

第 37 回日本小児感染症学会教育講演

Toll-like receptors による病原体の認識

植松 智* 審良 静男*

要旨 自然免疫は感染において第一線の防御を行う。Toll-like receptors は、細菌、真菌、原虫、ウイルス等の病原体に特異的な構造を認識する。リガンドの認識後、TLR はシグナル伝達経路を活性化し、樹状細胞の成熟やサイトカイン産生を促し、最終的に獲得免疫を活性化する。最近の知見より、各々の TLR は固有のシグナル伝達経路を有し、病原体に対して特異的な免疫反応を誘導することがわかってきた。

はじめに

細菌やウイルス、寄生虫などの異物が体内に侵入した際にそれを認識し、排除するシステムとして免疫系が存在する。長年、非特異的な免疫反応であると思われていた自然免疫系において、近年 TLR (Toll-like receptor) の発見を端緒に大きな進展がみられた。病原微生物の構成成分による自然免疫細胞の活性化の主要な部分は TLR を介して行われ、その構成成分ごとに異なる特異的な応答が起こるということが明らかになった。本稿では TLR がどのようにして病原微生物の構成成分

を認識して、細胞を活性化させるか細胞内シグナル伝達の最新の知見を交えて概説する。

I. TLR ファミリーとその役割

病原体が生体に侵入すると、免疫系はそれらの病原体を速やかに識別し排除する。哺乳類では免疫系は大きく自然免疫と獲得免疫に分けられる(表 1)。獲得免疫では、遺伝子再構成によって、無数の個々に異なる抗原特異性を持つ受容体が T 細胞や B 細胞表面に発現され、あらゆる未知の外來抗原に対処する。一方、自然免疫はマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などによ

表 1 自然免疫と獲得免疫

	自然免疫	獲得免疫
細胞	マクロファージ, 樹状細胞, NK 細胞	リンパ球 (B 細胞, T 細胞)
受容体	再構成しない	再構成する
認識機構	病原体に特有な分子構造の認識	抗原特異的な認識

哺乳類では免疫系は大きく自然免疫と獲得免疫に分けることができる。獲得免疫では、遺伝子再構成という方法で無数の個々に異なる抗原特異性を持つ受容体が T 細胞や B 細胞表面に発現され、あらゆる未知の外來抗原に対処する。一方、自然免疫は主にマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などによって担われ、病原体に特徴的な分子構造を認識する。

Key words : TLR, 自然免疫, シグナル伝達

* 大阪大学微生物病研究所自然免疫学分野 Satoshi Uematsu, Shizuo Akira
〔〒 565-0871 吹田市山田丘 3-1〕

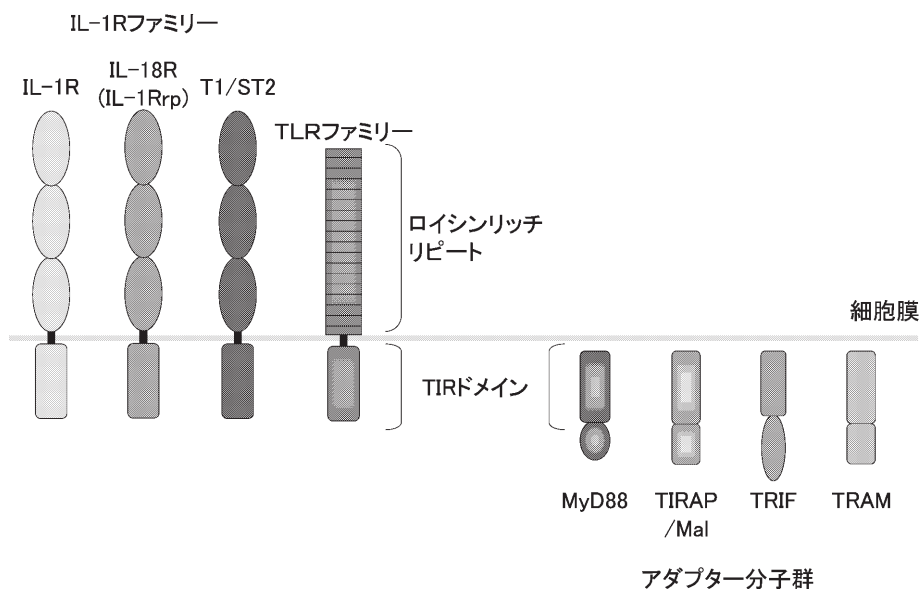


図 1 TLR/IL-1 R ファミリー

TLR は細胞外にロイシンリッチリピードを持つ。TLR と IL-1 R の細胞内領域は相同性を持ち TIR (Toll/IL-1 R 相同性) ドメインと呼ばれる。TIR ドメインを有する受容体は大きなファミリーを形成しており、類似した細胞内シグナル伝達経路を利用していると考えられる。MyD88, TIRAP/Mal, TRIF, TRAM といった TLR の細胞内のアダプター分子も TIR ドメインを持っている。

て担われる。最近まで自然免疫は、非特異的な貪食作用によって病原体に対処するだけで、獲得免疫が活性化されるまでの一時しのぎ的な役割しか行っていないと考えられていた。しかしながら、この自然免疫に関わる免疫細胞もきわめて特異的な受容体を用いて微生物の侵入を認識していることがわかってきた。B 細胞や T 細胞がなく獲得免疫が存在しない昆虫でも、Toll と呼ばれる受容体が真菌を特異的に認識し、それに引き続く NF- κ B の活性化によって抗真菌ペプチドが誘導され、真菌に対する感染防御が成立することが 1996 年に明らかとなった。そして、自然免疫系しか存在しない無脊椎動物や植物も十分に感染を防ぐシステムを発達させてきたことがわかってきた。その翌年には、哺乳類において Toll のホモログ (Toll-like receptor 4 : TLR 4) がデータベースサーチにより同定された¹⁾。

TLR は、細胞外領域にタンパク質間の相互作用に関わるモチーフであるロイシンリッチリピード (LRR) を持つ。また、細胞内領域はインターロイ

キン 1 レセプター (IL-1 R) の細胞内領域と相同性を持つ Toll/IL-1 R 相同領域 (TIR ドメイン) を有する。MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM といった細胞内のアダプターも TIR ドメインを持っている (図 1)。哺乳類の TLR は、哺乳類には存在しないが病原体でよく保存された特徴的な構造 (pathogen-associated molecular patterns : PAMPS) を認識して細菌、真菌、寄生虫、ウイルスなどのさまざまな病原体の侵入を感知する。TLR は現在までに 13 種類がデータベース上で報告されており、その大部分はリガンドが同定されている (表 2)²⁾。

1. TLR による細菌の認識

LPS はグラム陰性細菌の細胞壁成分で、マクロファージなどの細胞に作用して炎症性サイトカイン・炎症性生理活性物質 (NO など) の産生を誘導する。LPS の細胞上の受容体に関してはマクロファージ・単球の分化抗原である CD 14 が従来から知られていた。LPS は血清中の LPS 結合蛋白質 (LBP) と複合体を形成し、その複合体が CD 14

表 2 TLR ファミリーと主なりガンド

TLRs	リガンド
TLR 1	トリアシルリポペプチド (細菌) (TLR 2 とヘテロダイマーを形成)
TLR 2	リポペプチド, ペプチドグリカン, リポタイコ酸 (細菌), ザイモザン (真菌), <i>T. cruzi</i> の GPI 蛋白 (寄生虫), ヘマグルチニン (ウイルス)
TLR 3	Poly (I : C), 二本鎖 RNA (ウイルス)
TLR 4	LPS (細菌), <i>T. cruzi</i> の glycoinositolphospholipid (寄生虫), RSV の融合蛋白, MMTV の封入体蛋白 (ウイルス)
TLR 5	フラジェリン (細菌)
TLR 6	ジアシルリポペプチドを認識 (細菌) (TLR 2 とヘテロダイマーを形成)
TLR 7/TLR 8	イミダゾキノリン誘導体と一本鎖 RNA (ウイルス)
TLR 9	CpG DNA (細菌, ウイルス), <i>T. cruzi</i> のゲノムヘモジン (寄生虫)
TLR 11	尿路感染細菌の菌体成分 (細菌), <i>T. gondii</i> の profilin 様分子 (寄生虫)

TLR ファミリーの主なりガンドを示す。

と結合して細胞が活性化される。しかし、CD 14 はグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーによって細胞と結合しており膜貫通ドメインを持っていない。また、CD 14 欠損マウスは LPS に対する反応性は低下するものの LPS に反応した。このことから LPS のシグナル伝達に関わるもう一つの受容体の存在が示唆されていた。LPS 低応答性マウス C3 H/HeJ マウスでは TLR 4 の細胞質内ドメインに点変異が存在することが報告された。一方、われわれが作製した TLR 4 欠損マウスでも LPS に低応答性で、TLR 4 が LPS シグナル伝達に必須の分子であることが明らかになった。また、TLR 4 は単独で LPS のシグナルを伝えることができず、MD-2 と呼ばれるアクセサリ分子を必要とすることがわかった。

TLR 2 は細菌の細胞壁成分に存在するリポペプチドやペプチドグリカン、グラム陽性細菌のリポタイコ酸を認識する。そのため、TLR 2 欠損マウスはグラム陽性細菌の *Staphylococcus aureus* の感染に非常に弱い。TLR 1 や TLR 6 は TLR 2 とヘテロダイマーを形成し、TLR 1 はトリアシルリポペプチドを、TLR 6 はジアシルリポペプチドを認識する。このように、TLR 1 や TLR 6 は TLR 2 と協調的に働き、リポペプチドの微細な構造の違いを認識している。

TLR 2 や TLR 4 が細菌の壁成分を主に認識するのに対し、TLR 5 は細菌鞭毛構成蛋白であるフ

ラジェリンを認識する。腸管において、TLR 5 は腸管上皮に発現しており、しかも管腔側ではなく、基底膜側に特異的に発現していることが報告された。これによって、上皮を越えて侵入してきた鞭毛を持つ病原細菌を検出する腸内センサーとしての役割を果たしていると考えられる。ヒトの *tlr5* 遺伝子において、392 番目のアミノ酸が終始コドンに置換されるポリモルフィズム (TLR 5 392 STOP) が報告された。TLR 5 392 STOP を持つヒトは、*Legionella pneumophila* の感染に感受性であることが報告されている。

細菌の DNA も TLR のリガンドとして作用しうることがわかってきた。CpG DNA は細菌のゲノム DNA の特徴的な配列でメチル化されていない CpG 配列がある頻度で繰り返されている。哺乳類のゲノム DNA では CpG 配列の頻度が少なく高頻度にメチル化されているため、免疫賦活作用はない。一方、細菌の CpG DNA は宿主の免疫を活性化させることが以前より知られていた。われわれが作製した TLR 9 のノックアウトマウスの解析より、細菌の CpG DNA を認識するのが TLR 9 であることが判明した²⁾。

マウスの TLR 11 は TLR 5 と構造が似ており、腎臓や尿管によく発現している。TLR 11 のノックアウトマウスは尿路感染細菌に対して感受性を示した。TLR 11 は尿路感染細菌の菌体成分を認識していると考えられるが、リガンドはまだ同定されていない。しかしながら、ヒトでは TLR 11 は

シュードジーンであり、機能していないと考えられている^{2,3)}。

2. 真菌に対する TLR の認識

TLR 2 や TLR 4 は *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii* の細胞壁成分の認識に関わることが報告されている。真菌の細胞膜から抽出したザイモザンは TLR 2/TLR 6 を介して免疫細胞を活性化することが示された。ザイモザンの免疫賦活化作用は主に β -グルカンによると考えられている。Dectin-1 は β -グルカンを認識するレクチンレセプターファミリーに属する。最近、Dectin-1 が TLR 2 と協調的に作用し、チロシンキナーゼの Syk の活性化を介して酵母に対して強い免疫反応を誘導することが示された^{2,3)}。

3. 原虫に対する TLR の認識

TLR は *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum* といった原虫の認識にも関わる。*Trypanosoma cruzi* は Chagas 病の原因となる原虫であるが、*T. Cruzi* の膜に存在する glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー蛋白, glycoinositolphospholipid, そしてゲノム DNA がそれぞれ TLR 2, TLR 4, TLR 9 を介して自然免疫担当細胞を活性化することが示された。マウスの TLR 11 は *T. gondii* のプロフィリン様分子を認識する。マラリア原虫の *P. falciparum* は宿主のヘモグロビンを消化してヘモゾインと呼ばれる疎水性のヘム重合体を排泄する。ヘモゾインが TLR 9 によって認識されることが報告された。ヘモゾインは核酸ではない初めての TLR 9 のリガンドである^{2,3)}。

4. ウイルスに対する TLR の認識

TLR 4 が respiratory syncytial virus (RSV) の融合蛋白の認識に関わることが報告された。TLR 4 の遺伝子に変異を持つ C3H/HeJ マウスは RSV の感染に弱いことが示された。さらに、mouse mammary tumor virus (MMTV) の封入体の糖蛋白が TLR 4 を介して B 細胞を活性化させることが報告された。このように、TLR 4 は細菌の菌体成分だけでなくウイルス由来の蛋白の認識にも関わっている。

TLR 2 も Measles virus, human cytomegalovirus, Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) の構成成分の認識に関わることが報告されている。

2 本鎖 RNA (double stranded RNA : dsRNA) は免疫細胞を活性化させ、抗ウイルス作用をもつ I 型インターフェロン (IFN α/β) を誘導する最も代表的なウイルスの構成成分である。dsRNA は RNA ウイルスが宿主細胞に感染し複製する際に生じるが、合成の dsRNA である polyinosinic-polycytidylic acid [poly (I : C)] はウイルスの dsRNA と同様の免疫活性を持つ。TLR 3 がこの dsRNA の認識に関わることが報告された。

TLR 3 や TLR 4 に加えて、TLR 9 や TLR 7 もウイルスの認識に関わっている。TLR 9 のリガンドである CpG DNA はウイルスにも存在し、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell : PDC) から大量の IFN- α を誘導することが知られている。この結果に一致して、DNA ウイルスである HSV-2 が TLR 9 を介して PDC を刺激し IFN- α を産生させることが明らかとなり、TLR 9 が DNA ウイルスの CpG 配列を認識して抗ウイルス作用を発揮することが明らかになった。

イミダゾキノリン誘導体は、抗ウイルス活性や抗腫瘍効果を有する合成化合物である。イミダゾキノリン誘導体の一つであるイミキモドは、ヒトパピローマウイルス感染による尖型コンジローム (外陰部疣贅) に対する治療薬として、アメリカをはじめ世界各国で臨床応用されている。また、イミキモドよりもその活性が強い R-848 も合成され、現在、臨床試験が行われている。われわれのノックアウトマウスの解析から TLR 7 がイミダゾキノリン誘導体を認識し、さまざまな炎症性サイトカインを誘導し抗ウイルス活性を誘導することが明らかになった。イミダゾキノリン誘導体は核酸様の構造を持つため、TLR 7 はウイルスの成分を認識することが予測されていた。その後、TLR 7 (ヒトでは TLR 7 と TLR 8) がウイルスの一本鎖 RNA (single strand RNA : ssRNA) を認識することが明らかになった。このように、個々の TLR は、異なる病原体成分を認識し、生体内へのあらゆる種類の病原体の侵入を感知する受容体

であることが判明した^{2,3)}。

II. TLR のシグナル伝達系路

1. MyD 88 依存的経路

TLR がリガンドを認識すると TLR 3 以外のすべての TLR に共通なアダプター分子である MyD 88 が TIR ドメインを介して TLR と結合する。次いで Death ドメインを介して IL-1 receptor associated kinase (IRAK)-1 と IRAK-4 に結合し活性化させる。その後、IRAKs は TNF receptor associated factor 6 (TRAF 6) と相互作用し、I κ B kinase (IKK) 複合体を活性化させる。IKK 複合体は I κ B をリン酸化して degradation を誘導し、転写因子の NF- κ B を核に移行させる。この経路は MyD 88 依存的経路と呼ばれ TNF- α 、IL-6 や IL-12 といった炎症性サイトカイン産生や B 細胞の活性化に必須である (図 2)。TLR 2 と TLR 4 では、この MyD 88 依存的経路

に TIRAP/Mal と呼ばれる第 2 の TIR ドメインを持つアダプター分子が必要である (図 2)¹⁾。

最近、転写因子 interferon regulatory factor (IRF) 5 が MyD 88 と TRAF 6 に結合し TLR のシグナル伝達経路に関わることが報告された。IRF 5 のノックアウトマウスのマクロファージや樹状細胞では、TLR 3, 4, 5, 7, 9 の刺激による炎症性サイトカインの産生が顕著に傷害されていた。IRF 5 は TLR のリガンド刺激によって核移行し、遺伝子発現に関わる。しかし、TLR 3 では、アダプター分子 MyD 88 を使用しない。また、IRF 5 の下流のシグナル伝達もよくわかっておらず、詳細な解析が待たれる³⁾。

2. MyD 88 非依存的経路

MyD 88 のノックアウトマウスでは、TLR 3 を除くすべての TLR 刺激によるサイトカイン産生が消失していたにもかかわらず、TLR 4 や TLR 3 を介するシグナル伝達経路では NF- κ B と

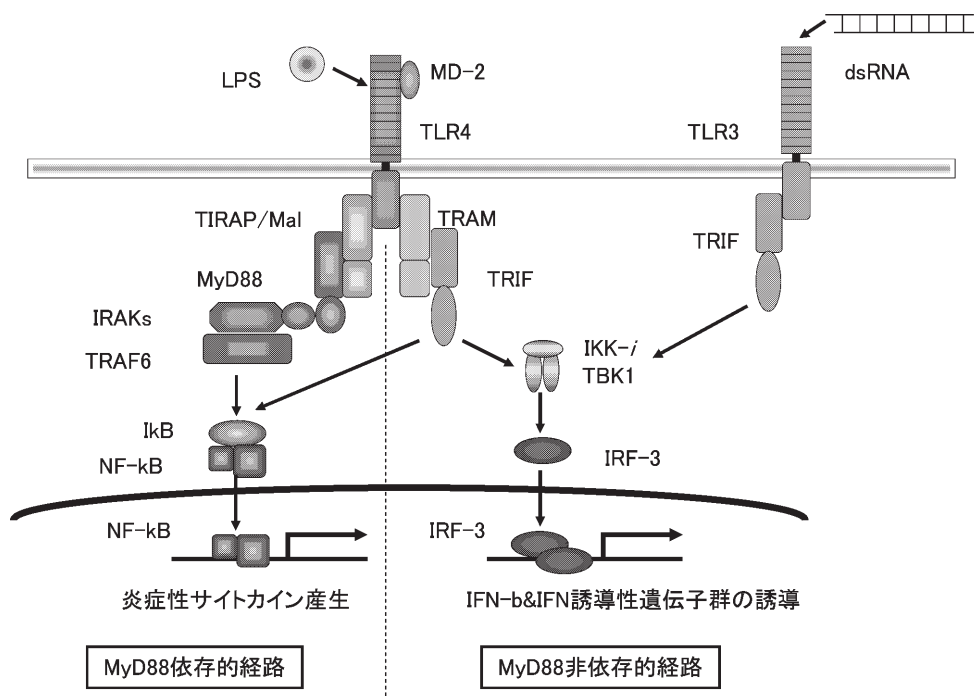


図 2 TLR 3 と TLR 4 のシグナル伝達系路

TLR 3 と TLR 4 には MyD 88 非依存的経路が存在する。MyD 88 非依存的経路の活性化により IFN- β や IFN 誘導性遺伝子群の発現が誘導される。この経路を担うアダプターが TRIF である。TLR 4 の MyD 88 非依存的経路にはさらに TRAM を必要とする。

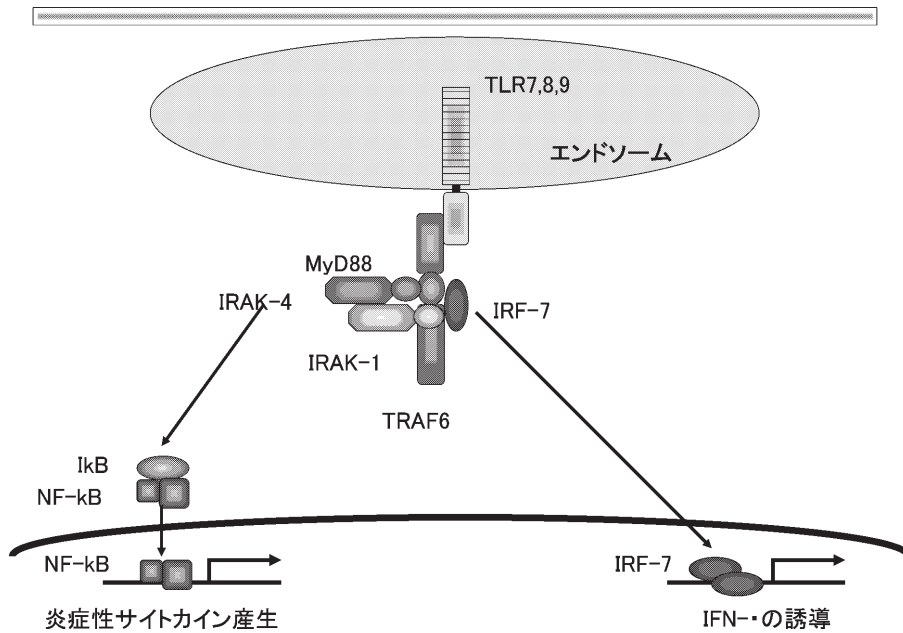


図3 pDCにおけるTLR7, 8, 9のシグナル伝達

TLR7, 8, 9はpDCにおいてMyD88依存的にIFN- α を産生する特徴的なシグナル伝達経路を持っている。このIFN- α 産生は、MyD88/IRAKs/TRAF6/IRF7からなる複合体によって制御されている。IRF7はIRAK-1によって直接リン酸化され、活性化して核移行する。

MAPKの活性化が依然として認められた。TLR3とTLR4を介するシグナル伝達経路にはMyD88を介さない、MyD88非依存的経路が存在することがわかった。この経路に関わる第3のアダプター分子TRIF/TICAM-1が同定された。TLR3, TLR4の刺激によりTRIFがTIRドメインを介してTLR3またはTLR4と結合すると、キナーゼであるIKK β とTBK1がTRIFに結合して活性化される。さらにこれらのキナーゼが転写因子であるIRF3をリン酸化することによりIFN- β やIFN誘導性遺伝子群が誘導される。これらの遺伝子群の発現によりウイルスに対する免疫反応が誘導される。TLR4を介するMyD88非依存的経路にはTRIFだけでなく、第4のTIRドメインを有するアダプター分子TRAMが必要である(図2)¹⁾。

3. TLR7, 8, 9によるI型IFNの誘導

TLR9のシグナルでは、リガンドのCpG DNAの種類により異なる免疫応答をする。CpG DNAにはIL-12産生能の強いclassical CpG DNAの

ほかに、A/D type CpG DNAが存在する。A/D type CpG DNAでPDCを刺激すると、IL-12の産生量は少なかったが、大量のIFN- α を誘導した。またこれらすべての反応はTLR9およびMyD88欠損細胞で消失していた。TLR7やTLR8のリガンドもヒトのPDCからMyD88依存的にIFN- α を産生した。このようにTLR7, 8, 9はPDCにおいてMyD88依存的にIFN- α を産生する特徴的なシグナル伝達経路を持つことがわかった⁴⁾。最近、転写因子IRF7がMyD88と直接結合することがわかった⁵⁾。PDCはIRF7を恒常的に発現しており、TLR7, 8, 9のリガンドに反応してIRF7がMyD88とデスドメインを介して結合し、活性化され、核移行し、IFN- α の産生を誘導することがわかった。IRF7はMyD88と結合するだけでなく、TRAF6とも結合する。TRAF6のユビキチンライゲース活性もIRF7の活性化に必要であることがわかった⁶⁾。

IRF7は、IRF3と同様にウイルスによって活性化されるキナーゼによってC末にある多数の

セリン残基がリン酸化され、2量体を形成し、核に移行してさまざまな遺伝子の発現に関わる。IRF 3は前述したように、IKK 関連キナーゼである TBK 1 と IKK*i*/IKK*e* によって活性化される。TBK 1 欠損マウスの PDC では、TLR 9 による IFN- α の産生が障害されていなかったため、IRF 7 の活性化にはほかのキナーゼが必要であることが示唆された。本田らは、TLR の下流の IRAK-4 欠損 PDC において、TLR 9 刺激による IFN- α および炎症性サイトカイン産生が消失していることを報告した⁶⁾。ところが、IRAK-4 は直接 IRF 7 には結合せず、また *in vitro* kinase assay においても IRF 7 をリン酸化しなかった。一方、IRAK-1 は IRF 7 と直接結合し、*in vitro* kinase assay において IRF 7 をリン酸化した。IRAK-1 欠損マウスでは、TLR 7 および TLR 9 による IFN- α 産生が特異的に障害されており、他の炎症性サイトカイン産生は障害されていなかった。IRAK-1 欠損 PDC では TLR 9 刺激による IRF 7 の核移行が消失していた。これより、IRAK-1 が TLR 9 を介する IRF 7 の活性化に必須のキナーゼであることがわかった⁷⁾。以上より TLR 7, 8, 9 を介する IFN- α 産生は、MyD 88/ TRAF 6/IRAKs/IRF 7 複合体によって制御されていることが明らかになった (図 3)。

最近、TRAF 3 が TLR を介する I 型 IFN 誘導に必要な分子であることが報告された。TRAF 3 は TRIF や IRAK-1, TBK 1 と IKK*i*/IKK*e* と結合し、転写因子 IRF の活性化における重要なアダプターとして作用することが報告された⁸⁾。TRAF 3 は抗炎症サイトカインの IL-10 の誘導にも必要不可欠であることが報告された⁸⁾。

おわりに

TLR の発見により、宿主による病原体の認識機構が急速に明らかになってきた。TLR は単独でも病原体を認識するが、他の TLR や TLR 以外の受容体と協調的に働き、巧みに病原体の構造を認識している。

個々の TLR は異なる組み合わせの TIR ドメインを持つアダプターを使用して NF- κ B や IRF ファミリーといった転写因子を活性化し、さ

まざまな遺伝子を誘導して免疫反応を惹起する。しかしながら、TLR 以外の自然免疫による病原体認識機構も存在することがわかってきた。例えば、TLR 3 欠損樹状細胞はウイルス由来の dsRNA を認識して I 型 IFN を誘導する。この誘導には TRIF は必要なく、TBK 1 や IRF 3 が必要である⁹⁾。Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) は細胞内の dsRNA の受容体として同定された¹⁰⁾。RIG-I は dsRNA に結合する RNA ヘリカーゼドメインと IRF 3 を活性化する CARD ドメインを有し、RNA ウイルスに対する感染防御に必須の分子であることがわかった⁹⁾。今後、自然免疫のより包括的な理解のために、TLR 依存적および TLR 非依存적の病原体認識機構のより詳細な解析が必要であろう。

文 献

- 1) Akira S, et al : Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 4 : 499-511, 2004
- 2) Akira S : Toll receptor families : structure and function. Semin Immunol 16 : 1-2, 2004
- 3) Kawai T, et al : Pathogen recognition with Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 17 : 338-344, 2005
- 4) Kaisho T, et al : Pleiotropic function of Toll-like receptors. Microbes Infect 6 : 1388-1394, 2004
- 5) Kawai T, et al : Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF 7 with MyD 88 and TRAF 6. Nat Immunol 5 : 1061-1068, 2004
- 6) Honda K, et al : Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD 88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. Proc Natl Acad Sci USA 101 : 15416-15421, 2004
- 7) Uematsu S, et al : Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR) 7- and TLR 9-mediated interferon- α induction. J Exp Med 201 : 915-923, 2005
- 8) Hacker H, et al : Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF 3 and TRAF 6. Nature

- 439 : 204-207, 2005
- 9) Kato H, et al : Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity* 23 : 19-28, 2005
- 10) Yoneyama M, et al : The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5 : 730-737, 2004

*

*

*