

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18390134
 研究課題名（和文）細胞内寄生性細菌由来の細菌性モジュリンの感染細胞内作用機構の解明とその応用
 研究課題名（英文）Mechanism for intracellular action of bacterial modulin from intracellular parasitic bacteria and application
 研究代表者
 光山 正雄（MITSUYAMA MASAO）
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号 10117260

研究成果の概要：

細胞内寄生性細菌であるリステリア菌および結核菌が有する細菌性モジュリンの感染細胞に対する作用を、主としてサイトカイン応答を中心として解析した。リステリアの病原因子 LL0 が感染マクロファージ内で認識されインフラマソーム形成が起こってカススペース 1 が活性化される分子機構や、結核菌が宿主カススペース 1 活性化を誘導する過程に RD1 領域産物が関与することなど、多くの新たな知見が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
平成 19 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
平成 20 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学

キーワード： 細胞内寄生菌、細菌性モジュリン、リステリア菌、結核菌、サイトカイン、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

リステリアや結核菌などの細胞内寄生性細菌は、感染宿主に極めて強い細胞性免疫応答を誘導する。その背景には、Th1 細胞を活性化する T 細胞抗原の存在に加えて、細菌が保有する何らかの細菌性モジュリンがマクロファージに認識され、マクロファージから IL-12 や IL-18 などの Th1 細胞分化促進に働くサイトカイン応答を惹起するからと考えられた。本申請研究開始時点では、すでにリステリア菌の主要病原因子タンパクであるリステリオリン 0 (LL0) がマクロファージに強力な細菌性モジュリン活性を示すことを、リコンビナントタンパクを用いて明らかにしていた。そこで本研究では、LL0 遺伝子を欠損させた変異株をまず作製し、各種の変異 LL0 や関連タンパクの遺伝子で相補した株を多数作製して、マクロファージに感染させた場合、どのような分子機構で IL-12 や IL-18

が誘導されるのかを明らかにすることを企画した。

2. 研究の目的

背景の項目に記載したように、リステリア菌のマクロファージ感染において誘導される Th1 細胞分化に関わる主要サイトカインの発現分泌の分子機構を、リステリアの病原因子の認識機構の観点から明らかにすることがひとつの大きな目的である。また、同じ細胞内寄生性を示す結核菌について、近年重要な病原因子候補として注目されてきた RD1 領域産物に的を絞り、RD1 領域の存在がどのように宿主マクロファージのサイトカイン誘導や免疫応答の修飾に関わるかを、これも RD1 領域の欠損変異株と遺伝子相補株を用いて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

リステリア菌については、先ず LLO 遺伝子である hly を、in frame で完全欠損させた変異株を作製し、これに LLO の各種変異タンパクをコードする遺伝子で相補した株を作製した。結核菌の RD1 欠損変異株と相補株を準備した。これらを培養マクロファージに感染させ、細胞内動態を顕微鏡下での観察と細胞内生菌数測定で調べた。サイトカインとしては、IL-12、IL-18 のほか各種炎症性サイトカインの発現レベル、タンパクとしての産生量を測定した。IL-18 は前駆体から成熟型への限定分解が必要で、そこに働く caspase-1 の活性化を p10 特異的な抗体によるウェスタンブロットで検出した。細胞内シグナル伝達に関わる分子の解析には、各種ノックアウトマウス由来のマクロファージを用いた。

4. 研究成果

食胞から脱出できない hly 欠損変異株でも野生株と同様に IL-12 の発現誘導がみられ、IL-12 の誘導には細胞質内認識機構は関与しないことが判明した、一方、IL-18 の分泌応答には、hly が必須であり、しかも相同性 n 高い ilo 遺伝子による相補株では見られなかった。LLO の変異タンパクをコードする遺伝子による相補株を用いた解析により、LLO 分子の第 1 ドメインがおそらく NALP3 を介して認識され、ASC 依存的なインフラマソーム形成が起こってカスパー 1 が活性化される結果、IL-18 の成熟分泌が起こってインターフェロンが誘導される機序が明らかとなった。LLO を介した宿主細胞への細胞質内シグナルは、カルパインを活性化し、活性化カルパインが作用して成熟する IL-1 α の分泌を促すことが示された。さらに、リステリア菌で誘導される I 型インターフェロンも一部カスパー 1 活性化に関与することが示された。リステリア菌に対する自然免疫応答に関わる TLR2 を介したシグナルが、リステリア菌体の食食促進にも関与することが明らかとなった。

結核菌の病原因子遺伝子クラスターである RD1 領域の欠損変異株を用いて、RD1 領域産物がマクロファージにおけるカスパー 1 活性化を誘導すること、その過程には RD1 領域産物を含むタイプ VII 分泌機構による宿主細胞膜での K イオン流出が関与することが示された。さらに、結核菌の未知の病原因子が、宿主の PD-L1/PD1 システムを活性化した抑制性シグナルを強く誘導する結果、感染防御に働く CD4⁺T 細胞の持続を抑制して慢性感染を可能にしていることを示唆する成績が得られ、その責任分子の研究が今後期待できるものと考えられた。

以上より、宿主マクロファージは細胞内寄

生性細菌の異なった細菌性モジュリンを認識し、カスパー 1 活性化など獲得免疫成立に必須の応答を起こすことが示された。

応用的研究としては、モジュリン活性を示す精製タンパク標品をマウスに投与し、細胞性免疫応答の誘導、とくに Th1 応答優位応答の誘導が可能となり、アレルギーモデルでは Th2 優位応答を Th1 応答に変換させアレルギー反応を抑制できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Isao Watanabe, Takamasa Nomura, Takanari Tominaga, Kazuhiro Yamamoto, Chikara Kohda, Ikuo Kawamura, and Masao Mitsuyama: Dependence of the lethal effect of pore-forming cytolysins on the cytolytic activity. Journal of Medical Microbiology, 査読有り, 55: 505-510 (May issue), 2006
2. Kiwamu Nakamura, Kazuya Miyagi, Yoshinobu Koguchi, Yuki Kinjo, Kaori Uezu, Takeshi Kinjo, Morikazu Akamine, Jiro Fujita, Ikuo Kawamura, Masao Mitsuyama, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Akiko Miyazato, Mitsuo Kaku, and Kazuyoshi Kawakami: Limited contribution of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 to the host response to a fungal infectious pathogen, Cryptococcus neoformans. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 査読有り, 47(1): 148-154, 2006
3. Kazuhiro Yamamoto, Ikuo Kawamura, Juichi Ito, and Masao Mitsuyama: Modification of allergic inflammation in murine model of rhinitis by different bacterial ligands: Involvement of mast cells and dendritic cells. Clinical and Experimental Allergy, 査読有り, 36(6):

- 760-769, 2006
4. Kazuhiro Yamamoto, Ikuo Kawamura, Takanari Tominaga, Takamasa Nomura, Junichi Ito, and Masao Mitsuyama: Listeriolysin O derived from *Listeria monocytogenes* inhibits the effector phase of an experimental allergic rhinitis induced by ovalbumin in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 査読有り, 144: 475-484, 2006
 5. Hirose K, Marui A, Arai Y, Nomura T, Inoue S, Kaneda K, Kamitani T, Fujita M, Mitsuyama M, Tabata Y, and Komeda M: Sustained-release vancomycin sheet may help to prevent prosthetic graft methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Vasc. Surg.*, 査読有り, 44: 377-382, 2006
 6. Juthaporn Kohwiwattanagun, Ikuo Kawamura, Takao Fujimura, and Masao Mitsuyama: Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A) contributes to induction of chemokine and proinflammatory cytokine expressions in A549 alveolar epithelial cells. *Microbiol. Immunol.*, 査読有り, 51(2): 253-261, 2007
 7. Ryosuke Uchiyama, Ikuo Kawamura, Michiko Kawanishi, Kohsuke Tsuchiya, Takanari Tominaga, Taijin Kaku, Yutaka Fukasawa, Shunsuke Sakai, Takao Fujimura, Takamasa Nomura and Masao Mitsuyama: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv is capable of inhibiting necrosis of the infected macrophages via activation of caspase-9. *Infect. Immun.*, 査読有り, 75(6): 2894-2902, 2007
 8. Nomura Takamasa, Ikuo Kawamura, Chikara Kohda, Hisashi Baba, Yutaka Ito, Terumi Kimoto, Isao Watanabe, and Masao Mitsuyama: Irreversible loss of membrane-binding activity of *Listeria*-derived cytolysins in non-acidic conditions: a distinct difference from allied cytolysins produced by other Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 査読有り, 153 (7): 2250-2258, 2007
 9. Hideki Hara, Ikuo Kawamura, Takamasa Nomura, Takanari Tominaga, and Masao Mitsuyama: Cytolysin-dependent endosomal escape is required but not sufficient for the induction of Th1 immune response against *Listeria* infection: A distinct role for listeriolysin O as determined by cytolysin gene replacement. *Infect Immun.*, 査読有り, 75(8): 3791-3801, 2007
 10. Taijin Kaku, Ikuo Kawamura, Ryosuke Uchiyama, Takeshi Kurenuma, and Masao Mitsuyama: RD1 region in mycobacterial genome is involved in induction of necrosis in the infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiology Letters*, 査読有り, 274(2): 189-195, 2007
 11. Masao Mitsuyama and David N. McMurray: Tuberculosis: Vaccine and drug development (a review) *Tuberculosis*, 査読有り, 87, S10-S13, 2007
 12. 河村伊久雄、光山正雄: 抗結核防御免疫と結核菌による免疫制御 実験医学

- 25(20) 増刊、査読有り、105(3183)-111(3189), 2007 -粘膜免疫からの感染と免疫応答機構 清野宏編- 2007年12月1日発行
13. 光山正雄: 病原体の感染戦略の新知見 化学療法の領域 23(11): 1707-1709, 2007 河村伊久雄、光山正雄: 結核菌の病原性発現機構はどこまでわかったか 化学療法の領域、査読有り、23 (11): 1750-1756, 2007
 14. Shereen Shoma, Kohsuke Tsuchiya*, Ikuo Kawamura, Takamasa Nomura, Hideki Hara, Ryosuke Uchiyama, Sylvia Daim and Masao Mitsuyama: Critical involvement of pneumolysin in production of IL-1 α and caspase-1- dependent cytokines in infection with Streptococcus pneumoniae in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. Infection and Immunity, 査読有り, 76(4): 1547-1557, 2008
 15. Hideki Hara, Kohsuke Tsuchiya, Takamasa Nomura, Ikuo Kawamura, Shereen Shoma and Masao Mitsuyama: Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by Listeria monocytogenes on cytolysin, Listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. J Immunol, 査読有り, 180: 7859-7868, 2008
-
16. Yanna Shen, Ikuo Kawamura*, Takamasa Nomura, Kohsuke Tsuchiya, Hideki Hara, Huixin Qu, Sita R. Dewamitta, Takeshi Yamamoto, Sylvia Daim, Shunsuke Sakai, Takeshi Kurenuma and Masao Mitsuyama: Involvement of Toll-like receptor 2 signaling in the phagocytosis of Listeria monocytogenes by murine macrophages. Submitted to Cellular Microbiology, 査読有り
 17. 光山正雄: 第81回日本細菌学会総会 最新の話 感染制御、査読有り、4 (4): 313-315, 2008
 18. Takeshi Kurenuma, Ikuo Kawamura*, Hideki Hara, Ryosuke Uchiyama, Sylvia Daim, Sita Ramyamali Dewamitta, Shunsuke Sakai, Kohsuke Tsuchiya, Takamasa Nomura and Masao Mitsuyama: RD1 locus in Mycobacterium tuberculosis genome contributes to the activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages Infect Immun., 査読有り, submitted Jan.6, 2009
-
19. 光山正雄: プロバイオティクスと疾患はじめに (編集企画) 医学のあゆみ, 査読有り, 228(3) 197, 2009
 20. Ikuo Kawamura, Chikara Kohda, Kohsuke Tsuchiya, Yutaka Ito, Terumi Kimoto, Takamasa Nomura and Masao Mitsuyama: Listeriolysin O, a major virulence factor of Listeria monocytogenes, is a novel Toll-like receptor (TLR) agonist recognized by TLR2 and TLR4. submitted to J. Exp. Med. Submitted to J Immunol, 査読有り, in revision
- [学会発表] (計10件)
1. 光山正雄「医学(系学)部における微生物学教育のレーゾン・デートル」第80回日本細菌学会総会シンポジウム SS1: 微生物学教育のあり方を考える 平成19年3月28日 大阪市 アジア太平洋トレードセンターATCホール
 2. Masao Mitsuyama "Interaction of

- intracellular parasitic bacteria and host defense system for the generation of Th1-dependent acquired immunity” COE International Symposium 2007, Shiran-kaikan, Kyoto, June 2, 2007
3. Masao Mitsuyama “Mechanism in the requirement of listeriolysin O (LLO) for the induction of caspase-dependent cytokines in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*” In Minisymposium 73- Mechanism of protection against intracellular pathogens, Symposium Chair and oral presentation at 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, August 25, 2007
 4. 光山正雄 (特別講演)「細胞内寄生性細菌の細胞内生存戦略と感染宿主の免疫応答」－細菌の病原因子と宿主防御機構のせめぎあい－第42回大分感染症研究会平成20年2月7日 大分全日空ホテル
 5. 光山正雄 (特別講演)「細胞内寄生性細菌リステリアの病原因子と宿主免疫応答」日本乳酸菌学会2008年度年次大会特別講演平成20年7月14日(月)京都大学百周年時計台記念館ホール
 6. 光山正雄 第134回日本医学会シンポ「感染症を巡る最近の進歩」司会、総合討論平成20年7月17日 日本医師会館大ホール 東京
 7. 光山正雄 (特別講演)「細菌感染に対する免疫応答」第38回日本耳鼻咽喉科感染症研究会(川内秀之会長)平成20年9月5日 島根県民会館ホール 松江市
 8. Masao Mitsuyama (Plenary lecture) “Critical involvement of bacterial virulence factor in the host immune response to *Listeria monocytogenes*” August 8, 2008 国際微生物学会議2008 イスタンブール トルコ
 9. Masao Mitsuyama “*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* and the host cytokine response” The 11st Kyoto University International Symposium in Shanghai, October 11, 2008 復旦大学上海医科大学ホール 中国
 10. 光山正雄「細胞内寄生性リステリア病原因子による宿主免疫応答の誘導機構－生菌免疫の作用機序へのアプローチ－」第82回日本細菌学会 浅川賞受賞講演 March 13, 2009 名古屋市国際会議場
- [図書] (計4件)
1. 光山正雄 (分担執筆) 結核(泉孝英監修 富岡洋海編集 改訂第4版) 第1章A 結核菌の基礎 pp.3-17, 医学書院 総ページ数458 2006年4月1日 第1刷発行
 2. 光山正雄 (監訳) メルクマニュアル 第18版 日本語版, 171章~175章 (pp 1524-1575), 日経BP社、2006年12月2日発行
 3. 光山正雄 (編集、分担執筆) 生体防御医学事典(鈴木和男監修, 光山正雄他編著) 朝倉書店 総頁数365、2007年5月20日初版
 4. Masao Mitsuyama, Adaptive Immunity to *Listeria monocytogenes*, Chapter 14 (pp427-448) In Handbook of *Listeria monocytogenes* Ed by Dongyou Liu Total Pages540 pages, CRC Press New York, 2008

.....

