

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07898

研究課題名（和文）胃癌と十二指腸潰瘍-ピロリ菌感染の場を起点として解く異なる二つの胃疾患発症機序

研究課題名（英文）Gastric cancer and duodenal ulcer - two different mechanisms of gastric disease onset based on Helicobacter pylori infection

研究代表者

赤田 純子（Akada, Junko）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30346548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌（GC）と十二指腸潰瘍（DU）患者由来ピロリ菌株をゲノムワイド遺伝子関連解析にて比較し、1遺伝子変異（SNP）を選択した前報を元に、本研究ではその1つdsbG遺伝子の実験的評価を行った。DsbGは細菌の遊走能に関与することから、26695株にて遺伝子破壊株、GC型SNP導入株やDU型SNP導入株を作成、各株の遊走能を評価した。dsbG破壊株では遊走能が欠損し、dsbG相補株では回復した。GC-SNP導入株はDU型SNP導入株に対し中性条件下では同等であるが、酸性条件下ではより高い遊走能を示した。他に胃オルガノイド感染実験系確立を進め、GCおよびDU患者血清の抗ピロリ菌IgAの解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の主要な誘導因子はピロリ菌であるが、ピロリ菌感染により誘導される胃疾患は、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、マルトリンパ腫、腸上皮化生、胃癌と多様である。内視鏡的観察や病理組織診断により、萎縮性胃炎から腸上皮化生を経て胃癌に至ると推定されており、また十二指腸潰瘍患者が後に胃癌が発生することはまれであることも指摘されてきた。我々はこの対照的な二つの胃疾患に関連するピロリ菌因子をゲノム解析から見出してきた。本研究では、胃癌発症に関与するこれら細菌因子を実験的に評価し、作用機序に関与する宿主因子や環境因子を見出し、そこから新しい胃癌予防や治療戦略につなげる道を開いてゆく。

研究成果の概要（英文）：Helicobacter pylori strains derived from gastric cancer (GC) and duodenal ulcer (DU), were compared using genome-wide gene association analysis, and 11 genes with single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified. Based on the previous report, this study focused on one of them, the dsbG gene and conducted an experimental evaluation. Since DsbG is involved in the motility of bacteria, we created a gene-knockout strain of standard strain 26695, GC-type-SNP or DU-type-SNP complemented strains, and evaluated the motility of each strain. The dsbG-knockout strain lacks motility, however, the gene-complemented strain recovers it. Moreover, the GC-type-SNP introduced strain is equivalent to the DU-type-SNP introduced strain under neutral conditions, but shows higher motility under acidic conditions. We proceeded with the establishment of a gastric organoid infection experimental system. We are also processing with the anti-H. pylori IgA analysis using GC- and DU-patient serum samples.

研究分野：分子疫学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 胃癌 十二指腸潰瘍 GWAS解析 遊走能 胃オルガノイド IgA

1. 研究開始当初の背景

近年、内視鏡検査技術と内視鏡手術法の進歩により、我が国や韓国における胃癌は早期発見・早期治療への道筋がつけられてきた。しかし、東アジアの胃癌年齢調整死亡率は 10 万人当たり 9.2 人と世界平均の 4.6 人に対し未だ 2 倍 (Globocan2022) と、東アジア全体を考えると胃癌死の低減へは道半ばである。胃癌の年間発症数及び死亡数は世界の 71% および 70% がアジアであるが、アフリカ諸国では他の感染症が優勢であるがために、過小評価されている可能性が指摘されている。

胃癌の主要な誘導因子は、*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) である。小児期より胃に持続感染し、典型的には壮年期から老年期に発症する感染発癌であることが明らかとなってきた。ピロリ菌は胃癌の他にも、様々な胃十二指腸関連疾患に関与する。初期感染時、ピロリ菌は胃幽門部に慢性感染を確立しほぼ 100% 胃炎を誘導するが、そこから生涯胃炎のみである人の他に、十二指腸潰瘍、胃潰瘍、分化型胃癌、未分化型胃癌、胃マルトリンパ腫と、多様な胃十二指腸疾患を発症させる。その要因については未だ十分に解明されていない。詳細な内視鏡学的および組織学的解析から、分化型胃癌は、体部萎縮性胃炎から腸上皮化生を発生母地として形成されるに対し、十二指腸潰瘍は幽門部胃炎を伴い、時に十二指腸に胃上皮化生が形成されるなど、対照的な疾患であり、十二指腸潰瘍患者からは胃癌は発症しにくいと考えられている。

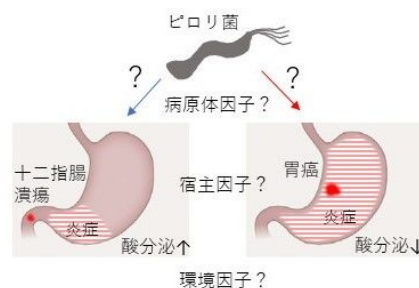


図1. ピロリ菌はどのようにして十二指腸潰瘍や胃癌という対照的な胃疾患を誘導するのか。

ピロリ菌は胃で慢性感染を成立後、どのように十二指腸潰瘍や胃癌といった対照的な胃疾患を誘導するのだろうか (図 1)。ピロリ菌因子を起点として、二つの異なる疾患が誘導されるのだろうか。それとも疾患誘導には、宿主因子や環境因子が決定的な役割を果たすのだろうか。

所属する研究室ではこれまでに、世界各地のピロリ菌株を分離培養し、精力的に全ゲノム解析が進めてきたが、この遺伝子情報を活かし、胃癌多発地域である東アジアから、125 胃癌株と 115 十二指腸株、合計 240 東アジア型ピロリ菌株 (日本株 137 株、ベトナム株 87 株を含む) を用いて、ゲノムワイド遺伝子関連 (GWAS) 解析を行い、2 疾患で有意に異なる 1 塩基多型 (SNP) を保有する 11 遺伝子と 3 遺伝子上流領域が抽出された (Tuan ら 2021)。この結果を基に、本研究では病原体因子からの解析を進める。11 遺伝子の機能は、病原因子、酸耐性、鉄獲得、運動性、蛋白質間相互作用、分子シャペロン、免疫攪乱、細胞膜蛋白質 (重複あり、推定も含む) など多岐にわたるが、いずれも胃癌発症に関してカギとなる機能を持ち、SNP 変異は何らかの形でそれを増強する変異であると推測される。

2. 研究の目的

十二指腸潰瘍および胃癌発症に関与するピロリ菌病原体因子の作用機序と、関連する宿主因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1). GWAS 解析から抽出した候補遺伝子改変株作成と機能解析

GWAS 解析で得られた 11 遺伝子のうちのひとつ、*dsbG* 遺伝子をモデル遺伝子として、遺伝子破壊株を作成後、胃癌および十二指腸潰瘍特異的 SNP を導入した *dsbG* 遺伝子相補株を作成した。遺伝子改変株は、表現型をまず細菌レベルで検証した。

遺伝子組換え株の作成 親株として 26695 株を用いた。PCR を活用して *dsbG* 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子に挿げ替えた遺伝子欠損融合 DNA を作製後、2669 株に自然形質転換

し、カナマイシン含有培地にて遺伝子欠損株を選択した。また、疾患特異的 SNP を有し遺伝的に近いペア株である胃癌株と十二指腸株、CHN91 と DU25(ベトナム人ペア株)、JP0037 と JP0123(日本人ペア株)の *dsbG* 遺伝子を増幅した。胃癌特異的 SNP、および十二指腸潰瘍特異的 SNP を含む *dsbG* 遺伝子も融合 PCR により作製した。それぞれの *dsbG* 遺伝子を遺伝子欠損株に再導入するため、クロラムフェニコール耐性遺伝子を含む相補用融合 DNA を作製し、クロラムフェニコール含有培地にて遺伝子相補株を選択した。

細菌学的特徴～中性および酸性条件下で遺伝子発現と表現型 変異株について野生株と共に、遊走性の比較検討を行った。細胞遊走試験は、0.45%軟寒天培地にて行った。遊走性は中性と酸性の両条件下にてモニターするため、12.5mM (pH 7.0)または MES (pH 5.5)を添加した培地を使用した。

(2) . 胃オルガノイド感染解析系の構築

大分大学にて正常者胃幽門部および体部から作出した3次元胃オルガノイドを安定的に培養した後、細胞を1度分離しトランスウエルを用いて2次元培養を行なった。

(3) . 血清試料解析

ベトナム人胃癌患者血清 169 試料、十二指腸患者血清 83 試料、胃炎患者血清 183 試料を用いた。抗原蛋白質として日本人胃炎患者由来ピロリ菌 KY 1 株細胞抽出液を作成した。ELISA プレートに抗原蛋白質 1 晩固定化し、ELISA 法の条件検討を行い、抗ピロリ菌 IgG、IgM および IgA を同時に測定した。

4 . 研究成果

(1) . GWAS 解析から抽出した候補遺伝子改変株作成と機能解析

親株、*dsbG* 遺伝子欠損株、*dsbG*²⁶⁶⁹⁵ 相補株、*dsbG*^{CHN91} 相補株、*dsbG*^{DU25} 相補株を用いて、軟寒天培地で遊走試験を行ったところ、既報の通り *dsbG* 遺伝子欠損株は運動性が低下した、*dsbG*^{CHN91} および *dsbG*^{DU25} 相補株は同程度に運動性を回復した。中性及び酸性軟寒天培地を作成し遊走試験を行ったところ、pH 7 で相違は認められなかった一方で、pH 5.5 では *dsbG*^{CHN91} 相補株は *dsbG*^{DU25} 相補株よりも遊走能が高かった。さらに、GC 型 SNP や DU 型 SNP を融合 PCR にて作製し、*dsbG* 遺伝子欠損株に導入して相補株を作成した。pH 7 で相違は認められなかったが、pH 5.5 では、GC 型 SNP *dsbG* 相補株は DU 型 SNP *dsbG* 相補株よりも遊走能が高かった。以上の結果から、胃癌株 *dsbG* 特異的 SNP が、より酸性度の高い胃体部への遊走と定着に参与している可能性がある。現在論文執筆中であるため、詳細は今年度中に改めて報告する。

(2) . 胃オルガノイド感染解析系の構築

機能解析には、胃上皮系培養細胞と共に、胃オルガノイドを将来的には活用する予定である。正常者胃幽門部および体部から作出した3次元胃オルガノイドを安定的に培養した後、胃オルガノイド細胞はキャピラリーを用いたピペティングにより、物理的に分離した。その細胞群をマトリゲル添加トランスウエル上にシードして、2次元培養を行なった。この2次元胃オルガノイドをピロリ菌感染プラットフォームとするため、培養条件検討を行った。今年度中に改めて報告する。

(3) . 血清試料解析

研究室では、海外ピロリ菌調査時に採取した胃生検より分離したピロリ菌株と、同一患者由来の血清および組織試料を保存している。また、ピロリ菌抗体データ、組織炎症及び免疫細胞の浸潤等のスコア化データも蓄積して保存している。これらを活用し、新たにラテックス法によるピロリ菌血清抗体測定を行った際に、ベトナム人患者試料において、十二指腸潰瘍患者群では血清抗体かが高く、胃癌患者群では低かった。一方で、市販の抗ピロリ菌抗体 ELISA キットを用いた解析では両患者群に違いがなかった。二つの検査方法による抗体価の違いを理解するために、研究

室で ELISA 法による抗ピロリ菌 IgG および IgA 抗体の測定方法を作成し、現在解析中である。
詳細は今年度中に改めて報告する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tuan VP, Yahara K, Dung HDQ, Binh TT, Huu Tung P, Tri TD, Thuan NPM, Khien VV, Trang TTH, Phuc BH, Tshibangu-Kabamba E, Matsumoto T, Akada J, Suzuki R, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Yano H, Fukuyo M, Takahashi N, Kato M, Nishiumi S, Azuma T, Ogura Y, Hayashi T, Toyoda A, Kobayashi I, Yamaoka Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Genome-wide association study of gastric cancer- and duodenal ulcer-derived Helicobacter pylori strains reveals discriminatory genetic variations and novel oncoprotein candidates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mgen.0.000680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Akada J, Tshibangu-Kabamba E, Tuan VP, Kurogi S, Matsuo Y, Ansari S, Doohan D, Phuc BH, Subsomwong P, Waskito LA, Binh TT, Nguyen LT, Khien VV, Dung HDQ, Miftahussurur M, Syam AF, Tshering L, Vilaichone RK, Mahachai V, Ratanachu-Ek T, Shrestha PK, Yee TT, Htet K, Aftab H, Matsuhisa T, Uchida T, Okimoto T, et. al.	4. 巻 36
2. 論文標題 Serum Helicobacter pylori antibody reactivity in seven Asian countries using an automated latex aggregation turbidity assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 2198-2209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15467	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
1. 著者名 Suzuki R, Saitou N, Matsuari O, Shiota S, Matsumoto T, Akada J, Kinjo N, Kinjo F, Teruya K, Shimoji M, Shiroma A, Kato M, Satou K, Hirano T, Asaka M, Kryukov K, Moodley Y, Yamaoka Y	4. 巻 25
2. 論文標題 Helicobacter pylori genomes reveal Paleolithic human migration to the east end of Asia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 友成航平, Batsaikhan S, Alfaray, RI, Fauzia KA, 松成修, 赤田純子, 松本昂, 珍田大輔, 下山克, 金城渚, 金城徹, 金城福則, 山岡吉生	4. 巻 29
2. 論文標題 日本国内より分離されたHelicobacter pylori の集団構造解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 大分県医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 100-108
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

1. 著者名 Phuc BH, Tuan VP, Binh TT, Huu Tung P, Tri TD, Dong HDQ, Thuan NPM, Fauzia KA, Tshibangu-Kabamba E, Alfaray RI, Saruuljavkhlán B, Matsumoto T., Akada J, Yamaoka Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparative genomics of two Vietnamese Helicobacter pylori strains, CHC155 from a non-cardia gastric cancer patient and VN1291 from a duodenal ulcer patient	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-35527-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saruuljavkhlán B, Alfaray RI, Oyuntsetseg K, Gantuya B, Khangai A, Renchinsengee N, Matsumoto T, Akada J, Azzaya D, Davaadorj D, Yamaoka Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Study of Helicobacter pylori Isolated from a High-Gastric-Cancer-Risk Population: Unveiling the Comprehensive Analysis of Virulence-Associated Genes including Secretion Systems, and Genome-Wide Association Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15184528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Thorell K, Munoz-Ramirez ZY, Wang D, Sandoval-Motta S, Boscolo Agostini R, Ghirotto S, Torres RC; HpGP Research Network; Falush D, Camargo MC, Rabkin CS.	4. 巻 14
2. 論文標題 The Helicobacter pylori Genome Project: insights into H. pylori population structure from analysis of a worldwide collection of complete genomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 8184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-43562-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Khangai A, Akada J, Saruuljavkhlán B, Gantuya B, Azzaya D, Oyuntsetseg K, Davaadorj D, Uchida T, Matsumoto T, Yamaoka Y	4. 巻 18
2. 論文標題 Utilization of an Automated Latex Agglutination Turbidity Assay for Assessing Gastric Mucosal Alteration during Helicobacter pylori Infection	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Gut and Liver	6. 最初と最後の頁 60-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5009/gnl220464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 赤田 純子
2. 発表標題 胃癌特異的一塩基多型を有するピロリ菌dsbG遺伝子の比較解析
3. 学会等名 第7回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Batsaikhan S, Alfaray RI, Matsumoto T, Akada J, Yamaoka Y.
2. 発表標題 Identification of the Helicobacter pylori genomic islands in a high gastric cancer region.
3. 学会等名 The 18th Japan-Korea H. pylori Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Cimuanga-Mukanya A, Tshibangu-Kabamba E, Ngoma-Kisoko PdeJ , Disashi-Tumba G, Matsumoto T, Akada J and Yamaoka Y
2. 発表標題 Amoxicillin resistance in Helicobacter pylori: Identification of new resistance-conferring mutations in the penicillinbinding protein 1A
3. 学会等名 The 19th Korea-Japan H. pylori Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Khangai A, Akada J, Azzaya D, Batsaikhan S, Gantuya B, Oyuntsetseg K, Davaadaorj D, Matsumoto T, Uchida T, Akada J, and Yamaoka Y.
2. 発表標題 Utilization of an Automated Latex Agglutination Turbidity Assay for Assessing Gastric Mucosal Alteration during Helicobacter pylori Infection
3. 学会等名 The 19th Korea-Japan H. pylori Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Saruuljavkhlan B, Gantuya B, Alfaray RI, Akada J, Matsumoto T, Tsukamoto Y, Oyuntsetseg K, Yamaoka Y
2. 発表標題 Entrococcus Hirae Attenuates chemokine and Induces Dna Damage In Gastric Epithelial Cell
3. 学会等名 DDW USA (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Alfaray RI, Miftahussurur M, Saruuljavkhlan B, Fauzia KA, Utomo, DH, Akada J, Matsumoto T, Yamaoka Y
2. 発表標題 Investigation of Low-Grade Intestinal Metaplasia From Clinical Dyspepsia Patients INA Country With Low-Incidence of Gastric Cancer: From Human to Helicobacter pylori Perspective
3. 学会等名 DDW USA (国際学会)
4. 発表年 2023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	山岡 吉生 (Yamaoka Yoshio) (00544248)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	松本 昂 (Matsumoto Takashi) (50609667)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	塚本 善之 (Tsukamoto Yoshiyuki) (00433053)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	村上 和成 (Murakami Kazunari) (00239485)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ベトナム	Cho Ray Hospital	108 Military Central Hospital		
モンゴル	Mongolian National Univ. of Med. Sci.			
インドネシア	Universitas Airlangga			
コンゴ民主共和国	University of Mbuji			