

가와사키병 환자에서 분리한 CD14양성 세포에서 Toll-like Receptor-2의 발현

연세대학교 의과대학 소아과학교실

황대환 · 한정우 · 최경민 · 신경미 · 김동수

Expression of Toll-like Receptor-2 on the Peripheral Blood Monocytes in Kawasaki Disease Patients

Dae Hwan Hwang, M.D., Jung Woo Han, M.D., Kyung Min Choi, M.D.
Kyung Mi Shin, M.D. and Dong Soo Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : Toll like receptor(TLR) is known to be involved in innate immunity. Many microbial antigens stimulate TLR, and as a result of intracellular signal transduction, they activate nuclear factor- κ B which produces diverse inflammatory cytokines. Until now, many research topics in Kawasaki disease focused on cytokine increasement. In this study, we aim to reveal TLR increasement which might be associated with initiation of inflammatory response.

Methods : We obtained the peripheral blood of ten patients who were diagnosed with Kawasaki disease in Yonsei University College of Medicine from March 2003 to August 2003, as well as those of a febrile control group and the same number of a normal control group. Flow cytometry was done in all samples for quantification of TLR-2 expression in CD14 positive monocyte. And we also extracted total RNA of peripheral monocyte and quantificated expression of TLR-2 mRNA by RT-PCR.

Results : The expression of TLR-2 in Kawasaki disease increased significantly compared with the normal control group but not when compared with the febrile control group. And the expression decreased slightly in the subacute phase of Kawasaki disease compared with the acute phase, but this was statistically insignificant. mRNA expression of TLR-2 in peripheral blood monocyte also increased in the acute phase of Kawasaki disease.

Conclusion : Expression of TLR-2 in Kawasaki disease increased when compared with the normal control group, which means that innate immunity is associated with the pathogenesis of Kawasaki disease. (Korean J Pediatr 2005;48:315-320)

Key Words : Kawasaki, Toll like receptor, Innate immunity

서 론

가와사키병은 관상동맥류 합병증을 일으킬 수 있는 전신적인 혈관염의 일종으로, 아직까지 그 병인이 정확히 밝혀지지 않았지만 강력한 염증반응이 일어나는 것은 분명하며 이러한 염증반응

을 유발하는 원인으로 여러 세균이나 바이러스 및 Heat shock protein(HSP)¹⁾ 등이 제시된 바 있다.

Toll-like receptor(TLR)는 자연면역(innate immunity)에 관여하는 수용체로서^{2,3)} 총 10여개의 TLR family 중⁴⁾ TLR-2, 4에 대한 ligand가 가장 많이 알려져 있는데 이들이 각종 세균의 peptidoglycans, lipopolysaccharide 혹은 HSP 등의 자극을 받게 되면 세포내 Nuclear Factor- κ B(NF- κ B)를 활성화시켜^{5,6)} TNF- α , IL-12 등의 염증성 사이토카인을 분비하게 된다⁷⁾. 현재까지 가와사키병에 대한 연구는 염증반응의 결과로서 사이토카인 증가에 대해 주로 이루어졌던 바, 저자들은 가와사키병에서 TLR의 발현정도를 살펴 염증반응이 유발되기 시작하는 기전에 대해 접근하고자 하였고 이에 비교적 잘 알려진 TLR-2를 분석

본 논문은 2003년도 연세의대 소아과학교실 강사연구비 지원으로 이루어졌음.

접수 : 2004년 9월 14일, 승인 : 2004년 10월 15일
책임저자 : 김동수, 연세대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence : Dong Soo Kim, M.D.
Tel : 02)361-5524 Fax : 02)393-9118
E-mail : dskim6634@yumc.yonsei.ac.kr

대상으로 하였다.

대상 및 방법

2003년 3월부터 8월까지 연세의료원에서 가와사키병으로 진단 받은 환자 10명과 발열대조군 10명 및 정상대조군 10명을 대상으로 하였다. 각 군의 남녀 성별비는 1:1이었고 발열 대조군은 백혈구와 염증단백질(CRP) 수치가 정상인 바이러스성 질환 환자를 대상으로 하였으며 가와사키병 환자군은 면역글로불린 치료 전과 치료후의 말초혈액을 각각 분리하여 실험에 사용하였다.

환자의 말초혈액으로부터 Ficoll-Paque(Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) 원심분리 방법으로 말초혈액단핵구(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리하였다. 4 cc의 혈액을 RPMI-1640 배지로 2배 희석하여 Ficoll에 얹어서 2,000 rpm에서 20분 원심분리하고, Ficoll 층과 혈장 층 사이의 PBMC 층을 분리해서 다시 RPMI 배지로 3회 세척하였다. 분리된 PBMC를 대상으로 다음과 같이 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하였다. CD14 양성 단핵구의 세포 표면에서 TLR-2 분자 발현을 조사하기 위해 환자의 말초혈액을 인산완충액으로 2회 세척한 후, FITC로 표지된 항 CD14 항체(Becton Dickinson, USA)와 PE가 표지된 항 TLR-2 단클론항체(eBioscience, San Diego, CA)로 얼음에서 30분간 반응시켜 직접형 광염색을 하였다. 음성 대조군으로 isotype control(Becton Dickinson, USA)을 사용하였다. 세포에 염색되지 않은 과잉의 단클론항체를 제거한 후 FACSCalibur(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 세포표면 분자의 발현을 측정하였다. 유세포 분석시 총 20,000개의 세포 중 큰 과립세포군을 선택(gating)하여 WinMDI 2.8(Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA)을 이용하여 Mean Fluorescence Intensity(MFI) 값을 분석하였으며 각 군간의 비교를 위해 t-TEST를 시행하였다.

또한 TLR-2의 mRNA 발현수준을 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 확인하였다. 우선 말초혈액단핵구에서 RNase kit(Quiagen, Santa Claris, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리한 후, total RNA 2 µg에 250 ng의 random primers(Life technologies)와 200 units의 Murine molony leukemia virus-reverse transcriptase(Life technologies)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켜 first strand complementary DNA를 합성하였다.

합성된 cDNA에 TLR-2(sense: 5'-GCCAAAGTCTTGAT-TGATTGG-3' antisense: 5'-TTGAAGTTCTCCAGCTCCT-G-3')와 β-actin(sense: 5'-GGCGGACTATGACTAGTTG-3' antisense: 5'-AAACAACAATGTGCAATCAA-3') 대한 primer 각 10 pg/mL과 1.25 U의 Taq polymerase(Takara, Tokyo, Japan)를 첨가하여 GeneAmp PCR system 9600(Per-

Table 1. The Median Age and Expression Rate of TLR-2 in Kawasaki Disease

	Pre-KD*	Post-KD†	FC‡	NC§
Median age (month)	24.3±1.8		32.1±2.7	22.1±1.5
TLR-2(%)	79.7±13.1	60.9±22.1	76.2±14.4	11.7±14.6

*Pre-KD: Kawasaki disease(before IVIG treatment)

†Post-KD: Kawasaki disease(after IVIG treatment)

‡FC: Fever control

§NC: Normal control

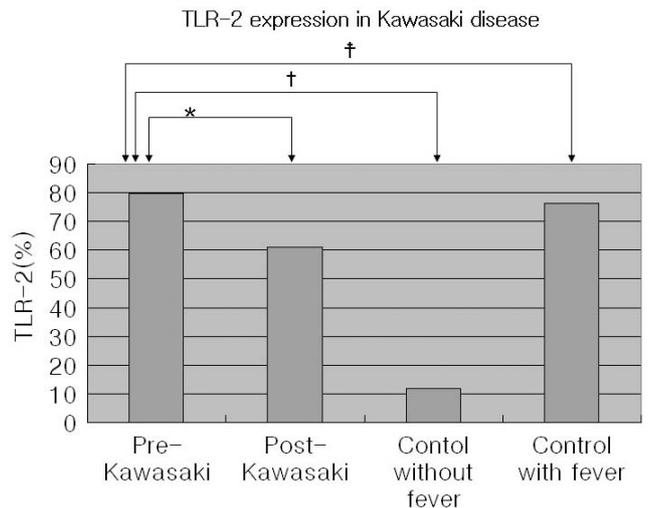


Fig. 1. Expression of Toll-like receptor-2(TLR-2) in Kawasaki disease. *P=0.413, †P<0.01, ‡P=0.637.

kin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 PCR을 수행하였다.

결 과

각 실험군의 나이별, 성별간의 통계적인 차이는 없었으며 CD14 양성인 말초혈액단핵구 표면에서의 TLR-2 단백질 발현은 치료 전 환자 79.7±13.1%, 치료 후 환자 60.9±22.1%, 발열대조군 환자 76.2±14.4%, 정상대조군 환자 11.7±14.6%로서 가와사키 치료 전 환자군에서의 발현이 정상 대조군보다 통계적으로 유의하게 증가되어 있었다(P<0.01)(Table 1). 그러나 임상경과에 따른 TLR-2의 발현을 보면 치료 전보다 치료 후에 감소하였지만 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으며 치료 전 환자군과 발열대조군의 TLR-2 발현도 의미있는 차이를 보이지 않았다(P=0.637)(Fig. 1, 2). 한편 RT-PCR을 통해 가와사키병 치료 전 환자의 말초혈액 단핵구에서 TLR-2의 mRNA 발현도 같이 증가되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

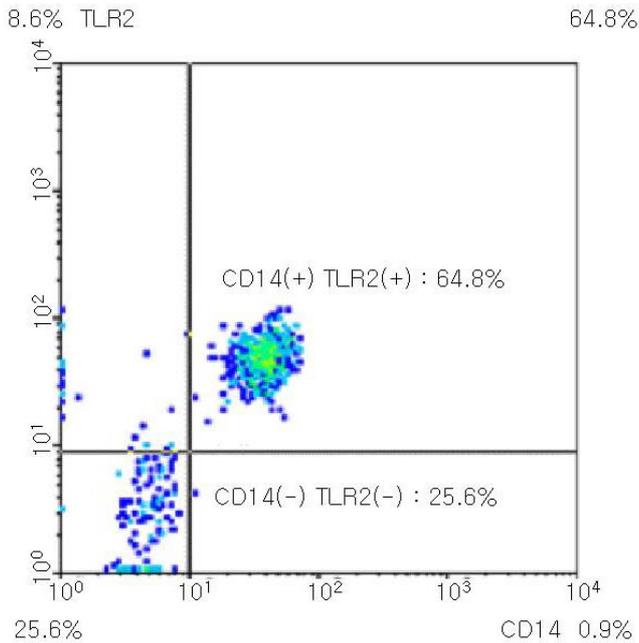


Fig. 2. TLR-2 expression detected by flowcytometry in PBMC of KD patient. MFI level of CD14(+) and TLR-2(+) is 64.8%.

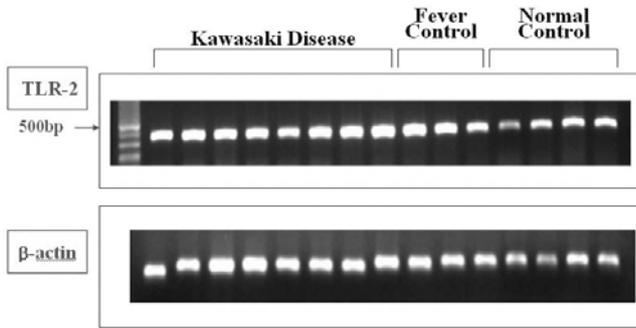


Fig. 3. Expression of m-RNA of TLR-2 in Kawasaki disease.

고 찰

병원체에 대한 숙주의 방어기전이라 할 수 있는 면역체계에는 선천성 면역계와 후천성 면역계가 있다. 이들은 별개로 존재하는 기전이라기보다는 상호보완적으로 작용하여 미생물의 감염을 물리친다. 후천성 면역계는 척추동물에서만 볼 수 있는 매우 정교화된 기전으로서, 세포표면수용체를 통해 항원에 특이적인 T세포 및 B세포에 의해 수행되며 항원의 형태를 기억할 수 있다는 것이 특징이다^{8,9)}. 그러나 후천성 면역계가 작용하기 위해서는 비교적 긴 시간이 필요하기 때문에 초기감염에 대항하는 면역반응은 선천성 면역계에 의해 수행된다. 선천성 면역계는 모든 동물이 가지고 있는데, 주로 대식세포, 호중구, 수지상세포에 의해 수행되며 후천성 면역계와는 달리, 비특이적인 면역반응에 관여

하고 면역반응에 신속하게 관여하는 대신 지속적이지 않는 특성이 있다¹⁰⁻¹²⁾. 초파리의 경우 Toll receptor¹³⁾가 이러한 선천성 면역계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 Toll receptor를 통해 여러 항원을 인지하여 신호전달체계가 활성화되어 외부의 미생물에 대한 항펩티드를 만듦으로써 이것을 가능하게 한다⁹⁾.

한편, 포유동물에서 Toll receptor의 homologous receptor가 발견되어 이를 Toll-like receptor(TLR)이라고 하는데 이것은 유형I의 세포막단백질로서, 현재까지 10종류가 밝혀져 있다. 이것들은 단독으로, 혹은 다른 수용체와 협력하여 미생물의 여러 병원균특이적분자양상(pathogen associated molecular pattern)⁹⁾을 감지하여 선천성 면역계의 중추적인 역할을 수행하고 그 뿐만 아니라 후천성 면역계에 까지도 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, 수지상세포와 같은 항원제시세포에서 발현되는 TLR들이 병원균에 의해 활성화될 경우 수지상세포는 미성숙한 형태에서 성숙한 형태로 분화되는데 이렇게 되면 수지상세포에서 사이토카인과 키모카인의 발현능이 높아지고 세포표면의 costimulatory molecule의 발현양도 높아지게 되는 동시에 이전에 포식했던 병원균의 단백질을 조각 내어 MHC와 함께 세포표면에 발현하게 된다. 이렇게 되면 naive T세포들은 이러한 항원을 제시받아 항원에 특이적인 T세포가 활성화되면서 결과적으로 후천적 면역계가 촉발된다^{14, 15)}.

현재까지 TLR의 리간드가 많이 밝혀졌는데 TLR-3의 경우 바이러스 감염에 의해 만들어지는 dsRNA를 감지하며¹⁶⁾ TLR-4는 그람 음성세균의 주요한 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS)를 인식하고^{17, 18)} TLR-5는 flagellin에 대한 수용체로 알려져 있다^{19, 20)}. TLR-9은 박테리아와 바이러스의 unmethylated CpG (cytosine-phosphate-guanosine) DNA를 인식하여 B세포 증식, 거식세포의 사이토카인생성, 수지상세포의 성숙등을 유도한다^{21, 22)}.

TLR-2는 TLR-1, TLR-6와 같은 다른 TLR과 이종이합체를 이루어 여러 미생물의 구성성분을 인식하는데^{23, 24)} 그람 음성세균, 그람 양성 세균, 마이코박테리아, spirochetes의 lipoprotein, 그람 양성세균의 peptidoglycan과 lipoteichoic acid, 마이코박테리아의 lipoarabinomannan, 진균류의 zymoan 등이 그 예이다²⁵⁻²⁷⁾. 아울러 병원균 특이적 분자양상 뿐만 아니라 내부에서 유래된 HSP들과 같은 단백질도 여러 TLR의 리간드로써 TLR를 자극할 수 있음이 밝혀졌다^{1, 28, 29)}.

TLR 들에 의한 신호전달에서 공통점은 TIR 도메인을 통한 NF-κB의 활성화이다. 즉, TLR들의 TIR 도메인은 연결단백질인 MyD88(myeloid differentiation protein)을 통해 IL-1 receptor associated kinase(IRAK)와 복합체를 형성하고 이것은 IRAK, TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)의 순차적인 활성화 및 계속되는 신호전달을 통해 결과적으로 NF-κB의 활성화를 야기하며 활성화된 NF-κB는 핵으로 이동하여 전사인자로서 작용하고 사이토카인과 세포접합분자

등을 비롯한 활성화 유전자의 발현을 유도한다^{5, 6, 23, 30-34}).

한편, 가와사끼병에서 보이는 혈관내피세포의 손상은 T세포, B세포, 단핵구등 활성화된 여러 면역세포 및 각종 사이토카인과 자가항체의 증가, 세포접합분자의 발현, Growth factors, 활성화된 호중구에서 분비하는 조직분해효소 및 라디칼 등과 연관이 되어있는데 이러한 현상 중 사이토카인의 증가 등 일부는 선천성 면역계에서 TLR가 활성화될 때 보이는 현상과 유사하다. 즉, 가와사끼병 환자의 손상된 혈관부위에 림프구를 비롯한 여러 염증세포의 침착이 보이는 점이라든지 발열과 발적등의 특징적인 임상양상의 출현은 IL-1, TNF- α , IL-6을 비롯해 가와사끼병에서 증가되는 여러 사이토카인과 밀접한 관련이 있으며 이러한 사이토카인들의 증가는 TLR의 증가와 관련이 있을 것으로 생각되고 있다. 따라서 이전의 사이토카인 연구들을 통해 가와사끼병이 염증반응의 결과라는 사실을 입증하는데 그쳤다면 이번 연구는 그러한 염증반응이 거치는 중간 pathway를 밝히고자 하는 최초의 연구였으며 결과적으로 가와사끼병의 급성기에 TLR-2의 발현증가가 관찰된 점으로 보아 가와사끼병의 염증반응 중간 단계에 TLR이 관여할 가능성을 보여준 것이라 할 수 있다.

또한 각종 감염성 염증 반응에서 사이토카인과 함께 TLR이 증가한다는 사실을 고려할 때 발열 대조군 환자에서 TLR의 발현이 증가했다는 것은 놀랄만한 일이 아니며 현재 가와사끼병의 원인으로 제시되고 있는 세균, 바이러스 등과의 연관성을 더욱 의심해 볼 수 있는 결과로 생각된다. 따라서 TLR의 역할을 통해 이제껏 밝혀지지 않은 가와사끼병의 원인 항원을 추정해보는 시도도 가능하다.

가와사끼병에서 T세포의 활성화를 일으킬 수 있는 원인 항원에 대해서는 여러 연구가 계속 진행되고 있으며 주로 항체를 찾으려는 노력으로 나타나고 있다. 현재까지 가와사끼병에서 증가한다고 알려진 항체들로는 anti-endothelial cell antibody (AECA), ANCA(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, IgM, IgG), anti-human cardiac myosin antibody, aCL(anti-cardiolipin antibodies), antimyeloperoxidase antibodies, anti-thrombin III antibody, EB virus의 virus capsid antigen에 대한 항체 및 Lipid A에 대한 항lipid A 항체, Mycobacterial heat-shock protein(HSP65)에 대한 항체, 혈관평활근세포의 70 kDa 단백질항원에 대한 항체 등이다.

이중 HSP65에 대한 연구는 최근 흥미있게 이루어졌는데 가와사끼병 환자에서는 BCG 접종부위의 발적을 볼 수 있고 또한 급성기 환자의 경우 PPD skin test를 실시한 경우 피부반응에 선 강양성이 나타나고 말초혈액에서는 T세포의 급격한 증식 및 IL-2의 다량의 증가가 나타나는데 이것은 다른 발열질환에서는 찾아볼 수 없는 현상이었다³⁵. 더불어 In vitro 실험에서도 HSP65에 대해 T세포의 증식과 사이토카인의 증가가 관찰되었다³⁶. 또한 이전에 BCG를 접종한 환자의 가와사끼병 회복기 혈청에서 HSP65에 대한 항체의 증가가 있었고³⁷ mycobactrium의 HSP65에 대한 human homologue인 HSP63이 가와사끼병

의 급성기에 증가된다는³⁸ 등의 이제까지의 여러 보고는 mycobacterium HSP65 혹은 HSP65의 epitope과 교차반응을 일으키는 human HSP63이 비록 가와사끼병의 단독으로서의 시발인자는 아닐지라도 가와사끼병의 면역계를 활성화시키는 항원으로서의 역할을 한다는 것을 시사한다고 볼 수 있다. 더욱이 HSP이 하나의 리간드로 작용하여 TLR의 발현을 증가시킨다는 최근의 보고가 있었으며 본 연구의 결과에서와 같이 가와사끼병의 급성기에 TLR의 발현이 증가한다는 점은 이런 가설을 더욱 뒷받침한다. 그러나 본 연구에서는 TLR-2에 초점을 맞추었으며 이러한 TLR-2의 리간드로 HSP외에 다양한 세균이 존재한다고 알려졌으므로 원인 항원에 대한 결론은 아직 유보되어야 할 것이다.

하지만 가와사끼병을 일으키는 원인 항원이 기존에 존재하던 내부항원의 활성화된 형태인지 혹은 외부에서 새롭게 침투한 항원이든지 간에 이러한 항원들로 인해 TLR-2의 발현증가를 가져왔다는 점에서 가와사끼병의 병인에 선천성 면역계가 관여할 가능성이 있으며 이제까지 밝혀진 TLR-2의 리간드를 비추어 볼 때 HSP과 더불어 각종 미생물의 구성성분이 항원으로 작용할 가능성이 높다고 생각된다. 따라서 가와사끼병의 감염설은 세포분자적 측면에서 뒷받침될 수 있다고 보여진다.

다만 본 실험에서 사용된 대상 환자의 수가 10명으로 작은 편이었는데 좀더 많은 환자군을 대상으로 하여 TLR-2 뿐만 아니라 다른 TLR에 대해서도 조사해 볼 필요가 있으며 앞으로 면역학 분야에서 TLR의 ligand에 대한 연구가 진행될수록 가와사끼병 환자에 특이한 원인항원(ligand)이 밝혀질 가능성도 높아질 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

목 적 : 본 연구에서는 가와사끼병에서 toll-like receptor (TLR)의 발현정도를 살펴 염증반응이 유발되기 시작하는 기전에 대해 접근하고자 하였다.

방 법 : 2003년 3월부터 8월까지 연세의료원에서 가와사끼병으로 진단 받은 환자 10명과 발열대조군 10명 및 정상대조군 10명의 말초혈액을 얻은 후 유세포분석기(flow cytometry)를 시행하여 CD14 양성인 단핵구에서의 TLR-2 발현정도를 측정하였다. 또한 말초 혈액 단핵구의 total RNA를 분리한 후 역전사 증폭효소 연쇄반응(RT-PCR)을 시행하여 TLR-2의 mRNA 발현을 살펴보았다.

결 과 : 환자군에서의 TLR-2 발현은 정상대조군보다 통계적으로 유의하게 증가되어 있었으나 임상경과에 따른 양상을 보면 급성기보다 아급성기에서 감소하였지만 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았고 환자군과 발열대조군의 TLR-2 발현도 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 또한 급성기 환자군의 말초혈액 단핵구에서 TLR-2의 mRNA 발현이 증가되어 있었다.

결 론 : TLR-2의 발현은 가와사끼병 환자에서 정상대조군과

비교하여 증가되어 있었으며 이는 TLR 및 이를 통한 선천성 면역계(innate immunity)가 가와사키병의 병인과 연관될 수 있음을 시사한다. 앞으로 TLR의 발현이 가와사키병에서의 염증유발에 있어 구체적으로 어떤 역할을 하는지에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

References

- 1) Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kold H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor 4 complex. *J Immunol* 2000;164:558-61.
- 2) Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan AB. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:588-93.
- 3) Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12:13-9.
- 4) Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002;168:554-61.
- 5) Ninomiya Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999;398:252-6.
- 6) Takaesu G, Kishida S, Hiyama A. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 2000;5:649-58.
- 7) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
- 8) Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 2002;416:194-9.
- 9) Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13:11-6.
- 10) Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50-3.
- 11) Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9.
- 12) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
- 13) Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA Jr, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-8.
- 14) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- 15) Chaudhary PM, Ferguson C, Nguyen V, Nguyen O, Massa HF, Eby M, et al. Cloning and characterization of two Toll/interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multigene receptor family in humans. *Blood* 1998;91:4020-7.
- 16) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Falvel RA. Recognition of double stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
- 17) Poltorak A, He X, Smirnov I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282:2085-8.
- 18) Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.
- 19) Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
- 20) Steiner RL, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RS. Enteroggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 2000;105:1769-77.
- 21) Wagner H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 1999;73:329-68.
- 22) Hacker H, Vaburas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med* 2000;192:595-600.
- 23) O'Neill L, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects and plants. *J Leuko Biol* 1998;63:650-7.
- 24) Wyllie DH, Kiss-toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in antibacterial responses. *J Immunol* 2000;165:7125-32.
- 25) Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor 2. *Science* 1999;285:736-9.
- 26) Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, et al. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999;163:2382-6.
- 27) Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. Activation of Toll-like receptor 2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001;167:416-23.
- 28) Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000;1:398-401.
- 29) Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR2 in the activation of nuclear factor B by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001;276:5197-203.
- 30) O'Neill L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: A molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans* 2000;28:557-63.
- 31) Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppac-

- ciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors(TLR) in human leukocytes : selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:5998-6004.
- 32) Visintin A, Mazonni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:249-55.
- 33) Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, et al. Tollip, a new component of the IL-1RI pathways, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2000;2:346-51.
- 34) Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383:443-6.
- 35) Bertotto A, Spinozzi F, Vagliasindi C, Radicioni M, De Rosa O, Vaccaro R. Tuberculin skin test reactivity in Kawasaki disease. *Pediatr Res* 1997;41:560-2.
- 36) Sireci G, Dieli F, Salerno A. T cells recognize an immunodominant epitope of heat shock protein 65 in Kawasaki disease. *Mol Med* 2000;6:581-90.
- 37) Yokota S. Heat shock protein as a predisposing and immunopotentiating factor in Kawasaki disease. *Acta Paediatr Jpn* 1991;33:756-64.
- 38) Takeshita S, Kawase H, Yamamoto M, Fujisawa T, Sekine I, Yoshioka S. Increased expression of human 63-kD heat shock protein gene in Kawasaki disease determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Pediatr Res* 1994;35:179-83.
-