

平成30年6月7日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08952

研究課題名(和文) 胃内ピロリ菌フローラ(遺伝子多様性)形成と各種疾患・病態との関連性の解明

研究課題名(英文) Clarification of the relationship between Helicobacter pylori flora and related diseases

研究代表者

水田 洋 (Mizuta, Hiroshi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：70527605

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)：Helicobacter pylori (HP) は著しい遺伝子多様性を有していることが知られているが、実地臨床で薬剤感受性を調べる場合、1カ所の生検組織から分離・培養された一株の感受性検査しか行われていない現状がある。そこで、今回我々は同一患者から胃前庭部、体部より生検・培養を行い、発育したHPを各々6株ずつ釣菌し(計12株/患者)、除菌治療に使用される4剤について感受性を調べたところ、同一患者から採取した複数の臨床分離株でも株間で薬剤感受性に違いがみられており、多様性を呈するピロリ菌叢(フローラ形成)を意識した治療の必要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori (HP) is characterized by the great genetic diversity. However, the drug susceptibility test is usually performed for only 1 strain per patient in clinical practice. We performed biopsies from the corpus and antrum of the stomach in all patients, cultured HP, and identified 6 strains at each part (total of 12 strains per patient). The sensitivity of HP to four antimicrobial drugs was examined. We found bacterial susceptibility to antimicrobial drugs differed among the strains colonized in the same patients. Therefore, it is difficult to discuss drug resistance by the verification of only one strain from individual patient. Regarding to effective eradication therapy, it is important to know the great diversity of drug-susceptibility among individual HP strains in the stomach.

研究分野：ヘリコバクターピロリ

キーワード：ヘリコバクターピロリ 遺伝子多様性 ピロリ菌フローラ

1. 研究開始当初の背景

(1) 本菌の初感染時は単クローンと仮定しても、胃内環境の変化に応じて出現した変異株を含む細菌叢（ピロリ菌フローラ）として慢性持続性感染が成立し、細菌 - 宿主間相互反応（免疫応答）を経て多彩な病態に関与すると考えられた。

(2) 変異株の創出によるフローラ形成は、恐らく胃内の様々な部位で起こっており、各微小環境下にて多様な生物特性を獲得することでストレスや抗菌薬に耐性化するとともに、宿主免疫応答にも干渉し慢性持続性感染を成立させ延いては種々の病態形成に関わっている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

ヘリコバクター・ピロリ（以下ピロリ菌）は慢性持続感染を経て、消化管のみならず様々な疾患・病態に関与している。しかし菌株の解析結果と罹患率や有病率（地域や個人差間）のエングマは解明されていない。ピロリ菌は感染後に個々の胃内（部位）にて著しい遺伝子変異（high genetic diversity）を繰り返し、種々の変異株を創出しながら集団として存在し全体の遺伝子プールを有効利用することで慢性持続感染を成立させ、薬剤耐性菌の出現をはじめ多彩な病態に関与すると考えられる。すなわち、本菌感染は単クローンではなく、silent majority やnoisy minority 株の存在と役割（細菌特性・生物多様性）で構成された細菌叢（ピロリ菌フローラ）と捉えて、宿主免疫応答を解析し関連疾患・病態の解明を目的に本研究を推進する。

3. 研究の方法

ピロリ菌陽性患者の内視鏡検査にて、

萎縮や胃潰瘍形成など背景粘膜の性質が異なる胃粘膜の3箇所（萎縮部（前庭部）、腺境界部、非萎縮部（胃体上部大弯））から生検を施行し、培養後各々最低5個ずつを釣菌し（1患者あたり最低15コロニー）、以下の遺伝子を中心にPCR からシーケンスにて比較解析する。次に、同一患者の同一部位もしくは異なった部位の粘膜から採取・培養したピロリ菌が、様々な多様性を有する遺伝子変異の集団として存在しピロリ菌フローラとして存在しているかを解析する。得られた遺伝的背景の異なる株（一応、変異株）は、各変異株の細菌学的・生物学的特性を検証する。

次の段階では得られたピロリ菌を用いて蛍光発色ピロリ菌の作成を行ない、それをスナネズミに感染させて1か月ごとにスナネズミの胃粘膜を観察しながら慢性持続性感染の成立に至る過程を検証する。また感染胃粘膜から生検し分離培養したピロリ菌の遺伝子変異について元々投与した株と比較検討し遺伝子変異について経時的、部位別に解析を行う。

4. 研究成果

薬剤感受性試験の結果からみたピロリ菌の多様性について、1カ所の胃粘膜の生検した組織から培養・分離されたピロリ菌がそれぞれ6株、生検を2ヶ所行ったため1人の患者から12株を分離することが出来た。この同一患者から分離された12株の株中においても、各種薬剤に対する感受性株と耐性株が混在していることが明らかとなった。さらに、同一患者内の耐性株の間でも薬剤感受性に違いがみられており、最小発育阻止濃度にもかなりの差を認めた。

当初の予定では、この分離・培養したピロリ菌について、以下の遺伝子を中心にPCR からシーケンスにて比較解析する予定であった。主な標的遺伝子は、持続感染・病原性・薬剤耐性等に関わる各遺伝子 (vacA, cagA, ureA, ureB, babA, sabA, oipA, OMP 遺伝子群, cdrA, minC, D, E, sod, ppb1-3, Efflux pump 遺伝子, gyrase, par, topoisomerases など) である。

しかしピロリ菌の分離培養には予定よりかなりの時間と費用を要し、さらに薬剤感受性を12株×30人のピロリ菌で調べることで2年近くを要した。結果として初め予定していた動物モデルによる慢性持続感染の成立機序を解明するためのスナネズミの実験にまで至らずに終了している。また、MALTリンパ腫や胃癌患者から分離培養したピロリ菌で、疾患・病変により異なった(特徴ある)遺伝子変異やフローラが構成されているのかをクラスター分類やマイクロアレイ等による網羅的解析を使用して解析する予定であったが、病変からのピロリ菌の培養がなかなかうまくいかず検討に至らなかった。

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 0 件)

現在、論文作成 進行中

[学会発表](計 5 件)

矢野有佳里、津田尚子、北川達也、羽柴基、吉良瑞樹、水田洋、竹内啓晃、小野正文、松村敬久、西原利治：薬剤感受性の検討からみた H.pylori の多様性に

ついて . JDDW2017FUKUOKA. デジタルポスター . 福岡市 (福岡国際センター) 2017.10.12-15

Yano Y , Mizuta H , Ono M , Nagano S , Tsuda H , Kitagawa T , Hashiba M , Okamoto N , Kira M , Takeuchi H , Matsumura Y , Saibara T : Vonoprazan-based third-line triple therapy in Helicobacter pylori eradication and study of the diversity of antimicrobial susceptibilities. APDW 2017. Poster , Hong Kong, (Hong Kong Convention and Exhibition Center), 2017.9.23-26

津田尚子、矢野有佳里、北川達也、羽柴基、吉良瑞樹、水田洋、岡本宣人、竹内啓晃、小野正文、松村敬久、西原利治：ポノプラザンを用いた H.Pylori 三次除菌療法について . 第 23 回日本ヘリコバクター学会学術集会 . 一般演題 ポスター、函館市 (函館アリーナ)、2017.6.30-7.1

矢野有佳里、津田尚子、北川達也、羽柴基、吉良瑞樹、水田洋、岡本宣人、竹内啓晃、小野正文、松村敬久、西原利治：同一患者内における H.Pylori の薬剤感受性の多様性について . 第 23 回日本ヘリコバクター学会学術集会 . ワークショップ 2「H.Pylori 基礎研究の新たな潮流」、函館市 (函館アリーナ)、2017.6.30-7.1

Yano Y , Mizuta H , Kira M , Matsumura Y , Kitagawa T , Hashiba M , Okamoto N , Takeuchi H , Ono M , Saibara T : POTASSIUM-COMPETITIVE ACID BLOCKER-BASED THIRD-LINE TRIPLE THERAPY IN ELICOBACTER PYLORI ERADICATION AND STUDY OF THE DIVERSITY OF

ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITIES . uegweek2016
(24th United European
Gastroenterology Week). Poster ,
Austria Vienna (Austria Center
Vienna), 2016.10.15-19.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水田 洋 (MIZUTA, Hiroshi)
高知大学 教育研究部医療学系
臨床医学部門 助教
研究者番号：70527605

(2)研究分担者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI, Hiroaki)
高知大学 教育研究部医療学系
臨床医学部門 講師
研究者番号：90346560

小野 正文 (ONO, Masafumi)
高知大学 教育研究部医療学系
臨床医学部門 准教授
研究者番号：70304681

西原 利治 (SAIBARA, Toshiji)
高知大学 教育研究部医療学系
臨床医学部門 教授
研究者番号：60145125

(3)連携研究者

(4)研究協力者

矢野 有佳里 (YANO, Yukari)
高知大学 医学部附属病院 医員