

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590919

研究課題名(和文) プロテオミクスと抗原チップ解析によるピロリ菌感染症抗体群の胃発癌シークエンス

研究課題名(英文) Anti-Helicobacter pylori antibody succession during gastric carcinogenesis monitored with proteomics and antigen-chip analysis

研究代表者

赤田 純子 (AKADA, Junko)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：30346548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌を誘導するピロリ菌感染症において、小児血清中のピロリ菌抗体に対するピロリ菌抗原蛋白質の網羅的同定を行なった。二次元ゲル上の40抗原蛋白質スポットを切り出し質量分析に供して、新規9抗原蛋白質を含む24抗原蛋白質を同定した。全てのピロリ菌陽性血清はCagAに反応し、多くの血清では強く反応した。CagAリコンビナント蛋白質シリーズを用いた解析より、主要エピトープドメインはCagA中央領域(CagA-M)であった。そこでCagA-Mを重複してカバーする25ペプチドを合成後アレイ状に基板に固定化し、血清抗体を反応させた。この方法によりCagA-M領域から2つ主要抗原エピトープペプチドを同定した。

研究成果の概要(英文)：This study focused on Japanese child serum antibodies against Helicobacter pylori, a chronically-infected gastric bacterium which causes gastric cancer in adults. Serum samples from 24 children, 22 H. pylori (Hp)-positive and 2 Hp-negative children, were used to catalogue antigenic proteins of a Japanese strain CPY2052 by two-dimensional electrophoresis followed by immunoblot and LC-MS/MS analysis. In total, 24 proteins were identified as candidate antigen proteins. Among these, the major virulence factor, cytotoxin-associated gene A (CagA) protein was the most reactive antigen recognized by all the Hp-positive sera even from children under the age of 3 years. The major antigenic part of CagA was identified in the middle region, and two peptides containing CagA epitopes were identified using a newly developed peptide/protein-combined array chip method. Each of the epitopes was found to contain amino acid residue(s) unique to East Asian CagA.

研究分野：感染症、微生物学、生化学、プロテオミクス

キーワード：Helicobacter pylori 血清 抗H. pylori抗体 抗原タンパク質 CagA 小児

1. 研究開始当初の背景

胃癌発症率の高い東アジアにおいて、胃癌克服は待ち望まれる医学の重要課題である。ピロリ菌は、主に幼少期に家族内で初期感染後持続感染して、胃炎、胃潰瘍、胃癌の発症に深く関与する。近年日本では、ピロリ菌除菌法がほぼ確立し、除菌治療の保険適用症例も、胃・十二指腸潰瘍から早期胃癌に対する内視鏡的治療後胃・胃 MALT リンパ腫・突発性血小板減少性紫斑病 (ITP) へと拡大された。さらに除菌対象を全感染者にすれば胃癌の発症低下を見込めるものの、医療経済的問題がある。したがって、今後胃癌撲滅までに重要となるのは、生まれてくる子供たちにピロリ菌を伝播させない方策と共に、すでに感染してしまった感染者の誰を除菌すべきか、除菌対象者の判断基準である。

日本で胃癌を発症する人は内科を訪れた感染者中の約 3% (Uemura ら、2001) であるから、この 3% をどれくらい早く見分けられるかが、検査方法を改良する上での目標になる。早期胃癌を見出すために、近年、成人のリスク管理型 ABC 検診が進められている(表 1)。血清抗体による感染判定とペプシノーゲン値による胃萎縮度判定を組み合わせ、萎縮が進んだ C、D 群、中でも血清ピロリ菌抗体が低下した D 群で胃癌リスクが高い (Tatemichi ら、2009、Mizuno ら、2010) ため、この群を見出し内視鏡検査頻度を高める。この路線を更に進めると、除菌対象者の判断基準を作れるはずである。D 群に至る前の C 群および B 群から、将来 D 群に移行する人を見分けられるとよい。また検診年齢を繰り上げて青少年を対象とした場合には、感染期間が短いため萎縮に至っていない B 群が多いと予測されるが、B 群中の将来 D 移行群を見分けられるとよい。見分けた人を確実に除菌することで、今より早期に胃発癌へのシークセンスを断つことができる。そのためには、萎縮が始まる前でも感染者に発現しているピロリ菌抗体群の中に、疾患予測を可能とするような抗体はないか (表 1)。

表 1. ピロリ菌感染と萎縮性胃炎による ABCD 群と胃癌発症危険リスクおよび抗体検査精度向上の可能性

35歳以上の 2895人の 検診より		Hp抗体		検査精度向上の可能性
		(-)	(+)	
萎 (-)	A	1	B 4.20	・B群の人の抗体陽性にはどんな抗体がどのくらい含まれるか。 ・B群の中で、萎縮がおこりやすい人や、萎縮のはじまりの人を抗体の種類と量で見分けられるか。
	D	14.81	C 11.23	
縮 (+)	D	14.81	C 11.23	・抗体検出感度を上げると、D群でも感染を検出できる抗体はないか。 ・C群がD群に移行するのは全ての抗体が減るのか、どの抗体が減るのか。 ・胃癌患者はピロリ菌抗体価が低く、既感染者とピロリ菌陰性患者を区別できない。既感染胃癌患者にも、過去のピロリ菌感染を示す抗体が残っていないか。
	C	11.23	B 4.20	

2. 研究の目的

これまで臨床の現場で活用されてきた血清試料中の抗体情報をさらに引き出して、ピロリ菌抗体検査の精度を上げることが本研究の狙いである。年齢や疾患の進行と共に移行変わるピロリ菌感染症関連抗体群の全体像を明らかにし、最終的には感染判定の精度を上げ、さらに疾患の進展予測が可能なバイオマーカー抗体群を見出さそうとするものである。

3. 研究の方法

小児血清は、和歌山ろうさい病院にて1996年から2002年の間に採取されたもので、奥田・宮代医師により血清を研究に用いる旨十分な説明を受けた後、十分な理解の上で患者本人もしくは保護者の自由意思による同意が得られた患者の血清である。今回対象とする感染小児血清は 22 試料で、無疾患小児14名の血清の他、以下の小児疾患患者 8 名が含まれている。てんかん 5 名、若年性関節リウマチ 2 名、鉄欠乏性貧血 2 名、萎縮性胃炎 1 名 (2 名で重複あり)。対照として、ピロリ菌陰性小児 2 名の血清を本研究に用いた。ピロリ菌陽性および陰性判定は、抗体検査とは異なる仕組みでの感染判定であるピロリ菌便中抗原テストを主に用いた。研究に先立ち、山口大学および和歌山ろうさい病院にて臨床研究申請を行い、受理された。

ピロリ菌は、山口大学病院で分離された日本人由来株 CPY2052 と、同株の *cagA* 遺伝子破壊株および *vacA* 遺伝子破壊株を主に用いた。他に、同 CPY3401 株、HPK5 株、および西洋人由来標準株 26695、NCTC11637 とそれ

それぞれの *cagA* 遺伝子破壊株を用いた。ピロリ菌全蛋白質の二次元電気泳動を行った。同時作成した複数の泳動ゲルを二分し、一方はイムノプロット、他方は高感度 CBB 染色を行い、染色ゲルから、イムノプロット陽性スポットを切り出し、質量分析に供した(図 1)。

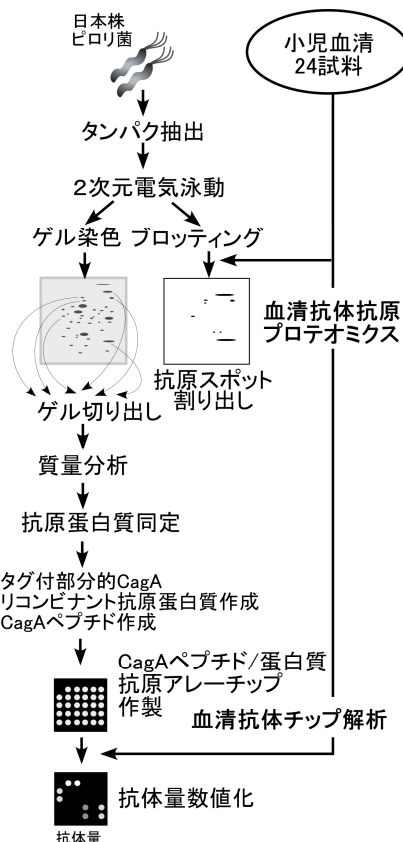


図1. 本研究のアウトライン

既存のデータベースに加え東アジア株7株のゲノム情報を追加して、蛋白質を同定した。また8つの部分的CagAリコンビナント蛋白質を大腸菌に発現させ、その粗抽出液をSDS-PAGE後、血清イムノプロット解析を行った。さらに、CagAの中央領域をコードするリコンビナント蛋白質(CagA-M)およびCagA-Mを網羅する25ペプチド(m1-25)を準備した。各ペプチドは22アミノ酸からなり、基板固定化のための3xCysタグとCag-M特異的な19アミノ酸を含んでいる。これらを、3mm角のマレイミド導入DLC基板(東洋鋼鈑)にアレー状に固定化したペプチド/蛋白質チップを作製した。30倍希釈血清をチップと反応させ、蛍光標識抗ヒトIgGにて陽性スポットを可視化し、抗原エピトープペ

チドを同定した。

本実験の一部は、研究に先立ち山口大学において承認を受けた遺伝子組換え実験である。

4. 研究成果

(1) 二次元イムノプロット上での小児血清IgGに対するピロリ菌抗原の同定

血清二次元イムノプロット解析により、約40の抗原スポットを検出し、質量分析にて新規10抗原蛋白質候補を含む24蛋白質を同定した。2血清以上が反応した30スポットから、疾患小児血清のみが反応した8蛋白質、疾患小児血清がより多く反応する4蛋白質、感染小児血清の大多数が反応する4蛋白質をグループ化した(表2)。

表2. 小児血清24試料中のIgGが反応したピロリ菌抗原タンパク質

抗原グループ	タンパク質スポット No.	ピロリ菌タンパク質名	反応した血清数		
			Hp (-) n=2	疾患なし n=14	疾患あり n=8
I 感染小児血清の大多数が反応	W1	CagA	0	14	8
	W14,15	CagA分解物(100kDa, 90kDa)	0	13	5
	W26	FlaA	2	10	6
	W53	未同定	0	12	5
	W2	VacA	0	6	5
III 疾患小児血清がより多く反応	W60	Omp21/AlpB	0	4	8
	W9	HefB	0	2	5
	W25	FusA	0	1	3
	W51	Omp18	0	1	2
IV 疾患小児血清のみが反応	W4	PorB	0	0	5
	W33	UreB	0	0	5
	W37,58,59	UreA	0	0	5
	W34	GroEL	0	0	4
	W77	Omp27/HopQ	0	0	3
	W3	HyuA	0	0	2
	W85	未同定	0	0	2
W84	GuaB	0	0	2	

(2) CagA蛋白質のエピトープ領域の同定

全ピロリ菌陽性児血清がCagAと反応し、100-kDaおよび90-kDaのCagA分解物とも反応した。従って、CagAが最も主要な抗原であった。そこで、8つの部分的CagA蛋白質シリーズを大腸菌に発現させて準備し、それぞれを含む大腸菌蛋白質抽出液に対して、各血清を用いたイムノプロット解析を行った結果、主要な抗原部位はCagAの中央領域であった。

(3) CagA中央領域を認識する抗体のチッ

板上でのエピトープマッピング

CagA 中央領域のエピトープを同定するため、CagA 中央領域の蛋白質 (CagA-M) と CagA-M を網羅するペプチドシリーズ (m1-25) を並べてスポット状に固定化したアレーチップを作製した (図2)。このチップを使い、ピロリ菌陽性 22 血清および陰性 2 血清を反応させて、CagA-M 領域に反応する血清 IgG 抗体をエピトープペプチドごとに検出した。その結果、基板上的 m5、m8、m24、m25 ペプチドスポットが、それぞれ 18%、77%、86%、23% の血清と反応した。したがって、

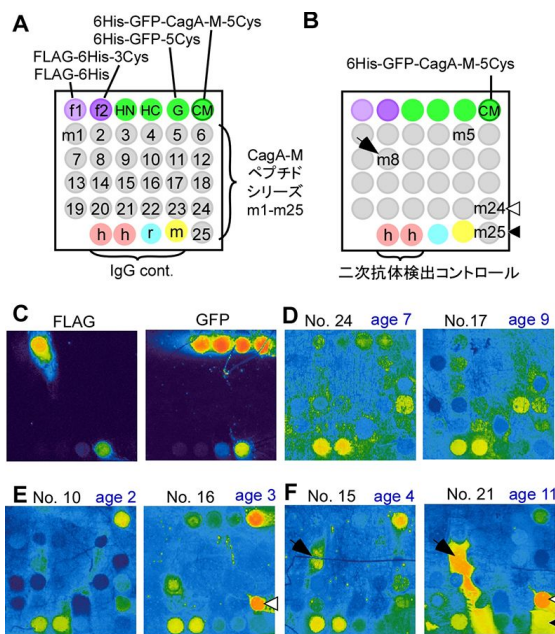


図2. CagA-Mエピトープアレーチップ解析

A. チップレイアウト図、B. 小児血清解析で最終的に検出されたスポット、C. 市販抗体によるチップ固定化と検出確認テスト、D. ピロリ菌陰性小児血清からの検出(反応しているスポットは非特異検出として以後の解析からは除外)、E. ピロリ菌陽性無疾患児からの検出、F. ピロリ菌陽性疾患児からの検出(No. 15: 若年性関節リウマチ、No. 21: てんかん)

多くの血清と反応した m8 と m25 が、CagA-M 領域の主要な抗原エピトープを含むペプチドであると結論された。

そこで m8 と m25 ペプチド領域を、ピロリ菌東アジア株 5 株および西洋株 5 株の CagA 相同領域と比較したところ、どちらのペプチド内にも、東アジア株特異的配列を含んでいた (図3)。このことから、小児におけるピロリ菌感染の血清診断には地域特異的 CagA 抗原が重要であることが示唆された。

(4) 今後の展開

本研究では、これまでに報告の少ない小児血清の解析を進めつつ、研究を進める新しい方法論を作成した。今後は、さらに多くの血清を用い、成人血清を用いた解析を進める。ピロリ菌血清抗体の変遷を明らかにすると共に、疾患予測システムの構築を行ってゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Akada J, Okuda M, Hiramoto N, Kitagawa T, Zhang X, Kamei S, Ito A, Nakamura M, Uchida T, Hiwatani T, Fukuda Y, Nakazawa T, Kuramitsu Y, and Nakamura K. (2014) Proteomic characterization of *Helicobacter pylori* CagA antigen recognized by child serum antibodies and its epitope mapping by peptide array. *PLOS ONE* 査読あり Vol. 9, No. 8, e104611.

DOI: 10.1371/journal.pone.0104611

	m8	m24	m25
EA-CagA CPY2052	... RDLEDKLVAKGLSPQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
EA-CagA 35A	... RDLEDKLVAKGLSPQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
EA-CagA F16	... RDLEDKLVAKGLSSQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
EA-CagA F30	... RDLEDKLVAKGLSPQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
EA-CagA F32	... RDLEDKLVAKGLSPQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
EA-CagA F52	... RDLEDKLVAKGLSSQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
EA-CagA 51	... RDLEDKLVAKGLSLQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
W-CagA G27	... RDLEDKLVAKGLSPQETNK...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSRVEQALADL...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSRVEQALADL...
W-CagA P12	... RNLEDKLVTKGLSIQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSRVEQALADL...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSRVEQALADL...
W-CagA J99	... QDLEDKLVAKGLSLQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSGVEQALADL...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSGVEQALADL...
W-CagA NCTC11637	... RNLENKLVTKGLSIQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSMAKATGDFSRVEQALADL...	... QKITDKVDNLNQA VSMAKATGDFSRVEQALADL...
W-CagA 26695	... RNLENKLVAKGLSLQEANK...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKAMGDFSRVEQALADL...	... QKITDKVDNLNQA VSVAKAMGDFSRVEQALADL...
共通配列	EA-CagA ... RDLEDKLVAKGLSPQEANK...	EA-CagA ... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...	EA-CagA ... QKITDKVDNLNQA VSEITKLTGDFSKVEQALAE L...
W-CagA ... RNLEDKLVAKGLS.QEANK...	W-CagA ... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSRVEQALADL...	W-CagA ... QKITDKVDNLNQA VSVAKATGDFSRVEQALADL...	

図3. CagA中央領域の主要エピトープm8およびm24-25の株による配列の違い

EA-CagAは東アジア人患者由来ピロリ菌株のCagA、W-CagAは西洋人由来株のCagAを示す。

〔学会発表〕(計 3 件)

赤田純子、奥田真珠美、福田能啓、中澤晶子、中村和行

「ピロリ菌感染小児血清抗体による東アジア CagA 特異的エピトープの同定」

第 20 回日本ヘリコバクター学会

2014 年 6 月 28-29 日 (土-日)

ステーションコンファレンス東京 (東京都千代田区)

赤田純子、奥田真珠美、福田能啓、中澤晶子、中村和行

「ピロリ菌感染小児血清中の抗ピロリ菌抗体群と CagA 抗原ドメインの解析」

第 19 回日本ヘリコバクター学会

2013 年 6 月 28 日 (金-土)

長崎大学医学部 (長崎県長崎市)

赤田純子、奥田真珠美、内田智久、福田能啓、中澤晶子、中村和行

「ピロリ菌感染小児血清中の抗ピロリ菌抗体群の解析」

第 18 回日本ヘリコバクター学会

2012 年 6 月 29-30 日 (金-土)

岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤田 純子 (AKADA, Junko)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：30346548

(2) 研究分担者

西川 潤 (NISHIKAWA, Jun)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00379950

奥田 真珠美 (OKUDA, Masumi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40531091

(3) 連携研究者

平山 壽哉 (HIRAYAMA, Toshiya)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50050696

中村 和行 (NAKAMURA, Kazuyuki)

山口大学・名誉教授

研究者番号：90107748

中村 美紀子 (NAKAMURA, Mikiko)

山口大学・大学研究推進機構・学術研究員

研究者番号：20457310