1151Met) は、EPIYA-D 群 20 株全てにおいて存在していた。東アジア型 CagA (EPIYA-D) を有する菌株では、ヒト細胞内膜に CagA タンパク質を係留するドメイン領域と、ヒト細胞内でシグナル伝達に参与する C 末端域にアミノ酸変異が多い。

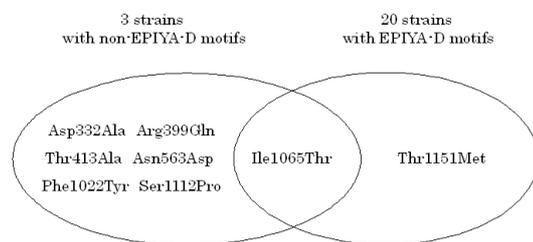
non-EPIYA-D 群 (非東アジア型) 3 株

4 株から参照配列である ATCC26695 株を除いた計 3 株 (F65、F79、J99) についても同様に解析を行った。13 個の共通した一塩基多型と 7 個の 3 株全てに共通するアミノ酸変異 (Asp332Ala、Arg399Gln、Thr413Ala、Asn563Asp、Phe1022Tyr、Ile1065Thr と Ser1112Pro) を認めた。



非東アジア型 CagA (non-EPIYA-D 群) 計 3 株の共通アミノ酸変異 7 個の分布

7 個のうちの 4 個 (57.1%) はドメイン領域に存在し、残りの 3 個 (42.9%) は C 末端領域に存在し、ドメイン領域には共通アミノ酸変異は認めなかった。



参照 ATCC26695 株を除いた全ての株に共通するアミノ酸変化は C 末端領域に存在する Ile1065Thr

参照配列である ATCC26695 株を除いた全ての株に共通する一塩基多型は T3194C であり、対応するアミノ酸変化は Ile1065Thr であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Hirofumi Ogawa, Akira Iwamoto, Toshihito Tanahashi, Rina Okada, Koji Yamamoto, Shin Nishiumi, Masaru Yoshida, and Takeshi Azuma. Genetic variants of *Helicobacter pylori* type IV secretion system components CagL and CagI and their association with clinical outcomes. Gut Pathogens (2017) 9:21.

DOI 10.1186/s13099-017-0165-1

(査読あり)

[学会発表](計2件)

小川 浩史、岩本 彰、棚橋 俊仁、山本 幸司、吉田 優、東 健、*Helicobacter pylori* CagL and CagI variants related with type IV secretion system、第 22 回ヘリコバクター学会学術集会、2016.6.24、大分

小川 浩史、岩本 彰、棚橋 俊仁、岡田 理菜、吉田 優、東 健、ヘリコバクターピロリ菌 IV 型分泌機構を制御する CagL と CagI の変異解析、第 102 回消化器病学会総会、2016.4.21、東京

[図書](計0件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本 彰 (Akira, Iwamoto)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10757347

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

東 健 (Takeshi, Azuma)

棚橋 俊仁 (Toshihito, Tanahashi)

岡田 理菜 (Rina, Okada)