

学位論文要旨

氏名 橋野 正紀

題目 : Studies on Molecular Mechanisms of Placental Infection by *Listeria monocytogenes*
(リステリアモノサイトゲネスによる胎盤感染の分子機構に関する研究)

論文要旨 :

Listeria monocytogenes (Lm)は、グラム陽性の細胞内寄生菌であり人獣共通感染であるリステリア症の原因菌である。多くの場合リステリア症は重篤な症状を引き起こすことはないが、免疫機能の低下状態にある人々（高齢者、新生児、妊婦、免疫不全疾患患者など）は感染リスクが高く、髄膜脳炎や流産等の重篤な症状を引き起こすことが知られている。特に妊娠期のLm感染は、高率に感染性流産を引き起こし、公衆衛生学上の大きな問題となっている。しかしながら、感染性流産の発症機序に関しては、菌の胎盤への感染が必須であることが知られているが、菌の胎盤への感染様式や感染後の免疫応答などについては未だに不明な点が多く存在し、予防・治療法の確立の障害となっている。そこで、本研究では感染性流産の予防・治療法の確立を目的に、マウス胎盤細胞株を用いて、Lm感染に重要な役割を担う受容体の同定およびLm感染に起因する細胞内シグナル伝達の変動に着目し、解析を試みた。

第一章では、マウス胎盤細胞株である栄養膜巨細胞(Trophoblast giant cell: TGC)を用いて、Lmの細胞内侵入に関与する受容体の同定を行った。TGCはマウス胎盤を構成する細胞の一つであり、胎盤の母子境界領域に存在する。また、先行研究によりTGCはマクロファージ用の貪食能を有する胎盤における免疫担当細胞であり、流産起因菌の胎盤感染における標的細胞であることが示唆されている。マイクロアレイを用いて、TGCにおいて発現が認められる受容体を探索した結果から、パターン認識受容体であるMannose receptor, C type 1(MRC1)に着目した。Reverse Transcription PCR および western blotting の結果からTGCにおけるMRC1の発現が明らかとなった。RNAi技術を用いてMRC1をノックダウン処理したTGCを使用しLm感染実験を行った結果、MRC1をノックダウンしたTGCではLmの細胞内侵入量が有意に減少した。また、MRC1のリガンドを処理したTGCにおいても、MRC1ノックダウン時と同様にLmの細胞内侵入量の顕著な減少が認められた。加えて、ファゴリソソーム染色を用いて、TGC内に取込まれた菌体の経時的動態を観察した結果、MRC1を介した菌の取込みでは、菌体を含んだファゴソームとリソソームとの融合に遅延が生ずることが示された。以上の結果から、LmのTGCへの細胞内侵入にはMRC1が利用されていることが示唆された。また、Lmの細胞内寄生にはファゴームからの脱出が必須であることから、MRC1を介した細胞内侵入ではファゴソームとリソソームとの融合遅延がLmの細胞質への脱出に有利に機能していることが考えられる。

第二章では、TGC を用いて、胎盤細胞内での Lm 感染によるシグナル伝達の変動についての検討を行った。Lm 感染による流産の誘導には、胎盤細胞への菌の侵入後における宿主免疫応答が重要な役割を担っていることが予想される。しかしながら、Lm 感染による胎盤での細胞内シグナル伝達への影響については全くの不明な状態であったため、TGC を用いて Lm 感染による細胞内シグナル伝達に対する影響についての解析を行った。MRC1 との関連性が報告されている細胞内シグナル伝達経路として Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナル伝達経路が重要であると考えられたため、Lm 感染との関連性を検討した。その結果 Lm 感染により MAPK family protein (p38、ERK、c-jun)の脱リン酸化が誘導されることが示された。更に、この MAPK family protein の脱リン酸化が妊娠の維持に重要な役割を果たす Heme Oxygenase (HO)-1 の発現量低下を介して、TGC の細胞死を誘導することが明らかとなった。また、MAPK 特異的阻害剤を処理した非感染状態の TGC においても HO-1 発現量の低下が示された。脱リン酸化誘導の責任因子の探索を目的に Lm の主要病原因子の一つである Listeriolysin O (LLO)欠損変異株を用いて、同様に MAPK family protein への影響を確認した結果、LLO 欠損変異株感染では MAPK family protein の脱リン酸化は認められなかった。更に HO-1 の発現量に関しても、LLO 欠損変異株感染では低下が認められなかった。以上の結果から、胎盤への Lm 感染は、LLO 依存的に MAPK family protein の脱リン酸化を誘導し、HO-1 の発現量の低下を介して細胞死を引き起こすことが示唆された。感染性流産では胎盤での細胞死が要因となることから、Lm 感染による MAPK family protein の脱リン酸化誘導が感染性流産の重要な引き金となると考えられる。

本研究では、これまでに不明な状態であった Lm の胎盤感染様式および感染性流産誘導機序に対して、TGC に着目し、病原体の感染から流産誘導までの一連の反応を解析しており、得られた知見は感染流産の予防・治療法の確立に大きく貢献するものだと期待できる。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	橋野 正紀
審査委員	主 査： 山口大学 教授 度会 雅久
	副 査： 鳥取大学 教授 村瀬 敏之
	副 査： 山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査： JRA 競走馬総合研究所 主査 丹羽 秀和
	副 査： 山口大学 准教授 清水 隆
題 目	Studies on Molecular Mechanisms of Placental Infection by <i>Listeria monocytogenes</i> (リステリアモノサイトゲネスによる胎盤感染の分子機構に関する研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>妊娠母体は非妊娠個体に比べ、免疫応答が異なっていると考えられている。胎児を体内に宿すという特殊な環境下において、細胞内寄生性病原体が引き起こす感染症に罹患した場合、重症化することが懸念されている。その原因として、母体における免疫応答の関与が考えられている。重症化あるいは流産は胎盤局所および全身の免疫応答が連動して引き起こされるものと推測されるが、その機構は不明である。本論文では胎盤に感染し流産を引き起こす細菌の代表として <i>Listeria monocytogenes</i> を用いて、胎盤における菌の増殖機構を分子レベルで解析した。とくに胎盤中の標的細胞と考えられる栄養膜巨細胞(trophoblast giant cell: TGC)との相互作用を中心に解析し、菌の胎盤感染が妊娠の維持に与える影響について検討を行った。結果は以下のとおりである。</p> <p>1) TGC 上に発現する細菌感染に関与する受容体の解析</p> <p><i>L. monocytogenes</i> の胎盤感染で重要な鍵となりうる TGC 細胞表面受容体の探索を行った結果、Toll-like receptor 2 (TLR2)および class B scavenger receptor type 1 (SR-B1)が菌の感染に関与することが示唆されていた。RNAiの技術によりこれらの受容体をノックダウンした時、菌の TGC への感染効率が低下することを確認した。この実験を行った際に、病原性のない大腸菌を実験対照として用いたところ、これらの受容体とは無関係に TGC に取込まれることが確認された。このことから、TGC には細菌取込みに関連する他のレセプターの存在が予測されたため、マイクロアレイを用いて網羅的に TGC の表面受容体を解析したところ、Mannose receptor, C type 1 (MRC1)が有力な候補として考えられた。RNAi 技術によるノックダウン、およびリガンドを用いた競合拮抗試験等により、MRC1 が菌の取込みに重要な役割を果たすことが認められた。これらの結果は、これまでに不明瞭であった <i>L. monocytogenes</i></p>	

の胎盤感染に関与する受容体を初めて科学的に提示するものとなった。

2) 細菌感染における TGC 内シグナル伝達機構の解析

L. monocytogenes 感染による流産に関連性を有する細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。病原細菌の感染において、病原体と宿主免疫応答の相互作用には様々な細胞内シグナル伝達が関与していることが知られており、感染症研究において細胞内シグナル伝達経路の解明は重要な意義を持つ。しかしながら、胎盤での細胞内シグナル伝達経路については全くの未知な状態にあった。そこで、これまでに同定した受容体との関連性が報告されている細胞内シグナル伝達経路の中から、mitogen-activated protein kinase (MAPK)に着目して感染性流産との関連性の有無を検討した。その結果、*L. monocytogenes* 感染により TGC 内での MAPK ファミリー蛋白質の脱リン酸化が誘導されることを見出した。さらに、MAPK ファミリー蛋白質の脱リン酸化誘導が heme oxygenase (HO)-1 の発現量低下を引き起こすことが示された。また、脱リン酸化阻害剤処理が HO-1 の発現量低下および TGC への細胞障害性を防ぐことが確認された。次いでこれらの脱リン酸化誘導と *L. monocytogenes* の病原因子である listeriolysin O (LLO)との関連性についても検討を行った。その結果 LLO 欠損変異株では MAPK ファミリー蛋白質の脱リン酸化誘導が確認されず、LLO 相補株では野生株と同様に MAPK ファミリー蛋白質の脱リン酸化誘導が生じることを見出した。これらの結果から LLO が MAPK ファミリー蛋白質の脱リン酸化を介した HO-1 の発現量減少および流産の誘導に必須であると考えられた。実際に LLO 欠損変異株ではマウスの流産が誘導されず、LLO 相補株では野生株と同様に流産が誘導されることが確認された。これらの結果は、これまで不明であった感染性流産に関与する細胞内シグナル伝達の動態を初めて科学的に提示したものであると共に、LLO が流産誘導に重要な病原因子であること示した。

以上により、審査委員一同は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。