

論文内容の要旨

Neutralizing antibodies for *Helicobacter pylori* urease inhibit
bacterial colonization in the murine stomach *in vivo*

ピロリ菌ウレアーゼに対する中和抗体による
マウス胃へのピロリ菌感染予防

日本医科大学大学院医学研究科 小児・思春期医学分野

大学院生 竹下 輝

Biomedical Research Vol. 40, No. 2 (2019) 掲載予定

【緒言】

ピロリ菌は胃粘膜に持続感染し、慢性胃炎や胃がん、MALTリンパ腫の原因として知られるとともに、関節リウマチや特発性血小板減少性紫斑病、シェーグレン症候群などの自己免疫疾患との関連が指摘されたグラム陰性菌の一種である。こうしたなか、ピロリ菌感染者ではピロリ菌特異的抗体が産生されるものの、その大半がピロリ菌の制御には関連しないため、ピロリ菌の持続感染が成立している。一方、ピロリ菌に固有の菌体毒素であるウレアーゼは、胃液中の尿素を分解し胃酸中和能のあるアンモニアを産生する、菌体の胃粘膜への持続感染を可能にする必要不可欠なタンパク質である。我々はこの菌体固有のウレアーゼに注目し研究をこれまで展開した結果、酵素活性部位に19個のアミノ酸からなるエピトープ(CHHLDKSIKEDVQFADSRI)を同定し、UB-33と命名した。そして、このUB-33に対する抗UB-33抗体が、ピロリ菌ウレアーゼの酵素活性を完全に失活させる中和抗体であること、そして菌体表面に発現したUB-33が胃粘膜生着に不可欠の部位であることを確認した。今回申請者らは、BALB/cマウスを免疫賦活物質(アジュバント)とともにUB-33ペプチドで免疫した結果、マウス個体内にUB-33に対する特異抗体が誘発され、胃液中からも分泌されることを見出した。本研究では、このUB-33に対する抗体を有したマウスに感染性のあるピロリ菌株(Sydney Strain1: SS-1)を経口投与することで、ピロリ菌の胃粘膜への生着ならびに持続感染が抑制されるか否かを評価した。

【方法】

6週齢の雌性BALB/cマウスに、UB-33ペプチド、純化したピロリ菌ウレアーゼ、PBSを抗原として完全フロイントアジュバントと共に腹腔内接種後、2週後したところで、同一抗原を不完全フロイントアジュバントと共に再度、腹腔内投与した(各マウスは5匹)。初回投与から4週後に血液を採取し、抗UB-33抗体と抗ウレアーゼ抗体の抗体産生を確認、その後48時間ごとにマウス胃内にSS-1株を3回経口投与しピロリ菌の感染を惹起した。そして、感染4週後の胃内ピロリ菌感染数をUB-33免疫群とウレアーゼ免疫群、未免疫群で比較した。それぞれの免疫群のマウス血清とピロリ菌抽出液の反応液を、尿素がアンモニアに分解されると変色する尿素培地を用いて、ウレアーゼに対する中和活性を比較検討した。また、ピロリ菌ウレアーゼに応答性を欠損したTLR2欠損マウスを用いて同様の実験を行なった。

【結果】

各免疫群における血清中の抗原特異的抗体の濃度をELISA法にて測定した。UB-33免疫群ではUB-33特異的IgG抗体が、ウレアーゼ免疫群ではウレアーゼ特異的IgG抗体が有意に検出されたが、特異的IgA抗体はほとんど産生されなかった。また、尿素培地を用いた酵素中和実験では抗UB-33特異的IgGが検出された群においてのみ、強い中和活性が検出された。また、胃内のピロリ菌菌体数は、UB-33免疫群では、未免疫群と比較して有意に抑制されていたものの、ウレアーゼ免疫群ではばらつきが多く、一定の抑制効果が認められなかった。胃液中にも特異的IgG抗体が分泌されていた。またTLR2欠損マウスでは、UB-33とアジュバントの投与による抗

UB-33 抗体は産生されなかった。

【考察】

本研究の結果、菌体酵素ウレアーゼの中和活性をもつ UB-33 特異的 IgG 抗体を有したマウスでは、経口投与したピロリ菌の胃内での持続感染が抑制されることが判明した。これまで、ピロリ菌感染防御のためのワクチン開発の研究は多数報告されているが、ピロリ菌表面に発現し、胃粘膜への接着の鍵を握る菌体酵素ウレアーゼの活性中心に存在する UB-33 を標的とした研究は本研究が初めてである。ピロリ菌感染者の多くは、抗ウレアーゼ抗体などの様々なピロリ菌特異的抗体をもっているが、本研究の結果、それら抗体自体はピロリ菌の生着ならびに増殖抑制には無関係なことが明らかとなった。また、抗ウレアーゼ抗体には、中和活性が強いものと弱いものが存在することが本研究の結果判明したが、ピロリ菌ウレアーゼの中和活性こそが、菌体の生着抑制の鍵を握る。即ち、ピロリ菌ウレアーゼの中和活性部位に結合し、酵素活性を抑制する抗体、例えば UB-33 に対する抗体こそが、ピロリ菌の胃粘膜への生着を抑制するものと考えられる。実際、本研究の結果、抗 UB-33 抗体によって認識される部位は、胃内のピロリ菌の持続感染を抑制し、菌体ウレアーゼの活性を制御する部位であることが明らかとなった。ピロリ菌除菌の既存の 3 剤併用療法における薬剤耐性化が問題となっている現在、UB-33 特異的な中和抗体を個体内で誘導することで、ピロリ菌の胃粘膜での増殖を制御することが可能となるかもしれない。