

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790136

研究課題名（和文）

ヘリコバクターハイルマニ菌の病原性遺伝子を基にした感染診断方法の確立

研究課題名（英文）

Diagnostic method of *Helicobacter heilmannii* infection based on genetic analysis

研究代表

三木 生也（IKUYA MIKI）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30420467

研究成果の概要（和文）：ヘリコバクターハイルマニ菌はマウスモデルならびにヒトにおいて胃マルト型リンパ腫との関連性が示唆されているが、感染診断法は確立されていない。そこで本研究ではハイルマニ菌の病原性遺伝子をピロリ菌と比較解析することにより、胃粘膜組織を用いた遺伝子診断法を確立した。さらに病原性遺伝子を基にした組み換えタンパク質を作成し、それを基にした抗体を作成することに成功した。これを基に血清を用いた感染診断を試みたが、ピロリ菌との交差反応を呈したため、さらなる病原性遺伝子を基に研究を継続している。

研究成果の概要（英文）：*Helicobacter heilmannii* infection is possibly associated with gastric MALT lymphoma in mice model and human, and however, its diagnostic method has not been established yet. In this study, we succeed in the diagnosis of its infection with gastric mucosa by analyzing pathogenic genes of *H. pylori* and *H. heilmannii*. In the next step, we tried to establish the serodiagnosis using monoclonal antibody, but our antibody showed cross-reactivity. Therefore, we are going on analyzing the other virulent genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	2,100,000 円	630,000 円	2,730,000 円
2011 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ヘリコバクターハイルマニ ウレアーゼ

1. 研究開始当初の背景
ヘリコバクターピロリ菌は胃炎、胃十二指腸

潰瘍だけでなく、胃 MALT 型リンパ腫の原因

として知られているが、他のヘリコバクター属細菌、中でもハイルマニ菌は胃 MALT 型リンパ腫との関連性が強く示唆されているにも関わらず、ヒトにおける感染実態、病原性遺伝子に関してはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

新規治療法の開発ならびに疾病予防へつなげるための礎として、ハイルマニ菌の病原性遺伝子をピロリ菌と比較解析し、その結果を基にした感染診断法を確立し、ヒトにおける感染サーベイランスを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ブタの顆粒状変化を伴う胃粘膜において、形態学的にハイルマニ菌と考えられる細菌を確認し、胃粘膜ホモジネート液として抽出。既報のヘリコバクター・ハイルマニ菌の16SrRNA、ウレアーゼ遺伝子配列の比較解析を基にハイルマニ菌特異的PCRプライマーを作成し、感染診断を試みた。

(2) ウレアーゼ遺伝子解析を基にして、組み換えタンパク質を作成・精製し、これを抗原として、ラットに免疫することで、ハイルマニに対するモノクローナル抗体を作成した。

(3) モノクローナル抗体を基に、血清を用いた感染診断が可能かどうかを解析した。

4. 研究成果

(1) ハイルマニ菌特異的PCRプライマーを用いて、ハイルマニ感染マウス、ピロリ菌感染マウス、非感染マウスの胃粘膜組織を用いた感染診断を行ったところ、ハイルマニ感染を診断できることが証明された。このことより、食肉用として流通しているブタの胃粘膜には、ヘリコバクターハイルマニ菌が存在することが確認され、ヒトにおける感染の既報と考え併せ、日本においても人畜共通感染症になり得ることを支持する結果であった。

(2) 保有しているハイルマニ菌のウレアーゼ

遺伝子のゲノムシーケンスを行い、ウレアーゼ遺伝子A/Bを基に、ヘリコバクター属細菌との比較解析を行ったところ、*H. pylori*とは70%、*H. felis*と86%、*H. bizzozeronii*と86%、*H. salomonis*と85%、*H. suis*とは99.5%以上の相同性を認め、ブタより抽出した保有細菌は、ヘリコバクター・ハイルマニ菌タイプ1とされてきた*H. suis*と考えられた。さらにウレアーゼ遺伝子のクローニング結果を基に、組み換えタンパクの作成を行い、PCR結果をゴールデンスタンダードとして、血清を用いたbacterial antigen based ELISAを構築し検討したところ、感染診断に有効であると考えられた。

(3) ヘリコバクターハイルマニのウレアーゼ遺伝子のクローニングを基に組み換えタンパク質の作成に成功した。それをラットに免疫することで、モノクローナル抗体を作成し、マウス血清を用いた感染診断を試みたところ、ピロリ陰性・ハイルマニ陽性マウスでは感染診断が可能であったが、ピロリ陽性の場合でも陽性判定となることが判明し、作成した抗体はハイルマニ菌とピロリ菌と交差反応を示すことが示唆された。そこで、ピロリ菌の遺伝子配列からハイルマニ菌の病原性遺伝子の配列を推測し、新たな遺伝子配列を基にした組み換えタンパクの作成に取り組み、ピロリ菌の *virB10* 遺伝子をはじめとするいくつかの遺伝子に相当する遺伝子のクローニングに成功しており、配列の相違部分の解析を基に新たな組み換えタンパクの作成、モノクローナル抗体の作成を継続中であり、これらによって、血清を用いた感染診断の確立を目指して解析を継続中である。

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. Ben Suleiman Y, Yoshida M, Nishiumi S, Tanaka H, Mimura T, Nobutani K, Yamamoto

K, Takenaka M, Aoganghua A, Miki I, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Blumberg RS, Azuma T. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium regulates bacterial infection in mice. Mucosal Immunol. 2012 ;5:87-98.

2. Mimura T, Yoshida M, Nishiumi S, Tanaka H, Nobutani K, Takenaka M, Suleiman YB, Yamamoto K, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Miki I, Azuma T. IFN- γ plays an essential role in the pathogenesis of gastric lymphoid follicles formation caused by Helicobacter suis infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011; 63, 25-34

3. Yamamoto K, Tanaka H, Nishitani Y, Nishiumi S, Miki I, Takenaka M, Nobutani K, Mimura T, Ben Suleiman Y, Mizuno S, Kawai M, Uchiyama I, Yoshida M, Azuma T. Helicobacter suis KB1 derived from pig gastric lymphoid follicles induces the formation of gastric lymphoid follicles in mice through the activation of B cells and CD4 positive cells. Microbes Infect. 2011;13:697-708.

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 生也 (MIKI IKUYA)
神戸薬科大学 薬学部 講師
研究者番号 : 30420467

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし