

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860544

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリCagA抗体の迅速検出キットの開発

研究課題名(英文)Development of serum Helicobacter pylori CagA antibody detection kit

研究代表者

塩田 星児 (SHIOTA, SEIJI)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：00420646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、ヘリコバクター・ピロリの病原因子CagAが日本を含む東アジアにおいて胃癌と関係していることを報告している。さらに日本のピロリ菌感染者の血清CagA抗体価は組織学的胃炎の程度と相関していることも報告した。今回、大腸菌を用いCagAの全長を発現することに成功し、イムノクロマトグラフィーの原理のもと、血清CagA抗体検出キットの作製に成功した。作製したキットでは、ピロリ菌陽性/CagA抗体陽性のものは陽性となり、ピロリ菌陰性/CagA抗体陰性のものは陰性となった。ピロリ菌陽性にも関わらずCagA抗体陰性の血清については現在条件設定中である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that Helicobacter pylori CagA was significantly associated with gastric cancer in East Asian countries. In addition, we reported that serum CagA antibody titers were correlated with the severity of gastritis. In this study, we purified H. pylori full length CagA protein using E. coli and developed a rapid detection kit for serum CagA antibody based on immunochromatography. The preliminary test kits showed positive bands for H. pylori-positive/CagA Ab positive cases, and showed negative for H. pylori-negative/CagA Ab negative cases. Appropriate condition for serum samples for H. pylori-positive but CagA Ab negative is now in progress.

研究分野：消化器内科

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ CagA

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌)感染者の一部のみが消化性潰瘍や胃癌を発症し、疾患発症には宿主側要因、環境因子に加え、菌側の病原因子が関与している。ピロリ菌の病原因子として *cagA* 遺伝子が最も研究されており、欧米では *cagA* 陽性菌に感染しているものの方が胃癌になりやすいことが報告されているが、胃癌の多い日本ではほぼすべてのピロリ菌が *cagA* 陽性菌であり、*cagA* の有無だけでは胃癌になりやすいかどうかの判断は困難である。一方、*cagA* 陽性のピロリ菌に感染していても、感染者すべてが血清の抗 CagA 抗体陽性を示すとは限らないことが報告されている。

私は日本を含む東アジアでさえ、血清の抗 CagA 抗体陽性率は胃癌群において胃炎群よりも有意に高いことをメタ・アナリシスの手法で証明し報告した (Shiota S. Future Microbiol.2010)。このことは血清抗 CagA 抗体陽性者が日本においても胃癌の高危険群であることを示唆している。

そこで大分県の検体を使用し、血清抗 CagA 抗体価が胃癌の危険因子である組織学的胃炎と関係するかについて検討を行った。その結果、血清の抗 CagA 抗体価は胃体部の炎症と活動度と有意に相関していることを発見した ($P < 0.05$)。この内容は 2012 年、サンディエゴで開かれた米国消化器病週間 (DDW) で発表を行った。このように日本において血清の抗 CagA 抗体価は強い炎症と関係していることから、血清抗 CagA 抗体陽性者は胃癌の高危険群と考えられる。

2. 研究の目的

そこで血清中に存在する CagA 抗体を容易に検出できるキットを開発できれば、胃癌の高危険群を容易にスクリーニングすることが可能になると私は考えた。ピロリ菌に対する抗体は血清のみならず尿中にも存在し、ピロリ菌の感染診断として、尿中のピロリ抗体をイムノクロマトキットで測定する方法があり広く臨床で使用されている。このことから、血清中のみならず尿中にも抗 CagA 抗体が存在している可能性があり、本研究で作製するキットが尿中の CagA 抗体も検出できれば、さらに非侵襲的に胃癌の高危険群をスクリーニングできるとも考えている。

3. 研究の方法

(1) CagA 抗体を検出するキットの開発

CagA 蛋白の発現

CagA の全長をターゲットとし、PCR で増幅、pGEX ベクターに挿入し、大腸菌を用いて CagA 発現系を確立した。CagA 蛋白発現はウェスタンブロットにて確認した。

イムノクロマトグラフィーの原理に基づくキット作製

次にこの組み換え CagA 蛋白を抗原とし、

固相化したニトロセルロース膜を用いた抗 CagA 抗体検出用イムノクロマトキットを構築した。テストデバイスには、検体を滴下する検体窓 (S) 及びテストライン (T)、コントロールライン (C) を確認する判定窓を作製した。検体窓と判定窓の間には、金コロイド標識抗ヒト IgG (Fc) ポリクローナル抗体 (ヤギ) (以下、標識抗体) が保持された。また、判定窓のテストライン上には CagA 蛋白を、コントロールライン上には抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (マウス) を固相化した。

測定原理

検体希釈液で希釈した検体を検体窓に滴下すると、希釈液中の IgG と標識抗体が反応し、免疫複合体を形成してニトロセルロース膜内を浸透し流れ進む。この免疫複合体の中に抗 CagA IgG 抗体複合体が存在すれば、テストライン上に固相化されている CagA 蛋白と反応して捕捉され、赤色のラインとなってあらわれる。

(2) 対象者の血清抗 CagA 抗体価を既製の ELISA 法で測定

大分大学医学部附属病院総合診療部で尿中抗体法 (ラピラン) でピロリ菌の感染診断をしたのち、それぞれの参加者から血清を採取し、既製の ELISA 法にて血清 CagA 抗体価を測定した。

(3) 作製したイムノクロマトキットと既製の ELISA の結果との相関の検討

同意が得られた上記患者血清を用い、作製したキットで血清 CagA 抗体が検出可能であるかを検討した。

4. 研究成果

CagA の全長をターゲットとして、PCR で増幅、pGEX ベクターに挿入し、大腸菌を用いて CagA 発現系を確立した。CagA タンパク発現は Western blot にて確認した。

次にこの組み換え CagA 蛋白を抗原とし、固相化したニトロセルロース膜を用いた抗 CagA 抗体検出用イムノクロマトキットを試験的に 10 テストキット構築した。テストデバイスには、検体を滴下する検体窓、およびテストライン、コントロールラインを確認する判定窓を作製した。判定窓のテストライン上には CagA 蛋白を、コントロールライン上には抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (マウス) を固相化した。

血清抗 CagA 抗体価の高い血清において良好に判定窓に陽性バンドが出現することを確認できた。ピロリ菌非感染の血清抗 CagA 抗体陰性の検体ではバンドは確認できなかった。ピロリ菌には感染しているが血清抗 CagA 抗体が ELISA にて陰性と判断された血清ではキットにてバンドを確認できなかった。

次にこれまで試験参加への同意を得ている血清を使用し既製の ELISA 法にて血清

CagA 抗体価を測定した。

ELISA にて CagA 抗体価を測定し、その中から 4 種類の血清を選別した(A: ピロリ菌抗体陰性、CagA 抗体陰性、B: ピロリ菌抗体陽性、CagA 抗体陽性(高力価)、C: ピロリ菌抗体陽性、CagA 抗体陽性(低力価)、D: ピロリ菌抗体陽性、CagA 抗体陰性)。

次にスティックタイプのイムノクロマトキットを作製した。固相化抗原 CagA と金コロイド標識抗ヒト IgG 抗体の組み合わせで、抗 CagA 抗体検出用イムノクロマトキットの構築は可能となった。

結果として、A: 陰性血清による非特異反応は見られなかった。B および C 検体では強い陽性反応を認めたが、バンドには差は認めなかった。バンドの強さは B、C 検体よりは弱かったが、D 検体でも陽性反応を認めた。次に非特異的バンドを抑制するため、非特異吸収剤の効果を検討した。その結果 C 検体ではバンドのやや薄くなったが、その他の検体ではバンドの強さは変化を認めなかった。今後、プラスミドベクター由来の蛋白の影響、弱陽性反応を示しているヒト正常血清についての CagA 抗体の有無について、検討が必要である。

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 27 件)

(1) Nguyen T, Ramsey D, Graham D, Shaib Y, Shiota S, Velez M, Cole R, Anand B, Vela M, El-Serag HB.

The Prevalence of *Helicobacter pylori* Remains High in African American and Hispanic Veterans.

Helicobacter. 2015 Feb 17.

doi: 10.1111/hel.12199.

(査読あり)

(2) Shiota S, Reddy R, Alsarraj A, El-Serag HB, Graham DY.

Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Among Male US Veterans.

Clin Gastroenterol Hepatol. 2015 Feb 11.

pii: S1542-3565(15)00122-6.

doi: 10.1016/j.cgh.2015.02.005.

(査読あり)

(3) Myint T, Shiota S, Vilaichone RK, Ni N, Aye TT, Matsuda M, Tran TT, Uchida T, Mahachai V, Yamaoka Y.

Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis in patients with dyspeptic symptoms in Myanmar.

World J Gastroenterol. 2015 Jan 14;21(2):620-7.

doi: 10.3748/wjg.v21.i2.620.

(査読あり)

(4) Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, Jiménez Abreu JA, Tronilo L, Rodríguez E, Disla M, Terao H, Uchida T, Mahachai V, Vilaichone RK, Tshering L, Mitsui T, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y.

Differences in interleukin 8 expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa tissues from patients in Bhutan and the Dominican Republic.

Hum Pathol. 2015 Jan;46(1):129-36.

doi: 10.1016/j.humpath.2014.10.006.

(査読あり)

(5) Shiota S, Yamaoka Y.

Biomarkers for *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases.

Biomark Med. 2014;8(9):1127-37.

doi: 10.2217/bmm.14.72.

(査読あり)

(6) Vannarath S, Vilaichone RK, Rasachak B, Mairiang P, Yamaoka Y, Shiota S, Binh TT, Mahachai V.

Virulence Genes of *Helicobacter pylori* in Gastritis, Peptic Ulcer and Gastric Cancer in Laos.

Asian Pac J Cancer Prev.

2014;15(20):9027-31.

(査読あり)

(7) Shiota S, Suzuki R, Matsuo Y, Miftahussurur M, Tran TT, Binh TT, Yamaoka Y.

Helicobacter pylori from Gastric Cancer and Duodenal Ulcer Show Same Phylogeographic Origin in the Andean Region in Colombia.

PLoS One. 2014 Aug 14;9(8):e105392.

doi: 10.1371/journal.pone.0105392.

(査読あり)

(8) Iwatani S, Nagashima H, Reddy R, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y.

Identification of the Genes That Contribute to Lactate Utilization in *Helicobacter pylori*.

PLoS One. 2014 Jul 31;9(7):e103506.

doi:10.1371/journal.pone.0103506.

(査読あり)

(9) Hanada K, Uchida T, Tsukamoto Y, Watada M, Yamaguchi N, Yamamoto K, Shiota S, Moriyama M, Graham DY, Yamaoka Y.

Helicobacter pylori-infection introduces DNA double-strand breaks in host cells.

Infect Immun. 2014 Oct;82(10):4182-9.

doi: 10.1128/IAI.02368-14.

(査読あり)

(10) Miftahussurur M, **Shiota S**, Suzuki R, Matsuda M, Uchida T, Kido Y, Kawamoto F, Maimunah U, Adi P, Rezkitha Y, Nasronudin, Nusi I, Yamaoka Y.

Identification of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients in Surabaya, Indonesia, using five diagnostic tests.

Epidemiol Infect. 2015 Apr;143(5):986-96.

doi: 10.1017/S095026881400154X.

(査読あり)

(11) **Shiota S**, Cruz M, Jiménez Abreu JA, Mitsui T, Terao H, Disla M, Iwatani S, Nagashima H, Matsuda M, Uchida T, Tronilo L, Rodríguez E, Yamaoka Y.

Virulence genes of *Helicobacter pylori* in the Dominican Republic.

J Med Microbiol. 2014 Sep;63(Pt 9):1189-96.

doi: 10.1099/jmm.0.075275-0.

(査読あり)

(12) Binh TT, **Shiota S**, Suzuki R, Matsuda M, Trang TT, Kwon DH, Iwatani S, Yamaoka Y.

Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing.

J Antimicrob Chemother. 2014 Jul;69(7):1796-803.

doi: 10.1093/jac/dku050.

(査読あり)

(13) Binh TT, Suzuki R, **Shiota S**, Kwon DH, Yamaoka Y.

Complete Genome Sequences of *Helicobacter pylori*

Clarithromycin-Resistant Strains.

Genome Announc. 2013 Nov 14;1(6).

doi:pil: e00912-13.

10.1128/genomeA.00912-13.

(査読あり)

(14) **Shiota S**, Yamaoka Y.

Strategy for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection.

Curr Pharm Des. 2014;20(28):4489-500.

(査読あり)

(15) Kodama M, Murakami K, Okimoto T, Abe H, Sato R, Ogawa R, Mizukami K, **Shiota S**, Nakagawa Y, Soma W, Arita T, Fujioka T.

Histological characteristics of gastric mucosa prior to *Helicobacter pylori* eradication may predict gastric cancer.

Scand J Gastroenterol. 2013

Nov;48(11):1249-56.

doi: 10.3109/00365521.2013.838994.

(査読あり)

(16) **Shiota S**, Murakami K, Okimoto T, Kodama M, Yamaoka Y.

Serum *Helicobacter pylori* CagA antibody titer as a useful marker for advanced inflammation in the stomach in Japan.

J Gastroenterol Hepatol. 2014

Jan;29(1):67-73.

doi: 10.1111/jgh.12359.

(査読あり)

(17) Senba K, Matsumoto T, Yamada K, **Shiota S**, Iha H, Date Y, Ohtsubo M, Nishizono A.

Passive carriage of rabies virus by dendritic cells.

Springerplus. 2013 Aug 29;2:419.

doi: 10.1186/2193-1801-2-419.

(査読あり)

(18) Vilaichone RK, Yamaoka Y, **Shiota S**, Ratanachu-Ek T, Tshering L, Uchida T, Fujioka T, Mahachai V.

Antibiotics resistance rate of *Helicobacter pylori* in Bhutan.

World J Gastroenterol. 2013 Sep 7;19(33):5508-12.

doi: 10.3748/wjg.v19.i33.5508.

(査読あり)

(19) **Shiota S**, Mahachai V, Vilaichone RK, Ratanachu-Ek T, Tshering L, Uchida T, Matsunari O, Yamaoka Y.

Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal atrophy in Bhutan, a country with a high prevalence of gastric cancer.

J Med Microbiol. 2013 Oct;62(Pt 10):1571-8.

doi: 10.1099/jmm.0.060905-0.

(査読あり)

(20) Vilaichone RK, Mahachai V, **Shiota S**, Uchida T, Ratanachu-Ek T, Tshering L, Tung NL, Fujioka T, Moriyama M, Yamaoka Y.

Extremely high prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Bhutan.

World J Gastroenterol. 2013 May 14;19(18):2806-10.

doi: 10.3748/wjg.v19.i18.2806.

(査読あり)

(21) Yamamoto K, **Shiota S**, Ohno S, Kuroda A, Yoshiwa A, Abe K, Murakami K, Fujioka T.

A diagnosis of depression should be

considered in patients with multiple physical symptoms in primary care clinics.

Tohoku J Exp Med. 2013;229(4):279-85.
(査読あり)

(22) **Shiota S**, Suzuki R, Yamaoka Y.
The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*.

J Dig Dis. 2013 Jul;14(7):341-9.
doi:10.1111/1751-2980.12054.
(査読あり)

(23) Takeo N, Hatano Y, Yamamoto K, **Shiota S**, Fujiwara S.

Case of Mycoplasma pneumoniae infection with maculopapular-type eruptions due to acetaminophen.

J Dermatol. 2013 Apr;40(4):304-6.
doi: 10.1111/1346-8138.12063.
(査読あり)

(24) **Shiota S**, Murakami K, Suzuki R, Fujioka T, Yamaoka Y.

Helicobacter pylori infection in Japan.

Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2013 Jan;7(1):35-40.
doi: 10.1586/egh.12.67.
(査読あり)

(25) Matsuo Y, **Shiota S**, Matsunari O, Suzuki R, Watada M, Binh TT, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y.

Helicobacter pylori cagA 12-bp insertion can be a marker for duodenal ulcer in Okinawa, Japan.

J Gastroenterol Hepatol. 2013 Feb;28(2):291-6.
doi: 10.1111/jgh.12067.
(査読あり)

(26) Binh TT, **Shiota S**, Nguyen LT, Ho DD, Hoang HH, Ta L, Trinh DT, Fujioka T, Yamaoka Y.

The Incidence of Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam.

J Clin Gastroenterol. 2013 Mar;47(3):233-8.
doi:10.1097/MCG.0b013e3182676e2b.
(査読あり)

(27) Takahashi A, **Shiota S**, Matsunari O, Watada M, Suzuki R, Nakachi S, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y.

Intact Long-Type *dupA* as a Marker for Gastrointestinal Diseases in Okinawan Subpopulation, Japan.

Helicobacter. 2013 Feb;18(1):66-72.
doi:10.1111/j.1523-5378.2012.00994.x.
(査読あり)

〔学会発表〕(計 5件)

Seiji Shiota, Miyuki Matsuda, Binh Thanh Tran, Trang Thu Huyen Tran, Katsuhiko Hanada, Yoshio Yamaoka
H. pylori infection can trigger to develop precancerous lesion in gp130 mutant mice
第10回 Japan-Korea Joint Symposium on Helicobacter infection. 2013; シンポジウム
2013年6月1日 Soul、韓国

Seiji Shiota, Miyuki Matsuda, Binh Thanh Tran, Trang Thu Huyen Tran, Katsuhiko Hanada, Yoshio Yamaoka
H. pylori infection can trigger to develop precancerous lesion in gp130 mutant mice
消化器病週間 2013; Digestive Disease Week 2013
2013年5月19日(発表5月18日) Orlando、米国

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 星児 (SHIOTA SEIJI)

大分大学・医学部・医員

研究者番号: 00420646