

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590698

研究課題名(和文) 血小板活性化を伴うピロリ感染症の急性冠症候群への関与

研究課題名(英文) The infection by Helicobacter pylori possessing platelet-activating factor influences the acute coronary syndrome (ACS)

研究代表者

杉浦 哲朗 (SUGIURA, Tetsuro)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50171145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：血小板活性化を誘導するピロリlpp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。lpp-His融合蛋白を作製し、ウサギ免疫で抗lpp抗体を作製した。ピロリ感染スナネズミではlppの血中移行は確認できなかった。しかし、急性冠症候群(ACS)の患者血清をlpp抗体で解析した結果、2名のピロリ菌感染者の血清中に約20kDa蛋白が検出され、本成分の血中移行を証明すると同時にACSの病態に関与する可能性が示唆された。さらに、lppの血小板活性化はL-セレクチンで相乗効果を認めた。lppは抗ヘパリン作用を有する可能性及びカルシウムイオン親和性がその活性作用に影響すると推察された。

研究成果の概要(英文)：We investigated to determine whether the infection by Helicobacter pylori possessing platelet-activating factor (lpp) influences the clinical pathology of acute coronary syndrome (ACS). Anti-lpp antibody was gained from a rabbit immunized with the lpp-His fusion protein made. In H. pylori infected Mongolian gerbil, the lpp was not found in blood. However, the 20-kDa was detected by western blotting with anti-lpp antibody in only sera from 2 H. pylori infected ACS patients. These indicated that the lpp transmigrates to blood vessels and might influence on the development of ACS. Moreover, the lpp associated platelet-activating was synergistically enhanced with L-selectin. Our study showed the possibility that the lpp possesses anti-heparin effect and the affinity of lpp for calcium iron influence the platelet-activating.

研究分野：循環器

キーワード：急性冠症候群 血小板 ヘリコバクター・ピロリ 菌体膜成分 白血球 抗凝固剤

1. 研究開始当初の背景

ピロリ関連免疫性血小板減少性紫斑病 (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証明し同定 (菌体 lpp) した。一方で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議論されていたが、明らかな証明はできていない。

2. 研究の目的

ACS の本態でもある「血小板凝集・活性化」を誘導するピロリ菌成分 lpp を発見し同定できたことから、本成分を中心に ACS とピロリ感染との関連性の解明を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌の lpp-His 融合蛋白と抗 lpp 抗体の作成 : His 融合プラスミドに本遺伝子をクローニング後 lpp-His 融合蛋白を大腸菌で発現誘導し作成した。本融合蛋白の血小板凝集・活性化能は健康人血小板多血漿 (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。得られた融合蛋白はウサギ免疫にて、polyclonal な抗 lpp 抗体を獲得し、特異性等はウエスタンブロットにて確認した。

(2) 感染動物実験 : lpp 保有ピロリ菌株を経口感染させ 2~4 ヶ月後に屠殺し、摘出胃をホモジナイズし培養にてピロリ菌の感染を確認した。確認されたスナネズミの心臓から血液 (血清および PRP) を採取し抗 lpp 抗体を使用してウエスタンブロット解析にて血中内 lpp の検出を試みた。また、lpp 抗体産生の有無を作成した融合蛋白を抗原に解析した。コントロールはピロリ菌を感染させていないスナネズミを使用した。

(3) ACS 患者血清によるピロリ lpp 蛋白の検出 : 倫理委員会承認後、研究を開始し合計 100 名の ACS 患者血清を得た。通常のピロリ抗体検査の実施と血清を抗原とした電気泳動後抗 lpp 抗体にてウエスタンブロット解析を実施した。

(4) 全血による凝集能解析 : lpp 融合蛋白による血小板凝集・活性化を白血球の影響を検証するために全血を使用し PRP 単独との比較解析を実施した。測定方法は融合蛋白を添加後 automatic platelet aggregometer にて各試料の透過度を経時的に測定し血小板凝集能を評価した。

(5) 抗凝固剤による凝集能解析 : 異なる 4 つの抗凝固剤 (クエン酸ナトリウム、ヘパリン、EDTA-2Na、EDTA-2K) を使用し作成した PRP を用いて、その影響について解析した。解析方法は各試料に融合蛋白を添加後、(4)

同様に血小板凝集能を評価した。コントロールには ADP を使用した。

4. 研究成果

(1) 作成した融合蛋白の血小板凝集能検証 : 作成したピロリ lpp-His 融合蛋白の血小板凝集能を automatic platelet aggregometer および標本観察 (ギムザ染色) にて検証した (Fig.1)。その結果、作成した融合蛋白は血小板凝集作用を有することが証明され、本蛋白を使用してウサギ免疫後、抗 lpp 抗体を獲得し以下の本研究に使用した。

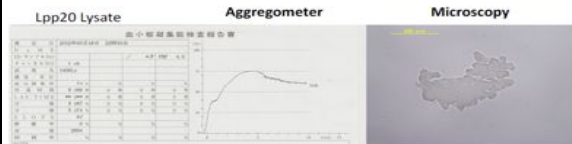


Fig.1 融合蛋白による血小板凝集能解析 Aggregometer および顕微鏡所見から明らかに本融合蛋白が血小板凝集活性を有することを証明した。

(2) ピロリ感染動物解析 : ACS 病態との関連性を解明するためには本ピロリ lpp 成分の血中移行性を先ず証明する必要がある、本動物実験を実施した。その結果、胃内感染が成立しているスナネズミの血中から本成分の検出を確認することはできなかった (Fig.2)。また、lpp 抗体の産生も確認することはできなかった。これは、感染後 2~4 ヶ月と短期間であったことが要因として考察される。

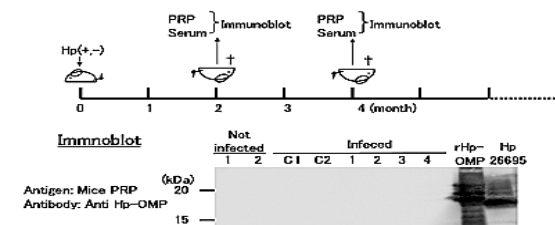


Fig.2 感染実験プロトコール (上) とウエスタンブロット解析 (下)

ピロリ菌感染後、2 および 4 ヶ月後に屠殺し検体を採取し、ウエスタンブロットにて解析した。非感染 2 匹、感染 6 匹 (2 匹は 2 ヶ月後、4 匹は 4 ヶ月後に屠殺した) から得た PRP を抗原に抗 lpp 抗体にて実施した。

(3) ACS 患者血清の解析 : 100 名の ACS 患者血清のピロリ抗体を測定した結果、陽性 48 名、陰性 52 名であった。さらに、血清中の lpp 蛋白の検出を抗 lpp 抗体を使用してウエスタンブロット解析した結果、ピロリ抗体陽性者 2 名のみ約 20kDa の陽性バンドを認めピロリ抗体陰性者からは検出されなかった (Fig.3)。このことは、少なくともピロリ lpp 成分のヒト血中移行性を証明するものであり、ACS の病態進展に關与する可能性が示唆された。

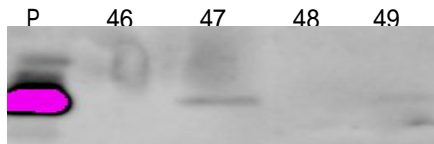


Fig.3 ACS 患者血清との反応性
患者血清に抗 Ipp 抗体を使用してウエスタン
ブロット解析した結果、患者番号 47,49 に約
20kDa の陽性バンドが検出された。

(4) 血小板凝集能解析：全血に Lpp 融合蛋白を添加すると PRP 使用よりも著しい血小板凝集が認められた。これは、恐らく白血球等に存在する L- selectin が相乗的に作用していると考えられたが、さらなる解析が必要である。次に 4 つの異なる抗凝固剤から作成した PRP での血小板凝集能を解析した結果、クエン酸ナトリウムおよびヘパリン血から作成した PRP では顕微鏡学的に血小板凝集を認めたが、EDTA2K および EDTA2Na から作成した PRP では血小板凝集を認めなかった。ヘパリンは ATIII の持つ抗トロンビン作用などを促進することにより抗凝固作用を示すことから、本 Ipp 蛋白は抗ヘパリン作用(トロンビン作用の亢進)あるいはヘパリン作用経路とは異なる別経路で血小板凝集作用を有する可能性が示唆された。また、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られると、本 Ipp 蛋白はこのキレート作用を阻害し血小板の凝集を誘導している可能性が示唆された。すなわち、本 Ipp 成分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考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Sugiura T, Yamanaka S, Takeuchi H, Morimoto N, Kamioka M, Matsumura Y. Autoimmunity and pulmonary hypertension in patients with Graves' disease. Heart and vessels. 査読有、2014 [Epub ahead of print]DOI:10.1007/s00380-014-0518-3

Morimoto N, Takeuchi H, Nishida Y, Morisawa M, Yoshikawa T, Morita T, Morimoto M, Sugimoto C, Matsumura Y, Sugiura T. Clinical application of the DiversiLab microbial typing system using repetitive- sequence-based PCR for characterization of *Helicobacter pylori* in Japan. J Clin Lab Anal. 査読有、00:1-4.2014 [Epub ahead of print] DOI:10.1002/jcla.21758

Kubo T, Kitaoka H, Yamanaka S, Hirota T, Baba Y, Hayashi K, Iiyama T, Kumagai N, Tanioka K, Yamasaki N, Matsumura Y, Furuno T, Sugiura T, Doi YL. Significance of High-Sensitivity Cardiac Troponin T in HypertrophicCardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 査読有、62:1252-9.2013. DOI:10.1016/j.jacc.2013.03.055

Matsumura Y, Nakashima Y, Noguchi T, Baba Y, Wada M, Hayashi K, Kubo T, Yamasaki N, Furuno T, Kitaoka H, Orihashi K, Sugiura T, Doi Y. Giant left atrial myxoma in a nonagenarian. J Am Geriatr Soc. 査読有、61:169-70.2013. DOI:10.1111/jgs.12059.

Matsumura Y, Hoshikawa-Nagai E, Kubo T, Yamasaki N, Furuno T, Kitaoka H, Takata J, Sugiura T, Doi Y. Left Ventricular Reverse Remodeling in Long-Term (> 12 Years) Survivors with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Am J Cardiol. 査読有、111:106-110.2013. DOI:10.1016/j.amjcard.2012.08.056.

Morishita K, Takeuchi H, Morimoto N, Shimamura T, Kadota Y, Tsuda M, Taniguchi T, Ukeda H, Yamamoto T, Sugiura T. Superoxide dismutase (SOD) activity of *Helicobacter pylori per se* from 158 clinical isolates and the characteristics. Microbiol. Immunol. 査読有、56:262-272. 2012.DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.00433.x.

Taniguchi Y, Kumon Y, Ohnishi T, Nogami M, Tani T, Ogawa Y, Sugiura T, Terada Y. Frequency of enthesitis in apparently healthy Japanese subjects detected by (18)F FDG-PET/CT. Mod Rheumatol. 査読有、22:939-41.2012. DOI: 10.1007/s10165-012-0632-y.

〔学会発表〕(計 83 件)

Sugiura T, Matsumura Y, Takeuchi H, Okumiya T. Intravascular hemolysis in patients with aortic stenosis: Evaluation by erythrocyte creatine. 64th Annual Scientific Session of American College of Cardiology.3.14-16.2015 San Diego USA

Matsumura Y, Kitaoka H, Sugiura T. Screening for abdominal aortic aneurysm during transthoracic echocardiography: a prospective study

in a Japanese population. 64th Annual Scientific Session of American College of Cardiology.3.14-16.2015 San Diego USA

Matsumura Y, Wada M, Hirakawa D, Yasuoka Y, Morimoto N, Takeuchi H, Kitaoka H, Sugiura T. Routine screening for abdominal aortic aneurysm during transthoracic echocardiography in a Japanese population. EuroEcho Imaging, 18th Annual meeting of the European Association of Cardiovascular Imaging.12.3-6.2014 Vienna Austria

Nishida Y, Umeda A, Morimoto N, Matsumura N, Sugiura T, Takeuchi H. Functional analysis of Min system and FtsZ in the cell division of *Helicobacter pylori*. 114th ASM General Meeting. 5.17-20.2014 MA(USA)

Shimamura Y, Hamada K, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Ishihara M, Horino T, Yuasa K, Yamanaka S, Sugiura T, Terada Y. N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a novel valuable biomarker for progression of CKD patients: a longitudinal follow-up study. ASN congratulates AAKP Medal of Excellence winners.11.5.2013. Atlanta USA

Hataguchi Y, Takeuchi H, Nakagawa K, Ikegami Y, Sugiura T. Translational research based on the potential of Refined Deep-Seawater (RDSW) which may control tumor growth. 2nd International Conference on Translational Medicine. 8.5-7.2013. Chicago USA

Ikeda Y, Kumon Y, Ohguro T, Hisakawa N, Nishiuchi J, Yamanaka S, Sugiura T. Serum Calprotectin Levels in Apparently Healthy Japanese Subjects. 81st European Atherosclerosis Society Lyon.6.2-3 2013. Lyon France

Kadota Y, Takeuchi H, Umeda A, Morimoto N, Nishida Y, Sugiura T. Functional analysis of *minC*, *D* and *E* genes of *Helicobacter pylori*. 113th ASM General Meeting. 5.18-21.2013 Colorado USA

Morimoto N, Takeuchi H, Kadota Y, Nishida Y, Kumon Y, Sugiura T. Analyzing for the pathophysiology of *Helicobacter pylori*-associated cITP via human platelet-*H. pylori* outer membrane protein interaction. 112th ASM

General meeting. 6.15-19.2012 CA(USA)

Kataoka H, Sakaki T, Hisahara T, Hatakeyama Y, Okuhara Y, Sugiura T. Assessment of the nutritional state using waveform pattern of protein fractionation analysis. AACCC(American Association for Clinical Chemistry) .7.15-19.2012 Los Angeles USA

Morishita K, Takeuchi H, Shimamura T, Morimoto N, Kadota Y, Tsuda M, Taniguchi T, Ukeda H, Sugiura T, Yamamoto T. Superoxide dismutase (SOD) of *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients with gastroduodenal diseases. 112th ASM General meeting. 6.15-19.2012 CA(USA)

〔図書〕(計 6件)

松村敬久、土居義典、杉浦 哲朗 検査診断学への展望 713(356-65)2013 南江堂

杉浦哲朗、松村敬久、土居義典 New 専門医を目指すケースメソッドアプローチ 循環器疾患(第2版)404(125-43)2013 日本医事新報社

土居忠文、宮尾恵示、杉浦哲朗 心電図ドリル p1-95.2013 ベクトル・コア

杉浦哲朗 他 コンパクトガイド検査値事典 309(26-29)2012 総合医学社

杉浦哲朗 他 ナースのための検査値ガイド 284(63-65)2012 総合医学社

〔産業財産権〕

出願状況(計 4件)

名称: C B C スキャットグラムを用いた診断支援装置

発明者: 片岡浩巳、畠山豊、奥原義保、杉浦哲朗

権利者: 国立大学法人高知大学、シスメックス株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2012-250498

出願年月日: 2012.11.14

国内外の別: 国内

名称: 前立腺癌の鑑別診断に用いるためのデータベースおよび方法

発明者: 片岡浩巳、杉浦哲朗

権利者: 国立大学法人高知大学、株式会社エイアンドティー

種類: 特許

番号: 特願 2012-249084

出願年月日: 2012.11.13

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 哲朗 (SUGIURA Tetsuro)

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

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

森本 徳仁 (MORIMOTO, Norihito)

高知大学医学部附属病院・副技師長

研究者番号：60398055