

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04127

研究課題名(和文) 腸肝型ヘリコバクター感染と胆道がん・膵がんリスク

研究課題名(英文) Intestinal and hepatic infection and risk of biliary tract and pancreatic cancer

研究代表者

菊地 正悟 (Kikuchi, Shogo)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40224901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Helicobacter hepaticus*や*H. bilis*に対する特異的な抗体測定系の確立に至らなかった。得られた結果からは、*Helicobacter*属細菌が胆道がんや膵がんのリスクを上昇させている可能性は示せたが、確定的な結論には至っていない。*Helicobacter*属細菌と胆道がんや膵がんの関係については、更に詳細な研究を続ける必要がある。本研究で収集した膵がん症例約1,100例を含む2,039例の膵がんと32,592例の対照によるGWASメタ解析で、糖尿病などに関与するGP2遺伝子が膵がんのリスクと関係する遺伝子であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、消化器病学(肝胆膵)、微生物学、疫学・公衆衛生学の専門家がチームで実施下研究で、協力体制を築くことで、通常得られない新鮮胆汁などの検体を用いた研究が可能となった。腸肝型ヘリコバクターである*Helicobacter hepaticus*や*H. bilis*と胆道がんや膵がんの関係はある程度示すことができた。しかし、研究期間内に確定的な因果関係を示すには至らなかった。重要な課題であるので、今後も研究を続け、わが国の胆道がん膵がんと感染症の関係がどの程度のものなのかを明らかにしたい。本研究を通じて得られた協力体制は貴重なもので、この関係を維持しながら、今後も研究を続けたい。

研究成果の概要(英文)：We have not yet succeeded in establishing measurement methods with enough sensitivity and specificity for *Helicobacter hepaticus* or *H. bilis* antibody. Although obtained results indicated the possibility of causal relationships between *H. hepaticus* or *H. bilis* and biliary tract or pancreatic cancers, they are not conclusive. In order to clarify the relationships further precise studies are needed. Using germline DNA samples from 1,100 pancreatic of the current study and other samples, we have performed genome-wide association meta-analysis and identified novel GP2 gene risk variants for pancreatic cancer in the Japanese population. GP2 gene is known to be related with diabetes mellitus.

研究分野：疫学

キーワード：Helicobacter bilis Helicobacter hepaticus 胆汁 抗体検査

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

平成 26-28 年度の研究で、*H. pylori*、*H. hepaticus*、*H. bilis* と膵がん胆道がんの関係について研究してきた。*H. pylori* は、膵がん症例 360、対照 400 例での分析で、オッズ比 1.65 (95%信頼区間 1.12-2.27) を示した。3 例の胆汁から *Helicobacter* 属の保有するウレアーゼ遺伝子が検出されたが、そのうち 2 例は *H. pylori* 血清抗体陰性であり、胆道に *H. pylori* 以外の腸肝型 *Helicobacter* 群が棲息する可能性が大きいことが明らかになった。*H. hepaticus* は既報に従い HRII51 抗原に対する抗体価の測定を行ったが、膵がん、胆道がんとも症例と対照で違いがなく、この抗原と病原性の強い関連は否定される結果であり、別の抗原を用いた分析が必要と考えられる。*H. bilis* については、抗体測定系の特異性が十分でない。

最近の研究で、マウスの腸肝型 *Helicobacter* 群である *H. typhlonius* が腫瘍を作ることが報告されている。*H. typhloniu* は強い病原性は認められないが、日和見病原菌として宿主の免疫力低下に伴い病原性を発揮する可能性がある。*H. typhlonius* の IL-10-/- 欠損マウスへの実験的感染により、激しい炎症性腸疾患 (IBD) 様病変の誘導や IBD 関連性の adenoma の発生が報告されている (Chichlowski et al., *Comp Med* 58:534-541, 2008)。また、近年 Apc 変異マウスにおいては炎症に基づかない腫瘍形成の誘導が報告されている (Dingemans et al., *Carcinogenesis* 36:1388-1396, 2015)。Frank ら (*Front Microbiol* 6, article 1549, 2016) は *H. typhlonius* MIT97-6810 株の全遺伝子構造を決定して、本菌の遺伝子長が 1.92 Mbp であり、*H. hepaticus* (1.80 Mbp) や *H. pylori* (1.67 Mbp) よりも長いことを報告した。また、*H. typhlonius* の遺伝子は *H. hepaticus* と類似し、75.3% の相同性を示した。更に *H. pylori* の病原因子および発がん因子と想定されている type IV 分泌装置や *cagA* 遺伝子を含む pathogenicity island (PAI)、*vacA* 遺伝子を保有していることが明らかになり、*H. pylori* や *H. hepaticus* と同様、病原性を持ち得る細菌であることがわかった。*H. typhlonius* はヒト腸管からは分離培養されていないが、*H. typhlonius* および類似菌の遺伝子検出についての研究は、腸管のみならず胆肝膵系臓器の疾患との関連性が疑われている。

## 2. 研究の目的

胆道の *Helicobacter* 感染と、胆道がん・膵がんの関係を明らかにするために以下の研究を行う。

- a) 肝内胆管、肝外胆管、胆嚢がん、膵がん症例と対照の血漿と DNA を多数収集する。(膵がん 1100 例、胆道がん 450 例は収集済)。
- b) 良性疾患を含む胆汁ドレナージ症例 100 例から胆汁と血清を収集する (50 例収集済)。
- c) 細胞診のためブラシで擦過後に採取した症例 30 例の胆汁の残余検体とブラシを用い DNA の 16S メタゲノム解析による細菌叢の網羅的解析を行う。
- d) c で確認された腸肝型 *Helicobacter* 属 (*H. bilis* を含む) について、b の検体を用いて抗体と DNA 検出が一致することを確認して、抗体測定系を確立する。この抗体測定系で a の血漿を測定し、各がんと感染の関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- a) 肝内胆管、肝外胆管、胆嚢の原発部位により、疫学的な性質が異なることが指摘されているため、肝内胆管、肝外胆管、胆嚢がんが各 200 例を超えるまで、協力施設で胆道がんを中心に症例収集を継続する。
- b) 良性疾患を含む胆汁ドレナージ症例から分析可能な胆汁と血清のペア合計 100 例を収集する。50 例は既に収集済であるが一部劣化検体を含む。
- c) 胆汁の残余検体とブラシを用い DNA の 16S メタゲノム解析による細菌叢の網羅的解析については、準備を進めたが、研究期間中には実施できなかった（今後実施予定）。
- d) *H. bilis* もしくは c で得られた細菌について特異性の高い抗体測定系を確立する。

### 4. 研究成果

最終的な、血漿（リンパ球由来 DNA も採取）収集症例数は、膵がん 1,316、胆道がん 543、対照 1,000 である。

a-1) 血清 *H. hepaticus* 抗体価を HRII51 モノクローナル抗体で測定した。胆道がん症例  $0.45 \pm 0.34$  (N=388) では対照  $0.39 \pm 0.24$  (N=545) より高値 (P=0.003)、膵がん症例は対照より低値 ( $0.33 \pm 0.16$ ) だった。

a-2) *Helicobacter* 属同士の抗体の交差反応の影響を除くため、*H. pylori* (以下 Hp) 非感染者の血清で *H. hepaticus* (以下 Hh), *H. bilis* (以下 Hb) 全菌体抗原 ELISA を行った。膵がん 120 症例中 Hh 抗体保有 2 例、Hb 抗体保有 9 例、胆道がん 130 例中 Hh 抗体保有 8 例、Hb 抗体保有 19 例が示された。非がん患者血清 117 例中では、Hh 抗体保有 1 例、Hb 抗体保有 10 例であった。胆道がん患者の Hh 抗体、Hb 抗体保有率が有意に非がん患者より高かった。

b-1) Hb (ATCC51630 株)、Hh (ATCC51449 株)、および Hp (TK1402 株) の可溶性菌体抗原に対する抗体価を測定した。胆汁から抽出の全 DNA を使って *Helicobacter* 属細菌特異的 PCR 増幅とその塩基配列から菌種同定を行った。胆道がん患者の *Helicobacter* 属細菌抗体保有状況は、*H. pylori* 抗体保有 17 名、同抗体非保有 18 名中で *H. hepaticus* または *H. bilis* 抗体保有が 4 名 (22%) であった。膵がん患者では Hp 抗体保有 23 名、Hp 抗体非保有 36 名で Hh, Hb 抗体保有が 13 名 (36%) であった。対照では、Hp 抗体保有は 13 名で、Hp 抗体非保有で Hh, Hb 抗体の保有例はなかった。

b-2) 胆汁から抽出の全 DNA を使って *Helicobacter* 属細菌特異的 PCR 増幅とその塩基配列から菌種同定を行った。Hp 抗体保有に関係なく、胆汁から *Helicobacter* 属細菌が検出されたのは胆道がん 9/30 例 (30%)、膵がん 19/56 例 (34%)、対照 6/22 例 (27%) だった。

b-3) 胆汁中の *Helicobacter* 属細菌の培養は新鮮胆汁を採取したが、成功しなかった。

本研究では、残念ながら Hh や Hb に対する特異的な抗体測定系の確立に至っていない。これまでの結果からは、*Helicobacter* 属細菌が胆道がんや膵がんのリスクを上昇させている可能性は示せたが、確定的な結論は得られなかった。感染症とがんなどの疾患の因果関係については、

同時に感染する他の病原体によるリスク上昇の可能性もある。*Helicobacter* 属細菌と胆道がんや膵がんの関係については、更に詳細な研究を続ける必要がある。

e) 本研究では同意を得て対象者のリンパ球由来 DNA も収集している。膵がん患者約 1,100 例を含む 2,039 例の膵がんと 32,592 例の対照による GWAS メタ解析で、糖尿病などに関与する GP2 遺伝子が、OR=1.46 (95%CI: 1.29-1.66) で膵がんの感受性遺伝子であることを同定した (Nature Communications 誌に accept され in press である)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 林櫻松, (13名), 笹平直樹, (2名), 上野誠 (8名), 大崎敬子, 神谷茂, (57名), 菊地正悟, (1名)	4. 巻 in press
2. 論文標題 Genome-wide association meta-analysis identifies GP2 gene risk variants for pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大崎敬子、北条史、米澤英雄、蔵田訓、花輪智子、神谷茂
2. 発表標題 胆道癌患者における腸肝Helicobacter属感染
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大崎敬子、林櫻松、米澤英雄、北条史、奥田真珠美、神谷茂、菊地正悟
2. 発表標題 胆道癌および膵臓がん患者における腸肝系Helicobacter属細菌の感染状況について
3. 学会等名 第25回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1.大崎敬子1、奥田真珠美2、米澤英雄1、蔵田訓1、花輪智子1、神谷茂1（1杏林大・医・感染症学、2愛知医科大学・小児科学）
2. 発表標題 腸肝系Helicobacter属細菌感染と膵臓癌および胆道癌との関連について
3. 学会等名 第92回日本感染症学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 2. 大崎敬子1、林 櫻松2、米澤英雄1、北条 史3、奥田真珠美4、福田能啓5、菊地正悟2、神谷 茂1 (1杏林大・医・感染症学、2愛知医科大学・公衆衛生学、3杏林大・医・共研実験動物部門、4愛知医科大学・小児科、5兵庫医科大学)
2. 発表標題 胆道癌および膵臓癌患者における胆汁からのHelicobacter属細菌の検出と血清抗体価の測定
3. 学会等名 第23回 日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 3. 大崎敬子、米澤英雄、蔵田 訓、花輪智子、神谷 茂 (杏林大・医・感染症学)
2. 発表標題 膵臓癌および胆道癌患者の腸管系Helicobacter 属細菌および抗体の保有状況
3. 学会等名 第66回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第64回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神谷 茂  (Kamiya Shigeru)  (10177587)	杏林大学・保健学部・教授   (32610)	
研究分担者	上野 誠  (Ueno Makoto)  (10520760)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・その他部局等・その他   (82713)	
研究分担者	笹平 直樹  (Sasahira Naoki)  (30401102)	公益財団法人がん研究会・有明病院 肝・胆・膵内科・部長   (72602)	

