

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460680

研究課題名(和文)ピロリ菌体膜蛋白による血小板活性化とマクロファージの免疫応答に関する解析

研究課題名(英文) Analysis of the immune response of platelet activation and macrophages by H. pylori membrane proteins

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌感染は免疫性血小板減少症(ITP)に関与し、我々はこれまでにピロリ菌外膜蛋白(Hp-OMP)、血小板および抗Hp-OMP抗体からなる免疫複合体が、ピロリ菌関連ITPに関与している可能性を報告している。本研究では、免疫複合体の貪食細胞への食作用の観察およびELISAによるHp-OMP抗体の検出を試みた。ITP患者をピロリ菌陰性群(Hp-N)、ピロリ菌陽性で除菌成功(CR)群または除菌失敗(NR)群に分類し、Hp-OMPに対する抗体の反応性を解析した。抗Hp-OMP抗体は、Hp-Nよりも感染群で有意に高く、NRよりCRにより高値を示す傾向が認められた。免疫複合体の貪食は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori infection has been associated in the pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura (ITP). We reported the possibility that the immunocomplexes consisting of H. pylori outer membrane (Hp-OMP), platelet and anti Hp-OMP antibodies were involved in development of H.pylori associated ITP as an extra mechanism. Patients with ITP were classified into 3 groups: H. pylori - negative (Hp-N); H. pylori - positive and completely or partially responsive to treatment (CR); H. pylori - positive and irresponsive to treatment (NR). Reactivity of antibodies to Hp-OMP was examined by ELISA. Value of anti-Hp-OMP antibody by ELISA, Hp-OMP was significant higher in infected groups (CR and NR) than that in Hp-N. Its value was higher in CR than that in NR. Phagocytosis of the immunocomplexes were not detected by microscopic and immunoblot analysis.

研究分野：感染症学

キーワード：Helicobacter pylori 免疫性血小板減少症 H, pylori 膜蛋白

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (以下 *H. pylori*) は、胃潰瘍および胃癌などの消化管疾患のほか、消化管外疾患にも深く関与することが報告されている。消化器疾患における本菌の病原因子に関しては、これまでの多くの研究により CagA 等の *H. pylori* の有する病原蛋白が疾患の発症および進展に関与することが報告されているが、消化管疾患以外の疾患においては、その発症メカニズムのほとんどが解明されていない。1998年、イタリアの Gasbarini らにより *H. pylori* 感染を有する免疫性血小板減少症(以下、ITP)患者に対する、*H. pylori* 除菌による血小板数回復(以下、*H. pylori* 関連 ITP)例が報告されて以降、同様な症例が多数報告されるようになった。このことから、2009年には日本国内でも ITP の治療法として *H. pylori* の除菌療法が保険適用となった。このように、血小板減少を主病態とする ITP に本菌感染が強く関与している可能性は高いにも関わらず、本菌関連 ITP の発症メカニズムには不明な点が多い。

そこで我々は、*H. pylori* 関連 cITP 発症のメカニズムとして *H. pylori* 蛋白が血小板に結合し、さらに抗 *H. pylori* 抗体が結合する免疫複合体が関与するという仮説のもと検討を行ってきた。これまでの研究結果から、*H. pylori* 除菌により血小板数が増加する ITP 患者血清中には、17 kDa を主体とする低分子の *H. pylori* 蛋白に対する抗体産生が多く認められ、これらの低分子蛋白の一つが *H. pylori* 外膜蛋白(Hp-OMP)であることを同定している。さらに、この Hp-OMP が血小板と結合することを見出し、*H. pylori* による ITP 発症において *H. pylori* 外膜蛋白と血小板の結合および本蛋白に対する抗体の関与が重要であると考えて検討を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では *H. pylori* 感染による消化管外疾患の一つである *H. pylori* 関連 ITP における免疫反応を明らかにするために、*H. pylori* 関連 ITP 患者の血清中 Hp-OMP の存在および Hp-OMP-抗 Hp-OMP 抗体-血小板の複合体の食細胞への取り込みを確認することを目的として検討を行った。また、*H. pylori* 関連 ITP を診断する検査法として *H. pylori* 外膜蛋白を固相した ELISA 法(以下 in-house Hp-OMP ELISA)を開発し、本法を用いた血清中の抗 *H. pylori* 外膜蛋白抗体の検出系を確立すべく検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Hp-OMP の同定

H. pylori 標準株 26695 を増菌および破碎後、2 次元電気泳動にて分離した蛋白をイム

ノプロットにより ITP 患者血清と反応させ、17 kDa 付近に反応性を有する蛋白のスポットを確認した。同一蛋白を Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色したゲル上から、切り出し LC/MS/MS にて解析を行い、Mascot search により 11 の候補蛋白を得た。候補蛋白のクローニングは、データベースから候補蛋白をコードする塩基配列を取得してプライマーを作成し、PCR にて当該遺伝子を増幅後、T-vector に挿入した。組み替え用 *Escherichia coli* (DH5⁺) に形質転換後、アンピシリンと X-Gal が入った LB 培地に接種しカラーセクションを行った。増菌後に得られたプラスミドを制限酵素で処理後、pET 20b(+) Vector に導入しさらにタンパク質発現用 *E. coli* (BL21(DE3)) に形質転換し、Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) で蛋白を発現誘導し菌体を集めソニケーターにより菌体を破壊し Lysate より候補蛋白のヒスチジン(His)融合蛋白を得た。各 His 融合蛋白と *H. pylori* 関連 ITP 患者血清とのイムノプロットによる解析結果から Hp-OMP を同定した。

(2) 抗 Hp-OMP 抗体の作製

抗 Hp-OMP 抗体は Hp-OMP と His の融合蛋白をラビットに免疫し、ラビット抗 Hp-OMP IgG ポリクローナル抗体(以下 抗 Hp-OMP 抗体)を本検討に用いた。得られた抗体は菌体 Lysate および融合蛋白を使用しウエスタンブロット(WB)にて反応性を確認した。

(3) Hp-OMP の精製

Hp-OMP は Hp-OMP-plasmid (以下、pHp-OMP) を形質転換した *E. coli* (BL21) を増菌し、IPTG で蛋白を発現誘導した後、菌体を集めソニケーターにより菌体を破壊し Lysate とした。さらに、Ni²⁺が充填されたアフィニティークロマトグラフィー用カラムを用いて Hp-OMP を精製した。カラムから溶出される各溶出分画(Elute 1-5)を個別に集め、SDS-PAGE にて泳動後、CBB 染色およびウエスタンブロットにて 抗 Hp-OMP 抗体および抗 6×His 抗体(R&D)と抗原抗体反応を行い Hp-OMP の精製度の確認を行った。

(4) in-house Hp-OMP ELISA の作成

精製した Hp-OMP を炭酸バッファー(pH 9.6)で 1~128 倍希釈し ELISA プレートに固相し一晩インキュベートしたのち、スキムミルクでブロッキングを行い、抗 Hp-OMP 抗体または患者血清を反応させた。続いて HRP 標識 Anti Rabbit IgG(Santa Cruz)抗体または Anti Human IgG 抗体(Santa Cruz)を二次抗体として反応させた。プレート洗浄後、テトラメチルベンチジン基質溶液を添加した後、マイクロプレートリーダーにて測定した。

(5) In-house Hp-OMP ELISA による ITP 患者における血清中抗 Hp-OMP 抗体の検出

ITP 患者を *H. pylori* 陰性(Hp-N)群、*H. pylori* 陽性 除菌有効(CR)群および *H. pylori* 陽性 除菌無効(NR)群の3群に分け、各群の血清抗 Hp-OMP 抗体を in-house Hp-OMP ELISA を用いて2重測定した。また、上述した3群の試料について、過去の解析にて得られた、抗 *H. pylori* 抗体(*H. pylori* high molecular mass cell associated protein(以下、抗 J-HM-CAP 抗体,協和メディックス))、抗 cytotoxin-associated gene A 抗体(以下、抗 CagA 抗体,RADIM)、in-house 抗 *H. pylori* whole cell lysate 抗体(以下、抗 whole *H. pylori* 抗体)および血小板結合性免疫グロブリン G (以下、PA-IgG) の測定値も加えて比較検討を行った。各群の ITP 患者の比較には、一元配置分散分析(ANOVA)および Tukey の多重比較を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(6) Hp-OMP 複合体の貪食

健康人へパリン加血液に、Hp-OMP および抗 Hp-OMP 抗体を添加後、35℃ で2時間および12時間インキュベートした。それぞれ全血、および白血球層を採取し、塗抹染色標本における貪食像の形態学的観察およびイムノプロットによる Hp-OMP の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) Hp-OMP の精製

pHp-OMP-His を形質転換した大腸菌(BL21)を IPTG で蛋白を発現誘導して得られた菌体 Lysate を用いた SDS-PAGE ゲルの CBB 染色において 19kDa 付近のバンドを確認した。カラムを用いて精製した Hp-OMP は SDS-PAGE ゲルの CBB 染色の結果から、溶出分画 1 および 2 が最も回収率が高かった。Hp-OMP の精製度の確認として抗 His 抗体および抗 Hp-OMP 抗体を用いたウエスタンブロットにより、抗 His 抗体との反応では Hp-OMP(19 kDa)付近にシングルバンドが認められたが、抗 Hp-OMP 抗体との反応では Hp-OMP 付近に複数の非特異的なバンドが認められた。精製度を上げるため、ネガティブ染色(ネガティブゲル染色 MS キット;和光純薬)を行ったゲルから抗 His 抗体が反応する位置のバンドのみを切り出しカラムにて精製した Hp-OMP を希釈し in-house Hp-OMP ELISA に用いた。

(2) in-house Hp-OMP ELISA による ITP 患者における血清抗 Hp-OMP 抗体

各群の in-house Hp-OMP ELISA による血清抗 Hp-OMP 抗体の OD 値は、それぞれ Hp-N 群: 0.43 ± 0.05 、CR 群: 0.65 ± 0.04 および NR 群: 0.60 ± 0.04 であった。Hp-N 群に対し *H. pylori* 感染群(CR 群および NR 群)は有意に高値を示し、特に CR 群でより高値の傾向を示した(図1)。

(3) ITP 患者における *H. pylori* 関連抗体および PA-IgG との比較

抗 J-HM-CAP 抗体および抗 CagA 抗体では、Hp-N 群と比較し CR 群および NR 群で同等に有意に高値を示した。また、抗 *H. pylori* whole

cell lysate 抗体および PA-IgG では各群間において有意差は認められなかったが、PA-IgG では Hp-N 群および NR 群よりも CR 群でより低値を示す傾向が認められた(図1)。

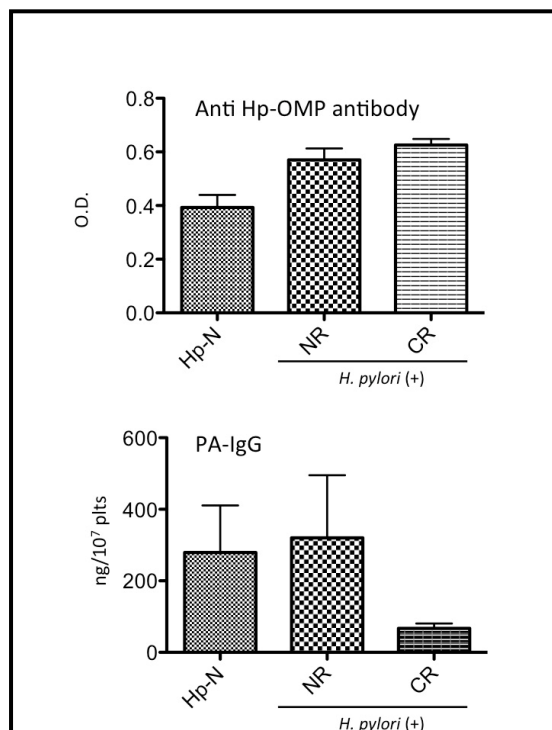


図1. *H. pylori* 関連 ITP 患者における抗 Hp-OMP 抗体および PA-IgG の比較

(4) Hp-OMP 複合体の貪食

形態学的に血小板が貪食された食細胞は観察されなかった。また、イムノプロットにおいても、白血球層の細胞溶解液中に Hp-OMP を検出することはできなかった。

H. pylori 関連 ITP 発症のメカニズムとして、血小板に *H. pylori* 抗原が結合し、さらに抗 *H. pylori* 抗体が結合した免疫複合体が形成され、血小板減少に至るものと考え、これまでに、*H. pylori* の外膜蛋白の一つが血小板に直接結合し、さらに外膜蛋白に対する抗体が結合することを実験的に証明している。本検討では、*H. pylori* 関連 ITP 患者において、ELISA を用いた in-house Hp-OMP ELISA による測定を試みた。その結果、Hp-N 群と比較すると *H. pylori* 感染群(NR 群および CR 群)で有意に高値を示し、さらに NR 群よりも CR 群でより高値($p < 0.05$ vs $p < 0.01$)を示した。このことは、*H. pylori* 関連 ITP 患者において in-house Hp-OMP ELISA を用いることにより、除菌前検査法として導入できる可能性がある。さらに PA-IgG 等の血小板関連の抗体検査を併用することでより臨床診断に寄与できるものと思われた。

食細胞による免疫複合体の貪食についても検討を行ったが、貪食の示唆する結果を得ることはできなかった。この点については、

in vitro での証明が困難なことを意味している。一つは、以前に行ったスナネズミへの *H. pylori* 感染実験において、*H. pylori* の持続感染は確認できたが、1 ヶ月および3 ヶ月後に採取した血小板および脾臓からの Hp-OMP の検出を試みたが検出されなかった。また血中の抗体価も検出感度以下であった。これら結果は、動物モデルとして *H. pylori* 関連 ITP を再現することが困難であったこと。また、これまでに実験動物を用いた *H. pylori* 関連 ITP モデルの報告もないことから、*H. pylori* 関連 ITP の病態が動物種により異なる可能性もあることが示唆される。また、ヒト由来の抗 Hp-OMP 抗体の入手が不可能であり、我々が仮説としている血小板-Hp-OMP-抗 Hp-OMP 抗体の免疫複合体が食細胞に貪食される機序を証明するには困難であった。したがって、本仮説を証明するには、個々の *H. pylori* 関連 ITP 患者由来の試料から解析を進める必要性があるものと考えられる。

これまでの *H. pylori* 関連 ITP に関する我々の知見では、今回対象とした Hp-OMP のほか、26 および 36kDa 等の低分子蛋白の関与も示唆しており、すでにこれらの蛋白の検出方法についての特許を取得している。今後、ITP をはじめとする *H. pylori* 感染により引き起こされるこれらの疾患において、*H. pylori* に対する生体反応（抗体産生や細胞との接着因子）等を解析し、プロファイルを作成することにより、さらに疾患特異的な検査法の開発が可能であると思われる。

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9件)

1. 森本徳仁, 是永正敬, 西田愛恵, 森本みゆき, 上岡彩椰, 森田珠恵, 小倉克巳, 松村敬久. 日常臨床における寄生虫検査 - アンケート調査から得られた現状の問題点および提言 - . 会報こうち. 2017, 46(2), 80-84. (査読無)
2. Yoshie N, 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 Microbiology Letters. 2016, 363(6), pii: fnw025. (査読有). doi: 10.1093/femsle/fnw025
3. 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. Cardiovascular Ultrasound. 2016. 14:8. (査読有).

doi:10.1186/s12947-016-0051-x

4. Nishida Y, Morimoto N, Korenaga M, Komatsu Y, Takeuchi H, Matsumura Y, Sugiura T. Genotyping *Giardia intestinalis* by using DNA extracted from long-term-preserved human specimens stained with chlorazol black E. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2016, 69(3), 244-247. (査読有). doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.543
5. 森本みゆき, 森本徳仁, 是永正敬, 大石拓, 森澤美恵, 吉川智絵, 岡本真知, 森田珠恵, 小倉克巳, 荒川良, 杉浦哲朗. 市販のたこ焼き粉に繁殖したダニによるアナフィラキシーの1例. 会報こうち. 2014. 42(2), 138-141. (査読無)
6. Takeuchi H, Trang VT, Morimoto N, Nishida Y, Matsumura Y, Sugiura T. Natural products and food components with anti-*Helicobacter pylori* activities. World J Gastroenterol. 2014, 20(7), 8971-8978. (査読有). doi:10.3748/wjg.v20.i27.8971
7. 長尾佳樹, 大石拓, 寺内芳彦, 森本徳仁, 菊池広朗, 満田直美, 玉城涉, 山本雅樹, 堂野純孝, 久川浩章, 是永正敬, 藤枝幹也. ミックス粉に繁殖するダニによるアナフィラキシーの3例とアンケート結果について. 日本小児アレルギー学会誌. 2014. 28(2), 226-231. (査読有). http://doi.org/10.3388/jspaci.28.226
8. 竹内啓晃, 森本徳仁, 西田愛恵, 杉浦哲朗. *Helicobacter pylori* 関連疾患の病体解析と臨床検査. 臨床病理. 2014, 62(5), 440-449. (査読有)
9. 大石拓, 森本徳仁, 荒川良, 是永正敬, 藤枝幹也. たこ焼き粉に繁殖したコナヒョウヒダニが原因と考えられたアナフィラキシーの1例 - 過去の報告例の検討. 日本小児皮膚科学会雑誌. 2014, 33(1), 69-73. (査読有)

〔学会発表〕(計14件)

1. 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, 松村敬久, 杉浦哲朗. 血小板擬集能を有する *Helicobacter pylori* 膜蛋白を利用した *H. pylori* 関連疾患検査法の開発. 第63回日本臨床検査医学会学術集会, 2016. 9.1-4, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
2. 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, 2016. 9.1-4, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
3. Morimoto N, Nishida Y, Morimoto M, Kamioka S, Morita T, Ogura K, Sugiura T, Matsumura Y. The

- association between virulence factors and viscosity of hypermucoviscosity phenotypes in *Klebsiella pneumoniae*. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science (IFBLS), 2016.8.31-9.4, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
4. 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, 2016.6.24-26 別府ビーコンプラザ (大分県別府市)
 5. Nishida Y, Takeuchi H, Morimoto N, Umeda A, Kadota Y, Kira M, Okazaki A, Matsumura Y, Sugiura T. Intrinsic role of *Helicobacter pylori* min proteins. 116th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2016.6.16-20, Boston Convention & Exhibition Center (Boston)
 6. 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. 2015.11.19-22, 長良川国際会議場/岐阜都ホテル (岐阜県岐阜市)
 7. 森本徳仁, 西田愛恵, 岡本真知, 森本みゆき, 上岡彩椰, 森田珠恵, 小倉克巳, 竹内啓晃, 松村敬久, 杉浦哲朗. 臨床材料より分離された高粘稠性 *Klebsiella pneumoniae* の遺伝子学的検討. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 2015.11.19-22, 長良川国際会議場/岐阜都ホテル (岐阜県岐阜市)
 8. Nishida Y, Kira Y, Morimoto N, Matsumura Y, Sugiura T, Takeuchi H. The molecular insights into *Helicobacter pylori* Min and FtsZ proteins. 115th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2015.5.30-6.2, Morial Convention Center. (New Orleans)
 9. 西田愛恵, 森本徳仁, 竹内啓晃. Molecular behavior of divisome in *Helicobacter pylori*. 第 88 回日本細菌学会総会, 2015.3.26-28, 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)
 10. 西田愛恵, 竹内啓晃, 森本徳仁, 松村敬久, 杉浦哲朗. MinE の *Helicobacter pylori* における働きと相互作用. 日本臨床検査医学会第 11 回合同地方会, 2015.2.21-22 岡山大学 (岡山県岡山市)
 11. 森本徳仁, 竹内啓晃, 西田愛恵, 松村敬久, 杉浦哲朗. 免疫性血小板減少性紫斑病に關与する *H. pylori* 膜蛋白の血小板との結合性および生体内での動態. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 2014.11.22-25, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
 12. 竹内啓晃, 森本徳仁, 西田愛恵, 松村敬久, 杉浦哲朗. ピロリ菌における細胞分裂関連蛋白の分子間相互作用. 第 20 回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2014.6.28-29, ステーションコンファレンス東京. (東京都千代田区)
 13. Nishida Y, Umeda A, Morimoto N, Sugiura T, Takeuchi H. Functional analysis of Min system and FtsZ in the cell division of *Helicobacter pylori*. ASM 114th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2014.5.17-20, Boston Convention & Exhibition Center (Boston)
 14. Morimoto N, Takeuchi H, Nishida Y, Morisawa M, Morimoto M, Okamoto M, Morita T, Matsumura Y, Sugiura T. Genotyping evaluation of *Helicobacter pylori* by DiversiLab microbial typing system using rep-PCR. The 9th Cherry Blossom Symposium International Conference of Clinical Laboratory Automation and Robotics, 2014.4.17-19, Yokohama Red Brick Warehouse (神奈川県横浜市)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :
- 取得状況 (計 0 件)
- 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :
- 〔その他〕
- ホームページ
- ・高知大学医学部病態情報診断学講座
http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_clncl/
 - ・高知大学医学部附属病院検査部
http://www.kochi-ms.ac.jp/~hc_clabo/index.html

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

(2) 研究分担者

西田 愛恵 (NISHIDA, Yoshie)
高知大学・医学部附属病院・臨床検査技師
研究者番号：30600796

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

竹内 啓晃 (TAKEUCHI, Hiroaki)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・講師
研究者番号：90346560