

文 献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.
- 2) Fumoto M, Miyazaki S and Sugawara H: Genome Information Broker (GIB): data retrieval and comparative analysis system for completed microbial genomes and more. *Nucleic Acids Research* 30: 66-68, 2002.
- 3) Goto K, Miyazaki S and Sugawara H: Genome Information Broker for Data Retrieval and Comparative Analysis of Microbial Genomes. *Journal of Japan Society of Information and Knowledge* 10: 4-13, 2001.
- 4) Miyazaki S, Hashimoto H, Shimada A, Tateno Y and Sugawara H: A New File Format and Tools for the Large-Scale Data Submission to DNA Data Bank of Japan (DDBJ). In: Miyano S, Shamir R and Takagi T (eds) *Currents in Computational Molecular Biology*. Universal Academy Press, Inc., Tokyo, pp60-61, 2000.

2 *Helicobacter pylori* の病原性因子と胃十二指腸疾患

山岡 吉生・David Y. Graham

ベイラー医科大学内科

Virulence Factors of *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Disease

Yoshio YAMAOKA and David Y. GRAHAM

Department of Medicine, Baylor College of Medicine

Abstract

Approximately 20 % of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-infected individuals develop clinically significant diseases such as peptic ulcer, gastric adenocarcinoma or gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. It is unknown which bacterial, host, and environmental factors are the critical determinants that predispose to these clinical manifestations of *H. pylori* infection. Host factors that influence acid secretion are potentially good candidates as factors that influence the outcome of an *H. pylori* infection. The proinflammatory cytokine, interleukin (IL)-1 β , is a candidate in this regard in that it is expressed in the gastric mucosa infected with *H. pylori*. Here we show that IL-1 genetic polymorphisms influenced *H. pylori*-related gastric mucosal IL-1 β levels and were related to gastric inflammation and atrophy, factors thought to be important in gastric carcinogenesis. Experience with other bacterial pathogens suggests that *H. pylori* strain specific factors also influence the pathogenicity of *H. pylori* as well as the risk of developing different *H. pylori*-related diseases. We show that the number of repeats in the 3' region of the

Reprint requests to: Yoshio YAMAOKA

Department of Medicine

Baylor College of Medicine

VAMC (111D), Medicine/GI

2002 Holcombe Blvd.,

Houston, TX 77030 USA

cagA gene was closely related to gastric atrophy and gastric cancer, and the *oipA* functional status was closely related to clinical presentation, *H. pylori* density and gastric inflammation.

Key words: *Helicobacter pylori*, interleukin - 1, *cagA*, *oipA*

はじめに

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染により胃粘膜に炎症が引き起こされることは広く認められており、最近では消化性潰瘍さらには胃癌や MALToma (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) までが *H. pylori* による感染症として考えられるようになってきた。しかし重要なことは *H. pylori* に感染した人すべてが消化性潰瘍や胃癌になるのではない。その病態には宿主側の要因、感染期間、環境因子などに加え、多様な菌側の病原因子が関与していると考えられる。今回は、宿主側の要因として最近注目されているインターロイキン 1 遺伝子の遺伝子多型、および現在研究の進んでいる菌側の病原因子について、問題点を含め、最新知見を紹介する。

宿主側因子

ヒトの DNA 配列には個人差があり、例えばわずか 1 塩基の違いがあればアミノ酸組成が変化し、蛋白質の機能に個人差が起こりうる事が明らかにされている。この個人差は遺伝子多型と呼ばれ、最近炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン (IL) - 1 遺伝子の遺伝子多型について興味深い報告がなされた。El-Omar らは *IL-1B* 遺伝子の転写開始部位から - 511 番目の塩基にシトシン-チミンの置換による多型が存在し、さらに *IL-1* リセプターアンタゴニスト遺伝子の第 2 イントロンに 86 bp の繰り返しによる多型が存在していることに注目し、*IL-1* 遺伝子の - 511 番目が T-T のホモの場合、胃癌の相対危険率が正常人に比べ 2.6 倍に、さらに *IL-1* リセプターアンタゴニスト遺伝子の多型部位の繰り返しが 2 回のホモの場合には胃癌の相対危険率が 3.7 倍に高くなると報告した¹⁾。

ただしこれは欧米人を対象にしており、われわれが日本人 116 名調べたところ、表 1 のように遺伝子多型と病気との関連は認めなかった。特に *IL-1* リセプターアンタゴニスト遺伝子 2-2 タイプは 1 例も存在しなかった。しかし *IL-1* 遺伝子多型と実際の胃粘膜からの *IL-1 β* 産生量を調べると興味深い結果がでた。すなわち *H. pylori* 菌感染者における胃粘膜中の *IL-1 β* 産生量と *IL-1B-511* 遺伝子多型との関連を調べたところ、T/T タイプの人は胃前庭部・胃体部ともに有意に T/C や C/C タイプの人より *IL-1 β* 産生量が亢進していた。さらに *IL-1* リセプターアンタゴニスト遺伝子では、1-2 タイプの人は 1-1 タイプの人に比べ有意に *IL-1 β* 産生量が亢進していた。さらに遺伝子多型と胃粘膜組織との関連を重回帰分析で調べたところ、*IL-1B* 遺伝子の多型は炎症性細胞浸潤と、さらに *IL-1* リセプターアンタゴニスト遺伝子の多型は胃粘膜萎縮と関連があることがわかった。

以上の結果より、*IL-1* の遺伝子多型が胃粘膜障害に何らかの関与をしていることは間違いないと考えられる。*IL-1B-511*T/T、*IL-1* リセプターアンタゴニスト遺伝子の繰り返し配列が 2 回の場合に、*H. pylori* 感染に伴う *IL-1 β* 産生が亢進し、*IL-1 β* には胃酸の分泌を抑制する作用があることから、胃粘膜萎縮が進むと考える話はある程度筋が通っている。ただし、*IL-1B* 遺伝子の多型と *IL-1* リセプターアンタゴニスト遺伝子の多型に異なった役割がある可能性や、最終的にこれらの遺伝子多型が胃癌にまで関与するか、という点に関して今後の検討が必要と思われる。

菌側の病原因子

1. *cagA* 遺伝子

現在もっとも研究の進んでいる病原性遺伝子が

表1 遺伝子多型と疾患との関係(日本人での検討)

疾患	数	<i>IL-1B-511</i>			<i>IL-1RN</i>		
		T/T n (%)	T/C n (%)	C/C n (%)	*1/*1 n (%)	*1/*2 n (%)	*1/*3 n (%)
胃がん	19	2 (11)	8 (42)	9 (47)	19 (100)	0	0
十二指腸潰瘍	34	7 (20)	21 (62)	6 (18)	29 (85)	4 (12)	1 (3)
胃潰瘍	30	5 (17)	18 (60)	7 (23)	29 (97)	1 (3)	0
胃炎	28	4 (14)	12 (43)	12 (43)	24 (86)	4 (14)	0
MALT	2	1 (50)	0	1 (50)	2 (100)	0	0
胃腺腫	4	1 (25)	3 (75)	0 (0)	4 (100)	0	0

表2 日本人由来株における *cagA* 遺伝子繰り返し配列と疾患

EASR 回数	慢性胃炎 (n = 50)	胃潰瘍 (n = 40)	十二指腸潰瘍 (n = 35)	胃癌 (n = 30)
1	50	38	35	24
2	0	2	0	6

(Yamaoka Y *et al.*, 1998²⁾ より改変引用)

cagA であり, 1993 年にクローニングされた. *H. pylori* には *cagA* の存在する株と存在しない株が存在し, *cagA* の存在する株は存在しない株に比べ, 病原性が強いと考えられている. ただしわが国を含めた東アジアでは, *cagA* 陽性の株が 90 - 100 % と大半を占め, *cagA* 遺伝子の有無のみで病態の違いを説明することは困難である.

CagA 蛋白の分子量は 120 - 150 K と様々であるが, *cagA* 遺伝子の後半部分には繰り返し配列が存在し, その繰り返し数によって分子量に差が生じると考えられている. われわれはその部位に注目し, 繰り返し配列の塩基配列を検討した²⁾⁻⁶⁾. その結果, 繰り返し配列には 2 種類存在することがわかり, しかも 2 番目の繰り返し配列は, 東アジア由来の菌と, アジア以外由来の菌で全く異なっていた²⁾⁻⁶⁾. 東アジア由来菌では, 19 アミノ

酸からなる第 1 繰り返し配列 (First Repeat: FR) が存在した後, 54 アミノ酸からなる第 2 繰り返し配列 (East Asian Second Repeat: EASR) が続く. 一方アジア以外の菌では FR は同様であるが, 第 2 繰り返し配列 (Non - Asian Second Repeat: NASR) は 34 アミノ酸からなる.

第 2 繰り返し配列と病気との関連を調べたところ, 興味深いことに, 東アジア型 (EASR), 非アジア型 (NASR) とともに第 2 繰り返し配列が胃癌と関連を持つことがわかったのである. 日本人 155 人の検討では, 十二指腸潰瘍, 慢性胃炎例ではすべて EASR を 1 回しか持たなかったが, 胃癌例では 20 % に EASR を 2 回持つ菌がみられた (表 2). アメリカ合衆国およびコロンビア由来菌の検討では, 通常 NASR は 1 回であったが, 胃癌症例では NASR を 3 回以上持つ症例がやはり 20

表3 *cagA* 遺伝子第2繰り返し配列（NASR）と病理組織所見

	NASR 回数				p 値
	1	2	1 and 2	3 以上	
コロンビア (n=44)	n=24	n=8	n=6	n=6	
<i>H. pylori</i> 頻度	2.0	3.0	1.0	2.5	NS
細胞浸潤	2.0	3.0	3.0	2.0	NS
胃粘膜萎縮	1.5	2.0	4.0	4.0	<0.005
腸上皮化生	0	0	3.0	3.0	<0.005
アメリカ合衆国 (n=58)	n=43	n=3	n=6	n=6	
<i>H. pylori</i> 頻度	2.5	2.0	3.5	3.0	NS
細胞浸潤	3.0	3.0	2.5	2.5	NS
胃粘膜萎縮	2.0	2.5	2.5	4.0	<0.01
腸上皮化生	0	0	1.5	3.5	<0.005

スコア：0（無所見）～5（高度）で中間値を示す。

（Yamaoka Y et al., 1999³⁾ より改変引用）

%弱に認められ、これら NASR を 3 回以上持つ症例では、有意に胃粘膜萎縮、腸上皮化生の程度が高度であった（表3）。

さらにわれわれはこの第2繰り返し配列の機能を追求するため、*in vitro* で胃酸との関連を調べた。すなわち *H. pylori* を pH3 の高酸状態に短時間（20－30分）さらし、どの程度の菌が死滅するかを調べた。その結果、第2繰り返し配列が3回以上の菌では、それ以下の繰り返しの菌に比べ胃酸に対する抵抗力が弱いという結果がでた²⁾。

第2繰り返し配列自体が胃粘膜萎縮を誘導するというより、胃酸分泌の少ない萎縮性胃炎の進行した状態（胃癌など）でしか、繰り返しを多く持つ *H. pylori* が生きられないということなのかも知れない。この仮説では、繰り返しの多い菌の悪性度が強いとはいえないが、繰り返し回数が胃癌の新しいマーカーになることは間違いない。最近この繰り返し配列にはチロシンリン酸化部位が存在することが報告され、CagA 蛋白のリン酸化が最近注目を浴びている。*H. pylori* が細胞に接すると、後述する *cag* pathogenicity island (PAI) によって CagA 蛋白が細胞内に注入され、宿主のリン酸化酵素（SHP-2 など）によってリン酸化を受けると考えられている。リン酸化された CagA 蛋白が細胞内で実際にどのような役割を果たすかについては今後検討が必要であろう。

さて、*H. pylori* の研究においては、病気との関連のみならず、人類の進化を調べるという広大なテーマについても手を伸ばすことが可能になる。特に *cagA* の繰り返し配列が、東アジアと非アジアで異なる点は非常に興味深いと考え、われわれは、世界中の菌における *cagA* の繰り返し配列を調べた⁶⁾。ウイトトスというアマゾンのジャングルに住むネイティブアメリカン人からの菌も調べることができた。彼らは、ヨーロッパからわたってきた現代人との接触のほとんどない種族である。東アジア菌の繰り返し配列を 1a 型、非アジア菌の繰り返し配列を 2a 型とすると、その境界はタイあたりにあり、非アジアの国は、新大陸の現代人を含め、すべて 2a 型であった。ところが、興味深いことに、アマゾンのジャングルに住む人の菌はすべてというわけではないが、非常に特徴的な配列をしていた。これらは 1a 型、すなわち東アジア型に似ているが、全く同一というわけではなく、われわれは 1b 型と名づけた。この事実より、彼らが数万年前にベーリング海峡を渡って新大陸に来た際にすでに *H. pylori* は存在しており、その後数万年を経てアジア型類似の新しいタイプに進化したと結論づけることができた。このように *H. pylori* の研究は、病気との関連のみにとどまらず、さらにその範囲を広げることが可能である。

2. *cag* PAI

cag PAI は *cagA* 遺伝子を含む全長約 40 kbp の 30 以上からなる遺伝子群で、一種の注射器のような役割をしており、これにより CagA 蛋白が細胞内に注入されると考えられる。このような仕組みをタイプIV分泌機構と呼んでいる。*in vitro* の検討で、*cag* PAI 内のいくつかの遺伝子 (*cagB*, *C*, *D*, *E*, *G*, *H*, *I*, *L*, *M* など) に人工的に変異導入した変異株を作成すると、胃癌細胞株からの IL-8 産生が有意に低下することが知られている⁶⁾。ただし *cagA* 遺伝子を人工的に変異させても IL-8 産生能には変化がなく、*cagA* 自体は IL-8 産生には関係がない。われわれは *in vivo* の検討でも、*cag* PAI 陽性菌に感染した場合は陰性菌に感染した場合に比べて、IL-8 をはじめとする C-X-C ケモカインの胃粘膜における産生が亢進していることを証明している^{7) - 10)}。IL-8 は多核白血球の強力な誘導活性化因子であり、T リンパ球に関しても同様の作用を持っており、多核白血球や単核球の浸潤を特徴とする *H. pylori* 起因性胃炎の組織所見によく合致している。

3. *oipA* 遺伝子

以前われわれは低分子量抗原 (33 - 35K) に対する抗体が十二指腸潰瘍症例で有意に発現していることを報告した¹¹⁾。さらにこの低分子量抗原の存在が胃体部における IL-8 産生に関与していることを証明した。胃癌細胞株を用いた検討では、死菌には IL-8 誘導能はみられず、生菌しかも菌と上皮細胞が接着する条件が必要であると考えられている。したがってわれわれは *cag* PAI 以外の IL-8 誘導物質の候補として表面関連抗原、特に外膜蛋白に注目した。*H. pylori* の外膜蛋白で 33 - 35 K の範囲にあるのは HP0638 と HP0796 である。それぞれの遺伝子を人工的に欠損させた変異株を作成し、胃癌細胞株からの IL-8 産生能を調べることにより HP0638 に IL-8 誘導能がみられることを見だし、われわれは outer membrane protein (*oipA*) 遺伝子と名付けた¹²⁾。*oipA* 遺伝子のシグナル領域には CT の繰り返し配列があり、slipped strand repair 機構により、フレーム

シフトが起こり産生蛋白の抗原性を規定している。すなわち CT の繰り返し数により、スイッチの “on”, “off” が起こり、“on” の場合に機能的 *OipA* が産生されると考えられる。われわれは日本、アメリカ合衆国、コロンビア由来の株で CT の繰り返し数を調べたが、日本の株ではきちんとした繰り返しを形成せず、全例で “on” の状態であった¹²⁾。一方アメリカ合衆国、コロンビアの株では興味深いことに十二指腸潰瘍症例では有意に “on” の状態が高頻度であった。さらに多変量解析を行い、*cag* PAI, *vacA*, *iceA*, *babA*, *oipA* という *H. pylori* の病原性遺伝子の候補のなかで、どの因子がもっとも十二指腸潰瘍に関連があるかを調べたところ、*oipA* の “on” 状態のみが、十二指腸潰瘍と関連していた¹³⁾。さらに好中球浸潤さらには胃内の菌量も *oipA* の “on” 状態のみが関連していた。さらに興味深いことに、“on” の状態は、*cag* PAI 陽性、*vacA* s1, *babA*2 陽性と強くリンクしていた。今後 *oipA* が新しい病原因子の一つとなることは間違いない。

ま と め

以上、インターロイキン1遺伝子の遺伝子多型および菌側の病原因子について概説した。インターロイキン1遺伝子の遺伝子多型も病態と関連があることは事実であるが、今後は他の宿主側の因子についても遺伝子多型を研究しなければいけない。さらに *oipA* “on” の菌は “off” の菌に比べ病原性が強いことは明らかであるが、*oipA* 単独ですべての病態を説明できるとは考えていない。これらの宿主側、菌側の因子を総合的に考えることが、*H. pylori* による胃粘膜病理の解明につながるものと考えられる。

文 献

- 1) El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KEL, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr and Rabkin CS: Interleukin-1

- polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404: 398 - 402, 2000.
- 2) Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY and Sepulveda AR: Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from different *H. pylori* associated diseases. *J Clin Microbiol* 36: 2258 - 2263, 1998.
 - 3) Yamaoka Y, El-Zimaity HMT, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, Kashima K and Graham DY: Relationship between subtypes of the *cagA* 3' repeat region, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 117: 342 - 349, 1999.
 - 4) Yamaoka Y, Osato MS, Sepulveda AR, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, Kashima K and Graham DY: Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non - Asian countries. *Epidemiol and Infect* 124: 91 - 96, 2000.
 - 5) Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, Osato MS, Kim JG, Ramirez FC, Mahachai V and Graham DY: *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS letter* 517: 180 - 184, 2002.
 - 6) Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R and Covacci A: *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I - specific and disease - associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14648 - 14653, 1996.
 - 7) Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N and Imanishi J: *Helicobacter pylori cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 110: 1744 - 1752, 1996.
 - 8) Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K and Imanishi J: Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene-positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* 41: 442 - 451, 1997.
 - 9) Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K and Imanishi J: Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 42: 609 - 617, 1998.
 - 10) Yamaoka Y, Kodama T, M Kita, J Imanishi, Kashima K and Graham DY: Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin - 1 β and - 8 production and *cagA* status. *Gut* 45: 804 - 811, 1999.
 - 11) Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY and Kashima K: Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low molecular weight (33 - 35K) antigen. *Dig Dis Sci* 43: 1482 - 1487, 1998.
 - 12) Yamaoka Y, Kwon DH and Graham DY: A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7533 - 7538, 2000.
 - 13) Yamaoka Y, Kikuchi S, El - Zimaity HMT, Gutierrez O, Osato MS and Graham DY: Importance of *Helicobacter pylori* OipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin - 8 production. *Gastroenterology* 123: 414 - 424, 2002.