



# Master's Lectures – 19

## 細胞内寄生菌リステリアの病原因子と宿主免疫応答の研究

京都大学名誉教授  
日本医療研究開発機構 (AMED) プログラムオフィサー

みつ やま まさ お  
光 山 正 雄  
Masao MITSUYAMA

### はじめに

1973年(昭和48年)に九州大学医学部を卒業し医師免許を取得して最初の3年間は、九州大学温泉治療学研究所附属病院(現九州大学別府病院)と金沢大学附属病院で研修医、ジュニア医員として内科の修練を受けた。とくに武者修行に出掛けた金沢大学第3内科での半年間の研修医時代には、急性白血病などの血液疾患患者主体の診療に従事し、多くの患者を主に重症感染症で亡くした経験から、感染宿主の感染防御機構を深く知りたいとの思いがつのり、当時感染免疫学では我が国のトップレベルの研究室であった九州大学医学部細菌学教室(武谷健二教授、野本亀久雄助教授)に出向し、1976年4月から基礎研究に従事することとなった。

当時の免疫学は、抗体や補体の生化学的機構など液性免疫学から、急速に細胞性免疫学へと研究の方向が変革した時期であり、ヘルパーT細胞、キラーT細胞、アクセサリー細胞などを対象とする細胞生物学的手法による研究が主流となっていた。しかし、現在のような分子生物学的手法は未だ確立されておらず、近交系マウスとその培養細胞を用いた *in vivo*, *in vitro* の実験によるマウス免疫応答の解析が主体の、やや泥臭い実験生物学の時代であった。

私が細菌学教室に入って最初に与えられたテーマは、リステリア (*Listeria monocytogenes*) を用いたマウス感染モデルを確立し、マクロファージや好中球などの食細胞がどのように感染の進展や抑制に関わるかを解析することであった。当初は1年間だけ

の一時的な出向研究の予定であったが、リステリアを用いた実験感染学の研究が面白くなった私は、結局臨床に復帰することなく、九州大学細菌学、新潟大学細菌学、京都大学微生物感染症学にて、都合40年近くを細菌学、感染免疫学の基礎研究者として、リステリアや結核菌など、マロファージの中で細胞内殺菌機構に抵抗して生存することができる細胞内寄生性細菌の病原因子と宿主免疫応答の研究に従事することとなった。

ここでは、主にリステリア感染モデルを用いた現役時代の研究に焦点を絞り、その歩みを振り返ってみたい。

### I. リステリア感染モデルの確立と防御機構の比重論

私がリステリア感染モデルに取り組んだ1976年頃には、極めて稀にヒトリステリア症を起こす程度の認識しかなかった *L. monocytogenes* (Lm) の実験感染を行うものはおらず、まず少量のLm生菌を静脈内接種感染させたマウスで、肝臓や脾臓の臓器内菌数の経時的変動を調べ、どのような経過で増殖し、その過程に宿主の免疫系細胞がどのような比重で関与するかを *in vivo* で明らかにすることとした。とくに、直接貪食殺菌能を有する食細胞(好中球、マクロファージ)の防御における比重を解明するために、好中球と遊離マクロファージを一挙に枯渇させる全身放射線照射群と、クッパー細胞などの臓器固定マクロファージの機能を阻害するカラゲナン(carrageenan)投与群を作製して、感染後の臓器内菌数

の変動を比較検討した。その結果、感染6時間目までは肝臓固定マクロファージが増殖抑制的に働き、次いで骨髄から供給される単球・マクロファージが遊走集合して3日目までの増殖に一定の抑制機能を発揮すること、その後は7日目以降に抗原特異的なT細胞が分化誘導されて完全排除に至るという、3つのフェーズに異なった防御機構の関与があることを明らかにできた<sup>1)</sup>。この報告論文はその後、リステリア感染実験を実施する世界の多くの研究者によって引用された。また、放射線照射マウスとカラゲナン投与マウスにおける感染動態の比較から、緑膿菌、大腸菌やクレブシエラへの感染防御にはマクロファージ系よりも好中球が主体となることを示すことができた<sup>2-4)</sup>。

これらの感染実験を行った1970年代には、未だディスプレイ器具は出回ってはおらず、ホモジナイザー、ピペット、試験管、遠心管、培養シャーレなどの全てがガラス製で、滅菌洗浄して何度も使い回していた。また、ピペットマンのような便利な器具も未だ使われてはいなかったため、感染動物の臓器のホモジネートを段階希釈するには口吸いガラスピペットを用いており、もし菌液を少しでも吸い込めば感染(Lmはヒトに経口感染後の脳脊髄膜炎を起こす)の可能性もある極めてリスクな実験であったが、他に方法はなく、実験者はみな平気で行っていた。さらに段階希釈した菌液を塗り広げ、培養後のコロニー数から臓器内菌数を算定した後の大量の培地は、コッホ釜という蒸気滅菌器で処理したのちシャーレの再生に供するため、準備室には強烈な臭気が立ち籠め、マウスケージの世話も含めてまさに3Kの研究室であった。

## II. Lm 感染マウスに成立する T細胞性免疫防御の解析

従来、我が国の細菌感染免疫の研究では主にサルモネラ(*Salmonella typhimurium*)感染マウスが用いられており、抗体は防御に有効ではなく、T細胞に依存した細胞性免疫が重要であるとの認識が得られていた。しかし、当時はT細胞にヘルパーT細胞とキラーT細胞があること(後年否定されたがサブ

レッサーT細胞の存在も強く信じられていた)は共通認識であったが、感染防御に関与するT細胞群がどのような亜群でどのような性状を示すかは未だ明確ではなかった。

感染早期の食細胞関与の比重論的解析を経て、感染を耐過して回復したマウス(生菌免疫マウス)にみられる極めて強力な獲得免疫の機序に次第に興味に移り、従来サルモネラ感染でT細胞性免疫成立の指標として用いられていた遅延型過敏反応(delayed-type hypersensitivity, DTH)の誘導機序の解明を主眼とするようになった。Lm感染マウスの足蹠に抗原としてLm死菌抗原を接種すると、24-48時間後をピークとする著明な腫脹(footpad swelling)が起こり、これは結核菌感染動物の皮内にPPD抗原を接種したときに見られるツベルクリン反応と同様のDTH特有の病理所見を呈した。リステリア感染マウスにおいてDTHは容易に誘導され、DTHが成立する時期に一致して、再感染させたLmに対する排除能が著明に亢進しており、獲得感染防御免疫とDTHの誘導は同時に起こることから、果たしてDTH反応そのものがLmに対する免疫排除能を直接発揮するかが問題となった。そこで、生菌免疫したマウスにDTHを発現させ、腫大した足蹠に直接Lmの局所攻撃感染を行って、その後の菌数の消長を調べることにより、DTHという生体反応そのものが菌の増殖抑制的に作用することを示すことができた<sup>5,6)</sup>。また、DTHが誘導成立した生菌免疫マウスの脾臓T細胞をin vitroで抗原刺激培養すると、上清中にマクロファージ走化因子(macrophage chemotactic factor; MCF)やマクロファージ活性化因子(macrophage-activating factor; MAF)が産生され、それらT細胞由来の分子(当時はリンフォカインとよんでいた)が感染部位へのマクロファージの走化集合を促し、マクロファージの殺菌能を亢進させて強い獲得免疫が発現されることを明らかにした<sup>7,8)</sup>。

その頃には助手から講師に昇任していたこともあり、臨床へ復帰する気持ちはなくなっており、教授(武谷健二先生)の推挙もあって米国留学の機会が与えられ、1981年暮れから、ボストンのハーバード大学医学部のJohn David教授の研究室へ家族(家

内と子供3人)とともに研究留学することになった。当時、マクロファージを活性化するT細胞由来リンフォカインの詳細は不明で、DTHの成立したマウスのT細胞が産生するマクロファージ遊走阻止因子 (macrophage-migration inhibitory factor; MIF) がそれであろうとの可能性が高かった。David博士の研究室は、そのMIFの生化学的性状研究では世界的に知られていたのであるため、私もMIFの研究室で新たな展開を期待していたのであったが、留学直前になってDavid博士からラボの研究対象の主眼を寄生虫感染免疫に変更するので(当時の米軍の世界的展開に関連してNIHから寄生虫感染免疫に関する研究費が巨大化したという背景があったらしい)、そのグループに参加して欲しいとの要望があり、ポストン滞在中は、マンソン住血吸虫の膜抗原の生化学的研究に従事することとなった。当初はやや不本意であったが、それまで生化学的実験に疎かった身にとっては、モノクローナル抗体を作成して感染防御抗原を探索し、住血吸虫の膜抗原を同定する実験はそれなりに興味深く、*Journal of Experimental Medicine* や *Journal of Immunology* に論文を公表することができた。米国留学で驚いたのは、ピペット、試験管、遠心管など全てが渡米前の日本では全てガラス器具であったものが、完全にプラスチック製のディスポ製品ばかりで、毎日膨大な量の使い捨て器具が山のように捨てられることであった。しかし2年後帰国してみると、日本のラボでもあつという間に同様のプラスチック製品に置き換わり、ガラス器具の洗浄再生作業が無くなったこともまた驚きであった。

### Ⅲ. DTHと感染防御免疫の解離の発見

米国留学から帰国したころ、米国のCarl Nathanらが、従来マクロファージ活性化因子として多くの研究者がその実態を追いかけていたT細胞由来リンフォカインが、実はインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) そのものであることを見事に証明し、IFN- $\gamma$  を作用させたマクロファージでは活性酸素生成能が著明に亢進して細胞内殺菌力が高まることを *Journal of Experimental Medicine* (1983; 158: 670-689) に報告

し、MAFの本体論争に決着がつけられた。我々も、マクロファージの活性化を個体発生の観点から解析し、活性酸素産生能を指標とすると、そのレベルとLmに対するマクロファージの細胞内殺菌能が平行すること<sup>9-11)</sup>、Lm生菌免疫マウスでの抗原提示細胞の成熟にIFN- $\gamma$ を介したmacrophageのIa抗原発現が重要であること<sup>12,13)</sup>などを明らかにした。

この当時、私は九州大学医学部細菌学で助教授に昇進していたが、1988年の3月から新潟大学医学部へ細菌学担当教授として異動することになった。生まれ育った福岡を遠く離れて家族4人とともに赴任した雪国新潟の気候は九州とは大違いで厳しく、また、教室には空きポストがなく、さらに感染免疫の実験に必要な機器も動物飼育装置もなく、手持ちの科研費は僅かな一般研究C(現在の基盤研究C)だけで、実験室のセットアップにはかなり苦勞させられた。とは言うものの、新米若造教授のゆえか講義以外の事務的雑用が回ってくることは少なく、毎日朝から晩まで自分自身で好きな実験(準備から後片付けを含めて)ばかりを行うことができた。

新潟大学へ異動する前の九大時代から取り組みを始めていたのが、少量のLm生菌免疫でマウスに成立する強い獲得免疫が死菌免疫では如何に抗原量を増やしても誘導できないのは何故か、言い換えれば、生菌免疫と死菌免疫で誘導されるT細胞の機能を比較することで、強力な獲得免疫の本態が解明できるのではないかと、この考えであった。

Lm生菌では致死量以下の $10^3$  cfuという少量接種で強い獲得免疫が誘導できるが、死菌の場合は $10^8$ といった大量で免疫しても獲得免疫は成立しない。しかし、死菌免疫マウスでも細胞性免疫の指標となるDTHを誘導することは可能であるとの発見が、次の研究ステップへの大きな足がかりとなった<sup>14)</sup>。生菌免疫と死菌免疫マウス由来脾細胞の比較から、従来は細胞性感染防御免疫応答と同義語的に認識されていたDTHのエフェクターT細胞(T<sub>DTH</sub>)と、再感染防御獲得免疫(acquired cellular resistance; ACR)を担う真のエフェクターT細胞(T<sub>ACR</sub>)には、胸腺依存性に違いがあることが判明し<sup>15-17)</sup>、さらにLm特異的なT細胞を、非免疫マウス脾細胞を生菌や死菌とともに*in vitro*培養して誘導する新たな

方法を開発し<sup>18, 19)</sup>、表1に示すようにマクロファージ走化因子、マクロファージ活性化因子、IFN- $\gamma$ などのリンフォカインの産生能に違いがあることを明確に示すことができた<sup>20, 21)</sup>。

#### IV. 抗酸菌による獲得免疫誘導における生菌免疫の意義

新潟大学へ移ってラボを主宰するようになった後、日米医学研究協力計画(感染症中心の部会から成る)の一部会であった日米結核部会への参加を要請され、Lmと同じく細胞内寄生性細菌である結核菌の感染免疫の研究にも着手することになった。この領域では、九州大学で大学院を終え、新潟大学細菌学に助手として着任してくれた河村伊久雄氏(現横浜薬科大学教授)の参加を得て、Lm感染免疫で得られていた生菌と死菌の違いを参考に解析が進んだ。マウスにおいてヒト結核のモデルとも言えるBCG (*Mycobacterium bovis*) 感染系を確立し、Lm感染と同様に、BCGに対する獲得防御免疫を担うT細胞はIFN- $\gamma$ 産生能が機能的マーカーとなること<sup>22, 23)</sup>、そのようなT細胞は生菌免疫でしか誘導できず、その誘導には生菌免疫初期に産生される内因性IFN- $\gamma$ が必須の役割を果たすことなどを示した<sup>24, 25)</sup>。このBCGを用いた実験成績から、抗原特異的な細胞性獲得免疫の誘導には生菌免疫が不可欠であることは、リステリアに限らず細胞内寄生菌に共通した事象であることが実証され、また、IFN- $\gamma$ 産生能に特徴づけられる免疫防御を担うT細胞の誘導過程にも、NK細胞由来のIFN- $\gamma$ が必須の役割を果たすことが示唆されるようになった。

#### V. Lmの生菌、死菌の免疫誘導能の違いへの本質的なアプローチ

感染防御免疫を担うT細胞が、抗原特異的なIFN- $\gamma$ 産生能を有するT細胞であることは確定したが、何故その種のエフェクターT細胞は生菌免疫でしか誘導できないのか、は大きな疑問のままであった。生菌と死菌では、接種されたマウスの個体内で最初に出会うマクロファージ系細胞に対する刺激能に違いがある可能性を想定し、1990年当時極めて複雑なbioassayによってのみ測定可能であったinterleukin-1 (IL-1)の産生誘導活性を比較した。その結果、Lmの死菌にはIL-1産生誘導能が見られないのに対して、生菌には強い誘導能があることを見出した。さらに重要なことに、同じLmでも一部のヘモリシン(listeriolysin O ; LLO)産生能のない菌株(2769株やATCC15313株)ではIL-1産生誘導能がほぼみられないことが観察された<sup>26)</sup>(表2)。この*in vitro*の実験をもとに、当時かなり苦労して入手することができたりコンビナントIL-1投与を死菌免疫マウスに併用することで、誘導されるT細胞の機能分化が促進されることが示され<sup>27)</sup>、菌体抗原に加えて生菌のみが誘導できる初期応答因子の協同作用が獲得免疫成立に必須であることが判明した。

#### VI. 生菌特有の因子としてのLLOへの着目

Lmのヘモリシンは血液寒天培地上のコロニー周囲に $\beta$ 溶血斑を形成する菌体からの分泌性タンパク

表1 リステリア生菌と死菌で免疫マウスに誘導されるT細胞の違い

	Lm生菌免疫	Lm死菌免疫
エフェクターT細胞	T <sub>ACR</sub> (CD4 <sup>+</sup> )	T <sub>DTH</sub> (CD4 <sup>+</sup> )
免疫防御移入能	++	-
DTH移入能	++	++
MCF産生能	++	++
MAF産生能	++	-
IFN- $\gamma$ 産生能	++	-

この実験の当時、免疫マウスの脾細胞からナイロンウールカラム通過で得たT細胞を非免疫マウスへ細胞移入し、感染防御能(ACR)は攻撃感染に対する菌数減少で、DTHは遅延型足跡反応で測定した。また抗原刺激した脾細胞の培養上清につき、MCFはボイデンチャンパー法で、MAFは上清を作用させたマクロファージのP815細胞に対する<sup>51</sup>Cr遊離量で、IFN- $\gamma$ は自作のELISA法にて測定した。

表2 生菌と死菌の IL-1 誘導活性の違いがあり、LLO が関与する可能性が初めて示唆された所見

刺激菌株	培養上清中のIL-1活性 (cpm)
なし	1,442 ± 206
EGD株 (LLO+) 生菌	13,580 ± 1,380
EGD株 (LLO+) 死菌	2,228 ± 464
2769株 (LLO-) 生菌	3,349 ± 263
ATCC15313株 (LLO-) 生菌	2,980 ± 183

この実験当時、IL-1量の定量は困難でBioassayしかできなかった。各菌体で刺激したマクロファージの培養上清を段階希釈し、C3H/HeJマウスの胸腺細胞を低濃度のPHA存在下で培養する際に添加し、<sup>3</sup>H-TdRの取り込み量 (cpm) で測定した。

分子で、米国の Daniel Portnoy らによって、Lm がマクロファージ内で食胞膜を傷害して細胞質へ脱出し、殺菌を免れて細胞内増殖をする上で必須の病原因子であることが示されていた (J. Exp. Med.1988; 167: 1459-1471.)。先に述べた実験成績から、生菌特有のマクロファージ刺激因子が LLO そのものである可能性が考えられたため、Lm の培養上清からイオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過などを用いて LLO タンパク質を精製し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で単一バンドとなった精製標品のマクロファージ刺激活性を調べた。その結果、菌体を用いずとも、精製 LLO 標品自体に、マクロファージからの強い IL-1 産生応答誘導活性があることが証明できた<sup>28)</sup>。ヘモリシン (溶血素) の呼称が示すように、LLO は赤血球に溶血活性を示す膜傷害タンパク質であり、マクロファージの細胞膜をも傷害する可能性のあるヘモリシン (サイトリジン) 活性因子が果たして IL-1 などのモノカイン産生を誘導できるか?との疑問が呈されたが、精製した LLO 標品が膜傷害活性を示さない低濃度でもモノカイン誘導活性を示すこと、溶血活性は低濃度のコレステロールで阻止されるが、一方のモノカイン誘導活性にはコレステロールの存在は影響を与えないことが示された<sup>29)</sup>。それまで、溶血素のような細菌由来毒性タンパク質が免疫系を刺激することは報告がなく、細菌のタンパク質毒素分子に毒素活性とマクロファージ刺激活性が同時に存在する可能性の認識はなかったため、この発見は興味をもって注目されたが、同時に懐疑的なコメントもしばらくは続いた。

その後、各種サイトカインの分子生物学的研究が世界的に進展し、ELISA 法による各種サイトカインの定量的測定が可能となり、リコンビナント標品や

中和抗体が業者から入手できるようになった。さらに RT-PCR 法の発展普及によって、サイトカイン遺伝子の発現を定量的に測定することも容易になってきた。そこで、感染防御免疫のエフェクター T 細胞の分化に最も重要なサイトカインの検索を詳細に行った。その結果、LLO 産生能の欠如した Lm 菌株や死菌に比べ、LLO 産生性の高い Lm 株生菌は、IL-1 や IFN- $\gamma$  誘導能にとどまらず、各種サイトカインの誘導能が明確に高いこと<sup>30-32)</sup>が判明し、獲得免疫のエフェクターとなる T 細胞の分化には、IL-12 の産生誘導に基づく内因性 IFN- $\gamma$  の産生が必須であること<sup>33)</sup>が示された。

ここまでの研究で、Lm 生菌免疫による感染抵抗性 T 細胞の誘導に必須の IL-12 や IFN- $\gamma$  産生応答誘導には、Lm 生菌が産生する LLO が作用している可能性が示唆された。そこで精製 LLO 標品でマウス脾細胞を刺激すると、IL-12 や IFN- $\gamma$  の発現が誘導され、それらはマクロファージと NK 細胞が関与していた<sup>34)</sup>。実際に *in vivo* でも、生菌免疫マウスに抗体を投与して初期の IL-12 や IFN- $\gamma$  産生応答を抑制すると、最終的に誘導されるべき感染抵抗性 T 細胞の分化成熟が阻害されることも示された<sup>35)</sup>。さらに、Lm 死菌や LLO 欠損株生菌による免疫に際して精製 LLO 標品を投与すると、生菌免疫に匹敵する強い再感染防御免疫の誘導が可能となることも示された<sup>36, 37)</sup>。

以上のような研究結果を総合して考察すると、生菌免疫でみられる強い再感染防御免疫のエフェクター T 細胞が死菌免疫では誘導されないのは、LLO の作用が存在しないために各種初期サイトカイン、とくに IL-12 に依存した内因性 IFN- $\gamma$  産生応答が起きないためであるものと考えられた。つまり、生菌

免疫では、マクロファージに感染した Lm 生菌が増殖に伴って産生する LLO 分子が、一方では菌のマクロファージ内殺菌からのエスケープに寄与すると同時に、マクロファージには各種サイトカイン産生を誘導する結果、IL-12 を介して NK 細胞からの内因性 IFN- $\gamma$  産生が誘導され、その作用によって最終的なエフェクター T 細胞の分化成熟が起こる、という全体像が見えてきた。

## VII. リコンビナント LLO の作製とその生物活性の解析

1998 年春に、11 年を過ごした新潟大学細菌学から京都大学医学部微生物学へと異動することになり、数年間教授不在のままであった研究室へ赴任し、再びラボの設営を一から始めることとなり、本格的な実験が可能となるまでに 1 年以上を要した。

京大では、前述の全体像をより詳細に明らかにすべく、分子生物学と細菌遺伝学的手法を重視し、常に純度が問題となっていた培養濾液から精製した LLO から、リコンビナント LLO 標品に切り替える作業から始めた。LLO の遺伝子 *hly* をクローニングし、6 x His の Tag をつけて pQE システムを用いて大腸菌に発現させ、リコンビナント LLO (rLLO) を大量採取した。グラム陽性菌の Lm の培養上清からのカラム精製過程では問題とならなかった LPS のコンタミが一番の問題となったが、最終的に LPS を吸着する detoxi-Gel カラムの頻回通過によって、大腸菌由来の LPS を徹底的に除去することができた。

漸く得られた rLLO 標品を用いて正常マウス脾細胞を刺激すると、期待どおり極めて強い IFN- $\gamma$  産生誘導能が観察された。LLO の遺伝子 *hly* の配列は *Streptococcus pyogenes* の streptolysin O (SLO) や *Clostridium perfringens* の perfringolysin O (PFO) などの、所謂 cholesterol-dependent cytolysin (CDC) ファミリーと総称されるヘモリシン毒素遺伝子と極めて高い相同性を示していたので、Rossjohn らによって報告されていた PFO のタンパク質構造 (Cell, 1997; 89: 684-692) と同様の 4 つのドメインから成るものと想定された。そこで、rLLO の N 末端や C 末端を欠失させた変異 rLLO を作製して、そ

の溶血活性 (膜傷害活性) とサイトカイン誘導活性を調べた。興味あることに、サイトカイン誘導活性には C 末端側の第 4 ドメインの存在は不要で、N 末端側の 1-3 ドメインがあればよく、一方、膜傷害活性の発現には LLO 全長分子が不可欠であり、とくに C 末端側の第 4 ドメインによる膜コレステロールへの結合が必須であることが判明した<sup>38)</sup>。加えて、rLLO による宿主からの内因性 IFN- $\gamma$  の産生誘導には、マクロファージが応答産生する IL-12 に加えて IL-18 が必須で、この両者が NK 細胞に対して IFN- $\gamma$  産生誘導因子となることが改めて示された<sup>39)</sup>。このように、単一毒素タンパク分子に、ドメイン依存性の違う 2 つの全く異なった機能 (活性) があることを示したのは我々が最初であった。

## VIII. Lm 以外の菌種由来の CDC についての解析

rLLO の機能解析から、LLO と相同性の高い他の CDC ファミリーヘモリシンにも LLO と同様のサイトカイン誘導活性があるのではないかと考えられた。*Listeria* 属には代表的な *Listeria monocytogenes* 以外に、臨床細菌学的にはあまり知られていない *L. seeligeri* や *L. ivanovii* という菌種があり、それぞれが seeligeriolysin O (LSO)、ivanolysin O (ILO) と呼ばれるヘモリシンを産生することが知られていた。そこで、それぞれのヘモリシン遺伝子である *lso* と *ilo* をクローニングして大腸菌に組み込み発現させ、LLO と同様の手法により rLSO と rILO 標品を作製した。rLSO は rLLO と同様に、第 4 ドメイン非依存的に IFN- $\gamma$  誘導活性を示し、やはりマクロファージと NK 細胞を介していた<sup>40)</sup>。一方で、rLSO 標品は rLLO に比べ膜傷害活性は低く、改めて 1-3 ドメイン依存性のサイトカイン誘導活性と第 4 ドメイン依存性の膜傷害活性が同一タンパク分子上の分離した生物活性であることが確認された。rLSO の膜傷害能の比活性が低い理由を検索した結果、CDC ファミリータンパクの第 4 ドメインに共通して保存されているウンデカペプチド配列 (ECTGLAWEWWR) にみられる A  $\rightarrow$  F 変異が原因となっていることを、アミノ酸置換標品を作製して証明できた<sup>41)</sup>。細胞膜

傷害活性が低い一方でサイトカイン誘導能の比活性が高い rLSO は *in vitro* での解析に有効で、そのサイトカイン誘導は自然免疫受容体の TLR2, TLR4 の両者に依存するが、LPS やペプチドグリカンなどの代表的な TLR リガンドとは異なり、強い IL-12 誘導活性で特徴付けられることも明らかにすることができた<sup>42)</sup>。一方、*L. ivanovii* 由来の rILO の膜傷害活性は LLO よりも高い比活性を示すにも関わらず、ほとんど IFN- $\gamma$  誘導活性を示さなかったため、その 1-3 ドメインに問題がある可能性が考えられた。そこで、LLO の 1-3 ドメインを ILO 由来のそれと置換したキメラタンパクを作製したところ、サイトカイン誘導活性に著明な低下をみた<sup>43)</sup>。またサイトカイン誘導活性の低い ILO を産生する *L. ivanovii* 生菌でマウスを免疫しても、Lm 生菌免疫で得られる強い再感染防御免疫は成立しなかった。また Caco-2 細胞に対しては、膜傷害活性が細胞致死濃度以下の rLLO を作用させると、膜の透過性亢進と Ca<sup>++</sup> イオンの流入が惹起されて炎症性サイトカインの発現が誘導されることも分かり、膜傷害活性と独立したサイトカイン誘導とは別に、非マクロファージ系細胞には膜構造の攪乱を介して感染局所の炎症応答を誘導する機序も示唆された<sup>44)</sup>。また、異なる菌種由来の CDC ファミリータンパクを比較すると、アミノ酸配列的には極めて相同性が高いが、リステリア属以外の菌種はリステリアのような CDC 依存的な食胞脱出と細胞質内増殖能を示すことがない。その理由として、リステリア属由来の CDC タンパクだけがアルカリ側 pH で不可逆的に失活することから、食胞内での V-H<sup>+</sup> ATPase による酸性化が、食胞から脱出するリステリアの CDC タンパクの安定化に寄与することも示された<sup>45)</sup>。

#### IX. 遺伝子組換え変異体作製による炎症性サイトカイン誘導機構

リコンビナント標品による *in vitro* での細胞刺激実験だけでは、全菌体接種による感染後の *in vivo* での応答を再現することはできず、また機能の異なるヘモリシンを有する異なった菌株の比較だけでは、真にヘモリシンの違いが感染および免疫誘導の

違いを規定するとは確定できない。そこで、基準となる Lm EGD 株の LLO 遺伝子である *hly* を *in-frame* で完全欠失させた欠損変異株 ( $\Delta hly$ ) を作製した。この株では、IL-6 や TNF $\alpha$  など TLR を介した菌体認識さえ起これば誘導されるサイトカイン種の発現は誘導されたが、Lm 死菌と同様に IFN- $\gamma$  の産生誘導能は消失した。この変化が *hly* 欠失導入操作に伴う別の遺伝子変化によるものでないことは、再度 *hly* を完全相補した復帰株 ( $\Delta hly::hly$ ) が元の Lm 生菌と同様の活性を示したことで確認された。リコンビナント標品を用いた先の研究から、*L. ivanovii* の ILO は細胞膜傷害能は高いがサイトカイン誘導能は低いことが判明していたので、LLO の欠損変異株である Lm  $\Delta hly$  に ILO 遺伝子である *ilo* で相補させた変異株 Lm  $\Delta hly::ilo$  を作製した。この変異株は Lm  $\Delta hly::hly$  と同等にマクロファージに感染し食胞を脱出して細胞質内増殖が可能であったが、IFN- $\gamma$  産生誘導能には回復がみられず、マウスを免疫しても感染抵抗性 T 細胞は誘導できなかった<sup>46)</sup>。これらの遺伝子組換え変異体を用いた感染実験から、Lm 生菌による T 細胞性感染防御免疫の誘導に LLO が必須である機序が、LLO により菌体のマクロファージ食胞からの脱出という LLO の従来知られたサイトリジン活性に加えて、我々が見出した LLO の 1-3 ドメイン依存的な炎症性サイトカイン誘導が感染抵抗性 T 細胞の最終分化誘導を担っていることを確的に証明できた。

#### X. Lm によるインフラマソーム活性化機構解析への展開

Lm の LLO 欠失変異株を用いた研究の過程で、それまで我々が重視してきたマクロファージ由来の IL-12 の産生誘導に加えて、NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生誘導に必須のサイトカインとして、IL-18 の重要性が浮かび上がってきた。IL-12 とは異なり、IL-18 の産生には caspase-1 による前駆体 IL-18 から活性型 IL-18 への変換が必要なことがすでに判明していた。前駆体サイトカインから活性型サイトカインの変換には、インフラマソームとよばれる巨大なタンパク質複合体の形成が必要で、その結果 IL-18 の

活型型への変換に必須の caspase-1 の活性化が起こる。私の研究室ではリステリアの LLO と類似の CDC タンパクの一つである pneumolysin (PLO) を産生する *Streptococcus pneumoniae* を用いた実験で、PLO がマクロファージのインフラマソーム (inflammasome) を活性化して caspase-1 依存的なサイトカイン産生を促すことを見出していた<sup>47)</sup>。Lm の実験でも、LLO 依存的な食胞脱出に続いて、LLO 自身の作用で caspase-1 の活性化が起こることが確認できた<sup>48)</sup>。また、この研究の初期段階で見出していた LLO 依存的な IL-1 の産生誘導にも、IL-1 $\alpha$  の活性化に必要なカルパインの活性化が先行することも見出された<sup>49)</sup>。この時期から、感染に伴う炎症性サイトカインの産生におけるインフラマソームの形成と caspase-1 の活性化機構の解析を重視した結果、*S. pneumoniae* 感染系でも Lm 同様のインフラマソーム形成が起こることを示し<sup>50)</sup>、リステリアによるインフラマソーム活性化には、マクロファージの細胞内受容体として AIM2 (absent in melanoma 2) を新たに同定し、それまで知られていた NLRP3 と NLRC4 を介した経路に加えて第 3 の活性化経路があることを初めて明らかにする大きな成果を得ることができた<sup>51)</sup>。私が京大医学部を定年退職した 2013 年春前後からのインフラマソーム研究では、大学院博士課

程を経て教室助教として研究をリードしてくれてきた土屋晃介博士 (現金沢大学特任准教授) と原英樹博士 (現慶応大学特任独立准教授) がさらに優れた新知見を解明してくれ<sup>52-55)</sup>、現在はそれぞれ独立してこの方面の第一人者となっている。

最後に本稿で述べた研究の結果得られた LLO を介したリステリア生菌による感染抵抗性 T 細胞誘導の機序を簡潔に図示してみた (図 1)。

## おわりに

医師となり僅か 3 年の臨床経験を経て基礎研究の世界に飛び込み、その後 30 余年を細菌学・感染免疫学の領域での研究と教育に明け暮れることになった。その間、様々な微生物を対象とした研究に関与し、多くを英文原著として公表してきたが、ここではライフワークとなったリステリアの病原因子と感染防御免疫誘導の研究に絞り、時間経過を追って述べてみた。基礎研究の世界に入って最初に与えられたテーマが結局は現役を引退するまでのメインの仕事となった訳だが、そこには、「初恋の味忘れ難し」という側面に加えて、実験研究を進めるにつれ次々と新たな疑問、到達目標が湧き、時代の流れで開発された新しい実験技法 (リコンビナントタンパク質

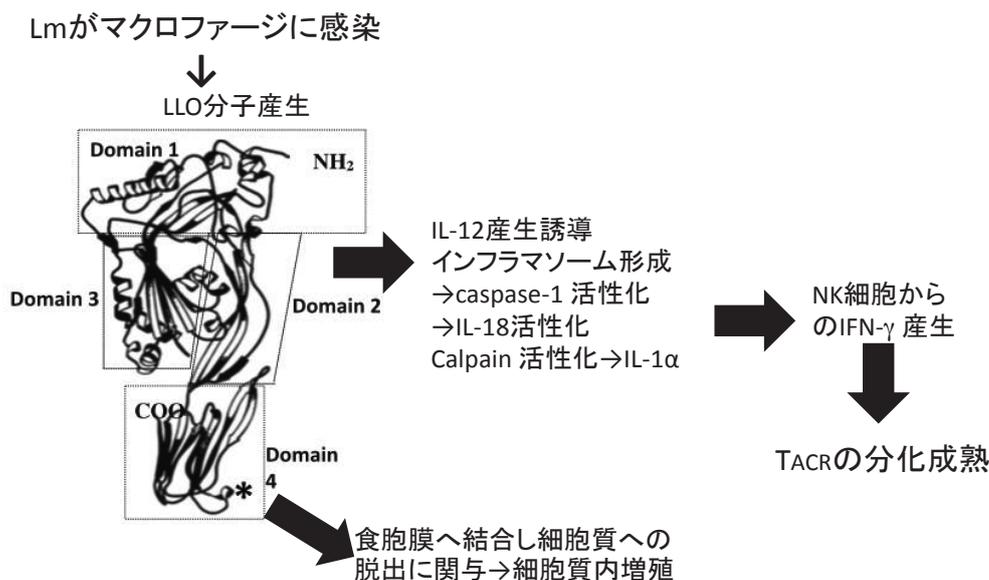


図 1 LLO のドメイン構造とドメイン別機能の概要

作製法、PCR法、RT-PCR法、遺伝子組換え法など)を導入することで一步一步、次の到達点へ迫ることの面白さがあったことが大きい。我田引水にはなるが、ここで示したりステリア感染モデルが、細菌学と免疫学の双方の領域の研究者に広く認識されるようになり、我が国における感染免疫学の発展に僅かながらでも貢献できたのではないかと自負している。

## 文 献

- 1) Mitsuyama M, Takeya K, Nomoto K, et al. Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*. J. Gen. Microbiol. 1978; **106**: 165-171.
- 2) Tatsukawa K, Mitsuyama M, Takeya K, et al. Differing contribution of polymorphonuclear cells and macrophages to protection of mice against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 1979; **115**: 161-166.
- 3) Tsuru S, Mitsuyama M, Nomoto K, et al. Importance of polymorphonuclear leukocytes in protection of mice against *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 1981; **122**: 335-338.
- 4) Fukutome T, Mitsuyama M, Takeya K, et al. Importance of antiserum and phagocytic cells in the protection of mice against infection by *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 1981; **119**: 225-229.
- 5) Mitsuyama M, Nomoto K, Akeda H, et al. Enhanced elimination of *Listeria monocytogenes* at the site of delayed footpad reaction. Infect. Immun. 1980; **30**: 1-5.
- 6) Mitsuyama M, Nomoto K, & Takeya K. Direct correlation between delayed footpad reaction and resistance to local bacterial infection. Infect. Immun. 1982; **36**: 72-79.
- 7) Miyata M, Mitsuyama M, Ogata N, et al. Two steps in the generation of acquired cellular resistance against *Listeria monocytogenes* : accumulation and activation of macrophages. Immunology. 1982; **47**: 247-253.
- 8) Miyata M, Mitsuyama M, Ogata N, et al. Protective mechanisms against infection by *Listeria monocytogenes* : accumulation and activation of macrophages. J. Clin. Lab. Immunol. 1984; **13**: 111-115.
- 9) Ohara R, Mitsuyama M, Miyata M, et al. Ontogeny of macrophage-mediated protection against *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 1985; **48**: 763-768.
- 10) Mitsuyama M, Ohara R, Amako K, et al. Ontogeny of macrophage function to release superoxide anion in conventional and germfree mice. Infect. Immun. 1986; **52**: 236-239.
- 11) Watanabe Y, Mitsuyama M, Sano M, et al. Enhanced resistance against *Listeria monocytogenes* at early phase of primary infection in pregnant mice : activation of macrophages during pregnancy. Infect. Immun. 1986; **52**: 730-735.
- 12) Koga T, Mitsuyama M, Handa T, et al. Macrophage Ia expression in athymic nude versus neonatally thymectomized mice. Immunobiology. 1986; **171**: 67-76.
- 13) Koga T, Mitsuyama M, Handa T, et al. Gamma interferon-mediated increase in the number of Ia-bearing macrophage during infection with *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 1987; **55**: 2300-2303.
- 14) Koga T, Mitsuyama M, Handa T, et al. Induction by killed *Listeria monocytogenes* of effector T cells mediating delayed-type hypersensitivity but not protection in mice. Immunology. 1987; **62**: 241-248.
- 15) Mitsuyama M, Watanabe Y, Sano M, et al. Generation of *Listeria monocytogenes*-specific T cells mediating the delayed footpad reaction and protection in neonatally thymectomized mice but not in nude mice. Med Microbiol. Immunol. 1988; **177**: 207-217.
- 16) Watanabe Y, Mitsuyama M, Koga T, et al. Protective immunity to *Listeria monocytogenes* in neonatally thymectomized mice : involvement of T cells distinct from those in sham-thymectomized mice. Immunology. 1988; **63**: 649-656.
- 17) Handa T, Mitsuyama M, Serushago BA, et al. Cooperative effect of MCF and MAF (IFN- $\gamma$ ) in the protection of mice against *Listeria monocytogenes*. Immunology. 1988; **65**: 427-432.
- 18) Mitsuyama M, Handa T, Koga T, et al. In vitro primary induction of T cells mediating the delayed footpad reaction and acquired cellular resistance to *Listeria monocytogenes*. Immunobiology. 1988; **177**: 254-266.
- 19) Handa T, Mitsuyama M, Serushago BA, et al. A low degree of requirement for Ia-positive macrophages and IL-2 in the induction phase of *Listeria monocytogenes*-specific T cells *in vitro*. Immunobiology. 1989; **179**: 244-258.
- 20) Muramori K, Mitsuyama M, Handa T, et al. A dissociated induction of MCF-producing and MAF-producing T cells specific for *Listeria monocytogenes* in the *in vitro* primary culture system. Immunology. 1991; **72**: 373-379.
- 21) Tsukada, H. Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Dissociated development of T cells mediating delayed-type hypersensitivity and protective T cells against *Listeria monocytogenes* and their functional difference in lymphokine production. Infect. Immun. 1991; **59**: 3589-3595.
- 22) Kawamura I, Tsukada H, et al. & Mitsuyama M. IFN- $\gamma$ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. J. Immunol. 1992; **148**: 2887-2893.
- 23) Kawamura I, Yang J, et al. & Mitsuyama M. Determination of the mycobacterial antigen provoking IFN- $\gamma$  production as a possible protective antigen in *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 1994; **62**: 4396-4403.

- 24) Yang J, Kawamura I, et al. & Mitsuyama, M. : Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG. Study on the mechanism of the different abilities of viable and killed BCG. J. Immunol. 1995; **155**: 5728-5735.
- 25) Yang J, Mitsuyama M. An essential role for the endogenous gamma interferon in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG. Immunology. 1997; **91**: 529-534.
- 26) Mitsuyama M, Igarashi K, Kawamura I, et al.: Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cells of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 1990; **58**: 1254-1260.
- 27) Igarashi K, Mitsuyama M, Muramori K, et al. Interleukin-1-induced promotion of T cell differentiation in mice immunized with killed *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 1990; **58**: 3973-3979.
- 28) Tsukada H, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Induction of macrophage interleukin-1 production by *Listeria monocytogenes* hemolysin. Cell. Immunol. 1992; **140**: 21-30.
- 29) Yoshikawa H, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Membrane damage and interleukin-1 production in murine macrophages exposed to listeriolysin O. Infect. Immun. 1993; **61**: 1334-1339.
- 30) Xiong H, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of *Listeria* spp. differing in the virulence. Infect. Immun. 1994; **62**: 3649-3654.
- 31) Nishibori T, Cooray K, et al. & Mitsuyama M. Correlation between the presence of virulence-associated genes as determined by PCR and actual virulence to mice in a various strains of *Listeria* spp. Microbiol. Immunol. 1995; **39**: 343-349.
- 32) Xiong H, Nishibori T, et al. & Mitsuyama M. Involvement of various combination of endogenous inflammatory cytokines in *Listeria monocytogenes*-induced expression of inducible nitric oxide synthase in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; **16**: 257-266.
- 33) Song F, Matsuzaki G, Mitsuyama M, et al. Differential effect of viable and killed bacteria on interleukin-12 expression of macrophages. J. Immunol. 1996; **156**: 2979-2984.
- 34) Nishibori T, Xiong H, et al. & Mitsuyama M. Induction of cytokine gene expression by listeriaolysin O and the role of macrophages and NK cells. Infect. Immun. 1996; **64**: 3185-3195.
- 35) Xiong H, Ohya S, et al. & Mitsuyama M. Persistent production of IFN- $\gamma$  and IL-12 is essential for the generation of protective immunity against *Listeria monocytogenes*. Clin. Exp. Immunol. 1997; **108**: 456-462.
- 36) Xiong H, Ohya S, et al. & Mitsuyama M. Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against *Listeria monocytogenes* in mice. Immunology. 1998; **94**: 14-21.
- 37) Tanabe Y, Xiong G, et al. & Mitsuyama M. Induction of protective T cells against *Listeria monocytogenes* in mice by immunization with a non-immunogenic strain of bacteria and liposome-encapsulated listeriolysin O. Infect. Immun. 1999; **67**: 568-575.
- 38) Kohda C, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 2002; **70**: 1334-1341.
- 39) Nomura T, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Essential role of interleukin 12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in the spleen cells of mice. Infect. Immun. 2002; **70**: 1049-1055.
- 40) Ito Y, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Seeligeriolysin O, a cholesterol-dependent cytolysis of *Listeria seeligeri*, induced gamma interferon from spleen cells of mice. Infect. Immun. 2003; **71**: 234-241.
- 41) Ito Y, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Difference in cholesterol-binding and cytolytic activities between listeriolysin O and seeligeriolysin O : a possible role of Ala residue of Trp-rich undecapeptide. FEMS Microbiol. Lett. 2001; **203**: 185-190.
- 42) Ito Y, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Seeligeriolysin O, a protein toxin of *Listeria seeligeri*, stimulates macrophage cytokine production via Toll-like receptors in a profile different from that induced by other bacterial ligands. Int. Immunol. 2005; **17**: 1597-1606.
- 43) Kimoto T, Kawamura I, et al. & 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*. Infect. Immun. 2003; **71**: 2447-2454.
- 44) Tsuchiya K, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent IL-6 production in Caco-2 cells during *Listeria monocytogenes* infection in vitro. Infect. Immun. 2005; **73**: 3869-3877.
- 45) Nomura T, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Irreversible loss of membrane-binding activity of *Listeria*-derived cytolysins in non-acidic conditions : a distinct difference from allied cytolysins produced by other Gram positive bacteria. Microbiology; 2007; **153**: 2250-2258.
- 46) Hara H, Kawamura I, et al. & Mitsuyama M. Cytolysin-dependent endosomal escape is required but not sufficient for the induction of Th1 immune response against *Listeria* infection. A distinct role for listeriolysin O as determined by gene replacement. Infect. Immun. 2007; **75**: 3791-3801.
- 47) Shoma S, Tsuchiya K, et al & Mitsuyama M. Critical in-

- volvement 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. *Infect. Immun.* 2008; **76**: 1547-1557.
- 48) Hara H, Kawamura I, et al & Mitsuyama M. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. *J. Immunol.* 2008; **180**: 7859-7868.
- 49) Dewamitta SR, Nomura T, et al. & Mitsuyama M. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into cytoplasm initiates calpain activation and IL-1 $\alpha$  secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 2010; **78**: 1884-1894.
- 50) Fang R, Tsuchiya K, et al. & Mitsuyama M. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Immunol.* 2011; **187**: 4890-4899.
- 51) Tsuchiya K, Hara H, et al. & Mitsuyama M. Involvement of absent in melanoma 2 (AIM2) in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 2010; **185**: 1186-1195.
- 52) Hara H, Tsuchiya K, et al. & Mitsuyama M. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregated and inflammasome activity. *Nature Immunol.* 2013; **14**: 1247-1255.
- 53) Tsuchiya K, Hara H, et al. & Mitsuyama M. The adaptor ASC exacerbated lethal *Listeria monocytogenes* infection by mediating IL-18 production in a inflammasome-dependent and -independent manner. *Eur. J. Immunol.* 2014; **44**: 3696-3707.
- 54) Tsuchiya K & Hara H. The inflammasome and its regulation. *Crit. Rev. Immunol.* 2014; **34**: 41-80.
- 55) Hara H, Seregin SS, Yang D, et al. The NLRP inflammasome recognizes lipoteichoic acid and regulates Gram-positive pathogen infection. *Cell.* 2018; **175**: 1651-1664.