

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790285

研究課題名（和文） ヒロリ菌 CagA 遺伝子型の血清診断法の開発

研究課題名（英文） A novel diagnostic monoclonal antibody specific for Helicobacter pylori CagA of East Asian type.

研究代表者

内田 智久 (UCHIDA TOMOHISA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70381035

研究成果の概要（和文）：

東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌に対するモノクローナル抗体を樹立し、免疫組織化学で東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌感染を正確に診断できた。また、以前作成したポリクローナル抗体と組み合わせてサンドイッチ ELISA を開発し、その精度の高さ(感度、特異度はそれぞれ 88.0%、100%)を証明した。また、胃粘膜に近いピロリ菌で CagA の発現レベルが上昇を認めたことは、CagA の発現調節にピロリ菌と宿主細胞の接触が重要である可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We developed and validated an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using a monoclonal antibody specifically recognizing East Asian CagA positive H. pylori. A total of 32 H. pylori strains were tested and the data were subjected to receiver operator characteristic (ROC) curve analysis. The accuracy of the test, determined by calculating the area under the curve, was 0.96, which indicated a high level of accuracy. At the ROC optimized cut off, the sensitivity and specificity of our ELISA method were 88.0% and 100%, respectively. The validated ELISA showed good performance in terms of sensitivity and specificity. These results suggest that this test is suitable for the diagnostic detection of East Asian CagA carrying strains. We also analyzed the localization of the CagA protein in H. pylori infected gastric mucosa with fluorescence immunohistochemistry, and found that CagA protein expression was up regulated by adhesion to epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子病理学

科研費の分科・細目：人体病理学・消化器・唾液腺

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、CagA, 病原性、ELISA、モノクローナル抗体、胃がん

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

日本人の胃癌発症には *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染胃炎が深く関連している (Uemura, New Engl. J. Med., 2001)。しかし *H. pylori* による胃炎は胃癌の少ない欧米人にも高頻度にみられることから、欧米人に感染する *H. pylori* と本邦に蔓延している *H. pylori* の違いが注目されてきた。最近、日本人と欧米人の *H. pylori* の毒素性因子 CagA



の遺伝子型に違いが発見された。それは、CagA 蛋白質の C 末側に存在する EPIYA motif の構造が異なっていることで、欧米人の EPIYA motif は A, B, C(-C-C) のドメインからなるのに対して (西洋型 CagA)、日本人の EPIYA motif は A, B, D (東アジア型 CagA) と三番目のモチーフが異なっている (下図)。東アジア型 CagA に存在する EPIYA-D が CagA の機能的差異と、日本人と欧米人の発癌性の差をもたらすものと推測されている (Hatakeyama et al., Nature rev, 2004)。逆に、*cagA* の遺伝子型を診断することで胃癌発症リスクを予測できる可能性がある。

胃癌の発生頻度が高い東アジア諸国では、両遺伝子型の存在が指摘されているものの十分な調査は行われておらず両者の割合は明らかにされていない。つまり、*cagA* 遺伝子の遺伝子型が簡便に診断できれば胃癌発症リスクを予測する上で有用であると思われる。

これまでは *cagA* 遺伝子型の決定のためには、培養した *H. pylori* からゲノム DNA を抽出しシークエンスを行うしかなかった。この方法は正確であるものの、*H. pylori* の培養という特殊な操作と、シークエンスという実験上の煩雑さがあり研究室レベルでのみ可能な方法で、汎用性があるとは言い難いものであった。そこで、私は東アジア型 CagA を特異的に検出する抗体を作製できれば *cagA* 遺伝子型を蛋白質レベルで診断できると考え、東アジア型 CagA を特異的に認識する抗体: anti-East Asian CagA Specific antibody (α -EAS 抗体) を作製した (Uchida et al., Cancer Sci. 2007)。作製した α -EAS 抗体は免疫組織学化学的に良好な反応性を示した。この抗体を用いて内視鏡検査時に採取された胃生検組織の α -EAS 抗体による免疫染色と、同じ胃から分離培養された *H. pylori* のシークエンスにより決定した *cagA* 遺伝子型を 143 例について比較検討したところ、感度は 93.2% (123/132)、特異度は 72.7% (8/11) であり、我々が作製した α -EAS 抗体は *cagA*

遺伝子型を組織上で決定できる非常に有効な方法であることを明らかにした (論文投稿中)。したがって、本法は遺伝子解析より簡便で、安価で、かつ短時間で解析可能であり臨床的に有用であると考えられた。

2. 研究の目的

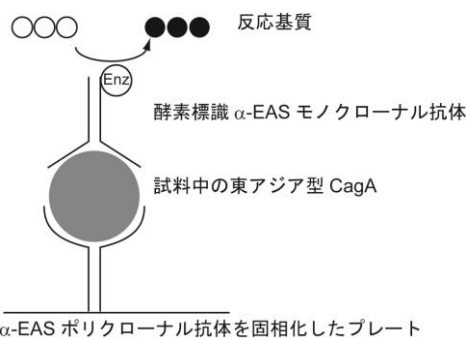
第一に胃粘膜生検組織抽出液から直接 CagA を検出できる ELISA キットを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

東アジア型 CagA 蛋白質に特徴的なアミノ酸 AINRKIDRINKIASAGKG を免疫されたマウスの脾臓とミエローマ細胞株 Sp2/0-Ag14 と細胞融合させハイブリドーマを得た。ELISA 法でスクリーニングを行い限界希釈法でモノクローナル抗体を樹立し、ウェスタンブロットティング、免疫組織化学、蛍光免疫組織化学にて抗体の特異性の検証を行った。

東アジア型 CagA を特異的に検出するサンドイッチ ELISA の開発は、4,000 倍に希釈したモノクローナル抗体を含む腹水を ELISA プレートにコートした後、250 μ g/ml に調整したピロリ菌抽出液を反応させた。抗東アジア型 CagA ポリクローナル抗体を反応させた後、2 次抗体を反応させ o-phenylenediamine を基質として発色させた。15 分後 O. D. 495nm で吸光度を測定した。

本学総合診療部消化器内科に保存してあ



るピロリ菌 32 株 (東アジア型 32 株、欧米型 7 株) に対して ELISA を行い、その結果を receiver-operator characteristic (ROC) 法で解析した。

4. 研究成果

ウェスタンブロットティング法により、作成したモノクローナル抗体は東アジア型 CagA のみに反応し、欧米型 CagA には反応しなかった。図 1

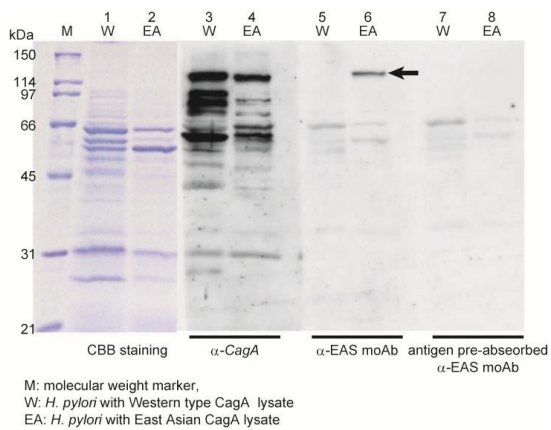


図 1 モノクローナル抗体のウェスタンブロットティング

ホルマリン固定パラフィン包埋されたピロリ菌感染胃粘膜を、モノクローナル抗体で免疫組織化学を行ったところ、東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌が感染している胃粘膜のみでピロリ菌に一致した強いシグナルを検出した。図 2

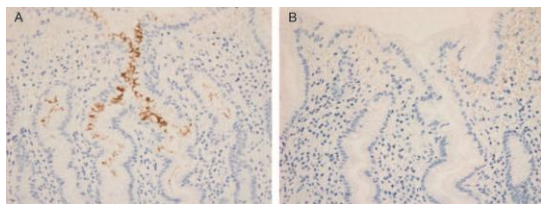


図 2 ピロリ菌感染胃粘膜のモノクローナル抗体を用いた免疫染色

ピロリ菌感染胃粘膜において CagA の局在をモノクローナル抗体と抗ピロリ菌抗体により免疫蛍光組織法により検討したところ、CagA はピロリ菌が胃粘膜に接触することで発現が亢進していた。図 3

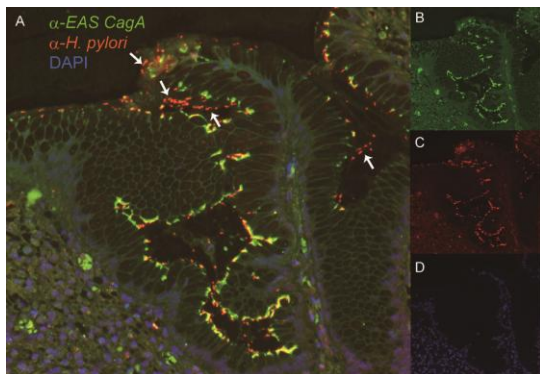


図 3 ピロリ菌感染胃粘膜の免疫蛍光染色。緑：抗東アジア型 CagA 抗体、赤：抗ピロリ菌抗体、青：核(DAPI)

サンドイッチ ELISA 法で測定した吸光度を ROC 法で解析したところ、area under the curve (AUC)は 0.96 と高い正確性を示した。ROC 法により決定したカットオフ値をもとにした ELISA 検査の感度、特異度はそれぞれ 88.0%、100%であり、非常に良好な結果であった。図 4

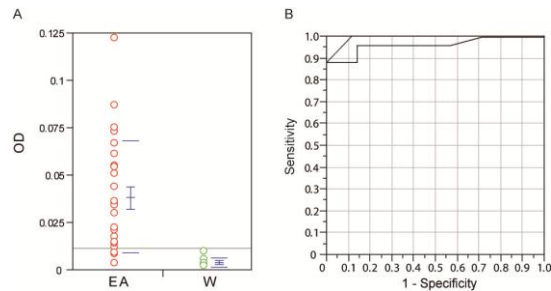


図 4 吸光度、ROC 解析

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yasuda A, Uchida T, Nguyen LT, Kawazato H, Tanigawa M, Murakami K, Kishida T, Fujioka T, Moriyama M. **A novel diagnostic monoclonal antibody specific for *Helicobacter pylori* CagA of East Asian type.** *Apmis*. 2009;117:893-9. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

内田智久、沖本忠義、兒玉雅明、松久威史、村上和成、藤岡利生、守山正胤
東アジア型 CagA 特異抗体を用いたタイとベトナムにおける *H. pylori* cagA 遺伝子型の決定
第 15 回日本ヘリコバクター学会学術集会

内田智久、Nguyen Lam Tung、村上和成、藤岡利生、守山正胤
ヘリコバクター・ピロリが有する東アジア型 CagA 蛋白質に対するモノクローナル抗体の開発による東アジア型 CagA を診断する ELISA 法の確立
第 16 回日本ヘリコバクター学会学術集会

Tomohisa Uchida, Ryoko Kanada, Yoshiyuki Tsukamoto, Lam Tung Nguyen, Naoki Hijiya, Keiko Matsuura, Masaaki

Kodama, Tadayoshi Okimoto, Kazunari Murakami, Toshio Fujioka, Shigetaka Yanagisawa and Masatsugu Moriyama
Genotyping of the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori* by Immunohistochemistry with East Asian CagA-specific Antibody
7th China-Korea-Japan Joint Conference on *Helicobacter* Infection

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 智久(UCHIDA TOMOHISA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号 70381035