

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870561

研究課題名(和文) H.pylori関連免疫性血小板減少症の病態形成および除菌療法効果の機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of pathogenesis and eradication response in Helicobacter pylori-associated immune thrombocytopenia

研究代表者

佐藤 隆司 (SATO, Takashi)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：90407114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：H.pylori陽性免疫性血小板減少症(ITP)患者におけるH.pylori除菌療法の効果と遺伝子多型(SNP)との関連について検討した。その結果、Fc RIIB 232I/T、TPO +24G/A、TGF- β 1 -509C/TのSNP頻度は、H.pylori関連ITPの除菌療法有効例と無効例で差が認められた。さらに、Fc RIIB 232I/TのTアリルは抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数を多く認め、TGF- β 1 -509C/TのTアリルは血漿TGF- β 1濃度が低い傾向であった。以上より、Fc RIIBとTGF- β 1のSNPはH.pylori関連ITPの病態形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the associations between gene polymorphisms and rates of Helicobacter pylori (H. pylori) eradication response in patients with H.pylori-associated immune thrombocytopenia (ITP) were evaluated. Patients with ITP who were carriers of the Fc RIIB 232T or TGF- β 1 -509T polymorphisms had significantly higher rates of H. pylori eradication responses than non-carriers. The frequency of the circulating anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody-producing cells was significantly higher in patients with ITP that carried the Fc RIIB 232T allele than in those with the non-T allele. In addition, patients with ITP that carried the TGF- β 1 -509T allele tended to have lower TGF- β 1 levels. These findings suggest that Fc RIIB 232I/T and TGF- β 1 -509C/T gene polymorphisms contribute to the susceptibility of H.pylori-associated ITP by controlling the autoimmune responses.

研究分野：血液検査学

キーワード：免疫性血小板減少症 Helicobacter pylori

1. 研究開始当初の背景

免疫性血小板減少症 (Immune thrombocytopenia: ITP) は血小板破壊が亢進し、血小板減少をきたす自己免疫疾患である。ITP の血小板破壊の機序は、血小板膜糖蛋白 (glycoprotein: GP) である GPIIb/IIIa などに対する自己抗体が自己反応性 B 細胞から産生され、その自己抗体と結合してオプソニン化された血小板が網内系で Fc R を介して貪食細胞に捕捉され、血小板破壊が起こる。近年、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 陽性 ITP 患者に *H. pylori* 除菌療法を行うことで、血小板数の増加が見られ注目されている。特に日本では、*H. pylori* 保菌率が高いこと、ITP の除菌療法が保険診療として 2010 年に承認されたことから、除菌療法が第一選択治療薬として使用されている。しかし、*H. pylori* 関連 ITP の約 4 割は除菌療法で改善せず、*H. pylori* 除菌療法の治療効果の違いは明確になっていない。

Fc R は活性化受容体 (Fc RIIA、Fc RIIIA、Fc RIIIB) と抑制型受容体 (Fc RIIB) が存在し、免疫複合体クリアランスや B 細胞・単球制御に関わる機能的な分子である。Fc R を介した血小板破壊の機序に着目して、*H. pylori* 関連 ITP の単球上の Fc R 発現を解析した報告がある。*H. pylori* 関連 ITP は Fc RIIB 発現が低下し、それに伴い Fc R バランスが活性化型に傾くことで貪食能が亢進し、マクロファージ、自己反応性 T・B 細胞による病的サイクルが活性化されることが示された。また、除菌療法後は Fc RIIB 発現の上昇とともに単球貪食能の低下が見られ、ITP 病態が是正された (*J Clin Invest*, 118:2939; 2008)。

ITP は他の自己免疫疾患と同様に遺伝素因と後天的な環境要因の両者が関与する多因子疾患である。*H. pylori* 陽性 ITP 患者に除菌療法を行うと ITP 病態が改善する有効例と改善しない無効例が存在する。つまり、*H. pylori* 感染という環境要因が一部の ITP 患者の発症に関与することが考えられる。*H. pylori* 陽性 ITP 患者の除菌療法による血小板数増加の有効率は、各国で大きく異なり、スペインや米国では 10%以下であるのに対し、日本やイタリアでは 50%以上である (*Int J Haematol*, 81:162; 2005)。このような地域による *H. pylori* 除菌後の血小板数改善効果の違いを規定する要因は不明であるが、宿主側の遺伝的素因が関連することが考えられる。Fc RIIB 232I/T (Ile/Thr) は膜貫通部位に存在する一塩基多型 (SNP) であり、T 型はシグナル伝達に重要とされる脂質ラフト領域への移行がほとんど見られず、Fc RIIB の抑制機能が発揮されないことが報告されている (*Nat Med*, 11:1056; 2005)。申請者は先行研

究として、健常成人 193 名、ITP 患者 206 名を対象に Fc RIIB 232I/T の SNP 解析を行った。その結果、抑制機能低下の T 型が *H. pylori* 陽性 ITP 患者で高頻度であった ($p=0.002$) (Sato T et al, *Blood*, 122:1991; 2013)。Fc RIIB 232 I/T の SNP の違いが *H. pylori* 関連 ITP の発症や除菌療法の効果機序にどのような影響を及ぼしているのかは不明なままである。また、他の SNP と *H. pylori* 関連 ITP 患者との関係の知見は数少ない。

2. 研究の目的

本研究では、活性化および抑制型の Fc R、巨核球の成熟に関わる造血因子であるトロンボポエチン (TPO)、制御性 T 細胞に関与する FoxP3 および TGF- β 、自己免疫疾患と関連する BAFF、FCRL3 の SNP を同定し、*H. pylori* 関連 ITP の病態形成や除菌療法の効果との関連を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 末梢血単核球 (PBMC) と顆粒球、血漿の分離、ゲノム DNA の抽出

Histopaque、Lymphoprep を用いて、比重遠心法により末梢血から PBMC と顆粒球、血漿を分離した。分離した顆粒球または PBMC より QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いてゲノム DNA を抽出した。

(2) Fc R、TGF- β 1、TPO、FCRL3、BAFF、Foxp3 の SNP 解析

ゲノム DNA を用い、PCR-RFLP 法により、Fc RIIB 252I/T (rs1050501)、Fc RIIIA 158 V/F (rs396991)、TGF- β 1 -509C/T (rs1800469)、TGF- β 1 +869T/C (rs1800473)、TPO +24G/A (rs6141)、FCRL3 -169C/T (rs7528684)、BAFF -871C/T (rs9514828) の SNP を解析した。

また、ゲノム DNA を用い、TaqMan 法により、Fc RIIA 131 R/H (rs1801274)、Foxp3 の転写調節領域に存在する Foxp3 -924A/G (rs2232365)、Foxp3 -2383C/T (rs3761549)、Foxp3 -3279C/A (rs3761548) の SNP 解析を行った。TaqMan 法では、TaqMan Genotyping Master Mix と設計済みのプライマーおよびプローブを用いた。PCR 条件は 95 15 分の反応の後、95 15 秒・60 1 分を 40 サイクルとした。

(3) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数の測定 (ELISPOT 法)

蛋白高吸着 PVDF 膜 96 穴マイクロプレートの各ウェル上に精製ヒト GPIIb/IIIa 抗原溶液を加え固相化した。さらにブロッキング液 (1% ウシ血清アルブミン含 PBS-Ca) を反応させ、ブロッキングを行った。そこに PBMC を 1

ウェルあたり 1×10^5 個/RPMI 200 μ l 加え、37、4 時間、CO₂ インキュベータ内で培養した。培養後、細胞成分を洗浄、除去したのち、酵素標識抗ヒト IgG 抗体を加え、さらにアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを加えた。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の存在した部位が膜上にスポットとして検出され、それを実体顕微鏡で計測した。

(4) ELISA による血漿 TGF- β 1 濃度の測定

血漿と 1N HCl を混和して室温で 10 分間反応させ、血漿を活性化させた。その後、1.2N NaOH を加えて中和した検体を用いてヒト TGF- β 1 ELISA キット (R&D Systems) で血漿 TGF- β 1 濃度を測定した。

(5) ELISA による血漿 TPO 濃度の測定

血漿を 4 で 5 分間、10000rpm で遠心し、その上清を検体として用いた。ヒト TPO ELISA キット (R&D Systems) で血漿 TPO 濃度を測定した。

(6) 統計学的検討

SNP 頻度の比較にはカイ二乗検定を用い、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数、TGF- β 1 濃度、TPO 濃度の比較には Mann-Whitney U-test を用いた。いずれにおいても有意水準 (P) が 0.05 未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) Fc R, TGF- β 1, TPO, FCRL3, BAFF, Foxp3 の SNP 解析

H. pylori 陽性 ITP 患者で除菌療法を行い、血小板数が増加した除菌療法有効例 21 例と血小板数が増加しなかった除菌療法無効例 22 例を用いた。*H. pylori* 関連 ITP の Fc R11B 252I/T の SNP の T アリルは、*H. pylori* 除菌療法無効例 (14%) と比べ除菌療法有効例 (67%) で有意に多かった ($p < 0.001$)。TGF- β 1 -509 C/T の T アリルは、*H. pylori* 除菌療法無効例 (56%) と比べ除菌療法有効例 (86%) で有意に多かった ($P = 0.045$)。また、TPO +24 G/A の A アリルは、*H. pylori* 除菌療法有効例 (41%) と比べ除菌療法無効例 (77%) で多い傾向が見られた ($p = 0.09$)。

一方、Fc R11A 131 R/H、Fc R11A 158 V/F、TGF- β 1 +869 T/C、FCRL3 -169 C/T、BAFF -871 C/T、Foxp3 -924 A/G、Foxp3 -2383 C/T、Foxp3 -3279 C/A の SNP 分布は、*H. pylori* 除菌療法無効例と有効例で差は見られなかった。

(2) Fc R11B 232I/T SNP と抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞数との関連

ITP 患者の Fc R11B 232I/T の T アリルが *H. pylori* 除菌療法有効例で多く認められた。

Fc R11B 232T アリルを有する Fc R11B 分子は、抑制性が正常に機能しないことが報告されている。このことから、Fc R11B 232T アリルを有する症例は、B 細胞シグナルの亢進により自己抗体産生が誘導されることを想定した。

そこで、Fc R11B 232I/T と ITP に特異的な自己抗体である抗 GPIIb/IIIa 抗体を産生する B 細胞数との関連を ELISPOT 法で検討した。使用した検体は、*H. pylori* 感染の有無に関わらず、T アリルを有する ITP 患者 51 例、T アリルを有さない ITP 患者 90 例を用いた。その結果、T アリルを有する ITP 患者 (7.6 ± 4.2) は T アリルを持たない ITP 患者 (5.2 ± 3.5) と比べ、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数が有意に多く認められた ($p = 0.02$) (図 1)。

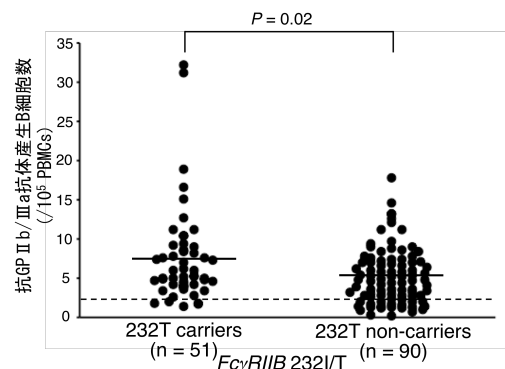


図1. ITP患者におけるFc γ RIIB 232I/T と抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数との関連 (棒線は平均値)

(3) TGF- β 1 -509C/T と TGF- β 1 濃度の関連

TGF- β 1 -509C/T の T アリルが ITP 患者の *H. pylori* 除菌療法有効例で多く認められた。そこで、TGF- β 1 -509C/T と ITP 患者の TGF- β 1 濃度との関連を検討するため、ELISA で TGF- β 1 濃度を測定した。その結果、TGF- β 1 -509C/T の T アリルを有する ITP 患者の TGF- β 1 濃度は 2289 ± 1187 pg/ml ($n = 19$)、T アリルを有さない ITP 患者の TGF- β 1 濃度は 3888 ± 2129 pg/ml ($n = 8$) であり、T アリルを有する ITP 患者は TGF- β 1 濃度が低い傾向であった ($p = 0.06$)。一方、健康成人での TGF- β 1 濃度は、TGF- β 1 -509C/T の SNP の分布で差は認められなかった。

(4) TPO +24G/A と血漿 TPO 濃度の関連

ITP 患者の *H. pylori* 除菌療法と TPO +24G/A の SNP との関連を見いだした。そこで、TPO +24G/A の SNP と ITP 患者の血漿 TPO 濃度との関連を検討した。TPO +24G/A の各 SNP における TPO 濃度の平均値は、A/A では 67.18 ± 51.03 pg/ml ($n = 8$)、G/A は 74.02 ± 108.79 pg/ml ($n = 19$)、G/G は 70.40 ± 67.48 pg/ml ($n = 24$) であり、3 群間で有意差は認められなかった。

(5)結語

H.pylori 関連 ITP では、*Fc RIIB* 2321/T および *TGF- 1* -509C/T の SNP が *H.pylori* 除菌療法の効果と関連することが明らかとなった。また、それらの SNP は抗 GPIIb/IIIa 抗体や *TGF- 1* の産生に影響を及ぼし、ITP の病態形成に関わる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Satoh T, Miyazaki K, Shimada N, Nagane K, Higashihara M, Takahashi S.

Detection of anti-thrombopoietin antibodies in patients with immune thrombocytopenia.

The 56th Annual Meeting & Exposition of the American Society of Hematology (San Francisco, USA). 2014. Dec.

〔その他〕

ホームページ : <http://www.kitasato-u.ac.jp/ahs/ml/ketsueki/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 隆司 (SATO, Takashi)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号 : 90407114