

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640114

研究課題名(和文) *H. pylori*の起源を求めて研究課題名(英文) Search for the origin of *H. pylori*

研究代表者

山岡 吉生 (YAMAOKA, YOSHIO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00544248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トナカイを含む複数の動物胃パラフィン包埋切片から増幅した16S rRNA遺伝子配列は、*H. pylori*もしくは*H. acinonychis*と高い相同性を示した。また*H. pylori*アラスカ株の全ゲノム配列を決定したところ、そのゲノム構造は*H. acinonychis*とよく類似していた。また進化系統樹解析からアラスカ株の多様性とその進化についての新たな知見が得られた。これら研究成果は、今後Whole metagenome解析によって同定される*Helicobacter* 属のゲノム配列との比較を可能にし、*H. pylori*の起源を明らかにするための手掛かりとなると期待する。

研究成果の概要(英文)：The variable regions of 16S rRNA genes were determined by next generation sequencing from the formalin-fixed paraffin-embedded gastric tissues from the reindeer and other animals. These sequences were highly identity with *H. pylori* and *H. acinonychis*. Also we determined the whole genome sequences of Alaskan *H. pylori* strains. Moreover, the genome structure comparison analysis indicated that its structure was partially shared with that of *H. acinonychis*. Phylogenetic analysis based on these 724 homologues genes shown that Alaskan strains clustered within own lineage independently. Our results suggested that the possibility to find an origin of *H. pylori* infection to human from the herbivorous animals. Further genetic analysis of *H. acinonychis* will be successful to verify our hypothesis.

研究分野：消化管感染症

キーワード：ヘリコバクター属 ヘリコバクター・ピロリ 次世代シーケンサー 起源

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は、全人類の約半数が感染して、消化器疾患をはじめとした多彩な疾患を引き起こす世界最大の感染症の一つである。特に、*H. pylori* は胃癌のリスクファクターであり、その健康被害は非常に重く、胃癌発生数は全世界で年間 100 万人を超えている。

H. pylori の主な感染経路は、家族内での垂直感染であると考えられており、人間と菌の系統関係は非常によく類似する。実際に、我々は、人類移動と菌の進化について大規模な疫学調査を行い、*H. pylori* 病原因子の進化やその多様性についてこれまで多くの研究成果を報告してきた。しかしながら、人類最大規模の感染症であるとともに、人類に最も身近な病原細菌でもあるこの *H. pylori* が如何に人間に寄生するようになっていったか、その起源はこれまでよくわかっていない。

一方、*H. pylori* は地域ごとに特徴があり、特に、アラスカ株は、主に東南アジアなどで流行する株とは明らかに異なることが我々の検討より予想されている。実際に、マイクロアレイ法を用いた先行研究では、アラスカ地域で分離された一部の *H. pylori* が *Helicobacter acinonychis* (*H. acinonychis*) と近縁性があることが示唆されている(1)。また、アフリカのライオンから *H. acinonychis* が検出されており、*Helicobacter* 属の中ではヒトが持つ *H. pylori* に最も近縁であるところから、*H. pylori* の起源である可能性が考えられていた(2)。実際に、南アフリカで狩猟採取生活を行っている人々の菌が最も *H. acinonychis* に近いことからその可能性がうかがえる。しかし、アラスカ地域にはネコ科の大型肉食獣が生息しないにもかかわらず、*H. acinonychis* と類似する遺伝子構造を持つ特異的な *H. pylori* が存在することなど多くの疑問が残っている。しかし、多くの *Helicobacter* は分離培養が困難であり、十分な遺伝子工学的解析による検証が必要である。

表 1. 動物の *Helicobacter* 属について

Species	Age, sex	Organ	Clinical signs	Helicobacter infection (HE stain) resembling	Reference
Ocelot	19y, F	Fundic region of the stomach	Multiple ulcers	<i>Helicobacter heilmannii</i>	J Comp Pathol. 2005
Cougar	14y, F	Stomach	Severe emaciation (died) Gastrointestinal adenocarcinomas Rectal adenoma	<i>Helicobacter</i> -like organisms	J Vet Med Sci. 2002
Cow	2y, F	Stomach	gammadelta T-Cell Lymphoma	<i>Helicobacter</i> -like organisms, found in the abomasum and small intestine	J Comp Pathol. 2001
Reindeer	na	Intestine ?	Gastroenteritis	<i>Helicobacter</i> -like organisms and rotavirus	Aust Vet J. 2001

2. 研究の目的

そこで我々は、アラスカ先住民がトナカイやアザラシの肉を生食する習慣に着目し、アラスカの *H. pylori* と *H. acinonychis* は、共に補食した他の動物の菌の影響を受けているのではないかと仮説を立てた。実際、トナカイの胃から *Helicobacter* 属と見られる菌

が検出されており(3)、またトナカイとアフリカのガゼルの消化管細菌叢は類似しているという報告もある(4)。そこで、本研究では、アラスカの先住民から分離された *H. pylori* の全ゲノム配列を決定すること、さらに、トナカイからの *Helicobacter* の同定を試み、アラスカの先住民から分離された *H. pylori* との遺伝子構造の違いを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 病理学的に *H. pylori* 様細菌を含むトナカイ (及び国内の獣医および動物園等の施設から得られたその他動物検体) の胃パラフィン包埋切片から DNA 抽出を試み、通常、*cagA*、*vacA* 遺伝子およびハウスキーピング遺伝子をターゲットとした RT-PCR を実施する。その後、公開データベース上の既存の *Helicobacter* 株の遺伝子配列との相同性を比較する。特に、*cagA* 及び *vacA* 遺伝子配列についてはこれまで十分な基礎研究が行われており、その多様性の評価に加え、病原性についても評価が可能である。

(2) 上記 1 の検体に含まれる全 DNA を増幅し、次世代シーケンサー MiSeq にて Whole genome 解析を行う。全ショートリード配列を読み取り、*de-novo* アッセムブリおよび *H. pylori* もしくは *Helicobacter acinonychis* 株に対するリファレンスマッピングを実施する。

(3) 上記 1 から得られた DNA を用いて、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域をターゲットとした RT-PCR を実施する。また精製後、インデックス配列を検体ごとに付加することでコスト削減と増幅率の向上を図る。インデックス配列を付加した増幅産物を Illumina MiSeq reagent v3 を用いて次世代シーケンサー MiSeq にてメタゲノムシーケンスを行う。

(4) アラスカ原住民の胃検体から選択培地および血液寒天培地を用いた *H. pylori* の分離培養を試みる。その後、*H. pylori* の DNA を抽出し長鎖読みとり型の次世代シーケンサー PacBio にて全ゲノム配列を決定する(沖縄総合科学研究所との共同研究)。得られたゲノムデータからは遺伝子予測を行い、完全ゲノムが発表されている既存の *H. pylori* の遺伝子と合わせて相同遺伝子のセットを生成する。そして相同遺伝子のセットごとにアラインメントを行い、配列を連結して系統解析に用いる。

(5) アラスカ株のゲノムに対する相同性の確認し、その他アフリカから分離された *H. pylori* または、ネコ科大型獣の *H. acinonychis* との遺伝子構造の違いについて評価する。

4. 研究成果

(1) 我々は、国内の獣医および動物園等の施設からトナカイ、クガー、オセロット、ウシの胃パラフィン包埋切片を入手し、DNA 抽出を試みた。

その後、*cagA* 及び *vacA* 遺伝子配列をター

ゲットにした RT-PCR 法を行ったがいずれの遺伝子も増幅されなかった。これは、胃パラフィン包埋切片が長期間保存されており、抽出された DNA 量が十分ではなかったことが考えられた。その為、方法 2 による解析も困難出ることが予想された。そこで、H27 度は抽出方法を改良するなど対策を講じた。

(2) これまで胃パラフィン包埋切片からの効率的な DNA 抽出方法の選定が課題であったが、H27 年度に高濃度の DNA 抽出が可能な核酸抽出方法を確立でき、DNA 抽出を再度試みた。その結果、トナカイ、オセロット、ウシおよびクガーからの DNA 抽出に成功した。これら検体を用いて 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅し、インデックス配列を付加し、メタゲノム解析を実施した。Green Gene database を基にした Operational Taxonomic Unit (OTU) 解析の結果、これら動物検体から平均で 37,848 OTUs が検出され、*Helicobacter* と思われる OTUs は 0.1% 程度であった。トナカイ、オセロットおよびクガーから *Helicobacter* OTUs が検出されたが、ウシ検体からは検出されなかった。トナカイから検出されたコンティグ配列 397bp を BLAST 検索した結果、*H. pylori* (Accession#: NC_000915) との相同性が 99% (393 ~ 396 nt が一致)、*H. acinonychis* (NC_008229)、*H. cetorum* (NC_017735)、*H. pullorum* (NZ_DS99045)、及び *H. winthamensis* (NZ_GG661973) とは 98% (386 ~ 391nt が一致) の相同性を示した。

(3) 我々は、アラスカ先住民から採取された *H. pylori* を 9 株分離・培養に成功し、次世代シーケンサー PacBio による全ゲノム配列を決定した。

表 2. アラスカ株のシーケンス結果

Strain name	Country	Genome size (nt)	%GC
AL02	Alaska, U.S.A	1575789	39.11
AL03	Alaska, U.S.A	1652551	38.71
AL04	Alaska, U.S.A	1639336	38.75
AL05	Alaska, U.S.A	1621023	38.94
AL07	Alaska, U.S.A	1563352	39.09
AL09	Alaska, U.S.A	1521116	39.17
AL10	Alaska, U.S.A	1548736	39.19
AL11	Alaska, U.S.A	1574336	38.99
AL15	Alaska, U.S.A	1591029	39

Dot plot によるゲノム構造の比較から、これら 9 株のうち 4 株のゲノム構造は、他の *H. pylori* と大きく異なっており、*H. acinonychis* に類似していることがわかる (図 1)。

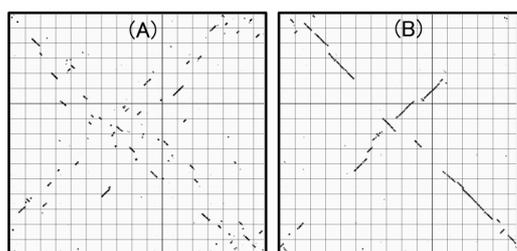


図 1. アラスカ株と *H. pylori* および *H. acinonychis* のゲノム構造比較。アラスカ株と *H. pylori* 26695 株 (A)、アラスカ株と *H. acinonychis* (B)

(4) また、ゲノムデータから得られた 724 組の相同遺伝子に基づく系統樹でも、これら 4 株は突出して長い枝を持っており、他の *H. pylori* と比べて進化速度が早い、あるいは系統的な違いが大きいことが示された (図 2)。

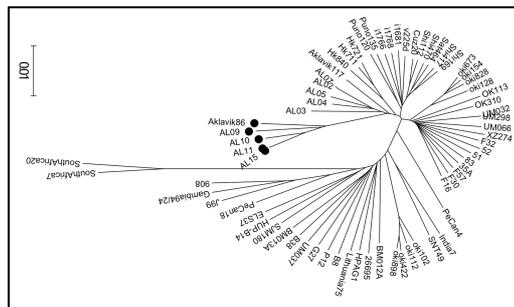


図 2. アラスカ株の系統的位置左端が南アフリカの株。●印で特異なゲノム構造を持つアラスカ株を示す

以上のことより、我々は、複数の動物胃パラフィン包埋切片から高い濃度で DNA を抽出する方法を確立し、16S rRNA 遺伝子配列を用いたメタゲノム解析を行った。これら結果を基に、今後、Whole metagenome 解析により、これら動物に感染する *Helicobacter* のゲノム解析により詳細な検討を行う予定である。

さらに、*H. pylori* アラスカ株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーによって決定し、その進化と多様性について明らかにした。

<引用文献>

- (1) Gressmann H *et al.* Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. PLoS Genet. 2005.
- (2) Linz B, Schuster SC. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms. Res Microbiol. 2007.
- (3) Shibahara T *et al.* Gastroenteritis associated with *Helicobacter*-like organisms and rotavirus in a reindeer (*Rangifer tarandus*). Aust Vet J. 2001.
- (4) Sundset MA *et al.* Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. Microb Ecol. 2007.

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 69 件 ; うち英文 48 件)
Matsunari O, Miftahussurur M, Shiota S,
Suzuki R, Vilaichone RK, Uchida T,

Ratanachu-Ek T, Tshering L, Mahachai V, Yamaoka Y. Rare *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Bhutan. *Sci Rep*. 2016; 6:22584. doi: 10.1038/srep22584. 査読あり

Miftahussurur M, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* virulence genes and host genetic polymorphisms as risk factors for peptic ulcer disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 9:1535-47. doi: 10.1586/17474124.2015.1095089. 査読あり

Sgouras DN, Trang TT, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 2015; 20 Suppl 1:8-16. doi: 10.1111/hel.12251. 査読あり

Uotani T, Miftahussurur M, Yamaoka Y. Effect of bacterial and host factors on *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19:1637-50. doi: 10.1517/14728222.2015.1073261. 査読あり

Miftahussurur M, Sharma RP, Shrestha PK, Suzuki R, Uchida T, Yamaoka Y. Molecular Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in Nepal: Specific Ancestor Root. *PLoS One*. 2015; 10:e0134216. doi: 10.1371/journal.pone.0134216. 査読あり

Trang TT, Shiota S, Matsuda M, Binh TT, Suzuki R, Vilaichone RK, Mahachai V, Tshering L, Dung HD, Uchida T, Matsunari O, Myint T, Khien VV, Yamaoka Y. The Prevalence of *Helicobacter pylori* virulence factors in Bhutan, Vietnam, and Myanmar is related to gastric cancer incidence. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:830813. doi: 10.1017/S0950268815001430. 査読あり

Miftahussurur M, Yamaoka Y. Appropriate first-line regimens to combat *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: an Asian perspective. *Molecules*. 2015; 20:6068-92. doi: 10.3390/molecules20046068. 査読あり

Binh TT, Suzuki R, Kwon DH, Yamaoka Y. Complete Genome Sequence of a Metronidazole-Resistant *Helicobacter pylori* Strain. *Genome Announc*. 2015; 3. pii: e00051-15. doi: 10.1128/genomeA.00051-15. 査読あり

Binh TT, Suzuki R, Trang TT, Kwon DH, Yamaoka Y. Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in

Helicobacter pylori using next-generation sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:2343-8. doi: 10.1128/AAC.04852-14. 査読あり

Miftahussurur M, Tuda J, Suzuki R, Kido Y, Kawamoto F, Matsuda M, Tantular IS, Pusarawati 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

Shiota S, Suzuki R, Matsuo Y, Miftahussurur M, Tran TT, Binh TT, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* from gastric cancer and duodenal ulcer show same phylogeographic origin in the Andean region in Colombia. *PLoS One*. 2014; 9:e105392. doi: 10.1371/journal.pone.0105392. 査読あり

Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncol*. 2014; 10:1487-500. doi: 10.2217/fon.14.29. doi: 10.2217/fon.14.29. 査読あり

Miftahussurur M, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Uchida T, Kido Y, Kawamoto F, Maimunah U, Adi P, Rezkitha 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

[学会発表](計25件 うち招待講演8件)
Yamaoka Y. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in ASEAN countries: Focused in Indonesia. KONKERPAS PPHI-PGI-PEGI2015. (2015年8月16日). 招待講演、マラン、インドネシア

Yamaoka Y, Jimenez A Joze, Modesto Cruz. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: association between *H. pylori* and disease outcomes. XII Congreso Centroamericano y del Caribe de parasitología y Medicina Tropical. (2015年6月13日). 招待講演、プンタカナ、ドミニカ共和国

Yamaoka Y. Self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: the organoids. XI Congreso Internacional de Investigacion

cientifica. (2015年6月10日).招待講演、サントドミンゴ、ドミニカ共和国

Yamaoka Y. The diversity of *Helicobacter pylori*: correlation to laboratory diagnosis. 9th National Symposium & Workshop of Indonesia Antimicrobiol Resistance Watch and Annual Scientific Meeting of Indonesian Society for Clinical Microbiologist (2014年11月29日) 招待講演、ジャカルタ、インドネシア

Yamaoka Y. Genomic diversity of *Helicobacter pylori* in Asia. Asian Pacific Digestive Week (2014年11月22日) 招待講演、バリ島、インドネシア

Yamaoka Y. Self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: the organoid. 4th Mongolian Digestive Disease Week (2014年6月18日) 招待講演、ウランバートル、モンゴル

Yamaoka Y. Does the difference of CagA phenotype explain the geographic differences in gastric cancer incidence?. 4th Mongolian Digestive Disease Week (2014年6月18日) 招待講演、ウランバートル、モンゴル

Yamaoka Y. The relations of bacterial and host factors in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa. X Congreso Internacional e Investigacion Cientifica. (2014年6月12日) 招待講演、サントドミンゴ、ドミニカ共和国

〔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

山岡 吉生 (YAMAOKA YOSHIO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00544248

(2)研究分担者

鈴木 留美子 (SUZUKI RUMIKO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70599092

(3)連携研究者 なし