

令和元年5月29日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08784

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ハイルマニイ感染の予防、診断、除菌法の開発

研究課題名(英文)Development of the new technologies for prevention, diagnosis, and eradication of *Helicobacter heilmannii* infections

研究代表者

松井 英則 (Matsui, Hidenori)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：30219373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：鳥肌胃炎の患者から分離した難培養性のヘリコバクター・ハイルマニイ(*H. suis* SNTW101株)の全塩基配列を解明した。ゲノム解析から*H. suis*特異的な外膜蛋白質遺伝子を発見し、hsvA遺伝子と命名した(全長約9 kb)。HsvA蛋白質に対する血清抗体を標的とするペプチドELISA法を開発した。一方、乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)によるリノール酸の飽和化代謝の中間体である水酸化不飽和脂肪酸(10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸;HYA)のヘリコバクターやカンピロバクターに特異的なメナキノン合成経路(フタルシン経路)を標的とする阻害活性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦においては、ピロリの国民総除菌時代に突入した。その結果、菌交代現象としてピロリに代わりハイルマニイ感染の増加である。これまで胃生検から調製したDNAに含まれるハイルマニイの16S rRNA遺伝子をPCRで検出する方法が、感染診断に用いられていた。しかし、内視鏡による生検は大変である上に、菌が寄生する場所を採取しなければならないという問題がある。当該研究により、血液、尿を検体とした迅速検査法を確立したので、今後は、ピロリ菌と同時の感染検査が可能となる。また、副作用の少ない狭域スペクトルの抗ヘリコバクター剤を開発したので、年少者の除菌も可能となった。

研究成果の概要(英文)：We identified a *H. suis* specific hsvA gene which was well-conserved among 16 strains of *H. suis*. We then synthesized 27 peptides to cover the antibody-binding sites of HsvA. Human serum specimens (*H. suis*-infected, *H. pylori*-infected, and uninfected) were examined for detecting the antibody response to HsvA by the synthetic peptide ELISA. Thirteen peptides specifically reacted with the 1800-fold diluted serum antibodies generated by infection with *H. suis*, although they did not respond to the serum antibodies generated by infection with *H. pylori* or the uninfected serum antibodies. Meanwhile, we revealed that 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) can prevent *Helicobacter* infection by blocking an alternative menaquinone biosynthetic pathway (the futasolone pathway). HYA prevented gastric *Helicobacter* infections by blocking their futasolone pathways. Daily HYA supplementation was effective for the prevention of gastric MALT lymphoma induced by persistent infection with *H. suis*.

研究分野：医歯薬学、基礎医学、細菌学(含真菌学)、病原細菌の分子遺伝学

キーワード：ヘリコバクター・ハイルマニイ 免疫組織化学 外膜蛋白質 合成ペプチド 迅速診断技術 ELISA 希少脂肪酸 メナキノン合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター属細菌は30種類以上見つかったが、ピロリ (*H. pylori*) 以外のヒトの胃に感染するヘリコバクターとして、ハイルマニイは K.L. Heilmann により 1988 年にドイツの医学雑誌に発表された (英文雑誌には、1991 年に Gut で発表)。申請者らは、ハイルマニイ感染の診断法として、胃生検体から DNA を調製し、特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法を開発した (Matsui *et al.*, *Helicobacter*, 19, 260-271, 2014; 注目の論文として抄訳版が出る「比較ゲノム解析を用いた、胃粘膜中の *Helicobacter suis* に対する新たな PCR プライマーの開発」魚谷貴洋、山岡吉生訳)。2014 年 7 月より日本ヘリコバクター学会の後援で、全国規模でピロリ陰性の胃疾患患者を調べたところ、62%がハイルマニイ陽性 (大部分は *H. suis* 感染) であった (Anders Øverby, 2015 年 6 月 27 日第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会で発表)。画期的な発見であり、日経メディカルで取り上げられた (その胃炎、ハイルマニイの仕業かも?: オンライン版の週間ランキング 1 位)。これまでの研究で明らかになったヒトの胃で見つかるハイルマニイ (大部分は *H. suis*) の特徴は、以下の通りである。

- (1) ピロリは、乳幼児期の近親者からの感染が主体で、霊長類にしか感染しない。ハイルマニイは、豚、猫、犬などの動物から年齢に関係なく感染する。
- (2) ピロリが全長 2.5-5.0 μm に対して、5-10 μm である。
- (3) ピロリがウレアーゼ陽性に対して、ヒトから分離されたハイルマニイはウレアーゼ遺伝子を有するが、陰性の場合が多い (動物から分離されたハイルマニイは、ウレアーゼ陽性)。
- (4) ピロリの主要な病原因子である、Cag PAI や VacA を欠損している。
- (5) ヒトから分離されたハイルマニイは、*in vitro* の培養が出来ない。
- (6) ハイルマニイは両端に鞭毛を持ち、運動性が高く胃腺腔深部や壁細胞内に侵入する。
- (7) ハイルマニイ感染により、B リンパ球の集積が主体となる Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) リンパ腫を高頻度に発症する。
- (8) マウスを用いた感染実験では、ピロリに比較して、遙かに感染力が強い。

2. 研究の目的

専門医を中心にハイルマニイ感染症の注目度は上がってきた。当該研究においては、以下の研究を遂行する。(1) ハイルマニイのゲノム解析を基にした迅速感染診断法の開発。(2) マウス感染モデルを用いた、ヘリコバクター特異的な狭域スペクトルの抗菌剤の開発

3. 研究の方法

(1) 難培養性の *H. suis* 2 株 (鳥肌胃炎の患者から分離した SNTW101 株とカニクイサルから分離した TKY 株) は、それぞれ別の C57BL/6 マウスに感染させ、3~6 ヶ月おきに、感染マウスの胃粘膜の懸濁液を非感染マウスに経口投与し、マウスの胃内で菌を継代している。ゲノム解析に先立ち、感染マウスの胃粘膜の懸濁液から、特異抗体を結合させた免疫磁気ビーズを用いて菌体を抽出した。次に、抽出液から DNA を調製し、イルミナ社の次世代 DNA シーケンサーを用いて全塩基配列を決定した。ドラフト塩基配列からアノテーション解析により、*H. suis* の染色体の遺伝子を決定した。そこで、当該研究では、比較ゲノム解析や代謝パスウェイ解析などにより、ハイルマニイの診断や抗菌剤の標的因子の解析を行った。

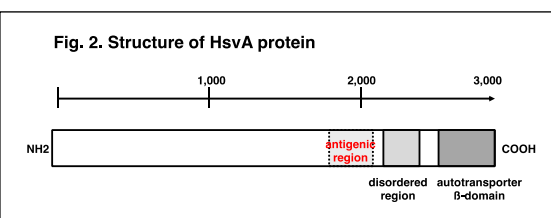
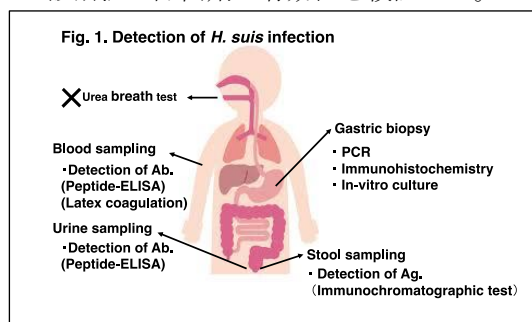
(2) ハイルマニイ感染による胃 MALT リンパ腫の発症に成功した。1x10⁴ の *H. suis* TKY を C57BL/6 マウス 1 回感染させると、感染後 3 ヶ月で全てのマウスに肉眼でもはっきり確認できる大きさの B リンパ濾胞が形成された。*H. suis* SNTW101 感染でも同様に胃 MALT リンパ腫を発症した。このマウス感染モデルと臨床検体を用いて診断法と除菌剤の有効性を検証した。

4. 研究成果

(1) ハイルマニイ感染の診断法の開発

当該研究で、当初開発を目指したハイルマニイ感染の診断法を Fig. 1 に示す。ゲノム解析より *H. suis* 特異的な外膜蛋白質 (HsvA と命名) を発見した (Fig. 2)。*hsvA* 遺伝子は、分離した *H. suis* に全て存在していた (Fig. 3A)。また、*H. suis* 感染、*H. pylori* 感染、非感染のヒト血清を用いて、HsvA に対する血清抗体価を ELISA で調べたところ、*H. suis* 感染血清のみが反応した (Fig. 3B)。

(2) ヘリコバクターには、プロバイオティクス・腸内細菌などの通常の細菌に存在しないメナキノン (ビタミン K₂, 細菌の増殖に必要な) 生合成経路 (フタロシン経路と命名) が存在する。フタロシン経路の阻害剤は、腸内細菌叢を変化



させることなくヘリコバクター特異的に働く。乳酸菌のリノール酸代謝物である水酸化不飽和脂肪酸 (10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸; HYA) 液体培地に HYA (20 μ M) を添加すると *H. pylori* の増殖を阻害したが、同時にメナキノン- (225 μ M) を加えると、この阻害効果は緩和した。更に、C57BL/6 マウスを用いた感染実験において、飲料水に HYA (200 μ M) を加えると、*H. pylori* あるいは *H. suis* の感染菌数が大幅に減少した (Fig. 4)。また、マウス感染モデルにおいて、*H. suis* 感染後に誘発される胃粘膜上のリンパ濾胞の形成を HYA は抑制した (Fig. 5)。以上の結果より、HYA はヘリコバクターのフタロシン経路を特異的に阻害することで、胃への感染を抑制しその結果、HYA の毎日の摂取は *H. suis* 感染に起因する胃 MALT リンパ腫の発症を抑制したと考えられる。

<学会賞>

- (1) 平成 29 年度日本ヘリコバクター学会上原 *H. pylori* 賞-優秀賞-「乳酸菌が産生する不飽和脂肪酸の抗ヘリコバクター属活性」
- (2) NEDO Technology Commercialization Program 2018, ファイナリスト修了証

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (合計 20 件)

- (1) 松井英則, 岸野重信, 小川順. 腸内細菌が産生する機能性脂肪酸の抗ヘリコバクター属活性. *Bio Industry*, 査読無, 36 (3), 52-59, 2019.
- (2) 松井英則, 高橋哲史, 村山琮明, 川口満里奈, 松尾光一, 中村正彦. 乳酸菌が産生する不飽和脂肪酸の抗ヘリコバクター属活性. *日本ヘリコバクター学会誌*, 査読無, 19 (2), 84-89, 2018.
- (3) B. Flahou, H. Matsui, 他 31 名. Evidence for a primate origin of zoonotic *Helicobacter suis* colonizing domesticated pigs. *ISME J.*, 査読有, 12 (1), 77-86, 2018.
- (4) H. Matsui, T. Takahashi, S.Y. Murayama, M. Kawaguchi, K. Matsuo, and M. Nakamura. Protective efficacy of a hydroxyl fatty acid against gastric *Helicobacter* infections. *Helicobacter*, 査読有, 22 (4), e12430, 2017.
- (5) 松井英則, 高橋哲史, 中村正彦. 動物実験におけるマイクロバイオームの知見と *Helicobacter* 属感染. *Helicobacter pylori* とマイクロバイオーム. *J. Helicobacter Res.*, 査読無, 21 (3) 65 (251)-69 (255), 2017.
- (6) T. Yamamoto, H. Matsui, K. Yamaji, T. Takahashi, A. Øverby, M. Nakamura, A. Matsumoto, K. Nonaka, T. Sunazuka, S. Ōmura, H. Nakano. Narrow-spectrum inhibitors targeting an alternative menaquinone biosynthetic pathway of *Helicobacter pylori*. *J. Infect. Chemother.*, 査読有, 22 (9), 587-592, 2016.
- (7) H. Matsui, T. Takahashi, S.Y. Murayama, I. Uchiyama, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, M. Suzuki, E. Rimbara, K. Shibayama, A. Øverby, M. Nakamura. Draft genome sequence of *Helicobacter suis* strain SNTW101, isolated from a Japanese patient with nodular gastritis. *Genome Announcements*, 査読有, 4 (5), e00934-16, 2016.

[学会発表] (合計 29 件)

- (1) 松井英則. ヘリコバクター・ハイルマニイ感染症の現状 (病原因子、新規診断・治療薬の開発). 第 101 回日本細菌学会関東支部総会・シンポジウム, 2018 年.
- (2) 松井英則. 難培養性ヘリコバクター・ハイルマニイのゲノム解析を基盤とした迅速診断法と新規抗菌剤の開発. 第 50 回日本分子形態学会総会・シンポジウム, 2018 年.

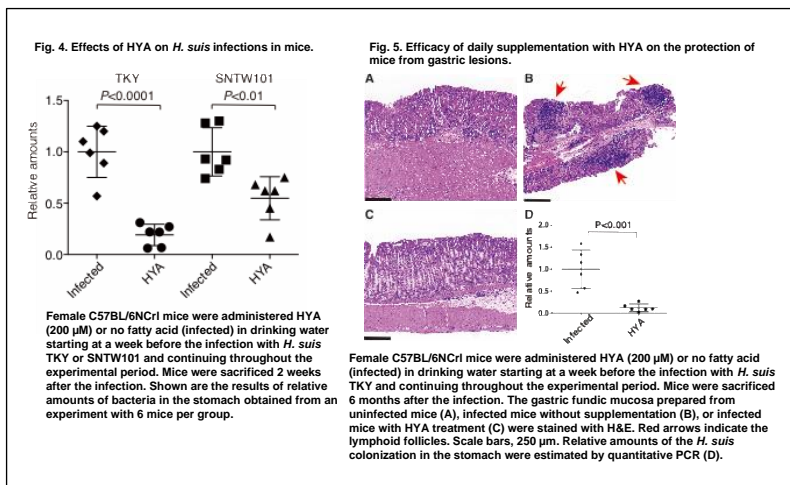
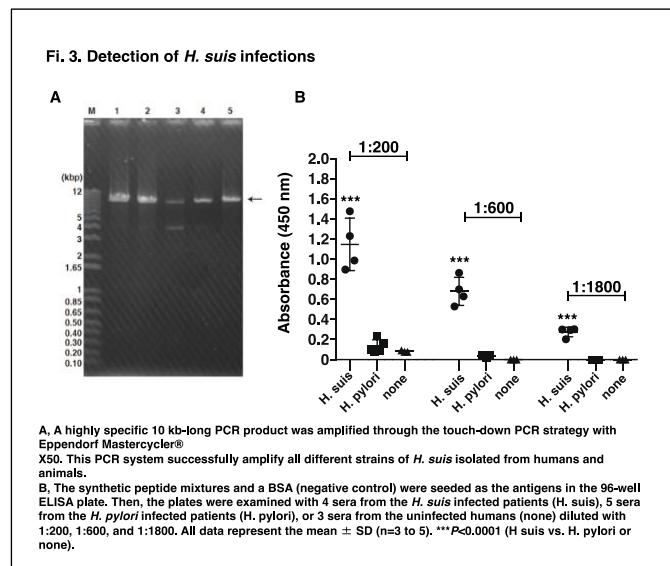


Fig. 4. Effects of HYA on *H. suis* infections in mice.

Fig. 5. Efficacy of daily supplementation with HYA on the protection of mice from gastric lesions.

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

- (3) 松井英則. ヘリコバクター・ハイルマニイ感染の迅速診断のための革新的テクノロジーの開発. イノベーションジャパン 2018-大学見本市&ビジネスマッチング, 2018年.
- (4) 松井英則. ヘリコバクター・スイス感染の迅速検査法の開発. 第24回日本ヘリコバクター学会学術集会・ワークショップ, 2018年.
- (5) 松井英則. 乳酸菌が産生する不飽和脂肪酸の抗ヘリコバクター属活性. 日本農芸化学会 2018年度大会・ランチョンセミナー, 2018年.
- (6) 松井英則. 新規メナキノン生合成系を標的とする不飽和脂肪酸の抗菌活性. 第91回日本細菌学会総会・選抜ワークショップ, 2018年.

[図書] (合計 2 件)

- (1) M. Nakamura, A. Øverby, H. Matsui. Angiogenesis and lymphangiogenesis in gastric MALT lymphoma: Relation of VEGF and VASH2: Novel therapies for digestive diseases. *in* Therapeutic targets for inflammation and cancer. Chi Hin Cho (ed.), pp. 177-188., 2017. World Scientific 460 pages.
- (2) M. Nakamura, A. Øverby, S.Y. Murayama, H. Suzuki, T. Takahashi, S. Takahashi, H. Matsui. Gastric non-*Helicobacter pylori* Helicobacter: Its significance in human gastric disease. Springer, Hidekazu Suzuki, Robin Warren, and Barry Marshall (eds), *Helicobacter pylori*, pp. 131-140., 2016.

[産業財産権]

○出願状況 (合計 2 件)

- (1) 名称: フタロシンまたはフタロシン誘導体を経由するメナキノン合成経路を備える細菌の増殖抑制組成物
発明者: 松井英則, 川口真里奈
権利者: 日東薬品工業株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2017-53056, PCT/JP2018/6804
出願年: 2017, 2018
国内外の別: 外
- (2) 名称: ヘリコバクター・スイス感染の診断法
発明者: 松井英則, 中村正彦, 村山琮明, 高橋哲史, 林原絵美子, 鈴木仁人, 柴山恵吾
権利者: 学校法人北里研究所, 国立感染症研究所長
種類: 特許
番号: 特願 2018-099903
出願年: 2018
国内外の別: 内

○取得状況 (合計 0 件)

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 無し
- (2) 研究協力者 無し

※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。