

## 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25年 5月 7日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22406026

研究課題名（和文）ヘリコバクター属細菌感染と消化器疾病構造の疫学調査研究

研究課題名（英文）Epidemiological study for association between *Helicobacter* infection and gastrointestinal diseases

## 研究代表者

東 健 (AZUMA TAKESHI)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：60221040

## 研究成果の概要（和文）：

本研究ではアジア・アフリカにおけるヘリコバクターピロリ菌及びスuis菌感染と消化器疾病構造を疫学調査すると共に、採取した菌のゲノム解析を行い、疾患発症を規定する宿主・環境・菌体因子を明らかにすることを目的としている。本研究で、リビア、タイ、中国での現地調査を実施するとともに、フィリピンとベトナムの調査協力者からの胃粘膜生検組織の提供により、ピロリ菌とスuis菌感染と消化器疾患との関連を検討した。ピロリ菌感染と慢性胃炎、スuis菌感染とマルトリンパ腫の関連が明らかになった。特に、ピロリ菌感染においては、病原因子 CagA の分子多型で、東アジア型の CagA を有するピロリ菌感染が胃癌発症リスクであることが認められた。また、ピロリ菌とスuis菌感染時の宿主の免疫応答を検討したところ、ピロリ菌感染では Th1 優位であったが、スuis菌感染は Th1 と Th2 共に反応が亢進していた。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the relationship between *Helicobacter* infection (*H. pylori* and *H. suis*) and gastrointestinal diseases in Asian and African countries. *H. pylori* is a group I carcinogen in human. CagA is a most important virulent factor of *H. pylori* associate with gastric cancer. The prevalence of East Asian CagA was significantly higher in patients with gastric cancer than in patients with chronic gastritis. The much greater magnitude of risk observed with East Asian CagA-positive *H. pylori* infection. Therefore, patients harboring East Asian CagA-positive *H. pylori* are at a higher risk for developing gastric cancer than those infected with Western CagA-positive strains. *H. suis*, which belongs to the *Helicobacter* family just like *H. pylori*, was found in the stomachs of various animals including cats, dogs and pigs, and furthermore humans. *H. suis* infection caused gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Th1 host response was predominant in *H. pylori* infection. In contrast, both Th1 and Th2 host response were up-regulated in *H. suis* infection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：*Helicobacter* 感染、消化器疾患、疫学調査

## 1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌は大きさ 1.0～4.0  $\mu\text{m}$  のグラム陰

性らせん状菌で、一端に鞭毛が3~6本あり、ヒトの胃内に特異的に生息する。ピロリ菌感染は全世界で人口の50%以上に認める最も感染率の高い慢性感染症であり、慢性胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、胃 MALT リンパ腫等多くの消化器疾患に関与している。一方、アジア・アフリカ諸国はピロリ菌感染率が一律高いにもかかわらず、ピロリ菌感染関連疾患の種類や頻度は各国により大きく異なっている。ピロリ菌感染は胃癌に関与し、ピロリ菌は1994年に世界保健機構より1群の発がん因子に認定されている。しかし、疫学的研究によるピロリ菌感染の胃癌発症オッズ比は、約2~23と国や地域により大きく異なる。日本、韓国、中国では胃癌の発症が極めて高いが、東南アジア・アフリカでは極めて低い。また、消化性潰瘍の中で、胃潰瘍の頻度は日本、韓国、中国北東部で高く、中国南部、タイ、アフリカ諸国では十二指腸潰瘍の頻度の方が高い。このピロリ菌感染の病態の民族差、「謎」、”Ethnical enigma”を明らかにすることが、ピロリ菌感染の病態解明につながると考えられる。ピロリ菌感染におけるこれら疾患の多様性に、ピロリ菌のゲノム多型が関与している。高い形質転換率を持ち外因性のDNAが導入されやすいピロリ菌には、遺伝子多型が極めて多いことが明らかにされ、菌株における疾患特異性が解析されてきている。1997年にはイギリスの胃炎患者から分離されたピロリ菌標準株26695のゲノムの全塩基配列が決定され、全長1667867塩基対で1590の遺伝子が認められた。次いで、1999年にはアメリカの十二指腸潰瘍患者から分離された菌株J99のゲノムの全塩基配列が決定され、全長1643831塩基対で1495の遺伝子が認められた。この2つの菌株間では、ゲノム構造は似かよったものであったが、6~7%の遺伝子がそれぞれの株に特異的であった。この違いが、胃炎と十二指腸潰瘍という、それぞれの病態の違いに関与していると考えられる。ピロリ菌はヒトの胃粘膜に特異的に接着し感染している。したがって、ヒトのこれまでの移動と共に、ピロリ菌も地球上を移動してきたと考えられる。ピロリ菌のゲノムを解析すると、ピロリ菌のゲノムの多型性の分布が、人類の起源や移動と一致することが示されてきた。これまで世界各地の菌株の遺伝子解析により、世界中のピロリ菌株は主に5つのグループ(2つのアフリカ株、1つのアジア株、2つのヨーロッパ株)に分けられることが報告されている。また、ピロリ菌のゲノムには本来ピロリ菌のものではない外来性の遺伝子群が存在している。これは多くのグラム陰性菌に共通した現象であり、これらの細菌では、この外来性遺伝子群を持つことで病原性を発揮することが認められており、この遺伝子群を病原遺伝子群

(pathogenicity island, PAI)と呼んでいる。ピロリ菌では、病原因子の一つである細胞空胞化毒素関連蛋白(CagA)の遺伝子 *cagA*がこのPAI内に位置しており、*cagPAI*と呼ばれている。ピロリ菌の *cagPAI*内には、4型分泌装置を構成する遺伝子が存在している。我々は、ピロリ菌が胃粘膜上皮細胞に接着すると、CagAが4型分泌装置を介してピロリ菌から上皮細胞内へ注入され、チロシンリン酸化を受け、ヒト上皮細胞のシグナル伝達系を攪乱することを世界で初めて明らかにした(**J Exp Med 191:593-602, 2000**)。また、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化されたCagAが、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素SHP-2と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した(**Science 295:683-686, 2002**)。さらに、CagAのチロシンリン酸化部位となるアミノ酸配列(E-P-I-Y-A)モチーフを同定するとともに、リン酸化チロシン残基を含むCagAのSHP-2結合配列を明らかにした。このSHP-2結合配列部位に一致して、CagAに分子多型が認められ、大きく東アジア型と欧米型の2つに分けられ、東アジア型のCagAは欧米型のCagAに比べSHP-2とより強く結合し、より強い生物活性を発揮することが認められた(**Proc Natl Acad Sci USA 99:14428-14433, 2002**)。したがって、東アジア型のCagAを有するピロリ菌による感染は、病原性が強く細胞障害を強く生じ、胃粘膜萎縮及び胃発がんに関与すると考えられた。

一方、近年、ピロリ菌類似細菌のスイス菌が胃 MALT リンパ腫患者から検出され注目されている。この細菌は大きさ4-10 μm、らせん状、波長が約1 μmで3-8回のねじれをもつ細菌で、最大14本の鞭毛を持ち、ヒト慢性胃炎患者の0.2-4.0%から検出されることが報告されている(**Gastroenterology 118:821-28, 2000**)。スイス菌の培養法はこれまで確立されていないため、その感染診断は、組織切片中の大型のらせん状形態を示す細菌の存在をもとに行われている。近年、胃 MALT リンパ腫患者から分離されたスイス菌をマウスに感染させることにより短期間で胃 MALT リンパ腫を誘導できるマウスモデルが開発された(**Infect Immun, 75:1214-22, 2007**)。したがって、スイス菌はヒト MALT リンパ腫の原因菌であると考えられる。しかし、スイス菌感染の病態については全く不明である。我々はこれまでに、マウス感染胃粘膜からスイス菌を回収し、ゲノム解析を行い、4型分泌装置構成遺伝子 *virB10*を認め、スイス菌にもピロリ菌同様にPAIが存在することが想定された。

## 2. 研究の目的

本研究ではアジア・アフリカにおけるピロ

リ菌及びスuis菌感染と消化器疾病構造を疫学調査すると共に、採取した菌のゲノム解析を行い、疾患発症を規定する宿主・環境・菌体因子を明らかにすることを目的としている。

1 アジア・アフリカ諸国のピロリ菌及びスuis菌感染率と関連疾患発症頻度の疫学調査：中国、韓国、フィリピン、ベトナム、タイ、バングラディッシュ、リビアにおいて、ピロリ菌及びスuis菌感染と消化器疾患との関連について疫学調査を行う。人畜共通感染症であるスuis菌については、ヒトと同時にブタやウシ等の家畜、犬や猫等のペットについても調査する。

2 アジア・アフリカ諸国のピロリ菌及びスuis菌感染の病態の特徴の解析：各国の胃粘膜生検組織を用いて、ピロリ菌とスuis菌感染胃粘膜の宿主免疫応答を解析する。

3 ピロリ菌とスuis菌のゲノム遺伝学的調査解析：アジア・アフリカ諸国におけるピロリ菌とスuis菌のゲノム解析を民族遺伝学的背景と合わせて解析する。

4 ピロリ菌とスuis菌感染関連消化器疾患発症を規定する因子の疫学的調査解析：ピロリ菌とスuis菌感染関連消化器疾患患者に、アンケート調査(年齢、性別、人種、食習慣、消化器疾患の病歴等)を行い、これら感染関連消化器疾患発症を規定する因子の疫学的解析を行う。

### 3. 研究の方法

1 アジア・アフリカ諸国のピロリ菌及びスuis菌感染率と関連疾患発症頻度の疫学調査：海外研究協力者の協力のもと、ピロリ菌及びスuis菌感染と消化器疾患との関連について疫学的調査を行う。海外研究協力者の医療機関における、慢性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃がん、胃 MALT リンパ腫症例を対象として、上部消化管内視鏡検査を施行し、病理学的検鏡下にピロリ菌及びスuis菌感染診断を行う。ブタやウシは摘出胃より、ペットにおいては内視鏡下生検組織の病理学的検鏡でヒトと同様にスuis菌感染診断を行う。また、ピロリ菌及びスuis菌感染関連消化器疾患発症を規定する因子の疫学的解析を行うため、アンケート調査(年齢、性別、人種、食習慣、消化器疾患の病歴等)を行う。アンケートの質問票は各国語に翻訳し、統一したものを使用する。

2 アジア・アフリカ諸国におけるピロリ菌及びスuis菌感染の病態の特徴の解析：上記の胃内視鏡施行時に胃粘膜生検組織を採取し、ピロリ菌及びスuis菌感染胃粘膜の炎症、萎縮の程度と感染宿主の胃粘膜免疫応答を検討する。胃前庭部と体部それぞれ1個はホルマリン固定により病理学的解析により、シドニーシステムに準じ胃粘膜の炎症、萎縮の

程度を0-3のグレード分類により点数化する(同時に上記における検鏡下の感染診断にも使用)。胃体部大彎の1個はピロリ菌とスuis菌の培養に用い、各症例から臨床分離株を樹立する。残りの胃前庭部と体部それぞれ1個は、-80°Cに保存し、Th1及びTh2サイトカイン(Th1としてINF- $\gamma$ 、Th2としてIL-4)の定量に用いる。組織抽出液中の各サイトカインをELISAで定量する。また、組織よりRNAを抽出し、抽出したRNAを用い、INF- $\gamma$ とIL-4のmRNA発現量を、TaqMan法による定量的RT-PCRを用いて解析する。各ヒトにおけるTh1/Th2バランスとピロリ菌及びスuis菌感染との関連を検討する。

### 4. 研究成果

本研究で、リビア、タイ、中国での現地調査を実施するとともに、フィリピンとベトナムの調査協力者からの胃粘膜生検組織の提供により、ピロリ菌とスuis菌感染と消化器疾患との関連を検討した。

各国のピロリ菌の病原因子 CagA の遺伝子多型を解析したところ、タイでは、欧米型の CagA が約 40%、東アジア型の CagA が約 60% 認め、韓国、中国ではほとんどが東アジア型の CagA を有していた。韓国、中国のピロリ菌感染者の胃粘膜は強い萎縮が認められたが、タイでは、どの CagA の遺伝子多型であっても、萎縮の程度は軽く、日本、韓国、中国等の東アジアとは大きく異なることが認められた。ベトナムでは、ピロリ菌はほとんどが東アジア型の CagA を有していた。胃がん死亡率の低いフィリピンでは欧米型の CagA が 73.7% 認め、胃がん死亡率の高い日本や韓国と異なることを明らかにした。また、日本のピロリ菌 4 株(胃がん 2 株、慢性胃炎 1 株、十二指腸潰瘍 1 株)の全ゲノムを解析した。これら日本の 4 株はアジア型を示した。疾患特異的な違いは現時点では明らかではないが、今後、個々の遺伝子について解析を行う予定である。

一方、ベトナムの慢性胃炎患者の約 4% にスuis菌感染が認められた。人のマルトリンパ腫患者で 20% の感染が、牛には約 60% がスuis菌感染が認められ、胃粘膜には多くのリンパ濾胞が認められた。また、スuis菌をマウスに経口感染させることで、マウス胃粘膜にリンパ濾胞の形成を認め、CXCL13 の発現が増加することを認めた。CXCL13 は、B 細胞を選択的に誘引する走化性因子であり、その受容体である CXCR5 との相互作用により、脾臓、および、リンパ節内の濾胞形成に関わる因子である。一方で、CXCL13 の発現上昇は、関節リウマチ、自己免疫疾患、ならびに、ピロリ菌感染における胃炎など、様々な病変の発症に関与していることが知られており、関節リウマチ発症マウスモデルにおいて、抗 CXCL13

抗体をマウスに投与することにより、病変発症の改善効果が報告された。スイス菌感染後の胃粘膜においても、CXCL13の発現上昇が認められることから、胃病変発症との関連性が示唆されるが、その詳細なメカニズムは、未だ明らかにされていない。

そこで我々は、スイス菌感染により発現誘導されるCXCL13に着目し、その中和抗体である抗CXCL13抗体をマウスに腹腔内投与することで、胃リンパ濾胞形成の抑制につながるか否かについて検討した。その結果、抗CXCL13抗体投与後のスイス菌感染マウスの胃粘膜において、リンパ濾胞形成が抑制されており、CXCL13発現誘導に関与するNF- $\kappa$ B2の活性化も阻害されていた。さらに、リンパ濾胞形成に関与するLTA、LTB、CXCR5、THFR1、ならびにLTBRの発現も低下していた。これらの結果は、スイス菌感染によって誘導されたCXCL13が、胃リンパ濾胞形成に関与していることを支持しており、今後、抗CXCL13抗体を用いたヒト胃MALTリンパ腫発症の治療効果が期待される。

さらに、ピロリ菌とスイス菌感染時の宿主の免疫応答を検討したところ、ピロリ菌感染ではTh1優位であったが、スイス菌感染はTh1とTh2共に反応が亢進していた。

#### 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10件)

1. Yahara K, Kawai M, Furuta Y, Takahashi N, Handa N, Tsuru T, Oshima K, Yoshida M, Azuma T, Hattori M, Uchiyama I, Kobayashi I. Genome-wide survey of mutual homologous recombination in a highly sexual bacterial species. *Genome Biol Evol.* 2012 Jan;4(5):628-40. (査読有)
2. Mimura T, Yoshida M, Nishiumi S, Tanaka H, Nobutani K, Takenaka M, Suleiman YB, Yamamoto K, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Miki I, Azuma T. IFN- $\gamma$  plays an essential role in the pathogenesis of gastric lymphoid follicles formation caused by *Helicobacter suis* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Oct;63(1):25-34. (査読有)
3. Kido M, Watanabe N, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Azuma T, Chiba T. Dual roles of CagA protein in *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 26;412(2):266-72. (査読有)
4. Yamamoto K, Tanaka H, Nishitani Y, Nishiumi S, Miki I, Takenaka M, Nobutani K, Mimura T, Ben Suleiman Y, Mizuno S, Kawai M, Uchiyama I, Yoshida M, Azuma T. *Helicobacter suis* KBI derived from pig gastric lymphoid follicles induces the formation of gastric lymphoid follicles in mice through the activation of B cells and CD4 positive cells. *Microbes Infect.* 2011 Jul;13(7):697-708. (査読有)
5. Kawai M, Furuta Y, Yahara K, Tsuru T, Oshima K, Handa N, Takahashi N, Yoshida M, Azuma T, Hattori M, Uchiyama I, Kobayashi I. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol.* 2011 May 16;11:104. (査読有)
6. Furuta Y, Kawai M, Yahara K, Takahashi N, Handa N, Tsuru T, Oshima K, Yoshida M, Azuma T, Hattori M, Uchiyama I, Kobayashi I. Birth and death of genes linked to chromosomal inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 25;108(4):1501-6. (査読有)
7. Nobutani K, Yoshida M, Nishiumi S, Nishitani Y, Takagawa T, Tanaka H, Yamamoto K, Mimura T, Bensuleiman Y, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Azuma T. *Helicobacter heilmannii* can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer's patch-independent pathway. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Nov;60(2):156-64. (査読有)
8. Mizuno S, Miki I, Ishida T, Yoshida M, Onoyama M, Azuma T, Habu Y, Inokuchi H, Ozasa K, Miki K, Watanabe Y. Prescreening of a high-risk group for gastric cancer by serologically determined *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis. *Dig Dis Sci.* 2010 Nov;55(11):3132-7. (査読有)
9. Cortes MC, Yamakawa A, Casingal CR, Fajardo LS, Juan ML, De Guzman BB, Bondoc EM; St. Luke's *Helicobacter pylori* Study Group, Mahachai V, Yamazaki Y, Yoshida M, Kutsumi H, Natividad FF, Azuma T. Diversity of the cagA gene of *Helicobacter pylori* strains from patients with gastroduodenal diseases in the Philippines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Oct;60(1):90-7. (査読有)

10. Tanaka H, Yoshida M, Nishiumi S, Ohnishi N, Kobayashi K, Yamamoto K, Fujita T, Hatakeyama M, Azuma T. The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice. Arch Biochem Biophys. 2010 Jun 1;498(1):35-42. (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① Takeshi Azuma, Bacterial virulence factors-Helicobacter pylori strain diversities in Asia, APDW, 7-8 December 2012, Bangkok Thailand
- ② ヤハヤ ベンスレイマン, Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium regulates the bacterial infection in mice. 第16回日本ヘリコバクター学会, 2010年6月24-25日, 京都

[図書] (計0件)

[その他]

特記することなし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 健 (AZUMA TAKESHI)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号：60221040

### (2) 研究分担者

吉田 優 (YOSHIDA MASARU)  
神戸大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：00419475

### (3) 研究分担者

久津見 弘 (KUTUMI HIROMU)  
神戸大学・医学研究科・特命教授  
研究者番号：70420461