

## 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 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659087

研究課題名（和文） ピロリ菌を用いた分子疫学研究

研究課題名（英文） Molecular Epidemiological Studies using *Helicobacter pylori*

研究代表者

山岡 吉生 (YAMAOKA YOSHIO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00544248

研究成果の概要（和文）：本研究では、沖縄で得られたピロリ菌から DNA を抽出し、病原性遺伝子（*cagA* および *vacA*）のタイピングおよび 7 つの遺伝子によるタイピングを行なった。その結果、沖縄において胃癌の発症が少ないのは、病原性の弱い菌（欧米型 *cagA* 遺伝子を持つ菌や *cagA* 陰性菌、s2m2 タイプの *vacA* 遺伝子）の割合が多いことに起因する可能性が示唆された。これらの菌の起源は、いわゆる欧米菌とは異なり、独自に進化してきたものと推測された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we extracted the DNA from *Helicobacter pylori* isolated in Okinawa, and performed the genotypes of virulence factors (*cagA* and *vacA*) and multilocus sequence typing using 7 housekeeping genes. Low prevalence of gastric cancer in Okinawa may result from the high prevalence of low virulent strains (Western-type *cagA* and *cagA*-negative strains, *vacA* s2m2 type). The origin of these strains in Okinawa may be different from those of Western countries, and these strains in Okinawa might evolve independently.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	0	2,400,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	150,000	3,050,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：ピロリ菌、分子疫学、起源、沖縄

## 1. 研究開始当初の背景

私は、以前 *Helicobacter pylori*（ピロリ菌）の病原遺伝子である *cagA* が、東アジア型（East Asian type）と欧米型（Western type）に分類されることを発見した。日本を始めとする東アジアのピロリ菌は、ほとんどが東アジア型に分類されるが、稀に欧米型を持つ菌も見られる。特に、沖縄（まれに大分）では

欧米型の *cagA* を持つ菌も多く、興味深いことに *cagA* の繰り返し配列の系統樹解析では、大分・沖縄の欧米型は、従来の欧米型とは明らかに異なる Cluster を形成している。

さて、我々の研究チームは複数遺伝子の塩基配列からピロリ菌を分類する手法（MLST）を利用し、ピロリ菌が約 58,000 年前に人類とともにアフリカを旅立ち、その後徐々に進化してきたことを証明した（Science 2003,

PLoS Genet 2005, Nature 2007)。さらに、人類はピロリ菌と共に 30,000 年以上前と 5,000 年ほど前の 2 度にわたりアジアから太平洋へと移住したことも明らかにした (Science 2009)。これらの研究では、いわゆる欧米型 *cagA* を持つ菌も、Africal 型、NEAfrica 型、Europe 型、Asia2 型に分かれることがわかったが、大分・沖縄の欧米型 *cagA* を持つピロリ菌についての詳細な研究は未だなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、MLST 解析を行い、特に沖縄の欧米型 *cagA* を持つピロリ菌の起源を明らかにし、さらにこれらのピロリ菌感染者が、通常の東アジア型菌感染者に比べ、潰瘍、胃がんなどの疾患になりやすいか否かも明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

大分大学および琉球大学に保存されてある日本人由来ピロリ菌から DNA を抽出し、*cagA* 遺伝子のタイピングを行う。欧米型および東アジア型 *cagA* を持つ菌、さらには *cagA* 陰性菌に対し、7つの housekeeping genes の塩基配列を定め、MLST 解析を行う。さらに大分大学に保存されてある、ベトナム、タイ人由来菌に関しても同様の解析を行う。これらのデータを我々がすでに保有している MLST のデータと比較解析を行うことで、日本に存在する欧米型 *cagA* を持つピロリ菌の起源を明らかにしたい。さらに、ピロリ菌のタイプと疾患の関連性についても検討する。

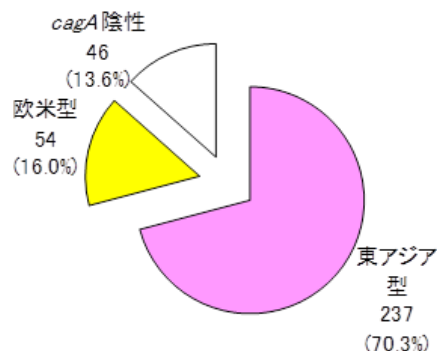
## 4. 研究成果

### (1) 日本におけるピロリ菌遺伝子のタイピング

大分大学に保存されてある大分および京都で採取されたピロリ菌それぞれ 100 例、さらに琉球大学に保存されてある沖縄で採取された 337 例を対象に、*cagA* および別のピロリ菌病原因子である *vacA* のタイピングを行なった。

その結果、京都では全例が東アジア型 *cagA* を保持し、*vacA* は s1m1 タイプであった。一方、大分では、96 例は東アジア型 *cagA* を保持し、4 例は欧米型 *cagA* を保持していた。一方、*vacA* はすべて s1m1 タイプであった。

一方、沖縄では、337 症例中、*cagA* 遺伝子を持つピロリ菌は 86.4% (291 例) であった (右図)。そのうち、欧米型 *cagA* 遺伝子を持つものは 16.3% (54 例) であった。



一方、*vacA* 遺伝子は、s1m1 が 68.2% (230 例)、s1m2 が 17.2% (58 例)、s2m2 が 13.9% (47 例) で、s2m1 はわずか 2 例であった。過去の欧米での報告と同様に、*cagA* 陰性例はほとんどの株が *vacA* s2m2 タイプであった。

沖縄株が、かなり他の日本の株とは異なることが確認されたため、沖縄株に焦点を絞ってさらに詳細な検討を行なうこととした。

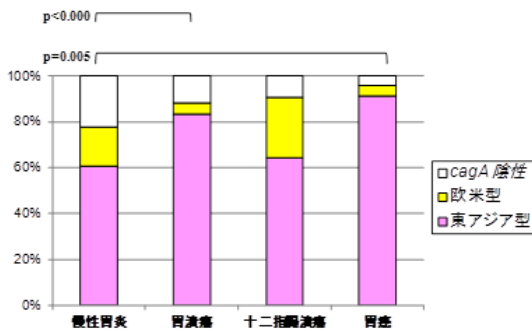
### (2) 沖縄株の *cagA* の繰り返し配列について

我々は以前、*cagA* には繰り返し配列が存在し、その構造が、東アジアの菌と欧米の菌ではかなり異なることを報告していた (J Clin Microbiol 1998)。この違いは、繰り返し配列に存在する EPIYA というアミノ酸配列の前後のセグメント配列で規定されており、東アジア型は A, B, D のセグメントからなり、欧米型は A, B, C のセグメントからなることが別のグループから報告され、一般に用いられている。セグメントの繰り返しの数によって、東アジア型 *cagA* は、ABD や ABDD、欧米型 *cagA* は、ABC や ABCC などとなるわけである。沖縄のピロリ菌についてその構造を検討すると、東アジア型 *cagA* では、ABD が 94.5% と最も多いが、ABDD, AD, ABABD という稀な型も 1-3% に認めた。また欧米型 *cagA* では、ABC (81.2%), ABCC (7.3%), AB (7.3%) で、他に AC, ABCCC が各 1 例認められた。以前我々は、繰り返し配列の数、特に C や D の数と胃癌には密接な関係があることを報告していたが (J Clin Microbiol 1998, Gastroenterology 1999)、今回の検討ではすべての東アジア型 *cagA* が D が 1 回であり、欧米型の場合も、C の数が 2 回以上の菌がわずか 9% であったからである可能性が高い。

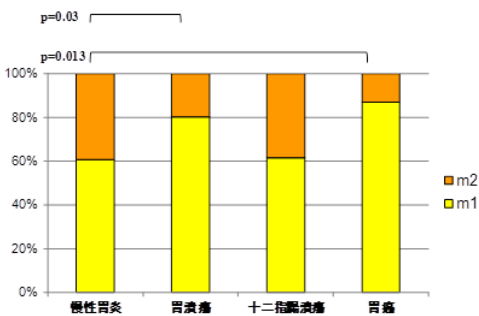
さらに、EPIYA 配列について検討した結果、EPIYA が 90.4% と最多であったが、EPIYT も 6.4% に認められ、特に欧米型 *cagA* の B セグメントでは、EPIYA より EPIYT が圧倒的に多かった (85.2% vs 3.7%)。その配列の違いと疾患には特に関連性がなかったが、なぜ B セグメントに EPIYT が多いのかの検討が必要と考えている。

### (3) 沖縄におけるピロリ菌遺伝子のタイピングと疾患の関連性

沖縄の胃癌発症率は、男女ともに日本で最低である。*cagA* のタイプでは、東アジア型の病原性が最も高く、次いで欧米型、最も弱いのが *cagA* 陰性と考えられており、*vacA* では、s1m1>s1m2>s2m2 となっている。すなわち、沖縄で胃癌が少ないのは、沖縄において、弱毒型の欧米型 *cagA* や *cagA* 陰性、*vacA* s2m2 タイプが多いことが原因である可能性が示唆された。今回沖縄で検討した 337 例の内訳は、98 例が胃炎、101 例が胃潰瘍、114 例が十二指腸潰瘍で、24 例が胃癌症例であった。疾患と *cagA*、*vacA* のタイプを比較すると、胃癌では東アジア型 *cagA* が多く、胃炎や十二指腸潰瘍例では欧米型や *cagA* 陰性の率が、胃癌例に比べて高いことが分かった（次ページグラフ）。胃癌と十二指腸潰瘍は、別のスペクトラムにある疾患と考えられており、両者が *cagA* のタイプで分けられる可能性があることは意義深い。



同様に、*vacA* のタイプと疾患にも有意な関連性を認めることができた（下図）。



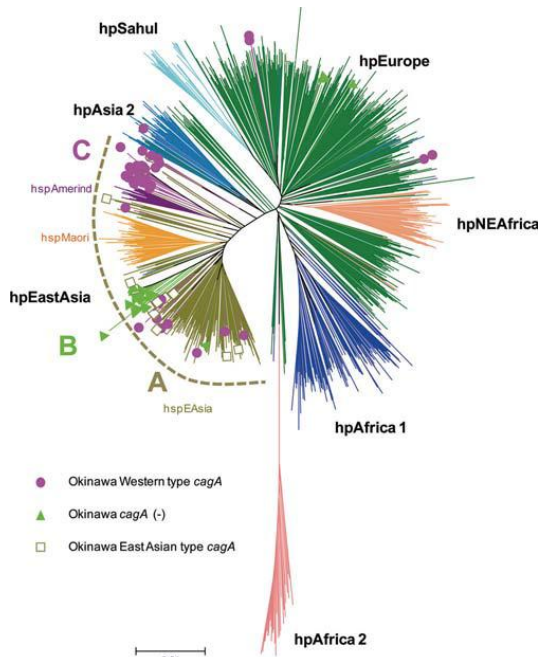
さらに年齢と性別を調整し多変量解析で検討を行ったところ、東アジア型 *cagA* を持ち、*vacA* s1m1 タイプのピロリ菌を保有することが、胃癌のリスク要因であることが分かった。

### (4) 沖縄のピロリ菌の起源

欧米型 *cagA* 遺伝子を持つピロリ菌の MLST による遺伝子系統解析において、欧米で分離される欧米型 *cagA* 遺伝子を持つピロリ菌と、沖縄にて認められる欧米型 *cagA* を持つピロリ菌は、その系統が大きく異なることが分かった。沖縄における欧米型 *cagA* 遺伝子を持つピロリ菌のうち、72.2%が系統樹解析において一団を形成し、これらが東アジアに多く見られるピロリ菌と同じ系統に属したが、若干異なるサブグループを形成した。同様に、*cagA* 遺伝子を持たないピロリ菌も、系統樹解析にて一団を形成し、これらも東アジアに多く見られるピロリ菌と同じ系統に属するが、異なるサブグループであった。

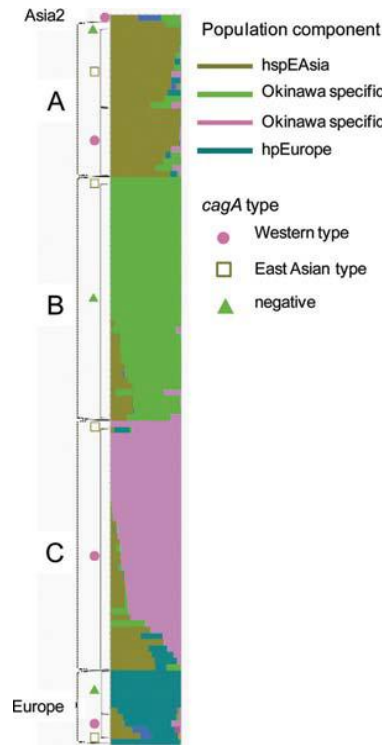
そこで、これらのピロリ菌に対し、MLST を施行した。MLST とは、多くの異なった部位をシーケンスし、塩基配列を決定してタイピングを行う方法である。ピロリ菌だけではなく、多くの細菌の遺伝子型の決定にも用いられている。現在 7 つの遺伝子 (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*) の一部をシーケンスし、その合計 3,406 bp を使用した解析が大規模に行われている。現在までに、世界中の菌は大きく 7 つのタイプに分けられている。hpEurope, hpEastAsia, hpAsia2, hpAfrical, hpAfrica2, hpNEAfrica および hpSahul タイプのうち、hpEurope はヨーロッパ起源の菌、hpEastAsia は東アジアの菌、hpAsia2 は、南、東南および中央アジアの菌、hpAfrical は西アフリカから南アフリカにかけての菌、hpAfrica2 は南アフリカの一部の菌に、さらに hpNEAfrica は北東アフリカの菌に多く認められる。さらに hpSahul はオーストラリアやパプアニューギニア地域（サウル地域）の原住民に認められる。hpEastAsia は、さらに、ポリネシア、メラネシア、さらには台湾原住民の菌に多く見られる hspMaori、アメリカ原住民に多く見られる hspAmerind、東アジアの菌に一般的に見られる hspEAsia といった 3 つのサブ集団に細分化される。hpAfrical も、西アフリカから南アフリカの菌、およびアメリカに移動した黒人の菌に多く見られに見られる hspWAfrica、南アフリカに多く見られる hspSAfrica の 2 つに細分化される。なお hpAfrica2 は他のタイプとはかなり遺伝子配列が異なり、むしろピロリ菌の近縁種の *H. acinonychis* に近い。これらの事実を総合的に解析すると、東アフリカから北東アフリカへとピロリ菌が移動し、それから脱アフリカを果たしたことが推測される。詳しいシミュレーションの結果、ピロリ菌は今から約 58,000 年前、人類の脱アフリカと同時期に脱アフリカを果たしたことが判明している。

我々は116株の沖縄サンプルを使って解析を行った。MLST配列を使った系統樹では、沖縄株の位置は大きく3つに分かれた。



一つは本土株 (hspEAsia) に近い 25 株 (A)、一つは hspEAsia と hspMaori の間の 39 株 (B)、もう一つは hspAmerind と hpAsia2 の間の 40 株 (C) である。他に hpEurope の中に入ったものが 11 株、hpAsia2 に入ったものが 1 株見られた。沖縄株 116 株のうち、欧米型 *cagA* を持つ株は 53 株あり、11 株がグループ A に、38 株がグループ C に、4 株が hpAsia2 に、4 株が hpEurope に入った。

沖縄グループ A、C に入った欧米型 *cagA* 株は、系統樹上の位置から hpEurope の株とは異なるものであることが予想されたが、これを確かめるため、STRUCTURE の admixture モデルを用いた集団解析を行った。この解析では、PubMLST に登録されている hpEurope、hpAsia2、hpSahul、hspMaori、hspAmerind、hspEAsia の各 20 株に先の沖縄株を加え、集団解析ソフト STRUCTURE を用いてクラスタリングを行った。右図は想定集団数を 7 に設定した時の結果である。この図は、一本の横線が一つの株を表し、7 つの色で集団の別を表している。興味深いことに、沖縄株の中には他の集団に見られない要素（緑色とピンク色の部分）が見られ、これは系統樹上のグループと一致した。グループ A は、すべての株で hspEAsia (黄土色) が主要要素であるが、*cagA* 遺伝子は東アジア型と欧米型が半々となっている。ここに見られる欧米型 *cagA* 遺伝子は、沖縄内の hpEurope 株か、グループ C の株から転移してきたものであろう。グループ B はすべての株で沖縄特有の緑色の要素が最も強く、グループ C は 33 株でピンク色が、7 株で hspEAsia が主要要素であった。沖縄



で西欧型 *cagA* 遺伝子を持つ株の多くはこのグループ C に属しているが、集団解析の結果からも hpEurope とは別の由来であると考えられる。

なお、この集団数では hspAmerind が一つの色にまとまっていないが、集団数を上げると一つの色にまとまり、沖縄のピンク色部分の一部に hspAmerind と同じ色が出現する。これは系統樹でも見られたように、グループ C が hspAmerind と共通の祖先を持つ可能性を示唆している。hspAmerind は北海道のアイヌ系の人々にもみられるタイプである。日本人の構成については、縄文時代に住んでいた人々が、弥生系の渡来人が流入したことによって北と南の周縁に移動したという二重構造説が唱えられているが、この説との関係性を考えると興味深い。

#### (5) アジア諸国のピロリ菌の検討

大分大学には、アジア各国から得られたピロリ菌が存在している。本研究では、ブータン、ミャンマー、タイ、ベトナムの菌も検討した。MLST 配列による系統樹から、アジア各国の株の違いが浮き彫りになった。

ベトナムで採取された株の多くは東アジアのグループ (hspEAsia) に近く、ミャンマーはインドなどアジア中央部に多く見られる hpAsia2 と、一部ヨーロッパ集団 (hpEurope) に近いものが見られた。

タイの株は広いグループに散開しており、これが他地域からの最近の人口流入による影響なのか、タイ国内の地域差によるものな



のかは今後さらなる検討が必要である。

ブータンは東アジア (hspEAsia) に近いものと、アメリンド (hspAmerind) に近いものに2分される。アメリンド型はベーリング海峡を越えてアメリカ大陸に渡ったモンゴロイドと共に移動した菌集団であり、アジア大陸内での移動経路はまだよくわかっていない。この型がインドの北側に位置するブータンで見られたことは、アジア大陸内でのモンゴロイドの移動を推測する上で興味深い結果である。

さらに STRUCTURE を利用して、MLST 配列による菌集団の解析も行った。タイ株には hpAsia2 と hpEAsia の要素が見られ、ブータン株は hpEAsia の要素を持つものが多かったが、一部に hpAsia2 や hspAmerind の要素も見られ、系統樹上のブータン株の位置 (hpAsia2 と hpAmerind の間) と一致する結果が得られた。沖縄の株は明確に複数の集団に別れ、その1つは本土と同じ hpEAsia 型、また一部に西欧型 (hpEurope) が見られたが、他にアジア大陸に由来すると考えられる集団が存在した。日本列島への人類移動は朝鮮半島経由のルートがよく知られているが、それとは異なる沖縄の菌集団の発見は、先史時代の日本列島への南からの人類移動を考える上で重要な手がかりとなるものである。

以上、ピロリ菌の遺伝子は人のそれに比べ突然変異率が高いので、特に短期間 (数千年～数万年) における詳細な変化を知ることができる。次第に今まで謎であった人類の歴史も解読できるようになってきた。人類誕生のアフリカ以降、常にわれわれと共生してきたピロリ菌は、人類の進化と同様に進化し、移住先の地に適応できるタイプへと進化してきたと考えられる。その中で明らかに菌の毒性も変化している。通常細菌はヒトの体に順応するために毒性を弱めているはずであるが、アフリカに留まったピロリ菌は悪性が低く、一方東アジアに移ったピロリ菌は残念にも悪性が強くなってしまった。この理由は明らかではないが、少なくともこのことが日本を含む東アジアの国々で胃癌が多い原因かもしれない。最近では次世代シーケンスのおかげで、比較的安価にピロリ菌の全遺伝子配列が求められるようになってきた。全遺伝子配列を解読することで、さらに研究は大きく前進するものと期待される。

#### 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 24 件)

英文雑誌 (すべて査読あり)

- ① Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol*. 2012;12:203-213.
- ② Watada M, Shiota S, Matsunari O, Suzuki R, Murakami K, Fujioka T, Yamaoka Y. Association between *Helicobacter pylori cagA*-related genes and clinical outcomes in Colombia and Japan. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:141.
- ③ Matsunari O, Shiota S, Suzuki R, Watada M, Kinjo N, Murakami K, Fujioka T, Kinjo F, Yamaoka Y. Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *J Clin Microbiol*. 2012;50:876-883.
- ④ Shiota S, Matsunari O, Watada M, Yamaoka Y. Serum *Helicobacter pylori* CagA antibody as a biomarker for gastric cancer in east-Asian countries. *Future Microbiol*. 2010;5:1885-1893.
- ⑤ Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 ;7:629-641.
- ⑥ Shiota S, Matsunari O, Yamaoka Y. Relationship between J-Western CagA subtype and the vacA m2 region of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2010 ;48:3033-3033.
- ⑦ Nguyen LT, Uchida T, Tsukamoto Y, Trinh TD, Ta L, Mai HB, Le HS, Ho DQ, Hoang HH, Matsuhisa T, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Fujioka T, Yamaoka Y, Moriyama M. Clinical relevance of cagPAI intactness in *Helicobacter pylori* isolates from Vietnam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:651-60.

日本語雑誌

- ① 鈴木 留美子、山岡 吉生、ピロリ菌からみた人類移動史、細胞工学、査読無、31 巻、2012, 217-221.
- ② 山岡 吉生、日本消化器病学会雑誌、査読有、107 巻、2010, 1262-1272.

③ 山岡 吉生、細胞工学、査読無、29 巻、2010、587-589.

④ 山岡 吉生、Pharma Media、査読無、28 巻、2010、41-46.

[学会発表] (計 28 件)

① 山岡 吉生、*Helicobacter pylori* の分子疫学研究：次世代シーケンスも含めて、85 回日本細菌学会総会 (2012 年 3 月 28 日) 招待講演、長崎、日本

② Yamaoka Y. Bacterial virulence factors, The 2nd Asian Pacific Topic Conference (2012 年 1 月 15 日) 招待講演、クアラルンプール、マレーシア

③ Yamaoka Y. Roles of virulence factors of *Helicobacter pylori*: OipA and DupA, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (2011 年 9 月 8 日) 招待講演、札幌、日本

④ Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* pathogenesis and gastric cancer, International gastric cancer congress (2011 年 4 月 21 日) 招待講演、ソウル、韓国

⑤ Yamaoka Y. Geographic differences of *Helicobacter pylori* genotypes and gastric cancer (2010 年 10 月 15 日) 招待講演、ハノイ、ベトナム

⑥ Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* virulence factors and gastric cancer, Gachon International Gastric Cancer Symposium 2010 (2010 年 10 月 9 日) 招待講演、インチョン、韓国

[図書] (計 1 件)

山岡 吉生、医薬ジャーナル社、病原菌の今日的意味、2011、493-504.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/phealth2/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 吉生 (YAMAOKA YOSHIO)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：00544248

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
齋藤 成也 (SAITOU NARUYA)  
国立遺伝学研究所 教授  
研究者番号：30192587