総 説

特集：自己免疫性疾患の病態形成に関わる細胞・分子と臨床応用

Toll-like receptor と炎症性腸疾患

竹 田 潔

Toll-like receptor

Kiyoshi TAKEDA

Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

(Received August 15, 2005)

summary

Toll-like receptors (TLRs) have been revealed to recognize specific patterns of microbial components. Recognition of microbial components by TLRs initiates signal transduction pathways, triggering expression of genes, which products control innate immune responses and further instruct development of antigen-specific acquired immunity. TIR domain-containing adaptors, such as MyD88, TIRAP, TRIF, and TRAM, play pivotal roles in TLR signaling pathways. Differential utilization of these TIR domain-containing adaptors provides specificity of individual TLR-mediated signaling pathways. TLR-mediated activation of innate immunity, when in excess, leads to immune disorders such as inflammatory bowel diseases. Therefore, several mechanisms that negatively control TLR signaling pathways and thereby prevent overactivation of innate immunity have been elucidated. Nuclear κ B proteins, such as Bcl-3 and κ BNS, have been revealed to be responsible for this process, by differentially inhibiting TLR-dependent cytokine production.

Key words——innate immunity; TLR; TIR domain; inflammatory bowel diseases

抄 録

自然免疫系においてファミリーを形成する Toll-like receptor (TLR) が病原体の構成成分を特異的に認識し、免疫応答の引き金を引くことが明らかになった。11 種の TLR の各メンバーがそれぞれ異なる病原体構成成分を認識し、遺伝子発現を誘導する。TLR を介したシグナル伝達経路では、TIR ドメインを有するアダプター群 (MyD88, TRIF, TIRAP, TRAM) が重要な役割を担っていて、この使い分けにより TLR ごとに異なる遺伝子発現が誘導される。そして、TLR を介した自然免疫系の活性化は、過剰になると、慢性炎症性腸疾患の発症につながることも明らかになった。そのため、自然免疫系の活性は様々なメカニズムで負に制御されている。その分子機構の一端として核に発現する κ B 分子 (Bcl-3, κ BNS) が TLR を介したサイトカイン産生を選択的に抑制していることが明らかになった。

はじめに

病原体などの外界異物の生体内への侵入を非自己として認識し、排除する免疫系は、自然免疫系 (Innate Immunity) と獲得免疫系 (Acquired Immunity) [あるいは適応免疫系 (Adaptive Immunity)] から大きく成り立っている。これまでの外界異物の認識機構は、獲得免疫系に属する B 細胞、T 細胞などのリンパ球が、抗原を外界異物として認識する分子機構が詳細に解析されてきたのに比して、自然免疫系による外界異物の認識機構は不明のまま

であった。この分子機構が、ショウジョウバエで Toll 分子の機能解析に端を発し、近年急速に理解されてきた。そこで、Toll-like receptor の機能解析から明らかになってきた、自然免疫系による病原体の認識機構、そして TLR を介したシグナル伝達経路の解析から明らかになってきた自然免疫系の活性化機構について紹介したい。また、TLR を介した自然免疫系の活性化と慢性炎症性腸疾患との関わりについて、最近の知見を紹介したい。

Toll-like receptor (TLR) の同定

獲得免疫系の存在しないショウジョウバエで、Toll 受容体の変異体の解析から、Toll を介したシ

グナルが真菌感染に応答して、抗真菌ペプチドを産生するのに必須であることが証明された¹⁾。さらに、哺乳類の Toll ホモログが 1997 年に初めて同定され、このシグナルが種々の炎症に関与した遺伝子を誘導することが示された²⁾。その後、ファミリー分子が Toll-like receptor (TLR) として次々と発見され、現在までに 11 種 (TLR1-TLR11) が論文に報告されている。TLR ファミリーは、細胞外の領域にロイシンに富んだ領域 (Leucine rich repeat : LRR) と、細胞内の領域には、Toll/IL-1 receptor (TIR) ドメインと呼ばれる IL-1 受容体ファミリーの細胞質内領域と極めて相同性の高い領域を有している。

TLR による病原体の認識

ファミリーを形成する TLR の各メンバーが病原体の構成成分をそれぞれ特異的に認識することが、主にノックアウトマウスの解析から明らかになってきた (図 1)³⁾。

1. TLR1, TLR2, TLR6

TLR2 は、グラム陽性菌の細胞壁に多く存在するペプチドグリカン (peptidoglycan : PGN) や種々の細菌の細胞膜に存在するリポペプチドの認識に必須である⁴⁾。さらに、TLR2 は種々の細菌に存在するリポペプチドの病原体特異的認識を行うため、TLR1 や TLR6 などの TLR2 と構造が極めて似ている他の TLR ファミリー分子と会合している。TLR2 欠損マウス由来のマクロファージはあらゆるタイプのリポペプチドに反応しない。一方、TLR6 欠損マウス由来のマクロファージは、マイコプラズマ由来のリポペプチドには反応しないが、細菌由来

のリポペプチドには正常に反応する⁵⁾。一方 TLR1 欠損マウス由来のマクロファージは、TLR6 欠損マウスとは逆に、マイコプラズマ由来のペプチドには正常に反応するが、マイコバクテリアや細菌由来のリポペプチドに対する反応が障害されている⁶⁾。細菌由来のリポペプチドは、その N 末端に 3 本の脂肪酸基の付加があるのに対し、マイコプラズマ由来のリポペプチドには 2 本の付加しか認めない。以上のように、構造の似た TLR2, TLR6, TLR1 は互いに協調し、リポペプチドの些細な構造の違いを識別している。

2. TLR3

ウイルス特異的な二本鎖 RNA が、自然免疫系を活性化させることが知られている。二本鎖 RNA は、炎症性サイトカインのなかでも特に強力な抗ウイルス作用を発揮する IFN- α/β の発現を誘導するが、TLR3 が二本鎖 RNA の認識に関与していることが明らかになった⁷⁾。

3. TLR4

哺乳類の TLR の発見と時期をほぼ同じくして、従来から LPS に対する応答性が低いマウスとして知られていた系統 (C3H/HeJ) の原因遺伝子が TLR4 遺伝子の点突然変異であることが明らかになった⁸⁾。また、TLR4 遺伝子欠損マウスも作製され、このマウスが C3H/HeJ マウスと同様に LPS 低応答性であることから、TLR4 が LPS の応答性に必須の受容体であることが明らかになった⁹⁾。

4. TLR5

病原体には、細胞壁の構成成分以外にも免疫系を

図 1 TLR ファミリーとそのリガンド

TLR4 は LPS の認識に必須の受容体である。一方、TLR2 はリポペプチドの認識に必須の受容体である。TLR6 は TLR2 と会合し、マイコプラズマ由来のジアシルリポペプチドを識別する。TLR1 は TLR2 と会合し、細菌由来のトリアシルリポペプチドを識別する。TLR5 は鞭毛タンパク質 (フラゲリン) を認識する。TLR9 は細菌やウイルス由来の CpG DNA の認識に必須である。そして、TLR3 はウイルス由来の二本鎖 RNA の認識に関与する。一方、TLR7 はウイルス由来の一本鎖 RNA を認識する。

活性化させる成分が存在する。例えば、鞭毛 (Flagella) を持つ細菌は、鞭毛を構成するタンパク質としてフラジェリン (Flagellin) を産生する。Flagellin も細胞壁構成成分と同様に自然免疫系を活性化させるが、これは TLR5 を介したものであることが明らかにされた¹⁰⁾。

5. TLR7, TLR8

ウイルスには DNA ウイルスや RNA ウイルスが存在する。その中で、RNA ウイルスが持つ一本鎖 RNA の認識に、TLR7 が必須であることが示された^{11,12)}。さらに TLR7 は、自然免疫系を活性化させる合成化合物をも認識する。ヒトパピローマウィルスの感染により発症する尖形コンジローマの治療薬として応用されている合成化合物 Imidazoquinoline は、IFN- α の発現を誘導することにより抗ウイルス作用を発揮する。TLR7 欠損マウスでは Imidazoquinoline による炎症性サイトカインの誘導が全く認められなかった¹³⁾。この結果は、TLR の活性化が種々の感染症治療の応用にもつながりうることを示している。

6. TLR9

細菌のゲノム DNA には、“CpG 配列”と呼ばれる、強力な免疫賦活作用を有する病原体に特有の DNA 配列が存在する。この CpG 配列が TLR9 に

よって認識されることが、ノックアウトマウスの解析から明らかになった¹⁴⁾。CpG 配列は、細菌だけでなく DNA ウイルスのゲノムにも存在している。その結果、TLR9 ノックアウトマウスでは、Herpes Simplex Virus1, 2 などの DNA ウイルスに対する免疫応答が減弱している。

TLR を介した細胞内シグナル伝達

上述のように、TLR ファミリーの各メンバーが病原体の構成成分をそれぞれ特異的に認識することが明らかになった。TLR による病原体の認識は、種々の遺伝子発現を誘導する。その中には、IL-12, TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカイン、CD40, CD80, CD86 などの副刺激分子 (co-stimulatory molecule) の遺伝子が含まれる。樹状細胞やマクロファージは従来病原体を貪食する細胞として知られていた。これら貪食細胞は抗原提示細胞として、病原体由来のペプチド抗原を MHC 分子と共に T 細胞に提示する。TLR の機能が明らかになった今、免疫系を見つめ直してみると、自然免疫系の細胞は、貪食による病原体由来のペプチド抗原の T 細胞への提示、そして TLR を介した炎症性サイトカインや副刺激分子の遺伝子発現により、抗原特異的な獲得免疫系、特に Th1 細胞分化を誘導することがわかる (図 2)。このように、病原体を認識する TLR を介した自然免疫担当細胞での遺伝子発現

図2 自然免疫系と獲得免疫系

自然免疫系に属するマクロファージや樹状細胞は、病原体に曝されると、貪食により病原体を取り込み消化分解するとともに、病原体由来のペプチド抗原を MHC 抗原と共に T 細胞に提示する。さらに、TLR が病原体構成成分を特異的に認識し炎症性サイトカインや副刺激分子などの遺伝子発現を誘導する。貪食による抗原提示、TLR を介した炎症性サイトカイン、副刺激分子などの遺伝子発現の全てが相まって、抗原特異的な獲得免疫系を誘導する。

は、獲得免疫系活性化に重要な役割を担っている。この TLR を介した遺伝子発現の誘導機構についても、シグナル伝達経路の解析からそのメカニズムが明らかになってきた。TLR ファミリーを介した細胞内シグナル伝達経路は、細胞質内に保存された TIR ドメインから開始される。そして、その下流でも、TIR ドメインを持った 4 種のアダプター (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。特に、先に同定されていた MyD88 の解析から、TLR を介したシグナルには、MyD88 依存性のシグナルと MyD88 非依存性のシグナルがあって、異なる遺伝子発現の誘導を担っていることが示された。そして、TIR ドメインを持つアダプター群がそれぞれのシグナルで特異的な働きをすることによって、自然免疫系の活性化が誘導されることが明らかになってきている。

MyD88 依存性のシグナル伝達経路

1. MyD88

MyD88 ノックアウトマウスでは、TLR ファミ

リーの認識するすべての病原微生物の構成成分による炎症性サイトカインの産生が認められないことから、MyD88 が全ての TLR を介した炎症性サイトカインの誘導シグナルに必須であることが明らかになった¹⁵⁾。MyD88 は IRAK 4 (IL-1 receptor-associated kinase 4) と会合する。IRAK4 は、TLR 刺激により活性化され、同じファミリーの IRAK1 のリン酸化を誘導する。IRAK-1 欠損マウスでは、LPS に対する反応性が部分的に障害されていたが、IRAK-4 欠損マウスでは、すべての TLR リガンドに対する応答性が顕著に障害されていた¹⁶⁾。また遺伝的に細菌感染を繰り返す家系で、ヒト IRAK-4 遺伝子の変異が発見された¹⁷⁾。これらのことから、IRAK-4 が TLR を介したシグナルに重要な役割を果たしていると考えられる。IRAK の下流で作用する TRAF6 のノックアウトマウスも TLR に対する応答性が顕著に低下している¹⁸⁾。このように、MyD88 の下流では、IRAK4, 1, そして TRAF6 を介し、転写因子 NF- κ B が I κ B kinase (IKK) 複合体により活性化され、遺伝子発現が誘導される (図 3)。

図3 TLRを介したシグナル伝達経路

TLR を介したシグナル伝達経路は、細胞質内に保存された TIR ドメインから開始される。TIR ドメインを持ったアダプター MyD88 を介し、IRAK (IRAK-4, IRAK-1) が活性化される。そして TRAF6 を介し、IKK α , IKK β , NEMO/IKK γ からなる IKK 複合体が活性化され、転写因子 NF- κ B が最終的に活性化される。このシグナルにより、TNF- α , IL-12 などの炎症性サイトカインが誘導される。TIR ドメインを持つアダプター TIRAP は、TLR2 と TLR4 を介したシグナルに特異的に関与している。TLR3, TLR4 を介したシグナルでは、MyD88 非依存性のシグナル伝達経路が存在する。TIR ドメインを持つアダプター TRIF がこのシグナルに必須の役割を果たしている。TRIF の下流で IKK ϵ /IKK ι と TBK1 により転写因子 IRF3 が活性化され、IFN- β が誘導される。TRAM は、TLR4 を介した MyD88 非依存性/TRIF 依存性のシグナルに特異的に関与している。

2. TIRAP

MyD88 と同様に TIR ドメインを持つアダプター TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) のノックアウトマウスでは、TLR2 と TLR4 のリガンド刺激による炎症性サイトカインの産生に障害を認めたが、他の TLR 刺激に対する反応は正常であった^{19,20}。このことから、TIRAP は、TLR2 と TLR4 による MyD88 を介したシグナルに特異的に関与していることが明らかになった。

MyD88 非依存性シグナル伝達経路

MyD88 ノックアウトマウスでは TLR ファミリーによる炎症性サイトカインの産生が全く認められない。実際、TLR2, TLR7, TLR9 のリガンドで MyD88 ノックアウトマウス由来のマクロファージを刺激しても、NF- κ B の活性化は全く認められない。しかし、TLR4 リガンドで刺激した場合には、炎症性サイトカインの産生は全く認めないにもかかわらず、NF- κ B の活性化は時間が遅れるものの正常マクロファージと同様に観察された²¹。このことから、TLR4 を介したシグナルには、MyD88 依存性の炎症性サイトカインの産生に必須のシグナルと、MyD88 非依存性のシグナルが存在することが明らかになった。さらに、MyD88 非依存性のシグナルでは、TLR4 刺激により IFN- β および IP-10, GARG16 などの IFN 誘導性遺伝子が IRF-3 の活性化を通して誘導されることが、明らかになった。また、TLR4 だけでなく TLR3 を介したシグナルでも、IRF-3 の活性化を通じて IFN- β が誘導される。さらに、IRF-3 の活性化を司るキナーゼが、IKK β と構造の似た IKKi/IKK κ と TBK1 であることが明らかになった²²。このように MyD88 非依存性のシグナルが明らかにされてくる中で、このシグナルに必須のアダプターも明らかになった。

1. TRIF

データベース検索により、MyD88, TIRAP に続いて発見された TIR ドメインを持つアダプター TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) のノックアウトマウスでは、TLR3 および TLR4 刺激による IRF-3 の活性化、IFN- β と IFN 誘導性遺伝子の発現が著明に減弱していた²³。また、TLR4 刺激に対する不応性マウスを random mutagenesis により解析していたグループも、TRIF が TLR3 と TLR4 を介した MyD88 非依存性シグナ

ルの活性化に必須であることを明らかにした²⁴。この結果から、TRIF が TLR3, TLR4 を介した MyD88 非依存性のシグナルに必須であることが明らかになった。

2. TRAM

さらにデータベース検索の結果、第 4 のアダプターとして TRAM (TRIF-related adaptor molecule) が同定された。TRAM ノックアウトマウスでは、TLR4 刺激による IRF-3 活性化、IFN 誘導性遺伝子の発現に障害が認められたが、TLR3 刺激に対する応答性は正常であった²⁵。このことから、TRAM は、MyD88 非依存性/TRIF 依存性のシグナルの中で TLR4 を介したシグナルに特異的に関与していることが明らかになった (図 3)。

自然免疫系細胞の異常活性化と慢性大腸炎

上述のように、TLR およびそのシグナル伝達経路の解析から、自然免疫系の活性化機構の概要が明らかになってきた。この自然免疫系が、実際の免疫応答、なかでも炎症性疾患の病態と関わっていることも明らかになってきている。特に、自然免疫系と慢性炎症性腸疾患の関わりが、自然免疫系に属するマクロファージで IL-10 のシグナル伝達に必須の役割をはたす Stat3 の変異マウスの解析から明らかになった²⁶。IL-10 は、自然免疫系細胞の活性を抑制すること、またノックアウトマウスの解析から個体レベルで慢性腸炎の発症抑制に重要な役割を担っていることが明らかになっている²⁷。自然免疫系細胞特異的に Stat3 を欠損したマウスのマクロファージでは、IL-10 シグナルが消失し、TLR 刺激による TNF- α , IL-6, IL-12p40 などの炎症性サイトカインの産生が正常マクロファージに比べ顕著に増加し、CD80, CD86 などの細胞表面抗原の発現も亢進するなど、異常活性化を示した。さらに Stat3 変異マウスは、IL-10 ノックアウトマウスと同様の Th1 応答優位な慢性大腸炎を発症した。このことは、マクロファージなどの自然免疫系細胞における IL-10 による Stat3 の活性化が生体において慢性大腸炎を抑制するのに重要であり、その破綻による自然免疫系の異常活性化が慢性大腸炎の発症につながることを示している。

さらに、自然免疫系の異常活性化から慢性大腸炎に発症にいたるメカニズムが、Stat3 との二重変異マウスを数種類作製することにより明らかにされ

図4 自然免疫系異常活性化と慢性大腸炎

IL-10 のシグナルに必須の Stat3 が欠失すると、マクロファージ (Mφ)、樹状細胞 (DC) が異常活性化され、TLR による腸管内細菌叢の構成成分認識により炎症性サイトカインを過剰産生する。その中で過剰産生された IL-12 が、T 細胞を Th1 型へ強く誘導することにより、Th1 細胞依存性の慢性大腸炎の発症にいたる。

た²⁸⁾。IFN- γ のシグナルに必須の Stat1 と Stat3 の二重変異マウス、TNF- α /Stat3 二重変異マウスでも慢性大腸炎は発症し、T ヘルパー細胞も Stat3 単独変異マウスと同様 Th1 に強くシフトしていた。一方、IL-12p40/Stat3 二重変異マウス、T 細胞のない RAG2/Stat3 二重変異マウスでは、まったく慢性大腸炎は発症しなかった。この結果から、負の活性制御機構の破綻した自然免疫系細胞から過剰に産生される IL-12p40 が Th1 細胞の分化を強く促し Th1 依存性の慢性大腸炎を引き起こすことが明らかになった。さらに、Stat3 と TLR4 の二重変異マウスでは、慢性大腸炎の発症が有意に抑制され、また CD4 陽性 T 細胞からの IFN- γ 産生も減少していた。このことから、IL-10 のシグナルが消失すると、TLR がおそらく腸管の細菌叢を認識することにより自然免疫系細胞からの炎症性サイトカインの過剰産生を導き、慢性大腸炎の最初のトリガーとなることが明らかになった (図4)。

大腸局所のマクロファージの機能

これらの結果は、大腸粘膜に局在する自然免疫系の細胞からの炎症性サイトカインの産生が慢性大腸炎の発症に関与していることを示している。そこで、大腸粘膜固有層に存在する CD11b 陽性細胞 (マクロファージ系細胞) を高純度で単離し、TLR リガンド (LPS や CpG DNA) に対する応答性を解析した²⁹⁾。脾臓の CD11b 陽性細胞は TLR 刺激により TNF- α 、IL-6、IL-12p40 などの炎症性サイトカインを産生するが、大腸粘膜固有層由来の

CD11b 陽性細胞はまったく産生しなかった。また、大腸粘膜固有層由来の CD11b 陽性細胞は刺激に関わらず恒常的に IL-10 の産生が見られた。次に、まだ大腸炎を発症していない若い IL-10 ノックアウトマウスあるいは Stat3 変異マウスから大腸粘膜固有層に存在する CD11b 陽性細胞を単離し、TLR リガンドに対する応答性を解析した。すると、正常マウスと違い炎症性サイトカインを有意に産生した。このように、大腸局所の自然免疫系細胞の TLR への応答性が、慢性大腸炎の発症と相関していた。そこで、正常マウスで大腸粘膜に局在する CD11b 陽性細胞が TLR に不応答になるメカニズムを、正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で比較することにより解析した。その結果、Bcl-3、I κ BNS、CD163 などの遺伝子が正常マウスの大腸粘膜に局在する CD11b 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子として同定された。Bcl-3、I κ BNS はアンキリンリピートをもった核に局在する I κ B ファミリー分子である。これらの分子のマクロファージでの機能を解析した。Bcl-3、I κ BNS 両遺伝子の mRNA が正常マウス由来の大腸粘膜 CD11b 陽性細胞には発現しているが、IL-10 ノックアウトマウス由来の細胞には発現していないことから、両遺伝子の他のマクロファージ (腹腔マクロファージやマクロファージ系細胞株 RAW264.7) での発現を解析したところ、両遺伝子ともに IL-10 により 1 時間以内に誘導された。

マクロファージにおける Bcl-3 の機能

まず、Bcl-3 をレンチウイルスシステムにより GFP とともにマクロファージ系細胞株 RAW264.7 に発現させ、LPS 刺激依存性の IL-6, TNF- α の産生を解析した。Bcl-3 を発現した細胞では、IL-6 産生に変化は認めないが、TNF- α の産生が著明に減弱していた³⁰⁾。次に、Bcl-3 ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージを IL-10 で前処置し、その後に LPS 刺激依存性の TNF- α , IL-6 産生を解析した。IL-6 産生は IL-10 前処置により正常マクロファージと同様に抑制された。一方、TNF- α 産生の IL-10 による抑制は、Bcl3 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、完全ではないものの有意に障害されていた。このことから、IL-10 で誘導される Bcl-3 は、LPS 刺激依存性の TNF- α 産生の抑制に特異的に関与していることが明らかになった。

Bcl-3 を発現したマクロファージでは、LPS 刺激による NF- κ B p50/p65 の DNA 結合能が、IL-10 で前処置した細胞と同様に障害されていた。このように、Bcl-3 は、核内で NF- κ B の活性を制御し、TNF- α 産生を負に制御している。次に、クロマチン免疫沈降法により Bcl-3 が TNF- α のプロモーターに会合するかどうかを解析した。Bcl-3 を RAW 細胞に発現させ、その結果、Bcl-3 を発現させた細胞では、IL-6 プロモーターに Bcl-3 は会合

しないが、TNF- α プロモーターには、LPS 刺激以前から会合していることが明らかになった。また、Bcl-3 は NF- κ B p50 と会合するが、Bcl-3 を発現させた細胞では、p50 が LPS 刺激前後にかかわらず TNF- α プロモーターに会合していることも明らかになった。これらの結果から、Bcl-3 が発現すると、Bcl-3 が転写活性のない p50 homodimer と会合し、TNF- α プロモーターに特異的に会合することにより、LPS 刺激依存性の転写活性の強い NF- κ B p50/p65 の DNA 結合を阻害する結果、TNF- α 産生を抑制していることが示唆された。

マクロファージにおける I κ BNS の機能

次に、I κ BNS をレンチウイルスシステムにより GFP とともに RAW264.7 に発現させ、LPS 刺激依存性の IL-6, TNF- α の発現誘導を Northern blot 法で解析した。その結果、I κ BNS を発現した細胞では、TNF- α の発現誘導に変化はないが、IL-6 の誘導が顕著に障害されていることが明らかになった。また RNAi により I κ BNS の発現誘導を抑えると、TNF- α の誘導に変化はないが、IL-6 の誘導が有意に上昇した。この結果から、I κ BNS は、IL-6 の発現誘導を選択的に抑制していることが明らかになった²⁹⁾。

I κ BNS を発現したマクロファージでは、I κ BNS が NF- κ Bp50 と選択的に会合し、また転写活性化

図5 Bcl-3, I κ BNS による TNF- α , IL-6 産生の抑制機構

大腸粘膜に局在するマクロファージは、Bcl-3, I κ BNS が核内に恒常的に発現している。Bcl-3, I κ BNS は、NF- κ B p50 homodimer と会合し、それぞれ TNF- α , IL-6 プロモーターに選択的に結合することにより、LPS 刺激依存性の転写活性を持つ NF- κ B p50/p65 heterodimer の DNA 結合を阻害することにより、TNF- α , IL-6 産生を抑制する。

能を持たない NF- κ B p50/p50 の IL-6 プロモーターの NF- κ B 結合領域への結合が刺激に関わらず極めて強く認められる。このように、I κ BNS は、核内で NF- κ B の活性を制御していることが示唆された。

さらに、I κ BNS の発現により IL-6 プロモーターの活性化は阻害されるが、TNF- α プロモーターの活性化は阻害されないことから、I κ BNS は IL-6 プロモーターの活性化を選択的に阻害していることが示唆された。クロマチン免疫沈降法による解析から、I κ BNS が IL-6 のプロモーターに p50 と共に選択的に TLR 刺激にかかわらず常にリクルートされていることが明らかになった。これらの結果から、I κ BNS が発現すると、I κ BNS が転写活性のない p50 homodimer と会合し、IL-6 プロモーターに選択的に会合することにより、TLR 刺激依存性の転写活性を有する NF- κ B p50/p65 の DNA 結合を阻害し、IL-6 産生を抑制していることが示唆された (図 5)。

おわりに

TLR およびそのシグナル伝達の機能解析により、自然免疫系が免疫応答の制御に深く関与していることが明らかになった。そして免疫応答のトリガーとなる自然免疫系が、その異常活性化により慢性炎症性腸疾患の根本的原因となりうることが明らかになった。そのため、大腸粘膜の局所では自然免疫担当細胞は様々なメカニズムでその活性が負に制御されている。この分子機構を明らかにすることにより、その破綻による慢性大腸炎の発症機構、さらには治療方法を確立していけることが期待される。

文 献

- 1) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M and Hoffmann JA : The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86** : 973-983, 1996.
- 2) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway CA Jr : A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388** : 394-397, 1997.
- 3) Takeda K, Kaisho T, Akira S : Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21** : 335-376, 2003.
- 4) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K and Akira S : Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11** : 443-451, 1999.
- 5) Takeuchi O, Kawai T, Muhlrardt PF, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K and Akira S : Discrimination of bacterial lipopeptides by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13** : 933-940, 2001.
- 6) Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL and Akira S : Role of TLR1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169** : 10-14, 2002.
- 7) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA : Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413** : 732-738, 2001.
- 8) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B and Beutler B : Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : mutation in *Tlr4* gene. *Science* **282** : 2085-2088, 1998.
- 9) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K and Akira S : Cutting Edge : Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* **162** : 3749-3752, 1999.
- 10) Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM and Aderem A : The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* **410** : 1099-1103, 2001.
- 11) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, and Bauer S : Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303** : 1526-1529, 2004.
- 12) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, and Reis E Sousa C : Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303** : 1529-1531, 2004.
- 13) Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo S, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K and Akira S : Antiviral low molecular weight compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signalling pathway.

- Nature Immunol* **3** : 196–200, 2002.
- 14) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K and Akira S : A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408** : 740–745, 2000.
 - 15) Takeda, K., and Akira, S. : Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511, 2004.
 - 16) Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW and Yeh WC : Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4. *Nature* **416** : 750–756, 2002.
 - 17) Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghonaïm A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidalo MA, Ozinsky A and Casanova JL : Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* **299** : 2076–2079, 2003.
 - 18) Gohda J, Matsumura T and Inoue J : Cutting Edge : TNFR-associated factor 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- β -dependent pathway in TLR signaling. *J. Immunol.* **173** : 2913–2917, 2004.
 - 19) Horng T, Barton GM, Flavell RA and Medzhitov R : The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420** : 329–333, 2002.
 - 20) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K and Akira S : Essential role of TIRAP for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420** : 324–329, 2002.
 - 21) Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K and Akira S : Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11** : 115–122, 1999.
 - 22) Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R and Hiscott J : Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300** : 1148–1151, 2003.
 - 23) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K and Akira S : Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301** : 640–643, 2003.
 - 24) Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Li P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J and Beutler B : Identification of *Lps2* as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424** : 743–748, 2003.
 - 25) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K and Akira S : TRAM is specifically involved in the TLR4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4** : 1144–1150, 2003.
 - 26) Takeda, K. et al. : Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* **10** : 39–49, 1999.
 - 27) Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, and Muller W. : Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75** : 263–274, 1993.
 - 28) Kobayashi M, Kweon M, Kuwata H, Kiyono H, Takeda K, and Akira S. : Toll-like receptor-dependent IL-12p40 production causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **111** : 1297–1308, 2003.
 - 29) Hirotani T, Lee PY, Kuwata H, Yamamoto M, Matsumoto M, Kawase I, Akira S, and Takeda K. : The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits LPS-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* **174** : 3650–3657, 2005.
 - 30) Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, and Akira S. : IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- α production in macrophages. *Blood* **102** : 4123–4129, 2003.