

# アジアにおけるヘリコバクター・ピロリ菌の分子疫学研究

実施予定期間：平成21年度～平成23年度

代表機関：大分大学

代表者：藤岡 利生

国内参画機関：大分大学

代表者：藤岡 利生

国外参画機関：台湾・高雄医学大学

代表者：Wen-Ming Wang

国外参画機関：ベトナム・ホーチミン医科大学

代表者：Hoang Hoa Hai

国外参画機関：ベトナム・ハノイ医科大学

代表者：Mai Hong Bang

国外参画機関：タイ・チュラロンコン大学

代表者：Varocha Mahachai

## I. 概要

ベトナム、タイ、台湾との共同研究を展開し、各地でピロリ菌の遺伝型を詳細に解析して、胃癌発症に関わるピロリ菌の病原因子の同定と分子機構を解明する。さらに遺伝型を解析することで、人類学的なアジア諸国の諸民族のルーツを明らかにできるものと期待され、アジア各国の歴史、文化の研究に貢献する。

### 1. 研究の目的

ピロリ菌は人類に広く蔓延し、消化性潰瘍や胃癌を引き起こすが、地域によりその病原性が異なる。アジア、特に東アジアにおけるピロリ菌感染胃炎は欧米に比べて、重症な傾向があり、かつ胃癌の発症率も東アジアが圧倒的に高い。我々は各国のピロリ菌の遺伝子解析により欧米のピロリ菌とアジア諸国のピロリ菌ではその遺伝子型が異なること、さらにアジア各国の諸民族に感染しているピロリ菌の遺伝子型も必ずしも同一ではないことを明らかにしている。胃癌発症率はアジア諸国間でも大きく異なることから、ピロリ菌の遺伝子型の多様性がその病原性に影響している可能性が高く、ピロリ菌の遺伝子型の詳細な疫学調査により、同感染症に続発する胃癌発症リスクを最小化することができると思われる。

他方、我々はピロリ菌が人類とともに地球上を移動してきたことを証明しており、ピロリ菌の遺伝子型を解析・分類することによって、世界の諸民族がどのような経路をたどって移動してきたかを科学的に推測することができる。従って、ピロリ菌の分子疫学研究は、医学研究にとどまらず、人類学的な視点から広くアジアの諸民族の歴史を科学的な手法を用いて明らかにすることができ、アジア諸国に大きな貢献ができると考える。しかしながら、ピロリ菌の遺伝子型を解析するには、第一にピロリ菌を採取するための内視鏡検査が可能であること、第二に内視鏡的に採取した胃粘膜からピロリ菌を分離培養する技術が必要であること、第三にピロリ菌から抽出したゲノムを分子生物学的手法で解析する高度な技術が必要である。したがって、本課題の目的は、1) 大分大学のもつ高度なピロリ菌解析技術をアジア各国に移転することにより、アジア諸国に蔓延するピロリ菌の詳細な分子疫学調査を実現する。2) ピロリ菌の病原遺伝子を特定し、疾患の発症要因を解明することにより各国の医学および公衆衛生学の進歩に貢献する。3) ピロリ菌の遺伝子型の解析によって、アジア諸国の民族のルーツをたどる人類学的研究の発展に貢献すること

である。

### 2. ネットワーク構築の実現可能性

大分大学では、平成19年度より、概算要求特別教育研究経費「東アジアにおけるヘリコバクター・ピロリ感染と胃癌研究の拠点形成」を得て、すでに今回の国外参画機関すべてと共同研究を開始している。さらに参画研究者の山岡は、アメリカ滞在時より、タイのチュラロンコン大学 Mahachai 部長のグループおよび台湾の高雄医学大学 Wang 准教授のグループそれぞれとの共同研究（留学生の受け入れを含む）として、13論文を国際医学雑誌に発表している。これら3機関合同の共同研究も含まれ、すでに国外参画機関同士の研究者の交流も始まっていることは本研究を効果的に進める上で有効に作用すると考える。チュラロンコン大学ならびに高雄医学大学とは、本課題が受理された時点で速やかに協定を締結することが確約されている。また、大分大学はベトナムのハノイ医科大学、ホーチミン医科大学と大学間協定をすでに2008年に締結しており、留学生の受け入れも実現しており、国際医学雑誌の発表実績がある。

### 3. 本制度により取組を支援する必要性

本研究の目的は、単に技術供与や援助のみを目的としたものでなく、アジアの各研究機関との共同研究の実現によって、各機関の利点を活かして日本だけでは達成することが難しい成果を獲得し、もってアジアの風土病である胃癌の撲滅を目指し、さらにピロリ菌の遺伝子型の解析に基づく東アジアの諸民族のルーツを明らかにする人類学的な研究を実現することにある。このため、いわゆるODA・援助の枠組みに直ちに対応するのではなく、その成果を各関係国・機関にもフィードバックしていくことで、各関係国の人文社会科学も含めた学術および科学技術の向上に資することが期待されるものである。なお、他方で、ピロリ菌の遺伝子型を解析し比較することは、各国におけるピロリ菌の除菌等発症予防の新たな技術開発およびその公衆衛生普及の活動にも資するものであることから、将来の新たな開発協力発案の発掘にも結びつく可能性もあるものである。この観点から、日本側としては、プロジェクトの進捗によって、その成果を踏まえながら各国社会へのフィードバックの方策について、各共同研究機関と随時協議していくことを想定している。また、本研究は、営利を目的としたものでなく、あくまで学術的な交流を目指すものであることから、企業の採算に乗るものではなく、したがって産業界の開発ベースに直ちに乗るものではないことは明らかである。

大分大学は、文部科学省概算要求特別教育研究経費（実施期間：平成19年度から21年度、課題名：東アジアにおけるヘリコバクター・ピロリ感染と胃癌研究の拠点形成、代表者：藤岡利生、参画機関：大分大学）に採択されている。

特別教育研究経費では、大分大学にピロリ菌ならびに胃癌についての研究拠点を形成することを目的として、大分大学の研究者が東アジア諸国に出向き、採取した胃粘膜サンプルを大分大学に持ち帰り、研究を行うものであり、各国における研究者の育成、研究力の向上は十分でない。本課題ではこれを発展させ、世界最高峰の大分大学のピロリ菌解析技術を各国に移転し、地元の研究者を育成し、ピロリ菌研究海外拠点を形成することにより、さらに充実した疫学調査の実現を目指すものであり、共同研究を趣旨とす

る本制度への申請が適当であると確信する。

#### 4. 継続性の担保（特に課題期間終了後の取組）

大分大学は、アジア太平洋諸国すべてを包括した学会を主宰し、ネットワークを維持する。本研究代表者の藤岡は平成16年から平成21年3月まで、日本ヘリコバクター学会の理事長を務め、現在は本研究テーマとの関連が強い財団法人日本消化器病学会の理事も務めている。さらに、藤岡およびタイのチュラロンコン大学の Mahachai 部長は、現在世界最大のピロリ菌関連の学会である、ヨーロッパヘリコバクター学会（European Helicobacter Study Group EHSG）のヨーロッパ外顧問としてアジア地区からその運営に参画し、学会設立のノウハウを熟知している。また、山岡は感染症関連の国際誌「Journal of Medical Microbiology」「Gut Pathogens」さらには消化器病関連の国際誌「World Journal of Gastroenterology」の副編集委員長を務めており、強力な研究・情報発信体制を構築・推進するための十分なネットワーク構築のための人材が揃っている。

大分大学では、「基盤研究の維持と連携の推進」、「研究分野の重点化・大型プロジェクトの推進」、「競争的環境における研究体制の強化」、「社会に支持される科学研究推進・人材育成」、「国際的な研究の推進」、「学際融合的な研究の推進・人材育成」を押し進めるために研究組織「重点研究推進機構（仮称）」を平成22年4月設置予定であり、本提案課題終了後は本機構で本研究を継続的に進める。

#### 5. 我が国を中心としたアジア・アフリカ諸国等との政府レベルでの協力関係の強化・構築への発展性

本提案課題は、ピロリ菌感染に関する新たな診断・治療法をアジアから発信することとなり、現在我が国政府がODAを通じて推進しているアジア諸国の感染症対策・公衆衛生支援の取組みにも応えていくことが期待される。昨年3月にベトナムからの大学院博士課程レベルの留学生受入れの推進に関する政府間の覚書が取り交わされたが、大分大学ではその趣旨に従い、昨年秋に同国の関係大学との交流協定を既に締結したところである。このように本提案課題を通じて相手国側から大学院生を積極的に受け入れていくことは、政府のいわゆる「留学生30万人計画」の推進にも資することとなる。

感染症対策・公衆衛生の向上は、アジア諸国における喫緊の政策課題となっており、各政府は対策のための諸施策に取り組んでいるところである。本研究を通じて開発される感染症の新たな診断・治療法を、各政府が自国社会へフィードバックしたいニーズはきわめて高いものと想定される。海外参画機関は、いずれも当該国政府との緊密なパイプを有しており、本研究の成果を社会へフィードバックすることについて速やかに自国政府と協議・調整し、新たな開発協力の案件形成を行うことは可能であることから、本研究は将来の政府レベルでの開発援助に発展することが十分に期待される。

#### 6. 生命倫理・安全面への配慮について

内視鏡下のサンプル採取に関しては被験者の同意のもとに行ない、大分大学の倫理委員会の承認を得る。さらに内視鏡実施国の法の定める手続きを遵守する。

#### 7. 研究実施体制

##### a. 国外参画機関の役割分担

本研究に参加する3国では、それぞれ人材育成、研究設備、および研究技術のレベルが異なるため、役割分担も国

ごとに異なる。ベトナムでは、消化器内視鏡検査は実施可能であるが、人材育成に関しては、現在大分大学に留学生を受け入れて研究教育を実施しており、先進的な研究が実現可能となりつつある段階である。したがって当初は内視鏡の実施、ピロリ菌の分離培養までをベトナムで行い、菌株を大分大学に郵送する。タイのチュラロンコン大学では、内視鏡検査を実施する人材、設備は十分整備されており、分子疫学研究の実施能力は十分備わっている。ただし分子生物学的解析を実施するためのハード面が立ち後れており、当初は内視鏡の実施、菌の培養、さらにゲノムDNAを抽出して特定遺伝子をPCR法で増幅する段階まで彼らの研究費、人材を利用して実施する。その結果を大分大学に菌株、DNAとともに郵送する。台湾の高雄医学大学では、消化器内視鏡の実施、分子疫学研究を実施する人材、施設とも十分に整備されており、すぐに共同研究実施が可能である。ピロリ菌の遺伝型解析に関しても、新たに調べべき遺伝子や最新の解析方法について情報交換することで実験の実施が可能である。研究結果を共有すると共に、菌株、DNAは大分大学に郵送する。

以上それぞれの出発点は異なるが、本研究終了時には、全ての最新技術の移転と研究員の技術指導を実現し、各国のピロリ菌分子疫学が世界レベルに到達することを目指す。本研究をより効果的に推進するために、国外参画機関・日本研究者を一年につき、2~3名、それぞれ1~3か月間相互派遣を行う。国外参画機関における自立的な解析・研究を促進するため日本から研究者を派遣し技術支援を行う。特にベトナムから受け入れる研究者については、最低1~3年間の教育期間を確保する。

##### b. 代表機関を含む国内参画機関の役割分担

国内参画機関は大分大学のみである。大分大学の担う役割は、第一に、ピロリ菌のDNAデータベースの構築である。国外参画機関から郵送されたピロリ菌は、大分大学に保存されてある3000株と共に保存分離株バンクとして大分大学で管理される。さらに抽出DNAのデータベース構築を進める。第二に、主要病原遺伝子の解析およびMLST解析による人類学的研究である。ベトナムから郵送されたピロリ菌は、大分大学でDNA抽出され、タイおよび台湾からはDNAさらには特定遺伝子のPCR増幅産物が輸送される。まずは既知の病原遺伝子およびMLST用の遺伝子群の塩基配列を決定する。様々な疾患由来の遺伝子型を調べることにより、疾患特異部位を同定し、国外参画機関で用いることのできる可能な塩基配列を用いないタイピング法を確立する。第三に、未知の病原遺伝子の特定である。ピロリ菌の不特定領域に存在する50ほどの病原遺伝子候補の解析や網羅的ピロリ菌遺伝子発現アレイを用いた解析により新しい病原遺伝子を同定する。第四に、分子生物学的手法を駆使した病原因子の解析である。Wntシグナル解析など我々のもつ高度な手法を用いる。

以上の解析を、将来的には国外参画機関で独立して行えるようにすることが最終目的であり、すべての実験方法に関して、詳細なプロトコルを作成し、さらに当初は大分大学に国外参画機関の研究者を受け入れ、ピロリ菌解析のために必要な分子生物学的手法の習得を図る。

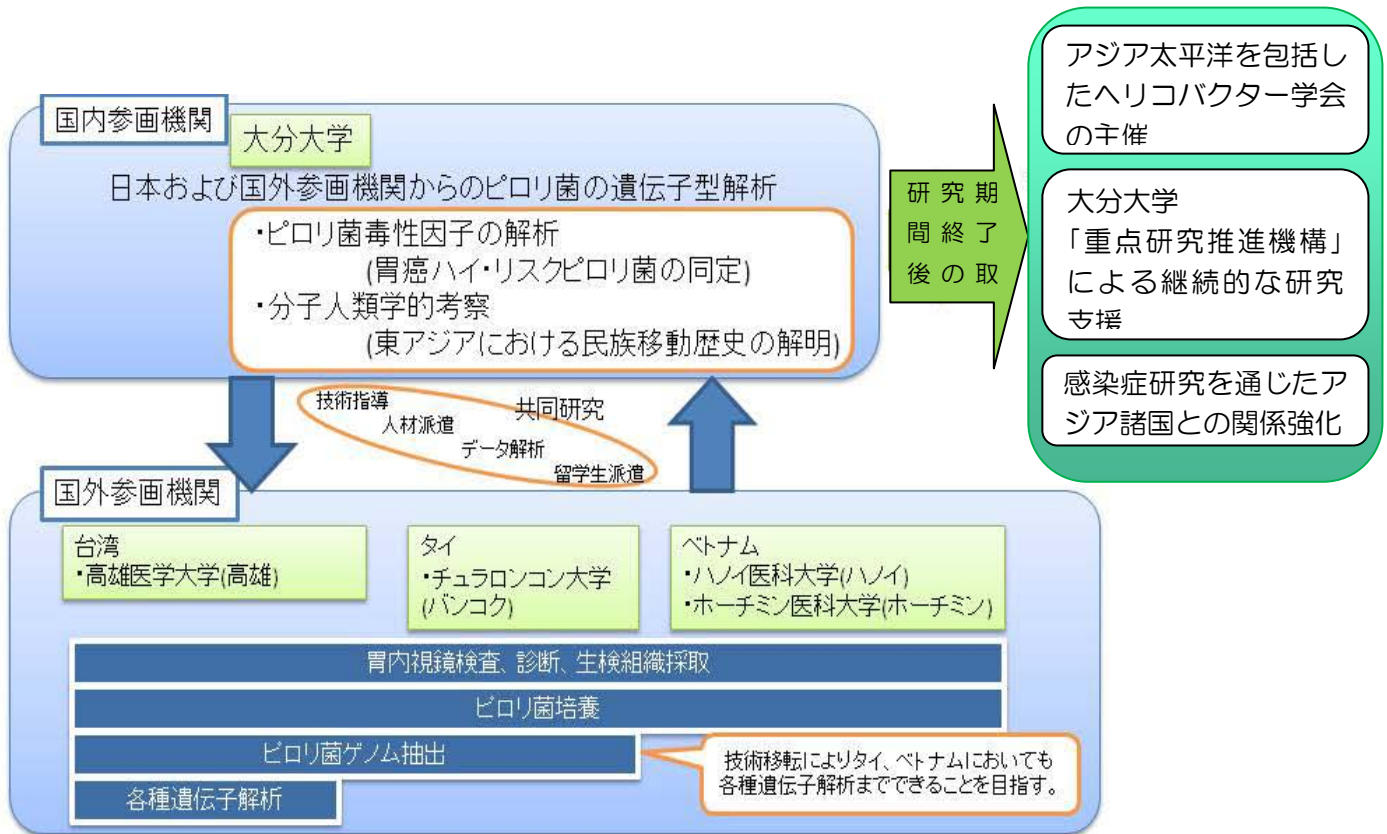
##### c. 責任体制及び機関間の連携を図る手法（研究の進め方、成果の共有方法）

国外参画機関・日本研究者による合同セミナー、ワークショップを少なくとも1年に1回開催し、研究方法やデータ解析について議論を行い、翌年度以降の効果的なプロジェクト遂行に役立てる。代表研究者の藤岡は平成16年に神戸で開催された第5回西太平洋ヘリコバクター会議の会長を主催、さらにタイのチュラロンコン大学の Mahachai 部長はバンコクで開催された第6回西太平洋ヘリコバク

一会議の会長を主催した経験を持つ。このような大規模の国際学会を主宰できる人的交流基盤確立とその手法をすでに備えている。そこで、アジアのリーダーとして共同研究の成果、さらには今後の研究交流拡大やアジア太平洋諸国の疾病対策等の国家的施策立案に際して参考となるための意味も込めて、アジア太平洋諸国すべてを包括した学

会を主宰する。参画研究者の山岡は、消化器病関連の国際誌「World Journal of Gastroenterology」の副編集委員長として特集号を担当しており、定期的に特集号を組んで成果を発表する場とする。特に国外参画機関の研究者や、学位取得を目指す若手研究者には国際学会で発表する機会を多く与え、論文を発表するように指導する。

## 【研究体制図】



氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
◎藤岡 利生	大分大学・理事	研究代表者
守山 正胤	大分大学医学部分子病理学講座・教授	ピロリ菌の遺伝子型の解析とピロリ菌による胃癌発症機構の解析
山岡 吉生	大分大学医学部環境予防医学講座・教授 (H. 21. 4. 01 就任予定)	アジア諸国のピロリ菌の遺伝子型の解析、ピロリ菌病原因子の機能解析
濱田 文彦	大分大学医学部生体構造医学講座・教授 (H. 21. 4. 01 就任予定)	ピロリ菌病原遺伝子産物の同定と機能解析
村上 和成	大分大学医学部総合診療科学講座・准教授	消化器内視鏡の実施と指導
内田 智久	大分大学医学部法医学講座・助教	ピロリ菌の疫学調査
沖本 忠義	大分大学医学部総合内科学第二講座・助教	消化器内視鏡の実施と指導
Wen-Ming Wang	高雄医学大学・教授	消化器内視鏡の実施とピロリ菌サンプルの収集、ピロリ菌遺伝子型の解析
Jeng-Yih Wu	高雄医学大学・講師	消化器内視鏡の実施とピロリ菌サンプルの収集、ピロリ菌遺伝子型の解析
Hoang Hoa Hai	ホーチミン医科大学・教授	消化器内視鏡の実施とピロリ菌サンプルの収集、疫学調査
Mai Hong Bang	ハノイ医科大学・教授	消化器内視鏡の実施とピロリ菌サンプルの収集、疫学調査
Varocha Mahachai	チュラロンコン大学消化器内視鏡センター・部長	消化器内視鏡の実施とピロリ菌サンプルの収集、ピロリ菌遺伝子型の解析

## 8. 各年度の計画と実績

### a. 平成 21 年度

#### ・計画

[代表機関]

#### (1) ピロリ菌の採取

(a) 国外参画機関(タイ、ベトナム、台湾)の研究代表者を大分大学に招聘し、会議を開催して、内視鏡検査によるサンプル採取のプロトコルを作成し、目標サンプル数と調査地域を決定する。さらにピロリ菌株の培養法、DNA 抽出法、各遺伝子の解析法ならびに MLST 解析法を決定する。

(b) ベトナムに関しては、内視鏡技術の指導のため村上、沖本がベトナムのホーチミン大学ならびにハノイ大学のスタッフとともに、サンプル採取する。タイと台湾に関しては、それぞれの施設でサンプル採取する。

#### (2) ピロリ菌の培養は会議で定められた実験プロトコルに従って実施する。

#### (3) ピロリ菌病原因子 (*cagA*, *oipA*, *dupA* など) の生物学的機能を解析する (濱田、山岡、守山)。

[国外参画機関]

台湾では研究設備、人員は充実しているため、21年度から、サンプルの収集、ピロリ菌の DNA の抽出、臨床情報の収集、病原遺伝子の解析を実施する。消耗品は必要に応じて支援する。タイでも同時期にサンプル収集を開始するが PCR 設備や消耗品を支援する。ベトナムに関しては、サンプル収集に関して、大分大学の担当者をベトナムに派遣し、支援する。また、ピロリ菌培養設備を支援し、方法を伝授する。ピロリ菌は大分大学に郵送し、ベトナム人留学生と担当者(内田、守山、山岡)が培養、解析する。

#### ・実績

[代表機関]

(1) 別府にて国際会議を開催、タイ、ベトナム、台湾の研究代表者、さらに実地に研究を行っている研究者も来日し、今後の計画を話し合った。さらに、韓国、中国からも研究者を招へいし、将来アジア全域を念頭にした研究計画を議論した。

その他についてもすべて計画通り遂行することができた。さらに一部の検体については、次世代シーケンサーを用いて、菌の全遺伝子配列を決定することができた。

[国外参画機関]

すべて計画通りに遂行することができた。

### b. 平成 22 年度

#### ・計画

[代表機関]

#### (1) ピロリ菌からのゲノム DNA の抽出 (各国で実施する)

#### (2) 抽出した DNA の一部はその臨床情報とともに大分大学に送る。

#### (3) 病原遺伝子の解析: PCR による遺伝子の構造解析とシーケンス解析 (タイ、台湾ではその一部をそれぞれの大学で実施する。ベトナムに関しては、大分大学に留学中の大学院生も参加して大分大学で解析する) (内田、守山、山岡)。

#### (4) MLST 解析を実施する (山岡)。

#### (5) 病原因子の機能解析は継続し (濱田、山岡、守山)、ベトナムからの留学生も参加する。

[国外参画機関]

台湾では、病原遺伝子解析ならびに MLST 解析を実

施する(研究担当者: Wang, Wu) が、データの解析状況については、大分大学(藤岡、山岡)と連携して進める。タイでは、抽出した DNA を用いて病原遺伝子解析を実施する。(研究担当者: Mahachai)。ベトナムについては、現在の留学生に加えてさらに留学生を受け入れ、大分大学で病原遺伝子解析ならびに MLST 解析を実施する。

#### ・実績

[代表機関]

#### (1) 国外参画機関(タイ、ベトナム、台湾)の研究者と個別会議

ベトナム消化器病学会の際に、第 3 回アジアヘリコバクター研究会議をハノイで 10 月 15 日に開催し、現在までの研究内容、結果について代表者の藤岡、参画研究者の山岡が発表、ベトナム側からもハノイ医科大学の Ta Long 教授がベトナムにおける発表成果を発表した。またヨーロッパ消化器病学会が開催される前日の 10 月 22 日に、参画研究者の山岡とチェラロンコン大学の Mahachai 教授と研究の打ち合わせを行った。さらにヨーロッパ消化器病学会の期間中には、山岡と高雄医学大学(台湾)の Wu 講師とも研究打ち合わせを行った。これらの会議、打ち合わせの結果、ベトナムでは、山岳民族の菌を採取する計画、台湾では、南部の離島に住む原住民から菌を採取する計画を進めることができた。またタイでは、チェラロンコン大学の研究者が隣国のカンボジア、ラオス、ミャンマーの研究者と交渉を開始、これらの国の菌を得られる公算が高いこともわかった。以上のように、最終年にむけて疫学研究をさらに発展させていくことで、国外参画機関との同意を得ることができた。

#### (2) ピロリ菌の遺伝子型の解析ならびにピロリ菌病原性の分子病理学的解明

内視鏡検査により得られたサンプルからピロリ菌株の培養、DNA 抽出、既知の病原遺伝子の解析ならびに MLST (Multilocus Sequence Typing) 解析を行った。その結果、各地で病原遺伝子には遺伝子配列に差があることが判明し、さらにある領域 (Plasticity region) にある遺伝子群が疾患と関連のあることがわかった。

#### (3) ピロリ菌感染者の疫学的調査とピロリ菌遺伝子型の解析

疫学調査で手に入れることができた検体は、ハノイ、ホーチミン、バンコク、タイ北部、タイ南部、台北、高雄およびブータンの菌であり、これらについては目的とする菌数を手に入れることが可能となった。さらに、アメリカのテキサス州ヒューストンのペイラー医科大学に保存されてある、バンコク、台湾原住民の菌体 DNA も手に入れ、さらにコントロールとしての、米国、コロンビアの菌体 DNA も手に入れることができた。これらを MLST で解析した。また当初の計画では、MLST のみを行う予定であったが、一部の菌については次世代シーケンサーに用い、全遺伝子解析を施行、現在解析中である。

[国外参画機関]

すべて計画通りに遂行することができた。

### c. 平成 23 年度

#### ・計画

[代表機関]

#### (1) ピロリ菌の病原遺伝子を特定し、さらに臨床情報

と統合して、病態（胃炎の程度、胃潰瘍の有無、胃癌の有無）と関連する遺伝子型ならびに新規病原因子を特定する（山岡、守山、村上）。

- (2) MLST 解析の結果と被験者の居住地域、人種（種族）などのデータと統合して、台湾、ベトナム、タイの諸民族のルーツを解明する（山岡、Mahachai, Wang, Wu, Bang, Hai）。そのため、新規地域として、ベトナムの少数民族や、ミャンマーの菌の採取も計画している。
- (3) (1)で新しく同定された遺伝子型について、塩基配列を用いないタイピング法を確立する
- (4) (1)で新しく同定された病原因子の解析を実施す

る（濱田、山岡、守山）。

[国外参画機関]

タイ、ベトナム、台湾の病原遺伝子解析ならびに MLST 解析の結果と被験者の地理的分布、人種、その他の臨床情報を統合して解析することによって、(1) 臨床病態と関連する遺伝子型を特定する。(2) 各国の諸民族がどのような経路をたどって移動してきたのかを解析する。これまで大分大学（山岡）が解析してきたデータと統合することでそれが可能である（Science 2003, Nature 2007, Science 2009 に発表）。

### 9. 年次計画

研究項目	1年度目	2年度目	3年度目
<p>ピロリ菌毒性因子の解析 (胃癌ハイ・リスクピロリ菌の同定)</p> <p>ピロリ菌遺伝子解析による東アジアにおける民族移動歴史の解明 (大分大学)</p>	<p>共同研究者会議の開催</p> <p>ピロリ菌培養</p> <p>既知のピロリ菌病原因子の機能解析</p>	<p>ピロリ菌ゲノムプロジェクト</p> <p>新規病原因子の探索</p> <p>MLST 解析</p> <p>既知のピロリ菌病原因子の機能解析</p>	<p>各国のデータの包括的解析</p> <p>病原遺伝子、MLST 解析のまとめ</p>
<p>ピロリ菌検体採取と遺伝子解析 海外参画機関 高雄医学大学 (台湾)</p>	<p>検体採取、ピロリ菌ゲノム抽出</p> <p>病原遺伝子解析</p>	<p>MLST 解析</p>	<p>台湾、タイの病原遺伝子、MLST 解析のまとめ</p>
<p>チュラロンコン大学 (タイ)</p>	<p>検体採取、ピロリ菌ゲノム抽出</p>	<p>病原遺伝子解析</p>	
<p>ハノイ医科大学、ホーチミン医科大学 (ベトナム)</p>	<p>検体採取(日本の内視鏡指導)</p> <p>日本の技術支援下でのピロリ菌培養、DNA 抽出</p>	<p>検体を日本に送付して以後の解析を行う。</p>	<p>留学生を日本に派遣、日本で遺伝子解析技術を習得</p>