

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02657

研究課題名(和文) アジアにおけるピロリ菌分子疫学研究の推進

研究課題名(英文) Promotion of molecular epidemiological studies of H. pylori in Asia

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) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：アジア各国において、国際共同研究を推進して、内視鏡検査を用いた疫学調査を実施し、1)ピロリ菌の病原因子の解析、2)ヒトの疾患感受性因子の解明、3)ピロリ菌とヒトの相互作用と共進化の理解、という3つの命題の取り組むことを目標とした。事業内に、アジア11カ国で(ブータン、インドネシア、モンゴル、タイ、ミャンマー、スリランカ、ベトナム、ネパール、バングラディシュ、ラオス、マレーシア)胃粘膜検体を得て、ピロリ菌を培養し、ピロリ菌およびヒト側の遺伝子解析を行い、感染率、ピロリ菌病原因子、ヒト側SNPなどと疾患及び胃粘膜炎症との関連性を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：The aims of this project were 1) evaluating the virulence factors of Helicobacter pylori, 2) evaluating the host factors related to the development of gastroduodenal diseases, and 3) understanding of the interaction and co-evolution between H. pylori infection and host genetic factors, by performing epidemiological studies using endoscopy among Asian population as international collaborative studies. During the periods of the projects, I could collaborate with researchers in 11 Asian countries (Bhutan, Indonesia, Mongolia, Thailand, Myanmar, Sri Lanka, Vietnam, Nepal, Bangladesh, Laos and Malaysia), and could obtain gastric biopsy specimens, and could succeed to culture H. pylori. By genomic analyses, I could identify the importance/association between gastroduodenal diseases/gastric mucosal damages and the prevalence of the infection, H. pylori virulence factors and host SNPs.

研究分野：消化管感染症

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 病原因子 胃癌 次世代シーケンサー 内視鏡検査

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)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。ピロリ菌感染は、感染後すみやかに死に至る感染症ではないが、長期的には胃癌などの重大な結果をもたらすことから、人類最大規模の新興感染症であるといっても過言ではない。我が国では、すべてのピロリ菌関連疾患に対する除菌治療が保険適応となり、ピロリ菌感染は我々が克服すべき重要疾患と位置づけられた。一方、ピロリ菌感染による疾患発症メカニズムは未だ不明な点が多い。単一の病原体がどうして多彩な疾患の原因となるのか、多くの感染者の中からどのような背景をもつ宿主が特定の疾患を発症するのかについてはほとんど明らかではない。また、地域により疾病パターンが異なり、日本を始めとする東アジアの胃癌発症率は欧米に比べて圧倒的に高い。また同じアジアでも、タイやミャンマーでは感染率は高いにもかかわらず、胃癌の発症率は非常に低く、Asian Enigma と呼ばれている。

我々は、長年アジアを中心としたピロリ菌の分子疫学研究を行ってきており、ピロリ菌の臨床分離株の保有数は7,000株を超え、世界最大規模である。私は、胃癌発症に関連すると考えられているピロリ菌病原因子CagAの構造が東アジアと欧米では異なり、この違いが両地域の胃癌発症数の差となっていることを世界に先駆け提唱しOipAやDupAという新規ピロリ菌病原因子を発見・命名するなどの成果をあげてきた。同時に、ピロリ菌の遺伝子型を解析することで、世界の諸民族がどのような経路をたどって移動してきたかを科学的に推測できることを証明してきた。

このような研究成果をあげられた背景には、強固な国際共同研究を行ってきたことがあげられる。平成19-21年度概算要求特別教育研究経費「東アジアにおけるヘリコバクター・ピロリ感染と胃癌研究の拠点形成」に始まり、平成21-23年度戦略推進費「アジアにおけるヘリコバクター・ピロリ菌の分子疫学研究」、さらに、平成22-24年度組織的な若手研究者等海外派遣プログラム「東アジア分子疫学研究推進のための若手研究者派遣プログラム」では、若手研究者をアジア各国に派遣させ、外交力を備えた多くの人材を育てた。平成24-26年度基盤研究(B)「東南アジアにおけるピロリ菌分子疫学研究：新規病原因子の探求と人類動の解明」では、当初の予定を超えた多くの国で疫学調査を行うことができた。さらに、平成22-24年度頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム「消化器感染症の最先端研究と中米におけるフィールド調査」、平成26-28年度頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラム「世界最高峰のヘリコバクター・ピロリ研究を目指す消化器病研究拠点形

成」では、文字通り、大分大学を世界最高峰のピロリ菌研究拠点にする計画である。その一環で、国費留学生の受入れにも精力的で、「**ピロリ菌感染症研究留学生人材育成プログラム**」を平成21年に開設し、多くの留学生が生が、私の講座でピロリ菌研究を行っている。

さて我々は、今までピロリ菌因子に焦点を絞って研究を進めてきたが、ピロリ菌のみで疾患発症メカニズムが完全に説明できるわけではない。強病原性のピロリ菌に感染していても、胃癌にも消化性潰瘍にもならず一生を過ごすヒトの方が圧倒的に多いという事実から考えても、ピロリ菌関連疾患は、宿主の遺伝的因子も関与している多因子疾患といえる。ピロリ菌関連疾患の発症メカニズムを解明するには、ピロリ菌とヒトの因子の双方を解析し、両者の相互作用を深く理解する必要があることは明らかである。またピロリ菌は人類とともに移動してきたことから、ピロリ菌の遺伝子を解析することで、諸民族の移動経路を推測できることを解明してきたが、移動の過程でピロリ菌の病原性は変化しており、この過程にもピロリ菌とヒトの相互作用がかかわっているといえる。このような背景から、国際共同研究(疫学調査)を行ないピロリ菌研究拠点の形成を目指した事業を計画した。

2. 研究の目的

アジア各国において、国際共同研究を推進して、胃十二指腸内視鏡検査を用いた疫学調査を実施し、**1)ピロリ菌の病原因子の解析、2)ヒトの疾患感受性因子の解明、3)ピロリ菌とヒトの相互作用と共進化の理解**、を目的とする国際共同研究拠点の形成を目指す。胃癌に代表されるピロリ菌関連疾患の発症メカニズムを明らかにすることで、新規治療法の開発、胃癌発症率の減少、ピロリ菌とヒトの共進化の歴史・人類移動の解明など、世界の医学および予防医学の進歩、歴史、文化の発展に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

上記の3つの目的のため、アジア各国において、国際共同研究を推進して上部消化管内視鏡検査を用いた疫学調査を実施し、ピロリ菌バンクおよびヒト遺伝子バンクを構築する。**1)ピロリ菌の病原因子の解析**では、次世代シーケンサーおよび次世代シーケンサーを用いた全遺伝子解析にて、新規病原因子を探索し、**2)ヒトの疾患感受性因子の解明**では、胃癌由来株および十二指腸潰瘍株を材料として、GWASにてヒトの疾患感受性因子を探索し、**3)ピロリ菌とヒトの相互作用と共進化の理解**では、ピロリ菌の全遺伝子およびヒトのGWASによるSNPデータを対応させ、その対応関係を解析する。

4. 研究成果

(1) アジアでの実際の疫学調査

平成 27 年度は、4 月に**ブータン**西部のハーにて約 200 名に内視鏡検査を施行し、迅速ウレアーゼ試験を実施、ピロリ菌陽性者には、除菌薬を配布、さらに培養用の検体、DNA/RNA 用の検体 (All Protect にて保存) 病理組織用検体、血清の採取も行った。また、5 月には、**インドネシア**のスラウェシ島のマナド、スマトラ島のバンダ・アチェ、8 月にはインドネシアのティモール島のクパン、バリ島でも同様に内視鏡検査を施行した。さらに 8 月には、**モンゴル**の西部、世界で最も胃癌発症率の高いウブス、さらにモンゴル北部ロシアとの国境に近いフクスブルでも、内視鏡検査を施行した。さらに、8 月に**タイ・ミャンマー**国境域のラノンに出かけ約 200 名に内視鏡検査を施行、平成 28 年 1 月にはタイ・ミャンマー・ラオス国境の黄金の三角地帯で内視鏡検査を施行、3 月にはインドネシアのスマトラ島沖合に浮かぶニアス島およびスマトラ島のトバ湖周辺の村でも内視鏡検査を施行した。

平成 28 年度は、8 月にモンゴル (南部ゴビ砂漠周辺、東部チングスハーン) およびインドネシア (メラウケ: パプア)、平成 29 年 2 月には**ミャンマー** (南部タイ国境域のモウラマイン)、3 月にインドネシア (スラウェシ島 [コラカ、パル]、マルク諸島 [テルナテ]) で内視鏡検査を行った。

さらに平成 29 年 3 月には、マレーシア (ボルネオ島) のサバ大学およびエリザベス病院で、共同研究の最終打ち合わせを行うことができ、同 8 月から現地医師が内視鏡調査を行い、検体を日本に送るシステムが稼働するようになった。なお、サバ大学とは大学間協定を締結することもできた。平成 29 年度はさらに、11 月に**スリランカ** (キャンディ) にて内視鏡検査を施行した。また、8 月にはブータンを訪問、厚生大臣とも相談して、今後のブータンでの胃癌撲滅対策についての意見交換を行うことができた。

以上の調査により、モンゴル、インドネシア、ブータンでは国内をほぼ網羅する地域でのデータを得ることができた。なお、これらの国とは別に、ベトナムでは、現地の医師が特に胃癌症例および十二指腸症例について検体を集めてくれ、定期的に大分大学に輸送するシステムが確立して、現在 300 例以上の胃癌症例を集めることができた。さらに、山岡は、モンゴルのモンゴル国立医科大学、インドネシアのアイランガ大学の客員教授にも就任して、現地の学生の指導を行うこととなった。

(2) 各国でのデータ解析

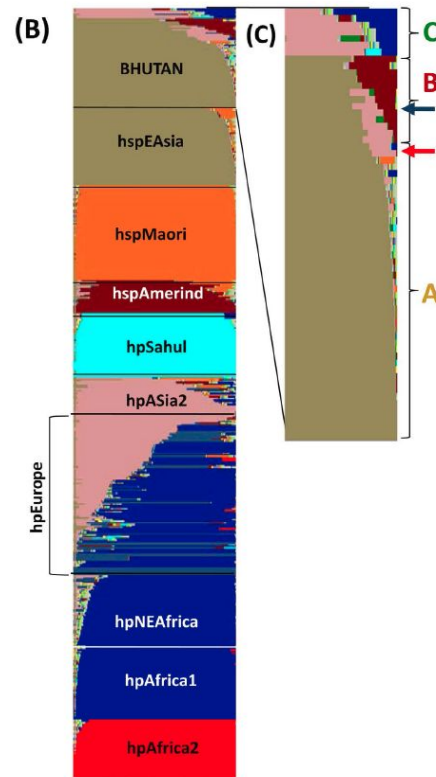
ブータン

ブータンにおけるピロリ菌に関して国際医学誌に 8 論文を発表することができた。**ピロリ菌の病原因子の解析**では、CagA の構造が強毒性の東アジア型であるが、通常見られる

タイプ (ABD 型) とは異なり、3' 領域の繰り返し配列が複数存在し、毒性がさらに増す可能性が示唆された (下図; Sci Rep 2016 より)。

	Total	Gastritis	Gastric ulcer	Duodenal ulcer	Gastric cancer	others
Western-type CagA						
AB'	1	1	0	0	0	0
AC	1	1	0	0	0	0
ABC	13	9	3	1	0	0
Total	15	11	3	1	0	0
East Asian-type CagA						
ABD	82	68	5	7	1	1
AB'D	1	1	0	0	0	0
ABBD	5	5	0	0	0	0
AB'BD	97	72	13	10	0	2
AB'BBD	2	2	0	0	0	0
BD	2	1	0	1	0	0
Total	189	149	18	18	1	3

さらに、**ヒトの疾患感受性因子の解明**では TLR の発現 (J Infect Dis 2015)、RAD51 の SNP (Epidemiol Infect 2016)、オートファジー関連遺伝子の SNP (Helicobacter 2017) が胃粘膜炎症に関与していることを報告した。**ピロリ菌とヒトの相互作用と共進化の理解**では、ブータンのピロリ菌にはアメリカ原住民の菌の要素が含まれていることを報告した (下図; Sci Rep 2016 より)。



インドネシア

インドネシアにおけるピロリ菌に関して国際医学誌に 7 論文を発表することができた。非常に興味深いことは、発展途上国で衛生状態も悪い国にもかかわらず、特にジャワ人は極端にピロリ菌感染率が低かったことである (PLoS One 2017)。しかし民族により感染率は異なり、例えばパプア人は約半数が感染していた。**ピロリ菌の病原因子の解析**では、次世代シーケンサーを用いた解析で、cag pathogenicity island (PAI) や Plasticity region を検討し、cag PAI を保持しているだけでなく、Intact な状態であることが病原性に重要であ

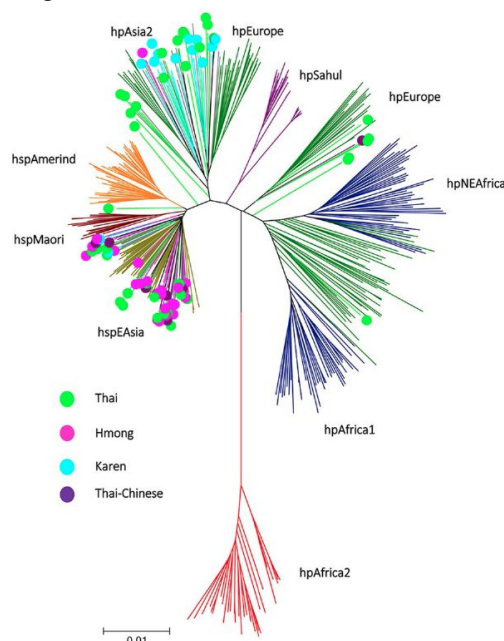
ることを証明した (Sci Rep 2018)。現在、**ピロリ菌とヒトの相互作用と共進化の理解**について検討を重ねているが、一部の民族の菌にはアジア大陸以外の菌の要素が含まれているなど興味深い発見が相次いでおり、現在さらなる解析を行っている。

モンゴル

胃癌死亡率ワースト1位のモンゴルにおけるピロリ菌に関して国際医学誌に4論文を発表することができた。モンゴルでは非常にピロリ菌感染率が高く、そのことが胃癌が多い理由と考えられたが (Gut Pathog 2018)、**ピロリ菌の病原因子の解析**では、興味深いことにモンゴルのピロリ菌が予想に反して、弱毒性と考えられている欧米型 CagA を保持していた。免疫組織化学法による検討はすでに発表し (World J Gastroenterol 2015)、現在遺伝子レベルでの検討を行っている。ただし、**ピロリ菌とヒトの相互作用と共進化の理解**という観点で調べると欧米型 CagA 菌は、純粋な欧米型ではなく、ピロリ菌がアフリカからアジアに進出してきた歴史を反映していることが徐々にわかってきており、現在論文を執筆中である。

タイ

タイにおけるピロリ菌に関して国際医学誌に7論文を発表することができた。興味深いことは、北部 (胃癌が南部に比べて多い) と南部では感染率に差があることであった (北部で感染率が多い)。一方、病原性に関して南部と北部であまり差はなく、胃癌の発症率に最も関与しているのは、感染率の差であることが考えられた (PLoS One 2017)。また民族により、菌の種類は異なり、Hmong 族は東アジア型、Karen 族はアジア2型の菌を多く保持していることも判明した (下図; Gut Pathog 2017)。



ミャンマー

ミャンマーにおけるピロリ菌に関して国際医学誌に3論文を発表することができた。**ピロリ菌の病原因子の解析**では、*cagA*, *vacA* という良く知られたピロリ菌病原因子に加えて、外膜蛋白遺伝子 *bab* の詳細な解析を行った (PLoS One 2017)。

スリランカ

現在解析中であるが、84名の検討でピロリ菌陽性者はわずか2名で、しかもこれらの菌がかなり特徴的であることを見出しており、現在さらなる検討を行っているところである。さらに現地医師が引き続いて検体採取を行ってくれており、平成30年秋ごろには400検体が集まる予定である。

その他の国

ベトナムでは、定期的に胃粘膜検体が輸送されており、その解析の結果、国際医学誌に5論文を発表することができた。**ピロリ菌の病原因子の解析**では、*cagA* のタイプはほぼ均一のため、*vacA* のタイプが胃癌と関連あることを報告した (Gut Pathog 2017)。さらに、13の少数民族からのピロリ菌についても解析を行い、エデ族の菌のみ、欧米型 CagA を保持していることがわかり (Int J Mol Sci 2018)。現在次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行っているところであり、**ピロリ菌とヒトの相互作用と共進化の理解**に新たな光を差し込める可能性を秘めている。さらに、当初の目的であったヒトの遺伝子の GWAS に関して検討を進め、ベトナムにおける胃癌症例と十二指腸潰瘍症例で異なる遺伝子変異の候補が見つかり、現在詳細な検討を行っているところである。

さらに、**ネパール**関連で国際医学誌に5論文、**バングラディッシュ**関連で国際医学誌に3論文、**ラオス**関連で国際医学誌に1論文、など予想をはるかに上回る成果を出すことができた。

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111件、うち国際医学誌73件) (*: Corresponding author) すべて査読有

Waskito LA, (他8名), Yamaoka Y*. Distribution and clinical associations of integrating conjugative elements and *cag* pathogenicity islands of *Helicobacter pylori* in Indonesia. Sci Rep. 2018;8(1):6073. doi:10.1038/s41598-018-24406-y.

Khasag O, (他6名), Yamaoka Y*. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection and other risk factors among Mongolian dyspeptic patients who have a high incidence and mortality rate of gastric

cancer. Gut Pathog. 2018;10:14. doi: 10.1186/s13099-018-0240-2.

Binh TT, (他 12 名), Yamaoka Y*. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a minor ethnic group of Vietnam: A multiethnic, population-based study. Int J Mol Sci. 2018;19(3). pii: E708. doi:10.3390/ijms19030708.

Ansari S, (他 15 名), Yamaoka Y*. *Helicobacter pylori* bab characterization in clinical isolates from Bhutan, Myanmar, Nepal and Bangladesh. PLoS One. 2017;12: e0187225. doi: 10.1371/ journal.pone. 0187225.

Subsomwong P, (他 5 名), Yamaoka Y*. Prevalence, risk factors, and virulence genes of *Helicobacter pylori* among dyspeptic patients in two different gastric cancer risk regions of Thailand. PLoS One. 2017; 12 :e0187113. doi:10.1371/journal. pone. 0187113.

Subsomwong P, (他 7 名), Yamaoka Y*. *Helicobacter pylori* virulence genes of minor ethnic groups in North Thailand. Gut Pathog. 2017;9:56. doi:10.1186/s13099 -017 -0205-x.

Binh TT, (他 10 名), Yamaoka Y*. Advanced non-cardia gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection in Vietnam. Gut Pathog. 2017;9:46. doi:10.1186/ s13099-017-0195-8.

Tanaka S, Nagashima H, Uotani T, Graham DY, Yamaoka Y*. Autophagy-related genes in *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2017;22(3). doi:10.1111/hel. 12376.

Miftahussurur M, (他 16 名), Yamaoka Y*. Gastric mucosal status in populations with a low prevalence of *Helicobacter pylori* in Indonesia. PLoS One. 2017;12(5):e0176203. doi: 10.1371/journal.pone.0176203.

Trang TT, (他 6 名), Yamaoka Y*. RAD51 G135C genetic polymorphism and their potential role in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori* infection in Bhutan. Epidemiol Infect. 2016;144:234-40. doi: 10.1017/S0950268815001430.

Matsunari O, (他 8 名), Yamaoka Y*. Rare *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Bhutan. Sci Rep. 2016; 6:22584. doi: 10.1038/srep22584.

〔学会発表〕(計 55 件、うち招待講演 28 件)

Yamaoka Y. Current status of *Helicobacter pylori* study and its future prospect. 7th Mongolian Digestive Disease Week. 2017, Ulaanbaatar, **Mongolia**. 招待講演

Yamaoka Y. Recent updates on basic research of *H. pylori* in Japan. 14th Japan-Korea Joint Symposium on *Helicobacter* Research. 2017, Seoul, **Korea**. 招待講演

Yamaoka Y. Epidemiology and disease association of *H. pylori*. Asian Pacific Digestive Week. 2016. Kobe, **Japan**. 招待講演

Yamaoka Y. GI complication of *H. pylori* infection. 33rd World Congress of Internal Medicine. 2016, Bali, **Indonesia**. 招待講演

Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* virulence and gastric cancer pathogenesis. Singapore Gastric Cancer Consortium; 9th Annual Scientific Program. 2016, Singapore, **Singapore**. 招待講演

Yamaoka Y. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in ASEAN countries: Focused in Indonesia. KONKERPAS PPHI-PGI-PEGI2015. 2015, Malan, **Indonesia**. 招待講演

〔図書〕(計 3 件)

山岡吉生. 医薬ジャーナル社. 病原菌の今日的意味 改正 5 版. 2018 (in press)

Miftahussurur M, Yamaoka Y. Springer Japan, *Helicobacter pylori*. 2016 (267 pages)

Miftahussurur M, Yamaoka Y. Springer Japan, *Helicobacter pylori* Research: from Bench to Bedside. 2016 (613 pages). Backert S and Yamaoka Y. Ed.

〔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 なし

(3) 連携研究者

徳永 勝士 (TOKUNAGA KATSUSHI)
東京大学・医学(系)研究科 教授
研究者番号: 40163977

斉藤 成也 (SAITOU NARUYA)
国立遺伝学研究所・集団遺伝研究部門 教授
研究者番号: 30192587

鈴木 留美子 (SUZUKI RUMIKO)
大分大学・医学部 助教
研究者番号: 70599092

(4) 研究協力者

ブータン

Lotay Tshering

インドネシア

Ari Syam

モンゴル

Khasag Oyuntsetseg

タイ

Varocha Mahachai,
Ratha-korn Vilaichone

ミャンマー

Thein Myint

スリランカ

Md Lamawansa

ベトナム

Ho Dang Quy Dung
Vu Van Khien

ネパール

Pradeep Krishna Shrestha

バングラディシュ

Hafeza Aftab
AK Azad Khan

ラオス

Sengdao Vannarath

マレーシア

Kamruddin Ahmed