

## TLR シグナルと歯周病

松口 徹也

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科発生発達成育学講座口腔分子生物学分野

### Toll-like receptor signals and periodontitis

Tetsuya Matsuguchi

Department of Biochemistry and Molecular Dentistry, Division of Developmental Medicine,  
Course of Health Research, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan

#### Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are a family of mammalian proteins homologous to *Drosophila* Toll, which was first identified as a protein controlling dorso-ventral pattern formation in the early development. TLR structure is characterized by proline-rich repeats (PRRs) in the extracellular domain and Toll/IL-1 receptor (TIR) motif in the cytoplasmic domain. Each TLR is essential for the recognition of specific pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Among TLRs, TLR4 is essential for LPS responsiveness, and TLR2 is a receptor for bacterial lipoproteins and peptidoglycan. Although TLRs share many downstream signaling molecules, various reports have also suggested differences among the biological responses induced by TLRs. We have recently found that JNK-interacting protein (JIP) 3, a scaffold protein of JNK and its upstream kinases, associates with TLR4 and enhances LPS-mediated JNK activation. As TLR signals (such as JNK activation) induce significant amounts of inflammatory mediators from various cell types, they need to be tightly controlled. We have recently cloned a novel MAP kinase phosphatase, MKP-M, and found that it is specifically essential in the downregulation of JNK activity induced by LPS. LPS has been identified as an important pathogenic factor of periodontitis. We found that osteoblasts express both TLR2 and TLR4 mRNAs and directly respond to LPS by increasing RANKL protein expression. Mice with disrupted RANKL gene completely lack osteoclasts and exhibit severe osteopetrosis and a defect in tooth eruption, suggesting that RANKL is essential for osteoclastogenesis. Thus, LPS may promote periodontitis by directly inducing RANKL expression via TLRs in osteoblasts.

**Key words:** TLR, periodontitis, JIP3, LPS, RANKL

## I. はじめに

都会にお住まいの方なら、スモッグと喧噪に汚れた生活に疲れて、少し離れた山里に「きれいな空気」を吸いに足をのびされた経験はおそらく誰にでもあるだろう。しかし感染免疫学の立場から言えば、山里の空気も都会同様に汚い。もし人間の目が顕微鏡のように精密で、ウイルスや細菌を見つけられるなら、とても山里の空気を深く吸い込もうなどという気分にはなれないだろう。本当の「きれいな空気」を吸いたければ、実は手術室かクリーンベンチの前に行った方が随分ましである。最初から夢のない話で申し訳ないが、それほど我々の周囲は微生物にあふれているのである。

免疫とは「疫を免れる」との名のごとく、多細胞生物（ホスト）と周りの病原体とのせめぎ合いから生まれてきたものである。哺乳類のような多細胞生物では体に存在する多数の細胞（人間の成人で約60兆個）を栄養するために体液環境を整え、生体の恒常性（ホメオスタシス）を保とうとする。しかし都合の悪いことに、体内の細胞にとって良い環境は、外界にあふれる微生物の生存にとっても理想的な環境なのである。そのため外界の微生物はわずかな隙をついてホストの中に侵入しようとする。さらに微生物のなかには、進化の過程で、多細胞生物に侵入するための様々な特別な“装置”を身につけたものも多い。

よって、侵入しようとする微生物の存在を認識し排除する機構は昆虫や植物もふくめたあらゆる多細胞生物にとって必須であり、この基本的な排除機構を自然免疫（innate immunity）と呼んでいる。これはより高等な生物（脊椎動物）にのみ存在する獲得免疫（acquired immunity）とは異なり、リンパ球のクローン増殖のステップを含まないため、急な病原体の侵入にも素早く対応することができ（図1）、生体防御の最前線を担う重要な役割を果たしている。また、自然免疫

	Innate Immunity 自然免疫	Acquired Immunity 獲得免疫
反応の速さ	速い (hours)	遅い (days-weeks)
特異性	低い	高い
免疫学的メモリ	なし	あり
系統進化	古い	新しい (脊椎動物以降)
担当細胞	マクロファージ 好中球 NK細胞 樹状細胞 など	T細胞 B細胞

図1 2つの免疫系 —自然免疫と獲得免疫—

を担う貪食細胞の一部（樹状細胞、マクロファージなど）は、貪食した病原体を抗原としてリンパ球に提示することでその後の獲得免疫を誘起することができる。つまり、実はこれらの2つの免疫機構は密接に繋がっているわけである。

図1に示すように、自然免疫は獲得免疫に対して特異性が低いとされている。確かに獲得免疫を担うリンパ球に見られる遺伝子再構成を伴うようなエレガントな抗原認識機構（T細胞：T細胞レセプター、B細胞：抗体）は自然免疫には存在しない。しかし、もし自然免疫に自己と非自己（病原体）を区別する機構が備わっていないとすれば、好中球やマクロファージが自己の細胞に対して無差別に攻撃を始めることになり、ホストの体の中はあつという間に大変な事態となる。だから自然免疫にもちゃんと自己と非自己を見分けるだけの特異性が備わっているはずである。最近の Toll-like receptors (TLRs) とよばれる蛋白ファミリーの発見は自然免疫における特異性をうまく説明し、今まで現象論でとどまっていた自然免疫と病原体の関わりを分子レベルで説明することを容易にした。以下これについて概説したい。

## II. TLR について

### A. PAMPs と PRRs

自然免疫の担当細胞が認識しうる病原体の分子構造を PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), PAMPs を認識する自然免疫細胞側の受容体を PRRs (pattern recognition receptors) と呼ぶことが提唱されている。最近 PRR の代表として新たに注目されている一群の蛋白群が Toll-like Receptor (TLR) である。TLR の原型はショウジョウバエで発見された Toll と呼ばれる蛋白であり、また、Toll に似た蛋白は植物でも見ついている。これらの事実は、Toll 様蛋白による自然免疫能が、あらゆる生物の生存に必須であることを如実に物語っている。

現在のところ、哺乳類では、TLR 1 から10までの10種類が報告されている。Toll ファミリーの蛋白は特徴的な構造を有し、その細胞外ドメインはロイシンに富む繰り返し構造 (leucine-rich repeat: LRR) を持つ。LRR は22-28アミノ酸からなる比較的短いモチーフであり、βシート構造をとって蛋白質同士の結合に関与すると考えられる。TLR が PRR として働くことを考えると理にかなっているといえる。実に様々な PAMPs がそれぞれの TLR に認識されることが報告されている（図2）。実際に TLR の多型性がヒトの易感

染性に関係する例がいくつかあげられており、たとえば TLR 4 の機能欠陥型突然変異とされる Asp299Gly の変異を持ったヒトは統計的にグラム陰性菌感染による敗血症になり易いと報告されている<sup>11)</sup>。面白いことにいくつかの Heat shock proteins (HSPs) やリポ蛋白など一部の内在性物質も TLR によって認識されることが次々と報告されている (図 2) が、これについての生物学的意義の詳細はまだはっきりしていない。

## B. LPS レセプターの TLR 4, マルチプレーヤーの TLR 2

良く知られた PAMP である LPS はグラム陰性菌の細胞壁を構成する糖脂質であり、その生物活性の殆どは lipid A といわれる脂質部分が受け持つ。LPS が多

量に存在すると、過剰な免疫反応によるエンドトキシンショックを惹起することから、臨床的にも極めて重要である。LPS は血中の LBP (LPS binding protein) と結合し、この LPS/LBP 複合体が貪食細胞などの細胞膜上に存在する CD14 によって認識されるが、CD14 は細胞内ドメインを持たず、LPS の強力な生物活性は TLR 4 によって伝達される。

一方、TLR 2 はペプチドグリカン、細菌性リポ蛋白、グラム陽性菌に認められるリポタイコ酸 (LTA)、マイコバクテリアに見られるリポアラビノマンナン (LAM)、酵母の成分である zymosan などに反応すると報告された。一つのレセプターが全く構造の異なる多種の細菌成分に反応する理由は不明であったが、Aderem ら

	bacterial	fungal	viral	endogenous	others
TLR1 (+TLR2)	OspA (Borrelia) Lipoprotein (mycobacterial)				
TLR2	Lipoprotein LTA LPS (cylindrical) Group B streptococcus secreted factor Fimbriae (P. gingivalis) Yersinia V-antigen OmpA (K. pneumoniae) Lipoarabinomannan (LAM) PIM	Aspergillus	HCV core lipopeptides Measles virus H protein	GP96 Hsp70 Necrotic cells	Schistosome (phosphatidylserine)
TLR3			dsRNA		
TLR4	LPS (conical) Fimbriae Poly-M (P. aeruginosa) Chlamydial hsp60 Pneumolysin (S. pneumoniae)	mannan (Cryptococcus, Candida, yeast)	RSV MMTV HCV core lipopeptides	Fibronectin Fibrinogen heparan Hsp60 Hsp70 Saturated fatty acid Surfactant protein-A GP96 Hyaluronan $\beta$ -defensin 2	Taxol Safflower polysaccharides
TLR5	flagellin				
TLR6 (+TLR2)	MALP-2 Peptidoglycan Soluble tuberculosis factor Phenol-soluble modulin (S. aureus)	zymosan			
TLR7					imidazoquinoline
TLR8					Imidazoquinoline (human only)
TLR9	CpG DNA			Chromatin-IgG complex	

図 2 TLR は各種の分子構造を認識する。

各 TLR によって認識されることが報告されている分子を列記した。すべてを網羅しているわけではないので留意。Hsp70 に関しては TLR への反応は混在する LPS によるとの最近の報告もある。

は、TLR 2がTLR 6とヘテロダイマーを形成してペプチドグリカンや zymosan に反応するらしいことを見いだした<sup>2)</sup>。一方、リポ蛋白のTLR 2による認識にはその種類 (triacylated あるいは diacylated) によってTLR 1もしくはTLR 6との共同による<sup>3)</sup>。また、TLR 2はある種の (レプトスピラや歯周病の原因菌である *P. gingivalis*) のLPSのレセプターとしても働くらしい。

### C. TLR メンバーの遺伝子発現様式の差

生体内でのTLRの役割を考える場合、各TLRの発現レベルとその分布の検討は極めて重要である。我々は、マクロファージにおけるマウスTLR 2および4の遺伝子発現の違いを報告した<sup>4)</sup>。TLR 2は無刺激状態の細胞では弱くしか発現していないが、LPS, Lipid A, および各種炎症性サイトカインによる刺激でそのmRNA発現量は著明に増加した。一方、TLR 4は常時発現しており、上述の各種刺激によってもその発現は変化しなかった。このことより、例えば細菌感染時に、TLR 4は初期より働くが、TLR 2はその発現が誘

導されて強く効果をあらわす二段式のモデルが考えられる (図3A)。同様に他のTLRメンバーについてもその発現調節を調べたところ、構成的に発現されているグループ (TLR 4, 6) と、LPSなどの刺激で誘導されてくるグループ (TLR 2, 3, 5) に2分されることが分かった (未発表データ)。さらにTLR 2の遺伝子発現誘導のメカニズム解明のため、マウスTLR 2遺伝子を単離しその5'調節領域を調べたところ、2つのNF- $\kappa$ B結合部位と、CREB, C/EBP, STATの認識部位が存在し、それぞれが各刺激物質に対する反応性を規定していた<sup>5)</sup>。これは別に報告されたTLR 4遺伝子の5'調節領域の構造と大きく異なっており、それぞれの遺伝子発現様式の違いを説明するものであった (図3B)。

## III. 各細胞種におけるTLRの役割

### A. 上皮細胞とTLR

自然免疫の細胞というと貪食細胞が代表にあげられるが、実は自然免疫の最前線にいるのは上皮細胞である。外界からの病原体の侵入は普通、上皮のバリアに

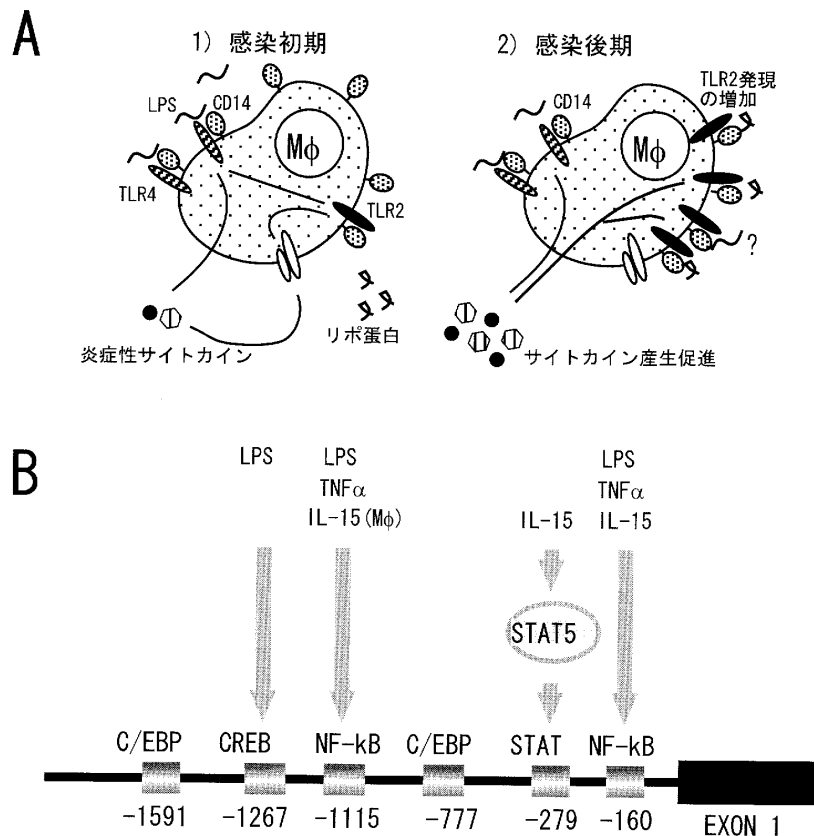


図3 TLR2遺伝子の発現誘導

よってブロックされる。厚い角化層に覆われた健全な皮膚を突破するのは困難なため、殆どの感染病原菌は口腔、気道、消化管、あるいは尿路の粘膜上皮を突破してくることになるが、粘膜上皮をとりまく環境は決して同じではない。例えば腸管上皮細胞 (intestinal epithelial cells: IECs) は外来病原菌の侵入門戸として重要であるが、同時にホストに様々な利益を与えてくれる常在腸管細菌の共生を許しておく必要がある。一方腎臓尿管上皮は尿を介して外界と接していることになるが、腸管上皮と異なって基本的に周囲は無菌環境下にある。逆にいうと上皮細胞に触れる極少量の細菌の存在も体にとっての異常事態であり、細菌感染を厳しく取り締まるためにそのアンテナの感度を上げておくことが可能になる。

実際に IEC にも TLR (TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6) は発現されているが、TLR 2, TLR 4 の発現レベルはかなり低く、それぞれのリガンドに対する反応性は極めて悪い<sup>6)</sup>。腸管の常在菌叢には TLR 2, TLR 4 を強く反応させるものがあるので、これは極めて合目的的といえる。実際に代表的な常在菌である乳酸菌の壁成分にふくまれる LTA には TLR 2 を強く刺激する作用があり、TLR 2 を強く発現するマクロファージなどからは多量のサイトカインを誘導する<sup>7)</sup>。また、鞭毛の主成分である fragellin を認識する TLR 5 蛋白の腸管上皮細胞における細胞内発現分布は、管腔面には殆ど認められず基底面、細胞側面に集中している<sup>8)</sup>。これは腸管腔に存在する細菌は認識せず、上皮層を侵入してきた細菌のみを認識するための巧妙なメカニズムと言えよう。面白いことに潰瘍性大腸炎や Crohn 病では TLR 4 の発現が上昇することが知られており<sup>9)</sup>、これらの炎症性腸疾患では常在菌叢が病勢に関係することを考えると興味深い。歯科領域で言えば、腸管と同様に歯肉上皮細胞における TLR の発現レベルも顕著ではない。しかし歯肉上皮細胞は IFN $\gamma$  に反応して TLR 2 および TLR 4 を強く発現するようになるとの報告があり<sup>9)</sup>、局所の炎症時には細菌成分に対してよく反応するようになることも考えられる。

一方、尿路を逆行性に上昇してきた細菌に腎臓で直接応対するのは腎尿管上皮細胞 (renal tubular epithelial cells: TECs) である。IECs と異なり、TECs は構造的に比較的多量の TLR 1, 2, 3, 4, 6 を発現している<sup>10)</sup>。特に TLR 2, 3, 4 の発現量は同時に検討したマクロファージと十分比肩しうるものである。これは前述のように TECs が普段は無菌環境下であり、わずかな細菌量に反応する鋭敏さをもつことができること

と関連があると考えられ興味深い。このように生体の上皮細胞はそれぞれを取り巻く環境によって TLR の発現量 (あるいはパターン) を変化させることでそれぞれの細菌感染に対する感度を調節していることが考えられる。

## B. マクロファージと TLR

単球・マクロファージは報告された全ての TLRs を発現し (TLR 3, TLR10 の発現レベルはかなり低い)<sup>11)</sup>、TLR 2 や TLR 4 の補助因子として働く CD14 も細胞表面に高レベルに発現する。上皮を通り抜けてきた病原細菌に対して各組織で主に立ち向かうものがマクロファージであることを考えると当然ともいえる。TLR からのシグナルを受けたマクロファージは細胞性免疫に重要な CD80 などの補助刺激分子と TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 などのサイトカインを産生し<sup>12)</sup>、T 細胞や好中球をからめた炎症反応を誘起する。また NO 産生などによって、結核菌などの細胞内寄生細菌に対する殺菌能が高まる<sup>13)</sup>。

## C. マスト細胞と TLR

喘息などの即時型アレルギーにおける悪役としての役割ばかりが強調されるマスト細胞であるが、実は末梢組織に存在し、感染局所でマクロファージとならんで感染防御に重要な役割を果たしている<sup>14)</sup>。我々を含めたいくつもの研究室で、マウス骨髄由来マスト細胞における TLR の発現が解析され<sup>15, 16)</sup>、TLR 2, 4, 6, 8 の遺伝子の発現が確認されたが、TLR 5 の発現は認められなかった。興味深いことに、マスト細胞の LPS 刺激により IL-5, 10, 13 といった Th2 サイトカインの産生、分泌が起こる。また、TLR 2 の活性化はマスト細胞からの脱顆粒をも惹起する<sup>17)</sup>。これらのことはマスト細胞が直接 PAMP を認識して各種のサイトカイン産生および脱顆粒によって病原体のクリアランスに関与することを示し、細菌やウイルス感染が喘息の経過に影響するという古くから知られた現象<sup>18)</sup>と関連するものかもしれない。

## D. 樹状細胞と TLR

末梢組織で外来病原体の抗原を取り込んだ未熟樹状細胞 (DC) は TLR からのシグナルを受けると成熟分化し、MHC クラス II, CD80, CD86, CD40 の発現が増加し抗原提示能、リンパ球刺激活性が増強する。同時に単球由来の DC (myeloid DC) では IL-12, リンパ系由来の DC (pDC = plasmacytoid DC) では IL-12/

IFN $\alpha$ の産生量が上昇する<sup>19)</sup>。さらにケモカインレセプターの発現変化により2次リンパ組織に移動したDCは、そこで抗原特異的なT細胞の増殖・分化を促し、病原体に対する強力な獲得免疫機構が発動される。DCから抗原提示を受けたヘルパーT細胞(Th)は主に産生するサイトカインの異なるTh1(IFN $\gamma$ )またはTh2(IL-4)タイプの細胞に分化し、それぞれの病原体にとっての最適な免疫機構が誘導される仕組みになっている。面白いことにDCにおけるTLRの発現パターンはDCのタイプ別に異なることが報告されており、myeloid DCではTLR1, 2, 4, 5, 7, 8, 9といった各種がよく発現されているのに対し、pDCではTLR7, 9はよく発現されているが、TLR2, 4などの発現レベルはとてども低い。Myeloid DCおよびpDCがそれぞれTh1あるいはTh2を選択的に規定するという報告もあるが、最近の論文では、どちらのDCも少ない抗原量ではTh2, 多い抗原量ではTh1優位の

分化を誘導することが示されている<sup>20)</sup>。

#### IV. 歯周病とTLR

##### A. 歯周病の原因としての細菌感染

口腔内には常時400種類以上もの細菌が生息していることが知られている。前述のように歯肉上皮細胞は反応性にTLR2やTLR4を発現する。また、歯肉線維芽細胞は比較的高いレベルのTLR4を発現しており、これらの細胞が局所からの細菌の侵入に対する防御壁となっていることが想定される。さて、LPSは破骨細胞による骨吸収を増加することが知られ、細菌感染による歯周病の誘導に深く関与していると考えられている<sup>21)</sup>。LPSによる骨吸収誘導の詳細なメカニズムについては不明な点が多いが、以前より、骨芽細胞(osteoblast)はLPS反応性にIL-1, IL-6, GM-CSF, PGE<sub>2</sub>, NOなどを分泌することが報告されており<sup>22)</sup>、歯肉組織に存在するマクロファージや線維芽細胞など

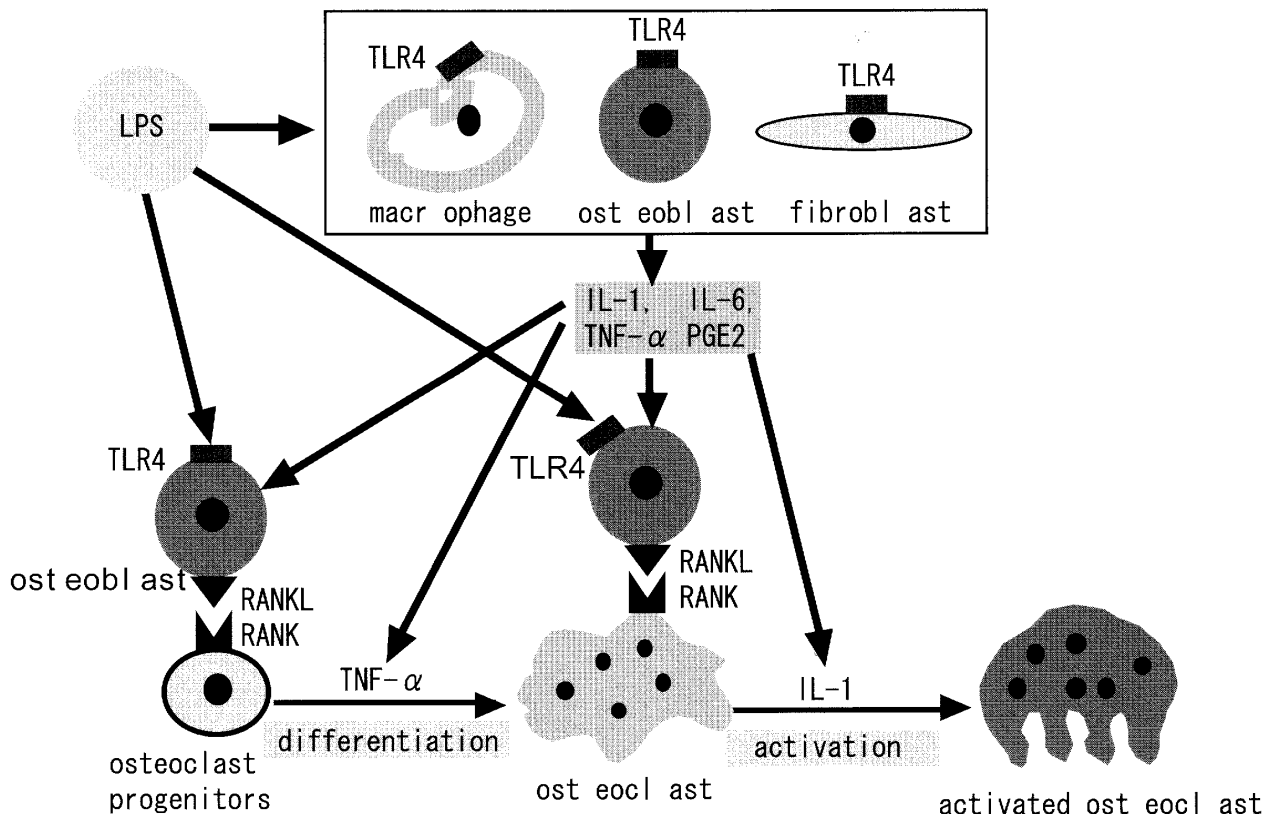


図4 RANKL産生におけるLPSシグナル伝達経路

LPSは骨芽細胞表面のTLR4によって(多くの場合CD14と共同して)認識され、ERK, PKCを介してシグナル伝達しRANKL産生を誘導する。また、TLR4より恒常的発現の弱いTLR2はLPSにより産生が誘導される。リポ蛋白等のレセプターであるTLR2の発現の誘導により、生体防御反応の強化につながると考えられる。

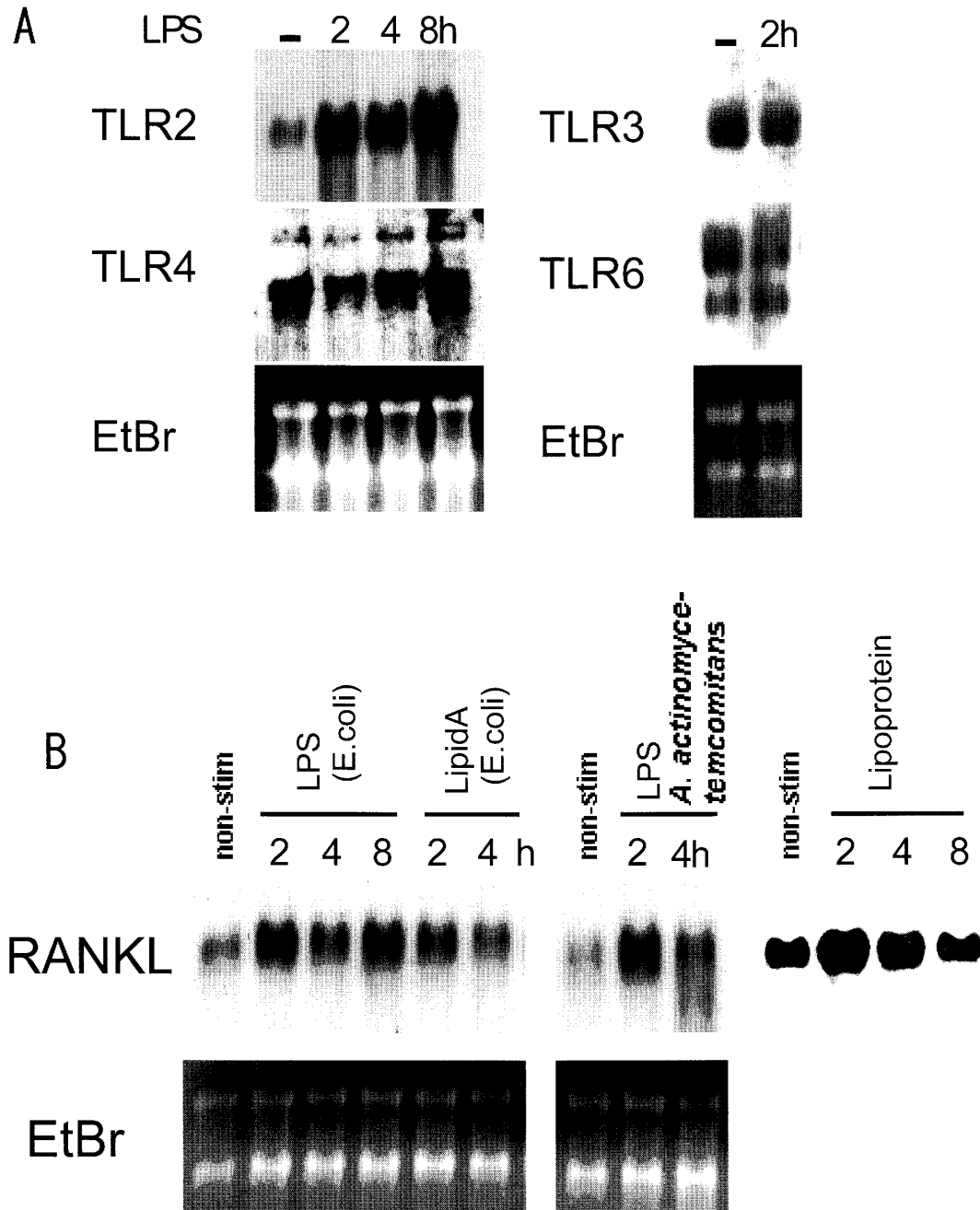


図5 骨芽細胞における TLR の役割

- A. マウス骨芽細胞における TLRs の遺伝子発現：マウス骨芽細胞を LPS で刺激し，各種 TLR の遺伝子発現をノーザンブロッティングで解析した。TLR2, 3, 4, 6 mRNA は骨芽細胞に構成的に発現しており，TLR2 mRNA は LPS による刺激で著明に増加した。一方，LPS のレセプターである TLR4 の遺伝子発現に著変は認められなかった。
- B. マウス骨芽細胞における RANKL の遺伝子発現調節：マウス頭頂骨より分離した骨芽細胞を LPS 及び合成 lipid A，合成 lipoprotein で刺激し，RANKL 遺伝子発現をノーザンブロッティングで解析した。RANKL の mRNA は各種因子の刺激により 2 時間以内に著明に増加した。

とともに、LPS の直接のターゲットとなりうることが考えられた (図4)。

## B. RANKL による破骨細胞分化誘導

RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) は、ストローマ細胞、骨芽細胞や T 細胞などから産生される TNF ファミリーに属するサイトカインで、破骨細胞前駆細胞に発現するレセプターである RANK を介して、破骨細胞の分化、活性化に重要な役割を担っている<sup>23)</sup>。骨芽細胞、ストローマ細胞が産生する RANKL は膜結合タンパクであるが、T 細胞からは分泌型の RANKL が産生される<sup>24)</sup>。RANKL 遺伝子を欠損したマウスは破骨細胞が見られず、大理石骨病を発症することから、RANKL は破骨細胞の分化に必須である<sup>24)</sup>。骨芽細胞や線維芽細胞はまた、恒常的に相当量の osteoprotegerin (OPG) を分泌している。OPG は可溶性で RANKL に対するおとり受容体として働きその活性を消失させる。このように二つの相反する機能的因子により破骨細胞の分化、活性化はコントロールされている。骨芽細胞は IL-1, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 等に反応して RANKL を発現し、炎症局所において破骨細胞の増加に関与していると考えられる。LPS はマクロファージ等からのこれらのサイトカインの分泌を刺激することで間接的に破骨細胞の分化と活性化をもたらしうる (図4)。一方、我々は、LPS が直接骨芽細胞での RANKL 発現を誘導する可能性について検討した。

## C. TLR を介した骨芽細胞からの RANKL 発現誘導

マウス頭頂骨より分離した骨芽細胞は高レベルの TLR 4 と低レベルの TLR 2 mRNA を構成的に発現していた (図5A)<sup>25)</sup>。また、TLR 3 と TLR 6 遺伝子も構成的に発現していた。さらに興味深いことに TLR 2 は LPS の刺激により発現が増強した。骨芽細胞が LPS のレセプターである TLR 4 を発現していることが明らかになったため、LPS、および合成 lipid A (LPS の活性中心) 投与による RANKL 発現の変化を調べたところ、図5Bに見られるように RANKL 遺伝子の発現は2時間以内に著明に増加した<sup>25)</sup>。同様に蛋白レベルにおいても RANKL の発現は LPS 刺激4時間以内に増加した。また、若年性歯周炎の原因菌と考えられている *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の LPS 刺激においても同様の結果を得た。一方、OPG の遺伝子発現は LPS 刺激後も変化を認めなかった。さらに、LPS による RANKL 遺伝子発現誘導は蛋白合成阻害剤である cycloheximide によりむしろ増強され、

この現象が二次的なものでなく、LPS の直接作用によるものであることが示された。加えて、TNFI 型受容体に対する中和抗体、プロスタグランジン合成阻害剤である NS-398 の添加も lipid A による RANKL 産生に影響を及ぼさなかった。以上の知見より LPS は骨芽細胞に作用し直接 RANKL 遺伝子の発現を増加させることが明らかとなった。

同様の実験を、TLR 4 に遺伝的欠陥を持つ C3H/HeJ マウス由来の骨芽細胞を用いて行ったところ、RANKL 遺伝子の発現誘導は認められず、また、LPS による RANKL 誘導は TLR 4 に対する中和抗体の前投与により抑制されたことから、LPS による骨芽細胞からの RANKL 誘導に TLR 4 が必須であることが示唆された。また、骨芽細胞は TLR 2 リガンドである lipoprotein にも反応して RANKL 遺伝子の発現を増加させた (図5B)。よって、骨芽細胞からの RANKL 誘導は LPS 特異的なものではなく、広い範囲の TLR リガンドにも認められる可能性がある。

## D. 骨芽細胞からの RANKL 誘導のシグナル伝達

TLR からのシグナルは、転写因子の NF- $\kappa$ B やいくつかの MAP キナーゼを活性化することが知られている。LPS による RANKL 誘導に重要なシグナル伝達分子を決定するため、我々は各種の特異的インヒビターを用いた実験を行い、extracellular signal-regulated kinase (ERK) と protein kinase C (PKC) の pathway が LPS 刺激による骨芽細胞における RANKL 遺伝子の発現増加に関与していることを明らかにした<sup>25)</sup>。これらの分子メカニズムは以前報告された T 細胞における T 細胞レセプター (TCR) からのシグナルによる RANKL 遺伝子の活性化機構と異なっていることが興味深い<sup>24)</sup>。面白いことに、マウス RANKL のプロモーター領域には inverted CAAT-boxes と Cbfa 1 の結合部位がある<sup>26)</sup>。CAAT/enhancer binding protein (C/EBP) と Cbfa 1 の両転写因子はそれぞれ ERK により活性化されることが知られ<sup>27)</sup>、また PKC による ERK の活性化は成長ホルモンによる C/EBP の活性化に必須であることが報告されている<sup>28)</sup>。これらの所見は我々の結果を裏付けるものである。また我々は最近、骨芽細胞での LPS による ERK の活性化に、その上流の Cot/Tpl 2 キナーゼが重要であることを、KO マウスを使った解析で明らかにした<sup>29)</sup>。

## V. TLR のシグナル伝達

TLR 各メンバーの細胞内領域には TIR (Toll/IL-1



receptor) という共通ドメインがあり、活性化されると共通の下流シグナルを誘導する。一方、各 TLR で特異的に活性化されるシグナル分子の存在もいくつか報告されており、TLR のシグナル伝達機構は当初思われていたような単純なものでない。ここではおもに LPS/TLR 4 のシグナル伝達について述べたい。

### A. NF- $\kappa$ B 活性化機構

LPS 刺激によって誘導される遺伝子のプロモーター領域の多くの中には NF- $\kappa$ B 結合配列および AP-1

結合配列が認められる。LPS 刺激を受けた TLR 4 は同じ TIR ドメイン同士の会合を介してアダプター蛋白である MyD88 と結合する。MyD88 は TIR と共に Death domain (DD) を有しており、同じく DD を持ったセリンスレオニンキナーゼである IRAK1 および IRAK 4 と結合することでその活性化を促す。また、MyD88 以外にも TIRAP や TRIF といったアダプター分子も関与することが知られている。こうして活性化された IRAKs は TRAF6-TAB2-TAK1 の複合体形成を促すことで TAK 1 の活性化を誘導する。TAK 1 は下

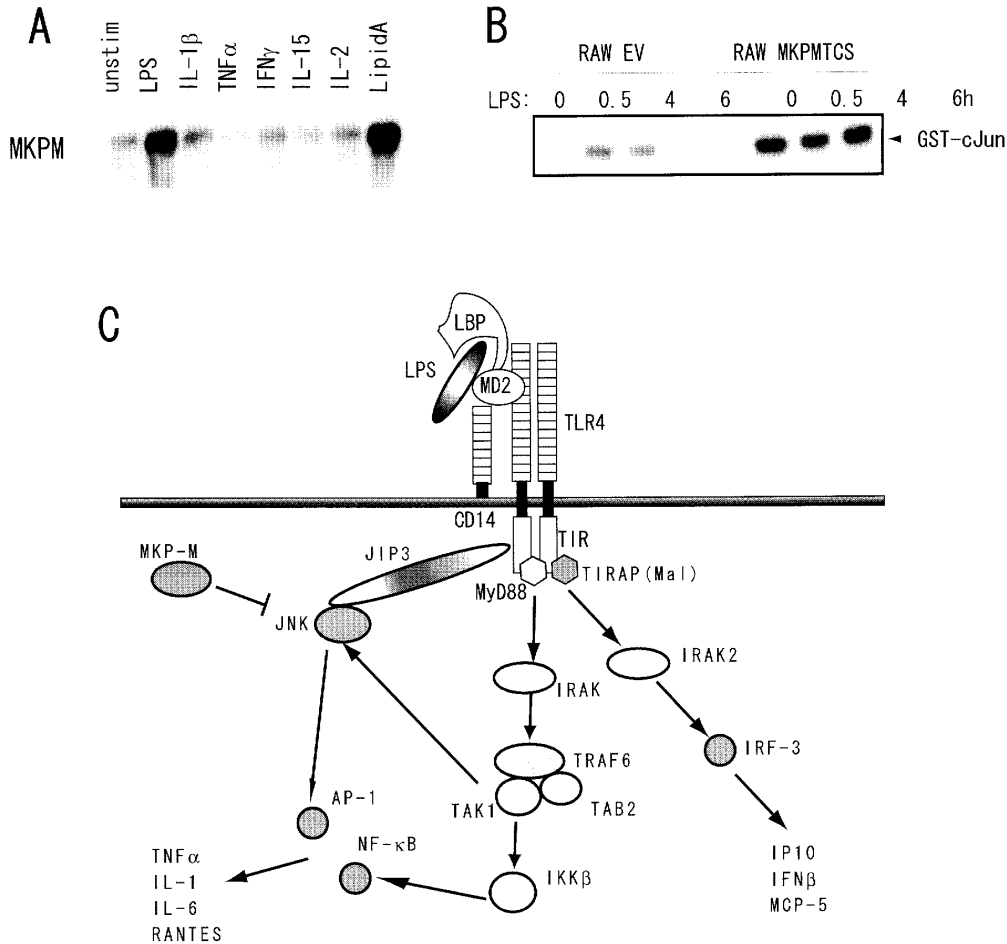


図6 TLR4シグナル伝達機構

- A. マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 をサイトカイン、LPS、lipid A で 2 時間刺激し、ノーザンブロッティングにて MKP-M の mRNA の発現量を比較した。MKP-M mRNA は LPS および lipid A で強く誘導された。
- B. MKPMTCS (フォスファターゼ不活性型) を発現させた RAW264.7 細胞とベクターのみを導入した細胞をそれぞれ LPS で刺激し、JNK 活性の経時変化を GST-cJun を基質に用いたキナーゼアッセイで示した。
- C. LPS 刺激時の TLR4 の下流シグナル伝達の模式図。詳細は本文を参照。

流の NIK を介して (NIK の生理的意義付けに関しては異説もあるが) I $\kappa$ B のキナーゼである IKKB を活性化して最終的に NF- $\kappa$ B の核移行とそのターゲット遺伝子の転写が誘導される<sup>30)</sup>。

## B. MAP キナーゼ活性化機構

LPS 等の PAMPs の刺激により 3 種類の MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38) が活性化されることが多くの細胞種で報告されている。JNK は c-Jun のリン酸化による AP-1 の活性化を引き起こすことで LPS 反応性遺伝子発現誘導に特に重要な働きをもつ。LPS による JNK の活性化には TRAF6-TAK1 の経路が重要な役割を果たすことが示されているが、その他の経路も存在することが示唆されている。MAP キナーゼの活性化には一般に MAP キナーゼとその上流の活性化キナーゼを結合することで MAP キナーゼ活性化の場を提供するいわゆる scaffold 蛋白が重要な役割を果たすが、我々は最近 yeast two hybrid スクリーニングより JNK の scaffold 蛋白として知られる JIP3 (JNK interacting protein-3, 別名 JSAP1) が TLR 4 と結合することを見いだした<sup>31)</sup>。この TLR 4-JIP 3 の結合は哺乳細胞内でも恒常的に認められ、JIP 3 の強発現は LPS による JNK 活性化を著しく促進し、JNK 非結合型 (ドミナントネガティブ型) JIP 3 の発現は逆に LPS による JNK 活性化を抑制した。このことは JIP 3 が LPS による JNK 活性化の促進因子として働くことを示唆している (図 6 B)。

## C. フィードバック機構

LPS によって誘導される炎症反応は病原菌の排除には役立つが、過度な反応が長く持続すると周囲の正常組織の破壊を招くことになる。このため、いったん反応が起こるとこれを鎮静化するフィードバック機構が必要である。LPS の場合にはこのフィードバックによって LPS の再投与による反応が著しく弱まる現象が知られており、LPS トレランスと呼ばれるが、その分子機構については定説が得られていない。LPS 刺激後に TLR 4 の表面発現量が低下するとの報告<sup>32)</sup>があり、我々は LPS 刺激後にマウス TLR4 遺伝子の alternative splicing によって細胞外ドメインの N 端の一部のみからなる可溶性の TLR 4 が誘導され、全長型の TLR 4 からのシグナルを抑制することを報告した<sup>33)</sup>。また最近、単球・マクロファージ特異的でキナーゼ活性をもたない IRAK の一種である IRAK-M が LPS 刺激によって誘導され、これが IRAK1/4 の活性化を競合抑制する

ことが LPS トレランスのメカニズムとして働くことが示された<sup>34)</sup>。このように LPS トレランスはいくつかのフィードバック機構が共同して働いていることによる可能性が強い。

我々は最近マウスマクロファージから新規の MAP キナーゼフォスファターゼ (MKP) をクローニングし、MKP-M (MKP isolated from macrophages) と命名した。MKP-M の mRNA および蛋白発現レベルはマクロファージの LPS 刺激により誘導された (図 6 A)。その基質特異性は 3 種類の MAP キナーゼのうち、特に JNK に強い特異性を認めた。MKP-M のフォスファターゼ不活性型変異体をマクロファージに導入すると、LPS 刺激後の JNK 活性の上昇が著明に延長し (図 6 B)、TNF  $\alpha$  の産生量が著明に増加した。このことは MKP-M が LPS 刺激による JNK 活性化のフィードバック機構の一つとして重要な働きをしていることを示す<sup>35)</sup> (図 6 C)。

## VI. おわりに

TLR は自然免疫における PRP の 1 つとして感染免疫において特に重要な働きをしていることをお話してきた。しかし PRR には TLR の他にもマンノースレセプターやスカベンジャーレセプターなど多種類のものが知られており<sup>36)</sup>、また病原体によって活性化される補体系の働きも感染免疫に極めて重要である。感染防御機構はこれら多数のシステム複雑なインタープレイによって成り立っていることは常に頭に置いておく必要がある。いずれにしても、この小さなレビューが、今後科学研究を志す (もしくはすでに行っている) 研究者の一助になれば幸いである。

## 文 献

- 1) Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L., and Schwartz, D. A.: Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 162, 1028-1032, 2002.
- 2) Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13766-13771., 2000.
- 3) Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S.: Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating

- immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, 169, 10-14, 2002.
- 4) Matsuguchi, T., Musikacharoen, T., Ogawa, T., and Yoshikai, Y.: Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol*, 165, 5767-5772., 2000.
  - 5) Musikacharoen, T., Matsuguchi, T., Kikuchi, T., and Yoshikai, Y.: Nf-kappab and stat5 play important roles in the regulation of mouse toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol*, 166, 4516-4524., 2001.
  - 6) Cario, E. and Podolsky, D. K.: Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 68, 7010-7017, 2000.
  - 7) Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., and Yoshikai, Y.: Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 259-266, 2003.
  - 8) Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L.: Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*, 167, 1882-1885, 2001.
  - 9) Uehara, A., Sugawara, S., and Takada, H.: Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J Med Microbiol*, 51, 626-634, 2002.
  - 10) Tsuboi, N., Yoshikai, Y., Matsuo, S., Kikuchi, T., Iwami, K., Nagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S., and Matsuguchi, T.: Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol*, 169, 2026-2033, 2002.
  - 11) Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G.: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 168, 4531-4537, 2002.
  - 12) Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J., and Modlin, R. L.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285, 732-736, 1999.
  - 13) Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M. T., Engele, M., Sieling, P. A., Barnes, P. F., Rollinghoff, M., Bolcskei, P. L., Wagner, M., Akira, S., Norgard, M. V., Belisle, J. T., Godowski, P. J., Bloom, B. R., and Modlin, R. L.: Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*, 291, 1544-1547., 2001.
  - 14) Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S. N.: Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*, 381, 77-80, 1996.
  - 15) Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H.: Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 167, 2250-2256, 2001.
  - 16) Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K., and Matsuguchi, T.: Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol*, 169, 3801-3810, 2002.
  - 17) Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H.: Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*, 109, 1351-1359, 2002.
  - 18) Gern, J. E.: Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 105, S497-502, 2000.
  - 19) Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J.: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284, 1835-1837, 1999.
  - 20) Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J., and O'Garra, A.: Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*, 197, 101-109, 2003.

- 21) Amano, S., Kawakami, K., Iwahashi, H., Kitano, S., and Hanazawa, S.: Functional role of endogenous CD 14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption. *J Cell Physiol*, 173, 301-309, 1997.
- 22) Nair, S. P., Meghji, S., Wilson, M., Reddi, K., White, P., and Henderson, B.: Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun*, 64, 2371-2380, 1996.
- 23) Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., and Galibert, L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390, 175-179, 1997.
- 24) Kong, Y. Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E. R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., Lacey, D. L., Fish, E., Boyle, W. J., and Penninger, J. M.: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402, 304-309, 1999.
- 25) Kikuchi, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Mitani, A., Tanaka, S., Matsuoka, M., Yamamoto, G., Hishikawa, T., Noguchi, T., and Yoshikai, Y.: Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol*, 166, 3574-3579, 2001.
- 26) Kitazawa, R., Kitazawa, S., and Maeda, S.: Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta*, 1445, 134-141, 1999.
- 27) Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M. D., Guan, K., Karsenty, G., and Franceschi, R. T.: MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*, 275, 4453-4459, 2000.
- 28) Clarkson, R. W., Chen, C. M., Harrison, S., Wells, C., Muscat, G. E., and Waters, M. J.: Early responses of trans-activating factors to growth hormone in preadipocytes: differential regulation of CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and C/EBP delta. *Mol Endocrinol*, 9, 108-120, 1995.
- 29) Kikuchi, T., Yoshikai, Y., Miyoshi, J., Katsuki, M., Musikachoen, T., Mitani, A., Tanaka, S., Noguchi, T., and Matsuguchi, T.: Cot/Tpl 2 is essential for RANKL induction by lipid A in osteoblasts. *J Dent Res*, 82, 546-550, 2003.
- 30) Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K.: The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 398, 252-256, 1999.
- 31) Matsuguchi, T., Masuda, A., Sugimoto, K., Nagai, Y., and Yoshikai, Y.: JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation. *Embo J*, 22, 4455-4464, 2003.
- 32) Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., and Akira, S.: Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol*, 164, 3476-3479, 2000.
- 33) Iwami, K. I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikachoen, T., and Yoshikai, Y.: Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol*, 165, 6682-6686, 2000.
- 34) Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., and Flavell, R. A.: IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110, 191-202, 2002.
- 35) Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Johnson, T. R., Kraft, A. S., and Yoshikai, Y.: A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines. *Mol Cell Biol*, 21, 6999-7009, 2001.
- 36) Gordon, S.: Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111, 927-930, 2002.