

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590719
 研究課題名（和文） 前庭部胃炎と体部胃炎の差を規定するヘリコバクター・ピロリ菌
 および宿主因子の同定
 研究課題名（英文） Identification of genetic factors of *H. pylori* difference
 between antral and body gastritis
 研究代表者
 伊藤 義幸（ITO YOSHIYUKI）
 福井大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：60313748

研究成果の概要：

DNA サブトラクション法を用いて疾患特異的および体部胃炎に特異的なヘリコバクターピロリ菌遺伝子の同定を試みた。その結果、十二指腸潰瘍株に有意に頻度が高い遺伝子断片を同定した。さらに以前に同定した日本株に特異的と考えられる膜蛋白について解析し、polyA を含み phase variable な遺伝子であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・上部消化管学（食道、胃、十二指腸）

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、DNA サブトラクション法、前庭部胃炎、体部胃炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 以前から、欧米のヘリコバクター・ピロリ（以下 Hp と略す）感染者や十二指腸潰瘍の患者は前庭部胃炎の頻度が高く、日本の Hp 感染者では体部胃炎から萎縮性胃炎に進展する頻度が高いことが知られている。我々は、沖縄県立中部病院との共同研究で cagA 遺伝子が陰性もしくは欧米型である Hp に感染し

ている患者は萎縮が軽度であることを報告している。しかし、アジア諸国の中で、東アジア型の cagA が多くても萎縮性胃炎の少ない国や地域が存在し、日本においても、Hp 感染者で萎縮が若年から体部に広く進展する患者と前庭部に限局する患者が存在する。さらに欧米で胃癌の頻度が高い国では、cagA のすべてが欧米型であることから、cagA 以外の

因子が萎縮に関与する可能性がある。

(2) Akada らは同一のマウス内に異なる2種類の菌株 (SS1 および X47) を混合感染させたところ、体部を好んで生息する菌株 (X47) と前庭部を好んで生息する菌株 (SS1) が存在することを報告している。

2. 研究の目的

(1) 体部胃炎 - 胃癌患者および前庭部胃炎 - 十二指腸潰瘍患者から分離された Hp を、DNA subtraction 法 (以下 SSH と略す) の手法を用いてゲノムレベルで比較し、体部胃炎と前庭部胃炎の差を規定する菌側因子の同定を行なう。

(2) これまでに我々は SSH の手法を用いて日本株に高頻度でみられ、スペイン株にほとんどみられない新規膜蛋白遺伝子を同定したが、その遺伝子について解析を行なう。

3. 研究の方法

I. SSH を用いた体部胃炎、疾患特異的な遺伝子の同定

(1) 若年で萎縮が進み胃癌を発症した福井の患者から分離された菌株と、萎縮が無く十二指腸潰瘍を有する福井および沖縄の患者から分離された菌株を比較検討した。当科で保存されている若年者胃癌株のうち、プラスミドを有しない FGC241-1 を Tester DNA とし、十二指腸潰瘍株 (F83, OK188, OK134, F90) を Driver DNA として用いる。同様に福井県で分離された十二指腸潰瘍株 (F90) を Tester DNA とし、胃癌株 (FGC13, FGC33, FGC157, FGC241-1) を Driver DNA として用いる。

(2) PCR-based bacterial DNA subtraction

kit (Clontech) のマニュアルに従い、萎縮のない前庭部胃炎から分離された菌株に存在せず、萎縮が若年から進行した菌株に特異的な遺伝子断片 (クローン) を抽出する。また、十二指腸潰瘍株に特異的で胃癌株に認めないクローンも抽出する。

(3) (2) で得られたクローンを TA ベクターに組み込み、electroporesion 法により、大腸菌 (DH5 α) に遺伝子導入し、アンピシリン添加 LB 寒天培地に接種して培養する。得られた個々のコロニーを 96 穴プレート上でアンピシリン添加 LB 液体培地により培養し、PCR でクローン DNA を増幅した後に PCR 産物をナイロン膜にプロットする。Tester DNA および Driver DNA をプローブとして dot blot hybridization (以下 DBH と略す) を行い、体部胃炎を伴う胃癌株あるいは十二指腸潰瘍株に特異的と考えられる候補クローンについて塩基配列を決定し、BLAST で既知の遺伝子と比較する。

(4) 沖縄県で分離された胃癌株由来の DNA (n=34)、十二指腸潰瘍由来の DNA (n=24) をそれぞれナイロン膜にプロットする。(3) で得られた体部胃炎-胃癌株に特異的と思われる候補クローンおよび、前庭部胃炎-十二指腸潰瘍株に特異的と考えられる候補クローンをプローブとして DBH を行い、疾患特異的クローンであるかを検証する。

II. SSH で同定された日本株に特異的な膜蛋白遺伝子の遺伝子解析

(1) 福井県および沖縄県で分離された Hp の DNA を用いて膜蛋白遺伝子 (以下 MPA3 と称す) の DNA シークエンシングを行い、疾患あるいは地域による差を検討し、塩基配列より機能を予測する。まず、この MPA3 に特異的な

primer set を用いて PCR を行なう。また、同時に DBH を用いて沖縄株で MPA3 の保有頻度をチェックする。

(2) 疾患および地域を考慮して 18 株を選んで MPA3 の塩基配列を決定する。解析は GENETYX を用いて塩基配列およびアミノ酸配列のホモロジーをみる。同時に樹形図を作成して株間の関係を検討する。

4. 研究成果

I. SSH を用いた体部胃炎、疾患特異的な遺伝子の同定

(1) 疾患特異的候補クローンの同定と DNA シークエンシング

FGC241-1 および F90 を Tester DNA とし、胃癌株 4 株、十二指腸潰瘍株 4 株をそれぞれ Driver DNA として SSH を行なった。それぞれ 96 個の候補クローンを抽出し、Tester および Driver DNA をプローブとして DBH を行なったところ、FGC241-1 に特異的と考えられるクローンとして 7 個(183-1346bp)、F90 に特異的と考えられるクローンとして 4 個(224-535bp)を選び、DNA シークエンシングを行なった。11 個のクローンのうち 5 個は制限修飾酵素に相同性があった。他に機能未知の遺伝子や integrase、DsbC-like protein、msrA などに相同性を有するクローンも認めた。

(2) 得られたクローンの疾患特異性の検証

11 個のクローンのうち、4 個の疾患特異的遺伝子候補について、沖縄県で分離された十二指腸潰瘍株(DU 株)24 株、胃癌株(GC 株)34 株における各クローンの頻度を DBH および PCR を用いて検討した。GC 株(FGC241-1)に特異的と考えられた 3 個のクローンはいずれも DU 株と GC 株の間で有意差は認めなかったが、

制限酵素に相同性を有するクローンのひとつは GC 株に頻度が高い傾向があった。DU 株(F90)に特異的と考えられた制限酵素に相同性を有するクローンは DU 株に有意に頻度が高かった。(DU 株 15/24, GC 11/34, $p < 0.05$)

II. 日本株に特異的な膜遺伝子 (MPA3) の解析

(1) スペイン株でほとんど認めず、日本株で頻度の高い新規膜蛋白遺伝子 MPA3 について、臨床株を用いて塩基配列を決定し、比較検討した。

MPA3 に特異的な primer set は多くの日本株でバンドが認められたが、欧米株もしくは、沖縄株で欧米型の cagA を有するのほとんどはバンドが認められなかった。既知の遺伝子と塩基配列大きく異なる 5' 領域について DNA シークエンシングを行った。その領域ではほとんどの日本株間では相同性が高かったが、日本株と欧米株では、同領域でほとんど相同性をもたないことがわかった。また日本株のその領域にはアデニンが 7 ~ 12 個連続する polyA が認められた。それによって多くの菌株は off の状態になっていた。

(2) 塩基配列を元にアミノ酸配列を比較すると沖縄と福井で差はなく、疾患による差もなかったが、F32 や F57 といった胃癌由来の菌株ではアミノ酸配列がその他の株と比較して一部異なることがわかった。

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)

1. Suto H, Yamazaki Y, Yoshida I, Yamakawa A, Ohtani M, Ito Y, Kuriyama M, Kato T,

Azuma T. The effects of *Helicobacter pylori* eradication on body mass index and dyspeptic symptoms. *Digestion* 79(4): 235-42, 2009

[学会発表] (計 5件)

1. 伊藤義幸, 松田秀岳, 大野崇, 松永心祐, 熊本倫子, 青木創吾, 大谷昌弘, 須藤弘之, 山崎幸直. DNAサブトラクション法を用いた*Helicobacter pylori*の疾患特異的遺伝子同定の試み. 第6回日本消化管学会総会学術集会 2010, 2 福岡

2. 松田秀岳, 伊藤義幸, 大野崇, 大谷昌弘, 李相植, 根本朋幸, 須藤弘之, 山崎幸直, 慶田喜秀. DNA sequencingによる*H.pylori dupA*遺伝子の解析. 第51回日本消化器病学会大会 2009, 10 京都

3. Matsuda H., Ito Y, Ohno T, Matsunaga S, Ohtani M, Lee S, Nemoto T, Suto H, Yamazaki Y, Keida Y. Genetic Diversity in *dupA* Region of *H. pylori*. XX nd International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation, Porto (Protugal) 2009, 9

4. 松田秀岳, 伊藤義幸, 高橋和人, 内藤達志, 森瀬涼子, 大野崇, 里見聡子, 大谷昌弘, 李相植, 根本朋幸, 須藤弘之, 山崎幸直. 日本において*Helicobacter pylori dupA*遺伝子は疾患に特異的なマーカーとなりうるか. 第95回日本消化器病学会総会 2009, 5 札幌

5. Ito Y, Inagaki T, Yamakawa A, Satomi S, Matsuda H, Ohno T, Masaki R, Ohtani M, Lee S, Suto H, Yamazaki Y, Keida Y. *Helicobacter pylori vacA*

i-region genotype is associated with an increased risk of gastric cancer, vacuolating cytotoxin activity, and *cagA* status in Okinawa, Japan. *Digestive Disease Week 2008, San Diego (USA) 2008, 5*

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 義幸 (ITO YOSHIYUKI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60313748

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし