

## 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 4月 6日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790348

研究課題名（和文）臨床分離株を用いたヘリコバクター・ピロリ菌 *cagPAI* 遺伝子の機能解析研究課題名（英文）Clinical relevance of *cagPAI* intactness in *Helicobacter pylori* isolates from Vietnam

研究代表者

内田 智久 (UCHIDA TOMOHISA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70381035

研究成果の概要（和文）：*Helicobacter pylori*（ピロリ菌）の病原遺伝子 *cagPAI* がピロリ菌の病原性に関与している可能性が指摘されている。これまでの研究でベトナムの臨床分離株の一部で *cagPAI* 遺伝子の一部が欠損している（欠損型ピロリ菌）ことを明らかにした。本研究で、*cagPAI* の分子生物学的な機能を明らかにすると共に、胃の病態形成において *cagPAI* 遺伝子が果たす役割を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、*cagPAI* 遺伝子の欠損がピロリ菌の毒性や胃粘膜の病変形成に重要な働きをしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this paper is to investigate the relationship between clinical outcome and the intactness of *cagPAI* in *Helicobacter pylori* strains from Vietnam. *H. pylori* strains with internal deletion within *cagPAI* are less virulent and, thus, less likely to be associated with severe clinical outcomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：消化器・唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染が胃癌や胃潰瘍の重要な要因となっていることは、広く受け入れられ信じてられている。一方、アジア諸国においては、ピロリ菌感染頻度に大きな差がないにもかかわらず胃癌発症頻度は国によって大きな違

いがある。この点に関して、感染しているピロリ菌の違い（菌側因子）がアジア各国で異なり、それがピロリ菌感染症の重症度や続発する疾病の発生に影響する可能性が指摘されている。実際、東アジアで蔓延しているピ

ロリ菌の遺伝子型が国によって異なることが部分的に調べられている。私は最近胃癌高頻度国である日本とより低いベトナムのピロリ菌の遺伝子を比較すると、ピロリ菌の毒性因子である *cagA*, *vacA* に構造的な差があり、さらに *vacA*, *m1 type* が胃癌発症に強く関わっている可能性があることを発見し報告した(Uchida et al., BMC microbiology, 2009)。また、ピロリ菌が有する遺伝子のうち、最も病原性に関与しているとされる CagA 蛋白質は、東アジア型と西洋型があることが知られており、東アジア型が病原性が高いとされている。

私は、強毒型である東アジア型 CagA の各国における出現頻度の違いを解析するために、自ら東アジア型 CagA 特異抗体を開発し免疫組織化学的に本邦及びアジア各国(タイ、ベトナム、中国、韓国)の強毒型東アジア型 CagA 出現頻度を明らかにし報告してきた(Uchida et al, Cancer Science, 2007, Kanada et al., Pathology International, 2008, Nguyen et al., Clin Vaccine Immunol, 2009)。しかしながら、ピロリ菌の遺伝子にピロリ菌の病原性を説明するにはまだ十分ではなく、その他の病原遺伝子についても解析する必要がある。そこで、今回 *cag pathogenicity island (cagPAI)* について解析を行う。*cagPAI* は病原性に関わる約 30 個の遺伝子が存在する 40kb の領域(下図)であり、ピロリ菌の進化の過程で他の生物から水平伝播されたとされている。



*cagPAI* は type IV secretion system (T4SS) を構成するタンパク質をコードする遺伝子を含み、T4SS はピロリ菌が胃粘膜に感染した際、その毒素を直接に宿主細胞に注入する“注射針”を構成するタンパク質である。CagA タンパク質などの病原性物質は T4SS を通って宿主細胞に注入されることから、*cagPAI* 遺伝

子群がピロリ菌の病原性に直接的に関係している可能性がある。これまでに *cagPAI* に含まれるいくつかの遺伝子に関して、その機能について少数の報告があるが、ピロリ菌の臨床分離株を用いて行った研究はない。そこで、本研究ではピロリ菌を用いての *cagPAI* の役割を明らかにしたい。

## 2. 研究の目的

本研究では、*deletion* 型 *cagPAI* と *intact* 型 *cagPAI* の生物学的機能を解析し、比較検討することによって、*cagPAI* の機能を解明する。

## 3. 研究の方法

*deletion* 型 *cagPAI* ピロリ菌と *intact* 型 *cagPAI* ピロリ菌の病原性の違いを明らかにするために、それぞれのピロリ菌が感染していた胃粘膜の臨床病理学的検討を行うとともに、*cagPAI* 遺伝子の機能解析を行う。

### ピロリ菌の生物学的機能解析 I

*intact* 型 *cagPAI* と *deletion* 型 *cagPAI* を持つピロリ菌をそれぞれ胃上皮細胞株に感染させ、**A. 胃上皮細胞株の形態変化に及ぼす影響**、**B. 分泌されるサイトカイン量**について解析を行う。

#### A. 胃上皮細胞株の形態変化に及ぼす影響

胃上皮細胞株である AGS 細胞にピロリ菌を感染させると、細胞突起が延長する“hummingbird phenotype”と呼ばれる特徴的な形態変化を生じる。*cagPAI intact* 型、*deletion* 型ピロリ菌をそれぞれ AGS 細胞に感染させ、36 時間後における hummingbird phenotype の形成率を指標に胃上皮細胞株の形態変化に及ぼす影響を解析する。

#### B. サイトカイン量の測定

ピロリ菌が胃上皮細胞に感染すると、宿主の応答として IL-8, TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインが分泌されることが知られている。*cagPAI* 病原性の違いは、*in vitro* でサイトカインの分泌量の差として検出できると考え、ピロリ菌を培養細胞に感染させたときの上清を採取して、ELISA 法によりサイトカイン量を定量する。本感染実験に使用する胃上皮細胞株は、MKN45 細胞を用いる。

## ピロリ菌の生物学的機能解析 II

### A. deletion 型 *cagPAI* ピロリ菌の胃上皮細胞株に対する接着力の強さの検討

*cagPAI* 領域に存在する遺伝子群は type IV secretion system (T4SS)を構成する蛋白質をコードしている。T4SS は CagA 等の病原因子を直接宿主細胞内に注入するため、T4SS がピロリ菌-宿主細胞の接着に重要な役割を果たしている可能性がある。私は、deletion 型 *cagPAI* を有するピロリ菌では、T4SS の構造的不全により、細胞接着に影響を及ぼしているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、deletion 型 *cagPAI* ピロリ菌と、intact 型 *cagPAI* ピロリ菌とで宿主細胞の接着の強さを比較検討する。参考文献 Clyne M, et al. Infect Immun 1993;61:4051-7 に記されているように、flow cytometry 法を用いて解析する。

## 4. 研究成果

### ベトナムの臨床分離株の *cagPAI* 構造

PCR, dot-blot 法により、*cagPAI* 遺伝子の構造を決定した。図 1 に示すとおり、ベトナム臨床分離株 103 例のうち、12 株が *cagPAI* 遺伝子の一部に欠損を有するピロリ菌であり、残る 91 株では *cagPAI* 遺伝子に欠損を認めなかつた。

た。

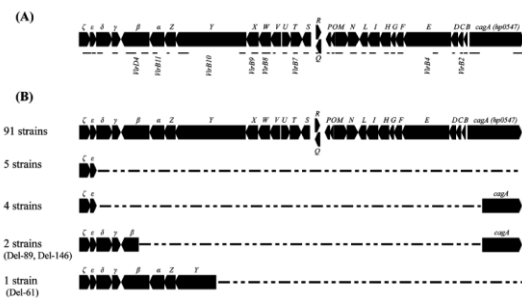


図 1 ベトナム臨床分離株の *cagPAI* 構造

次に *cagPAI* 遺伝子と内視鏡診断について解析した。表 1 に示すとおり、完全型 *cagPAI* ピロリ菌では消化性潰瘍の頻度が高かったのに対して、欠損型 *cagPAI* ピロリ菌では、消化性潰瘍を認めなかった。

表 1 *cagPAI* 遺伝子と内視鏡診断

<i>cagPAI</i> genotype	Diseases	
	Gastritis	Peptic ulcer
Partial (n=12)	12	0
Intact (n=91)*	66	25

\*p=0.036, Fisher's exact test

*cagPAI* 遺伝子型と、組織学的胃炎の関連性について図 2 に示す。幽門部の単核球浸潤とピロリ菌密度の項目を除いた全ての項目で、完全型 *cagPAI* ピロリ菌が欠損型 *cagPAI* ピロリ菌と比較して、単核球浸潤、好中球浸潤、萎縮を高度に認めた。これらの結果は、欠損型 *cagPAI* ピロリ菌は炎症を起こす力が低いことを示唆している。

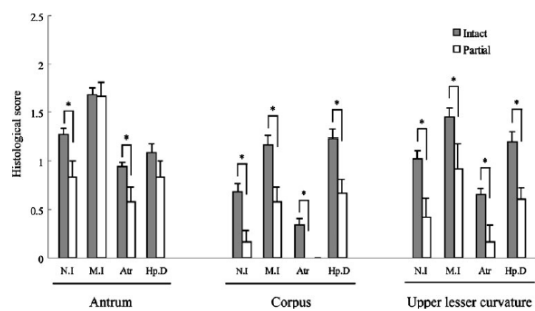


図2 *cagPAI* 遺伝子と組織学的胃炎

In vitro において培養胃上皮細胞株に完全型 *cagPAI* ピロリ菌と欠損型 *cagPAI* ピロリ菌を感染させて、培養上清中に産生される II-8 と細胞のハミングバード表現型について解析したところ、図3に示すとおり完全型 *cagPAI* ピロリ菌を感染させた方が、II-8 誘導能が高く、ハミングバード表現型も高頻度に認めた。

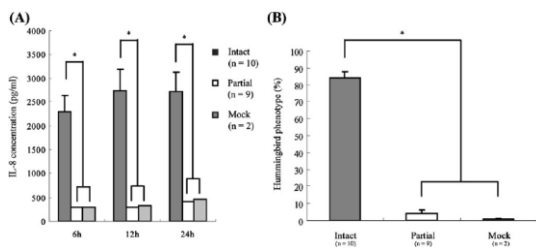
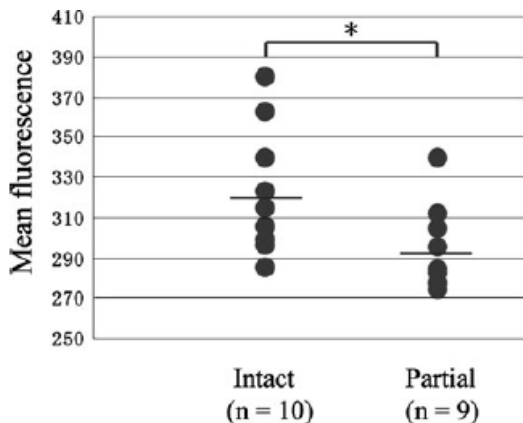


図3 *cagPAI* 遺伝子と II-8 産生とハミングバード表現型の頻度

最後に、胃上皮細胞への接着強度について検討したところ、図4に示すとおり完全型 *cagPAI* ピロリ菌は胃上皮細胞との強い接着を示すことが明らかになった。



以上のデータより、*cagPAI* 遺伝子の欠損がピロリ菌の毒性や胃粘膜の病変形成に重要な働きをしていることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Nguyen, T. L., Uchida, T., and Moriyama, M.

(17 人中 2 番目) 2010 *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital-based study. **BMC gastroenterology** 10, 114 査読有り

2. Nguyen, L. T., Uchida, T., and Moriyama, M. (16 人中 2 番目) 2010 Clinical relevance of *cagPAI* intactness in *Helicobacter pylori* isolates from Vietnam. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 29, 651-660 査読有り

3. Nguyen, L. T., Uchida, T., and Moriyama, M. (15 人中 2 番目) 2010 Evaluation of rapid urine test for the detection of *Helicobacter pylori* infection in the Vietnamese population. **Digestive diseases and sciences** 55, 89-93 査読有り

4. Nguyen, L. T., Uchida, T., and Moriyama, M. (9 人中 2 番目) 2010 *Helicobacter pylori* dupA gene is not associated with clinical outcomes in the Japanese population. **Clin Microbiol Infect** 16, 1264-1269 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital-based study 日韓ヘリコバクターカンファレンス、韓国ソウル、2011 年 9 月 28 日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 智久 (UCHIDA TOMOHISA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70381035