

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590677

研究課題名(和文)ピロリ菌膜蛋白による血小板凝集と血小板関連疾患発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidate the platelet aggregation and the platelet associated diseases developing mechanism of the Helicobacter pylori outer membrane

研究代表者

森本 徳仁 (MORIMOTO, NORIHITO)

高知大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：60398055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Helicobacter pylori感染によって引き起こされる特発性血小板減少性紫斑病(H. pylori関連ITP)の発症メカニズムとしてH. pylori菌体膜蛋白(HpOMP)-血小板-抗HpOMP抗体の免疫複合体が関与する可能性を示唆しており、血小板に結合するHpOMPの本疾患発症における機能解析を行った。

本実験から、HpOMPはほとんどのH. pylori株が有しているにも関わらずH. pylori感染患者の一部のみでITPを発症することや、動物実験で再現できなかったことから、H. pylori関連ITP発症のメカニズムは個々の宿主免疫システムに複雑に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori associated ITP were caused by H.pylori infection,we suggested that immunocomplex of platelets, H. pylori outer membrane protein (Hp-OMP) and anti Hp-OMP antibody were involved in pathogenic mechanisms of H. pylori associated ITP. In this study, Hp-OMP has platelet agglutinating capacity, but the platelet aggregation-related factor of leukocytes may be involved. Although many of H. pylori strains have HpOMP,we thought that part of patients of H. pylori associated ITP have been affected by HpOMP. H. pylori associated ITP model was not able to reappear by an animal experiment. It was suggested that the mechanism of H.pylori related ITP development of symptoms is participating in each host immune system intricately.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：Helicobacter pylori 特発性血小板減少性紫斑病 H. pylori菌体膜蛋白 抗原抗体複合体

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (以下 *H. pylori*) は、胃炎、胃潰瘍および胃癌などの消化器疾患のみならず、生活習慣病として位置づけられる急性冠症候群や自己免疫性疾患の一つである慢性特発性血小板減少性紫斑病(以下 cITP)などの血液あるいは全身性疾患等にも関与することが報告されている。消化器疾患における本菌の病原因子に関しては、多くの研究により CagA 等の *H. pylori* の有する病原蛋白が疾患の発症および進展に関与することが報告されている。しかしながら、本菌の関連する消化器疾患以外の疾患においては、その発症メカニズムのほとんどが解明されていないのが現状である。

申請者がテーマとする本菌関連 cITP の発症機序にも不明な点が多く、*H. pylori* 感染により産生された抗体や免疫不均衡により生じた自己抗体が血小板に交差反応(抗体反応説)する可能性が高いものと考えられていた。しかしながら、*H. pylori* 除菌後の抗体価は 1 ヶ月以上持続するにもかかわらず、奏効群では抗体価が低下する事なく除菌後 1-2 週間後から血小板数が回復する現象はこれまでの仮説とは明らかに矛盾しており、*H. pylori* 関連 cITP の発症機序を説明できない(図 1)。

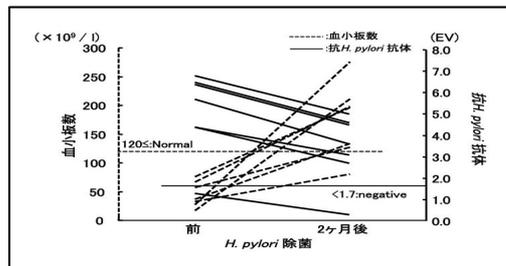


図 1. *H. pylori* 除菌による血小板数および抗 *H. pylori* 抗体の経時的変化

そこで、申請者らは新しい本菌関連 cITP の発症機序として、菌体抗原が血小板と結合し複合体を形成することにより、最終的に抗 *H. pylori* 抗体との結合を介して血小板破壊(抗原抗体複合体説)が誘導されるという仮

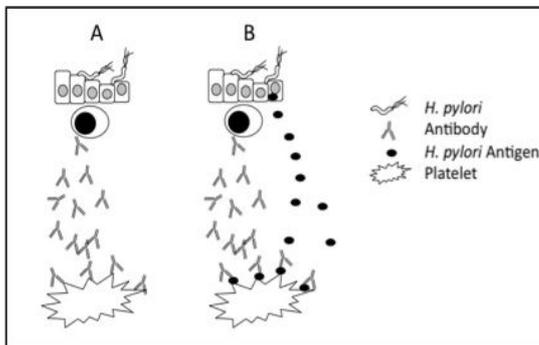


図 2. *H. pylori* 関連 ITP 発症における血小板への Hp-OMP の結合と抗 Hp-OMP 抗体との免疫複合体の形成(仮説)

説に基づいて研究を行ってきた(図 2)。

H. pylori とヒト血小板を反応させ、血小板と *H. pylori* 蛋白の結合性を免疫沈降法により解析した結果、17kDa *H. pylori* 低分子蛋白が血小板と結合することが明らかとなった(Morimoto, N. et al. 2007)。*H. pylori* より本 17kDa 蛋白を分離し質量分析(LC-MS)により解析した結果、本蛋白は *H. pylori* 細胞膜を構成する膜蛋白(Outer Membrane Protein: 以下 OMP)の 1 つであることを証明した。

2. 研究の目的

H. pylori OMP(以下 Hp-OMP)による cITP 発症との関連性を明らかにするために、本研究では、Hp-OMP の血小板との結合部位の同定、実験動物を用いた生体内での Hp-OMP による *H. pylori* 関連 cITP 発症メカニズムの解明を行うことが目的である。

3. 研究の方法

(1) 実験動物を用いた Hp-OMP に対する反応性の検討

H. pylori を実験動物に感染させ、申請者らが提唱する *H. pylori* 関連 ITP における血小板- Hp-OMP- 抗 Hp-OMP 抗体が生体内で形成されるか否かを検討した。スナネズミに *H. pylori* を感染させた後、1 ヶ月および 3 ヶ月後に血液、脾臓を採取し抗 Hp-OMP 抗体により血小板または脾臓における Hp-OMP の検出を試みた。また Hp-OMP に対する抗体の産生についても検討を行った。

(2) Hp-OMP の血小板凝集および血小板結合部位の同定

これまでに Hp-OMP が血小板凝集を引き起こすことを確認しており、本蛋白を含めた *H. pylori* 菌体表面あるいは菌体内部に存在する血小板凝集惹起物質の同定を試みた。

(3) *H. pylori* の遺伝子型と疾患との関連性

これまでに蓄積した *H. pylori* 臨床分離株 135 株を対象として、Diversilab Bacterial kit を用いた rep-PCR 法により解析を行った。DNA マイクロボチップおよび Agilent 2100 Bio analyzer を用いて、増幅産物の分離および検出を行い、データ解析は Web ベースソフトウェアにて解析した。

4. 研究成果

(1) 実験動物を用いた Hp-OMP に対する反応性の検討

スナネズミへの *H. pylori* の持続感染は確認できたが、1 ヶ月および 3 ヶ月後に採取した血小板および脾臓からの Hp-OMP の検出を試みたが検出されなかった。また血中の抗体価も検出感度以下であったことから、今後は感染時期をさらに延長して再度検討を行う必要があるものと考えられた。

(2) Hp-OMP の血小板凝集および血小板結合部位の同定

血小板多血漿 (PRP) を用いた場合と全血を用いた血小板凝集 (全血凝固) について検討を行ったが、PRP よりも全血試料の方が Hp-OMP による血小板凝集 (全血凝固) が高い傾向が見られた。これまで、*H. pylori* により血小板凝集が引き起こされる事は知られており、セレクチンファミリーの関与も示唆されている。申請者らの結果も、同様に血小板凝集において好中球等の血液細胞から分泌される血小板凝集惹起物質が関与している事が示唆された。

(3) *H. pylori* の遺伝子型と疾患との関連性

H. pylori 135 株のうち 90 株が A - E の 5 群に分類された (図 3)。このうち E 群 (n=17) は胃癌由来株を最も多く含み (58.9%)、B 群 (n=24) は薬剤耐性株が最も多かった (45.8%)。同一株の判定基準参考値である相同性 98.0% 以上の株は、2~6 株と少数の株間で認められた。しかしながら、*H. pylori* 関連 ITP 患者由来の *H. pylori* 株は非常に少なく、*H. pylori* 関連 ITP 群に特有な *H. pylori* 株は見いだせなかった。本菌の感染時期や生活環境等に加え、宿主側の様々な因子が *H. pylori* の遺伝子多様性に強く関与しているものと考えられた (Morimoto N, et al. J Clin Lab Anal 2014)。

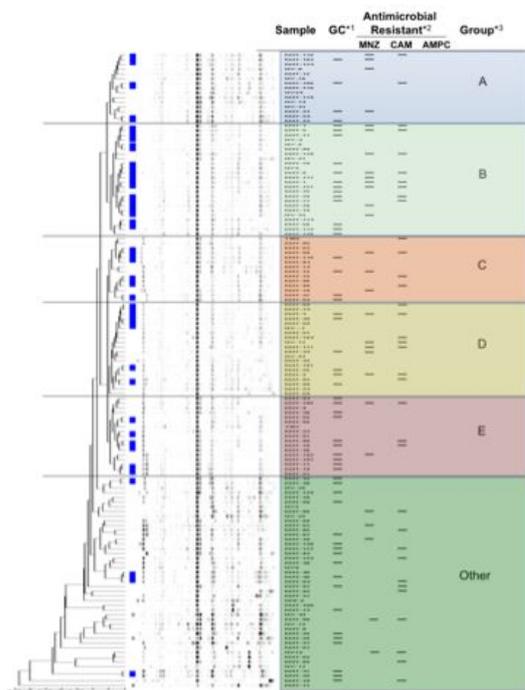


図 3. 癌群および非癌群患者由来 *H. pylori* 135 株の rep-PCR による遺伝子タイピング

これまでの研究成果に加え本研究成果からも、ヒトにおいて Hp-OMP が *H. pylori* 関連 ITP に関与している可能性は高いが、ヒト以外の動物においてヒトと同様なメカニズムが作用しているか否かは明らかに出来な

かった。*H. pylori* の遺伝子タイピングの結果から *H. pylori* の多様性が確認されており、これに加えた宿主 (ヒト) の免疫応答等が複雑に作用している可能性が示唆された。

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 5 件)

Sugiura T, Yamanaka S, Takeuchi H, Morimoto N, Kamioka M, Matsumura Y.

Autoimmunity and pulmonary hypertension in patients with Graves' disease. Heart Vessels. 2014 May 18. [Epub ahead of print] (査読有)

Morimoto N, Takeuchi H, Nishida Y, Morisawa M, Yoshikawa T, Morita T, Morimoto M, Sugimoto C, Matsumura Y, Sugiura T. Clinical Application of the DiversiLab Microbial Typing System Using Repetitive Sequence-Based PCR for Characterization of *Helicobacter pylori* in Japan. J Clin Lab Anal. 2014 May 5. doi: 10.1002/jcla.21758. [Epub ahead of print] (査読有)

Morimoto N, Korenaga M, Nishida Y, Takeuchi H, Kumon Y, Sugiura T. PCR amplification and DNA sequence analysis of parasitic intestinal protozoa in specimens stained with Chlorazol Black E. Acta Parasitol. 2013, Jun;58(2):132-8. (査読有) doi: 10.2478/s11686-013-0119-9.

Takeuchi H, Zhang YN, Israel DA, Peck RM Jr, Kamioka M, Yanai H, Morimoto N, Sugiura T. Effect of *Helicobacter pylori* cdrA on interleukin-8 secretions and nuclear factor kappa B activation. World J Gastroenterol. 2012, Feb7;18(5):425-34. doi:10.3748/wjg.v18.i5.425. (査読有)

Morishita K, Takeuchi H, Morimoto N, Shimamura T, Kadota Y, Tsuda M, Taniguchi T, Ukeda H, Yamamoto T, Sugiura T. Superoxide dismutase activity of *Helicobacter pylori* per se from 158 clinical isolates and the characteristics. Microbiol Immunol. 2012 Apr; 56(4):262-72. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00433.x. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

門田陽集, 竹内啓晃, 梅田昭子, 森本徳仁, 松村敬久, 杉浦哲朗. 細胞分裂関連遺伝子 *ftsZ*, *min* の *Helicobacter pylori* に及ぼす影響と相互作用解析. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会, 2013.10.31-11.3 神戸国際会議場 (神戸)

門田陽集, 竹内啓晃, 森本徳仁, 松村敬

久,杉浦哲朗. *Helicobacter pylori* の細胞分裂制御システム Min が形態に及ぼす影響. 日本臨床検査自動化学会第 45 回大会. 2013.10.10-12, パシフィコ横浜 (横浜)

長尾佳樹, 大石拓, 寺内芳彦, 森本徳仁, 菊池広朗, 満田直美, 玉木渉, 山本雅樹, 堂野純孝, 久川浩章, 荒川良, 是永正敬, 藤枝幹也. ミックス粉に繁殖するダニによるアナフィラキシーについてのアンケート結果について -当科で経験した 3 症例とともに報告する-. 第 50 回日本小児アレルギー学会, 2013.10.19-20. パシフィコ横浜会議センター (横浜)

西田愛恵, 森本徳仁, 是永正敬, 小松豊, 竹内啓晃, 松村敬久, 杉浦哲朗. Chlorazol Black E 染色標本から抽出した DNA を用いた *G. intestinalis* の Genotyping. 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, 2013.8.30-9.1. あわぎんホール (徳島)

竹内啓晃, 森本徳仁, 門田陽集, 西田愛恵, *Helicobacter pylori* phage の分離と生物学的性状解析. 第 19 回日本ヘリコバクター学会, 2013.6.28-29, 長崎大学 (長崎)

森本徳仁, 門田陽集, 西田愛恵, 竹内啓晃, ピロリ関連慢性特発性血小板減少性紫斑病に關与する菌体膜蛋白の血小板への結合と活性化. 第 19 回日本ヘリコバクター学会, 2013.6.28-29, 長崎大学 (長崎)

森本徳仁, 是永正敬, 西田愛恵, 竹内啓晃, 松村敬久, 杉浦哲朗. ヒト糞便から検出された *Giardia intestinalis* の triose phosphate isomerase (*tpi*) 遺伝子による genotyping. 第 82 回日本寄生虫学会大会, 2013.3.29-31, 東京医科歯科大学 (東京)

門田陽集, 梅田昭子, 森本徳仁, 杉浦哲朗, 竹内啓晃. *Helicobacter pylori* の分裂部位制御システムの動態解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013.3.18-20, 千葉 (幕張メッセ)

森本徳仁, 竹内啓晃, 門田陽集, 西田愛恵, 公文義雄, 杉浦哲朗. *Helicobacter pylori* の rep-PCR typing による疾患由来株および薬剤耐性株の分類. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 2012.11.29-12.2, 国立京都国際会館 (京都)

門田陽集, 竹内啓晃, 森本徳仁, 杉浦哲朗. *Helicobacter pylori* min 遺伝子の分裂機序における役割. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 2012.11.29-12.2, 国立京都国際会館 (京都)

門田陽集, 竹内啓晃, 森本徳仁, 杉浦哲朗. *Helicobacter pylori* min 遺伝子と divisome components の相互作用. 日本臨床検査自動化学会第 44 回大会,

2012.10.11-13, パシフィコ横浜 (横浜)
N.Morimoto, H.Takeuchi, Y. Kadota, Y. Nishida, Y. Kumon, T. Sugiura. Analyzing For The Pathophysiology Of *Helicobacter H. pylori* - associated cITP Via Human Platelet - *H.pylori* Outer Membrane Protein Interaction, 2012.6.16-19, Moscone Center (San Francisco)
門田陽集, 竹内啓晃, 森本徳仁, 公文義雄, 杉浦哲朗. *Helicobacter pylori* の細胞分裂制御に關与している Min システムの解析. 第 85 回日本細菌学会総会, 2012.3.27-29, 長崎ブリックホール他 (長崎)

森本徳仁, 竹内啓晃, 門田陽集, 西田愛恵, 公文義雄, 杉浦哲朗. 血小板結合 *Helicobacter pylori* 膜蛋白と血小板凝集・活性化. 第 85 回日本細菌学会総会. 2012.3.27-29, 長崎ブリックホール他 (長崎)

森下慶子, 竹内啓晃, 島村智子, 森本徳仁, 門田陽集, 受田浩之, 杉浦哲朗, 山本哲也. Superoxide dismutase activity of *Helicobacter pylori* from 158 clinical isolates. 第 85 回日本細菌学会総会, 2012.3.27-29, 長崎ブリックホール他 (長崎)

K.Morishita, H.Takeuchi, T.Shimamura, N.Morimoto, Y.Kadota, M.Tsuda, T. Taniguchi, H.Ukeda, T Sugiura and T. Yamamoto, Superoxide dismutase(SOD) of *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients with gastroduodenal diseases. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.11.6-16, Sapporo Convention Center (Sapporo)

Y.Kadota, H.Takeuchi, N.Morimoto, Y.Nishida, Y.Kumon, T.Sugiura. Functional analysis of minC, D and E genes of *Helicobacter pylori*. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.11.6-16, Sapporo Convention Center (Sapporo)

森本徳仁, 竹内啓晃, 森澤美恵, 西田愛恵, 吉川智絵, 森本みゆき, 森田珠恵, 門田陽集, 杉本千鶴子, 公文義雄, 小倉克巳, 近藤孝美, 杉浦哲朗. rep-PCR を原理とした細菌タイピングシステム DiversiLab による *Helicobacter pylori* の genotyping. 日本臨床検査自動化学会第 43 回大会, 2011.10.6-8, パシフィコ横浜 (横浜)

森本徳仁, 竹内啓晃, 西田愛恵, 森澤美恵, 吉川智絵, 森田珠恵, 森本みゆき, 小倉克巳, 近藤孝美, 杉浦哲朗. 遺伝子タイピングシステム DiversiLab による *Helicobacter pylori* ゲノム解析の評価. 第 17 回日本ヘリコバクター学会

学術集会，2011. 6.24-25，富山国際会議場（富山）

森本徳仁，是永正敬，西田愛恵，森澤美恵，吉川智絵，森田珠恵，小倉克巳，杉浦哲朗．長期保存したクロラゾール・ブラック E 染色標本から抽出した DNA を用いた腸管内寄生原虫遺伝子の PCR 法による増幅．第 80 回日本寄生虫学会大会，2011. 7. 17-18，東京医科歯科大学（東京）

〔産業財産権〕

取得状況（計 1 件）

名称：H.ピロリ関連特発性血小板減少性紫斑病の検出方法、およびその予防治療剤のスクリーニング

発明者：竹内啓晃、森本徳仁

権利者：国立大学法人高知大学

種類：特許権

番号：特許第 4852706 号

取得年月日：平成 23 年 11 月 4 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 徳仁 (MORIMOTO, Norihito)

高知大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：60398055

(2) 研究分担者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI, Hiroaki)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：90346560