

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21081

研究課題名(和文) 口腔ピロリ菌は胃がんの原因となるか？磁気ビーズを用いたDNA解析による検索

研究課題名(英文) Does Oral Helicobacter Pylori Cause Gastric Cancer? Retrieval by DNA analysis using magnetic beads.

研究代表者

永田 量子(NAGATA, Ryoko)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：40911748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の口腔から胃への感染機序は十分に解明されておらず、口腔内での菌の生死を確認できていない。本研究では、胃と口腔の関連性を解明するために、胃と口腔にピロリ菌の現感染がある患者の口腔と胃の試料よりDNAを抽出し、Nested PCR、MLST解析を行い、相同性を解析する。結果、胃と口腔のピロリ菌は異なる遺伝子を持つが、近縁である可能性が高い。MLSTを用いて胃と口腔のピロリ菌の遺伝的関係を解析する方法は、感染経路の解明を考察するのに役立つ。本研究では、限られた数の遺伝子の組み合わせによる解析であったため、口腔が胃の感染源となるかどうかを解明するには、口腔ピロリ菌の培養法を確立する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌の口腔から胃への感染機序は十分に解明されていない。本研究では、口腔と胃の試料よりDNAを抽出し、Nested PCR、MLST解析を行うことで相同性を解析する。胃と口腔のピロリ菌DNAが高い相同性を有することが確認されれば、経口感染を証明するエビデンスを追加できる点で、高い学術的独自性を有する。結果、胃と口腔のピロリ菌は異なる遺伝子を持つが、近縁である可能性が高い。また、ピロリ菌は成人の口腔内に正常な微生物叢として存在している可能性がある。MLST解析は、感染経路の解明を考察し、口腔ピロリ菌の除菌の必要性を考察するのに役立つ。

研究成果の概要(英文)：The infection mechanism of Helicobacter pylori from the oral cavity to the stomach has not been fully elucidated, and it has not been possible to confirm the survival and death of the bacteria in the oral cavity. In this study, in order to elucidate the relationship between the stomach and oral cavity, DNA will be extracted from oral and gastric samples of patients with current H. pylori infection in the stomach and oral cavity. Then, homology is then analyzed by performing nested PCR and MLST analysis.

As a result, although the gastric and oral H. pylori have different genes, they are likely to be closely related. Using MLST to analyze the genetic relationship between gastric and oral H. pylori is useful for considering the elucidation of the infection route. In this study, since the analysis was based on a limited number of gene combinations, it is necessary to establish a culture method for oral H. pylori to clarify whether the oral cavity is the source of gastric infection.

研究分野：Oral bacteria

キーワード：Helicobacter pylori Nested PCR MLST genotype gastric mucosa allele sequences

1. 研究開始当初の背景

WHO (世界保健機関) は、*Helicobacter pylori* (以下ピロリ菌) が胃の発がん因子であると認定し (1994 年)、ピロリ菌除菌に胃がん予防効果があると認め、各国ごとに戦略を立てるよう勧告した。また、口腔はピロリ菌の第二の至適生息部位であり、胃ピロリ菌感染者の口腔からはピロリ菌 DNA が高確率で検出されることから、ピロリ菌は経口感染の可能性が高いとされてきた (Song Q et al. Dig Dis Sci 45: 2162-2167, 2000)。実際に、申請者らが胃のピロリ菌感染者および除菌療法経験者 15 名を対象に、口腔サンプル中のピロリ菌 DNA の存在割合を調査したところ、被験者の 80% が、ピロリ菌 DNA を保有していた (図 1 上段, Nagata R et al. Pathogens 10(1):10, 2020)。

一方、最近の日本人の胃ピロリ菌感染率は、生活水準の向上により、特に若年層において減少傾向にあることが示唆された (Miyamoto R et al. J Infect Chemother. 2019)。申請者らは、口腔ピロリ菌の感染率も若年層において減少すると仮説を立て、24-91 歳の 88 名の健常者を対象に、口腔サンプル中のピロリ菌 DNA の存在割合を調査した。

その結果、年代に関係なく 21-48% の割合でピロリ菌 DNA が存在していた (図 1 下段、年代間に有意差なし。上記発表論文から抜粋)。若年層の胃ピロリ菌の低い感染率と、口腔ピロリ菌 DNA の高い存在率という、相反する申請者らの知見から、衛生環境が改善した現在でも、口腔ピロリ菌は口腔常在細菌叢を構成する“ありふれた”細菌である可能性があると考えた。

ピロリ菌の感染経路は完全には解明されておらず、上下水道設備が整っていない不衛生な環境が感染の原因と推察されている。実際、日本人のピロリ菌の感染者数は若年者ほど低く、若年層 (24-34 歳) の胃ピロリ菌感染率は、10.7-19.3% と報告されている (表 1 左, Wang C et al. Sci Rep 7:15491, 2017.)。一方で申請者が行った口腔ピロリ菌の感染率検索では、年齢層に関係なく高い割合 (21-48%) で存在していた (表 1 右, Nagata R et al. Pathogens 10(1):10, 2020)。つまり口腔ピロリ菌は常在細菌のひとつとして存在する“ありふれた”細菌であり、胃のピロリ菌感染が経口感染であるなら、若年層における胃と口腔における感染率の無相関は矛盾が生じる。そこで、胃と口腔にピロリ菌の現感染がある患者を対象に、ピロリ菌が口腔で生きて存在し、将来の胃感染のリスクファクターとなるか、両ピロリ菌が同一起源であるかを検討することとした。

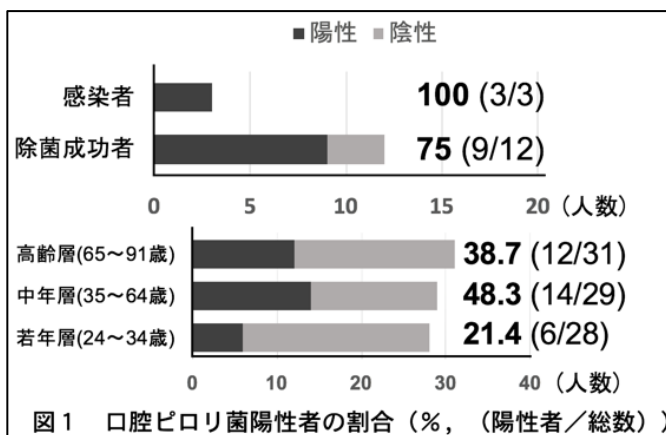


表 1 日本人の胃と口腔におけるピロリ菌感染率 (%)

	胃	口腔
高齢層(65~91歳)	55.0~67.5	38.7
中年層(35~64歳)	20.2~54.0	48.3
若年層(24~34歳)	10.7~19.3	21.4

2. 研究の目的

口腔から胃への感染機序は十分に解明されていない。本研究の目的は、ピロリ菌が口腔で生きて存在し、将来の胃感染を起こす可能性があるかを検討することである。これまで、口腔内からは DNA しか検出されておらず、菌の生死を確認した報告はない。本研究では、胃と口腔の関連性を解明するために、胃と口腔にピロリ菌の現感染がある患者から試料採取後 DNA を抽出し、遺伝子解析を行い、相同性を解析することである。さらに、上記背景を踏まえ、本研究では、(1) 胃と口腔の関連性を解明するために、胃と口腔にピロリ菌の現感染がある患者から試料採取後 DNA を抽出し、Nested PCR を行い、口腔に存在するピロリ菌の検出率を確認する。(2) 胃と口腔で得られた増幅産物を用いて、MLST 解析による菌のタイピングを行う。さらに、不特定領域の遺伝子増幅産物をシーケンシングして、一塩基ごとの変異の比較することで、相同性を解析する。

この手法が確立されれば、胃と口腔の関連性を解明する強力なツールとなりえる点で創造的で斬新性がある。また、胃のピロリ菌感染者の口腔内からピロリ菌 DNA が検出されたという報告はあるが、遺伝子レベルで相同性を検索した信頼度の高い研究報告は見当たらない。胃と口腔のピロリ菌 DNA が高い相同性を有することが確認されれば、経口感染を証明するエビデンスを追加できる点で、高い学術的独自性を有する。

ピロリ菌が口腔を隠れ家 (リザーバー) としていることが証明されれば、胃感染のリスクファクターとなる可能性があり、ピロリ感染症研究に新たな視点を提供できる。

3. 研究の方法

本研究は、新潟大学医歯学総合病院消化器内科を受診し、ピロリ菌の現感染があると診断され、内視鏡治療を受けた早期消化管癌患者 21 名より、胃の一部組織と口腔試料の提供を受けた。これらの胃のピロリ菌 DNA は、先行研究(挑戦的研究(萌芽) 19K22704)により既に採取し、冷凍保存している試料を用いた。

(1). Nested PCR 法を用いた口腔試料、胃組織からのピロリ菌 DNA の検出

口腔試料(唾液、舌苔、デンタルバイオフィルム(上下顎前歯・臼歯部))及び、胃一部組織、胃組織より培養した細菌コロニーから DNA を抽出し、先行論文にて確立済みの高感度 Nested PCR 法によりピロリ菌 DNA の有無を調査した。(Nagata R et al. Pathogens 10(1):10, 2020)

ピロリ菌が確認された胃組織をヘマトキシリンエオシン(H-E)染色、ギムザ染色し、ピロリ菌菌体の有無を確認した。

(2). MLST 解析

菌が生存のために必要とする 7 種類の必須遺伝子 (House keeping 遺伝子: *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *urel*, *yphC*) 及び、細胞空胞化毒素遺伝子 *vacA* のそれぞれ 500 塩基程度の配列に合ったプライマーを詮索、使用した(図 2 参照)。

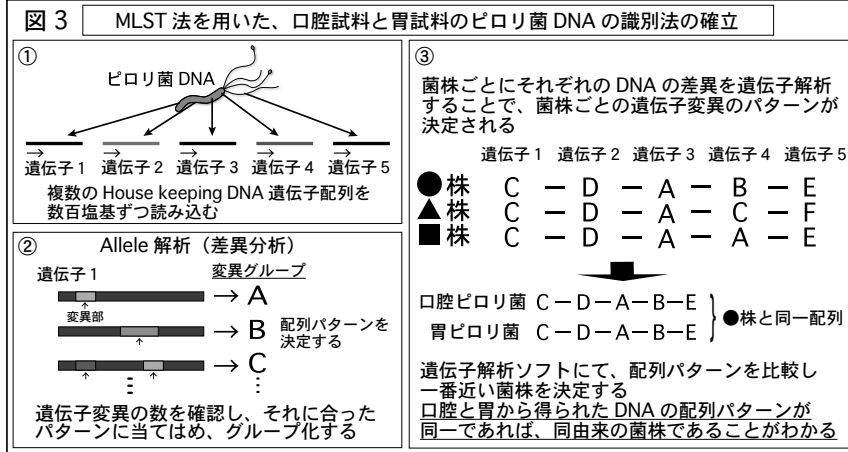
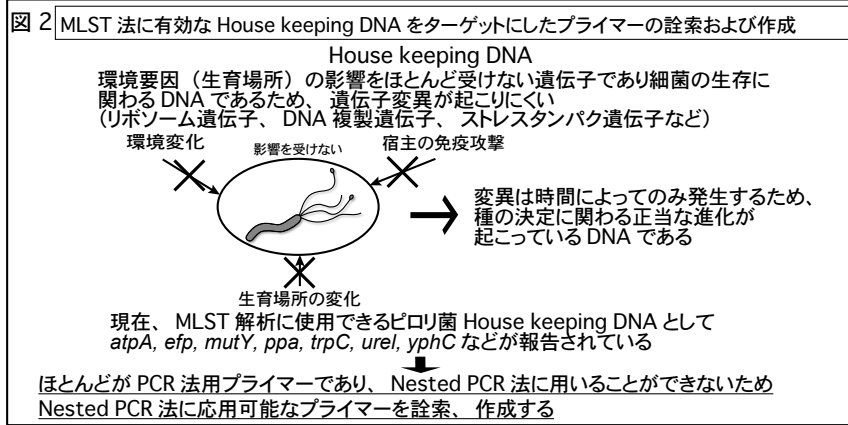
プライマーの決定後ショットガンゲノムシーケンスにより配列を得る。その配列の相異 (Allele) のパターンを統合遺伝子解析ソフトにより解析し、ピロリ菌の近縁種と比較することで菌のタイピングを行った(図 3 参照、PubMLST (<http://pubmlst.org/helicobacter/>, Jolly KA et al. Wellcome Open Res 3:124, 2018))。House keeping 遺伝子は、菌の生存に必須の糖代謝に関わる酵素をコードしており、その遺伝子変異は緩やかな時間で生じるため、同一性を推定できる。

(3). 系統樹分析
胃と口腔から得られたピロリ菌の系統発生を分析するために、世界中 8 つの地域(東アジア、東南アジア、南アジア、オセアニア、ヨーロッパ、北アメリカ、南アメリカ、アフリカ)、29 カ国から 159 のピロリ菌分離株の House keeping 遺伝子配列を BLAST ウェブサイト (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) よりダウンロードした。MEGA (V11) を使用し、本研究で得られた DNA 配列と世界中のピロリ菌配列を比較し、系統樹を作成した。また、Allele 解析にて *vacA* を含む 2 つ以上の対立遺伝子が得られたサンプルはそれぞれ胃と口腔のサンプル間で系統樹解析を行った。

4. 研究成果

(1). Nested PCR 法を用いた口腔試料、胃組織からのピロリ菌 DNA の検出

ピロリ菌 DNA は全ての患者口腔内試料の少なくとも 1 ヶ所より検出され、特に上顎前歯部からは 71.4% の割合で検出された。胃組織からは全ての被験者からピロリ菌 DNA が検出された。



胃組織の H-E 染色(図 4.A)、及びギムザ染色(図 4.B,C)では、胃粘膜と粘液酸性細胞の間を貫通する螺旋状の桿菌を確認した(図 4.C,矢頭, (Nagata R et al. Int J Mol Sci 24(3):2211, 2023))。



図4 ピロリ菌の H-E 染色及び、ギムザ染色像

(2). MLST 解析

ピロリ菌 DNA が検出された口腔サンプルと胃から培養されたピロリ菌より、8 つの House keeping 遺伝子をターゲットにしたプライマーを用いて DNA 増幅産物を得た。ピロリ菌の DNA 量は Nested PCR を行っても収量が少なかったため、Allele 解析に使用できたものはサンプルによって 0~8 種であった。得られた増幅産物は PubMLST ウェブサイトにて Allele 解析を行った(表 2, (Nagata R et al. Int J Mol Sci 24(3):2211, 2023))。8 種全ての Allele 解析ができたのは 1 人の被験者のみであった。また 1 人の被験者は一つも DNA 増幅産物が得られなかったため MLST 解析には使用しなかった。

Participants No.	Housekeeping Gene															
	<i>atpA</i>		<i>ureI</i>		<i>efp</i>		<i>mutY</i>		<i>ppa</i>		<i>trpC</i>		<i>yphC</i>		<i>vacA</i>	
	Oral	Gastric	Oral	Gastric	Oral	Gastric	Oral	Gastric	Oral	Gastric	Oral	Gastric	Oral	Gastric	Oral	Gastric
1	-	NP	n/m	3242	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	3504	3488	-	NP
2	-	NP	n/m	463	453	n/m	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP
3	2364	963	2643	2943	1162	2421	2368	2368	45	942	458	970	3556	3538	573	573
4	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP
5	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP
6	-	NP	-	NP	-	NP	n/m	2476	-	NP	970	423	-	NP	-	NP
7	-	NP	n/m	2647	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP
8	-	NP	n/m	67	-	NP	-	NP	942	929	-	NP	-	NP	-	NP
9	-	NP	286	2856	-	NP	-	NP	849	45	-	NP	-	NP	-	NP
10	2364	1760	n/m	466	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	3513	457	-	NP
11	-	NP	-	NP	-	NP	n/m	2360	420	945	-	NP	3569	3515	-	NP
12	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	420	448	-	NP	3515	1962	-	NP
13	2003	958	-	NP	-	NP	n/m	2729	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP
14	-	NP	-	NP	-	NP	935	38	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP
15	-	NP	-	NP	453	1879	935	1907	-	NP	-	NP	-	NP	29	950
16	1760	n/m	3243	966	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	3538	3523	-	NP
17	-	NP	n/m	2471	-	NP	935	2450	-	NP	-	NP	3572	3572	-	NP
18	-	NP	n/m	466	-	NP	3162	935	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP
19	-	NP	n/m	825	-	NP	935	1219	-	NP	-	NP	-	NP	785	618
20	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	1887	445	-	NP	3513	3543	-	NP
21	-	NP	738	971	-	NP	-	NP	-	NP	-	NP	3542	3542	-	NP

表2 House keeping 遺伝子をターゲットにした胃と口腔から得られたピロリ菌 DNA の Allele 解析結果 n/m: Allele number とのマッチなし。 NP: 増副産物なし。

MLST 解析では House keeping 遺伝子として登録されている 7 種類の DNA を使用してタイピングを行った。*vacA* 遺伝子に関しては PubMLST ウェブサイトで MLST に使用することはできなかった (Yokota S et al. *Helicobacter* 20(5):334-342, 2015)。MLST の結果では、胃と口腔から得られた遺伝子型のうち 1 つのサンプルでのみ一致する遺伝子型を確認できた (No.13)。そのほかの被験者から得られた遺伝子型は類似しているとは言えず、特に全ての DNA で Allele 解析ができていた No.3 の遺伝子型も一致しなかった。これは、胃と口腔で異なる遺伝子配列を持ったピロリ菌が生息していることを示唆している。

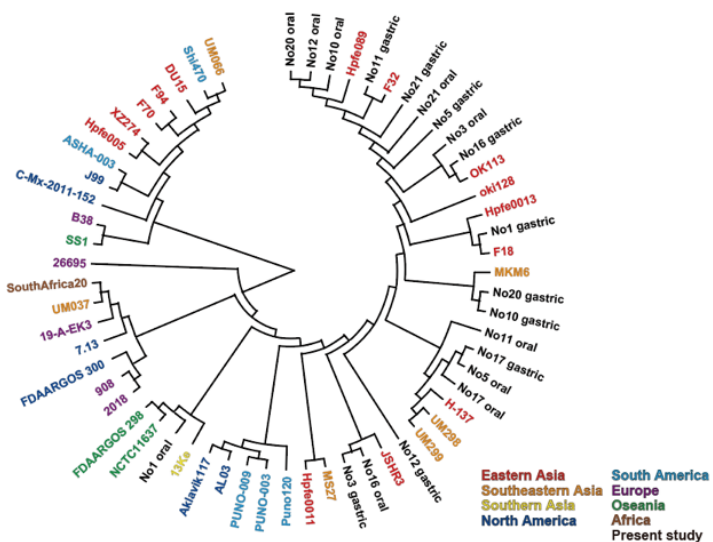


図5 YphC 遺伝子による樹形図

(3). 系統樹分析

Allele 解析にて得られた 7 つの遺伝子型それぞれを用いて系統樹解析を行った。この研究で得られた胃と口腔のピロリ菌遺伝子配列は主にアジアの分離株に集約されていた(図 5, (Nagata R

et al. Int J Mol Sci 24(3):2211, 2023)).

2つ以上の対立遺伝子が得られたサンプルで得られた系統樹では、ほとんどのサンプルで胃と口腔のピロリ菌 DNA に多様性が見られたが、6つのサンプルで口腔のピロリ菌 DNA は胃由来株と類似した配列を有することが確認された(図6, (Nagata R et al. Int J Mol Sci 24(3):2211, 2023))。

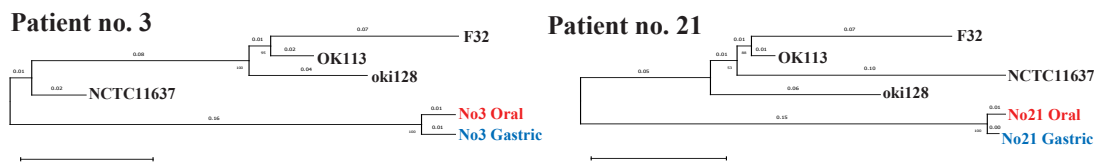


図6 口腔と胃のピロリ菌の相互関係を示す系統樹

(4). 考察と結論

本研究では、MLSTを使用して早期消化管癌患者21名の胃と口腔ピロリ菌のゲノムシーケンスを行った。全ての被験者の胃と口腔からピロリ菌DNAを得ることができ、口腔サンプルでは特に上顎前歯部歯肉縁上バイオフィームで多く検出された。この特徴的な分布は局所的な酸素濃度と酸性度に関係しているかもしれない。ピロリ菌は好気性菌であり、酸耐性を持つことが知られている。前歯部は頻りに酸素に触れる、また、歯肉縁上バイオフィーム内は酸性を維持しているため、ピロリ菌にとって好条件を生み出している可能性がある。

7つのHouse keeping遺伝子を使用して得られたほぼ全ての系統樹で、本研究で得られたピロリ菌遺伝子配列は、病原性が高いと考えられているアジア株と近いものと分類された。発癌に関与する一部のピロリ菌株は、*cagA* や *vacA* などの細胞毒素関連遺伝子を保有しており、特に *vacA* 遺伝子は東アジア株で優位に検出されている (Yamaoka Y et al. Gastroenterology 117(2):342-9, 1999)。本研究に参加した被験者も全員胃癌を患っており、分離されたピロリ菌株もこれらの病原性遺伝子を持っている可能性は高い。

MLST分析では、口腔サンプルから得られた8つの遺伝子配列より得られた対立遺伝子は非常に限られていた。その理由として考えられることは、Nested PCRを行ってもDNAを得ることができなかったことが挙げられる。現在、口腔からピロリ菌を分離培養できる確実な方法は確立されていない。そのため、Nested PCRにて口腔内に存在する非常に少量のピロリ菌を検出する必要があるが、その検出感度はプライマーセットにより異なる。例えば、本研究でも使用したEHC/ET-5プライマー(Nagata R et al. Pathogens 10(1):10, 2020)では100万分の1菌体を超える濃度で口腔ピロリ菌が存在しなければ検出することができない。また、Sulo等は口腔内に存在するピロリ菌の存在量は低く、DNAは切断された状態で存在している可能性が高いため、長いbpをターゲットにするプライマーの感度は著しく低下すると報告している (Sulo P et al. World J Gastroenterol 27(41):7100-7112)。本研究で使用されたプライマーのほとんどは最終増殖産物のbpが500を超えている。この制限を克服するには、口腔からの分離培養法を確立する必要がある。

MLSTの結果は21人の被験者のうち1人が胃と口腔で同じ遺伝子型を有していることが確認された(No.13)。ただし、分析に使用されたHouse keeping遺伝子は2種類のみであり、特異性は低い。MLSTではHouse keeping遺伝子が一組あれば解析が可能であるものの、信頼できる結果を得るためには6つ以上の対立遺伝子が必要であり、数が減るにつれて特異性と信頼性が低下する (Maiden MC et al. Proc Natl Acad Sci USA 95(6):3140-5)。よって、7つの遺伝子を用いて解析を行ったNo.3は信頼性が高く、口腔と胃のピロリ菌が異なる起源である可能性が高い。

*vacA*を含む2つ以上のHouse keeping遺伝子の組み合わせが得られたサンプルを使用して作成した系統樹では、6人の被験者から得られた口腔と胃のピロリ菌DNAが類似していることが確認された。

これらの結果から、胃と口腔のピロリ菌は遺伝的に類似しているものの、同一起源ではなく別々の機会に感染している可能性が示唆された。胃にピロリ菌が存在する被験者は、ピロリ菌が豊富な環境下で生活を続けている可能性が高く、再感染を引き起こしている可能性が高い。

しかしながら、次の2つの可能性から胃と口腔のピロリ菌の同一性を完全に否定することはできない。1つは胃と口腔における生育環境による遺伝子変異の可能性、もう一つは胃と口腔におけるピロリ菌の混合感染の可能性である。Linz等はピロリ菌感染の急性期における遺伝子変異率は慢性期の10倍であることを報告し (Linz B et al. Nat Commun 5:4165, 2014)、Palau等は胃に異なる遺伝子を持つピロリ菌が感染していると報告している。これらは、口腔内でも起こっている可能性がある (Palau M et al. Helicobacter 21(6):481-487, 2016)。

結論として、胃と口腔にピロリ菌が存在する場合、異なる遺伝子を持つピロリ菌が存在する可能性が高い。そのピロリ菌は近縁であり、成人の口腔内に正常な微生物叢として存在している可能性がある。MLSTを用いて胃と口腔のピロリ菌の遺伝的関係を解析する方法は、感染経路の解明や口腔ピロリ菌の除菌の必要性を考察するのに役立つ。本研究では、限られた数の遺伝子の組み合わせによる解析であったため、口腔が胃の感染源となるかどうかを解明するためには、口腔ピロリ菌の培養法を確立する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagata Ryoko, Sato Hiroki, Takenaka Shoji, Yokoyama Junji, Terai Shuji, Mimuro Hitomi, Noiri Yuichiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Analysis of Genetic Relatedness between Gastric and Oral Helicobacter pylori in Patients with Early Gastric Cancer Using Multilocus Sequence Typing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2211 ~ 2211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032211	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 -

1. 著者名 Noiri Yuichiro, Nagata Ryoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Current status of gastric and oral infection/diseases caused by Helicobacter pylori	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1172	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------