

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305027

研究課題名(和文) アジア圏におけるヘリコバクター属細菌感染及びその関連消化器疾患予防対策調査研究

研究課題名(英文) Management of Helicobacter infection and its related gastrointestinal diseases in Asia

研究代表者

東 健 (AZUMA, Takeshi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60221040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：東アジア型のCagAを有するピロリ菌感染の頻度が、胃がん死亡率との相関が認められた。また、全ゲノム遺伝子解析により、ピロリ菌は、西アフリカ型とヨーロッパ型が分かれ、さらにそこからアメリンド型と東アジア型の祖先が分かれることが示された。ゲノムの違いを調べると、東アジア株はヨーロッパ株と、病原因子、外膜蛋白質遺伝子に大きな違いが認められた。このような違いが宿主との相互作用に違いが生じると考えられた。一方、スイス菌感染により、胃リンパ濾胞形成が認められた。スイス菌感染によるリンパ濾胞形成にはNF- κ B2を介したCXCL13産生亢進が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori CagA protein is considered to be one of the virulence factors associated with gastric cancer. Two major subtypes of CagA have been observed, the Western and East Asian types. The prevalence of the East Asian CagA-positive strain is associated with the mortality rate of gastric cancer in Asia. A phylogenetic tree of concatenated well-defined core genes supported divergence of the East Asian lineage from the European lineage ancestor, and then from the Amerind lineage ancestor. Greater divergence was observed in the genes of outer membrane proteins and lipopolysaccharide synthesis. Helicobacter suis infects the stomachs of both animals and humans, and can induce gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. CXCL13 was highly expressed in the Helicobacter-infected mice and gastric MALT lymphoma patients. CXCL13 neutralization interfered with the formation of gastric lymphoid follicles.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヘリコバクターピロリ菌 ヘリコバクタースイス菌 胃がん 胃マルトリンパ腫

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌は大きさ 1.0~4.0 μm のグラム陰性らせん状菌で、ヒトの胃内に特異的に生息する。ピロリ菌感染は、全世界で人口の約 50% に認める最も感染率の高い慢性感染症であり、慢性胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、胃 MALT リンパ腫等多くの消化器疾患に関与している。「どうしてピロリ菌という単独の細菌感染により、病態の異なる多彩な消化器疾患が生じるのか？」一方、アジア諸国はピロリ菌感染率が一律高いにもかかわらず、ピロリ菌感染関連疾患の種類や頻度は各国により大きく異なっている。ピロリ菌感染は胃癌に関与し、ピロリ菌は 1994 年に世界保健機構より 1 群の発がん因子に認定されている。しかし、疫学的研究によるピロリ菌感染の胃癌発症オッズ比は、約 2~23 と国や地域により大きく異なる。日本、韓国、中国では胃癌の発症が極めて高いが、東南アジアでは極めて低い。また、消化性潰瘍の中で、胃潰瘍の頻度は日本、韓国、中国北東部で高く、中国南部、タイでは十二指腸潰瘍の頻度の方が高い。「どうしてピロリ菌感染関連消化器疾患の発症率がアジア諸国において異なるのか？」このピロリ菌感染の病態の民族差、「謎」、”Ethnical enigma”を明らかにすることが、ピロリ菌感染の病態解明につながると考えられる。ピロリ菌感染におけるこれら疾患の多様性に、ピロリ菌のゲノム多型が関与している。高い形質転換率を持ち外因性の DNA が導入されやすいピロリ菌には、遺伝子多型が極めて多いことが明らかにされ、菌株における疾患特異性が解析されてきている。1997 年にはイギリスの胃炎患者から分離されたピロリ菌標準株 26695 のゲノムの全塩基配列が決定され、全長 1667867 塩基対で 1590 の遺伝子が認められた。次いで、1999 年にはアメリカの十二指腸潰瘍患者から分離された菌株 J99 のゲノムの全塩基配列が決定され、全長 1643831 塩基対で 1495 の遺伝子が認められた。この 2 つの菌株間では、ゲノム構造は似かよったものであったが、6~7% の遺伝子がそれぞれの株に特異的であった。この違いが、胃炎と十二指腸潰瘍という、それぞれの病態の違いに関与していると考えられる。ピロリ菌はヒトの胃粘膜に特異的に接着し、ヒトのこれまでの移動と共に、ピロリ菌も地球上を移動してきたと考えられる。これまで世界各地の菌株の遺伝子解析により、世界中のピロリ菌株は主に 5 つのグループ(2 つのアフリカ株、1 つのアジア株、2 つのヨーロッパ株)に分けられることが報告されている。また、ピロリ菌のゲノムには本来ピロリ菌のものではない外来性の遺伝子群が存在している。これは多くのグラム陰性菌に共通した現象であり、これらの細菌では、この外来性遺伝子群を持つことで病原性を発揮することが認められており、この遺伝子群を病原遺伝子群 (pathogenicity island, PAI) と呼んでいる。ピロリ菌では、

病原因子の一つである細胞空胞化毒素関連蛋白(CagA)の遺伝子 *cagA* がこの PAI 内に位置しており、*cagPAI* と呼ばれている。ピロリ菌の *cagPAI* 内には、4 型分泌装置を構成する遺伝子が存在している。我々は、ピロリ菌が胃粘膜上皮細胞に接着すると、CagA が 4 型分泌装置を介してピロリ菌から上皮細胞内へ注入され、チロシンリン酸化を受け、ヒト上皮細胞のシグナル伝達系を攪乱することを世界で初めて明らかにした。

また、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化された CagA が、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素 SHP-2 と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した。さらに、CagA のチロシンリン酸化部位となるアミノ酸配列 (E-P-I-Y-A) モチーフを同定するとともに、リン酸化チロシン残基を含む CagA の SHP-2 結合配列を明らかにした。この SHP-2 結合配列部位に一致して、CagA に分子多型が認められ、大きく東アジア型と欧米型の 2 つに分けられ、東アジア型の CagA は欧米型の CagA に比べ SHP-2 とより強く結合し、より強い生物活性を発揮することが認められた。したがって、東アジア型の CagA を有するピロリ菌による感染は、病原性が強く細胞障害を強く生じ、胃粘膜萎縮及び胃癌に関与すると考えられた。

一方、近年、ピロリ菌類似細菌のスイス菌が胃 MALT リンパ腫患者から検出され注目されている。この細菌は大きさ 4-10 μm 、らせん状、波長が約 1 μm で 3-8 回のねじれをもつ細菌で、ヒト慢性胃炎患者の 0.2-4.0% から検出されることが報告されている。スイス菌の培養法はこれまで確立されていないため、その感染診断は、組織切片中の大型のらせん状形態を示す細菌の存在をもとに行われている。近年、胃 MALT リンパ腫患者から分離されたスイス菌をマウスに感染させることにより短期間で胃 MALT リンパ腫を誘導できるマウスモデルが開発された。したがって、スイス菌はヒト MALT リンパ腫の原因菌であると考えられる。しかし、スイス菌感染の病態については全く不明である。我々はこれまでに、マウス感染胃粘膜からスイス菌を回収し、ゲノム解析を行い、4 型分泌装置構成遺伝子 *virB10* を認め、スイス菌にもピロリ菌同様に PAI が存在することが想定された。

2. 研究の目的

本研究は、アジアにおけるピロリ菌とスイス菌の感染及びその関連消化器疾患の実態を疫学調査し、ヘリコバクター属細菌感染関連消化器疾患の予防対策について、アジアでのコンセンサスを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

タイ、中国(上海、青島)、フィリピン、

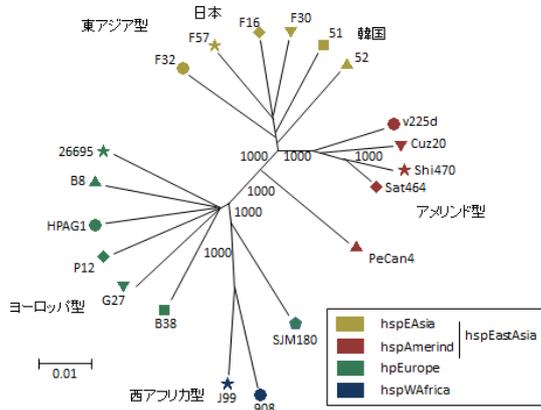
韓国を現地調査するとともに、ベトナムからは胃粘膜サンプルを送付してもらい、これらサンプルより、日本、中国、フィリピン、ベトナム、タイのピロリ菌を採取し、遺伝子解析を進めた。

また、スイス感染については胃生検組織のH.E.染色より、菌を肉眼的に同定するとともに、胃粘膜抽出物を用いてC57BL/6の胃に注入し、スイス感染の病態を解析した。

4. 研究成果

本研究で、平成 25 年度にタイと上海、平成 26 年度に、中国青島と上海、フィリピンマニラに、平成 27 年度に韓国に現地調査するとともに、ベトナムからは胃粘膜サンプルを送付してもらった。これらサンプルより、日本、中国、フィリピン、ベトナム、タイのピロリ菌を採取し、遺伝子解析を進め、日本中国 18 株(慢性胃炎 7 株、十二指腸潰瘍株 11 株)、フィリピン 19 株(慢性胃炎 8 株、胃潰瘍 6 株、十二指腸潰瘍 3 株、胃がん 2 株)、ベトナム 22 株(胃潰瘍 2 株、十二指腸潰瘍 9 株、胃がん 11 株)、タイ 41 株(慢性胃炎 23 株、胃潰瘍 3 株、十二指腸潰瘍 4 株、胃がん 8 株)の病原因子 *cagA* の遺伝子多型を解析した。東アジア型の *cagA* の頻度が、胃がん死亡率の高い中国(94.4%)、日本(98.1%)、胃がん死亡率の中等度のベトナム(95.4%)で高く、胃がん死亡率の低いフィリピン(26.3%)、タイ(57.9%)では低いことが認められた。

また、これまでに、日本の 4 株(慢性胃炎 1 株:F16、十二指腸潰瘍 1 株:F30、胃がん 2 株:F32、F57)の全ゲノム遺伝子解析を行い、既報の株を含め系統樹解析を行ったところ、ピロリ菌は、西アフリカ型とヨーロッパ型が分かれ、さらにそこからアメリンド型と東アジア型の祖先が分かれることが示された(図)。



ゲノムの違いを調べると、日本の株を含む東アジア株はヨーロッパ株と、病原因子など宿主との相互作用因子、酸化還元、ゲノム・プロテオーム維持、エピジェネティクスで大きく異なっていた。特に、東西で *oipA*, *hopMN* 等の外膜蛋白質遺伝子や、細胞表面にあってヒトのルイス抗原を擬態するリポ多糖合成酵素である *futA/futB* に大きな違いが

認められた。このような違いが宿主との相互作用に違いが生じると考えられる。

一方、スイス菌は単離培養が困難で、現地で採取した胃粘膜抽出物をマウスの胃に注入し、スイス感染を定着させ、スイス感染の病態を検討した。スイス感染の病態において、マウススイス菌感染により、ほぼ 100%のマウスにリンパ濾胞を形成する。そこで、スイス感染後の胃リンパ濾胞形成と CXCL13 発現誘導との関連性を調べるために、スイス感染マウスに抗 CXCL13 抗体を投与した。その結果、抗 CXCL13 抗体の投与により、スイス感染後に誘導される胃リンパ濾胞形成は有意に抑制された。さらに、免疫染色法を用いて胃リンパ濾胞内に浸潤している細胞の同定を行うと、B 細胞、CD4 陽性細胞、樹状細胞、ならびに、濾胞樹状細胞の胃粘膜への浸潤が観察された。しかしながら、これらの細胞浸潤は、抗 CXCL13 抗体の投与により抑制されることが明らかとなった。スイス感染後に発現上昇を示す CXCL13 は、胃リンパ濾胞形成と密接に関連しているが、どのようなメカニズムにより CXCL13 が産生されるのかは明らかでない。これまでの報告で、CXCL13 は、リンホトキシン-リンホトキシン受容体との相互作用により I B-⁻F- B2 経路の活性化を介して濾胞性樹状細胞から産生され、リンパ組織の形成に重要なケモカインであることが知られている。そこで我々は、スイス感染後の胃リンパ濾胞形成と NF-⁻B2 シグナル伝達経路の活性化との関連性について検討した。免疫染色法の結果、NF-⁻B2 は、胃粘膜に浸潤した FDC 内で高い活性化を示していたが、抗 CXCL13 抗体を投与したマウス胃粘膜では、NF-⁻B2 の活性化は観察されなかった。さらに、ウエスタンブロット法の結果、NF-⁻B2 活性化は、I B-⁻ の活性化を介して、リンパ濾胞が多数形成された胃粘膜で検出されることが確認された。これらの結果、NF-⁻B2 は、I B-⁻ の活性化を介して、リンパ濾胞形成を含むスイス感染胃粘膜で高い活性化を示し、CXCL13 産生に寄与していることが明らかとなった。

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)

- Yamamoto K, Nishiumi S, Yang L, Kimatcheva E, Pandina T, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Zauderer M, Yoshida M, Azuma T. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. *Mucosal Immunol* 査読有 7:1244-1254, 2014. DOI:10.1038/mi.2014.14.
 Yang L, Yamamoto K, Nishiumi S,

Nakamura M, Matsui H, Takahashi S, Dohi T, Okada T, Kakimoto K, Hoshi N, Yoshida M, Azuma T. Interferon- γ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection. *Mucosal Immunol* 査読有 8:279-295, 2015.

DOI: 10.1038/mi.2014.66.

Shimoda A, Ueda K, Nishiumi S, Murata-Kamiya N, Mukai SA, Sawada S, Azuma T, Hatakeyama M, Akiyoshi K. Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Sci Rep.* 査読有 7:6:18346. 2016

DOI: 10.1038/srep18346

[学会発表](計 18 件)

山本 幸司*, 東 健*, Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. 第 20 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2014 年 6 月 28 日 29 日, ステーションカンファレンス東京 (東京都)

岩本 彰*, 棚橋 俊仁*, 楊 林*, 山本 幸司*, 東 健*, 次世代シーケンサーを用いた本邦におけるヘリコバクターピロリ菌 *cagA* 遺伝子の全ゲノム解析, 第 20 回ヘリコバクター学会学術集会, 2014 年 6 月 28 日 29 日, ステーションカンファレンス東京 (東京都)

Koji Yamamoto*, Lin Yang*, Takeshi Azuma*, Interferon- γ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15 日~18 日, グランドプリンスホテル京都 (京都府)

岩本 彰*, 棚橋 俊仁*, 東 健*, Comparative analysis of *Helicobacter pylori* *cagA* gene using whole-genome sequencing, Japan Digestive Disease Week 2014, 2014 年 10 月 23 日~26 日, 神戸国際展示場 (兵庫県)

Koji Yamamoto*, Lin Yang*, Takeshi Azuma*, Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. The 5th International Symposium on Carcinogenic Infection, Immunity, and Cancer, 2015 年 2 月 26 日 27 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)

Lin Yang*, Koji Yamamoto*, Takeshi Azuma*, Interferon- γ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after

Helicobacter suis infection. The 5th International Symposium on Carcinogenic Infection, Immunity, and Cancer. 2015 年 2 月 26 日 27 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)

岩本 彰*, 棚橋 俊仁*, 岡田 理菜*, 小川 浩史*, 張 菁芸*, 吉田 優*, 東 健*, Detection of novel missense variants of *Helicobacter pylori* *cagA* gene using whole-genome sequencing, The 5th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, 2015 年 2 月 26 日 27 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)

岩本 彰*, 棚橋 俊仁*, 岡田 理菜*, 小川 浩史*, 張 菁芸*, 吉田 優*, 東 健*, 次世代シーケンサーを用いたヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白 CagA に特徴的な変異の検出, 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会, 2015 年 3 月 6 日, 神戸大学百年記念館 (兵庫県)

山本幸司*, Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26 日~28 日, 長良川国際会議場 (岐阜県)

岩本 彰, 棚橋 俊仁, 岡田 理菜, 小川 浩史, 張 菁芸, 吉田 優, 東 健, Whole-genome sequencing detects novel virulence variants of *Helicobacter pylori* *cagA* gene and its relationship with oncogenic CagA, DDDW 2015, 2015 年 5 月 16 日~19 日, U. S. A. 山本 幸司, 東 健, インターフェロン産生 B 細胞は, *H. suis* 感染後の胃リンパ濾胞形成を誘導する, 第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2015 年 6 月 26 日 27 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)

岩本 彰, 棚橋 俊仁, 小川 浩史, 楊 林, 山本 幸司, 東 健, 次世代シーケンサーを用いたヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白 CagA に特徴的な変異の検出, 第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2015 年 6 月 26 日 27 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)

山本 幸司, 東 健, インターフェロン産生 B 細胞は, *H. suis* 感染後の胃リンパ濾胞形成を誘導する, 第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 2015 年 7 月 17 日 18 日, 東京工業大学大岡山キャンパス蔵前会館 (東京都)

東 健, *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer, The 10th Chinese H. Pylori and Digestive Diseases Forum, 2015 年 8 月 22 日 23 日, 中国

東 健, *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer, CHA International

Symposium 2015年10月16日～18日、
韓国

山本 幸司、東 健、インターフェロン
産生B細胞は、H. suis 感染後の胃リン
パ濾胞形成を誘導する、第68回日本細
菌学会関西支部総会2015年11月28日、
京都薬科大学愛学館（京都府）

山本 幸司、東 健、抗CXCL13抗体は、
ヘリコバクター感染後の胃リンパ濾胞
形成を抑制する、第38回日本分子生物
学会、第88回日本生化学会合同大会、
2015年12月1日～4日、神戸ポートア
일랜드（兵庫県）

山本 幸司、東 健、インターフェロン
産生B細胞は、H. suis 感染後の胃リン
パ濾胞形成を誘導する、第89回日本細
菌学会総会、2016年3月23日～25日、
大阪国際交流センター（大阪府）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 健 (AZUMA, Takeshi)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60221040

(2) 研究分担者

星 奈美子 (HOSHI, Namiko)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40645214

森田 圭紀 (MORITA, Yoshinori)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60420460