

静岡大学 博士論文

*Helicobacter pylori*病原因子の分子遺伝学的解析

2006年7月

田仲 志保

## 目次

要旨	1
略語	3
緒言	4
第1章 <i>Helicobacter pylori</i> CagA はヒトの胃粘膜において、上皮細胞内に注入され SHP-2 と結合する	
序論	6
方法	6
結果	7
考察	8
図表	10
第2章 東アジアにおける <i>Helicobacter pylori</i> の <i>vacA</i> , <i>cagA</i> 遺伝子の多型性	
序論	12
方法	12
結果	14
考察	15
図表	17
第3章 <i>Helicobacter pylori</i> CagA の SHP-2 結合部位多型と胃萎縮度および胃癌との関連	
序論	23
方法	23
結果	25
考察	27
図表	29
第4章 高感度リアルタイム PCR 法を用いての胃生検組織からの <i>Helicobacter pylori</i> とその <i>cagA</i> 遺伝子型の確認	
序論	36
方法	36

結果	38
考察	38
図表	40
第 5 章 日本における消化性潰瘍に関与している <i>Helicobacter pylori</i> の <i>vacA</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> 遺伝子の明確な多型性	
序論	45
方法	45
結果	47
考察	49
図表	52
結語	64
謝辞	67
参考文献	68
論文目録	74

## 要旨

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) のヒト胃粘膜への持続感染は萎縮性胃炎、胃潰瘍の病変発症に深く関わる。*H. pylori* には複数の病原因子が知られており、その中でも *vacA* 遺伝子と *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) 内に存在する *cagA* 遺伝子がとりわけ重要な因子として注目されている。*CagA* タンパク質は、*H. pylori* 菌体内から菌が接触した胃上皮細胞内に IV 型分泌装置を介して直接注入され、細胞内チロシンキナーゼによりリン酸化される。さらに注入された *CagA* は、チロシン脱リン酸化酵素 Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-2) とリン酸化依存的に結合し、その酵素活性を刺激する。*CagA* には主に 2 つの分子多型、欧米型と東アジア型が存在し、東アジア型 *CagA* はこの SHP-2 との結合力が欧米型 *CagA* に比べ非常に強い。また、*VacA* タンパク質は空胞化毒素と呼ばれ、培養細胞に空胞化形成を引き起こすタンパク質である。*vacA* 遺伝子には主に 2 カ所の多型部分があり、そのモザイク構造の組み合わせによりいくつかのゲノタイプに分類される。*cagA*、*vacA* 遺伝子ともに、ゲノタイプおよびその有無に明らかな世界的な地域差がある。

本研究では、*cagA* と *vacA* 遺伝子に着目し、主に臨床分離株における *cagA*、*vacA* 遺伝子多型と病態および地域性との相関性を検討するために以下の研究を行った。

(1) 上記の、近年明らかにされてきた *in vitro* のヒト胃上皮 AGS 培養細胞における *CagA* の分子機構が、*in vivo* のヒト胃粘膜内でも実際に起こっているかを確認した。その結果、*H. pylori* 陽性萎縮性胃炎患者の胃粘膜および早期胃癌患者の非癌部位組織よりチロシンリン酸化 *CagA* および *CagA* と共免疫沈降する SHP-2 を検出した。一方、腸上皮化生や癌組織においては *CagA* は検出されなかった。これらの結果により、*in vivo* のヒト胃粘膜においても正に *CagA* が胃上皮細胞に直接注入され、チロシンリン酸化を受け、さらに SHP-2 と結合することが明らかになった。多段階発癌プロセスの比較的早い段階において、この *CagA* による SHP-2 の脱制御が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(2) *cagA*、*vacA* 遺伝子多型と病態および地域性との相関性を検討するために、東アジア（日本の福井と沖縄、さらに中国の杭州）の十二指腸潰瘍患者および慢性胃炎患者から *H. pylori* を計 143 株単離し、その *vacA* と *cagA* 遺伝子の多型を PCR とシーケンス解析によって調査した。その結果、東アジアにおいて *vacA* および *cagA* 遺伝子配列には多型が見られた。*cagA* 陽性 *H. pylori* の比率に福井と沖縄で有意差がみられ ( $P=0.0032$ )、また欧米型 *CagA* 陽性 *H. pylori* の比率は福井に比べ沖縄で有意に高かった ( $P<0.0001$ )。しかしながら、*cagA* 多型と病態の間に有意な相関性はみられなかった。日本における最も多い *vacA* ゲノタイプは *s1c/m1b* であった。一方杭州においては *s1c/m2* であり、これらの株はすべて東アジア型 *CagA* 陽性株であった。これらの結果より、東アジアにおいて、*vacA* と *cagA* ゲノタイプには明らかな多型が存在するが、病態との関連性は低いことが示された。

(3) *H. pylori* *CagA* 多型と病態の関連性を検討するため、臨床分離株 115 株の *cagA* 遺伝子配列の一部を決定し、さらに *CagA* と SHP-2 の結合親和性を培養

細胞への感染実験にて検討した。その結果、炎症の程度、胃炎の活性、および萎縮度は、*cagA* 陰性株や欧米型 *CagA* 陽性株感染患者に比べ東アジア *CagA* 陽性株感染患者において有意に高かった。胃癌患者から単離した株は全て東アジア型 *CagA* 陽性株であった。感染実験において、東アジア型 *CagA* は欧米型 *CagA* に比べ SHP-2 との結合活性が強かった。これらの結果から、東アジア型 *CagA* 陽性 *H. pylori* の感染は萎縮性胃炎と胃癌に関与することが示唆され、東アジア型 *CagA* 陽性 *H. pylori* による持続的な活動炎症が病原性を発揮していると考えられた。

(4) 胃生検組織より *H. pylori* の検出と *CagA* 分子多型を同時に識別するための高感度リアルタイム PCR 法を開発した。欧米型、東アジア型の特異的配列領域でそれぞれプライマーとプローブのセットを設計し、さらに *H. pylori* の 16S rRNA を検出するプライマー、プローブセットも合わせて設計した。その結果、胃生検組織より抽出した DNA から、*H. pylori* の 16S rRNA 遺伝子、および欧米型または東アジア型 *cagA* 遺伝子を検出できた。タイ患者のサンプルで検討したところ、このシステムにおける *H. pylori* 感染の感度と特異性は 100%であった。さらに、患者の 87.8% (36/41) が *cagA* 遺伝子陽性であり、内 26.8% (11/41) が欧米型、53.7% (22/41) が東アジア型、残り 7.3% (3/41) が混在型であった。これらの結果より、このリアルタイム PCR システムは病原性 *H. pylori* 感染を評価できる高感度の診断手段として有用であると考えられる。

(5) 病態に関して *vacA* と *cagPAI* 間の分子遺伝学的な関与を検討するため、日本分離株からさまざまな *vacA* 遺伝子型の株を選び、*vacA*、*cagA* そして *cagE* 遺伝子の全配列を決定した。*vacA* および *cagA* 遺伝子配列には多型が見られたが、*cagE* 遺伝子は株間でよく保存されていた。VacA、CagA そして CagE のアミノ酸配列それぞれの系統樹解析から、この 3 種のタンパク質はいずれも欧米型と東アジア型の大きく 2 つのグループに区別でき、その分布は 3 種のタンパク質間で似たパターンを示した。*vacA* 遺伝子が s2 と s1a/m1a 型、*cagA* 遺伝子 3'領域が欧米型の株は欧米型に、*vacA* 遺伝子が s1c/m1b 型、*cagA* 遺伝子 3'領域が東アジア型の株は東アジア型に分類された。さらに、消化性潰瘍患者分離株における欧米株の割合 (90.0%、9/10) が慢性胃炎患者分離株におけるそれ (22.7%、5/22) よりも有意に高かった ( $\chi^2=12.64$ ,  $P=0.00057$ )。これらの結果より、*vacA* と *cagPAI* 間には分子遺伝学的な相関があり、また *vacA* と *cagPAI* 遺伝子の欧米型は消化性潰瘍の発症に関与することが示唆された。

## 略語

- bp: base pair; 塩基対
- BSA: bovine serum albumin; ウシ血清アルブミン
- cagPAI: cytotoxin associated gene pathogenicity island; サイトトキシン関連遺伝子病原性遺伝子群
- DNA: deoxyribonucleic acid; デオキシリボ核酸
- EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; エチレンジアミン四酢酸
- EMR: endoscopic mucosal resection; 内視鏡的粘膜切除術
- EPIYA: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala; グルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニン
- ESS: East Asian CagA-specific, SHP-2-binding sequence; 東アジア型 CagA 特異的 SHP-2 結合配列
- FCS: fetal calf serum; ウシ胎児血清
- HE: hematoxylin eosin; ヘマトキシリン・エオシン
- HGF: hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子
- HLA: histocompatibility locus antigen; 組織適合抗原
- HRP: horseradish peroxidase; 西洋ワサビペルオキシダーゼ
- IL: interleukin; インターロイキン
- kb: kiro base;  $10^3$  塩基対
- MALT: mucosa associated lymphoid tissue; 粘膜関連リンパ組織
- MAPK: mitogen-activated protein kinase; セリントレオニンキナーゼ
- Mb: mega base;  $10^6$  塩基対
- MOI: multiplicity of infection; 感染多重度
- PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis; ポリアクリルアミドゲル電気泳動
- PBS: phosphate buffer saline; リン酸緩衝液
- PCR: polymerase chain reaction; ポリメラーゼ連鎖反応
- PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride; セリンプロテアーゼ阻害剤
- rRNA: ribosomal ribonucleic acid; リボゾームリボ核酸
- SDS: sodium dodecyl sulfate; ドデシル硫酸ナトリウム
- SHP-2: Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase; チロシン脱リン酸化酵素
- TBS: Tris buffer saline; トリス緩衝液
- TE: Tris-EDTA
- TSA: trypticase soy agar
- VacA: vacuolating cytotoxin A; 空胞化毒素
- WSS: Western CagA-specific, SHP-2-binding sequence; 欧米型 CagA 特異的 SHP-2 結合配列
- 2-ME: 2-mercaptoethanol; 2-メルカプトエタノール

## 緒言

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は、1983年 Warren と Marshall によりヒト胃粘膜から単離されたらせん状グラム陰性微好気性桿菌であり、世界人口の半分を超える人々に感染していると推定されている。*H. pylori* のヒト胃粘膜細胞への持続感染は、慢性萎縮性胃炎や消化性潰瘍の病変発症に関与し、胃癌発症の重要な危険因子ともいわれている[46, 57, 60]。数多くの疫学的調査により、世界保健機関は *H. pylori* を発癌性という点で最も危険度の高い group1 “definite carcinogen”に指定している[32]。

*H. pylori* にはウレアーゼ、接着因子、空胞化毒素等の複数の病原因子が知られており、病原因子遺伝子の中では、特に *vacA* と *cagA* 遺伝子が重要な規定因子として注目されている。*H. pylori* 株は *vacA* と *cagA* 遺伝子の有無で type I と type II に大別でき、type I 株は VacA と CagA タンパク質を産生するが、type II 株は産生しない[66]。type I 株はより強い毒性を持ち、より激しい疾患の発症に関与するといわれている。さらに *H. pylori* の分布には地理的に明確に区別できる特徴があり[18, 24]、この遺伝子多型マーカーで最もよく知られているのも *vacA* と *cagA* 遺伝子である [63, 70]。

*vacA* 遺伝子より産生される VacA タンパク質 (vacuolating cytotoxin A : 空胞化毒素) は、培養細胞に空胞化形成を引き起こすタンパク質である。胃潰瘍患者から分離された *H. pylori* の約 7 割、胃炎患者からの分離株の約 3 割に VacA の産生が認められ、さらに実験動物に VacA 産生株の培養上清および精製 VacA を経口投与すると、胃粘膜に空胞形成、びらん、潰瘍を引き起こすことも知られている。*vacA* 遺伝子には少なくとも 2 カ所の多型部分がある。33 アミノ酸からなる VacA N 末端側のシグナルペプチドをコードする s-region の配列には、s1 と s2 に大別される 2 つの異なる配列があり、s1 はさらに s1a, s1b, s1c のサブタイプに分けられる。s1 配列をもつ VacA は s2 配列をもつ VacA に比べより速やかにかつ多量に分泌され、消化性潰瘍との関連が示されている。さらに約 300 アミノ酸からなる中間領域の m-region の配列には、m1 と m2 の 2 つの異なる配列があり、m1 はさらに m1a と m1b のサブタイプに分類される[6, 34, 61, 66]。m1 配列をもつ VacA は m2 配列をもつ VacA に比べ空胞活性が強い。産生される VacA は、s-region と m-region の組み合わせによりいくつかのモザイク構造をもつ VacA に分けられる。一般的に、s1/m1 株は強毒型、s1/m2 株は並毒型、s2/m2 株は弱毒、または無毒型といわれる (s2/m1 株は存在が報告されていない) [6]。

*cagA* 遺伝子より産生される CagA は抗原性の高いタンパク質である。近年、*cagA* 遺伝子を保有する *H. pylori* 感染は、萎縮性胃炎や胃癌発症の危険率を著しく高めるとい報告が数多くなされている[14, 31, 38, 47, 48, 50]。*cagA* 遺伝子は cytotoxin associated gene (*cag*) pathogenicity island (PAI) と呼ばれる約 40 kb 長の遺伝子領域内に存在する遺伝子であり、この *cagPAI* は他の領域との GC 含量の違いなどから、本来 *H. pylori* ゲノム上に存在しなかった DNA 断片が水平伝達により持ち込まれたと考えられている[15]。*cagPAI* には約 30 種類の遺伝子が存在し、その一部は他の細菌が保有する遺伝子との相同性から IV 型分泌装置と呼ばれるミクロの注射針様構造を構成するタンパク質をコードする [2, 18]。近年

の分子生物学的研究より、CagA の胃上皮細胞に及ぼす病原性の分子メカニズムが明らかにされてきた。cagA 陽性 *H. pylori* が胃上皮細胞に接着後、CagA は IV 型分泌装置を介して *H. pylori* 菌体内から宿主細胞内に直接注入され、細胞内の Src ファミリーチロシンキナーゼによりリン酸化される[5, 12, 43, 51, 53]。Src ファミリーによる CagA のチロシンリン酸化部位は、CagA 分子の C 末端側に複数出現するグルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニンというユニークなアミノ酸モチーフ (EPIYA モチーフ) で特徴づけられ、このモチーフ内のチロシン残基がリン酸化される[13, 28, 54]。ヒト胃上皮 AGS 培養細胞に cagA 陽性 *H. pylori* を感染させた際、細胞形態の伸長、仮足の形成といった劇的な細胞形態の変化が観察される。この形態変化は、ハチドリのかちばしに似ていることから“hummingbird 表現型”と呼ばれ、同様の形態変化は上皮系細胞を肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF) で刺激したときにも観察される[51]。さらに細胞内に移行した CagA はチロシン脱リン酸化酵素 Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-2) とチロシンリン酸化依存的に結合し、その酵素活性を活性化していることが明らかになった[28]。SHP-2 は細胞増殖、細胞運動や細胞接着など様々な細胞機能の制御に重要な役割を果たしていることが報告されていることから[25, 26, 72]、CagA による SHP-2 の脱制御が胃上皮細胞の異常な増殖や運動に関与している可能性が示唆されている。

*H. pylori* の分布と遺伝子配列には地理的特徴があり[18, 24]、アジアで単離される株と他の国で単離される株との間には、cagA 遺伝子配列に大きな違いが見られることが報告されている[1, 29]。CagA の分子量は菌株によって 128~140kDa とバリエーションに富み、このバリエーションは cagA 遺伝子の 3'領域に存在する繰返し配列の回数によるものであり[17, 67, 68, 69]、また CagA のリン酸化部位 (EPIYA モチーフ) もこの領域に存在する[13, 28, 54]。胃癌の高い発症率を示す東アジアと欧米それぞれで単離された *H. pylori* 株の CagA の分子構造を比較すると、EPIYA モチーフ繰返し領域においてアミノ酸配列が東アジア株と欧米株の間で大きく異なる。最近、北海道大学の東らによって、東アジア型 CagA は、欧米型 CagA と比較して SHP-2 結合親和性および hummingbird 表現型の誘導能が強いことが明らかになった[29]。

本研究では、*H. pylori* 病原因子遺伝子である cagA と vacA 遺伝子に着目し、主に臨床分離株における cagA、vacA 遺伝子多型と病態および地域性との相関性を検討するために以下の研究を行った。

第 1 章においては、近年明らかにされてきたヒト胃上皮 AGS 培養細胞における CagA の分子機能が、ヒト胃粘膜内でも実際に起こっているかを確認した。

第 4 章においては、簡便迅速かつ高感度に cagA 遺伝子多型を識別するためのリアルタイム PCR 法を開発した。

第 2、3、5 章においては、cagA、vacA 遺伝子多型と病態および地域性との相関性を検討するために、主に日本の福井や沖縄、中国の杭州、または欧米分離株の cagA、vacA 遺伝子型を決定し、比較解析した。



## 第1章

The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa

*Helicobacter pylori* CagA はヒトの胃粘膜において、上皮細胞内に注入され SHP-2 と結合する

### 序論

CagA タンパク質は *cagA* 遺伝子から産生され、*cagA* 遺伝子を持つ *H. pylori* は病原性を示す type I に分類される[15]。欧米単離株の 1/2 から 2/3 が type I であり、*cagA* 陽性 *H. pylori* の感染は胃粘膜の萎縮や胃癌に関係していると考えられている[47]。一方、日本など東アジア単離株のほとんどは病態と関係なしに *cagA* 遺伝子を保有する[34, 63]。近年、*in vitro* の研究により、CagA の胃上皮細胞に及ぼす病原性の分子機能が明らかにされてきた。*cagA* 陽性 *H. pylori* が胃上皮細胞に接着後、CagA は IV 型分泌装置を介して *H. pylori* 菌体内から宿主細胞内に注入され、細胞内の Src ファミリーチロシンキナーゼによりリン酸化される[5, 12, 43, 51, 52]。さらに細胞内に移行した CagA は、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 とチロシンリン酸化依存的に結合し、その酵素活性を刺激する [28]。SHP-2 は細胞の増殖や形態変化、運動能亢進に深く関わり、CagA による SHP-2 の脱制御が胃上皮細胞の異常な増殖や運動に関与している可能性がある。しかしながら、これらの知見はすべて主にヒト胃上皮細胞株 AGS 培養細胞を用いた *in vitro* のシステム (*in vitro* での *H. pylori* 感染系や *cagA* 遺伝子の異所性発現系) で得られたものであり、本章では *in vivo* のヒト胃粘膜においてこれらの現象を検証した。

### 方法

#### 対象

上部消化管内視鏡検査で診断された、慢性胃炎患者 10 名（男性 6 名、女性 4 名、平均年齢 52.5 歳）と早期胃癌患者 5 名（男性 4 名、女性 1 名、平均年齢 54.8 歳、全員腸型胃癌）を対象とした。さらに、対照として福井医科大学第 2 内科にて実施した多相的健康診断に参加した *H. pylori* 陰性者 5 名（男性 3 名、女性 2 名、平均年齢 51.8 歳）を選んだ。この健診において胃癌検査のために上部消化管内視鏡施術を行った。それぞれの患者および対照者から前庭部および胃体部より 4 カ所ずつ計 8 カ所の胃生検組織を採取した。前庭部および胃体部それぞれ 2 カ所ずつを immunoblot 解析に使用し、残り 1 つずつをそれぞれ組織鏡検解析（ヘマトキシリン・エオシン[HE]染色）と *H. pylori* の培養に用いた。5 名の早期胃癌患者には内視鏡的胃粘膜切除術（EMR）を施行した。切除した胃粘膜組織より、癌組織 1 カ所、周辺の非癌組織 1 カ所を採取した。

#### 抗体

免疫沈降と immunoblot の第 1 抗体として、anti-CagA ポリクローナル抗体（Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA）、anti-リン酸化チロシン抗体（4G10, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA）、anti-SHP-2 抗体（C-18, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA）を使用した。

## 免疫沈降および immunoblotting

生検および切除組織を 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を含む 0.01M PBS、pH 7.5 で 3 回洗浄し、2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、2 mM PMSF、10 μg/ml leupeptin、10 μg/ml trypsin inhibitor、10 μg/ml aprotinin を含む氷冷した lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離 (10,000 g, 10 分, 4°C) して上清を回収し、anti-CagA ポリクローナル抗体または正常 IgG を加え 30 分、4°C で反応させ、次いで protein G-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Piscataway, NJ, USA) を加え 90 分、4°C で吸着させた。免疫沈降サンプルを緩やかな遠心分離 (1,000g, 1 分, 4°C) で回収し、lysis buffer で 4 回洗浄した後、SDS sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 6% 2-ME, 0.003% bromophenol blue, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8) を加え 5 分間煮沸した。煮沸サンプルの上清を SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide) にかき、次いで Immobilon P (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) にブロットした。メンブレンを 1% ウシ血清アルブミン (BSA) または 5% スキムミルク含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Tween 20) でブロッキングし、第 1 抗体と 4°C で一晩反応させた。メンブレンを T-TBS で洗浄後、HRP ラベルされた anti-ウサギまたは anti-マウス IgG ポリクローナル抗体と 1 時間反応させ、enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Piscataway, NJ, USA) にて X 線フィルムに感光させた。

## *H. pylori* 培養

各患者の生検組織を trypticase soy agar (TSA) -II/5% sheep blood plate に塗布し、微好気性条件下 (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)、37°C、3~5 日間培養した。第 1 培養プレートより単コロニーを採取し、新しい TSA-II plate に継代し同条件下で培養した。*H. pylori* 判定はウレアーゼ活性により行い、いくつかのコロニーを採取して 10% fetal calf serum (FCS) を含む brucella broth liquid culture medium に植菌し、同条件下で 24 時間振盪培養した。菌液の一部を 20% glycerol を含む 0.01M PBS に懸濁させ -80°C で保存した。残りの菌液より遠心にてペレットを回収し、protease/phenol-chloroform 法により DNA を抽出し、TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) に溶解させ PCR 増幅まで 4°C で保存した。

## *cagA* 遺伝子の PCR 解析

*cagA* 遺伝子の 3' 領域を増幅するプライマー [8] (forward primer: 5'-GAATTGTCTGATAAACTTGAAA、reverse primer: 5'-GCGTATGTGGCTGTTAGTAGCG) を用い、PCR より分離株間の *cagA* 遺伝子を比較した。PCR 条件は、95°C で 5 分加熱後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分を 25 サイクル、その後 72°C で 7 分おいた後、4°C で保存した。PCR 産物を 2% agarose gel で電気泳動し、*cagA* 遺伝子を検出した。

## 結果

近年、*in vitro* の研究により、CagA の胃上皮細胞に及ぼす病原性の分子メカニズムが解明されてきた。すなわち *H. pylori* CagA が IV 型分泌装置を介して宿主細胞内に注入され、細胞内でチロシンリン酸化を受け、移行した CagA は SHP-2 と結合する。今回、チロシンリン酸化 CagA とその CagA と結合している SHP-2

が、全ての *H. pylori* 陽性萎縮性胃炎患者の前庭部および胃体部の胃粘膜より検出され、一方で *H. pylori* 陰性対照者からは検出されなかった (Figure 1-1)。*cagA* 遺伝子は PCR により確認し、これら患者より分離された *H. pylori* 株はすべて *cagA* 陽性 *H. pylori* であった。興味深いことに、全ての *H. pylori* 陽性早期胃癌患者の非癌部においては、CagA、チロシンリン酸化 CagA、さらに CagA と免疫共沈する SHP-2 が検出されるのにもかかわらず、腸上皮化生（胃粘膜に腸型上皮が出現する現象）または癌部の胃粘膜ではこれらは検出されなかった (Figure 1-2)。

## 考察

今回の検討により、*in vivo* のヒト胃粘膜においても正に CagA が胃上皮細胞に直接注入され、チロシンリン酸化を受け、さらに SHP-2 と結合することが初めて明らかになった。Correa の胃発癌モデルによると、発癌過程は 2、30 年以上かけて病変の危険度を増しながら連続的に進行すると考えられている。すなわち、急性胃炎は慢性胃炎へと移行し、腸上皮化生を惹起しながら慢性萎縮性胃炎へと進行し、ついには胃癌発症へと至る[16]。慢性萎縮性胃炎患者の 10% が 15 年以内に胃癌へと進行するという統計がある。胃癌の 90% 以上が goblet cells を有した腸上皮化生を併発しており、このことから腸上皮化生は前癌病変の組織マーカーとして用いられている。*H. pylori* 感染による慢性胃炎はたいてい萎縮性胃炎へと進行する。胃癌リスクは萎縮性胃炎の程度と範囲で増大する。激しく腺萎縮が進み、腸上皮化生が起きると、*H. pylori* が定着できなくなる。このため今回のように腸上皮化生および癌部において、CagA やチロシンリン酸化 CagA、CagA と免疫共沈する SHP-2 が検出されなかったのであろう。それ故に、*H. pylori* 感染は胃癌発症の比較的早い段階で病原性を発揮していると考えられる。

感染期間中 *H. pylori* から胃上皮細胞に注入された CagA は、SHP-2 と結合して宿主細胞のシグナル伝達系を攪乱し、細胞機能に変化をもたらしている[28]。SHP-2 分子は *Drosophila* の Corkscrew と相同性を持ち、Ras-MAPK 経路の活性化を介した細胞増殖刺激を増強させることが明らかにされており、細胞内シグナル伝達制御において重要な役割を担う分子である[26]。また、SHP-2 は細胞接着や細胞運動の制御にも関与している。多段階発癌プロセスの比較的早い段階において、この CagA による SHP-2 の脱制御が重要な役割を担っている可能性があり、*H. pylori* の病原性には CagA の関与が示唆された。

スナネズミなどの動物感染実験モデルにより、*H. pylori* の長期感染と胃癌発症との関連性が明らかにされている[65]。*H. pylori* 感染は *N*-methyl-*N*-nitrosourea によって誘発されるスナネズミの胃底腺癌の発症率も高めることが報告されている[55]。これらスナネズミのモデルにより、*H. pylori* 感染は胃癌発症の発動因子であり促進因子であると示唆される。腫瘍の発因は未だ不明だが、一つの説明得る可能性として炎症粘膜における上皮の代謝回転の上昇が考えられる。細胞複製が増進すると、ゲノム複製時のエラーや DNA 相同組換え、DNA 修復過程における時間の減少などによる変異の頻度も高くなる。スナネズミモデルでは、常に目立った胃粘膜の肥厚化が特徴的に観察される。これは胃粘膜におけ

る細胞増殖が永続的に亢進していることを意味する。さらにヒト胃粘膜においても *H. pylori* 感染により再生の増殖活性が亢進していることが報告されている [4]。CagA による SHP-2 シグナル経路の脱制御が、胃上皮細胞の増殖異常と形態異常を引き起こし、胃癌の発生や促進に関与している可能性が示唆された。*H. pylori* 感染による胃発癌のさらなる詳細な分子メカニズムの解明が必要であろう。

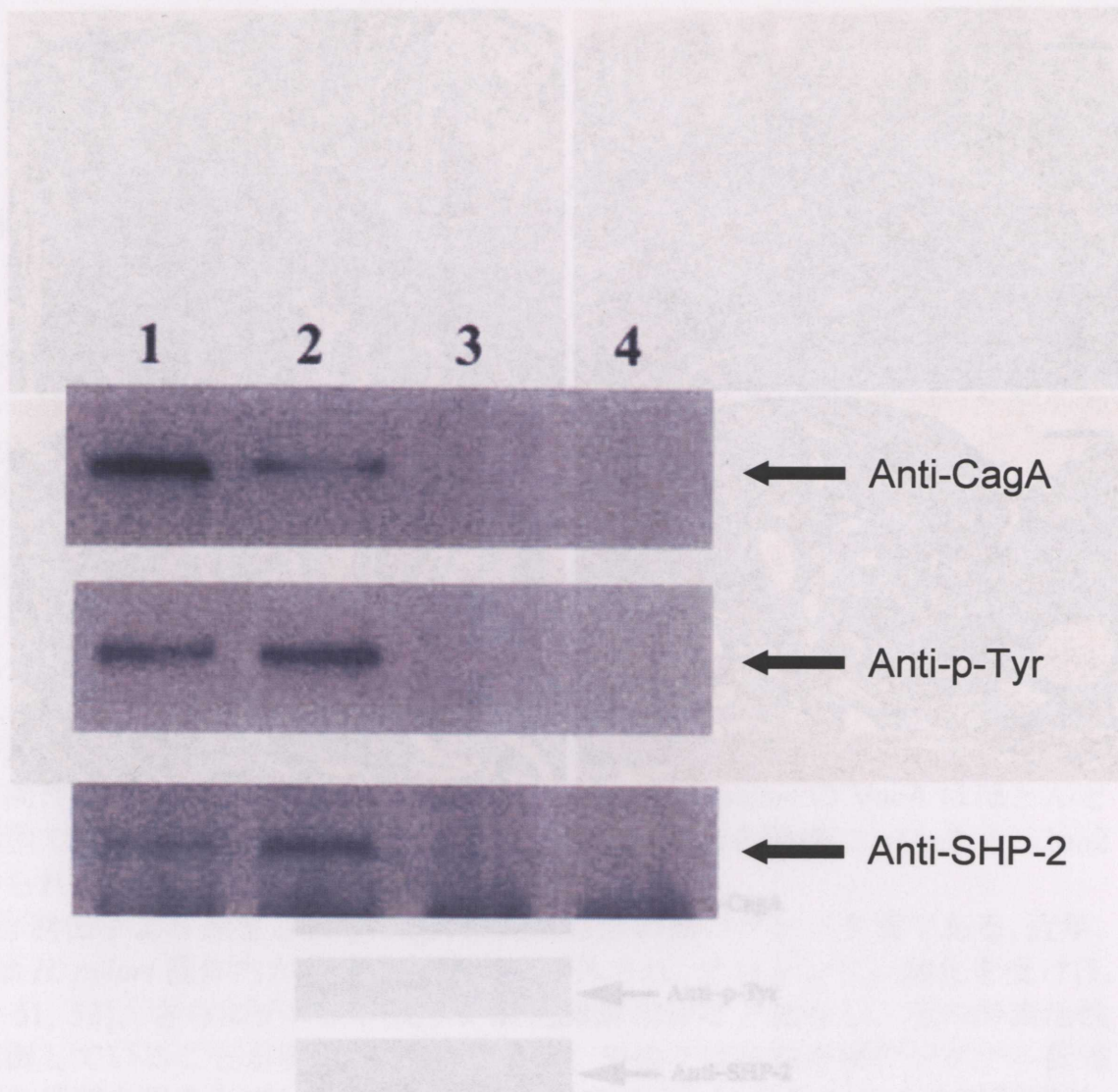


Figure 1-2

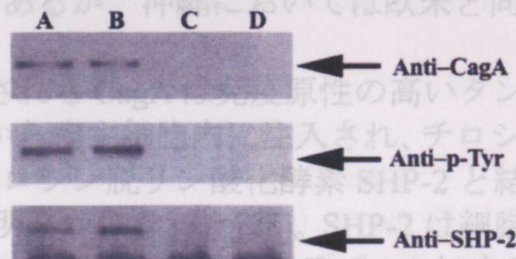
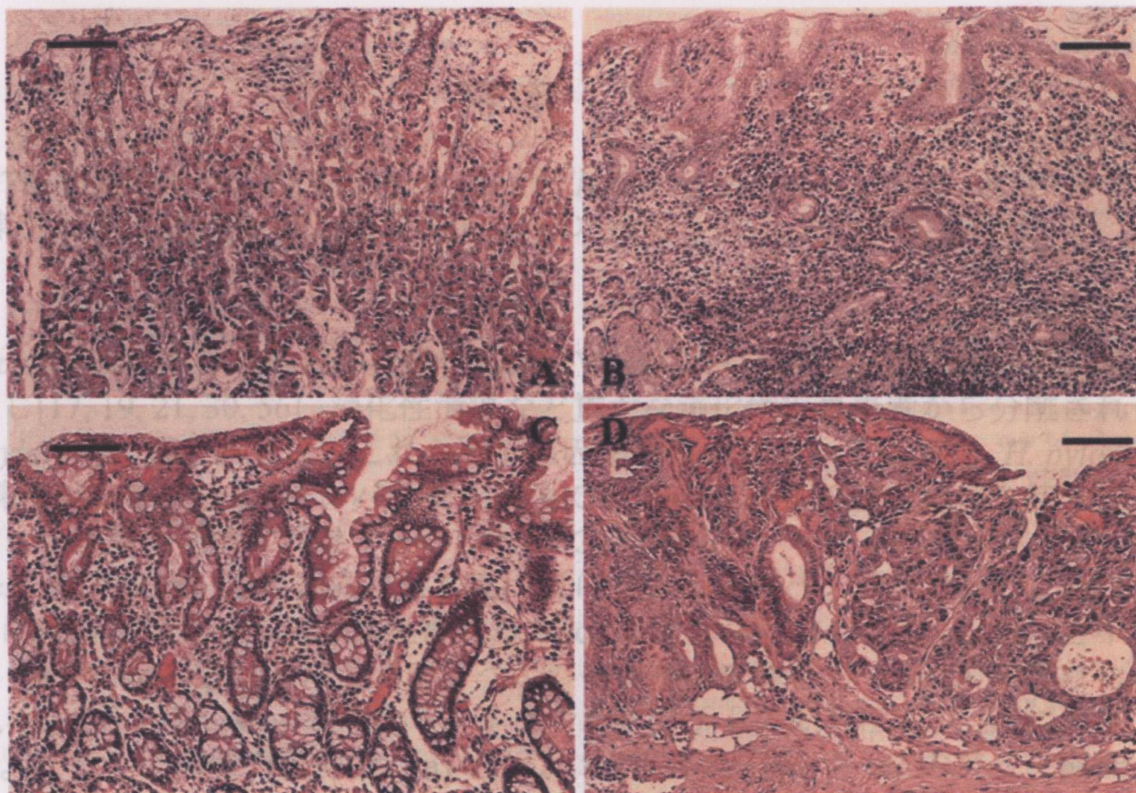
腸型早期胃癌患者より採取した胃粘膜immunoblot解析  
 上（4枚の組織写真）；下のimmunoblotのサンプルに相当する  
 組織学的所見（HE染色）  
 (scale bars, 20  $\mu$  m)

- (A) 軽度の炎症浸潤が認められる胃体部の生検組織
- (B) 重度の炎症浸潤が認められる前庭部の生検組織
- (C) 腸上皮化生の併発が認められる癌部周辺の切除胃粘膜
- (D) 炎症は認められない管状腺癌の切除組織

Figure 1-1

ヒト胃粘膜のimmunoblot解析  
 上；anti-CagA抗体，中；anti-リン酸化チロシン抗体 (anti-p-Tyr)，下；anti-SHP-2  
 抗体。

ピロリ菌陽性萎縮性胃炎患者の胃体部 (lane 1) および前庭部 (lane 2) からは  
 チロシンリン酸化CagAとそのCagAと免疫共沈するSHP-2が検出された。  
 一方、ピロリ菌陰性対照者からはそれらは検出されなかった（胃体部; lane 3, 前  
 庭部; lane 4）。



**Figure 1-2**

腸型早期胃癌患者より採取した胃粘膜immunoblot解析  
上（4枚の組織写真）；下のimmunoblotのサンプルに相当する  
組織学的所見（HE染色）

(scale bars, 20  $\mu$  m)

(A) 軽度の炎症浸潤が認められる胃体部の生検組織

(B) 重度の炎症浸潤が認められる前庭部の生検組織

(C) 腸上皮化生の併発が認められる癌部周辺の切除胃粘膜

(D) 粘膜下の浸潤は認められない管状腺癌の切除組織

下（3枚のgel写真）；腸型早期胃癌患者より採取した胃粘膜  
immunoblot解析

上；anti-CagA抗体, 中；anti-リン酸化チロシン抗体 (anti-p-Tyr), 下；anti-SHP-2  
抗体。

腸上皮化生部(C)および癌部(D)からは、チロシンリン酸化CagAとそのCagAと免疫共沈するSHP-2が検出されなかったが、一方、同じ患者の非癌部の胃粘膜組織においてはそれらは検出された（胃体部 [A], 前庭部 [B]）。

## 第2章

### The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia 東アジアにおける *Helicobacter pylori* の *vacA* と *cagA* 遺伝子の多型性

#### 序論

*H. pylori* にはウレアーゼや空胞化毒素 (VacA)、CagA など複数の病原因子が存在し[17, 19, 21, 30, 56]、消化性潰瘍など重大な消化性疾患患者から分離された *H. pylori* 株のほとんどは、これらの病原因子を生成している[6, 62]。 *H. pylori* type I 株は VacA と CagA タンパク質を産生でき、type II 株より強い毒性を持ち、より激しい疾患の発症に関与するといわれている[66]。

VacA は、細胞を空胞変成させて死に至らしめるタンパク毒素である。 *vacA* 遺伝子には多型が認められ、産生される VacA は、シグナルペプチド (s) と中間領域 (m) の組み合わせによりいくつかのモザイク構造をもつ VacA に分けられる[6, 41, 45, 61, 62, 66]。すなわち、シグナルペプチドの配列は s1 と s2 に大別される。また中間領域の配列は、m1 と m2 に大別され、m1 と m2 のアミノ酸配列の相同性は約 55% である[6]。日本で分類される *H. pylori* の VacA はほとんどが強毒型である s1/m1 であるが、沖縄においては欧米と同様に s1/m2 と s2/m2 が認められている。

*cagA* 遺伝子より産生される CagA は免疫原性の高いタンパク質である。近年、CagA は *H. pylori* 菌体内から宿主細胞内に注入され、チロシンリン酸化を受け[5, 12, 43, 51, 53]、さらにチロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合し、その酵素活性を脱制御していることが明らかになった[28]。SHP-2 は細胞増殖のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることで知られ[25]、CagA による SHP-2 の脱制御が、胃上皮細胞の異常な細胞増殖と細胞運動を引き起こすと考えられている。さらに最近、CagA のリン酸化および SHP-2 結合領域において、東アジアで単離された *H. pylori* 株の CagA と欧米で単離された *H. pylori* 株の CagA ではそのアミノ酸配列および働きに大きな違いがあることが示された。すなわち、CagA のリン酸化後、東アジア特有の配列の方が欧米特有の配列に比べ、SHP-2 と強く結合することが明らかになった[29]。CagA の病原因子として宿主細胞の機能を攪乱する能力は、SHP-2 との結合力によって決定できると考えられ、そのため CagA と SHP-2 結合親和性の多様性は、異なる *H. pylori* 株感染による臨床の病態を決定づける重要な差違であると考えられる。

本章では、*H. pylori* のゲノタイプと病態との間の関連性を検討するために、日本の福井と沖縄、さらに中国南東部に位置する杭州における十二指腸潰瘍患者および慢性胃炎患者の *H. pylori* 臨床分離株を用いて、その *vacA* と *cagA* 遺伝子の多型を調査した。

#### 方法

##### *H. pylori* 株

計 143 株 (福井分離株 65 株、沖縄分離株 60 株、杭州分離株 18 株) の臨床分離株を、福井大学医学部第 2 内科または沖縄中部病院または Zhejiang 大学 Sir

Run Run Shaw 病院にて上部消化管内視鏡施術時に採取した胃生検より単離した。福井の 65 患者のうち、十二指腸潰瘍患者が 26 例（男性 17 名、女性 9 名、平均年齢 48.8 歳）、慢性胃炎患者が 39 例（男性 19 名、女性 20 名、平均年齢 57.6 歳）であった。沖縄の 60 患者のうち、十二指腸潰瘍患者が 21 例（男性 18 名、女性 3 名、平均年齢 55.2 歳）、慢性胃炎患者が 39 例（男性 15 名、女性 24 名、平均年齢 59.5 歳）であった。また杭州の 18 患者のうち、十二指腸潰瘍患者が 11 例（男性 4 名、女性 7 名、平均年齢 42.9 歳）、慢性胃炎患者が 7 例（男性 3 名、女性 4 名、平均年齢 36.1 歳）であった。非ステロイド抗炎症薬や抗生物質を最近処方されていた患者は除外した。

#### **H. pylori 培養**

各患者の生検組織を TSA-II/5% sheep blood plate に塗布し、微好気性条件下（5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>）、37°C、3~5 日間培養した。第 1 培養プレートより単コロニーを採取し、新しい TSA-II plate に継代し同条件下で培養した。*H. pylori* 判定はウレアーゼ活性により行い、いくつかのコロニーを採取して 10% FCS を含む brucella broth liquid culture medium に植菌し、同条件下で 24 時間振盪培養した。菌液の一部を 20% glycerol を含む 0.01M PBS に懸濁させ -80°C で保存した。残りの菌液より遠心にてペレットを回収し、protease/phenol-chloroform 法により DNA を抽出し、TE buffer（10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA）に溶解させ PCR 増幅まで 4°C で保存した。

#### **cagA 遺伝子 3' 領域の配列決定**

以前報告したプライマー[8]（forward primer: 5'-GAATTGTCTGATAAACTTGAAA、reverse primer: 5'-GCGTATGTGGCTGTTAGTAGCG）を用い、*cagA* 遺伝子の 3' 領域を増幅した。PCR 条件は、95°C で 5 分加熱後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分を 25 サイクル、その後 72°C で 7 分おいた後、4°C で保存した。PCR 産物を 2% agarose gel で電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。PCR 産物は引き続き Centricon-100 Concentrator columns（Amicon, Beverly, Massachusetts, USA）で精製し、BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems, Foster City, California, USA）を用いて DNA direct sequencing PCR をかけ、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer（Applied Biosystems）でシーケンス解析した。さらに GENETYX-Mac software（version 11.2.3, Software Development）を用いて塩基配列の比較解析を行った。

#### **vacA タイピング**

PCR を用いた *vacA* 遺伝子の s-region（シグナルペプチドをコードする領域）と m-region（中間領域）のタイピングは Table 2-1 に示すそれぞれのサブタイプ特異的なプライマーペアを用いて、以前の報告に準じて行った[34, 35, 45]。PCR 条件は、95°C で 5 分加熱後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 25 サイクル、その後 72°C で 7 分おいた後、4°C で保存した。PCR 産物は 2% agarose gel 電気泳動にかけて分離した。

以前の報告で[34]、37 株の福井臨床分離株の全長 *vacA* 配列が決定されており、それらのデータも今回の解析に含めた。14 株の十二指腸潰瘍由来株の GenBank accession numbers は、AF049620、AF049621、AF049623、AF049625、AF049627、



AF049629、AF049630、AF049631、AF049637、AF049639、AF049641、AF049645、AF049647、AF049652 であり、17 株の慢性胃炎由来株の accession numbers は、AF049619、AF049622、AF049624、AF049626、AF049628、AF049632、AF049633、AF049635、AF049636、AF049642、AF071095、AF049643、AF049644、AF049646、AF049648、AF049649、and AF071096 である。

### 統計処理

*cagA*、*vacA* ゲノタイプ多型の分布の違いおよび *cagA*、*vacA* ゲノタイプ多型と病態との相関関係は、chi-square test および Fisher's exact probability test により統計解析した。有意差は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### CagA 多型

福井と杭州から分離された株の全てが *cagA* 陽性株であったのに対し、沖縄分離株の 8.3% (5/60) が *cagA* 陰性株であった。*cagA* 陰性株の比率は福井に比べ沖縄で有意に高かった ( $P = 0.0032$ ) (Table 2-2)。

以前より CagA は欧米型と東アジア型に分類されることが報告されている [29]。欧米型と東アジア型の間で CagA リン酸化部位周辺の配列に大きな違いがあり、欧米型 CagA は WSS (Western CagA-specific, SHP-2-binding sequence)、東アジア型 CagA で ESS (East Asian CagA-specific, SHP-2-binding sequence) と呼ばれる (Figure 2-1)。福井分離株の全てと杭州分離株の 94.4% (17/18) が東アジア型 CagA を保有していたのに対し、沖縄分離株の 21.7% (13/60) が欧米型 CagA 保有株であった。欧米型 CagA 保有株の比率は福井に比べ沖縄で有意に高かった ( $\chi^2 = 15.7, P < 0.0001$ ) (Table 2-2)。98.4% (122/124) の東アジア型 CagA 保有株はひとつの ESS をもつものであり、残り 2 株は 2 つの ESS をもつタイプであった。78.6% (11/14) の欧米型 CagA 保有株はひとつの WSS をもつものであり、残り 1 株は 2 つの WSS を、2 株は 3 つの WSS をもつタイプであった。また、福井、沖縄、杭州いずれにおいても、*cagA* ゲノタイプと病態 (慢性胃炎、十二指腸潰瘍) との間に有意な相関はみられなかった。

### *vacA* 多型

福井分離株ではすべて s-region は s1 サブタイプ、m-region は m1 サブタイプであり (Figure 2-2)、最も多いゲノタイプは s1c/m1b であった (55/65, 84.6%)。沖縄分離株では、福井同様最も多いゲノタイプは s1c/m1b であったが (38/60, 63.3%)、s1a/m1b が 4 株 (6.7%)、s1b/m1b が 1 株 (1.7%)、s1a/m2 が 7 株 (11.7%)、s1c/m2 が 5 株 (8.3%)、s2/m2 が 5 株 (8.3%) と、福井に比べバリエーションがみられた。一方杭州では、最も多いゲノタイプは s1c/m2 であった (11/18, 61.1%)。福井における s1c/m1b ゲノタイプの比率は、沖縄や杭州に比べ有意に高かった (対沖縄;  $\chi^2 = 11.9, P = 0.0006$ 、対杭州;  $\chi^2 = 22.7, P < 0.0001$ )。杭州における s1c/m2 ゲノタイプの比率は、福井や沖縄に比べ有意に高かった (対福井;  $\chi^2 = 45.8, P < 0.0001$ 、対沖縄;  $\chi^2 = 23.7, P < 0.0001$ )。また *vacA* ゲノタイプと病態 (慢性胃炎、十二指腸潰瘍) との間に有意な相関はみられなかった (Table 2-3)。

### *cagA* と *vacA* の相関性

日本において東アジア型 CagA 陽性株の 80% 以上が s1c/m1b *vacA* ゲノタイプ

であった（福井；55/65, 84.6%、沖縄；34/42, 81.0%）。一方杭州においては、64.7%（11/17）の東アジア型 CagA 陽性株が s1c/m2 vacA ゲノタイプであった。また、沖縄、杭州でみられた欧米型 CagA 陽性株のほとんどが m2 vacA ゲノタイプであった（11/14, 78.6%）（Table 2-4）。

## 考察

*H. pylori* は遺伝子変異に富んだ細菌の一種であり、この変異多型は広範囲な菌株間での遺伝子伝達や相同組換えによって高まっている[18]。*H. pylori* がさまざまな疾病を発症させるのは株特有の遺伝子多型がその原因の一つと考えられる。さらに *H. pylori* には明確な地理的分布も確認されている。欧米諸国では単離された菌の 1/2 から 2/3 が cagA 陽性株であるのに対し、東アジア分離株のほとんどが cagA 陽性株である[34, 63]。またさらにアジア株と他の株との cagA 配列には大きな違いがあることも報告されている[1, 29]。今回の検討により、同じ東アジア内でも日本（福井と沖縄）と中国（杭州）において cagA の多型が確認された。福井と杭州から分離された株はすべて cagA 陽性株であったのに対し、沖縄では 8.3% の分離株が cagA 陰性株であった。cagA 陽性株の比率に福井と沖縄で有意に違いがみられた。さらに、福井分離株のすべてと杭州分離株の 94.4% が東アジア型 CagA 陽性であったのに対し、沖縄分離株の 21.7% が欧米型 CagA 陽性であった。欧米型 CagA 陽性株の比率は福井に比べ沖縄で有意に高かった。福井は本州の中央部に位置し、一方沖縄は日本の南西端に位置する島々であり、2 県の間は 1,300km 以上離れている。沖縄は歴史的に西洋諸国と活発な交流があり、20 世紀中頃より大勢のアメリカ人の居住があった。そのため欧米型 *H. pylori* が欧米諸国より沖縄に移行してきたのだろう。今回の検討では、cagA 陰性株はすべて慢性胃炎患者から分離されたものであったが、cagA ゲノタイプと病態（慢性胃炎と十二指腸潰瘍）との間に有意な相関性はみられなかった。

本章においては、vacA 多型とさらに vacA と cagA 間の関連性も検討した。福井分離株はすべて、シグナルペプチド領域では s1 サブタイプを、中間領域では m1 サブタイプを持っていた。日本で最も多いゲノタイプは s1c/m1b であった（福井；55/65, 84.6%、沖縄；38/63, 63.3%）。van Doorn らによっても、s1c サブタイプは東アジアでは高頻度にみられるが、世界の他の地域では極めて稀なサブタイプであることが報告されている[61]。さらに日本において東アジア型 CagA 陽性株の多くは vacA ゲノタイプが s1c/m1b タイプであったのに対し、杭州では多くの株の vacA ゲノタイプが s1c/m2 タイプであった（11/17, 64.7%）。Pan らによって、中国分離株（上海と広州、広州-上海間は 1,000km 以上）の 80% 以上が s1a/m2 ゲノタイプをもつと報告されているが[45]、この中では s1a と s1c サブタイプは区別していない。杭州は上海に近いことから中国の vacA ゲノタイプで最も多いタイプは s1c/m2 タイプであると考えられる。今回の検討では s1c/m2 ゲノタイプの株はすべて東アジア型 CagA 陽性株であったことから、東アジア型 CagA 陽性株間であっても vacA ゲノタイプには地理的分布が存在することが示された。欧米において、cagA 陽性、vacA s1 サブタイプをもつ *H. pylori* は、より激しい疾病（十二指腸潰瘍や胃癌）発症に明らかに関与していることが報告されている[63]。しかしながら今回の検討では、s2/m2 ゲノタイプであった株は

すべて慢性胃炎患者由来であったものの、*vacA* ゲノタイプと十二指腸潰瘍との間に有意な相関はみられなかった。

東アジア諸国は、欧米諸国に比べ胃癌の発症率が非常に高いことが知られている。しかしながら、東アジア内においても胃癌リスクは地域によって違い、胃癌による死亡率は、福井で 43.7/100,000、沖縄で 18.2/100,000、杭州で 23.1/100,000 である。今回の検討では、*cagA/vacA* ゲノタイプと病態との間に明らかな相関性はみられなかったが、さらなる綿密で大規模な解析が必要であると考えられる。

## Table 2-1

ピロリ菌*vacA*タイピングに用いるプライマー

Region	Primer	Sequence <sup>a</sup>	Size and location of PCR product
s1a	vacA s1a-F	5'- CTC TCG CTT TAG TAG GAG C -3'	213 bp (843 - 1055) <sup>b</sup>
	VA1-R	5'- CTG CTT GAA TGC GCC AAA C -3'	
s1b	SS3-F	5'- AGC GCC ATA CCG CAA GAG -3'	187 bp (869 - 1055) <sup>c</sup>
	VA1-R		
s1c	vacA s1c-F	5'- CTC TCG CTT TAG TGG GGY T -3'	213 bp (843 - 1055) <sup>c</sup>
	VA1-R		
s2	SS2-F	5'- GCT AAC ACG CCA AAT GAT CC -3'	199 bp (433 - 631) <sup>d</sup>
	VA1-R		
m1a	VA3-F	5'- GGT CAA AAT GCG GTC ATG G -3'	290 bp (2741 - 3030) <sup>b</sup>
	VA3-R	5'- CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC -3'	
m1b	VAm-F3	5'- GGC CCC AAT GCA GTC ATG GAT -3'	291 bp (2741 - 3031) <sup>c</sup>
	VAm-R3	5'- GCT GTT AGT GCC TAA AGA AGC AT -3'	
m2	VA4-F	5'- GGA GCC CCA GGA AAC ATT G -3'	352 bp (976 - 1327) <sup>e</sup> (2284 - 2635) <sup>d</sup>
	VA4-R	5'- CAT AAC TAG CGC CTT GCA C -3'	

<sup>a</sup> Y : C or T

<sup>b</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* 60190 (GenBank accession no. HPU05676) [20].

<sup>c</sup> Corresponding to nucleotide position of *H. pylori* 60190.

<sup>d</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* Tx30a (GenBank accession no. HPU29401) [6].

<sup>e</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* 87-203 (GenBank accession no. HPU05677) [20].

## Table 2-2

CagAゲノタイプの分布

	Fukui			Okinawa			Hangzhou		
	<i>cagA</i> (-)	East Asian	Western	<i>cagA</i> (-)	East Asian	Western	<i>cagA</i> (-)	East Asian	Western
Duodenal ulcer	0	26	0	0	14	7	0	10	1
Chronic gastritis	0	39	0	5	28	6	0	7	0
Total	0	65	0	5 <sup>a</sup>	42	13 <sup>b</sup>	0	17	1

<sup>a</sup>*cagA*陰性株の比率は福井に比べ沖縄で有意に高かった ( $P=0.0032$ ) 。

<sup>b</sup>欧米型CagA陽性株の比率は福井に比べ沖縄で有意に高かった ( $P<0.0001$ ) 。

## Table 2-3

*vacA*ゲノタイプの分布

	sla/mla	sla/mlb	slb/mla	slb/mlb	slc/mla	slc/mlb	sla/m2	slb/m2	slc/m2	s2/m2
<b>Fukui</b>										
Duodenal ulcer	0	4	1	0	0	21	0	0	0	0
Chronic gastritis	1	4	0	0	0	34	0	0	0	0
Total	1	8	1	0	0	55 <sup>a</sup>	0	0	0	0
<b>Okinawa</b>										
Duodenal ulcer	0	1	0	0	0	13	4	0	3	0
Chronic gastritis	0	3	0	1	0	25	3	0	2	5
Total	0	4	0	1	0	38	7	0	5	5
<b>Hangzhou</b>										
Duodenal ulcer	0	0	0	0	0	2	1	0	8	0
Chronic gastritis	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0
Total	0	1	0	0	0	5	1	0	11 <sup>b</sup>	0

<sup>a</sup>slc/mlbゲノタイプの比率は沖縄、杭州に比べ福井で有意に高かった（対沖縄； $P=0.0006$ 、対杭州； $P<0.0001$ ）。

<sup>b</sup>slc/m2ゲノタイプの比率は福井、沖縄に比べ杭州で有意に高かった（対福井； $P<0.0001$ 、対沖縄； $P<0.0001$ ）。

## Table 2-4

*cagA*と*vacA*ゲノタイプ間の相関

<i>cagA</i> status	<i>vacA</i> genotype									
	<i>sla/m1a</i>	<i>sla/m1b</i>	<i>slb/m1a</i>	<i>slb/m1b</i>	<i>slc/m1a</i>	<i>slc/m1b</i>	<i>sla/m2</i>	<i>slb/m2</i>	<i>slc/m2</i>	<i>s2/m2</i>
<b>Fukui</b>										
East Asian type	1	8	1	0	0	55	0	0	0	0
<b>Okinawa</b>										
<i>cagA</i> -negative	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3
Western type	0	0	0	1	0	2	5 <sup>a</sup>	0	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
East Asian type	0	4	0	0	0	34 <sup>b</sup>	2	0	2	0
<b>Hangzhou</b>										
Western type	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
East Asian type	0	1	0	0	0	5	0	0	11	0

<sup>a</sup> 欧米型CagAは*vacA* m2ゲノタイプと有意に相関性があった ( $P<0.0001$ ) 。

<sup>b</sup> 東アジア型CagAは*vacA* *slc/m1b*ゲノタイプと有意に相関性があった ( $P<0.0001$ ) 。

```

F36 East Asia type      KVSAKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASPEPIYATIDFDEANQAGF
F75 East Asia type      ...T.....A.....
OK112 Western type     ..N...R..QIA.GLGGVGQAAGFPLKRHDKVDDLSKV...V.....DLGGPF---
OK111 Western type     ..TQ.....QAA.GLGGVGQA-GFPLKRHDKVDDLSKV...V.....DLGGP----
OK107 Western type     ..K...R.DQIA.GLGGVGQA-GFSLKGHTKVDDLSKV.L..NH.....DLGGP----

F36
-----
F75
KVSTKIDQLNEAASAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASPEPIYATIDFDEANQAGF
OK112
-----
OK111
-----FPLKRHDKVDDLSKV...V.....DLGGPF---
OK107
-----FPLKKHTKVDDLSKV.L..NH.....DLGGPF---

F36
-----
F75
-----
OK112
-----
OK111
-----
OK107
-----FPLKKHTKVDDLSKVGLSANHEPIYATIDDLGGP---

F36
PLRRYAGFDDLSKVGLS
F75
....S.AVN.....
OK112
..K.HDKV.....
OK111
..K.HDKV.....
OK107
..KKHDKVG.....

```

## Figure 2-1

*cagA* 3'領域における、F36株(GenBank accession number AB090080)、F75株(AB090106)、OK112株(AB090088)、OK111株(AB090140)、OK107株(AB090086)間のアミノ酸配列の比較  
ドットは一致を、ハイフンは残基が抜けていることを示す。  
配列の開始位置は、NCTC11637株 (AE202973) CagAの918番目に相当する。  
下線部はESS領域を、二重下線部はWSS領域を示す。  
F36株は1つのESSを、F75株は2つのESSをもち、OK112株は1つのWSSを、OK111株は2つのWSSを、OK107株は3つのWSSをもつ。



## A. *vacA* s alleles

```

NCTC11638   s1a CTCTCGCTTTAGTAGGAGCATTAGTCAGCATCACACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTCACAACCGTGATCAT
F37         s1a .....G.....
F51         s1a .....G..G.....
F56         s1a .....C..T.....
F73         s1a .....C..T.....

J99         s1b .....T.....C.....G..GA.T..GC..T.....G.G.....G.....
F80         s1b .....T.....C.....G..GA.T..TGC..T.....G.G.....

Taiwan34    s1c .....G..GTT..G.....A.....C..T.....
F20         s1c .....G..GCT..G.....A.....
F21         s1c .....G..GCT..G.....A.....
F28         s1c .....G..GCT..G.....A..A.....T.....
F29         s1c .....G..GTT..G..T.....A.....

```

## B. *vacA* m alleles

```

NCTC11638   m1a GGTCAAAATGCGGTCATGGATTATAGCCAATTTTCAAATTTAACCATTCAGGGGATTCATCAACAATCAAGGCA
F37         m1a .....C.....T.....C.....T.....
China R13   m1b ..C.CC....A.....G.....G...A...TG.....
F20         m1b ..C.CC....A.....T.....G.....G...A...T.....

NCTC11638   m1a CTATCAACTATCTGGTCCGAGGTGGAAAGTGCAACCTTAAGCGTAGGCAATGCAGCAGCTATGATGTTAATAA
F37         M1a .....C.....AT.....
China R13   m1b .....T...T...T....C....CA.A.A.....C...C.T.....
F20         m1b .....T...T...T....C....CA.A.A.....TC...GT....C..

NCTC11638   m1a TGATATAGACAGCGCGACCGGATTTTACAAACCGCTCATCAAGATTAACAGCGCTCAAGATCTCATTAAAAATACA
F37         m1a .....
China R13   m1b .....T.....T.....T.....T.....G.....A.....
F20         m1b .....T.....T.....T.....A.....A.....A.....

NCTC11638   m1a GAACATGTTTTATTGAAAGCGAAAATCATTGGTTATGGTAATGTTTCTACAGGTACCAATGGC
F37         m1a ..G.....T.....
China R13   m1b .....C.....C.....AA...C...TT...C..T..CA..
F20         m1b .....C.....C.....AA...TT...C..T..CA..

```

## Figure 2-2

### *vacA* 遺伝子の塩基配列の比較

A : *vacA* シグナル領域 (s-領域) における s1a、s1b、s1c サブタイプ間の比較。

それぞれ 76bp の配列の開始位置は、NCTC11638 株 (GenBank accession number U07145) *vacA* の 47 番目に相当する。

B : *vacA* 中間領域 (m-領域) における m1a、m1b サブタイプ間の比較。

それぞれ 291bp の配列の開始位置は、NCTC11638 株 *vacA* の 2914 番目に相当する。

ドットは一致を示す。

それぞれの株の *vacA* GenBank accession number は、AF071095 (F37 株)、AF049630 (F51 株)、AF049633 (F56 株)、AF049652 (F73 株)、AE001511 (J99 株)、AF049619 (F20 株)、AF049620 (F21 株)、AF049621 (F28 株)、AF049622 (F29 株)、AF035610 (China R13 株) である。

## 第3章

Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer

*Helicobacter pylori* CagA の SHP-2 結合部位多型と胃萎縮度および胃癌との関連

### 序論

*cagA* 遺伝子より産生される CagA は、複数の *H. pylori* 病原因子の中で最も研究の進んでいる因子の一種である。*cagA* 遺伝子を保有する *H. pylori* 感染は、萎縮性胃炎や胃癌発症の危険率を著しく高めることが知られている[14, 31, 38, 47, 48, 50]。近年、CagA は *H. pylori* から宿主細胞に注入され、チロシンリン酸化を受け[5, 12, 43, 51, 53]、さらにチロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合し、酵素活性を脱制御していることが明らかになった[28]。CagA による SHP-2 の脱制御が、胃上皮細胞の異常な細胞増殖と細胞運動を引き起こすと考えられている。

*H. pylori* には株間で多くの遺伝子多型が確認され、それに起因して各株間の性質が異なることで発症疾患の違いが起こると考えられている。最近、CagA のリン酸化、SHP-2 結合領域のアミノ酸配列は、東アジア型、欧米型間で大きく異なり、SHP-2 結合能も東アジア型の方が欧米型に比べ強いことが明らかになった[29]。CagA の病原因子として宿主細胞の機能を攪乱する能力は、SHP-2 との結合力が一因と考えられ、そのため CagA リン酸化および SHP-2 結合部位の多様性は、異なる *H. pylori* 株感染による臨床の病態を決定づける重要な差違であると考えられる。

日本における胃癌の発症および死亡率は他の先進諸国に比較して非常に高いことが知られる。しかし、国内においても胃癌の死亡率には大きな差違があることが報告されている[33]。福井は本州の中央部に位置し、一方沖縄は日本の南西端に位置する島々であり他県とは違った歴史や食文化をもつ。2 県の間は 1,300km 以上離れている。この 2 県間では、*H. pylori* 感染による病態に大きな違いが見られる。胃癌の前段階である萎縮性胃炎の罹患率は福井の方が高く、胃癌による死亡率も沖縄の約 2.4 倍で福井の方が高い（1999 年統計で、福井は人口 10 万人に対し 43.7 人、沖縄は人口 10 万人に対し 18.2 人）。ゆえに、本章では CagA 多型と胃癌の関連性を検討するために、胃癌リスクの違う日本の 2 カ所（福井と沖縄）から *H. pylori* を単離し、CagA リン酸化部位の多型を調べた。さらに、GenBank に登録されている世界各国の CagA 多型の分布も調査した。

### 方法

#### *H. pylori* 株

計 115 株（福井分離株 65 株、沖縄分離株 50 株）の臨床分離株を、福井大学医学部第 2 内科または沖縄中部病院にて上部消化管内視鏡施術時に採取した胃生検より単離した。この施術はヘルシンキ宣言基準に基づき、説明後患者の同意を得て行った。福井の 65 患者のうち、慢性胃炎患者が 36 例（男性 17 名、女性 19 名、平均年齢 57.9 歳）、胃癌患者が 29 例（男性 18 名、女性 11 名、平均

年齢 60.0 歳)、沖縄の 50 患者のうち、慢性胃炎患者が 42 例 (男性 18 名、女性 24 名、平均年齢 58.6 歳)、胃癌患者が 8 例 (男性 5 名、女性 3 名、平均年齢 61.0 歳) であった。患者は全て日本人であり、非ステロイド抗炎症薬や抗生物質を最近処方されていた患者は除外した。それぞれの患者から前庭部および胃体部より 2 カ所ずつ計 4 カ所の胃生検組織を採取した。前庭部および胃体部それぞれ 1 カ所ずつを 10%ホルマリン (pH7.2) で固定し組織鏡検解析に用い、残りの 1 カ所ずつを *H. pylori* の培養に用いた。

### 組織学的解析

生検組織をパラフィン包埋し、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を施した。プレパラートをブラインド法で検鏡し、慢性胃炎の組織学的特徴である、炎症度 (リンパ球の浸潤)、胃炎の活動度 (好中球の浸潤)、胃粘膜の萎縮度を改訂版シドニーシステムによって 0~3 のスコアで点数化した。

### *H. pylori* 培養および DNA 抽出

各患者の生検組織を TSA-II/5% sheep blood plate に塗布し、微好気性条件下 (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)、37°C、3~5 日間培養した。第 1 培養プレートより単コロニーを採取し、新しい TSA-II plate に継代し同条件下で培養した。*H. pylori* 判定はウレアーゼ活性により行い、いくつかのコロニーを採取して 10% FCS を含む brucella broth liquid culture medium に植菌し、同条件下で 24 時間振盪培養した。菌液の一部を 20% glycerol を含む 0.01M PBS に懸濁させ -80°C で保存した。残りの菌液より遠心にてペレットを回収し、protease/phenol-chloroform 法により DNA を抽出し、TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) に溶解させ PCR 増幅まで 4°C で保存した。

### *cagA* 遺伝子 3' 領域の配列決定

以前報告したプライマー [8] (forward primer: 5'-GAATTGTCTGATAAACTTGAAA、reverse primer: 5'-GCGTATGTGGCTGTTAGTAGCG) を用い、*cagA* 遺伝子の 3' 領域を増幅した。PCR 条件は、95°C で 5 分加熱後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分を 25 サイクル、その後 72°C で 7 分おいた後、4°C で保存した。PCR 産物を 2% agarose gel で電気泳動しエチジウムブルマイドで染色した。PCR 産物は引き続き Centricon-100 Concentrator columns (Amicon, Beverly, Massachusetts, USA) で精製し、BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いて DNA direct sequencing PCR をかけ、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンス解析した。さらに GENETYX-Mac software (version 11.2.3, Software Development) を用いて塩基配列の比較解析を行った。以前報告した NCTC11637 株 (GenBank accession number: AE202973) の *cagA* 配列やさらに、GenBank データベースに世界各国から登録されている *cagA* 配列も解析に加えた。

### 感染実験

ヒト胃上皮 AGS 細胞は 10% FCS (Filtron) を含む RPMI1640 培地 (Gibco BRL) で培養した。*H. pylori* はリン酸化部位数の違う 3 株 (福井胃癌患者分離株 F32、福井慢性胃炎患者分離株 F65、沖縄慢性胃炎患者分離株 OK112) を選んだ。AGS 細胞 (2×10<sup>6</sup> 個/100mm dish) を抗生物質無添加の培地で培養し、そこに

MOI (multiplicity of infection) =100 になるように、*H. pylori* ( $2 \times 10^8$  個) を添加した。5% CO<sub>2</sub>、37°C で 5 時間培養した後、AGS 細胞を氷冷した 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を含む 0.01M PBS、pH 7.5 で 3 回洗浄し、2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、2 mM PMSF、10 μg/ml leupeptin、10 μg/ml trypsin inhibitor、10 μg/ml aprotinin を含む氷冷した lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) で溶解した。不溶画分を遠心分離 (10,000 g, 10 分, 4°C) にて沈殿させ上清を回収し、細胞溶解液とした。

## 抗体

免疫沈降と immunoblot の第 1 抗体として、anti-CagA ポリクローナル抗体 (Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA)、anti-リン酸化チロシン抗体 (4G10, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)、anti-SHP-2 抗体 (C-18, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA) を使用した。

## 免疫沈降および immunoblotting

調製した細胞溶解液に、anti-CagA ポリクローナル抗体または正常 IgG を加え 30 分、4°C で反応させ、次いで protein G-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Piscataway, NJ, USA) を加え 90 分、4°C で吸着させた。免疫沈降サンプルを緩やかな遠心分離 (1,000g, 1 分, 4°C) で回収し、lysis buffer で 4 回洗浄した後、SDS sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 6% 2-ME, 0.003% bromophenol blue, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8) を加え 5 分間煮沸した。煮沸サンプルの上清を SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide) にかけて、次いで Immobilon P (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) にブロットした。メンブレンを 1% ウシ血清アルブミン (BSA) または 5% スキムミルク含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Tween 20) でブロッキングし、第 1 抗体と 4°C で一晩反応させた。メンブレンを T-TBS で洗浄後、HRP ラベルされた anti-ウサギまたは anti-マウス IgG ポリクローナル抗体と 1 時間反応させ、enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Piscataway, NJ, USA) にて X 線フィルムに感光させた。

## 統計処理

結果の値は平均値±標準偏差または%で示した。CagA 多型分布の差および CagA 多型と病態との相関関係は、chi-square test および Fisher's exact probability test により統計解析した。各グループ間の炎症の程度、胃炎の活動度、萎縮度には Mann-Whitney U test よって比較した。有意差は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### cagA 多型

今回検討した患者において、各患者の前庭部と胃体部よりそれぞれ単離した cagA 陽性株の cagA 3' 領域配列は、前庭部単離株と胃体部単離株で一致し、混合感染はないと考えられた。福井単離株はすべて cagA 陽性株であり、それに対し沖縄単離株の 12.0% (6/50) が cagA 陰性株であった。cagA 陰性株はすべて慢性胃炎患者由来であった。福井と沖縄における cagA 陽性株の分布には有意に差がみられた ( $P = 0.006$ ) (Table 3-1)。

NCTC11637 株、OK112 株、F32 株間の cagA 遺伝子の 3' 領域におけるアミノ

酸配列の比較を Figure 3-1 に示す。CagA の Src ファミリーキナーゼによるチロシンリン酸化部位は、CagA 分子の C 末端側に複数出現するグルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニンというユニークなアミノ酸モチーフ (EPIYA モチーフ) 内に存在し、NCTC11637 株は 5 つの EPIYA モチーフを持つ。EPIYA-A と EPIYA-B サイトは欧米型および東アジア型ほとんど全ての CagA に存在し周辺配列の相同性も高い。一方その後の EPIYA-C、D サイト周辺領域は、欧米型と東アジア型間で相同性が非常に低下する。以前、共同研究者の東らの報告[29]により、これらの EPIYA モチーフのうちリン酸化を受け SHP-2 複合体形成に関与するチロシン残基は、欧米型 CagA では EPIYA-C サイトであり、東アジア型 CagA では EPIYA-D サイトであることが明らかになった。欧米型 CagA において、EPIYA-C サイトを含む 34 アミノ酸からなるセグメントが高頻度に欠失、重複を認めるために、EPIYA-C サイトは 0~3 カ所とバリエーションが生じる。この EPIYA-C サイトを含む 34 アミノ酸からなるセグメントは、“Western CagA-specific, SHP-2-binding sequence” (WSS) と名付けられ [29]、以前 Covacci らが定義した EPIYA-D1、EPIYA-D2、EPIYA-D3 モチーフや[17]、山岡らが定義した R1 と WSR 領域を含む[68, 69]。一方、東アジア型 CagA は WSS を持たず、WSS に相当する、EPIYA-D サイトを含む“East Asian CagA-specific, SHP-2-binding sequence” (ESS) を持つ[29]。ESS は以前山岡らが定義した JSR 領域を含む[68, 69]。以上のことより、OK112 株は一つの WSS、NCTC11637 株は三つの WSS、また F32 株は一つの ESS を持つため、それぞれ A-B-C タイプ、A-B-C-C-C タイプ、A-B-D タイプに分類された。

#### **CagA 多型の分布と CagA 多型と病態との関連性**

CagA 多型の分布について、福井と沖縄では違いがみられた (Table 3-2)。EPIYA モチーフの数は株によってさまざまであったが、福井単離株のほとんど全てが ESS をもつ東アジア型 CagA 陽性であった。唯一、慢性胃炎患者から分離された F65 株が ESS も WSS も存在せず、A-B-B タイプに分類された。福井において一番多いタイプは一つの ESS をもつ A-B-D タイプであった。一方、沖縄単離株の 16.0% (8/50) が WSS をもつ欧米型 CagA 陽性であった。欧米型 CagA 陽性株の割合は福井 (0/64) に比べ沖縄 (8/50) で有意に高かった ( $P=0.001$ )。福井、沖縄ともに胃癌患者単離株はすべて東アジア型 CagA 陽性株であった (Table 3-3)。

#### **CagA 多型の世界的な分布**

世界的な CagA 多型の分布を、GenBank に登録されているデータを用いて検討した。GenBank から 154 株の *cagA* 3'領域の塩基配列データを得、その CagA 多型の分布を Table 3-4 に示す。欧米 17 株 (アイルランド 3 株、オーストリア 1 株、イタリア 1 株、イギリス 1 株、アメリカ 6 株、オーストラリア 3 株) はすべて欧米型 CagA であった。さらにラテンアメリカ 57 株 (チリ 1 株、コロンビア 23 株、コスタリカ 33 株) もすべて欧米型 CagA であった。一方、東アジア 70 株 (日本 52 株、韓国 5 株、中国 8 株、台湾 5 株) はすべて東アジア型 CagA であった。ベトナムにおいては、4 株全てが東アジア型 CagA であった。タイにおいては 3 株が東アジア型 CagA、2 株が欧米型 CagA であった。インドにおいては、3 株全てが欧米型 CagA であった。病態との関連性については、病態が

GenBank に登記されていない株がほとんどであったため解析できなかった。

### 組織学的特徴と CagA 多型との関連性

沖縄の慢性胃炎患者において組織学的特徴と *H. pylori* CagA のタイプ間の相関を検討したところ、前庭部および体部胃粘膜において、東アジア CagA 陽性株感染患者の炎症程度や胃炎活動度、胃粘膜萎縮度が、*cagA* 陰性株や欧米型 CagA 陽性株感染患者に比べ有意に重度であった (Table 3-5)。F65 株を除くすべての慢性胃炎患者由来の福井分離株が東アジア型 CagA を保有していた。東アジア型 CagA 陽性株感染患者についてみると、前庭部および体部胃粘膜において、胃粘膜萎縮度は沖縄に比べ福井の方が有意に高くなった (Table 3-5)。

### CagA のリン酸化と CagA-SHP-2 の結合親和性

以前より、日本単離株のほとんどが完全な *cagPAI* を保有することが報告されている[8]。今回、CagA のリン酸化と CagA-SHP-2 の結合親和性を、F32 株、F65 株、OK112 株を用いて培養細胞への感染実験で検討した。F32 株は典型的な東アジア型 CagA である A-B-D タイプ CagA、OK112 株は典型的な欧米型 CagA である A-B-C タイプ CagA を持つ。培養細胞への遺伝子導入試験により EPIYA-C サイトや EPIYA-D サイトのチロシン残基がメジャーなリン酸化部位であることが分かっている[28]。F65 株 CagA はメジャーなリン酸化部位を持たず、A-B-B タイプに分類される。OK112 株、F32 株感染系において、CagA のリン酸化と CagA-SHP-2 複合体形成が観察されたが、F65 株感染系では観察されなかった。CagA-SHP-2 結合親和性は、東アジア型 CagA をもつ F32 株の方が欧米型 CagA をもつ OK112 株よりも強いことが明らかになった (Figure 3-2)。

## 考察

*H. pylori* には株間において多くの遺伝子多型が確認されており、それによって各株間の性質が異なることがさまざまな疾病発症の起因のひとつであると考えられている。その中でも *cagPAI* を持つ *H. pylori* は強い病原性を示し、強い胃炎を誘発し胃粘膜萎縮や胃癌にも深く関与する[14, 38, 48]。近年、CagA は IV 型分泌装置を介して宿主細胞質内に注入され、細胞内のキナーゼによりリン酸化を受けることが示された[5, 18, 43, 51, 53]。加えて CagA は、細胞増殖シグナル伝達系に重要な役割を果たしている SHP-2 と複合体を形成し、その酵素活性を刺激していることも明らかになった[28]。日本では、ほぼ 100%の株が *cagPAI* を保有し[8, 34]、萎縮性胃炎や胃癌の罹患率が欧米諸国に比べ極めて高い[16]。最近のヒト胃上皮 AGS 細胞への *cagA* 遺伝子導入実験より、東アジア型と欧米型の間では *cagA* の SHP-2 結合部位周辺の配列が大きく異なり、東アジア型 CagA の SHP-2 結合親和性は欧米型 CagA に比べ強いことが明らかになった[29]。本章では培養細胞における感染実験系においても同様の結果を確認した。ESS を持つ東アジア型 CagA (A-B-D タイプ) は、WSS を持つ欧米型 CagA (A-B-C タイプ) に比べ SHP-2 結合親和性が強かった。SHP-2 は *Drosophila* の Corkscrew と相同性を持ち、Ras-MAPK 経路の活性化を介した細胞増殖刺激を増強させることが明らかにされており、細胞内シグナル伝達制御において重要な役割を担う分子であり、また細胞の伸長や運動、接着の制御にも関与していることが知られている[26, 72]。このことから CagA による SHP-2 の脱制御が胃上皮細胞の異常な

増殖や運動に関与している可能性が考えられる。本章ではまた、東アジアと欧米諸国の間で CagA 多型の分布に明瞭な違いがあることも示した。世界的にみて *cagA* 陽性 *H. pylori* に起因する疾病に違いがあるのは、この観察された分布の違いが要因の一つであると考えられる。東アジア諸国において胃癌発症率が特に高いのは、より病原性の高い CagA を持つ *H. pylori* がこの地域の中で蔓延しているからであろう。*H. pylori* CagA の多型と胃癌の間の関連性を検討するために、本章では、日本国内において胃癌発症リスクの違う 2 県（福井と沖縄、福井の胃癌死亡率は沖縄の約 2.4 倍）における単離菌の CagA 多型を調査した。福井、沖縄ともに胃癌患者単離株はすべて東アジア型 CagA を持つ菌株であった。加えて沖縄においては、胃粘膜萎縮度が *cagA* 陰性株や欧米型 CagA 陽性株感染患者に比べ、東アジア型 CagA 陽性株感染患者で有意に高値であった。これらの結果より、東アジア型 CagA 陽性株の感染は萎縮性胃炎や胃癌の発症に関与することが示唆された。

第 1 章において、*in vivo* のヒト胃粘膜においても、CagA が *H. pylori* から宿主細胞内に注入され、チロシンリン酸化を受け、さらに SHP-2 と複合体を形成していることを明らかにした[71]。興味深いことに、胃癌患者の胃粘膜において、CagA、チロシンリン酸化 CagA、CagA と複合体形成している SHP-2 は、非癌部では検出されたが腸上皮化生部および癌部では検出されなかった。*H. pylori* 感染によって引き起こされる慢性胃炎はたいてい萎縮性胃炎に進行する。胃発癌のリスクは萎縮性胃炎の程度と範囲によって増大する。著しく腺萎縮が進行したり、腸上皮化生が生じたりすると、そこにはもはや *H. pylori* は定着できない。これが腸上皮化生部および癌部では、CagA、チロシンリン酸化 CagA、CagA と複合体形成している SHP-2 が検出されなかった理由であり、それゆえに、*H. pylori* 感染が胃発癌プロセスの比較的早い段階においてその原因となっていると推測される。CagA による SHP-2 の脱制御が早い時期での細胞の性質変化を引き起こしている可能性が考えられる。本章では、慢性胃炎患者において、炎症の程度や胃炎の活動度が *cagA* 陰性株や欧米型 CagA 陽性株感染患者に比べ、CagA 陽性株感染患者で有意に高値であったことを示した。SHP-2 との親和性がより強い東アジア型 CagA 陽性株によって引き起こされる、持続的で活発な炎症が、萎縮性胃炎や胃癌へ進行させる一因になっている可能性が示唆された。

今回さらに、東アジア型 CagA 陽性株感染患者の中でも、福井の慢性胃炎患者の萎縮程度が沖縄に比べ有意に高かった。このことから、環境因子や宿主側因子など他の要因が萎縮の程度に影響を与えていると考えられる。最近では、IL-1 遺伝子群や HLA 遺伝子の多型が胃癌リスクに影響するという報告がなされている[7, 23, 27]。今後 *H. pylori* 感染によって起こる胃癌発症メカニズムをさらに明確にするために、*H. pylori*、宿主、そして環境因子間の相互作用を解析していくことが必要である。

### Table 3-1

福井と沖縄における臨床分離株の*cagA*保有の差違

Location, patient group		<i>cagA</i> (+)	<i>cagA</i> (-)
Fukui	Chronic gastritis	36	0
	Gastric cancer	29	0
-----			
Total		65	0
Okinawa	Chronic gastritis	36	6
	Gastric cancer	8	0
-----			
Total		44	6 #

Chronic gastritis : 慢性胃炎、 Gastric cancer : 胃癌

#:福井と沖縄における*cagA*陽性株の分布には有意に差がみられた ( $P=0.006$ )。



## Table 3-2

福井と沖縄における臨床分離株のCagA多型の分布 (パターン別)

CagA type East Asian / Western	Fukui		Okinawa	
	CG	GC	CG	GC
A-B-B	1	0	0	0
A-D / A-C	0	0	1 / 0	0
A-B-D / A-B-C	28 / 0	23 / 0	26 / 6	8 / 0
A-A-B-D / A-A-B-C	0	2 / 0	0	0
B-A-B-D / B-A-B-C	1 / 0	0	0	0
A-B-B-D / A-B-B-C	1 / 0	1 / 0	1 / 0	0
A-B-A-B-D / A-B-A-B-C	4 / 0	2 / 0	0	0
A-B-D-D / A-B-C-C	0	0	0 / 1	0
A-B-D-B-D / A-B-C-B-C	0	1 / 0	0	0
A-B-D-A-B-D / A-B-C-A-B-C	1 / 0	0	0	0
A-B-D-D-D / A-B-C-C-C	0	0	0 / 1	0

CG: chronic gastritis (慢性胃炎), GC: gastric cancer (胃癌)

### Table 3-3

福井と沖縄における臨床分離株のCagA多型の分布

	Fukui			Okinawa		
	<i>cagA</i> (-)	East Asian	Western	<i>cagA</i> (-)	East Asian	Western
Chronic gastritis	0	35 <sup>a</sup>	0	6	28	8
Gastric cancer	0	29	0	0	8	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>64 <sup>a</sup></b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>36</b>	<b>8 <sup>b</sup></b>

a: 福井の慢性胃炎患者単離菌1株は分類不能であった。

b: 沖縄における欧米型陽性株の比率は福井に対し有意に高かった ( $P=0.001$ )。

## Table 3-4

CagA多型の世界的分布：GenBankデータの解析

Region	Country	CagA type		GenBank accession number
		East Asian	Western	
The West	Ireland	0	3	AF427098-427100
	Austria	0	1	AF043490
	Italy	0	1	AB057094
	England	0	1	AE000569
	USA	0	6	AB057074-057075, AB057095, AB057099, AB057100, AE00143
	Australia	0	3	AF202973, AF247651, AF282853
Latin America	Chile	0	1	AB479032
	Colombia	0	23	AB057076-057093, AB057101-057105
	Costa Rica	0	33	AF289432-289464
East Asia	Japan	52	0	AB057004-057039, AB 015404-015412, AB 017921-017923, AF043487-043490
	Korea	5	0	AB057040-057044
	China	8	0	AB057050-057054, AF249275, AF367250-367251
	Taiwan	5	0	AB057045-057049
Asia	Vietnam	4	0	AB057055-057058
	Thailand	3	2	AB057059-057063
	India	0	3	AF222807-222809

### Table 3-5

#### 慢性胃炎患者における組織学的特徴とCagA多型との相関性

Location, CagA subtype	N	Inflammation		Activity		Atrophy	
		Antrum	Body	Antrum	Body	Antrum	Body
Okinawa							
<i>cagA</i> (-)	6	1 (1.0 ± 0.6)	1 (0.8 ± 0.4)	1 (0.8 ± 0.4)	1 (0.7 ± 0.5)	1 (1.2 ± 0.4)	1 (0.7 ± 0.5)
Western	8	1 (1.0 ± 0.8)	1 (1.0 ± 0.5)	1 (1.0 ± 0.5)	1 (0.9 ± 0.4)	1 (1.5 ± 0.5)	1 (1.1 ± 0.4)
East Asian	28	2 (2.2 ± 0.5) <sup>a</sup>	2 (1.9 ± 0.5) <sup>b</sup>	2 (2.0 ± 0.6) <sup>c</sup>	2 (1.7 ± 0.5) <sup>d</sup>	2 (2.3 ± 0.5) <sup>e</sup>	2 (2.1 ± 0.5)
Fukui							
East Asian	35	3 (2.5 ± 0.6) <sup>g</sup>	2 (2.3 ± 0.6) <sup>h</sup>	2 (2.2 ± 0.7) <sup>i</sup>	2 (2.1 ± 0.5) <sup>j</sup>	3 (2.7 ± 0.5) <sup>k</sup>	3 (2.5 ± 0.5) <sup>l</sup>

Median score (平均値 ± 標準偏差)

- a: *cagA* (-) ( $P=0.002$ ) または 欧米グループ ( $P=0.012$ ) に比べ有意差あり.  
b: *cagA* (-) ( $P=0.0025$ ) または 欧米グループ ( $P=0.008$ ) に比べ有意差あり.  
c: *cagA* (-) ( $P=0.002$ ) または 欧米グループ ( $P=0.0025$ ) に比べ有意差あり.  
d: *cagA* (-) ( $P=0.003$ ) または 欧米グループ ( $P=0.007$ ) に比べ有意差あり.  
e: *cagA* (-) ( $P=0.001$ ) または 欧米グループ ( $P=0.01$ ) に比べ有意差あり.  
f: *cagA* (-) ( $P=0.0003$ ) または 欧米グループ ( $P=0.0004$ ) に比べ有意差あり.  
g: *cagA* (-) ( $P=0.0006$ ) または 欧米グループ ( $P=0.0002$ ) に比べ有意差あり.  
h: *cagA* (-) ( $P=0.0003$ ), 欧米グループ ( $P=0.002$ ), または 沖縄の東アジアグループ ( $P=0.03$ ) に比べ有意差あり.  
i: *cagA* (-) ( $P=0.0003$ ) または 欧米グループ ( $P=0.0003$ ) に比べ有意差あり.  
j: *cagA* (-) ( $P=0.0003$ ), 欧米グループ ( $P=0.0003$ ), または 沖縄の東アジアグループ ( $P=0.03$ ) に比べ有意差あり.  
k: *cagA* (-) ( $P=0.0002$ ), 欧米グループ ( $P=0.0002$ ), または 沖縄の東アジアグループ ( $P=0.003$ ) に比べ有意差あり.  
l: *cagA* (-) ( $P<0.0001$ ), 欧米グループ ( $P<0.0001$ ), または 沖縄の東アジアグループ ( $P=0.006$ ) に比べ有意差あり.

	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>11637 (A-B-C-C-C)</b>	882 NNNNGLEN-- <b>EPIY</b> AKVNKKKTGQVASPE <b>EPIYA</b> QVAKKVNAKIDRLNQA	
	***** * ***** * *	
<b>OK112 (A-B-C)</b>	882 NNNNGLKN-- <b>EPIY</b> AKVNKKKSGQAASPE <b>EPIYA</b> QVAKKVNAKIDRLNQI	
	***** * ***** * *	
<b>F32 (A-B-D)</b>	870 NNNNGLKNNT <b>EPIYA</b> QVNKKKTGQATSPE <b>EPIYA</b> QVAKKVSAKIDQLNEA	

	<b>WSS</b>
	┌──────────────────────────────────┐
	<b>C</b>
<b>11637</b>	930 ASGLGGVGQA-GFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSP <b>EPIYA</b> TIDDLGGP---
	***** * *
<b>OK112</b>	930 ASGLGGVGQAAGFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSP <b>EPIYA</b> TIDDLGGP---
	* * * * *
<b>F32</b>	920 TSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASPE <b>EPIYA</b> TIDFDEANQAG
	<b>D</b>
	└──────────────────────────────────┘
	<b>ESS</b>

	<b>C</b>
<b>11637</b>	976 <u>FPLKRHDKVDDL SKVGRSVSP<b>EPIYA</b>TIDDLGGP---</u>
<b>OK112</b>	-----
<b>F32</b>	-----

	<b>C</b>
<b>11637</b>	1010 <u>FPLKRHDKVDDL SKVGRSVSP<b>EPIYA</b>TIDDLGGP---</u> FPLKRHDKVDDL SKVGLS
	***** * *
<b>OK112</b>	----- FPLKRHDKVDDL SKVGLS
	*** * * * *
<b>F32</b>	----- FPLRRSAAVNDL SKVGLS

## Figure 3-1

*cagA*遺伝子3'領域における、NCTC11637株、OK112株、F32株間のアミノ酸配列の比較

数字はそれぞれの株におけるアミノ酸残基の位置を示す。

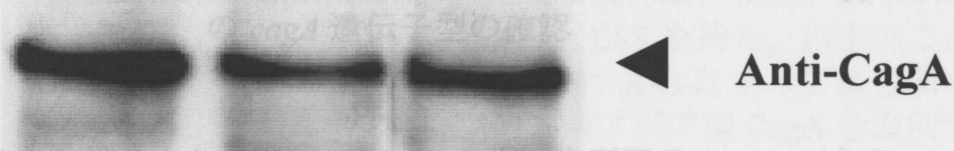
WSSは欧米型CagA特異的配列を、ESSは東アジア型特異的配列を示す。

下線はNCTC11637株のWSS繰り返しを示す。

星印は一致を、ハイフンは塩基が抜けていることを示す。

Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly-sensitive real time PCR as a new diagnostic tool

高感度リアルタイムPCR法を用いての胃生検組織からの *Helicobacter pylori* とその



*cagA* 遺伝子より産生される CagA は *H. pylori* 病原因子の一つであり、*cagA* 遺伝子を保有する *H. pylori* 感染は、萎縮性胃炎や胃癌発症の危険率を著しく高めることが知られている[14, 31, 38, 47, 48, 50]。近年、CagA は *H. pylori* から宿主細胞に注入され、チロシンリン酸化を受け[5, 12, 43, 51]、脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合し、酵素活性を脱制御していることが明らかになった[28]。CagA による SHP-2 の脱制御が、胃上皮細胞の異常な細胞増殖と細胞運動を引き起こすと考えられている。

*H. pylori* には株間で多くの遺伝子多型が確認され、それに起因して各株間の性質が異なることが疾病発症の因子の一つと考えられる。チロシンリン酸化、SHP-2 結合領域のアミノ酸配列は、東アジア型、欧米型間で大きく異なり、SHP-2 結合能も東アジア型の方が欧米型に比べ強いことが明らかになった[29]。CagA の病原因子として宿主細胞の機能を攪乱する能力は、SHP-2 との結合力が一因と考えられ、そのため CagA リン酸化および SHP-2 結合部位の多様性は、異なる *H. pylori* 株感染による臨床の病態を決定づける重要な差違であると考えられる。

ゆえに、東アジア型と欧米型 CagA を識別することは、臨床上の処置、例えば除菌治療などをはかどらせるのに重要だと思われる。そこで本章では、胃生検組織から得た DNA サンプルを用いて、*H. pylori* の検出と *cagA* 遺伝子型を同時に識別するための高感度リアルタイム PCR 法を開発した。さらに、このシステムを用いてタイ患者における CagA 分子多型の分布を調査した。

Figure 3-2

方法

OK112株 (lane 1)、F32株 (lane 2)、F65株 (lane 3) を感染させた AGS 細胞の immunoblot 解析

上 ; anti-CagA 抗体, 中 ; anti-リン酸化チロシン抗体 (anti-p-Tyr), 下 ; anti-SHP-2 抗体。

CagA 多型のタイプはそれぞれ、OK112株が A-B-C タイプ、F32株が A-B-D タイプ、F65株が A-B-B タイプである。

OK112株 (lane 1)、F32株 (lane 2) においては、チロシンリン酸化 CagA とその CagA と免疫共沈する SHP-2 が検出されたが、F65株 (lane 3) においてはそれらは検出されなかった。

F32株の東アジア型 CagA のほうが、OK112株の欧米型 CagA よりも SHP-2 との結合力が強かった。

## 第4章

### Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly-sensitive real time PCR as a new diagnostic tool

高感度リアルタイム PCR 法を用いての胃生検組織からの *Helicobacter pylori* とその *cagA* 遺伝子型の確認

### 序論

*cagA* 遺伝子より産生される CagA は *H. pylori* 病原因子の一つであり、*cagA* 遺伝子を保有する *H. pylori* 感染は、萎縮性胃炎や胃癌発症の危険率を著しく高めることが知られている[14, 31, 38, 47, 48, 50]。近年、CagA は *H. pylori* から宿主細胞に注入され、チロシンリン酸化を受け[5, 12, 43, 51, 53]、さらにチロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合し、酵素活性を脱制御していることが明らかになった[28]。CagA による SHP-2 の脱制御が、胃上皮細胞の異常な細胞増殖と細胞運動を引き起こすと考えられている。

*H. pylori* には株間で多くの遺伝子多型が確認され、それに起因して各株間の性質が異なることが疾病発症の規定因子の一つと考えられる。最近、CagA のリン酸化、SHP-2 結合領域のアミノ酸配列は、東アジア型、欧米型間で大きく異なり、SHP-2 結合能も東アジア型の方が欧米型に比べ強いことが明らかになった[29]。CagA の病原因子として宿主細胞の機能を攪乱する能力は、SHP-2 との結合力が一因と考えられ、そのため CagA リン酸化および SHP-2 結合部位の多様性は、異なる *H. pylori* 株感染による臨床の病態を決定づける重要な差違であると考えられる。

ゆえに、東アジア型と欧米型 CagA を識別することは、臨床上の処置、例えば除菌治療などをはかどらせるのに重要だと思われる。そこで本章では、胃生検組織から得た DNA サンプルを用いて、*H. pylori* の検出と *cagA* 遺伝子型を同時に識別するための高感度リアルタイム PCR 法を開発した。さらに、このシステムを用いてタイ患者における CagA 分子多型の分布を調査した。

### 方法

#### プライマーとプローブの設計

*H. pylori* の 16S rRNA、欧米型-*cagA*、および東アジア型-*cagA* のプライマーとプローブを“Primer Express ver.1.5” (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いて設計した (Table 4-1)。典型的な欧米型 CagA (26695 株) と東アジア型 CagA (F32 株) の EPIYA モチーフ繰り返し領域におけるアミノ酸配列の比較を Figure 4-1 に示す。EPIYA-A、B サイト近傍では非常に高い相同性を示す一方、EPIYA-C、D サイト近傍では相同性が低下する。以前、共同研究者の東らの報告により、これらの EPIYA モチーフのうちリン酸化を受け SHP-2 複合体形成に関与するチロシン残基は、欧米型 CagA では EPIYA-C サイトであり、東アジア型 CagA では EPIYA-D サイトであることが明らかになった[29]。EPIYA-A と EPIYA-B サイトは欧米型および東アジア型ほとんど全ての CagA に存在する。一方欧米型 CagA においては、EPIYA-C サイトを含む 34 アミノ酸か

らなるセグメントが高頻度に欠失、重複を認めるために、EPIYA-C サイトは 0 ~3 カ所とバリエーションが生じる。このサイト C を含む 34 アミノ酸からなるセグメントを、“Western CagA-specific, SHP-2-binding sequence” (WSS) と呼ぶ [29]。一方、東アジア型 CagA は WSS を持たず、WSS に相当する、EPIYA-D サイトを含む“East Asian CagA-specific, SHP-2-binding sequence” (ESS) を持つ [29]。26695 株と F32 株の CagA はそれぞれ一つの WSS、ESS を持ち、以上のことより 26695 株 CagA は A-B-C タイプに、F32 株 CagA は A-B-D タイプに分類される (Figure 4-1)。ゆえに、PCR によって欧米型、東アジア型 CagA を識別するため、プライマーとプローブは WSS、ESS 内でそれぞれ設計した。

## 対象

タイの Chiang Mai 大学にて上部消化管内視鏡を受けた *H. pylori* 陽性患者 41 名の胃体部生検を用いた。患者内訳は、慢性胃炎患者 24 名 (男性 13 名、女性 11 名、平均年齢 52.5 歳)、胃潰瘍患者 4 名 (男性 4 名、平均年齢 66.5 歳)、十二指腸潰瘍患者 5 名 (男性 4 名、女性 1 名、平均年齢 52.6 歳)、胃癌患者 8 名 (男性 6 名、女性 2 名、平均年齢 57.2 歳) であった。*H. pylori* 感染診断は、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色、トロイジン-ブルー染色、そして *H. pylori* 特異的抗体を用いての免疫染色にて行った [40]。対照として 4 名の *H. pylori* 陰性患者の胃体部より生検組織を採取した。この 4 名の *H. pylori* 陰性患者は 2 年以上前に除菌治療を受けており、経過観察中の少なくとも 2 回以上の組織学検査と尿素呼気試験にて除菌成功の診断がなされた。

組織からの DNA 抽出には GeneRelease™ kit (Bioventures Inc., Murfreesboro, TN, USA) を用い、4°C で保存した。これらのサンプルはほとんど全てが宿主であるヒト DNA であるが、もし *H. pylori* が存在していれば *H. pylori* DNA もわずかながら含まれているはずである。

## *H. pylori* 培養および DNA 抽出

凍結保存した菌株を TSA-II/5% sheep blood plate に塗布し、微好気性条件下 (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)、37°C、2~3 日間培養した。コロニーを採取して 10% FCS を含む brucella broth liquid culture medium に植菌し、同条件下で 24 時間振盪培養した。菌液の一部を 20% glycerol を含む 0.01M PBS に懸濁させ -80°C で保存した。残りの菌液より遠心にてペレットを回収し、protease/phenol-chloroform 法により DNA を抽出し、TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) に溶解させ 4°C で保存した。

## リアルタイム PCR

本章では“ABI PRISM 7700 Sequence Detection System” (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応液は、“TaqMan Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystems) 25 μL、200-800nM のそれぞれのプライマー、400-600nM のプローブ、DNA サンプルまたは標準として約 10 倍希釈シリーズ *H. pylori* DNA (0.1fg ~ 10<sup>6</sup> fg) 5 μL、そして蒸留水を含む最終量 50 μL に調製し、0.2mL MicroAmp optical tubes (Applied Biosystems) に分注した。PCR 条件は、95°C で 10 分加熱後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 50 サイクルとした。いくつかの PCR 産物は 3% agarose gel で電気泳動し、エチジウムブルマイドで染色した。

加えて、いくつかの PCR 産物は引き続き Centricon-100 Concentrator columns



(Amicon, Beverly, Massachusetts, USA) で精製し、BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて DNA direct sequencing PCR をかけ、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンス解析した。さらに GENETYX-Mac software (version 11.2.3, Software Development) を用いて塩基配列の比較解析を行った。

## 結果

### システムの確認

このシステムで、胃生検組織からの DNA より *H. pylori* 16S rRNA 遺伝子、欧米型そして東アジア型 *cagA* 遺伝子が検出できた。典型的な欧米型 *cagA* (Thailand-080, 104) と東アジア型 *cagA* (Thailand-100, 116) サンプルの結果を Figure 4-2 に示す。16S rRNA はすべての *H. pylori* 陽性サンプルにおいて増幅されたが、欧米型または東アジア型 *cagA* はそれぞれの特異的 PCR セットでのみ増幅された (Figure 4-2、上図)。この PCR 産物を agarose gel 電気泳動にかけたところ、バンドは確認できるものの感度においてはリアルタイム PCR システムの方がより高度だと考えられた (Figure 4-2、下図)。

さらに、欧米型と東アジア型 *cagA* の PCR 産物の塩基配列を調べたところ、東アジア型株間 (F32, Thailand-038, 055) では 92 bp の配列は完全に一致していた。また欧米型株間 (26695, Thailand-063, 080) では Thailand-063 の G が A へ置換している 1 bp を除いては、92 bp の配列は高い相同性を示した (Figure 4-3)。

### タイ患者の CagA 多型の分布

今回検討したすべての *H. pylori* 陽性患者より *H. pylori* 16S rRNA が検出され (Table 4-2)、一方 *H. pylori* 陰性患者は 4 例すべてで不検出だったので、*H. pylori* 感染について感度と特異性は 100% であった。CagA 多型について、53.7% (22/41) が東アジア型 CagA 陽性であり、26.8% (11/41) が欧米型 CagA 陽性であった。さらに欧米型、東アジア型両方のプライマーセットに反応するために (欧米型、東アジア型どちらか一方が強反応ではあるものの)、どちらにも分類できないものが 3 例 (7.3%) (Thailand-019, 053, 112) あった。これらのケースは複合感染であると考えられた (Figure 4-2)。さらに今回の検討では 5 例 (Thailand-070, 075, 102, 122, 125) (12.2%) において CagA が検出できなかった (Figure 4-2)。*H. pylori* 16S rRNA は検出されたので、これらのケースは、*cagA* 陰性または ESS も WSS も有しない A-B タイプの CagA を持つ菌に感染していると考えられた (Table 4-2)。

## 考察

日本や韓国などの東アジアは、欧米に比べ胃癌の発症率が非常に高いといわれている。*H. pylori* の分布には地理的に明確に区別できる特徴があり [18, 24]、東アジア株と欧米株との間には、*cagA* 遺伝子配列に大きな違いが見られることが報告されている [1, 29]。第 3 章では、*H. pylori* 陽性胃炎患者において、東アジア型 CagA 陽性株感染患者の炎症や萎縮の程度が、*cagA* 陰性株や欧米型 CagA 陽性株感染患者に比べ有意に重度であることを明らかにした [9]。さらに、ヒト胃上皮 AGS 細胞へ *cagA* 遺伝子導入し、CagA を胃上皮細胞に異所性発現させる

と、東アジア型 CagA の SHP-2 結合親和性は欧米型 CagA に比べ強いことが報告されている[29]。これらのことより、東アジア型 CagA 陽性株は欧米型 CagA 陽性株に比較してより強力な病原性を持つと考えられる。ゆえに、特に東アジア株、欧米株が混在するような地域において、東アジア型と欧米型 CagA を識別することは、臨床上の処置を迅速に進めるためには重要だと思われる。そこで本章では、胃生検組織の DNA サンプルを用いて、*H. pylori* の検出と *cagA* 遺伝子型を同時に迅速に識別するための高感度リアルタイム PCR 法の開発を試みた。

TaqMan 蛍光を用いたリアルタイム PCR 法は、一般的な PCR 法に比べ大変簡便な方法である。これらのプライマーセットを用いて、PCR 産物を agarose gel 電気泳動法により結果を観察することもできるが、リアルタイム PCR 法の方がより高感度であると考えられる。本検討ではまた、いくつかのパラフィン包埋組織、胃液、大便から抽出した DNA サンプルにおいても、*H. pylori* 16S rRNA と欧米型、東アジア型 *cagA* 遺伝子を検出することができた（データ未掲載）。これらのサンプルはほとんど全てが宿主であるヒト DNA であるが、もし *H. pylori* が存在していれば *H. pylori* DNA もわずかながら含まれているためである。このシステムでは宿主組織から DNA を抽出するので、*H. pylori* 培養施設がなくても *cagA* 遺伝子のタイピングが可能である。さらには *H. pylori* 感染の病態の多様性には、IL-1 遺伝子群や HLA 遺伝子の多型性などのような宿主の免疫遺伝学的違いも関与していると指摘されており[7, 23, 44]、宿主 DNA より同時にこの宿主側免疫反応因子も調べることができる。

本章ではタイ患者の胃生検組織における CagA 多型分布を調べ、東アジア型 CagA と欧米型 CagA の比率はそれぞれ 53.7%と 26.8%であった。この結果は、日本の福井（100%, 65/65）や中国の杭州（94.4%, 17/18）からの分離株の 90%以上が東アジア型 CagA を保有するという、第 2 章での東アジアにおける結果と大きく異なり[9, 73]、タイでは東アジア型、欧米型 *H. pylori* が混在していた。また 3 例（7.3%）において、欧米型、東アジア型両方のプライマーセットに反応するために（欧米型、東アジア型どちらか一方が強反応ではあるものの）、どちらにも分類できず、これらのケースは複合感染であると考えられた。さらに 5 例（12.2%）において、*H. pylori* 16S rRNA は検出されたものの、CagA が検出できず、これらのケースは *cagA* 陰性または ESS も WSS も有しない A-B タイプの CagA を保有する菌に感染していると考えられた。最終的に、今回の検討では約 80%の *cagA* をタイピングできた。東アジア型 *H. pylori* 感染には病態によってばらつきが見られたが（慢性胃炎－54.2%、胃癌－62.5%、胃潰瘍－100%、十二指腸潰瘍－60.0%）、有意差は認められなかった。

これらの結果より、このリアルタイム PCR システムは胃生検組織において *H. pylori* の CagA 多型を高感度に評価でき、簡便な診断手段として有用であると考えられる。今後地理的かつ臨床医学的な CagA 多型の意味をより解明するために、このシステムを用いてさらに大規模な調査が望まれる。

## Table 4-1

ピロリ菌16S rRNAおよび欧米型、東アジア型*cagA*のプライマーとプローブの配列

Gene and oligonucleotide	Sequence	Corresponding DNA sequence
<b>16S rRNA</b>		
Forward primer	5'-TGC GAA GTG GAG CCA ATC TT-3'	1381-1400 <sup>a</sup>
Reverse primer	5'-GGA ACG TAT TCA CCG CAA CA-3'	1499-1480 <sup>a</sup>
Probe	5'-(FAM) CCT CTC AGT TCG GAT TGT AGG CTG CAA C (TAMRA)-3'	1408-1435 <sup>a</sup>
<b><i>cagA</i> -Western</b>		
Forward primer	5'-AGG CAT GAT AAA GTT GAT GAT-3'	2854-2874 <sup>b</sup>
Reverse primer	5'-AAA GGT CCG CCG AGA TCA T-3'	2945-2927 <sup>b</sup>
<b><i>cagA</i> -East Asian</b>		
Forward primer	5'-AAA GGA GTG GGC GGT TTC A-3'	2812-2830 <sup>c</sup>
Reverse primer	5'-CCT GCT TGA TTT GCC TCA TCA-3'	2903-2883 <sup>c</sup>
<i>cagA</i> -common probe	5'-(FAM) TCA GCT AGC CCT GAA CCC ATT TAC GCT AC (TAMRA)-3'	2893-2921 <sup>b</sup> 2845-2872 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Nucleotide positions in the 16S rRNA gene of *H. pylori* 85D08 (GenBank accession no. U00679).

<sup>b</sup> Nucleotide positions in the *cagA* gene of *H. pylori* 26695 (GenBank accession no. AE000569).

<sup>c</sup> Nucleotide positions in the *cagA* gene of *H. pylori* F32 (GenBank accession no. AF202972).

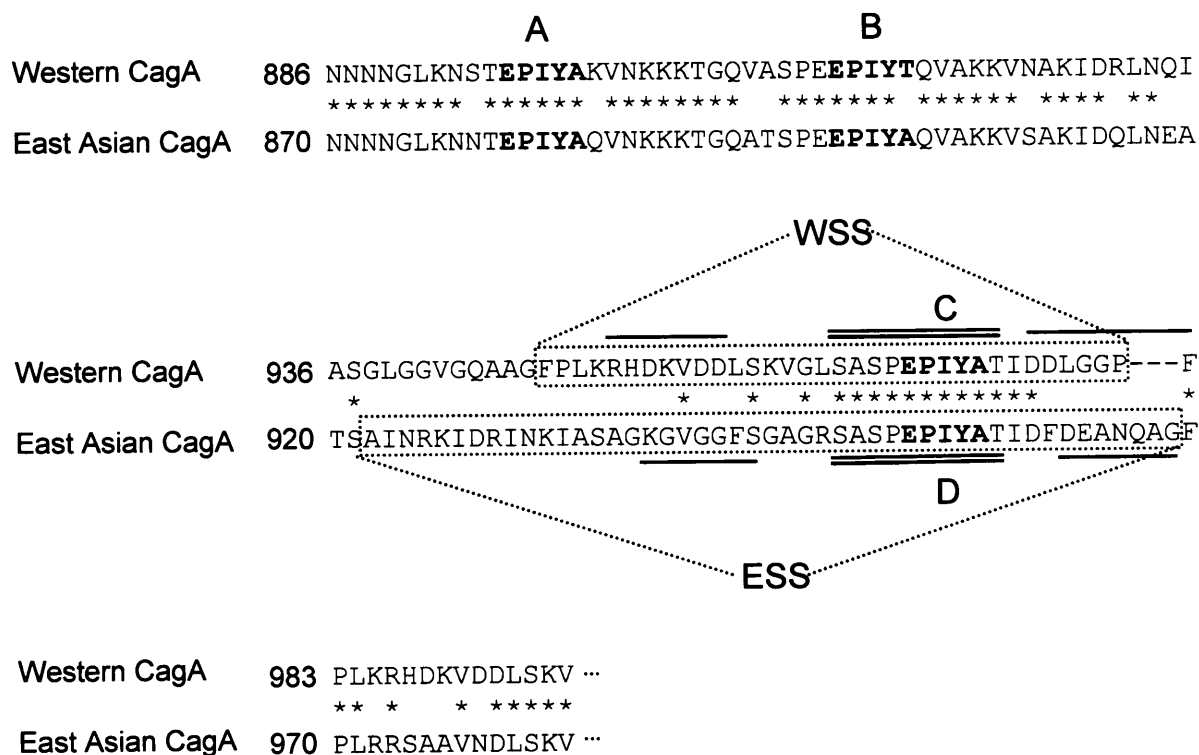
Table 4-2

タイ患者胃生検組織における欧米型、東アジア型*cagA*の識別

Sample	age	sex	diagnosis	16s rRNA	<i>cagA</i>		Decision HP(+)
					Western	East Asian	
006	77	M	CG	+++	-	+++	East Asian
011	38	M	CG	+++	-	+	East Asian
013	45	F	CG	+++	-	++	East Asian
019	28	F	CG	+++	++	+++	East Asian / Western
026	44	F	CG	+++	-	+++	East Asian
029	57	M	CG	+++	-	+++	East Asian
033	25	M	CG	+	-	+	East Asian
034	78	M	CG	+	-	++	East Asian
037	27	F	CG	+++	+++	-	Western
038	63	M	GU	+++	-	+++	East Asian
040	41	M	CG	++	-	++	East Asian
045	80	M	GU	+++	-	+++	East Asian
051	58	M	GU	+++	-	+++	East Asian
053	65	M	GU	+++	+++	+	Western / East Asian
055	45	F	GCA	+++	-	+++	East Asian
057	45	M	GCA	+++	-	+++	East Asian
059	70	M	GCA	+++	+++	-	Western
061	55	M	GCA	+++	-	++	East Asian
063	40	M	GCA	+++	+++	-	Western
067	60	M	GCA	++	-	+	East Asian
068	78	F	GCA	+++	-	+	East Asian
070	66	M	GCA	+++	-	-	<i>cagA(-)</i> / AB type
075	70	M	CG	+++	-	-	<i>cagA(-)</i> / AB type
076	50	F	CG	+++	++	-	Western
078	37	M	CG	++	-	+	East Asian
080	44	F	CG	+++	+++	-	Western
082	64	F	CG	+	++	-	Western
084	29	M	CG	+++	-	+	East Asian
088	73	F	CG	+++	+++	-	Western
092	59	M	CG	+++	-	++	East Asian
094	41	M	CG	+++	+++	-	Western
096	33	F	CG	+++	+	-	Western
098	43	F	CG	+++	++	-	Western
100	63	F	CG	+++	-	+++	East Asian
102	22	M	CG	+	-	-	<i>cagA(-)</i> / AB type
104	34	M	CG	+++	+++	-	Western
112	59	M	DU	+++	+++	++	Western / East Asian
116	35	F	DU	+++	-	+++	East Asian
120	76	M	DU	+++	-	+++	East Asian
122	32	M	DU	+	-	-	<i>cagA(-)</i> / AB type
125	61	M	DU	++	-	-	<i>cagA(-)</i> / AB type

CG: 慢性胃炎, GU: 胃潰瘍, GCA: 胃癌, DU: 十二指腸潰瘍

100 fg < "+++", 10 fg < "++" < 100 fg 1 fg < "+" < 10 fg "-" < 1 fg



**Figure 4-1**

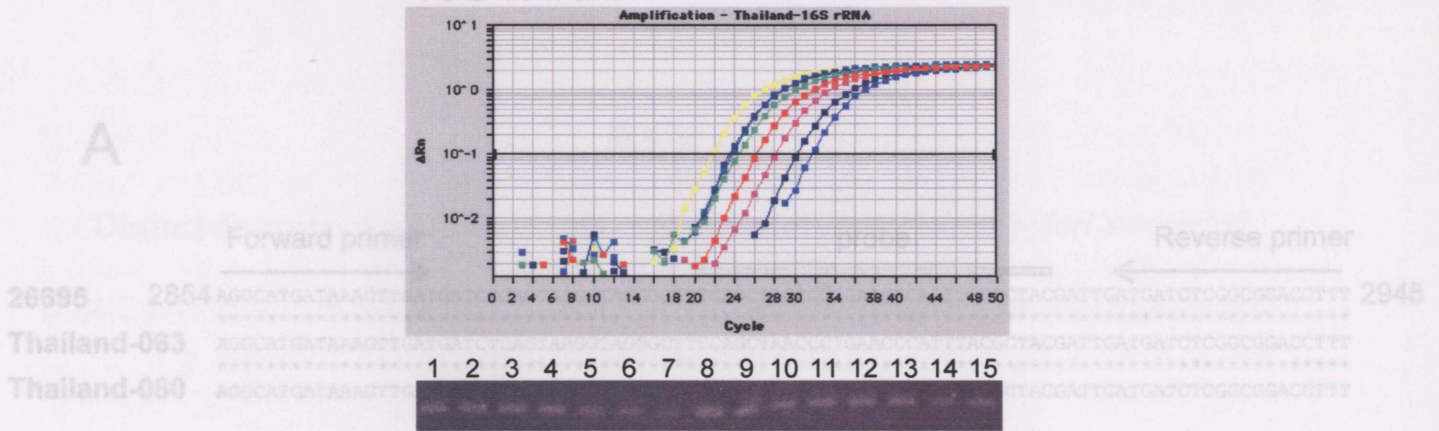
**欧米型、東アジア型CagAタンパク質の分子構造の比較**

欧米型CagA（26695株）と東アジア型CagA（F32株）のEPIYAモチーフ繰り返し領域におけるアミノ酸配列を比較した。

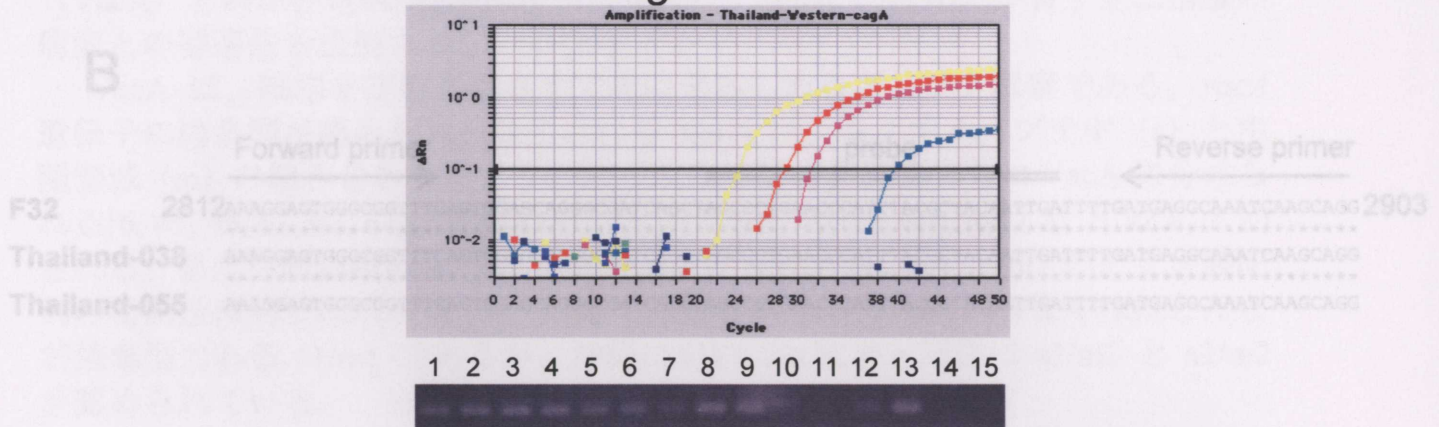
図中の一重線はそれぞれforwardとreverseプライマーの位置を、二重線はプロンプの位置を示す。

星印は一致を、ハイフンは塩基が抜けていることを示す。

## 16S rRNA



## Western-cagA



## East Asian-cagA

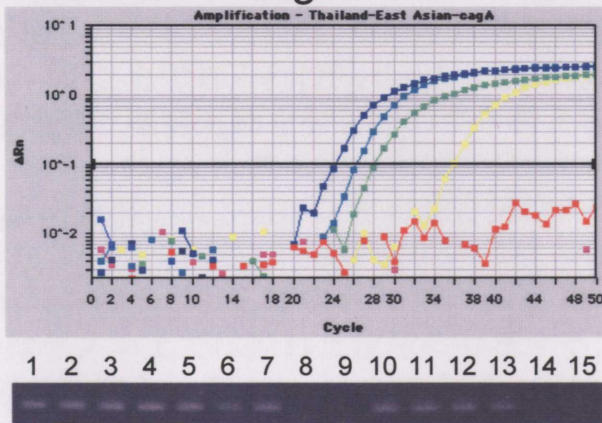


Figure 4-3

Figure 4-2

16S rRNA、欧米型*cagA*、東アジア型*cagA*の増幅曲線と agarose gel 電気泳動図の代表例

Thailand-080 (赤, lane 8) と 104 (ピンク, lane 9)が典型的な欧米型*cagA*、Thailand-100 (緑, lane 10) と 116 (青, lane 11)が典型的な東アジア型*cagA*のサンプルである。

また、Thailand-019 (深緑, lane 12) と 112 (黄, lane 13)は欧米型、東アジア型 PCRセット共に反応が見られた、混合感染例である。

Thailand-070 (薄青, lane 14) と 075 (深青, lane 15)は欧米型、東アジア型 PCRセット共に反応が見られなかった、*cagA*陰性またはAB型CagA例である。

Lanes 1-7は、標準希釈シリーズ( $10^6 \sim 1$  fg)である。

A



B

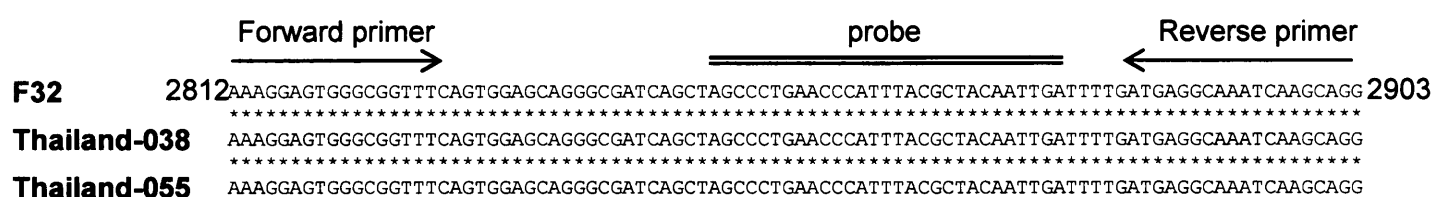


Figure 4-3

*cagA* 遺伝子の3'領域における塩基配列の比較

- (A) 26695株、Thailand-063株、Thailand-080株間の欧米型*cagA*配列。  
26695 *cagA* (GenBank accession number: AE000569)の読み枠2,854bpの位置から92bpを示す。
- (B) F32株、Thailand-038株、Thailand-055株間の東アジア型*cagA*配列。  
F32 *cagA* (GenBank accession number : AF202972)の読み枠2,812bpの位置から92bpを示す。

星印は一致を示す。

## 第5章

### Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan

日本における消化性潰瘍に関与している *Helicobacter pylori* の *vacA*、*cagA*、*cagE* 遺伝子の明確な多型性

### 序論

*H. pylori* には複数の病原因子が存在し[17, 19, 21, 30, 56]、特に空胞化毒素 (VacA) と病原性遺伝子群 (*cag* pathogenicity island; *cagPAI*) が胃・十二指腸の病変との関連性を指摘されている[15]。

VacA は、細胞を空胞変成させて死に至らしめるタンパク毒素である。*vacA* 遺伝子には多型が認められ、産生される VacA は、シグナルペプチド (s) と中間領域 (m) の組み合わせによりいくつかのモザイク構造をもつ VacA に分けられる[6, 41, 45, 61, 62, 66]。すなわち、シグナルペプチドの配列は s1 と s2 に大別される。また中間領域の配列は、m1 と m2 に大別され、m1 と m2 のアミノ酸配列の相同性は約 55% である[6]。日本で分類される *H. pylori* の VacA はほとんどが強毒型である s1/m1 であるが、沖縄においては欧米と同様に s1/m2 と s2/m2 が認められている。

*cagA* 遺伝子より産生される CagA は免疫原性の高いタンパク質である。近年、CagA は *H. pylori* 菌体内から宿主細胞内に注入され、チロシンリン酸化を受け[5, 12, 43, 51, 53]、さらにチロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合し、その酵素活性を脱制御していることが明らかになった[28]。SHP-2 は細胞増殖のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることで知られ[25]、CagA による SHP-2 の脱制御が、胃上皮細胞の異常な細胞増殖と細胞運動を引き起こすと考えられている。SHP-2 との結合部位配列の違いから、CagA は欧米型と東アジア型に分類され、東アジア型 CagA は欧米型 CagA と比較して、SHP-2 との結合活性がより強いことが示されている[29]。さらには、アジア分離株の *cagA* 遺伝子は他の欧米国分離株 *cagA* 遺伝子と大きく異なる配列を持つことも報告されている[1, 70]。

*vacA* と *cagA* 遺伝子はゲノム上では離れた位置に存在する[3, 58]にも関わらず、地理的な分布に相関が観察される[63]。ゆえに今回、病態に関して *vacA* と *cagPAI* 間の分子遺伝学的な関与を検討するため、日本分離株からさまざまな *vacA* 遺伝子型の株を選び、*vacA*、*cagA* そして *cagE* 遺伝子の全配列を決定した。*cagE* は、*cagPAI* 内で *cagA* と隣接する遺伝子であり、CagE タンパク質は IV 型分泌装置の構成成分の一つである[18]。さらに、全長の VacA、CagA、CagE アミノ酸配列間の系統樹解析を行った。

### 方法

#### *H. pylori* 株

日本の 2 つの異なる地域、福井と沖縄から分離された株を用いた。福井は本州の中央部に位置し、一方沖縄は日本の南西端に位置する島々であり、2 県の間は 1,300km 以上離れている。この 2 県間では、*H. pylori* 感染による病態に大きな



違いが見られる。胃癌の前段階である萎縮性胃炎の罹患率は福井の方が高く、胃癌による死亡率も沖縄の約 2.4 倍で福井の方が高い。一方、十二指腸潰瘍の罹患率は沖縄の方が高く、胃・十二指腸潰瘍の発症率は福井の約 1.8 倍で沖縄の方が高い。計 220 株（福井分離株 115 株、沖縄分離株 105 株）の臨床分離株を、福井大学医学部第 2 内科または沖縄中部病院にて上部消化管内視鏡施術時に採取した胃生検組織より単離した。福井の 115 患者のうち、慢性胃炎患者が 41 例（男性 22 名、女性 19 名、平均年齢 57.7 歳）、胃癌患者が 26 例（男性 14 名、女性 12 名、平均年齢 60.2 歳）、十二指腸潰瘍患者が 26 例（男性 17 名、女性 9 名、平均年齢 49.9 歳）、胃潰瘍患者が 18 例（男性 10 名、女性 8 名、平均年齢 55.3 歳）、胃・十二指腸潰瘍患者が 4 例（男性 4 名、平均年齢 58.5 歳）であった。沖縄の 105 患者のうち、慢性胃炎患者が 58 例（男性 20 名、女性 38 名、平均年齢 59.6 歳）、胃癌患者が 4 例（男性 3 名、女性 1 名、平均年齢 70.3 歳）、十二指腸潰瘍患者が 24 例（男性 20 名、女性 4 名、平均年齢 53.8 歳）、胃潰瘍患者が 18 例（男性 11 名、女性 7 名、平均年齢 59.2 歳）、胃・十二指腸潰瘍患者が 1 例（男性、年齢 40 歳）であった。

#### ***H. pylori* 培養**

各患者の生検組織を TSA-II/5% sheep blood plate に塗布し、微好気性条件下（5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>）、37°C、3~5 日間培養した。第 1 培養プレートより単コロニーを採取し、新しい TSA-II plate に継代し同条件下で培養した。*H. pylori* 判定はウレアーゼ活性により行い、いくつかのコロニーを採取して 10% FCS を含む brucella broth liquid culture medium に植菌し、同条件下で 24 時間振盪培養した。菌液の一部を 20% glycerol を含む 0.01M PBS に懸濁させ -80°C で保存した。残りの菌液より遠心にてペレットを回収し、protease/phenol-chloroform 法により DNA を抽出し、TE buffer（10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA）に溶解させ PCR 増幅まで 4°C で保存した。

#### ***vacA* タイピング**

PCR を用いた *vacA* 遺伝子の s-region（シグナルペプチドをコードする領域）と m-region（中間領域）のタイピングは Table 5-1 に示すそれぞれのサブタイプ特異的なプライマーペアを用いて、以前の報告に準じて行った[6, 34, 61]。PCR 条件は、95°C で 5 分加熱後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 25 サイクル、その後 72°C で 7 分おいた後、4°C で保存した。PCR 産物は 2% agarose gel 電気泳動にかけて分離した。

#### **全長の *vacA*、*cagA*、*cagE* 遺伝子の配列決定**

計 33 株（福井分離株 13 株、沖縄分離株 20 株）を *vacA* ゲノタイプによって選んだ。福井の 13 患者のうち、慢性胃炎患者が 10 例、十二指腸潰瘍患者、胃潰瘍患者、胃癌患者がそれぞれ 1 例ずつであった。沖縄の 20 患者のうち、慢性胃炎患者が 12 例、十二指腸潰瘍患者が 8 例であった。このうち 11 株（F16, F17, F28, F32, F79, F80, OK101, OK107, OK109, OK112, OK129）は以前の報告ですでに *cagPAI* の全配列を決定済みである[11]。*vacA*、*cagA*、*cagE* 遺伝子の全配列を決定するために使用した PCR プライマーを Table 5-2 に示す。全長 *vacA* を増幅させる PCR 条件は、95°C で 5 分加熱後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 4.5 分を 25 サイクル、その後 72°C で 7 分おいた後、4°C で保存した。また全長

*cagA* および *cagE* を増幅させる場合も同様の条件だが、伸長ステップ (72°C で 4.5 分) の時間をそれぞれ 4 分と 3.5 分に変更した。PCR 産物は引き続き Centricon-100 Concentrator columns (Amicon, Beverly, Massachusetts, USA) で精製し、BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いて DNA direct sequencing PCR をかけ、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンス解析した。全長塩基配列から全長アミノ酸配列に翻訳し、GENETYX-Mac software (version 11.2.3, Software Development) を用いてアミノ酸配列の比較解析を行った。

#### 系統樹解析

日本分離株と以前より報告されている欧米株との系統進化的関係を明らかにするために、*VacA*、*CagA*、*CagE* アミノ酸配列の比較解析さらに、unweighted pair group 法による系統樹解析を試みた (GENETYX-Mac)。すでに報告されている欧米株 26695 株 (Genbank accession number: AE000598; *vacA* [HP0887], AE000569; *cagA* [HP0547], AE000568; *cagE* [HP0544])、J99 株 (AE001511; *vacA* [jhp0819], AE001483; *cagA* [jhp0495], AE001482; *cagE* [jhp0492])、NCTC11638 株 (HPU07145; *vacA*, AF282853; *cagA*, *cagE*)、そして NCTC11637 株 (AF049653; *vacA*, AF202973; *cagA*) もこの解析に含んだ。

#### 統計処理

*cagA*、*vacA* 多型と病態との相関関係は、chi-square test および Fisher's exact probability test により統計解析した。

#### 塩基配列の GenBank accession numbers

今回決定した *cagA*、*cagE*、そして *vacA* 塩基配列は、GenBank データベースに登録した (Table 5-3)。

## 結果

#### *vacA* 多型

*vacA* ゲノタイプの一覧を Table 5-4 に示す。第 2 章において、日本分離株に特徴的な *vacA* ゲノタイプは s1c/m1b であることを明らかにした [73]。福井においては 81.7% が s1c/m1b であり、一方沖縄では、最も多いのは福井同様 s1c/m1b (71.4%) であったが、さまざまなタイプの *vacA* ゲノタイプが観察された (Table 5-5)。今回この計 220 株 (福井 115 株、沖縄 105 株) のうち、*vacA* ゲノタイプによって 33 株の *H. pylori* を選んだが、s1b/m2 と s1c/m1a は存在しなかった (Table 5-5)。

*vacA* 遺伝子は 3,867 ~ 3,981-bp、*VacA* アミノ酸は 1,289 ~ 1,327 残基とサイズにバリエーションが観察された。シグナル配列領域の相同性を、F37 (s1a)、F80 (s1b)、F32 (s1c)、OK155 (s2) 間で調べ (Figure 5-1a、Table 5-6 の右上エリアの数値)、さらに中間領域の相同性を、F37 (m1a)、F32 (m1b)、OK155 (m2) 間で調べた (Figure 5-1b、Table 5-6 の左下エリアの数値)。加えて、全長のアミノ酸配列と塩基配列の相同性を F37、F80、F32、OK155 間で調べた (Table 5-7)。さらに、Atherton らの報告によると [6]、60190 (m1) 株と Tx30a (m2) 株間の *VacA* 中間領域を比較したところ、59.0% しか相同性がなかったという (60190 株; 244 アミノ酸残基、509-752 番目領域、Tx30a 株; 253 ア

ミノ酸残基、522-774 番目領域)。ゆえに F32 (m1b) と OK210 (m2) の VacA 中間領域を比較したところ (F32; 244 アミノ酸残基、512-755 番目領域、OK210; 253 アミノ酸残基、533-785 番目領域)、58.9%の相同性であった (Figure 5-2)。また F32 (m1b) と F37 (m1a; 244 アミノ酸残基、517-760 番目領域) の相同性は 85.3%であった。

### CagA 多型

典型的な欧米型 CagA (26695 株) と東アジア型 CagA (F32 株) の繰り返し領域 (*cagA* 遺伝子の 3'領域に当たる) におけるアミノ酸配列の比較を Figure 5-3 に示す。以前より CagA は欧米型と東アジア型に分類されることが報告されている [9, 29]。CagA のチロシンリン酸化部位は、CagA 分子の C 末側に複数出現する EPIYA モチーフ内に存在し [13, 28, 54]、これらの EPIYA モチーフのうちリン酸化を受け SHP-2 複合体形成に参与するチロシン残基は、欧米型 CagA では EPIYA-C サイトであり、東アジア型 CagA では EPIYA-D サイトである [29]。EPIYA-A と EPIYA-B サイトは欧米型および東アジア型ほとんど全ての CagA に存在し周辺配列の相同性も高い。一方その後の EPIYA-C、D サイト周辺領域は、欧米型と東アジア型間で相同性が非常に低下し、欧米型 CagA は WSS (Western CagA-specific, SHP-2-binding sequence)、東アジア型 CagA で ESS (East Asian CagA-specific, SHP-2-binding sequence) と呼ばれる [29]。26695 株と F32 株の CagA はそれぞれ一つの WSS、ESS を持ち、26695 株 CagA は A-B'-C タイプに、F32 株 CagA は A-B-D タイプに分類される。

上記のタイピングにより決定した CagA ゲノタイプを Table 5-4 (EPIYA type) に示す。“B'”は、EPIYT-Bつまり A (アラニン) が T (スレオニン) に置換したもの、“B''”は、ESIYA-Bつまり P (プロリン) が S (セリン) に置換したもの、“B'''”は、ESIYT-Bつまり P および A が S および T に置換したもの、そして“A'”は、NPIYA-Aつまり E (グルタミン酸) が N (アスパラギン) に置換したものを意味する。EPIYA モチーフの数は株によってさまざまだが、ほとんど全ての株が欧米型 (12 株) と東アジア型 (20 株) に分類された。ただ OK181 株のみ、WSS も ESS も持たない“A-B'”タイプで、分類不可であった。今回の検討では、B' が NCTC11637 株、NCTC11638 株、OK155 株、OK160 株以外のすべての欧米型 CagA において観察されたので、欧米型に特徴的であると考えられる。OK155 株と OK160 株 CagA は B' ではなく B''' であった。B'' は東アジア型 CagA の 4 株 (F26, F55, OK159, OK204) において、A' は F37 株のみで観察された。*cagA* 遺伝子は 3,444 ~ 3,825-bp、CagA アミノ酸は 1,148 ~ 1,275 残基とサイズにバリエーションが観察された。欧米型 OK130 株と東アジア型 F32 株の CagA 全アミノ酸配列の相同性は 80.3%、また Figure 5-3 に示した CagA 繰り返し領域における相同性は 53.0% であった (OK130; 109 アミノ酸、884-992 番目残基、F32; 114 アミノ酸、870-983 番目残基)。

F80 株と OK204 株は欧米・東アジア混合型 CagA を持つ株であった (Figure 5-4)。欧米型 CagA の他の特徴として、CagA 繰り返し領域の上流にある 13 アミノ酸の挿入がある (26695 株、823-835 番目残基)。F80 株、OK204 株ともにこの挿入があるが、ともに ESS を持つ (F80 株は A-B'-D-D タイプ、OK204 株は A-B'''-D タイプ)。OK204 株は完全な ESS を持つが、F80 株の ESS は EPIYA-D

サイトの前半は WSS の配列で、後半が ESS の配列になっている。このことから、F80 株 CagA は OK204 株 CagA に比べ、より欧米型に近いことが推測される。

### **cagE 多型**

*cagE* 遺伝子は株間で良く保存されていた。F36 株を除く全ての株において、*cagE* 遺伝子は 2,949-bp、CagE アミノ酸は 983 残基であり、これはすでに報告されている 26695 株、J99 株、NCTC 11637 株と同様であった。F36 株は、最初の 2 アミノ酸が欠失しているために、*cagE* 遺伝子は 2,943-bp、CagE アミノ酸は 981 残基であり、これは以前報告されている NCTC 11638 株と同様であった。各株間の全アミノ酸配列の相同性はいずれも 98%以上であった (Table 5-4)。

### **VacA、CagA、CagE アミノ酸配列の系統樹解析**

33 株の臨床分離株とすでに報告されている欧米株 4 株 (26695, J99, NCTC11638, NCTC11637) 間の VacA、CagA、CagE の系統樹を Figure 5-5 に示す。3 つのタンパク質は全て欧米型、東アジア型の 2 つの大きなグループに分類された (Table 5-4)。いくつかの例外を除いて、それぞれのタンパク質間において分離株の分布はおおよそ一致していた。

CagA において、OK181 は A-B'型であったが、欧米グループに含まれた。F80 株と OK204 株は ESS を持つにも関わらず、欧米グループに含まれた (Figure 5-4)。これらの株の VacA と CagE もともに欧米グループに属しているため、これらの株は東アジア由来というよりも欧米由来の株なのであろう。他の株においては、EPIYA タイプと、系統樹での分布は一致した。

VacA において、系統樹は m1 と m2 サブタイプで明確に 2 分された。すべての m2 株は欧米グループに含まれた。さらに m1 クラスターにおいて、m1a と m1b で明らかに区別され、m1a は全て欧米グループに、m1b は全て東アジアグループに含まれた。またさらに、m1a および m1b クラスターにおいて、s1a または s1c と s1b クラスターに分けられ、s1a と s1c サブタイプは区別されなかった。F37 株と OK129 株は、CagA タイプは東アジア型であるのに、VacA は欧米グループに含まれた。これは m 領域のサブタイプが、F37 株は m1a、OK129 株は m2 であったためだろう。一方 OK111 株 (*vacA* ゲノタイプは s1b/m1b) は、CagA タイプは欧米型であるのに、VacA は m1b サブタイプのため東アジアグループに含まれた。

CagE において、F79 株、OK155 株、OK187 株、OK210 株は、CagA が欧米型であるのに CagE は東アジアグループに含まれた。上記 7 株 (F37, F7, OK111, OK129, OK155, OK187, OK210) を除く他の全ての株は、3 つのタンパク質間で地理的分布は一致した (78.8%, 26/33)。

興味深いことに、消化性潰瘍患者分離株において、CagA と VacA とともに欧米グループに分類された株の割合 (90.0%, 9/10) が慢性胃炎患者分離株におけるそれ (22.7%, 5/22) よりも有意に高かった ( $\chi^2=12.64, P=0.00057$ )。

## **考察**

日本や韓国などの東アジア諸国は、胃癌の発症率がとりわけ高いことが知られている。さらに *H. pylori* には明確な地理的遺伝子多型が確認されている [18, 24]。 *H. pylori* は VacA と CagA の有無により type I と type II に分類され [66]、type

I の菌株は type II の株に比べ病原性が高いと考えられている[34]。vacA と cagA はともに病原因子であり、2 つの遺伝子多型の間には地理的な相関があるといわれている[31, 63]。本章では、日本の沖縄と福井において vacA、cagA、cagE 間の分子遺伝学的相関を検討した。福井分離株のほとんど (81.7%) が s1c/m1b 型であったのに対し[73]、沖縄分離株にはさまざまな vacA ゲノタイプが存在した (最も優占な s1c/m1b は 71.4%)。沖縄は歴史的に西洋諸国と活発な交流があり、20 世紀中頃より大勢のアメリカ人の居住があったためさまざまなタイプの *H. pylori* が混在することになったのであろう。一方福井分離株の vacA にほとんどバリエーションがみられなかったのは、日本の典型的な特性、すなわちほぼ単一民族国さらに島国のため地理的に隔離されているなどによるものと考えられる。そのため異なるゲノタイプの株間における DNA 伝達の機会が、欧米諸国に比べ少なかったのであろう。van Doorn らの報告によると、s1c サブタイプは東アジアで優勢であり、他の地域ではほとんどみられない[63]。

VacA の系統樹解析では、m2 サブタイプの株は全て欧米グループに分類された。Ji らは、中国株 8 株と欧米株 6 株間で系統樹解析し、m1 サブタイプの m-領域はある程度の進化的相関があるが、m2 サブタイプの m-領域は独立的に進化していると報告しており、中国と欧米株が分離した後に m2 領域が広まったと示唆している[36]。さらに、s1a/m1a、s1b/m1a、s1b/m1b 株も日本では大変稀なタイプであり、欧米グループに属した。今回の検討では、s-領域における s1a、s1b、s1c、s2 サブタイプ間の相同性と m-領域における m1a、m1b、m2 サブタイプ間の相同性を計算した。s-領域では、s1 サブタイプ間では 80%以上の相同性があり、s1a と s1c サブタイプの相関性の方が s1b とのそれより高く、また s1 と s2 サブタイプ間では約 60%の相同性しかなかった。m-領域では、s-領域と同様、m1a と m1b サブタイプ間の相関は高く、m1 と m2 サブタイプ間の相同性は低かった。Atherton らもまた、60190 株 (m1) と Tx30a 株 (m2) 間の VacA 配列を比較し、VacA の m-領域における 2 株間の相同性は 59.0%であったと報告している。s1 と s2、そして m1 と m2 間の違いは毒性の強弱に関与している可能性がある[6]。ひとつの遺伝子内の異なる領域において進化の程度が著しく違うのは、遺伝子組換えで説明でき、vacA のモザイク構造は DNA 水平伝達による遺伝子組換えによるものと考えられる[36]。

cagA 陽性 *H. pylori* の感染は、萎縮性胃炎の進行や胃癌の危険性を増大させると考えられており [14, 31, 50]、また cagA には東アジア株と欧米株間で配列に大きな違いが観察される[1, 70]。近年のヒト胃上皮 AGS 細胞への cagA 遺伝子導入実験より、東アジア型 CagA の SHP-2 結合親和性は欧米型 CagA に比べ強いことが明らかになり[29]、東アジア型 CagA 陽性株は欧米型 CagA 陽性株に比較してより強力な病原性を持つと考えられる。臨床上では、第 1 章でヒト胃粘膜生検組織において CagA-SHP-2 複合体形成を確認しており[71]、さらに第 3 章では *H. pylori* 陽性胃炎患者において、東アジア CagA 陽性株感染患者の炎症や萎縮の程度が、cagA 陰性株や欧米型 CagA 陽性株感染患者に比べ有意に重度であることを明らかにした[9]。本章では以前の報告のように[9, 10, 73]、SHP-2 との結合部位である EPIYA 領域の配列によって、欧米型と東アジア型 CagA という 2 つのゲノタイプを観察した。この EPIYA による分類はほとんどの株において CagA

の系統樹のクラスターと一致した。さらに欧米株と東アジア株の CagA 繰り返し領域の相同性は低く (53%)、この配列の大きな違いが CagA の毒性の強弱に関係していると考えられる。またさらに、今回混合型 CagA を持った *H. pylori* が 2 株存在した。株間の遺伝子伝達や組換えが起こった可能性があるが、この 2 株は VacA と CagE が欧米型だったため、もともとは欧米型株であり、日本に移行してきて株間の遺伝子伝達や組換えが起こったのであろう。

*cagE* 遺伝子は、*Bordetella pertussis* の *ptlC* や *Agrobacterium tumefaciens* の *virB4* 遺伝子のホモログであり [15]、*cagPAI* 内の *cagA* 上流近くに存在し、また CagE タンパク質は IV 型分泌装置の構成成分の一つである [59]。さらに CagE は胃上皮細胞における IL-8 発現を誘導することが報告されている [59]。今回の検討では *cagE* 遺伝子は株間で良く保存されていることが分かった。全長のアミノ酸配列を観察しても、欧米型、東アジア型特有の配列というものは発見できなかったが、系統樹では明確に 2 つのグループに区別された。

3 つのタンパク質の系統樹解析から遺伝的相関が示された。*H. pylori* 株の分布は、3 つのタンパク質間でほとんど同じようなパターンを示し、*vacA* と *cagPAI* の間には、ゲノム上距離が離れているにもかかわらず、遺伝的な連関が存在することが示唆された [3, 58]。ヒト胃粘膜において長期感染を持続させるために、*vacA/cagPAI* ゲノタイプを組み合わせが株の炎症誘発性と抗炎症性のバランスを維持しているのかも知れない。今回興味深いことに、消化性潰瘍株は CagA と VacA の欧米型と相関があった。沖縄における株の多様性は、福井と沖縄間の *H. pylori* 感染による病態の差に影響を及ぼしているのかも知れない。株多様性と病態との関連性について、*H. pylori* の病原性を明らかにするためにさらなる研究が必要であらう。

# Table 5-1

ピロリ菌*vacA*タイピングに用いるプライマー

Region	Primer	Sequence <sup>a</sup>	Size and location of PCR product
s1a	vacA s1a-F	5'- CTC TCG CTT TAG TAG GAG C -3'	213 bp (843 - 1055) <sup>b</sup>
	VA1-R	5'- CTG CTT GAA TGC GCC AAA C -3'	
s1b	SS3-F	5'- AGC GCC ATA CCG CAA GAG -3'	187 bp (869 - 1055) <sup>c</sup>
	VA1-R		
s1c	vacA s1c-F	5'- CTC TCG CTT TAG TGG GGY T -3'	213 bp (843 - 1055) <sup>c</sup>
	VA1-R		
s2	SS2-F	5'- GCT AAC ACG CCA AAT GAT CC -3'	199 bp (433 - 631) <sup>d</sup>
	VA1-R		
m1a	VA3-F	5'- GGT CAA AAT GCG GTC ATG G -3'	290 bp (2741 - 3030) <sup>b</sup>
	VA3-R	5'- CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC -3'	
m1b	VAm-F3	5'- GGC CCC AAT GCA GTC ATG GAT -3'	291 bp (2741 - 3031) <sup>c</sup>
	VAm-R3	5'- GCT GTT AGT GCC TAA AGA AGC AT -3'	
m2	VA4-F	5'- GGA GCC CCA GGA AAC ATT G -3'	352 bp (976 - 1327) <sup>e</sup>
	VA4-R	5'- CAT AAC TAG CGC CTT GCA C -3'	

<sup>a</sup> Y : C or T

<sup>b</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* 60190 (GenBank accession no. HPU05676) [20].

<sup>c</sup> Corresponding to nucleotide position of *H. pylori* 60190.

<sup>d</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* Tx30a (GenBank accession no. HPU29401) [6].

<sup>e</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* 87-203 (GenBank accession no. HPU05677) [20].

## Table 5-2

*H. pylori vacA*, *cagA*, *cagE*のDNA sequencingに用いるプライマー

Gene	Primer	Sequence	Corresponding DNA sequence (size of PCR product)
<i>vacA</i>	VAS-1F	5'- AGC CGA TAG CAT CAG AGA AGA AC -3'	95 - 117 <sup>a</sup> (4281 bp)
	VAS-11R	5'- TGT GGT GTA TGC GTT GTA GGG GTT -3'	4375 - 4352 <sup>a</sup>
	* <i>vacA</i> s1a-F	**	} 452 - 470 <sup>a</sup> 478 - 495 <sup>b</sup> 452 - 470 <sup>b</sup> 433 - 452 <sup>c</sup>
	* SS3-F	**	
	* <i>vacA</i> s1c-F	**	
	* SS2-F	**	
	* <i>vacA</i> S5	5'- GCT AAC CGC ACC ACG AGA GT -3'	959 - 968 <sup>a</sup>
	* <i>vacA</i> AS5	5'- TTG TCT GTA ACG CCG CTA AAA -3'	2009 - 1999 <sup>a</sup>
	* VA3-F	**	} 2373 - 2392 <sup>a</sup> 2373 - 2394 <sup>b</sup> 976 - 994 <sup>d</sup>
	* VAm-F3	**	
	* VA4-F	**	
	* VA3-R	**	} 2663 - 2644 <sup>a</sup> 2664 - 2642 <sup>b</sup> 1327 - 1309 <sup>d</sup>
	* VAm-R3	**	
	* VA4-R	**	
	* <i>vacA</i> S3	5'- TAT TGA AAG CGT GTT TGA AT -3'	3069 - 3088 <sup>a</sup>
	* <i>vacA</i> 3'F	5'- CAT TGT GGG CGG TTT TGG AAG -3'	4156 - 4177 <sup>a</sup>
<i>cagA</i>	<i>cagA</i> L2(+)	5'- AAG GAG AAA CAA TGA CTA ACG AAA CTA TTG -3'	(-11) - 19 <sup>c</sup> (3576 bp)
	<i>cagA</i> L2(-)	5'- TCC TTT AAG ATT TTT GGA AAC CAC CTT TTG -3'	(+4) - 3536 <sup>c</sup>
	* <i>cagA</i> B1(-)	5'- CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A -3'	520 - 499 <sup>c</sup>
	* <i>cagA</i> M2(+)	5'- ATA CAA GGC TTA CCG CCT G -3'	754 - 772 <sup>c</sup>
	* <i>cagA</i> S2	5'- GGC AAT GGT GGT CCT GGA GCT AGG C -3'	976 - 1000 <sup>c</sup>
	* <i>cagA</i> M1(-)	5'- GTA GCC ACA TTG TCG CCT TGT TGG -3'	1055 - 1032 <sup>c</sup>
	* <i>cagA</i> C2(+)	5'- GAA TTG TCT GAT AAA CTT GAA A -3'	2059 - 2080 <sup>c</sup>
	* <i>cagA</i> C2(-)	5'- TTT GCT TGC GTT ACC TTG CTG -3'	2306 - 2286 <sup>c</sup>
	* <i>cagA</i> C3(-)	5'- GCG TAT GTG GCT GTT AGT AGC G -3'	3210 - 3189 <sup>c</sup>
* <i>cagA</i> 3'F1	5'- AAA CCC TGA GTG GCT CAA GCT C -3'	3273 - 3294 <sup>c</sup>	
<i>cagE</i>	<i>cagE</i> S1	5'- GAG CGG TAA GGT TTT GTT CGG TGA T -3'	(-164) - (-140) <sup>f</sup> (3315 bp)
	<i>cagE</i> AS3	5'- CCA ACA AAC AAC GCT GCT TTC -3'	(+199) - (+179) <sup>f</sup>
	* <i>cagE</i> AS4	5'- CAA TGG GTG GGG AGT ATG TCA AGA -3'	1007 - 984 <sup>f</sup>
	* <i>cagE</i> AS1	5'- CCA ACG CAG CGA CTT TCT CTA TG -3'	1430 - 1408 <sup>f</sup>
	* <i>cagE</i> AS5	5'- TGC ATG GTG GGG TGA AAG AAG TTT A -3'	1850 - 1826 <sup>f</sup>
	* <i>cagE</i> AS2	5'- ATG GGG TGA TCC TTA CTA ACA ACT A -3'	2435 - 2411 <sup>f</sup>

\* DNA sequencingでのみ使用するプライマー。

\*\* Table 1参照、ゲノタイプに応じてs-領域のforward primerとm-領域のforward, reverse primerを選択する。

<sup>a</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* 11638 (GenBank accession no. HPU07145)[35, 49].

<sup>b</sup> Corresponding to nucleotide position of *H. pylori* 11638.

<sup>c</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* Tx30a (GenBank accession no. HPU29401) [6].

<sup>d</sup> Nucleotide positions in the *vacA* gene of *H. pylori* 87-203 (GenBank accession no. HPU05677)[20].

<sup>e</sup> Nucleotide positions in the HP0547 (*cagA*) gene of *H. pylori* 26695 (GenBank accession no. AE000569).

<sup>f</sup> Nucleotide positions in the HP0544 (*cagE*) gene of *H. pylori* 26695 (GenBank accession no. AE000568).



### Table 5-3

DDBJデータベースに登録した塩基配列のaccession numbers

Strain	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>cagE</i>
F13	AB190958	AB090073	AB191062
F15	AB190959	AB090074	AB191063
F16	AB190960	AB090075	AB191064
F17	AB190961	AB090076	AB191065
F18	AB190962	AB090077	AB191066
F26	AB190963	AB090078	AB191068
F32	AB190964	AF202972	AB191071
F36	AF049642	AB090080	AB191072
F37	AF071095	AB190934	AB191073
F55	AF049632	AB090081	AB191076
F79	AF071097	AB090082	AB191077
F80	AB190965	AB090083	AB191078
F92	AB190966	AB090084	AB191079
OK101	AB190967	AB090085	AB191080
OK107	AB190968	AB090086	AB191081
OK109	AB190969	AB090087	AB191082
OK111	AB190970	AB190937	AB191083
OK118	AB190971	AB190939	AB191086
OK129	AB190972	AB090089	AB191087
OK130	AB190973	AB190940	AB191088
OK139	AB190974	AB190941	AB191090
OK144	AB190975	AB190942	AB191091
OK155	AB190976	AB190943	AB191092
OK158	AB190977	AB190944	AB191093
OK159	AB190978	AB190945	AB191094
OK160	AB190979	AB190946	AB191095
OK180	AB190981	AB190948	AB191096
OK181	AB190982	AB190949	AB191097
OK185	AB190983	AB190950	AB191098
OK187	AB190984	AB190951	AB191099
OK194	AB190985	AB190952	AB191100
OK204	AB190986	AB190954	AB191101
OK210	AB190988	AB190956	AB191102
26695	AE000598	AE000569	AE000568
J99	AE001511	AE001483	AE001482
NCTC11638	HPU07145	AF282853	AF282853
NCTC11637	AF049653	AF202973	AB191103

# Table 5-4

## *H. pylori* 33分離株の遺伝的特徴

Strain	Diagnosis <sup>a</sup>	<i>vacA</i>			<i>cagA</i>			<i>cagE</i>	
		Genotype	Geographic type	Size of predicted protein (residue)	EPIYA type <sup>b</sup>	Geographic type	Size of predicted protein (residue)	Geographic type	Size of predicted protein (residue)
F79	GU	s1a/m1a	Western	1290	AB'CC	Western	1216	East Asian	983
F37	AG	s1a/m1a	Western	1295	A'BD	East Asian	1172	East Asian	983
F16	AG	s1a/m1b	East Asian	1291	ABD	East Asian	1172	East Asian	983
OK109	AG	s1a/m1b	East Asian	1289	ABD	East Asian	1178	East Asian	983
OK118	AG	s1a/m1b	East Asian	1291	ABD	East Asian	1176	East Asian	983
OK158	DU	s1a/m1b	East Asian	1296	ABD	East Asian	1173	East Asian	983
OK159	AG	s1a/m1b	East Asian	1296	AB'D	East Asian	1172	East Asian	983
OK194	AG	s1a/m1b	East Asian	1296	ABD	East Asian	1177	East Asian	983
OK107	AG	s1a/m2	Western	1303	AB'CCC	Western	1251	Western	983
OK139	AG	s1a/m2	Western	1303	AB'C	Western	1183	Western	983
OK144	DU	s1a/m2	Western	1303	AB'C	Western	1183	Western	983
OK160	AG	s1a/m2	Western	1303	AB''C	Western	1183	Western	983
OK185	DU	s1a/m2	Western	1303	AB'C	Western	1183	Western	983
OK204	DU	s1a/m2	Western	1303	AB'D*	Western	1188	Western	983
OK210	DU	s1a/m2	Western	1323	AB'C	Western	1188	East Asian	983
F80	DU	s1b/m1a	Western	1295	AB'DD*	Western	1222	Western	983
OK111	AG	s1b/m1b	East Asian	1295	AB'CC	Western	1214	Western	983
F13	AG	s1c/m1b	East Asian	1296	ABD	East Asian	1175	East Asian	983
F15	AG	s1c/m1b	East Asian	1291	ABD	East Asian	1172	East Asian	983
F17	AG	s1c/m1b	East Asian	1297	AAABD	East Asian	1275	East Asian	983
F18	AG	s1c/m1b	East Asian	1291	ABABD	East Asian	1239	East Asian	983
F26	AG	s1c/m1b	East Asian	1296	ABAB'D	East Asian	1269	East Asian	983
F32	GCA	s1c/m1b	East Asian	1291	ABD	East Asian	1173	East Asian	983
F36	AG	s1c/m1b	East Asian	1294	ABD	East Asian	1170	East Asian	981
F55	AG	s1c/m1b	East Asian	1291	AB''B'D	East Asian	1232	East Asian	983
F92	AG	s1c/m1b	East Asian	1291	ABABD	East Asian	1270	East Asian	983
OK101	AG	s1c/m1b	East Asian	1296	ABD	East Asian	1172	East Asian	983
OK129	AG	s1c/m2	Western	1323	ABD	East Asian	1172	East Asian	983
OK130	DU	s1c/m2	Western	1301	AB'C	Western	1183	Western	983
OK180	DU	s1c/m2	Western	1303	AB'C	Western	1183	Western	983
OK181	AG	s1c/m2	Western	1303	AB'	Western	1148	Western	983
OK187	DU	s1c/m2	Western	1303	AB'C	Western	1189	East Asian	983
OK155	AG	s2/m2	Western	1327	AB''C	Western	1184	East Asian	983
26695	G	s1a/m1a	Western	1290	AB'C	Western	1186	Western	983
J99	DU	s1b/m1a	Western	1288	B'C	Western	1167	Western	983
NCTC11638	G	s1a/m1a	Western	1296	AB	Western	1147	Western	981
NCTC11637	G	s1a/m1a	Western	1290	ABCCC	Western	1247	Western	983

<sup>a</sup> AG: 萎縮性胃炎, G: 胃炎, GU: 胃潰瘍, DU: 十二指腸潰瘍, GCA: 胃癌

<sup>b</sup> B' : EPIYT, B'' : ESIYA, B''' : ESIYT, A' : NPIYA

\* mixed-type of CagA repeat domain.

## Table 5-5

*vacA*タイプの分布

	sla/mla	sla/mlb	sla/m2	s1b/mla	s1b/mlb	s1b/m2	s1c/mla	s1c/mlb	s1c/m2	s2/m2	UD*	total
Fukui	2 (1.8%)	9 (7.8%)	0 (0%)	1 (0.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	94 (81.7%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (7.8%)	115
Okinawa	0 (0%)	5 (4.8%)	9 (8.6%)	0 (0%)	1 (0.9%)	0 (0%)	0 (0%)	75 (71.4%)	6 (5.7%)	5 (4.8%)	4 (3.8%)	105
total	2 (0.9%)	14 (6.3%)	9 (4.1%)	1 (0.5%)	1 (0.5%)	0 (0%)	0 (0%)	169 (76.8%)	6 (2.7%)	5 (2.3%)	13 (5.9%)	220

UD\*: undetectable

## Table 5-6

*vacA*のs-領域とm-領域における相同性

		% Nucleotide sequence identity <sup>a</sup>			
		F37	F80	F32	OK155
		(s1a)	(s1b)	(s1c)	(s2)
F37	(m1a)	-	86.3	93.1	62.8
F80	(m1a)	92.5	-	80.4	62.8
F32	(m1b)	84.8	89.4	-	64.3
OK155	(m2)	70.5	72.3	69.2	-

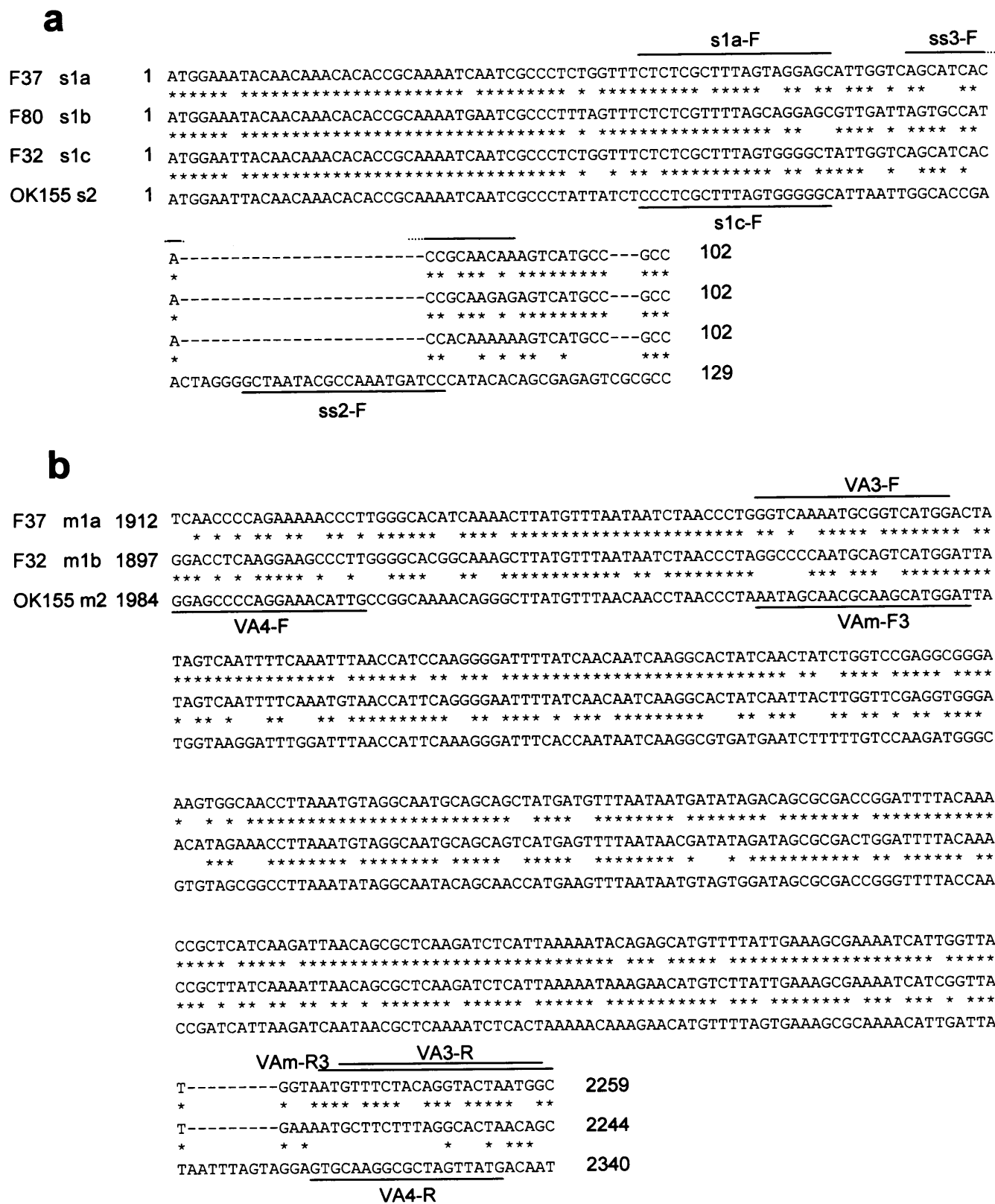
<sup>a</sup> ハイフンより右上の値がs-領域、左下の値がm-領域における値

## Table 5-7

*vacA*の相同性

	% Nucleotide and amino acid sequence identity <sup>a</sup>			
	F37 (s1a/mla)	F80 (s1b/mla)	F32 (s1c/mlb)	OK155 (s2/m2)
F37	-	93.7	90.6	78.8
F80	94.4	-	89.9	77.1
F32	91.6	91.4	-	78.7
OK155	84.1	83.0	84.4	-

<sup>a</sup> ハイフンより右上の値がアミノ酸配列、左下の値が塩基配列における値



**Figure 5-1**

*vacA* 遺伝子塩基配列の比較

a: *vacA* シグナル領域 (s-領域) における s1a、s1b、s1c、s2 サブタイプ間の比較。

b: *vacA* 中間領域 (m-領域) における m1a、m1b、m2 間の比較。

配列の最初と最後の数字はそれぞれの株における塩基の位置を示す。星印は一致を、ハイフンは塩基が抜けていることを示す。

```

60190 m1a509 ID--TGNGGFNT--LDFSGVTNKVNINKLITASTNVAVKNFNINELIVKTNGVSVGEYTHFSEDIGSQSRINTVRLETGTRSI FSGGVKFKS GEKLVIDE
** *****
F32 m1b 512 ID--TGNGGFNT--LDFSGVTNKVNINKLITASTNVAIKNFNINELLVKTNGISVGEYTNFSEDIGNQSRINTVRLETGTRSIYSGGVKFKGGEKLVIND
** *****
OK210 m2 533 IDATKSDNGLNTSTLDFSGVTDKVNINKLTTSATNVNIKNFDIKELVVTRVQSFQYTI FGENIGDKSRIGVVS LQTGYSPAYSGGVTFKGGKLVIDE
*****
Tx30a m2 522 IDATKSDNGLNTSTLDFSGVTDKVNINKLTTAATNVNIKNFDIKELVVTRVQSFQYTI FGENIGDKSRIGVVS LQTGYSPAYSGGVTFKGGKLVIDE
*****

```

```

FYYS PWNYFDARNIKNVEITRKFASSTPENPWGTSKLMFNNTLGQNAVMDYSQFSNLT IQGDFINNQGTINYLVRGGKVATLNVGNAAAMMFNNDIDSA
** *****
FYYPWNYFDARNIKNVEITNKLAFGPQSPWGTAKLMFNNTLGPNAVMDYSQFSNVT IQGNFINNQGTINYLVRGGNIETLNVGNAAVMSFNNDIDSA
* *****
LYHAPWNYFDARNVTDVEINKKILFGAPGYIAGKTGLMFNNLTLSNASMDYGKDLDLT IQGHFTNNQGTMNL FVQDGRVATLNAGHQASMI FNNVVD SA
*****
LYHAPWNYFDARNVTDVEINKRILFGAPGNIAGKTGLMFNNLTLSNASMDYGKDLDLT IQGHFTNNQGTMNL FVQDGRVATLNAGHQASMI FNNVVD ST

```

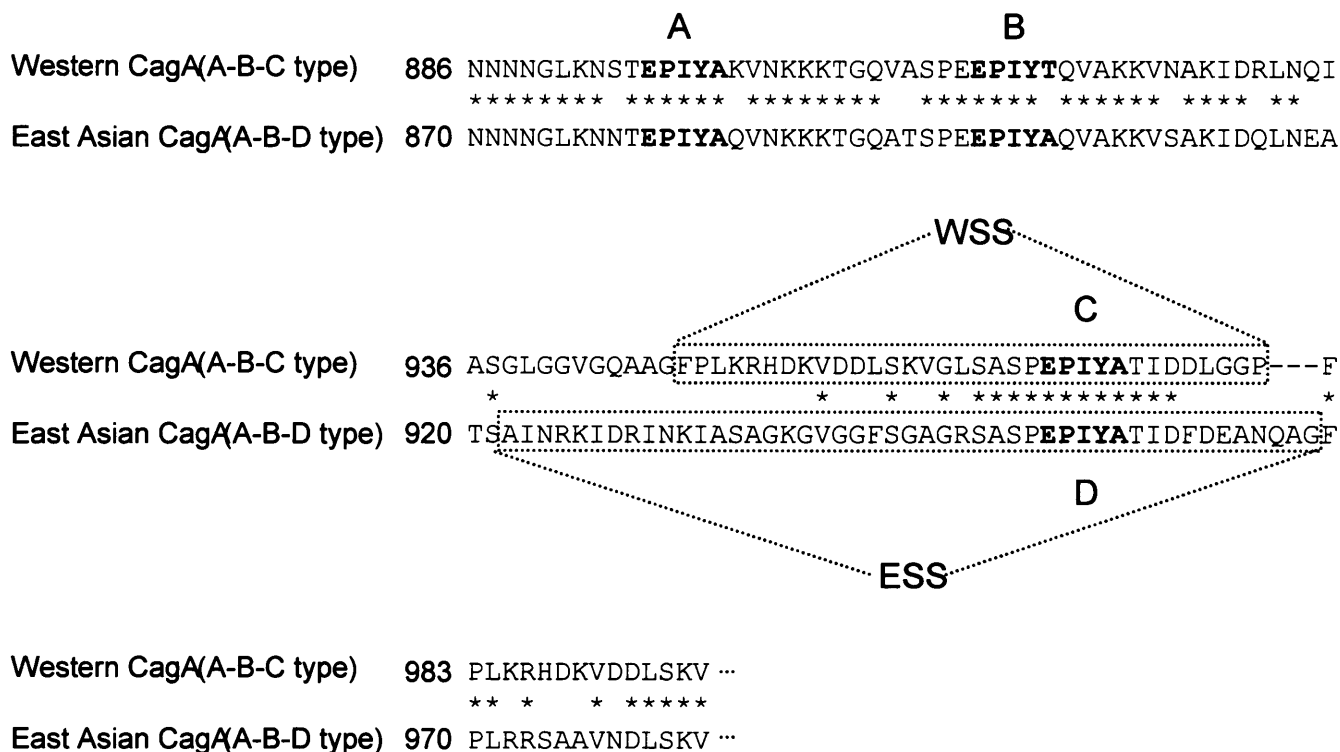
```

TGFYKPLIKINSAQDLIKNTEHVLLKAKI IGY---GNVS--TG TNGISNVNLE 752
*****
TGFYKPLIKINSAQDLIKNKEHVLLKAKI IGY---ENAS--LG TNSISANLI 755
*****
TGFYKPLIKINNAQNLTKNKEHVLVKARNIDYNLVGVQGAS YDNISASNTNLQ 785
*****
TGFYKPLIKINNAQNLTKNKEHVLVKARNIDYNLVGVQGAS YDNISASNTNLQ 774

```

## Figure 5-2

VacA中間領域（m-領域）におけるm1a、m1b、m2サブタイプ間のアミノ酸配列の比較  
 配列の最初と最後の数字はそれぞれの株におけるアミノ酸残基の位置を示す。  
 星印は一致を、ハイフンは塩基が抜けていることを示す。

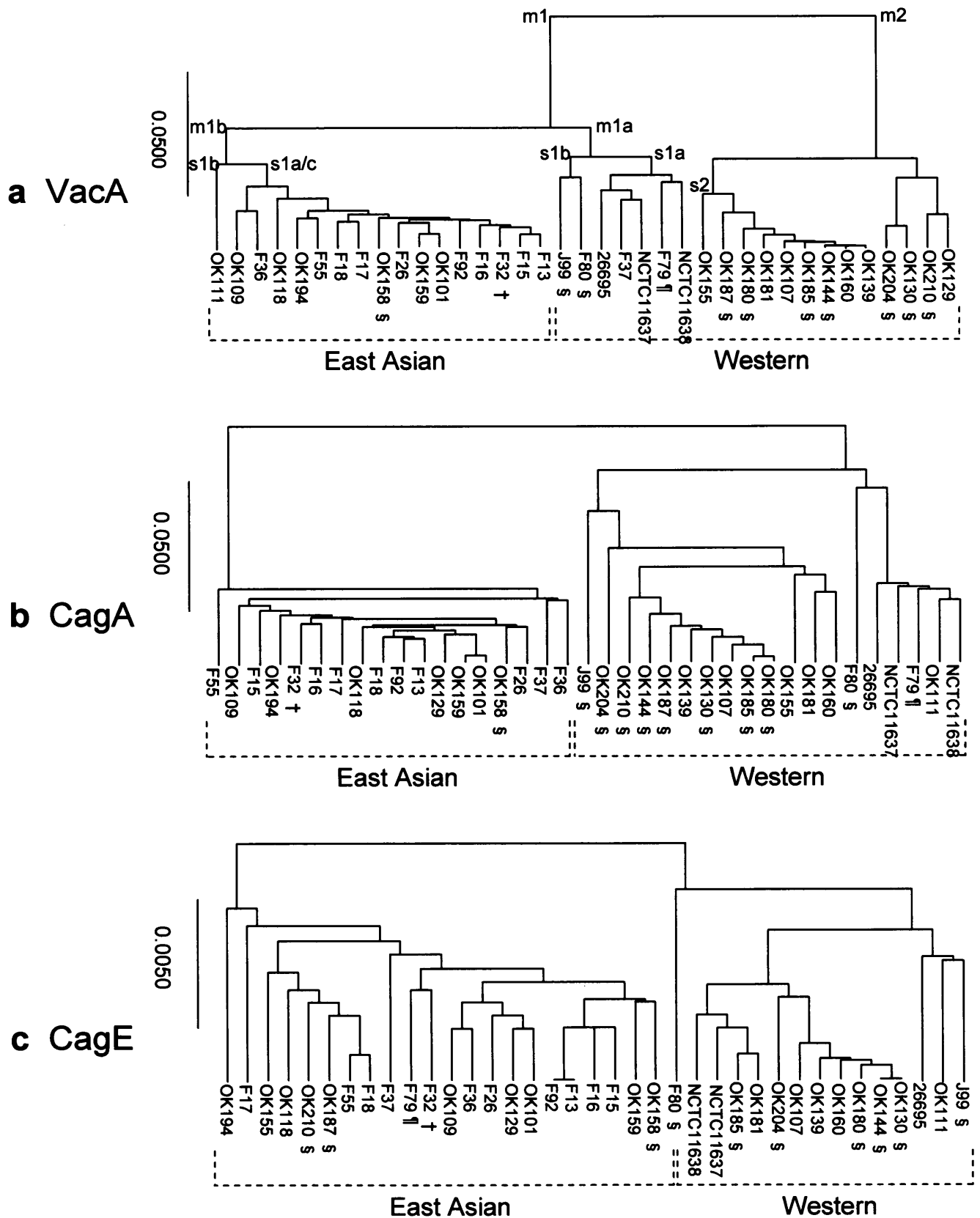


**Figure 5-3**

EPIYA領域（CagA繰り返し領域）における、典型的な欧米型（26695株）と東アジア型（F32株）間のアミノ酸配列の比較。欧米型CagA特異的配列（WSS）と東アジア型特異的配列（ESS）を枠で囲んだ。配列の最初と最後の数字はそれぞれの株におけるアミノ酸残基の位置を示す。星印は一致を、ハイフンは塩基が抜けていることを示す。







**Figure 5-5**

VacA (a)、CagA (b)、CagE (c)の完全長アミノ酸配列の系統樹  
 スケールバーは算出距離を示す。

3つのタンパク質とも欧米型と東アジア型の2つのグループに区別された。

\$は十二指腸潰瘍分離株、¶は胃潰瘍分離株、†は胃癌分離株を示し、他の株はすべて胃炎分離株である。

## 結語

*H. pylori* の感染ルートは、排泄物や吐物、唾液などを介してのヒトからヒトへの経口感染が最有力であり、幼少期における家庭内感染が多いと言われている。しかしながら *H. pylori* 感染率調査によると、先進国に比べ発展途上国において感染率が高いことや、日本においても数十年前に比べ近年では若者の感染率が低下していることから、衛生環境が感染に大きく影響していると考えられる。一般的に *H. pylori* は、自然環境中では生育できずに死滅すると考えられているが、周辺環境が悪化すると球状体を形成して休止状態ながら生存しているとの報告もある。不衛生な飲料水や洗浄不十分な農作物の摂取による感染の可能性も十分に考えられ、環境中の *H. pylori* の生態についてさらなる調査が必要である。なお、特定の食品からの検出や、特定の動物からの感染例は今のところ報告されていない。

*H. pylori* の世界的な分布は、数種の housekeeping 遺伝子と病原因子遺伝子を用いた multilocus sequence typing 法により、遺伝学的に調査されている[18, 24]。それによると、*H. pylori* には伝染性はほとんどなく、その分布と進化は、人類の分布とその移住の歴史に付随していることが示唆された。人類は最初、中央アフリカ辺りから移動を始め、ヨーロッパ方面、南アフリカ方面、アジア方面、そして東アジアからオセアニアやアメリカ大陸方面へと移住していったと考えられている。上述の方法により、現在の *H. pylori* をグループ化すると大きく 4 つのグループ、アフリカ 1、アフリカ 2、東アジア、ヨーロッパに分類され、さらに東アジアグループは、東アジア、イヌイット、オセアニアのサブグループに分けられることが明らかになった。人類と *H. pylori* との遺伝学的分布が共通していることから、少なくとも人類の移住が始まった 10 万年前には、*H. pylori* はすでにヒトの胃粘膜に定着し、その後ずっと人類とともに移動してきたと推察され、人類への依存性が非常に高い *H. pylori* は、人類学的にも非常に興味深い細菌といえる。

*H. pylori* のゲノムは、1997 年と 1999 年に、異なる 2 株 (26695 株と J99 株) で全配列が決定された[3, 58]。それによると、*H. pylori* ゲノムは約 1.7Mb の環状 2 本鎖 DNA 1 分子からなり、大腸菌の約 40% の大きさであった。推定遺伝子数はそれぞれ 1,590 個と 1,495 個であり、そのうちほぼ 2/3 については塩基配列の相同性などから機能の推定できるものであったが、残りは機能不明の新規遺伝子であった。2 種類の菌株の遺伝子は約 90% 共通で、ゲノムの構造的安定性は比較的保たれていた。しかしながら、それぞれの株に特有の遺伝子も多数あり、これらはゲノムの中で特に可塑性に富む領域に局在していた。また、*H. pylori* のゲノムには本来の遺伝子の他に、外来性に伝達されたと推定される特有の GC 含量を示す *cagPAI* 領域や、トランスポゾンと考えられる挿入配列 (Insertion Element, IS605, IS606) も確認されているが、それらの数や分布についても 2 つの菌株間にかなりの相違があり、*H. pylori* のゲノム構造には遺伝子の配列自体の変化 (inversion や translocation) やその遺伝子構成自体が異なる macrodiversity があることが示された。なかでも *cagPAI* 領域は分断や欠失などさまざまな遺伝子変化が確認されており、*H. pylori* ゲノムにおいて最も多様性の高い領域である

ことが示されている。*cagPAI* に存在する遺伝子はほとんどが新規遺伝子であり、その約半数にシグナルペプチド配列が観察されることから、*cagPAI* は病原性分子の産生と分泌に関与する遺伝子領域であると考えられている。また *cagPAI* 遺伝子中の 6 種の遺伝子産物には、他の細菌の IV 型分泌装置と相同性が認められており、*H. pylori* にも IV 型分泌装置が存在すると考えられている。この分泌装置は、大腸菌や *Agrobacterium tumefaciens*、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、レジオネラや赤痢菌などにも確認されている。この分泌装置を介して菌体外に放出または菌体から宿主細胞に直接注入される病原因子はさまざまであり、*A. tumefaciens* は T-DNA を植物細胞に直接移行させ、クラウンゴールと呼ばれるこぶ状腫瘍を形成することが知られている。また、百日咳菌は百日咳毒素 (pertussis toxin) タンパク質を分泌し、*H. pylori* は CagA タンパク質を宿主に直接注入する。複数種の細菌において同様の分泌装置を持つということは、生物進化の過程で多種類の生物間で遺伝子の水平伝達があったことを裏付けるものであり、病原性細菌の進化と分類を考える上でも非常に興味深い。

一方、*H. pylori* 関連の疫学的調査から、東アジア諸国の胃癌死亡率は欧米に比べて際立って高いことがわかる。CagA の生物活性が *H. pylori* の病原性・発癌性につながるなら、病原性・発癌性のより強い CagA を保有する *H. pylori* の蔓延が東アジア地域における際立った胃癌発症の一因と考える。本研究第 1 章では、ヒト胃粘膜において CagA-SHP-2 複合体形成を確認しており [71]、さらに第 3 章では *H. pylori* 陽性胃炎患者において、東アジア CagA 陽性株感染患者の炎症や萎縮の程度が、*cagA* 陰性株や欧米型 CagA 陽性株感染患者に比べ有意に重度であることを明らかにし [9]、SHP-2 との親和性がより強い東アジア型 CagA 陽性株によって引き起こされる、持続的で活発な炎症が、萎縮性胃炎や胃癌へ進行させる一因になっている可能性を示唆した。また我が国で最も胃癌発症率の少ない沖縄地方では、例外的に東アジア型 CagA を有する *H. pylori* と欧米型 CagA を保有する *H. pylori* の感染が混在するが、この沖縄でも胃癌患者から分離される *H. pylori* 株のほとんどは東アジア型 CagA を保有していることが今回確認された (第 3 章)。今後、病原性・発癌性に関わる CagA 分子多型がより詳細に検討され、感染した *H. pylori* がもつ CagA の分子多型を判別することで、胃癌を含めた関連疾病発症の予測や個々の感染者に適した治療、予防法の選択が可能になり、我が国における胃癌死亡率の減少に結びつくことが期待される。また、*H. pylori* の CagA 多型の判別には、本研究第 4 章で示したリアルタイム PCR システムが有用なので、地理的かつ臨床医学的な CagA 多型の意味をより解明するためにも、このシステムを用いた大規模な調査が望まれる。

本研究では、*H. pylori* の主な病原因子について取り上げ、病原性発現との関連性を検討した。第 5 章のタンパク質系統樹解析から、*vacA* と *cagPAI* の間には分子遺伝学的な相関があることが明らかになり、さらには *vacA*、*cagPAI* の欧米型は消化性潰瘍発症に (第 5 章)、*cagA* の東アジア型は萎縮性胃炎と胃癌発症に (第 3 章) 関与していることが示唆された。しかし、我が国における *H. pylori* 保菌者は約 6,000 万人と推定されるなか胃癌の発症は年間 24 万人前後であり、*H. pylori* 感染者がすべて症状を呈する胃十二指腸疾患を発症するわけではない。*H. pylori* 感染において疾患の多様性が生じるのは、*H. pylori* 菌体の病原性と宿主

側の反応の諸因子が複雑にからみあっているためと考えられている。本研究第3章において、東アジア型 CagA 陽性株感染慢性胃炎患者は、萎縮程度が沖縄より福井で有意に高値であったことから、環境因子や宿主側因子など他の要因が萎縮の程度に影響を与えていると考えられる。宿主側の因子として発癌素因（癌遺伝子、癌抑制遺伝子に異常があるか否か）や免疫系に代表される生体防御系、内分泌系の個体差といった遺伝的背景に加え、各個人のライフスタイルに起因する epigenetic な要因が想定され、その解明は必ずしも容易ではない。しかし IL-1 遺伝子群や HLA 遺伝子の多型性など宿主側免疫遺伝学面での研究も進んでおり、今後さらなる菌体－宿主側双方の総合的な解明が進むことが望まれる。

我が国においては、2000年11月より保険診療での *H. pylori* の感染診断と除菌治療が、胃・十二指腸潰瘍、胃 MALT (mucosa associated lymphoid tissue) リンパ腫、および早期胃癌患者に適用されるようになり、多くの難治性潰瘍、再発性潰瘍患者が苦しみから解放されてきた。一方近年、*H. pylori* と胃以外の疾患との関わりも話題になってきている。小児鉄欠乏性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、慢性蕁麻疹、自己免疫性甲状腺炎、虚血性心疾患などで、*H. pylori* の除菌によって改善を示す例が報告され、*H. pylori* による直接侵襲以外の疾病発症メカニズムが示唆されるようになってきた。今後ますますの多岐にわたる研究が推進されることで、近い将来 *H. pylori* 感染症の全容が解明されることを期待する。

## 謝辞

本研究は、福井大学医学部内科学（2）において行われたものであり、終始懇篤なご指導を賜り、論文校閲の労をとられた神戸大学医学部医学医療国際交流センター東健教授に深く感謝いたします。さらに、本研究を進めるにあたり、ご指導、ご協力頂いた福井大学医学部内科学（2）のスタッフの皆様にも心から感謝いたします。

また、さまざまな実験手法等を快くご指導、ご助言頂いた北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野畠山昌則教授、東秀明助教授、研究室の皆様にも深く感謝いたします。

また、審査において貴重なご指摘を頂いた静岡大学理学部生物学科の先生方に心から感謝いたします。最後に本研究をまとめるにあたり、丁寧なご指導を頂いた竹内浩昭助教授に深く感謝いたします。

## 参考文献

1. **Achtman, M., T. Azuma, D. E. Berg, Y. Ito, G. Morelli, Z. Pan, S. Suerbaum, S. A. Thomson, A. van der Endo, and L. J. van Doorn.** 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.* **32**:459-470.
2. **Akopyants, N. S., S. W. Clifton, D. Kersulyte, J. E. Crabtree, B. E. Youree, C. A. Reece, N. O. Bukanov, E. S. Drazek, B. A. Roe, and D. E. Berg.** 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **28**:37-53.
3. **Alm R.A., L.S. Ling, D.T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **397**:176-180.
4. **Anti, M., A. Armuzzi, A. Gasbarrini, and G. Gasbarrini.** 1998. Importance of changes in epithelial cell turnover during *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis. *Gut.* **43** (Suppl. 1): S27-S32.
5. **Asahi, M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, M. Omata, T. Suzuki, and C. Sasakawa.** 2000. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* **191**:593-602.
6. **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* **270**:17771-17777.
7. **Azuma, T., S. Ito, F. Sato, Y. Yamazaki, H. Miyaji, Y. Ito, H. Suto, M. Kuriyama, T. Kato and Y. Kohli.** 1998. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer.* **82**:1013-1018.
8. **Azuma, T., A. Yamakawa, S. Yamazaki, K. Fukuta, M. Ohtani, Y. Ito, M. Dojo, Y. Yamazaki, and M. Kuriyama.** 2002. Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J. Infect. Dis.* **186**:1621-1630.
9. **Azuma, T., S. Yamazaki, A. Yamakawa, M. Ohtani, A. Muramatsu, H. Suto, Y. Ito, M. Dojo, Y. Yamazaki, M. Kuriyama, Y. Keida, H. Higashi, and M. Hatakeyama.** 2004. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J. Infect. Dis.* **189**:820-827.
10. **Azuma, T.** 2004. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J. Gastroenterol.* **39**:97-103.
11. **Azuma, T., A. Yamakawa, S. Yamazaki, M. Ohtani, Y. Ito, A. Muramatsu, H. Suto, Y. Yamazaki, Y. Keida, H. Higashi, and M. Hatakeyama.** 2004. Distinct Diversity of the *cag* Pathogenicity Island among *Helicobacter pylori* Strains in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2508-2517.
12. **Backert, S., E. Ziska, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Fauconnier, P. R.**

- Jungblut, M. Naumann, and T. F. Meyer.** 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* **2**:155-164.
13. **Backert, S., S. Moese, M. Selbach, V. Brinkmann, and T. F. Meyer.** 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **42**:631-644.
  14. **Blaser, M. J., G. I. Perez-Prez, H. Kleanthous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, G. N. Stemmermann, and A. Nomura.** 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **55**:2111-2115.
  15. **Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:14648-14653.
  16. **Correa, P.** 1988. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* **48**:3554-3560.
  17. **Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and R. Rappuoli.** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:5791-5795.
  18. **Covacci, A., J. L. Telford, G. DelGiudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli.** 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* **284**:1328-1333.
  19. **Cover, T.L., and M. J. Blaser.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**:10570-10575.
  20. **Cover, T. L., M. K. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser.** 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* **269**:10566-10573.
  21. **Cover, T.L.** 1996. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **20**:241-246.
  22. **Dixon, M. F., R. M. Genta, J. H. Yardley, and P. Correa.** 1996. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**:1161-1181.
  23. **El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, and C. S. Rabkin.** 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* **404**:398-402.
  24. **Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitsch, X. Wang, M. Achtman, and S. Suerbaum.** 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* **299**:1582-1585.
  25. **Feng, G., C. Hui, and T. Pawson.** 1993. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science.* **259**:1607-1611.
  26. **Freeman, R., J. Plutzky, and B. G. Neel.** 1992. Identification of a human src



- homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**:11239-11243.
27. **Furuta, T., E. M. El-Omar, F. Xiao, N. Shirai, M. Takashima, and H. Sugimura.** 2002. Interleukin 1 $\alpha$  polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. Gastroenterology. **123**:92-105.
  28. **Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama.** 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science. **295**:683-686.
  29. **Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2002. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**:14428-14433.
  30. **Hirai, M., T. Azuma, S. Ito, T. Kato, Y. Kohli, and N. Fujiki.** 1994. High prevalence of neutralizing activity to *Helicobacter pylori* cytotoxin in serum of gastric carcinoma patients. Int. J. Cancer **56**:56-60.
  31. **Huang, J. Q., G. F. Zheng, K. Sumanac, E. J. Irvine, and R. H. Hunt.** 2003. Meta-analysis of relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology. **125**:1636-1644.
  32. **International Agency for Research on Cancer working group.** 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. **61**:1-124.
  33. **Ito, S., T. Azuma, H. Murakita, M. Hirai, H. Miyaji, Y. Ito, Y. Ohtaki, Y. Yamazaki, M. Kuriyama, Y. Keida, and Y. Kohli.** 1996. Profile of *Helicobacter pylori* cytotoxin derived from two areas of Japan with different prevalence of atrophic gastritis. Gut. **39**:800-806.
  34. **Ito, Y., T. Azuma, S. Ito, H. Miyaji, M. Hirai, Y. Yamazaki, F. Sato, T. Kato, Y. Kohli, and M. Kuriyama.** 1997. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. J. Clin. Microbiol. **35**:1710-1714.
  35. **Ito, Y., T. Azuma, S. Ito, H. Suto, H. Miyaji, Y. Yamazaki, Y. Kohli, and M. Kuriyama.** 1998. Full-length sequence analysis of the *vacA* gene from cytotoxic and noncytotoxic *Helicobacter pylori*. J. Infect. Dis. **178**:1391-1398.
  36. **Ji, X., F. Frati, S. Barone, C. Pagliaccia, D. Burroni, G. Xu, R. Rappuoli, J. M. Reytrat, and J. L. Telford.** 2002. Evolution of functional polymorphism in the gene coding for the *Helicobacter pylori* cytotoxin. FEMS Microbiol. Lett. **206**: 253-258.
  37. **Kikuchi, S., O. Wada, T. Nakajima, T. Nishi, O. Kobayashi, T. Konishi, and Y. Inaba.** 1995. Serum anti-*Helicobacter pylori* antibody and gastric carcinoma among young adults. Research group on prevention of gastric carcinoma among young adults. Cancer. **75**:2789-2793.
  38. **Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. M. Meuwissen, and M. J. Blaser.** 1995. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. J. Natl. Cancer Inst. **87**:1777-1780.
  39. **Marshall, B. J., C. S. Goodwin, J. R. Warren, R. Murray, E. D. Blincow, S. J. Blackbourn, M. Phillips, T. E. Waters, and C. R. Sanderson.** 1988. Prospective

40. **Matsuhisa, T., N. Matsukura, and N. Yamada.** 2004. Topography of chronic active gastritis in *Helicobacter pylori*-positive Asian populations: age-, gender-, and endoscopic diagnosis-matched study. *J. Gastroenterol.* **39**:324-328.
41. **Mukhopadhyay, A.K., D. Kersulyte, J. Jeong, S. Datta, Y. Ito, A. Chowdhury, S. Chowdhury, A. Santra, S. K. Bhattacharya, T. Azuma, B. Nair, and D. E. Berg.** 2000. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J. Bacteriol.* **182**:3219-3227.
42. **NIH Consensus Conference.** 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA.* **272**:65-69.
43. **Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* **287**:1497-1500.
44. **Ohtani, M., T. Azuma, S. Yamazaki, A. Yamakawa, Y. Ito, A. Muramatsu, M. Dojo, Y. Yamazaki, and M. Kuriyama.** 2003. Association of the HLA-DRB1 gene locus with gastric adenocarcinoma in Japan. *Dig. Liver Dis.* **35**:468-472.
45. **Pan, Z., D. E. Berg, R. W. M. van der Hulst, W. Su, A. Raudonikiene, S. Xiao, J. Dankert, G. N. J. Tytgat, and A. van der Ende.** 1998. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J. Infect. Dis.* **178**:220-226.
46. **Parsonnet, J., G. P. Friedman, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelman, N. Orentreich, and R. K. Sibley.** 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **325**:1127-1131.
47. **Parsonnet, J., G. P. Friedman, N. Orentreich, and J.H. Vogelman.** 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* **40**:297-301.
48. **Peek, R. M., S. F. Moss, K. T. Tham, G. I. Perez-Perez, S. Wang, G. G. Miller, J. C. Atherton, P. R. Holt, and M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori* *cagA*<sup>+</sup> strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**:863-868.
49. **Phadnis, S. H., D. Ilver, L. Janzon, S. Normark, and T. U. Westblom.** 1994. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**:1557-1565.
50. **Rokkas, T., S. Ladas, C. Liatsos, E. Petridou, G. Papatheodorou, S. Theocharis, A. Karameris, and S. Raptis.** 1999. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig. Dis. Sci.* **44**:487-493.
51. **Segal, E.D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:14559-14564.
52. **Selbach, M., S. Moese, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2002. Src is the kinase of *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **277**:6775-6778.
53. **Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci.** 2000. Tyrosine phosphorylation of the

- Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**:1263-1268.
54. **Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenback, R. Rappuoli, W. J. Fantl, and A. Covacci.** 2002. c-Src/Lyn kinases active *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. Mol. Microbiol. **43**:971-980.
  55. **Sugiyama, A., F. Maruta, T. Ikeno, K. Ishida, S. Kawasaki, T. Katsuyama, N. Shimizu, and M. Tatematsu.** 1998. *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in Mongolian gerbil. Cancer Res. **58**:2067-2069.
  56. **Tee, W., J. R. Lambert, and B. Dwyer.** 1995. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. J. Clin. Microbiol. **33**:1203-1205.
  57. **The Eurogast Study Group.** 1993. An association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet. **341**:1359-1362.
  58. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzegerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelly, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Wathley, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. **388**:539-547.
  59. **Tummuru, M. K., S. A. Sharma, and M. J. Blaser.** 1995. *Helicobacter pylori* *picB*, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. Mol. Microbiol. **18**:867-876.
  60. **Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R. J. Schlemper.** 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N. Engl. J. Med. **345**:784-789.
  61. **van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, S. Pena, P. Midolo, E. K. Ng, J. C. Atherton, M. J. Blaser, and W. G. Quint.** 1998. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. J. Clin. Microbiol. **36**:2597-2603.
  62. **van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, A. Plaisier, P. Schneeberger, W. de Boer, and W. G. Quint.** 1998. Clinical relevance of *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. **115**:58-66.
  63. **van Doorn, L. J., C. Figueiredo, F. Megraud, S. Pena, P. Midolo, D. M. Queiroz, F. Carneiro, B. Vanderborght, M. D. Pegado, R. Sanna, W. De Boer, P. M. Schneeberger, P. Correa, E. K. Ng, J. Atherton, M. J. Blaser and W. G. Quint.** 1999. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. **116**:823-830.
  64. **Warren, J.R. and B. J. Marshall.** 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. **1**:1273-1275.
  65. **Watanabe, T., M. Tada, H. Nagai, S. Sasaki, and M. Nakao.** 1998. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. Gastroenterology. **115**:642-648.

- obacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**:94-98.
67. **Yamaoka, Y., T. Kodama, K. Kashima, D. Y. Graham, and A. R. Sepulveda.** 1998. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2258-2263.
  68. **Yamaoka, Y., H. M. El-Zimaity, O. Gutierrez, N. Figura, J. G. Kim, T. Kodama, K. Kashima, D. Y. Graham, and J. K. Kim.** 1999. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology.* **117**:342-349.
  69. **Yamaoka, Y., M. S. Osato, A. R. Sepulveda, O. Gutierrez, N. Figura, J. G. Kim, T. Kodama, K. Kashima, and D. Y. Graham.** 2000. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries. *Epidemiol. Infect.* **124**:91-96.
  70. **Yamaoka, Y., E. Orito, M. Mizokami, O. Gutierrez, N. Saitou, T. Kodama, M. S. Osato, J. G. Kim, F. C. Ramirez, V. Mahachai, and D. Y. Graham.** 2002. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett.* **517**:180-184.
  71. **Yamazaki, S., A. Yamakawa, Y. Ito, M. Ohtani, H. Higashi, M. Hatakeyama, and T. Azuma.** 2003. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* **187**:334-337.
  72. **Yu, D., C. Qu, O. Henegariu, X. Lu, and G. Feng.** 1998. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J. Biol. Chem.* **273**:21125-21131.
  73. **Zhou, W., S. Yamazaki, A. Yamakawa, M. Ohtani, Y. Ito, Y. Keida, H. Higashi, M. Hatakeyama, J. Si, and T. Azuma.** 2004. The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**:81-87.

## 論文目録

1. **Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M.** Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*. 130 (4): 1181-90, 2006.
2. **De Guzman BB, Hisatsune J, Nakayama M, Yahiro K, Wada A, Yamasaki E, Nishi Y, Yamazaki S, Azuma T, Ito Y, Ohtani M, van der Wijk T, den Hertog J, Moss J, Hirayama T.** Cytotoxicity and recognition of receptor-like protein tyrosine phosphatases, RPTPalpha and RPTPbeta, by *Helicobacter pylori* m2 VacA. *Cell Microbiol*. 7 (9): 1285-1293, 2005.
3. **Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, Yamazaki Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T.** Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J Clin Microbiol*. 43 (8): 3906-3916, 2005.
4. **Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, Yamazaki Y, Yamakawa A, Tokudome S, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T.** Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 44 (3): 261-268, 2005.
5. **Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, Tatematsu M.** *Helicobacter pylori*-dependent NF-kappa B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci*. 96 (3): 170-175, 2005.
6. **Azuma T, Kato S, Zhou W, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Fujiwara S, Minoura T, Iinuma K, Kato T.** Diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in Japanese children. *Aliment Pharmacol Ther*. 20 Suppl 1: 7-12, 2004.
7. **Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Ohtani M, Ito Y, Muramatsu A, Suto H, Yamazaki Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M.** Distinct diversity of the *cag* pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol*. 42 (6): 2508-2517, 2004.
8. **Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Muramatsu A, Suto H, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M.** Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis*. 189 (5): 820-827, 2004.
9. **Zhou W, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Ito Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M, Si J, Azuma T.** The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 40 (1): 81-87, 2004.
10. **Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Dojo M, Yamazaki Y, Higashi H, Hatakeyama M.** The effects of cure of *Helicobacter pylori* infection on the signal transduction of gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther*. Suppl 1: 39-44, 2003.
11. **Ohtani M, Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Muramatsu A, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M.** Association of the HLA-DRB1 gene locus with

- gastric adenocarcinoma in Japan. *Dig Liver Dis.* 35 (7): 468-472, 2003.
12. **Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T.** The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J Infect Dis.* 187 (2): 334-337, 2003.
  13. **Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M.** Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis.* 186 (11): 1621-1630, 2003.
  14. **Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M.** Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (22): 14428-14433, 2002.