様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年４月４日現在

機関番号：１７５０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：２１７９０９６１
研究課題名（和文）　ピロリ菌毒性因子の分子疫学的研究　ベトナムに特異的な遺伝型の同定と解析
研究課題名（英文）　Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolates from Vietnam

研究代表者　黒田 明子（Kuroda Akiko）
大分大学・医学部・助教
研究者番号：１０５０８８５７

研究成果の概要（和文）：胃癌発症においてピロリ菌感染は重要である。今回の研究ではベトナムで採取したピロリ菌からいくつかの病原因子を解析することを目的とした。103 例のサンプルを採取し、CagA、VacA の遺伝子型を解析した。CagA タンパク質は C 末側に Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala(EPIYA)の複数回の繰り返しからなる特徴的な配列を有しており、EPIYA 配列上流の欠失パターンから 3 つのタイプがあることが判明した。cagA 遺伝子に関しては、ベトナム株の 77%において、EPIYA ドメインの約 300bp 上流(pre-EPIYA)において 18bp の欠失が存在することを発見した。また vacA 遺伝子についても東アジアに多い遺伝型(m1 型)と西欧に多い遺伝型(m2 型)が異なることが知られているが、m1 型が胃癌発症率の多いハノイ市(北部ベトナム)で多いことがわかった。

研究成果の概要（英文）：*Helicobacter pylori* is recognized to play a causative role in the pathogenesis of gastric cancer. The aim of this study was to investigate several genetic factors regarded as virulence or molecular epidemiologic markers in *H. pylori* isolates from Vietnamese subjects. The *cagA*, *vacA* and *cag* right-end junction genotypes of 103 *H. pylori* strains from Vietnam were determined by PCR and sequencing. Three types of deletion in the region located upstream of the *cagA* Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) repeat region were identified: the 39-bp deletion type, the 18-bp deletion type, and the no-deletion type. The majority of strains studied (77%; 80/103) had the 18-bp deletion. The *vacA* m1 genotype was significantly more common in strains isolated in Hanoi, where the incidence of gastric cancer is higher, than in strains from Ho Chi Minh.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	1,700,000	510,000	2,210,000
２０１０年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学
キーワード：H.pylori、胃癌、cagA 遺伝子、vacA 遺伝子、DNA 解析

１．研究開始当初の背景

胃癌発症においてピロリ菌感染は重要な位置を占めており、ピロリ菌の病原因子のなかでも CagA タンパク質は、毒性を決める重要な因子である。CagA タンパク質は C 末側に Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala(EPIYA)の複数回の繰り返しからなる EPIYA 配列を有しており、その構造的な特徴から日本、韓国、中国で頻度高く検出される東アジア型 CagA と、欧米諸国で検出される欧米型 CagA とに大きく分類される。両者は構造的に異なっているのみならず機能的に異なっており、東アジア型 CagA は欧米型 CagA と比較して胃上皮細胞により深刻なダメージを与えることが in vivo, in vitro の解析から明らかになっている。アジアは胃癌発症の頻度が高いことが知られているが、とりわけ日本、中国、韓国等の東アジアでは胃癌発症率が高く、東南アジアでは胃癌発症率は低い。興味深いことに、胃癌発症頻度の高い国では東アジア型 CagA を有するピロリ菌が高頻度に検出されており、東アジア型 CagA と胃癌発症は深く関係していると考えられている。しかしながら、同じ東アジア型 CagA を持つピロリ菌が蔓延している日本とベトナムでは、胃癌発症率に大きな差があり、東アジア型 CagA の発癌性は一様でない可能性が示唆される。cagA 遺伝子に関しては、北部ベトナムも南部ベトナムも大部分（94/98 strains）が東アジア型であることが明らかにした。さらに、ベトナム株の 77%において欧米型と比較して、EPIYA ドメインの約 300bp 上流(pre-EPIYA)において 18bp の欠失が存在することを初めて発見した。さらに私は、GenBank（データベース）を詳細に解析して、ベトナム以外の東アジア諸国（日本、中国、韓国）から採取されたピロリ菌では、pre-EPIYA 領域において 39 bp の欠失が存在することを発見した。

２．研究の目的

これらの欠失はアジアのピロリ菌に特異的なものであり、欧米で採取されたピロリ菌ではこのような欠失は見られないことから、pre-EPIYA 領域の構造の違いによりベトナム型、東アジア型、ならびに欧米型の 3 つに分類できることが判明した。これらの遺伝子型は全て read-through されることから、コードされる蛋白質の機能の違いがあることが推測される。疫学的に胃癌発症頻度との違いとよくオーバーラップしており、欠失の違いによる CagA 蛋白質の機能の違いは胃癌発症と関連している可能性があると考えた。

また同様に vacA 遺伝子についても東アジアに多い遺伝型(m1 型)と西欧に多い遺伝型(m2 型)が異なることが知られている。しかし、これらの遺伝型は互いに相関しており、しかも地域間を比較するためには、塩分摂取量を含む食習慣、人種間の差などの他要因の介在が大きく、各遺伝型のどれがより病態と関連するかを疫学的に証明することは困難であった。ベトナムは人種的には地域差が少なくほぼ均等であり、また食習慣を含む文化的にも地域差が少ない国である。一方で、ベトナムの胃癌発生頻度には地域差が見られ北部ベトナムでは胃癌発生率、死亡率ともに高く、南部ベトナムでは低い。したがって、ベトナムを広く疫学調査し、ピロリ菌の遺伝型を詳細に解析して地域間における違いを比較検討すれば、個々の毒素因子の病態との関連性を疫学的に検証できると考えた。

３．研究の方法

(1)ベトナムのピロリ菌遺伝子のタイピング

① ピロリ菌の培養と DNA 抽出

北部ベトナムのハノイ市、南部ベトナムのホーチミン市から得た計 103 検体のピロリ菌を血液寒天培地を用いて培養し、CTAB 法により DNA を抽出する。

② ピロリ菌の遺伝子解析

(a)*cagA* pre-EPIYA region の遺伝子タイピング

cagA 遺伝子の EPIYA 領域と、その約 300bp 上流にある pre-EPIYA 領域を含む約 1100bp からなる断片を 2 種類の primer（2059f(forward), 3156r(reverse)）を用いて PCR により増殖させる。その後、ABI Prism310 Genetic Analyzer によりシークエンスを行い、18bp deletion, 39bp deletion, no-deletion の 3 種類の遺伝子配列を決定する。

(b) *vacA* 遺伝子タイピング

vacA 遺伝子は signal region と middle region の構造の違いで s1/s2, m1/m2 に分類される。*vacA*-s1 type は、2 種類の primer(VA1-F(forward), VA1-R (reverese)) を用い、*vacA*-s2 type は、2 種類の primer(SS2-F(forward), VA1-R (reverese)) を用いて PCR を行う。*vacA*-m type は、2 種類の primer(VAG-F(forward), VAG-R (reverese))を用いて PCR を行う。各々の PCR 産物を電気泳動にかけ、各種タイプを決定する。

(2)各遺伝子とベトナム国内における胃癌発症率の地域差との比較

ベトナムの胃癌発生頻度には地域差が見られ、北部ベトナムに位置するハノイでは胃癌発生率、死亡率ともに高く、南部ベトナムに位置するホーチミンでは低い。*cagA* pre-EPIYA region (18bp deltion, 39bp deletion, no-deletion), *vacA* region(s1/s2, m1/m2)のそれぞれについて、ハノイ、ホーチミンの 2 都市の分布を示し、疾病との関連性について検討する。

(3)解析した遺伝子タイピングと組織学的相関解析

103 例全例の前庭部 1 ヶ所、体部 2 ヶ所からの生検検体のそれぞれについて、組織学的に好中球浸潤、単核球浸潤、萎縮、腸上皮化生、感染ピロリの量について 0～3 の 4 段階で Updated Sydney system に基づいて評価を行う。ピロリ菌の各種遺伝子情報と、組織学的な評価との間の相関関係を The Mann-Whitney Rank Sum test を用いて解析する。

４．研究成果

(1)*cagA* pre-EPIYA region の遺伝子タイピング

103 検体のうち、cagA 陽性であった 98 検体について、cagA 遺伝子の EPIYA 領域と、その約 300bp 上流にある pre-EPIYA 領域のシークエンスを行った。ベトナム株のうち、18bp の欠失を持つものは 77%を占め、ハノイ市(76%)とホーチミン市(80%)との地域差はなかった。一方で、39bp の欠失をもつものはわずか 13%であった。今回の研究で、18bp 欠失型をベトナム型、39bp の欠失型を東アジア型と定めた。

(2) *vacA* 遺伝子タイピング

全てのベトナム株は、vacA s1 遺伝子型であった。また、一検体のみ vacA s1 と s2 の両方の遺伝子型を有しており、2 株の混合感染が疑われた。vacA m1 遺伝子型は、ハノイ市(54%)とホーチミン市(31%)で地域差を認めた($p<0.05$)。臨床転帰別にみると、vacA m1 遺伝子型は、消化性潰瘍の検体では 60%、慢性胃炎の検体では 37%で認められ、有意差を認めた(オッズ比 2.59,$p<0.05$)。m 領域の遺伝子型と pre-EPIYA 領域との関連性は認めなかった。

(3)各遺伝子とベトナム国内における胃癌発症率の地域差との比較

今回のベトナム人を対象とした研究では、各 pre-EPIYA 領域のタイプと臨床転帰に関連性は認めなかったが、胃癌発症率が高いハノイ市ではホーチミン市と比較し vacA m1 遺伝子型が有意差をもって多く認めたことより、vacA m1 遺伝子型は胃癌の発症機序に関与している可能性が示唆された。

(4)解析した遺伝子タイピングと組織学的相関解析

胃前庭部において、単球の浸潤スコアが、pre-EPIYA 領域のベトナム型、東アジア型で非常に高く、欧米型と比較し有意差を認めた。同部位の好中球浸潤スコアでは、欧米型で中

等度の浸潤を多く認め、東アジア型と比較し有意差を認めた。vacA m 領域の遺伝子型と組織学的スコアの関連性は認めなかった。また、cagA 遺伝子型と粘膜の萎縮や腸上皮化性の程度にも関連性は認めなかった。

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３件）

① Nguyen LT, Kuroda A, et al. Evaluation of Rapid Urine Test For the Detection of Helicobacter pylori Infection in the Vietnamese Population. Dig Dis Sci, 2010, 55, 89-93
② Nguyen LT, Kuroda A, et al. Helicobacter pylori dupA gene is not associated with clinical outcomes in the Japanese population. Clin Microbiol Infect, 2010, 16, 1264-1269.
③ Uchida T, Kuroda A, et al. Analysis of virulence factors of Helicobacter pylori isolated from a Vietnamese population. BMC microbiology, 2009, 9, 175.

〔学会発表〕（計１件）

① 黒田明子 Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. 第 69 回日本癌学会学術総会

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.oita-u.ac.jp/byori2/index.htm

６．研究組織
(1)研究代表者

黒田　明子（Kuroda Akiko）
大分大学・医学部・助教
研究者番号：１０５０８８５７