

氏 名	つち や こう すけ 土 屋 晃 介
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2900 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 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	Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent IL-6 production in Caco-2 cells during <i>Listeria monocytogenes</i> infection <i>in vitro</i> (リステリア菌の <i>in vitro</i> での感染におけるリステリオリシン O による膜透過性亢進に依存した IL-6 の持続的産生誘導に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 沢 光 昭 教 授 一 山 智 教 授 杉 田 昌 彦

論 文 内 容 の 要 旨

リステリア (*Listeria monocytogenes*) は、土壌や家畜 (反芻動物) の腸管に棲息し、ウシやヒツジに敗血症を起こすと乳中に排菌されて乳製品の汚染の原因となる。経口的に感染したリステリアは、主に腸管を介して宿主へ侵入すると考えられており、コンプロマイズドホストや妊婦に致命的なリステリア症 (髄膜炎や脳脊髄膜炎) を起こす。リステリアの病原性には本菌の細胞内動態が深く関わっている。リステリアは、上皮細胞など多様な細胞への侵入および細胞内増殖が可能な細胞内寄生菌であり、また、マクロファージなど食細胞に貪食された場合でも、食胞膜を傷害して細胞質に脱出することで細胞内殺菌機構を回避することができる。リステリアが産生する listeriolysin O (LLO) は、本菌がマクロファージの食胞から脱出するのに必須な膜傷害毒素であるが、ヒト上皮細胞の細胞質への侵入には LLO は必須でなく、*plcA* および *plcB* 遺伝子にコードされる 2 種類のホスホリパーゼの働きのみでも十分である。

腸管上皮細胞は、リステリアの侵入の標的となる一方、様々な菌に対する障壁の役割も担っている。腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞にリステリアを感染させると、種々の炎症性サイトカインが産生される。一部は誘導性一酸化窒素合成酵素の発現誘導などを介して Caco-2 細胞のリステリア排除能を亢進させることから、腸管局所における抗リステリア防御の中心的役割を担っていると思われる。一方、LLO 分子は、膜傷害活性だけでなくマクロファージや上皮細胞、内皮細胞などからのサイトカイン産生を誘導する機能も有しており、リステリア感染細胞からのサイトカイン産生誘導に重要な役割を果たすことが報告されている。また、Toll-like receptor (TLR) は宿主細胞による菌体構成成分の認識に重要な役割を果たす分子群であるが、Caco-2 細胞は TLR2 リガンドおよび TLR4 リガンドに対して不応答性を示し、リステリア加熱死菌体にも殆ど応答しないことから、リステリア感染で誘導される Caco-2 細胞のサイトカイン産生は菌体よりも LLO の活性に強く依存している可能性が考えられる。

そこで、リステリア野生株と LLO 非産生株を Caco-2 細胞に感染させ、IL-6 mRNA の発現を解析したところ、両株の細胞内菌数が同程度に認められる場合でも、野生株感染では持続的な IL-6 mRNA 発現がみられたのに対し LLO 非産生株感染では一時的なものしかみられなかった。次に、LLO の直接的作用を調べる目的で Caco-2 細胞をリコンビナント (r) LLO 標品で刺激すると、細胞が深刻なダメージを受けない程度に細胞膜が傷害される rLLO 濃度 (1nM~4nM) で IL-6 mRNA 発現が認められ、その活性は rLLO の膜傷害性に依存していた。また、LLO は Ca^{2+} 透過性の孔を形成することが知られているが、rLLO を Caco-2 細胞に作用させた場合にも細胞内への Ca^{2+} 流入が認められ、rLLO で誘導される IL-6 mRNA 発現も Ca^{2+} キレーターで抑制された。細胞膜の透過性亢進はリステリア野生株感染でも認められ、野生株感染後期における IL-6 mRNA 発現も Ca^{2+} キレーターで抑制された。一方、LLO 非産生株感染では細胞膜の透過性亢進は認められなかった。

これらの結果から、リステリア感染で誘導される Caco-2 細胞のサイトカイン産生は、感染早期では LLO 非依存的に、

感染後期では LLO 依存的に誘導されることがわかった。LLO による感染後期のサイトカイン産生誘導の機序として、細胞内のリステリアから産生された LLO が内側から細胞膜を傷害することで細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こし、その結果炎症性サイトカインの発現に必要な NF- κ B などのシグナル伝達経路の活性化が誘導されることが考えられる。

論文審査の結果の要旨

リステリア菌は上皮細胞など多様な細胞へ侵入し細胞内増殖が可能な細胞内寄生菌であり、その過程には膜傷害性タンパクである listeriolysin O (LLO) が重要である。本研究では、リステリアを感染させた腸管上皮系細胞が示す炎症性サイトカイン産生の機構について解析した。

リステリア野生株と LLO 非産生変異株を Caco-2 細胞に感染させ IL-6 mRNA 発現を解析すると、両株の細胞内菌数が同程度の条件でも、持続的な IL-6 mRNA 発現は野生株感染においてのみしかみられなかった。LLO の直接的作用を調べる目的で Caco-2 細胞をリコンビナント (r)LLO 標品で刺激すると、細胞膜に軽度の傷害がされる 1~4nM の濃度で、膜傷害の程度に比例した IL-6 mRNA 発現が認められた。また、rLLO を Caco-2 細胞に作用させると細胞内への Ca^{2+} 流入が認められ、rLLO で誘導される IL-6 mRNA 発現も Ca^{2+} キレーターで抑制された。細胞膜の透過性亢進はリステリア野生株感染でも認められ、野生株感染後期における IL-6 mRNA 発現も Ca^{2+} キレーターで抑制された。一方、LLO 非産生株感染では細胞膜の透過性亢進は認められなかった。

これらの結果から、リステリア感染で誘導される Caco-2 細胞のサイトカイン産生は、感染早期では LLO 非依存的に、感染後期では LLO による膜傷害に依存的に誘導されることが明らかとなった。

以上の研究はリステリア菌に対する感染細胞のサイトカイン応答の機構の解明に貢献し、宿主感染防御機構の更なる理解に寄与するところが多い。したがって、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17年5月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。