

総 説

非感染性炎症を惹起するダメージ関連分子パターン (DAMP)

引 頭 毅

Sterile inflammation induced by damage-associated molecular patterns (DAMPs)

INTO TAKESHI

病原体が組織に感染を起こすと、自然免疫系は病原体の存在をパターン認識受容体 (PRR) を使って感知し、炎症反応を誘導して病原体の排除や組織の修復を進めていく。一方、病原体の存在が無い、いわゆる「非感染性炎症」の場合でも PRR による自然免疫系の認識機構が重要な役割を果たしている。近年、自然免疫系による認識を受けて炎症反応を惹起する内因性分子が次々と同定されており、「ダメージ関連分子パターン (DAMP)」と呼ばれている。その機能や役割に関して、免疫学的、生理学的、あるいは病理学的意義について注目が集まっている。DAMP として働く分子の多くは通常、組織中や細胞内に格納されており、PRR による認識から物理的に隔離されている。DAMP の放出・遊離はストレスや損傷による組織障害、あるいは細胞破壊や細胞死に伴い、組織中や細胞内の空間から二次的に生じてくる。DAMP は生体の危機を知らせる「危険シグナル」として生理学的に重要な役割をもつだけでなく、過剰な DAMP の生成は炎症を慢性化させ、あるいは生命を脅かすような炎症反応を引き起こすこともあり、病理学的にも重要な意味を持っている。本総説では DAMP の由来と生成機序、PRR による認識機構、誘導されるシグナル伝達経路について、著者が最近報告した歯周病に関連する DAMP である γ -GTP の知見も含めて概説しながら非感染性炎症との関連性について考えていきたい。

キーワード：非感染性炎症、ダメージ関連分子パターン、病原体関連分子パターン、パターン認識受容体、危険シグナル

When host tissues suffer infections caused by pathogens, the innate immune system senses their presence through pattern recognition receptors (PRRs), and subsequently, initiates inflammatory responses whereby pathogen exclusion and tissue repair can be promoted. Additionally, the recognition mechanism of the innate immune system involving PRRs also plays an important role in "sterile inflammation" that occurs in the absence of pathogens. In recent years, various endogenous molecules that induce inflammatory responses following recognition by the innate immune system have been identified, and are called damage-associated molecular patterns (DAMPs). Considerable attention has been focused on their functions and roles in inflammatory responses to investigate their immunological, physiological, or pathological significance. Most of the molecules acting as DAMPs are normally stored within tissues or cells, and therefore, they are physically isolated from PRR recognition. DAMP release from tissues and intracellular spaces occurs when tissues and cells are damaged by tissue stressors/injury and cell destruction/death, respectively. Thus, DAMPs have physiological functions as "danger signals" to inform the crisis of organisms. Moreover, excessive DAMP generation exerts pathological effects, and causes chronic inflammation or severe life-threatening inflammatory reactions. In this review, I will describe advances in the understanding of the origin and generation of DAMPs, their recognition by PRRs, and downstream signaling pathways, and include our finding on γ -GTP, acting as a periodontal disease-associated DAMP; thus, I will discuss the relevance of DAMP generation to the onset of sterile inflammation.

1. 緒言

組織が細菌や真菌などの病原体による感染を受けたり、あるいは外傷などで損傷した場合、循環障害や組織液滲出、変性などの病的変化を伴って組織異常が起こる。炎症反応とは、病原体の存在や組織の病的変化を察知し、原因を取り除いて異常を修復しようとする一連の免疫学的・脈管学的生体防御反応を指す^{1,3)}。

病原体に対する初期の炎症反応では、自然免疫機構が活性化されて感染部位に好中球やマクロファージなどの炎症細胞が動員され、これらが産生する様々なサイトカインやケモカインが介在しながら病原体の排除が進められる¹⁾。この際、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) やインターロイキン- 1β (IL- 1β)、IL-6などの炎症性サイトカインの働きにより発赤、腫脹、疼痛、熱感などが誘導され、生体の恒常性にとって一見不利益な応答が惹起されるが、これらはあくまで感染に対する生体防御反応である。一方、感染性の病原体が存在しない場合に誘導される炎症反応はその性質上「非感染性炎症 (sterile inflammation)」と呼ばれる⁴⁾。例えば、外傷や打撲、心筋梗塞や脳卒中で見られる虚血再灌流障害、アテローム性動脈硬化症、痛風、種々の自己免疫疾患、極度の温度差や有害化学物質による組織損傷、あるいは悪性腫瘍等で起こる炎症反応はこれに相当する。非感染性炎症の場合も組織に好中球やマクロファージなどの炎症細胞の動員が起こり、炎症性サイトカインやケモカインの産生が誘導される。すなわち、病原体の有無に関わらず類似した、あるいは全く共通のメカニズムを介して炎症反応が誘導されている。

病原体に対する炎症反応は自然免疫系が病原体の構成要素を認識することで開始される⁵⁾。つまり、外因性の「非自己分子」を認識して排除しようとする生体防御反応であり、免疫本来の性質として理に適っている。一方、非感染性炎症の場合にも同様の自然免疫機構による認識機構が働くことになるが、この場合、損傷組織や死細胞から放出・遊離する内因性の「自己分子」が炎症反応を惹起する^{6,7)}。近年、自然免疫系を刺激して炎症反応を惹起する内因性分子が次々と同定されており、その機能や役割とともにこのメカニズムの免疫学的、生理学的、あるいは病理学的意義について注目が集まっている^{6,8)}。

組織に感染した病原体は組織液中の抗菌因子、自然抗体や補体、あるいは好中球などの免疫細胞によって

攻撃を受ける。これにより病原体は破壊され、構成成分が遊離することになる。自然免疫系は病原体がもつ特徴的な構成成分を「パターン認識受容体 (pattern recognition receptor; PRR)」を使って「分子パターン」として認識する⁹⁾。その後、PRRを発現する免疫細胞や組織構成細胞でPRR下流の細胞内シグナル伝達が活性化され、サイトカインやケモカインの産生の誘導を伴って、炎症反応や感染防御反応が誘導される。現在PRRには5つのクラスが存在が明らかになっている⁹⁾。最も良く知られているのはToll様受容体 (TLR) であり、様々なタイプの細胞で細胞表層またはエンドソームに発現している⁸⁾。その他、細胞質内に局在するNOD様受容体 (NLR)、RIG-I様受容体 (RLR)、AIM2様受容体 (ALR)、そして細胞膜に発現するC型レクチン様受容体 (CLR) が知られている。PRRで認識される病原体の分子パターンは「病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular pattern; PAMP)」とよばれ、PRRのリガンドとして直接的に会合して作用する。一方、非感染性炎症反応の場合、組織ストレスや損傷、細胞の損傷や細胞死などに伴って内因性分子が放出・遊離することで誘導され、これら内因性分子もPRRによる認識を受ける^{4,6)}。これらの因子はPAMPの名称に倣って「ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular pattern; DAMP)」と呼ばれている。DAMPはアラミン (alarmin) の名称で呼ばれることもある¹⁰⁾。

DAMPは組織の危機を知らせる「危険シグナル」として生理学的に重要な役割をもつだけでなく、過剰なDAMPの生成は炎症を慢性化させたり、あるいは生命を脅かすような炎症反応を引き起こすなど、病理学的にも重要な意味を持っている^{4,6,7)}。またDAMPは特定の疾患の進行や重症度を示すマーカーとして有用である可能性もある。近年、DAMPのような内因性の危険シグナルが免疫応答において重要な要素として作用している可能性が示唆されている^{4,6)}。この10年間でDAMPの種類と生成機序、DAMPのパターン認識を担う受容体や下流のシグナル伝達経路もかなり同定されてきた。このような背景から、DAMPやDAMPの受容体をターゲットとした戦略は非感染性炎症の効果的治療法として有望である可能性も考えられている。

本総説ではDAMPの由来と生成機序、PRRによる認識機構、誘導されるシグナル伝達経路について解説

しながら、非感染性炎症との関連性について、最近著者が報告した新しい知見も含めて概説していきたい。非感染性炎症はアスベストなどの珪酸化合物類、あるいはアルミニウムなどの金属類でも惹起されるが、本稿では取り扱わないため他の文献等を参照していただければ幸いである。

2. DAMP の種類, 由来と性質

DAMP の放出・遊離はストレスや損傷による組織崩壊、あるいは細胞破壊や細胞死に伴い、組織中や細胞内の空間から二次的に生じてくる (図1)。つまり DAMP は通常条件では、組織中では細胞外マトリッ

クスタンパク質の一部として、あるいは細胞内では細胞内小器官内などに格納されていることで、PRR による認識から物理的に隔離されている^{4,6,7)}。これは PAMP と類似しており、PAMP は通常、PRR と会合する部位が病原体内部に格納されており、免疫系の攻撃を受けて損傷したり、あるいは寿命によって死を迎え溶菌したりしない限り、PRR による認識を受けない。例えば、グラム陰性菌が有する代表的な PAMP であるリポポリサッカライド (LPS) は TLR4 のリガンドとして作用するが、LPS の構造中で TLR4 と直接会合するリポド A 領域は通常、菌体外膜に埋没している^{5,11)}。

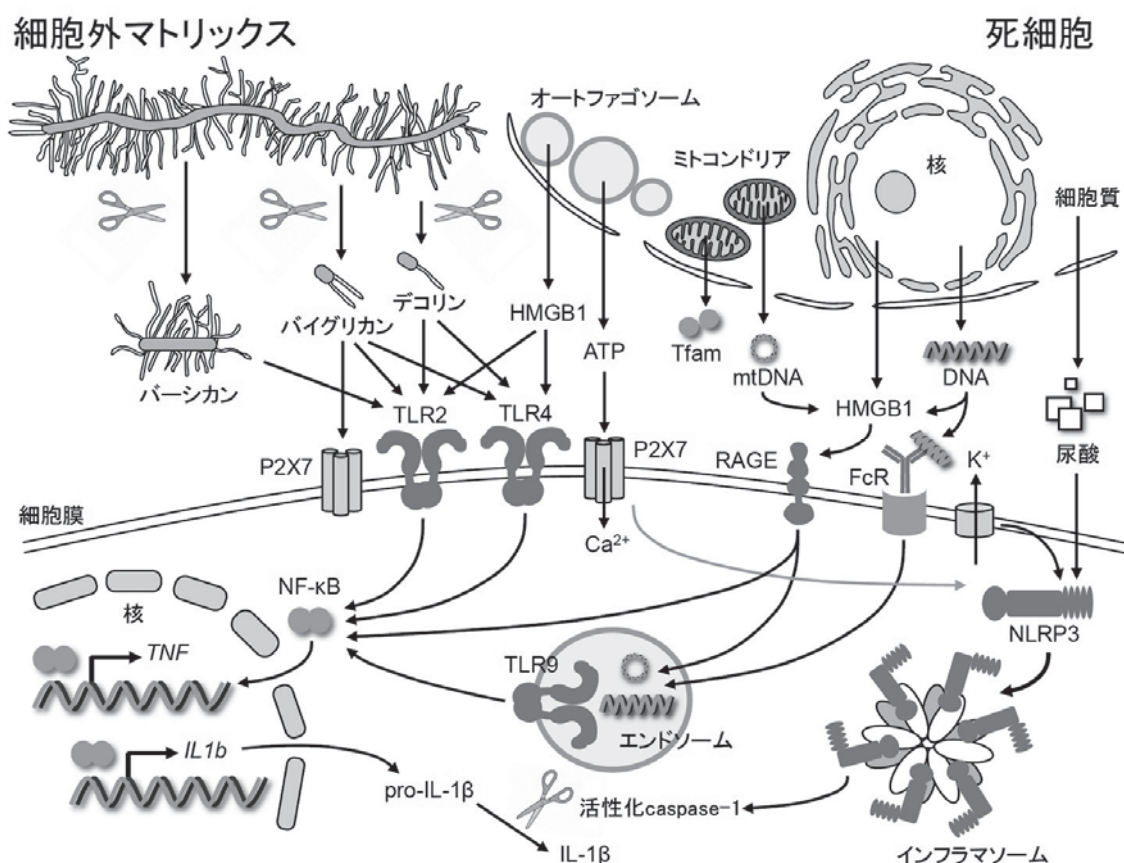


図1. ECM または細胞から放出・遊離される DAMP と PRR による認識機構。

DAMP として機能する分子は活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) のような小さな分子から 1,000kDa 以上の大きな分子量をもつタンパク質、あるいは細胞内小器官そのものも含まれ、DAMP の分子構造や本来もっている生化学的性質は多種多様である⁶⁾。基本的に DAMP はその由来と生化学的性質に基づいて分類される。DAMP は構造的多様性から

PRR との間で多様な親和性をもっており、また PRR による PAMP の認識時には起こり得ないような PRR 間のクロストークを誘導することもある^{6,8)}。

2.1. 細胞外マトリックス (ECM) 由来の DAMP

ECM は通常、細胞外の空間を充填する物質であると同時に細胞接着における足場の役割、細胞増殖因子

やケモカインなどを結合して保持・提供する役割、基底膜の構成成分としての役割、さらに軟骨や骨での骨格的役割など生体組織の恒常性を維持する重要な役割を担っている。一部のECM分子は組織損傷後にタンパク質分解に依存的にECM断片を放出し、これがDAMPとして作用する(図1)。タンパク質分解を起こすプロテアーゼは好中球や活性化マクロファージのみならず、様々な組織構成細胞からも産生される。ECM断片の一部はPRRに作用して急性炎症反応の開始に関与する^{6,12)}。

プロテオグリカン(PG)は最も研究が進められているECM由来のDAMPである¹²⁾。PGはコアタンパク質に種々多様なグリコサミノグリカンの側鎖が多数結合した複雑な構造を有している。一部のPGには、PRRと相互作用してリガンドとして作用し、あるいはPRR間のシグナル伝達のクロストークを誘導するポテンシャルがある¹³⁾(図1)。

コンドロイチン硫酸PGの一種バイグリカンや、デルマトン硫酸PGの一種デコリンは、PGに対してマトリックスメタロプロテアーゼ-2(MMP-2)、MMP-3、MMP-13、BMP-1、およびグランザイムBなどのプロテアーゼが作用することで遊離してくる¹⁴⁾。バイグリカンは38kDaのコアタンパク質に二本のコンドロイチン硫酸またはデルマトン硫酸側鎖を持つものに対し、デコリンは36kDaのコアタンパク質にデルマトン硫酸側鎖を一本持っている。バイグリカンとデコリンは、ともにスモール・ロイシンリッチPG(small leucine-rich proteoglycan; SLRP)ファミリーに分類される分子であるが、両者ともTLR2とTLR4の内因性リガンドとして作用し、非感染性炎症応答を誘発する^{15,16)}。さらに、バイグリカンはTLR2・TLR4とATP受容体P2X7との相互作用をもたらし、後述のインフラマソーム活性化経路を介してpro-IL-1 β の合成とIL-1 β への成熟化をもたらし¹⁷⁾。従って、バイグリカンとデコリンはともにTLRのリガンドとして働くSLRP分子ではあるが、誘発する炎症応答は異なったものになる。一方、SLRPファミリーに属するケラタン硫酸PGであるルミカンの場合、DAMPとは異なった活性を有しており、LPSに結合し、TLRの補助受容体CD14へLPSを会合させる役割を果たす¹⁸⁾。

パーシカンは広範な組織分布を示す分子量1,000kDa以上の大型のコンドロイチン硫酸PGであり、グリコサミノグリカン側鎖を12~16本持っている。コアタンパク質の分子量は~500kDaであり、ヒアルロン酸やレクチンへの結合能を持っている。パーシカンはTLR2/TLR6ヘテロ二量体とCD14に対するリガンドとして作用し、この活性によって悪性腫瘍の転移促進に関与する¹⁹⁾。

基底膜を構成するヘパラン硫酸PGであるパルカン、細胞膜貫通型のヘパラン硫酸PGであるシンデカン、およびグリコシルホスファチジルイノシトールアンカーを介して細胞膜に結合するヘパラン硫酸PGであるグリピカンなどにヘパラーゼ-1が作用すると活性型ヘパラン硫酸が遊離し、これはTLR4で認識されるDAMPとなる^{6,20)}。

ヒアルロン酸はコアタンパク質と共有結合していない非硫酸化グリコサミノグリカンであるが、ヒアルロニダーゼによって切断を受けて低分子量化されるとDAMPとして作用する²¹⁾。生成された低分子量ヒアルロン酸断片は、TLR2・TLR4のリガンドとして作用し、炎症関連遺伝子の発現を刺激することで悪性腫瘍において血管新生や転移を促進することが報告されている^{21,22)}。

その他、MMPで切断されたフィブロネクチンの細胞外Aドメイン、血管外に堆積したフィブリノゲン、テネイシンCなどの糖タンパク質もまたTLR4で認識されるDAMPとして作用する^{23,25)}。

以上のようにECMは炎症応答に伴って産生・活性化される酵素群の働きによって放出・遊離されるDAMPの貯蔵庫としての機能を担っていることが理解できる。ECM由来のDAMPの存在意義とは組織損傷に対して迅速な応答を示すことにより、生体の危機をいち早く伝える「危険シグナル」を発信しながら、炎症応答をより確実なものに強化し、持続時間を伸ばすことにあると考えられている。一方、このような役割が裏目に出て自己免疫疾患などでは炎症を慢性化して制御困難にしたり、悪性腫瘍では転移を促進させる結果に加担してしまう。

2.2. 細胞由来の DAMP

細胞にも様々なDAMPが存在する。多くは特定の細胞区画、あるいは細胞内小器官に格納されており、細胞の損傷や細胞死に伴って細胞外に放出・遊離された後、DAMPとして作用する^{4,6)}(図1)。

2.2.1. 細胞質由来の DAMP

尿酸はプリン代謝の酸化最終生成物であるが、内因性の危険シグナルを仲介する因子としても知られている²⁶⁾。尿酸は全ての細胞に普遍的に存在するが、その多くは栄養過多や激しい運動に伴って肝臓から産生され、血流へ放出される。死細胞から多量の尿酸が細胞外へ放出されたり、血中で高濃度になると、尿酸は溶解度が低いため低体温箇所や酸性条件下で結晶化を起こす。特に足指の関節腔や血管壁に蓄積して炎症を引き起こし、痛風の原因になる。尿酸結晶はNLRの一

種 NLRP3 による認識を受け、好中球やマクロファージを活性化して非感染性炎症反応に寄与する²⁷⁾。また樹状細胞を成熟させたり、CD8陽性 T 細胞に対するクロスプライミングを増強させるなどの能力も有している²⁸⁾。

カルシウム結合タンパク質である S100A8 および S100A9 は炎症の誘導とともに発現が増加し、ヘテロ二量体は抗菌活性を有すると言われているが、その一方、炎症や線維症の誘導にも広く関与している²⁹⁾。これらのタンパク質は主にストレスを受けた好中球やマクロファージなどの食細胞から放出され、その後 DAMP として作用する。この分泌機構は古典的な小胞体-ゴルジ経路に依存しておらず、プロテインキナーゼ C-チューブリン依存的経路の活性化により放出される³⁰⁾。S100A9 はインフルエンザウイルス感染時に細胞ダメージを受けていないマクロファージからも細胞外に放出され、炎症応答やウイルス感染防御応答を増強する³¹⁾。細胞からの放出後、S100A8 と S100A9 は TLR4 の認識を受ける³²⁾。

熱ショックタンパク質 (HSP) は原核生物、真核生物問わず広く保存されたタンパク質群である。通常分子シャペロンの役割を果たしており、タンパク質の適切なフォールディング (折りたたみ) を補助することで細胞恒常性に寄与している³³⁾。一方、HSP は細胞ストレス、あるいはアポトーシスやネクローシスに伴ない細胞外へと放出される^{33, 34)}。Hsp60 や Hsp70, Hsp22, gp96 などの HSP は細胞内からの放出後に TLR2・TLR4 と会合して DAMP として作用する^{33, 35)}。また HSP の DAMP としての活性は歯周病と関連することも指摘されている³⁶⁾。

2.2.2. ミトコンドリア由来の DAMP

ミトコンドリアは酸化リン酸化による ATP 産生により重要なエネルギー代謝を担う細胞内小器官であるが、その他リン脂質やヘム、ステロイド等の合成、細胞内カルシウム濃度の調節などの細胞代謝活動も担っている。これらに加えミトコンドリアは DAMP の格納庫にもなっており、細胞死に伴って傷害・破壊されると DAMP が放出されて炎症反応を強く惹起する^{4, 6, 37)}。ミトコンドリア由来の DAMP は様々な非感染性炎症において作用することが明らかになってきている。

アポトーシスのようなプログラムされた細胞死でも、ネクローシスのようなプログラムされていない細胞死でも、損傷したミトコンドリアからは PRR に認識される様々な DAMP が放出される。ROS, ATP, ミトコンドリア DNA (mtDNA), ホルミル化ペプチドなどがこれに相当し、細胞死に伴って循環系へと放出される^{37, 39)}。

mtDNA は輸血血液中でも検出され、輸血関連急性肺障害に関与することが知られている⁴⁰⁾。また、mtDNA の転写と構造安定を司るミトコンドリア転写因子 A (Tfam) も細胞外に放出され、ヒトの脳ではミクログリアによって認識されると炎症反応を誘発する⁴¹⁾。さらに、ミトコンドリア自身もまた DAMP として機能する。実際、ネクローシスを起こした細胞からミトコンドリアを精製してマクロファージに作用させると、ミトコンドリアは貪食され炎症性サイトカインの産生を誘導する³⁸⁾。

2.2.3. 核由来の DAMP

核内に存在する HMGB1 (High-mobility group box 1) やヒストン、あるいは DNA などの分子もまた、細胞死に伴って細胞外へ放出されると DAMP となり、炎症反応の誘導に関与する⁴²⁾ (図1)。

HMGB1 は分子量 30kDa の非ヒストン DNA 結合性タンパク質の一種であり、通常はクロマチン構造の安定化や遺伝子転写反応において補助的役割を担っている。一方、様々な刺激に伴って細胞質へと移行し、小胞輸送を介して細胞外へと放出される⁴²⁾。活性化された単球やマクロファージ、樹状細胞などからも放出されるが、ネクローシスを起こした細胞や損傷した線維芽細胞などからも受動的に放出される^{43, 44)}。またアポトーシスを起こした細胞から遅延して放出されるエクソソーム中にも見出される^{45, 46)}。HMGB1 はアポトーシスとネクローシスで異なる酸化還元状態を示し^{42, 47)}、また核酸結合能があるため、生化学的状態の違いにより TLR2, TLR4, TLR9 や RAGE など異なる受容体で認識され得る^{48, 50)}。菌血症や敗血症のメディエーターとして重要な役割を果たすことが知られている⁵¹⁾。

ヒストンは染色体を構成する核タンパク質である。コアヒストンは DNA を巻き付けてクロマチンの最小単位ヌクレオソームを構築している。核内からのヒストンの放出は、細菌感染等により傷害された好中球が死に至る際に見られ、特に、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular trap) の形成プロセスで認められる⁵²⁾。またネクローシス細胞からも放出される⁵³⁾。肝障害が起こると血中にヒストンが増加し、これが血管内皮細胞の障害に関与して臓器不全を増悪させることが示唆されている^{53, 54)}。

ネクローシス細胞から放出される DNA は通常速やかに DNase により分解を受けるが、抗菌ペプチド LL-37 や HMGB1 と結合して分解から逃れると、形質細胞様樹状細胞などに取り込まれて TLR9 による認識を受けようになる^{50, 55)}。同様に、自己免疫疾患では、DNA が抗 DNA 抗体と結合し、Fc 受容体を介して免疫細胞に取り込まれることで炎症反応を起こす⁵⁶⁾。こ

のような反応には DNase の欠如や機能不全も関係している^{8, 57)}。乾癬では非常に高濃度の LL-37 が患部皮膚で産生されており、DNA と会合することで DAMP としての活性が病態形成に関与する⁵⁵⁾。また DNA と HMGB1 の複合体は、細胞表面で RAGE に結合してエンドサイトーシスで取り込まれ、その後 TLR9 による認識を受けて形質細胞様樹状細胞や B 細胞を活性化する^{48, 50, 57)}。

2.2.4. オートファジーに関連した DAMP

オートファジーは細胞内タンパク質をリソソームで分解する機構であり、細胞内での異常タンパク質の蓄積を防いだり、タンパク質過剰時や栄養環境の悪化時にタンパク質のリサイクルを行ったり、細胞質内に侵入した病原微生物を排除する役割を担っている⁵⁸⁾。ストレスを受けた細胞ではオートファジーが誘導され、これに関連して細胞死を伴わずに種々の DAMP が放出されることが明らかになっている。炎症関連タンパク質として知られる HMGB1、ATP、IL-1 β および DNA などの DAMP がこれに相当する⁵⁹⁾ (図1)。

オートファジーの誘導は、細胞質膜の崩壊やネクロシス起こすことなく HMGB1 の放出を起こすと考えられている⁶⁰⁾。逆に、caspase などのシステインプロテアーゼ群が活性化されているようなアポトーシス細胞ではオートファジーが誘発されておらず、この場合 HMGB1 は細胞内に保持される。また、HMGB1 は細胞から放出される前にオートファゴソームに局在することも示されている。緑茶カテキンの一種である没食子酸エピガロカテキンは HMGB1 と複合体を形成すると、HMGB1 はオートファジーにより分解されるようになり、HMGB1 の放出は阻害される⁶¹⁾。

ATP はオートファジーを過剰に起こした死細胞からパネキシン-1 を介して放出され、これがマクロファージに作用すると NLRP3-インフラマソーム経路を活性化する⁶²⁾。また、オートファジー誘導物質を作用させた細胞では、ATP が内部に充填されたアンフィソーム (オートファゴソームとエンドソームが融合し、リソソームが融合していない状態の小胞) を細胞の周辺部へと移動させ、細胞が飢餓状態になるとアンフィソームは細胞膜と融合して細胞外へ ATP を放出させる⁶³⁾。

炎症性サイトカインの IL-1 β は PRR を介してインフラマソームが活性化された細胞から能動的に分泌されるが、ネクロシス細胞からも受動的に放出され得るため、DAMP の一つとして分類されることがある⁵⁹⁾。オートファジーはインフラマソームの活性化を阻止したり、IL-1 受容体・TLR シグナルを抑制する方向に働き、

IL-1 β に対する抑制因子として多くの役割が報告されている^{32, 64, 65)}。実際、オートファジーの過程においてインフラマソームや、IL-1 受容体・TLR のアダプター分子 MyD88 のユビキチン化、p62 と LC3 の動員、オートファゴソーム依存的分解という連続的なプロセスが起こって細胞内から除去され、IL-1 β の産生と放出は強くブロックされる。つまり、IL-1 β の産生・放出とオートファジーの機能不全は強く関連しているということである。マクロファージでオートファジー関連タンパク質 LC3B あるいは Beclin1 を欠失させると、細胞質へ mtDNA が遊離し、caspase-1 が強く活性化して IL-1 β の産生・放出が誘導される⁶⁶⁾。

2.2.5. 細胞膜由来の DAMP

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP) は細胞膜に局在するエクトエンザイムである。細胞表面でグルタチオンなどの γ -グルタミル基をもつペプチドを加水分解し、遊離した γ -グルタミル基を他のペプチドやアミノ酸に転移する役割を担う。グルタチオンなどの抗酸化物質のターンオーバーを促進することで結果的に生体の抗酸化作用を高める働きをしている⁶⁷⁾。 γ -GTP は生体内に遍在性に発現しているが、肝癌、アルコール性肝障害、閉塞性黄疸など肝・胆道疾患に伴う細胞障害により遊離して血中に流出するため、 γ -GTP は肝・胆道系機能のマーカーとして広く利用されている。

著者らの研究グループは細胞から遊離した γ -GTP が DAMP として機能しうることを見出した⁶⁸⁾。遊離 γ -GTP は TLR4 による認識を受けるが、興味深いことにマクロファージから破骨細胞への分化を促進させ、破骨細胞を活性化させる能力が高いことが分かった。マウスの歯肉溝に精製した γ -GTP を投与すると破骨細胞の出現と歯槽骨の吸収が起こることから、 γ -GTP は歯周病の骨吸収に関与する DAMP の一つであると考えられる。 γ -GTP は大小 2 種類のポリペプチドが結合して構成されているが、DAMP の活性を有するのは大サブユニットの方である⁶⁹⁾。

何故遊離 γ -GTP がマクロファージや破骨細胞に強く作用するのかはまだ分かっていないが、 γ -GTP と特異的に会合する何らかの補助受容体に関与している可能性が考えられる。遊離 γ -GTP レベルの上昇は関節リウマチ患者の滑液で認められ、また病態形成とも関連しており^{69, 70)}、 γ -GTP は骨代謝と関連した DAMP として働いている可能性がある。また近年、血中の遊離 γ -GTP レベルの上昇は様々な循環器系炎症性疾患のリスクファクターであることも臨床医学的に示唆されており⁷¹⁾、これには TLR4 による遊離 γ -GTP 認識の関与が考えられる。

3. 組織障害の指標としての DAMP の意義

DAMP は上記のように種類が豊富で各々の性質は大きく異なっているが、その一方で多くの DAMP に共通なのは、生理学的条件下で組織中や細胞内に隔離されており、免疫系による認識を回避する内因性因子として存在している、という点である。組織の損傷や細胞ストレス、あるいは細胞死が誘導される条件下では、これらの分子は組織外・細胞外へと放出され、非感染性炎症に関わることになる。細胞由来の DAMP の場合には、誘導される細胞死のタイプが特に DAMP の放出・遊離や放出後の免疫刺激性に大きく影響する^{4,72)}。細胞のネクローシスは通常、アポトーシスが起らないような生理学的状態が極度に失われた条件下で起こるが、ネクローシスの意義として重要なのは細胞膜のインテグリティが完全に失われることである。このような状況に陥ると DAMP は放出されやすくなり、DAMP の影響が強く反映される⁷²⁾。ネクローシス細胞に由来する DAMP の代表例は HMGB1、熱ショックタンパク質、ATP ならびに尿酸であり、いずれも細胞障害の指標となる。これらに加え、IL-1 α や IL-33 などの細胞内貯蔵型の炎症性サイトカインもまたネクローシス細胞から放出される^{4,73,74)}。IL-1 α や IL-33 は従来は DAMP とは考えられていなかったが、現在は非感染性炎症を媒介する DAMP の一種と考えられつつある⁷⁵⁾。細胞外に存在する DAMP の場合、組織損傷に伴う ECM の分解によって放出が誘導される。ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸やバイグリカンなどの ECM 断片の生成は活性化した免疫細胞から、あるいは組織修復を促進するために非免疫細胞から産生された酵素群に依存して起こる。これらの DAMP の生成は組織障害の指標となる。

内因性分子が DAMP であることの主要な証明法は、精製された分子が *in vitro* あるいは *in vivo* で炎症反応を誘発する能力を証明するとともに、細胞や生体からその分子を選択的に欠如させた場合に炎症反応の減少を観察することである⁷⁶⁾。これまで証明されてきた DAMP のうちのいくつかは、単に精製物に LPS などの PAMP が混入していただけとの懸念があるのも事実で、実際、疑念が晴らされていない DAMP も未だに存在する⁷⁷⁾。炎症性サイトカイン産生を誘導する能力について *in vitro* で特定された DAMP のいくつかは非感染性炎症を *in vivo* で誘導する能力を有していない場合もある⁴⁾。上記のように DAMP の活性は組織障害や細胞死と強く関連していることから、動物モデルを使用して *in vivo* で DAMP を同定しようとする場合、組織障害や細胞死があまり強く起こらないよ

うな条件では DAMP の有意な活性を認めない結果となることも考え得る。

現在までに炎症反応を誘発する潜在的 DAMP の同定にはかなりの進歩があったが、その一方で DAMP の疾患特異性に関する知見はまだ乏しい状況である。特定の DAMP が優勢となって疾患を引き起こすことがあるのかどうかは不明で、実際には様々な DAMP が同時に関与すると考えられるため、個々の DAMP の相対的重要性を考慮するのは困難を伴うと思われる。また HSP や HMGB1 などの DAMP の場合、いくつかの異なる受容体と相互作用するようである^{4,6)}。DAMP としての能力自体が疑われるものすら存在するため、DAMP を取り巻く様々な背景を地道に研究していくことが重要である。そして新しい治療標的として DAMP をターゲットにするためには各々の DAMP の異なる生物学的活性を詳細に解明していくことが課題となる。

4. DAMP の受容体およびシグナル伝達経路

4.1. TLR

TLR は PAMP と DAMP を含む様々な分子を認識する I 型膜貫通型受容体群であり、炎症性免疫応答の誘導に関与している (図1)。基本的に TLR は1つの膜貫通領域をもち、N 末端にリガンド認識に関与する高度にグリコシル化されたロイシンリッチリピート (LRR) を含む細胞外ドメイン (ECD)、C 末端には細胞内シグナル伝達に関与する Toll・IL-1 受容体相同 (TIR) ドメインをもっている^{5,8)}。ヒトでは10種類、マウスでは13種類の TLR が存在する。細胞表面に局在する TLR とエンドソーム (細胞内) に局在する TLR とに大きく分類される⁸⁾。TLR が活性化するシグナル伝達経路は TIR ドメインに会合するアダプター分子の種類により決定されており、MyD88 に依存的に誘導される経路と TRIF に依存的に誘導される経路とがある。NF- κ B 経路やインターフェロン誘導経路等が活性化されるが^{88,78)}、詳細については他稿に譲りたい。

TLR によるリガンド認識を考える上での大きな特徴は ECD に LRR が存在すること、そしてリガンド認識において補助的に働く MD-2 などのアクセサリ分子や CD14 や CD36 などの補助受容体を利用していることである^{79,81)}。LRR モチーフは典型的には22~29 アミノ酸残基を含み、タンパク質-タンパク質間の相互作用を媒介する能力が高いのが特徴である。これが連なって存在することで ECD が馬蹄型を呈する要因となっている⁷⁹⁾。ECM 由来の DAMP で TLR リガンドとして作用するデコリンとバイグリカンにも

LRRが存在する⁶⁾。結晶構造解析等によってTLRのECDとPAMPがどのように相互作用するのかがかなり詳細に解明されてきた^{80, 81)}。TLRはリガンドの種類に依存し、ヘテロ二量体(TLR2/TLR1またはTLR2/TLR6)またはホモ二量体(ほとんどのTLR)を形成して基盤構造となり、ここにアクセサリ分子や補助受容体が相互作用する。これらの特徴により、ファジーとも特異的とも言えるようなTLRのリガンド認識が可能にされていると考えられる。

通常TLR2はTLR1またはTLR6と協働して細菌のアシル化リポタンパク質を、またTLR4はLPSをPAMPとして認識する^{8, 80)}。一方、DAMPにはTLR2とTLR4による認識を受けるものが多数含まれている。尿酸はTLR2とTLR4の両者を介してマクロファージを活性化する⁸²⁾。S100A8とS100A9はTLR4の活性化因子として知られているが²⁹⁾、S100Bの場合、TLR2に結合してその活性を阻害する⁸³⁾。HSPもまたTLR2とTLR4のリガンドとして作用する^{33, 35)}。バイグリカンとデコリンの場合は、TLR2・TLR4と会合する際、分子中に存在するLRRによって相互作用が媒介される可能性が高いと考えられている^{13, 15, 16)}。ヘパラン硫酸や低分子ヒアルロン酸断片は両者ともTLR4に認識される^{84, 85)}。γ-GTPもTLR4を介して認識され、マクロファージや破骨細胞を活性化する⁶⁸⁾。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炎症では、酸化型LDLやβ-アミロイドはTLR4・TLR6による二量体に認識され、炎症応答を引き起こすDAMPとして働いている⁸⁶⁾。この認識にはCD36が補助受容体として使われる。このような認識機構はPAMPでは認められないため、DAMP特有のケースなのかもしれない。

TLR9は通常、細菌やウイルスに由来する非メチル化CpGモチーフを含むDNAをPAMPとして認識する^{8, 87)}。TLR9は同様にCpG配列を含むmtDNAをDAMPとして認識し、敗血症等で誘発される免疫経路を活性化する³⁹⁾。HMGB1はCpG-DNAと会合し、DNAを初期エンドソームへと誘導してTLR9へ受け渡す役割を担う^{50, 88)}。また、HMGB1自身はTLR2・TLR4のリガンドとしても作用する⁴²⁾。HMGB1のDAMP活性はシステイン残基の酸化還元修飾を介して調節されており⁴⁷⁾、この領域を介してTLRと相互作用すると考えられる。

結晶構造解析によるTLRのECDとDAMPとの相互作用はまだ証明されていないが、PAMPとの結合部位は一部のDAMPの認識にも使用されると考えられる。しかし、一部のDAMPではPAMPとの結合とは異なる部位が結合に利用されているようであり^{6, 89)}、ま

たTLRの組合せ、アクセサリ分子、補助受容体の種類もPAMPの場合とは異なっていることがある⁹⁰⁾。さらに、いくつかのDAMPは同じTLRで認識されるPAMPが引き起こすものとは異なる下流シグナル伝達や細胞応答を誘発できる場合もある⁸⁵⁾。この現象はTIRドメインに会合するアダプター分子に依存すると考えられるが、どのDAMPでどのアダプターの経路が誘導されるかは正確に特定されていない場合が多い。

これらの知見を総合的に考えると、TLRによるDAMPの認識は単に一種類のリガンドを一種類の受容体が認識し、単純な細胞応答が誘導されるという既知のパラダイムでは到底理解が及ばない事象である可能性が示唆される。

4.2. 終末糖化産物受容体 (RAGE)

終末糖化産物受容体 (receptor for advanced glycation end-products: RAGE) は最も研究されているDAMP受容体の1つである。RAGEは分子量55kDaのI型膜貫通型受容体であり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。この受容体は終末糖化産物(AGE; タンパク質に非酵素的に糖が結びつき、体温等で熱せられて「糖化」が起きた分子)の糖化領域と結合し、酸化ストレスや炎症反応を惹起させて組織障害を引き起こすことがある^{48, 91, 92)}(図1)。RAGEは細胞外領域にリガンド認識を担うVドメインをもち、1つの膜貫通領域、そして下流シグナル伝達を担う細胞質ドメインの3つの部分から成る。RAGEには選択的スプライシング、またはプロテアーゼによるプロセッシングにより短縮型の受容体も存在する。膜貫通領域を欠如している場合は可溶性の受容体となってリガンドに結合し、通常のRAGEの活性化を防ぐ「デコイ受容体」として作用する⁹¹⁾。

RAGEはAGEの受容体として最初に同定されたが、後にHMGB1、S100タンパク質、β-アミロイドを含む多くのDAMPの受容体としても機能することが示されてきた^{44, 93, 94)}(図1)。RAGEの生物学的活性で重要なのはその発現がそのリガンドの認識後増加し、その後の応答がフィードバック的に増幅されてしまうことである⁹¹⁾。またRAGEのリガンド認識には幅広い構造的多様性があるが、一方でRAGEが活性化する下流のシグナル伝達経路は常に同じで、NF-κBの活性化とともに細胞増殖やTGF-βの産生をもたらす⁹¹⁾。このような性質はリガンドの種類によって応答が変化するTLRとは大きく異なっているように見える。RAGEは1型糖尿病、2型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、肺線維症ならびに悪性腫瘍の発症に関与し、これら疾患の重要なマーカー分子である可能性も指摘されている^{95, 96)}。

4.3. インフラマソーム

「インフラマソーム (inflammasome)」とは、システインプロテアーゼ caspase-1を活性化し、炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18の放出を調節するタンパク質複合体の総称である^{97,99}。細胞質にインフラマソームが形成されて活性化されると caspase-1のプロテアーゼ活性にスイッチが入れられ、IL-1 β と IL-18の前駆体である pro-IL-1 β と pro-IL-18の一部が切断されて成熟化 IL-1 β と IL-18へと変換され、細胞外への放出が可能になる (図1)。逆に、IL-1 β や IL-18はインフラマソームの形成と活性化が起こらなければ、基本的に細胞外へは放出されない。このような性質から IL-1 β や IL-18も DAMP の一員として考えられることもある。

NOD 様受容体 (NOD-like receptor ; NLR) ファミリーの一員である NLRP3 (別名 NALP3, Cryopyrin) はそのリガンド認識後、下流のアダプター分子 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) と caspase-1と協働し、いわゆる「NLRP3インフラマソーム」を形成して IL-1 β や IL-18のプロセシングを行う^{97,98}。NLRP3は LRR を有しており、幅広い生化学的背景をもつリガンドの認識を行っている。NLRP3インフラマソームの形成は多種多様な細胞外からの刺激によって起こり、いくつかの DAMP に対する応答としても生じる (図1)。これまでに最も研究されているのは、細胞外 ATP に応答して起こる NLRP3インフラマソームの形成である。細胞外 ATP は細胞表面に存在するプリン受容体 P2X7に認識されてこれを活性化し、細胞内からのカリウムイオンの流出を引き起こす。カリウムの流出は二次的に NLRP3インフラマソームの形成を誘導する¹⁰⁰。尿酸は NLRP3インフラマソームを活性化することができるが、これは NLRP3の LRR ドメインを必要とするプロセスとして起こる²⁷。低分子量ヒアルロン酸断片もまた NLRP3インフラマソームを活性化できるが、この場合 CD44に依存した細胞内への取込みが必要である¹⁰¹。バイグリカンは P2X7と TLR2・TLR4とのクロストークを起こすことにより NLRP3インフラマソームを活性化することができる¹⁷。またネクロトーシス細胞から放出されるヒストンの場合は少なくとも P2X7に非依存的に NLRP3インフラマソームを活性化する¹⁰²。

マクロファージにおける IL-1 β の放出は TLR シグナルなどの NF- κ B 活性化による pro-IL-1 β 転写の誘導と、それに続く NLRP3インフラマソームの形成と活性化を起こす2つの別個のシグナルを必要とする⁹⁷ (図1)。一方、DAMP の中には、バイグリカンや低分子量ヒアルロン酸のように、両方のシグナル伝達を同

時に活性化するものもある⁶。このような性質は、炎症誘導因子を考える上で PAMP と DAMP の違いに関する重要な根拠である。

近年、インフラマソームを標的にした阻害薬が非感染性炎症の治療薬として有効である可能性が示唆されてきている。例えば、 β -ヒドロキシ酪酸 (BHB) は絶食や激しい運動、カロリー制限食 (低炭水化物ケト原性食) の摂取などに応答して体内で生産される代謝産物であるが、BHB には NLRP3に直接結合して阻害する作用がある¹⁰³。また、MCC950という人工合成化合物が NLRP3を直接阻害できることも報告されている¹⁰⁴。いずれの化合物も炎症性疾患のマウスモデルに投与すると炎症の症状は軽減することから、様々な非感染性炎症性疾患の治療に使える可能性がある。またこれらの抗炎症作用は特異的で、インフラマソーム以外で感染制御に必要な成分には影響を与えないことも示されている^{103,104}。

5. おわりに

ここ20年間で炎症の誘導機序について、その概念を大きく変革する数多くの発見があった。最も大きなインパクトを与えたのは病原体由来の分子を認識する TLR を始めとする PRR の存在であり、またこれら受容体の細胞内シグナル伝達経路が解明されたことである^{5,9}。この発見はその後の研究を加速、発展させ、2011年にはノーベル生理学医学賞において受賞対象となったことも脳裏に蘇る。一連の PRR の発見に伴い、さらに二つの大きな発見ももたらされた。一つは NLR による細胞内シグナル伝達システムとしてのインフラマソームの存在と、インフラマソームによる IL-1 β ・IL-18のプロセシングのメカニズムが解明されたことである^{97,98}。そしてもう一つの大きな成果が本総説で紹介した様々な DAMP の発見による危険シグナルの存在である。DAMP は内因性に生成され、PRR に認識されて種々の非感染性炎症に関与することが明らかにされてきた。

現在までに自然免疫系を刺激する DAMP が次々と特定されてきたが、各々が実際の炎症性疾患の病態形成においてどの程度関与しているのかについては未だ理解が進んでいない。この原因として、DAMP として働く分子の種類が豊富で性質や構造的に異質であるため、各々の DAMP の生物学的活性の相対的重要度を解析しにくいことが考えられる。特に同じ PRR で認識される DAMP の場合、活性化される下流のシグナル伝達経路に差を認めにくいいため個々の特徴をつかみにくい。さらに言えば、病原体由来の PAMP によって誘導される応答ともほぼ同じであるため、感染症に

における DAMP の役割を解明しようと試みるのは困難を極める。またこのような背景から未同定の DAMP がまだ存在する可能性も否定はできない。

その一方で DAMP とその認識に対応する PRR が同定できれば、非感染性炎症の治療戦略を考慮する上では有効な知見が提供されることにはなる。ここで必ず考慮されなければならないのは、あくまで DAMP は通常の条件下では組織中や細胞内に無害な状態で存在し、そしてほとんどの場合は我々の生命活動において重要な役割を果たしているということである。つまり闇雲に DAMP を治療標的にできる訳ではないということである。仮に DAMP を標的として治療戦略を考えるのなら、DAMP としての役割のみを特異的に妨害し、生体内での正常な役割を妨害しないということが重要となる。この概念を可能にする一例を挙げると、DAMP と PRR との相互作用に関与する特徴的なアミノ酸残基、あるいは小ドメインのみを特異的に阻害し、残りの分子をそのままの状態に保つことができれば実現可能かもしれない。一方、インフラマソームを阻害する BHB や MCC950 を先に紹介したが^{103, 104)}、実際これらの化合物を非感染性炎症の治療に応用するのはそう簡単でないかもしれない。将来的に DAMP を標的とした原因療法開発に至るためには、様々な未解決の疑問点を基礎・臨床の両方の立場から地道に解決していく必要がある。エビデンスが積み重ねられれば、治療戦略において必要な道筋は必ず開かれてくるはずである。

本総説では歯周病における歯槽骨吸収に関与する可能性のある DAMP の一つとして γ -GTP を紹介したが⁶⁸⁾、HSP などを含む種々の DAMP もまた程度の差こそあれ歯周病の病態に関連していることが予想される。歯周病に関連する DAMP のエビデンスをさらに集積していく必要はあるが、仮に上記のような条件を確実にクリアできるならば未来の歯周病治療戦略の一つとして DAMP や DAMP 受容体を標的に定めることが可能かもしれない。口腔顔面領域での非感染性炎症を伴う疾患としては原発性 Sjögren 症候群や顎関節リウマチなど未だ原因不明のものも存在する。これら疾患における DAMP の役割はほとんど研究されておらず、今後に期待が持たれるところである。歯科領域における DAMP に関する研究は未開の領域と言っても過言でない状況であり、特に将来を担う若い歯学研究者には本領域への積極的参入を期待したい。

謝辞

本総説は朝日大学より支援頂きました。2017年度宮田研究奨励金 A 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) Luster A D, Alon R and von Andrian U H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 2005; 6: 1182-1190.
- 2) Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008; 454: 428-435.
- 3) Lawrence T, Willoughby D A and Gilroy D W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 787-795.
- 4) Chen G Y and Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 826-837.
- 5) Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124: 783-801.
- 6) Schaefer L. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *J Biol Chem.* 2014; 289: 35237-35245.
- 7) Broggi A and Granucci F. Microbe- and danger-induced inflammation. *Mol Immunol.* 2015; 63: 127-133.
- 8) 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.
- 9) Brubaker S W, Bonham K S, Zanoni I and Kagan J C. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015.
- 10) Said-Sadier N and Ojcius D M. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J.* 2012; 35: 437-449.
- 11) Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol.* 2007; 297: 353-363.
- 12) Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo R V and Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.* 2013; 280: 2165-2179.
- 13) Moreth K, Iozzo R V and Schaefer L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle.* 2012; 11: 2084-2091.
- 14) Nastase M V, Young M F and Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem.* 2012; 60: 963-975.
- 15) Merline R, Moreth K, Beckmann J, Nastase M V, Zeng-Brouwers J, Tralhao J G, Lemarchand P, Pfeilschifter J, Schaefer R M, Iozzo R V and Schaefer

- L. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal*. 2011; 4:ra75.
- 16) Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser H J, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young M F, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer R M and Grone H J. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2223-2233.
 - 17) Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young M F, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer R M, Grone H J and Schaefer L. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via Toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem*. 2009; 284: 24035-24048.
 - 18) Wu F, Vij N, Roberts L, Lopez-Briones S, Joyce S and Chakravarti S. A novel role of the lumican core protein in bacterial lipopolysaccharide-induced innate immune response. *J Biol Chem*. 2007; 282: 26409-26417.
 - 19) Kim S, Takahashi H, Lin W W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo J L and Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 2009; 457: 102-106.
 - 20) Goodall K J, Poon I K, Phipps S and Hulett M D. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One*. 2014; 9: e109596.
 - 21) Jiang D, Liang J and Noble P W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23: 435-461.
 - 22) Singleton P A. Hyaluronan regulation of endothelial barrier function in cancer. *Adv Cancer Res*. 2014; 123: 191-209.
 - 23) Midwood K, Sacre S, Piccinini A M, Inglis J, Trebaul A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F and Foxwell B. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med*. 2009; 15: 774-780.
 - 24) Okamura Y, Watari M, Jerud E S, Young D W, Ishizaka S T, Rose J, Chow J C and Strauss J F, 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001; 276: 10229-10233.
 - 25) Smiley S T, King J A and Hancock W W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2001; 167: 2887-2894.
 - 26) Kono H, Chen C J, Ontiveros F and Rock K L. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120: 1939-1949.
 - 27) Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A and Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006; 440: 237-241.
 - 28) Shi Y, Evans J E and Rock K L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003; 425: 516-521.
 - 29) Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen M A, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C and Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007; 13: 1042-1049.
 - 30) Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M and Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1997; 272: 9496-9502.
 - 31) Tsai S Y, Segovia J A, Chang T H, Morris I R, Berton M T, Tessier P A, Tardif M R, Cesaro A and Bose S. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 pathway. *PLoS Pathog*. 2014; 10: e1003848.
 - 32) Into T, Horie T, Inomata M, Gohda J, Inoue J I, Murakami Y and Niida S. Basal autophagy prevents autoactivation or enhancement of inflammatory signals by targeting monomeric MyD88. *Sci Rep*. 2017; 7: 1009.
 - 33) Tsan M F and Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*. 2009; 85: 905-910.
 - 34) Vabulas R M, Wagner H and Schild H. Heat shock proteins as ligands of Toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002; 270: 169-184.
 - 35) Vabulas R M, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning C J, Hacker H and Wagner H. Endocytosed HSP60s use Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*. 2001; 276: 31332-31339.
 - 36) Ueki K, Tabeta K, Yoshie H and Yamazaki K. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor- α in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol*. 2002; 127: 72-77.
 - 37) Krysko D V, Agostinis P, Krysko O, Garg A D, Bachert C, Lambrecht B N and Vandenabeele P. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol*. 2011; 32: 157-164.
 - 38) Maeda A and Fadeel B. Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1312.
 - 39) Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger

- W, Brohi K, Itagaki K and Hauser C J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010; 464: 104-107.
- 40) Lee Y L, King M B, Gonzalez R P, Brevard S B, Frotan M A, Gillespie M N and Simmons J D. Blood transfusion products contain mitochondrial DNA damage-associated molecular patterns: a potential effector of transfusion-related acute lung injury. *J Surg Res*. 2014; 191: 286-289.
 - 41) Little J P, Simtchouk S, Schindler S M, Villanueva E B, Gill N E, Walker D G, Wolthers K R and Klegeris A. Mitochondrial transcription factor A (Tfam) is a pro-inflammatory extracellular signaling molecule recognized by brain microglia. *Mol Cell Neurosci*. 2014; 60: 88-96.
 - 42) Pisetsky D S. The translocation of nuclear molecules during inflammation and cell death. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20: 1117-1125.
 - 43) Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M and Bianchi M E. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J*. 2001; 20: 4337-4340.
 - 44) Scaffidi P, Misteli T and Bianchi M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418: 191-195.
 - 45) Beyer C, Stearns N A, Giessel A, Distler J H, Schett G and Pisetsky D S. The extracellular release of DNA and HMGB1 from Jurkat T cells during in vitro necrotic cell death. *Innate Immun*. 2012; 18: 727-737.
 - 46) Spencer D M, Mobarrez F, Wallen H and Pisetsky D S. The expression of HMGB1 on microparticles from Jurkat and HL-60 cells undergoing apoptosis in vitro. *Scand J Immunol*. 2014; 80: 101-110.
 - 47) Yang H, Lundback P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi M E, Al-Abed Y, Andersson U, Tracey K J and Antoine D J. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med*. 2012; 18: 250-259.
 - 48) Sims G P, Rowe D C, Rietdijk S T, Herbst R and Coyle A J. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28: 367-388.
 - 49) Anggayasti W L, Mancera R L, Bottomley S and Helmerhorst E. The self-association of HMGB1 and its possible role in the binding to DNA and cell membrane receptors. *FEBS Lett*. 2017; 591: 282-294.
 - 50) Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi M K, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, Savitsky D, Ronfani L, Akira S, Bianchi M E, 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.
 - 51) Cavaillon J M and Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*. 2006; 12: 151-170.
 - 52) Papayannopoulos V and Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009; 30: 513-521.
 - 53) Jiang N, Reich C F, 3rd and Pisetsky D S. Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells. *Blood*. 2003; 102: 2243-2250.
 - 54) Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo C T, Semeraro F, Taylor F B, Esmon N L, Lupu F and Esmon C T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009; 15: 1318-1321.
 - 55) Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y H, Homey B, Cao W, Wang Y H, Su B, Nestle F O, Zal T, Mellman I, Schroder J M, Liu Y J and Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007; 449: 564-569.
 - 56) Means T K, Latz E, Hayashi F, Murali M R, Golenbock D T and Luster A D. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest*. 2005; 115: 407-417.
 - 57) Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F and Ishii K J. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: 168.
 - 58) Mizushima N, Levine B, Cuervo A M and Klionsky D J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008; 451: 1069-1075.
 - 59) Zhang Q, Kang R, Zeh H J, 3rd, Lotze M T and Tang D. DAMPs and autophagy: cellular adaptation to injury and unscheduled cell death. *Autophagy*. 2013; 9: 451-458.
 - 60) Thorburn J, Horita H, Redzic J, Hansen K, Frankel A E and Thorburn A. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 175-183.
 - 61) Li W, Zhu S, Li J, Assa A, Jundoria A, Xu J, Fan S, Eissa N T, Tracey K J, Sama A E and Wang H. EGCG stimulates autophagy and reduces cytoplasmic HMGB1 levels in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81: 1152-1163.
 - 62) Ayna G, Krysko D V, Kaczmarek A, Petrovski G, Vandenabeele P and Fesus L. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PLoS One*. 2012; 7: e40069.
 - 63) Fader C M, Aguilera M O and Colombo M I. ATP is

- released from autophagic vesicles to the extracellular space in a VAMP7-dependent manner. *Autophagy*. 2012; 8: 1741-1756.
- 64) Shi C S, Shenderov K, Huang N N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald K A, Sher A and Kehrl J H. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012; 13: 255-263.
- 65) 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.
- 66) Nakahira K, Haspel J A, Rathinam V A, Lee S J, Dolinay T, Lam H C, Englert J A, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim H P, Fitzgerald K A, Ryter S W and Choi A M. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2011; 12: 222-230.
- 67) Zhang H and Forman H J. Redox regulation of γ -glutamyl transpeptidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009; 41: 509-515.
- 68) Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K and Niida S. γ -Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Sci Rep*. 2016; 6: 35930.
- 69) Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K and Taniguchi N. γ -Glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J Biol Chem*. 2004; 279: 5752-5756.
- 70) Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G and Ikeda K. Overexpression of γ -glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology*. 2007; 148: 2708-2715.
- 71) Jiang S, Jiang D and Tao Y. Role of γ -glutamyltransferase in cardiovascular diseases. *Exp Clin Cardiol*. 2013; 18: 53-56.
- 72) Chan F K, Luz N F and Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33: 79-106.
- 73) Eigenbrod T, Park J H, Harder J, Iwakura Y and Nunez G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 α released from dying cells. *J Immunol*. 2008; 181: 8194-8198.
- 74) Moussion C, Ortega N and Girard J P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008; 3: e3331.
- 75) Netea M G, van de Veerdonk F L, van der Meer J W, Dinarello C A and Joosten L A. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33: 49-77.
- 76) Kono H and Rock K L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 279-289.
- 77) Wakelin S J, Sabroe I, Gregory C D, Poxton I R, Forsythe J L, Garden O J and Howie S E. "Dirty little secrets"--endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunology letters*. 2006; 106: 1-7.
- 78) Into T, Inomata M, Takayama E and Takigawa T. Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cell Signal*. 2012; 24: 1150-1162.
- 79) Botos I, Segal D M and Davies D R. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*. 2011; 19: 447-459.
- 80) Jin M S, Kim S E, Heo J Y, Lee M E, Kim H M, Paik S G, Lee H and Lee J O. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell*. 2007; 130: 1071-1082.
- 81) Kim H M, Park B S, Kim J I, Kim S E, Lee J, Oh S C, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo O J and Lee J O. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 2007; 130: 906-917.
- 82) Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose D M and Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 2936-2946.
- 83) Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, Bistoni F, Donato R and Romani L. The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog*. 2011; 7: e1001315.
- 84) Goldberg R, Meirovitz A, Hirshoren N, Bulvik R, Binder A, Rubinstein A M and Elkin M. Versatile role of heparanase in inflammation. *Matrix Biol*. 2013; 32: 234-240.
- 85) Taylor K R, Yamasaki K, Radek K A, Di Nardo A, Goodarzi H, Golenbock D, Beutler B and Gallo R L. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem*. 2007; 282: 18265-18275.
- 86) Stewart C R, Stuart L M, Wilkinson K, van Gils J

- M, Deng J, Halle A, Rayner K J, Boyer L, Zhong R, Frazier W A, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock D T and Moore K J. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 2010; 11: 155-161.
- 87) 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.
- 88) Ivanov S, Dragoi A M, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, Sitia G, Yap G S, Wan Y, Biron C A, Bianchi M E, Wang H and Chu W M. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood.* 2007; 110: 1970-1981.
- 89) Hodgkinson C P, Patel K and Ye S. Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen. *Thromb Haemost.* 2008; 100: 301-307.
- 90) Piccinini A M and Midwood K S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010.
- 91) Lee E J and Park J H. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inform.* 2013; 11: 224-229.
- 92) Schmidt A M, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M and et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 1992; 267: 14987-14997.
- 93) Rani S G, Sepuru K M and Yu C. Interaction of S100A13 with C2 domain of receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1844: 1718-1728.
- 94) Chaney M O, Stine W B, Kokjohn T A, Kuo Y M, Esh C, Rahman A, Luehrs D C, Schmidt A M, Stern D, Yan S D and Roher A E. RAGE and amyloid β interactions: atomic force microscopy and molecular modeling. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1741: 199-205.
- 95) Ramasamy R, Yan S F and Schmidt A M. Receptor for AGE (RAGE) : signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1243: 88-102.
- 96) Xie J, Mendez J D, Mendez-Valenzuela V and Aguilar-Hernandez M M. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal.* 2013; 25: 2185-2197.
- 97) Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T and Flavell R A. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol.* 2012; 13: 321-324.
- 98) Davis B K, Wen H and Ting J P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 707-735.
- 99) Martinon F, Mayor A and Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 229-265.
- 100) Mariathasan S, Weiss D S, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee W P, Weinrauch Y, Monack D M and Dixit V M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006; 440: 228-232.
- 101) Yamasaki K, Muto J, Taylor K R, Cogen A L, Audish D, Bertin J, Grant E P, Coyle A J, Misaghi A, Hoffman H M and Gallo R L. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem.* 2009; 284: 12762-12771.
- 102) Allam R, Darisipudi M N, Tschopp J and Anders H J. Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol.* 2013; 43: 3336-3342.
- 103) Youm Y H, Nguyen K Y, Grant R W, Goldberg E L, Bodogai M, Kim D, D'Agostino D, Planavsky N, Lupfer C, Kanneganti T D, Kang S, Horvath T L, Fahmy T M, Crawford P A, Biragyn A, Alnemri E and Dixit V D. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med.* 2015; 21: 263-269.
- 104) Coll R C, Robertson A A, Chae J J, Higgins S C, Munoz-Planillo R, Inserra M C, Vetter I, Dungan L S, Monks B G, Stutz A, Croker D E, Butler M S, Haneklaus M, Sutton C E, Nunez G, Latz E, Kastner D L, Mills K H, Masters S L, Schroder K, Cooper M A and O'Neill L A. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015; 21: 248-255.