

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	Dewamitta Sita Ramyamali
論文題目	Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 α secretion in macrophages infected with <i>Listeria monocytogenes</i> . (リステリア感染マクロファージにおけるカルパイン活性化とインターロイキン1 α 産生誘導には、リステリオリシンOを介した菌の細胞質内侵入が必要である)		
（論文内容の要旨） リステリアはマクロファージに食食されると一旦は食胞内に取り込まれるが、リステリオリシンO (LLO)を産生して食胞から細胞質に脱出することでマクロファージの殺菌機構を回避する。一方、マクロファージは細胞表面の Toll-like receptors (TLRs)や細胞質内の Nod-like receptors (NLRs)で侵入してくる細菌を識別し、tumor necrosis factor-α (TNF-α)、interleukin-1α (IL-1α)、IL-1β、IL-12 や IL-18 などの炎症性サイトカインを産生して自然免疫応答を惹起する。リステリアの病原性と、これらサイトカイン産生応答に関するこれまでの解析から、マクロファージの TNF-αや IL-12 産生はリステリア感染後の TLR シグナル経路の活性化により誘導されることが示されている。一方、IL-1βと IL-18はproformとして合成された後、カスパーゼ1により切断されmature formとして細胞外に分泌される。従って、これらのサイトカイン産生誘導には TLR シグナル経路の活性化に加えて、カスパーゼ1の活性化が必要となる。IL-1αはIL-1βやIL-18と同じIL-1ファミリーに属しており、これらサイトカインと同様に mature form に変換されて細胞外に分泌される。また、TLR リガンドが保持されているリステリア死菌で刺激してもそれだけでは IL-1α産生は誘導されないことから、IL-1αの場合もその産生誘導には TLR 以外のシグナルが必要になると考えられる。そこで本研究では、リステリア感染後の IL-1α産生誘導機序について解析を行った。3%チオグリコレートを腹腔内に注射して得られた腹腔滲出マクロファージにリステリアを感染させ、18時間後に培養上清中のサイトカイン量を ELISA で測定した。その結果、リステリア野生株の感染では mature IL-1α産生が強く誘導された。しかし、LLO 欠損株の感染では IL-1α mRNA の発現および proIL-1αの合成は野生株感染の場合と同程度に認められたが、mature IL-1α産生は誘導されなかった。また、Bafilomycin A1 で食胞の酸性化を阻害して LLO の膜傷害作用を抑制した場合、リステリア野生株感染で誘導される IL-1α産生が有意に低下することが示された。これらの結果から、LLO 欠損株の感染でも proIL-1αは合成されるが、IL-1αの成熟化を誘導するためには菌の細胞質への侵入が必要となることが示された。これまでの報告から、IL-1αの成熟化にはカルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインが関与することが示されている。そこで、リステリア感染マクロファージのカルパインの活性を調べたところ、LLO 欠損株感染の場合に比較して野生株の感染ではカルパインの活性化が強く誘導されることが示された。また、リステリア野生株の感染では細胞内カルシウムレベルの上昇を認めたが、LLO 欠損株の感染では認められなかった。そこで、カルシウムイオノフォアである A23187 存在下でマクロファージに LLO 欠損株を感染させたところ、IL-1α産生の著明な増加が観察された。また、マクロファージにリコンビナント LLO を作用させると、細胞内カルシウム濃度が上昇し、リコンビナント LLO 存在下でマクロファージに LLO 欠損株を感染させた場合には、IL-1α産生が誘導されることが示された。以上の結果から、リステリアは感染マクロファージの TLR/MyD88 経路を活性化し、IL-1α mRNA の発現および proIL-1αの合成を誘導する。さらに、菌は LLO を産生して細胞質内に侵入し、細胞質へのカルシウムの流入を引き起こす。その結果、カルパインが活性化され、IL-1αの成熟化および培養上清への分泌を誘導されることが示された。			

（論文審査の結果の要旨） リステリア感染に対するマクロファージのサイトカイン応答のプロフィールを調べた結果、各種炎症性サイトカインのうち、IL-1α産生分泌はリステリア野生株の感染では認められるが、食胞からエスケープできない LLO 欠損株ではみられなかった。本研究では、LLO 依存的な IL-1α 産生分泌の機構が解析された。その結果、LLO 欠損株の感染では IL-1α産生分泌は誘導されないが、IL-1α mRNA の発現および proIL-1αの合成は野生株感染の場合と同程度に認められることが明らかとなった。また、LLO 欠損株感染の場合に比較して野生株の感染では細胞内カルシウムレベルの上昇が認められ、その結果としてカルパインの活性化が強く誘導されることが示された。さらに、マクロファージにリコンビナント LLO を作用させると、細胞内カルシウム濃度が上昇し、リコンビナント LLO 存在下でマクロファージに LLO 欠損株を感染させた場合には、IL-1α産生分泌が誘導されることが示された。以上の結果から、リステリア感染マクロファージでは、病原因子 LLO 依存的な細胞質内への侵入、細胞質へのカルシウム流入、それに基づくカルパイン活性化によって、IL-1αのプロセッシングと分泌に至ることが明らかにされた。 以上の研究は、リステリアの病原因子依存的サイトカイン産生機構の解明に貢献し、細胞内寄生性細菌に対する宿主応答研究の進歩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23年1月26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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			