

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08617

研究課題名(和文) 急性冠症候群におけるピロリ菌由来血小板活性化成分とマクロファージの関与

研究課題名(英文) Influence of the platelet-activating factor of *Helicobacter pylori* and macrophages in the development of acute coronary syndrome (ACS)

研究代表者

杉浦 哲朗 (SUGIURA, Tetsuro)

高知大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：50171145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の血小板活性化成分Ippを中心にピロリ感染と急性冠症候群との関連性を解析した。Ipp-His融合蛋白および抗Ipp抗体を作製した。急性冠症候群(ACS)の患者血清を抗Ipp抗体で解析した結果、2名のピロリ菌感染者に検出され、本成分の血中移行を証明した。本菌体成分の血小板結合・凝集能はIpp-His融合蛋白発現大腸菌と健常人の血小板を使用して確認に至った。さらに、1.5%塩添加培養条件での解析の結果、破壊株は野生株よりも高いviabilityを維持し、本菌体成分はピロリ菌の浸透圧ストレス(osmolarity shock)に重要な役割を担っていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between the platelet-activating factor (Ipp) of *H. pylori* and clinical pathology of acute coronary syndrome (ACS). We produced the Ipp-His fusion protein and anti-Ipp Ab. By western assay with anti-Ipp Ab and the sera from ACS patients with or without *H. pylori* infection, the Ipp was detected in only 2 infected but not in non-infected patients. These indicated that the Ipp was transmigrated into blood. Regarding the platelet aggregation induced by the Ipp, we confirmed the phenomenon using platelets from 3 healthy adults with or without *H. pylori* infection, demonstrating that the Ipp induced the platelet aggregation irrespective of *H. pylori* infection. Concerning the role of Ipp on the bacterial cells, the comparative analyses showed that the Ipp-disrupted strains constructed could survive longer time than wild strains in liquid culture at 1.5% NaCl concentration, indicating that the Ipp plays a critical role against to osmotic stress.

研究分野：循環器学

キーワード：急性冠症候群 ヘリコバクター・ピロリ 血小板結合・活性化 血小板凝集機序 ピロリ菌体成分 ストレス応答 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

ピロリ関連免疫性血小板減少症 (ITP) の病態解析から血小板凝集・活性化を誘導する菌体成分の存在を見出し同定 (菌体 lpp) した。本邦の死因上位に位置する急性冠症候群 (ACS) と推定約半数の国民が感染しているピロリ菌 (ピロリ感染症) との関連性は指摘されているが、未だ機序は不明である。

2. 研究の目的

そこで、「血小板凝集・活性化」が病態進展の基礎となっている ACS におけるピロリ感染の影響について研究を行なった。特に見出したピロリ菌成分 lpp を中心に ACS との関連性の解明を目的に本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 本遺伝子をクローニング後、ピロリ菌 lpp-His 融合蛋白とウサギ免疫による抗 lpp 抗体を作成した。融合蛋白は血小板凝集能を健常人血小板多血漿 (PRP) を使用し automatic platelet aggregometer および標本観察 (ギムザ染色) にて確認した。また、抗 lpp 抗体の特異性等は約 30 菌株を使用してウエスタンブロット法で確認した。

また、抗 lpp 抗体を用いて、計 100 名の ACS 患者血清 (ピロリ感染者と非感染者) にて本菌体成分の検出をウエスタンブロット解析にて実施した。(倫理委員会承認後)

(2) lpp-His 融合蛋白発現大腸菌 (BL21 大腸菌) を用いて 3 名の健常人 (ピロリ感染者と非感染者) から採取された血小板を使用して本菌体成分の血小板凝集能をさらに検証した (automatic platelet aggregometer 使用)。

(3) 本遺伝子破壊株を作成し、本菌体成分の菌体に及ぼす影響を種々の方法で解析した (経時培養、CFU、ウレアーゼ活性、形態、塩添加培養による osmolarity stress など)。

4. 研究成果

(1) 作成したピロリ菌 lpp-His 融合蛋白の血小板凝集能検証: automatic platelet aggregometer で lpp-His 融合蛋白による血小板凝集能および標本観察 (ギムザ染色) を行なった (Fig. 1)。その結果、lpp-His 融合蛋白は血小板凝集作用を有することが証明された。また、本蛋白を使用しウサギ免疫にて得られた抗 lpp 抗体の特異性を約 30 株で検証した結果、目的サイズの単一バンドが全株に認められ、その特異性が証明された。さらにピロリ菌の本成分保有率 (発現率) はほぼ 100% である可能性が強く示唆された。

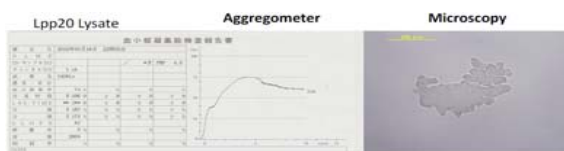


Fig. 1 融合蛋白による血小板凝集能解析 Aggregometer および顕微鏡所見から明らかに本融合蛋白が血小板凝集活性を有することを証明した。

また、抗 lpp 抗体を使用した ACS 患者血清 (ピロリ感染者と非感染者) とのウエスタンブロット解析より、感染者 2 名の血清中からのみ目的サイズのバンドが検出されたが、非感染者からは検出されなかった。以上より、本菌体成分が血中移行することを証明した。

(2) 本菌体成分の血小板凝集能をさらに確認するため、lpp-His 融合蛋白発現大腸菌を用いて 3 名の健常人 (ピロリ感染者と非感染者) から得た血小板にて解析した (Fig. 2)。その結果、ピロリ感染に関係なく 3 名とも明らかな血小板凝集を認めた (血小板凝集に程度の差は認める)。非感染者の血小板でも凝集が誘発される事は新たな知見であり、極めて興味深い成果である。

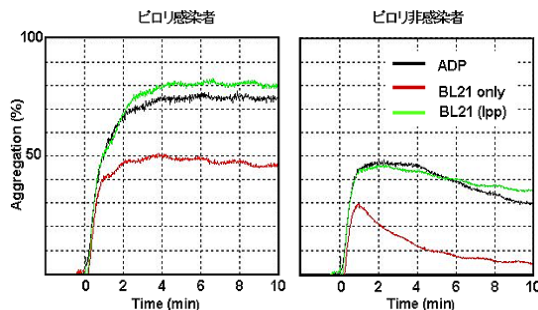


Fig. 2 誘導発現大腸菌 (lpp-His 融合蛋白) による血小板凝集能 mock 大腸菌よりも遥かに強い血小板凝集を共に認める。感染者では血小板刺激物質 ADP (アデノシン二リン酸、positive control) 以上の凝集を認め、非感染でも ADP 同等の凝集を示した。ピロリ感染者 (左) と非感染者 (右)

(3) 本遺伝子がピロリ菌体に及ぼす影響を野生株 (HPK5 と 26695) およびその遺伝子破壊株を使用して比較解析を行なった。形態、ウレアーゼ活性、通常の培養による CFU には 2 株とも有意な差を認めなかった。一方で 1.5% 塩添加培養では、培養 24 時間後には両野生株は伸長化し分裂不完全な形態に変化するが、両遺伝子破壊株は桿菌状を維持するものが多く認められた (Fig. 3)。さらに、その結果を支持するかのよう

CFU も両野生株は著しく低下したが、両遺伝子破壊株ではその低下する程度は野生株と比較して有意に軽度であった (Fig. 4)。以上より、少なくとも本菌体成分はピロリ菌の osmorality stress に深く関与することが明らかとなった。

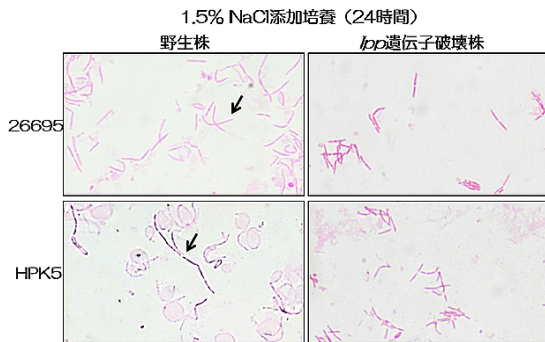


Fig. 3 1.5%塩添加培養での形態観察 (24時間)  
グラム染色による形態観察。両野生株とも伸長化 (矢印) しているが、両遺伝子破壊株は桿菌状を呈するものが多い。

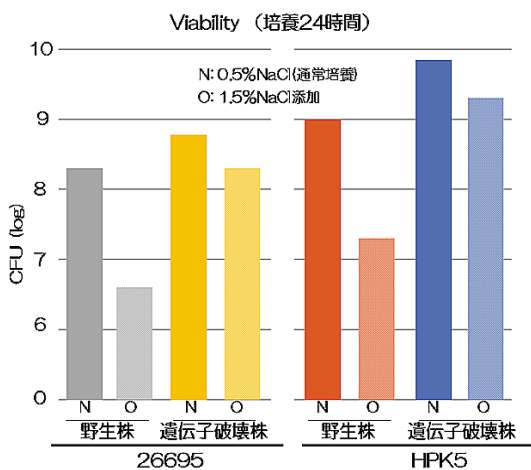


Fig. 4 培養 24 時間後の viability  
両野生株とも 1.5%塩添加培養では著しい CFU の低下を認める。一方、両遺伝子破壊株も CFU の低下は認めるが、明らかに野生株よりもその低下率は減少しており、塩耐性を示す傾向を認めた。  
N: 通常培養 (0.5%NaCl)、O: 1.5%塩添加培養

さらに、本菌体成分による血小板凝集は抗凝固剤を使用した解析結果で、クエン酸ナトリウムおよびヘパリンでは影響を認めなかった。しかし、EDTA2K および EDTA2Na では血小板凝集を抑制した。EDTA やクエン酸ナトリウムはカルシウムイオンのキレート作用で抗凝固作用を発揮していると考え、本菌体成分による血小板凝集機序はこのキレート作用を阻害し血小板凝集を誘導している可能性が示唆された。ただしこのカルシウムイオンキレート阻害

作用は EDTA よりも弱くクエン酸ナトリウムも強いと考えられ親和性が影響していると推察された。

## 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 12 件)

- ① Takeuchi H, Kira M, Konishi S, Uchiyama J, Matsuzaki S, Matsumura Y. Polymorphisms in the *Helicobacter pylori* NY43 strain and its prophage-cured derivatives. Microbiology. 査読有、In press 2018.  
DOI: 10.1099/mic.0.000665.
- ② Takeuchi H, Ishizuka S, Higuchi K, Yoshikane Y, Takagi R, Takenaka K, Matsumura Y. An improvement of the human gut ecosystem by drinking refined-deep-seawater (RDSW). J Food Process Technol. 査読有、9:81 2018.  
DOI:10.4172/2157-7110-C1-078
- ③ 森本徳仁、竹内啓晃、西田愛恵、森本みゆき、上岡彩椰、森田珠恵、小倉克巳、杉浦哲朗、松村敬久. *Helicobacter pylori* 関連免疫性血小板減少症における *H. pylori* 外膜蛋白を用いた検査法の開発. 臨床病理 査読有、65(11):1169-1176 2017.
- ④ 竹内啓晃、松村敬久. 調製海洋深層水飲用による生体効果. 海洋深層水研究. 査読有、17(1):17-22. 2016.
- ⑤ 内山淳平、竹内啓晃、平山隆一郎、島倉秀勝、阪口雅弘、松崎茂展. *Helicobacter pylori* フェージとそのゲノム. *Helicobacter Research* 先端医学社. 査読無、20(5):50(470)-54(474) 2016.
- ⑥ Sugiura T, Okumiya T, Kubo T, Takeuchi H, Matsumura Y. Evaluation of Intravascular Hemolysis with erythrocyte creatine in patients with aortic stenosis. International Heart Journal. 査読有、57(4):430-433. 2016.  
DOI: 10.1536/ihj.15-433.
- ⑦ Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Takeuchi H, Sakaguchi Y, Ujihara T, Daibata M, Shimakura H, Okamoto N, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Screening of KHP30-like prophages among Japanese *Helicobacter pylori* strains, and genetic analysis of a defective KHP30-like prophage sequence

integrated in the genome of the *H. pylori* strain NY40. FEMS Microbiology Lett. 査読有、363(16) 2016. DOI: 10.1093/femsle/fnw157

- ⑧ Matsumura Y, Wada M, Hirakawa D, Yasuoka Y, Morimoto N, Takeuchi H, Kitaoka H, Orihashi K, Sugiura T. Clinical utility of transthoracic echocardiography for screening abdominal aortic aneurysm: A prospective study in a Japanese population. Cardiovasc Ultrasound. Feb 12, 査読有、14(8) 2016. DOI: 10.1186/s12947-016-0051-x
- ⑨ Nishida Y, Takeuchi H, Morimoto N, Umeda A, Kadota Y, Kira M, Okazaki A, Matsumura Y, Sugiura T. Intrinsic characteristics of Min proteins on the cell division of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett. [Epub ahead of print] 査読有、363(6) 2016. DOI: 10.1093/femsle/fnw025
- ⑩ Nishida Y, Morimoto N, Korenaga M, Komatsu Y, Takeuchi H, Matsumura Y, Sugiura T. Genotyping *Giardia intestinalis* using DNA extracted from long-term-preserved human specimens stained with chlorazol black E. Jpn J Infect Dis. [pub ahead of print] 査読有、Aug 7. 2015. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2014.543

[学会発表] (計 51 件) 招待講演 4 件、WS/シンポジウム 3 件、受賞 2 件含む

[国際学会]

- ① Takeuchi H, Ishizuka S, Higuchi K, Yoshikane Y, Takagi R, Takenaka K, Matsumura Y. An improvement of the human gut ecosystem by drinking refined-deep-seawater (RDSW). 21<sup>st</sup> Euro-Global Summit on Food and Beverages. 3.7-10 2018 Berlin (Germany) (招待講演)
- ② Takeuchi H. 深層水飲水による腸内環境改善効果 = 臨床試験成績 = The Founding Conference for the Taiwan Deep Sea Water Industry Consortium and 2017 Deep Sea Water International Seminar. 10.30-31 2017 台湾大学 (台湾) (招待特別講演)
- ③ Takeuchi H, Ishizuka S, Higuchi K, Takagi R, Takenaka K, Matsumura Y. The effects of drinking refined-deep-seawater (RDSW) on the human body. 16<sup>th</sup>

Euro-Global Summit on Food and Beverages. 3.2-4 2017. Amsterdam (Netherlands) (Best Poster Award 受賞)

- ④ Yano Y, Mizuta H, Kira M, Matsumura Y, Kitagawa T, Hashiba M, Okamoto N, Takeuchi H, Ono M, Saibara T. Potassium-competitive acid blocker-based third-line triple therapy in *Helicobacter pylori* eradication and study of the diversity of antimicrobial susceptibilities. The 24th United European Gastroenterology Week, Gastroenterology conference. 10.15-19 2016 Vienna (Austria)
- ⑤ Nishida Y, Takeuchi H, Morimoto N, Kira M, Okazaki A, Matsumura Y, Sugiura T. Intrinsic Role of *Helicobacter pylori* Min Proteins. ASM Microbe 6.16-20 2016 Boston (USA)
- ⑥ 竹内啓晃 海洋深層水による生体効果の検証 = がん細胞の増殖抑制効果について = 台湾深層海洋水資源利用学会 2015 大会 10.29-30 2015 台湾大学 (台湾) (招待講演)
- ⑦ Nishida Y, Kira M, Morimoto N, Matsumura Y, Sugiura T, Takeuchi H. The molecular insights into *Helicobacter pylori* Min and FtsZ proteins. 115<sup>th</sup> ASM General Meeting. 5.29-6.2 2015 LA (USA)

[国内学会]

- ⑧ 竹内啓晃. 海洋深層水の飲用による健康増進効果 = 腸内フローラへの影響 = 日本海水学会西日本支部秋季講演会. 11.30 2017 かるぼーと高知 (招聘講演)
- ⑨ 竹内啓晃、上岡樹生、杉浦哲朗、松村敬久. 調整海洋深層水飲料と腸内環境 *Helicobacter pylori* Prophage (KHP30) の宿主細菌 (NY43) に及ぼす影響. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会. 11.16-19 2017 国立京都国際会館
- ⑩ 竹内啓晃、石塚悟史、吉金優、樋口慶郎、松村敬久、竹中幸市. 調整海洋深層水飲料と腸内環境 = 高知県産学官民連携 project = 第 21 回海洋深層水利用学会. 10.12-13 2017 北海道羅臼公民館
- ⑪ 矢野有佳里、津田尚子、北川達也、羽柴基、吉良瑞喜、水田洋、竹内啓晃、小野正文、松村敬久、西原利治. 薬剤感受性の検討からみた *H. pylori* の多様性について. 第 25 回消化器関連学会週間. 10.12-15 2017 福岡国際センター (ポスター優秀演題受賞)

- ⑫ 矢野有佳里、津田尚子、北川達也、羽柴基、吉良瑞喜、水田洋、岡本宣人、竹内啓晃、小野正文、松村敬久、西原利治. Diversity of antimicrobial susceptibility of *H. pylori* in individual patients. 第 23 回日本ヘリコバクター学会学術集会. 6. 30-7. 2 2017 函館アリーナ (WS 発表)
- ⑬ 吉良瑞喜、岡崎亜美、森本徳仁、上岡樹生、松村敬久、杉浦哲朗、竹内啓晃. 同一患者における *Helicobacter pylori* の生化学的および遺伝子多様性の検討. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会. 9. 1-4 2016 神戸国際会議場 (座長推薦論文投稿受ける)
- ⑭ 竹内啓晃、西田愛恵、吉良瑞喜、岡崎亜美、森本徳仁、松村敬久. ヘリコバクターピロリ Min 蛋白の細胞分裂における固有特性. 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会. 6. 24-26 2016 別府ビーコンプラザ
- ⑮ 内山淳平、内山 (竹村) 伊代、阪口義彦、竹内啓晃、阪口雅弘、松崎茂展. 活性型ピロリ菌フェージ KHP30 の特徴付けとその潜伏感染性の解析. 第 89 回日本細菌学会総会. 3. 26-28 2016 大阪国際交流センター (WS 発表)
- ⑯ 岡崎亜美、竹内啓晃、吉良瑞喜、森本徳仁、松村敬久、杉浦哲朗. *omp* 遺伝子が *Helicobacter pylori* の生物学的機能に与える影響の解析. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 11. 19-22 2015 長良川国際会場
- ⑰ 吉良瑞喜、岡崎亜美、森本徳仁、松村敬久、杉浦哲朗、竹内啓晃. 同一胃内から分離された *Helicobacter pylori* の genetic diversity の検討. 第 47 回日本臨床検査自動化学会. 10. 8-10 2015 パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉浦 哲朗 (SUGIURA Tetsuro)  
高知大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：50171145

### (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

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

松村 敬久 (MATSUMURA, Yoshihisa)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：10274391

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