

平成 22 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790415
 研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ関連特発性血小板減少性紫斑病発症メカニズムの
 解明
 研究課題名(英文)Elucidate the pathogenic mechanism of *Helicobacter pylori*-
 associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura
 研究代表者
 森本 徳仁 (NORIHITO MORIMOTO)
 高知大学・医学部附属病院・臨床検査技師
 研究者番号：60398055

研究成果の概要(和文)：*Helicobacter pylori* 関連慢性特発性血小板減少性紫斑病(以下 *H. pylori* 関連 cITP)発症に関与していると考えられる *H. pylori* 17 kDa 蛋白の同定を試みた。種々の解析から、*H. pylori* 菌体膜蛋白 (Outer membrane protein :OMP) の一つが同定された。ラットを免疫して得られた OMP に対するポリクローナル抗体は、数種の *H. pylori* 株と高感度かつ特異的に反応性を有し、さらに免疫沈降法による解析結果では、OMP が血小板と結合することも確認した。

研究成果の概要(英文)：We reported the possibility that the immunocomplex consisting of bacterial 17-kDa protein, platelet and anti-*H. pylori* antibodies were involved in development of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (cITP). The *H. pylori* outer membrane protein (OMP) was identified among 11 candidates as one of bacterial factors involved in development of *H. pylori* - associated cITP. The recombinant fusion protein (rOMP) prepared was immunized with a rabbit to obtain polyclonal antibody. The specificity of the antibody was confirmed and this antibody could detect the OMP among individual *H. pylori* strains. The OMP was identified as one of the 17-kDa proteins of *H. pylori*, which binds to platelet, leading to aggregation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病体検査学

キーワード：*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)、慢性特発性血小板減少性紫斑病 (cITP)、血小板低分子蛋白、免疫複合体、菌体膜蛋白 (OMP)

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (以下 *H. pylori*) 感染は、慢性胃炎、胃癌、胃潰瘍および胃 MALT リンパ腫など多くの消化器疾患に関与している。また、消化器以外の病変と *H. pylori*

との関係が話題となっており、本菌と自己免疫疾患との関連性も報告されている。そのうち慢性特発性血小板減少性紫斑病 (cITP) は抗血小板抗体 (platelet associated IgG (以下 PA-IgG)) の出現を特徴とする、免疫学

的機序により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、*H. pylori* 感染は本疾患の注目すべき発症因子として解析され始めている。ITP の治療を目的とした *H. pylori* 除菌療法はすでに臨床でも認知されており、ITP に対する高い有効率も報告されている。しかしながら、*H. pylori* 感染と cITP 発症との関連性はほとんど解明されていない。これまでに *H. pylori* 感染を伴う cITP (以下 *H. pylori* 関連 cITP) 患者血中の PA-IgG の動態は、除菌後早期に血小板数が回復する群 (以下 CR 群) では低く、さらに除菌により有意に低下するが、除菌後も血小板数が回復しない群 (以下 NR 群) では高値でかつ除菌後も低下していない。また、*H. pylori* の有する毒素関連蛋白 (CagA) に対する抗体が血小板と結合することが報告されており (Takahashi, T. *et al*, 2004. Br. J. Haematol. 124: 91-96)、本菌関連 ITP の発症機序として、抗血小板抗体の直接の作用よりも *H. pylori* 感染により産生された抗体が血小板に交差反応する可能性が高いものと考えられている。しかしながら、除菌成功にもかかわらず非奏効例が存在することや、抗体は 1 ヶ月以上持続するにもかかわらず、CR 群では除菌後 1-2 週間後から血小板数が回復する現象 (臨床経過) は明らかに矛盾している。すなわち、現在有力な菌体抗原に対する抗体が血小板と交差反応する説 (抗 *H. pylori* 抗体の交差反応説) や本菌感染による免疫不均衡から抗血小板抗体が産生される説 (抗血小板抗体誘導説) では *H. pylori* 関連 ITP 発症機序を説明できないのが現状である。

そこで、我々は新たな仮説を提唱し研究を遂行している。それは、菌体抗原が血小板と結合し複合体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誘導される血小板破壊 (抗原複合体説) である。すでに、この仮説に基づいて研究を行っており、これまでに 17, 27 および 36 kDa の *H. pylori* 低分子蛋白に対する反応性 (抗体) が CR 群患者で多く認められ、さらに 17 kDa *H. pylori* 低分子蛋白が血小板に結合することを確認している (Morimoto, N. *et al*, 2007. Scand J Infect Dis. 39:409-416)。すでに *H. pylori* がヒト血小板凝集に関与することを確認したが、少なくとも *H. pylori* 蛋白のうち CagA、VacA などの主要な *H. pylori* 蛋白は血小板凝集に関与していなかった。すなわち、未知な菌体蛋白の存在が血小板凝集に関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

申請者らが明らかにした種々の *H. pylori* 低分子蛋白が血小板凝集に関与している可能性が高く、これらの蛋白を含めた *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の解析を進める。また、*H. pylori* と血小板凝集に関与する宿主 (ヒト) 側の血小板凝集惹起物質や血小板表在因子の解析も行う。我々が提唱する抗原複合体説に立脚して *H. pylori* 関連 ITP の発症病態・機序を解明する事を目的として、これまで明らかにした *H. pylori* 低分子蛋白の同定および機能を解析し、効率のよい治療 (除菌前の治療効果予測) および患者 QOL の改善を視野に本研究を遂行する。

3. 研究の方法

1) 2D-PAGE による *H. pylori* 17 kDa 低分子蛋白の分離およびプロテオミクス解析

H. pylori 26695 株のライセートを 2D-PAGE にて分離し、それぞれ Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色およびメンブレンへブロットイングし、*H. pylori* 関連 cITP の CR 群患者血清を用いてイムノプロットを行った。イムノプロットにて 17 kDa 付近に反応性を認めた CBB 染色ゲルのスポット (蛋白) を採取し、LC-MS/MS 解析を行った (図 1)。さらに、LC-MS/MS 解析より得られたスペクトルをデータベース検索 (Mascot 検索) することにより *H. pylori* 17 kDa の候補蛋白を検索した。各候補遺伝子をクローニング後、発現プラスミドを使用して、His-Tag 融合リコンビナント蛋白 (以下、リコンビナント蛋白) を作製した。

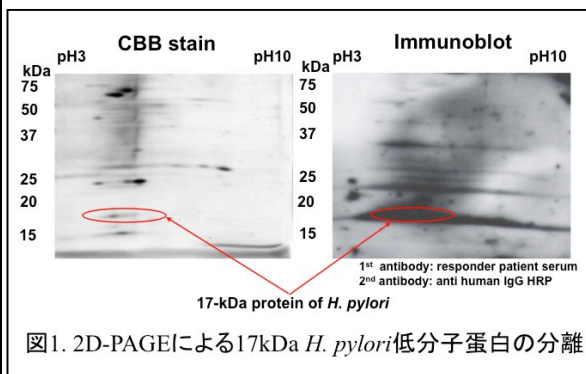


図1. 2D-PAGEによる17kDa *H. pylori*低分子蛋白の分離

2) リコンビナント蛋白に対する患者血清の反応性

17kDa *H. pylori* 低分子蛋白の候補蛋白として得られたリコンビナント蛋白と ITP 患者血清 (*H. pylori* 陰性群、*H. pylori* 陽性群 (CR 群および NR 群)) によるイムノプロットを実施し、各蛋白に対する反応性を解析した。

3) *H. pylori* 菌体膜蛋白による血小板凝集試験

上述したイムノプロット解析により同定された *H. pylori* 菌体膜蛋白 (以下 rOMP) を用いて血小板凝集試験を行った。また、比較対象に *H. pylori* Biosynthesis protein の

リコンビナント蛋白を用いた。健常人より得られた血小板多血漿(以下 PRP)に rOMP を添加し、惹起される血小板凝集を血小板凝集測定装置にて経時的に測定した。また、PRP に rOMP を添加し洗浄後、FITC ラベルした抗 His 抗体を反応させ血小板への rOMP の結合を蛍光顕微鏡にて観察した。

4) rOMP に対するポリクローナル抗体の作成

rOMP に対するポリクローナル抗体(rOMP-Ab)は、rOMP を抗原としてラットに接種して作成した。

5) *H. pylori* 株における rOMP 陽性率

H. pylori 標準株(26695, 11637, SS-1, J99)、臨床分離株(3411, KMT114, KMT130, NY31, HPK5)および HPK5 の *cdrA* 遺伝子欠損株の合計 10 株の *H. pylori* 株の rOMP 保有率を調査した。各菌株のライセートを抗原としたイムノブロットにて反応性を確認した。

6) 血小板と rOMP との結合性試験

rOMP の血小板との結合試験を免疫沈降法(IP)にて解析した。まず、rOMP と血小板を 37°C で 15 分間反応させた後 PBS で洗浄後、抗ヒト血小板抗体で 4°C で 2 時間 IP を行った。さらにプロテイン G ビーズにて複合体を精製した。精製して得られた複合体(rOMP-血小板-抗ヒト血小板抗体)を SDS-PAGE にて分離後、メンブレンに転写した後、rOMP 抗体でイムノブロットを行った。

また、rOMP の血小板との結合部位を推測するため、rOMP の C 末端側と N 末端側のリコンビナント蛋白を作成し、上述した方法にて検出を試みた。

4. 研究成果

1) *H. pylori* 17 kDa 低分子蛋白の候補蛋白

LC-MS/MS により得られたデータのマスコット検索により *H. pylori* 17 kDa 低分子蛋白として推測される 11 個の候補蛋白がヒットした(表 1)。これらの 11 個のリコンビナ

Protein	Number of positive reaction	
	Responder (n=3)	Non-Responder (n=3)
1. Ribosomal protein 1	0	0
2. Enzyme 1	2	2
3. Ribosomal protein 2	0	0
4. Peroxidase associated protein	0	0
5. Cytokine induced protein	1	2
6. Enzyme 2	2	2
7. Biosynthesis protein	0	0
8. Outer membrane protein (OMP)	3	1
9. Cytotoxin associated protein	0	0
10. Ribosomal protein 3	1	1
11. Enzyme 3	1	1

ント蛋白に対する患者血清の反応性をイムノブロットで解析した結果から *H. pylori* 膜蛋白の一つ(以下 OMP)が同定された。OMP のリコンビナント蛋白(rOMP)に対する cITP 患者血清との反応性は HP-N 群で 0% (0/2) および NR 群で 40.0%(2/5)に対し CR 群では 71.4% (5/7) と、CR 群で有意に高い反応性が認められた(図 2)。

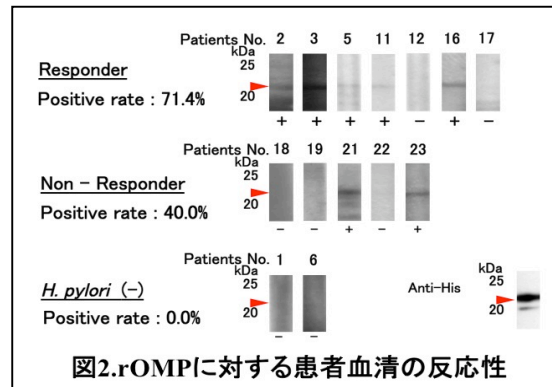


図 2. rOMP に対する患者血清の反応性

2) rOMP による血小板凝集試験

rOMP による血小板凝集能を解析した結果、rOMP に強い血小板凝集能を有することを確認した。一方、Biosynthesis protein のリコンビナント蛋白による血小板凝集は確認されなかった。また、FITC ラベルした抗 His 抗体を用いて蛍光顕微鏡により観察した結果、rOMP を添加した血小板では、凝集した血小板表面に rOMP が明らかに存在していることを確認した。一方、Biosynthesis protein のリコンビナント蛋白を使用した場合、血小板凝集および血小板との結合は認められなかった(図 3)。

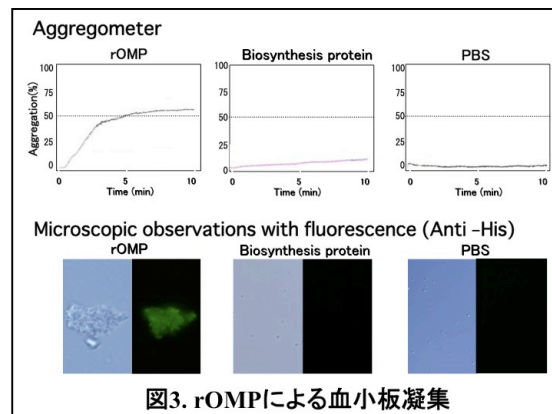
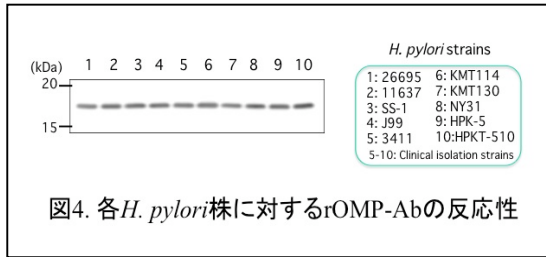


図 3. rOMP による血小板凝集

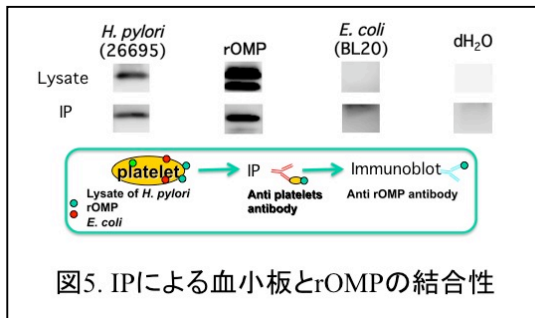
3) rOMP-Ab による *H. pylori* OMP の検出

10 株の *H. pylori* ライセートに対する rOMP-Ab の反応性をイムノブロットにて解析した結果、すべての株に対して十分な特異性と感度を有することを確認した(図 4)。



4) rOMP の血小板との結合

IP の結果を図 5 に示す。*H. pylori* 26695 および rOMP のライゼートを rOMP-Ab でイムノプロットを行った結果、17kDa 付近にバンドが認められた。同様に、これらのライゼートを抗血小板抗体で IP したのち、rOMP-Ab でイムノプロットを行った場合においても同様にバンドが認められたことから、血小板に rOMP が結合することが確認された。また、rOMP の N 末および C 端側との反応性を検討した結果、N 末端側を用いて作成した rOMP のみ IP にてバンドが検出された。



本研究結果から、*H. pylori* 関連 cITP 発症機序の一つとして、今回同定された *H. pylori* 膜蛋白 (OMP) の一つが血小板と結合し複合体を形成し、最終的に抗 *H. pylori* 抗体の結合を介して誘導される可能性が示唆された。

H. pylori の除菌不成功例にも一時的な血小板数増加が認められたことが報告されており (Fujinura, K. *et al.*, 2005. *Int. J. Hematol.* 81: 162-168)、除菌により完全除菌ができなくても菌量の減少、すなわち抗原量の低下により奏功する可能性がある。このことは我々の仮説である抗原複合体説を強く支持するものである。

H. pylori 感染後、本蛋白がどのようなメカニズムによって血中あるいは組織に侵入しているかは今後の研究の課題である。また、OMP が多くの *H. pylori* 株で発現していたことから、本疾患の発症において本抗原と反応する生体側の免疫機構なども本疾患発症において重要な因子であると考えられる。現在 *H. pylori* を感染させたマウスの生体からの OMP の検出および免疫反応に関する検討を行っている。

H. pylori 関連 cITP に関与する *H. pylori*

蛋白の同定を試み、*H. pylori* 膜蛋白 (OMP) の一つを同定した。OMP に対する特異的な抗体を作成できたことから、本蛋白が血小板に結合することを確認できた。今後は生体内での検証を進めるとともに、本蛋白の機能解析および結合する血小板のリガンドの検索を進め *H. pylori* 関連 cITP 発症メカニズムの解明に寄与したいと考えている。

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 2 件)

- ① 森本徳仁、竹内啓晃、公文義雄、杉浦哲朗、*Helicobacter pylori* 膜蛋白と *H. pylori* 関連特発性血小板減少性紫斑病との関連性、日本ヘリコバクター学会誌、査読無、Vol. 11, No. 2, 2010、49-52
- ② Con SA, Takeuchi H, Nishioka M, Morimoto N, Sugiura T, Yasuda N, Con-Wong R, Clinical relevance of *Helicobacter pylori* babA2 and babA2/B in Costa Rica and Japan, *World J Gastroenterol*、査読有、Vol. 16, No. 4, 2010、474-478

[学会発表] (計 4 件)

- ① 森本徳仁、Identification of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein Related to *H. pylori* - associated Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura、American Society for Microbiology (ASM) 110th General Meeting、2010 年 5 月 24 日、San Diego Convention Center (San Diego, California, USA)
- ② 森本徳仁、*Helicobacter pylori* 膜蛋白と *H. pylori* 関連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、2009 年 6 月 25 日、東京ステーションコンファレンス (東京)
- ③ 森本徳仁、血小板結合性を有する *Helicobacter pylori* 低分子蛋白と *H. pylori* 関連特発性血小板減少性紫斑病との関連性、第 82 回日本細菌学会総会、平成 21 年 3 月 13 日、名古屋国際会議場 (名古屋)
- ④ 森本徳仁、ヘリコバクター・ピロリ関連特発性血小板減少性紫斑病に関与する菌体蛋白の同定と解析、第 55 回日本臨床検査医学会、平成 20 年 11 月 28 日、名古屋国際会議場 (名古屋)

[その他]

- ① 森本徳仁、第 15 回日本ヘリコバクター学会、上原 *H. pylori* 賞 優秀賞受賞

2009.

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