

シンポジウム

細胞内寄生菌感染症と免疫応答

光山 正雄

(京都大学大学院医学研究科・感染・免疫学教授)



座長 松下 祥 (埼玉医科大学免疫学教授)

次のご講演は光山正雄先生です。先生は現在京都大学大学院医学研究科におられます。昭和48年、九州大学医学部をご卒業後、51年九州大学医学部細菌学講座へ出向、53年同助手、56年に米国NIH 国際奨励研究員として、ハーバード大学に留学され、58年には九州大学の細菌学助教授、それから62年に新潟大学医学部細菌学教授。そして平成10年から京都大学で教授をされています。先生は日本細菌学会や、それから日米医学協力会議の結核部会の部会長としてご活躍です。今日は「細胞内寄生菌感染と免疫応答」のタイトルでお話ををお願いします。



松下先生、どうもご紹介をありがとうございました。このたびは、このシンポジウムにお招きいただきましたことを感謝申し上げます。

私も大昔は臨床を少しやっていたのですが、もう25年ぐらい医者をやっておらず、いつの間にか、感染生物学のようなことをやっています。今日の私

のお話は、必ずしも臨床の先生方や看護婦さんのお役には立たないかもしれませんが、しばらく耳をお貸しください。

「細胞内寄生菌」、もしくは「細胞内寄生性細菌」という用語が出てきますが、あまりなじみがないのではないかと思います。これは、細胞がないと生きられない細菌という意味ではありません。この菌についてこれから生体防御との関連でお話ししたいと思います。

ここには免疫学の大家の松下先生がいらっしゃるのですが、一応、免疫学では進化した免疫機構が大事なのですが、あえて申しますと、すべての生命体に普遍的に必要な生体防御機構の一番の基本は食細胞であると思います。これはマクロファージが、今日の私のお話の中心でありますリステリアという菌を貪食している像です。異物を異物として認識し、それを細胞の中で

殺すことができるのは食細胞だけです。抗体であれ補体であれ、T細胞であれ、B細胞であれ、NK細胞であれ、 γ δ T細胞であれ、菌を直接殺すという機能はなく、食細胞だけが細菌を行うことができます。

食細胞、特に好中球といわれるもの、およびマクロファージには、いろいろな細胞内殺菌機構が備わっています。ここで赤く示したものが、何らかの細菌なり異物とお考えください。これを異物と認識した食細胞は細胞の中に取り込みますが、それは裸の異物を取り込むのではなく、細胞膜で取り囲み、内部に取り込みます。これを私たちは食胞 (phagosome) と呼んでいます。この食胞というのは、単なる袋ではなく、食細胞の中では、その中に取り込んだバクテリアを殺菌してしまう、殺してしまう、そういうるつぽのようなものであり、非常にたくさんの多様な殺菌因子が、ここで働くようになっています。

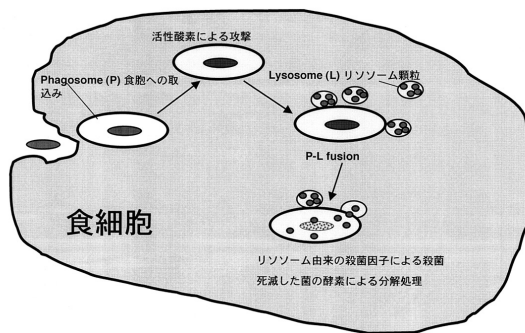


図1. 食細胞による貪食以後の細胞内殺菌の過程

その一つは NADPH オキシダーゼといわれる、電子伝達系によって生成される活性酸素、スーパーオキシド・アニオンに始まる、いろいろな活性酸素群です。もう一つは、顆粒として認められるリソソーム (Lysosome) で、アズール顆粒や特殊顆粒が組織学的に認められていますが、この異物を取り込んだ食細胞にはこの顆粒が融合します。これを P-L fusion と呼んでいますが、この中には、非常に多様な殺菌性の物質が蓄積されていて、それが降り注ぐことになります。例えば、今日は詳しくお話ししませんが、デフェンシンやセリンプロテアーゼ系の殺菌因子、それからラクトフェリンのような鉄をキレートするようなもの、細胞壁を壊すリゾチームといった酵素系、このようなものがたくさんあります。また、ミエロペルオキシダーゼが供給されますと、非常に強力なハイポクロライドが作られてきます。

したがって、免疫系という高度に発達した、抗原特異的なクローンで対応する機構がなくても、この非特異的な食細胞群が十分にあって機能すれば、おそらくウイルスも含めて、ほとんどのバクテリアに対応できるはずなのです。ところが、困ったことに細胞内寄生性細菌と私たちが呼んでいるいくつかの種類の菌は、この取り込まれて本来、殺されるステップに乗らなければいけないにもかかわらず、いろいろな方法でそれをエスケープしてしまうという特性を持っています。

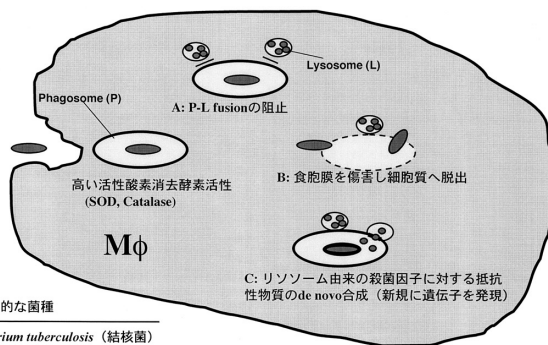


図 2. 細胞内寄生菌の食細胞殺菌からのエスケープ機構

あまり知られていないものまで含めると、20 種類ぐらいの細菌・原虫がこの細胞内寄生菌、つまり食細胞の中で殺されずに生き延びられるという性格を示しますが、ここでは代表的なものとして、3つのものを挙げています。一つは、グローバルな脅威である結核を起こす結核菌。もう一つが、私が長らく研究しているリステリアという菌で、この菌は臨床的にはそれほど大きな問題にはなりませんが、大学病院や癌センターのようなところで、基礎疾患がある

方、血液疾患、癌の方に、ごくまれに非常に致命的なリステリオシスが起こることがあります。また産婦人科でも、リステリアによる死産などを経験することがあります。報告されているものとしては日本では年間大体 50 例ぐらいですが、この菌の一番臨床的な問題は、これは牛のような反すうを持っている偶蹄類が自然界に持っており、それからヒトへ移ってくる、いわゆる zoonosis (人獣共通感染症) なわけです。

世界中ではいろいろなアウトブレイクが起こっており、特に乳製品、生乳や低温殺菌乳、風味がいいということで好まれているパステライズドミルクや、自家製のアイスクリームやチーズなどによって、特に肝臓が悪い方などが召し上がりますと、たまに脳髄膜炎や脳炎などを発症し、わかったときには手遅れということがしばしばあります。幸か不幸か日本ではアウトブレイクは起こっていませんが、食生活の変化によって、日本でも、カナダやヨーロッパで見られた 100 人規模、死亡が半数以上ということが起こらない保障はありません。

ただ、今日お話しするのは、そういうリステリア症を引き起こす原因起炎菌としてどうかということではなく、あくまでマクロファージの中で生き延びるメカニズムと、それに対して我々はどう応答するかという、一つのモデルとしてお話をさせていただきたいと思います。

もう一つは、サルモネラのある種のもので、この A, B, C と書いてありますが、簡単に申しますと、そのエスケープのしかたが違うわけです。結核菌はなぜ殺されないかという、たくさんものがありますが、最も大きな理由は、この殺菌因子を含んでいる顆粒が、自分を取り込んだファゴソームに融合しないようにしてしまう方法を取ります。

リステリアというのは、あとで詳しくお話ししますが、ある蛋白分子を使って、その融合をブロックすることはできませんが、自分を取り囲んでいるファゴソームの膜を破り、細胞質へ逃げ出すということをします。非常に珍しいタイプの菌です。

サルモネラおよびその類似の菌についてはよくわかりませんが、P-L fusion が起こり、活性酸素が降り注ぎ、そこからいろいろな殺菌性のペプチドや蛋白が降り注いでも、この中での環境の変化を察知するシステムを持っています。それによって、新たな遺伝子発現を起こして、そういった殺菌因子から身を守る、新たな蛋白を作ると考えられています。

一つだけ結核菌のスライドをお出ししますが、結核菌がなぜあれほど病原性が高いのか、そして慢性化するのか、十分わかっているわけではありませんが、その一つは構造にあります。それは普通のグラム陽性菌とはずいぶん違う、特殊な脂肪酸をたくさん持ったミコール酸含有糖脂質をはじめとする、非常に脂質に

富んだ細胞壁を持っていることです。これが非常に強いサイトカイン応答を引き起こします。

しかし、これだけで結核菌の病原性は説明できません。というのは、このような細胞壁のコンポーネントをマウスに注射しますと、確かに *granuloma* を作ったり炎症応答を引き起こしますが、いわゆる結核的な病気にはなりません。なぜ結核という伝染病、伝播性の強い病気が起こるかという、それは結核菌がマクロファージの中に、むしろ積極的に入り込んでいき、その中で殺されずに長く生き延びるという能力にあります。

一つは、マクロファージの表面にある、非常に多様なレセプターを積極的に使うという能力があり、もう一つ最も重要な能力は、このファゴソームに取り囲まれたあと、リソソームのフュージョンをブロックしてしまうという能力です。すでに結核菌の全ゲノムが明らかにされていますが、残念ながらこれがどのジーンプロダクトによって、どのような仕組みによってこれが可能になっているかは、まだわかっていません。

以下のお話は、非常に実験上のお話ばかりになりますが、リステリアという、私が若いころからいじっております菌についてお話をします。このリステリアという菌は、少し低温で培養しますと、鞭毛を4本作る、多少遊走能のあるグラム陽性の短桿菌です。コロニーとしては、ストレプトコッカスに似たコロニーを作りますが、この菌はストレプトコッカスなどとは違い、マクロファージに感染させますと、食食に抵抗することなく、簡単に取り込まれます。取り込まれた菌は、普通は殺されてしまうわけですが、この菌は殺されずに、例えばマクロファージ系の細胞の中でどんどん増えていきます。これをもしマウスに接種して、実験動物感染を起こしますと、ここにあるように、臓器の中で指数関数的に増えていき、病気を引き起こします。主な動物では、ターゲットは脾臓や肝臓ということになります。

このような動物は正常な動物ですから、生体防御能が正常です。にもかかわらず、このように増殖し、マウスを倒すわけです。ということは、それだけ強い病原性を持っているわけです。この病原機構がわかってきたのは比較的最近で、今私たちが知っている範囲では、このような *pathogenicity island* と私たちは呼びますが、この菌を病原菌たらしめる（これは必ずしもオペロンというわけではありませんが）一連の遺伝子群がまとまって、ある *chromosomal DNA* の中に存在しています。

その一つ一つについては、詳しくお話をすれば、ずいぶん時間を取ってお話ができるのですが、今日のお話のポイントは、私たちが主にやっている、この遺伝子産物の役割についてお話をしたいと存じますので、簡単にだけこの役割をお話します。

このリステリアという菌は、マクロファージに取り込まれます。もしくは経口摂取されたリステリアは、おそらくもう一つ、インターナリン、インル A、インル B (InlA/B) という遺伝子があり、それを使って上皮細胞の E-カドヘリンを介して上皮細胞に入り込みます。しかし、マクロファージのような、異物を識別し食食する能力のある菌に関しては、別にそのインターナリンがなくても取り込まれる。つまり、殺す兵隊さんにどんどんつかまってしまうということをするわけです。

菌がこのファゴソームに取り込まれますと活性酸素が働きます。ところがこの菌は、非常にカタラーゼ反応の強い菌で、活性酸素の消去能が高い、さらにスーパーオキシド・ディスムターゼ (*superoxide dismutase*) の活性も高いということで、この中で降り注ぐ活性酸素は、ほとんど殺菌の役に立ちません。ところが、この食細胞の顆粒にある、特に好中球などではよく発達していますが、殺菌因子を含んだ顆粒が融合し降り注ぐと、この菌も生き延びていけないわけです。

ところが、この菌は結核菌のように、この融合をブロックする能力を持ちませんので、彼らはどうするかというと、できるだけ速やかにここに穴を空けて細胞質へ出ることをします。細胞質は同じ食細胞、つまり我々の防御細胞の、同じ細胞の中の殺菌機構、活性酸素にせよ、リソソームから供給される殺菌因子にせよ、非常にリスクが高いものですから、我々の食細胞では、この食胞の中でしか作用しない仕組みになっています。逆に言うと、この食胞さえ脱出してしまえば、同じ敵の腹の中であっても、細胞質という場所はぬくぬくと何の障害も受けずに、生き延びられる安住の地となります。

このファゴソームを破ることを可能にしているのが、*hly* という遺伝子の産物で、これから詳しくお話をしますリステリオリシン O (*Listeriolysin O*) という蛋白です。外に出たこの菌はそのあとどうするかというと、鞭毛があるわけですが、このべん毛を構造している遺伝子の発現は、37℃ではオフになるようになっていますので、移動装置としてべん毛を使うことができません。そこで彼らは、この *ActA* という遺伝子産物の、6万7000 ぐらいの *ActA* 蛋白を作ります。この *ActA* 蛋白は、非常におもしろい蛋白で、サイトゾルにあるアクチンを重合させる非常に重要なイニシエーターであり、それによって次々と、ある一方方向に、アクチンのポリマーから成る、我々がコメットテールと呼ぶものができてきます。菌体端で新しいモノメリックなアクチンが置き換わっていくのですが、それによってできるコメットテールに押される、押し上げられることによって、細胞質の中を動き回ることが出来ます。

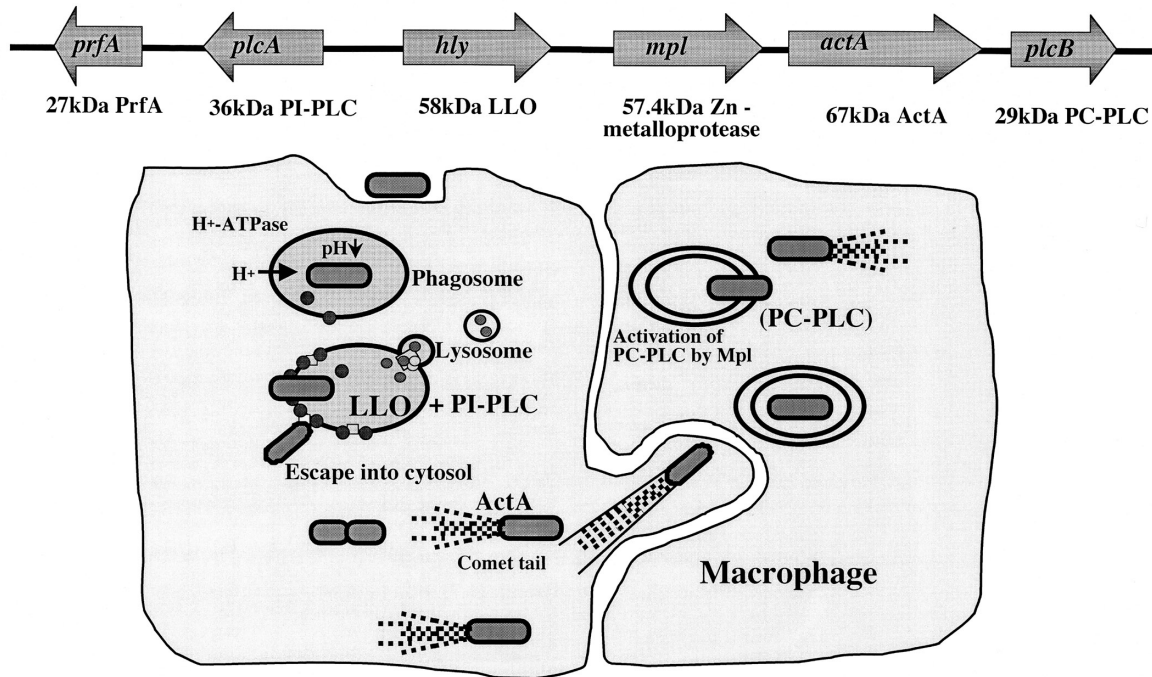


図 3. リステリアの細胞内寄生を可能にする遺伝子群とマクロファージ内での菌の動揺

そして、この二重膜をかぶって、隣の細胞へどんと protrusion するわけです。二重膜をかぶりますが、この2つのホスホリピッドを、ここに2つありますホスホリパーゼ、ホスファチジルイノシトールにスペシフィックなホスホリパーゼと、ブロードスペクトラムのレシチナーゼの2つを使って、このメタルプロテアーゼはこれを活性化するわけです。この膜を破って、また裸になって動き回って移るという、細胞から細胞への伝播をしてどんどん広がっていくと考えられます。

しかし、あくまでこのファゴソームを出ないことにはこういうことは起こりませんので、この中で何が一番重要なビルレンス・ファクターかというと、この *hly* です。実際、この *hly* という遺伝子をノックアウトした菌を作ってやりますと、ほかの遺伝子はインタクトに発現される菌であっても、*hly* の遺伝子が障害されただけでマクロファージの中での増殖は不可能になります。また、動物に接種しますと、ほかのブドウ球菌や連鎖球菌を打ったときと同じようにさっと殺されて、動物はひどい病気にはならないことを観察することができます。

このような病原因子があるために、例えば数千個のリステリア菌を健康なマウスに静注で接種しますと、肝臓や脾臓に菌が分布します。そのあと数日間にわたり、指数関数的に菌が増えます。したがって、この菌数を増やしてある程度以上打ちますと、マウスは3日ぐらいで全部死んでしまい、そのときには臓器の中には10の8乗から9乗ぐらいの

レベルにまで生菌が増殖しているという状態になります。

ところが、接種菌量のある程度のところまで上げてやりますと、いったん増えた菌がなぜか治療も何もしないのに、だんだん減り始めることを観察することができます。これがいわゆる生体防御機構です。つまり、生体防御機構をエスケープするような、そういう遺伝子を、virulence gene cluster として持っている菌に対しても、我々は何らかの方法によって、その感染を何とかやりくりすることができるということがわかります。

実際に、10日ぐらししますと菌が全部いなくなり、動物は回復します。そのように、いったん感染から自力で回復したマウスに、気の毒なのですが、もう1度同じ菌を接種してみます。そうしますと、初めて感染を受けたマウスだと、このように菌が増えていくのに、前に感染から立ち直ったマウスでは、全く菌が増殖していないことを観察することができます。つまり免疫ができています。

簡単に申しますと、この免疫というのは、いわゆる TH1 細胞が主体で働くものであり、この TH1 はいろいろな抗原、リステリアが持っている多様な抗原の刺激を受けると、マクロファージ活性化因子を出します。その実態として最も重要なものは、インターフェロンガンマですが、そのほかに GM-CSF など活性化因子として TH1 からリリースされます。このような免疫を担う抗原特異的な TH1 ができきますと、抗原の刺激によってこういう因子が出て、それ

によってマクロファージが活性化されます。活性化されたマクロファージの中では、もはやこのリステリア菌も増殖することはできません。

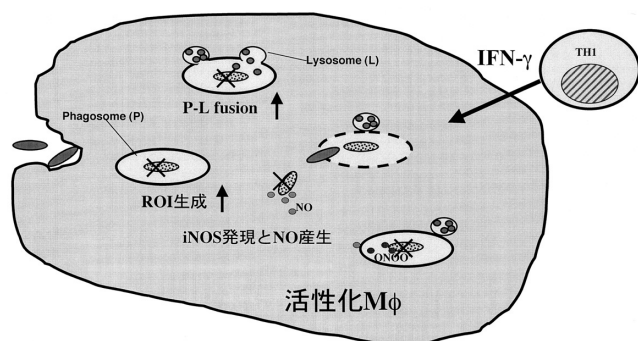


図4. TH1由来マクロファージ活性化因子 (IFN- γ) によるマクロファージの活性化と細胞内殺菌の亢進

なぜ増殖できなくなるのか。それはマクロファージが強くなるからです。どのように強くなるのか。大体、3つのことが考えられています。一つは、本来マクロファージが持っている機能がより高まること。その一つは、活性酸素を生成する能力が非常に高まります。これにより、一定程度のスーパーオキシド・ディスムターゼや、一定程度のカターゼしか発現できない菌は、それをはるかに上回るエフェクターの活性酸素が出てくれば殺されることになります。

もう一つは、これは分子レベルでのメカニズムがよくわかりませんが、ファゴソームとリソソームのフュージョンが非常に促進されます。これにより、P-L fusionをブロックするような結核菌などに対しても、かなり対処できるようになりますし、P-L fusionが時間的にも量的にも促進されることは、ある程度、時間をかけてこれを破ろうとしている菌をやっつけるうえでも役に立つわけです。

もう一つのメカニズムは、ナイトリック・オキシド (NO) を産生するということです。マクロファージは、high-output nitric oxide synthase, iNOS というものを持っており、これは普通は簡単には発現しないようになっていますが、活性化されるとこの発現が起こります。この一酸化窒素合成酵素がいったん発現されると、アルギニンを基質として、ナイトリック・オキシドというガス状の分子が作られます。このナイトリック・オキシドはラディカルであり、サイトゾルの中に作られます。すなわち、細胞内寄生菌のうち、サイトゾルへ逃げ出すことによって身を守ろうとしている菌に対しても、ナイトリック・オキシドはアタックをかけることができます。

もう一つ、ナイトリック・オキシドの重要な点は、活性酸素はファゴソームの生体膜を通して外へと浸透

できないのに対して、ナイトリック・オキシドは膜を越えて入っていくことができることです。したがって、ナイトリック・オキシドがファゴソームの中に入りますと、ファゴソームの中に充満しているスーパーオキシド・アニオンと反応が起こり、ペルオキシナイトライト (ONOO⁻) という分子ができますが、これはかなり安定で、非常に強力な殺菌作用を持っています。ナイトリック・オキシドができることによって、細胞質に逃げ出した細胞内寄生菌も殺すことができるし、その中で増えているような P-L fusion をブロックしているような菌に対しても、アタックがかけられることになります。

つまり、このような単純化した系における T 細胞免疫というのは、わかりやすく言えば、ポパイにほうれん草の缶詰めを T 細胞があげて、それを食べたポパイが元気になる、そしてブルートをやっつけるということになります。

ところで、この菌に対して感染マウスでは、非常に強い TH1 の誘導と、再感染防御免疫がみられ、これは passive transfer で TH1 であることが証明できるわけですが、私たちは昔から、このような TH1 細胞がどのようにして誘導されるのか、どのようにそのエフェクターとして働くのかを研究してきました。その過程で、大昔から常に疑問であったことが一つあります。

というのは、リステリアの生菌で免疫をすることによって誘導ができますが、死菌ワクチンでは、絶対に再感染防御免疫を誘導することはできません。もしくは、リステリアのコンポーネントワクチンを作って打ってやっても、ほとんど誘導できません。実は結核でも似たようなことがいえます。マウスに BCG を接種することにより、結核菌に対する感染防御免疫を誘導することができます。その本体は、ほとんど TH1 だということを知ることができます。

ご存じのように、BCG は今は効き目が悪い、効かないと、1980 年に報告のあったインドのチングルブットスタディでは、20 万人規模のフィールドスタディをやって、BCG の予防接種の効果はゼロという結果が “Lancet” に載りました。“Bad News from India” というタイトルで、エディトリアルが掲載されました。いろいろ問題はありますが、世界の多くの研究者は、BCG は効かないのだと公言しています。一般にはそういうわざをえません。

しかし、少なくともマウスに BCG を接種して、全身感染モデルを作りますと、これは決してヒトの結核のモデルではないのですが、ものすごく効きます。そのときに BCG をもし加熱死菌にしたりホルマリン死菌にしたものを接種すると、ほんのわずかの防御効果は出ますが、生菌と同様の強い防御効果は全く誘導できません。これは昔からどなたもお考えだと思いますが、BCG がある程度、効くのではないかと思います。

いた時代でも、あれが死んでいたら効くはずはない。たぶんあまりエビデンスはなくても、BCGの活きが悪ければ、それはだめだろうということは常識だったのではないかと思います。動物実験では、まさにそうなるわけです。

私たちは、なぜそうなのかということに、非常に長い間興味を持っていました。そのなぜ生菌でないのだめなのかということをはっきりとすれば、裏を返せば、それによって有効なワクチンへの手だても考えられるかもしれない。また、その臨床応用はともかく、実験感染学的に昔から非常に、だれもが知っていて、だれもが説明できないことを説明したいということでした。

このリステリアを使った研究をしている過程で、私たちは次のようなことに気づきました。それは、生きた病原性の高いリステリアで、弱い感染を起こしたネズミには、プロテクションが誘導され、TH1細胞が誘導される。しかし、死んだリステリア、これは加熱をしてもホルマリンでも、そういうことは誘導されません。ところが生きていても、彼らがファゴソームからエスケープして生き延びるための菌の病原因子である、*hly*という遺伝子をノックアウトしてやった菌では、この菌もワイルドタイプの菌も、培地の上では全くその増殖は変わらないにもかかわらず、感染させてやっても免疫が誘導できないことがわかりました。さらにいろいろ調べていきますと、その免疫をされた動物の体内では、非常に早期に、このグループのマウスにおいてだけ、内因性のインターフェロンガンマの発現が非常に強く誘導されるけれども、この2つではだめだということがわかりました。

このことが何を意味するかというと、免疫が誘導されるときには、早期に内因性のインターフェロンガンマがたくさん出る状況でないとだめだということです。これは昔のオブザベーションですが、今のようにはTH1、TH2が、やや極端にアクセプトされ、インターフェロンガンマの役割が教科書に載る時代では、これはあたりまえのオブザベーションなのです。そのような昔のオブザベーションから、私たちは次のようなことを考えました。

つまり、内因性のインターフェロンガンマが重要である。そして、一つの遺伝子をノックアウトしただけで、それが起こらなくなるということには、単純化すればこの*hly*という遺伝子産物であるLLOというバクテリアのトキシンが、ダイレクトにマウスにインターフェロンガンマを誘導させるのではないかと。死菌は、遺伝子DNAは壊れていなくて、あってもいいわけですが、殺していますので蛋白を作れません。ですから、これは当然作らないわけです。そのようなことを一つの仮説として考えました。

と同時に、本当にこの内因性のインターフェロンガ

ンマを *in vivo* でブロックしてやると、プロテクションが誘導できないかどうかということ、動物実験をしました。簡単に申し上げますと、そのとおりであり、免疫をして最初の数日間だけ、マウスのインターフェロンガンマを中和する十分量のラットの抗体を投与してやりますと、出るべきこのプロテクションが全く出てこないことがわかり、この内因性インターフェロンガンマの重要性がわかりました。

そこで私たちはその仮説を検証すべく、私がまだ新潟にいたころには、培養上清からリステリオリシンOを作っていました。これはカラム使って精成するわけです。そして、このネイティブなリステリオリシンOというバクテリアの毒素蛋白を生成し、マウスの脾臓の細胞にかけてやりますと、確かに用量依存的にインターフェロンガンマが培養上清中に産生されることがわかりました。この毒素には、宿主にインターフェロンガンマ誘導活性があることがわかりました。

さらに、そうであるとすれば、このインターフェロンガンマがTH1の分化を促進させるという考え方に立てば、単独では防御免疫が誘導できない、例えば Δhly 株による免疫において、LLOという蛋白をアジュバントのように使えば、プロテクションが誘導できるのではないかとこの考えに基づいて、そのような動物実験を行いました。

そうしますと、野生株で感染を起こさせると、1週間か10日後に防御免疫が誘導でき、TH1が誘導されますが、死菌や Δhly というノックアウト株ではだめです。この Δhly 株と同時に、ある方法を使ってリステリオリシンOと一緒に混ぜてマウスに打ってやります。死菌に混ぜて打ってやりますと、LLOだけを打ってもだめなのですが、こういう抗原とLLOをアジュバント的に使うと、防御免疫やTH1が誘導できることが証明できました。つまり、そのような仮説は正しいであろうということになります。

そこで、私たちが次に知りたいと思ったことは、本来リステリオリシンOは、細胞膜を壊すバクテリアの毒素タンパクです。これは血液寒天培地の上では、A群溶連菌として知られている、ストレプトコッカス・ピオジェネス (*Streptococcus pyogenes*) のように、コロニーの周りに溶血斑を作ります。その溶血斑は、周りの赤血球が壊れて溶血しているわけで、非常に長い間、このリステリオリシンOというものは溶血毒としてのみ知られていました。

そのような溶血性、もしくはファゴソームを破る、つまり生体膜を破るという毒素が、なぜ生体にとっては都合のいいサイトカイン誘導という別な側面を持っているのか。一つの分子に、そのように全く違う活性があるのは、いったいどういう機構になっているのか、そういうことを少し詳しく調べようと思いました。

4年少し前に、私は京都大学の方に移る機会があり、ゼロからラボをつくって、最初は2~3人から始めたのです。動物実験が、いろいろな事情でできにくい状態にありましたので、しかたなくもう少し試験管の仕事、バイオケミカルな仕事で、それを明らかにしようと考えました。幸い、私たちの力ではありませんが、すでにこのリステリオリシンOをコードする *hly* という遺伝子のシーケンスがわかっていました。ただ残念ながら、まだだれも LLO の立体構造を明らかにした人はいないわけです。この同じファミリーの毒素蛋白は、グラム陽性菌に分布していますが、クロストリジウム・パーフリンジエンス (*Clostridium perfringens*) が産生するパーフォリンゴリシンOという分子の結晶解析の結果が、1998年、“Cell”に載りました。このような4つのドメインから成っています。

このアミノ酸シーケンスは、非常にホモロジーが高いので、この構造をもとに調べていくと、LLOの、これはアミノ酸のシーケンスですが、このようにドメインが分布しています。1, 2, 3というのは非常に折り畳まれていて、コンプレックスになっているので、これを切り離した、ドメイン1だけの標品やドメイン2だけの標品を作ることは難しいのです。ここでヒンジがあり、ドメイン4だけは一本鎖になっているということがわかります。

そこで、私たちはリコンビナントの蛋白を作ってみました。まずフルサイズのものを作ってみますと、確かに私たちが作ったリコンビナント LLO は溶血活性を示しました。これを細胞にかけて電子顕微鏡で見ると、ここにありますように、少し小さいのですが、孔が形成され、細胞傷害性があるということがわかりました。ここにありますように、溶血活性を見ますと、このリコンビナントは用量依存的に非常に速やかにサーチュレートして、非常に強い細胞傷害活性を示します。

ところが、この状態で細胞にかけてやりますと、細胞から障害されてインターフェロンガンマの産生は認められません。ところが、非常に少量のコレステロールで処理をしてやりますと、その溶血活性が完全になくなってしまふのと反対に、サイトカイン誘導活性が出てきます。つまり、この分子はたぶん膜のコレステロールにくっつくのです。しかし、フリーのコレステロールをかけてやりますと、常に毒素がブロックされて、膜にくっつけなくなる代わりに、なぜかサイトカイン誘導活性が前面に出てくるというように考えられました。

そこで、それを明らかにするために、私たちはこのフルサイズの LLO を、いろいろ切ったりアミノ酸を入れ替えることをしました。そして、たくさんのリコンビナントを作りました。その一部をお示しま

すが、これは第4ドメインを構成しているC末端部分から少しずつ削っていったものです。このように、シルバーステインで、シングルバンドになるような標品を作りました。

そうしてみますと、結論だけ申し上げますと、このC末端の第4ドメインを削っていくと、すぐに細胞傷害活性はなくなってしまうことがわかりました。ところが、サイトカイン誘導活性は、このC末端を削っていても結構残っているということがわかりました。しかしながら、第4ドメインだけの分子量の小さな標品を作ってみますと、それ自身には溶血活性もなければ、サイトカイン誘導活性もないことがわかりました。

少し時間が足りなそうなので、この辺は飛ばしますが、薄層を使ってコレステロールへの結合能を見てみますと、フルサイズのものとは第4ドメインには、コレステロールへの結合能があるけれども、C末端を少しでも削ってやると、それがなくなることがわかりました。さらに、コンピペティティブ・アッセイをすることにより、このドメイン4という短い分子は、フルサイズの毒素による細胞障害活性を用量依存的にブロックできるけれども、サイトカイン誘導活性はブロックできないことを知ることができました。

つまり、第4ドメインは、細胞膜のコレステロールにくっついて細胞傷害活性を発揮するのですが、それとはどうも別の、無関係のN末端側の方の部分が、細胞と何らかのインタラクションして、サイトカイン誘導を引き起こすことがわかりました。

このシェーマにありますように、ドメイン4というのは、この膜のコレステロールにくっついて、このような構造を取ると考えられています。オリゴマーを作って、私たちが電顕で見たような穴を開ける。このプロセスには、第4ドメインを介する膜コレステロールへの結合と、1-3ドメインも含まれたオリゴマーの形成、このメカニズムはまだよくわからないのですが、重要であることがわかります。サイトカインのシグナルを入れるには、ここだけで十分であるということがわかりました。

次に私たちがやりましたのは、このリステリアという病原菌の仲間には、少し病原性が落ちますが、いくつかの菌種があり、その中の残り2つの遺伝子を見てみますと、非常によく似た病原因子遺伝子群があります。しかし、*Listeria welshmeri* と *Listeria innocua* という環境から見つかる非病原菌には、ここからここまでの病原因子遺伝子群がごっそり欠落しています。どこからか、入ってきたのかもしれませんが、それをよく検討し、シーケンスも調べてみますと、この *hly* と非常によく似た、80%ぐらいのホモロジーを示すようなヘモリシンがコードされていることがわかりましたので、私たちはこの2つの異なったヘモリ

シンも作ってみることにしました。

当初は、私たちは最初に観察したりコンビナント LLO と同じようなことを予想したわけです。ところが、作った結果はどうも様相が違いました。一つは、*Listeria seeligeri* の遺伝子である LSO 遺伝子がコードしている seeligeriolysin という 530 アミノ酸から成るリコンビナントなのです。インターフェロンガンマ誘導活性は同じようにあるにもかかわらず、LLO に比べると、膜傷害活性が非常に低いことがわかりました。なぜそうなのか。いろいろなことを調べていくうちに、その C 末端に近いこのアミド化ペプチドのこのコンサーブされた領域の、本来 Ala であるところが、Phe に置き換わっていることがわかりました。そこで、この Ala と Phe を取り換えてみることをしてみました。

そうしますとわかったことは、このペプチド配列の中の Ala が、cytolytic activity の発現にはかなり重要であり、もともと遺伝子レベルでこれが置き換わって phe になっているために、LSO の cytolytic activity は弱いのだということがわかりました。

またもう一つこれから得られる情報は、この C 末端でそのようなことが起こって細胞傷害活性に変化が出ても、N 末端側がたぶんやっているだろうと思われるサイトカイン誘導活性には影響がないということで、これも私達の仮説をサポートするものです。

もう一つの菌である *Listeria ivanovii* という菌の持っている ilo 遺伝子産物である ivanolysin というやはりこれも 528 個のアミノ酸から成る蛋白を作ってみますと、非常に強い細胞傷害活性を示しました。

ところが、またこれも予想に反して、ILO は、LLO が示すようなインターフェロンガンマ誘導活性を示さなかったのです。そこで私たちは困り、この N 末端が重要であろうから、ここが何かおかしいのだろう。そうすれば、これを置き換えてやれば、つまりいわゆるドメイン・スワッピングをすれば回復するのではないかと考えました。そういうドメイン・スワッピングをやってみましたら、確かにそのとおりで、この強いものの 1-3 ドメインをこれに持ってきて変えてやりますと活性が出ますし、この 1-3 ドメインを、ない 1-3 ドメインにスワップしてやりますと活性がなくなることから、1-3 ドメインが重要であることがわかりました。

ただ問題は、非常にホモロジーの高い 3 つの蛋白でありながら、なぜあるものはサイトカイン誘導活性がほとんどなく、あるものは cytolytic activity が低いのか？。私たちの興味は、TH1 を誘導するうえで必要なサイトカイン誘導活性ですから、cytolysis ではなくて、サイトカイン誘導活性の本体がどうなっているかということを知りたい訳です。

それで、この 1-3 ドメインのこの辺に注目し、いろ

いろなことを考えてみました。コンピュータでいろいろな解析をしましたが、サイトカイン誘導活性があるものだけに共通で、こちらにないというシークエンスやアミノ酸を見つけ出すことができませんでした。しかしその後、少しずつ削っていく実験から、どうもこのシグナル・シークエンス以降の大体 20 番目ぐらいまでのアミノ酸が、特に重要だということがわかりましたので、これをいろいろアミノ酸を変えるようなことも考えました。

そして、あるときこのシークエンスを、いろいろあちらから眺めたり、こちらから眺めたりしていて、ハイドロパシーを描かせてみたわけです。そうしたら、サイトカイン誘導活性があるこの 2 つと、ILO、サイトカイン誘導活性のないものを並べますと、非常によく似ている。ところが、どこが違うかというと、この一番エクストリーム N 末端のところを拡大しますと、こういう違いがあるのです。そこで、これは大体 12~13 番目ぐらいまでのアミノ酸の、オリゴペプチドで書かれるハイドロパシーなのですが、そこで 13 番目ぐらいまでのアミノ酸が重要ではないかと考え、今度は 13 番目までのアミノ酸をいろいろ入れ替えることをやってみました。

そうしますと、必ずしも望んだとおりの結果ではありませんでしたが、本来活性があるこのようなフルサイズのもの 13 番目までを、活性のない由来のものに置き換えただけで、活性がなくなることがわかりました。しかし残念ながら、活性が全くないものの 13 番目を活性のある 13 個のアミノ酸に置き換えても、少し上がったのですが、これがどんと上がることはありませんでした。

次に、これは 34 番なのですが、N 末端から順番にオリゴペプチドをオーバーラッピングペプチドを作って、そのものに単独でサイトカイン誘導活性がないかということはかなりお金をかけて調べましたら、残念ながら、そのような活性は、オリゴペプチドそのものにはありませんでした。やはり全体としての構造、その中で N 末端の部分がとっている何らかのコンフォメーションが大事だろうと考えられました。まだ結論は出ていませんが、どうも PEST sequence というものが、かなり重要な意味を持っているのではないかと、今の一つの作業仮説です。この PEST sequence は、本来は細胞の中でいかなる蛋白であれ、どのようなデグラデーションを受けるかという、一つのデグラデーションを受けやすさのシグナルになっているものです。詳細は省略しますが、簡単に言いますと、サイトカイン誘導活性がある蛋白の N 末端には、PEST score が高い。ないものには、この PEST 配列が認められないということに気がつきました。

そのサイトカイン誘導活性があるものには、この PEST sequence がある、これにはない。そこで、

PESTをなくすことをしました。アルギニンをトリプトファンに置き換えることをして、PEST scoreをなくしてやりますと、この場合にはチョッピングやドメインスワップではないので、シークエンスは全く一緒に、アミノ酸の数も一緒に、アミノ酸の種類が1個だけ置き換わっていることになるわけです。このLysを置き換えただけでPEST scoreがゼロになり、サイトカイン誘導活性がなくなってしまうが、溶血活性はなくなることがわかりました。

ここで少し話が変わり、LLOのこのようなサイトカイン誘導活性によって、どのようにしてインターフェロンガンマが産生されるのかについて、*in vitro*での結果をお示しします。いろいろな細胞を分画するとか抗体を使う、ノックアウトマウスを使うことによって、何がわかったか。このインターフェロンガンマを出すうえで何が大事かという、NK細胞とマクロファージ系の細胞が大事であり、*dendritic cell*も関与していること、サイトカインとしては、IL-12とIL-18が大事だということがわかりました。それは、IL-12のノックアウトマウスやIL-18のノックアウトマウスを使っても確認することができました。漫画で書きますと、つまりLLOという菌の蛋白毒素は、マクロファージを最初に刺激して、IL-12やIL-18を出させる。これにより、NKもしくはNK+DCから、インターフェロンガンマがたくさん産生されることにより、TH1の分化が起こると考えられます。

このようなバクテリアのプロダクトが、マクロファージというinnate immunityを刺激することは、この数年来、非常にもてはやされており、特にTLRにからんだ研究が進んでいます。私たちも当然、このLLOという蛋白が、TLRを介してマクロファージを刺激するのではないかと想定し、TLRのノックアウトマウスを入手してやってみました。

非常におもしろいことには、これはまだパブリッシュしていないのですが、これまでにないオブザベーションとなります。それはTLRの2とTLRの4の両方が必要であることです。そして、どちらか欠けているだけで起こりませんので、これはどちらも使っているのではなく、たぶんヘテロダイマーか何かになっていないと、だめだということになるわけです。そういうイグザンプルは、これまでないわけです。そのせいもあってなかなか通りにくい。

そしてもう一つ、確かにTLRを使っていることを証明するためには、MyD88という、TLRすべてのファミリーに共通しているアダプター分子を、ノックアウトしたものを使えばいいわけです。これも審良教授から頂戴してやってみますと、TLR2を使うペプチドグリカン、TLR4を使うLPS、どちらもこのMyD88のノックアウトマウスでは全然、反応がない。そういう状況でLLOも反応を起こさないということで、TLRを使っ

ていることはまちがいないし、ノックアウトから2と4の両方を使っているらしいということが出来ます。

もう一つ、これをサポートするためには、例えばHEK cellのような細胞にTLRをトランジェントにエクソプレスさせてやり、この強制発現系でどう反応が起こるか、NF- κ Bのアクチベーションを見るという方法があります。それをやってみますと、まだこれは十分とは言えませんが、TLRの2と4、もちろんそこにCD14とMD2がいるわけですが、それらを発現させたときに最もいい反応が起こることから、結論としては、たぶんこのエクストリームN末端の部分が（もう一つ何か介しているかどうかまではわからないのです。いろいろ探しているのですが）、少なくともTLRの2と4を介して、NF- κ Bアクチベーションのシグナルを入れて、それによりIL-12やIL-18の産生が起こり、インターフェロンガンマ応答が最終的に起こり、TH1が誘導されるであろうと考えられます。

最後に、ここで申し上げたいことは、細かいことは置くとして、バクテリアは非常に巧妙な仕組みを使って、私たちがこれまでevolveしてきたというか、獲得してきた生体防御機構をすり抜けようとしたり、これを壊そうとしたりするわけです。それがビルレンス・ファクターなわけです。ところがよく見てみると、この例のように、そのようなビルレンス・ファクターを一つのアラームとして、私たちというかネズミなのですが、動物は「もう一歩上の方策を練り出すべき」という、シグナルとして使っているのではないかと。そのようなせめぎ合い、しのぎ合いの過程で、今の私たちがあり、今の私たちが見ている免疫機構、免疫防御機構があるのではないかということが、伺えるのではないかと思います。

時間をオーバーしてしまい、あまり臨床のお役に立つお話ではなく恐縮ですが、以上です。

座長：光山先生、大変興味深いお話をいただき、どうもありがとうございました。質疑応答です。はい、どうぞ。

参加者：ありがとうございました。非常にプリミティブな質問になろうかと思いますが、先生のお話ですと、リステリアのエスケープ現象は、免疫した場合には、マクロファージ内でスーパーオキシドなり、ナイトリック・オキシドを大量に産生するゆえに失われるのだと、こういうお話ですね。TH1系のマクロファージ・エスティメート・ファクターにインターフェロンガンマを含み、それによって、細胞内の濃度が高まるというお話ですね。

光山：はい。

参加者：実は、私どもも肝のマクロファージを使って、これはP. アクネスなのですが、プライミングという状態が起きて、そのときに細胞内でいったいそう

いう TNF にしろ、あるいはスーパーオキシドがどうであるかは、動態を見ていないのです。しかし、もう一つそこに excitation を LP3 で刺激しますと、それが大量に産生され、細胞外に放出されて、toxicity を発揮するという現象をとらえているのです。しかも、そのときにはプライミングを起こす刺激因子が、やはりインターフェロンガンマなのです。その2つの間で何か違いがあるのかどうか、私の質問をもう1度繰り返しますと・・・。

光山：わかります。先生がおっしゃっている系は、昔から非常に有名なものです。

参加者：ええ、昔からあるものです。

光山：P. アクネスで前感作をしておいて、LPS をシステミックに投与すると、ものすごい肝障害が起こるし、そのときに血中に TNF やインターフェロンや、サイトカインが出るわけですね。その系を使って兵庫医大の岡村さんが見つけたのが、IL-18 なのです。そこで起こっている現象と・・・。

参加者：先生の先程のマクロファージの中で、ナイトリック・オキシドにしろ、スーパーオキシドが大量に存在する。それがエスケープ現象をブロックするのだという、こういうお話だったと思うのですが。

光山：はい。

参加者：つまり、細胞内に、すでにそこにものが存在しているというメカニズムなのですが、私どもの見ているものは、産生能を高める、要するにプライミングを起こしているだけであるということなのです。インターフェロンガンマであるということもつかまえています。

光山：P. アクネスは、私はあまり経験がないのですが、あれを接種しますと、顕微鏡で切ってみますと、クッパーセルにたくさんいますね。たしか。

参加者：ええ。

光山：そしてヘパティックセルには、あまりないのではないかとと思うのですが。

参加者：何がですか。

光山：P. アクネスの菌体です。

参加者：いや、これは動物モデルとして、たまたま使っているのであって、P. アクネス自体が普通の人間の肝細胞にいることはありません。

光山：ですから、これは私の考えですが、実はその P. アクネス+LPS の系を使っている方は、日本でも世界でも非常にたくさんの方がいらっしゃると思うのです。けれども、おそらくだれ1人としてその前感作に使った P. アクネスが、どのような動態で、どのように分布していて、何を刺激しているかを分子レベルで知っている人はいないと思うのです。わずかに最近いわれているのは、例えば TLR のエクスプレッションが変わっているかということを見ると、非常に高まっているという実験系がいくつかあります。それ

によって、FPS で次に provocation するのかなと思いますが、そういう実験が・・・。

参加者：私どもは TNF α とスーパーオキシドです。

光山：なるほど。やはりそのプロボケーションで行かなくなりますか。

参加者：そうです。プロボケーションで広範な肝壊死を起こすということは、10 年以上前からいくつか証明していますけれども、細胞内で見ただけではないのです。今、先生のお話を聞いて、少し疑問に思ったというか。

光山：十分お答えできなくて申し訳ありません。

座長：あと一つだけございますか。はい、渡辺先生。

渡辺（埼玉医大・生理）：LLO のドメイン 4 がコレステロールについて、細胞膜を破壊して溶血する。私は細菌の細胞膜や壁、あるいはそういう細菌が LLO をどうやって放り出すのか、全然わかっていないからこういう質問をするのです。リステリア自身に、その膜の崩壊をこの LLO が起こさない理由は、コレステロールがないとか、あるいは何かそういう理由なのでしょう。

光山：自分が壊れない理由ということですか。

渡辺：ええ、自分自身。

光山：それは確かに、ごもっともなご質問だと思います。LLO を、それがリコンビナントでもネイティブでも、我々が作ったものを、せっせと菌にかけてどのくらい傷害がないのかということ、コンファームしたことはありません。しかし、おそらくこれは細菌の膜にはコレステロールがありませんので、コレステロールがないことが、たぶんインタープリテーションとしては一番考えていいのではないかと思います。

それから、これはリーダーシークエンスがありますが、25 個のアミノ酸がシグナル・シークエンスについていて、そのプロボクされる場所のメカニズムは、必ずしもコンファームされてはいないのですが、外に出ていって切り離されます。そして外で働くわけですが、この菌の場合には、グラム陽性菌で比較的セルウォールが強いので、大腸菌などとは違い、cytoplasmic membrane の外側には、かなり厚いギャップがあるわけです。

ですから、うまく出してしまうと、例えばコレステロールのあるなしで説明できますが、感受性が多少あったとしても、cytoplasmic membrane へのアクセスはほとんど不可能になると思いますので、その2つで一応解釈はできますけれども、実験的にそれを実際に見て確かめたことはありません。

渡辺：そうすると、いずれにしてもドメインの 1-3 のあたりが、うまく組み合うことによって、膜に穴を開けていくとか、そういうメカニズム自体は存在しているわけですか。

光山：メカニズムとしては、実はこれはものすごくバ

イオケミカルな人たちの中には、ステプトオリシン O とか、LLO を使っている人はいないのですが、パーフリングオリシオン O を使って、そのモデルでどのように配列するのかを、一生懸命やっているグループが世界に 3 つぐらいあるのです。これは全く感染や免疫、宿主応答、病原性など全く無関係に、物として、蛋白の一つのモデルとして、やっていらっしゃる方があるのです。

そのグループが、JBC などにときどき出しているものを見ますと、まだよくわからないのですが、パーフォリンゴオリシン O などは、ドメイン 4 でコレステロールにくっついて、そうすると、ある物理科学的な力がかかって、1-3 の丸いドメインが、ある角度でベントしてくるのです。そしてそれが並ぶ。実際に並ぶのは電顕的に証明、見ることはできるのですが、なぜそのライニングするのか。固まりになってふ

さぐのではなく、なぜ孔が開くのか。それはまだよくわからないのです。

もう一つは、やはりこの細胞から言うとコレステロールといえば、ラフトです。リピッドラフトがどのように存在していて、もしかすると、そのシグナリングにはラフトが関係しているのではないかという可能性が非常にあります。ラフトの研究も含めてやっているのですが、そういったことも関係あるかもしれません。そんな状況です。

渡辺：どうもありがとうございます。

座長：それでは、光山先生、どうも興味深いお話をいただきまして、ありがとうございました。それでは、ブレイクを 10 分間取らせていただき、6 時 20 分から次の演題に入らせていただきたいと思います。よろしくお願いいたします。