

氏 名	吉 田 優
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2246 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Cloning and Characterization of a Novel Membran-Associated Antigenic Protein of <i>Helicobacter Pylori</i> . (ヘリコバクターピロリ膜蛋白由来の新規炎症惹起性因子の同定とその解析)

論文調査委員	(主 査) 教 授 光 山 正 雄	教 授 西 淵 光 昭	教 授 千 葉 勉
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

Cloning and Characterization of a Novel Membran-Associated Antigenic Protein of *Helicobacter pylori*.

研究背景と目的

元来胃粘膜内にはほとんどリンパ球は存在しない。しかし *H. pylori* 感染により慢性胃炎に移行する患者では、血液・胃液中に多量な抗 *H. pylori* 抗体と、感染胃粘膜内に著明な細胞浸潤だけでなく、リンパ濾胞の形成も認められるようになる。このように胃粘膜内に浸潤しているリンパ球が *H. pylori* のどのような抗原を認識し、臓器障害あるいは病態形成に関与しているかはまだ明らかではない。そこで今回その機序を明らかにする目的で *H. pylori* の表層抗原の同定ならびにその解析を行った。

(1) クローニングの方法

H. pylori (SR 7791 株) を polytronA 処理後、表層膜蛋白を調整し、象兎抗血清を得た。次に *H. pylori* 染色体 DNA より λファージを用いて、Expression Library を作成し、この家兎抗血清を用いてクローニングをおこなった。結果、16.5 kDa の蛋白を同定した。(HP-MP 1)。この遺伝子は既知の塩基配列と明らかな相同性を認めなかった。

(2) 組み換え体の作成

得られた遺伝子を His Tag との融合蛋白として大腸菌に発現させた。発現した蛋白を His・Bind Resin 固相カラムを用いて精製した。また *H. pylori* の代表的な主要抗原である UreaseB 遺伝子の全長を PCR にて増幅し、同様に融合蛋白として発現させ精製した。

(3) 抗 Rat 抗体を用いた *H. pylori* 菌体における抗原の同定

この組み換え蛋白を精製後、Rat に免疫して抗血清を得た。この抗体を用いて、HP-MP 1 がさまざまな *H. pylori* 株に発現しているかどうかを Western Blotting にて検定した。結果、HP-MP 1 は *H. pylori* に特異的であり、*E. coli* や *Gmpylobacter* 等の他の菌には存在していないということ、*H. pylori* のさまざまな株で存在していることが明らかとなった。さらにこの蛋白は S-S 結合による dimer として存在している事が明らかとなった。

(4) 免疫電顕による *H. pylori* 菌体における局在の同定

免疫電顕により、この蛋白は菌内膜に存在しているということが明らかとなった。対照的に Urease は菌体内部にびまん性に存在していた。

(5) 患者血清中の抗体の同定

Hp 持続性感染患者血清中に新たに得られた蛋白に対する抗体が存在するかどうかを調べるため、慢性胃炎、胃、十二指腸潰瘍を有する患者ならびに健康人から得た血清を一次抗体とする Western Blotting を行った。結果 *H. pylori* 感染患者血清中にのみ、この蛋白に対する抗体が存在することが明らかとなった。

(6) 単球の調整ならびに刺激実験

この蛋白にも Urease と同様な単球活性化能があるかどうかを調べるため、単球の刺激実験をおこなった。正常人末梢血より得られた単球をこの蛋白と 37 度、8 時間培養後、フローサイトメトリーにて単球活性化マーカーである class II 抗原と CD 25 (IL-2 Receptor) の変化を、さらにその上澄み液から、proinflammatory monokines である TNF- α , IL-1 β を ELIZA にて測定した。結果、得られた蛋白は、class II, CD 25 の発現を増強し、また TNF- α , IL-1 β の産生を増強した。

結 語

以上より新しくクローニングした 16.5 kDa の蛋白は、H. pylori 感染胃炎の病態形成に関与している可能性があることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

H. pylori 感染症は慢性胃炎や消化性潰瘍の原因であるのみならず、疫学的に胃癌や MALT 型胃リンパ腫のような悪性疾患の原因とも考えられている。そこで本研究では、H. pylori 慢性胃炎の病態形成に関与する菌側の因子を明らかにするため、その表層抗原の同定と解析を行った。まず、H. pylori から膜蛋白を調整して家兔抗血清を作成し、H. pylori の発現 Library より既知の塩基配列と明らかな相同性を認めない 16.5 kDa の蛋白を同定した。次に、得られた遺伝子を大腸菌に発現させ精製、Rat に免疫し抗血清を作成した。Western Blot にてこの蛋白が H. pylori 株に特異的であり他の菌には存在していないこと、S-S 結合による 2 量体として存在していること、免疫電顕にてこの蛋白は菌内膜に存在していること、またヒト血清を一次抗体とする Western Blot より H. pylori 感染患者血清中にのみこの蛋白に対する抗体が存在するということ、さらに単球の刺激実験にてこの蛋白は class II, CD 25 の発現を増強し、また TNF- α , IL-1 β の産生を増強することを明らかにした。

以上の研究は、新しく同定した 16.5 kDa の蛋白が、H. pylori 感染胃炎の病態形成に関与していることを示唆するものであり、消化器病学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。