

## 総 説

# 免疫系を調節する Toll 様受容体のリガンド認識とシグナル伝達機構 ～その生理学的・病理学的役割

引 頭 毅<sup>1)</sup> 猪 俣 恵<sup>1)</sup> 滝 川 俊 也<sup>2)</sup>

## Regulation of Immunity by Toll-like Receptor Functions: Their Physiological and Pathological Roles

INTO TAKESHI<sup>1)</sup>, INOMATA MEGUMI<sup>1)</sup> and TAKIGAWA TOSHIYA<sup>2)</sup>

免疫系は生体内に存在する異物を感知してそれを排除するシステムであり、自然免疫系と獲得免疫系から成り立っている。自然免疫系は古くから非特異的な応答であると考えられてきたが、この概念を一蹴する引き金となったのは Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) の発見である。TLR は病原体に存在する特有の「分子パターン」と結合し、様々な異物を特異的に感知しうる受容体ファミリーである。多くの微生物の構成成分は生体内で特異的に認識された後、TLR とアダプター分子との会合に依存して細胞内シグナル伝達経路を活性化し、様々な自然免疫応答の調節が行われている。TLR は貪食細胞やリンパ球を含む免疫細胞、あるいは様々な体細胞にも発現しており、細胞性免疫と液性免疫に直接的ならびに間接的に作用することで獲得免疫系も制御している。また TLR 発見以降、歯科・口腔科学領域では特に、グラム陰性菌の感染症として捉えられる歯周病の病因の輪郭がより明確になってきたのは明白な事実である。さらに近年、TLR は内在性因子を認識することで生体内の異常を感知する能力を持ち、場合によっては自己免疫疾患に加担することも徐々に分かってきた。本総説では、TLR のリガンド認識機構や細胞内シグナル伝達経路、その制御機構など、TLR の機能について最近の知見を交えながらその進捗状況を紹介し、その免疫系における生理学的あるいは病理学的な役割について考察してみたい。

キーワード：Toll 様受容体、自然免疫、シグナル伝達、感染制御、炎症

*The immune system consists of innate immunity and adaptive immunity, by which foreign pathogens are sensed and excluded from the body. Although the innate immune system had originally been considered to involve non-specific responses, this concept was completely refused after the discovery of Toll-like receptors (TLRs). TLRs belong to a receptor family that can specifically recognize pathogen-associated molecular patterns. It has already been accepted that various sorts of structural components conserved in microbes are sensed by TLRs, followed by triggering many kinds of innate immune responses through activation of cellular signaling pathways downstream of the adaptor molecules specifically recruited to TLRs. As TLRs are expressed not only in immune cells, including phagocytes and lymphocytes, but also in various types of somatic cells, TLRs directly or indirectly exert regulatory effects on adaptive immunity through activation of both cellular and humoral immunity. In addition, it is undeniable that pathophysiological insights on the development of periodontal diseases have been more clearly understood since the discovery of TLRs, because TLRs are strongly associated with the recognition of periodontogenic microbes, especially Gram-negative bacterial species. Moreover, recent findings have gradually demonstrated that TLRs are also involved in the development of autoimmune disorders through recognition of endogenous or host-derived molecules as a 'danger signal'. In this review, we describe research advances in understanding TLR functions, including TLR ligand recog-*

<sup>1)</sup>朝日大学歯学部口腔感染医療学講座口腔微生物学分野

<sup>2)</sup>朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔解剖学分野  
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

<sup>1)</sup>Department of Oral Microbiology, Division of Oral Infections and Health Sciences

<sup>2)</sup>Department of Oral Anatomy, Division of Oral Structure, Function and Development

Asahi University School of Dentistry  
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan  
(平成22年11月22日受理)

*niton and TLR signaling pathways, and further discuss their physiological and pathological roles in the immune system.*

Key words: Toll-like receptor, innate immunity, signal transduction, infection control, inflammation

## 1. 緒 言

近年、感染防御機構において自然免疫系が微生物の構成成分を「特異的」に認識しているという概念は急速に進展し、定着してきた。自然免疫系は過去には「非特異的」な病原体認識・排除機構であると捉えられてきた。結果的にこの概念を一蹴することになったのは、1997年の Medzhitov らによる Toll 様受容体 (TLRs) の発見であり<sup>1)</sup>、これにより外来の病原体中に保存されている特有の分子パターン、いわゆる「病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs)」を生体内で特異的に認識しうる受容体の存在が明らかになった<sup>2,3)</sup>。PubMed 検索では、TLR の関連論文はすでに15,000報を超え (2010年11月現在)、その研究分野は免疫学、感染症学や微生物学のみならず、生化学、生理学、病理学、組織解剖学、分子生物学、細胞生物学など医学・生物学全般で多岐にわたっており、いかにこの受容体の発見のインパクトが大きいものであったかが伺われる。

TLR は I 型膜貫通型受容体であり、ロイシンリッチリピートを含む細胞外領域で PAMPs を認識する<sup>2)</sup>。細胞内領域には、Toll-インターロイキン (IL)-1 受容体相同性ドメイン (TIR ドメイン) と呼ばれる、IL-1受容体ファミリーと極めて相同性の高い領域を有しており、この部位で細胞内シグナル伝達経路を活性化する<sup>1,2)</sup>。現在までにヒトで10種、マウスでは12種の機能的 TLR の存在が確認されており、TLR1~TLR9 はどちらの種でも保存されている<sup>2)</sup>。マウスゲノムでは *Tlr10* 遺伝子の存在自体は確認できるが、レトロウイルスゲノムの挿入によりその発現は失われている<sup>2,4)</sup>。また、マウスでは確認される *Tlr11*、*Tlr12* ならびに *Tlr13* はヒトゲノム上では欠失している<sup>2,5)</sup>。これまでに審良静男教授のグループを中心として各 TLR 遺伝子の欠損マウスが作成され、その機能解析が進められてきた。これらのマウスから明らかになったのは、各 TLR は異なる PAMPs を「リガンド」として認識し、自然免疫系のみならず獲得免疫系をも調節していることである<sup>2,3)</sup>。近年、各 TLR の細胞外領域の結晶構造解析が行われてきたことで、TLR はリガンドとして、脂質、リボタンパク質や核酸などと直接的に結合することが明確になった<sup>6)</sup>。TLR による PAMPs の認識は細胞表面だけでなく、エンドソーム

やエンドリソソームなど細胞内でも行われている。細胞内に局在する TLR は核酸を認識し、細胞内に取り込まれた病原体の感知に寄与し、また本来認識すべきでない宿主由来の核酸のアクセスを物理的に隔離し、免疫寛容に役立っていると考えられる<sup>3,7)</sup>。

TLR のシグナル伝達経路に関しては、TIR ドメインを含むアダプター分子である MyD88 (myeloid differentiation factor 88) の機能が明らかになって以降、加速的に知見が発展した。MyD88に引き続いて、TIR ドメインを含むアダプター分子が次々と発見されたことで、各 TLR は独自にアダプター分子を使用し、感知した微生物の種類に見合った免疫応答を誘導できるように工夫されていることが分かった<sup>2)</sup>。また、TLR シグナル伝達分子の翻訳後修飾機構、その空間的制御あるいは TLR シグナルを介して誘導される特徴的な遺伝子群などが次々と明らかになり、TLR の免疫系での重要性を示す分子機構が急速に理解されるようになった。

TLR は微生物感染に対する防御機構において生理学的に重要な役割を果たすが、この制御機構に異常を来た場合には病理学的な役割を担うこともあり、自己免疫疾患などで炎症の増悪に加担する。TLR は死細胞、傷害組織あるいは癌細胞から産生・放出される因子や、感染、炎症あるいは酸化ストレスなどによって産生された内在性因子を「危険シグナル」として認識し、結果的に炎症反応を増強してしまう<sup>7)</sup>。

以上に述べたような TLR の機能と役割については口腔領域の免疫機構、特に歯周組織においても同様であると考えられ、TLR は生理学的役割と病理学的役割の両方を担うと考えられる。特に歯肉縁下のグラム陰性菌感染が関連する歯周病では、このような「諸刃の刃」としての TLR の役割が病態形成において重要であると考えられる。本総説では、TLR の機能について最近の知見を含めながらできるだけ詳細に紹介し、その免疫系における生理学的あるいは病理学的役割について考察していきたい。

## 2. 細胞表面型 TLR によるリガンド認識機構

TLR は細胞における局在パターンやリガンド認識パターンによって大きく2つのグループに分けられる。1つ目のグループは、細胞膜に局在し、細胞表面でリガンドを認識する TLR 群であり、TLR1, TLR2,

TLR4, TLR5, TLR6ならびに TLR11が含まれる。これらの TLR は、主に微生物の外膜や細胞壁などの成分として存在する脂質、糖脂質、タンパク質やリポタンパク質などを認識する。

TLR2はグラム陽性菌のペプチドグリカン、リポタイコ酸やポーリン、結核菌のリボアラビノマンナン、インフルエンザウイルスや麻疹ウイルスのヘマグルチニン、真菌のザイモサン、トリパノソーマのグリコシルホスファチジルイノシトールなど、多種多様の微生物の PAMPs をリガンドとして認識する<sup>3)</sup>。歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* の線毛も TLR2による認識を受ける<sup>8)</sup>。しかしながら、TLR2の最も主要なリガンドは細菌の細胞膜リポタンパク質である<sup>3)</sup>。細菌のリポタンパク質の生物学的活性部位は N 末端のアシル化システイン残基を含みリポペプチド領域であることは古くから知られていたが、TLR2はこれを特異的に認識することで他の分子との識別を行っている。細菌のリポタンパク質は構造的に、N 末端にトリアシル化されたシステイン残基を含み脂肪酸鎖を 3 本持つもの、またはジアシル化されたシステイン残基を含み脂肪酸鎖を 2 本持つものに大別される。ほとんどの細菌は前者のリポタンパク質を持つ

が、マイコプラズマや *Rhodopseudomonas* などは後者を持つ。TLR2はこの構造の差異も識別しており、これには TLR2と系統分類上最も相溶性の高い TLR1 と TLR6が関わっている<sup>9,10)</sup>。合成リポペプチドを用いた結晶構造解析により、トリアシル化リポペプチドは TLR2-TLR1複合体で認識され、ジアシル化リポペプチドは TLR2-TLR6複合体で認識されることが明らかにされた<sup>11,12)</sup>。これらの TLR 複合体は 2 つが組み合わさって、M 字型の構造体を形成する<sup>11,12)</sup> (図 1)。TLR2-TLR1-トリアシル化リポペプチド複合体では、トリアシル化リポペプチドの 3 本の脂肪酸鎖のうちの 2 本が TLR2と会合し、残りの 1 本の脂肪酸鎖が TLR1中の疎水性の溝にはまり込む<sup>11)</sup>。この疎水性の溝は TLR6には見られないため、TLR6はトリアシル化リポペプチドを認識できず、TLR2-TLR6複合体はジアシル化リポペプチドのみを認識すると考えられる<sup>12)</sup>。柴田健一郎教授と著者の研究グループによって設計された口腔マイコプラズマ由来の合成ジアシル化リポペプチド FSL-1<sup>13)</sup> (現在 Invivogen 社から入手可) は、様々な TLR 研究において広く TLR2-TLR6リガンドとして用いられており、その成果の一助となっている。TLR2によるリガンド認識機構には TLR 以外の

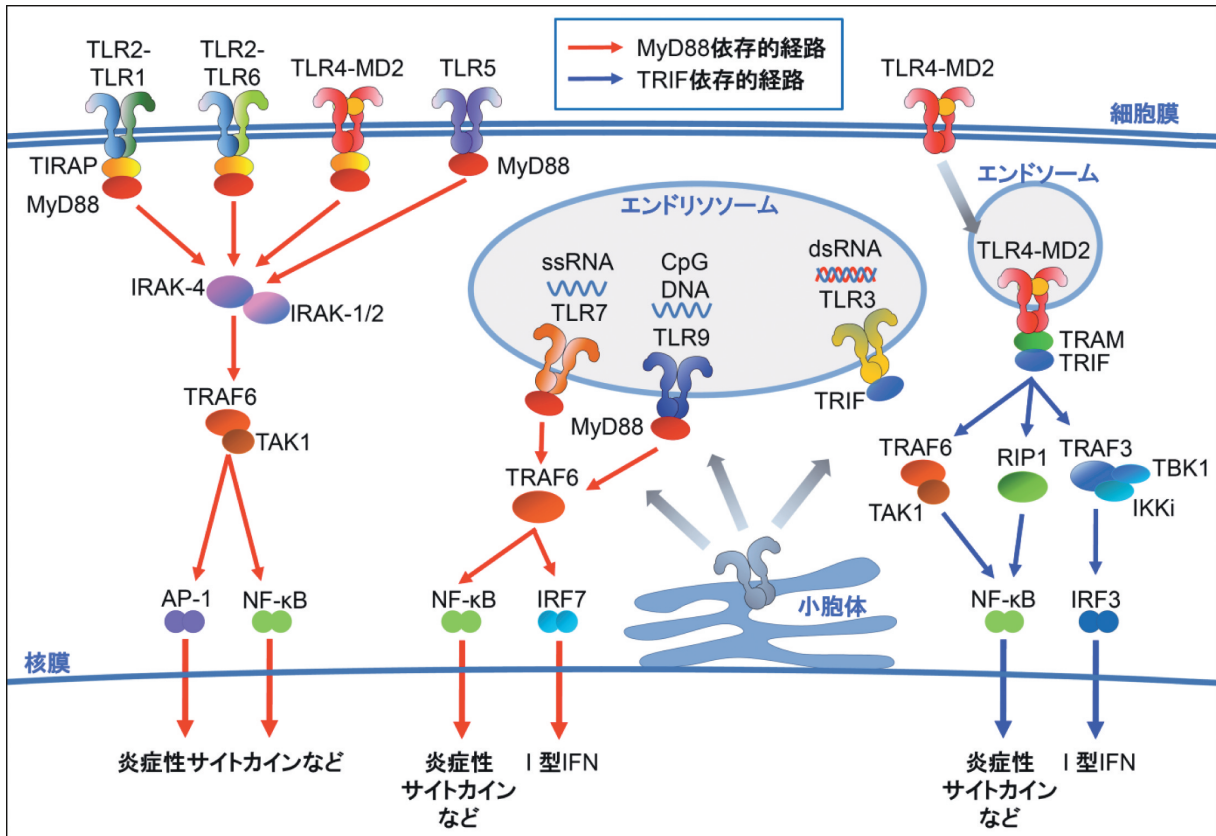


図 1 細胞表面型 TLR と核酸認識型 TLR によって開始されるシグナル伝達経路の活性化機構。



補助受容体も関与しており、特にスカベンジャー受容体 CD36 は TLR2-TLR6 複合体と共役して機能する<sup>14)</sup>。一般的にマクロファージや樹状細胞において、TLR2 リガンドは主に炎症性サイトカインの産生を誘導するが、I 型インターフェロン (IFN- $\alpha$  ならびに IFN- $\beta$ ) の産生は誘導することができない。しかしながら、炎症性単球と呼ばれる特殊な CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> 単球では、TLR2 はワクシニアウイルスを認識して I 型 IFN の産生を誘導する<sup>15)</sup>。このメカニズムの詳細はまだ理解されていない。

全ての TLR メンバーの中で、TLR4 は機能的に最も研究が進められてきたが、これはグラム陰性菌の主要な細胞壁成分であるリポ多糖体 (lipopolysaccharide; LPS) を認識するためである。LPS は様々な生物学的活性を有し、また菌血症の主要なメディエーターであるため、古くから様々な研究が進められてきたが、TLR4 の発見までは CD14 が受容体であると信じられてきた<sup>16)</sup>。TLR4 による LPS 認識までのステップは、他の TLR によるリガンド認識機構よりもかなり複雑である。TLR4 は補助因子である MD2 と複合体を形成し、LPS 認識の基盤を作っている<sup>17)</sup> (図 1)。LPS の生物学的活性部位はリピド A であるが、大腸菌型リピド A の 5 本の脂肪酸鎖は MD2 の疎水性ポケットに入り込み、MD2 表面に露出された残り 1 本の脂肪酸鎖が TLR4 と会合する<sup>18,19)</sup>。またリピド A 中のリン酸基は TLR4 の陽荷電残基に会合する。この TLR4-MD2-LPS 複合体が 2 つ組み合わさった時に初めて、細胞内領域にアダプター分子が会合し、シグナル伝達経路を活性化する。TLR4 が LPS を認識するまでのステップでは、さらに LPS 結合タンパク質 (LBP) と CD14 が関与する<sup>16)</sup>。LBP は LPS 結合性の血漿タンパク質であり、CD14 はグリコシルホスファチジルイノシトールを介して細胞表面にアンカーしている分子で、ロイシンリッチリピートを持つ。LPS と結合した LBP は CD14 のロイシンリッチリピートに結合し、この後に LPS は TLR4 に引き渡される<sup>3)</sup>。これと同様に、TLR2 がリガンドを認識するまでのステップでも LBP や CD14 が必要であると考えられている<sup>20)</sup>。歯周病関連細菌の多くはグラム陰性菌であるため LPS を有しているが、そのほとんどは TLR4 による認識を受ける。しかしながら *P. gingivalis* の LPS は異なる構造の数種のリピド A を含むため、TLR4 だけでなく TLR2 でも認識されることが報告されている<sup>21)</sup>。TLR4 は LPS 以外にも、ウイルス抗原やエンベロープ、肺炎レンサ球菌のニューモリシンなども認識するが<sup>27)</sup>、その分子機構はまだ明らかにされていない。

TLR5 は細菌の鞭毛成分であるフラジェリンを認識

する<sup>22)</sup>。TLR5 はミエロイド系の免疫細胞などで発現が見られ、特に腸管粘膜固有層の CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 樹状細胞では強く発現している。粘膜固有層樹状細胞にはヘルパー T 細胞を分化させる上で特徴的な性質があり、特に 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) と IL-17 産生性ヘルパー T 細胞 (Th17 細胞) を強く誘導する<sup>23)</sup>。さらに、TLR5 でフラジェリンを認識した後、ナイーブ B 細胞を IgA 産生型形質細胞へ分化させることができる<sup>23)</sup>。TLR5 は腸管上皮細胞にも発現しており、腸内細菌の鞭毛を認識して腸管の恒常性や粘膜免疫機構を制御すると考えられるが、口腔の粘膜免疫機構あるいは歯周病における TLR5 の役割についてはほとんど明らかにされていない。

TLR11 はヒトには存在しないが、マウスでは腎臓や膀胱で強く発現している。TLR11 は尿路病原性細菌の構成成分を認識すると考えられており、*Tlr11* 欠損マウスではこのような細菌の感染を受けやすい<sup>24)</sup>。また TLR11 は *Toxoplasma gondii* のプロフィリン様タンパク質の認識にも関与する<sup>25)</sup>。

### 3. 核酸認識型 TLR によるリガンド認識機構

細胞表面型 TLR のグループに対し、2 つ目のグループは小胞体やエンドリソソームなどの細胞内小胞に局在してリガンド認識する TLR 群であり、TLR3、TLR7、TLR8 ならびに TLR9 が含まれる。これらの TLR は全て微生物由来の核酸を認識する。

TLR3 はウイルスの 2 本鎖 RNA (dsRNA) を認識する受容体であるが、元来 TLR3 は合成 2 本鎖 RNA である poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid) を認識する受容体として同定された<sup>26)</sup> (図 1)。poly(I:C) は dsRNA の性質をミミックし、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導するため、抗ウイルス性免疫応答を人工的に誘導することができる。TLR3 の細胞外領域の結晶構造解析により、TLR3 への poly(I:C) の結合は直接的な結合であることが明らかにされた<sup>27)</sup>。TLR3 の細胞外領域は馬蹄形であり、表面積を増加させて dsRNA のアクセスを容易にするための構造であると考えられる<sup>28)</sup>。TLR3 はレオウイルスのゲノム dsRNA、RS ウイルス (respiratory syncytial virus)、脳筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus)、ウエストナイルウイルスなどの RNA ウイルス、あるいは small interfering RNA (siRNA) の認識に関与する<sup>2, 29, 30)</sup>。TLR3 はリガンド認識後、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導し、抗ウイルス性免疫応答で重要な役割を果たすと考えられる。TLR3 が dsRNA を認識するのは疑いないが、*Tlr3* 欠損マウスでは、RNA ウイルスではなく、DNA ウイルス

であるマウスサイトメガロウイルス感染が致死的になる<sup>5)</sup>。またヒトでの *TLR3* 欠損でも、DNA ウイルスである 1 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) に感染しやすくなることが報告されている<sup>31)</sup>。

TLR7はもともと抗ウイルス薬であるイミダゾキノリン (imiquimod や resiquimod など) やグアニン誘導体 (loxoribine など) を認識する受容体として同定されたが<sup>32)</sup>、後に 1 本鎖 RNA (ssRNA) を認識する受容体であることが分かった<sup>33)</sup> (図 1)。TLR7は合成核酸である poly(U) やある種の siRNA も認識する<sup>34)</sup>。TLR7はリンパ球系の樹状細胞である形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell ; pDC) において強い発現が見られ、pDC が TLR7 を介してウイルスを認識した場合には大量の I 型 IFN (特に IFN- $\alpha$ ) を産生し、抗ウイルス性免疫応答を強力に誘導するのに役立つ<sup>3,34)</sup>。pDC での TLR7 を介した RNA ウイルスの認識はウイルスの細胞内増殖に非依存的であり、pDC がエンドサイトーシスで取り込んだウイルスがエンドリソソームへ移行する際、エンドリソソームの TLR7 が認識すると考えられる。また TLR7 は水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus) の細胞質での増殖をオートファジーの機構を利用して感知することができる<sup>35)</sup>。オートファジー (autophagy) は細胞内タンパク質をポリユビキチン化に依存して分解する細胞戦略の一環であり、そのプロセスでオートファゴソームと呼ばれる脂質膜に覆われた小胞が形成される。従って、オートファゴソームに局在する TLR7 がウイルスを認識すると考えられる。TLR7 はウイルス認識以外に細菌の認識に関与するケースもある。コンベンショナル樹状細胞 (cDC) に発現する TLR7 は、B 群レンサ球菌などの細菌の RNA も認識し、I 型 IFN を産生する<sup>36)</sup>。

TLR8 は系統分類上、最も TLR7 に相対的な TLR である。ヒトの TLR8 はイミダゾキノリンやウイルスの ssRNA を認識することができる<sup>32)</sup>。しかしながら、*Tlr8* 欠損マウスはイミダゾキノリンやウイルスの ssRNA に対して正常に応答するため、マウスでは TLR7 がこれらの分子の認識において主要な役割を担っていると考えられ、ヒトとマウスの TLR8 では機能的な差異が認められる<sup>37)</sup>。

TLR9 は DNA 上の非メチル化 CpG (cytidine-phosphate-guanosine) モチーフを認識することができる<sup>2,38)</sup> (図 1)。このモチーフは細菌やウイルスのゲノムで頻繁に見られるが、哺乳類細胞ではほとんど見つからない。このモチーフを人工的に化学合成したオリゴヌクレオチドは TLR9 の認識を受け、樹状細胞や B 細胞を活性化し、強力に Th1 応答を誘導する<sup>2)</sup>。TLR9

は pDC において強い発現が見られ、マウスサイトメガロウイルス、HSV-1 や HSV-2 などの DNA ウイルスを感知する<sup>2,39)</sup>。前述のように pDC には TLR3 や TLR7 も強く発現しているため、pDC はウイルス感染を総合的に監視する専門的役割を担った細胞であると考えられている。また、TLR9 はマラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の代謝産物であるヘモゾインも認識する<sup>39)</sup>。ヘモゾインはマラリア原虫が赤血球内分裂期においてヘモグロビンを消費し、遊離ヘムをポリマー状にした結晶性代謝産物である。ヘモゾインは原虫と共に血中に放出され、網内系でマクロファージなどに貪食される。

核酸認識型 TLR は細胞内、特にエンドリソソームでリガンドを認識する。エンドリソソームの酸性化はエンドソームの成熟化において重要なステップであるが、これを阻害すると、TLR7 や TLR9 を介した免疫応答は妨害される<sup>40)</sup>。TLR7 と TLR9 は通常小胞体に存在し、リガンド刺激が加わると、速やかにエンドリソソームに移動する<sup>41)</sup>。従ってエンドソームに取り込まれた核酸が TLR にアクセスするためには、小胞体からエンドリソソームへの TLR の移行が必須である (図 1)。TLR の小胞体での局在は小胞体タンパク質 UNC93B1 によって制御されている。*Unc93b1* 遺伝子にミスセンス突然変異が生じたマウスでは、TLR7 や TLR9 リガンドのみならず、TLR3 リガンドに対しても応答性が見られなくなる<sup>42)</sup>。このマウスでは、ウイルス感染だけでなく細菌感染も起こりやすくなる。UNC93B1 は小胞体において、TLR3、TLR7 ならびに TLR9 の膜貫通領域に特異的に結合するタンパク質であり、UNC93B1 が欠損すると、これらの TLR は小胞体に留まったままとなり、エンドリソソームへ移行できない<sup>41,43)</sup>。ヒトでの UNC93B1 欠損も報告されており、ウイルス性脳炎に罹患しやすくなることが明らかにされている<sup>44)</sup>。UNC93B1 欠損患者から分離された細胞では、TLR3、TLR7 ならびに TLR9 のリガンドに対して低応答性を示すが、細胞表面型 TLR のリガンドに対しては正常に応答する<sup>45)</sup>。

小胞体からの TLR の輸送に関しては、小胞体タンパク質 PRAT4A (別名 CNPY3) と gp96 について報告がなされている。PRAT4A は TLR4 と TLR9 に結合するタンパク質であり、これらの TLR を細胞膜あるいはエンドリソソーム膜に輸送するのに役立つ<sup>45)</sup>。*Cnpy3* 欠損マウス由来の細胞では、TLR2、TLR4 ならびに TLR9 のリガンドに対して応答性が見られなくなるが、TLR3 リガンドに対しては正常に応答する<sup>46)</sup>。従って、少なくとも TLR3 と TLR9 のエンドリソソームへの輸送は異なる機構で行われていることが示唆さ

れる。gp96は小胞体に局在する熱ショックタンパク質 Hsp90のファミリーメンバーであり、gp96欠損マクロファージでは、TLR2, TLR4, TLR5, TLR7ならびに TLR9リガンドに対する応答が見られなくなる<sup>47)</sup>。最近、gp96は PRAT4A と共役して TLR3以外の全ての TLR のシャペロンとして機能することが報告された<sup>48)</sup>。

TLR7と TLR9に関しては、エンドリソソームにおいて N 末端の細胞外領域が切断されることで成熟化し、リガンド認識機能やシグナル伝達機能を得と考えられている<sup>49)</sup>。これらの TLR の切断に関わるのは、リソソーム内の種々のカテプシンやアスパラギンエンドペプチダーゼである<sup>7,50,51)</sup>。興味深いことに、このような切断を受けずに機能を獲得できなかった TLR9は細胞膜に輸送され、細胞表面型となる<sup>49)</sup>。このような TLR の輸送機構についてはまだ議論の余地があり、細胞種や生物種での違いもあるのかもしれない。

口腔領域における核酸認識型 TLR の役割はほとんど分かっていないが、一部の報告では *P. gingivalis* の歯周組織感染時に TLR7がその認識に関与することが示唆されている<sup>52)</sup>。今後口腔領域でのウイルス感染の認識機構も含め、その役割の解明が期待される。

#### 4. TLR のアダプター分子とシグナル伝達経路

各々の TLR は異なるリガンドを認識するため、免疫系の調節において異なる生物学的意義を持つと考えられるが、下流で活性化されるシグナル伝達経路にも独自性が見受けられ、誘導される免疫応答にもある程度の特異性が見受けられる。例えば、TLR3や TLR4 は I 型 IFN 関連応答と炎症性サイトカイン応答のどちらも誘導することができるのに対し、TLR2-TLR1, TLR2-TLR6や TLR5は基本的に I 型 IFN 関連応答を誘導することはできない。この理由は、TIR ドメインを含むアダプター分子である、MyD88, TIRAP(別名 Mal), TRIF(別名 TICAM-1)ならびに TRAM(別名 TICAM-2) が異なる TLR に会合し、異なるシグナル伝達経路を活性化するという概念である程度は説明可能である(図1)。

MyD88は TIR ドメインを含むアダプター分子として同定され、IL-1受容体のアダプター分子であることが明らかにされていた<sup>53)</sup>。その後の TLR の発見に伴い、TLR3を除いた全ての TLR において共通の「ユニバーサル」アダプター分子であることが解明された<sup>2,54)</sup>。MyD88は転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化経路や細胞分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(mitogen-activated protein kinases; MAPKs)カスケードを活性化し、炎症性サイトカイン応答を誘導することがで

きる。これに対して、TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) は TLR3と TLR4にのみに働くアダプター分子であり、MyD88とは別経路のシグナル伝達経路を活性化する<sup>2,55)</sup>。TRIF は転写因子である IFN 制御因子 3 (IFN regulatory factor 3; IRF3) と NF- $\kappa$ B の両者の活性化を誘導することができるため、I 型 IFN 関連応答と炎症性サイトカイン応答のどちらも誘導することができる。TIRAP と TRAM は TLR への MyD88あるいは TRIF の結合を選り分けるための「ソーティング」アダプター分子である<sup>56,57)</sup>。TLR2-TLR1, TLR2-TLR6や TLR4への MyD88の 会合は、TIRAP の仲介が無いと起こらず、またこれと同様に、TLR4への TRIF の会合には、TRAM の仲介が必要である。TLR5, TLR7や TLR9への MyD88の 会合は TIRAP の仲介を必要としない。また、TLR3 への TRIF の会合も TRAM の仲介を必要としない。

機能面から考えれば、TLR のシグナル伝達経路は大きく、「MyD88依存的経路」と「TRIF 依存的経路」の2つに分けられることになる。TLR4は唯一、この両者を活性化することができる TLR である<sup>2)</sup>。TLR4 が異なるアダプター分子を利用してシグナル伝達を開始する分子メカニズムに関しては、TLR を発見した Medzhitov 教授らの報告によって大きな進展が見られた<sup>56,57)</sup>。TLR4リガンドは、 $\beta$ 2インテグリンに依存してホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 (PIP2) を細胞膜内側に集積させる。TIRAP には N 末端に PIP2と結合する領域があり、PIP2集積部位で特異的に細胞膜に結合する。これによって TLR4は TIR ドメインを介して TIRAP と細胞膜上で複合体を形成し、MyD88との選択的会合を可能にする<sup>56)</sup>。TLR4 は MyD88依存的経路の活性化の後、ダイナミン依存的エンドサイトーシスによってエンドソームに取り込まれる。この際に初めて TRAM が TLR4と会合し、これに伴って TRIF の選択的会合が可能となる<sup>57)</sup>(図1)。このようなメカニズムにより、TIRAP 依存的な MyD88経路と TRAM 依存的な TRIF 経路は同時に開始されないように工夫されている。しかし、何故 TLR4 のみが2つの異なるアダプター分子依存的経路を利用できるのか、その意義は未だ明確ではない。

##### 4.1. MyD88依存的経路

MyD88は N 末端にデスドメイン、C 末端に TIR ドメインを持つ300アミノ酸に満たない比較的小さなアダプター分子である<sup>58)</sup>。TLR が PAMPs を認識してコンフォーメーションが変化すると、MyD88の TIR ドメインは TLR の TIR ドメインに会合してシグナル伝達を開始させる。この際、MyD88は6量体を形成するが、ここにデスドメインを持つキナーゼである IL-1



受容体関連キナーゼ4 (IRAK4) が MyD88 のデスドメインに対して4分子結合し、さらに4分子の IRAK1 または IRAK2 が結合することにより、「Myddosome」と呼ばれるシグナル複合体が形成される<sup>59)</sup>。IRAK4 はシグナル開始の早期に活性化され、MyD88 下流において早期の NF- $\kappa$ B や MAPK カスケード活性化において重要な役割を果たす<sup>2,60)</sup>。IRAK1 や IRAK2 も IRAK4 に引き続いて活性化されるが、IRAK1 の活性はプロテアソームにおける分解に伴って早期に消失してしまうのに対し、IRAK2 はより強力で持続的な NF- $\kappa$ B や MAPK カスケードの活性化を誘導することができる<sup>60)</sup>。

IRAK のシグナル活性化能は、E3 ユビキチンリガーゼである TNF 受容体関連因子6 (TRAF6) と相互作用することに依存する。TRAF6 は E2 ユビキチンリガーゼである Ubc13 および Uev1A と共同して機能し、TRAF6 自身ならびに IRAK1 などの標的タンパク質にユビキチンが63番目のリジン残基を介して重合したポリユビキチン鎖 (Lys63-linked polyubiquitin chain; K63Ub) を付加する<sup>61)</sup>。K63Ub は TRAF6 下流の TAK1 複合体の構成成分中に存在する制御因子、TAB2 ならびに TAB3 上のユビキチン結合ドメインに結合し、MAPKKK メンバーである TAK1 の活性化を誘導することができる<sup>62)</sup>。TAK1 は本来キナーゼであるため、ユビキチン化シグナルというよりはむしろ MAPK カスケード (MAPKKK $\rightarrow$ MAPKK $\rightarrow$ MAPK の連続したリン酸化反応) を活性化し、最終的に MAPK (Erk1/2, p38 や Jnk) を活性化することで、AP-1 などの転写因子の活性化を誘導する。また K63Ub は NF- $\kappa$ B 経路の活性化に関与する IKK 複合体の必須制御因子である NEMO/IKK $\gamma$  上のユビキチン結合領域にも結合する<sup>63)</sup>。このような K63Ub の作用により、TAK1 は IKK 複合体と会合し、TAK1 は IKK 複合体中の IKK $\beta$  のリン酸化を誘導することで、NF- $\kappa$ B 阻害因子 I $\kappa$ B の分解を引き起こし、NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する<sup>63)</sup>。しかしながら、Ubc13 が欠損した細胞でも正常に TLR リガンドに応答し、NF- $\kappa$ B の活性化が誘導される<sup>64)</sup>。Ubc13 欠損では NEMO への K63Ub の付加は誘導されないため、NEMO による NF- $\kappa$ B 活性化には K63Ub に非依存的なメカニズムが存在すると考えられる。最近、ヘッド・トゥ・テール (分子鎖の頭部と別分子鎖の尾部が直列に結合する形態) の直鎖状ユビキチンが HOIL-1L と HOIP 複合体により産生され、この直鎖状ユビキチンが NEMO に結合することが、IKK の活性化において重要であることが明らかにされた<sup>65)</sup>。また、TRAF6 にも直鎖状ユビキチンを産生する能力があり、これにより TAB3 を介した

TAK1 の活性化が誘導される<sup>66)</sup>。

細胞表面型 TLR では MyD88 に依存して上記のようなメカニズムが稼働するが、核酸認識型 TLR の場合には、TRAF6 依存的に転写因子 IRF5 や IRF7 が活性化され、I 型 IFN 応答も誘導される<sup>2,29)</sup>。細胞表面型 TLR の場合には、細胞膜上に形成されるリポドラフトやその関連因子、あるいはソーティングアダプター分子の作用があり、また核酸認識型 TLR の場合には後述の TRAF3 の働きがあるため、結果としてこのような差異が生まれると思われるが、厳密には検証されていない。

MyD88 依存的経路による NF- $\kappa$ B や AP-1 などの転写因子の活性化により、サイトカイン、ケモカイン、抗菌ペプチド、一酸化窒素合成酵素、補助刺激因子、接着因子、アポトーシス抑制因子などの多種多様な遺伝子群が誘導されることになるが、この中には NF- $\kappa$ B 転写能の調節において重要な役割を担う分子の遺伝子も含まれている。例えば、I $\kappa$ B ファミリーメンバーである I $\kappa$ B $\zeta$  (*Nfkbiz*) は MyD88 依存的経路によって特異的に誘導され、NF- $\kappa$ B p50 サブユニットの共役因子として機能することにより、IL-6 や IL-12p40 などの特定遺伝子の効果的な誘導を可能にする<sup>67)</sup>。C/EBP $\delta$  は NF- $\kappa$ B と共役して働き、IL-6 の産生を誘導することができる<sup>68)</sup>。ATF3 はヒストン脱アセチル化酵素と結合することにより、NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することが知られている<sup>69)</sup>。

ヒトでは先天性の MyD88 欠損が存在し、この患者では侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) に罹患しやすいことが知られている<sup>70)</sup>。

#### 4.2. TRIF 依存的経路

TRIF は分子の中間に TIR ドメインを持ち、700 を超えるアミノ酸から構成される比較的大きなアダプター分子である。TRIF 依存的経路は最終的に、転写因子である IRF3 と NF- $\kappa$ B の両者を活性化することができる。TRIF も MyD88 依存的経路と同様に、TRAF6 によるシグナル伝達因子のユビキチン化に依存したメカニズムによって TAK1 を活性化し、NF- $\kappa$ B 経路の活性化を誘導する<sup>71)</sup>。TRIF の N 末端には TRAF 結合モチーフが存在する。TRIF は C 末端に RIP 結合ドメインを持ち、これを介してデスドメインを持つキナーゼである RIP1 に結合する<sup>72)</sup>。RIP1 は K63Ub 化され、このユビキチン化に依存して NF- $\kappa$ B 経路の活性化が誘導される。Peli1 は E3 ユビキチンリガーゼである Pellino ファミリーに属する分子であるが、Peli1 が欠損している場合、MyD88 を介した NF- $\kappa$ B の活性化は正常に誘導されるが、TLR3 リガンドによる RIP1 の K63Ub 化ならびに RIP1 による NF- $\kappa$ B 経路の活性化

が認められなくなる<sup>73)</sup>。また TNF 受容体のアダプター分子である TRADD は RIP1 と結合することが知られているが、TRADD を欠損したマウスでは TLR3 リガンドによる RIP1 の K63Ub 化が認められず、またそれに伴う NF- $\kappa$ B 経路の活性化も認められないことから、TLR3 の下流では TRADD も RIP1 依存的なシグナル伝達経路に関与すると考えられている<sup>74)</sup>。しかしながら、TRIF 下流での TRADD の関与はマクロファージや樹状細胞などの免疫細胞では見られず、むしろ線維芽細胞などの体細胞において観察される。総合して、TRIF は、TRAF6、Peli1、TRADD や RIP1 からなるシグナル複合体を形成することで TAK1 を活性化し、NF- $\kappa$ B や MAPK カスケードの活性化を誘導することができる。

TRIF は NF- $\kappa$ B 活性化に加えて、IRF3 活性化を介した I 型 IFN の産生も誘導することができる。これは TRIF が TANK 結合性キナーゼ 1 (TANK-binding kinase1; TBK1) や誘導性 IKK (IKKi/IKK $\epsilon$ ) からなる複合体に結合し、IRF3 のリン酸化と核移行を誘導するためである<sup>55, 71)</sup>。TRIF による TBK1-IKKi の活性化には、E3 ユビキチンリガーゼである TRAF3 が必須な役割を果たす<sup>75, 76)</sup>。TRAF3 の欠損によって、TLR3、TLR7 や TLR9 による I 型 IFN である IFN- $\beta$  の産生は全く認められなくなる。TRAF3 は MyD88 にも結合する能力を有しているが、MyD88 に結合した TRAF3 は、E3 ユビキチンリガーゼである cIAP1/2 によって、ユビキチンが 48 番目のリジン残基を介して重合したポリユビキチン鎖 (Lys48-linked polyubiquitin chain; K48Ub) を介したユビキチン化を受け、プロテアソームにおいて速やかに分解される<sup>76)</sup>。cIAP1/2 は細胞表面型 TLR から開始された MyD88 依存的経路には関与するが、TRIF 依存的経路には関与しない。上記のメカニズムで TRAF3 が分解されることは、細胞膜内側に近接して起こる TRAF6 依存的シグナルを優先的に誘導し、これによって TAK1 が優先的に活性化される。従って TRAF3 は TRIF 依存的経路においては、MyD88-TRAF6 経路を抑制しつつ、IRF3 を活性化していることが示唆される<sup>76)</sup>。TRAF3 と同様に MyD88 依存的経路と TRIF 依存的経路において異なる役割を担う分子として、E3 ユビキチンリガーゼである NRDP1 が知られている。NRDP1 は Ubc13 と共役して TBK1 に結合し、K63Ub 化することで TBK1 を活性化するが、同時に MyD88 を K48Ub 化してプロテアソームで分解し、MyD88 依存的経路を抑制する<sup>77)</sup>。このような分子による TLR シグナル伝達経路の調節は、結果として炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生にバランスをもたらし、

過剰な炎症応答や自己免疫疾患の制御において重要な役割を果たすことになる。

#### 4.3. TLR シグナルを負に制御する因子

TLR を介した免疫応答を調節することは、過剰な炎症応答や組織傷害性の免疫応答を抑制するために重要となる。TLR を介した免疫応答において、そのステップを負に制御可能な因子が数多く明らかにされてきている。これには、MyD88s<sup>78)</sup> などのアダプター分子のスプライシングバリエーション、IRAK-M<sup>79)</sup>、TANK<sup>80)</sup>、TOLLIP<sup>81)</sup>、FADD<sup>82)</sup>、ホスファチジルイノシトール 3 (PI3) キナーゼ<sup>83)</sup> や SHP-1<sup>84)</sup> などのシグナル伝達関連因子、SOCS-1<sup>85)</sup>、TRIAD3A<sup>86)</sup> や TRIM30 $\alpha$ <sup>87)</sup> などのユビキチンリガーゼ、A20<sup>88)</sup>、CYLD<sup>89)</sup> や DUBA<sup>90)</sup> などの脱ユビキチン化酵素、miR-146a<sup>91)</sup> などの microRNA、あるいは上記で述べたような転写制御因子が含まれる。

A20 (別名 TNFAIP3) は TLR シグナルによって発現が増加するタンパク質であり、E3 ユビキチンリガーゼと脱ユビキチン化酵素の両者の機能を併せ持っている。A20 は補助因子である Itch や TAX1BP1 と共役して機能し<sup>92)</sup>、RIP1 ならびに TRAF6 の機能を制御することで、TLR に起因した NF- $\kappa$ B 経路の活性化を抑制する<sup>88)</sup>。Tnfaip3 欠損マウスでは、多臓器にわたる炎症や重度の悪液質の自然発症が観察され、生後間もなく死亡する<sup>93)</sup>。これは A20 が強力な抗炎症作用を有しており、免疫系を正常に維持するために必須であることを示唆している。興味深いことに、A20 と MyD88 の両者が欠損している場合には、重度の炎症は誘導されず、個体は未熟死しなくなる<sup>94)</sup>。また、Tnfaip3 欠損マウスに抗生物質を投与することにより、重度の悪液質の発症を抑制することができる<sup>94)</sup>。従って、A20 は常在微生物によって恒常的に誘導される TLR-MyD88 経路を介した免疫応答を強力に抑制していることが伺える。

チロシン脱リン酸化酵素である SHP-1 遺伝子に変異が生じたマウスでは、TLR 刺激に対してマクロファージが異常に活性化され、生体内の各所で炎症反応の亢進が見られる<sup>95)</sup>。SHP-1 と MyD88 の両者の欠損により、炎症反応は誘導されなくなることから、SHP-1 は MyD88 依存的経路に対して抑制的に機能することが考えられる。実際、SHP-1 は IRAK1 や IRAK2 の機能を抑制することが報告されている<sup>83)</sup>。

著者らは最近、ミスフォールディングタンパク質の排除に関与する因子である、SQSTM1 (sequestosome1; 別名 p62) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 6 が MyD88 依存的経路の抑制に関わることを見出した<sup>96)</sup>。SQSTM1 と HDAC6 はタンパク質の



K63Ub 化の認識を介して不要なタンパク質を凝集化させて封入体を形成し、これをオートファジーで分解させる。これらの分子は TLR 刺激に応じて TRAF6 依存的に MyD88 を凝集化させ、また CYLD を制御することで TRAF6 下流の p38 や JNK の活性化に対して抑制的に働くが、NF- $\kappa$ B 経路にはほとんど影響しない<sup>96)</sup>。従って TLR はミスフォールディングタンパク質の排除機構を利用し、ストレスシグナルを負に制御するという新たな機構が明らかになった。

最近、オートファジーの一連のメカニズムは TLR シグナルに対して抑制的に機能することが明らかになってきている。オートファジー関連因子である Atg16L1 の変異は炎症性腸疾患であるクローン病に関与しているが<sup>97)</sup>、*Atg16L1* 欠損マウスのパネート細胞では、腸炎発症の関連遺伝子の発現が増加しており<sup>98)</sup>、Atg16L1 を介したオートファジーは腸管の恒常性維持において重要な役割を果たすと考えられる。*Atg16L1* のミュータントマウスでは、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性の腸炎モデルにおいて、重度の腸炎が観察される<sup>99)</sup>。これは IL-1 $\beta$  や IL-18 に対する中和抗体の投与により抑制することができる。さらに、このマウス由来のマクロファージは、LPS 刺激に対して強力なカスパーゼ 1 の活性化ならびに IL-1 $\beta$  や IL-18 の産生が認められる<sup>99)</sup>。この反応は Atg16L1 と TRIF の両者の欠損によって観察されなくなることから、TRIF 依存的経路に対し、Atg16L1 によるオートファジーが抑制的に機能すると考えられる。

## 5. TLR によるリンパ球機能の調節

TLR は樹状細胞、マクロファージや好中球などの貪食細胞で強く発現しており、病原体の貪食の際に PAMPs を認識してシグナル伝達経路を活性化し、様々な免疫系応答を惹起することができる。また TLR によって活性化された樹状細胞のサブセットは間接的に CD4<sup>+</sup>T 細胞を活性化し、Th1 や Th17 などの各種ヘルパー T 細胞応答を誘導する。最近、血流中に豊富に存在する単球は病原体と遭遇して TLR4-TRIF 経路が活性化されることにより、DC-SIGN/CD209<sup>+</sup> 樹状細胞に分化し、二次リンパ組織中の T 細胞領域へ移行して抗原提示することが明らかにされている<sup>100)</sup>。このようなミエロイド系の免疫細胞のみならず、TLR は B 細胞においても強い発現が見られ、多くの TLR リガンドは抗原と共役して作用し、抗体産生を誘導することができる。また TLR の発現は T 細胞サブセットにおいても見られ、これらの機能を直接的に制御することも可能である。従って TLR は細胞性免疫と液性免疫を担う抗原提示細胞とリンパ球系細胞の両者で

大きく機能的役割を果たしており、自然免疫系の調節だけでなく、獲得免疫系の始動と制御においても重要となる<sup>101)</sup>。

### 5.1. TLR による CD4<sup>+</sup>T 細胞の制御

TLR はヘルパー系 T 細胞応答のクオリティーを直接的ならびに間接的に制御する能力を持つ。樹状細胞やマクロファージなどに発現した TLR はシグナル伝達経路の活性化を介して様々な遺伝子発現プログラムを実行して自然免疫系を賦活化し、獲得免疫を形作るための足がかりとする。樹状細胞などから産生される異なるサイトカインの種類に応じて、ヘルパー系 CD4<sup>+</sup>T 細胞は Th1、Th2 あるいは Th17 や制御性 T (Treg) 細胞への分化が決定されてくる。

おおよそのコンセンサスが得られているのは、TLR は Th1 応答を誘導し、細胞性免疫を調節することである<sup>101, 102)</sup>。ほとんどの TLR は cDC を刺激して IL-12p70 の産生を誘導し、IFN- $\gamma$  産生性の Th1 細胞の分化を促進させる。実際、TLR4 リガンドの LPS、TLR9 リガンドの CpG DNA、TLR3 リガンドの poly(I:C) および TLR7 リガンドは、樹状細胞で p38 や JNK を活性化し、強力に IL-12p70 産生を誘導する<sup>2, 102, 103)</sup>。また MyD88 欠損マウスでは、卵白アルブミン (OVA) とフロイント完全アジュバントとの接種で本来優先的に誘導されるはずの Th1 応答が見られなくなる<sup>104)</sup>。これは TLR を介した MyD88 依存的シグナルが Th1 応答のみをコントロールすることを示唆するが、一概に TLR が Th2 応答やその他のヘルパー系応答を誘導しないとは言いつけない。TLR は強力に TNF- $\alpha$  や IL-6、IL-23 の産生を誘導するため、Th17 応答の誘導にも促進的に働く<sup>105, 106)</sup>。またある種の TLR リガンドは IL-10 の産生を誘導し、Th2 応答を誘導すると考えられている<sup>107)</sup>。TLR2 リガンドのみに限ると、TLR2-TLR1 リガンドである Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>、TLR2-TLR6 リガンドである FSL-1、*P. gingivalis* の LPS などによる刺激は cDC の TLR2 を刺激し、ERK の活性化に依存して IL-10 を産生させ、Th2 や Treg 応答誘導の足がかりを作る<sup>103, 108-110)</sup>。*Erk1* 欠損マウス由来の cDC では、TLR2 リガンドによって IL-12p70 が優先的に産生され、IL-10 の産生量は劇的に減少する。またこれに付随して、*Erk1* 欠損マウスでは Th1 応答が増強されており、その結果自己免疫性の脳脊髄炎の罹患感受性が増加する<sup>111)</sup>。さらに、ザイモサンは TLR2-TLR6 とともに樹状細胞特異的な C 型レクチンである dectin-1 と共役して働き、ERK の活性化を介して脾臓樹状細胞にレチノイン酸と IL-10 の産生を誘導する<sup>112, 113)</sup>。このような脾臓樹状細胞では、レチノイン酸と IL-10 によって SOCS-3 依存的に炎症性サイトカインの産生が強力に

抑制され、Treg 細胞の分化を誘導することができ<sup>112)</sup>。従って、樹状細胞における ERK の活性化の度合いは、ヘルパー系 CD4<sup>+</sup>T 細胞の分化を決定する重要な因子であることが示唆される。

未だ曖昧な点が多く残されているが、このような機構を介して、TLR は産生するサイトカインの種類に大きく影響を及ぼすことでヘルパー系 T 細胞の制御を行う。前述のように、免疫細胞には、粘膜固有層樹状細胞や炎症性単球、形質細胞様樹状細胞などの特殊に分化した細胞が含まれるため、これらに発現した TLR が複雑に機能して相互作用し、異なるヘルパー系応答を誘導することは十分に考えられる。

TLR4 リガンドや TLR9 リガンドはアジュバントとして作用し、TCR レパトアの閾を増加させ、また抗原特異的なクローン選択を増強させて TCR レパトア自体も制御することができる<sup>114)</sup>。これは結果的に、抗原と結合した MHC クラス II と最も強く結合することのできる TCR を厳選し、その選ばれた TCR を持つ T 細胞クローンを局所で効果的に増加させるのに役立つ。TLR が中枢（セントラル）メモリー T 細胞やエフェクターメモリー T 細胞に対してどのような作用を示すのかについてはまだ分かっていない。

### 5. 2. TLR による CD8<sup>+</sup>T 細胞の制御

TLR は T 細胞そのものにも発現が見られ、T 細胞の機能を直接的に制御する能力も兼ね備えている。例えば、CD8<sup>+</sup>T 細胞は TLR2 を発現しており、抗原と TLR2 リガンドの共刺激によって細胞増殖や細胞生存性を直接的に増強し、樹状細胞由来の間接的な共刺激の必要性を低下させるのに役立つ<sup>115)</sup>。また間接的な CD8<sup>+</sup>T 細胞への影響として、樹状細胞は TLR リガンド（特に TLR3、TLR7 や TLR9）で刺激することにより、外来性抗原の MHC クラス I による「クロスプレゼンテーション」能力が増加させられ<sup>116)</sup>、抗原特異的に CD8<sup>+</sup>T 細胞を細胞傷害性 T 細胞（cytotoxic T cell；CTL）へ効果的に分化させることができる<sup>117)</sup>。これは TLR3、TLR7 や TLR9 によって I 型 IFN が産生されることに起因する。このような TLR を介した CD8<sup>+</sup>T 細胞の免疫応答は抗ウイルス性免疫に役立っており、実験的には、マウスで低毒性の黄熱病ウイルス生ワクチンやリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスに対する抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞活性が増強される<sup>118, 119)</sup>。このような活性は、CD8<sup>+</sup>T 細胞活性の制御を介して、TLR リガンドをタンパク質ワクチンや DNA ワクチンのアジュバントとして応用するのに役立つと考えられる。しかしながら、マラリアのように全身的に樹状細胞が活性化されるような感染症や、全身性に TLR リガンドを接種したような場合には逆の応答が起こ

り、樹状細胞のクロスプレゼンテーション能力も抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞活性も大きく低下する<sup>120)</sup>。従って TLR リガンドによって効果的に抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を制御するためには、局所的な免疫応答が誘導されることが必須なのかもしれない。

### 5. 3. TLR による B 細胞の制御

ワクチンの接種によって効果的に抗体産生は誘導され、そのワクチンの種類によっては一生涯その産生を持続させることが可能であるが、そのメカニズムにも TLR が関与すると考えられる。ヒトでの一例としては、マラリア原虫未感染の個人にマラリア原虫ワクチン（の候補）を投与し、これを CpG DNA の接種の有無で比較した場合、CpG DNA を同時に投与した場合にのみ、メモリー B 細胞応答の誘導が促進され、またその強度や持続期間も増強されることが分かっている<sup>121)</sup>。タンパク質抗原と共に TLR リガンドを接種することにより、抗原特異的な抗体産生が強力に誘導されることはすでに疑いの無い事実として認識されている。しかしながら、TLR の T 細胞応答の調節機構は徐々に明らかにされているものの、抗体産生や B 細胞活性化における TLR の役割については未知の部分が多く残されている。

TLR リガンドが抗体産生やメモリー B 細胞に対してどのように調節活性を示すのかはあまり理解されていないが、マウスにおける実験では、TLR リガンドが樹状細胞の活性化のみならず、直接的に B 細胞に作用することで強力な抗体産生応答を誘導することが示されている<sup>122)</sup>。これは *in vitro* において、マウスのナイーブ B 細胞を TLR リガンドで刺激した場合、TLR5 と TLR8 リガンド以外はそのポリクローナルな細胞増殖を促進し、抗体を産生させること<sup>123)</sup>に一致する。また、TLR リガンドはポリクローナルな B 細胞の細胞増殖を促進してしまうため、自己抗体産生も誘導する<sup>124-126)</sup>。ヒトのナイーブ B 細胞には TLR4 や TLR9 の発現は見られず、これらのリガンドに対して全く応答性は見られない。しかしながら、血流を循環するメモリー B 細胞では TLR9 の発現が見られるようになり、CpG DNA に対しての応答性も見られる<sup>127)</sup>。ヒトの場合には、抗原感作を経て活性化し、分化・増殖したメモリー B 細胞のみに TLR の発現が誘導され、リガンド応答性が獲得されるのかもしれない。さらに、ヒトのメモリー B 細胞は CpG DNA で刺激することにより形質細胞に分化することが可能であり、抗原感作による一次免疫応答から数年が経過してからの再抗原感作であるにせよ、メモリー B 細胞の血中出现頻度に比例したレベルで抗原特異的抗体が産生可能である<sup>128)</sup>。このことは、生体において断続的にメモ

リー B 細胞が TLR を経て活性化されることが、ヒトの一生にわたる「免疫記憶」の維持において必要であることを示しているのかもしれない。

TLR が実際の抗体産生に直接的に作用するかどうかは依然不明であったが、最近、MyD88 と TRIF の両欠損マウスを使用し、抗原とアジュバントの両者を同時接種して特異抗体産生を調べたところ、正常マウスと同様に抗体産生が誘導されることが明らかにされた<sup>129)</sup>。従って TLR は直接的に抗体産生に関与する訳ではないと思われるが、一方、MyD88 欠損マウスでは、持続的な抗体産生が見られなくなり、また IgG2a/c サブクラス抗体の欠如や、IgA 産生の低下などが観察される<sup>130-132)</sup>。TLR はメモリー B 細胞の機能調節のみならず、B 細胞自身の寿命調節やクラススイッチにも影響している可能性がある。

## 6. TLR に認識される内在性リガンド

TLR は微生物に由来する PAMPs に加え、危険シグナルとして産生・放出された宿主由来の内在性因子も認識し、炎症性応答を引き起こすことが明らかになってきた<sup>7)</sup> (図 2)。これらの分子は死細胞や傷害組織、あるいは癌細胞や酸化ストレスなどによって産生され、細胞外マトリックスタンパク質の分解産物、熱

ショックタンパク質や HMGB1 (high mobility group box-1) などを含み、主に細胞表面型 TLR を刺激する。また、死細胞から遊離したクロマチン-DNA 複合体や snRNA や snoRNA が特定のタンパク質と結合したりボヌクレオプロテイン複合体、あるいは核酸を巻き込んだ自己抗原の免疫複合体などは、核酸認識型 TLR を刺激してしまい、結果的に自己免疫疾患の発症につながっていく。

### 6.1. 細胞表面型 TLR の内在性リガンド

炎症や組織傷害によって細胞死が誘導されると、細胞内に留まっていた細胞外マトリックスの構成タンパク質は細胞内プロテアーゼで分解され、最終的に細胞外へ放出される。放出された成分の中には、TLR2、TLR4 あるいはその両者によって認識されるものが存在し、パイグリカン<sup>133)</sup>、ヒアルロン酸断片<sup>134)</sup>、パーシカン<sup>135)</sup>やフィブロネクチンの細胞外ドメイン A 領域<sup>136)</sup>などが含まれる。パイグリカンは炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導するが、これは TLR2 と TLR4 の両者を欠損したマウスでは完全に消失する<sup>133)</sup>。パイグリカンの欠損マウスでは、ザイモサンや LPS によって誘導されるショックに対して強く抵抗性を示すようになり、また血中の TNF 濃度は低く保たれ、肺への炎症細胞の浸潤も少なくなる<sup>133)</sup>。このこ

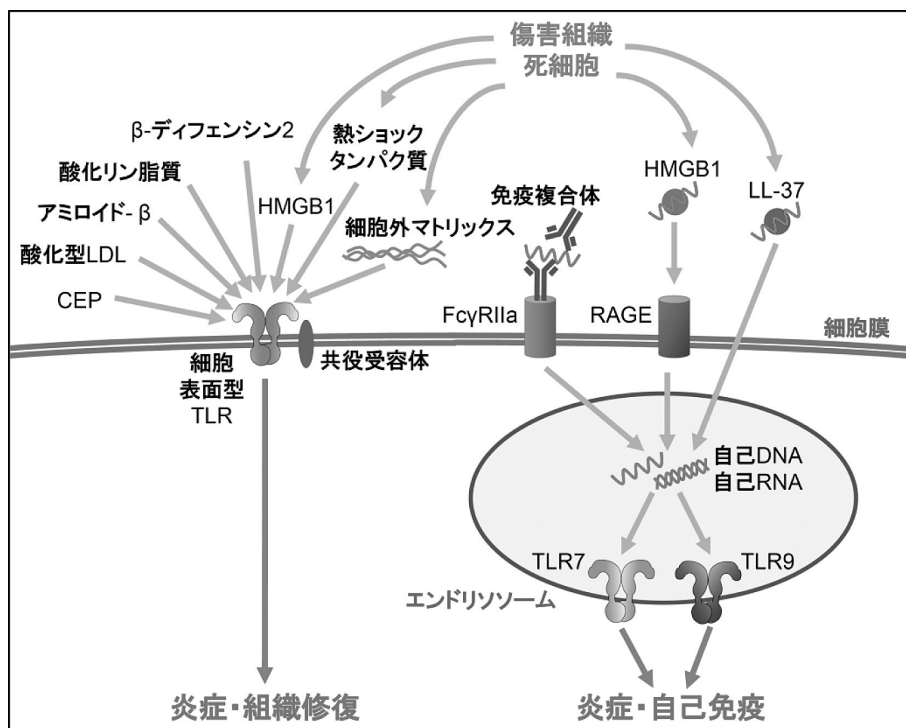


図2 TLR による内在性リガンドの認識。

TLR は PAMPs に加え、危険シグナルとして産生・放出された宿主由来の内在性因子を認識する。これらの分子は細胞表面型 TLR と核酸認識型 TLR の両者を刺激する。



とはバイグリカンが TLR2 や TLR4 で認識され、細菌感染時における肺組織の損傷をさらに増悪することを示唆している。ヒアルロン酸断片は肺の機能障害に伴って蓄積し、TLR2 と TLR4 で認識されてマクロファージを活性化する<sup>134)</sup>。しかしながら、マウスでヒアルロン酸による非感染性肺機能障害を誘導すると、TLR2 と TLR4 両者の欠損マウスでは、その生存率は逆に低下する<sup>134)</sup>。この場合、肺における炎症細胞の浸潤は減少するが、上皮細胞のアポトーシスが増加し、組織傷害の程度も増加する。従って TLR2 や TLR4 によるヒアルロン酸の認識は、炎症を誘導すると同時に組織修復も強く誘導していると考えられる。

HMGB1 や熱ショックタンパク質などの細胞内成分も TLR のリガンドとして機能する。核内の非ヒストン性タンパク質である HMGB1 は壊死細胞や炎症過程で放出され、菌血症におけるショックや虚血再還流時の炎症性メディエーターとして働く<sup>137)</sup>。HMGB1 は TLR2、TLR4 あるいは TLR9 によって認識される。HMGB1 中和抗体を用いると、マウスの虚血再還流実験モデルにおいて、組織損傷の程度を軽減させることができる<sup>138)</sup>。この実験モデルでは、TLR4 欠損でも組織損傷の程度が減少するため、少なくとも TLR4 は非感染性炎症応答で内在性リガンドを認識し、炎症応答を仲介することが伺える。HMGB タンパク質には、HMGB1 の他に、HMGB2 と HMGB3 が存在し、これらは全て細胞外で核酸と結合し、「核酸の見張り番」として、TLR などの核酸認識受容体が核酸を識別するために重要である<sup>139)</sup>。Hsp60、Hsp70、Hsp22 や gp96 などの熱ショックタンパク質は、マクロファージや樹状細胞において、TLR2、TLR4 あるいはその両者を介して炎症性メディエーターの産生を誘導する<sup>140,141)</sup>。

TLR による内在性リガンドの認識は、実際に炎症性疾患の発症に関与する。アテローム性動脈硬化症やアルツハイマー症のような非感染性の炎症性疾患では、酸化型 LDL やアミロイド  $\beta$  は TLR4 と TLR6 による二量体に認識され、炎症応答を引き起こす<sup>142)</sup>。この認識は CD36 を介して行われる。細胞外マトリックスプロテオグリカンであるバーシカン<sup>143)</sup>は、癌細胞から産生されて集積し、TLR2、TLR6 や CD14 による認識に依存し、癌組織に浸潤したミエロイド系免疫細胞を刺激して TNF の産生を誘導し、癌細胞の転移を促進させる<sup>135)</sup>。このようなバーシカンの認識は、組織内での炎症性環境を提供し、結果的に癌細胞の生存を支援すると考えられる。

TLR によって認識される内在性リガンドは、微生物感染でも産生・放出される。抗菌ペプチドである  $\beta$ -ディフェンシン 2 は、粘膜組織や皮膚における感染

に応答して速やかに産生され、侵入微生物を殺傷する。 $\beta$ -ディフェンシン 2 は樹状細胞の TLR4 を介して補助刺激因子の産生を誘導し、効率的に獲得免疫系を活性化するのに寄与する<sup>143)</sup>。H5N1 型インフルエンザウイルスは TLR4-TRIF 依存的に酸化リン脂質の産生を増加させ、急性肺傷害の原因となる<sup>144)</sup>。TLR4 または TRIF の欠損マウスでは、不活化した H5N1 型インフルエンザウイルスなどの接種による急性肺傷害は認められなくなる<sup>144,145)</sup>。

TLR4 による酸化ストレス応答は、急性肺傷害において重要な役割を果たすが、TLR2 もまた酸化ストレス応答に深く関与する。酸化ストレスで誘導される脂質の酸化は最終産物である  $\omega$ -2-カルボキシエチル-ピロール (CEP) の産生を誘導し、これは血管内皮細胞の TLR2 によって認識され、血管新生を誘導する<sup>146)</sup>。CEP は老化組織や癌組織などでその蓄積が観察される。酸化ストレス産物である CEP は創傷治癒などの生理学的役割を持つと考えられるが、癌組織での血管新生も誘導するため、バーシカンと同様の病理学的役割も担うと考えられる。

## 6.2. 核酸認識型 TLR の内在性リガンド

核酸認識型 TLR は通常は微生物の核酸を認識するが、場合によって自己核酸も認識してしまう。正常状態では、細胞外の自己核酸は血清中の核酸分解酵素によって分解されるため、細胞内での TLR による認識を受けず、自然免疫応答を誘導することはない。また核酸認識型 TLR が細胞内に局在することで、物理的に細胞外に存在する自己核酸から隔離し、その認識を防いでいる<sup>147)</sup>。これに加え、N 末端の切断による TLR9 や TLR7 の成熟化のプロセスも、細胞外に存在する自己核酸を不適切に認識しないために重要であると考えられる。しかしながら、これらの防衛機能は、重度の炎症や自己免疫疾患では破綻してしまう。例えば、自己核酸が LL-37 や HMGB1 などの内在性因子と複合体を形成した場合には、自己核酸は核酸分解酵素による分解を免れ、細胞内に取り込まれて TLR の認識を受け、自己免疫疾患の発症に寄与する<sup>148,149)</sup>。さらに TLR4 による LPS の認識は、TLR7 や TLR9 を小胞体からエンドソームへ移行させるため<sup>41)</sup>、感染症と関連した炎症は TLR7 や TLR9 による自己核酸の認識を促進することが示唆される。

全身性エリテマトーデス (SLE) では、自己核酸や核タンパク質に対する自己抗体が高濃度で検出される。I 型 IFN は SLE の重症度に強く反映するが、SLE 患者から採取した血清は、pDC に I 型 IFN の産生を誘導する<sup>150)</sup>。また自己核酸や核タンパク質と結合した自己抗体は、pDC 上の Fc $\gamma$ IIa 受容体と結合して細胞

内部に取り込まれ、TLR7やTLR9を含む細胞内小胞に運ばれて、I型IFNの産生を誘導する<sup>151, 152)</sup>。さらに、この免疫複合体は、B細胞受容体にも結合して細胞内に取り込まれ、TLRを活性化するため、最終的に自己抗体を産生するB細胞の活性化を助長する<sup>126, 153)</sup>。このようにpDCとB細胞のTLRは、自己免疫疾患の発症とその継続に寄与することになる。

カテリシジンファミリーに属する抗菌ペプチドLL-37は好中球やケラチノサイトから積極的に産生されるが、乾癬患者では、非常に高濃度のLL-37が疾患部皮膚で検出される<sup>148)</sup>。LL-37は壊死細胞から放出された自己DNAと結合して凝集化し、これがエンドサイトーシスによってpDCに取り込まれて早期エンドソームに残留し、TLR9を活性化する<sup>148)</sup>。LL-37は本来、TLR応答を強力に抑制する因子として働くため<sup>154)</sup>、これはpDCに特化した応答なのかもしれない。HMGB1は微生物のDNAに結合するが、自己DNAにも結合する。HMGB1とDNAの複合体は、細胞表面のRAGEに結合してエンドサイトーシスで取り込まれた後、早期エンドソームに運ばれてTLR9による認識を受け、pDCやB細胞を活性化する<sup>155)</sup>。

自己免疫疾患は自己核酸が適切に排除されない場合にも誘導される<sup>7)</sup>。血清DNase I遺伝子に変異が生じた場合、マウスでもヒトでもループス様の自己免疫疾患の発症が認められる<sup>156)</sup>。またライソゾームDNase IIの欠損マウスでは、マクロファージにおいて不完全に切断されたDNAの集積と血清中での高濃度のI型IFNやTNFが認められ、慢性多発性関節炎様の自己免疫疾患を発症する<sup>157)</sup>。またエキソヌクレアーゼであるTREX1<sup>158)</sup>やエンドヌクレアーゼであるFEN1<sup>159)</sup>の欠損でも自己免疫疾患を発症する。このような排除機構を免れた核酸がTLRを介して自己免疫疾患を引き起こすのかどうかは明確ではないが、細胞内での核酸認識機構が関与しているのは間違いないと思われる。

## 7. 結 語

TLRの発見から14年近くが経過し、この間に世界各国の研究者が様々な研究成果を報告してきたことにより、免疫系、あるいは生体内におけるTLRの機能と役割はかなり明確になってきた<sup>7)</sup>。TLRはPAMPsを認識することで、外来の脅威から宿主を防御する免疫応答を誘導するだけでなく、宿主内の異常を感知して排除・修復を試みるようである。また、近年次々に同定されてきた、非TLR型の細胞質型パターン認識受容体群もTLRと同様の役割を果たしていると考えられる。これは免疫系がそもそも、病原微生物感染や悪性腫瘍などの生体内の異常を常に感知し、異常があ

ればすみやかに生体を防御し、生体内を正常に保つしくみであることを省みれば、そこで自然免疫系が中心的な役割を担っていることは容易に理解できる。しかしながら、TLRによる生理学的な免疫調節機構が破綻した場合には、本来の役割は失われ、生体にとって刃として襲いかかる病理学的役割を担ってしまう。実際、自然免疫系の関与が明確な炎症性疾患は全身性から局所性のものまで多岐にわたっている。従って、健康な個体においては、いかに自然免疫系のバランスが厳密に制御され、生体の恒常性が維持されているかが伺い知れる。歯周病は局所性の炎症性疾患として捉えられ、TLRが上記のように病理学的な役割を担ってしまうものと考えられるが、おそらくはTLRによる歯周病関連細菌のPAMPsの認識だけでなく、内在性リガンドの認識も病態形成に深く関与すると予測される。これについての知見はまだ得られおらず、口腔領域におけるTLR研究はまだまだ発展途上ではあるが、これまでに得られているエビデンスを厳密に検証して考察していくことで、一旦は病理学的な役割を担ってしまったTLRを元の生理学的な役割へ引き戻す方法論が得られる可能性があるのかもしれない。また、このような免疫系の制御こそが効果的な歯周組織再生への近道なのかもしれない。これを期待しながら、そしてTLRに関連したさらなる研究成果を期待しながら、本稿を完結させていただきたい。

## 謝 辞

本総説は朝日大学ならびに日本私立学校振興・共済事業団から支援された、2010年度学術研究振興資金によって執筆されており、ここに厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-397.
- 2) Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124: 783-801.
- 3) Janeway CA Jr and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216.
- 4) Chuang T-H and Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1518: 157-161.
- 5) Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA and Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune de-

- fense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 3516-3521.
- 6) Jin MS and Lee JO. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*. 2008; 29: 182-191.
  - 7) Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11: 373-384.
  - 8) Asai Y, Ohyama Y, Gen K and Ogawa T. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2001; 69: 7387-7395.
  - 9) 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*. 2002; 169: 10-14.
  - 10) Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K and Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 2001; 13: 933-940.
  - 11) Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H and Lee JO. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007; 130: 1071-1082.
  - 12) Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG and Lee JO. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*. 2009; 31: 873-884.
  - 13) Shibata K, Hasebe A, Into T, Yamada M and Watanabe T. The N-terminal lipopeptide of 44-kDa membranebound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal gingival fibroblasts. *J Immunol*. 2000; 165: 6538-6544.
  - 14) Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U and Beutler B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005; 433: 523-527.
  - 15) Barbalat R, Lau L, Locksley RM and Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol*. 2009; 10: 1200-1207.
  - 16) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ and Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990; 249: 1431-1433.
  - 17) Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M and Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*. 2002; 3: 667-672.
  - 18) Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ and Lee JO. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 2007; 130: 906-917.
  - 19) Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H and Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458: 1191-1195.
  - 20) Schröder NW, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, Hamann L, Göbel UB and Schumann RR. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol*. 2004; 173: 2683-2691.
  - 21) Bainbridge BW and Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand*. 2001; 59: 131-138.
  - 22) 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 receptor5. *Nature*. 2001; 410: 1099-1103.
  - 23) Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ and Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor5. *Nat Immunol*. 2008; 9: 769-776.
  - 24) Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA and Ghosh S. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004; 303: 1522-1526.
  - 25) Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S and Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005; 308: 1626-1629.
  - 26) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001; 413: 732-738.
  - 27) Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM and Davies DR. Structural basis of Toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*. 2008; 320: 379-381.
  - 28) Choe J, Kelker MS and Wilson IA. Crystal structure of human Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*. 2005; 309: 581-585.
  - 29) Kawai T and Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006; 7: 131-137.
  - 30) Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S,



- Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Karikó K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW and Ambati J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*. 2008; 452: 591-597.
- 31) Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chappier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Héron B, Vallée L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L and Casanova JL. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 2007; 317: 1522-1527.
  - 32) Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K and Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7-MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002; 3: 196-200.
  - 33) 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*. 2004; 303: 1529-1531.
  - 34) Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S and Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*. 2005; 11: 263-270.
  - 35) Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N and Iwasaki A. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Science*. 2007; 315: 1398-1401.
  - 36) Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, Teti G and Beninati C. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009; 10: 587-594.
  - 37) 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*. 2004; 303: 1526-1529.
  - 38) 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*. 2000; 408: 740-745.
  - 39) Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T and Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med*. 2005; 201: 19-25.
  - 40) Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H and Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 2987-2997.
  - 41) Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME and Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing Toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 2008; 452: 234-238.
  - 42) Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits AA, Portnoy DA, Cooke M, Tarantino LM, Wiltshire T, Steinberg BE, Grinstein S and Beutler B. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol*. 2006; 7: 156-164.
  - 43) Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL and Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol*. 2007; 177: 265-275.
  - 44) Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Sénéchal B, Geissmann F, Tabeta K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Héron B, Mignot C, de Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L and Casanova JL. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC93B deficiency. *Nat Immunol*. 2006; 7: 156-164.
  - 45) Kiyokawa T, Akashi-Takamura S, Shibata T, Matsumoto F, Nishitani C, Kuroki Y, Seto Y and Miyake K. A single base mutation in the PRAT4A gene reveals differential interaction of PRAT4A with Toll-like receptors. *Int Immunol*. 2008; 20: 1407-1415.
  - 46) Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, Kiyokawa T, Wakabayashi Y, Tanimura N, Kobayashi T, Matsumoto F, Fukui R, Kouro T, Nagai Y, Takatsu K, Saitoh S and Miyake K. A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J Exp Med*. 2007; 204: 2963-2976.
  - 47) Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Le François L and Li Z. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for Toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*. 2007; 26: 215-226.
  - 48) Liu B, Yang Y, Qiu Z, Staron M, Hong F, Li Y, Wu S, Li Y, Hao B, Bona R, Han D and Li Z. Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun*. 2010; 1: e79.

- 49) Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA and Barton GM. The ectodomain of Toll-like receptor9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*. 2008; 456: 658-662.
- 50) Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM and Ploegh HL. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor9. *Nat Immunol*. 2008; 9: 1407-1414.
- 51) Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, Nishikawa K, Latz E, Golenbock DT, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y, Miyazono K, Kato S, Saftig P and Takayanagi H. Cathepsin K-dependent Toll-like receptor9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science*. 2008; 319: 624-627.
- 52) Zhou Q and Amar S. Identification of signaling pathways in macrophage exposed to *Porphyromonas gingivalis* or to its purified cell wall components. *J Immunol*. 2007; 179: 7777-7790.
- 53) Muzio M, Ni J, Feng P and Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 1997; 278: 1612-1615.
- 54) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S and Janeway CA Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998; 2: 253-258.
- 55) 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*. 2003; 301: 640-643.
- 56) Kagan JC and Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2006; 125: 943-955.
- 57) Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S and Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nat Immunol*. 2008; 9: 361-368.
- 58) Hultmark D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 199: 144-146.
- 59) Lin SC, Lo YC and Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010; 465: 885-890.
- 60) Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O and Akira S. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol*. 2008; 9: 684-691.
- 61) Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C and Chen ZJ. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 2000; 103: 351-361.
- 62) Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J and Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001; 412: 346-351.
- 63) Bhoj VG and Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*. 2009; 458: 430-437.
- 64) Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O and Akira S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol*. 2006; 7: 962-970.
- 65) Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, Kensche T, Uejima T, Bloor S, Komander D, Randow F, Wakatsuki S and Dikic I. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- $\kappa$ B activation. *Cell*. 2009; 136: 1098-1109.
- 66) Xia ZP, Sun L, Chen X, Pineda G, Jiang X, Adhikari A, Zeng W and Chen ZJ. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature*. 2009; 461: 114-119.
- 67) Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K and Akira S. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ . *Nature*. 2004; 430: 218-222.
- 68) Litvak V, Ramsey SA, Rust AG, Zak DE, Kennedy KA, Lampano AE, Nykter M, Shmulevich I and Aderem A. Function of C/EBP $\delta$  in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat Immunol*. 2009; 10: 437-443.
- 69) Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Roach JC, Kennedy K, Hai T, Bolouri H and Aderem A. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2006; 441: 173-178.
- 70) von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Sirvent N, Guedes M, Vitor AB, Herrero-Mata MJ, Aróstegui JI, Rodrigo C, Alsina L, Ruiz-Ortiz E, Juan M, Fortuny C, Yagüe J, Antón J, Pascal M, Chang HH, Janniere L, Rose Y, Garty BZ, Chapel H, Issekutz A, Maródi L, Rodriguez-Gallego C, Banchereau J, Abel L, Li X, Chaussabel D, Puel A and Casanova JL. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008; 321: 691-696.
- 71) Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K and Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and

- TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- $\kappa$ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2003; 171: 4304-4310.
- 72) Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M and Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nat Immunol.* 2004; 5: 503-507.
  - 73) Chang M, Jin W and Sun SC. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol.* 2009; 10: 1089-1095.
  - 74) Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermöhlen O, Kranidioti K, Kollias G, Tschopp J and Pasparakis M. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2008; 9: 1037-1046.
  - 75) Häcker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Häcker G, Mann M and Karin M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature.* 2006; 439: 204-207.
  - 76) Tseng PH, Matsuzawa A, Zhang W, Mino T, Vignali DA and Karin M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol.* 2010; 11: 70-75.
  - 77) Wang C, Chen T, Zhang J, Yang M, Li N, Xu X and Cao X. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nat Immunol.* 2009; 10: 744-752.
  - 78) Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R and Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med.* 2003; 197: 263-268.
  - 79) Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R and Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2002; 110: 191-202.
  - 80) Kawagoe T, Takeuchi O, Takabatake Y, Kato H, Isaka Y, Tsujimura T and Akira S. TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nat Immunol.* 2009; 10: 965-972.
  - 81) Zhang G and Ghosh S. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem.* 2002; 277: 7059-7065.
  - 82) Ma Y, Liu H, Tu-Rapp H, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Cole SM and Pope RM. Fas ligation on macrophages enhances IL-1 R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation. *Nat Immunol.* 2004; 5: 380-387.
  - 83) Liew FY, Xu D, Brint EK and O'Neill LA. Native regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 446-458.
  - 84) An H, Hou J, Zhou J, Zhao W, Xu H, Zheng Y, Yu Y, Liu S and Cao X. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat Immunol.* 2008; 9: 542-550.
  - 85) Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, Nicholson SE, Hilton DJ, O'Neill LA and Hertzog PJ. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol.* 2006; 7: 148-155.
  - 86) Chuang TH and Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2004; 5: 495-502.
  - 87) Shi M, Deng W, Bi E, Mao K, Ji Y, Lin G, Wu X, Tao Z, Li Z, Cai X, Sun S, Xiang C and Sun B. TRIM30 $\alpha$  negatively regulates TLR-mediated NF- $\kappa$ B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol.* 2008; 9: 369-377.
  - 88) Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C and Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol.* 2004; 5: 1052-1060.
  - 89) Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D and Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- $\kappa$ B signalling by deubiquitination. *Nature.* 2003; 424: 801-805.
  - 90) Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, O'Rourke KM, Eby M, Pietras E, Cheng G, Bazan JF, Zhang Z, Arnott D and Dixit VM. DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science.* 2007; 318: 1628-1632.
  - 91) Dai R, Phillips RA, Zhang Y, Khan D, Crasta O and Ahmed SA. Suppression of LPS-induced interferon- $\gamma$  and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. *Blood.* 2008; 112: 4591-4597.
  - 92) Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA, Matesic LE and Harhaj EW. The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol.* 2008; 9: 254-262.
  - 93) Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP and Ma A. Failure to regulate TNF-induced NF- $\kappa$ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science.* 2000; 289: 2350-2354.



- 94) Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsumatsu O, Advincula R, Lee B, Shifrin N, Malynn BA and Ma A. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J Exp Med.* 2008; 205: 451-464.
- 95) Croker BA, Lawson BR, Rutschmann S, Berger M, Eidenschenk C, Blasius AL, Moresco EM, Sovath S, Cengia L, Shultz LD, Theofilopoulos AN, Pettersson S and Beutler BA. Inflammation and autoimmunity caused by a SHP1 mutation depend on IL-1, MyD88, and a microbial trigger. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 15028-15033.
- 96) Into T, Inomata M, Niida S, Murakami Y and Shibata K. Regulation of MyD88 aggregation and the MyD88-dependent signaling pathway by sequestosome 1 and histone deacetylase 6. *J Biol Chem.* 2010; 285: 35759-35769.
- 97) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häslér R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M and Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007; 39: 207-211.
- 98) Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS and Virgin HW 4th. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 2008; 456: 259-263.
- 99) Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Saitoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T and Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature.* 2008; 456: 264-268.
- 100) Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, Jeffrey KL, Anthony RM, Kluger C, Nchinda G, Koh H, Rodriguez A, Idoyaga J, Pack M, Velinzon K, Park CG and Steinman RM. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209<sup>+</sup> dendritic cells for immune T cell areas. *Cell.* 2010; 143: 416-429.
- 101) Iwasaki A and Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004; 5: 987-995.
- 102) Akira S, Takeda K and Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2: 675-680.
- 103) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T and Pulendran B. Different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol.* 2003; 171: 4984-4989.
- 104) Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S and Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001; 2: 947-950.
- 105) Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 133-146.
- 106) Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G and Gerosa F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper17 response in humans. *Immunol Rev.* 2008; 226: 112-131.
- 107) Pulendran B and Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell.* 2006; 124: 849-863.
- 108) Suttmüller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG and Adema GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2006; 116: 485-494.
- 109) Jotwani R, Pulendran B, Agrawal S and Cutler CW. Human dendritic cells respond to *Porphyromonas gingivalis* LPS by promoting a Th2 effector response *in vitro*. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 2980-2986.
- 110) Kiura K, Kataoka H, Yasuda M, Inoue N and Shibata K. The diacylated lipopeptide FSL-1 induces TLR2-mediated Th2 responses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 48: 44-55.
- 111) Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S and Pulendran B. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses *in vivo*, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol.* 2004; 172: 4733-4743.
- 112) Manicassamy S, Ravindran R, Deng J, Oluoch H, Denning TL, Kasturi SP, Rosenthal KM, Evavold BD and Pulendran B. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat Med.* 2009; 15: 401-409.
- 113) Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasprowitz DJ, Kellar K, Pare J, van Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D and Pulendran B. Yeast zymosan, a stimulus for TLR 2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest.* 2006; 116: 916-928.
- 114) Malherbe L, Mark L, Fazilleau N, McHeyzer-Williams

- LJ and McHeyzer-Williams MG. Vaccine adjuvants alter TCR-based selection thresholds. *Immunity*. 2008; 28: 698-709.
- 115) Mercier BC, Cottalorda A, Coupet CA, Marvel J and Bonnefoy-Bérard N. TLR2 engagement on CD8 T cells enables generation of functional memory cells in response to a suboptimal TCR signal. *J Immunol*. 2009; 182: 1860-1867.
- 116) Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P and Tough DF. Cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol*. 2003; 4: 1009-1015.
- 117) Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM and Steinman RM. *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*. 2004; 199: 815-824.
- 118) Zhou S, Kurt-Jones EA, Mandell L, Cerny A, Chan M, Golenbock DT and Finberg RW. MyD88 is critical for the development of innate and adaptive immunity during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 822-830.
- 119) Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, Akira S, Ahmed R and Pulendran B. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006; 203: 413-424.
- 120) Wilson NS, Behrens GM, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, Forehan SP, Mount A, Steptoe RJ, Shortman KD, de Koning-Ward TF, Belz GT, Carbone FR, Crabb BS, Heath WR and Villadangos JA. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol*. 2006; 7: 165-172.
- 121) Crompton PD, Mircetic M, Weiss G, Baughman A, Huang CY, Topham DJ, Treanor JJ, Sanz I, Lee FE, Durbin AP, Miura K, Narum DL, Ellis RD, Malkin E, Mullen GE, Miller LH, Martin LB and Pierce SK. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naïve individuals. *J Immunol*. 2009; 182: 3318-3326.
- 122) Pasare C and Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 2005; 438: 364-368.
- 123) Whitlock CA and Watson JD. B-cell differentiation in the CBA/N mouse. I. Slower maturation of mitogen and antigen-responsive B cells in mice expressing an X-linked defect. *J Exp Med*. 1979; 150: 1483-1497.
- 124) Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ and Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 2002; 416: 603-607.
- 125) Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ, Smyth MJ, Mackay CR and Mackay F. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med*. 2007; 204: 1959-1971.
- 126) Herlends RA, Christensen SR, Sweet RA, Hershberg U and Shlomchik MJ. T cell-independent and Toll-like receptor-dependent antigen-driven activation of autoreactive B cells. *Immunity*. 2008; 29: 249-260.
- 127) Bernasconi NL, Onai N and Lanzavecchia A. role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*. 2003; 101: 4500-4504.
- 128) Bernasconi NL, Traggiai E and Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002; 298: 2199-2202.
- 129) Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B and Nemazee D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of Toll-like receptor signaling. *Science*. 2006; 314: 1936-1938.
- 130) He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, Shan M, Xiong H, Bussell JB, Chiu A, Puel A, Reichenbach J, Marodi L, Dörfinger R, Vasconcelos J, Issekutz A, Krause J, Davies G, Li X, Grimbacher B, Plebani A, Meffre E, Picard C, Cunningham-Rundles C, Casanova JL and Cerutti A. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol*. 2010; 11: 836-845.
- 131) Guay HM, Andreyeva TA, Garcea RL, Welsh RM and Szomolanyi-Tsuda E. MyD88 is required for the formation of long-term humoral immunity to virus infection. *J Immunol*. 2007; 178: 5124-5131.
- 132) Geeraedts F, Goutagny N, Hornung V, Severa M, de Haan A, Pool J, Wilschut J, Fitzgerald KA and Huckriede A. Superior immunogenicity of inactivated whole virus H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signalling. *PLoS Pathog*. 2008; 4: e1000138.
- 133) Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, Malle E, Schaefer RM and Gröne HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2223-2233.
- 134) Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R and Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. 2005; 11:

- 1173-1179.
- 135) Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL and Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 2009; 457: 102-106.
  - 136) Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC and Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001; 276: 10229-10233.
  - 137) Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R and Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28: 367-388.
  - 138) Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, Stolz DB, Geller DA, Rosengart MR and Billiar TR. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med*. 2007; 204: 2913-2923.
  - 139) Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, Savitsky D, Ronfani L, Akira S, Bianchi ME, Honda K, Tamura T, Kodama T and Taniguchi T. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*. 2009; 462: 99-103.
  - 140) Kirschning CJ and Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002; 270: 121-144.
  - 141) Tsan MF and Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*. 2009; 85: 905-910.
  - 142) Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT and Moore KJ. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010; 11: 155-161.
  - 143) Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ and Kwak LW. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin2. *Science*. 2002; 298: 1025-1029.
  - 144) Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, Ermolaeva M, Veldhuizen R, Leung YH, Wang H, Liu H, Sun Y, Pasparakis M, Kopf M, Mech C, Bavari S, Peiris JS, Slutsky AS, Akira S, Hultqvist M, Holmdahl R, Nicholls J, Jiang C, Binder CJ and Penninger JM. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 2008; 133: 235-249.
  - 145) Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C and Penninger JM. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005; 11: 875-879.
  - 146) West XZ, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, Podrez EA, Salomon RG and Byzova TV. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature*. 2010; 467: 972-976.
  - 147) Barton GM, Kagan JC and Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006; 7: 49-56.
  - 148) Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder JM, Liu YJ and Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007; 449: 564-569.
  - 149) Urbanaviciute V, Fürnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, Bianchi ME, Kirschning C, Wagner H, Manfredi AA, Kalden JR, Schett G, Rovere-Querini P, Herrmann M and Voll RE. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*. 2008; 205: 3007-3018.
  - 150) Guiducci C, Gong M, Xu Z, Gill M, Chaussabel D, Meeker T, Chan JH, Wright T, Punaro M, Bolland S, Soumelis V, Banchereau J, Coffman RL, Pascual V and Barrat FJ. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*. 2010; 465: 937-941.
  - 151) Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT and Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest*. 2005; 115: 407-417.
  - 152) Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S and Krieg AM. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med*. 2005; 202: 1575-1585.
  - 153) Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ and Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*. 2003; 19: 837-847.
  - 154) Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS and Hancock RE. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol*. 2006; 176: 2455-2464.



- 155) Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA and Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007; 8: 487-496.
- 156) Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M and Kuroda Y. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2001; 28: 313-314.
- 157) Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, Yoshikawa H and Nagata S. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature.* 2006; 443: 998-1002.
- 158) Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA, de Silva U, Bailey SL, Witte T, Vyse TJ, Kere J, Pfeiffer C, Harvey S, Wong A, Koskenmies S, Hummel O, Rohde K, Schmidt RE, Dominiczak AF, Gahr M, Hollis T, Perrino FW, Lieberman J and Hübner N. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2007; 39: 1065-1067.
- 159) Zheng L, Dai H, Zhou M, Li M, Singh P, Qiu J, Tsark W, Huang Q, Kernstine K, Zhang X, Lin D and Shen B. Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nat Med.* 2007; 13: 812-819.