

論 文 要 旨

Shared expression of mucin12 in *Ascaris lumbricoides* and the human small intestine
(ヒト回虫とヒト小腸粘膜に共通に局在する mucin12)

関西医科大学衛生・公衆衛生学講座
(指導：西山 利正 教授)

林 猪 都 子

【はじめに】

ヒト回虫症はヒト回虫 (*Ascaris lumbricoides*) の寄生によって引き起こされる疾病である。ヒト回虫はヒトが成熟卵を経口摂取すると消化管内で孵化し、孵化幼虫が小腸壁に侵入し、体内移行を行ってから再び小腸に戻り、成虫となり小腸において定着寄生する。

本研究において、ヒト回虫はヒトを宿主として小腸を好適な場所として寄生するのは、ヒトの免疫から逃れる得る共通抗原性物質を有しているのではないかと考え、ヒト回虫とヒト小腸粘膜に存在する共通抗原性を遺伝子レベルで検討することを目的とした。

【研究方法】

最初にヒト大腸 cDNA ライブラリーにて、抗ヒト回虫粗抗原抗体を用いてスクリーニングを行った。陽性プラークを採取し、その遺伝子の塩基配列をデータベースと照会した結果、その1つはヒト mucin12 と高い相同性を有していた。

次にこのヒト Mucin12 中の 14 アミノ酸からなる合成ペプチドを作製し、抗ヒト Mucin12 ポリクローナル抗体を作製した。また、この抗体とは異なるエピトープ部位を認識する抗ヒト Mucin12 抗体を購入して同様に用いた。

続いて、ヒト回虫とヒト小腸の切片を用いて免疫染色を行った。一次抗体に作製した抗ヒト Mucin12 抗体および抗体作製時に用いた合成ペプチドで予め吸収処理した抗ヒト Mucin12 抗体を用いた。二次抗体に蛍光標識した抗 rabbit IgG を用いて、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

次に、ヒト大腸癌細胞株 CACO-2 とヒト直腸由来の小細胞癌細胞株 ECC4 から抽出した細胞溶解抽出物とヒト回虫粗抗原を用いて、それぞれに含有されるヒト Mucin12 との共通抗原性物質の検討を行った。

【結果】

ヒト大腸 cDNA ライブラリーにおいて陽性クローンを3クローン取得した。この陽性クローンのシーケンスを遺伝子データベースと照会し、ホモロジー検索した結果、それぞれのクローンは transmembrane mucin 12 (AF147790)、similar to actin (BC012617)、beta-casein-like-protein (NM_033504) と高い相同性を有していた。

次に抗ヒト Mucin12 抗体を用いてヒト回虫とヒト小腸における Mucin12 の局在部位を検討した結果、ヒト回虫中の粘液分泌器官及び上皮に Mucin12 の局在が確認された。ヒト小腸においては、腸の陰窩および絨毛の周囲に存在する粘膜上皮に Mucin12 の局在が認められた。またこれらのシグナルは、ヒト回虫とヒト小腸とも合成ペプチドで吸収処理した抗ヒト Mucin12 抗体を使用した場合、完全に消失した。

そこで、ヒト回虫はヒト Mucin12 と相同性の高いタンパクを発現しているものと想定し、我々が作製した抗ヒト Mucin12 抗体と市販の抗ヒト Mucin12 抗体を用いて共通抗原性物質の同定を行った結果、ヒト回虫粗抗原中には約 37KDa と 100KDa に、ヒト消化管細胞 CACO-2 と ECC4 の細胞溶解抽出物中には 85KDa にそれぞれ異なる分子量の特異的なシグナルが検出された。合成ペプチドを用いて作製した抗ヒト Mucin12 抗体

と市販の抗ヒト Mucin12 抗体を用いて同様に検討した結果、双方とも同じ分子量の特異的なシグナルが検出された。

さらに、ヒト回虫粗抗原および CACO-2 と ECC4 の細胞溶解抽出物を用いて抗 GAPDH 抗体にてウエスタンブロットを行った結果、CACO-2 および ECC4 には GAPDH に特異的シグナルが検出されたが、ヒト回虫粗抗原中には検出されなかった。ヒト回虫粗抗原を 5 倍量にした場合においてもシグナルは検出されなかった。

【考察】

本研究においてヒト大腸 cDNA を用いて回虫との共通抗原性物質のスクリーニングを行い mucin12 をその候補として挙げた。

Mucin12 のヒト小腸における局在部位を検討した結果、陰窩および絨毛の周囲に存在する粘液上皮にその局在が観察された。新鮮な粘液は常に杯細胞から特に陰窩の開口部から分泌されている。一方、ヒト回虫において、Mucin12 は粘液分泌器官および上皮に局在していた。回虫の粘液分泌器官は花房状様の形態を有し回虫の上皮に接続されている。これらの結果から、ヒト回虫は Mucin12 様のタンパクを発現、分泌することで、回虫の体表面はこのタンパクで覆われていることが推察された。

さらに、ヒト回虫粗抗原とヒト細胞株 CACO-2 と ECC4 から抽出したタンパク中には異なる分子量の抗ヒト Mucin12 抗体と交差反応を示すタンパクが存在することが示唆された。更に今回作製した抗ヒト Mucin12 抗体は市販の抗ヒト Mucin12 抗体とともに同じ分子量のタンパクが検出された。また、抗 GAPDH 抗体を用いたウエスタンブロットの結果より、ヒト回虫粗抗原中に GAPDH タンパクが検出されなかったことから、この共通抗原性物質の検出は宿主由来のタンパクの混入による影響ではないことが明らかになった。

これらの結果から、Mucin12 はヒト回虫およびヒト小腸粘膜組織に存在する共通抗原の 1 つであることが示唆された。ヒト回虫成虫は、宿主小腸に局在する共通抗原性を有する Mucin12 様タンパクを分泌することにより、宿主からの攻撃を回避し、小腸という好適な環境で寄生し生活していることが推測された。

今後はヒト大腸 cDNA を用いてスクリーニングを行って陽性を示した他の候補遺伝子である similar to actin と beta-casein-like-protein についても検討していく予定である。