

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591378

研究課題名(和文)ピロリ菌惹起ITPにおける外毒素VacAと血小板マルチメリンの役割

研究課題名(英文)The role of multimerin1 and VacA, an exotoxin released by H. pylori on ITP.

研究代表者

尾崎 由基男(OZAKI, Yukio)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30134539

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 (HP)感染のある特発性血小板減少性紫斑病(ITP)ではHP除菌療法により血小板数が回復することが知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究により、HP産生毒素の一つであるVacAとマルチメリン1が結合することを見出した。マルチメリン1は血小板顆粒中に存在する高分子タンパクで、血小板活性化に伴って細胞外に放出されて血小板膜表面に結合する。この膜表面のマルチメリン1にVacAが結合して血小板を活性化させて消費性、あるいはVacA-マルチメリン1複合体に対する自己抗体の産生により、血小板減少をきたすメカニズムが存在するのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Platelets were activated under the infection with H. pylori in human and mice. We investigated the role of VacA, an exotoxin released by H. pylori in this context. Acid-activated VacA, but not heated VacA, induced platelet CD62P expression. However, VacA reacted with none of the alleged VacA receptors present on platelet membranes. We therefore analyzed VacA associated proteins obtained through VacA affinity chromatography, using MALDI-TOF-MS. Multimerin1 was detected in two consecutive experiments, as the binding protein for VacA. Plasmon resonance confirmed their binding, and dot print analysis revealed that the peptide sequence AA 321-340 of multimerin 1 is the binding site for VacA. In conclusion, we propose a new interaction between multimerin1 and VacA, which may give another insight into H. pylori-induced platelet activations under H. pylori infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：VacA Helicobacter pylori 特発性血小板減少性紫斑病 multimerin1 platelet 血液内科学

1. 研究開始当初の背景

HP 感染が血小板減少を引き起こすメカニズムについては、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者の血小板結合抗体 PAIgG の中に HP 由来毒素 CagA を認識する抗体の存在が報告され、免疫学的機序により血小板減少が起きていると推察されている。しかし、除菌前に抗 CagA 抗体陰性でも除菌後に血小板増加を認める症例があることから、血小板減少の原因として CagA 以外のメカニズムの存在が推定されていた。

HP を感染させたマウスでは流血中での血小板凝集塊の生成や、血小板活性化マーカーである CD62P の発現が増加することが知られているが、HP による血小板の活性化メカニズムは未だ解明されていない。これまでに広く研究されてきた CagA は内毒素であり、CagA が直接血小板に作用することは期待できないと我々は考え、HP 由来外毒素である VacA のヒト血小板に対する影響を評価したところ、CD62P の発現増加が認められたため、血小板活性化に VacA が関与していると考えた。VacA の受容体として RPTP が知られているが、この受容体が血小板に発現していることを確認したので、抗 VacA 抗体あるいは抗 RPTP 抗体を用いて両蛋白の結合性を検索したが、共沈は認められなかった。また、RPTP の下流に存在する信号伝達分子 Git1 のチロシンリン酸化が VacA 刺激により認められなかったことから、血小板には RPTP 以外の VacA 受容体が存在するとの結論に至った。

2. 研究の目的

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) において *Helicobacter pylori* (以下 HP) 陽性例が多く、HP 除菌療法により血小板数が回復することが示され、現在では HP 除菌療法は保険適応をうける標準治療となっている。しかし、HP 感染が ITP を引き起こす機序はまだ解明されていない。

我々は以前 HP 由来外毒素である VacA (vacuolating cytotoxin A) が血小板に結合し、血小板を活性化することを見いだした。そこで血小板のどの蛋白と VacA が反応するのかを TOF-Mass 等の手法を用いて解析し、最近 VacA が認識する蛋白が高分子蛋白マルチメリン (multimerin1; MMRN1) であることを見いだした。今回の研究では、VacA と MMRN1 の結合を種々の方法で証明し、VacA の結合部位などを同定する。そのために、免疫沈降、表面プラズモン共鳴を原理とするピアコアシステム、Dot-blot 法などで VacA との結合を確認する。

MMRN1 と VacA の結合がなぜ血小板減

少を引き起こすかを、a) MMRN1 と結合する凝固第 V 因子活性化、b) MMRN1 と VacA 結合により MMRN1 の新たなエピトープが出現することによる抗体産生の 2 つの仮説より検証する。

3. 研究の方法

(1) VacA の精製

VacA 産生株 ATCC49503 の培養上清に対して硫酸沈殿および抗 VacA 抗体固相化カラムを用いて精製した。一部は 95 °C で 10 分間加熱して不活化させた (H-VacA)。

(2) VacA 結合タンパクの分離・精製

VacA を CNBr-活性化ビーズに固相化し、表面タンパクをビオチンで標識した血小板可溶性試料と混合してビーズに結合してきたタンパク質を SDS-PAGE で分離し、ペルオキシダーゼ標識アビジンで検出した。陰性コントロールとしてグリシンを固相化した CNBr-活性化ビーズを用いた。分離されたタンパクは MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリンティング法によりタンパク質を同定した。

(3) ピアコアシステム

MMRN1-GST 融合タンパクを定法に従い CM5 チップに固相化した。3.1~1000nM の VacA を注入して結合活性を測定した。再生は NaOH を用いておこなった。

(4) Dot-blot

以下のペプチドを合成し、12.5nmol を PVDF 膜に塗布して乾燥させた。

- a: IHTNQAESHTAVGRGVAEQQ (291-310)
- b: VAEQQQQQCGDPEVMQKMT (306-325)
- c: MQKMTDQVNYQAMKLTLLQK (321-340)
- d: TLLQKKIDNISLTVNDVRNT (336-355)
- e: DVRNTYSSLEGKVSSEDKSRE (351-370)
- f: DKSREFQSLKGLKSKSINV (366-385)
- g: KSINVLIRDI (381-390)

PVDF 膜を BSA でブロッキングした後、VacA あるいは H-VacA を反応させ、続いて抗 VacA ポリクローナル抗体を反応させた。抗体の結合を HRP 標識-抗ウサギ抗体ならびに ECL 試薬により検出した。

4. 研究成果

VacA を共有結合させた CNBr ビーズと血小板可溶性試料を混合し、免疫沈降の原理で VacA 結合タンパクを精製し、SDS-PAGE にて分離した。その結果、40kDa、50kDa、55kDa、80kDa、120kDa、175kDa のタンパクが VacA 結合タンパクとして精製された (図 1)。これらのタンパクを PVDF 膜から切り出して、MALDI-TOF-MS により解析したところ、175kDa のバンドから multimerin1 (MMRN1) が同定された。

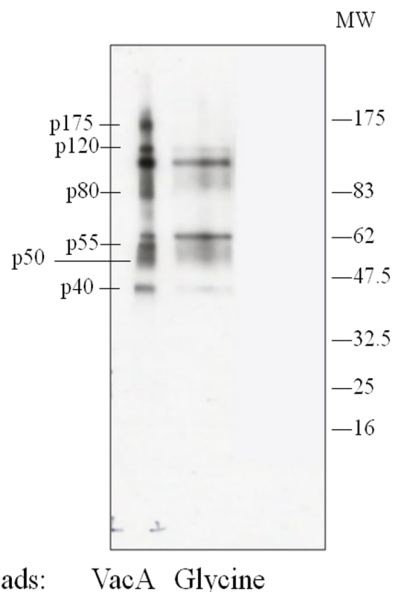


図 1 . VacA 結合タンパクの精製・分離 .

MMRN1 は血管内皮細胞、巨核球、血小板の顆粒に含まれる 1228 アミノ酸からなる糖蛋白であり、その機能は不明な部分が多い。そこで、MMRN1 の 291 ~ 391 アミノ酸に相当する領域の GST 融合タンパクをチップ上に固相化し、ピアコアシシステムにより VacA との結合性を解析した。その結果、VacA は濃度依存的に MMRN1-GST 融合タンパクに結合し(図 2) 解離定数は $3.3 \times 10^{-8} \text{M}$ であった。この解離定数は抗原抗体反応と同程度であった。

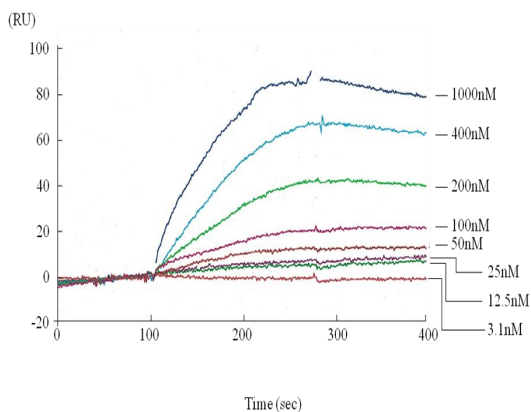


図 2 . ピアコアシシステムによる VacA と MMRN1-GST 融合タンパクとの結合曲線 .

VacA に対する MMRN1 の結合が 291 ~ 391 アミノ酸の領域に存在することが示唆されたのでこの領域に相当するペプチドを合成して、さらに結合領域の同定をおこなった。7 種類のペプチドを PVDF 膜に塗布して Dot-blot をおこなった。その結果、VacA はペプチド c に対して最も強く結合したことから 321 ~ 340 アミノ酸に相当する領域と結合すると考えられた(図 3)。

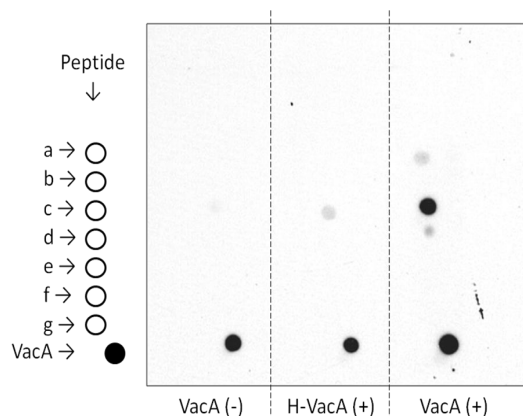


図 3 . Dot-blot 法による MMRN1 ペプチドと VacA との結合 .

これまでの結果、免疫沈降法、ピアコアシシステム、Dot-blot と異なる原理の解析法を用いたが、いずれも VacA と MMRN1 との結合を支持する結果となり、両タンパクの結合活性は存在すると確定できた。

VacA が血小板膜上の MMRN1 と反応することにより、MMRN1 の構造変化、血小板との更なる結合、血小板活性化による MMRN1 の顆粒からの放出、というポジティブフィードバックを起こして、最終的には末梢血液中の血小板減少、ITP の病態を起こす、との仮説を検証するために、MMRN1 のリコンビナント蛋白を合成し、VacA と反応させたあとに、血小板に振りかけて血小板の活性化を起こさせ、また、活性化 MMRN1 と反応する血小板膜上の受容体タンパクの同定をおこなうことを目的に、MMRN1 の全長融合タンパクの合成をおこなってきた。しかし、複数の発現系を試みたが、全長 MMRN1 を作成することができなかった。また、MMRN1 の全長タンパクは世界でもカナダの 1 グループが作成してるのみで、他の施設からの報告はないことから作成が容易でないことが推測された。そこで、カナダのグループに全長タンパクの提供を打診したが、受け入れてもらえず、現在のところ、全長タンパクを利用した実験を実施するに至っていない。今後も全長 MMRN1 タンパクの合成について更なる工夫や条件検討を行い、ITP の病態解明に向けた研究を進めたい。

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 1 件)

Satoh K, Hirayama T, Takano K, Sato T, Ozaki Y. VacA, the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, binds to multimerin 1 on human platelets. *Thromb J*. 査読有、2013;11(1):23-30.

doi: 10.1186/1477-9560-11-23

〔学会発表〕(計3件)

佐藤金夫、平山壽哉、高野勝弘、井上克枝、多田正人、尾崎由基男 . Helicobacter pylori 産生毒素 Vacuolating toxin A の結合タンパクに関する解析 . 第36回日本血栓止血学会、2014/5/31、大阪国際交流センター(大阪府)

Satoh K, Hirayama T, Takano K, Suzuki-Inoue K, Sato T, Ohta M, Nakagomi J, Ozaki Y. VacA, the vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori, binds to multimerin 1 associated with platelet membranes. XXIVth International Society of thrombosis and Haemostasis. 2013/7/2, Amsterdam RAI (Netherlands)

Yukio Ozaki. The role of VacA, an exotoxin in Helicobacter pylori-related ITP. 7th Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis. 2012/10/27, Melbourne Convention Exhibition Centre (Australia)

〔その他〕

ホームページ等

山梨大学大学院医学工学総合研究部 臨床検査医学講座 研究紹介 .

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/cn6/cn22/index2.1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 由基男 (OZAKI, Yukio)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30134539

(2) 研究分担者

佐藤 金夫 (SATO, Kaneo)

山梨大学・医学部・助手

研究者番号：20242662

(3) 研究分担者

高野 勝弘 (TAKANO, Katsuhiko)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60382925

(退職のため、平成25年5月8日 削除)