

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：17501  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2013  
 課題番号：23791141  
 研究課題名（和文）ヘリコバクター・ピロリ菌の病原遺伝子判定キットの開発  
 研究課題名（英文）Development the detection kit for Helicobacter. pylori pathogenic genes  
 研究代表者  
 綿田 雅秀 (WATADA MASAhide)  
 大分大学・医学部・医員  
 研究者番号：30583778

研究成果の概要（和文）：ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）において cagA 遺伝子は最も研究されている病原因子であるが、日本ではほとんどが cagA 陽性菌であり cagA の有無だけでは疾患との関係を説明できない。そのため今回病原性の疑われる新たな遺伝子を選出し、海外のサンプルと比較しながら、また日本の異なる疾患群で比較しながらその評価を行った。更に効率的にそれらの遺伝子を評価する方法の開発および条件設定を行った。

研究成果の概要（英文）：It is known that most Helicobacter. pylori strains are cagA positive in Japan. Therefore I selected several candidate virulent genes which were supposed to be beneficial in Japan, and I evaluated these genes with a large number of samples from the US, Colombia, and Japan population. Secondary I developed a method which evaluates a number of pathogenic genes at once.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症診断学、ヘリコバクター・ピロリ、ピロリ菌、cagA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ピロリ菌治療における臨床上的問題点  
 ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）は疫学的に消化性潰瘍や胃癌の主要な原因である。研究開始時においては日本ヘリコバクター学会により発表されたピロリ菌感染の診断と治療のガイドライン 2009 改訂版ですべてのピロリ菌感染者が除菌治療を受けることを推奨されていたが、医療保険上は限られた疾患のみが除菌治療の保険適応となつて

いた。またピロリ菌感染者がすべてこれらの疾患になるわけではないことから、疾患発症における高危険群の同定が重要であった。

## (2) ピロリ菌の病原因子について

ピロリ菌の病原遺伝子としては、cagA 遺伝子が最も研究されており、cagA 遺伝子を有する菌の中で東アジア型 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。

### (3) 日本での問題点

cagA は最も研究されている病原因子であるが、日本でのピロリ菌はほとんど cagA 陽性であり cagA の有無だけでは疾患との関係を説明できない状況である。

## 2. 研究の目的

(1) cagA 以外に報告されている病原因子としては、hopQ1 型、babA、homB、oipA “on” 型や dupA がある。この中で dupA は、菌株間に遺伝子の多様性が認められるいわゆる plasticity region (不安定領域) にある遺伝子であるが、この plasticity region とは、ピロリ菌が保有する 50 ほどの遺伝子が存在する領域で、この領域の遺伝子は各菌株に特有のものが多く、cagA が存在する領域と同様に病原性に関わるとの報告が多い。日本では plasticity region にある遺伝子が病原性を有している可能性があり、我々の研究では日本におけるピロリ菌の病原因子をこの領域を含めて同定することを目的の一つとする。

(2) 上述のように多くの病原因子が現在確認されているが、それらの一度に評価できる方法の開発はされていない。そこで今回の研究では日本において病原性の高い遺伝子も含めて複数の病原因子を同時に測定するためのドットプロット法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 日本株、アメリカ株、コロンビア株の比較による病原遺伝子の特定

我々および他のグループが *H. pylori* の全遺伝子を網羅的に Microarray で解析した報告から cagA と関連のある遺伝子や plasticity region に存在する遺伝子を選択し、次に、米国で単離された 163 株 (胃炎 87 株、十二指腸潰瘍 (DU) 38 株、胃潰瘍 (GU) 25 株、胃癌 (GC) 13 株)、コロンビア 70 株 (胃炎 22 株、DU22 株、GC26 株)、日本 57 株 (胃炎 19 株、DU10 株、GU10 株、GC18 株) の DNA を PCR 法にて遺伝子の有無を確認した。

(2) 全塩基配列を調べた株からの新たな病原遺伝子候補の選択

我々のグループにおいて全塩基配列を調べられた日本株 8 株 (DU 株 4 株、GC 株 4 株) の臨床株を比較して、GC 群 4 群全てで存在が認められ、かつ DU 群で存在が認められない

遺伝子 1 つと、GC 群 3 群全てで存在が認められ、かつ DU 群で存在が認められない遺伝子 6 つを候補遺伝子として選定した。その後日本の臨床株 (DU 株 58 株、GU 株 50 株および GC 株 32 株) を選定し、それぞれの DNA を PCR 法にて遺伝子の有無を確認した。

### (3) ドットプロット法による評価

データベース登録されている菌株の塩基配列をもとにプライマー設計を行い、PCR を施行。PCR 産物を標識することで各病原性遺伝子特異的プローブを作成し、ドットプロット法を行った。全てのプローブをメンブレンに固相化し、1 回の解析ですべての遺伝子の評価を行った。

### (4) 宿主側の遺伝子の評価

胃癌の発生には菌側の因子以外にも、宿主因子や環境因子の関連が報告されていることから、ブータンにて採取された検体を用いて RNA microarray を行い、東アジアにおける宿主因子の検索を行った。

## 4. 研究成果

(1) Microarray データから cagA と関連のある hp0967、hp1426、jhp0045、jhp0951 の 4 つの遺伝子を選択した。jhp0951 は plasticity region に存在し、jhp0951-jhp0950 が DU と関連があるという報告もあることから、jhp0950 も追加した。コロンビア株における検討で、jhp0045、および jhp0046 が cagA と有意な相関を持つことが確認された (図 1、図 2)。しかし日本やアメリカにおいても同様の傾向は認めるもののサンプル数や陽性率の違いによりこれらの遺伝子の疾患との有意差を確認するまでにはいたらなかった。また plasticity region に存在する jhp0950 を軽度胃炎群 (OLGA 分類 2 以下) と胃癌群で比較検討したところ、胃炎群で 29% の陽性率に対し胃癌群では 67% の陽性率を認め、胃癌との関連が示唆された ( $p < 0.05$ )。しかしいくつかの陽性サンプルの DNA 配列には途中で終止コドンをもつものもあり、さらなる検討が必要である。

図 1) コロンビアにおける *cagA* 陽性群の *jhp0045* 陽性率

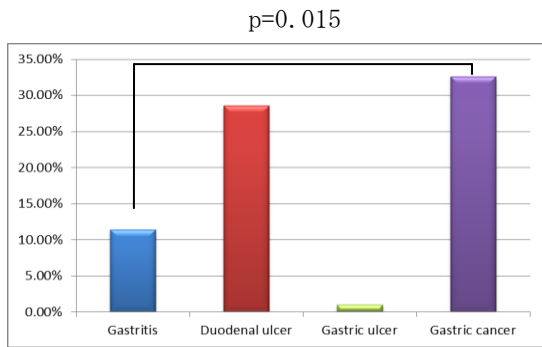
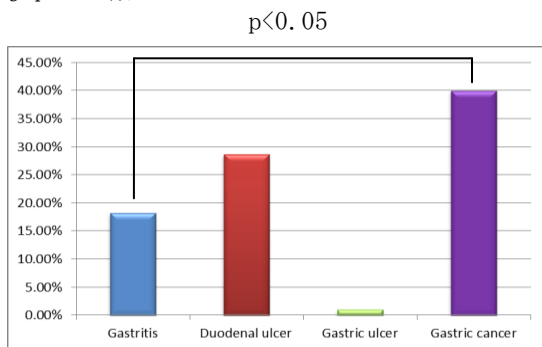


図 2) コロンビアにおける *cagA* 陽性群の *jhp0046* 陽性率



(2) 全塩基配列を調べた日本株 8 株から選定された遺伝子 1~7 の各候補遺伝子について塩基配列を比較検討したところ、遺伝子 4 と遺伝子 7 は相同する遺伝子であった。またこの遺伝子のプライマーの作成を試みたが、非特異的なバンドを多く認め、作成が困難であった。遺伝子 5 は“*dorA*”という遺伝子と相同する部位を持ち、この遺伝子と判別が可能なプライマーセットの作成を試みたが、今回作成することが出来なかった。遺伝子 6 は他の全遺伝子配列が報告されている菌株で調べたところ、いくつかの菌株では遺伝子間領域に含まれているものがあったため、今回の検討では除外することとした。

今回比較検討が出来た遺伝子は遺伝子 1、2 および 3 であり陽性率を以下に示す (表 1)。ただし遺伝子 2 は全てのサンプルで 90%以上の陽性率を示したため、除外した。

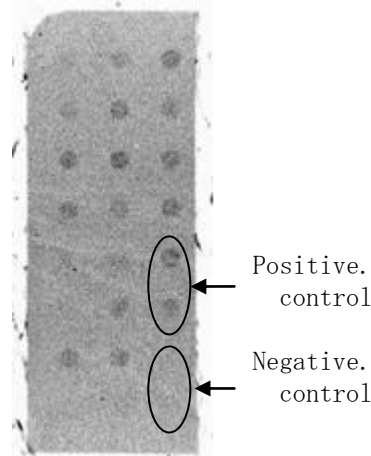
表 1) 各遺伝子の疾患別陽性率

|       | DU    | GU    | GC    |
|-------|-------|-------|-------|
| 遺伝子 1 | 53.4% | 52.0% | 43.8% |
| 遺伝子 3 | 67.2% | 76.0% | 56.3% |

いずれも P 値>0.05 であり、明らかな疾患間での有意差は認めず新たな病原遺伝子の検出は確認されなかった。

(3) すでに病原遺伝子として報告されている *dupA*、*jhp0949* および *cagA* に加え、今回の研究で評価対象とした遺伝子群にて DNA 用のプローブを作成しドットプロット法による評価を行った。各遺伝子はそれぞれ遺伝子内で異なった領域を認識するプローブをドットプロット用のメンブレンに固定し、複数の遺伝子領域を評価するメンブレンを作成した。下図は J99 という *H. pylori* の菌株をプローブとしてハイブリッドさせ、計 22 の遺伝子を一度に評価したものである (図 3)。

図 3) J99 株における病原遺伝子の評価



発光の強弱はあるものの、対象となるサンプルを設定することでほぼ確実に陽性、陰性を判定可能であった。しかし、1 枚のメンブレンにより複数回の判定を目標としていたが、発光が前のサンプルで強かった場合、時間を置いてもバックグラウンドとして残ってしまい、2 回目以降のメンブレンの使用に支障を生じた。この問題を解決するために各プローブの濃度調整やサンプルの濃度調整、感受性の異なる 3 種の試薬を使い分ける等行なっている。

(4) ブータンにて採取された検体を用いて RNA microarray を行い、500 以上の宿主因子の可能性のある遺伝子が検出された。

(5) 今回の研究成果として、*jhp0045* と *jhp0046* という *cagA* と関連し、日本のピロリ菌株において病原因子となりうる遺伝子の発見があった。残念ながら日本においてはこの遺伝子の陽性率が低いことも関連して、今回の研究では十分量のサンプルの検討が行えず有意差を得るにいたらなかったが、さら

なる追加実験により今後有用な遺伝子となる可能性がある。

また全塩基配列を調べた日本株8株の検討であるが、DU症例とGC症例で最も差のあった遺伝子を調べ、今回は有意差を認めなかった。この比較を行うにあたってはDU症例は胃癌のリスクが低いという報告を基にしているが、臨床的にはDU症例であっても条件によっては胃癌を来すリスクの高い症例はあると思われるため、今後は抽出された症例の背景胃粘膜等も考慮してさらなる候補遺伝子の選出を行い、より効率的に病原遺伝子の検出を行う予定である。

また本研究では今回発見された遺伝子や既知の病原遺伝子に対して効率的に病原性の高いピロリ菌の検出を行う方法を試みた。単回での使用には問題なかったが、複数回同じメンブレンを使用する際、あまりに強い陽性反応が生じると、次にバックグラウンドとして残ってしまう問題が生じた。3種類の感受性の異なる発光試薬を使い、条件設定を行っているが、経済的な側面から実用性には問題点がまだ多く、さらなる検討を行う予定である。今後は宿主側の因子も同様に測定できるように追加検討も行う。宿主側のリスク因子としては500以上の遺伝子を同定できており、今後は菌側の因子と並行して研究を行う。

当研究を始めた時点では、ヘリコバクター感染性胃炎のみでは保険治療の対象外であったが、現在は全てのヘリコバクター陽性胃炎が保険治療の適応となっている。しかし除菌後も胃癌のリスクが完全になくなるわけではなく、今後は除菌後の発癌因子として、本研究のような新たな病原遺伝子の検出および効率的な検出方法の模索を進めていく必要がある。除菌後にどのような症例に対して詳細なフォローアップを行う必要があるのかということが今後の臨床上の大きな問題であり、本研究のような検討を引き続き行っていくことが重要と思われた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Watada M, Shiota S, Matsunari O, Suzuki R, Murakami K, Fujioka T, Yamaoka Y., Association between *Helicobacter pylori* cagA-related genes and clinical outcomes in Colombia and Japan, BMC Gastroenterology. 査読有, 2011 Dec 22;11:141. DOI:10.1186/1471-230X-11-141.

[学会発表] (計1件)

- ① 発表者 綿田 雅秀  
発表表題 「Association between *Helicobacter pylori* cagA-related genes and clinical outcomes」  
学会名 「Asian Pacific *Helicobacter Pylori* Meeting 2012」、  
発表年月日 2012年1月14日  
発表場所 クアラルンプール (マレーシア)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

綿田 雅秀 (WATADA MASAHIDE)  
大分大学・医学部・医員  
研究者番号：30583778

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし