

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460212

研究課題名(和文) 全員除菌時代での薬剤耐性ヘリコバクターピロリ菌の潜在的ゲノム変化

研究課題名(英文) Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes

研究代表者

棚橋 俊仁 (TANAHASHI, Toshihito)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・学術研究員

研究者番号：30380067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：全ゲノムシーケンシング法(Whole-genome Sequencing)を用いて、単一塩基変異に加え、遺伝子欠失や増幅、逆位、転座などのあらゆるゲノム変化を俯瞰することにより、バクテリアゲノムの潜在的な病原因子を理解する研究手法が試みられつつある。全ゲノムの解読は困難であったが、シーケンシング技術の急速な進歩により、2日間で80億塩基の解読が現在可能である。このゲノム解読技術を活用し、クラリスロマイシン耐性ヘリコバクターピロリ菌ゲノムを明らかにし、薬剤耐性を担う潜在的なゲノム変化を解明する。ゲノムエビデンスにもとづき、全員除菌時代でのより適正な治療法を開発し、海外を含めた医療現場で活用する。

研究成果の概要(英文)：Clarithromycin (CLR) is the key drug in eradication therapy of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection, and widespread use of CLR has led to an increase in primary CLR-resistant *H. pylori*. The known mechanism of CLR resistance has been established in A2146G and A2147G mutations in the 23S rRNA gene, but evidence of the involvement of other genetic mechanisms is lacking. Using the MiSeq platform, whole-genome sequencing of the 19 clinical strains and the reference strain ATCC26695 was performed. All sequencing reads of CLR-resistant strains had a G mutation in an identical position of the 23S rRNA gene. In addition, genetic variants of four gene clusters (hp0605-hp0607, hp0971-hp0969, hp1327-hp1329, and hp1489-hp1487) of TolC homologues, which have been implicated in multi-drug resistance, were examined. Gene clusters of TolC homologues are involved in CLR susceptibility profiles in individual *H. pylori* strains.

研究分野：消化器内科学

キーワード：全ゲノムシーケンシング ヘリコバクターピロリ菌 薬剤耐性 クラリスロマイシン

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ菌が薬剤耐性を獲得するメカニズム、なかでもクラリスロマイシン (CAM) への耐性機構は、過去 15 年以上にわたり国内外において研究の進展は認めていない。CAM 耐性は、ピロリ菌 23S rRNA 遺伝子の単一塩基変異により生じるとされているが、この変異のみで CAM 耐性機構をすべて説明出来ない。全ゲノムシーケンス法により、ピロリ菌ゲノムに隠されているあらゆる遺伝子変化を検出し、潜在的な薬剤耐性機構の解明が可能である。

2. 研究の目的

臨床分離ピロリ菌 81 株を用いて、既知の 23S rRNA 遺伝子変異を解析した。単一塩基変異である A2143G および A2144G を特異的に検出する Allele Specific-PCR (AS-PCR) 法を開発し、これら臨床分離株のゲノム変異の有無を検出した。23S rRNA 遺伝子に単一塩基変異を有するピロリ菌は、22 株存在した。臨床分離ピロリ菌と標準株を用いて、以下の項目を研究目的とする。

- (1) 標準株 ATCC26695 (166 万塩基) の全ゲノムシーケンスを実施する。
- (2) 6 サンプル同時に全ゲノムシーケンスが可能なマルチプレックス法を構築し、1 サンプルあたり 100 万リード以上のデータ取得を可能とする。
- (3) 在籍研究室で、全ゲノムシーケンスデータを解析し得る研究環境を構築した。
- (4) クラリスロマイシン耐性ピロリ菌 12 株 (23S rRNA 遺伝子変異株) の全ゲノムシーケンスを実施し、既知の 23S rRNA 遺伝子変異に加え、菌体内外への多薬剤輸送を担う遺伝子群に特異的なアミノ酸置換が存在することを確認し、薬剤耐性をきたす潜在的なゲノム変化を見出す。

3. 研究の方法

全ゲノムシーケンス法で、クラリスロマイシン耐性菌 22 株 (23S rRNA 遺伝子変異株) と感受性菌 10 株の 160 万塩基配列を解読する。バイオインフォマティクス手法により、塩基変異、アミノ酸置換、遺伝子欠失や増幅、逆位、転座を決定し、あらゆるゲノム変化を解読する。薬剤耐性をきたす潜在的なゲノム変化を解明し、さらに mRNA 発現解析も加え、統合的な理解を進める。海外で収集しているピロリ菌株で、薬剤耐性菌での特異的なゲノム変化の有無を検証し、ゲノムエビデンスにもとづく、本邦と海外でのより適正な除菌治療の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) Allele Specific-PCR 法による既知の 23S rRNA 遺伝子変異の確認

標準株 ATCC26695 と臨床分離ヘリコバクターピロリ菌 81 株の、既知の 23S rRNA 遺伝子変異を解析し、クラリスロマイシン (CAM) 感受性を検討した。配列特異的なプライマーにより A2143G と A2144G 変異を Allele Specific-PCR (AS-PCR) 法で検出した。標準株 ATCC26695 には単一塩基変異が存在せず、臨床分離 22 株 (22/81 = 27.1%) には変異が認められ、耐性ピロリ菌と判定している。CAM 耐性株の頻度は、2007 年度の日本ヘリコバクター学会のサーベイランスの報告 (27.6%) と一致しており、申請者の結果からも、CAM 耐性株の増加が示されており、より適正な除菌治療の開発が期待される。

(2) 標準株ピロリ菌 166 万塩基の全ゲノムシーケンス

今回の研究では、次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ社) を使用する。250 塩基のペアエンドシーケンス反応により、1000 万リード (リードは、次世代シーケンスの単位) 以上を産出し、80 億塩基 (8 ギガ) を取得し得る。標準株 ATCC26695 の全ゲノムシーケンスを、MiSeq システムで実施した。ピロリ菌ゲノムの断片化とアダプター付加は、改変したトランスポゾームを用いて行い、解析ライブラリーを作成した。クラスター形成と塩基合成反応からなるシーケンス反応は、27 時間以内に終了した。

塩基配列データの品質チェックを標準的な方法で実施し、クオリティ 30 以上の塩基割合 89.7%、212 万リード、アセンブルサイズ 1,667,544 塩基 (カバー率 99.98%)、デプス 50 以上、と良好な結果が得られた。

(3) 臨床分離ピロリ菌 32 株の全ゲノムシーケンス

耐性ピロリ菌 12 株および感受性ピロリ菌 7 株の計 19 株の全ゲノムシーケンスは実施済みである。シーケンスデータは、申請者らが定めた品質チェック基準を満たしていた。バクテリアゲノムの変異解析には、デプスは最低でも 50 以上必要とされている。取得したデータのデプスは、すべて 80 以上あり、さらにリード数は 100 万以上を確保しており、ゲノム変化解析に充分耐え得るデータ量である。研究期間内に、臨床分離ピロリ菌 32 株の全ゲノムシーケンスの完了を目指す。

(4) 全ゲノムシーケンスによる 23S rRNA 遺伝子変異の確認

標準株 ATCC26695 のシーケンスデータには、A2143G と A2144G 変異は存在せず、AS-PCR 法の結果と一致していた。耐性ピロリ菌 12

株においても、同領域でデプス 80 以上のリードが得られているが、すべてのリードに既知の変異が存在しており、こちらも AS-PCR 法の結果と完全に一致している。

(5) 菌体内外への多薬剤輸送を担う遺伝子群のゲノム変化

多薬剤輸送を担う 12 遺伝子から構成される 4 オペロン (HP0605-HP0607、HP0971-HP0969、HP1327-HP1329、HP1489-HP1487) がピロリ菌ゲノムに存在する。これら遺伝子群は、CAM を含めた多薬剤の取り込みと排出への関与が示唆されているが、そのゲノム変化は全く検討されていない。申請者らは、耐性ピロリ菌にのみ存在するアミノ酸置換を見出しており、多薬剤輸送を担う遺伝子群のゲノム変化が、クラリスロマイシン耐性に関わる可能性は強い。

(6) バイオインフォマティクス手法による全ゲノム変化の解読

データ解析には、コマンドによる作業を従来は要したため、単独の研究室での解析は困難であった。今年度からウインドウズでの作業が可能なソフトウェア (CLC Bio 社 Genomic Workbench) が市販されている。申請者も解析ソフトを既に所有しており、現在メーカーからの支援をうけ、より効率的な解析手法を構築中である。高度なインフォマティクス処理については、研究協力者から適時助言をうけた

薬剤耐性および感受性ピロリ菌の潜在的なゲノム変化、塩基変異やアミノ酸置換に加え、遺伝子欠失や増幅、逆位、転座、染色体構造を解読し、薬剤耐性に関わるゲノムエビデンスを構築し、より適正な抗生剤の選択を可能とする。

(7) 海外収集ピロリ菌株の全ゲノムシーケンシング

中華人民共和国およびベトナムの大学や病院と共同し、海外ピロリ菌の収集を実施している。浙江大学 (浙江省、杭州市) と共同し、中国人由来ピロリ菌 59 株を収集した。チョーライ病院 (ホーチミン市) との共同により、ベトナム人由来ピロリ菌 33 株を収集した。これらピロリ菌からのゲノム抽出は既に実施し、冷凍保存している。本邦で収集した耐性ピロリ菌のゲノム変化が、これら海外ピロリ菌のゲノムにも存在するのか、全ゲノムシーケンシング法で明らかにし、海外での除菌治療に向け、基盤となるデータベース構築を行った。

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 2件)

1. Ogawa H, Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T. Genetic variants of *Helicobacter pylori* type IV secretion system components CagL and CagI and their association with clinical outcomes. *Gut Pathog.* 2017.

2. Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, Murakami Y, Yang L, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. *Gut Pathog.* 2014.

[学会発表](計 8件)

1. ヘリコバクターピロリ菌の IV 型分泌装置に関連する CagL と CagI の変異解析. 小川浩史、岩本彰、榎橋俊仁、山本幸字司、吉田優、東健. 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会 2016 年 6 月 24-26 日 別府ビーコンプラザ (大分県、別府市)

2. ヘリコバクターピロリ菌 IV 型分泌装置を制御する CagL と CagI の変異解析. 小川浩史、岩本彰、榎橋俊仁、岡田理菜、張菁芸、吉田優、東健. 第 102 回日本消化器病学会総会 2016 年 4 月 21-23 日 京王プラザホテル (東京都、新宿区)

3. 東アジアにおけるヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白質 CagA の解析. 岩本彰、榎橋俊仁、岡田理菜、小川浩史、張菁芸、吉田優、東健. NGS 現場の会第四回研究会 2015 年 7 月 3 日 つくば国際会議場 (茨城県、つくば市)

4. 次世代シーケンサーを用いたヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白質 CagA に特徴的な変異の検出. 岩本彰、榎橋俊仁、小川浩史、楊林、山本幸司、東健. 第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会 2015 年 6 月 26-27 日 神戸ポートピアホテル (兵庫県、神戸市)

5. Whole-genome sequencing detects novel virulence variants of *Helicobacter pylori* cagA gene and its relationship with oncogenic CagA. Akira Iwamoto, Toshihito Tanahashi, Rina Okada, Hirofumi Ogawa, Chang Ching Yun, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. 2015 May 16-19, DDW 2015 Washington DC, USA.

6. 次世代シーケンサーを用いたヘリコバク

ターピロリ菌癌性蛋白 CagA に特徴的な変異の検出. 岩本彰、**棚橋俊仁**、岡田理菜、小川浩史、張菁芸、吉田優、東健. 第9回日本ゲノム微生物学会年会 2015年3月6-7日 神戸大学百年記念館(兵庫県、神戸市)

7. 全ゲノム解読による本邦とベトナムのヘリコバクターピロリ菌 cagA 遺伝子の比較解析. 岩本彰、**棚橋俊仁**、東健. 第56回日本消化器病学会シンポジウム8 HP 研究の新時代-病態生理から除菌まで- 2014年10月24日 神戸国際展示場(兵庫県、神戸市)

8. 次世代シーケンサーを用いた本邦におけるヘリコバクターピロリ菌 cagA 遺伝子の全ゲノム解析. 岩本彰、**棚橋俊仁**、楊林、山本幸司、東健. 第20回日本ヘリコバクター学会学術集会 2014年6月29日 東京ステーションコンファレンス(東京都、中央区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

棚橋 俊仁 (TANAHASHI, Toshihito)

徳島大学大学院医歯薬学研究部・学術研究員

研究者番号：30380067

(4)研究協力者

東 健 (AZUMA, Takeshi)

神戸大学・医学部・教授

岡田 理菜 (OKADA, Rina)

神戸大学・医学部・技術補佐員

田口 善弘 (TAGUCHI, Yoshihiro)

中央大学・理工学部・教授

以上