

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590629

研究課題名（和文）急性冠症候群におけるヘリコバクター・ピロリ感染症の関与とその機序

研究課題名（英文）Analyzing the participation of *Helicobacter pylori* infection in acute coronary syndrome (ACS)

研究代表者

杉浦 哲朗 (SUGIURA TETURO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50171145

研究成果の概要（和文）：ピロリ関連免疫性血小板減少性紫斑病の病態解析からピロリ成分が血小板に結合することを見出した。そこで、その血小板結合成分を LC-MS/MS 解析を経て、11 の候補蛋白から最終的に1つの菌体膜蛋白の同定に成功した。その His 融合蛋白を作製し血小板との反応性解析から、本蛋白が明らかに血小板を凝集し活性化することを証明した。さらに、患者検体から本蛋白検出に必須な特異性の高い抗体をウサギ免疫から獲得することができた。

研究成果の概要（英文）：We had previously found the certain components of *H. pylori* involved in development of *H. pylori* associated-ITP through the event which the bacterial component binds to platelet. In this study, we attempted to seek the bacterial component binds to platelet using western blotting with IP and LC-MS/MS for analyzing the participation of *Helicobacter pylori* infection in ACS. Eventually, an outer membrane protein of *H. pylori* (HP-OMP) was identified among 11 candidate bacterial proteins followed by western blotting (IP) with all 11 His- fusion candidate proteins prepared. The platelet aggregation experiment demonstrated that the HP-OMP could definitely aggregate platelets via binding to surface of the platelet. Furthermore, the antibody specific to HP-OMP (anti-HP-OMP) was made with rabbit immunization.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,700,000 | 810,000   | 3,510,000 |
| 2010年度 | 600,000   | 180,000   | 780,000   |
| 2011年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

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：ヘリコバクター・ピロリ、血小板凝集、菌体膜蛋白、急性冠症候群、特異抗体

## 1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染は上部消化管疾患以外にも種々の疾患・病態に関与することが示唆され多くの報告がある。急性冠症候群（ACS）も

ピロリ感染との関連性が示唆されている疾患の一つであるが、その病態発症へのピロリ菌の関与は不明である。申請者らはピロリ関連免疫性血小板減少性紫斑病（ピロリ関連

ITP) の病態解析から菌体成分が血小板と結合することを見出した。そこで、血小板凝集・活性化を病態に有する ACS へのピロリ菌の関与を解明するため血小板結合菌体成分の同定から研究を開始した。

## 2. 研究の目的

ピロリ菌 (感染) の ACS 発症病態におよぼす影響を解明しその予防および新たな治療戦略の構築を目的に本研究を開始した。特に、血小板に結合し凝集を誘導する菌体成分の検索・同定とそれに反応する特異性の高い抗体作成を中心に研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 血小板結合成分の検索

健康人の血小板とホモジナイズしたピロリ菌 (以下、ホモジナイズ菌液) を反応後、抗血小板抗体で免疫沈降 (IP) し、電気泳動、ウエスタンブロット (ピロリ関連 ITP 患者血清: 特に除菌奏効群患者血清) にて目的蛋白を検索した。同じ泳動位置にある蛋白をゲル抽出 (クーマシー染色) し LC-MS/MS 解析後、得られた結果を基にデータベース上から候補蛋白を検索した。

### (2) 血小板結合成分の同定

候補蛋白は全てクローニング後、His 融合蛋白を作製し大腸菌 (BL21) で IPTG 発現誘導後に精製して以下の研究に使用した (図 1)。血小板との結合性は各融合蛋白と血小板を反応後にアグリゴメーターで解析した。さらに、抗血小板抗体で IP 後にウエスタンブロット (抗 His 抗体) にて血小板との結合性の再確認を実施した。

### (3) 特異抗体作成

得られた蛋白 (血小板結合菌体成分) をウサギにアジュバントと共に免疫し、ELISA で力値を測定し十分であることを確認後に屠殺し抗体を得た (図 1)。

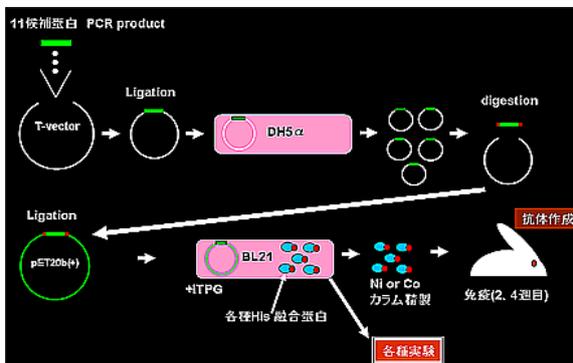


図1: 融合蛋白作製・誘導発現・抗体作成フローチャート

### (4) ピロリ菌株における lpp20 遺伝子保有率および Lpp20 発現状態の解析

臨床分離株 (約 150 株) から gDNA を抽出 (キアゲンキット) 後、lpp20 遺伝子特異的プライマーを作成し PCR (条件: ) にて本遺伝子の保有率を解析した。さらに reference 株 (26695、NCTC11637、J99、SS1) を含む 10 株を random に選択し、それらホモジナイズ菌液をウエスタンブロット (作成した抗 Lpp20 抗体使用) に供して Lpp20 蛋白の発現状態を検証した。

### (5) vivo (ピロリ菌感染動物) における血中 Lpp20 検出

スナネズミ (♂、6 週齢) に KYU1 株 (当科で動物感染効率の高い株: 由来は NCTC11637 株) をゾンデで経口摂取 ( $1 \times 10^9$  CFU/500  $\mu$ l (10% ウマ血清入ブルセラ溶液)) させ、4 週間後に屠殺し胃を摘出し血液を採取した。胃はホモジナイズ後、その懸濁液を培地に塗布しピロリ菌の胃内感染状態を確認した。必要に応じて増殖したコロニーは PCR にてさらに確認作業を実施した。

## 4. 研究成果

(1) LC-MS/MS 解析: 2 次元電気泳動後でウエスタンブロットにて約 18kDa 付近に強い反応性を認める菌体成分を見出し (図 2)、そこからゲル抽出成分を LC-MS/MS 解析に供し最終的に 11 個の候補遺伝子 (ピロリ菌体成分) を得た。

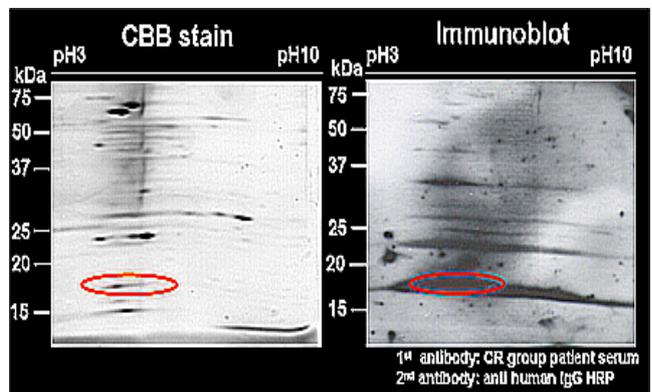


図2: 2次元電気泳動とウエスタンブロット  
左: クーマシー染色  
右: インムノブロット (奏効群患者血清) 反応性のある領域 (丸印) を確認後、同一部位のゲルから蛋白を抽出し LC-MS/MS 解析へ供した。

(2) 血小板結合成分の同定: 全 11 の候補遺伝子をクローニング、融合蛋白作製後、血小板との結合性を解析し、最終的に 11 から 1 つのピロリ菌体成分 (膜蛋白: Lpp20) を同

定した (図 3)。さらに IP 後ウエスタンブロットでも本膜蛋白の血小板結合性を確認した (図 4)。

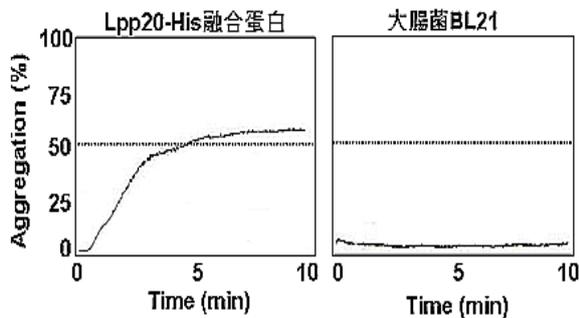


図3：Lpp20-His融合蛋白と血小板結合性（アグリゴメーター）  
見出した1つの菌体成分（Lpp20蛋白）のHis融合蛋白は血小板を凝集させることを確認した。

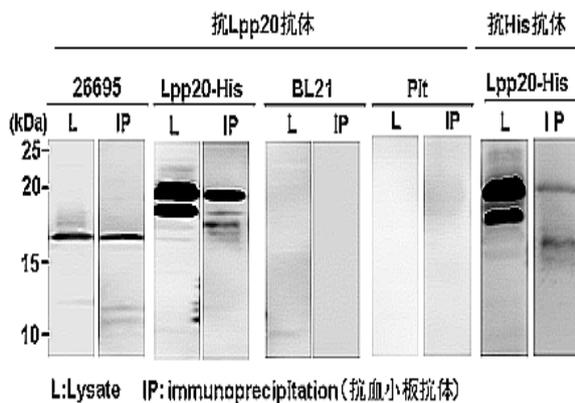


図4：IPによる血小板との結合性  
このLpp20蛋白が血小板と結合することを抗血小板抗体を使用した免疫沈降法にて確認した。陰性コントロールとして、大腸菌および血小板のみを使用した、ともに交差反応は認めない。

(3) 抗 Lpp20 抗体の特異性：ウサギ免疫で作成した抗 Lpp20 抗体(ポリクローナル抗体)は目的であるピロリ菌体の Lpp20 蛋白のみに特異的に反応することを確認した。

(4) lpp20 遺伝子保有率：調べた全ての株で本遺伝子は保有されており、PCR 解析では diversity も認められなかった。このことは、本遺伝子は全てのピロリ菌株で保有されており、かつ恒常的に Lpp20 蛋白を発現していることが判明した (図 5)。対数増殖期後期～停常期前期での解析であり詳細な phase variation は解析しておらず、株間が増殖動態により発現量には差があるかもしれない。

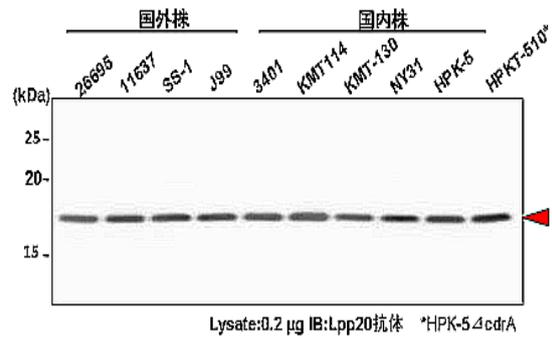


図5：抗Lpp20抗体による臨床分離株の発現検証  
各種臨床分離株（国内・国外株）のLpp20蛋白の発現を作製した抗体にて検証した。目的の位置（約18kDa）に1つのバンドを認めた。他に交差反応は認めなかった。HPKT510は *cdrA* 破壊 HPK5 株

(5) Lpp20 蛋白の血中移行：vivo（ピロリ菌感染スナネズミ）にて解析した結果、感染動物の血中から抗 Lpp20 抗体に反応性を認める成分が検出されたことより、本蛋白は腸管から血中へ移行する可能性が示唆された。今後はさらに感染動物にて検証するとともに、患者検体にて本菌体成分の関与について詳細な解析を実施し急性冠症候群におけるピロリ感染症の病態解明に繋げる予定である (図 6)。さらに、本蛋白の血小板凝集阻止作用を有する成分の検索や既存の治療薬（抗血小板凝固阻止剤）を使用した阻害作用の解析から、血小板凝固機序の解明を行う予定である。

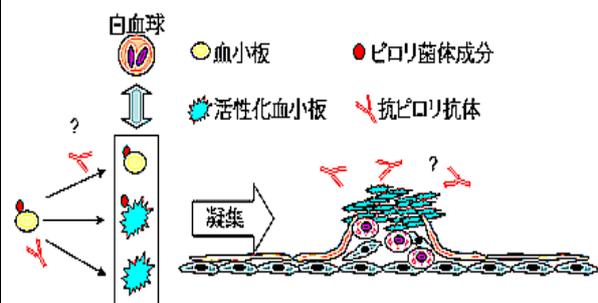


図6：ピロリ菌感染とACS病態発症仮説シエーマ

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 27 件)

- ① Takeuchi H, Sugiura T, 他 6 名 8 番目 Effect of *Helicobacter pylori* *cdra* on IL-8 secretions and NF- $\kappa$ B activation. World J. Gastroenterology 査読有、18:425-34. 2012
- ② Morishita K, Takeuchi H, Sugiura T, 他 7 名 10 番目 Superoxide dismutase (SOD) activity of *Helicobacter pylori* *per se* from 158 clinical isolates and the characteristics. Microbiol. Immunol. 査読有、in press 2012
- ③ Kudo H, Takeuchi H, Sugiura T, 他 2 名 4 番目 In vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese chive (*Allium tuberosum*). Food Science and technology research 査読有、17:505-13. 2011
- ④ Con SA, Takeuchi H, Sugiura T, 他 3 名 6 番目 Clinical relevance of *babA2*, and a recombinant gene between *babA2* and *babB* of *Helicobacter pylori*: Studies in Costa Rican and Japanese isolates. World J. Gastroenterology 査読有、16:474-8. 2010
- ⑤ Nishioka M, Takeuchi H, Kumon Y, Sugiura T, 他 4 名 8 番目 The mechanical binding strengths of *Helicobacter pylori* BabA and SabA adhesins using an adhesion binding assay-ELISA and its clinical relevance in Japan. Microbiol. Immunol. 査読有、54: 442-51. 2010
- ⑥ Trang VT, Takeuchi H, Sugiura T, 他 5 名 7 番目 Antimicrobial activity of aminoreductone against *Helicobacter pylori*. Journal of Agricultural and Food Chemistry/ Biochemistry 査読有、57: 11343-8. 2009
- ⑦ Zhang Y, Takeuchi H, M, Kumon Y, Sugiura T, 他 3 名 7 番目 Relationship of IL-8 production and the CagA status in AGS cells infected with *Helicobacter pylori* exposed to low-pH and activating transcription factor 3 (ATF3). Microbiol Res 査読有、164:180-90. 2009
- ⑧ Fujitaka K, Sugiura T, 他 7 名 3 番目 Combined analysis of multislice computed tomography coronary angiography and stress-rest myocardial perfusion imaging in detecting patients with significant proximal coronary artery stenosis. Nucl Med Commun 査読有、30:789-96. 2009
- ⑨ Yoshida S, Sugiura T, 他 8 名 3 番目 Factors associated with myocardial salvage immediately after emergent percutaneous coronary intervention in

patients with ST-elevation acute myocardial infarction. Annals of Nuclear Medicine INDEX 査読有、23:383-90. 2009

[学会発表] (計 84 件)

- ① Takeuchi H, Evaluation of Natural product, Refined Deep Seawater, for *Helicobacter pylori* colonization and intestinal flora condition, and its application. World Congress of Microbes-2011. 2011.7.31. Beijing International Convention Center China
- ② Kadota Y, Functional analysis of *mirC*, D and E genes of *Helicobacter pylori*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011.9.6-10. Sapporo convention center, Japan
- ③ 門田陽集、他 *Helicobacter pylori* の細胞分裂制御に関する Min システムの解析第 58 回日本臨床検査医学会学術集会岡山 2011.11.17-19. 岡山コンベンションセンター
- ④ Kawada M, In vivo effects of refined deep seawater (RDSW) against *Helicobacter pylori*. 110<sup>th</sup> ASM General Meeting 2010.5.23-28. Convention center San Diego, CA. USA
- ⑤ Morimoto N, Identification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein related to *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. 110<sup>th</sup> ASM General Meeting 2010.5.23-28. Convention center San Diego, CA. USA
- ⑥ 森本徳仁、他 *Helicobacter pylori* 膜蛋白と *H. pylori* 関連慢性特発性血小板減少性紫斑病との関連性第 15 回日本ヘリコバクター学会学術総会 2009.6.25-26. 東京サンピアタワー

[図書] (計 6 件)

- ① 編者：竹内啓晃、杉浦哲朗  
執筆：竹内啓晃、上原良雄、他 Pocket Handbook Atlas 二版 pp1-33. 2011

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉浦 哲朗 (SUGIURA TETURO)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：50171145

### (2) 研究分担者

高田 淳 (TAKATA JUN)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：90206748

公文 義雄 (KUMON YOSHITAKA)  
高知大学・教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号：40215033

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