

令和元年6月14日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08652

研究課題名(和文) タイのピロリ菌の遺伝子解析-病原因子と人類遺伝学的解析-

研究課題名(英文) Genetic analysis of H. pylori isolated in Thailand

研究代表者

内田 智久(Uchida, Tomohisa)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70381035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌感染による慢性炎症の持続が胃癌発症に重要な役割を果たしている。タイではピロリ菌感染に関連した胃癌発症が非常に低い。タイのピロリ菌感染率は46%程度であり、世界の約半数がピロリ菌に感染しているとの現状との大きな乖離はなかった。今回、タイのピロリ菌に着目し検討をおこなったところ、vacA遺伝子、oipA遺伝子など病原遺伝子が強毒型を示した。また、複数の民族が暮らす(モン族、カレン族、タイ族、タイ-中華族)メーソットにおけるピロリ菌のMLST法による詳細な遺伝子解析により、「モン族とタイ-中華族の起源は中国にあり、カレン族はミャンマー由来」である事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タイでは胃癌が少ない原因は、感染しているピロリ菌の病原遺伝子が弱毒型であり感染に続発する胃粘膜の変化が軽微であることを明らかにした。このことは、日本で胃癌が多い原因が、強毒型遺伝子を持つピロリ菌が主である事を示唆している。さらに、ピロリ菌の詳細な遺伝子解析により、複数の民族が暮らすタイ西部メーソットにおける民族の由来を明らかにする事ができた。

研究成果の概要(英文)：Persistence of chronic inflammation caused by H. pylori infection plays an important role in gastric cancer development. The incidence of gastric cancer associated with H. pylori infection is very low in Thailand. The rate of infection with H. pylori in Thailand was around 46%, and there was no major divergence from the current situation that about half of the world population is infected with H. pylori. In this study, we focused on H. pylori gene in Thailand, and found that pathogenic genes such as the vacA and the oipA were highly virulent type. In addition, according to MLST analysis of H. pylori in multiple ethnic groups (Hmong, Karen, Thai, Thai-Chinese), I found that The origin of Hmong and Thai-Chinese is from China. And the Karen tribe was derived from Myanmar.

研究分野：病理学

キーワード：ヘリコバクターピロリ 遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

アジアにおける胃癌発症率には大きな地域差があり、International Agency for Research on Cancer (IARC)が発表する人口10万人あたりの胃癌発症率は、本邦は45.8とアジアの中でも非常に高く、タイは3.8と10倍以上の開きがある。

研究代表者は平成22年度～24年度に採択された日本学術振興会「組織的な若手研究者等海外派遣プログラム」でバンコクに派遣されたのを皮切りに、最近の6年間で延べ27ヶ月間バンコクに滞在し、チュラロンコン大学医学部消化器内科、病理学講座、微生物学講座等と共同でタイ各地に出向き、内視鏡検査による検体採取を行ってきた。その成果として17都市、1,546件の生検組織を採取した。病理組織学的解析の結果、タイのピロリ菌感染胃炎は炎症の程度が軽く、続発する萎縮、腸上皮化生が少ないことを明らかにした。さらに、ピロリ菌の遺伝子型について、最も重要な病原因子の一つであるCagAの多様性について、自ら開発した抗東アジア型CagA抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、陽性率11.7%であり、胃癌が多い日本(93%)、韓国(94%)とは大きな開きがあった。この結果から、感染しているピロリ菌の遺伝子的な多様性が胃炎の程度に関与しており、タイで胃癌が少ない要因は、ピロリ菌が起こす慢性胃炎の質の違いにある事を明らかにし2015年Plos One誌に筆頭著者として発表した。

アジアでは国ごとに組織学的な胃炎の質が異なっていることを見出し、慢性胃炎を引き起こす「ピロリ菌」との関連性について疫学研究を行ってきた。これまでに、フィールド調査により自ら赴き胃粘膜生検やピロリ菌を採取したタイ、ベトナム、ブータン、ミャンマーを始め、連携研究者等との共同研究として検体採取したインド、インドネシア、韓国、モンゴル、ドミニカ、ネパールの胃粘膜を対象に、ピロリ菌感染に伴う炎症の程度やピロリ菌感染率について病理組織学的解析をもとにした解析を行ってきた。その結果、胃癌が多い日本や韓国ではピロリ菌感染により高度の好中球浸潤を伴った組織学的胃炎が観察されるが、胃癌の低い国ではピロリ菌が感染しているにもかかわらず炎症細胞浸潤スコアが低い等、国や地域によってピロリ菌の病原性が異なっていることを明らかにした。中でも、ベトナムのハノイ、ホーチミンにおけるフィールド調査では、病原性に関与するcagPAI遺伝子群に欠損の見られるピロリ菌(欠損型ピロリ菌)が存在しこの欠損型ピロリ菌が胃粘膜の病変形成に重要な働きを担っていることを明らかにした。さらに、本邦のピロリ菌と比較して毒性因子であるcagA, vacAに構造的な差違があり、vacA, m1 typeが胃癌発症に強く関わっている可能性を指摘した。

## 2. 研究の目的

*Helicobacter pylori* (ピロリ菌)感染による慢性炎症の持続が胃癌発症に重要な役割を果たしている。一方、タイでは胃癌発症率は本邦の1/10以下と非常に低く、その原因はピロリ菌感染による胃炎が非常に軽く、さらに胃粘膜萎縮、腸上皮化生が少ないことをタイ全土から採取した1,500検体を越える病理検体を用いた疫学研究で明らかにした。本研究では、生検組織と同時に採取し培養したピロリ菌の遺伝子解析により、「胃癌が少ない=胃炎が軽い」原因をピロリ菌病原遺伝子の面から明らかにすると共に、ピロリ菌のMulti Locus Sequence Typing (MLST)解析を始めとした分子疫学的解析手法により、タイ人の民族の成り立ちを明らかにする。

## 3. 研究の方法

これまでに自ら採取したタイ全土からの生検組織から培養法で分離同定したピロリ菌とメーソットで採取したサンプルセットについて以下の解析を行った。

### (1) タイ全土から採取したピロリ菌の解析

#### ピロリ菌病原因子の解析

#### ピロリ菌遺伝子解析

生検組織から分離培養したピロリ菌からDNAを抽出し、vacA m1/m2, s1/s2, i1/i2, oipA on/off, dupA等の病原遺伝子の解析を行う。胃癌発症率の高い日本で分離されたピロリ菌の遺伝子タイプと比較することで病原性にかかわるピロリ菌の遺伝子タイプを同定した。

#### タイのピロリ菌の薬剤耐性の解明

ピロリ菌の薬剤耐性パターンは国によって違っている。薬剤耐性遺伝子の解析はピロリ菌除菌治療の基礎的かつ必須のデータである。タイのピロリ菌の薬剤耐性について解析した。

### (2) メーソットで採取したピロリ菌の解析

メーソットの検体について、下記の解析を行った

#### メーソットの胃粘膜疾病構造の解明

生検検体(Antrum 1個、Body 1個)の病理組織標本(H&E染色、ギムザ染色)を作製し、updated-Sydney systemに基づき胃炎、萎縮、ピロリ菌の程度を半定量的にスコア化する。内視鏡所見、性別、年齢、民族(タイ民族、タイ少数民族、タイ-中華系民族)を加味して、メーソットの胃粘膜疾病構造を明らかにした。

## ピロリ菌遺伝子解析

### Multi Locus Sequence Typing (MLST) 解析

MLST 法は、ハウスキーピング遺伝子の遺伝子 (*arc*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) のシーケンス解析を行うことで、細菌の遺伝子型決定する方法である。これまでの研究の蓄積により、ピロリ菌は大きく *hpEurope*, *hpEastAsia*, *hpAsia2*, *hpAfrica1*, *hpAfrica2*, *hpNEAfrica*, *hpSahul1* の7つのタイプに分けられることが明らかになっている。タイのピロリ菌のタイピングを行い、そのルーツを探索した。

#### 4. 研究成果

タイの北部及び南部の消化不良の症状を有する患者 273 人 (南部から 136 人、北部から 137 人) のピロリ菌感染頻度は、34.1% (93/273) であった。全体のピロリ菌感染率は南部より北部の方が高く (50.4% 対 17.6%,  $P < 0.001$ )。高感染率グループの特徴として、低所得、北東または北地域の出生地、農業従事、アルコール摂取、煮沸しない水の使用などがあった。ピロリ菌感染に伴う胃炎の病理組織学解析では、症例全体では北部は南部より有意に重度の組織学的スコアを示していた。対照的にピロリ菌陽性症例に限ると、南部の患者は有意により重症の胃炎スコアを示した。病原性遺伝子型 (*cagA*, *vacA*, *hrgA* および *jhp0562* 陽性 / - (1,3) *galT*) の検討をおこなったところ、培養できた 74 株のうち、56.8% がウエスタン型を保有していたが、南部では北部よりも高い割合であった (76.2% 対 49.1%,  $P = 0.05$ )。タイの胃癌の発生率は地域によって異なり南部で低いが、ピロリ菌感染率の差に対応していた。

タイ西部のメーソットは、モン族、カレン族、タイ族-中華族、タイ族の4つの民族が暮らしている。メーソットで集められたピロリ菌感染の感染率は 54.5% (158/289) であった。培養できた 152 の分離株の中で、東アジア型 *cagA* が最も優勢な遺伝子型として認められた。モン族、タイ族-中華族、タイ族の東アジア型 *cagA* は、それぞれ 96.0% [48/50]、85.7% [6/7]、62.7% [47/75] であり、カレン族では西洋型 *cagA* が 73.3% [11/15] であった。東アジア型 *cagA* 株に感染した患者は、西洋型 *cagA* の人よりも前庭部における炎症の活動性、腸上皮化生、および体の活動性が高かった (それぞれ  $p=0.024$ ,  $0.006$ ,  $0.005$ )。MLST 解析では、モン族とタイ-中華民族からのほとんどの株は *hspEAsia* 型に属していた (それぞれ 92.0 と 85.7%) が、カレン由来の菌株は主に *hpAsia2* (86.7%) を保有し、タイ族の菌株は *hspEAsia* (45.2%) と *hpAsia2* (31.1%) であった。このことは、*Helicobacter pylori* 遺伝子型はタイの民族間で異なっている事を示しており、モン族、タイ-中華民族は中国由来、カレン族はミャンマー由来である事が示唆された。

次に、薬剤耐性について検討をおこなったところ、抗生物質耐性は全体で 75.8% に認められ、アモキシシリン耐性 0.8%、テトラサイクリン耐性 0%、クラリスロマイシン耐性 5.6%、メトロニダゾール耐性 71.8%、シプロフロキサシン耐性 19.4%、レボフロキサシン耐性 19.4% であった。民族間特徴として、カレン族はメトロニダゾール耐性の割合が最も高く、モン族は、フルオロキノロン耐性 27.3%、多剤耐性 34.1% であった。

以上の研究成果から、タイにおけるピロリ菌の感染状況が明らかになり、タイで胃がんが少ない原因はピロリ菌の病原因子が弱毒型であり、ピロリ菌が惹起する慢性胃炎が軽度であることが理由であることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Subsomwong, P., M. Miftahussurur, T. Uchida, R. K. Vilaichone, T. Ratanachu-Ek, V. Mahachai and Y. Yamaoka (2017). "Prevalence, risk factors, and virulence genes of *Helicobacter pylori* among dyspeptic patients in two different gastric cancer risk regions of Thailand." *PLoS One* 12(10): e0187113. 査読有り

(2) Subsomwong, P., M. Miftahussurur, R. K. Vilaichone, T. Ratanachu-Ek, R. Suzuki, J. Akada, T. Uchida, V. Mahachai and Y. Yamaoka (2017). "Helicobacter pylori virulence genes of minor ethnic groups in North Thailand." *Gut Pathog* 9: 56. 査読有り

(3) Vilaichone, R. K., T. Ratanachu ek, P. Gamnarai, P. Subsomwong, T. Uchida, Y. Yamaoka and V. Mahachai (2017). "High Fluoroquinolone Resistant Strains of *Helicobacter pylori* in the Golden triangle." *Asian Pac J Cancer Prev* 18(2): 455-458. 査読有り

(4) Vilaichone, R. K., T. Ratanachu-Ek, P. Gamnarai, S. Chaithongrat, T. Uchida, Y. Yamaoka and V. Mahachai (2016). "Extremely High Prevalence of Metronidazole-Resistant *Helicobacter pylori* Strains in Mountain People (Karen and Hmong) in Thailand." *Am J Trop Med Hyg* 94(4): 717-720. 査読有り

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) T. Uchida, P. Subsomwong, M. Miftahussurur, R. Vilaichone, T. Ratanachu-ek, R. Suzuki, V. Mahachai, Y. Yamaoka, Helicobacter pylori Virulence Genes of Minor Ethnic Groups in North Thailand, European Helicobacter and Microbiota Study Group, 2017 Sep 6-9, Bordeaux, France
- (2) T. Uchida, M. Miftahussurur, R. Vilaichone, T. Ratanachu-ek, Y. Yamaoka, V. Mahachai, Histopathological Characteristics of H. pylori Infected Gastric Mucosa in Asia, European Helicobacter and Microbiota Study Group, 2016 Sep 15-17, Magdeburg Germany
- (3) T. Uchida, M. Miftahussurur, R. Pittayanon, R. Vilaichone, N. Wisedopas, T. Ratanachu-ek, Y. Yamaoka, V. Mahachai, Helicobacter pylori Infection in Thailand: A Nationwide Study of the CagA Phenotype, European Helicobacter and Microbiota Study Group, 2015 Sep 24-26, Nicosia, Cyprus

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。