

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860545

研究課題名(和文)ピロリ菌の病原遺伝子多型が与える疾患への影響

研究課題名(英文)Effects of Helicobacter pylori virulence genotypes on disease outcomes

研究代表者

松田 みゆき (Matsuda, Miyuki)

大分大学・医学部・技術補佐員

研究者番号：90586207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリ感染による消化性潰瘍や胃癌発症の高危険群を同定することは非常に重要である。発症の原因として、ピロリ菌の病原因子のなかではcagA遺伝子が最も研究されている。本研究では、ピロリ菌のDNAサンプルを用いてPCRを行い、cagA遺伝子の有無について調べた。cagA遺伝子のシーケンス解析を行ったところ、cagAの遺伝子型がAB、ABC、ABCC、ABCCC、ABD、ABABCCなど種々の遺伝子多型を持つピロリ菌株を得ることができた。これらの野生株、cagA欠損株を胃がん細胞株と共培養し、発現する遺伝子に関して、マイクロアレイを用いた解析を行い、結果を解析中である。

研究成果の概要(英文)：It is important to identify the high risk group of peptic ulcers and gastric cancer infected with Helicobacter pylori. The most studied virulence factors of H. pylori to cause these diseases is cagA. In this project, we performed PCR-based sequencing of cagA from cultured clinical isolates of H. pylori. We could detect various genotypes of cagA including AB, ABC, ABCC, ABCCC, ABD, ABABCC. We co-cultured these types of wild-type H. pylori or cagA-deleted mutants with gastric epithelial cells, and performed microarray to identify the molecules up-regulated or down-regulated, and the analyses are now on going.

研究分野：分子疫学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 病原因子

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌)感染者の一部のみが消化性潰瘍や胃癌を発症することから、消化性潰瘍や胃癌発症高危険群を同定することが重要である。疾患発症の原因として、宿主側要因、環境因子に加え、多様な菌側の病原因子が関与していると考えられる。私は現在ピロリ菌の病原因子について研究を行っており、アメリカと日本における *jhp0562* 遺伝子と疾患との関連性について検討し、アメリカにおいては *jhp0562* 遺伝子が消化性潰瘍と有意に関連することを筆頭著者として報告した (Matsuda M, Shiota S, Matsunari O, Watada M, Murakami K, Fujioka T, Yamaoka Y. Prevalence of two homologous genes encoding glycosyltransferases of *Helicobacter pylori* in the United States and Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26:1451-6.)。ピロリ菌の病原因子のなかでは *cagA* 遺伝子が最も研究されているが、私は *jhp0562* 遺伝子の有無は *cagA* の有無と相関することも報告し、このことから *cagA* が病原因子として重要であり、詳細な検討が必要であると考えた。

cagA の遺伝子型と病原性

cagA 遺伝子は CagA 蛋白をコードし、微小の注射針様構造 (IV 型分泌装置) を介して宿主細胞内に注入される。細胞内に注入された CagA 蛋白は一部がチロシンリン酸化され、SHP-2 などと結合し、さまざまな細胞内シグナル伝達系に異常を起こすことが報告されている。*cagA* 遺伝子には大きく東アジア型 *cagA* と欧米型 *cagA* があり、東アジア型 *cagA* を有するピロリ菌感染者が胃癌の危険性が最も高く、次いで欧米型 *cagA*、*cagA* 陰性菌と胃癌の危険性が低下する。この東アジア型と欧米型 *cagA* の遺伝子型は 3'末端側にある繰り返し配列によって識別できることを、私の上司である山岡吉生教授らは初めて報告した。現在では繰り返し配列に存在するチロシンリン酸化部位を含むアミノ酸配列 (EPIYA) モチーフの周辺アミノ酸配列をもとに、東アジア型にも欧米型にも存在する A および B モチーフ、欧米型に特徴的な C モチーフ、東アジア型に特徴的な D モチーフの組み合わせで、欧米の菌は ABC や ABCC、東アジアの菌は ABD などと表現する。ABD である東アジア型が最も病原性が高いが、欧米型 *cagA* に存在する繰り返し配列は C の数が増すほど病原性が高い。

私の講座では日本のみならず世界中から得られたピロリ菌の *cagA* 配列について検討を行っている。最近では、胃癌の最も少ない沖縄県では欧米型 *cagA* が 15% ほどに認められるが、胃癌症例ではほとんどが東アジア型であったことを発見した。さらにピロリ菌は 7 つの housekeeping 遺伝子を用いた multilocus sequence typing (MLST) 解析により大きく 7 つのグループに分類できるが、私の講座では沖縄の欧米型 *cagA* を持つピロリ菌はこれまで報告されているグループとは全く異なる新たなピロリ菌であることを報告した。

2. 研究の目的

以上のように、疫学的には *cagA* のタイプが病原性と関連することは明らかであるが、*cagA* のタイプの違いは直接的に病原性の違いとして考えてよいのであろうか。2008 年 ABDD や ABCCC などの CagA 蛋白を全身に人為的に導入したトランスジェニックマウスの実験が行われ、一部に胃癌などの悪性腫瘍が認められた。しかしこの実験系はトランスジェニックの手法を用いたものであり、実際それらの *cagA* 配列を有する (CagA 蛋白を発現する) 菌が胃粘膜で同様の現象を引き起こすかについては現時点で明らかになっていない。異なる *cagA* タイプを示す臨床株を用いて、その病原性を検討することも可能であるが、*cagA* のタイプはその他の病原因子のタイプとも関係しており、*cagA* タイプの違いだけが病原性に関係しているかを証明することは困難である。そこで本研究では繰り返し配列の異なる様々な *cagA* 遺伝子を持つピロリ菌を用いて、*cagA* 遺伝子の多型と病原性の関連性について評価する計画を立てた。

3. 研究の方法

平成 25 年度は、臨床検体から分離されたピロリ菌 DNA を用いて PCR とシーケンスを行い、*cagA* の遺伝子配列を決定する。この配列から遺伝子型を同定し、さらに *cagA* 変異株を作製する。

平成 26 年度は培養細胞などへの感染実験を行い、ピロリ菌における *cagA* の遺伝子多型がもたらす病原性の違いについて、生理・生化学的手法を用いて評価する。

4. 研究成果

まずは、臨床株を用いて、*cagA* 遺伝子が陽性であるかどうか、もしも陽性であればどのようなタイプであるかを調べた。特に、私は若

手研究者海外派遣事業の一環として、2 か月間、インドネシア、タイ、ベトナムで疫学調査に参加していたこともあり、これらの菌を中心に検討を行った。さらに、本講座にストックされてあるドミニカ共和国のピロリ菌や沖縄のピロリ菌についても検討を行った。インドネシアでは、ジャワ島のスラバヤおよびスラウェシ島のマナドに滞在し、胃粘膜からのピロリ菌培養を行ったが、5 . 主な発表論文、 で発表したように、ともにピロリ菌感染率が非常に低く(マナドで 14.3%、スラバヤで 11.5%)、マナドでは 1 株のみ、スラバヤでは 5 株のみ菌の培養に成功した。マナド株は、東アジア型 *cagA* (ABD) を保持しており、スラバヤ株は、5 株中 4 株で *cagA* を保持、3 株は ABD で 1 株は ABB タイプであった。興味深いことに、ABB タイプの株は、インドネシアのパプアでも見られるタイプに類似していた。

ドミニカ共和国では、感染率が 62.5% で、*cagA* 陽性率は 75% で、*cagA* はすべて欧米型 *cagA* であった(ABC が 92.3% で他は ABCC) 主な発表論文。

また、沖縄のピロリ菌には東アジアにもかかわらず欧米型を保持する菌が 15% ほどに存在することを私の所属する講座で見出していたが、今回はこれらの菌を次世代シーケンサーを用いて解析する研究も手伝った主な発表論文。さらには次世代シーケンサーを用いた様々な解析にも参加(主な発表論文)することができた。

さて、本研究のもう一つの大きな目的は、これらの臨床株の *cagA* をクローニングして、変異株を作成することであった。これらの菌を用いて、変異株を得るために T7 Blue vector に *cagA* の上流及び下流領域とクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) を挿入したプラスミド (pTHP494/496::*cat*) を作製し、natural transformation 法で TN2 *cagA* 欠損株 (TN2 *cagA*) の作製に成功した。次いで遺伝子相補株を作成するために、ピロリ菌 - 大腸菌の両宿主で複製可能なシャトルベクターである pHel3 (Heuermann D. and Haas R., Mol. Gen. Genet., 1998) 上に、*cagA* 遺伝子全長およびそのプロモーター領域をクローニング (pHel3::*cagATN2*) することにも成功した。しかし、pHel3::*cagATN2* はのピロリ菌への natural transformation は成功せず、エレクトロポレーション法も試みたが、遺伝子相補株を作成することには、最後まで成功しなかった。コツなどが知るために、*cagA* の遺伝子相補株を用いた研究を行っているドイツの Steffen

Backert 教授にも連絡を取り、上司の山岡教授が直接彼の研究室を訪問して、コツなどを学んでくれたが、うまくいかなかった。Backert 教授からも相補用のプラスミドをいただき、実験も行ったがうまくいかなかった。そのため、この段階で、やや時間をかなり費やすことになってしまった。そこで、まずは野生株、変異株を用いて、これらの株を胃がん細胞株 (AGS 細胞) と共培養し、発現する遺伝子に関して、マイクロアレイを用いた解析を行った。特に、DNA 断裂に関する遺伝子群が、*cagA* と関連して発現増加していることがわかっており、山岡教授の講座でこれらの因子について解析を行っている。

残念ながら、私は大分大学を辞することとなり、科研費応募資格を失うこととなったが、山岡教授らが私の築いた研究成果をさらに発展してくれるものと考えている。

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 6 件 ; うち英文 6 件)

- Myint T, Shiota S, Vilaichone RK, Ni N, Aye TT, Matsuda M, Tran TT, Uchida T, Mahachai V, Yamaoka Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis in patients with dyspeptic symptoms in Myanmar. World J Gastroenterol. 2015;21:629-36. doi: 10.3748/wjg.v21.i2.629. 査読あり
- Miftahussurur M, Tuda J, Suzuki R, Kido Y, Kawamoto F, Matsuda M, Tantular IS, Pularawati S, Nasronudin, Harijanto PN, Yamaoka Y. Extremely low *Helicobacter pylori* prevalence in North Sulawesi, Indonesia and identification of a Maori-tribe type strain: a cross sectional study. Gut Pathog. 2014;6:42. doi: 10.1186/s13099-014-0042-0. 査読あり
- Miftahussurur M, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Uchida T, Kido Y, Kawamoto F, Maimunah U, Adi P, Rezkiha Y, Nasronudin, Nusi I, Yamaoka Y. Identification of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients in Surabaya, Indonesia, using five diagnostic tests. Epidemiol Infect. 2015;143:986-96. doi: 10.1017/S095026881400154X 査読あり

Shiota S, Cruz M, Abreu JA, Mitsui T, Terao H, Disla M, Iwatani S, Nagashima H, Matsuda M, Uchida T, Tronilo L, Rodríguez E, Yamaoka Y. Virulence genes of *Helicobacter pylori* in the Dominican Republic. J Med Microbiol. 2014 Sep;63(Pt9):1189-96. doi: 10.1099/jmm.0.075275-0 査読あり

Satou K, Shiroma A, Teruya K, Shimoji M, Nakano K, Juan A, Tamotsu H, Terabayashi Y, Aoyama M, Teruya M, Suzuki R, Matsuda M, Sekine A, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y, Hirano T. Complete Genome Sequences of Eight *Helicobacter pylori* Strains with Different Virulence Factor Genotypes and Methylation Profiles, Isolated from Patients with Diverse Gastrointestinal Diseases on Okinawa Island, Japan, Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. Genome Announc. 2014;2. pii: e00286-14. doi: 10.1128/genomeA.00286-14 査読あり

Binh TT, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Trang TT, Kwon DH, Iwatani S, Yamaoka Y. Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing. J Antimicrob Chemother. 2014;69:1796-803. doi: 10.1093/jac/dku050 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/phealth2/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 みゆき (MATSUDA MIYUKI)
大分大学・医学部・技術補佐委員

研究者番号 : 90586207

(2)研究分担者 なし