

氏 名	い とう ゆたか 伊 藤 穰
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2599 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Seeligeriolysin O, a cholesterol - dependent cytolysin of <i>Listeria seeligeri</i> , induces gamma interferon from spleen cells of mice. (<i>Listeria seeligeri</i> 由来コレステロール依存性溶血毒素 Seeligeriolysin O によるマウス脾細胞からの IFN- γ 産生機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 西 沢 光 昭 教 授 光 山 正 雄

論 文 内 容 の 要 旨

Listeria seeligeri により産生されるコレステロール依存性溶血毒素 seeligeriolysin O (LSO) は *L. monocytogenes* により産生される listeriolysin O (LLO) とアミノ酸配列で80%の相同性を示す。申請者の所属する研究室では、LLO が従来知られた細胞傷害活性に加え、サイトカイン誘導活性を有することを示してきた。LSO がこれら2つの活性を有するかどうかを明らかにする目的で、にりコンビナント LSO (rLSO530) と細胞傷害活性に重要な undecapeptide より C 末端側を切断し、細胞傷害活性が失われた LSO (rLSO483) を作製し、リコンビナント LLO (rLLO) と比較した。細胞傷害活性はそれぞれのリコンビナントタンパクで C3H/HeN マウス脾細胞を6時間刺激した後の培養上清中の LDH 量から算定し、サイトカイン誘導活性は、脾細胞を刺激24時間後の培養上清中の IFN- γ 量を ELISA 法で測定することにより検討した。細胞傷害活性を有する rLSO530 は、コレステロールによる前処置にて細胞傷害活性を抑えると脾細胞からの IFN- γ 産生を強く誘導した。さらに、細胞傷害活性を示さない rLSO483 も IFN- γ 産生を誘導したことから、undecapeptide 以下 C 末端側は細胞傷害活性には必須であるが、サイトカイン誘導には必須ではないことが示された。これらのリコンビナントタンパクに含まれる LPS はごく微量で、同等の量の LPS では IFN- γ 産生を誘導できず、また LPS を中和するポリミキシン B を添加しても IFN- γ 産生に変化なかったことから LPS の関与は否定された。抗 LLO ポリクローナル抗体は LLO により誘導される IFN- γ 産生を抑制し、さらに LSO により誘導される IFN- γ 産生も抑制したことから、LLO と LSO は IFN- γ 産生に必要な活性部位を共有していることが示唆された。Micro Beads に結合した抗 NK 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD11c 抗体を用いて、脾細胞から NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞を除去し、それぞれの細胞分画を LSO で刺激したところ、IFN- γ 産生誘導は全脾細胞を刺激した時より低く、LSO により誘導される IFN- γ 産生には NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞のいずれが必要であると考えられた。脾細胞では rLSO 刺激により IFN- γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α の mRNA の発現が増強され、CD11b 陽性細胞では IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12 p35、IL-12 p40、IL-18、TNF α の発現が増強されたが、IFN- γ の発現は認めなかった。また、CD11b 陽性細胞を除去した細胞分画 (CD11b 陰性細胞) では、LSO 刺激しても IFN- γ を含めいずれのサイトカインも発現を認めなかった。このことから、IFN- γ 産生には CD11b 陽性細胞と CD11b 陰性細胞の両者が必要であると考えられた。CD11b 陽性細胞を LSO で刺激した時に発現を認めたサイトカインのうちいずれが IFN- γ 産生に重要なのかを知るために、これらのサイトカインに対する中和抗体を添加し、脾細胞を LSO で刺激したところ、抗 IL-12 p70 と抗 IL-18 抗体を添加した場合に IFN- γ 産生の抑制が認められ、IL-12 と IL-18 が重要であると考えられた。これらの結果は、LLO 刺激による IFN- γ 産生の時と同様の結果であり、LSO は LLO と同様の生物活性を有することが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞内寄生菌であるリステリア属細菌は膜傷害性蛋白毒素を産生し、食胞膜を傷害し、細胞質に脱出することでマクロフ

ァージ内寄生を可能としている。一方、感染宿主には TH1 依存性の強い感染防御免疫が誘導される。申請者は、リステリア属の一種である *Listeria seeligeri* が産生するコレステロール依存性タンパク毒素 seeligeriolysin O (LSO) のリコンビナント標品を作製し、膜傷害と宿主感染防御免疫成立に必須の IFN- γ 誘導の機構を解析した。

作製したリコンビナント LSO でマウス脾細胞を刺激すると IFN- γ 産生を強く誘導した。LSO のホモログである *Listeria monocytogenes* 由来の listeriolysin O (LLO) はすでに IFN- γ 産生を誘導することが知られるが、これに対する中和抗体は LSO を認識し、IFN- γ 産生を抑制した。脾細胞から DX5 陽性細胞（主に NK 細胞）、CD11b 陽性細胞（マクロファージ）、CD11c 陽性細胞（樹状細胞）を除去すると LSO 刺激による IFN- γ 産生誘導は著しく減少した。RT-PCR の解析において rLSO 刺激により CD11b 陽性細胞では IL-1, IL-12, IL-18, TNF α の mRNA の発現が増強された。IFN- γ 産生における各サイトカインに対する中和抗体添加の影響を調べた結果、抗 IL-12 p70 と抗 IL-18 抗体を添加により IFN- γ 産生の低下が認められた。以上の結果より、LSO は LLO と生物活性を共有し、マクロファージ由来の IL-12, IL-18 が NK 細胞や樹状細胞を刺激して IFN- γ 産生が誘導されることが明らかとなった。

本研究は、細菌の病原因子と宿主防御免疫の連関の一部を解明し、細菌学および感染免疫学の発展に寄与するところが大きい。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成15年2月19日実施の論文内容とそれに連関した試問を受け、合格と認められたものである。