自己免疫疾患における Toll-like receptor 4 の役割

北本 直美, 山崎 将司

要約：Toll-like receptor (TLR) 4 は当初, グラム陰性菌のリポ多糖 (lipopolysaccharide) を認識し自然免疫系を活性化する受容体として発見された。しかし, このような感染防御を担う自然免疫反応のみならず, ①関節リウマチなどの自己免疫疾患において産生される各種内因性のリガンドをも認識すること, ②自己免疫疾患の病変部において TLR4 の発現が亢進していること, ③ TLR4 遺伝子欠損マウスや変異マウスにおいて, あるいは TLR4 阻害薬の処置により各種自己免疫疾患モデル動物での病態の発症や進行が著明に抑制されることが, 近年報告されている。さらに④自己免疫疾患で中心的な役割を担う各種細胞の活性化にも関与することが明らかにされている。これらのことから, TLR4 は各種自己免疫疾患の発症や病態において重要な役割を担っていることが示唆されるに至り, 自己免疫疾患の新規創薬ターゲットのひとつとして TLR4 がクローズアップされている。

1. はじめに

関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA), 全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE), 強皮症 (systemic sclerosis : SSc) をはじめとする自己免疫疾患は, 免疫反応が異常をきたし自己の細胞や組織を攻撃することにより引き起こされる疾患である。その罹患者数は年々増加しており, 米国では 2350 万人, 国民の 12 人に 1 人が自己免疫疾患に罹患していると報告されている (1)。これら自己免疫疾患の治療には, 1998 年に抗 tumor necrosis factor (TNF)- α 抗体が導入されて以来, 種々の生物製剤の使用により一定レベルの寛解誘導までが可能になった。しかしながら, それら生物製剤による治療に抵抗性を示す患者や, 寛解・再燃を繰り返す患者が依然として

多く存在することから, 治療薬に対する unmet need は未だに高いものがある。従って, これら自己免疫疾患の病態や発症メカニズムをより深く理解し, 新しい治療薬を開発することが急務となっている。

近年, これら自己免疫疾患には獲得免疫に加えて自然免疫反応も深く関与することが示唆されている。Toll-like receptor (TLR), 特に TLR4 は, グラム陰性菌の成分を認識し自然免疫反応を司る代表的な分子の一つである。そこで本章では TLR4 と自己免疫疾患との関わりについて最近の知見を紹介し, TLR4 阻害薬の自己免疫疾患治療薬としての可能性について考察する。

2. TLR とは

TLR は細菌やウイルスに特徴的な成分を認識することで自然免疫反応を活性化させる 1 回膜貫通型受容体タンパクである。その発見は, ショウジョウバエの発生に必要な分子である Toll が真菌に対する防御にも関与することを見出した 1996 年の Hoffmann らの報告 (2) に遡る。当時 Toll は昆虫に特有な分子であると考えられていたが, Medzhitov らによって昆虫のみならず, ヒトにも Toll 様の分子が存在することが明らかにされるとともに, この Toll 様分子がすべての生物に備わった生体防御機能に関わるレセプターとして認識されるようになった (3)。その後さらに研究が進み, 現在までにヒトで 10 種類, マウスで 12 種類の TLR が知られ, その各々がリポ多糖体, ペプチドグリカン, 非メチル化 CpG DNA, 二本鎖 RNA など, 細菌, ウイルス, 真菌などの特異的な成分を認識し病原体センサーとして働くことが明らかにされている (4)。表 1 に各 TLR と代表的なリガンドの関係を示す。細胞膜に発現している TLR2 は TLR1 もしくは TLR6 との間でヘテ

キーワード：TLR4, 自己免疫疾患, PAMPs, DAMPs, TLR4 阻害薬

武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 炎症疾患創薬ユニット (〒251-8555 神奈川県藤沢市村岡東二丁目 26 番地 1)

E-mail: naomi.kitamoto@takeda.com 原稿受領日：2014 年 7 月 1 日, 依頼原稿

Title: Role of Toll-like receptor 4 in autoimmune diseases Author: Naomi Kitamoto, Masashi Yamasaki

表1 ヒトにおける各 Toll-like receptor (TLR) と認識リガンド

TLRs	リガンド	
	Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)	Damage associated molecular patterns (DAMPs)
TLR1	細菌: Triacyl lipopeptides	
TLR2	細菌: Peptidoglycan, Lipoteichoic acid, Lipoprotein 真菌: Zymosan	HSP70, GP96, Biglycan, HMGB1
TLR3	ウイルス: 二本鎖 RNA	mRNA
TLR4	細菌: Lipopolysaccharide, HSP60 ウイルス: Respiratory syncytial 真菌: mannan	HSP22, 70, 72, HMGB1, SP-A, S100A Fibronectin, Fibrinogen, Hyaluronan, Biglycan Fatty acid, LDL, Tenascin-C
TLR5	細菌: Flagellin	
TLR6	細菌: Diacyl lipopeptides, Lipoteichoic acid 真菌: Zymosan	
TLR7/TLR8	真菌: Zymosan ウイルス: 一本鎖 RNA	RNA
TLR9	細菌, ウイルス: CpG DNA	DNA
TLR10	不明	

HSP: heat shock protein, HMGB1: high mobility group box 1, SP-A: surfactant protein-A, LDL: low density lipoprotein.
(文献 23 より改変)

ロ二両体を形成し、グラム陽性菌のペプチドグリカン、リボテイコ酸を認識する。それ以外の TLR はホモ二量体を形成し、TLR5 は細菌の鞭毛成分であるフラジエリンを、TLR3, 7, 8 および 9 は細胞内の小胞体やエンドソームに存在し、1 本鎖あるいは 2 本鎖 RNA や DNA を認識する。そして TLR4 はグラム陰性菌由来の lipopolysaccharide (LPS) を認識する受容体としてその機能が同定された。これら TLRs が各々対応するリガンドを認識すると TNF- α や type I interferon (IFN) などのサイトカイン産生の誘導、B 細胞の増殖、樹上細胞の成熟化などが惹起され感染防御機構が活性化される。

TLR4 は上述の如く当初グラム陰性菌の菌体成分である LPS を認識する分子として同定されたが、LPS 以外に一部のウイルスや *Chlamidia pneumoniae* の産生する heat-shock protein (HSP) などの pathogen associated molecular patterns (PAMPs) も認識することが分かってきた。さらに、TLR4 は PAMPs 以外にも自己の細胞が障害を受けたときに放出される high mobility group box protein 1 (HMGB1) や HSP, 細胞外基質の分解物であるフィブロンectin やヒアルロン酸、そして脂肪酸など生体内に存在する内因性の因子 (damage-associated molecular patterns: DAMPs) も認識して各種細胞から様々な炎症性サイトカインや type I IFN の産生を惹起することが明らかにされ、グラム陰性菌感染以外に炎症性疾患や自己免疫疾患との関連が注目されている (図 1)。

3. 各種自己免疫疾患における TLR4 の関与

上述のような理由から、①自己免疫疾患患者の病変部または血液中細胞での TLR4 の発現量ならびに内因性のリガンドの探索と定量、② TLR4 の遺伝子改変マウスや自然変異マウスを使った検討、さらに③自己免疫疾患で中心的な役割を担う各種細胞を用いた実験が盛んに行われ、自己免疫疾患における TLR4 の関わりが明らかにされつつある。表 2 にこれまでの報告を簡潔に纏めるとともに、各自己免疫疾患における TLR4 の関わりについて以下に概説する。

1) 関節リウマチ (RA)

RA は多発性関節炎を主症状とし血管、心臓、肺、皮膚、筋肉といった全身の臓器にも障害が及ぶ進行性の慢性全身性自己免疫疾患である。RA と TLR4 の関係については患者由来のサンプルや動物を用いた関節炎モデルなどにおいて数多くの検討がなされており、RA 患者由来の滑膜では TLR4 の発現が亢進し、その発現量は病態の重症度と相関していることが報告されている (5)。また、TLR4 の内因性リガンドであるテネイシン C や HMGB1 が滑膜、滑液、軟骨などの病変部位あるいは循環血液中において検出または増加していることが明らかにされている (6, 7)。さらに、自己免疫性の関節炎を自然発症する interleukin (IL)-1 レセプターアンタゴニスト欠損マウスで TLR4 遺伝子を欠損させると関節炎の発症が抑制されること (8) や、HMGB1 の中和抗体がマウスのコラーゲン誘発関節炎

図1 各種リガンドによる TLR4 刺激とシグナル伝達経路

DAMPs: damage-associated molecular patterns, PAMPs: pathogen associated molecular patterns, HMGB1: high mobility group box 1, HSP: heat shock protein, LDL: low density lipoprotein, LPS: lipopolysaccharide, TLR: Toll like receptor, Mal: myeloid differentiation primary response (MyD88) adapter-like, TIRAP: Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein, IRAK: interleukin-1 receptor associated kinase, TAK1: transforming growth factor- β -activated kinase 1, NF- κ B: nuclear factor-kappa B, MAPKs: mitogen-activated protein kinases, AP-1: activator protein-1, TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRAM: TRIF-related adapter molecule, TRAF: tumor necrosis factor receptor-associated factor, TBK1: TANK-binding kinase 1, IRF: interferon regulatory factor, IFN: interferon, RA: rheumatoid arthritis, SLE: systemic lupus erythematosus, SSc: systemic sclerosis.

を抑制することも報告されている(9)。これらの報告は何れも TLR4 が RA の病態に重要な役割を担っていることを示唆するものである。興味深いことに、Midwood らは RA 患者由来のマクロファージや線維芽細胞を LPS または テネシシン C で刺激すると TLR4 の活性化を介して TNF- α , IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインが産生されることを報告している(10)。また、RA 患者に高頻度で認められるシトルリン化タンパクや抗シトルリン化タンパク抗体と TLR4 の活性化との関係も報告されている。すなわち、Sokolove らはシトルリン化フィブロネクチンが naive なフィブロネクチンと比べて強い TLR4 活性化作用を有することや、

シトルリン化フィブロネクチンを含む免疫複合体が TLR4 と Fc γ 受容体を介してヒトのマクロファージを刺激し TNF- α 産生を惹起することを明らかにした(11)。このように RA では TLR4 が関節局所あるいは全身性に産生された DAMPs/PAMPs を認識することで様々な細胞からの炎症性サイトカイン産生を惹起し、その病態進行に関与していることが推察される。

2) 全身性エリトマトーデス (SLE)

SLE は、顔面皮膚に特徴的な紅斑を呈し、全身の皮膚、関節、血管、腎臓などで炎症性の臓器障害を発症する。病変部では自己抗原と免疫複合体の沈着が認められ、これが臓器障害の一因と考えられている。この SLE 患者の血中でも HMGB1 の増加が確認されており、その程度は腎炎発症患者において顕著である(12)。Lartigue らは SLE における TLR4 の関与を明らかにする目的で病態モデル動物 (C57BL/6^{lpr/lpr}) において TLR4 遺伝子を欠損させ種々の検討を行った(13)。その結果、TLR4 欠損マウスでは血中の抗核抗体、抗 double stranded (ds) DNA 抗体、カルジオライピン抗体などの自己抗体の力価が低下するとともに、腎臓の糸球体における IgG 抗体の沈着やメサンギウム細胞の増殖が劇的に減少することを明らかにした。面白いことに、TLR4 欠損マウスでは脾臓の辺縁帯に局在する B 細胞の数が減っていた。これらのことから SLE では TLR4 は炎症性サイトカインの産生だけでなく B 細胞の活性化による自己抗体産生にも関与している可能性が考えられる。

3) 全身性皮膚硬化症 (SSc)

SSc は皮膚の硬化を主訴とする自己免疫疾患であり、病態の進行に伴い肺、腎臓、消化器、心臓などの内臓臓器が線維化する。発症原因が明らかにされておらず、有効な治療薬も無いことから unmet need が高い疾患の一つである。Bhattacharyya らは SSc における TLR4 の関与を検討し、① SSc 患者の血液中や皮膚において TLR4 の内因性リガンドであるヒアルロン酸、テネシシン C およびフィブロネクチンが増加していること、②皮膚および肺組織では TLR4 の発現が増加していること、そして③ SSc 患者の皮膚から採取した線維芽細胞は TLR4 リガンド刺激に対する反応性が亢進しており、TLR4 の刺激が transforming growth factor (TGF)- β 刺激による I 型コラーゲンの産生を著明に亢進させることを明らかにしている(14-16)。また、SSc のモデルとして汎用されるブレオマイシン誘発モデルにおける皮膚や肺の線維化が C3H/HeJ (TLR4 ミュータント) マウスや TLR4 の選択的阻害薬の投与によって抑制されることも報告している。これらの成績

表2 各種自己免疫疾患において TLR4 の関与を示唆する情報

疾患名	動物モデル	ヒト	文献
関節リウマチ	TLR4 -/-マウスでの発症抑制 抗 HMGB1 抗体投与による発症抑制	関節滑膜, マクロファージ, T cell, B cell での TLR4 の発現上昇 LPS, HSP, HMGB1, TnC の増加	5-11
SLE	TLR4 -/-マウスで病態抑制 TLR4 -/-マウスで抗体産生抑制	血中での HMGB1 の上昇 PBMC での TLR4 の発現上昇	12, 13, 34
強皮症	C3H/HeJ, TLR4 -/-マウスでの発症抑制 抗 HMGB1 抗体投与による発症抑制	DCs, 皮膚線維芽細胞での TLR4 の発現上昇 病変部で TnC, hyaluronan の増加	14-16
多発性硬化症	TLR4 -/-マウスでの発症抑制 抗 HMGB1 抗体投与による発症抑制 脊髄での TLR4/HMGB1 の増加	中枢組織での TLR4 の発現上昇 CSF 中 Mφ, マイクログリアでの HMGB1 の上昇	17, 18
1 型糖尿病	TLR4 -/-マウスでの発症抑制 TLR4/HMGB1 の発現上昇	β cell, B cell での TLR4 の発現上昇 HSP60, HMGB1 の増加	19, 20, 35
乾癬		PBMC, ケラチノサイトでの TLR4 発現上昇 HSP27, HSP70, S100A9 の増加	21, 22

LPS : lipopolysaccharide, HSP : heat shock protein, HMGB1 : high mobility group box 1, TnC : tenascin-C, SLE : systemic lupus erythematosus, PBMC : peripheral blood mononuclear cell, DCs : dendritic cells, CSF : cerebrospinal fluid.

は, TLR4 が SSc の発症や病態進行に深く関与することを強く示唆するものである。

4) その他の自己免疫疾患

上述した自己免疫疾患の他に多発性硬化症, 1 型糖尿病, 乾癬においても, 患者の血液中や病変部位で HMGB1, HSP60 といった内因性の TLR4 リガンドが上昇していること, 白血球やマクロファージ, グリア細胞, 膵 β 細胞, そして皮膚での TLR4 の発現量増加が報告されており, TLR4 のこれら疾患への関与が示唆される (17-23)。

TLR4 は本来グラム陰性菌を認識し, それを排除する反応を惹起することで生態防御に深く関わり, 感染が収束すればその活性化は収束に向かう。しかし, 自己免疫疾患では過剰な免疫反応や炎症反応に伴い産生される種々の TLR4 リガンドが TLR4 を刺激し, TLR4 が慢性的に活性化された状態となっており, これが自己免疫疾患の発症, 増悪の一因となっていると考えられる。従って, TLR4 の活性化を特異的に制御する薬剤の創製は, 自己免疫疾患の新たな治療薬の開発に繋がると期待される。

4. TLR4 阻害薬

日本の製薬企業が TLR4 の活性化を特異的かつ強力に阻害する薬剤を世界に先んじて創製している。第一三共株式会社の CS-4711, エーザイ株式会社の Eritoran (E5564) (24, 25), 武田薬品工業株式会社の Resatorvid (TAK-242) (26, 27) である。CS-4711 の作用機作等の詳細は明らかでないが, Eritoran は LPS の糖鎖部分であるリビッド A のアナログであり TLR4 拮

抗作用を示す。一方, Resatorvid は TLR4 の細胞内ドメインに結合して TLR4 特異的な阻害活性を示す低分子化合物である。いずれもセプシスを対象疾患として臨床開発されたが, 残念ながら上市には至っていない。しかしながら, これらの化合物は選択的かつ強力な TLR4 阻害薬であり, 臨床試験において毒性面での深刻な問題は報告されていないことから, 今後, 自己免疫疾患への適応が期待される。さらに近年, TLR4 と協調して LPS を認識する MD2 に特異的に結合して TLR4 signal を阻害する新たな TLR4 阻害化合物として JTT705 やクルクミンが報告されている (28-30)。

TLR4 の活性化シグナルは細胞内の myeloid differentiation primary response (MyD) 88 依存経路と Toll/IL-1 receptor-domain-containing adaptor inducing interferon β (TRIF) 依存経路の 2 経路に分かれて伝達される (図 1)。MyD88 依存性経路は nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や mitogen-activated protein kinases (MAPKs) カスケードを活性化しサイトカイン産生を誘導する。そして, TRIF 依存性経路は interferon regulatory factor 3 (IRF3) を活性化し type I IFN の産生を誘導する。これら TLR の下流にあるシグナル伝達を抑制する化合物として, MyD88 に結合してシグナル伝達を抑制する ST2825 (31) や NF- κ B 経路の活性化を抑制する ML120B (32) ならびに PHA-408 (32, 33) が報告されており, これら薬剤も新たな TLR4 阻害薬として自己免疫疾患治療に適応できるかもしれない。

5. おわりに

本稿では関節リウマチなどの自己免疫疾患の発症や病態における TLR4 の関与について概説し, TLR4 阻害薬の新規自己免疫疾患治療薬としての可能性について述べた. 近年, TLR4 は自己免疫疾患のみならずインフルエンザ感染に伴う急性肺障害, 動脈硬化, 2 型糖尿病, 虚血後の臓器障害, 移植拒絶, がんの転移, 神経因性疼痛においても重要な役割を担うことが示唆されている. 今後, 上述した TLR4 阻害薬を用いた基礎ならびに臨床研究がさらに進み, 自己免疫疾患を含む各種疾患での TLR4 の役割がより一層深く解明されるとともに, TLR4 阻害薬あるいは TLR4 シグナル阻害薬がこれら疾患の新たな治療薬となることを期待する.

著者の利益相反: 北本直美, 山崎将司 (武田薬品工業株式会社).

文 献

- 1) NIH, The Autoimmune Diseases Coordinating Committee. NIH Publication No. 05-5140. 2005.
- 2) Lemaitre B, et al. Cell. 1996;86:973-983.
- 3) Medzhitov R, et al. Nature. 1997;388:394-397.
- 4) Akira S, et al. Cell. 2006;124:783-801.
- 5) Park MK, et al. Exp Mol Med. 2011;43:446-454.
- 6) Chen Y, et al. Rheumatology (Oxford). 2013;52:1739-1747.
- 7) Taniguchi N, et al. Arthritis Rheum. 2003;48:971-981.
- 8) Abdollahi-Roodsaz S, et al. J Clin Invest. 2008;118:205-216.
- 9) Kokkola R, et al. Arthritis Rheum. 2003;48:2052-2058.
- 10) Midwood K, et al. Nat Med. 2009;15:774-780.
- 11) Sokolove J, et al. Arthritis Rheum. 2011;63:53-62.
- 12) Abdulahad DA, et al. Arthritis Res Ther. 2011;13:R71.
- 13) Lartigue A, et al. J Immunol. 2009;183:6207-6216.
- 14) Bhattacharyya S, et al. Sci Transl Med. 2014;6:232ra250.
- 15) van Bon L, et al. Ann Rheum Dis. 2010;69:1539-1547.
- 16) Varga J. Bull NYU Hosp Jt Dis. 2008;66:198-202.
- 17) Andersson A, et al. J Leukoc Biol. 2008;84:1248-1255.
- 18) Reynolds JM, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:13064-13069.
- 19) Jagannathan M, et al. Diabetologia. 2010;53:1461-1471.
- 20) Li M, et al. Exp Mol Med. 2012;44:260-267.
- 21) Garcia-Rodriguez S, et al. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013;27:242-250.
- 22) Zhang HJ, et al. Yao Xue Xue Bao. 2013;48:503-507.
- 23) Li J, et al. Pharmacol Ther. 2013;138:441-451.
- 24) Opal SM, et al. JAMA. 2013;309:1154-1162.
- 25) Mullarkey M, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2003;304:1093-1102.
- 26) Rice TW, et al. Crit Care Med. 2010;38:1685-1694.
- 27) Li M, et al. Mol Pharmacol. 2006;69:1288-1295.
- 28) Mancek-Keber M, et al. J Biol Chem. 2009;284:19493-19500.
- 29) Gradisar H, et al. J Leukoc Biol. 2007;82:968-974.
- 30) Peri F, et al. Biotechnol Adv. 2012;30:251-260.
- 31) Capolunghi F, et al. Rheumatology (Oxford). 2010;49:2281-2289.
- 32) Schopf L, et al. Arthritis Rheum. 2006;54:3163-3173.
- 33) Mbalaviele G, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2009;329:14-25.
- 34) Liu B, et al. J Immunol. 2006;177:6880-6888.
- 35) Devaraj S, et al. Cytokine. 2011;55:441-445.