



# 胃悪性リンパ腫を誘導するヘリコバクター属細菌の病原性遺伝子の解析（助成研究報告）

三木， 生也

---

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 25:81-82

(Issue Date)

2009-08

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81006740>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81006740>



# 「胃悪性リンパ腫を誘導する ヘリコバクター属細菌の病原性遺伝子の解析」

神戸薬科大学 医療薬学研究室

三木 生也 (平成9年卒)

## I はじめに

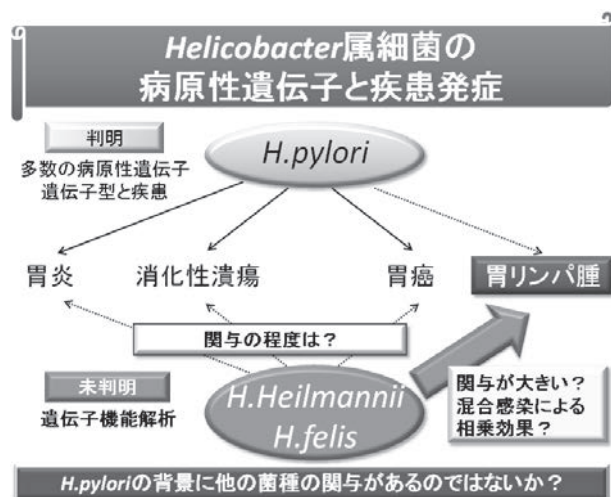
*Helicobacter* 属細菌はグラム陰性桿菌で、現在約30種類が知られている。中でも *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) は、胃粘膜に定着し、胃炎、消化性潰瘍、胃癌、胃 MALT 型リンパ腫を発症させることが知られており、遺伝子機能解析が進んでいる。一方、*H.pylori* 同様、胃内感染により類似病態をきたす細菌として、*H.heilmannii* や *H.felis* が知られているが、これらの遺伝子学的な報告は極めて少ない。*H.heilmannii* ならびに *H.felis* は、イヌ、ネコ、ブタなどのペットや家畜における感染が広く確認されており、ヒトにおいても感染することが報告されており、人畜共通感染症として認識されている<sup>1), 2)</sup>。*H.pylori* に比べヒトに関する報告は極めて少ないものの、既報によれば、*H.heilmannii* は、ヒト胃粘膜においては、*H.pylori* と同様に慢性胃炎や胃癌を来すこと<sup>3)</sup>、<sup>4)</sup>、胃 MALT 型リンパ腫患者からも検出され、その発症率は *H.pylori* 感染者に比較し2倍以上高いことが報告されている<sup>5)</sup>。さらに近年、動物モデルとしてカニクイザルから分離された *H.heilmannii* をマウスに感染させることにより数か月で胃 MALT 型リンパ

腫を誘導できるマウスモデルも開発された<sup>6)</sup>。現在のところ *H. heilmannii* の培養ならびに診断方法は確立されておらず、その感染診断は、組織切片中の大型のらせん状形態を示す細菌の存在をもとに行われている<sup>7)</sup>。しかし、*H.pylori* の場合で指摘されているように鏡検による診断では疑陰性がしばしばあること、*Helicobacter* 属細菌間の区別が困難な場合があること、さらにはモノクローナル抗体も存在しないため臨床的な感染実態も不明で、培養不能なため遺伝子学的研究も進んでいない。一方、*H.felis* においても、マウスでの1年以上の長期感染モデルにおける胃 MALT 型リンパ腫の発生が確認されているが<sup>8)</sup>、ヒトにおける感染サーベイランスや発癌との関係はほとんど分かっていない。そこで *H.heilmannii*、*H.felis* の病原性遺伝子を全ゲノム配列が解明されている *H.pylori* で判明している各種病原性遺伝子<sup>9)</sup>と比較することで推定し、疾患発症に関わる病原性遺伝子の解析を行うことを計画した。遺伝子比較機能解析により、ヒトにおける感染診断法の確立や胃 MALT リンパ腫等の上部消化管疾患の病態解明につながることを期待される。これらの研究は、未確立の *Helicobacter* 属細菌の診断法の開発、新規治療法の探索ならびに疾病予防への可能性につながると期待される。現在、順次解析中であるが、今報告ではその一部として、ウレアーゼ (ure) 遺伝子群についての解析結果を報告する。

## II 方法

### 1. 解析サンプル

*H.felis*、*H.heilmannii* は、鏡検による形態学的に確認を行った。また、既報にある16S rRNA の塩基配列と比較するため、16S rRNA のPCRとダイレクトシーケンスによる *Helicobacter* 属細菌の系統解析を行い、それぞれの菌種を同定し、解析対象がそれぞれ *H.heilmannii*、*H.felis* であることを最初に確認した。



## 2. DNA の抽出

*H.felis* は培養法が確立されているため、細菌からの DNA 抽出法の一般的な方法を行った。一方、*H.heilmannii* は、培養が困難であり、マウスの胃内での継代をしており、胃粘膜ホモジナイズ液から密度勾配法等にて精製した後に DNA 抽出を行った。

## 3. ure 遺伝子群の解析

*H.felis*, *H.heilmannii* において、塩基配列の判明している *H.pylori* をベースに作成した各種プライマーにより PCR を行い、ダイレクトシークエンス、もしくは各種 ure 遺伝子を断片ごとにクローニングの上でシークエンスを行った。この方法で完遂できない場合には、解読可能であった配列をベースとして、未知の周辺遺伝子を inverse PCR, cassette PCR を併用し、primer walking によってカバーすることとした。

## Ⅲ 結果と考察

いずれの菌も ureA, ureB の部分配列のシークエンスは可能であったが、それ以外の ure 遺伝子では困難であったため、inverse PCR, cassette PCR を併用した。*H.felis* に関しては、*H.pylori* 類似の ure 遺伝子群の存在が確認可能であった (ureA,B,I,E,F,G,H)。*H.pylori* との ure 遺伝子群との塩基配列の相同性は約 75% であった。*H.heilmannii* に関しては、ureA, B 以外の解析は、非特異的反応が排除できず、この方法ではこれ以上の解析が困難であった。現在、精製方法の再検討と、判明部分をプローブとしてゲノムライブラリーからの検出による解析を行っている。

## Ⅳ まとめ

胃 MALT 型リンパ腫の発症メカニズム解明の糸口の一つとして、疾患発症動物モデルが確立しており人畜共通感染症であることが判明している *Helicobacter* 属細菌の病原性遺伝子を検討した。今回は設立間もない研究室でも可能な古典的方法によるアプローチを試みた。今報告では、公表前であるためデータの一部として ure 遺伝子群の解析経過のみを報告したが ure 遺伝子群以外にも *H.pylori* において重要な役割を果たしている病原性遺伝子との類似配列が順次確認されつつあり、現在、組み換えタンパクを用いた検討も進めている。これまでは動物モデルによる疾患の発症という現象だけが一人歩きしていたが、疾患発症へのカギとなる遺伝子の探索、*H.pylori* との相違についてさらに検討をさらに進めていく予定である。遺伝子機能解析をさらに進めていくことにより、ヒトでの感染サー

ベイランスだけでなく、胃 MALT 型リンパ腫等の上部消化管疾患と *Helicobacter* 属細菌との発症メカニズムの解明つながることが期待される。

## 文 献

- 1) Svec A, Kordas P, Pavlis Z, et al (2000) : High prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated gastritis in a small, predominantly rural area: further evidence in support of a zoonosis? Scand J Gastroenterol 35: 925-8,
- 2) Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, et al. (2005) : Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. J Clin Microbiol 43: 2256-60
- 3) Heilmann KL, Borchard F. (1991) : Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. Gut 32: 137-40
- 4) Ierardi E, Monno RA, Gentile A, et al. (2001) : *Helicobacter heilmannii* gastritis: a histological and immunohistochemical trait. J Clin Pathol 54:774-7
- 5) Morgner A, Lehn N, Andersen LP, et al (2000) : *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. Gastroenterology, 118:821-828
- 6) Nakamura M, Murayama M, Serizawa H, et al. (2007) : Candidatus *Helicobacter heilmannii* from a cynomolgus monkey induces gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas in C57BL/6 mice. Infect Immun. 75:1214-22
- 7) Singhal AV, Sepulveda AR. (2005) : *Helicobacter heilmannii* gastritis: a case study with review of literature. Am J Surg Pathol 29: 1537-9
- 8) Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, et al. (2005) : Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. J Clin Microbiol 43: 2256-60
- 9) Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al (1997) : The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, 388:539-47.