

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08834

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを利用したH. pylori病原性遺伝子の網羅的探索

研究課題名(英文) Extensive exploration of Helicobacter pylori virulence genes using next generation sequencer

研究代表者

鈴木 留美子 (Suzuki, Rumiko)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70599092

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)：本研究は次世代シーケンサーを用いてピロリ菌のゲノム比較を行い、東アジア株における新規疾患関連遺伝子を探索した。胃癌患者由来の株と胃MALTリンパ腫由来の株の比較から、既知の病原遺伝子以外の遺伝子の違いを見出した。また、ピロリ菌感染モデルとして使われるスナネズミへの経口投与前と後のゲノムを比較して、スナネズミへの適応に伴う遺伝子の変化を同定した。我々の先行研究では沖縄には弱毒型のピロリ菌が存在することがわかっていたが、その由来は不明であった。本研究ではこれらの菌の起源が中央アジアであり、約3万年前に沖縄まで到達した痕跡を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東アジア型のピロリ菌は、大部分が強毒型の既知病原遺伝子を持っており、それが胃癌発症率の高さにつながっている。しかし、同じ強毒型のピロリ菌に感染しても発症する疾患が同じとは限らず、既知病原遺伝子だけでは疾患の違いが説明できなかった。我々は胃癌株と胃MALTリンパ腫株のゲノム比較から遺伝子の新規な差異を見出し、疾患の違いにつながる因子の手がかりを得た。また、モデル動物への適応に伴う遺伝子の変化も同定した。系統解析からは弱毒型の沖縄株が中央アジアに起源を持つことを明らかにし、先史時代における日本への人類移動に関しても新たな視点を加える結果を得た。

研究成果の概要(英文)：This study compared genome sequences of Helicobacter pylori read by next generation sequencers to explore new virulence genes among East Asian strains. We identified difference of genes between gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma other than known virulence genes. We also compared H. pylori genomes before and after inoculation to Mongolian gerbils, which is a model animal of infection, and identified mutations during the incubation in the animal stomach. Our preceding study observed weak virulence strains in Okinawa, however, its origin was unknown. This study discovered that the Okinawa strain originate from Central Asia and that it reached to Okinawa around 30,000 years ago.

研究分野：分子進化

キーワード：ピロリ菌 ゲノム解析 病原遺伝子 系統関係

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌は世界人口の約50%が感染している病原体である。感染は免疫の弱い小児期に確立し、除菌されない限り生涯にわたって持続する。感染による慢性的な炎症は、胃酸過多による胃潰瘍や十二指腸潰瘍の要因となったり、逆に胃酸産生の低下をきたす萎縮性胃炎から胃がんへと進展したりする。また、上皮性の胃がんよりは稀ではあるが、粘膜とリンパ球細胞の複合組織であるMALTから胃MALTリンパ腫を生じる場合もある。特発性血小板減少性紫斑病はピロリ菌の除菌治療によって血小板数が回復するケースがあることから、ピロリ菌感染と疾患との関連が示唆されている。

これまで疾患と病原性遺伝子 *cagA*, *vacA* の関係について、多くの研究がなされてきた。CagAタンパクはC末端にEPIYAというアミノ酸の並びを含むモチーフの繰り返しがあり、モチーフは配列の差異によってA, B, C, Dに分類される。ABDの組み合わせはABCより胃がんのリスクが高い。細胞空胞化毒素をコードする *vacA* には、シグナル領域 (s領域) と中間領域 (m領域) があり、それぞれ2つのタイプ (s1, s2 および m1, m2) に分けられる。s1m1タイプはs2m2タイプより毒性が高い。このような観察に基づいて、従来の病原性評価は *cagA* のEPIYA領域、*vacA* のs, m領域といった遺伝子の一部を読み取って行うのが主流であった。しかし日本を含む東アジアのピロリ菌は、ほとんどが強毒性のABD型 *cagA* およびs1m1型 *vacA* を持っており、このようなジェノタイピングでは、当地域での胃がん発症率の高さを説明することはできても、他の疾患のリスクを評価することは難しい。

ピロリ菌感染のモデル動物としてはスナネズミがよく用いられる。これはマウスより感染が成立しやすいからであるが、さらに一度感染させた菌株回収して別の個体に投与すると、感染率が上がることがある。これはピロリ菌がスナネズミに適応した結果であると考えられる。しかし、菌が異なる環境に適応する際、どのような遺伝子に変化が生じるのか、ゲノムワイドに網羅した研究はまだ少なかった。

また、我々は先行研究で、沖縄には本土と病原性も系統も異なる弱毒性のピロリ菌が2グループ存在することを発見した。そのうちの1つは病原遺伝子 *cagA* を含む病原遺伝子群を欠き、系統樹では東アジア株グループの中で特異なクラスターを形成する。もう一つはJWestern-*cagA* と呼ばれる欧米株に似た *cagA* を持ち、系統樹では東アジアのみならずインド等も含むアジア系統の中で最も古い分岐を示した。しかしJWestern-*cagA* 株についてはネパールにしか近縁株が見つからず、このタイプの菌がどこから来たのか謎であった。

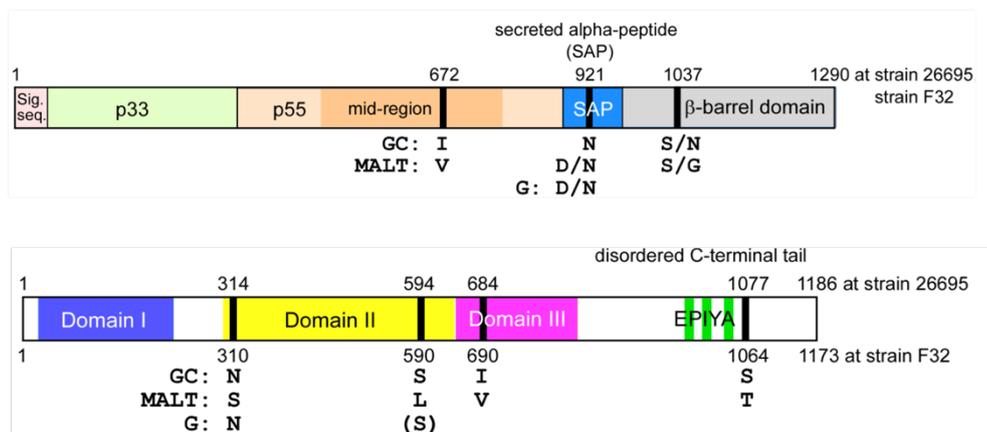
2. 研究の目的

ピロリ菌ゲノムの塩基全長は1.5Mb~1.6Mbである。近年のDNAシーケンサーの発展により、この程度のサイズであれば、多数のゲノムを安価に読み取ることができるようになった。そこで我々は、次世代シーケンサーを用いてピロリ菌ゲノムを読み取り、ゲノムワイドな解析を行うことを考えた。

目的の一つは疾患と関連する遺伝子を網羅的に探索することである。我々は先行研究で、胃がん由来の17株と胃MALTリンパ腫由来の12株を用いて *cagA* と *vacA* を比較し、*cagA* の4座位、*vacA* の3座位で有意なアミノ酸頻度差を検出している (図1)。本研究では解析範囲を全ゲノムに広げ、新規疾患関連遺伝子を探索することを目指した。また、ピロリ菌感染のモデル動物として用いられるスナネズミへの投与前の菌と、投与後に回収した菌のゲノムを比較し、どのような遺伝子に変化が生じたかを明らかにする。

また、沖縄に存在する弱毒性のピロリ菌は、本土と異なる起源を持つと考えられる。特にJWestern-*cagA* を持つ菌株は、ネパールにしか近縁株が見出されておらず、沖縄とネパールという離れた2点を結ぶものが存在しなかった。沖縄特異的なピロリ菌がどこからやって来たのか、世界の広い範囲のピロリ菌を含めて系統解析、および集団解析を行い、起源を探る。

<図1> *vacA* (上) および *cagA* (下) で胃がん (GC) 群と胃MALTリンパ腫群 (MALT) で有意なアミノ酸頻度差が見られた座位 (黒縦線)



3. 研究の方法

(1) 胃がん由来 17 株と胃 MALT リンパ腫由来 12 株のピロリ菌ゲノム解析

①シーケンシングとゲノムアセンブリ

菌から抽出した DNA をイルミナ社 MiSeq で読み取り、ショートリードデータを fastq ファイルとして得た。ピロリ菌は株ごとのゲノム構造多型が多いため、de Novo アセンブリでゲノムのコンティグ配列を生成した。

②相同遺伝子の抽出

コンティグ配列に対してフリーソフトウェア Prokka を用いてコード領域を推定、同じくフリーソフトウェア Roary を用いて相同遺伝子を同定した。さらに胃がん由来 17 株と胃 MALT リンパ腫由来 12 株の全てに存在する相同遺伝子群を抽出し、解析対象とした。

③アミノ酸頻度の比較

相同遺伝子群をアミノ酸に翻訳後アラインメントを行い、多型のある座位ごとに胃がん株群と胃 MALT リンパ腫株群のアミノ酸頻度を調べた。各群のアミノ酸頻度を Fisher の正確性検定にかけて有意差のある座位を検出した。

(2) スナネズミ投与前と投与後のピロリ菌ゲノム比較

①シーケンシングとリファレンスマッピング

元株 (TN2) をスナネズミに投与後、1、3、6ヶ月後にそれぞれ解剖して胃からピロリ菌を回収、抽出した DNA をイルミナ社 MiSeq で読み取った。TN2 は PacBio を用いて完全ゲノムが得られていたので、これをリファレンスとして投与後の菌から得られたショートリードをマッピングした。

②変異の同定

マッピング結果から、各株でミスセンス又はナンセンス変異が起こっている座位を同定、投与後 1、3、6ヶ月後に見られた変異を比較した。

(3) 沖縄弱毒株の系統・集団解析

①ゲノムデータの取得

日本 (沖縄および北海道)、カナダ (アラスカ)、コロンビア、タイ、ブータン、ネパールから得た 21 株のピロリ菌については、PacBio を用いて完全ゲノムを得た。これらと Genbank に登録されているピロリ菌完全ゲノムを合わせて解析に用いた。また、NCBI の Genome neighbor でリストアップされた沖縄近縁株については、コンティグ状態のものも解析に含めた。

②集団構造解析

ゲノムデータについてはフリーソフト fineSTRUCTURE を用いて集団構造解析を行った。従来から用いられてきた MLST 配列データは、配列長は短いが多数の株の情報が手に入るため、これらもフリーソフト STRUCTURE による集団解析、および PCA の対象とした。

③系統解析と分岐年代推定

ゲノムデータから得られた相同遺伝子群を用いて系統樹を作成した。また、fineSTRUCTURE の結果を参照して他集団との交雑組み換えが少ない株を選択し、フリーソフト BEAST を用いて分岐年代推定を行った。

4. 研究成果

(1) 胃がん由来 17 株と胃 MALT リンパ腫由来 12 株のピロリ菌ゲノム解析

疾患群間で、84 遺伝子の 113 座位でアミノ酸頻度に有意差が見られた。これら全てが疾患と関連しているとは限らないが、候補遺伝子として解析を続ける予定である。表 1 に p-value の低い順に 10 の遺伝子を示す。

<表 1>

Gene	Position	p-value
putative DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	150	0.0019
ATP-binding protein	197	0.0019
glutamine ABC transporter, permease protein (glnP)	67	0.0024
osmoprotection protein (proV)	160	0.0035
cag pathogenicity island protein (cag9)	530	0.0036
nickel-cobalt-cadmium resistance protein (nccB)	6	0.0036
dephospho-CoA kinase	91	0.0056
nitrite extrusion protein (narK)	448	0.0056
glycerol-3-phosphate dehydrogenase	392	0.0064
pyruvate flavodoxin oxidoreductase subunit gamma	13	0.0069

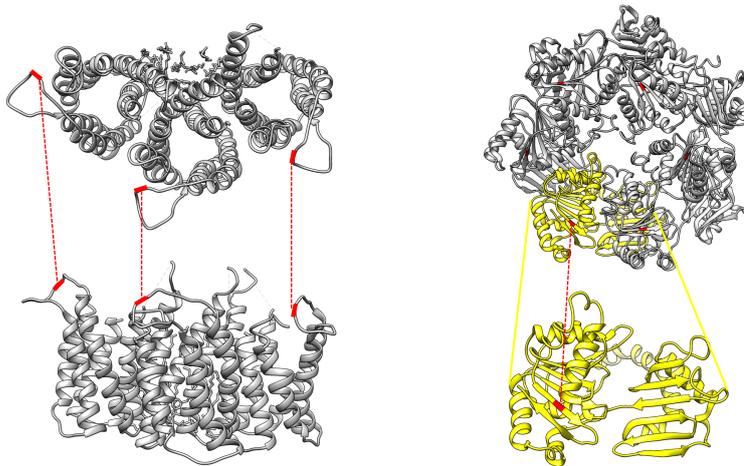
(2) スナネズミ投与前と投与後のピロリ菌ゲノム比較

投与後 1、3、6ヶ月後の株の比較から、17 遺伝子の 21 座位でアミノ酸頻度に有意差が見られた。3ヶ月と6ヶ月では共通の2遺伝子で変異が検出された (表 2)。これらのうち *babA*, *oppA*, *t1pB* は先行研究でもスナネズミでの変異が報告されている。

<表 2 >

投与後	Position	Mutation	Gene	Change
1ヶ月	31255	C→A	outer membrane protein (<i>hefG</i>)	A61S
	517741	G→A	glutathione-regulated potassium-efflux system protein (<i>kefB</i>)	N232S
	517792	T→C		A249V
	1241193	Insertion	outer membrane protein (<i>hofH</i>)	Frameshift
	1297623	A→G	urease accessory protein (<i>ureI</i>)	H131R
	1496148	A→C	glutamate permease (<i>gltS</i>)	W131G
3ヶ月	112286	G→A	dinucleoside polyphosphate hydrolase	R139C
	188008	C→G	type II restriction enzyme R protein	R173T
	194568	G→T	Uncharacterized protein	G201W
	926807	Insertion	cag pathogenicity island protein	Stop
	1007324	A→G	outer membrane protein (<i>hopB</i>)	T123A
	1202841	G→A	FOF1 ATP synthase subunit alpha	P470L
6ヶ月	935451	C→T	P-type DNA transfer ATPase (<i>virB11</i>)	H314Y
	989679	Deletion	outer membrane protein (<i>babA</i>)	Stop
	1174908	C→A	Lipopolysaccharide biosynthesis proteins	G154W
	1251850	Insertion	outer membrane protein	Stop
3ヶ月	87451	Deletion	oligopeptide ABC transporter periplasmic	Stop
6ヶ月	87451		oligopeptide-binding protein (<i>oppA</i>)	
3ヶ月	175008	G→T	methyl-accepting chemotaxis protein (<i>t1pB</i>)	G26W
	175755	G→T		G275W
6ヶ月	175691	Deletion		Stop

これらの中で立体構造データがあるものについては、立体構造に変異箇所をマッピングした。
 <図 2 >左 *ureI*、右 *virB11*

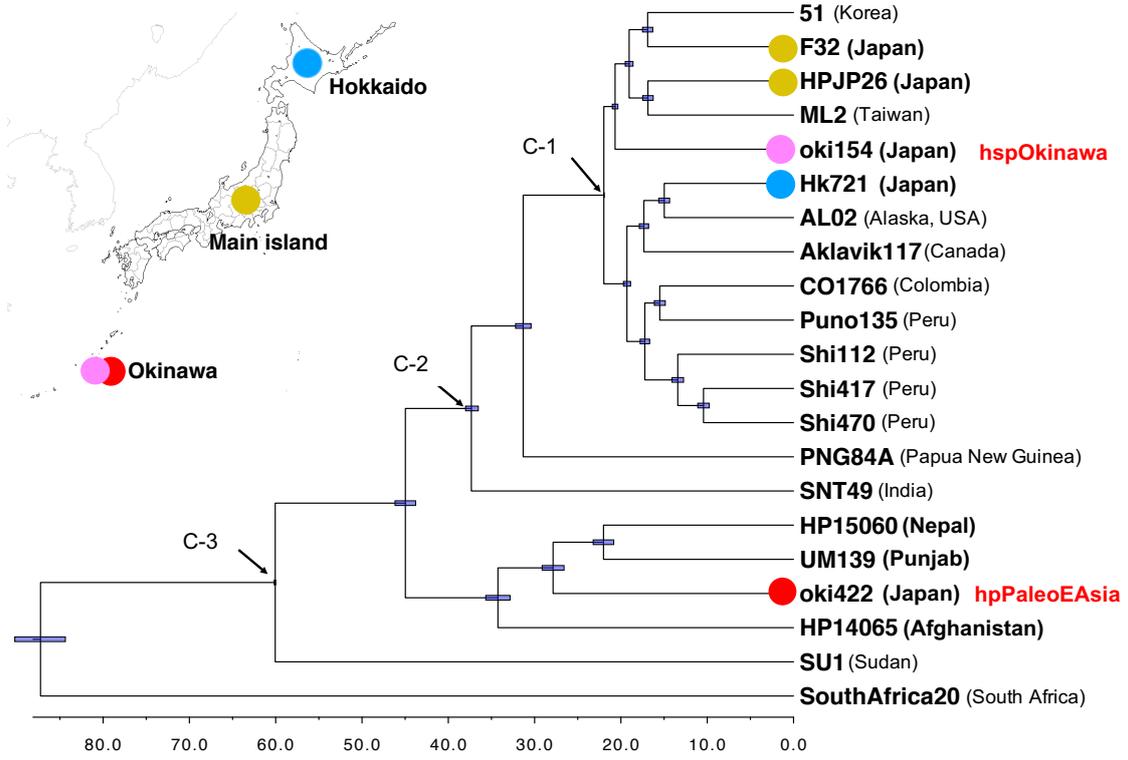


(3) 沖縄弱毒株の系統・集団解析

我々は沖縄特異的なピロリ菌のうち、*cagA*を持たず分岐年代が新しいグループを *hspOkinawa*、*JWestern-cagA* を持ち分岐年代が古いグループを *hpPaleoEAsia* と名付けた。先行研究では *hpPaleoEAsia* と同じサブブランチに入る株はネパールにしか見られなかったが、Genbank に登録されているコンティグのうち、4株がこのサブブランチに入ることがわかった。この4株はオーストラリアとマレーシアのグループから公開されており、当初それ以上の地理情報がなかったが、論文著者に問い合わせたところ、アフガニスタン、パンジャブ地方、ネパールの出身者から得られた株であることがわかった。

ピロリ菌は外来のDNAを自分のゲノム中に取り込みやすく、系統の異なる菌が同じ宿主に多重感染したような場合は、ゲノムがキメラ状に混じってしまうことがある。そのため我々は *fineSTRUCTURE* を利用して *gene flow* を解析し、なるべく他の系統からの影響を受けていない純粋な株を代表株として抽出し、*BEAST* でベイズ系統樹を作成するとともに分岐年代の推定を行った(図3)。その結果、*hpPaleoEAsia* の分岐年代は約3万年前と推定された。これは旧石器時代に相当し、縄文時代以前に人類集団が琉球列島に到達したことを示唆している。沖縄からは旧石器時代の人骨が出土しているが、その頃渡来した人々はその後に絶滅し現代人にはつながっていないという説もある。現代沖縄人に分岐年代の古いピロリ菌が見られることは、日本人の起源についても新たな視点を加える結果である。

<図3> C1~C3は先行研究を参照して Calibration points として加えた。C-1 (15,000~20,000 BC)、C2 (25,000~38,000 BC)、C3 (Lower 60,000~150,000 BC)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Subsomwong Phawinee, Miftahussurur Muhammad, Vilaichone Ratha-korn, Ratanachu-ek Thawee, Suzuki Rumiko, Akada Junko, Uchida Tomohisa, Mahachai Varocha, Yamaoka Yoshio	4. 巻 9
2. 論文標題 Helicobacter pylori virulence genes of minor ethnic groups in North Thailand	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gut Pathogens	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13099-017-0205-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Thorell Kaisa, Yahara Koji, Berthenet Elvire, Lawson Daniel J., Mikhail Jane, Kato Ikuko, Mendez Alfonso, Rizzato Cosmeri, Bravo Maria Mercedes, Suzuki Rumiko, Yamaoka Yoshio, Torres Javier, Sheppard Samuel K., Falush Daniel	4. 巻 13
2. 論文標題 Rapid evolution of distinct Helicobacter pylori subpopulations in the Americas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1006546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Aftab Hafeza, Miftahussurur Muhammad, Subsomwong Phawinee, Ahmed Faruque, Khan A. K. Azad, Matsumoto Takashi, Suzuki Rumiko, Yamaoka Yoshio	4. 巻 12
2. 論文標題 Two populations of less-virulent Helicobacter pylori genotypes in Bangladesh	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0182947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Rumiko, Satou Kazuhito, Shiroma Akino, Shimoji Makiko, Teruya Kuniko, Matsumoto Takashi, Akada Junko, Hirano Takashi, Yamaoka Yoshio	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome-wide mutation analysis of Helicobacter pylori after inoculation to Mongolian gerbils	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gut Pathogens	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13099-019-0326-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木留美子、山岡吉生、斎藤成也、平野隆、佐藤万仁
2. 発表標題 旧石器時代人類の内陸移動 Helicobacter pyloriからの推測
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木留美子, 松成修, 斎藤成也, 山岡吉生
2. 発表標題 沖縄特異的なヘリコバクター・ピロリの由来を探る
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山岡 吉生 (Yamaoka Yoshio) (00544248)	大分大学・医学部・教授 (17501)	