

特集：生体防御メカニズムの分子基盤

Toll 様受容体の機能

松本 美佐子, 瀬谷 司

Toll 様受容体 (Toll-like receptor (TLR)) は自然免疫においてウイルス・細菌の構成成分を認識し、タイプ I インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカン産生の誘導、樹状細胞の成熟化を介してリンパ球に感染防御のシグナルを伝達するパターン認識レセプターである。ヒトで 10 種類存在するが、TLR 活性化により誘起されるシグナルは、各 TLR と下流のアダプター分子との組み合わせにより規定され最終の細胞応答が異なる。目的とするリンパ球応答を誘導するためには TLR リガンドの選別が必要であり、アジュバント開発の戦略となっている。近年、TLR は微生物由来の成分のみでなく内在性の分子も認識することが明らかとなり、自己免疫疾患や炎症性疾患との関わりが注目されている。本総説では、自然免疫と獲得免疫をリンクする TLR の機能について概説する。

はじめに

1996 年、Hoffmann らは、*Drosophila* の背・腹軸形成に必須の分子 Toll が抗菌ペプチド産生を誘導し真菌感染を防御することを発見した¹⁾。翌年、Medzhitov と Janeway はヒトの TLR を同定し、植物や昆虫、哺乳類などの多細胞生物に共通の微生物認識機構が存在することを報告した²⁾。自己と非自己の識別システムである免疫系は、B 細胞、T 細胞を中心とする獲得免疫系とマクロファージ、好中球などの貪食細胞を中心とする自然免疫系から成り立っている。TLR の発見以前、自然免疫は非特異的な生体防御システムと考えられ、遺伝子再構成による高度な自己・非自己識別システムをもつリンパ球を中心とする獲得免疫の研究とは区別されてきた。しかし TLR の発見以後、微生物認識に関与する分子群の同定とシグナル伝達機構の解明が急速に進み、自然免疫は、TLR で代表されるパターン認

識レセプターにより微生物を識別し、リンパ球活性化に必須のシグナルを伝達することが明らかとなったのである³⁾。更に近年、TLR は、微生物由来の成分のみでなく自己由来の分子も認識することが明らかとなり、自己免疫疾患や生活習慣病などとの関わりが注目されるようになってきた⁴⁾。本稿では、TLR の機能について、特に自然免疫と獲得免疫のリンクに焦点を当て、我々の最近の知見も含めて概説する。

1. TLR の構造と局在

TLR は 1 型の膜タンパク質で、細胞外にロイシンリッチリピート (LRR)、細胞内にインターロイキン (IL)-1 レセプターの細胞内領域と相同性のある Toll-IL-1 レセプター (TIR) ドメインをもつ⁵⁾。ヒトでは 10 種類存在し、ウイルスや細菌由来の成分を認識し生体防御の応答を誘起する (表 1)。TLR1, 2, 3, 4 の細胞外領域およびリガンドとの結晶構造解析から、TLR は馬蹄型の構造をとり、ホモダイマーあるいはヘテロダイマーでそれぞれのリガンドと結合することが明らかになっている⁶⁻¹⁰⁾。TLR ファミリーは、認識するリガンドの種類により、局在の異なる二つのグループに大別される。細菌やウイルス由来の糖、脂質、タンパク質を認識する TLR1, 2, 4, 5, 6 はいずれも細胞表面に存在し、細胞表面で微生物の表層成分を認識しシグナルを伝達する。一方、核酸を認識する TLR3, 7,

北海道大学大学院医学研究科微生物学講座免疫学分野
(〒060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 丁目)

Role of Toll-like receptors in innate and adaptive immune responses

Misako Matsumoto and Tsukasa Seya (Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan)

8, 9 はいずれも ER, エンドソームなどの細胞内オルガネラ膜に局在し, エンドソームでリガンドを認識しシグナルを伝達する¹¹⁻¹³). 例外は二本鎖 RNA (dsRNA) を認識する TLR3 で, 細胞の種類により局在が異なる¹⁴). 筆者らは, ヒト TLR1, 2, 3, 6 に対する機能阻害モノクローナル抗体を作製し, 血液細胞におけるこれら TLR のタンパク質レベルでの発現と局在の解析を行った (図 1)¹⁵). TLR の発現パターンは細胞種により異なり個人により発現レベルに違いがある. 単球 TLR の免疫蛍光染色では, TLR1 と TLR6 はそれぞれ TLR2 と共局在を示しお互いも近い場所に存在することから, TLR1/2/6 リッチなマイクロドメインでリガンドが認識され则认为られる¹⁵).

表 1 ヒト Toll 様受容体と微生物由来のリガンド

TLR	微生物由来のリガンド
1/2	トリアシルリポプロテイン
2	ペプチドグリカン リポアラビノマンナン, ポリン
3	二本鎖 RNA
4	リボ多糖
5	フラジェリン
2/6	ジアシルリポプロテイン, ザイモザン
7	一本鎖 RNA
8	一本鎖 RNA
9	CpG-DNA
10	?

一方, 核酸を認識する TLR は樹状細胞などの一部の細胞に選択的に発現する. 一本鎖 RNA (ssRNA) を認識する TLR7 と CpG DNA を認識する TLR9 は形質細胞様樹状細胞と B 細胞にのみ発現し, ER とエンドリソソームに局在する^{13,16,17}). dsRNA を認識する TLR3 と ssRNA を認識する TLR8 は骨髄系樹状細胞のエンドソームに発現する¹¹). 加えて TLR3 は線維芽細胞, 上皮系細胞, 血管内皮細胞の細胞表面及びエンドソームに発現し, TLR8 は単球にも存在する^{14,18}). HeLa 細胞を用いて内在性 TLR3 の細胞内局在を各オルガネラマーカーとの共染色で詳しく調べると, 後期エンドソームやリソソームには存在せず初期エンドソームに局在することが明らかとなった¹⁹). 細胞内局在を決定づける TLR 内のドメインは, TLR3 は膜貫通ドメインと TIR ドメインの間のリンカー領域¹⁸), TLR7, 9 は膜貫通ドメイン^{12,20}), TLR8 は TIR ドメインとそれぞれ異なっている (伊藤, 松本ら未発表データ). TLR7, TLR9 は, ER 膜に存在する UNC93B1 と膜貫通ドメインを介して結合し, ER からゴルジ体を経てエンドリソソームへ運ばれ限定分解を受けることにより機能型レセプターとなることが最近明らかになっている²¹⁻²³). こうした局在の制御により, 自己の RNA, DNA は TLR による認識から免れていると考える.

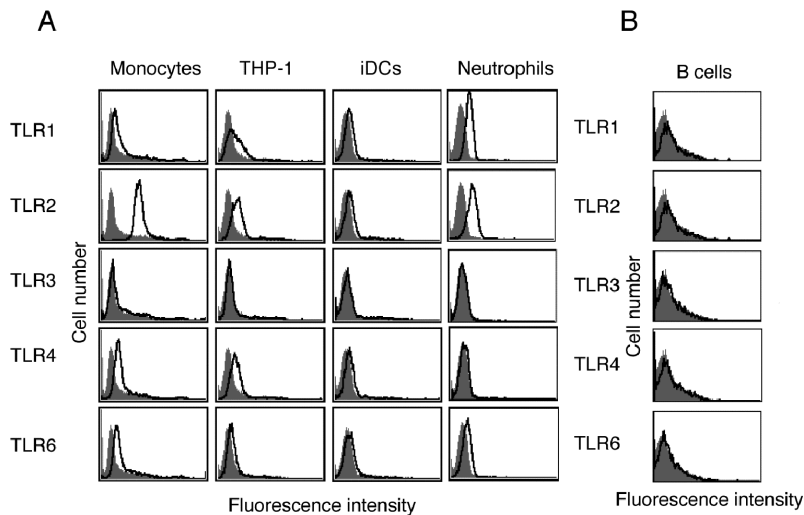


図 1 ヒト血液細胞における TLR の発現

ヒト末梢血より単球 (monocyte), 好中球 (neutrophil), B 細胞を分離し, 細胞表面の TLR1, 2, 3, 4, 6 の発現を各 TLR に対するモノクローナル抗体 (mAb) を用いてフローサイトメトリーで測定した. 未成熟樹状細胞 (iDC) は, 単球を GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor) と IL-4 で 6 日間培養して得られる単球由来未成熟樹状細胞を用い, ヒト単球の細胞株として THP-1 を用いた. TLR の発現を実線で示す. 用いた抗体は, TLR1 mAb (TLR1.136), TLR2 mAb (TLR2.45), TLR3 mAb (TLR3.7), TLR4 mAb (HTA125), TLR6 mAb (TLR6.127) である. コントロールに mIgG1 を用いた. 6 名の健康人のうちの代表例を示す.

2. TLR を介したシグナル伝達

TLR の活性化は、リガンドの LRR への結合によるホモダイマーあるいはヘテロダイマー形成により、細胞質の TIR ドメインが近接し下流のアダプター分子がリクルートされることで開始される。TLR からのシグナルを伝えるアダプター分子は、MyD88, Mal (別名 TIRAP), TICAM-1 (別名 TRIF), TICAM-2 (別名 TRAM) の 4 種類で、いずれも TIR ドメインを有する²⁴⁾。細胞応答は、各 TLR とアダプター分子の組み合わせで決定される (図 2)。MyD88 と TICAM-1 はシグナルアダプターとして、Mal, TICAM-2 は TLR とシグナルアダプターをブリッジするソーティングアダプターとして機能する。MyD88 は TLR3 以外のすべての TLR の下流で NF- κ B 活性化による炎症性サイトカイン産生を誘導するが、形質細胞様樹状細胞に発現する TLR7, 9 の下流では IRF7 を活性化し IFN- α 産生を誘導する^{25, 26)}。

一方、TICAM-1 は TLR3 と TLR4 のシグナルアダプター分子で、TLR3 の TIR ドメインあるいは TLR4 の下流で TICAM-2 の TIR ドメインに会合しシグナルを伝達する^{27, 28)}。TICAM-1 の下流では、TRAF3 を介した NAPI/TBK1/IKK ϵ のキナーゼ複合体の活性化による IRF3 のリン酸化、RIP1, TRAF6 を介した NF- κ B 活性化、MAP キナーゼ活性化により、IFN- β や炎症性サイトカイン産生が

誘導される²⁹⁻³¹⁾ (図 3)。骨髓系樹状細胞では、IFN- α/β , IL-12p70 などの Th1 型サイトカイン産生、CD80, CD83, CD86 などの副刺激分子の発現上昇が誘導され成熟化し、TICAM-1 依存的に NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞を活性化する。また、RIP1 の下流で FADD, カスパーゼ 8 を介したアポトーシス誘導、カスパーゼ 8 を介した IL-1 β 産生誘導など多彩な免疫応答が惹起される。更にマクロファージにおいて、リポ多糖 (LPS) 刺激で誘導されるオートファジーが TLR4-TICAM-1 経路に依存することが明らかとなっている³²⁾。TICAM-1 の下流で、RIP1 と p38 MAP キナーゼが関与するとされているが、詳細な分子機構は不明である。

筆者らは、TLR3 の下流で TICAM-1 がどのように活性化されるか、生細胞イメージングと生化学的手法を用いて解析した^{19, 33)}。YFP (yellow-green fluorescence protein) で標識した TICAM-1 は、HeLa 細胞に低発現させると細胞質内に拡散して存在し、TLR3 とは共局在していないことが判明した。TLR3 の合成リガンドであるポリ (I:C) で細胞を刺激すると、TICAM-1-YFP は時間とともに拡散した状態からドット状に集まる (図 4)。下流のシグナル伝達分子 NAPI, RIP1 も TICAM-1 と同じ細胞内動態をとることが YFP 標識することで観察される。共焦点レーザー顕微鏡で調べると、TICAM-1 は刺激後 15-30 分で TLR3 と共局在するが、60 分では TLR3 から離れ凝集体構造の

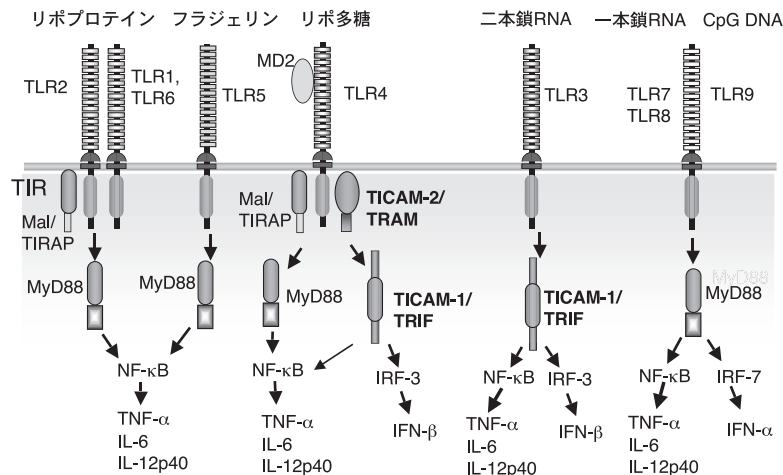


図 2 TLR とアダプター分子の組み合わせによるシグナルの選別

リガンド結合により活性化された各 TLR からのシグナルは、下流のアダプター分子を介して伝達される。MyD88 は TLR3 以外の TLR のアダプター分子で、転写因子 NF- κ B を活性化して TNF- α , IL-6, IL-12p40 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導する。形質細胞様樹状細胞に発現する TLR7, 9 の下流では、さらに IRF-7 を活性化し IFN- α 遺伝子の転写を誘導する。Mal/TIRAP は TLR2, TLR4 のアダプター分子で MyD88 をリクルートする。TICAM-1/TRIF は TLR3, TLR4 の下流で NF- κ B, IRF-3 を活性化し炎症性サイトカインと IFN- β 遺伝子の発現を誘導する。LPS は TLR4-MD2 複合体で認識され、Mal/TIRAP, MyD88 による炎症性サイトカイン産生、TICAM-2/TRAM, TICAM-1/TRIF による IFN- β 産生を誘導する。

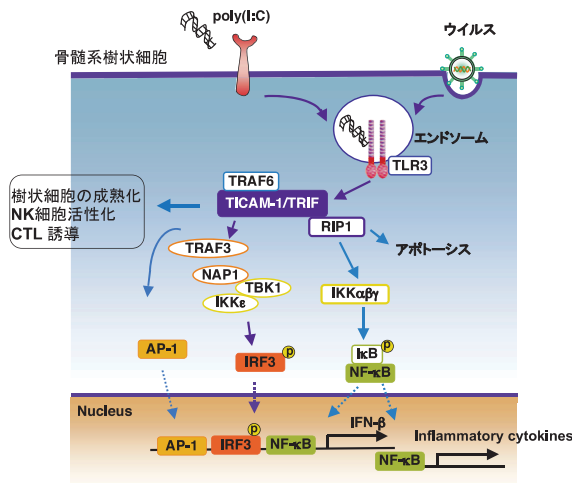


図 3

図 3 TLR3-TICAM-1 シグナル

TICAM-1 は分子中央部に TIR ドメインをもち、N 末側での TRAF3 を介した NAP1/TBK1/IKKε のキナーゼ複合体の活性化による IRF3 のリン酸化、C 末側の RIP1 および N 末側 TRAF6 を介した NF-κB 活性化、さらに MAP キナーゼ活性化により、タイプ I IFN や炎症性サイトカイン産生を誘導する。また、RIP1 を介してアポトーシスを誘導するなど多彩な免疫応答を惹起する。骨髄系樹状細胞では、TLR3-TICAM-1 シグナルにより CD80, CD83, CD86 などの副刺激分子の発現が上昇し成熟化するとともに、NK 細胞活性化と外来抗原の MHC クラス I 提示による細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化が起きる。

図 4 TICAM-1 の細胞内動態

A. YFP 標識 TICAM-1 と FLAG タグ TLR3 を共発現した HeLa 細胞を 20 μg/ml のポリ (I:C) で刺激し、時間毎に細胞を固定、TLR3 を染色し、TICAM-1 と TLR3 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。TICAM-1 は未刺激時、細胞質に拡散して存在し TLR3 と共局在を示さない。ポリ (I:C) 刺激後 15-30 分で TLR3 と一部共局在するが、60 分では TLR3 から離れ凝集体を形成する。
B. HeLa 細胞に YFP 標識 TICAM-1 を発現させ、ポリ (I:C) で刺激後の TICAM-1 の挙動を生細胞で蛍光顕微鏡観察した。TICAM-1-YFP は時間とともに拡散した状態からドット状に集まった。コントロールの、未刺激および TLR2 リガンドのペプチドグリカン (PGN) 刺激では、TICAM-1-YFP は細胞質に拡散したままで存在した。

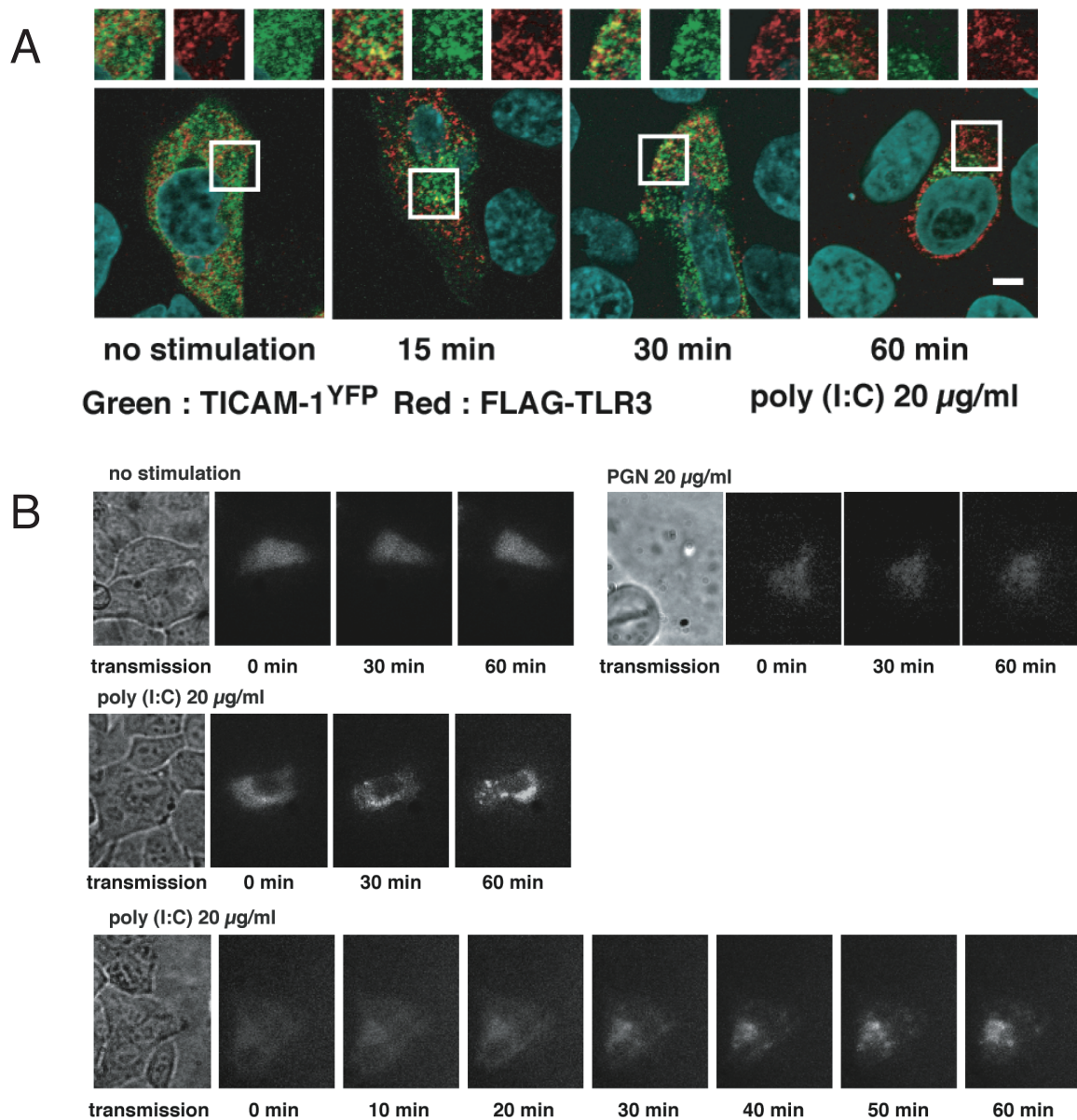


図 4

TICAM-1 signalosomeを形成することが明らかとなった(図4)。更に、TICAM-1-YFPとRIP1-CFPあるいはNAP1-CFPでFRET (fluorescence resonance energy transfer) が観察され、TICAM-1とRIP1, NAP1が生細胞においても相互作用することが明らかとなった¹⁹⁾。凝集体構造のTICAM-1 signalosomeには下流の様々なシグナル伝達分子が集積すると考えられ、多彩なTICAM-1シグナル伝達機構の解明につながると思われる。

TICAM-1は細胞に過剰発現させるだけで、下流のシグナル伝達経路を活性化する。種々のTICAM-1変異体を用いた解析より、TICAM-1の活性化にはTIRドメインとC末端領域の2箇所を介したダイマー形成が重要であることが判明した³³⁾。ダイマー形成に必須のTICAM-1C末端領域のアミノ酸残基は未同定であるが、TIRドメイン内のBBループに存在するプロリン残基がTICAM-1のTIRドメインを介したホモダイマー形成に重要であり、TLR3やTICAM-2のTIRドメインとの結合には関与しないことが明らかとなった。TLR3, TLR4のTIRの変異体TLR3(A795H), TLR4(P714H)はTICAM-1, TICAM-2とそれぞれ結合することができずシグナルを伝えることができないこと、また、TICAM-2のTIRドメインの変異体(C117H)は、TICAM-1と結合できないことから、TLRにおけるTIRドメインを介したシグナル伝達においては、上流分子のTIRドメインが下流分子のTIRドメインとの相互作用を決定すると考えられる³³⁾。TICAM-1からのシグナルは後述するように激しい炎症反応を引き起こすことがあるため、TICAM-1のダイマー形成を阻害する薬剤は選択的なTICAM-1シグナル阻害剤として有用と思われる。

3. TLRの内因性リガンド

発生や分化の過程で起きるアポトーシスによるクリーンな細胞死と異なり、感染や損傷による組織傷害は細胞の壊死を引き起こし炎症反応を誘導することが知られていたが、その分子機構は不明であった。近年、非感染性の炎症反応を誘導する機構の解明が始まり、微生物認識レセプターとして発見されたTLRが、非感染性の組織破壊に伴う炎症反応に関与することが明らかになってきた³⁴⁾。壊死した細胞から放出されるタンパク質や核酸を危険信号と認識し警告する機能を持ち、炎症性疾患や慢性疾患、全身性自己免疫疾患の発症に関与することは、新たに自己と非自己とは何かという命題を提示するとともに、TLRの機能が獲得免疫の出現とともに進化発展してきたことを裏付けるものともいえる。

1) TLR4の内因性リガンド

LPSの認識レセプターとしてTLRファミリーの中で最初にリガンドが同定されたTLR4は、多岐にわたる内在性

分子を認識する。これまでに報告された内在性リガンドは、HSP60, HSP70, HSP22などの細胞質タンパク質やヒアルロン酸、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸などの細胞外マトリックス分子である³⁵⁾。細胞・組織傷害に伴い放出されたこれらの分子はTLR4を活性化し、炎症反応を誘発することで関節炎などの慢性自己免疫疾患や炎症性疾患と密接に関わっていると考えられている。また、急性呼吸促進症候群などの急性肺損傷が、酸化リン脂質による肺胞マクロファージ上のTLR4-TICAM-1経路の活性化により起きることがマウス実験で示された³⁶⁾。興味深いことに、MyD88を介したシグナル伝達経路やTICAM-1の下流のIFN産生経路は関与せず、TICAM-1-TRAF6-NF- κ B経路によるIL-6産生が重要であるとされている。リガンドによるアダプター分子選択のメカニズムは不明で、今後の重要課題といえる。更に、自然発生の大腸がんモデルにおいて、MyD88ノックアウトマウスではがんの発症が優位に減少することから、MyD88シグナルががんの進展に関与することが報告されるなど、がんの発症・進展におけるTLRを介した炎症シグナルの関与が注目されている^{37,38)}。

2) TLR7, 8, 9の内因性リガンド

TLR7, 8はウイルス由来のssRNAを、TLR9はウイルス、細菌由来のCpGDNAを認識し、MyD88を介してIFN- α 産生を誘導し抗ウイルス応答を誘起する。TLR8は単球、骨髄系樹状細胞の、TLR7, 9はB細胞と形質細胞様樹状細胞のER、エンドリソソームなどの細胞内オルガネラに局在するため、自己由来の核酸の認識から免れている。しかし、全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患の患者で見いだされるクロマチン-DNA複合体に対する自己抗体などが存在すると免疫複合体を形成し、B細胞や形質細胞様樹状細胞上のFc γ レセプターを介して取り込まれ、TLR9を活性化することが明らかとなった³⁹⁾。また、ヌクレオプロテインとRNA複合体に対する自己抗体が存在する場合、同様にFc γ レセプターを介して取り込まれ、TLR7, 8を活性化すると考えられる^{40,41)}。一方、B細胞では、自己抗原特異的B細胞レセプター(BCR)や自己抗体のFc部分を認識する抗体(リウマチ因子)を介してクロマチン-DNAあるいはヌクレオプロテイン-RNAそのものもしくは免疫複合体が取り込まれ、TLR7, 9を介してB細胞が活性化される⁴²⁾。更に、壊死細胞から放出される自己由来DNAは、同様に壊死細胞から放出されるhigh mobility group protein B1(HMGB1)と結合し、HMGB1のレセプターadvanced glycosylation end products(RAGEs)により取り込まれTLR9を活性化することも明らかとなった⁴³⁾。タイプI IFNは自己免疫疾患の増悪に関連する因子のひとつであり、TLR7, 9を介したIFN- α 産生の疾患への関与が注目されている。

3) TLR3 の内因性リガンド

TLR3 は細胞外の dsRNA をリガンドとし, TICAM-1 を介して多彩な細胞応答を誘導する^{14, 44, 45)}. 結晶構造解析から, TLR3 による dsRNA の認識には 20 番目の LRR に存在する His⁵³⁹, Asp⁵⁴¹ 残基と N 末端側の LRR にある His³⁹, His⁶⁰, His¹⁰⁸ 残基が必須で, 40 塩基以上の dsRNA が TLR3 のダイマー形成と TICAM-1 を介した IFN- β プロモーターおよび NF- κ B 活性化に重要であることが明らかになっている^{10, 46)}. 一方, TLR3 が 21 塩基の二本鎖 RNA (small interfering RNA: siRNA) やポリ I, 自己細胞の mRNA, 壊死細胞由来の RNA を認識するという報告もあり, dsRNA 以外の RNA の認識については不明確である^{47~49)}. ヒト TLR3 の一塩基多型解析により, 点変異 TLR3 (L412F) が加齢黄斑変性疾患における地図状萎縮の防御と関連することが最近報告された⁵⁰⁾. 点変異 TLR3 (L412F) 発現細胞は TLR3 の合成リガンドであるポリ (I:C) 刺激によるアポトーシスを誘導しないことから, ウイルス dsRNA による網膜色素上皮細胞のアポトーシスが誘導されないことが防御につながっていると考えられているが, 詳細な分子機構は不明である. dsRNA はウイルス特有の構造であるため, TLR3 による抗ウイルス応答がノックアウトマウスを用いて調べられたが, マウスサイトメガロウイルス (DNA ウイルス) では感染防御に, ウェストナイルウイルス (+鎖 ssRNA ウイルス) や A 型インフルエンザウイルス (-鎖 ssRNA ウイルス) では感染増悪に働くなど, ウイルスの種類によって異なる機能を示すことが明らかとなっている⁵¹⁾. 更に, 同じウイルスであっても正反対の結果が報告されるなど, 実験系により違う様相を示す. TLR3 が dsRNA 以外のウイルス RNA 構造を認識するか否かは不明である. TLR3 の抗ウイルス応答の多様性や免疫疾患における機能は, ウイルスの種類・感染の場, リガンドの種類, TLR3 の発現分布と局在, TICAM-1 を介したシグナルの多様性などに深く関わると考えられる. 筆者らの研究で, 細胞表面に TLR3 が存在する線維芽細胞や上皮細胞は, ポリ (I:C) より程度は低いものの 100 塩基以上の *in vitro* で転写した dsRNA に応答し IFN- β を産生するが, TLR3 がエンドソームにのみ局在する骨髄系樹状細胞はポリ (I:C) に応答するが *in vitro* で転写した dsRNA には全く応答しない⁵²⁾. 骨髄系樹状細胞において, ポリ (I:C) はクラスリン依存的エンドサイトーシスによって取り込まれ, エンドソームの TLR3 を活性化するが, *in vitro* で転写した dsRNA は取り込まれない⁵³⁾. 更に, ポリ (I:C) の取り込みは TLR9 のリガンドである B-type CpG-oligodeoxynucleotide (ODN) により阻害されることから, ポリ (I:C) と B-type CpG ODN は未知の共通の取り込みレセプターを介して取り込まれることが判明している⁵³⁾. TLR3 のリガンド構造と取り込みレセプターによって認識される RNA 構造は同一ではな

く, 細胞外核酸による TLR3 活性化の機構は未だ不明な点が多い.

4. TLR のアジュバント機能

自然免疫の活性化による獲得免疫始動には抗原提示細胞である樹状細胞が重要な働きをする^{54, 55)}. 樹状細胞は骨髄系樹状細胞と形質細胞様樹状細胞に大別され, TLR の発現も異なっている. 抗原提示能の高い骨髄系樹状細胞では, 外来性抗原のクラス II 提示, 内在性抗原のクラス I 提示に加え, 外来性抗原のクラス I 提示 (クロスプレゼンテーション) が行われる. また, 樹状細胞を介した NK 細胞の活性化も誘導される (図 5). 樹状細胞による T 細胞活性化には, MHC 分子による抗原ペプチド提示以外に CD80, CD83, CD86 などの副刺激分子からの第二シグナルが必須である. 貪食能は高いが抗原提示能の低い未成熟樹状細胞上の TLR を活性化すると, TNF- α , IL-6, IL-12 などの炎症性サイトカイン, ケモカイン, IFN- α/β などの産生が誘導されるとともに, 副刺激分子の発現が上昇し, 貪食能の低い抗原提示能の高い成熟樹状細胞へと変わる⁵⁴⁾. どの TLR を活性化するかにより樹状細胞応答が異なり, リンパ球活性化の方向性が決定づけられる. 免疫増強剤として用いられるアジュバントが TLR を活性化することが明らかになり, 目的とするリンパ球応答を誘導する

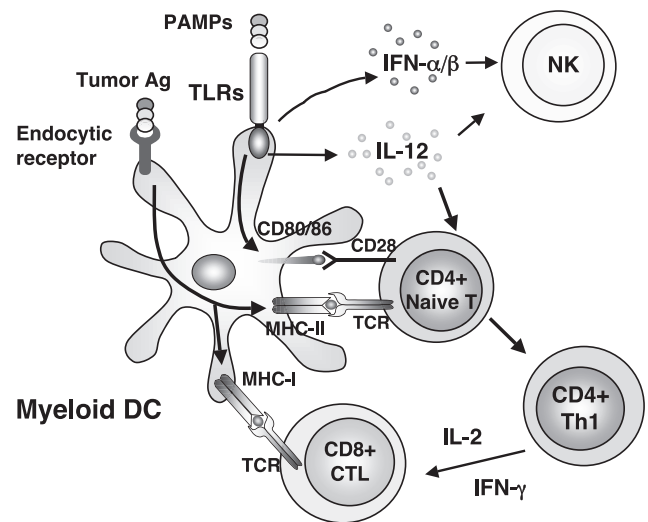


図 5 骨髄系樹状細胞の TLR 活性化による抗がん免疫の基本概念
TLR からのシグナルにより, CD80, CD83, CD86 などの副刺激分子の発現が上昇し, IL-12, IFN- α/β などのサイトカインが産生されると NK 細胞が活性化され, naïve CD4 陽性 T 細胞は抗原刺激により Th1 細胞へと分化する. 腫瘍抗原は取り込まれ MHC クラス II へ提示される以外に, MyD88, TICAM-1 からのシグナルを介して MHC クラス I へクロスプレゼンテーションされ CD8 陽性 T 細胞 (CTL) が誘導される. エンドソームからの TLR3-TICAM-1 を介したシグナルにより, 新規 NK 細胞活性化分子の発現が誘導され IFN- α/β , IL-12 非依存的に NK 細胞が活性化される. Myeloid DC: 骨髄系樹状細胞, PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

ためのTLRリガンドの選別が重要事項となってきた⁵⁶⁾。

1) TLR3-TICAM-1 活性化による樹状細胞応答

2005年、Sousaらは、TLR3ノックアウトマウスを用いて、マウス骨髄系樹状細胞による抗原のクロスプレゼンテーションにTLR3を介したシグナルが必須であることを明らかにしたが、分子機構は未だ不明である⁵⁷⁾。筆者らはTLR3の合成リガンドであるポリ(I:C)による抗がん免疫活性をマウス同系移植がんモデルで検討した⁵⁸⁾。MHCクラスI陰性の腫瘍の場合、ポリ(I:C)を胆がんマウスの腹腔内に投与すると、NK細胞を活性化し抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。腹腔内に投与したポリ(I:C)は、TLR3以外に細胞内RNAヘリカーゼのMDA5によっても認識されるが^{59,60)}、TICAM-1ノックアウトマウスでポリ(I:C)の抗がん活性は見られなくなることから、TICAM-1依存的シグナルがNK細胞活性化に重要であることが判明した。MDA5依存的に産生されるIFN- α/β はNK細胞活性化因子のひとつであるが、活性化に関与しない。更に、骨髄系樹状細胞のTLR3-TICAM-1依存的にIL-12産生が誘導されるが、抗IL-12抗体をマウスに投与しても抗がん活性が見られることから、IL-12も関与しないことが明らかとなった。NK細胞の活性化には骨髄系樹状細胞とNK細胞の直接的相互作用が必要であることから、TLR3-TICAM-1シグナル伝達経路の下流で、樹状細胞上にNK活性化分子の発現が誘導されると考えられる。

また、MHCクラスI陽性がん細胞を用いた場合には、ポリ(I:C)の腹腔内投与により、TICAM-1依存的に細胞傷害性T細胞依存的な抗がん活性が誘導されがんが退縮する(未公表データ)。TICAM-1の下流では、NK、CTL活性化に必須の遺伝子発現が誘導されることが考えられる。

骨髄系樹状細胞のTLR3活性化によるNK細胞活性化は、ウイルス感染の場合にも見られる。C型肝炎ウイルス(HCV)の感染ではNK細胞やCTLがウイルス排除に関与すると考えられているがその機序は不明である。HCVは+鎖ssRNAウイルスで感染細胞内ではウイルス増殖に伴いdsRNAが生じる。Ebiharaらは、HCV感染肝細胞がアポトーシスを起こすと、dsRNAを含むアポトーシス小体が骨髄系樹状細胞に取り込まれ、TLR3-TICAM-1経路でT細胞やNK細胞を活性化することを明らかにした⁶¹⁾。骨髄系樹状細胞のTLR3-TICAM-1経路は、ウイルス感染時の初期のタイプI IFN産生よりむしろ後期の獲得免疫活性化によるウイルス感染防御に重要な役割を果たしていると考えられる。こうしたTLR3-TICAM-1シグナルの特徴から、骨髄系樹状細胞のTLR3活性化リガンドは、抗がん免疫やウイルスワクチンのアジュバントとして有望であろうと思われる。

2) TLR2/4 リガンドのアジュバント機能

ヒトでの抗がん免疫療法に用いられているBCGの細胞壁成分、BCG-CWSはミコール酸、アラビノガラクトン、ペプチドグリカンから構成されており、TLR2とTLR4をレセプターとする⁶²⁾。不活化した腫瘍細胞をBCG-CWSと混合しマウスに免疫した後同じ腫瘍細胞を移植すると、腫瘍の生着が阻止される。BCG-CWSの抗腫瘍効果は細胞傷害性T細胞(CTL)を除去した場合、また、MyD88ノックアウトマウスでは消失することから、MyD88からのシグナルによりCTLが誘導されたと考えられる⁶³⁾。

Gavinらは、フロイント完全アジュバント(FCA)やフロイント不完全アジュバント(FIA)などによる抗体産生増強作用にTLRからのシグナルは必須でないことをMyD88とTICAM-1のダブルノックアウトマウスを用いて証明したが、用いたアジュバントの種類は限られている⁶⁴⁾。TLRアゴニストはCTLを誘導するアジュバントとして有望視されている。ヒトに投与できる低毒性の次世代アジュバントとして、TLR4アゴニストのmonophosphoryl lipid A (MPLA) (Ribi adjuvant)がある。MPLAは、TLR4リガンドのlipid Aと構造が似ているが、TLR4の下流でTICAM-1依存性の遺伝子発現のみ誘導し、抗原のクロスプレゼンテーションによるT細胞活性化を誘導する⁶⁵⁾。MPLAによる抗体産生増強には、TICAM-1シグナルは関与しない⁶⁴⁾。MPLAによるアダプター分子の選別機構は不明であるが、TICAM-1を介したシグナルがT細胞活性化に重要であると考えられる。

3) TLR 以外のアジュバントレセプター

アルミニウム塩(alum)は現在唯一ヒトで用いられているアジュバントである。Eisenbarthらは、alumのレセプターがnucleotide-binding domain-, LRR-containing receptor (NLR) familyのなかのNALP3であることを明らかにした⁶⁶⁾。NALP3あるいはその下流のアダプター分子ASCのノックアウトマウスでは、抗原(卵白アルブミン:OVA) + alumによる抗OVA抗体産生とTh2依存性の免疫応答が起きないことが判明した。NALPファミリーは細胞質に存在するパターン認識レセプターで、N末端側にLRRを有する分子群である^{67,68)}。NALP3はinflammasomeの構成成分で、リガンドにより活性化されるとCARDドメインをもつアダプター分子ASCを介してカスパーゼ-1を活性化し、活性型IL-1 β 、IL-18を生成する。inflammasomeの下流ではNF- κ Bは活性化されないため、IL-1 β 遺伝子の発現誘導にはTLRなどの他のレセプターからのシグナルが必要である。NALP3は微生物由来のペプチドグリカンやRNAを細胞質で認識し活性型IL-1 β 産生を誘導して感染防御に働くとともに、尿酸結晶やシリカなどの生体代謝産物、アミロイド- β などを認識し痛風やアルツハイマー病の発症へ

の関与が示唆されている⁶⁹⁻⁷¹⁾。alum による NALP3 を介したアジュバント作用の分子機構の詳細は不明で、TLR とのクロストークや樹状細胞における機能など今後の解析が待たれる。

終 わ り に

免疫学は自己と非自己の識別システムである。TLR の発見は免疫学、特に自然免疫の研究を非常に進展させたことは疑いもないことである。非自己は微生物から、がん細胞や壊死細胞のような“altered-self”，さらにがん抗原や代謝産物のような“increased-self”まで含まれ、すべて自然免疫のレセプターで認識され下流のシグナルを介して獲得免疫へ情報を伝えることが明らかになり、病気との関連が語られるようになったのは驚きである。自然免疫のなかで未解明の事象が分子レベルで明らかになり、病気の予防や治療に成果を還元することも期待できるのではないと思う。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、大阪府立成人病センター研究所免疫学部門在籍中および現北海道大学大学院医学研究科ならびに先端生命科学研究院免疫学分野で行われたものです。たくさんの共同研究者の方々にこの場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., & Hoffmann, J.A. (1996) *Cell*, 86, 973-983.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C.A. Jr. (1997) *Nature*, 388, 394-397.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006) *Cell*, 124, 783-801.
- Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B., & Theofilopoulos, A.N. (2007) *Nature Med.*, 13, 543-551.
- O'Neill, L.A. & Dinarello, C.A. (2000) *Immunol. Today*, 21, 206-209.
- Choe, J., Kelker, M.S., & Wilson, I.A. (2005) *Science*, 309, 581-585.
- Bell, J.K., Botos, I., Hall, P.R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D.M., & Davies, D.R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 10976-10980.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S. G., Lee, H., & Lee, J.O. (2007) *Cell*, 130, 1071-1082.
- Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J., & Lee, J. O. (2007) *Cell*, 130, 906-917.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., & Davies, D.R. (2008) *Science*, 320, 379-381.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, M., & Seya, T. (2003) *J. Immunol.*, 171, 3154-3162.
- Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S., & DeFranco, A. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 37107-37117.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N., Espevik, T., & Golenbock, D.T. (2004) *Nature Immunol.*, 5, 190-198.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., & Seya, T. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 239, 1364-1369.
- Nakao, Y., Funami, K., Kikkawa, S., Taniguchi, M., Nishiguchi, M., Fukumori, Y., Seya, T., & Matsumoto, M. (2005) *J. Immunol.*, 174, 1566-1573.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., & Liu, Y.J. (2001) *J. Exp. Med.*, 194, 863-870.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. & Hartmann, G. (2002) *J. Immunol.*, 168, 4531-4537.
- Funami, K., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Akazawa, T., Yamamoto, A., & Seya, T. (2004) *Int. Immunol.*, 16, 1143-1154.
- Funami, K., Sasai, M., Ohba, Y., Oshiumi, H., Seya, T., & Matsumoto, M. (2007) *J. Immunol.*, 179, 6867-6872.
- Barton, G.M., Kagan, J.C., & Medzhitov, R. (2006) *Nature Immunol.*, 7, 49-56.
- Kim, Y.M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.E., & Ploegh, H.L. (2008) *Nature*, 452, 234-238.
- Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G-P., Chapman, H.A., & Barton, G.M. (2008) *Nature*, 456, 658-662.
- Park, B., Brinkmann, M.M., Spooner, E., Lee, C.C., Kim, Y-M., & Ploegh, H.L. (2008) *Nature Immunol.*, 9, 1407-1414.
- O'Neill, L.A. & Bowie, A.G. (2007) *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 353-364.
- Hoshino, K., Sugiyama, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., Saito, M., Hemmi, H., Ohara, O., Akira, S., & Kaisho, T. (2006) *Nature*, 440, 949-953.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoaka, A., Taya, C., & Taniguchi, T. (2005) *Nature*, 434, 772-777.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., & Seya, T. (2003) *Nature Immunol.*, 4, 161-167.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., & Akira, S. (2003) *Science*, 301, 640-643.
- Sasai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Fujita, F., Nakanishi, M., & Seya, T. (2005) *J. Immunol.*, 174, 27-30.
- Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M., & Karin, M. (2006) *Nature*, 439, 204-207.
- Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.O., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., & Cheng, G. (2006) *Nature*, 439, 208-211.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X-D., Sharafkhan, A., Kolodziej, K.E., & Eissa, N.T. (2007) *Immunity*, 27, 135-144.
- Funami, K., Sasai, M., Oshiumi, H., Seya, T., & Matsumoto, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 18283-18291.
- Kono, H. & Rock, K.L. (2008) *Nature Reviews Immunol.*, 8, 279-289.
- Marshak-Rothstein, A. (2006) *Nature Reviews Immunol.*, 6, 828-835.
- Imai, Y., Kuba, K., Neely, G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., Ermolaeva, M., Veldhuizen, R., Leung, Y.H.C., Wang, H., Liu, H., Sun, Y., Pasparakis, M., Kopf, M., Mech, C., Bavari, S., Peiris, J.S.M., Slutsky, A.S., Akira, S.,

- Hultqvist, M., Holmdahl, R., Nicholls, J., Jiang, C., Binder, C. J., & Penninger, J.M. (2008) *Cell*, **133**, 235–249.
- 37) Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004) *Cell*, **118**, 229–241.
- 38) Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Tamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., Shibuya, M., Akira, S., Aburatani, H., & Maru, Y. (2008) *Nature Cell Biol.*, **10**, 1349–1355.
- 39) Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M., & Marshak-Rothstein, A. (2002) *Nature*, **416**, 603–607.
- 40) Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S., & Krieg, A.M. (2006) *J. Exp. Med.*, **202**, 1171–1177.
- 41) Krieg, A.M. & Vollmer, J. (2007) *Immunological Reviews*, **220**, 251–269.
- 42) Lau, C.M., Broughton, C., Tabor, A.S., Akira, S., Flavell, R.A., Mamula, M.J., Christensen, S.R., Shlomchik, M.J., Viglianti, G. A., Rifkin, I.R., & Marshak-Rothstein, A. (2005) *J. Exp. Med.*, **202**, 1171–1177.
- 43) Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S-Y. Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., Hua, J., An, L.L., Audoly, L., Rosa, G.L., Bierhaus, A., Naworth, P., Marshak-Rothstein, A., Crow, M.K., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Kiener, P.A., & Coyle, A.J. (2007) *Nature Immunol.*, **8**, 487–496.
- 44) Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., & Flavell, R.A. (2001) *Nature*, **413**, 732–738.
- 45) Matsumoto, M. & Seya, T. (2007) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 805–812.
- 46) Fukuda, K., Watanabe, T., Tokisue, T., Tsujita, T., Nishikawa, S., Hasegawa, T., Seya, T., & Matsumoto, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 22787–22794.
- 47) Kleinman, M.E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J.Z., Albuquerque, R.J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Karikó, K., Ambati, B.K., Wilgus, T.A., DiPietro, L.A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J.R., Taylor, E.W., & Ambatim, J. (2008) *Nature*, **452**, 591–597.
- 48) Karikó, K., Ni, H., Capodiici, J., Lamphier, M., & Weissman, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 12542–12550.
- 49) Cavassani, K.A., Ishii, M., Wen, H., Schaller, M.A., Lincoln, P.M., Lukacs, N.W., Hogaboam, C.M., & Kunkel, S.L. (2008) *J. Exp. Med.*, **205**, 2609–2621.
- 50) Yang, Z., Stratton, C., Francis, P.J., Kleinman, M.E., Tan, P.L., Gibbs, D., Tong, Z., Chen, H., Constantine, R., Yang, X., Chen, Y., Zeng, J., Davey, L., Ma, X., Hau, V.S., Wang, C., Harmon, J., Buehler, J., Pearson, E., Patel, S., Kaminoh, Y., Watkins, S., Luo, L., Zabriskie, N.A., Bernstein, P.S., Cho, W., Schwager, A., Hinton, D.R., Klein, M.L., Hamon, S.C., Simmons, E., Yu, B., Campochiaro, B., Sunness, J.S., Campochiaro, P., Jorde, L., Parmigiani, G., Zack, D.J., Katsanis, N., Ambati, J., & Zhang, K. (2008) *New Eng. J. Med.*, **359**, 1456–1463.
- 51) Schroder, M. & Bowie, A.G. (2005) *TRENDS in Immunol.*, **26**, 462–458.
- 52) Okahira, S., Nishikawa, F., Nishikawa, S., Akazawa, T., Seya, T., & Matsumoto, M. (2005) *DNA Cell Biol.*, **24**, 614–623.
- 53) Itoh, K., Watanabe, A., Funami, K., Seya, T., & Matsumoto, M. (2008) *J. Immunol.*, **181**, 5522–5529.
- 54) Ardavin, C., Amigorena, S., & Sousa, C.R. (2004) *Immunity*, **20**, 17–23.
- 55) Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., & Villadangos, J.A. (2004) *Immunol. Rev.*, **199**, 9–26.
- 56) Seya, T., Akazawa, T., Tsujita, T., & Matsumoto, M. (2006) *eCAM*, **3**, 31–38.
- 57) Schultz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Naslund, T., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y-T., Flavell, R.A., Liljestrom, P., & Sousa, C.R. (2005) *Nature*, **433**, 887–892.
- 58) Akazawa, T., Ebihara, T., Okuno, M., Okuda, Y., Tsujimura, K., Takahashi, T., Ikawa, M., Okabe, M., Shingai, M., Inoue, N., Tanaka-Okamoto, M., Ishizaki, H., Miyoshi, J., Matsumoto, M., & Seya, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 252–257.
- 59) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004) *Nature Immunol.*, **5**, 730–737.
- 60) Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006) *Nature*, **441**, 101–105.
- 61) Ebihara, T., Shingai, M., Matsumoto, M., Wakita, T., & Seya, T. (2008) *Hepatology*, **48**, 48–58.
- 62) Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K., & Seya, T. (2000) *Infect. Immun.*, **68**, 6883–6890.
- 63) Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I., Akira, S., Toyoshima, K., & Seya, T. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 757–764.
- 64) Gavin, A.L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., & Nemazee, D. (2006) *Science*, **314**, 1936–1938.
- 65) Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P.M., Casella, C.R., & Mitchell, T.C. (2007) *Science*, **316**, 1628–1632.
- 66) Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, Jr., W., Sutterwala, F.S., & Flavell, R.A. (2008) *Nature*, **453**, 1122–1126.
- 67) Martinon, F. & Tschopp, J. (2005) *TRENDS in Immunol.*, **26**, 447–454.
- 68) Kanneganti, T., Lamkanfi, M., & Nunez, G. (2007) *Immunity*, **27**, 549–559.
- 69) Kanneganti, T-D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J-H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., Akira, S., & Nunez, G. (2006) *Nature*, **440**, 233–236.
- 70) Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., & Latz, E. (2008) *Nature Immunol.*, **9**, 847–856.
- 71) Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moor, K.J., & Golenbock, D.T. (2008) *Nature Immunol.*, **9**, 857–865.