総 説

レチノイドによる自己免疫疾患の治療

深澤 弘志^{*1}, 影近 弘之^{*2,*3}, 首藤 紘一^{*3}

Retinoid Therapy for Autoimmune Diseases

Hiroshi FUKASAWA^{*1}, Hiroyuki KAGECHIKA^{*2,*3} and Koichi SHUDO^{*3}^{*1}*Department of Drug Development, Institute of Medicinal and Molecular Design, Inc.*^{*2}*School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University*^{*3}*Research Foundation Itsuu Laboratory*

(Received May 8, 2006)

summary

Retinoid is a collective term for compounds which bind to and activate retinoic acid receptors (RAR α , β , γ and RXR α , β , γ), members of nuclear hormone receptor superfamily. The most important endogenous retinoid is *all-trans*-retinoic acid (ATRA) which is an RAR α , β and γ ligand. ATRA and its mimics have been in clinical use for treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) and some skin diseases. Many synthetic retinoids have been developed and attempts to improve their medicinal properties have been made. Among them, tamibarotene (Am80) is an RAR α - and RAR β - specific (but RAR γ - and RXRs-nonbinding) synthetic retinoid that is effective in the treatment of psoriasis patients and relapsed APL. Experimentally, this compound is also active in animal models of rheumatoid arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis. On this background, possible application of retinoids for the treatment of autoimmune diseases was discussed. In particular, Th1 dominant autoimmune diseases may be the targets of the retinoids.

Key words——Retinoid; Tamibarotene; Psoriasis; Autoimmune Disease; Type1 Helper T cells

抄 録

レチノイドとは、核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属するレチノイン酸受容体 (RAR α , β , および γ と RXR α , β , および γ) に結合し、これらを活性化する化合物の総称である。内在性に存在する最も重要な生体内レチノイドは、*all-trans*-レチノイン酸 (ATRA) であり、これは RAR α , β , γ を区別なく活性化する。ATRA およびその類似化合物が急性前骨髄球性白血病 (APL) や皮膚疾患の治療に用いられている一方で、数多くの合成レチノイドが合成され、医薬としての性状を改善する試みも行われている。中でも、タミバロテン (Am80) は、RAR α , β のみを活性化し、RAR γ や RXRs には結合しない特徴的な合成レチノイドである。Am80 は、乾癬と再発 APL の治療において有効性が確認されていることに加え、コラーゲン誘導関節炎モデルや実験的自己免疫性脳炎 (EAE) においてもその効果を示す。レチノイドは、特に Th1 優勢な自己免疫疾患に有効ではないかと考えられる。

レチノイドとは

レチノイド (retinoid) とは、ビタミン A の活性本体である *all-trans*-retinoic acid (ATRA, 以下、レチノイン酸; 図 1) とそれと同等の活性を示す化合物群の総称である。より正確には、Sporn によって定義されたように、核内に存在するレチノイン酸の特異的受容体 retinoic acid receptor (RAR) のレチノイン酸結合部位に結合する化合物である¹⁾。

RAR をレチノイン酸のように活性化する化合物 (アゴニスト) やその活性を阻害する化合物 (アンタゴニスト) がすでに多数、化学合成されており、それらも含めて本稿の対象とするレチノイドである。RAR と相同の核内受容体である RXR (retinoid-X receptor, 後述) に結合する化合物 (rexinoid と呼ばれることもある) も、レチノイン酸との見かけの化学構造の差異が様々であっても、広くレチノイドとして扱われる。

レチノイン酸は生体内において、細胞の増殖・分化、生体の恒常性維持、形態形成に関わる重要な生体内ホルモンである^{1,2)}。現在、レチノイドには、

^{*1} 株式会社医薬分子設計研究所創薬事業部^{*2} 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部^{*3} 財団法人乙卯研究所

急性前骨髄球性白血病 APL の分化誘導療法剤としてレチノイン酸（医薬一般名トレチノイン）が用いられるほか、その異性体や類似の活性を持つ合成化合物が、乾癬、角化症、重症のニキビなど、皮膚の炎症性・増殖性疾患の治療に用いられている^{1,3,4)}。レチノイン酸やその類似体を臨床的に用いた場合、催奇形性の不安、皮膚炎症状、口唇炎、血中脂質の上昇等の副作用がしばしば問題にされ、その応用の可能性を狭めているが、一方では、多くの合成レチノイドが新規に開発され、医薬としての性状を改善する試みがなされている⁵⁾。そのような取り組みの中で、我々は合成レチノイド Am80（タミバロテン、図 1）の開発を推進し、レチノイン酸治療後の APL 再発例に有効な医薬として、最近、医薬品としての承認を得ることができた^{5,6)}。

さて、乾癬に対するレチノイドの効果は、主に、角化細胞の増殖、分化に対する作用として説明されてきた。しかし、現在では、乾癬の発症に免疫細胞の関与するところが大きいことが知られており、乾癬等への治療効果を免疫機能に対するレチノイドの効果としてとらえ直せば、レチノイドの医薬としての応用を他の免疫異常疾患に対しても広げられる。本稿では、レチノイドの免疫系に対する作用に注目し、新規合成レチノイドの免疫疾患治療薬としての

可能性を論じてみたい。

レチノイン酸と合成レチノイド

まず、レチノイドの作用メカニズムをおさらいしてみたい。レチノイドの作用は、細胞核内に存在するレチノイン酸受容体 RAR (α , β , γ) に依存したものである（図 2）^{1,2)}。ステロイドホルモン受容体と同様、RAR はレチノイン酸との結合に依存して活性化する転写因子である。また、RAR は、レチノイド X 受容体 RXR (α , β , γ) と呼ばれる別の核内受容体とヘテロ二量体を形成しており、生体内では RXR はレチノイン酸の 9-*cis*-異性体と結合した時に活性化されると考えられる。レチノイン酸の広範な生理作用は、それぞれに 3 種存在するサブタイプ RAR α , β , γ と RXR α , β , γ の組織・時間特異的な発現パターン、ヘテロ二量体の組み合わせ、標的遺伝子に対する選択性、転写コファクターの使い分けにより実現されていると考えられる。また、組織内のレチノイン酸濃度はレチノイン酸合成酵素 retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) と代謝酵素 Cyp26 による絶妙な制御を受けており、また、細胞内においてはレチノイン酸結合蛋白 (CRABP) の緩衝作用を通じてフリーのレチノイン酸の濃度が調節されている（図 2）⁷⁾。

Natural Retinoic acid or mimics in Clinical Use

Synthetic Retinoid/Rexinod in Clinical Use

図 1 臨床で使われているレチノイド

レチノイン酸を医薬として用いた場合、レチノイン酸には受容体サブクラスに対する選択性がほとんどないこと、脂溶性が高いことによって脂肪組織に長時間留まること、一方で、短期間のうちに血中濃度が低下することなどが、作用の選択性をなくし、副作用の問題を大きくしている。従って、新規合成レチノイドの開発においては、サブタイプ選択性と良好な体内動態を有することが重要なポイントとなる。

レチノイドの乾癬に対する治療効果

レチノイドの作用における RAR サブタイプ選択性の重要性は、皮膚での作用において見ることができる。レチノイン酸を皮膚に塗布した場合、基底膜上の上皮細胞の著しい増殖とケラチノサイトの角化への分化抑制が見られ、レチノイン酸の類似体 acitretin (図 1) を乾癬治療に用いた場合にも、同様の上皮細胞増殖と角質層の脱落から皮膚の剥脱を伴うことが多い。すなわち皮膚組織のターンオーバーが促進されることにより治療効果が発揮される

と理解しうるが、これは、患者の QOL を損なうと共に、皮膚透過性の亢進による炎症症状の促進原因にもなりうる。ノックアウトマウスを用いた研究から、レチノイン酸は、RAR γ 活性化を通じてケラチノサイトからの HB-EGF 産生を誘導し、基底上細胞の増殖を促進することが示されている⁸⁾。一方、RAR α と β に選択的で RAR γ は活性化しない合成レチノイド Am80 (タミバロテン) も乾癬の治療においてほぼステロイドと同等の効果を示すことが分かっているが (図 3)⁹⁾、Am80 では、表皮の落屑、すなわち皮膚のターンオーバーを著しく少なくして皮膚組織の正常化を促すことができる (図 4)^{10~12)}。RAR γ をほとんど活性化しない Am80 では、レチノイン酸に比べてケラチノサイトの HB-EGF 産生誘導がわずかであり、そのような過剰な基底上細胞の増殖が起きないのである。それでも Am80 が乾癬に対して十分な治療効果を示すことは、レチノイドが、RAR γ に依存しない乾癬発症の本質的な部分における正常化作用を発揮していることを示唆する。

乾癬は、ケラチノサイトの異常な増殖、分化を特

図2 レチノイン酸シグナル

細胞に取り込まれたレチノールは、レチノール脱水素酵素 (RDH) とレチナル脱水素酵素 (RALDH) による2段階の酸化反応によりレチノイン酸 (ATRA) に変換される。核内においてレチノイン酸応答配列 (RARE) 上の RAR に ATRA が結合すると、各種転写コファクターが RAR 上にリクルートされ、下流標的遺伝子の転写を活性化する。RAR は、RXR とのヘテロ二量体として存在しており、ATRA の異性体 9-シス-レチノイン酸が RXR に結合すると、相乗的な転写活性化が起こる (9 シス体は RAR にも結合可能)。RAR は、AP1 などの他の転写因子とクロストークすることにより、それらの転写活性を抑制することもある。細胞内のフリー ATRA 濃度は、細胞内レチノイン酸結合蛋白 (CRABP) の緩衝作用により調節を受けると共に、Cyp26 による代謝調節を受ける。図では、ATRA 合成・代謝、RAR 活性化をひとつの細胞内にまとめているが、これらはそれぞれ別々の細胞に起こりうる。

徴とする皮膚疾患であり、その発症のメカニズムは謎に包まれたままであるが、近年では、T細胞により媒介される自己免疫的な疾患であると捉えられるようになってきている¹³⁾。乾癬の疾患部位にはCD4抗原陽性またはCD8抗原陽性のT細胞や樹状

細胞が見出され、それぞれ、インターフェロン γ (IFN- γ) やTNF- α 、インターロイキン12 (IL-12) やIL-23等のサイトカインを産生し、持続的な炎症反応を担っていると考えられている。次項で述べるように、レチノイドには、T細胞や樹状細胞に働いて、エフェクターT細胞の機能分化を制御する作用があり、それによって乾癬の発症・病態を抑制しうるものと考えられる。

さらに、細胞内のシグナル伝達分子に目を向ければ、NF κ B, AP-1, STAT1, STAT3と言った転写因子の活性が乾癬の発症・病態に深く関与する事が示唆されている^{14,15)}。レチノイドの作用の本質がRARを介した標的遺伝子の発現制御であることを考えると、これらの転写因子との相互作用にも注目したいところである。我々が、レチノイドの研究を始めて20年余が経つが、マウス皮膚発癌モデルで典型的に示されるように、Protein kinase C (PKC) 及びその下流AP-1を活性化する発ガンプロモーターphorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)の作用に対して、レチノイドは、阻害的に働くことと認識している¹⁶⁾。その要因の一つには、RARとAP-1の相互作用によるものと思われるレチノイドのAP-1活性阻害を挙げることができるが(後述)、AP-1フ

図3 乾癬患者におけるAm80軟膏と吉草酸ベタメタゾン軟膏の有効性の比較

吉草酸ベタメタゾン軟膏(リンデロン(R)-V軟膏0.12%)を対照薬としたAm-80軟膏の第III相左右比較試験を行った。Am-80軟膏の1日1回塗布による効果は吉草酸ベタメタゾン軟膏より緩徐ではあるが有効な薬剤であることを示唆するものであった⁹⁾。

症例1

軟膏基材3週

0.008% Am-80 軟膏3週

症例2

処置前

0.008% Am-80 軟膏3週

図4 乾癬患者におけるAm80軟膏の効果¹⁰⁾(文献10より許諾を得て転載)

ファミリー分子の一つ JunB の働きにも注目したいと考えている。最近, JunB の発現が乾癬患者の疾患部位表皮で低下していること, これに対応するように, JunB と AP-1 ファミリーの主要な一員である c-Jun の表皮特異的なダブルノックアウトマウスにおいて乾癬様の皮膚炎症と関節炎が誘導されることが報告されている¹⁷⁾。このモデルマウスにおいて T 細胞の関与は低いと報告されているものの, JunB は, T 細胞, 顆粒球, ケラチノサイトの分化において, 増殖促進的な c-Jun と拮抗する働きをされると言われており, 加えて, エフェクター T 細胞分化において Th2 分化促進的に働く¹⁸⁾。レチノイドが白血病細胞株 HL-60 細胞の増殖を抑えて顆粒球に分化誘導すること, また, 次項に述べるようにレチノイドも Th2 促進的であることに注目すると, RAR と JunB には, 作用としての関連性が認められ, 両者の制御する遺伝子群に何らかの共通性や関連性を見出すことも可能ではないかと考えられる。

レチノイドによる T 細胞機能の制御

獲得免疫系のエフェクター細胞として働くヘルパー T 細胞は, IFN- γ を産生して細胞性免疫に主に働くタイプ 1 ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) と, IL-4 や IL-5 を産生して液性免疫に主に働くタイプ 2 ヘルパー T 細胞 (Th2 細胞) とに分類され, 互いに作用が拮抗する関係にある。関節リウマチのような臓器特異性のある自己免疫疾患では, Th1/Th2 バランスが, Th1 側に病的に傾いた状態 (Th1 ドミナント) であると考えられている。このような観点からは, 乾癬も Th1 ドミナントな免疫異常疾患であると捉えられる。

これまでの報告を見ると, レチノイドは, Th1/Th2 の機能・分化に少なからず影響を与え, Th1 を抑え, Th2 側にバランスを偏らせる傾向を示す^{19,20)}。古くから知られるように, ビタミン A 欠乏状態のヒトや動物は, 感染に対する防御力が著しく低下する。例えば, ビタミン A 欠乏ラットは成長が停止した後, 感染により死亡するし, 途上国の子ども達で感染による死亡リスクが高いことも, ビタミン A 摂取の不足がその一因であると考えられている。このような感染に対する抵抗力の低下の原因の一つを免疫グロブリン (Ig) 産生能の低下に求めることができる。正常なビタミン A レベルにあるマウスの B 細胞をビタミン A 欠乏マウスの T 細胞を用いて in vitro で抗原刺激した場合, 誘導され

る IgG1 の産生量が低下するが, 逆に, ビタミン A 欠乏マウスの B 細胞を正常なビタミン A レベルのマウスの T 細胞を用いて抗原刺激した場合には, IgG1 の産生量に抑制がかからない。従って, ビタミン A 欠乏マウスの免疫グロブリン減少は, T 細胞機能の低下によるものであろうと理解される²¹⁾。一方, ビタミン A 高摂取状態のマウスにおいては, Th2 サイトカイン IL-4, IL-10 と IgA の産生上昇が見られ, Th1 サイトカイン INF- γ には産生抑制の傾向が見られる^{22,23)}。

Th1, Th2 各サブセットは, 末梢での抗原提示を受けたことのないナイーブ T 細胞が, 樹状細胞を代表とする抗原提示細胞からの刺激を受けて末梢リンパ組織において分化したものである。レチノイン酸の抗原提示細胞への作用に注目すると, レチノイン酸で前処理した抗原提示細胞を用いた in vitro で Th1/Th2 分化誘導の実験結果から, レチノイン酸は, 抗原提示細胞に作用して IL-12 産生抑制を介して Th1 誘導を抑制し, Th2 誘導を促進する事がわかっている^{24,25)}。さらに, ナイーブ T 細胞を抗原提示細胞なしで in vitro で Th1/Th2 に分化誘導する系を用いて, T 細胞に対するレチノイン酸の直接的な影響を調べた岩田らの報告では, レチノイン酸および合成 RAR アゴニストは, Th1 誘導の抑制と Th2 誘導の促進をもたらす, RAR アンタゴニストはこれを阻害した (図 5)^{20,26)}。レチノイン酸処理によって Th1 分化のマスター分子である T-bet の発現誘導が抑制され, Th2 分化に重要な c-maf の発現亢進が見られたことから, レチノイン酸は, Th1/Th2 分化制御の本質的な部分に働いていると考えられる。このように, レチノイドは, RAR を介して, 抗原提示細胞, ナイーブ T 細胞の両方に作用し, Th1/Th2 分化のコントロールに関与する。加えて最近, RXR のリガンド結合部位にアミノ酸置換が起きている *Pinkie* マウスにおいて, OVA 感作後の Th2 応答 (IgG1 産生) が損なわれ, Th1 分化への偏りが見られる事も報告されている²⁷⁾。これは, RXR の二量体パートナーである RAR やビタミン D 受容体のシグナル系に異常が出ている結果と考えられる。

レチノイドによる免疫異常疾患の治療を考える場合, 以上のような Th1/Th2 分化制御作用から Th1 ドミナントな疾患により有効ではないかというコンセプトが立つ。例えば, 多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は, 典

 図5 Th1/Th2 分化に対するレチノイドの作用²⁶⁾

a) 岩田らは、クラス I, クラス II の MHC 抗原を共に欠損するマウスから CD4 陽性ナイーブ T 細胞を調製し、レチノイン酸の存在・非存在下、IL-12 と IL-4 を同時添加し、Th1 細胞、Th2 細胞の誘導を抗原提示細胞なしに in vitro でおこなった。CD3/CD28 刺激で産生されるサイトカインの量でレチノイン酸が Th1/Th2 分化に与える影響を評価した。b) レチノイン酸は、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を抑え、IL-4 などの Th2 サイトカインの産生を亢進した。c) 10 nM のレチノイン酸で、Th1 細胞への分化が抑えられ、Th2 細胞への分化が促進された。d) 合成 RAR α / β アゴニスト Am80 は、レチノイン酸同様、IFN- γ の産生を抑え、IL-4 の産生を亢進した。合成 RXR アゴニスト HX600, TZ335 の共存による相乗効果は見られない。また、RAR アンタゴニスト LE135 は、ATRA の作用に拮抗した。これらの結果は、Th1/Th2 分化に対するレチノイドの作用が、もっぱら RAR を介していることを示す。e) レチノイン酸は、Th2 分化に関わる転写因子 c-maf の発現を促進し、Th1 分化の決定因子 t-bet の発現を抑えた (RT-PCR)。 (文献 26 より許諾を得て転載)

典型的な Th1 ドミナントな自己免疫疾患モデルである。従って、レチノイドは、EAE モデルに有効であると予想されるが、実際、レチノイン酸や Am80 は、EAE の発症を抑制し、Am80 では EAE ラット脊髄中に見出される IFN- γ の発現減少が認められている^{23,28,29)}。MBP 特異的なマウスリンパ節細胞やヒト Th1 細胞株においては、レチノイン酸は IL-4 産生を誘導し、Th2 細胞様へと導く^{23,30)}。近年、IL-4 の全身投与が乾癬に対する治療法として有効であるという報告がなされており、レチノイドによる Th2 機能亢進作用は、レチノイドの乾癬に対する治療効果の分子的基盤の一つとなっていると考えられる³¹⁾。さらに、RAR α 選択的アゴニスト ER-38925 では、アロの異所性心移植モデルの急性拒絶反応を顕著に抑制するが、これはアロ抗原刺激に対する IL-2, IL-12, INF- γ の産生抑制に見られる Th1 機能の抑制にその機序を求めることができる³²⁾。一方、全身性エリテマトーデス (SLE) のような全身性の自己免疫疾患の病態では Th2 細胞の

影響が強いとされているが、SLE で見られる局所的な臓器損傷に関しては、IFN- γ 産生の Th1 細胞の関与するところも大きいと考えられる。従って、ループス腎炎、中枢神経障害、呼吸器障害等の症状が顕著な SLE の症例に関しても、レチノイドが有効となりうるであろう。レチノイン酸が、SLE のモデルマウスにおいて腎臓障害を抑制することが報告されており、また、合成レチノイドでは RAR α 選択的な E6060 が、NZB/W F1 マウスの腎障害を抑え、血中の IL-12, IgG2a のレベルを下げることを示されている^{33~36)}。

レチノイドの関節リウマチに対する効果： AP1 活性阻害と IL-6 シグナル阻害

乾癬の他に、以前からレチノイドの臨床応用が期待されているもう一つの自己免疫性炎症疾患として、関節リウマチを挙げることができる。関節リウマチの発症・病態にも Th1 応答が深く関与しているため、その点からもレチノイドの効果を期待でき

るのであるが、世の注目を集めるようになったきっかけは、関節リウマチ患者の滑膜細胞のコラゲナーゼ (MMP-1) 産生が、*in vitro* でレチノイン酸により抑制される事を示した 1980 年の Brinkerhoff らの報告である³⁷⁾。その後、その作用メカニズムは、コラゲナーゼを含むメタロプロテアーゼ遺伝子群 (MMPs) の発現に重要な転写因子 AP-1 に対する RAR の抑制作用 (trans-repression) によると理解されるようになった³⁸⁾。レチノイン酸はコラーゲン誘発関節炎モデルにはあまり有効ではなかったものの、*etretinate* と 4-*HPR* が、ラットのアジュバンド誘発関節炎モデルにおいてある程度の有効性が示され、レチノイドの関節リウマチへの臨床応用に期待が膨らんだ^{39,40)}。だが、残念なことに、これらの化合物による臨床予備試験では、その有効性は明らかにならなかった^{41,42)}。前述の *etretinate* が乾癬性関節炎には有効であることを考えると、*etretinate* は、リウマチ治療薬としては適当な特性を持つ化合物ではなかったのではないかという疑問が残る。一方で、我々の実験では、Am80 はレチノイン酸の効かないコラーゲン誘発関節炎モデルにおいても極めて有効であり、これまで試されたレチノイドでは示されなかった関節リウマチへの有効性を臨床的に示せるのではないかという期待が持てる。(図 6)^{43,44)}。最近、RAR アンタゴニスト BMS-189453 も、マウスのコラーゲン誘発関節炎モデルで有効性が報告された^{45,46)}。この化合物は RAR を活性化せずに AP1 の抑制を示すレチノイドであるが、炎症増強にかかわる RAR γ を阻害するアンタゴニスト活性を持つため、それが関節炎に有効に働いたと見ることも出来る。

関節リウマチに対するレチノイドの有効性を考える場合、AP1 抑制を介した MMP 産生阻害に加えて注目される作用は、IL-6 産生およびそのシグナル伝達系に対する影響である。IL-6 は、炎症時に誘導される多面的作用を示すサイトカインであり、IL-6 の過剰産生は、関節リウマチにおいては、自己反応性 T 細胞の活性化とアポトーシス阻害、自己抗体産生誘導、破骨細胞活性化などのプロセスに深く関わっていると考えられる⁴⁷⁾。IL-6 は、マウスのコラーゲン誘発関節炎の発症に必須な分子であり、臨床的にも抗 IL-6 受容体抗体投与による IL-6 シグナル遮断が、関節リウマチ治療に有効であることが示されている^{48,49)}。レチノイドはこの IL-6 産生を非常に強く抑制する。レチノイン酸は、IL-1

図 6 コラーゲン誘導関節炎モデルにおける Am80 と 13-cis-レチノイン酸の効果の比較⁴⁴⁾

ラットに typeII コラーゲンを皮内注射後、1 日目から 23 日目まで表示の用量 (mg/kg/day) で Am80 と 13-cis-レチノイン酸を連日経口投与した。24 日目の血中抗コラーゲン抗体量 (上) と Paw 容量 (下) を測定した。*** $P < 0.01$ (vs. vehicle)

刺激された肺線維芽細胞における IL-6 の産生誘導を抑制し、多発性骨髄腫細胞においては恒常的な IL-6 産生を抑制する^{50,51)}。合成レチノイド Am80 も骨芽細胞様細胞株 MG-63 細胞や MC3T3-E1 細胞の IL-1 誘導 IL-6 産生を抑制し、LPS 投与マウスやコラーゲン誘発関節炎においても、血清 IL-6 濃度の上昇に対して抑制効果を示す^{44,52)}。先に述べた Am80 予防投与によるラット EAE の抑制においては、脊髄 IL-6 mRNA 発現の増減が、INF- γ 以上に Am80 によく応答する²⁸⁾。IL-6 遺伝子プロモーター上には、転写因子 AP1, NF- κ B, C/EBP の認識配列の存在が明らかとなっており、レチノイドは、MMP の場合と同様、RAR とこれらの転写因子とのクロストークを通じて IL-6 の産生を抑制するものと考えられる⁵³⁾。IL-6 下流の細胞内シグナル伝達に目を向けると、IL-6 受容体 α 鎖と会合して情報を細胞内に伝えるシグナル鎖 gp130 の発現をレチノイン酸が抑制する効果もあることが、IL-6 を自己増殖因子とする多発性骨髄腫細胞において報告されている^{51,54)}。レチノイドは、Th1/Th2 バランス制御の作用に加えて、炎症のメディエーター分子である MMP と IL-6 の産生、及び IL-6 のシグナル伝達分子 gp130 の発現を抑制することにより、関節リウマチに対する治療効果を示すとみ

られる。

レチノイドによるクローン病治療の可能性

次に、難治性炎症性腸疾患であるクローン病 (Crohn's disease) についても考察してみたい。クローン病は、若い成年に好発する慢性の炎症性腸疾患であり、本邦でも登録患者数が2万人を超える難治性の疾患である。クローン病の発症機序は、まだ十分に明らかにされていないが、腸管における免疫応答の異常が、その発症・病態に大きく関わっていると考えられる⁵⁵⁾。クローン病も Th1 ドミナントとされる自己免疫疾患であり、また、IL-6 がクローン病の病態に深く関わっていることも明らかである⁴⁷⁾。レチノイドによるクローン病の治療の可能性も、乾癬、リウマチ、多発性硬化症の治療の可能性という文脈から十分に考えられることである。

腸管は、その表面積から体内における最大の免疫組織とも捉えられ、食物や常在細菌に対する免疫寛容が常態として成立していることでも特徴的である^{56,57)}。腸管では、本来的にエフェクター T 細胞に対する抑制がかかっている。近年、T 細胞の新たなサブセット、制御性 T 細胞 (レギュラトリー T 細胞) の存在が明らかとなり、これにはエフェクター T 細胞の機能を抑制する働きがある⁵⁸⁾。クローン病においては、腸管組織の制御性 T 細胞の機能低下によりエフェクター T 細胞の機能が亢進し、常在細菌等への免疫寛容が破綻することが、その発症・病態に重要ではないかと考えられるようになってきている。制御性 T 細胞は、エフェクター T 細胞の機能を抑制する IL-10 や TGF- β の産生、細胞接触を介してその作用を表し、TGF- β ノックアウトマウスと IL-10 ノックアウトマウスは腸炎を自然発症する。そこで興味深いことは、レチノイン酸には、以前から TGF- β の産生を促進する作用があることが知られていることで、ビタミン A 欠乏マウスにレチノイン酸を投与すると、腸管粘膜において TGF- β 2, TGF- β 3 の発現が速やかに誘導される^{59~61)}。レチノイドには IgA 産生誘導する作用があるが、腸管組織での TGF- β 産生促進を介して IgA へのクラススイッチを促進するのであろう。制御性 T 細胞に対するレチノイドの影響を示した報告はないが、腸管上皮組織には RAR α , γ と共にレチナル脱水素酵素 (RALDH) が高発現しており、これにより生合成されたレチノイン酸は、TGF- β の発現調節を介して腸管免疫の抑制的な環境の維持

に関わっているように思われる^{62~65)}。

実のところ、クローン病とビタミン A、すなわちレチノイドとの関係は、クローン病患者にビタミン A 血中濃度の低下が見られることから、1980 年頃から少なからず注目を集めていた^{66,67)}。ビタミン A の上皮組織を維持する作用から、腸管においても粘膜上皮バリアの維持にビタミン A が重要と考えられたのである。そこで、クローン病患者へのビタミン A 補給が検討されたが、目立った効果は得られなかった⁶⁸⁾。その後、乾癬などの皮膚病治療に合成レチノイド isotretinoin (13-*cis*-レチノイン酸) や etretinate が、APL にレチノイン酸が用いられるようになると、クローン病を併う症例もいくつか報告されるようになったが、クローン病に対する効果として積極的にレチノイドの有効性を確かにした報告はない^{69~71)}。しかし、関節リウマチや乾癬の場合と同様、クローン病治療に適した合成レチノイドが存在する可能性は十分に残っている。

現在、我々は、クローン病動物モデルでレチノイドの効果を調べており、ラット DNBS 誘発腸炎において Am80 の治療効果を認めている (未発表データ)。クローン病患者の腸管組織に浸潤する T 細胞、マクロファージでは、STAT3 のリン酸化、活性化が認められるが^{72~74)}、我々の行った DNBS 誘発腸炎モデルでも、腸管組織抽出液中に STAT3 のリン酸化亢進を認め、Am80 投与群では抑制の傾向を示した。STAT3 は T 細胞のアポトーシス阻害に働くため、抗炎症のための標的分子としての可能性を有し、今後も注目して解析を進めていきたいと考えている⁷⁵⁾。

免疫系におけるレチノイドの作用に関する新たな展開

最近の報告からレチノイドと免疫の関係に関する興味深い知見を少し紹介したい。まず、T 細胞の腸管ホーミングにおいてレチノイン酸が重要な働きをしていることを示した岩田らの報告が挙げられる⁶⁴⁾。彼らは、レチノイン酸処理によって T 細胞の腸管へのホーミングに必要なケモカイン受容体 CCR9 の発現が誘導されることを見出し、合成レチノイドも駆使して、その作用が RAR α 活性化を介するものであることを示した。さらに、消化管関連リンパ系組織 (GALT) において T 細胞に抗原提示を行う樹状細胞が、同時に RALDH を発現してレチノイン酸を産生し、T 細胞に CCR9 の発現を

誘導していることを示した。レチノイン酸の新たな生理的役割を分子レベルまで還元して明らかとした画期的な発見である。クローン病治療へのレチノイドの応用を考えるにおいても重要な観察であるが、レチノイン酸による CCR9 発現誘導は、生理的に低いレベルの濃度で活性が飽和する。クローン病の治療の観点からは、Th1/Th2 バランスに対して作用する目的で与える薬理的な濃度のレチノイドの作用とは状況が大きく異なると言えよう。

もう一つ、レチノイン酸の自然免疫系に対する作用を示した報告を紹介すると、Liu らは、レチノイン酸がヒト単球に発現する病原体認識分子 Toll-like receptor 2 (TLR2) の発現を抑制し、TRL2 リガンド刺激による IL-12, TNF- α , IL-6 の産生を抑制することを報告した⁷⁶⁾。TLR2 を活性化する感染源の一つにニキビ菌を挙げられるが、レチノイドの重症ニキビに対する治療効果を考えると、彼らの報告にはなるほどと思える⁷⁷⁾。クローン病発症の外的要因として細菌感染が関わっていることが指摘されているが、単球・マクロファージに発現する腸内細菌リ

ポ多糖に対する細胞内受容体をコードする NOD2 遺伝子多型がクローン病患者に高頻度に認められることも近年見出された^{78,79)}。興味深いことに、NOD2 は、TRL2 シグナルの負の制御因子となることが報告されており、クローン病では NOD2 の異常が TLR2 を介して Th1 応答を過剰にしている可能性が考えられる⁸⁰⁾。TLR2 も、レチノイドによるクローン病治療の可能性を考える時、新たな治療標的分子に入れて良いかもしれない。

おわりに

今考えれば、レチノイドが、正常な免疫系の維持に必須であることはビタミン A の発見当初から明らかであった。レチノイドの免疫系に対する作用は、本稿で紹介したように、エフェクター T 細胞に対する作用に始まって、生理的、薬理的に非常に多岐にわたるものである (図 7)。自己免疫疾患の発症・病態のメカニズムに関しては、依然として不明の部分が多いものの、近年の免疫学の目覚ましい発展により、その詳細は次第に明らかになりつつあ

図 7 免疫応答に対するレチノイン酸の作用

レチノイン酸は、Th1 細胞分化を抑制し、Th2 細胞分化を促進し、抗体産生の維持に働く。レチノイン酸は、Th 細胞の分化に直接作用することに加え、樹上細胞からの IL-12 産生を抑制する。マクロファージなどからの炎症性サイトカイン IL-6 産生は、RAR と C/EBP β とのクロストークにより抑制されう。消化管関連リンパ系組織の樹上細胞は、自らレチノイン酸を産生し、Th 細胞に CCR9 の発現を誘導し、腸管組織へのホーミングを促すことが知られている。一方、レチノイン酸は TGF β の産生を誘導することも知られており、特に腸管上皮で産生されるレチノイン酸は、腸管組織の免疫抑制的な環境維持、IgA 産生の促進に働いているのではないと思われる。

る。関連する臓器の違いや発症原因などにより、多くの難治性の免疫疾患があるが、それぞれの疾患の治療に適した特性を持つレチノイド化合物を選び出すことが当面の課題である。レチノイドが多くの重要な生命現象に関わっていることを考えると、様々な免疫異常の疾患にも基本的に共通のメカニズムがあり、その上でそれぞれのレチノイドが特徴的に働く細胞や組織の環境があるのではなかろうかと考えている。

レチノイド化合物の選択において留意すべき点は、合成レチノイドの効果は、必ずしもレチノイン酸の効果とは同一ではないことである。正常な免疫系維持に必要と考えられるレチノイン酸の生理的濃度は、精々、数 nM である。Th1/Th2 バランス制御による正常な液性免疫の維持、T 細胞ホーミングを含む腸管免疫系の維持のような作用は、この生理的濃度のレチノイン酸で十分であろう。さらに上の薬理学的濃度のレチノイン酸では、Th1 分化抑制や AP1 抑制を介した炎症性サイトカイン、メディエーターの産生に対する抑制作用が前面に出てくると考えられ、より高濃度では全体として免疫抑制的にも働きうるかもしれない。と同時に、RAR γ 選択性の強いレチノイドでは、主に RAR γ 活性化を介するであろう炎症惹起の側面も出てくる可能性がある。レチノイン酸とは異なるサブタイプ選択性、体内動態などに特徴を与えられた合成レチノイドでは、それぞれの疾患に有利なレチノイン酸の作用を選択的に示しうるのである。すでに、様々な特性を持った合成レチノイドが多数創製されている現在、経口投与可能な新たな自己免疫疾患の治療薬がそこに眠っている可能性を、自己免疫疾患の治療を目指す多くの研究者の方々に是非知っていただきたいと願う次第である。

文 献

- Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. : The Retinoids. 2nd ed. New York, Raven Press. 1994.
- Chambon P. : A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* **10** : 940–954, 1996.
- Altucci L, Gronenmeyer H. : The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Rev Cancer* **1** : 181–193, 2001.
- Fisher GJ, Voorhess JJ. : Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J* **10** : 1002–1013, 1996.
- Kagechika H. : Novel synthetic retinoids and separation of the pleiotropic retinoid activities. *Curr Med Chem* **9** : 591–608, 2002.
- Shinjo K, et al. : Koseisho Leukemia Study Group. : Good prognosis of patients with acute promyelocytic leukemia who achieved second complete remission (CR) with a new retinoid, Am80, after relapse from CR induced by *all-trans*-retinoic acid. *Int J Hematol* **72** : 470–473, 2000.
- Napoli JL. : Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1440** : 139–162, 1999.
- Chapellier B, et al. : Physiological and retinoid-induced proliferations of epidermis basal keratinocytes are differentially controlled. *EMBO J* **21** : 3402–3413, 2002.
- Am-80 軟膏臨床研究会 : Am-80 軟膏の乾癬に対する有効性の検討吉草酸ベタメタゾン軟膏との左右比較試験(第3相試験). 臨床医薬. **11** : 733–746, 1995.
- Am-80 軟膏臨床研究会 : Am-80 軟膏第2相・用量設定予備試験. 臨床医薬. **11** : 545–554, 1995.
- Yoshimura K, et al. : Differential expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) mRNA in normal human keratinocytes induced by a variety of natural and synthetic retinoids. *Exp Dermatol* **12** (Suppl 2) : 28–34, 2003.
- 只木行啓, 田上八朗 : 4-[(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-carbamoyl] benzoic acid 軟膏 (Am-80) の表皮に与える影響. 皮膚科紀要. **88** : 277–288, 1993.
- Bowcock AM, Krueger JG. : Getting under the skin : the immunogenetics of psoriasis. *Nature Rev Immunol* **5** : 699–711, 2005
- Nickoloff BJ, Nestle FO. : Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* **113** : 1664–1675, 2004.
- Sano S, et al. : Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nature Med* **11** : 43–49, 2005.
- Verma AK, et al. : Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis by vitamin A analogs (retinoids). *Cancer*

- Res* **38** : 793–801, 1978.
- 17) Zens R, et al. : Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* **437** : 369–375, 2005.
- 18) Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. : AP-1 subunits : quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117** : 5965–5973, 2004.
- 19) Hayes CE, et al. : Retinoids and Immunity. Nau H, Blaner WS. eds. “Retinoids The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action” (Handbook of Experimental Pharmacology , Vol. 139) : 589–610, 1999.
- 20) 岩田 誠 : レチノイン酸による Th1 分化の抑制. 臨床免疫. **41** : 520–526, 2004.
- 21) Carman JA, Smith SM, Hayes CE. : Characterization of a helper T lymphocyte defect in vitamin A-deficient mice. *J Immunol* **142** : 388–393, 1989.
- 22) Cui D, Moldoveanu Z, Stephensen CB. : High-level dietary vitamin A enhances T-helper type 2 cytokine production and secretory immunoglobulin A response to influenza A virus infection in BALB/c mice. *J Nutr* **130** : 1132–1139, 2000.
- 23) Racke MK, et al. : Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course. *J Immunol* **154** : 450–458, 1995.
- 24) Hoag KA, et al. : Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells. *J Nutr* **132** : 3736–3739, 2002.
- 25) Kang BY, et al. : Retinoid-mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4 (+) T cells. *Br J Pharmacol* **130** : 581–586, 2000.
- 26) Iwata M, Eshima Y, Kagechika H. : Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol* **15** : 1017–1025, 2003.
- 27) Du X, et al. : An essential role for Rxra in the development of Th2 responses. *Eur J Immunol* **35** : 3414–3423, 2005.
- 28) Wang T, et al. : The effect of Am-80, one of retinoids derivatives on experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Life Sci* **67** : 1869–1879, 2000.
- 29) Massaccesi L, et al. : Immunosuppressive activity of 13-cis-retinoic acid and prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Clin Invest* **88** : 1331–1337, 1991.
- 30) Lovett-Racke AE, Racke MK. : Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol* **215** : 54–60, 2002.
- 31) Ghoreschi K, et al. : Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nature Med* **9** : 40–46, 2003.
- 32) Seino K, et al. : Prevention of acute and chronic allograft rejection by a novel retinoic acid receptor-alpha-selective agonist. *Int Immunol* **16** : 665–673, 2004.
- 33) Nozaki Y, et al. : The beneficial effects of treatment with all-trans-retinoic acid plus corticosteroid on autoimmune nephritis in NZB/WF mice. *Clin Exp Immunol* **139** : 74–83, 2005.
- 34) Kinoshita K, et al. : Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J Immunol* **170** : 5793–5798, 2003.
- 35) Perez de Lema G, et al. : Retinoic acid treatment protects MRL/lpr lupus mice from the development of glomerular disease. *Kidney Int* **66** : 1018–1028, 2004.
- 36) Yamauchi T, et al. : Effect of E6060, a novel subtype-selective retinoid, on lupus-like nephritis in female (NZBxNZW)F1 mice. *J Pharmacol Exp Ther* **312** : 938–944, 2005.
- 37) Brinkerhoff CE, et al. : Inhibition by retinoic acid of collagenase production by rheumatoid synovial cells. *N Eng J Med* **303** : 432–435, 1980.
- 38) Nicolson R, et al. : Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP-1 binding site. *EMBO J* **9** : 4443–4454, 1990.
- 39) Brinkerhoff CE, Coffey JW, Sullivan AC. : 13-cis-retinoic acid decreases inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis. *Science* **221** : 756–758, 1983.
- 40) Trentham DE, Brinkerhoff CE. : Augmentation of collagen arthritis by synthetic analogues of retinoic acid. *J Immunol* **129** : 2668–2672, 1982.
- 41) Bird HA, et al. : A clinical and biochemical evaluation of etretinate in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **8** : 55–59, 1988.

- 42) Gravalles EM, et al. : N-[4-hydroxyphenyl] retinamide in rheumatoid arthritis : a pilot study. *Arthritis Rheum* **39** : 1021-1026, 1996.
- 43) Kuwabara K, Shudo K, Hori Y. : Novel synthetic retinoic acid inhibits rat collagen arthritis and differentially affects serum immunoglobulin subclass levels. *FEBS Lett* **378** : 153-156, 1996.
- 44) Nagai H, et al. : Effect of Am-80, a synthetic derivative of retinoid, on experimental Arthritis in Mice. *Pharmacology* **58** : 101-112, 1999.
- 45) Beehler BC, et al. : Inhibition of disease progression by a novel retinoid antagonist in animal models of arthritis. *J Rheumatol* **30** : 355-363, 2003.
- 46) Brinckerhoff CE, Sporn MB. : Retinoids and rexinoids for the 21st century : a brave new world for arthritis. *J Rheumatol* **30** : 211-213, 2003.
- 47) Nishimoto N, Kishimoto T. : Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* **4** : 386-391, 2004.
- 48) Alonzi T, et al. : Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* **187** : 461-468, 1998.
- 49) Nishimoto N, et al. : Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody : a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **50** : 1761-1769, 2004.
- 50) Zitnik RJ, et al. : Retinoic acid inhibition of IL-1-induced IL-6 production by human lung fibroblasts. *J Immunol* **152** : 1419-1427, 1994.
- 51) Ogata A, et al. : Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on the growth of freshly isolated myeloma cells via interference with interleukin-6 signal transduction. *Blood* **84** : 3040-3046, 1994.
- 52) Kagechika H, et al. : Inhibition of IL-1-induced IL-6 production by synthetic retinoids. *Biochem Biophys Res Commun* **231** : 243-248, 1997.
- 53) Nagpal S, et al. : Retinoid antagonism of NF-IL6 : insight into the mechanism of antiproliferative effects of retinoids in Kaposi's sarcoma. *Mol Cell Biol* **17** : 4159-4168, 1997.
- 54) Sidell N, et al. : Retinoic acid-induced growth inhibition of a human myeloma cell line via down-regulation of IL-6 receptors. *J Immunol* **146** : 3809-3814, 1991.
- 55) Shanahan F. : Crohn's disease. *Lancet* **359** : 62-69, 2002.
- 56) Monteleone I, et al. : Immunoregulation in the gut : success and failures in human disease. *Gut* **50** (Suppl 3) : iii60-64, 2002.
- 57) Macdonald TT, Monteleone G. : Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307** : 1920-1925, 2005.
- 58) Maloy KJ, Powrie F. : Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* **2** : 816-822, 2001.
- 59) Glick AB, et al. : Retinoic acid induces transforming growth factor-beta 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regul* **1** : 87-97, 1989.
- 60) Han GR, et al. : All-trans-retinoic acid increases transforming growth factor-beta2 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression through a retinoic acid receptor-alpha-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* **272** : 13711-13716, 1997.
- 61) Glick AB, et al. : Complex regulation of TGF beta expression by retinoic acid in the vitamin A-deficient rat. *Development* **111** : 1081-1086, 1991.
- 62) Plateroti M, et al. : Mesenchyme-mediated effects of retinoic acid during rat intestinal development. *J Cell Sci* **110** : 1227-1238, 1997.
- 63) Niederreither K, et al. : Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev* **110** : 165-171, 2002.
- 64) Iwata M, et al. : Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21** : 527-538, 2004.
- 65) Monteleone G, et al. : Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **108** : 601-609, 2001.
- 66) Main AN, et al. : Vitamin A deficiency in Crohn's disease. *Gut* **24** : 1169-1175, 1983.
- 67) Dvorak AM. : Vitamin A in Crohn's disease. *Lancet* **1** (8181) : 1303-1304, 1980.
- 68) Wright JP, et al. : Vitamin A therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **88** : 512-514, 1985.
- 69) Gold MH, Roenigk HH Jr., Vanagunas A. : The retinoids and inflammatory bowel disease. *Arch Dermatol* **124** : 325-326, 1988.
- 70) Godfrey KM, James MP. : Treatment of severe acne with isotretinoin in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Dermatol* **123** : 653-

- 655, 1990.
- 71) Harewood G, Markovic S. : Treatment of acute myeloid leukemia M3 in a patient with Crohn's disease. *Cancer Invest* **18** : 98, 2000.
- 72) Lovato P, et al. : Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* **278** : 16777–16781, 2003.
- 73) Mudter J, et al. : Activation Pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **100** : 64–72, 2005.
- 74) Musso A, et al. : Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway-An essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* **11** : 91–98, 2005.
- 75) Akira S. : Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* **19** : 2607–2611, 2000.
- 76) Liu PT, et al. : All-trans retinoic acid down-regulates TLR2 expression and function. *J Immunol* **174** : 2467–2470, 2005.
- 77) Kim J, et al. : Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* **169** : 1535–1541, 2002.
- 78) Hugot JP, et al. : Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411** : 599–603, 2001.
- 79) Ogura Y, et al. : A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411** : 603–606, 2001.
- 80) Watanabe T, et al. : NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunol* **5** : 800–808, 2004.