

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23790798

研究課題名（和文） ピロリ菌病原性に関わる新たな IV 型分泌装置の解明

研究課題名（英文） Novel type IV secretion system of *Helicobacter pylori*

研究代表者

塩田 星児（SHIOTA SEIJI）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00420646

研究成果の概要（和文）：

ヘリコバクター・ピロリの病原因子 *dupA* は遺伝子変異の有無で大きく二つに分類できる。さらに *dupA* は 5' 領域の 600bp の存在により long-type と short-type に分けられる。*dupA* の領域の前後には、各種 *vir* 遺伝子が存在しており IV 型分泌機構を形成していると考えられる。我々は変異を有さない intact な long-type *dupA* の陽性率が疾患により異なることを発見した。さらに *dupA* かつすべての *vir* 類似遺伝子を有する complete *dupA* cluster の陽性率は十二指腸潰瘍株で有意に高かった。

研究成果の概要（英文）：

Helicobacter pylori dupA can be divided into two types according to the presence or absence of the mutation. In addition, *dupA* has two types with different lengths depend on the presence of approximately 600 bp in the putative 5' region (presence; long-type and absence; short-type). *dupA* was predicted to form a type IV secretary system (T4SS) with *vir* genes around *dupA* (*dupA* cluster). We reported that intact long-type *dupA* is a real virulence marker for severe outcomes. In addition, the presence of a complete *dupA* cluster (*dupA* and all adjacent *vir* genes) was associated with duodenal ulcer development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、*dupA*

1. 研究開始当初の背景

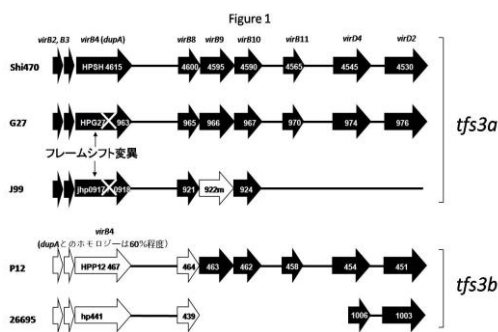
ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）感染者の一部のみが消化性潰瘍や胃癌を発症することから、消化性潰瘍や胃癌発症高危険群を同定し、優先的に除菌治療を行うことが費用対効果の点から重要である。疾患発症の原因として、宿主側要因、環境因子に加え、多様な菌側の病原因子が関与していると考えられる。ピロリ菌の病原遺伝子としては、*cagA*、*vacA* が最も研究されているが、日本人由来の菌では、ほぼ全例で *cagA* は陽性で *vacA* は病原性の高い s1/m1 タイプであり、現時点

で日本人にも通用する疾患特異的なピロリ菌病原因子は同定されていない。

私の上司である山岡吉生教授は 2005 年、十二指腸潰瘍誘導遺伝子（duodenal ulcer promoting gene: *dupA*）を発見し、*dupA* の陽性率は十二指腸潰瘍由来株で高く、一方胃癌由来株では有意に低いことを報告した。*dupA* は J99 株の *jhp0917* と *jhp0918* の 2 遺伝子の *jhp0917* の 1385 番目の塩基配列に C もしくは T の挿入があり、フレームシフトを起こすことで一つにつながった遺伝子である。*dupA* はいわゆる不安定領域

(plasticity region)と呼ばれる領域に存在し、この領域には病原性と関係していると考えられる遺伝子が多いことから、*dupA* も重要な病原因子である可能性が高い。

現在までに多くの国で *dupA* と疾患との関連について検討が行われているが、関連があるという報告と関連がないという報告が混在している。ブラジルからの論文では、*dupA* 遺伝子では遺伝子の変異(遺伝子欠失、挿入)が多く認められたとされており、*dupA* 遺伝子に変異を認めるものでは機能的な DupA 蛋白が産生されていないと考えられる。さらに *dupA* は VirB4 型 ATPase と高いホモロジーを持つ配列であるが、*dupA* の領域の前後には、各種 *vir* 遺伝子が存在しており、たとえば Shi470 株では、*virB2*、*virB3*、*virB4* (*dupA*)、*virB8*、*virB9*、*virB10*、*virB11*、*virD4*、*virD2* が存在する。これらは *cag* PAI や ComB と呼ばれる IV 型分泌機構の構造に類似しており、第 3 の IV 型分泌機構と考えられる。最近この第 3 の IV 型分泌機構は *tfs3* (type four secretion 3) と命名され、*dupA* を含むタイプを *tfs3a*、*dupA* ではない *virB4* を持つタイプを *tfs3b* と命名された (Figure 1)。例えば G27 株は、*tfs3a* を持つが *dupA* にフレームシフト変異があるため機能的とは考えにくい。また Shi470 株では J99 株の *jhp0917* のスタートコドンよりも約 700bp N 末端側にスタートコドンが存在し全長が 2,500bp である。J99 株は、*tfs3a* の一部しか保持していない。



2. 研究の目的

以上より、**機能的な DupA を持ち、かつ *tfs3a* を完全に保持(完全型 cluster)している菌のみが、*cag*PAI や ComB と呼ばれる IV 型分泌機構と同様の働きを持つ真の病原性菌といえるかもしれないという着想に至った。**

本研究の目的は、

(1) 日本のピロリ菌の *dupA* および *vir* 類似因子の有無の確認を PCR、dot blot、DNA シークエンスにて行う。このことで *dupA* および *tfs3* のタイプを明らかにする。さらに完全型 cluster を形成するために最も重要である

vir 類似因子を推定する。

(2) *dupA* および *tfs3* のタイプと消化器疾患の関係について明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) *dupA*、*tfs3* のタイピング

① *dupA* 遺伝子のタイピング

dupA 遺伝子の有無: 先述のように 2,500bp の long *dupA*、ならびに 1,800bp の short *dupA* を認識するプライマーを用いて PCR で検出を行った。

次に *dupA* 遺伝子陽性例については、*dupA* 配列が現時点で最も長い Shi470 の配列をもとにシークエンスプライマーを設計し、DNA シークエンスを行うことで *dupA* の全長の解明を行った。シークエンスの結果をもとにプライマーの適正化を検証した。

② *vir* 類似因子

dupA 下流の *vir* 類似因子(*virB8*、*virB9*、*virB10*、*virB11*、*virD4*、*virD2*)の 6 つの遺伝子に対し設計したプライマーを使用し、PCR にてそれらの遺伝子の有無を確認し *tfs3* のタイピングを行う。

(2) *dupA*、*tfs3* のタイプと疾患の関係の検討

胃癌、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、萎縮性胃炎におけるそれぞれの *dupA* の陽性率や *tfs3* のタイプを明らかにし、その陽性率の差を検討した。

4. 研究成果

(1) 沖縄におけるピロリ菌と *dupA*

沖縄県で採取された 319 株のピロリ菌について *dupA* と *cagA* を PCR で検討した。Long-type *dupA* についてはシークエンスを行い、変異の有無を確認した。Long-type *dupA* の陽性率は 26.3% であった。シークエンス解析では 7.1% のみが stop codon を形成する変異を有していた。興味深いことに変異を有さない intact な long-type *dupA* の陽性率は胃炎よりも胃潰瘍と胃癌で有意に高かった。年齢、性別、*cagA* で補正した後においても intact long-type *dupA* の存在は有意に胃潰瘍と胃癌と関係していた。これらの結果は *Helicobacter* 誌に掲載された。(Takahashi A, **Shiota S**, Matsunari O, Watada M, Suzuki R, Nakachi S, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y. Intact Long-Type *dupA* as a Marker for Gastrointestinal Diseases in Okinawan Subpopulation, Japan. *Helicobacter*. 2013 Feb;18(1):66-72.)

(2) アメリカにおけるピロリ菌と *dupA*、*tfs3*
アメリカで採取された 245 株のピロリ菌について *dupA* の有無と、*dupA* 下流の *vir* 類似因子(*virB8*、*virB9*、*virB10*、*virB11*、*virD4*、

virD2)の6つの遺伝子の有無をPCRで確認した。*dupA* かつすべての *vir* 類似遺伝子を有する complete *dupA* cluster の陽性率は十二指腸潰瘍株で有意に高かった。また胃粘膜における IL-8 濃度も有意に complete *dupA* cluster 群で高かった。*In vitro* における MKN-45 細胞からの IL-8 産生も complete *dupA* cluster 群で有意に高かった。これらの結果は Infection and Immunity 誌に掲載された。(Jung SW, Sugimoto M, **Shiota S**, Graham DY, Yamaoka Y. The intact *dupA* cluster is a more reliable *Helicobacter pylori* virulence marker than *dupA* alone. **Infect Immun.** 2012 Jan;80(1):381-7.)

(3)大分における *dupA* と *tfs3*

①complete *dupA* cluster の陽性率

これまでの我々は大分県で採取されたピロリ菌の *dupA* 陽性率は約 25%であり、疾患との関係は認めなかったことを報告している。そこで今回は *dupA* 陽性であった株について long-type *dupA* の有無を PCR で検討。変異の有無をシーケンスにて検討している。さらに上述の *vir* 類似因子(*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11*, *virD4*, *virD2*)の6つの遺伝子の有無を PCR で確認している。これらの結果から、*dupA* 陽性の中でも long-type *dupA* が重要であること、さらにその周辺の *vir* 遺伝子群をすべて有し完全型 cluster を形成しているものが IV 型分泌装置を形成し、病原性に関係している可能性がある。

②*dupA* と組織学的胃炎の検討

大分県で採取された検体について、Update Sydney System により活動度、炎症、菌量、萎縮、腸上皮化生についてデータベースへの入力完了した。

③臨床分離ピロリ菌を用いた培養細胞への感染実験

それぞれの *dupA* タイプを発現する臨床分離株を用い胃上皮細胞株からの IL-8 産生能の違いを検討。胃上皮細胞株として AGS 細胞を培養中であり、IL-8 産生に最も適した条件の検討中である。

④抗 DupA 抗体を用いた DupA 蛋白の検討

DupA の合成ペプチドをウサギに接種しウサギ血清中で抗 DupA 抗体が産生されるかを検討。現在それらの抗体が DupA 特異的かを検討中である。

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 23 件)

- (1) **Shiota S**, Suzuki R, Yamaoka Y.
The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*.
J Dig Dis.
2013 in press.
doi: 10.1111/1751-2980.12054.
(査読あり)
- (2) Binh TT, **Shiota S**, Nguyen LT, Ho DD, Hoang HH, Ta L, Trinh DT, Fujioka T, Yamaoka Y.
The Incidence of Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam.
J Clin Gastroenterol.
2013 Mar;47(3):233-8.
doi:10.1097/MCG.0b013e3182676e2b.
(査読あり)
- (3) Matsuo Y, **Shiota S**, Matsunari O, Suzuki R, Watada M, Binh TT, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y.
Helicobacter pylori cagA 12-bp insertion can be a marker for duodenal ulcer in Okinawa, Japan.
J Gastroenterol Hepatol.
2013 Feb;28(2):291-6.
doi: 10.1111/jgh.12067.
(査読あり)
- (4) Takahashi A, **Shiota S**, Matsunari O, Watada M, Suzuki R, Nakachi S, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y.
Intact Long-Type *dupA* as a Marker for Gastroduodenal Diseases in Okinawan Subpopulation, Japan.
Helicobacter.
2013 Feb;18(1):66-72.
doi:10.1111/j.1523-5378.2012.00994.x.
(査読あり)
- (5) **Shiota S**, Murakami K, Suzuki R, Fujioka T, Yamaoka Y.
Helicobacter pylori infection in Japan.
Expert Rev Gastroenterol Hepatol.
2013 Jan;7(1):35-40.
doi:10.1586/egh.12.67.
(査読あり)
- (6) **Shiota S**, Nguyen LT, Murakami K, Kuroda A, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Fujioka T, Yamaoka Y.

- Association of *Helicobacter pylori* *dupA* With the Failure of Primary Eradication.
J Clin Gastroenterol.
 2012 Apr;46(4):297-301.
 doi:10.1097/MCG.0b013e318243201c.
 (査読あり)
- (7) **Shiota S.** Watada M, Matsunari O, Iwatani S, Suzuki R, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori iceA*, Clinical Outcomes, and Correlation with *cagA*: A Meta-Analysis.
PLoS One.
 2012;7(1):e30354.
 doi: 10.1371/journal.pone.0030354.
 (査読あり)
- (8) Kodama M, Murakami K, Okimoto T, Sato R, Uchida M, Abe T, **Shiota S.** Nakagawa Y, Mizukami K, Fujioka T. Ten-year prospective follow-up of histological changes at five points on the gastric mucosa as recommended by the updated Sydney system after *Helicobacter pylori* eradication.
J Gastroenterol.
 2012 Apr;47(4):394-403.
 doi: 10.1007/s00535-011-0504-9.
 (査読あり)
- (9) Suzuki R, **Shiota S.** Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*.
Infect Genet Evol.
 2012 Mar;12(2):203-13.
 doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.002.
 (査読あり)
- (10) 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, southwestern island of Japan.
J Clin Microbiol.
 2012 Mar;50(3):876-83.
 doi: 10.1128/JCM.05562-11.
 (査読あり)
- (11) **Shiota S.** Matsunari O, Watada M, Yamaoka Y. Virulence factors or ancestral origin of *Helicobacter pylori*: Which is a better predictor of gastric cancer risk?
Gut.
 2012 Mar;61(3):469-70.
 doi:10.1136/gutjnl-2011-300317.
 (査読あり)
- (12) Jung SW, Sugimoto M, **Shiota S.** Graham DY, Yamaoka Y. The intact *dupA* cluster is a more reliable *Helicobacter pylori* virulence marker than *dupA* alone.
Infect Immun.
 2012 Jan;80(1):381-7.
 doi: 10.1128/IAI.05472-11.
 (査読あり)
- (13) 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 Dec 22;11:141.
 doi:10.1186/1471-230X-11-141.
 (査読あり)
- (14) Goh KL, Chan WK, **Shiota S.** Yamaoka Y. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection and Public Health Implications.
Helicobacter.
 2011 Sep;16 Suppl 1:1-9.
 doi:10.1111/j.1523-5378.2011.00874.x.
 (査読あり)
- (15) Matsuda M, **Shiota S.** Matsunari O, Watada M, Murakami K, Fujioka T, Yamaoka Y. Prevalence of two homologous genes encoding glycosyltransferases of *Helicobacter pylori* in the United States and Japan
J Gastroenterol Hepatol.
 2011 Sep;26(9):1451-6.
 doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06779.x.
 (査読あり)
- (16) **Shiota S.** Murakami K, Yoshiiwa A, Yamamoto K, Ohno S, Kuroda A, Mizukami K, Hanada K, Okimoto T, Kodama M, Abe K, Yamaoka Y, Fujioka T.

The relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan
J Neurol.
2011 Aug;258(8):1460-3.
doi:10.1007/s00415-011-5957-5.
(査読あり)

[学会発表] (計 21 件)

- ① Seiji Shiota, Kazunari Murakami, Yoshio Yamaoka, Toshio Fujioka
Association between serum *Helicobacter pylori* CagA antibody titer, pepsinogen in Japan
消化器病週間 2012 ; Digestive Disease Week 2012
2012年5月20日 サンディエゴ、米国
- ② Seiji Shiota, Lam Tung Nguyen, Kazunari Murakami, Toshio Fujioka, Yoshio Yamaoka
Helicobacter pylori dupA is the predictor for the failure of primary eradication
消化器病週間 2011 ; Digestive Disease Week 2011
2011年5月10日 シカゴ、米国

[図書] (計 5 件)

- (1) 塩田星児, 山岡吉生、先端医学社
Helicobacter pylori 感染率と感染経路
Helicobacter Research.
2013:17(2):94-99
- (2) 塩田星児、先端医学社
米国消化器病週間 (Digestive Disease Week : DDW) 2012 -基礎から-
Helicobacter Research.
2012:16(5):441-444
- (3) 塩田星児, 村上和成、科学評論社
プライマリーケアにおける上腹部症状と内視鏡所見
消化器内科
2012:51(5):7-11
- (4) 塩田星児, 山岡吉生、先端医学社
傷害機序に関する新知見をみる
Helicobacter Research.
2011:15(4):319-324
- (5) Seiji Shiota, Kazunari Murakami, Yoshio Yamaoka, Toshio Fujioka., 先端医学社
Helicobacter pylori infection in Japan
Helicobacter Research.
2011:15(3):201-207

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 星児 (SHIOTA SEIJI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号 : 00420646