

BCG 生菌による Th1 型防御免疫誘導における

生菌由来分化誘導因子の同定とその機構

(課題番号 13670270)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成15年5月

研究代表者 河村伊久雄

(京都大学大学院医学研究科助手)

京都大学図書



9810059454

附属図書館

本研究の背景・目的と成果の概要

結核菌やリステリアなどいわゆる細胞内寄生菌に対しては、細胞性免疫がその防御の主体となることが旧来より知られている。しかし、この防御免疫がなぜ生菌で免疫した場合にのみ誘導され、死菌や菌体成分では認められないのかは重要な命題でありながら明らかではなかった。我々はこの点を明らかにするため、リステリアを用いて感染後のサイトカイン産生応答を中心に解析を行ってきた。その結果、リステリア感染に対する防御免疫の誘導には、感染早期に産生される IFN- γ が重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Infect. Immun. 65: 72-77, 1997)。また、この IFN- γ 産生を指標にして、リステリア感染ではリステリオリシン O が病原因子としてだけでなく、内因性 IFN- γ 産生を誘導することにより感染防御の成立にも関与する重要な因子であることを示すことができた (Infect. Immun. 64: 3188-3195, 1996, Infect. Immun. 67: 568-575, 1999)。

一方、*Mycobacterium bovis* BCG 感染初期、あるいは BCG 生菌でマウス脾細胞を刺激すると、リステリア感染の場合と同様に強い IFN- γ 産生が誘導される (Immunology 91: 529-535, 1997, J. Immunol. 155: 5728-5735)。この IFN- γ 産生は死菌刺激では認められず、感染早期に産生される IFN- γ を抗体で中和することにより、BCG に対する防御免疫誘導が阻害されることもこれまでの研究で明らかになった。これらの結果は、細胞内寄生菌に対する防御免疫の誘導には IFN- γ が普遍的に重要な役割を果たすことを示唆するものであるが、一方 BCG のどのような因子がこのサイトカイン産生誘導に関与するのかは今のところ不明である。

そこで本研究ではこれまでに得られた知見を基に、感染早期の IFN- γ 産生に関与する BCG 由来因子を同定し、そのサイトカイン産生のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的として解析を行った。また、本研究の2年目には結核菌にも BCG 同様の活性が認められるか否かについて検討した。以下に、本研究でこれまでに得られた成果の概要を示す。

1. BCG 生菌でマウス正常脾細胞を刺激した場合には IFN- γ 産生が誘導されるが、この主要な産生細胞は NK 細胞である。この IFN- γ 産生は抗 IL-12 抗体および抗 IL-18 抗体で抑制されたことから、BCG はマクロファージを活性化し、その結果産生された IL-12 および IL-18 が NK 細胞からの IFN- γ 産生を誘導したことが明らかとなった。
2. BCG および結核菌細胞壁には強いアジュバント活性があるが、BCG 死菌刺激では IFN- γ 産生が誘導されないことから、BCG 生菌で誘導さ

れる IFN- γ 、IL-12 および IL-18 などの Th1 型サイトカイン産生は菌体構成成分に対して誘導された反応ではなく、生菌特有な因子が関与するものと考えられた。その因子について解析を進めた結果、BCG 生菌培養 1 日目の上清中に IL-12p40 産生を誘導する活性が存在することが明らかとなった。この活性は proteinase K 処理により抑制されたが、コントロールレベルまでは低下しなかったことから、BCG 培養上清中には IL-12p40 産生誘導能を有するタンパク性および非タンパク性因子が存在することが示された。

3. 結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv 早期培養上清中にも BCG の場合と同様に IL-12p40 産生誘導活性が認められた。また、結核菌の場合もタンパク性および非タンパク性分泌成分が IL-12p40 産生誘導に関与しており、分子量 10-50kDa および 90-100kDa 付近にその活性が存在することが示された。
4. IL-12p40 の発現に必須な転写因子である NF- κ B の活性化を指標にしたレポーターアッセイにより、IL-12 産生誘導のメカニズムを解析した。その結果、BCG および結核菌培養上清は Toll-like receptor 2 (TLR2) を発現した細胞の NF- κ B を活性化したが、TLR4 を発現した細胞の NF- κ B の活性化は誘導しなかった。

以上の結果から、BCG および結核菌由来の分泌成分は TLR2 を介して IL-12 産生を誘導することが示され、これが結果的に IFN- γ 産生を惹起するものと考えられた。これら因子は培養早期より上清中に分泌されたことから、実際の感染においてもマクロファージに取り込まれた後、ファゴソーム内で早期に産生され、その機能を発揮するものと推定される。また、IL-12p40 誘導因子の病原因子としての役割は今のところ明らかではないが、BCG や結核菌によるファゴソームの成熟阻害に何らかの役割を果たす可能性も考えられ、本研究で得られた知見は菌とマクロファージの *interaction* のダイナミズムを解明する上で大変重要な情報であると考えている。

研究組織

研究代表者：河村伊久雄（京都大学医学研究科助手）

研究分担者：光山 正雄（京都大学医学研究科教授）

（研究協力者：角 泰人、幸田 力、野村卓正、土屋晃介、伊藤 穰、木本てるみ、馬場尚志、渡辺勇夫、富永隆生、山本一宏）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	2,400	0	2,400
平成14年度	900	0	900
総計	3,300	0	3,300

研究発表

（1）学会誌等

Kimoto, T., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura T., Tsuchiya, K., Ito, Y., Watanabe, I., Kaku, T., Setianingrum, E., and Mitsuyama, M. Differences in gamma interferon production induced by listeriolysin O and ivanolysin O result in different levels of protective immunity in mice infected with *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infection and Immunity* 71:2447-2454, 2003.

Ito, Y., Kawamura, I., Kohda, C., Baba, H., Nomura, T., Kimoto, T., Watanabe, I., and Mitsuyama, M. Seeligeriolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria seeligeri*, induces gamma interferon from spleen cells of mice. *Infection and Immunity* 71: 234-241, 2003.

Nomura, T., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Kohda, C., Baba, H., Ito Y., Kimoto, T., Watanabe, I., and Mitsuyama, M. Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells. *Infection and Immunity* 70: 1049-1055, 2002.

Kohda, C., Kawamura, I., Baba, H., Nomura, T., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., and Mitsuyama, M. Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*

70: 1334-1341, 2002.

Baba, H., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura, T., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., Ichiyama, S., and Mitsuyama, M. Induction of gamma interferon and nitric oxide by truncated pneumolysin that lacks pore-forming activity. *Infection and Immunity* 70: 107-113, 2002.

Ito, Y., Kawamura, I., Kohda, C., Baba, H., Kimoto, T., Watanabe, I., Nomura, T., and Mitsuyama, M. Difference in cholesterol-binding and cytolytic activities between listeriolysin O and seeligeriolysin O: a possible role of alanine residue in tryptophan-rich undecapeptide. *FEMS Microbiology Letters*. 203: 185-189, 2001.

Baba, H., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura, T., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., Ichiyama, S., and Mitsuyama, M. Essential role of domain 4 of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in cytolytic activity as determined by truncated proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 281: 37-44, 2001.

Chitale, S., Ehrt, S., Kawamura, I., Fujimura, T., Shimono, N., Anand, N., Lu, S., Cohen-Gould, L., Riley, L. W. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cellular Microbiology* 3: 247-254, 2001.

Ishiguro, T., Naito, M., Yamamoto, T., Hasegawa, G., Gejo, F., Mitsuyama, M., Suzuki, H., and Kodama, T. Role of macrophage scavenger receptors in response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *American Journal of Pathology* 158: 179-188, 2001.

Tachibana, T., Matsuyama, T., Ito, M., and Mitsuyama, M. *Sporothrix schenckii* thermo-tolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. *Medical Mycology* 39: 295-298, 2001.

光山正雄 : リステリア感染の分子機構と宿主の応答 *Molecular Medicine* 39: 164-171, 2002.

光山正雄 : リステリアの宿主認識・細胞内動態と宿主サイトカイン応答

細胞工学 21: 170-176, 2002.

伊藤穰、光山正雄：非結核性抗酸菌の感染成立の機序 呼吸 (Respiration Research) 21: 43-47, 2002.

光山正雄：特集：感染症 2. 多剤耐性化と病原性の変容 日本内科学会雑誌 90: 163-168, 2001.

光山正雄：未だ謎多き結核菌、現実間近な DNA ワクチン ～結核蔓延の構図と根本対策 医薬ジャーナル社 37: 218-226, 2001.

光山正雄：細胞内寄生菌のエスケープ機構と細菌性モジュリン 医学のあゆみ 197: 868-869, 2001.

河村伊久雄、光山正雄：抗酸菌の細胞内感染の分子機構 科学療法の領域 17: 1-7, 2001.

光山正雄：細胞内寄生性細菌のエスケープ機構と新たな感染対応戦略の展望 日本臨床 59: 1013-1021, 2001.

光山正雄、河村伊久雄、幸田力：リステリアの膜傷害毒素と免疫系の相互作用 蛋白質・核酸・酵素 46: 556-561, 2001.

(2) 口頭発表

Ikuo Kawamura: A heat-stable factor from viable *M. bovis* BCG responsible for induction of both IFN- γ production and protective immunity. The 36th Tuberculosis and Leprosy research conference. 2001.7.16.

河村伊久雄、角泰人、光山正雄：BCG 生菌特有の IFN- γ 産生誘導因子の解析. 第 12 回日本生体防御学会学術集会 2001.8.24.

野村卓正、幸田力、伊藤穰、河村伊久雄、光山正雄：listeriolysin O が示す膜傷害活性の pH 感受性とその機構. 第 54 回日本細菌学会関西支部総会 2001.10.27.

伊藤穰、河村伊久雄、幸田力、野村卓正、光山正雄：チオール活性型溶血毒素 seeligeriolysin O と listeriolysin O に共通する IFN- γ 産生誘導能. 第 54 回日本細菌学会関西支部総会 2001.10.27.

木本てるみ、河村伊久雄、幸田力、光山正雄：リステリアに対する感染防御免疫誘導における thiol-activated cytolysin の重要性. 第31回日本免疫学会総会 2001.12.11.

藤村響男、河村伊久雄、Riley, L. W., 宮田聡子、松浦智寛、松澤幹男、藤岡憲生：AIDA 法を用いた結核菌 mce 領域の組み換え発現と抗体による侵入抑制効果の検討. 第31回日本免疫学会総会 2001.12.12.

角泰人、河村伊久雄、土屋晃介、光山正雄：*M. bovis* BCG 由来 Th1 型サイトカイン産生誘導因子の解析. 第31回日本免疫学会総会 2001.12.12.

伊藤穰、河村伊久雄、幸田力、野村卓正、光山正雄：チオール活性型溶血毒素 seeligeriolysin O と listeriolysin O に共通する IFN- γ 産生誘導機構. 第31回日本免疫学会総会 2001.12.12.

野村卓正、河村伊久雄、土屋晃介、光山正雄：*Listeria monocytogenes* 感染防御の誘導における IL-18 の役割. 第31回日本免疫学会総会 2001.12.12.

土屋晃介、野村卓正、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：RAW264 細胞のサイトカイン産生応答におけるリステリア死菌体刺激とリステリア生菌分泌性因子の相乗効果. 第31回日本免疫学会総会 2001.12.12.

Ikuo Kawamura : Molecular mechanism in cytokine response against Listeriolysin O of *Listeria monocytogenes* and allied protein toxins and its implication in host defense. 第31回日本免疫学会総会シンポジウム 2001.12.13.

河村伊久雄、光山正雄：リステリアの病原因子と宿主感染防御免疫. 第75回日本細菌学会総会シンポジウム 2002.4.4.

幸田力、野村卓正、伊藤穰、馬場尚志、河村伊久雄、光山正雄：チオール活性型膜傷害毒素の細胞膜傷害活性に与える pH の影響. 第75回日本細菌学会総会 2002.4.4.

渡辺勇夫、河村伊久雄、幸田力、光山正雄：化膿レンサ球菌由来 SLO を

定量的に測定する EIA の確立. 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.4.

伊藤穰、土屋晃介、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：チオール活性型溶血毒素 seeligeriolysin O による NO 産生誘導. 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.4.

土屋晃介、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：リステリア死菌体刺激によるサイトカイン産生応答を促進するリステリア生菌分泌性因子. 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.4.

野村卓正、幸田力、伊藤穰、河村伊久雄、光山正雄：Listeriolysin O が示す細胞膜傷害活性のアルカリ側 pH 感受性の分子機構. 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.5.

小林稔、伊藤穰、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：TH1 型サイトカイン産生誘導におけるリステリア病原因子の重要性 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.5.

木本てるみ、河村伊久雄、幸田力、光山正雄：リステリア由来溶血素のサイトカイン誘導能における N 末端配列の重要性. 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.5.

角泰人、河村伊久雄、土屋晃介、光山正雄：BCG 生菌由来因子の Th1 型サイトカイン産生誘導機構の解析. 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.5.

馬場尚志、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：膜傷害活性を欠如した pneumolysin によるマウス脾細胞に対する IFN- γ と NO 産生の誘導 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.5.

竹内修、鈴木達彦、山田美恵子、河村伊久雄、光山正雄：Yersinia enterocolitica 感染防御の誘導における病原性プラスミドの役割について. 第 75 回日本細菌学会総会 2002.4.5.

木本てるみ、河村伊久雄、幸田力、光山正雄：リステリア由来 cytolysin のサイトカイン誘導能における N 末端配列の重要性. 第 13 回日本生体防御学会学術集会 2002.7.11

野村卓正、河村伊久雄、土屋晃介、光山正雄：*Listeria monocytogenes* 感染に対する防御免疫誘導における IL-18 の役割。第 13 回日本生体防御学会学術集会 2002.7.11.

Ikuo Kawamura and Masao Mitsuyama: Molecular mechanism of cytokine induction by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. The 10th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2002.7.31.

Ikuo Kawamura: Possible involvement of *Mycobacterium bovis* BCG-producing TLR2 ligand to generate protective immunity by inducing endogenous IFN- γ production. The 37th Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2002.8.22.

Chikara Kohda, Ikuo Kawamura, Terumi Kimoto, Yutaka Ito, Takamasa Nomura and Masao Mitsuyama: Cytokine-inducing activity of *Listeria monocytogenes* mutant strains harboring plasmid encoding various listeriolysin O derivatives. The 6th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2002.11.8.

Takamasa Nomura, Ikuo Kawamura and Masao Mitsuyama: Role of IL-18 in the protection of mice against infection with *Listeria monocytogenes*. The 6th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2002.11.8.

木本てるみ、河村伊久雄、幸田力、光山正雄：リステリア由来膜傷害毒素 listeriolysin O と ivanolysin O のサイトカイン産生誘導能の違いと N 末端アミノ酸配列との関係。第 32 回日本免疫学会総会 2002.12.5.

幸田力、木本てるみ、野村卓正、伊藤穰、河村伊久雄、光山正雄：各種 mutant リステリオリシン O を組み込んだ *Listeria monocytogenes* 変異株のサイトカイン誘導活性。第 32 回日本免疫学会総会 2002.12.5.

土屋晃介、幸田力、木本てるみ、河村伊久雄、光山正雄：リステリア菌体および listeriolysin O 刺激によって誘導される TLR 非依存的な NF- κ B の活性化。第 32 回日本免疫学会総会 2002.12.5.

伊藤穰、土屋晃介、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：*L. seeligeri* 由来タ

ンパク LSO に対するサイトカイン応答の TLR 依存性と既知 TLR リガンドに対するサイトカイン応答パターンの比較. 第 32 回日本免疫学会総会 2002.12.5.

河村伊久雄、幸田力、伊藤穰、木本てるみ、土屋晃介、野村卓正、光山正雄 : Listeriolysin O による TH1 サイトカイン産生誘導の分子機構. 第 32 回日本免疫学会総会 2002.12.5.

角泰人、河村伊久雄、土屋晃介、光山正雄 : *Mycobacterium bovis* BCG 生菌由来因子による IL-12 産生応答の TLR2 依存性. 第 32 回日本免疫学会総会 2002.12.5.

野村卓正、河村伊久雄、光山正雄 : *Propionibacterium acnes* 感作によって誘導される *Listeria* 感染抵抗性の亢進とその機序. 第 32 回日本免疫学会総会 2002.12.5.

土屋晃介、幸田力、木本てるみ、河村伊久雄、光山正雄 : *Listeria monocytogenes* 由来 listeriolysin O の膜傷害活性に依存した NF- κ B 活性化の誘導. 第 76 回日本細菌学会総会 2003.4.2.

幸田力、河村伊久雄、伊藤穰、木本てるみ、光山正雄 : *Listeria monocytogenes* 由来 listeriolysin O のマクロファージ内活性発現のメカニズム. 第 76 回日本細菌学会総会 2003.4.2.

小林稔、伊藤穰、幸田力、河村伊久雄、光山正雄 : リステリア感染後の菌の細胞内動態とサイトカイン産生誘導パターンの関連性. 第 76 回日本細菌学会総会 2003.4.2.

角泰人、河村伊久雄、Juthaporn Kohwiwattanagun、光山正雄 : *Mycobacterium tuberculosis* 生菌由来 TH1 サイトカイン産生誘導因子の解析. 第 76 回日本細菌学会総会 2003.4.2.

河村伊久雄、幸田力、伊藤穰、木本てるみ、土屋晃介、野村卓正、光山正雄 : リステリオリシン O による Th1 サイトカイン産生誘導機構の解析. 第 76 回日本細菌学会総会 2003.4.2.

富永隆生、河村伊久雄、伊藤穰、光山正雄 : Bacterial modulin としての seeligeriolysin O の Th1 型防御免疫誘導能の解析. 第 76 回日本細菌

学会総会 2003.4.2.

伊藤穰、土屋晃介、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：*Listeria seeligeri*由来タンパク LSO と既知 TLR リガンドのサイトカイン産生応答パターンの比較. 第76回日本細菌学会総会 2003.4.2.

(3) 出版物

河村伊久雄、光山正雄：Annual Review 呼吸器 2003 (分担) 中外医学社 2003.1.30

光山正雄、河村伊久雄：感染症の宿主防御機構 —理論と実際— (分担) 医薬ジャーナル社 2002.7.10

光山正雄、河村伊久雄：別冊・医学のあゆみ 免疫疾患 ver.2 (分担) 医歯薬出版社 2002.3.25

光山正雄、幸田力：細菌毒素ハンドブック (分担) サイエンスフォーラム社 2002.2.28

光山正雄：臨床微生物学ハンドブック (監修) 医薬ジャーナル社 2001.6.25

研究成果による工業所有権の出願・取得状況
なし