

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007 — 2008  
 課題番号：19590709  
 研究課題名 (和文) マイクロアレイを用いたヘリコバクター・ピロリの鉄欠乏性貧血  
 関連遺伝子の研究  
 研究課題名 (英文) Study of *Helicobacter pylori* genes associated with iron deficiency  
 anemia using DNA microarray  
 研究代表者 加藤 晴一 (KATO SEIICHI)  
 東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
 研究者番号：90177452

## 研究成果の概要：

*Helicobacter pylori* が特に小児・若年者における鉄欠乏性貧血 (IDA) の発症に関連することが明らかとなった。したがって、*H. pylori* 関連の IDA の発症機序の解明に関して、*H. pylori* に IDA 責任遺伝子が存在するとの仮説に立ち、その特定を目指し DNA マイクロアレイ法を用いて全 *H. pylori* 遺伝子の発現を検討した。対象は IDA 小児 4 例および年齢と性をマッチさせた対照小児 4 例から分離した *H. pylori* 株である。また、両群各 2 株においては、鉄欠乏条件下で培養後に同様のマイクロアレイを行い、鉄イオンによる *H. pylori* 遺伝子の発現調節も検討した。対照株と比べて、IDA 株で有意に高い発現 (3.5 倍以上) を示した遺伝子は *HP0682*、*hopO*、*hopP* など 29 の遺伝子で、*ceuE1*、*iceA*、*frpB2* など 12 の遺伝子は有意に低い発現 (1/3.5 倍以下) を示した。中でも、外膜蛋白をコードする *hopO* 遺伝子と *hopP* 遺伝子は、*H. pylori* において鉄の取り込み機構に重要と報告されているヒトラクトフェリン結合蛋白の分子量 (70kDa) にほぼ一致しており、極めて高い発現差を示した *HP0682* (84 倍) と共に有力な IDA 責任遺伝子候補と考えられた。一方、*pfr*、*fur*、*fecA*、あるいは *feoB* など主要な鉄輸送・代謝関連遺伝子の発現は両群間で有意差がなく、IDA への関与は否定的であった。さらに、*vacA*、*cagN*、*babB*、あるいは *iceA* 遺伝子などいくつかの病原性関連遺伝子が有意な発現差を示し、何らかの機序で *H. pylori* における鉄の取り込み機構に関与をしている可能性が示唆された。

*H. pylori* 関連の IDA の病態解明は、*H. pylori* だけでなく、例えば腸内細菌叢の構成細菌あるいは病原性細菌がヒトの鉄代謝に及ぼす影響およびそのメカニズムを明らかにする可能性があると思われる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：*Helicobacter pylori*、マイクロアレイ、鉄欠乏性貧血

## 1. 研究開始当初の背景

1993年に *Helicobacter pylori* が小児の鉄欠乏性貧血 (IDA) に関与するとの報告 (Dufour C, et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 17: 225-227, 1993) がなされて以来、多くの症例研究および大規模疫学研究などにより、*H. pylori* が IDA ないし鉄欠乏性状態 (iron deficiency) の発生に関与することが明らかとなった (DuBois S, et al. *Am J Gastroenterol* 100: 453-459, 2005)。報告例の多くは小児ないし若年者であることは特記すべきである。我々が行った上部消化管内視鏡検査を受けた小児の検討 (Kato S, et al. *J Gastroenterol* 39: 734-738, 2004) でも、*H. pylori* 陽性群と陰性群で検査の発端となった症状において、腹痛、悪心・嘔吐、吐血、および下血の頻度に有意差はみられなかったが、唯一貧血の頻度 (*H. pylori* 陽性群、13.8%; 陰性群、1.1%) に有意差がみられた ( $p < 0.05$ )。今後、IDA の病態解明は臨床的に、そして基礎医学的にも極めて大きなテーマとなる可能性をはらんでいる。

発症機序は不明であるが、当初二つの仮説が報告されていた。第一の仮説は、*H. pylori* に起因する潰瘍やびらんなどからの粘膜出血を主因とするものである。しかし、特に IDA を発症する *H. pylori* 陽性の小児・青年において出血性粘膜病変は少なく、主因である可能性は低い。第二の仮説は、*H. pylori* 慢性感染が胃粘膜萎縮を引き起こし、結果としての胃酸分泌の低下により鉄イオンの吸収障害を招来する、との解釈である。しかし、我々の検討では、小児において有意な胃粘膜萎縮をきたすことは少なく (Kato S, et al. *Dig Dis Sci* 51: 99-104, 2006)、実際、*H. pylori* 感染の有無に関わらず小児の胃酸分泌能は保たれており (Kato S, et al. *Helicobacter* 9: 100-105, 2004)、胃酸分泌の低下を IDA の主因とするには無理があると考えられる。

最近、*H. pylori* 関連の IDA に対する有力な仮説として、*H. pylori* による積極的な鉄イオンの取り込みが提唱されている。そして、この仮説を支持するデータとして、*H. pylori* がラクトフェリン結合蛋白を外膜に発現し、これを介して宿主であるヒトから鉄イオンを奪取している可能性が指摘されている。鉄関連遺伝子の中では、フェリチン遺伝子 *pfr* (Choe YH, et al. *Helicobacter* 6: 55-59, 2001) および鉄イオン輸送蛋白をコードする *feoB* 遺伝子 (Jeon BH, et al. *Helicobacter* 9: 330-334, 2004) の二つが検討されているが、IDA への関与について肯定

的な結果は得られていない。一方、IDA の病態・病因に関して、1,500 以上ある *H. pylori* の全遺伝子を網羅的に検討した報告はない。

## 2. 研究の目的

今回の研究目的は *H. pylori* 感染による IDA の発症機序を解明することである。我々は *H. pylori* 因子に注目し、*H. pylori* 遺伝子の中に IDA 責任遺伝子が存在するとの仮説に立ち、DNA マイクロアレイ法を用いて *H. pylori* の全遺伝子の発現を解析し、責任遺伝子の特定を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象症例

消化管出血のない IDA 小児 4 例 (平均年齢、14.5 歳)、そして年齢および性をマッチさせた対照小児 4 例から分離した *H. pylori* 株を対象とした。IDA 群において、身長と体重は正常範囲内であり、偏食傾向がないことを含めて食事内容に問題はなかった。ヘモグロビン、血清鉄およびフェリチン値 (中間値) は 6.6 g/dL, 11  $\mu$ g/dL, そして 1.6 ng/mL であった。対照群におけるこれら血液・生化学的マーカーは正常であった。内視鏡所見は全例において胃炎のみであり、胃・十二指腸粘膜において、潰瘍、びらん、および出血性病変は認めなかった。便潜血反応 (免疫法) は全例で陰性であった。

なお、胃粘膜生検試料および *H. pylori* の臨床分離株の使用に関しては、患者およびその家族に研究目的・意義などを説明後に同意を得た (東北大学医学部倫理委員会、承認番号 2000-55 および 2001-269)。

### (2) *H. pylori* 感染診断

内視鏡検査時に得られた胃粘膜生検試料に対して、組織検査、ウレアーゼ試験、および培養法を行った。また、全例において  $^{13}\text{C}$ -尿素呼気試験 (Kato S, et al. *Am J Gastroenterol* 97: 1667-1673, 2002) を併用した。IDA 群の 4 例はすべての *H. pylori* 検査が陽性で、対照群 4 例は陰性であった。

### (3) 病理学的検討

Updated Sydney Classification System (Dixon MF, et al. *Am J Surg Pathol* 20: 1161-1181, 1996) に基づき、胃前庭部および胃体部から採取された粘膜生検組織を病理学的に検討し、両群間で比較した。

### (4) DNA マイクロアレイ

#### ① IDA 株と対照株の発現比較

IDA 群と対照群の各 4 株に対して、通常の培養条件下で 15-17 時間 *H. pylori* を液体培養 (exponential phase, OD<sub>600</sub> = 0.4-0.65) した後、RNA protect (QUIAGEN) で処理して total RNA を抽出した。抽出した RNA は 1% agarose gel electrophoresis により質的確認を行った。次に、total RNA (10mg) より cDNA を合成 (SuperScript II cDNA Conversion Kit)・抽出し、Cy3-nonomers によりラベルした。そして、*H. pylori* 26695 株のゲノム情報に基づいて作成した cDNA マイクロアレイ *HP26695* 4-plex array (NimbleChip, Roche NimbleGen) を用いて、16 時間、42°C でハイブリダイゼーションを行った。遺伝子発現の測定は GenePix 4000B microarray scanner で行い、IDA 群と対照群の遺伝子発現を比較検討した。

#### ② 鉄イオンによる遺伝子発現調節の検討

IDA 群と対照群の各 2 株に対して、鉄欠乏条件下 (deferrioxamine mesylate 50μM 添加) で液体培養後に total RNA を抽出し、上記 A) と同様の方法でマイクロアレイを行った。そして、同株における通常の培養条件下の遺伝子発現と比較して、鉄イオンによる発現調節を *H. pylori* 全遺伝子、特に、発現調節が報告されている既知の鉄輸送・代謝関連遺伝子に注目して検討した。

#### (5) 統計学的検討

両群間の有意な遺伝子の発現差は 3.5 倍以上と規定した。また、*t*-検定 (Bonferroni 補正法) による有意差検定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 胃粘膜の病理学的検討

Inflammation, Activity, *H. pylori* density、および Atrophy score の中間値 (胃前庭部 / 胃体部) は IDA 群で 3 / 1.5、1.5 / 1、2 / 1、0.5 / 0 で、対照群ではそれぞれ 2.5 / 1、1 / 0.5、1.5 / 1、0 / 0 であった。両群の各 score に差異は見られなかった。また、Intestinal metaplasia はいずれの症例でも認めなかった。

#### (2) 鉄イオンによる遺伝子発現調節

鉄輸送・代謝関連遺伝子において、通常培養条件下の結果と比較して、対照株および IDA 株共にフェリチン遺伝子 *pfr* は down-regulation (0.1-0.3 倍)、3 価の鉄イオン輸送蛋白遺伝子 *fecA1* および *frpB1* (4.0-17.3 倍) は up-regulation を示した。一方、Ferric uptake regulator *fur* 遺伝子 (1.0-1.9 倍)、*fecA2* (1.2-1.8 倍)、*fecA3* (0.6-0.8 倍)、*frpB2* (1.0-1.3 倍)、*frpB4* (1.0-1.0 倍)、そして 2 価の鉄イオン輸送蛋白遺伝子 *feoB* (0.8-1.3 倍) は有意な発現差を示さず、鉄イ

オンによる発現調節を受けていないと考えられた。

今回の結果は、基本的に既報の結果に一致した鉄イオンによる発現調節パターンを示しており、本法の妥当性が示唆された。

#### (3) IDA 株と対照株の発現比較

通常の培養条件下における検討において、IDA 群と対照群の遺伝子発現は  $r = 0.962$  と極めて良好な相関を示した。この結果は、本マイクロアレイ法の妥当性を支持するだけでなく、ほとんどの *H. pylori* 遺伝子は IDA の発症に関与していないことを示唆していると考えられた。

対照群に比べ、IDA 群で 29 の遺伝子が高発現 (3.5 倍以上) を示した。この中で、機能が特定・推定されているのは 10 遺伝子あり、外膜蛋白 (outer membrane proteins) をコードする *hopO* (10.9 倍、 $p < 0.001$ ) および *hopP* (3.7 倍、 $p < 0.001$ )、DNA 代謝に関与する *hsdM* (10.6 倍、 $p < 0.001$ ) や *mutY* (5.4 倍、 $p < 0.001$ )、そして病原性関連遺伝子とされる *leoA* (3.9 倍、 $p < 0.001$ ) や *terY* (3.5 倍、 $p = 0.020$ ) などが含まれる。一方で、機能が特定されていない遺伝子は 19 あり、中でも *HP0682* 遺伝子は 84.0 倍 ( $p = 0.003$ ) と極めて高い発現差を示した。

一方、対照群に比べ、IDA 群で 12 の遺伝子が有意な低発現 (1/3.5 倍以下) を示した。この中で、機能が特定・推定されているのは 6 遺伝子あり、残りの 6 遺伝子は機能が未解明のものであった。機能が判明している遺伝子では、3 価の鉄イオン輸送蛋白遺伝子の一つである *ceuE1* (0.02 倍、 $p < 0.001$ )、鉄イオンの輸送に関連するとされる *frpB2* (0.22 倍、 $p = 0.022$ )、外膜蛋白遺伝子 *palA* (0.03 倍、 $p < 0.001$ )、あるいは DNA 代謝に関与し毒性関連遺伝子とされる *iceA* (0.15 倍、 $p = 0.003$ ) などが含まれる。

上述したように、病原性関連遺伝子において、IDA 群で *leoA* と *terY* が有意な高発現を、*iceA* が低発現を示した。このほかに、*vacA* (3.2 倍、 $p < 0.001$ )、*babB* (0.4 倍、 $p < 0.001$ )、そして *cagN* 遺伝子 (0.5 倍、 $p < 0.001$ ) が 3.5 倍以下ではあるが有意な発現差を示した。一方で、*flaA* (1.0 倍)、*flaB* (1.1 倍)、*ureA* (1.2 倍)、*ureB* (1.0 倍)、*napA* (1.2 倍)、*oipA* (1.3 倍)、あるいは *cagA* (0.2 倍) など主要な病原性関連遺伝子は IDA 群と対照群間で発現に有意差は示さなかった。

#### (考察)

今回の検討で、有意な遺伝子の発現差を示した遺伝子の中に、IDA 責任遺伝子が存在する可能性が考えられる。特に、外膜蛋白をコードする *hopO* 遺伝子および *hopP* 遺伝子は鉄の取り込み機構に関与している *H.*

*pylori* のヒトラクトフェリン結合蛋白 (Dhaenens L, et al. *Infect Immun* 65: 514-518, 1997) の分子量 (70kDa) にほぼ一致しており、極めて高い発現差を示した *HP0682* 遺伝子と共に有力な IDA 責任遺伝子候補と考えられた。

一方、*frpB2* および *ceuE1* 遺伝子を除き、*pfr*、*fur*、*fecA1/2/3*、*frpB1/3*、および *feoB* 遺伝子などの主要な鉄輸送・貯蔵・調節遺伝子の発現は両群間で有意差がみられず、これら遺伝子の IDA の発症機序への関与は否定的と考えられた。

興味深いことに、*vacA*、*cagN*、*babB*、あるいは *iceA* などいくつかの病原性関連遺伝子が有意な発現差を示した。このことは、これらの遺伝子が *H. pylori* による鉄の取り込み機構に何らかの機序で関与をしている可能性を示唆するものと思われる。

以前、特に発展途上国において、*H. pylori* と低栄養ないし成長障害との関連が指摘されていた (Sullivan PB, et al. *Arch Dis Child* 65: 189-191, 1990)。その関連性に関しては賛否両論があり、結論に至っていない。しかし、*H. pylori* が高率に IDA ないし鉄欠乏状態を起こすことを考慮すると、「低い社会経済レベル — 高い *H. pylori* 感染率 (および食料事情の悪さ) — 高率の IDA ないし鉄欠乏状態の発生 — 低栄養ないし成長障害」という悪循環で Sullivan らの指摘を説明できる可能性が出てきた (Windle HJ, et al. *Pediatrics* 119: e754-e759, 2007)。今後の検討を待つ必要があるが、この悪循環説に基づいて考えれば、特に発展途上国においては、小児期の *H. pylori* 感染症に対する中心戦略が、「低栄養・成長障害の改善」という大きな臨床テーマに変化する可能性をほらんでいる。

## 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 2 件)

1) Kato S, Kikuchi S, Nakajima S. When does gastric atrophy develop in Japanese children? *Helicobacter* 13: 278-281, 2008 (査読有)

2) Kato S, Osaki T, Tsuchiya S, Nakayama Y, Kamiya S. A whole-genome DNA microarray in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with severe iron deficiency anemia. *Gut* 57 (Suppl II): A119, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1) 加藤晴一、藤村茂. 第 15 回日本ヘリコ

バクター学会、東京 (2009 年 6 月 25 日発表確定): 小児の再燃性・難治性鉄欠乏性貧血における *Helicobacter pylori* 感染の関与

2) Kato S, Osaki T, Tsuchiya S, Nakayama Y, Kamiya S. 第 16 回欧州消化器病週間 (United European Gastroenterology Week)、ウィーン (2008 年 10 月 20 日): A whole-genome DNA microarray in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with severe iron deficiency anemia

3) 加藤晴一、大崎敬子、中山佳子、藤村茂、神谷茂. 第 15 回日本ヘリコバクター学会、東京 (2009 年 6 月 25 日発表確定): DNA マイクロアレイ法による鉄欠乏性貧血関連 *Helicobacter pylori* の検討

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

(2007 年度-2008 年度)

加藤 晴一 (KATO SEIICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号: 90177452

### (2) 研究分担者

(2007 年度)

藤村 茂 (FUJIMURA SHIGERU)

宮城大学・看護学部・准教授

研究者番号: 70295393

### (3) 連携研究者

(2008 年度)

藤村 茂 (FUJIMURA SHIGERU)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号: 70295393