

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790333  
 研究課題名 (和文) リステリア主要病原因子に依存した感染宿主細胞からの活性型IL-18誘導機構の解析  
 研究課題名 (英文) The study on mechanism of listeriolysin O-dependent IL-18 production induced by *Listeria* infection  
 研究代表者 原 英樹 (HARA HIDEKI)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：30456892

研究成果の概要 (和文)：細菌感染において caspase-1 の活性化は IL-1 や IL-18 を含む様々な炎症誘導因子を細胞外へと分泌し、宿主の免疫応答を惹起するための重要なプロセスである。今回我々の研究から、リステリア感染で誘導される caspase-1 活性化に DNA センサーとして知られている AIM2 が関与することが証明され、細菌由来の DNA が細胞内で認識されている可能性が示唆された。また、主要病原因子 listeriolysin O はこれらを介した caspase-1 活性化を促進させていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Caspase-1 plays an important role in the activation of host immune response through the secretion of pro-inflammatory cytokines including IL-1 and IL-18 in bacterial infection. Based on our results, we concluded that AIM2, which is known as a DNA sensor, is involved in caspase-1 activation induced by *Listeria* infection and the response is enhanced by listeriolysin O.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) グラム陽性桿菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) 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。本菌は、マクロファージ系食細胞に貪食されても、主要病原因子である膜傷害性タンパク listeriolysin O (LLO) を

産生することで食胞膜を傷害し、細胞質へとエスケープして細胞内殺菌を回避する。本菌が宿主に感染すると免疫応答の1つとして感染防御に重要な IFN-gamma が産生誘導される。感染初期に産生される IFN-gamma は NK 細胞に由来しており、マクロファージから産生される IL-12 や IL-18 によって NK 細胞が活性

化されることで産生が惹起される。

(2) これまで申請者の所属する研究室ではリステリアの IFN-gamma 産生誘導因子の探索を試みており、2007年にリステリアが産生する LL0 がこの IFN-gamma 産生に関与していることを報告した (Hara H, et al. *Infect. Immun.* 2007)。また、IFN-gamma 産生誘導因子のうち、IL-12 は LL0 非依存的に産生されるが、IL-18 は LL0 依存的に産生されていることを明らかにした。しかしながら、その誘導機構については不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究は、感染マクロファージにおけるリステリアで誘導される IL-18 産生機構の解明、および主要病原因子である LL0 がどのようなメカニズムで IL-18 産生誘導に関与しているのか明確にする目的で行った。

## 3. 研究の方法

(1) リステリア野生株を ASC 欠損マクロファージに感染させ、リステリア感染で誘導される IL-18 産生が ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 依存的なものであるか検討した。IL-18 産生量は ELISA 法により測定した。また IL-18 の成熟化に重要な caspase-1 の活性化についても活性型の caspase-1 p10 フラグメントをウエスタンブロット法で検出することにより確認した。

(2) リステリア感染による caspase-1 活性化や IL-18 産生が ASC 依存的であることを確認したのち、さらに上流の細胞内アダプター分子を同定するため、siRNA で候補となる細胞内分子の発現をノックダウンし、リステリア感染後の caspase-1 活性化および IL-18 産生に違いが出るか調べた。

(3) リステリアの主要病原因子である LL0 が IL-18 の成熟化に重要な caspase-1 の活性化に関与しているのか調べるために、LL0 遺伝子を LL0 類縁体の ivanolysin 0 (ILO) 遺伝子に置き換えたリステリア株を作製し、マクロファージに感染後、caspase-1 の活性化に変化があるか調べた。また LL0 のどの領域が重要であるのか調べるために、LL0 の各ドメインを ILO の相対する部位と置換したキメラタンパクを発現するリステリア組換え株を構築し、LL0 の IL-18 産生誘導における責任領域を絞り込んだ。

## 4. 研究成果

(1) リステリア感染で誘導される IL-18 産生は、caspase-1 のアダプター分子として知られている ASC を欠損させると非感染レベル

まで低下することから、完全に ASC 依存的であることを確認した (図 1)。そこで ASC 依存的に caspase-1 を活性化する細胞内分子に焦点を絞り siRNA を用いてスクリーニングを行ったところ、現在関与が示唆されている Nlrp3 及び Nlrc4 の他に AIM2 が強く関与するという結果が得られた (図 2)。この AIM2 は近年細胞内 DNA センサーとしての機能が報告されており、細胞内寄生菌であるリステリアの DNA が宿主細胞内で認識されている可能性が示唆された。

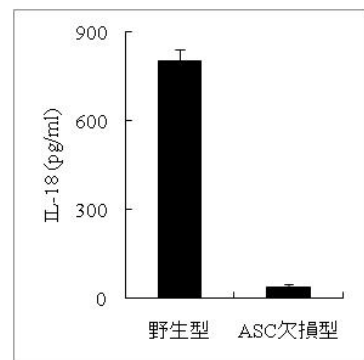


図 1

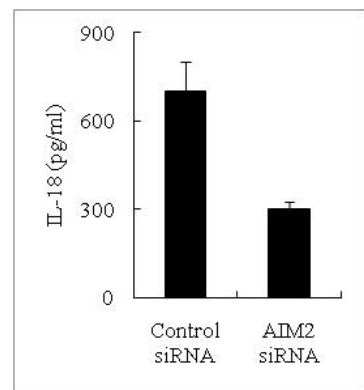


図 2

(2) 感染細胞での caspase-1 活性化に関わる菌側の要因として LL0 の関与を検討するために、LL0 を ILO に置き換えたリステリア株 (ILO 相補株) を作製し、それらの caspase-1 活性化能を比較したところ、ILO を発現する株では有意に caspase-1 の活性化が減弱していた (図 3)。そこで、この LL0 分子内の caspase-1 活性化における責任領域を絞り込むために、様々な変異を加えた LL0 を発現するプラスミドを ILO 相補株に導入して各組換え LL0 を発現させ、その caspase-1 活性化能

を比較したところ、LLO を構成する 4 つのドメインのうち、ドメイン 4 (D4) は不要であること、つまり細胞傷害活性は caspase-1 活性化誘導には関与していないことが明らかとなった (図 4)。

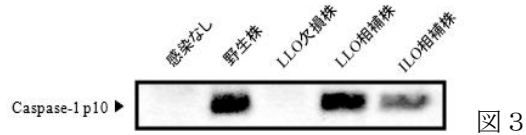


図 3

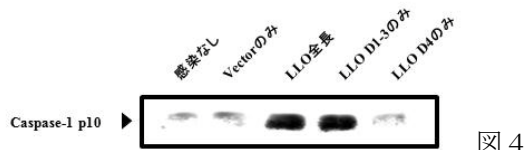


図 4

以上の結果から、リステリア感染を認識する細胞内分子として新たに AIM2 の関与が証明され、細菌由来の DNA がリガンドになっている可能性が示唆された。また、AIM2 は 1 型 IFN を介して発現が上昇することが知られており、LLO を発現するリステリアは ILO を発現するものより 1 型 IFN の産生誘導能が高いことから、上記の細胞内での DNA 認識効率が LLO によって亢進されていることが考えられた。

(3) 細菌感染モデルにおいて、細菌の主要病原因子が宿主免疫応答の誘導にも関与しているという報告は世界で初めてであり、今回の研究の発端となった申請者の最初の報告は米国細菌学会誌でもハイライトとして取り上げられている (Microbe, Sep. 2007)。この研究で用いているリステリアは細胞内寄生を特徴とし、極めて強い T 細胞依存的な防御免疫を宿主に賦与することから、近年、ワクチンや遺伝子治療のベクターとしての利用が注目されている。LLO の免疫誘導活性の詳細な分子機構が解明されれば、単に学術的な興味にとどまらず、より効率的かつ安全なワクチン・遺伝子治療用ベクターの開発にとっても有用な知見となることが期待される。

##### 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 6 件)

1. Involvement of absent in melanoma 2 (AIM2) in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. Tsuchiya K, Hara H, Kawamura I, Nomura T, Yamamoto T, Daim S, Dewamitta SR, Shen Y, Fang R, Mitsuyama M. *J. Immunol.* 2010. Accepted. 査読有
2. Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages. Shen Y, Kawamura I, Nomura T, Tsuchiya K, Hara H, Dewamitta SR, Sakai S, Qu H, Daim S, Yamamoto T, Mitsuyama M. *Infect. Immun.* 78: 2857-2867. 2010. 査読有
3. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into cytoplasm is required for calpain activation and IL-1 $\alpha$  secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. Dewamitta SR, Nomura T, Kawamura I, Hara H, Tsuchiya K, Kurenuma T, Shen Y, Daim S, Yamamoto T, Qu H, Sakai S, Xu Y, Mitsuyama M. *Infect. Immun.* 78: 1884-1894. 2010. 査読有
4. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. Kurenuma T, Kawamura I, Hara H, Uchiyama R, Daim S, Dewamitta SR, Sakai S, Tsuchiya K, Nomura T, Mitsuyama M. *Infect. Immun.* 77: 3992-4001. 2009. 査読有
5. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. Hara H, Tsuchiya K, Nomura T, Kawamura I, Shoma S, Mitsuyama M. *J. Immunol.* 180: 7859-7868. 2008. 査読有
6. Critical involvement of pneumolysin in production of IL-1 $\alpha$  and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, Nomura T, Hara H, Uchiyama R, Daim S, Mitsuyama M. *Infect. Immun.* 76: 1547-1557. 2008. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 原 英樹、Listeriolysin O contributes to inflammasome formation through the phosphorylation of Syk、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
2. 原 英樹、Participation of LL0-dependent IFN-beta production in caspase-1 activation during *Listeria monocytogenes* infection、第 8 回感染症沖縄フォーラム、2010 年 2 月 11 日、フェストーネ(沖縄県)
3. 原 英樹、LL0 participates in caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages via induction of IFN-beta production、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日、グランキューブ(大阪府)
4. 原 英樹、Involvement of LL0-dependent IFN-beta production in caspase-1 activation during *Listeria monocytogenes* infection、第 62 回日本細菌学会関西支部総会、2009 年 11 月 14 日、大阪府立大学(大阪府)
5. 原 英樹、Participation of listeriolysin O in caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes* infection、The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity、2009 年 9 月 8 日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)
6. 原 英樹、LL0-induced IFN-beta production is critical for IL-18 secretion in *Listeria* infection、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 12 日、名古屋国際会議場(愛知県)
7. 原 英樹、リステリア感染マクロファージで誘導される caspase-1 活性化における listeriolysin O の関与、第 7 回感染症沖縄フォーラム、2009 年 2 月 12 日、那覇市青年会館(沖縄県)
8. 原 英樹、Involvement of listeriolysin O in caspase-1 activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1 日、京都国際会館(京都府)
9. 原 英樹、Involvement of listeriolysin O on caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes* infection、The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity、2008 年 9 月 8 日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)
10. 原 英樹、Involvement of listeriolysin O on caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes* infection、Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2008、2008 年 8 月 5 日、Istanbul(Turkey)
11. 原 英樹、リステリア感染で誘導される宿主 caspase-1 活性化における listeriolysin O の関与、第 19 回日本生体防御学会学術総会、2008 年 7 月 10 日、北海道大学(北海道)
12. 原 英樹、リステリア感染マクロファージで誘導される IL-18 産生における listeriolysin O の関与、第 82 回日本感染症学会総会、2008 年 4 月 17 日、島根県民会館(島根県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原 英樹 (HARA HIDEKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30456892