

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590491

研究課題名（和文）

ヘリコバクター・ハイルマニイの病原因子と胃 MALT リンパ腫発症機序の解明

研究課題名（英文）

Identification of the virulence factors associated with *Helicobacter heilmannii*-induced gastric MALT lymphoma

研究代表者

松井 英則 (MATSUI HIDENORI)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号：30219373

研究成果の概要（和文）：感染マウスの胃懸濁液から免疫磁気ビーズ Sepa-Max Hp を用いて分離し、ゲノム DNA を調製した。次にフラグメントライブラリを作製し、ABI SOLiD 4 システムにより塩基配列を決定した。目的の *H. heilmannii* TKY と *H. suis* SNTW101 の配列以外にマウスゲノムと腸内細菌のゲノム由来の配列がかなりあったので、種々の条件でアセンブルを行った。その結果 *H. heilmannii* TKY と *H. suis* SNTW101 それぞれに総コンティグ長が、推定されるゲノムサイズをカバーできる程度になった。このデータを基に既にゲノム解析が終了している *Helicobacter* 属細菌との比較を行い、幾つかの *H. heilmannii* 特異的な病原遺伝子を発見した。

研究成果の概要（英文）： The genomic DNA was prepared from gastric homogenates of mice infected with *H. heilmannii* TKY or *H. suis* SNTW10 by using immunomagnetic beads (Sepa-Max Hp). Greater than 1^{10} bases were sequenced of each strain by ABI SOLiD 4 system. Comparative analysis of newly sequenced genomes to the existing reference genomes of *Helicobacter* species enabled the identification of several *H. heilmannii*-specific virulence genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：*Helicobacter heilmannii*, 胃 MALT リンパ腫, ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

16S rRNA 遺伝子の配列が、明らかにされた *Helicobacter* 属細菌のうちヒトに対する病原性が確認されているのは、胃に寄生する *H. pylori*, *H. heilmannii* (正式名称: *Candidatus Helicobacter*

heilmannii) と腸肝循環(enterohepatic) 菌である、*H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. fennelliae* である。また、近縁に位置する *H. heilmannii*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. suis* の 5 種は、*Helicobacter heilmannii*-like

organisms (HHL0s)として表記される。申請者らは、ウレアーゼ陽性にも拘わらず、*H. pylori*が分離できない胃 MALT

(mucosa-associated lymphoid tissue)リンパ腫のヒト臨床検体から DNA を抽出し、特異プライマーを用いた PCR 法により、*H. heilmannii*感染を確認した(中村ら、消化管 Network, 2007, 8 (2), 29)。ごく最近ブタの胃に寄生する *H. heilmannii* の純粋培養に成功した報告がなされたが、既知の 16S rRNA 遺伝子とウレアーゼ遺伝子の一部の配列が公表されただけで、全ゲノム解析はもちろんのこと、菌のコロニーの形状すら発表されなかった(M. Baele, *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, 58:1350-1358)。従って、マウスの胃やヒト由来の生検体といった少量の菌で、純粋培養に成功した報告は未だ無い。一方、申請者も独自に菌の分離法と純粋培養法の確立を目指している。また、これまでに申請者らは、カニクイサルより分離した、*H. heilmannii* TKY 株を C57BL/6 マウスに経口感染させると、短期間(3ヶ月以内)で、全てのマウスの胃底部粘膜層(gastric fundic mucosa)に肉眼でもはっきりと確認できるリンパ濾胞を伴った、B cell リンパ腫の形成を確認している(M. Nakamura *et al.*, *Infect. Immun.*, 2007, 75:1214-1222)。*H. heilmannii*は人獣共通に感染するため、感染源は家畜が疑われる。しかし純粋培養法が確立していなかったため、*H. heilmannii*の病原因子の解析は進んでいない。

2. 研究の目的

*H. heilmannii*には *H. pylori*の主要な病原因子である、サイトトキシン(CagA, VacA 等)は、見つかっていない。本菌は、胃の壁細胞(parietal cell)内で見つかる場合が多いが、細胞侵入の機構は解明されていない。本菌は純粋培養法が確立していなかったため、多種のほ乳類で頻繁に検出されるにも係わらず病原因子は同定されていない。そこで、*H. heilmannii*の病原性の解明に向けて *H. heilmannii*の純粋培養と全ゲノム解析を行う。

3. 研究の方法

- ① 胃生検体の PBS による懸濁液を C57BL/6 マウスに経口投与し、マウスの胃内菌を増殖させた。次に

Sepa-Max rabbit IgG (ウサギ IgG を固定化したナノ磁気ビーズ, JNC 石油化学・試作品)で処理し、非吸液を続いて Sepa-Max Hp (*H. pylori*抗体を固定化したナノ磁気ビーズ, JNC 石油化学・試作品)で処理し、*H. heilmannii*を分離・精製した。

- ② 分離した *Helicobacter* は、ヘリコバクター寒天培地に塗布し、デシケーターを用いた混合ガス培養 (H_2 6%, CO_2 10%, N_2 84%) を行った (37°C, 湿度 100%)。
- ③ 菌体からのゲノム DNA の調製には、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いた。
- ④ 自然科学研究機構基礎生物学研究所の次世代 DNA シーケンサー SOLiD ver. 4 (ABI) を用いて *H. heilmannii* 2 株の配列を決定した。
- ⑤ 自然科学研究機構基礎生物学研究所の RECOG システムによりオーソログ解析を行い、近縁の近縁の 27 菌株 (*Helicobacter* 属・16 菌株、*Campylobacter* 属・11 菌株) との比較ゲノム解析を行った。
- ⑥ 重要と思われる遺伝子は、プライマーを設計し、PCR により増幅した遺伝子の配列を再度確認した。

4. 研究成果

- ① 本菌を Th1 優位の C57BL/6 マウスに経口感染させると、壁細胞の障害が認められ、100%の確率で胃 MALT リンパ腫が形成される。一方、本菌を IL-10 欠損 C57BL/6 マウスに経口感染させると、壁細胞の減少に伴い MALT リンパ腫の形成も抑制される。

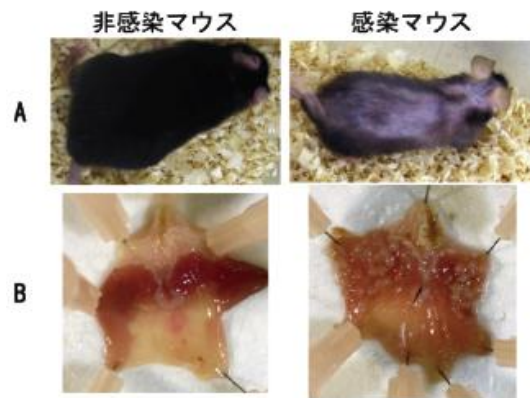


図 1. *H. heilmannii* TKY 株感染 1 年後の C57BL/6 マウスと非感染マウスの比較。(A) マウスの状態。(B) 胃の状態。感染マウスには MALT リンパ腫が形成される。

- ② 胃生検体の PBS による懸濁液を C57BL/6 マウスに経口投与すると、投与 2 週間後に感染マウスの胃では、*H. heilmannii* が 10^{4-5} 個に対し腸内細菌が 10^7 CFU も増殖する。Sepa-Max rabbit IgG と Sepa-Max Hp を用いることで、*H. heilmannii* の単離し、リアルタイム PCR を用いて調製した DNA の純度を調べた (図 1)

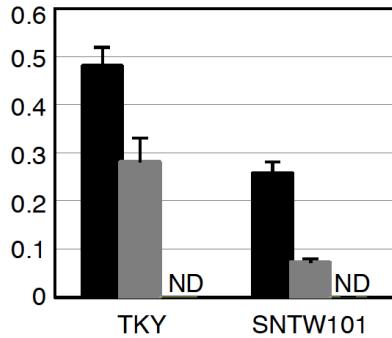


図 1. 感染マウスの胃懸濁液から *H. heilmannii* TKY 株と SNTW101 株のゲノム DNA を調製し、リアルタイム PCR により、純度を検定した。黒色カラム、細菌共通のプライマーを使用した時の DNA の相対量; 灰色カラム、*Helicobacter* 特異的プライマーを使用した時の DNA の相対量; 白色カラム、宿主細胞特異的プライマーを使用したときの DNA の相対量。細菌に *Helicobacter* も含まれるので、黒カラムから灰色カラムを差し引いた値が夾雑する細菌の DNA 量となる。宿主由来の DNA は検出されなかった (ND)。従って純度は 80% (TKY), 30% (SNTW101) と見積りゲノム解析に用いた。

- ③ *H. pylori*, *H. heilmannii* TKY 株, *H. heilmannii* SNTW101 株の病原遺伝子遺伝子の一部を表 1 にまとめる。

Table 1. Genes associated with virulence in *H. suis* TKY and SNTW101 compared with *H. pylori*.

Trait	Gene name in	Gene name in	Gene name in	Role
	<i>H. pylori</i>	<i>H. suis</i> TKY	<i>H. suis</i> SNTW101	
Type IV secretion	copT-5AZ	Absent	Absent	Inflammation, gastric cancer
	comB	comB2,3,6,8	comB2,3,8,10,2	Natural competence
Urease	ureA,B,E,F,G,H,I	ureA2,B2,C2,E2,F2,G2,H2	ureA,B2,C2,H2	Acid protection
Vacuolating	vacA	vacA (Putative)	vacA (Putative)	Vacuolation, cytotoxin, T-cell inhibition
Neutrophil activation	napA	napA	napA	Neutrophil activation, Th1 polarization

H. heilmannii には存在しないとされていた

空胞化毒素遺伝子 (*vacA*) が TKY, SNTW101 の両株で見つかった。また、SNTW101 株はウレアーゼ活性を欠損しているが、*ure* 遺伝子は存在していた。更に Type IV 分泌機構に関わる遺伝子は、TKY, SNTW101 両株とも存在しなかった。

- ④ マウスの胃に夾雑する細菌の大部分は、*Lactobacillus murinus* であった。*H. heilmannii* が感染することで、胃に共存できるようになったと考えられる。
- ⑤ *H. heilmannii* には、*H. pylori* が保持しない数個の遺伝子が存在した。

結論：

Helicobacter 属細菌は 30 種類以上にも分類され、それらの幾つかは、ヒトに対する病原性が明らかになってきた。*H. heilmannii* は胃 MALT リンパ腫を惹起すると考えられる。マウスの胃内に *H. heilmannii* を投与することによりヒトのリンパ腫に類似の病態を誘発することは、その証明となる。これまで培養が困難なため *H. heilmannii* 感染が原因となる疾患を見逃していた可能性が高い。本菌をマウスに感染させると、感染胃内に *L. murinus* が *H. heilmannii* の 100 倍量も増殖した。*L. murinus* は、L-乳酸のみを産生する。*H. heilmannii* は、LDH (乳酸脱水素酵素) 遺伝子を保持していないが、L-乳酸が存在すると増殖が可能となる。感染マウスにおいては、*H. heilmannii* の菌数が胃内の全菌数の 1% 以下であるが、Sepa-Max Hp 処理により、純度を飛躍的に上げることが出来た。そのため、培養不能菌ではあるが、*H. heilmannii* のゲノム解析が可能となった。今後は、*H. heilmannii* の病原性の解析が一層進むと期待できる。従って、今後は、全国規模の疫学調査が是非とも必要である。

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 28 件)

- ① 胃、肝 MALT リンパ腫形成および進展における幹細胞の関与。
中村正彦、高橋哲史、横山展子、松田唯、松井英則、土本寛二。
Prog. Med., 2012, 32, 553-555. ★
- ② ヘリコバクター・ハイルマニー感染とは ” One Point Advice ”

- 松井英則、高橋孝、中村正彦.
Medical Practice, 2011, 28 (6),
1123.
- ③ “*Candidatus Helicobacter heilmannii*” infection in the course of gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in human beings and mouse models.
Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Chihiro Aikawa, Soamy Yamagata Murayama, Tetsufumi Takahashi, Haruno Yoshida, Takashi Takahashi, Kanji Tsuchimoto, and Masahiko Nakamura. Current Trends in Microbiology, 2010, 6, 27-34.
- ④ *Helicobacter heilmannii* と胃 MALT リンパ腫-brain-gut ペプチド、とくに CGRP の関連性について。
中村正彦、高橋哲史、松井英則、土本寛二. *Helicobacter Research*, 2010, 14 (2), 11-14.
- ⑤ *Helicobacter heilmannii* 臨床分離株の分離と病原性の検討
高橋哲史、松井英則、村山そう明、中村真一、白鳥敬子、土本寛二、中村正彦. 潰瘍(Ulcer Research), 2010, 37, (1) 46-49.
- ⑥ *Helicobacter heilmannii* 感染時の NSAIDs 消化管傷害
中村正彦、高橋哲史、松井英則、土本寛二. 潰瘍 (Ulcer Research) , 2009, 36, 26-29.
- ⑦ ★*Helicobacter heilmannii* と胃 MALT リンパ腫
中村正彦、高橋哲史、田村亮、小川智史、松井英則、土本寛二
Helicobacter Research, 2009, 13 (4), 302-305.

[学会発表] (計 49 件)

- ① 日本における PCR 法を用いた胃生検体からの *Helicobacter heilmannii* DNA の検出 (Detection of *Helicobacter heilmannii* DNA in gastric biopsy specimens by PCR in Japan.
関谷幸江、中谷百合子、吉田春乃、村山そう明、中村正彦、松井英則
85 回日本細菌学会総会, 2012, 3, 27, 長崎ブリックホール・長崎新聞分化ホール.
- ② Molecular mechanism of gastric MALT lymphoma formation by *Helicobacter heilmannii* infection.
Takahashi, T., Matsui, H., Takizawa A, Takahashi, S., Hibi, T., Nakamura, M., and Tsuchimoto, K.
Digestive Disease Week (DDW) 2011, 2011, 5, 7, Chicago IL, USA.
- ③ マウス胃 MALT リンパ腫に対する celecoxib および Flt-1, Flk-1, Flt-4 抗体の効果.
中村正彦、高橋哲史、松井英則、土本寛二. 第 6 回日本消化管学会総会学術集会 (福岡) , 2010, 2, 19-20.

[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◇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

松井 英則 (MATSUI HIDENORI)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号：30219373