

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440198

研究課題名(和文) H. pyloriによる人類移動の推定と病原因子の進化解析

研究課題名(英文) Prediction of human migration by H. pylori and evolutionary analysis of the virulence

研究代表者

鈴木 留美子 (Suzuki, Rumiko)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70599092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、(1)Helicobacter pylori(ピロリ菌)を利用した先史時代アジアにおける人類移動経路の推定、および、(2)ピロリ菌が持つ新規疾患関連因子の探索の2つをテーマとして進めた。テーマ(1)に関しては、沖縄に特異的に見られるピロリ菌の分岐年代(2～3万年前)から、縄文時代以前に琉球列島に人口流入があった可能性が示唆された。テーマ(2)に関しては、胃がん、および胃MALTリンパ腫患者由来のピロリ菌の比較から、主要な病原性遺伝子であるcagAとvacAで、アミノ酸頻度に有意差のある座位を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study focused on two subjects: (1) prediction of prehistoric human migration in Asia using H. pylori, and (2) exploration of new virulence factors in H. pylori. As for the subject (1), we found that there are unique H. pylori strains in Okinawa and that divergence date of Okinawa specific strains is estimated as 20,000 to 30,000 B.C. This result suggests that human population might have reached to Ryukyu islands before Jomon era. As for the subject (2), we compared genomic sequences of H. pylori isolated from gastric cancer and MALT lymphoma patients. As the results, we found loci where amino acid frequency differs significantly between the two disease groups in major virulence genes cagA and vacA.

研究分野：分子進化

キーワード：Helicobacter pylori 人類移動 病原性 系統解析 集団解析

1. 研究開始当初の背景

(1) ピロリ菌を利用した人類移動の推定

Helicobacter pylori (ピロリ菌)と人類とのつきあいは10万年以上前のアフリカ大陸に遡る。この菌は現生人類の祖先がアフリカで暮らしていた頃にヒトの胃に適応し、その後人類と共に世界各地へ移動した。

ピロリ菌は胃の外の環境では増殖できず、主に家族内で親から子へ伝播するため、菌の類縁関係は人類集団の類縁関係とよく一致する。これを利用して、世界各地の人々から採取されたピロリ菌の系統関係を調べることで、宿主である人間の来歴を推定することが可能である(1-3)。

現在ピロリ菌は、7つのハウスキーピング遺伝子の断片配列を用いた MLST 法 (Multi Locus Sequence Typing) によって、大きく7つの集団 (hpAfrica1, hpAfrica2, hpNEAfrica, hpEurope, hpAsia2, hpSahul, hpEastAsia) に分けられている。東アジアに存在する hpEastAsia は、さらに中国・韓国・日本に分布する hspEAsia、台湾～ニュージーランドに分布する hspMaori、1～2 万年前に陸橋であったベーリング海峡を経て新大陸に渡ったモンゴロイド系先住民に見られる hspAmerind の3つのサブグループに分けられる。日本本州のピロリ菌はほとんどが hspEAsia に属するが、我々は沖縄に hspEAsia に属さない菌集団が2種類(合わせて全体の30%程度)存在することを確認した。

(2) ピロリ菌の新規疾患関連因子の探索

ピロリ菌の病原因子として最もよく研究されている遺伝子の一つが *cagA* である。*cagA* はアミノ酸モチーフの違いによって、欧米型 *cagA* と東アジア型 *cagA* に分けられる。また、南アフリカには *cagA* 遺伝子そのものを持たない *cagA* 陰性菌が存在する。

これまでの疫学研究で、東アジア型 *cagA* 株の頻度が高くなるほど胃癌発症率が高くなる相関がわかっており、実験的にも東アジア型 *cagA* 菌は強い炎症を引き起こすことが知られている。しかし、強毒性の東アジア型 *cagA* 菌に感染することが即がんにつながるわけではなく、日本本州では感染者のほぼ全例が東アジア型 *cagA* 菌に感染しているにもかかわらず、無症候のまま経過したり、胃炎、十二指腸潰瘍、胃 MALT リンパ腫など他の疾患に発展することも多い。従来遺伝子型評価では強毒株であることがわかって、その先の疾患リスクを予測することは困難である。

2. 研究の目的

(1) ピロリ菌を利用した人類移動の推定

日本本州のピロリ菌は、韓国・中国と共通する hspEAsia に属し、大陸からの人口流入(弥生系)を反映している。沖縄には hspEAsia より分岐年代の古い菌集団が2種類見られ、弥生系より先に琉球列島に渡来し

た人々から受け継がれたものと考えられる。しかし現在は、沖縄特異的なピロリ菌に近縁な系統は周辺地域に見られない。

我々は沖縄特異的なピロリ菌を、タイ、ベトナム、ネパール、インドネシアなどアジア各地で採取した菌と比較することで、沖縄特異的なピロリ菌の由来を探ることを目的とした。

(2) ピロリ菌の新規疾患関連因子の探索

日本本州ではピロリ菌感染者のほぼ全例が東アジア型 *cagA* 菌に感染しているが、症状としては萎縮性胃炎から胃癌に至る場合もあれば、無症候で萎縮も見られない場合もある。

疾患の発症には宿主側の遺伝的抵抗性や環境要因も関与すると考えられるが、我々は、まだ知られていない菌側の要因が存在する可能性を考え、異なる疾患に由来する臨床検体を用いて、ピロリ菌の遺伝子配列と疾患との関連性を調べ、新規な疾患関連因子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

近年の DNA シーケンサーの発展によって、迅速・安価に細菌のゲノム配列を読み取ることが可能となった。目的(1)、(2)の両者について、次世代シーケンサーを用い、以下のような方法で研究を行った。

(1) ピロリ菌の収集と DNA 抽出

大分大学におけるピロリ菌研究は、全学研究推進機構における重点研究領域として位置づけられており、アジア諸国で採取されたピロリ菌を集積してピロリ菌解析拠点を形成することを目指している。このような環境の中、我々はベトナム、タイ、インドネシア、ネパール、ミャンマー、ブータン、台湾の7カ国との共同研究を推進し、各国で内視鏡検査およびサンプル採取を行ってきた。アジア以外にもアラスカ、ドミニカ共和国、コロンビアなどで採取された株を保有している。ピロリ菌ストックは数・地域ともに世界最大規模であり、今後もさらに増える予定である。このような中から、国ごとに数十株を選びだし、次世代シーケンサー用に菌の培養と DNA 抽出を行った。また、国によっては地域ごとに少数民族が存在する場合もあるので、そのような場合は民族ごとに検体を採取し、DNA サンプルを準備をした。

(2) 次世代シーケンサーによるゲノム配列の読み取り

従来、ピロリ菌の系統解析には、サンガー法で7つのハウスキーピング遺伝子を読み取って連結する MLST (Multi Locus Sequence Typing) 法が広く用いられて来た。しかし、ピロリ菌ゲノムは約 1.6Mb 程度であるので、現在では次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を読み取ることが可能である。我々は

以前から企業に外注したり外部の支援を受けて次世代シーケンサーによるピロリ菌ゲノムの読み取りを行っていたが、共通機器として大分大学にも次世代シーケンサー (MiSeq) が導入されたので、これを用いてさらにゲノム配列の読み取りを行った。

(3) ゲノム配列のアセンブリと遺伝子予測

次世代シーケンサーで読み取ったショートリードデータは、CLC 社のソフトウェア Genomics Workbench を用いてアセンブリを行った。ピロリ菌ゲノムは組み換えを起こやすく、近縁の株であってもゲノムを比較すると逆位や転座などの構造変異が見られる。このため基準株を決めてリファレンスマッピングを行うのが難しいので、de-novo アセンブリを行った。de-novo アセンブリで完全長ゲノムを得るのは難しいが、ほとんどの株でコンティグ数 40~100、合計 1.5Mb~1.6Mb の配列が得られ、実質的にはゲノムの 90%以上が読み取れている。得られたコンティグ配列に対して同様に Genomics Workbench を用いて遺伝子予測を行うとともに、NCBI のアノテーションパイプラインや遺伝研の MiGap を用いて遺伝子に対するアノテーションを行った。

(4) 系統解析

次世代シーケンサーから得られた遺伝子配列を元に、遺伝子をクラスタリングするフリーソフトウェアである OrthoMCL を利用して各株の相同遺伝子を推定した。パラログは正確な系統関係の推定に不適なので、相同遺伝子の中からシングルコピーのオーソログのみを選出し、連結配列を作成して解析に用いた。これにより従来の MLST 法より格段に長い配列を系統解析に用いることができた。

(5) 集団解析

従来の MLST 配列は 3400bp ほどであるが、データベースに登録されている株数が多い。我々は MLST 配列に対しては集団構造推定ソフトウェア STRUCTURE を用いて全世界のピロリ菌の集団構造を解析した。

次世代シーケンサーから得られたゲノムデータはデータサイズが大きすぎて STRUCTURE では解析できないので、STRUCTURE の開発者が新しく開発した fineSTRUCTURE を用いて集団解析を行った。

(6) 新規疾患関連因子の探索

ピロリ菌遺伝子と疾患との関連については、従来のアミノ酸モチーフ部分のみによるタイピングや、PCR 産物の大きさの違いによる大まかなタイピングではなく、(1)~(3)で得られた遺伝子全長を用いて解析を行った。

疾患関連因子の探索を行う場合、対象に年齢差・民族差などの違いがあると、疾患による差異なのか、集団構造による差異なのか見分けが付きにくい。我々は、大分県内という

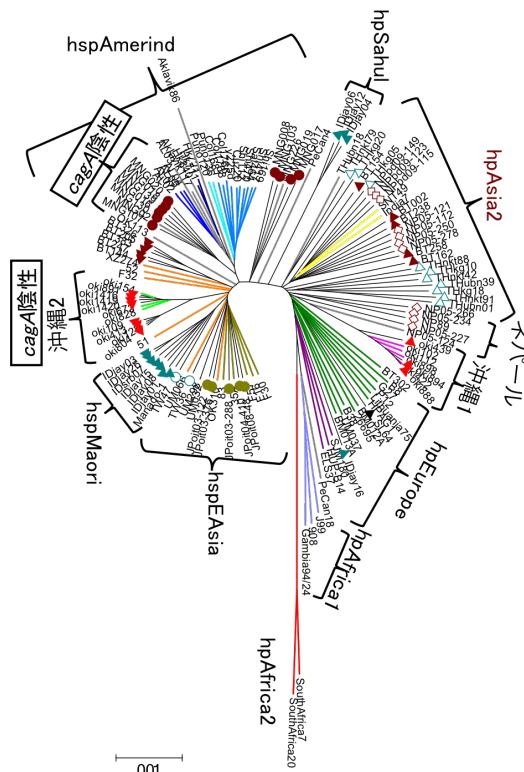
均一性の高い住民から得られ、疾患群間の年齢・性比にも有意差のないサンプルを用いて比較を行った。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌を利用した人類移動の推定

ピロリ菌 83 株の完全ゲノムに、次世代シーケンサーデータからコンティグ配列をアセンブリした 58 株のデータを加えて 141 株のデータセットとし、397 の相同遺伝子をアラインメントして(117,998bp) 系統樹を構築した(図1)。

【図1】ピロリ菌 141 株の系統樹

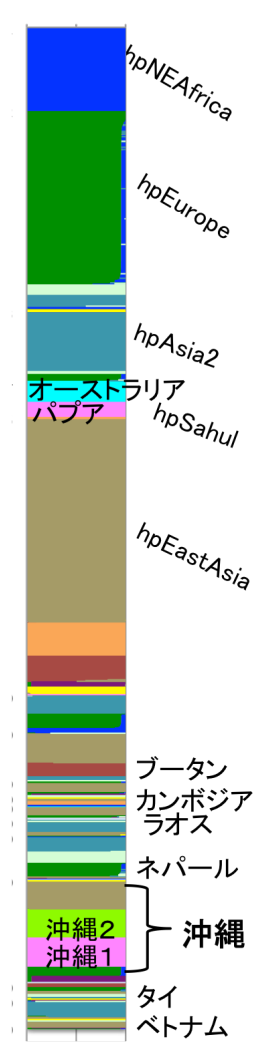


沖縄特異的なピロリ菌グループの一つ(沖縄1)はネパール株と共に、インド・バングラディシュ・タイなどの南アジアに見られる hpAsia2 の辺縁にサブランチを形成し、もう一つの沖縄特異的グループ(沖縄2)は、新大陸モンゴロイドに見られる hspAmerind と hspEAsia/hspMaori の間に独自のサブランチを形成した。また、沖縄2の菌はアジア系統のピロリ菌には非常に稀である cagA 陰性菌であるが、cagA 陰性菌は hspAmerind の一部(モンゴルおよび北海道)にも見られた。

この系統樹は、3400bp ほどの MLST 配列を用いた系統樹よりは格段にブートストラップ値が良いが、オーストラリア、およびパプアニューギニアの先住民から採取される hpSahul の菌数が少ない。この点を補うため、hpSahul のデータ数が多い MLST 配列を使って、集団解析を行った(図2)。

図2は1300株の菌を13集団に分類した結果で、横線1本が1つの株を、線の色が集団分類を表している。沖縄の菌の中には本州と同じ hpEastAsia も存在するが、沖縄1、2は

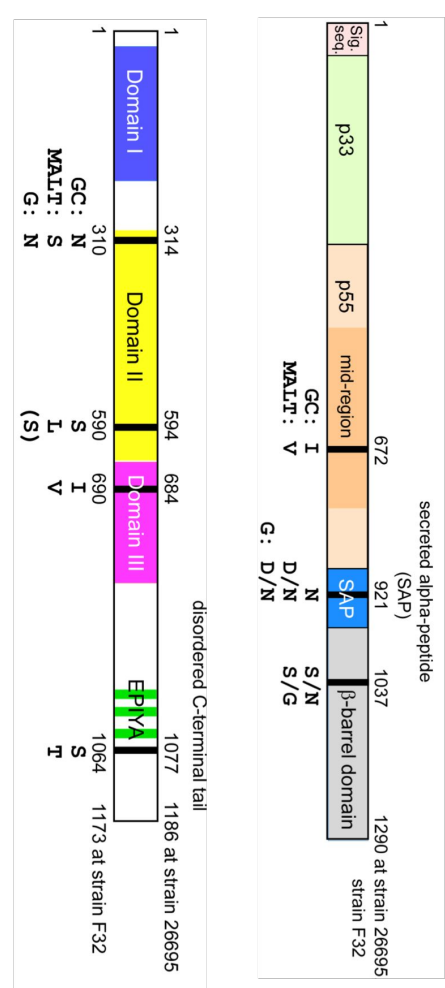
これと異なる色を示し、沖縄2とhpSahul(パプアニューギニア)が同じ集団分類となった。
【図2】ピロリ菌 1300 株の集団解析



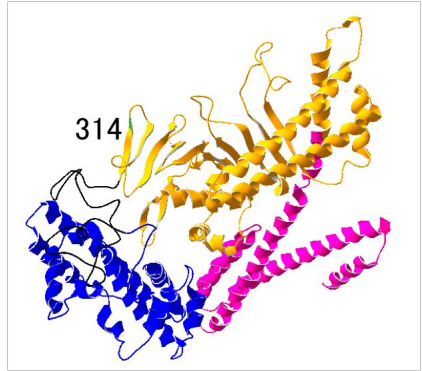
パプアニューギニア、およびオーストラリアには3~4万年前の旧石器時代に人類が到達しており、ある程度の航海技術があったと考えられている。沖縄では近年、約1万8千年前の港川人頭骨の形状見直しが行われ、オセアニアの先住民に近い顔立ちに修正された。また、国立科学博物館では旧石器時代の技術で、南方から琉球列島にアプローチする航海実験を行っている。本研究の結果はこれらと符合するが、多数の遺伝子を用いた系統樹で、なぜネパール株が沖縄株と最近縁になるのかは、今後の研究課題である。

(2)ピロリ菌の新規疾患関連因子の探索
ピロリ菌の病原遺伝子としては *cagA*、および *vacA* がよく研究されているが、*cagA* のタイピングは、主に EPIYA モチーフと呼ばれるアミノ酸モチーフ周辺によって、*vacA* のタイピングは PCR 産物のサイズ差によるバンド位置の違いによってなされており、多数の株を用いた遺伝子の全長配列の比較は例がなかった。
そこで我々は、大分県で採取された胃がん由来のピロリ菌 18 株、胃マルトリンパ腫由来 12 株、どちらの疾患にも発展していない胃炎株 18 株について、*cagA* および *vacA* のアミノ酸配列の全長を比較した。
その結果、疾患群間でアミノ酸頻度に有意差のある座位を、*cagA* で 4 座位、*vacA* で 3 座位同定した(図3)。また、*cagA* については有意差が見られた座位が、タンパク立体構造上のどこに位置するかも明らかにした(図4)。これらの結果は国際雑誌に論文として発表している(雑誌論文)。

【図3】 *cagA* (左) および *vacA* (右) で胃がん(GC)群と胃 MALT リンパ腫群(MALT)で有意なアミノ酸頻度差が見られた座位(黒線)



【図4】 *cagA* アミノ酸配列 314 番座位の位置



<引用文献>
Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations, Falush D, Wirth T, Linz B et al., Science. 2003 Mar 7;299(5612):1582-5, DOI:10.1126/science.1080857
An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori, Linz B, Balloux F, Moodley Y et al., Nature. 2007 Feb 22;445(7130):915-8. Epub 2007 Feb 7., DOI:10.1038/nature05562
The peopling of the Pacific from a

bacterial perspective, Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y et al., Science. 2009 Jan 23;323(5913):527-30.
doi: 10.1126/science.1166083.

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11件)

Differences in amino acid frequency in CagA and VacA sequences of *Helicobacter pylori* distinguish gastric cancer from gastric MALT lymphoma, Hashinaga M, Suzuki R, Akada J, Matsumoto T, Kido Y, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Yamaoka Y., Gut pathog 2016 Nov 8;8:54. DOI: 10.1186/s13099-016-0137-x (査読あり)

H. pylori から探る人類の旅, Suzuki R, Yamaoka Y., Helicobacter Research(和文総説・査読なし), 2016 Oct;20(5):45-48

Rare *Helicobacter pylori* Virulence Genotypes in Bhutan, Matsunari O, Miftahussurur M, Shiota S, Suzuki R, Vilaichone RK, Uchida T, Ratanachu-ek T, Tshering L, Mahachai V, Yamaoka Y., Sci Rep. 2016 Mar 2;6:22584, DOI:10.1038/srep22584 (査読あり)

Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* using next-generation sequencing, Binh TT, Suzuki R, Trang TT, Kwon DH, Yamaoka Y., Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr;59(4):2343-8, DOI: 10.1128/AAC.04852-14 (査読あり)

Helicobacter pylori from gastric cancer and duodenal ulcer show same phylogeographic origin in the Andean region in Colombia, Shiota S, Suzuki R, Matsuo Y, Miftahussurur M, Tran TT, Binh TT, Yamaoka Y., PLoS One. 2014 Aug 14;9(8), DOI:10.1371/journal.pone.0105392 (査読あり)

Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing, Binh TT, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Trang TT, Kwon DH, Iwatani S, Yamaoka Y., Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jul;69(7):1796-803, DOI: 10.1093/jac/dku050(査読あり)

Complete Genome Sequences of Eight *Helicobacter pylori* Strains with Different Virulence Factor Genotypes and Methylation Profiles, Isolated from Patients with Diverse Gastrointestinal Diseases on Okinawa Island, Japan, Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology, Satou K, Shiroma A, Teruya K, Shimoji M, Nakano K, Juan A,

Tamotsu H, Terabayashi Y, Aoyama M, Teruya M, Suzuki R, Matsuda M, Sekine A, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y, Hirano T, Genome Announc. 2014 Apr 17;2(2), DOI: 10.1128/genomeA.00286-14(査読あり)

[学会発表](計7件)

鈴木留美子(発表),小野孝明,永島裕之,内田智久,塩田星児,山岡吉生、ドミニカ共和国における *Helicobacter pylori* と宿主の系統関係、第69回日本細菌学会九州支部総会、2016年9月1日、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)

鈴木留美子(発表),小野孝明,塩田星児,山岡吉生、コロナプス後の南米におけるピロリ菌・mtDNA・Y、日本進化学会第18回年大会、2016年8月26日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)

Suzuki R(発表), Matsumoto T, Akada J, Matsunari O, Shiota S, Binh TT, Trang HT, Miftahussurur M, Subsomwong P, Yamaoka Y、Human migration patterns in Asia revealed by *H. pylori*、日本ヘリコバクター学会第22回学術集会、2016年6月25日、別府ビーコンプラザ(大分県別府市)

鈴木留美子(発表),山岡吉生,齋藤成也,平野隆,佐藤万仁、*Helicobacter pylori* から推定する先史アジアの人類移動、日本進化学会第17回年大会、2015年8月20日、中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)

Rumiko Suzuki(発表), Binh Tran Thanh, Muhammad Miftahussurur, Subsomwong Phawinee, Osamu Matsunari, Yoshio Yamaoka、Geographic diversity of *Helicobacter pylori* genomes and predicted host human migration、日本ヘリコバクター学会第21回学術集会、2015年6月26日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

鈴木留美子(発表),齋藤成也,山岡吉生、ピロリ菌から推定する先史時代アジアの人類移動、日本進化学会第16回年大会、2014年8月22日、高槻現代劇場(大阪府高槻市)

Rumiko Suzuki,Yoshio Yamaoka、Prediction of human migration in ancient Asia by *H. pylori*、日本ヘリコバクター学会第20回学術集会、2014年6月28日、ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 留美子(SUZUKI, Rumiko)

大分大学・医学部・助教

研究者番号:70599092

(2)研究分担者

山岡 吉生(YAMAOKA, Yoshio)

大分大学・医学部・教授

研究者番号:00544248