

V preS-S 遺伝子産物

HBV 粒子外殻を構成する膜タンパクである。Small S (SS もしくは HBs) を共通部分として、preS1 (108 ~ 120aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると large S (LS, 389 ~ 401aa), preS2 (55aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると middle S (MS), SS (226aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると SS が産生される (図 2C)。これらの違いは転写の開始がどこから始まるかで決定されると考えられているが、SS をコードする転写産物が圧倒的に多い。SS にはそれ自体で粒子形成・分泌能があり、感染能をもつ Dane 粒子に比し約 1,000 倍の量で SS 粒子 (もしくは HBs 粒子) として大量に分泌される。

Dane 粒子の形成には SS に加え、LS が必要であり、コア粒子を内包する過程で粒子サイズや機能の点からも重要な役割を担っていると思われる。MS は Dane 粒子形成に必ずしも必要ではないと思われるが、分泌を促進する過程で機能していると考えられ、やはり、LS, MS, SS の量比は Dane 粒子形成を促進するか、subviral 粒子としてのみ分泌されるかの点で鍵になっているものと考えられる^{11) 12)}。

VI X 遺伝子産物

HBV ゲノムの塩基配列が決定されたとき、機能未知の翻訳読み取り枠 (ORF : open reading frame) として同定された。約 0.8kb の固有の転写産物から翻訳されると考えられる (図 1B) 細胞内シグナル伝達や、ウイルス宿主遺伝子の転写活性を修飾する機能が数々報告されている。こういった機能面での重要ポイントは、DHBV には X 遺伝子が存在せず、DHBV 感染アヒルでは肝がんが発症しない点に着目した X 遺伝子機能と肝がんとの関連である。実際、HBV X トランスジェニッ

クマウスで肝発がんが促進される¹³⁾。哺乳類へパドナウイルスでは感染能に影響を与えるとの報告もあるが、感染そのものに影響があるのか、転写活性化に原因があるのかなど不明な点も多い。

X タンパクはさまざまな機能をもつが、培養細胞を用いた大量かつ一過性発現系から得られたものである¹⁴⁾。X タンパクは哺乳類細胞系でも難溶性であり、実際の生活環の中でどの程度発現し、その発現程度に見合った機能は何なのか、また、大量に発現される事態があるとする、それは一体どういう局面なのか、実際何が起こるのか、疑問は尽きない。

VII HBV の生活環 (図 3) と複製 (図 4)

HBV の生活環はおもに、DHBV の初代培養肝細胞感染系や個体レベルでの感染系を用いた解析で一般的には次のように考えられている⁵⁾。

まず、細胞表面の特異的感染受容体を介して付着・侵入し、感染を成立させる。HBV のゲノムは前述のごとく、⊖鎖 DNA の 5' に末端タンパク (pol) が共有結合しているが、これが取り除かれ、また、末端タンパク付着部位近傍の重複配列部分もトリミングされる。⊕鎖 DNA の RNA プライマーも取り除かれ、完全長が複製される。最終的にはギャップはすべて埋め尽くされ結合されて、プラスミド型の環状 2 本鎖 DNA (covalently closed circular DNA : cccDNA) となる。この過程に HBV pol が必要かどうかはまだ議論のあるところである。

cccDNA はエピゲノムとなり、HBV 関連 mRNA (3.5kb mRNA : プレゲノム RNA [C, pol], preC- プレゲノム RNA [preC-C, pol ?], 2.4kb mRNA [LS], 2.2kb mRNA [MS], 2.1kb mRNA [SS], 0.8kb mRNA [X]) が転写される (図 1B, 3)。この他にも、

III 血液感染するウイルス肝炎

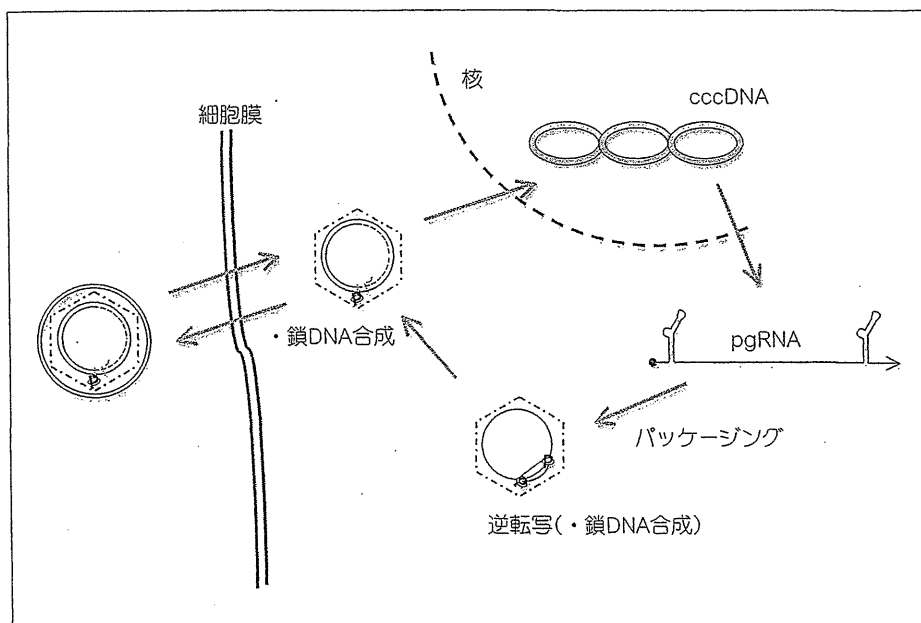


図3 HBVの生活環

HBVの生活環の概略を示した。HBV感染粒子は想定される受容体に結合後、細胞膜上もしくはエンドゾームで膜融合を起こし、コア粒子が細胞質へ取り込まれる。コア粒子は核へ移送されると仮定されているが、このプロセスでゲノムDNAのギャップは埋められ、末端タンパクは取り外されて、核内ではプラスミド型の閉環状cccDNAとなる。このエピゾームは被転写競合型であり、HBV関連転写物が発現される。ゲノム合成に供与されるRNAはpgRNAであり、コア粒子のアセンブリーと共役して、パッケージング、逆転写反応が進行する。分泌された感染性HBV粒子のゲノムは完全なHBVゲノム構造をとっており、⊕鎖DNA合成は膜粒子に取り込まれるまでに完了していると考えられている。

HBV：B型肝炎ウイルス

(文献9より改変)

C遺伝子の後半からpreSにかけてスプライスされた2.3kb前後のmRNA(機能不明)も産生される¹⁵⁾。これらのmRNAはすべて⊕鎖極性をもつもので、⊖鎖極性をもつ転写産物は基本的には知られていない。プレゲノムRNAはゲノムサイズより長く、5'と3'が重複配列になっていることが特徴であり、また、逆転写複製に不可欠である。

プレゲノムRNAから翻訳されたpolはプレゲノムRNAのパッケージングシグナルεに結合し、タンパクプライミングによって⊖鎖DNAの合成を開始する(HBVの場合は63番目のチロシンからチミンが合成開始の発端になる)(図4A)。εからDR1、5'の配列はプレゲノムRNAの3'にも存在するため、こ

こまで合成された⊖鎖DNAはプレゲノムRNA3'と同様の相補的な配列に転座して、さらに、5'までの両端の重複した完全長の⊖鎖DNAを完成する。プレゲノムRNA自体は⊖鎖DNA合成が進むに連れてpol自身のRNaseH活性により分解されるが、5'のDR1を含む短い配列部分が最終的に⊖鎖DNAのDR2に相補的に結合することが⊕鎖DNAのプライミングになる。⊖鎖DNAの5'のDR1辺りまで合成された⊕鎖DNAは3'のDR1に転座して、さらに⊕鎖DNA合成を進める。この⊕鎖DNA合成はS遺伝子ORFとX遺伝子のORF辺りで停止している。粒子内での基質が枯渇してくることが理由のひとつかもしれない⁹⁾(図4B)。

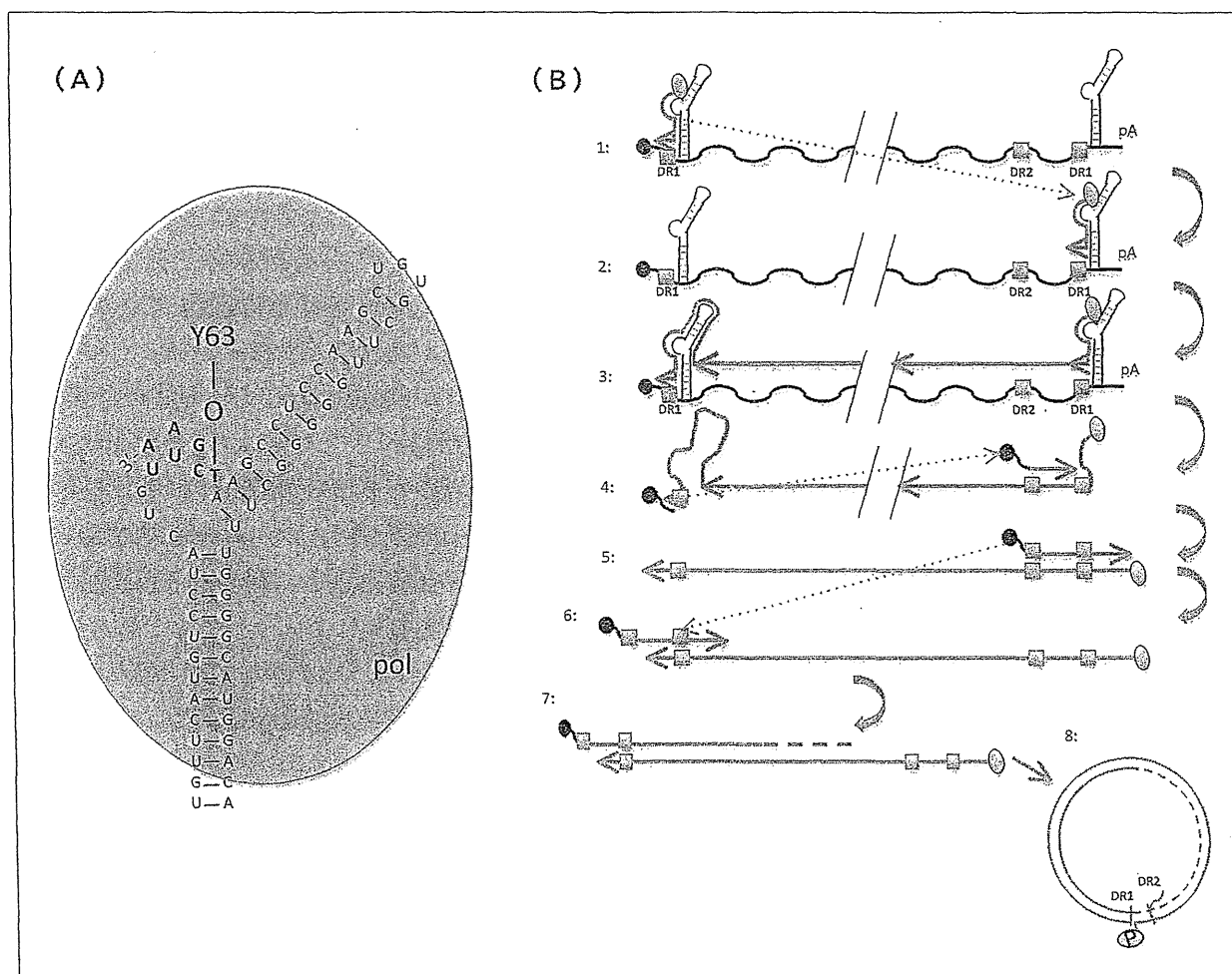


図4 HBV パッケージングシグナル(ε)と逆転写複製メカニズム

(A) HBV HBV パッケージングシグナル(ε)。RNAによくみられる pseudo-not 構造をとると考えられている。HBV pol 末端タンパク領域で認識されると考えられていて、部分的に1本鎖となる膨らみ(bulge)の根元のアデニンと相補的にHBV polの63番目のチロシンからプライミングされる。(B) HBV複製メカニズム。① εから開始した逆転写産物は5' DR1まで合成されると、② 3' DR1に転座することで全長⊖鎖DNA合成が可能となる。③ 5' DR1まで⊖鎖DNA合成が進行するにともない、④ 鋳型 pgRNAはHBV polのRNaseH活性により順次分解される。キャップ構造～DR1をもつ5'の短いpgRNA部分は完全なDNA-RNAハイブリッドにならないため分解を免れ、この部分のRNAが3'に近いDR2領域に相補的に転座することで⊕鎖DNA合成のプライマーとして機能する(レトロウイルスの⊕鎖DNA合成のプライマーとなる polypurine tract [ppt]に相当する)。⑤ ⊕鎖DNA合成は⊖鎖DNA5'まで進み、⑥ その後、3' DR1に転座することで、⑦ さらに⊕鎖DNA合成が進む。この反応過程で、⑧ DR領域の相補的な配列をもとに環状化構造をとる。⊕鎖DNA合成は確固とした理由は定かではないが、50～80%くらいのところで合成が停止している。本図では末端タンパクを独立した因子として描いているが、HBV polは機能構造に分解されないため、末端タンパク～合成酵素活性はひとつのタンパクとして機能している。

HBV: B型肝炎ウイルス

(文献9より)

HBVの逆転写(⊖鎖DNA合成)から⊕鎖DNA合成といった一連のHBVゲノム複製がコア粒子内で行われると考えられており、ゲ

ノムを含むコア粒子はERに分子集合している膜タンパクに内包されてERを経由して細胞外に分泌されると考えられる。コア粒子の

III 血液感染するウイルス肝炎

ERでの内包から分泌の過程にどのような宿主因子がかかわり、ウイルス因子がどのように機能しているのか、受動的なものなのか、能動的な移送・分子集合なのか、いまだ謎だらけである。

VII HBV 研究の将来

HBV感染者は世界に2~3億人、わが国でもいまだ150万人存在すると考えられている。このような巨大感染症はワクチン回避変異体を生み、慢性化率の高いゲノタイプが蔓延しつつある。HBV慢性肝炎の治療はインターフェロンによるseroconversionを目指した治療が最良であるが、効果は限定的である。したがって、HBV増殖を抑えることに主眼がおかれるが、抗HBV剤は抗HIV剤のたらい回しの利用で変異株とのいたちごっこである。

HBVの研究は分子生物学的手法を主体になされ、各遺伝子の機能が明らかにされて来た。しかし、これまでの報告がHBVの本質的なウイルス学をどこまで正確に記述しているのかを検討する必要がある。すなわち、少なくとも培養細胞を利用した*in vitro*感染系で、可能であればマウス等を利用した個体感染モデルでの実証が必要である。これらの感染系の樹立はHBVのウイルス学を発展させるに留まらず、病態発症機構の解明や、その事実に基づく治療法の開発へと発展することを約束する。

そこで、今後のHBV研究を進める上でもっとも大きな問題点を2つあげておきたい。①HBV感染受容体を分離・同定し、その性質を明らかにしつつ、有用かつ簡便な*in vitro*, *in vivo*感染系を樹立すること、②HBV polの簡便なアッセイ系によるhigh-throughput抗HBV剤スクリーニングシステムを確立することの2点である。これらの問題はウイルス学に託された最難問である。

IX HBV 感染受容体の分離・同定と感染系の確立

ウイルスの発見からすでに半世紀足らず、HBVの感染受容体はそのかけらもわかっていないに等しい。本来の感染宿主実質肝細胞に感染増殖するが、肝実質細胞由来の培養肝がん細胞にはほとんど感染しない。もちろん、培養肝がん細胞が元々の正常の肝実質細胞の性質を維持していないことは想定される。初代培養ヒト肝実質細胞の系では確かにHBV感染が確認されるが、倫理的な側面、調達の煩雑さを考えると、研究室での使用にはまったく耐えない。

C型肝炎ウイルスに起因すると思われる肝がんから樹立されたHepaRGという培養肝がん細胞がHBVにも感染感受性を示すことが示された¹⁶⁾。しかし、感受性を得るために2~3週間程度の分化誘導が必要なこと、感染効率は最大で30%程度で、しかもディッシュ1枚当たり10万円以上する高価な細胞株であることなどから汎用性に耐えない(増殖維持は特許の関連で制限されている)。iPSから分化させた肝細胞の利用もひとつのアイデアではあるかもしれないが、その誘導から維持の手間を考えると、HBV研究者が低コストで簡便・自由に使用できる状況にはない。

そこでやはり、HBV感染受容体の分離・同定とその応用としての感染系の樹立が必要不可欠と考えている。とは言っても、半世紀近い研究でまったく成果が出なかった対象である。ウイルス感染機構の概念を根本から変える非常識的なアイデアが必要となると、かえってかなり厄介であるが、斬新なスクリーニング方法を考案しつつ、ウイルス感染の基本に立って地道な同定作業を続けている。

X HBV pol アッセイシステム

タンパクプライミング逆転写が、パッケージングシグナル ε ; コア粒子のアセンブリー

と共役して活性化するなどの特殊性や、発現タンパクの可溶化が困難であるなど、試験管内反応系を拒む問題点が立ちはだかる。High-throughput/mass screening システムの構築、立体構造から *in silico* 解析を行うにしても純度の高い評品が大量に必要である。いかに活性を維持した状態でこういった評品を得るか、種々のアイデアをもとに試行錯誤を続けている。

XI おわりに

抗HBVワクチンが開発されて、わが国では特段HBV感染症に対する意識が下がったのか、わが国におけるHBVの基礎研究者はほとんど影を潜めてしまった。わが国の150万人強の患者、世界に数億人の感染者をもってして、容易に減少していく感染症ではないと考える。HBVウイルス学もHBV肝炎、肝がんもよくわからないことだらけである。一見きわめて単純なウイルスのようにみえるが、逆に抗ウイルス標的材料が少なく、種々の側面からの治療薬の開発も難しい。本ウイルスの基本的な問題を解決することが、いろいろな意味で新たな展開を生むかもしれない。

文 献

- 1) Blumberg BS, et al : A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191 : 541-546, 1965.
- 2) Blumberg BS, et al : A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. Ann Intern Med 66 : 924-931, 1967.
- 3) Okochi K., Murakami S : Observation on Australia antigen in Japanese. Vox Sang 15 : 374-385, 1968.
- 4) Schaefer S : Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotype. World J Gastroenterol 13 : 14-21, 2007.
- 5) Seeger C, et al : Hepadnaviruses. "Fields Virology" Knipe DM and Howley PM ed. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. p2977-3029, 2007.
- 6) Liang TK : Hepatitis B : The Virus and Disease. Hepatol 49 : S13-S21, 2009.
- 7) Wynne SA, et al : The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. Mol Cell 3 : 771-780, 1999.
- 8) Watts NR, et al : The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. EMBO J 21 : 876-884, 2002.
- 9) Beck J, Nassal M : Hepatitis B virus replication. World J Gastroenterol 13 : 48-64, 2007.
- 10) Yang W, Summers J : Integration of Hepadnavirus DNA in infected liver : evidence for a linear precursor. J Virol 73 : 9710-9717, 1999.
- 11) Bruss V, Ganem D : The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 1069-1063, 1991.
- 12) Ueda K, et al : Three envelope proteins of hepatitis B virus : large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. J Virol 65 : 3521-3529, 1991.
- 13) Kim CM, et al : HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature 351 : 317-320, 1991.
- 14) Wei Y, et al : Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathologie Biologie 58 : 267-272, 2010.
- 15) Suzuki T, et al : Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 8422-8426, 1989.
- 16) Gripon P, et al : Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 15655-15660, 2002.

遺伝子挿入HBVを用いた感染レセプターの探索

上田 啓次*

索引用語：HBVベクター，HBV psuedotype，HBVレセプター，HBV感染系

要旨：B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) が同定されてから、約半世紀が過ぎようとしている。日本には今なお130万人前後、世界的には3.6億人の感染患者が存在するが、本感染症の抜本的な克服手段は今もって存在しないといっても過言ではない。その根本的な理由のひとつが、本ウイルスには簡便な *in vitro* あるいは *in vivo* 感染系が存在しないことによると思われる。このことは逆にHBV感染レセプターの同定を阻んでいると思われるが、世界中で展開されている多くのデータの積み重ねにも関わらず謎は深まるばかりである。ウイルス学的にもまたその感染による病態発症機構の解明、治療法やその評価系の考案には、*in vitro* あるいは *in vivo* 感染系の構築が必須であると考えられる。しかしながら、このような経緯を克服し、HBV感染レセプターを同定、感染系を樹立するにはかなりの創意工夫が必要と思われる。本稿では、これまで進展してきたHBV *in vitro* 感染系、HBV感染レセプターに関する研究を総括し、今後のHBV感染レセプター同定と感染系樹立へ向けた遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を概説する。

1 はじめに

1964年にBlumbergがオーストラリア抗原として、世界で初めてHBVの存在を示してから¹⁾、約半世紀が迫ろうとしている。HBVは肝炎、肝硬変、肝癌の発症に関わる社会的にも重要視されるウイルスであり、その克服のため、さまざまな観点からウイルス学的、臨床医学的研究が展開されてきた。

HBVは、複製に逆転写過程をもち、3.2 kb

の部分二重鎖DNAにコードされたたった4つの遺伝子で、ほぼ特異的に肝実質細胞において生活環を全うするウイルス学的にも特異的なウイルスである²⁾。分子生物学的手法の開眼と相まって、ゲノムクローニング、塩基配列解析、HBV関連遺伝子解析、組込みと病態解析などが展開され、ワクチンの開発やインターフェロン、抗HIV剤の流用による治療法の進展もあったことも事実である。こういった経緯を背景にし、基礎ウイルス学的に

Keiji UEDA : Separation and identification of the hepatitis B virus receptors with recombinant HBV technology

*大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座ウイルス学 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]

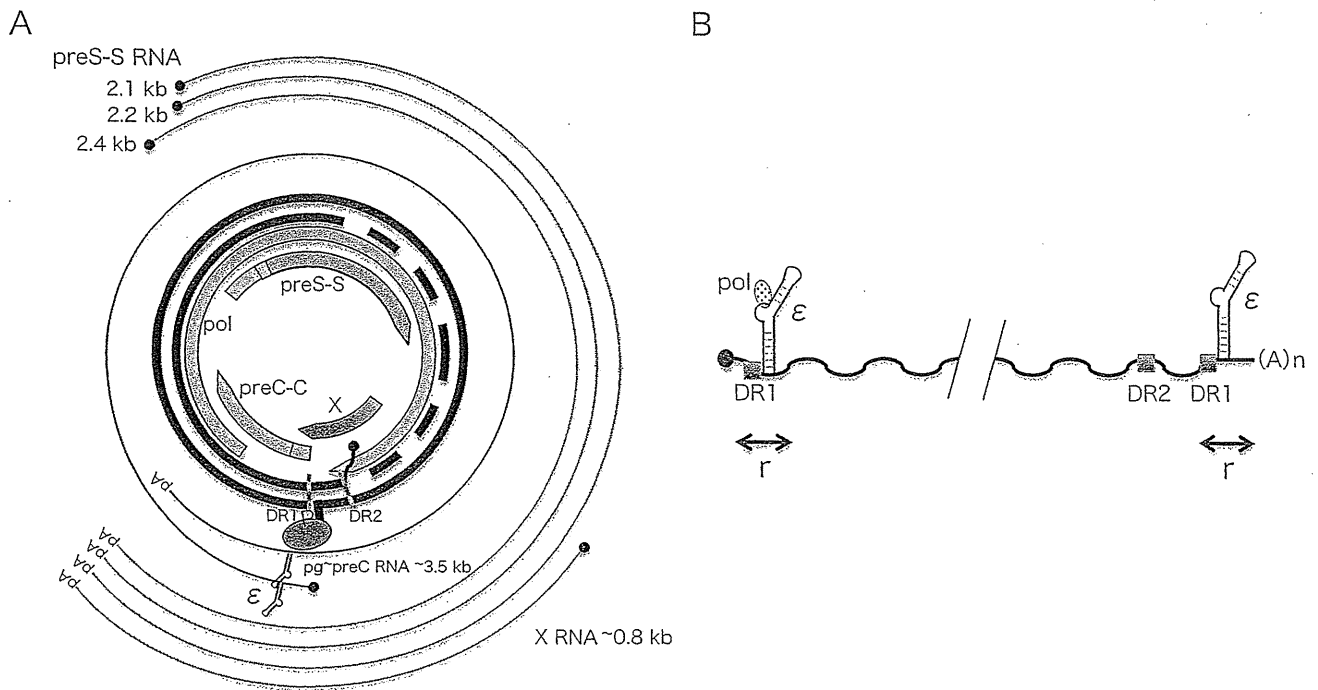


図1 HBVゲノム構造と遺伝子転写産物

- A: HBVのゲノム構造を太線, 太破線で示す。⊖鎖DNA末端にpolが付着する。DR1およびDR2の位置を示した。その内側にHBV関連遺伝子産物の読取り枠を示している。遺伝子は基本的にpreCore-Core (preC-C), preS-S, pol, Xの4つである。3.5 kb mRNAがpreCのATGを含む場合, preCore-Coreとして翻訳され, 分泌過程でN末の分泌シグナルおよびC末が切断されてHBe抗原(p17)となる。preCのATGを含まない場合がpregenome RNA (pgRNA)である。pgRNAは逆転写の鋳型となる重要な機能をもつと同時にcore蛋白, polの翻訳に利用される。preS-S遺伝子はmRNAの開始部位の違いにより, 2.4 kb mRNAからlarge S (preS1-preS2-small S [SS]) (LS), 2.2 kb mRNAからmiddle S (preS2-SS) (MS), 2.1 kb mRNAからSSが翻訳される。この内最も産生量として多いのはSSである。X遺伝子は固有のmRNA (0.8 kb)から翻訳される。●はキャップ構造を示す。
- B: pgRNAの構造。両端は重複した配列(r)となる。DR配列, パッケージングシグナル(ε), polのプライミングする位置を示す。

はもはややり尽された感があったのか, ここ10年間, 日本のHBVの基礎研究は暗黒の時代であった。しかし, 現在なお日本国内に約130万人, 世界的には3.6億人の巨大感染症を形成する人類史上最も危惧すべき感染症のひとつであり, その克服にはHBVの本質を詳細に解析できる *in vitro* あるいは *in vivo* 感染系が何としても必要であり, 感染系を土台とした病態発症機構の解明とそれらに基づくウイルス排除へ向けた抜本的な治療法の開発が重要であると考えている。

HBVは本来の宿主であるヒト若しくはチンパンジーなどのヒト近縁類人猿にしか感染

しない。これらの初代培養肝細胞はHBV感染系としての効率は高いが, その調達は倫理的にも不可能に近く, できたとしてもその手間を考えると, とても日々の実験に容易に用いられる感染系とはいえない。

類人猿に感染するHBVを除いた animal hepadnaviruses (アヒルB型肝炎ウイルス [duck hepatitis B virus = DHBV]³⁾, ウッドチャック肝炎ウイルス [woodchuck hepatitis virus = WHV]⁴⁾, 地リス肝炎ウイルス [ground squirrel hepatitis virus = GSHV])を用いた分子ウイルス学的アプローチは, 確かに多くの事実を明らかにしてきたと思うが, それに

しても、感染レセプター、感染系、cccDNA (covalently closed circular DNA) 生合成とその維持機構、動態、病態との関連、HBV ポリメラーゼのアッセイ系、詳細な複製メカニズムなど、多くの謎が残されたままである。

HBV感染レセプターの分離・同定は、初代培養アヒル肝細胞(primary duck hepatocyte = PDH)を用いたDHBVを中心に進められた。HBV吸着因子を含め、候補にあげられた因子は、重合アルブミンレセプター⁵⁾から始まって、gp120⁶⁾、gp180⁷⁾などいくつかあるが、繰り返し述べたように感染系の構築には至っていない。これ程までに困難なHBV感染レセプターの分離・同定に向けてどのようなアプローチが必要なのか、遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を考案した。

2 In vitro HBV感染系

前述のごとく、簡便な特に*in vitro*感染系が存在しないことが、HBV感染レセプターの分離・同定にとって決定的な障壁となっていることはいうまでもないが、*in vitro* HBV感染系(初代培養肝細胞を除く)構築の努力は続けられている。当然のことながら、HBVは正常肝実質細胞へ高親和性を示し、増殖能を発揮することから、肝実質細胞由来と考えられるHepG2、HuH7などのヒト肝癌培養細胞株が感染系として試されてきた。これらの細胞はHBVの複製サイクルと考慮して構築したHBV発現ベクターをトランスフェクションすることにより、感染性粒子を産生することがわかっている^{8,9)}。生体においてどのような形質をもつ肝実質細胞に感染するのか全く検討もつかないが、一般的に正常肝細胞は高分化状態にあると考えられるため、これらの細胞をステロイド、インスリ

ン、dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて分化誘導し、感染実験を試みたという報告がある¹⁰⁾。またこれらの細胞を用いて、肝臓という臓器状態をできるだけ再現する目的で高密度三次元培養によるHBV感染系の構築の試みもあるが、感染効率、コストパフォーマンスを考えるとHBV感染系としての価値は評価するレベルにないといわざるを得ない。

一般培養細胞系感染系としては、最近(といっても、すでに10年も経過する)樹立されたHCV感染肝癌から樹立されたHepaRGを用いたHBV感染系が唯一であると思われる¹¹⁾。この細胞を2~4% DMSOで数週間分化誘導すると20%程度のHBV感染効率が得られるとされる。しかしながら、一般的な培養肝癌細胞ながら商業用で直径約10 cmのディッシュで10万円強もする高価な細胞であり、とても日常的に使用できる細胞ではない。cccDNA形成など、本来の感染サイクルが進行していると思われるが、Dane様粒子の存在が示されている一方、感染性粒子を排出できないなどの問題点もある¹²⁾。

HBV感染レセプターの分離・同定から、感染系の構築を目指す場合にこのHepaRGの有用性が議論されている¹³⁾。最近の報告¹⁴⁾では、小管構造の形成に関わる肝細胞の側底側細胞膜(basolateral membrane)側からHBVは感染する。初代培養ヒト肝細胞(primary human hepatocyte = PHH)では接着細胞の表面側一面に小管構造マーカーであるmultidrug resistance protein 2 (MRP2)の発現がみられ、8000 multiplicity of genome equivalent (mge)以上でほぼ100%のHBV感染性がみられるのに対し、DMSO分化誘導HepaRGでは、限られた集属する領域にMRP2の発現がみられ、同じmgeを用いた感染実験でその集団の周辺部にHBV感染が観

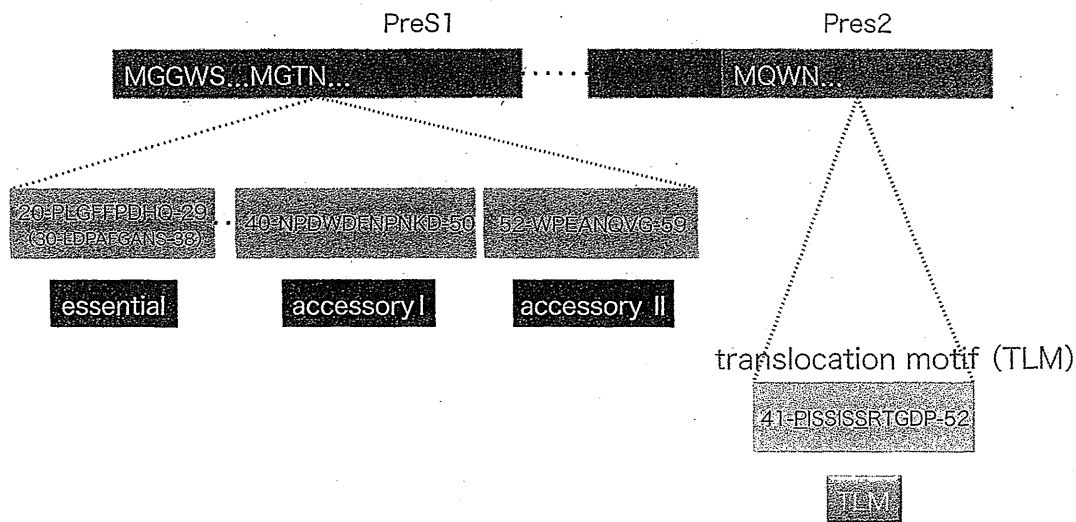


図2 preSの機能配列

preS1内の付着・侵入に必須な機能配列(20～29aa), 付随的機能配列(accessory IおよびII)とpreS2内の侵入過程で重要なTLMを示す。

察されることや、この現象がEGTAで促進される、集団の内部へも感染が確認できるようになる、ことから導き出された。本知見は生体における肝実質細胞の形質は、培養肝癌細胞株に比べ著しい高分化状態にあり、培養肝癌細胞では容易には達成し難い形質を有することを想像させる。この高分化状態がHBV感染レセプターの発現に関わるのか、活性に関わるのか定かではないにせよ、興味深い問題である。

3 付着・融合・侵入に関わるHBV因子

培養肝癌細胞のひとつ、HepG2細胞のHBV感染効率はないに等しいと考える研究者は多いと思われるが、当初はこの細胞を用いたHBV感染粒子の付着機構に関する研究は多々報告された^{15,16)}。最近ではD型肝炎ウイルス(HDV)なども利用してHepaRG細胞を用いた研究が多い¹⁷⁾。HBVの感染性粒子の形成には所謂small S (SS若しくは単にHBs)膜蛋白とmiddle S (MS)膜蛋白に加え、large S (LS)膜蛋白が必須の因子となるが、感染性HBV粒子の細胞への付着に関し

て、特にpreS1領域の機能が重要視されている¹⁸⁾。preS1領域は部分的にアミノ酸配列の相同性の低いところがあるが、おおむね高い相同性があると考えて良く、付着・膜融合に関わる必須な領域、2つの付随的な領域が存在すると考えられている。preS2領域も相同性は高く、細胞内侵入に関わると思われる領域(translocation motif = TLM)が想定されている。またSS膜蛋白N末にも膜融合に関わる領域が予測されている。

以上のような情報をもとにして、preS1内の必須領域を介して、肝細胞膜表面因子に結合(付着)し、レセプター分子集合・構造変化、SS膜蛋白N末を加えたHBV粒子膜-細胞膜融合が起こり、TLMを介した細胞内侵入といったHBVの付着・膜融合・侵入機構が想像される。

6 HBV感染レセプターの分離・同定

さて、HBV感染レセプターの分離・同定は倫理的な制約も絡んで、PDH-DHBV系を中心に行われてきた。DHBVにはHBVのMSに相当する膜蛋白はなく、すなわちpreS2に

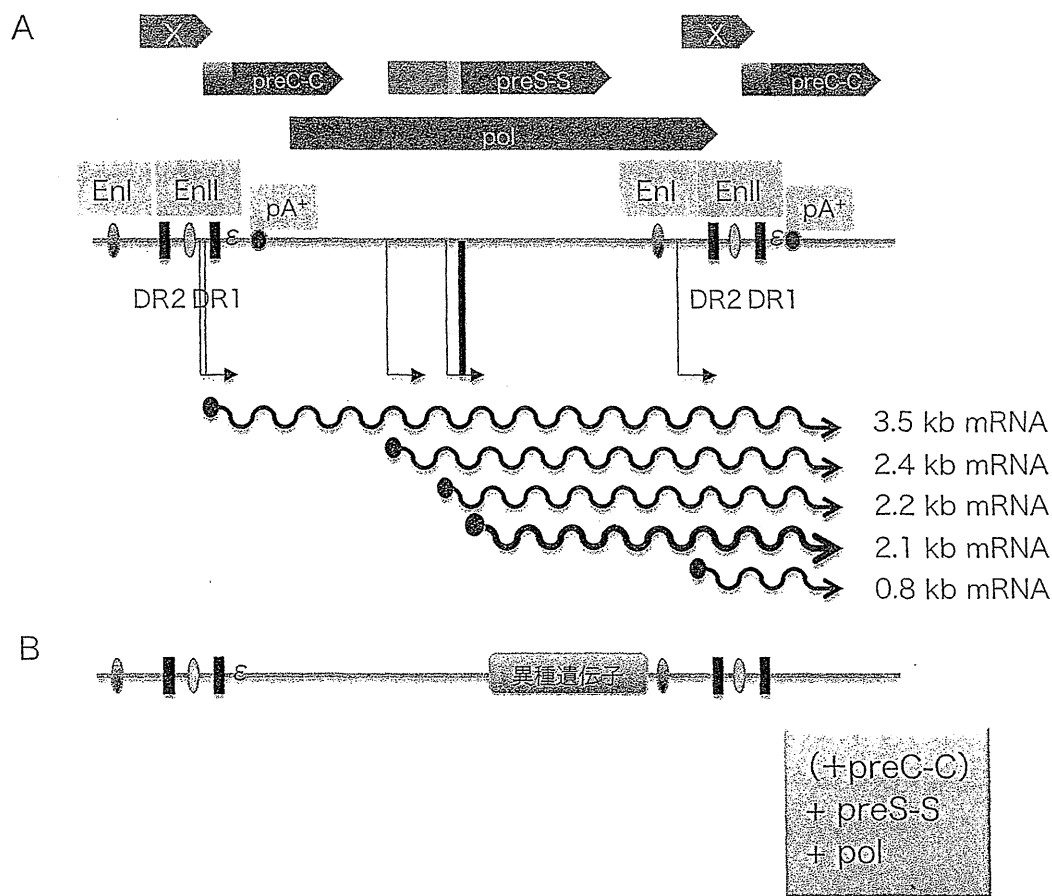


図3 HBVベクター型遺伝子挿入HBVデザイン

- A: HBVゲノムを直鎖状に描いている。上段のボックス矢印はORFを示す。pgRNAを発現するための必須基本ユニットを示した。En: エンハンサー。pA: ポリA付加シグナル。鍵矢印は各転写産物の開始部位、波線は転写産物を示す。
- B: SSの位置に異種遺伝子を挿入したデザインを示した。この場合、挿入により、preC-C遺伝子、X遺伝子を除くそのほかのHBV関連遺伝子はすべて破壊されるため、トランスに供給する必要がある。挿入部位によってはpreC-Cの供給も必要となる

該当する領域は存在しない。LS内のpreS領域に付着・膜融合に関わる必須な領域、2つのTLMに相当する領域が同定されている。

DHBVで同定された最も有力なDHBV付着因子はgp180 (carboxypeptidase D)であった¹⁹⁾。本因子は膜表面をビオチン化したPDHをDHBVと付着させた後、抗DHBV膜蛋白抗体を用いて免疫沈降することによって分離・同定されたものである。本因子の同定は、HBVの付着・膜融合・侵入に関わるHBV感染レセプターの本質にも迫る因子として期待されたが、LMH細胞(chicken由来

の培養肝癌細胞株でDHBV感染を許容しない)をDHBV感染許容細胞へ変化させることはできなかったし、またgp180に対する抗体もアヒル初代培養肝細胞へのDHBV感染を阻止するに至らなかった。

付着因子の存在が報告されているHepG2細胞からもHBV感染が許容される分化誘導したHepaRG細胞からも、依然としてHBV感染レセプターの本体に迫る因子の分離・同定はされていない。現時点における生化学、分子生物学などの技術を駆使しても、確固としたHBV膜蛋白結合因子すらこれらの細胞

から同定されないのはなぜであろうか？—ますますHBV感染レセプターの謎は深まり、逆に興味深くもあるが、HBV感染レセプターの分離・同定には相当の工夫と努力とを余儀なくされると思われる。

7 遺伝子挿入HBVの作製

これまでの経緯から、HBV感染レセプターの分離・同定へ向けた新たな局面を拓くために遺伝子挿入HBV-いわば、組換え型HBV或はpseudotype HBV作製を試みている。この2つの遺伝子挿入HBVは、前者のごとくHBVの複製機構を理解したHBVベクター型か、膜粒子のみをHBV型に変えたpseudotype HBV型に分けられる。本アプローチはこれまでに試みられなかったHBV感染性粒子を基盤にした感染性を指標にするアッセイ系の構築を可能にする。

1. HBVベクター型

本ベクターの構築には、HBVの複製過程を正確に理解する必要がある。HBVは、部分二重鎖DNAという独特のゲノム構造をもつことは勿論、さらに蛋白プライミングによって逆転写複製を行うという極めて特徴的な複製サイクルをもつ²⁰⁾。

HBVは感染成立後、部分二重鎖DNAを修復し、いわゆるcccDNAというエピゲノムを形成する。本ゲノムは肝実質細胞核内にあって、転写許容構造体として逆転写の鋳型となる3.5 kb プレゲノムRNAをはじめ、いくつかのHBV関連転写産物産生の鋳型として機能する。3.5 kb プレゲノムRNAはpreC翻訳領域内でDR1 (direct repeat 1)を含む形で転写され、3'側にDR2、さらに5'のDR1を含んだやや下流でpolyA付加シグナルが認識されて、すなわち5'と3'が重複される形で集結する。

本稿ではHBV複製サイクルの詳細については省略するが、このベクター構築上最低限必要なエレメントとして、プレゲノムRNA転写開始部位を含めた転写開始装置、5' DR1, ϵ , DR2, 3' DR1配列の基本情報を残しておく必要がある、またどの転写unitを使うか考慮する必要がある(図3A, B)。ウイルス蛋白因子として、実際の逆転写過程から部分二重鎖DNA合成に関わるHBVポリメラーゼ(HBVpol)、コア粒子を供給するHBVコア蛋白(HBV-C)、膜粒子を構成するpreS-S蛋白(HBV preS-S)を適宜トランスに供給する必要がある(図3B)。またゲノムサイズも厳密に影響すると思われるし、プレゲノムRNAの転写効率を上げるために適宜異種遺伝子エンハンサーを考慮する必要があるかもしれない。

このタイプの遺伝子挿入型HBVはHBVの生活環を踏襲するので、理論上は感染後速やかにcccDNAが形成され遺伝子発現が可能となると予測される。蛍光蛋白遺伝子などで感染をモニターすることにより、HBV感染レセプターの遺伝子の分離・同定に役立てることが可能である。ただし、HBV cccDNAには γ ヘルペスウイルスにみられる潜伏感染複製オリジン(ori-P)は存在せず、細胞分裂の際に複製・分配・維持されることなくしだいに希釈されていくと想定される。

私どもは肝実質細胞を標的とした遺伝子治療を達成する目論見で、約20年前に本タイプの遺伝子挿入HBVベクターの開発に挑んだ経緯がある。その後Schallarらを中心として本タイプの遺伝子挿入HBVベクターが作製可能であることが示されている²¹⁾。

2. HBV pseudotype particles (HBVpp)型

このタイプの遺伝子挿入型HBVは、VSV-Gを使った pantropic retrovirus, あるいは lenti-

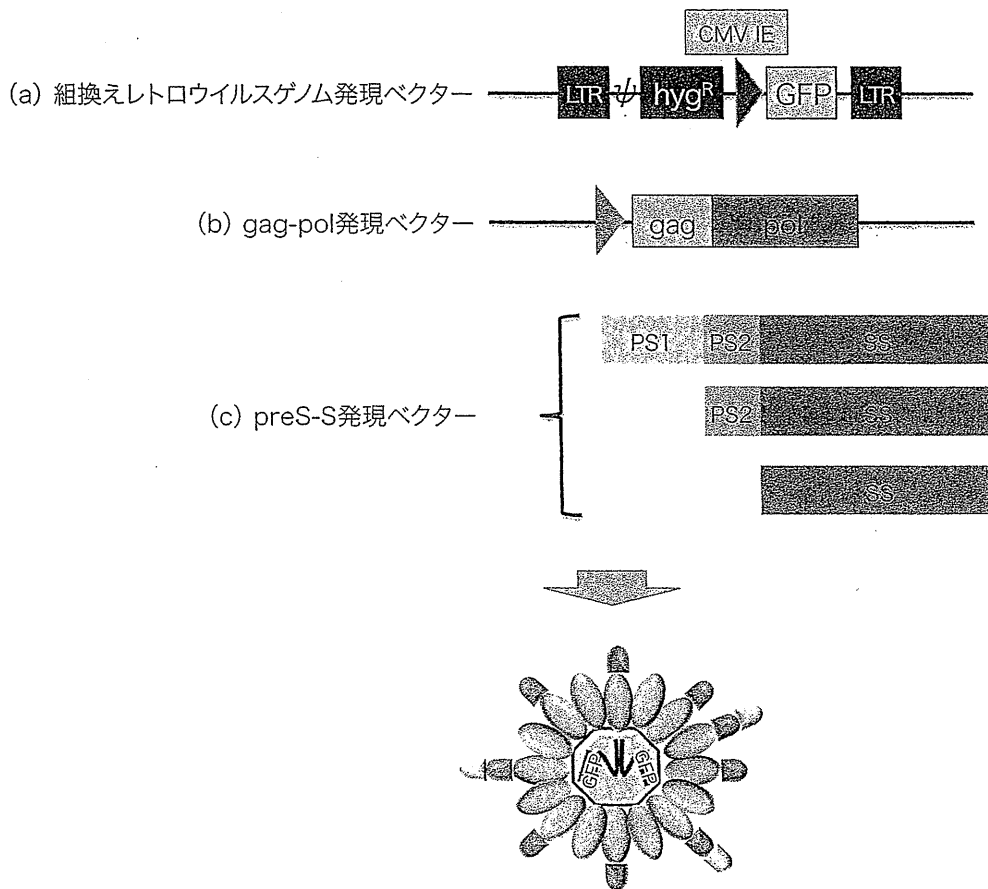


図4 HBVpp型のデザイン

このタイプではレトロウイルスのRNAゲノムを供給する発現ベクター (a), コア粒子と逆転写過程からプロウイルス合成に必要な pol を供給する gag-pol 発現ベクター, HBV 膜粒子を供給する HBV の 3 つの膜蛋白を供給する発現ベクターが必要となる. (b) に HIV 型を用い, (a) に HIV (レンチウイルス) 型のゲノムを供する rev responsive element (RRE) などの必要なエレメントを携えておけば, レンチウイルス型のレトロウイルスベクターとなる. (a) あるいは (b) をあらかじめ安定型培養細胞株として樹立してパッケージング細胞として使用することも可能である. LTR: long terminal repeat. hyg^R : hygromycin resistance gene. CMV IE: cytomegalovirus immediate early enhancer-promoter. GFP: green fluorescent protein. ψ : レトロウイルスパッケージングシグナル. \triangleright : エンハンサー-プロモーター.

virus において VSV-G を HBV 膜蛋白に変えた pseudo-HBV である. HCV でも pseudotype particles (HCVpp) として試みられている²²⁾. HBVpp は付着・侵入は HBV の過程を辿り, それ以降の過程はレトロウイルスの生活環に従う. 最終的には逆転写過程を経て, プロウイルスとして安定的に感染宿主細胞ゲノムに組み込まれるので, 培養細胞など, 継代が基本的に可能な細胞を用いた場合, ウイルス遺伝子として蛍光蛋白遺伝子や薬剤耐性遺伝子

を挿入しておけば, 感染細胞はクローン化できることになる.

問題となるのは, 通常のレトロウイルスベクターを用いた場合, 感染後, プロウイルスを形成し, 安定的な挿入遺伝子の発現まで数日から1週間程度の時間を要する点である. この意味で lentivirus 型のレトロウイルスをベースにした HBVpp が望ましいかもしれない.

私どもの研究室では, 肝実質細胞の cDNA

ライブラリーを培養肝癌細胞へ導入後、HBVppの感染性を指標にしたHBV感染レセプターの分離・同定を試みる戦略で通レトロウイルス型HBVppの構築を独自に試みた。まずレトロウイルスのgag-pol遺伝子を発現する細胞にEGFP (EGFP)とハイグロマイシン耐性遺伝子(HygR)を挿入したレトロウイルスベクターゲノムを組み込んだパッケージング細胞を作製し、この細胞に3つのHBV膜蛋白を発現させることで培養上清中にHBV膜蛋白を被ったウイルス粒子が産生されるかどうかを検討した。抗HBs抗体による免疫沈降、ウイルスゲノム抽出、RT-PCRで免疫沈降したサンプルに挿入したEGFP遺伝子が確認された。セシウム密度勾配超遠心法でもHBV粒子密度に近い1.22 g/ml近傍に粒子が集積することや、電顕によっても粒子形成されていることが確認された²³⁾。なお、本HBVppの感染能についていくつかの知見を得ているが本稿では差し控えたい。

8 おわりに

以上、遺伝子挿入HBVベクターについて概説した。HBVベクタータイプもHBVppタイプも作製可能であり、それぞれの利点を活かしたHBV感染レセプターの分離・同定における利用価値は高いと思われる。またこれら2つの遺伝子挿入HBVベクターは感染性を指標にしたアッセイ系を組み立てることにより、HBV感染レセプター分離・同定後の*in vitro*、および*in vivo*におけるHBV生活環や病態解析解明、治療法の開発とその評価系の構築に有用性は極めて高いものと思われる。

文 献

- 1) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S : A "New" Antigen in Leukemia Sera. JAMA 191 : 541-546, 1965
- 2) Seeger C, Zoulim F, MASON WS : Hepadnaviruses. In "Fields Virology". 5th ed , 2007, pp2977-3029
- 3) Funk A, Mhamdi M, Will H et al : Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. World J Gastroenterol 13 : 91-103, 2007
- 4) Menne S, Cote PJ : The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 13 : 104-124, 2007
- 5) Hellström U, Sylvan S : Human serum albumin and the enigma of chronic hepatitis type B. Scand J Immunol 23 : 523-527, 1986
- 6) Li JS, Tong SP, Wands JR : Characterization of a 120-Kilodalton pre-S-binding protein as a candidate duck hepatitis B virus receptor. J Virol 70 : 6029-6035, 1996
- 7) Kuroki K, Cheung R, Marion PL et al : A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. J Virol 68 : 2091-2096, 1994
- 8) Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K : Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 444-448, 1987
- 9) Sells MA, Chen ML, Acs G : Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 1005-1009, 1987
- 10) Bchini R, Capel F, Dauguet C et al : In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. J Virol 64 : 3025-3032, 1990
- 11) Gripon P, Rumin S, Urban S et al : Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 15655-15660, 2002
- 12) Hantz O, Parent R, Durantel D et al : Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. J Gen Virol 90 : 127-135, 2009
- 13) Marion MJ, Hantz O, Durantel D : The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. Methods Mol Biol 640 : 261-272, 2010
- 14) Schulze A, Mills K, Weiss TS et al : Hepatocyte

- polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* 55 : 373–383, 2012
- 15) Neurath AR, Kent SB, Strick N et al : Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46 : 429–436, 1986
 - 16) Petit MA, Dubanchet S, Capel F et al : HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-preS1 (21-47) . *Virology* 180 : 483–491, 1991
 - 17) Blanchet M, Sureau C : Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* 80 : 11935–11945, 2006
 - 18) Glebe D, Urban S : Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13 : 22–38, 2007
 - 19) Kuroki K, Eng F, Ishikawa T et al : gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem* 270 : 15022–15028, 1995
 - 20) Beck J, Nassal M : Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13 : 48–64, 2007
 - 21) Protzer U, Nassal M, Chiang PW et al : Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10818–10823, 1999
 - 22) Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM et al : Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446 : 801–805, 2007
 - 23) Ueda K, Ohsaki E, Omori H : submitted.

*

*

*

Clinical Relevance and Sequence Analysis of the *Helicobacter pylori* *dupA* Region from Two Areas in Japan with Different Gastric Cancer Risks

Hidetaka Matsuda¹, Yoshiyuki Ito¹, Hiroyuki Suto¹, Akiyo Yamakawa¹, Satoko Satomi¹, Masahiro Ohtani^{1,2}, Yukinao Yamazaki^{1,2}, Yukinori Kusaka³, Yoshiki Shimabukuro⁴, Kaoru Kikuchi⁴, Yoshihide Keida⁴, Takeshi Azuma⁵, Yasunari Nakamoto¹

¹Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan; ²Department of Endoscopic Medicine, University of Fukui Hospital, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan; ³Department of Environmental Health, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan; ⁴Division of Internal Medicine, Okinawa Chubu Hospital, Okinawa 904-2293, Japan; ⁵Frontier Medical Science in Gastroenterology, International Center for Medical Research and Treatment, Kobe University School of Medicine, Kobe 650-0017, Japan

Abstract

Background & Aims: We investigated the virulence and sequences of duodenal ulcer-promoting gene A (*dupA*) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) isolated from 2 areas in Japan with different gastric cancer risks.

Methods: The *dupA* status of 248 Japanese *H. pylori* strains (111 from Fukui and 137 from Okinawa) isolated from patients with duodenal ulcers, gastric ulcers, chronic gastritis, or gastric cancer was evaluated by dot-blot hybridization followed by polymerase chain reaction. Sequence analyses of *dupA* and its upstream region were performed in 15 strains.

Results: In both areas, no significant association was observed between *dupA* and the evaluated clinical outcomes. In a multivariable logistic regression, *dupA* positivity was independently associated with strains isolated from Okinawa, showing the lowest incidence of gastric cancer in Japan, and with East Asian-type *cagA* positivity (odds ratio [OR]=2.128, 95% confidence interval [CI] =1.146–3.949 and OR=12.924, 95% CI=1.689–98.901, respectively). Sequence alignment showed *dupA* was divided into 2 genotypes: a Shi470-type (2499 bp) and a J99-type (1839 bp). Among 60 *dupA*⁺ Japanese strains, 58 (96.7%) were of the Shi470-type and 2 of the J99-type. The nucleotide sequences of 13 Shi470-type Japanese isolates from both areas were highly homologous (98.9%) to each other and a remote Amazonian strain, Shi470. Of these, 12 (92.3%) carried intact full-length *dupA*.

Conclusion: In Japan, *dupA* appeared to be associated with East Asian-type *cagA* and with host residence in Okinawa. The intact genotype of the Shi470-type *dupA* was the major form in Japan.

Immunogastroenterology 2012; 1:127-135

Key words

Helicobacter pylori; *dupA*; *cagA*; virulence factors; type IV secretion system; Okinawa

Introduction

Chronic *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is a definitive risk factor for various gastroduodenal diseases such as peptic ulcers, gastric adenocarcinoma, and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.¹⁻³ Although the mechanism of this infection in humans has been extensively studied, no definitive explanation has been obtained. Although infection with strains producing cytotoxin-associated gene A antigen (CagA) and vacuolating cytotoxin (VacA) are reported to increase the risk of severe gastroduodenal diseases in the West, this association has not been demonstrated in East Asia.⁴⁻¹⁰ In addition, none of the reported virulence factors including *cagA* and *vacA* expression has

been confirmed to be a definitive marker for any single specific clinical outcome.¹¹⁻¹³

H. pylori exhibits a higher degree of genomic and allelic diversity than most other bacterial species, and significant geographic differences exist among strains.¹⁴⁻¹⁶ Geographic diversity in the *H. pylori* virulence genes has been associated with different regional prevalences in gastroduodenal diseases; the prevalence of gastric cancer (GC) is higher in Japan than in other countries.^{17,18} However, Okinawa has the lowest prevalence of GC in Japan and approximately half of that in other prefectures.¹⁹ On the other hand, the prevalence of *H. pylori* in Okinawa does not differ significantly from those in other parts of Japan.²⁰ To investigate the differences in the prevalence of GC between Okinawa and other prefectures in Japan, we previously analyzed the sequences of *H. pylori* virulence genes isolated from patients in 2 distinct Japanese areas (Okinawa and Fukui) and found that the genotypes of *cagA* were the most important factor causing the discrepancy.^{19,21-27}

Recently, Lu et al. described a novel *H. pylori* virulence factor,

Yasunari Nakamoto, Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan; Email: nakamoto-med2@med.u-fukui.ac.jp

Submitted: 26/02/2012; Revised: 20/03/2012; Accepted: 12/06/2012

DOI: 10.7178/ig.21

designated duodenal ulcer-promoting gene A (*dupA*).²⁸ *dupA* comprises 2 genes—*jhp0917* and *jhp0918*—present in the *H. pylori* plasticity zone. A single base-pair insertion (C or T) in the 3' region of *jhp0917* confers a continuous 1839 bp open reading frame (ORF). As *dupA* shows homology to *virB4*, a *virB/D* homolog gene encoding the type IV secretion system (T4SS) of *Agrobacterium tumefaciens*, this gene is considered a component of a novel TFSS of *H. pylori*.^{11,28-30}

Infection with *dupA*⁺ strains is associated with increased interleukin-8 (IL-8) production from the gastric antral mucosa and the development of duodenal ulcers (DUs), in 3 different countries (Japan, Korea, and Colombia). Infection with the *dupA*⁺ strain is also a potential protective factor against atrophic gastritis and GC.²⁸ However, subsequent studies in various geographic areas were unable to confirm the close association between *dupA* and clinical outcomes.³¹⁻⁴² Moreover, the findings of previous Japanese studies have been inconsistent.^{28,39,40}

The association between the presence of *dupA* and other virulent factors of *H. pylori* remains largely unexamined. Although some previous studies have discussed the association between the statuses of *dupA* and *cagA*,^{31-35,37,42} the genetic diversity of *cagA* (i.e., the East Asian-type or the Western-type) was not considered. Similarly, the genetic structure of *dupA* is not well known. Most previous studies analyzed the limited nucleotide sequences corresponding to *jhp0917* and *jhp0918*,^{28,31,33,34,36,38,39,41,43,44} but only a few have investigated the surrounding *dupA* regions, especially the upstream ones, which may regulate *dupA* expression.^{30,45,46} In this study, we aimed to examine whether (i) *dupA* could be a disease-specific risk determinant in Japan; (ii) *dupA* could explain the lower risk of GC in Okinawa; and (iii) *dupA* and *cagA* statuses were associated, even when the genotypes of *cagA* (i.e., the East Asian or Western genotype) were considered. We also discuss whether the genetic diversity of the *dupA* upstream region exists among the groups of clinical isolates in Japan.

Materials and Methods

H. pylori strains, culture, and DNA extraction

A total of 248 clinical *H. pylori* isolates were obtained from Japanese patients (111 patients in Fukui and 137 in Okinawa) during upper gastrointestinal endoscopy performed at the University of Fukui Hospital, Fukui, and Okinawa Chubu Hospital, Okinawa. The patient group in Fukui comprised 20 patients with DU, 20 with gastric ulcer (GU), 39 with chronic gastritis, and 32 with GC. The patient group in Okinawa comprised 26 patients with DU, 18 with GU, 60 with chronic gastritis, and 33 with GC. This study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from each patient and the institutional ethics committee approved the study protocol. The presence of *H. pylori* in a patient was confirmed through positive results of the rapid urease test (RUT), the C13 urea breath test (UBT), or a histological analysis. The clinical diagnosis was established by endoscopic findings. In addition, the diagnosis of GC was histologically confirmed in all cases. *H. pylori* culture and DNA extractions were conducted as described previously.²¹⁻²⁵ Patients

from whom *H. pylori* could not be cultured were excluded from the study.

H. pylori sequence analysis

The primers used in this study are shown in **table 1** and **figure 1**. The presence of *dupA* was defined by both dot-blot hybridization and polymerase chain reaction (PCR) as described below.

Dot-blot hybridization was performed using Hybond-N⁺ nylon membranes (GE Healthcare Lifesciences, Uppsala, Sweden) containing 10-20 ng aliquots of genomic DNA per spot from each strain of interest and hybridization probes labeled using the enhanced chemiluminescence kit (AmershamTM ECLTM Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System; GE Healthcare Lifesciences), according to the manufacturer's instructions. Probes for the 2 *dupA* segments (*jhp0917* and *jhp0918*) were generated by PCR from J99 genomic DNA with primers JHP0917(+) and JHP0917(-) (307 bp product) and JHP0918-1F and JHP0918-1R (377 bp product). The PCR-amplified DNAs were purified using the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) prior to ECL labeling for use in hybridization according to the manufacturer's instructions. A probe for *ureI* (a housekeeping gene of *H. pylori*) was used as a positive control for hybridization.

Following the dot-blot hybridization, PCR was performed using the DupAF113/R1083 and DupAFb/Rb primer pairs. Specific PCR and DNA sequencing was conducted as described previously.²¹⁻²⁷ The PCR products were purified on Centricon-100 Concentrator columns (Amicon, Beverly, MA, USA) and then sequenced directly using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Cycle sequencing reactions were performed for both strands. DNA sequencing editing and analysis were performed with GENETYX-MAC software version 14.0.1 (GENETYX Corporation, Tokyo, Japan).

For the dot-blot hybridization, the tested strains were considered *dupA*⁺ or *dupA*⁻ if the *jhp0917* and *jhp0918* genes were both present or absent, respectively. When a strain was positive for only one of these genes, the *dupA* status was defined in accordance with the PCR results. For the PCR assay, only strains showing both DupAF113/R1083 and DupAFb/Rb positivity were considered *dupA*⁺, while all the remaining strains were defined as *dupA*⁻. Both assays were performed for all strains. If a strain showed discrepant results between the 2 tests, the PCR result was adopted to define its *dupA* status.

The *cagA* detection and genotyping of all 248 isolates were performed by PCR tests and subsequent direct sequencing as described previously.²³⁻²⁷

Nucleotide sequence accession numbers

The DNA sequences of the *dupA* region of the 14 representative Japanese strains used in this study were deposited in the DDBJ database under accession numbers AB617832-AB617845; their characteristics are listed in **table 2**. In this study, we refer to the released sequences of 12 *H. pylori* strains whose complete genomes were deposited in GenBank under the following accession numbers: AE001439 for J99, CP001072 for Shi470,

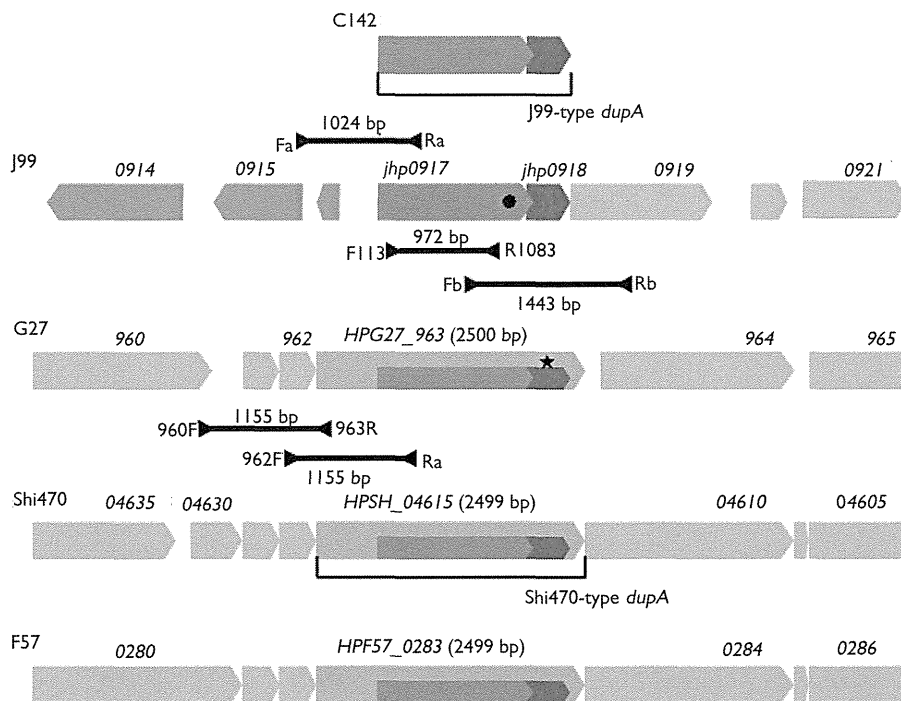


Figure 1. Comparison of the genomic regions surrounding duodenal ulcer-promoting gene A (*dupA*) in 4 published *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) genomes and strain C142. The positions of the primers used in this study are also shown.

Sequences of *dupA* (corresponding to *jhp0917* and *jhp0918*) and the surrounding region in the published full-genome sequences of 4 *dupA*⁺ *H. pylori* strains—J99 from the United States, G27 from Italy, Shi470 from a remote Amazonian village in Peru, and F57 from Japan—and strain C142 from Colombia are shown. Initially, *dupA* was reported in J99 as a 1839 bp gene consisting of *jhp0917* and *jhp0918* genes and was found to contain a 1 bp insertion at the 3' end of *jhp0917*, which J99 lacked (indicated by a black dot). Lu et al. found *dupA* of C142 to be a representative gene.²⁷ In strains Shi470 and F57, the sequences corresponding to *dupA* (*jhp0917* and *jhp0918*) were parts of continuous 2499 bp genes, which were highly homologous to each other (*HP_04615* and *HPF57_0283*, respectively). *HPG27_963*, a 2500 bp sequence in strain G27, was homologous to both *HP_04615* and *HPF57_0283* but contained a stop codon created by a 1-bp insertion of a “T” after position 1176, leading to truncation of the gene product (indicated by a black star). In this study, *jhp0917* and *jhp0918* with the described 1 bp insertion was defined as the J99-type *dupA* (indicated by red and blue boxes) and *HPSH_04615* as the Shi470-type *dupA* (indicated by a green box). In J99, the upstream region of *dupA* was completely different from those of the 3 other strains with a full published genome. The nucleotide sequences surrounding Shi470-type *dupA* of Shi470, F57, and G27 were homologous. In the present study, 5 primer pairs were designed to confirm the positivity of *dupA* and consequently classify the genotype of *dupA* as either the J99 or Shi470 type.

CP001173 for G27, CP002076 for Cuz20, CP002184 for HP 908, CP002332 for Gambia 94/24, CP002336 for SouthAfrica7, AP011945 for F57, CP002571 for HP 2017, CP002572 for HP 2018, CP002982 for Puno135, and CP002983 for SNT49. We also refer to the *dupA* sequence of strains C142 (GenBank accession number AB196363; **Fig. 1**), and AB21 (GenBank accession number GU932735).

Statistical analysis

The associations of *dupA* prevalence with clinical diagnosis, geographic locations, and *cagA* genotypes were examined using the Fisher's exact probability test for univariate analysis, and multivariable logistic regression for multivariable analysis. In the multivariable logistic regression, *dupA* positivity was used as a dependent variable and the other 3 as independent variables. All tests were 2-sided, and a probability level (*P*) of <0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Association between *dupA* and clinical outcomes or *cagA* status

Among the 111 tested strains from Fukui, 24 (21.6%) were positive for both *jhp0917* and *jhp0918* on the dot-blot hybridization, while 22 (19.8%) were positive for both DupAF113/R1083 and DupAFb/Rb according to the PCR test. Accordingly, these strains were defined as *dupA*⁺ on each test. For the dot-blot hybridization, 2 strains were positive for both *jhp0917* and *jhp0918*, but were finally revealed to be *dupA*⁻ by the PCR. One strain was considered *dupA*⁻ because it was *jhp0917*⁺ but *jhp0918*⁻ on the dot-blot hybridization and was confirmed as *dupA*⁻ based on the PCR results. In Okinawa, no strains showed opposite results between the dot-blot hybridization and the PCR tests. The findings were consistent between these 2 tests, with 38 (27.7%) of the 137 tested Okinawan strains defined as *dupA*⁺. The overall agreement between the dot-blot hybridization and the PCR results was 98.2% (109/111) in Fukui and 100% (137/137) in Okinawa, respectively. Combining the results of the

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'→3')	Reference
DupAF113	GACGATTGAGCGATGGGAATAT	Argent et al. (2007)
DupARI083	CTGAGAAGCCTTATTATCTTGTTGG	Argent et al. (2007)
DupAFa	TCCCAAATGCTTTGCCTGCG	Present study
DupARa	GCGCTCTGTCAGTAGAAACC	Present study
DupAFb	TGAGCGTGGTAGCTCTTGAC	Present study
DupARb	TCGCTTACAATCCTACCTAGCC	Present study
DupA960F	CCTGAGCCTGTGAATAAACCTG	Present study
DupA963R	ATATGGCGTGGTCTATTGGTG	Present study
DupA962F	GTGTAGCCACCTCTTCTTATC	Present study
JHP0917 (+)	TGGTTTCTACTGACAGAGCGC	Lu et al. (2005)
JHP0917 (-)	AACACGCTGACAGACAATCTCCC	Lu et al. (2005)
JHP0918-1F	CTCAAGCTAGAAAGATCAACGG	Present study
JHP0918-1R	ACTCTTCCTATAAGTTTCTTGG	Present study

Table 2 Characteristics of the sequenced strains

<i>H. pylori</i> strain	Origin	Disease	<i>cagA</i> genotype	<i>dupA</i> genotype	<i>dupA</i> size (bp)	<i>dupA</i> null mutation
F51	Fukui	DU	East Asian	Shi470	2499	-
F57	Fukui	GC	East Asian	Shi470	2499	-
F58	Fukui	Gastritis	East Asian	Shi470	2499	-
F64	Fukui	DU	East Asian	Shi470	2499	-
F77	Fukui	GU	East Asian	Shi470	2499	-
F80	Fukui	Gastritis	Hybrid	J99	1840	+
F228	Fukui	GC	East Asian	Shi470	2499	-
OK99	Okinawa	DU	East Asian	Shi470	2499	-
OK108	Okinawa	GU	East Asian	Shi470	2499	+
OK165	Okinawa	Gastritis	East Asian	Shi470	2499	-
OK169	Okinawa	DU	East Asian	Shi470	2499	-
OK203	Okinawa	Gastritis	Western	Shi470	2499	-
OK303	Okinawa	GC	East Asian	Shi470	2499	-
OK309	Okinawa	GC	East Asian	Shi470	2499	-
OK317	Okinawa	Gastritis	East Asian	J99	1840	+

H. pylori, *Helicobacter pylori*; *cagA*, cytotoxin-associated gene A; *dupA*, duodenal ulcer-promoting gene A; DU, duodenal ulcer; GC, gastric cancer; GU, gastric ulcer.

dot-blot hybridization and the PCR, the *dupA* status of Fukui and Okinawa were determined.

Twenty-two (19.8%) *dupA*⁺ strains were found in Fukui. The frequency was higher in strains from patients with DU (7/20, 35.0%) than in those from patients with GU (3/20, 15.0%), chronic gastritis (6/39, 15.4%), or GC (6/32, 18.8%). The *dupA* gene was positive in 38 strains (27.7%) isolated in Okinawa, and the prevalence was greater among strains from patients with GC (14/33, 42.4%) than in those with DU (5/26, 19.2%), GU (5/18, 27.8%), or chronic gastritis (14/60, 23.3%). However, no statistical significance between the *dupA* status and clinical outcomes was observed in both areas (Table 3). Further, no association was observed between the *dupA* status and GC histology, with the intestinal and diffuse types observed in both areas (data not shown).

We also determined the *cagA* genotypes. Two strains of F80 (*dupA*⁺) and OK204 (*dupA*⁻) carried the East Asian-type

CagA motif (AB'DD and ABD, respectively) but were assigned as Western in origin on the basis of our previous phylogenetic analysis of *cagA* and were considered a hybrid type. Both F80 and OK 204 were isolated from DU patients. Another strain (OK181) isolated from an Okinawan host with chronic gastritis could not be classified owing to the lack of a *CagA* C/D motif, but was assigned as a Western type by phylogenetic analysis. Consistent with our previous reports,²³ a variety of genotypes was observed for *cagA* among the 137 *H. pylori* strains in Okinawa, including 110 (80.3%) strains with East Asian-type *cagA*, 20 (14.6%) with Western-type *cagA*, 6 (4.4%) *cagA*⁻ strains, and 1 (0.7%) with hybrid-type *cagA*. In contrast, almost all strains in Fukui (109/111, 98.2%) possessed East Asian-type *cagA*, only 1 (0.9%) carried Western-type *cagA*, and none were *cagA*⁻. One (0.9%) strain with hybrid-type *cagA* was also detected in Fukui. This observed high *cagA* prevalence in Japan was also consistent with previous reports.^{47,48}

Next, we focused on the relationship between *dupA* and *cagA* statuses for *H. pylori*. We measured the *dupA* prevalence of *H. pylori* strains with East Asian-*cagA*, the most dominant *cagA* genotype in Japan, against those with non-East Asian *cagA* status (i.e., the combination of Western-type *cagA*⁺ and *cagA*⁻ strains). The 2 strains with hybrid-type *cagA* were excluded from this analysis due to the association between *dupA* and *cagA*. In Okinawa, only 1 *cagA*⁻ strain (3.8%) of the 26 Western-type *cagA* or *cagA*⁻ strains was *dupA*⁺. In contrast, 37 (33.6%) of the 110 Okinawan strains with the East Asian-type *cagA* carried *dupA* ($p=0.0013$)(Table 4). The relationship of *dupA* and *cagA* statuses could not be assessed in Fukui because of the extremely small number of *H. pylori* strains with non-East Asian *cagA* status.

In the 246 tested Japanese strains isolated from both Fukui and Okinawa (excluding F80 and OK204), the associations of *dupA* prevalence with clinical diagnosis, geographic locations, and *cagA* genotypes were analyzed (Table 5). In the univariate analysis, only East Asian-*cagA* positivity was related to the presence of *dupA* (26.5% vs. 3.7%, $p=0.0073$). In the multivariate analysis, strains isolated from Okinawa and those with East Asian-type *cagA* positivity were significantly associated with an increased probability for *dupA* positive status (odds ratio [OR]=2.128, 95% confidence interval [CI]=1.146-3.949 and OR=12.924, 95% CI=1.689-98.901, respectively). No significant association was found between any tested clinical diagnosis and *dupA* status in both statistical analyses.

Comparison of *dupA* sequences and the upstream region between genome-sequenced reference strains

We first compared *dupA* sequences (corresponding to *jhp0917* and *jhp0918*) and the upstream region between the released genome sequences from 3 *dupA*⁺ *H. pylori* strains (Shi470, G27, and J99). In strain Shi470, the sequence corresponding to *dupA* (*jhp0917* and *jhp0918*) was part of a continuous 2499 bp gene, *HP_04615*. *HPG27_963* is a 2500 bp sequence from strain G27, which was isolated from Italy and was homologous to *HP_04615*; however, *HPG27_963* contained a stop codon, resulting in the truncation of this gene product. In J99, the upstream region of *dupA* was entirely different from those of the other 2 strains. In the genome sequences of J99, the direction of *jhp0917*, *jhp0918*, and the downstream genes was opposite to that of *jhp0916*, *jhp0915*, and *jhp0914*, while the series of genes centered by *HP_04615* and *HPG27_963* were aligned in the same direction in the partial genome sequences of Shi470 and G27, respectively (Fig. 1). Thus, we hypothesized the “original” *dupA* reported by Lu et al. may be the legacy of a truncated gene that resulted from the deletion of the 5' region of the full-length *dupA*. Here, we sub-classified *dupA* into 2 genotypes by defining *jhp0917* and *jhp0918* as J99-type *dupA* and *HPSH_04615* as Shi470-type *dupA*. On the basis of these results, a chromosomal alignment was performed from 12 released *H. pylori* genome sequences available in the public database GenBank as of February 2012. Seven strains (Shi470, G27, Cuz20, SouthAfrica7, F57, Puno135, and SNT49) were of the Shi470 type, and 5 strains (J99, HP 908, Gambia 94/24, HP 2017, and HP 2018), of the J99 type. Strains HP 2017 and HP 2018 were the chronological subclones of HP 908.⁴⁹ With the exception of G27, the Shi470-type strains carried intact full-

length *dupA* consisting of 2499 bp.

Sub-classification of *dupA* into 2 genotypes

On the basis of the published sequences, 3 primer pairs were designed for PCR to distinguish the 2 *dupA* genotypes (the Shi470 and J99 types) (Table 1 & Fig. 1). All 60 *dupA*⁺ strains in this study (22 from Fukui and 38 from Okinawa) were examined: 58 (96.7%) were of the Shi470 type, 57 were positive for both 960F/963R and 962F/Ra and were of the Shi470 type, 1 strain (OK329) was positive for 962F/Ra but was negative for 960F/963R and was assigned as the Shi470 type, and 2 strains (F80 and OK317) were positive for only Fa/Ra and were classified as the J99 type (Table 2 & Table 6).

Sequence analysis of full-length *dupA* from clinical isolates in Japan

We next examined the sequence diversity of 15 full-length *dupA* from Japanese clinical isolates. We compared 13 Shi470-type Japanese strains (6 from Fukui and 7 from Okinawa), including F57, whose complete genome sequence was recently released. Twelve of these strains (92.3%) carried intact full-length *dupA* (Table 2). Alignments of the nucleotide and amino acid sequences showed these strains were highly homologous (98.9%, standard deviation [SD] ± 0.4) irrespective of the clinical outcome and the area of isolation (Fukui or Okinawa). The remote Amazonian strain Shi470 was also highly homologous to those 13 Japanese strains (98.5%, $SD\pm 0.2$)(Table 7). Sequences from the remaining 2 Japanese strains (F80 and OK317), which carried the J99-type *dupA*, were also compared with the corresponding J99 sequences (1838 bp). These strains were highly homologous to each other (99.9%) but less homologous to J99 (95.7%). A G/T insertion at position 1633, resulting in a null mutation, was found in both strains (Table 2); this mutation was previously reported in a strain from Argentina.⁴⁴ All 15 Japanese strains possessed the 1 bp insertion of a C or T in the 3' region of *jhp0917*, which was initially reported by Lu et al. Recently, Hussein et al. also classified *dupA* into 2 main groups. These investigators reported that *dupA1* was a 1884 bp ORF with a longer 3' end than that initially described by Lu et al. and that *dupA2* was a truncated gene.⁴⁵ To evaluate the correspondence of the Shi470-type *dupA* to *dupA1*, we compared the 13 Shi470-type *dupA* sequences of the Japanese isolates included in the present study, with the *dupA1* sequence of strain AB21 released by Hussein et al. We found all of these sequences included an intact *dupA1* at the 3' end of the gene. OK108, a strain with an incomplete Shi470-type *dupA*, also possessed intact *dupA1* sequences, as the stop codon causing a truncation of the 2499 bp ORF was located upstream of the beginning of the *dupA1* lesion.

Discussion

In this study, we found no significant association between *dupA* and certain diseases in the 2 distant areas in Japan (Fukui and Okinawa) and could confirm no relationship between the *dupA* gene and the lower incidence of GC in Okinawa. However, our results indicated patients infected with *dupA*⁺ strains were prone to DU in Fukui, as opposed to the high frequency of *dupA*⁺ strains

Table 3 Comparison of *dupA* prevalence among *H. pylori* groups with various clinical outcomes in the 2 different areas in Japan

Clinical outcome	<i>dupA</i> prevalence (%)	
	Fukui (n=111)	Okinawa (n=137)
Duodenal ulcer	7/20 (35.0)	5/26 (19.2)
Gastric ulcer	3/20 (15.0)	5/18 (27.8)
Chronic gastritis	6/39 (15.4)	14/60 (23.3)
Gastric cancer	6/32 (18.8)	14/33 (42.4)
Total	22/111 (19.8)	38/137 (27.7)

H. pylori, *Helicobacter pylori*; *dupA*, duodenal ulcer-promoting gene A.

Table 4 Relationship between *dupA* prevalence and the *cagA* genotype

<i>cagA</i> genotype	<i>dupA</i> prevalence (%)	
	Fukui	Okinawa
East Asian	21/109 (19.3)	37/110 (33.6)
Western and <i>cagA</i> ⁻	0/1 (0.0)	1/26 (3.8)

In Okinawa, *dupA* positivity was significantly higher in the East Asian-type *cagA*⁺ strains than in the Western-type *cagA*⁺ and *cagA*⁻ strains (P=0.0013, Fisher's exact probability test). Two stains isolated from duodenal ulcer hosts with hybrid-type *cagA*, F80 (*dupA*⁺) and OK204 (*dupA*⁻), were excluded. *cagA*, cytotoxin-associated gene A; *dupA*, duodenal ulcer-promoting gene A.

Table 5 The associations of *dupA* prevalence with clinical diagnosis, geographic locations, and *cagA* genotypes

	<i>dupA</i> positivity (%)	Univariate ^a p value	Multivariate ^b	
			OR (95% CI)	p value
Disease				
Chronic gastritis	20/99 (20.2)	Referent	–	0.472
Gastric ulcer	8/38 (21.1)	1.0000	–	0.272
Duodenal ulcer	11/44 (25.0)	0.5177	–	0.295
Gastric cancer	20/65 (30.8)	0.1395	–	0.167
Geography				
Okinawa	38/136 (27.9)	0.1330	2.128 (1.146–3.949)	0.017
Fukui	21/110 (19.1)			
<i>cagA</i> genotype				
East Asian	58/219 (26.5)	0.0073	12.924 (1.689–98.901)	0.014
Non-East Asian	1/27 (3.7)			

Two stains isolated from duodenal ulcer hosts with hybrid-type *cagA*, F80 (*dupA*⁺) and OK204 (*dupA*⁻), were excluded. *dupA*, duodenal ulcer-promoting gene A; OR, odds ratio; CI, confidence interval; *cagA*, cytotoxin-associated gene A; a Fisher's exact probability test; b multivariable logistic regression.

Table 6 Distribution of *dupA* genotypes in clinical strains

	Prevalence (%)		
	Fukui (n=22)	Okinawa (n=38)	Total (n=60)
J99-type	1 (4.5)	1 (2.6)	2 (3.3)
Shi470-type	21 (95.5)	37 (97.4)	58 (96.7)

dupA, duodenal ulcer-promoting gene A.

among patients with GC in Okinawa. In a systematic review, Hussein reported *dupA* promotes DU in some populations and GU and GC in others.⁵⁰ Meanwhile, based on a meta-analysis, Shiota et al. reported the importance of *dupA* positivity in DU pathogenesis, especially in Asian countries.³¹ These conflicting results probably result from differences in the circulating *H. pylori* strains between East Asia and the West. Although the mechanism by which *H. pylori* is involved in 2 extremely different gastroduodenal diseases (DU and GC) remains unclear, our discrepant results in 2 different areas in Japan suggest *dupA* may be one of the virulence determinants that causes severe diseases, while other virulence factors, host differences, and environmental factors might affect the clinical outcome of the infection. Fukui is a typical rural prefecture located on the central Japanese mainland (Honshu), while Okinawa consists of islands in the southwestern part of Japan. Historically, Okinawa has had more

active international communication than the rest of the country. Because these geographical and historical factors may affect the development of gastroduodenal diseases in Okinawan hosts, the pathogenesis of *H. pylori* isolated from Okinawa needs to be analyzed more comprehensively.

Seven studies have investigated the association of *dupA* with *cagA*, one of the most widely studied virulence genes, but the results have been inconsistent. A positive association between the *dupA* and *cagA* statuses was reported in a study investigating strains isolated from patients with chronic gastritis or DU in North India,³¹ whereas 3 other studies refuted the presence of a relationship with any clinical outcomes in China,³⁷ Iraq, and Iran.^{35,42} Douraghi et al. reported *dupA* was associated with *cagA* only in patients with DU in Iran.³⁴ A Brazilian study also reported the association of these 2 genes was limited to a group of strains from adult hosts with DU.³³ Argent et al. investigated the