

平成 21 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790319
 研究課題名 (和文) リステリア感染における Toll 様受容体を介した自然免疫応答の誘導機序の解析
 研究課題名 (英文) Analysis on the induction mechanism of innate immune response to *Listeria monocytogenes* through Toll-like receptors
 研究代表者
 土屋 晃介 (TSUCHIYA KOHSUKE)
 京都大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：50437216

研究成果の概要：Toll-like receptor (TLR) は、病原体由来の構造パターン (PAMPs) を認識し、侵入した病原体に対する防御に働くと考えられているが、病原体は通常複数の PAMPs を有しており、細胞内で特殊な動態を示す場合もある。そこで、細胞内寄生細菌であるリステリアの感染モデルを用いて各 TLR の役割を解析したところ、複数の TLR を含む MyD88 依存的なレセプターが補償的に働くことで宿主防御が強固に維持されていることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：感染免疫

科研費の分科・細目：細菌学 (含真菌学)

キーワード：Toll-like reseprot、リステリア、細胞内寄生菌、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

通性嫌気性のグラム陽性桿菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) は、反芻動物腸管に棲息し、排泄物を介して下水や土壌、ときに農作物を汚染する。ウシやヒツジに敗血症を引き起すと乳中に排菌され、乳製品が汚染される原因になる。健康人が経口的に少量のリステリアを摂取しても発病することは少ないと考えられているが、重篤な基礎疾患のあるコンプロマイズドホストや妊婦 (胎児) には致命的なリステリア症 (通常は髄膜炎や脳脊髄膜炎) を起こす。リステリアは、広範な細胞に侵入して細胞質内で増殖する代表的な細胞内寄生菌である。また、マクロ

ファージ系食細胞に貪食されても、ゲノム上の LIPI-1 と呼ばれる一連の病原因子遺伝子群の働きで食胞から細胞質に脱出し、細胞内殺菌を回避する。そのため、比較的少量の菌数 (10^5 cfu 程度) でも、マウスの静脈内に接種すると、宿主の免疫防御能が正常であっても対数的増殖を示してマウスを死に至らしめる。一方、致死量以下の感染では、標的臓器である肝臓や脾臓で一時的な菌の増殖がみられるものの、その後速やかに排除される。感染を耐過したマウスには極めて強い T 細胞依存的獲得免疫が誘導され、二次感染に対し防御的に働くが、そのエフェクターとしてはインターフェロン (IFN) γ 産生性の CD4 陽

性 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) と、同じく IFN- γ 産生性で CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の両者が関与している。本菌は研究材料として扱いやすいことから結核感染モデルに代わる細胞性免疫の研究に広く用いられており、Th1 および CTL の誘導機序、メモリーの維持など、獲得免疫の解析を中心に用いられてきた。一方、リステリア感染における自然免疫応答の意義については、近年になって病原体由来構造パターン (PAMPs) の認識に関わる分子群が同定されるまで詳細な解析は限られていた。リステリア初期感染では、感染早期から炎症応答が強く誘導され、種々の炎症性サイトカイン、インターロイキン (IL) -1、IL-6、IL-12、IL-18、IFN- γ 、腫瘍壊死因子 (TNF) - α などが産生される。これらの中でも IFN- γ と TNF- α は、それぞれの欠損マウスや受容体欠損マウス、中和抗体投与マウスなどがリステリアに対して感染早期より非常に高い感受性を示すことから宿主防御に必須の因子であることが知られており、自然免疫系を介した炎症応答がリステリアの制御に重要な役割を果たすと考えられている。また、IL-12 は Th1 の分化促進に働くことから、自然免疫系が抗原特異的な獲得免疫の誘導にも深く関わっていると考えられる。

マクロファージや樹状細胞は自然免疫の中心的役割を担う細胞であり、生体内に侵入した病原体を抗原非特異的に認識することで炎症性サイトカイン産生を含む様々な宿主応答を引き起こす。Toll-like receptor (TLR) は、これらの細胞による病原体認識に関わる分子群の一種として同定され、その細胞外ドメインで PAMPs を認識し、細胞内ドメイン (Toll/IL-1 receptor; TIR) を介して炎症性サイトカインや I 型 IFN の発現を誘導する (Kaisho et al. 2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:979)。現在、ほ乳類では 13 の TLR ホモログが同定されているが、主として細菌の認識には、TLR2 が TLR1 または TLR6 と会合して細菌由来リポペプチドやリポタイコ酸などの認識に働き、TLR4 はグラム陰性菌のエンドトキシン、TLR5 は鞭毛のフラジェリン、TLR9 は細菌由来 DNA の CpG モチーフの認識にそれぞれ働くことが報告されている。TIR ドメインのアダプター分子である MyD88 は、(TLR3 以外の) TLR が NF- κ B や MAPK、IRF7 などの下流のシグナル伝達経路を活性化するのに必須な役割を果たし、MyD88 欠損マウス由来のマクロファージは多くの PAMPs に不応答性を示す。また、MyD88 欠損マウスが多くの病原体に対して高い感受性を示すことから、TLR を介した PAMPs 認識が宿主防御に重要であることが明らかになっている。グラム陽性菌であるリステリアの加熱死菌体や

リステリア由来リポタイコ酸は主に TLR2 を介して認識されるため、リステリア初期感染における TLR2-MyD88 の役割が期待される。しかしながら、MyD88 欠損マウスがリステリア感染に極めて感受性であるのに対して TLR2 欠損マウスは正常マウスとほぼ同程度の抵抗性を示すことが複数の研究グループから報告されている (Seki et al. 2002. *J. Immunol.* 169:3863, Edelson et al. 2002. *J. Immunol.* 169:3869)。これらの結果から、リステリア感染に対する宿主防御には TLR-MyD88 経路を介した PAMPs 認識が必須であるが、それには TLR2 以外の TLR が働いている可能性、または TLR2 がその他の TLR と相補的に働く可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、研究背景を踏まえ、自然免疫系を介した宿主防御の発現機序を詳細に解明するため、リステリアの認識に関与する TLR を同定すること、およびそれらの防御における役割を明らかにすることを目的とする。どの TLR がリステリアに対する炎症性サイトカイン産生応答に関わるかを明らかにし、さらに、各 TLR のリステリアに対する宿主防御への貢献度を明らかにする。本研究により TLR-MyD88 を中心とした宿主防御機構が解明され、リステリアを含む細胞内寄生菌感染症の病態への理解が深まると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 多重欠損マウスの作製 C57/BL6 バックグラウンドの各 TLR 欠損マウスをかけ合わせ、遺伝子型の判定を行うことで多重 TLR 欠損マウス系統を得た。遺伝子型の判定はマルチプレックス PCR 法で行った。各系統のマウスは 8 週齢前後で実験に用いた。

(2) 細菌の菌株および培養方法 リステリア標準株として *Listeria monocytogenes* EGD 株を用いた。ブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地で震盪培養し、遠心回収したものを 1% グリセロール含 PBS に懸濁して -80°C フリーザーにて保存した。

(3) マクロファージの培養 マウスの腹腔に 2 ml の 3% チオグリコレート培地を注射し、3 日後に腹腔浸出細胞を回収した。遠心洗浄の後、10% FCS 含 RPMI 培地に懸濁し、マイクロプレートにて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。培養開始 2 時間後に非附着性細胞を洗浄除去し、附着細胞をマクロファージとして用いた。

(4) 感染方法 保存菌を PBS で希釈し、マウスには尾静脈から注射して感染させた。マクロファージへの感染は、細胞培養に菌液を添加して 30 分間のインキュベートで菌を貪食させた後、5 μ g/ml のゲンタマイシンを

加えて細胞外に残存するリステリアを殺菌し、さらに24時間インキュベートした。

(5) 臓器内菌数測定 マウスから回収した脾臓および肝臓をボット型ホモジェナイザーでホモジェナイズし、PBSで希釈した後、BHI寒天に塗布して37°C培養で生育したコロニーを測定した。

(6) サイトカイン測定 細胞培養上清および脾臓を1% CHAPS存在下でホモジェナイズしたホモジェネートをサンプルとし、IFN- γ 、IL-12p70 (Endogen)、IL-1 β 、TNF α 、IL-6 (e-Bioscience)、IL-18 (MBL) を各サイトカインのELISAキットまたは抗体ペアを用いてELISAで測定した。

(7) IL-18のウェスタンブロット 脾臓を1% CHAPS存在下でホモジェナイズしたホモジェネートにビオチン標識抗IL-18抗体 (MBL) を添加し、4°Cで1時間の反応の後にストレプトアビジン結合ビーズ (Promega) を加えて4°Cで一晩震盪しながら反応させた。ビーズを5回遠心洗浄し、少量のグリシンバッファー (pH2.8) で溶出したものをサンプルとして15%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEした。ゲルからPVDF膜に転写し、抗IL-18抗体 (Santa Cruz) で膜上のIL-18を検出した。

4. 研究成果

(1) リステリア感染マクロファージの炎症性サイトカイン応答 リステリアの鞭毛は37°Cでは発現が停止されることから、リステリア認識に関わるTLR2以外のTLRとして最初にTLR9の関与を調べた。野生型、TLR9欠損、TLR2欠損およびTLR2とTLR9を同時に欠損する(二重欠損)マウス由来のマクロファージにリステリアを感染させて炎症性サイトカインの産生応答を調べた所、TLR9欠損マクロファージおよびTLR2欠損マクロファージのIL-1 β 産生応答は野生型マクロファージと比べて部分的に低下していた。また、二重欠損マウス由来のマクロファージはTLR9欠損マクロファージおよびTLR2欠損マクロファージよりも低いIL-1 β 産生応答を示し、野生型マクロファージの約20%程度の応答しか示さなかった(図1)。IL-6産生応答にはTLR9の関与は殆ど認められなかったが、TLR2単独欠損でIL-6産生が野生型マクロファージの20%以下に低下していることからTLR2が大きく関与していることがわかった(図は省略)。さらに、TNF α 産生応答は二重欠損マクロファージで野生型マクロファージと比べて有意に低下しており(図は省略)、マクロファージのリステリアに対する炎症性サイトカイン産生応答におけるTLR2およびTLR9の重要性が示された。

(2) リステリア感染マウス脾臓での炎症

性サイトカイン応答 リステリアを感染させたマウスから脾臓を回収し、そのホモジェネート中のサイトカインを測定することで生体でのサイトカイン応答を解析した。感染1日後の脾臓内におけるIL-1 β 、IL-6およびTNF α の産生量は、二重欠損マウスで野生型マウスよりも若干低下していたが目立った差ではなかった。感染3日後、これら炎症性サイトカインの産生応答は二重欠損マウスの脾臓において野生型マウスの脾臓内よりも強く誘導されていたことから、この時点ではTLR2およびTLR9に全く依存していないことがわかった。また、MyD88欠損マウスの脾臓でも二重欠損マウスと同様に感染1日後のIL-1 β 、IL-6およびTNF α の産生量が野生型マウスよりも若干低下していたが、感染3日後にはこれら炎症性サイトカインは高い値で検出され、野生型マウスよりも強く産生応答を示すことがわかった。(図2、IL-6とTNF α は省略)この結果により、*in vitro*の解析時とは異なり、*in vivo*(脾臓)においてはTLR-MyD88非依存的にIL-1 β 、IL-6およびTNF α の産生が誘導される経路があることおよび感染の経過とともにその割合が高まることがわかった。

IL-1 β (pg/ml)

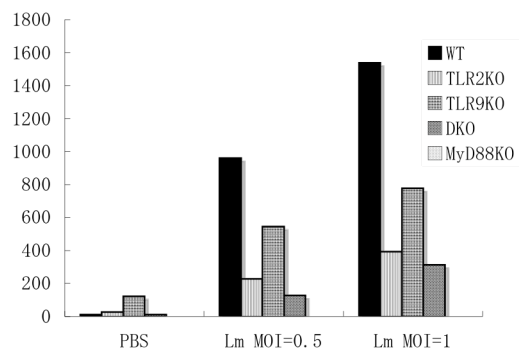


図1・マクロファージのIL-1 β 産生応答

IL-1 β (pg)

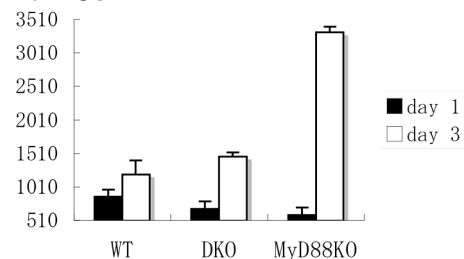


図2・脾臓内のIL-1 β 量

(3) リステリア感染マウスの脾臓におけるIFN- γ 産生応答 リステリアに対する防御の中心的役割を担うIFN- γ の産生応答を

解析した。感染1日後、TLR2 欠損マウス、TLR9 欠損マウスおよび二重欠損マウスの脾臓において IFN- γ 産生応答は殆ど認められず、野生型マウスの応答より著明に低下していた (図 3)。しかし、感染 3 日後にはこれらマウス系統の脾臓で高い IFN- γ 産生応答が認められ、野生型マウスと同程度であった (図 4)。一方、MyD88 欠損マウスの脾臓では IFN- γ 産生応答は感染 1、3 日後ともに野生型マウスのものより著明に低下していた (図 7)。次に、内因性 IFN- γ を誘導するサイトカインである IL-12p70 および IL-18 の産生応答を調べた。IL-12p70 は野生型マウスの脾臓ではリステリア感染によって強く誘導されたが二重欠損マウスおよび MyD88 欠損マウスの脾臓では感染 1 日後、3 日後とも全く検出されず、IL-12p70 の産生応答には TLR2 および TLR9 が必須な役割を果たすことが示された (図 5)。一方、IL-18 は二重欠損マウスおよび MyD88 欠損マウスの脾臓でも野生型マウスの脾臓と同様に強く誘導され、IL-18 の産生応答に TLR-MyD88 は必要ないことが示された。また、ウェスタンブロットによる解析においても IL-18 の成熟化断片は二重欠損マウスおよび MyD88 欠損マウスの脾臓から検出され、IL-18 の産生応答に TLR-MyD88 は関与しないことが確認された (図は省略)。

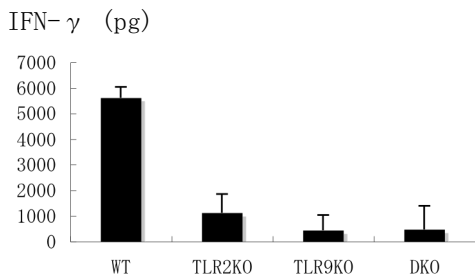


図3・脾臓内のIFN- γ 量 (感染1日後)

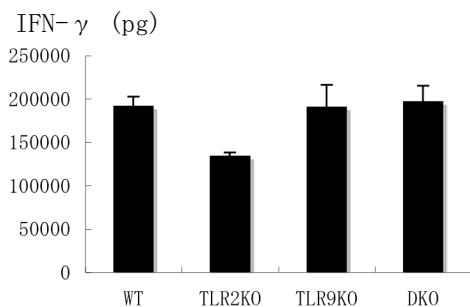


図4・脾臓内のIFN- γ 量 (感染3日後)

(4) TLR2 および TLR9 の宿主防御への関与
野生型マウス、TLR2 欠損マウスおよび TLR9 欠損マウスに LD50 相当 (野生型マウスにおける値) のリステリアを感染させて生存数を数えたところ、TLR2 欠損マウスおよび TLR9

欠損マウスは野生型マウスと同程度の割合で生存した。また、致死量以下のリステリアを感染させて脾臓および肝臓内の菌数を測定したところ、感染 1 日後および 3 日後において各臓器内の菌数は野生型マウスと TLR2 欠損マウスおよび TLR9 欠損マウスで同程度認められた。この結果から、TLR2 欠損マウスおよび TLR9 欠損マウスのリステリア抵抗性は野生型マウスと殆ど変わらないことがわかった。そこで、TLR2 と TLR9 が補償的に働いている可能性を考え、TLR2 と TLR9 を同時に欠損する二重欠損マウスを用いて同様の解析を行ったが、二重欠損マウスのリステリア抵抗性も野生型マウスと同程度であった (図 6)。この結果は、リステリアに対する防御に重要な TNF α と IFN- γ の産生応答が TLR2 および TLR9 に依存していない結果と一致するものであった。

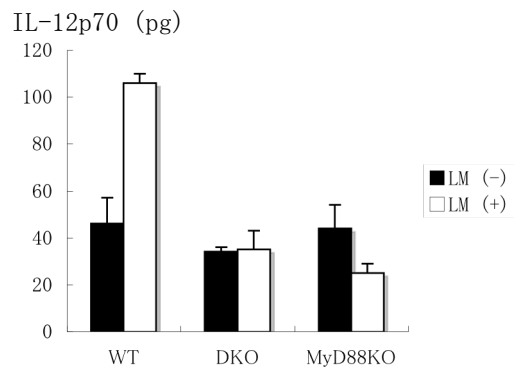


図5・脾臓内のIL-12p70量

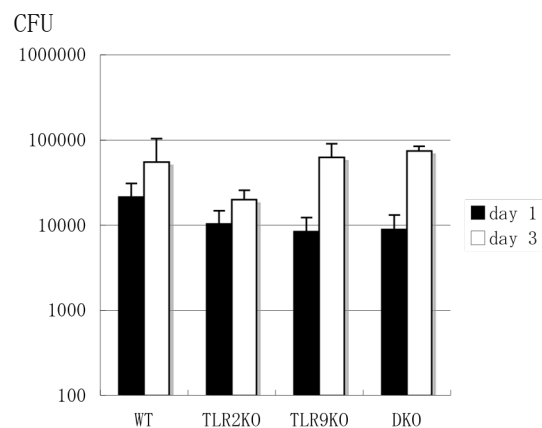


図6・脾臓内の菌数

(5) TLR2 および TLR9 の非存在下における IL-18 の宿主防御への貢献

これまでの結果でリステリア in vivo 感染における二重欠損マウスの TNF α および IFN- γ 産生応答が感染 3 日目においては野生型マウスのものと同程度であり、野生型マウスと二重欠損マウスでは感染抵抗性に差が無い

ことが示された。一方、感染抵抗性が著しく低下している MyD88 欠損マウスでは、TNF α 産生応答の低下はみられなかったが IFN- γ 産生応答は感染 3 日目においても著明に低下していた。そのため、MyD88 欠損マウスがリステリアに感受性なのは IFN- γ 産生応答が継続的に低いためである可能性が考えられた。また、二重欠損マウスの解析から、IFN- γ 誘導サイトカインである IL-12p70 の産生応答は TLR2 および TLR9 に依存していたが IL-18 は TLR-MyD88 非依存的に誘導されることがわかった。そこで、二重欠損マウスの脾臓における IFN- γ の誘導に IL-18 が補償的に働く可能性を考えた。事実、MyD88 は TLR だけでなく IL-18 レセプターのシグナル伝達にも必須な役割を果たすことから、MyD88 欠損マウスでは TLR2 および TLR9 に加えて IL-18 の働きも不全になっているはずである。この可能性を検討するため、TLR2、TLR9 および IL-18 を同時に欠損する三重欠損マウスを作製して解析に用いた。三重欠損マウスではリステリア感染 1 日後および 3 日後の脾臓内 IFN- γ 量は野生型マウスと比べて著しく低下しており、MyD88 欠損マウスのもと同程度であった (図 7)。次に三重欠損マウスの感染抵抗性を調べた。三重欠損マウスでは感染 3 日後の臓器内菌数が野生型マウスのもと同程度で有意に多く (約 5 倍)、感染抵抗性は明らかに低下していた。しかし、MyD88 欠損マウス (臓器内菌数が野生型マウスの数百倍) と比べると感染抵抗性の低下は限定的であった (表 1)。

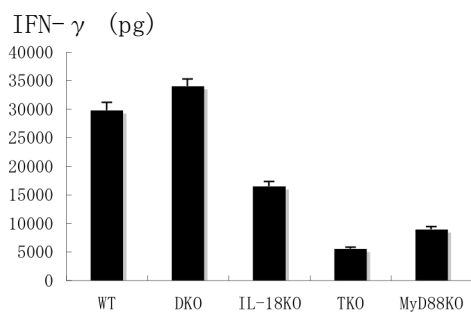


図7・脾臓内のIFN- γ 量 (感染3日後)

表1・脾臓内の菌数 (感染3日後)

Mouse strains	CFU \pm SD
WT	$3.40 \times 10^4 \pm 1.34 \times 10^4$
IL-18KO	$0.38 \times 10^4 \pm 0.05 \times 10^4$
DKO	$7.51 \times 10^4 \pm 1.12 \times 10^4$
TKO	$16.27 \times 10^4 \pm 4.11 \times 10^4$
MyD88KO	$8.64 \times 10^6 \pm 1.88 \times 10^6$

本研究において、リステリアに対する宿主

防御に関わると予想される TLR2、TLR9 および IL-18 を同時に欠損する三重欠損マウスを作製してリステリアへの抵抗性を解析した。このマウスでの感受性亢進は有意に認められたが非常に限定的であったことから、TLR2、TLR9 および IL-18 が防御に貢献することは確実であるがこれら以外の MyD88 依存的レセプター分子の働きだけでもリステリアに対する宿主防御はほぼ完全に保たれることがわかった。本研究の結果からは TLR2、TLR9 および IL-18 が MyD88 依存的な IFN- γ 誘導の中心を担うことが示されたが、IFN- γ 産生応答の低下が MyD88 欠損マウスの著しい感染抵抗性低下の原因になっている訳ではない事が明らかになった。防御に必須の内因性 IFN- γ は、MyD88 非存在下でも感染において微量誘導されることから、TLR2、TLR9 および IL-18 以外の MyD88 依存的レセプター分子は、そのような MyD88 非依存的に誘導される IFN- γ と強調的に働くことで防御に貢献すると思われる。このことから、リステリアに対する宿主防御が機能的に重複した複数の MyD88 依存的レセプターによって成り立っており非常に安定していることが明らかになった。しかしながら、in vivo においては IL-1 β 、IL-6 および TNF α などの炎症性サイトカインは感染によって MyD88 非存在下でも誘導されるため、これらの産生誘導に関わると予想される TLR2 および TLR9 以外の TLR (TLR5 や TLR7) の関与は限定的であるとも予想できる。一方、TLR-MyD88 非依存的に誘導される IL-1 β は、そのレセプターがシグナルを下流に伝える際にアダプターとして MyD88 を必要とするため、IL-1 のシグナルが TLR2、TLR9 および IL-18 の非存在下における宿主防御の中心を担う可能性が考えられる。IL-1 β および IL-18 は共にリステリアがマクロファージの細胞質に侵入した際に形成されるインフラマソームにおいて caspase-1 依存的に成熟化されるが、caspase-1 欠損マウスは MyD88 欠損マウスのように著しい感染抵抗性低下を示さないことが知られている。TLR の活性化とインフラマソームの活性化という独立した経路が補償的に働くことで細胞内寄生菌であるリステリアに対して強固且つ安定的な宿主防御が発揮されるのかもしれない。

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 4 件)

- ① Hara H, Tsuchiya K, Nomura T, Kawamura I, Shoma S, Mitsuyama M. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes*

- on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. *The Journal of Immunology*. 180: 7859-7868. 2008 (査読あり).
- ② Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, Nomura T, Hara H, Uchiyama R, Daim S, Mitsuyama M. Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infection and Immunity*. 76: 1547-1557. 2008 (査読あり).
- ③ Hara H, Kawamura I, Nomura T, Tominaga T, Tsuchiya K, Mitsuyama M. Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against *Listeria monocytogenes* infection: distinct role of listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement. *Infection and Immunity*. 75: 3791-3801. 2007 (査読あり).
- ④ Uchiyama R, Kawamura I, Fujimura T, Kawanishi M, Tsuchiya K, Tominaga T, Kaku T, Fukasawa Y, Sakai S, Nomura T, Mitsuyama M. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 75: 2894-2902. 2007 (査読あり).

[学会発表] (計4件)

- ① Tsuchiya K., Nomura T., Hara H., Shen Y., Sakai S., Kurenuma T., Yamamoto T., Kawamura I., and Mitsuyama M. MyD88 signals are essential but redundant in host defense against *Listeria monocytogenes*. 第82回日本細菌学会総会、2009年3月12日、愛知県名古屋市
- ② Tsuchiya K., Shoma S., Kawamura I., Nomura T., Mitsuyama M. Critical involvement of pneumolysin in the production of caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae*. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2008年9月7日、兵庫県淡路市
- ③ Tsuchiya K., Kawamura I., Nomura T., Mitsuyama M. Critical involvement of pneumolysin in the production of caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae*. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2008年8月5日、イスタンブール・トルコ
- ④ Tsuchiya K., Kawamura I., Nomura T., Hara H., Mitsuyama M. Escape of *Listeria monocytogenes* producing broad-range phospholipase C from autophagy-dependent killing. 日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月21日、東京・品川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 晃介 (TSUCHIYA KOHSUKE)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50437216