

「メタボローム解析によるヘリコバクターピロリ感染関連疾患リスク評価法の確立」

国立大学法人神戸大学大学院医学研究科

西海 信

1 研究の背景と目的

ヘリコバクターピロリ菌感染により発症する疾患の多様性には、病原因子、宿主因子、食生活などの環境因子が相互に作用すると考えられるものの、「なぜピロリ菌感染により病態の異なる多彩な消化器疾患が生じるのか？」という問いは解明されていない。また、ピロリ菌由来病原因子によるピロリ菌感染関連疾患のリスク評価は重要であるものの、ピロリ菌感染に関わる病原因子は多数存在し、かつ、複雑に相互関連しており、結果として、単独の病原因子による疾患発症リスク評価は完全ではない。症例数が極めて多いピロリ菌感染者に対して、胃がん発症リスクに応じた個別化対策が重要であることから、本研究では、ピロリ菌感染関連疾患発症リスク評価の新たな手法を確立し、胃がん予防を目指した研究の足掛かりとすることを目的とする。なお、今回は、メタボローム解析技術を用いて研究を実施する。メタボローム解析とは、生体内の低分子代謝物も網羅的に解析する技術であり、生体内代謝物の変動は生体の表現型に近いとされており、本研究の実施に有用であると考えた。まず、ピロリ菌が宿主に感染することにより、宿主における生体内代謝がどのように変動するのかを明らかにし、その代謝物変動に基づいて、ピロリ菌感染関連疾患発症リスク評価の新たな手法を構築することが可能か否かについて検討した。

2 研究方法・研究内容

A. in vitro 感染モデルにおけるメタボローム解析の有用性の検証

ヒト胃がん培養細胞株に、ピロリ菌臨床分離株を継時的に感染させ、続けて、感染させた宿主細胞中の代謝物分析を実施した。代謝物分析には、高速液体クロマトグラフ/トリプル四重極型質量分析計 (LC/QqQMS)、ガスクロマトグラフ/シングル四重極型質量分析計 (GC/QMS)、ガスクロマトグラフ/トリプル四重極型質量分析計 (GC/QqQMS) を使用し、代謝物分析結果に基づき、各疾患特異的に変動する代謝経路を同定した。

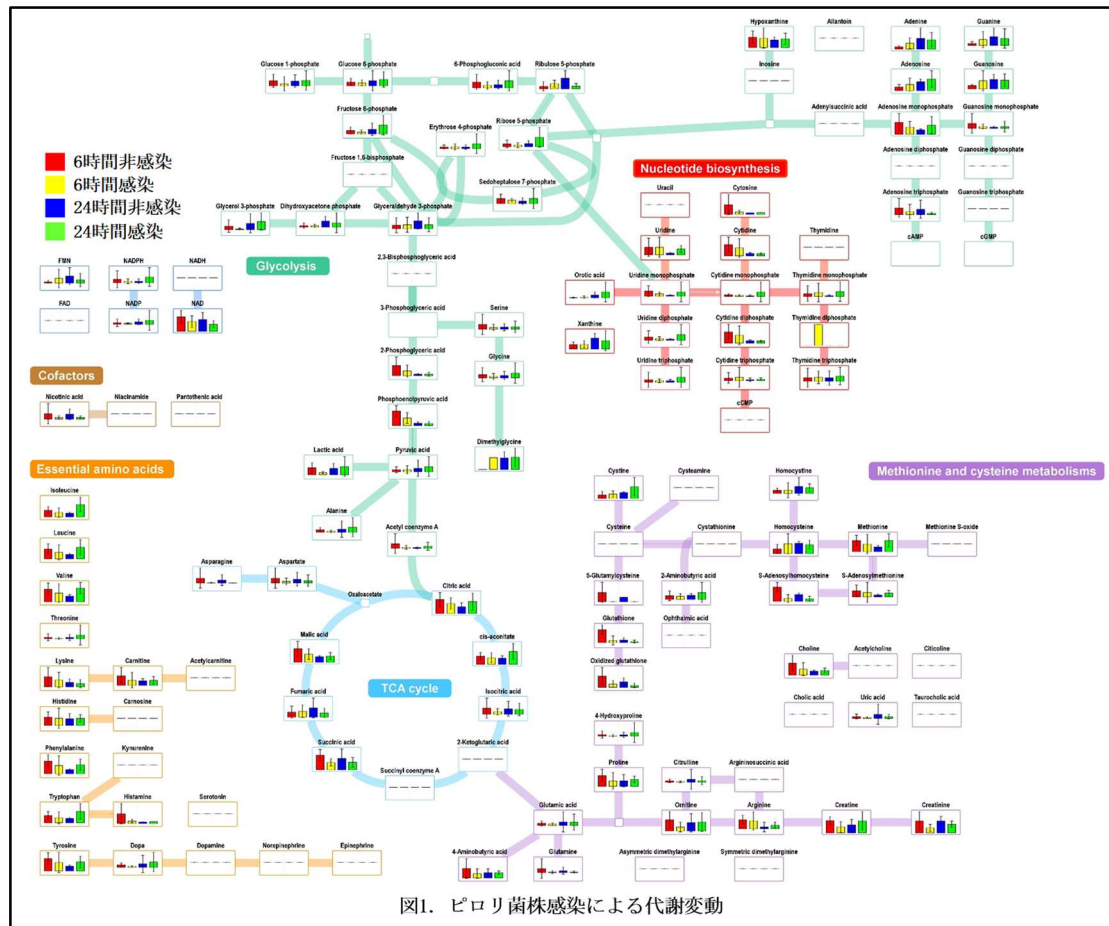
B. ヒト臨床試験におけるメタボローム解析の有用性の検証

ピロリ菌感染関連疾患患者から血液を提供していただき、血漿中代謝物分析を実施した。なお、血漿中代謝物分析実施に先立ち、LC/QqQMS や GC/QMS、GC/QqQMS を用いたヒト血漿中代謝物分析システムの構築を行った。次に、血漿代謝物分析データを多重ロジスティック回帰分析に供することで、有用な代謝物バイオマーカー候補を選択し、各ピロリ菌感染関連疾患に対する疾患予測式を構築した。さらに、ピロリ菌除菌前後での血漿中代謝物比較解析などを実施することにより、疾患発症リスクがどのように変動するのかなどを検証することで、代謝物プロファイルによるピロリ菌感染関連疾患リスク評価の可能性について検討した。

3 研究成果

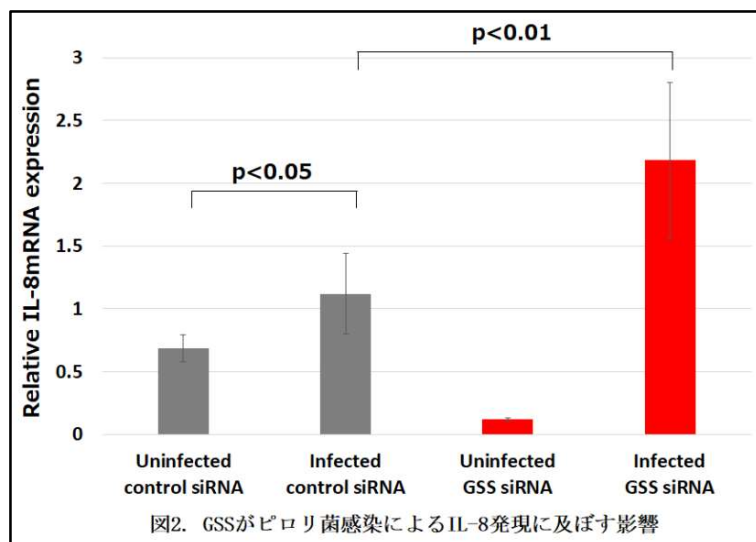
A. in vitro 感染モデルにおけるメタボローム解析の有用性の検証

ヒト胃がん培養細胞株に、ピロリ菌標準株 (26695 株) を感染させ、引き続き、ヒト胃がん培養細胞中の代謝物分析を実施した。その結果に基づき、解糖系、ペントースリン酸回路、TCA サイクル、尿素サイクル、ピリミジン経路、プリン経路、アミノ酸代謝、グルタチオンサイクルの代謝経路変動を検討した結果、ピロリ菌感染によりアミノ酸代謝とグルタチオンサイクルが顕著に変動することを明らかにできた (図 1)。アミノ酸代謝の場合、ピロリ菌感染初期では宿主細胞中の多くのアミノ酸レベルが低下し、その後、感染が



継続すると、宿主細胞中のアミノ酸レベルが増加した。グルタチオンサイクルの場合、ピロリ菌感染初期段階から酸化型グルタチオン (GSH) レベルが低下し、感染が継続しても、GSH レベルは低下していた。グルタチオンサイクルは、宿主細胞内の酸化ストレスと関連することから、グルタチオンサイクルに注目し、実験を実施した。

グルタチオンサイクルでは、グルタチオン合成酵素 (GSS) により GSH が合成される。そこで、siRNA により GSS 発現を低下させることで宿主細胞中の GSH レベルを減少させ、ピロリ菌 (26695 株) 感染により誘発される、炎症性サイトカインのひとつインターロイキン-8 (IL-8) 発現上昇に酸化型 GSH がどのような影響を及ぼすのかを検討した (図 2)。その結果、ピロリ菌 (26695 株) 感染による IL-8 発現の上昇が、GSS 発現が低下した条件下で亢進された。GSH は、細胞内に酸化ストレスが誘発された場合に、防御的に作用して酸化ストレスを軽減させる機能を有していることから、ピロリ菌が宿主細胞に感染することにより酸化ストレスが誘導されること、そして、その酸



化ストレスが宿主細胞へのピロリ菌感染により誘発される生化学的反応を亢進する可能性を明らかにした。

次に、ヒト胃癌培養細胞株に、ピロリ菌臨床分離株（萎縮性胃炎：Atrophic gastritis；十二指腸潰瘍：Duodenal ulcer；胃癌：Gastric cancer）をそれぞれ感染させ、ピロリ菌感染患者の由来疾患によってグルタチオンサイクルに及ぼす影響が異なるのか否かについて検討した。GSH、ならびに、還元型グルタチオン（GSSG）と GSH との比について検証した結果（図 3）、胃癌患者由来ピロリ菌感染による GSH レベルの減少の程度が、他の由来疾患と比較して大きいことが確認できた。さらに、GSSG/GSH 比は、胃癌患者由来ピロリ菌株感染では、他の由来疾患と比較して高いことも明らかにできた。その一方で、ピロリ菌患者の由来疾患と宿主細胞における IL-8 発現上昇との関連性は確認できなかった。GSSG/GSH 比は酸化ストレスの指標とされており、GSSG/GSH 比が高いほど、酸化ストレスの程度も大きいことから、胃癌原因ピロリ菌感染は、宿主細胞に及ぼす酸化ストレスの程度が大きい可能性を提案できた。さらに、ピロリ菌感染が GSS 発現に及ぼす影響を検討した結果、胃癌患者由来ピロリ菌株感染では、GSS タンパク質の発現が低下したものの、萎縮性胃炎や十二指腸潰瘍患者由来ピロリ菌株感染においては、その発現低下は確認できなかった（図 4）。これらの結果は、ピロリ菌に感染により、宿主では酸化ストレスが誘導され、その結果として GSH が消費され、本来であれば、宿主における生体防御機構により GSH 産生が亢進されるものの、胃癌患者由来ピロリ菌株感染では、GSH 産生も阻害する可能性を示唆している。

これらの結果は、ヒトから分離されたピロリ菌株が宿主細胞に与える影響を評価することで疾患リスクを評価ができる可能性があり、その疾患リスクの評価対象として、酸化ストレス（GSH や、GSSG/GSH 比など）を候補として提唱できた。

B. ヒト臨床試験におけるメタボローム解析の有用性の検証

本項目では、LC/QqQMS や GC/QMS、GC/QqQMS を用いて、ヒト血漿中代謝物を分析することから、血漿中代謝物分析に先立ち、ヒト血漿中代謝物分析システムの検証を実施した。その結果、アミノ酸、有機酸、糖、糖アルコール、グリセロリン脂質、脂肪酸、アシルカルニチンなど、約 300 種類の血漿中代謝物を分析できる手法を確立できた。

次に、ヒト血液検体の収集を進めるとともに、有用な代謝物バイオマーカー候補の選択、各ピロリ菌感染関連疾患に対する疾患予測式の構築などを実施し、代謝物プロファイルによるピロリ菌感染関連疾患リスク評価の可能性について検討した。胃癌患者、胃炎患者など疾患患者とその陰性対照となる健常者の血中代謝物を分析した結果、各疾患患者と健常

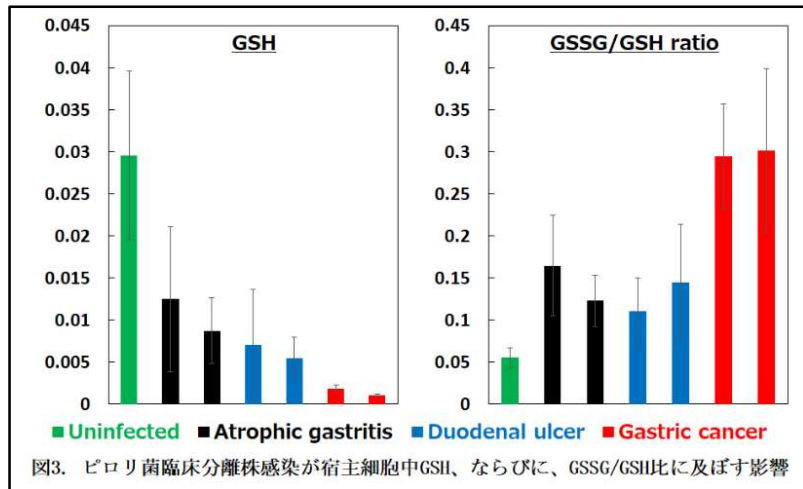


図3. ピロリ菌臨床分離株感染が宿主細胞中GSH、ならびに、GSSG/GSH比に及ぼす影響

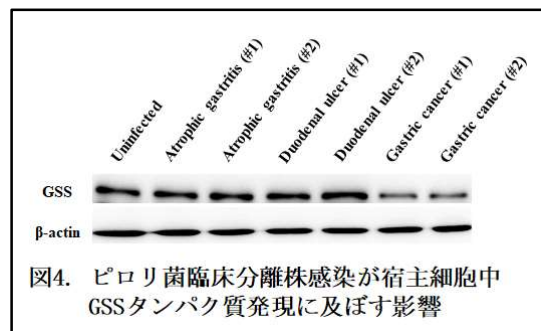


図4. ピロリ菌臨床分離株感染が宿主細胞中GSSタンパク質発現に及ぼす影響

者との間でそれぞれ血中代謝物プロファイルが異なることが確認できた。特に、胃がん患者における血中代謝物の変動は大きく、統計学的に有意に変動した代謝物の例として、ピルビン酸や 3-ヒドロキシプロピオン酸、3-ヒドロキシイソ酪酸が明らかとなった。また、酸化ストレスに関連する代謝物が胃がん患者において変動する可能性も確認できた。これらの結果から、ピロリ菌が宿主に感染することにより、宿主において生体内代謝が変動し、その変動が宿主の血中代謝物に反映する可能性、そして、その代謝物変動に基づいたピロリ菌感染関連疾患発症リスク評価につながる可能性が示唆された。

4 生活や産業への貢献および波及効果

近年、日本では、胃がん予防の観点から、ピロリ菌感染胃炎に対する除菌治療が保険適用となり、除菌治療が広く行われている。兵庫県篠山市では、「胃がんゼロのまち」を目指して、平成 26 年度より、全国に先駆けて中学 1 年生を対象に学校での尿検査で「ピロリ菌検診」を実施している。胃がん発症リスクを分類し、評価する検診として、血液検査によるピロリ菌抗体の検出と、胃の炎症・萎縮の度合いを反映するペプシノーゲン測定し、その組み合わせから評価する ABC 検診（胃がんリスク分類）が存在する。しかし、この検診では、ピロリ菌の存在有無のみが評価対象となっており、ピロリ菌のタイプは考慮されない。欧米と比較して日本や中国などの東アジア諸国は世界的に胃がん多発地域であり、この違いは、ピロリ菌が有する病原因子のひとつである CagA のタイプが欧米と東アジアで異なり、その相違が胃がん発症率に影響を与えるとされている。さらに、日本では、世界に先駆けて、胃がん予防の観点から、ピロリ菌感染胃炎に対する除菌治療が保険適用となり、除菌治療が広く行われており、除菌後、胃がん発症が約 3 分の 1 に低下すると報告されているものの、胃がんリスクが残ることも現実であり、除菌後も毎年、内視鏡検査が必要である。本研究は、新たなピロリ菌感染関連疾患発症リスク評価法確立の足掛かりと位置付けることができ、新たなリスク評価法が確立できれば、胃がん発症リスクに応じた除菌治療や除菌後の適切な経過観察期間など、より効率的な胃がん予防対策が実施可能となり、ヒト、特に、ピロリ菌感染者への貢献は非常に大きいと考える。

また、今回の研究では、ピロリ菌感染により宿主細胞において GSH が急激に減少すること、さらには、萎縮性胃炎や十二指腸潰瘍患者由来ピロリ菌株と比較して、胃がん患者由来ピロリ菌株感染による GSH の減少の程度が大きいことが明らかとなった。さらに、GSS をノックダウンすることで、ピロリ菌感染による IL-8 発現上昇が亢進したことから、GSH 制御により、ピロリ菌感染が誘発する宿主への悪影響を改善できる可能性を明らかにできた。今後、GSH や GSS をターゲットとしたピロリ菌関連疾患の新たな治療手法の確立につながるかもしれない。