

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第644号	氏名	DALLA DOOHAN
審査委員会委員		主査氏名	花田 礼子 ①
		副査氏名	谷川 雅人 ②
		副査氏名	水野 一弘 ③
<p>論文題目 Characterization of a novel <i>Helicobacter pylori</i> East Asian-type CagA ELISA for detecting patients infected with various <i>cagA</i> genotypes (多様な <i>cagA</i> 遺伝子型のヘリコバクター・ピロリ感染患者検出のための新規東アジア型 CagA ELISA の評価)</p> <p>論文掲載雑誌名 Medical Microbiology and Immunology</p> <p>論文要旨 【背景と目的】ヘリコバクター・ピロリ (<i>H. pylori</i>) は慢性胃炎や消化性潰瘍、胃がんなどを引き起こす主要な病原菌であり、<i>H. pylori</i> のエフェクター分子である Cytotoxin-associated gene A antigen (Cag A) は胃がんの発症に重要な役割を果たしている。この CagA タンパク質は、その C 末端側領域に存在する EPIYA セグメントの違いにより、主に欧米型の CagA と東アジア型の CagA に分類され、現在市販されている <i>H. pylori</i> の CagA ELISA キットは、欧米型の CagA タンパク質に対する ELISA 測定系が主である。本研究では、新たな東アジア型 CagA ELISA 測定系を構築し、その系を用いて南アジアと東南アジアの4か国(ブータン、インドネシア、ミャンマー、バングラデシュ)における <i>H. pylori</i> の異なる <i>cagA</i> 遺伝子型に感染した患者(症例)の抗 CagA 抗体価を評価するとともに、その抗体価と胃粘膜組織における病理学的所見ならびに <i>H. pylori</i> の菌数との相関について解析し、本 ELISA の有用性を検討した。 【研究対象・方法】全長の東アジア型 <i>cagA</i> 遺伝子は胃炎を有する日本の患者から採取した <i>H. pylori</i> 臨床株のゲノム DNA を用いてクローニングした。次に組換え CagA タンパク質を発現させ、Glutathione Sulfate-Transferase (GST) タグ融合タンパク質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。東アジア型の CagA 固定化 ELISA を使用して、ブータン、インドネシア、ミャンマー、およびバングラデシュの 750 症例の血清サンプルの抗 CagA 抗体レベルを測定した。各国における血清抗体のカットオフ値は、Receiver-Operating Characteristic (ROC) を用いて解析した。 【結果】本 ELISA 測定系のカットオフ値は調査した4か国間で異なり、ブータン: 18.16 U/mL、インドネシア: 6.01 U/mL、ミャンマー: 10.57 U/mL、バングラデシュ: 6.19 U/mL であった。主に東アジア型 CagA を有する <i>H. pylori</i> (ブータンおよびインドネシア) に感染した症例の抗 CagA 抗体検出の精度および正確さは、欧米型 CagA を有する <i>H. pylori</i> (ミャンマーおよびバングラデシュ) に感染した症例よりも高いことが判明した。さらに、上記のすべての症例において、抗-CagA 抗体と幽門洞単球浸潤との間に正の相関関係があることが判明した。一方、細菌数と抗-CagA 抗体との間には有意な相関は認めなかった。</p> <p>本研究では、新たに東アジア型 CagA ELISA を立ち上げ、多様な <i>cagA</i> 遺伝子型を有する <i>H. pylori</i> 感染患者の血清を用いて、本測定系の評価をおこなった。その結果、本 ELISA 測定系では、東アジア型 CagA <i>H. pylori</i> に感染した症例において有意に抗 CagA 抗体が検出されることが証明され、東アジア型 <i>H. pylori</i> 感染症例における抗 CagA 抗体検出率改善に対する有用性が示された。以上より、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第 644 号	氏名	DALLA DOOHAN
審査委員会委員	主査氏名	花田 礼子 (花)	
	副査氏名	谷川 雅人 (谷)	
	副査氏名	水戸 一弘 (水)	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. What is the difference of the newly developed Elisa compared with the previous your home-made one? 2. How is Cag-A protein transferred into the blood? Can you explain the mechanism of this? 3. About EPIYA motif, Is EPIYA motif specific in H. Pylori? Are there other bacteria which have this motif? Is there any other diseases related with this EPIYA motif? 4. In recombinant protein, recombinant Cag-A m24 protein, you have confirmed the expression levels by SDS-PAGE and western blotting. How about the functional examination of this recombinant protein is? For example, have you checked some signals of downstream of this pathway? 5. Is this specific antibody targeted EPIYA-D region? 6. What is ROC analysis? And what is the benefit to use this analysis in this study? 7. What is the reason you have chosen the parameters of bacterial density and histological score association of anti-Cag-A antibody? Is there any possible parameter such as urease level or inflammation markers? 8. What is the reason for the difference of the cut off value in these 4 countries? From an etiological or pathological point of view, what does this difference mean? 9. What is the reason you have chosen the parameters of bacterial density and histological score association of anti-Cag-A antibody? Is there any possible parameter such as urease level or inflammation markers? 10. What is the pathophysiological mean of higher level of anti-Cag-A antibody? Is this higher level related with gastric cancer progression? 11. After some medication or treatment, how does the kinetics of anti-Cag-A antibody level change? 12. Is there any report of Cag-A overexpressing model or Cag-A knockout model? What is the phenotype of these models?? 13. Is there any clinical trial for inhibiting Cag-A activities? What do you think about the next direction from this study? 14. Although Bhutan is located north of Bangladesh and far from Indonesia, could you explain why the East Asian type of CagA is predominant in Bhutan as well as in Indonesia. 15. Why do you culture E. coli at 30°C to express recombinant CagA? 16. Are cagA negative strains also pathogenic? 17. There are two types of CagA ELISA: the Western CagA ELISA and the East Asian CagA ELISA. Which type of ELISA do you think is better in Bangladesh and Myanmar? 18. To evaluate the effect of East-Asian type CagA ELISA it is necessary to measure and compare the anti-CagA antibody levels by Western-type CagA ELISA. Was the patient measured using the Western-type ELISA? 19. In Table 1, there seems to be differences in the age of each country, but what about statistically? Can you tell me whether the duration of H. pylori infection affect histological findings, such as monocyte infiltration? <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 DALLA DOOHAN

論 文 題 目

Characterization of a novel *Helicobacter pylori* East Asian-type CagA ELISA for detecting patients infected with various *cagA* genotypes

(多様な *cagA* 遺伝子型のヘリコバクター・ピロリ感染患者検出のための新規東アジア型 CagA ELISA の評価)

要 旨

ア. 緒 言 **Background:**

Currently, Western-type CagA is used in most commercial *Helicobacter pylori* CagA ELISA kits for CagA detection rather than East Asian-type CagA. We evaluated the ability of the East Asian-type CagA ELISA developed by our group to detect anti-CagA antibody in patients infected with different *cagA* genotypes of *H. pylori* from four different countries in South Asia and Southeast Asia.

イ. 研究対象 **Method:**

The recombinant CagA protein was expressed and later purified using GST-tag affinity chromatography. The East Asian-type CagA-immobilized ELISA was used to measure the levels of

anti-CagA antibody in 750 serum samples from Bhutan, Indonesia, Myanmar, and Bangladesh. The cutoff value of the serum antibody in each country was determined via Receiver-Operating Characteristic (ROC) analysis.

ウ. 結果 **Results:**

The cutoff values were different among four countries studied (Bhutan, 18.16 U/mL; Indonesia, 6.01 U/mL; Myanmar, 10.57 U/mL; and Bangladesh, 6.19 U/mL). Our ELISA had better sensitivity, specificity, and accuracy of anti-CagA antibody detection in subjects predominantly infected with East Asian-type CagA *H. pylori* (Bhutan and Indonesia) than in those infected with Western-type CagA *H. pylori* predominant (Myanmar and Bangladesh). We found positive correlations between the anti-CagA antibody and antral monocyte infiltration in subjects from all four countries. There was no significant association between bacterial density and the anti-CagA antibody in the antrum or the corpus.

エ. 結語 **Conclusion:**

The East-Asian type CagA ELISA had improved detection of the anti CagA antibody in subjects infected with East Asian-type CagA *H. pylori*. The East Asian-type CagA ELISA should, therefore, be used in populations predominantly infected with East Asian-type CagA