

マスト細胞の分化に伴う機能制御

田中 智之

マスト細胞は造血幹細胞に由来し、前駆細胞として循環血中を經由した後、浸潤した組織において最終的な分化を遂げる。このことは、マスト細胞の分化を通じた機能獲得のプロセスが、組織の微小環境によって影響を受けることを示唆している。マスト細胞が関与する応答を理解するためには、こうした組織によるヘテロ性を解明する必要がある。筆者らは、初代培養系を利用して、IgEが抗原非存在下においてもマスト細胞を活性化し、その機能を増強することや、線維芽細胞との共培養による成熟過程においてダイナミックな遺伝子発現変化が起こることを明らかにした。近年の研究から、マスト細胞は多彩な刺激に応じて反応することが明らかとなっており、組織のセンサー細胞として、重要な機能が今後さらに見いだされていくことが予想される。

1. はじめに

マスト細胞は全身の様々な組織に分布する免疫細胞であり、その特徴として細胞質に多数の顆粒をもつことがあげられる。顆粒内には硫酸化プロテオグリカンが豊富に含まれているが、Ehrlichによるマスト細胞の発見はその特異な染色性に基づくものである¹⁾。マスト細胞は、蕁麻疹や花粉症といった即時型アレルギーにおける主要なエフェクター細胞として機能することがよく知られているが、一方で寄生虫感染の生体防御に関与することも古くから報告がある²⁾。マスト細胞は刺激に応じて多様な炎症性メディエーターを産生することが知られている。例えば、即時型アレルギーにおけるIgEを介する抗原抗体反応では、速やかな脱顆粒応答によりヒスタミン等の顆粒内容物が放出され、その後、プロスタグランジンD₂ (PGD₂)やロイコトリエンC₄ (LTC₄)といったアラキドン酸代謝物が産生され、数時間後には転写を介してサイトカインが産生される

(図1)²⁾。このようにして産生されるメディエーターの多くは炎症応答の惹起に関与するが、近年の研究ではT細胞との相互作用をはじめ、より広範な免疫応答の制御にマスト細胞が関与することが報告されている(表1)。こうしたマスト細胞の生体内での役割を理解するためには、組織に分布するマスト細胞の機能や性質を明らかにする必要がある。マスト細胞は骨髄の造血幹細胞に由来するが、後述するように、マスト細胞は前駆細胞として骨髄を遊離し、浸潤した組織の微小環境の影響を受けて成熟、分化すると考えられている。筆者は、ヒスタミン合成の研究を進める過程で、マスト細胞の分布組織によるヘテロ性の解明が、マスト細胞の機能を理解する上で重要であることを認識する

表1 最近報告されたマスト細胞の新たな機能

マスト細胞の機能		文献
T細胞との相互作用		
Treg	Treg 活性化の抑制	4)
	Tregのエフェクター細胞としてのはたらき(免疫寛容)	5)
Tc (CD8 ⁺)	MHCクラスを介した抗原のクロスプレゼンテーション	6)
液性免疫 炎症反応の抑制	脱顆粒を介したアジュバント効果	7)
	接触性皮膚炎, UVBによる炎症応答の抑制(IL-10 誕生)	8)
その他・疾患	耐糖能の低下, 肥満を促進	9)
	動脈硬化の増悪への寄与	10)
	ヘビ毒, ハチ毒の分解(防御応答)	11)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体機能化学分野
(薬学部免疫医薬品化学) (〒700-8530 岡山市北区津島
中1-1-1)

Regulation of mast cell functions through its differentiation
Satoshi Tanaka (Department of Immunochemistry, Division
of Pharmaceutical Sciences, Okayama University Graduate
School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences,
1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan)
本総説は2009年度奨励賞を受賞した。

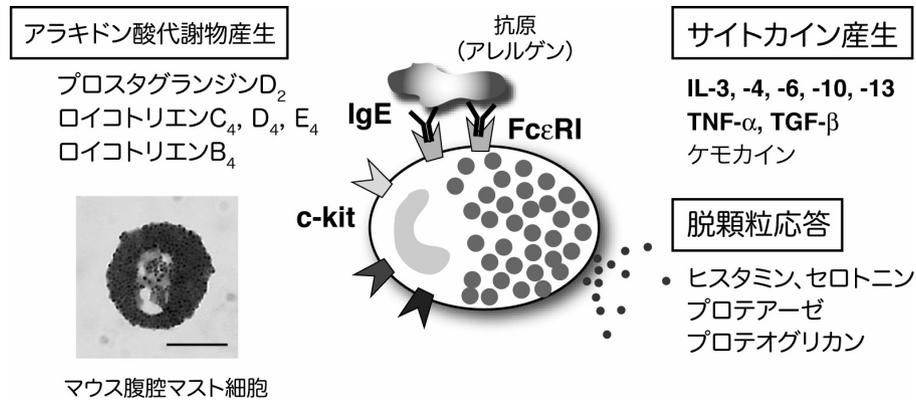


図1 マスト細胞由来のメディエーター

マスト細胞は様々な刺激により活性化し、多彩なメディエーターを産生する。図はIgEを介した抗原抗体反応を示しており、産生されるメディエーターを、1) 刺激後直ちに起こる脱顆粒応答、2) 酵素反応により生じるアラキドン酸代謝物の産生、3) 転写レベルで誘導されるサイトカイン産生、という三つのカテゴリーに分類している。この他にも、増殖因子や生理活性ペプチドを産生することが知られている。左下はマウス腹腔マスト細胞をサフラニン染色したもの。Bar=10 μm.

に至った。本総説では、マスト細胞の機能制御に関する近年の関連分野の進捗とあわせて、筆者らの研究により得られた知見を述べる。

2. IgE を介するマスト細胞の活性化

高親和性IgE受容体であるFcεRIとstem cell factor (SCF)の受容体であるc-kitとともに発現する細胞としてマスト細胞は定義される。IgEとSCFはマスト細胞の増殖、分化、活性化に重要な因子であるが、生体内で両者を介するシグナルがどのような状況でマスト細胞に作用するかは必ずしも明らかではない。また、IgEを介する抗原抗体反応についてはこれまで盛んに研究が進められてきたが、マスト細胞の成熟や分化にIgEがどのような役割を果たすかについては、不明な点が数多く残されている。

(1) 抗原抗体反応による活性化

マスト細胞からのヒスタミン遊離は様々なアレルギー様症状を惹起することから、従来の研究ではマスト細胞の脱顆粒機構に焦点がおかれてきた。しかしながら、近年、脱顆粒が起こらないような弱い抗原刺激によってもケモカインや一部のサイトカインの産生が誘導されることが見いだされている¹²⁾。一方で、一部のサイトカインの産生には、脱顆粒の閾値より強い抗原刺激が必要である。即ち、FcεRIを介したマスト細胞の活性化応答は、刺激の強さに応じて精巧に制御されていると考えられる(図2)。例えば、強い抗原刺激が入力された際にはIL-10が産生されるが、これは過剰な免疫応答の進行を抑制する一種のフィードバック機構と考えられる⁸⁾。ごく最近、FcεRIの凝集について単分子レベルでの解析が行われ、抗原濃度が低くFcεRIのクラスターのサイズが小さい場合は、比較的その

流動性が高く、一方で大きなものは流動性に乏しいことが明らかとなった¹³⁾。こうしたFcεRIの膜表面での動態の相違が、マスト細胞の出力パターンの変化を制御している可能性も考えられる。

(2) 単量体IgE 応答

従来、IgEがFcεRI分子に結合する「感作」の段階は静的で、マスト細胞に変化はもたらされないと考えられてきた。しかしながら、そうした概念は近年の一連の研究により修正されている。Src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) 欠損マウスから調製したIL-3依存性骨髄由来培養マスト細胞(BMMC, 後述)では、特異抗原が存在しない条件でも、IgEにより脱顆粒が起こることが見いだされた¹⁴⁾。また、この解析を通じて、野生型のBMMCでは脱顆粒は起こらないものの、細胞質Ca²⁺濃度はIgE単独処理でも増大することが同時に明らかとなった。その後、IL-3を除くことにより惹起されるアポトーシスが、IgEを添加することにより抑制されることが報告され、抗原非依存的なIgEの作用に注目が集まるようになった^{15,16)}。一方のグループは、IgEによる複数のサイトカイン産生をあわせて報告したが、アポトーシスの抑制には、この中のIL-3のオートクライン作用が重要であることが後に明らかにされている¹⁷⁾。筆者は同時期にやはりBMMCにおいて、IgEの結合がヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素(L-histidine decarboxylase, HDC)を転写レベルで顕著に誘導し、細胞内のヒスタミン含量を約4倍に増大させることを見いだした¹⁸⁾。こうした抗原に依存しないIgEによるマスト細胞の活性化は、「単量体IgE 応答」と呼ばれ、その後、マスト細胞の接着や遊走、サイトカイン産生についての報告が相次いだ¹⁹⁾。単量体

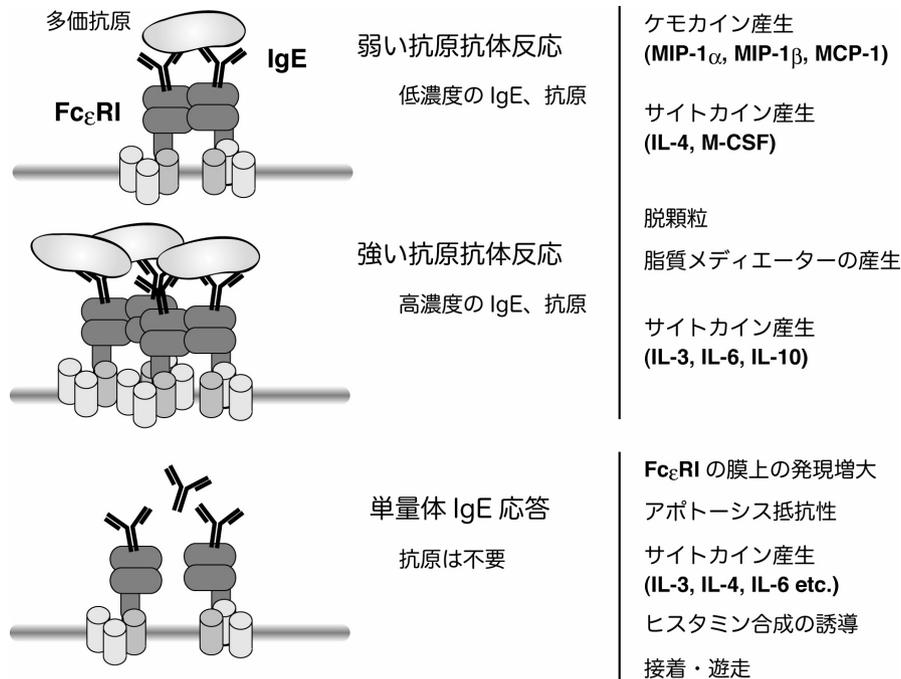


図2 IgE を介するマスト細胞の活性化

IgE を介する抗原抗体反応では、従来脱顆粒の有無が注目されてきたが、脱顆粒に至らない弱い抗原抗体反応（抗体濃度が低い、あるいは抗原濃度が低い）でもケモカイン産生や一部のサイトカイン産生が起こることが明らかとなっている。一方で、脱顆粒より閾値の高いサイトカイン産生があることも報告されている。一方、抗原不在でも IgE の結合によりマスト細胞の活性化が起こる。この、「単量体 IgE 応答」では脱顆粒は殆ど起こらないが、抗原抗体反応に匹敵する多彩な細胞応答が惹起される。

IgE 応答では、脱顆粒やアラキドン酸代謝物の産生は起こらないものの、抗原抗体反応に匹敵するレベルのサイトカイン産生が報告されている。単量体 IgE 応答のメカニズムの詳細は今なお明らかではないが、IgE のクローンにより応答の強さが異なることが筆者を含む複数のグループにより確認されており、抗原結合部位が応答の惹起に関わることが示唆されている。抗原抗体反応では、多価抗原が IgE を介して Fc ϵ RI を架橋することが応答の引き金となるため、単価抗原を大量に添加するとその反応は顕著に減弱する。そこで、単量体 IgE 応答において同様の検討を行ったところ、抗原抗体反応と同様に単価抗原の存在により顕著に応答が減弱することが明らかとなった^{20,21)}。こうした知見から、一部の IgE クローンには、その抗原結合部位を介してある特定の標的分子と相互作用する働きがあるという可能性が考えられる。しかしながら、現在のところその候補は不明である。James らは、単量体 IgE 応答を強く惹起するクローンの一つである SPE-7 の X 線結晶構造解析を行い、この IgE 分子が二種の異なるコンフォメーション間での平衡状態にあり、全く立体構造の異なる抗原と結合できることを示した²²⁾。こうした 'isomeric antibody' の報告と単量体 IgE 応答との関係は、興味深い観点である。単量体 IgE 応答は緩衝液中でも起こり、血清の存在には依存し

ないことから、筆者は IgE の標的は細胞表面に存在する分子ではないかと考えている。

単量体 IgE 応答が報告された当初は、抗原抗体反応との異同がしばしば議論的となった。筆者は、細胞外からの Ca²⁺ 流入について、単量体 IgE 応答と抗原抗体反応とを比較し、両者が薬理学的に異なるチャンネルを介するのを見いだした²¹⁾。Fc ϵ RI を発現しないことが知られているが、ん化マスト細胞株 P-815 を用いた検討では、Fc ϵ RI 分子を再構成した細胞では抗原抗体反応による Ca²⁺ 応答が確認されるにも関わらず、単量体 IgE 応答は全く見られなかった。しかしながら、Fc ϵ RI 下流のシグナル分子の発現を調べたところ、P-815 では protein kinase C β II (PKC β II) が欠失していること、そして Fc ϵ RI と PKC β II を同時に発現した細胞では単量体 IgE 応答が再現されることが明らかとなった²³⁾。この結果から、PKC β II は抗原抗体反応には必須ではなく、単量体 IgE 応答に特異的な機能があることが強く示唆された。マスト細胞では、PKC β II は、サイトカイン産生に重要な役割を果たす Akt の活性化をそのリン酸化を通じて促進することが知られている^{24,25)}。また、mitogen-activated protein kinase (MAPK) のファミリーの活性化では、抗原抗体反応では一過性の強い応答が、一方で単量体 IgE 刺激では弱く持続的な応答が起こることが見い

だされている。こうした一連の知見もまた、単量体 IgE 応答と抗原抗体反応では、少なくとも一部は異なるシグナル伝達経路が利用されることを示唆するものである。

花粉症やアトピー性皮膚炎のような慢性アレルギー疾患では、しばしば血中 IgE レベルが 100 倍以上にも達する高 IgE 血症が認められる。この際、誘導される IgE 分子の殆どはアレルゲン特異的ではないが、その機能については明らかではない。一方で、臨床でも用いられている抗 IgE 抗体の作用機序は、血中 IgE レベルを低下させることではないかと考えられている²⁶⁾。FcεRI 受容体は IgE が結合していない状態では速やかに内在化するが、IgE の結合により安定化し、形質膜表面に留まる。そのため、細胞外の IgE 濃度が上昇することにより、顕著な FcεRI のアップレギュレーションが起こる²⁷⁾。即ち、IgE レベルの増大は FcεRI のアップレギュレーションを介して、さらにその作用を拡大することが予想される。Bryce らは、マスト細胞に依存する接触性皮膚炎モデルにおける IgE の役割について興味深い結果を報告している²⁸⁾。このモデルは IgE に依存しており、IgE 欠損マウスでは反応が消失するが、ハプテン感作前に IgE を投与することで再び皮膚炎が発症する。しかしながら、この際に必要な IgE は必ずしもハプテン特異的な IgE クローンである必要はなかった。即ち、局所における感作の成立には IgE 分子が必要であるが、その機能は抗原非特異的なものであると考えられる。

こうした近年の一連の知見は、IgE には特異抗原と結合して FcεRI の架橋を引き起こすことに加えて、組織のマスト細胞機能の増強や局所の免疫環境の変化をもたらすという働きがあることを示唆している (図 3)。

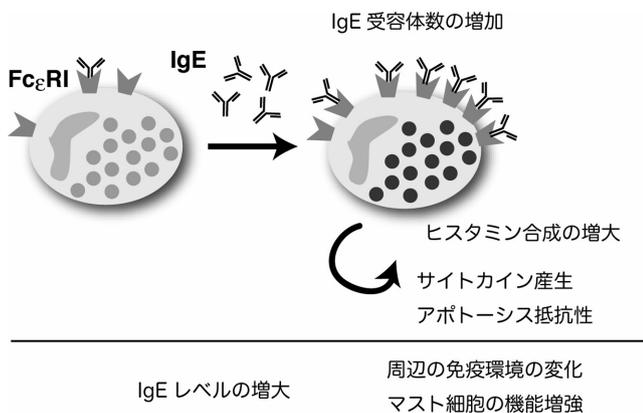


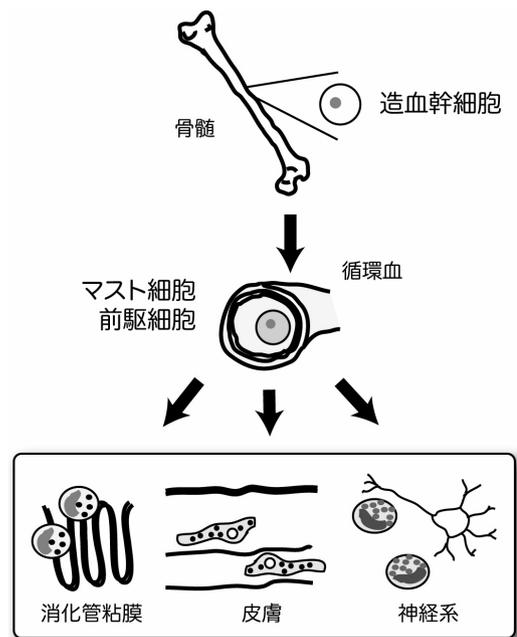
図 3 単量体 IgE 応答の及ぼす効果

慢性アレルギーにおいてしばしば認められる高 IgE 血症はマスト細胞にも影響を与えることが予想される。マスト細胞の周囲の IgE 濃度が増大すると、膜表面の FcεRI 分子のアップレギュレーションが起こる。単量体 IgE 応答により産生されたサイトカインは、オートクラインの仕組みで自己のアポトーシスを抑制し、また一方では周囲の細胞にはたらきかけて局所の免疫環境に変化をもたらす。ヒスタミン合成の誘導は顆粒内のヒスタミン貯留量を増大させる。

3. マスト細胞の分化と機能獲得

マスト細胞は骨髄の造血幹細胞に由来し、前駆細胞として循環血中を移動し、組織へ浸潤した後に最終的な分化を遂げると考えられている (図 4)。これは、北村らの遺伝子変異モデルを巧みに利用した先駆的な研究により提示され、後述するマスト細胞再構成実験が成立する根拠としてもきわめて重要な概念である²⁹⁾。近年相次いでマスト細胞への分化に方向付けられた前駆細胞の同定が報告されており、組織中のマスト細胞前駆細胞やその遊走、定着に関する研究とあわせて、生体内のマスト細胞の運命が次第に明らかにされつつある³⁰⁻³²⁾。

生体内のマスト細胞は、染色性や刺激応答性に基づき二種に大別されている。齧歯類では、皮膚や腹腔などに分布する組織結合型マスト細胞 (connective tissue-type mast cell, CTMC) と、寄生虫感染の際に消化管に誘導される粘膜型マスト細胞 (mucosal mast cell, MMC) という分類がある²⁾。CTMC はサフラニン染色陽性のヘパリンに富む顆粒をもち、高いヒスタミン含量を示し、カチオン性刺激 (ポリカチオンである compound 48/80 に対する反応性が指標となる) に応じて脱顆粒する。一方で、MMC は顆粒内のプロテオグリカンの硫酸化レベルやヒスタミン含量は低く、



成熟マスト細胞

図 4 マスト細胞の分化

マスト細胞は骨髄の造血幹細胞に由来し、その最終的な成熟は浸潤した組織において起こると考えられている。循環血中にはマスト細胞の特徴をもつ細胞は存在しないが、マスト細胞前駆細胞については近年報告がある。それぞれの組織で最終分化を遂げるマスト細胞には、分布組織によるヘテロ性が大きいことが予想される。

カチオン性刺激に対する応答性を示さない。また、CTMCの分化は主としてSCFのシグナルに依存しており、受容体をコードする*c-kit*の遺伝子に変異をもつマウスの中には、マスト細胞欠損マウスとして知られる系統がある³³。一方で、MMCの誘導にはT細胞の活性化が関与しており、マウスでは特にIL-3が重要な働きをしている³⁴。マスト細胞の最終分化は浸潤した組織で起こることから、生体内のマスト細胞はより大きなヘテロ性をもつ集団と考えられるが、マスト細胞の分化と機能を関連づけて考える上で有用な分類としてCTMC/MMCの分類は用いられてきた。生体内に分布するマスト細胞の多くは、CTMCに分類されるものであり、実際、*c-kit*変異をもつ*Kit^{W^v}*マウスは、マスト細胞欠損モデル動物として利用されている。近年明らかになったマスト細胞の多彩な生理作用の多くは、CTMCに分類されるマスト細胞によって担われている。しかしながら、CTMCの性質を反映する培養系の報告は僅かであり、CTMCがどのような刺激を受容し、さらにどのような応答を通じて免疫応答を制御するのかという課題を細胞レベルで解析することは困難であった。そこで、筆者はCTMCモデルとなる細胞培養系を確立し、これを用いてマスト細胞の分化、成熟プロセスを解明することを目標とした。

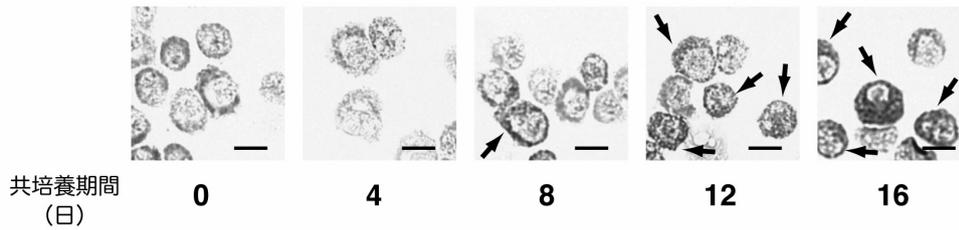
(1) 組織結合型マスト細胞モデルの確立とその解析

MMCへの分化にはIL-3が大きな役割を果たすが、マウス骨髄細胞をIL-3存在下長期間(およそ1ヶ月)培養することにより、ほぼ均一なマスト細胞の集団を得ることができる。これはIL-3依存性骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)と呼ばれ、*c-kit*とFceRIの両方を発現し、IgEを介した抗原抗体反応により、脱顆粒、アラキドン酸代謝物産生、サイトカイン産生といった応答を示す。マスト細胞株の多くが常時活性型の変異型*c-kit*を発現しているのに対して、BMMCは初代培養でSCFに対する応答性を示すことから、数多くの研究においてマスト細胞のモデルとして採用されている。一方、組織の成熟マスト細胞と比較すると、プロテオグリカンの成熟度や、ヒスタミン含量、顆粒内のプロテアーゼ発現、カチオン性刺激に対する脱顆粒応答といった指標においていずれも低いレベルにとどまることから、BMMCは未成熟なマスト細胞の性質を反映する系と位置づけられている。近年、IgE非依存性の刺激によるマスト細胞の活性化が注目を集めているが、そうしたテーマの研究では必ずしもBMMCが適切な実験系ではないため、腹腔マスト細胞の精製や個体レベルでの検討が行われてきた。しかしながら、こうした手法はスケールや結果の解釈において限界があり、CTMCの性質を反映する細胞培養系の開発が望まれていた。筆者は、BMMCを線維芽細胞株とSCF存在下、共培養することにより

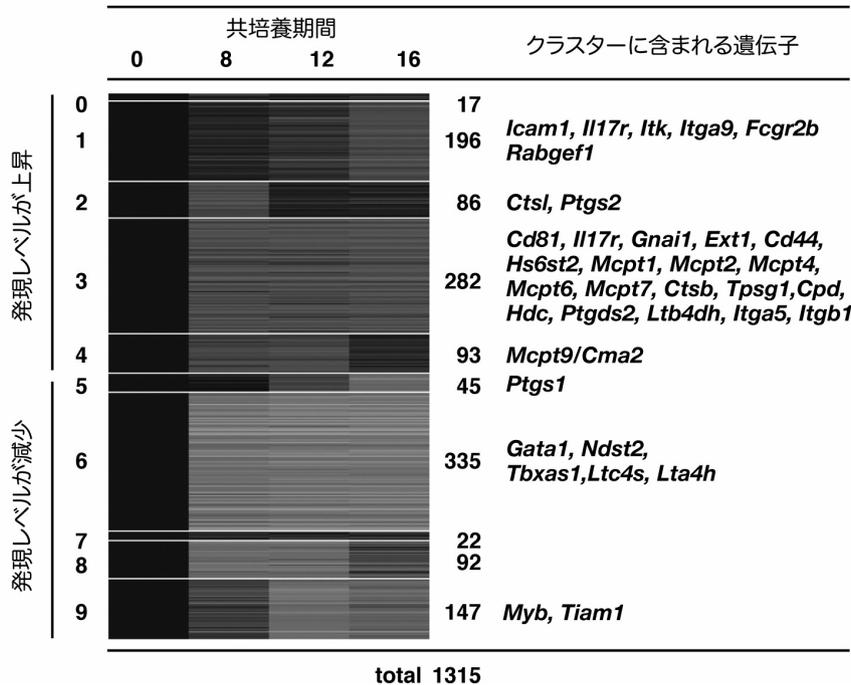
CTMC様の培養マスト細胞を得るという実験系に着目した^{35,36}。この系では、可溶性のSCFおよび線維芽細胞株が発現する膜結合型SCFとマスト細胞が発現する*c-kit*との結合、および機序は不明であるがマスト細胞と線維芽細胞株間の接着を通じて、BMMCからCTMC様細胞への分化が進展する。しかしながら、マスト細胞と線維芽細胞は互いに他の細胞増殖に影響を与えるため、少しの培養条件の相違やサイトカインの添加により、共培養系で維持されているバランスが崩壊し、再現性の良い結果が得られない点が課題であった。筆者は、フィーダーである線維芽細胞株をマイトマイシンCで処理し、その細胞増殖を停止させることにより、再現性が高く安定した共培養系を確立することに成功した³⁷。この新規培養法により、4日間毎にフィーダーを交換し、計16日間でBMMCの80%以上がサフラニン染色陽性のCTMC様のマスト細胞へと分化することを確認した(図5A)。培養過程では、細胞内ヒスタミン量、顆粒プロテアーゼ活性といった指標において経時的な増大が認められ、一方でcompound 48/80やサブスタンスPに対する感受性が獲得されることも明らかとなった。筆者は、この過程が生体内でマスト細胞が成熟する過程の一部を反映するものと考え、共培養時のマスト細胞の発現遺伝子の網羅的な解析を行った。その結果、約20,000の遺伝子を搭載したマイクロアレイにより、分化過程で発現量が2倍以上に変化したものが1,315抽出され、それらは経時的な変動パターンに基づき10のクラスターに分類された(図5B)。共培養により発現量が増大する遺伝子群には、HDCや顆粒プロテアーゼ群、ヘパリン合成に関わる酵素群などが含まれており、共培養におけるマスト細胞の性質の変化が反映されていることが確認された。マスト細胞の最終分化過程を制御する転写因子は未だ不明であるが、血球系細胞の分化に重要でマスト細胞分化の初期段階にも関わる転写因子GATA1や、マスト細胞におけるHDCの発現調節に関わるということが報告されているMybといった転写因子の発現が著しく低下することを始め、興味深い遺伝子の発現変動が見いだされている(図5C)³⁷。compound 48/80刺激による三量体型Gタンパク質のG_i依存的な脱顆粒応答はCTMCの特徴の一つであるが、網羅的な発現解析からはG_{i1}のαサブユニットの誘導が見いだされた。従来報告ではG_{i2}やG_{i3}の関与が推測されていたが、イムノプロットの結果からは、共培養により誘導されるαサブユニットはG_{i1}のみであった。マスト細胞の最終分化と機能獲得のメカニズムを解明する上で、ここで得られた遺伝子群は重要な手がかりとなることが期待される。

(2) CD44を介した皮膚組織におけるマスト細胞数の制御 共培養実験では、フィーダー上のマスト細胞の中で、線

A



B



C

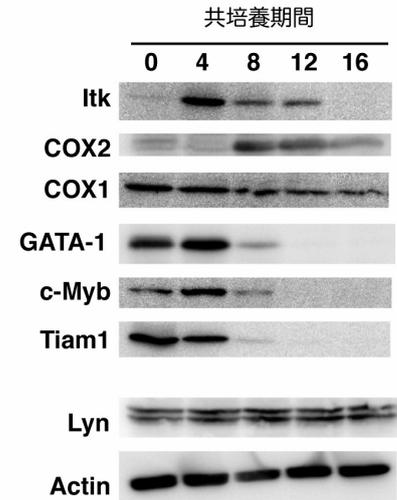


図 5 組織結合型マスト細胞モデル

IL-3 依存性マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMBC) を、マウス線維芽細胞株 Swiss 3T3 と SCF 共存下、共培養を行うことにより、組織結合型マスト細胞モデルを確立した。(A) アルシアンブルー・サフラニン染色により、共培養時の顆粒染色性の経時変化を調べた。矢印で示すサフラニン陽性の成熟マスト細胞の比率が次第に増大した。Bar = 10 μ m。(B) 共培養時の遺伝子発現の経時変化をマイクロアレイにより解析し、発現パターンに基づき 10 のクラスターに選別した。(C) (B) で得られた遺伝子群の一部について、イムノプロット法によりタンパク質レベルでの発現変化を検討した。Lyn, Actin は共培養期間中に発現量に変化のない遺伝子産物で、対照として測定した。

維芽細胞株に接着するものは一部で、殆どは浮遊状態で緩やかなクラスターを形成した。そこで、線維芽細胞から産生されるマトリックス成分に着目したところ、このクラスターはヒアルロニダーゼ処理により破壊されることが分かった。一方で、共培養により誘導される遺伝子群にはヒアルロン酸の主要な受容体として知られる CD44 の遺伝子が含まれていた。ヒアルロン酸は皮膚組織に豊富に含まれるマトリックス成分であることから、筆者はヒアルロン酸との相互作用はマスト細胞の分化、成熟を理解する上で重要な要因であると考え、さらに検討を加えることとした³⁸⁾。

まず、共培養系のマスト細胞における CD44 の誘導は、イムノプロットやフローサイトメトリーにより確認され

た。さらに、抗 CD44 抗体とヒアルロン酸結合タンパク質を用いた蛍光染色の結果、ヒアルロン酸により形成されるマトリックスに、CD44 を発現するマスト細胞が結合していることが明らかとなった (図 6A)。CD44 には選択的スプライシングによるアイソフォームが多数存在することが知られているが、マスト細胞に発現する CD44 は alternative exon をもたない血球型 CD44 (CD44H, CD44s という呼称もある) であった。CD44 欠損マウス骨髄から BMBC を調製し、マスト細胞関連の指標を野生型と比較したところ、殆ど相違は見られなかった。そこで、共培養系における両者の分化、成熟について比較を行った。CD44 欠損マスト細胞は、野生型と比較すると小さなクラスターを形成した。また、顆粒の染色性や顆粒プロテアーゼ活性の誘導

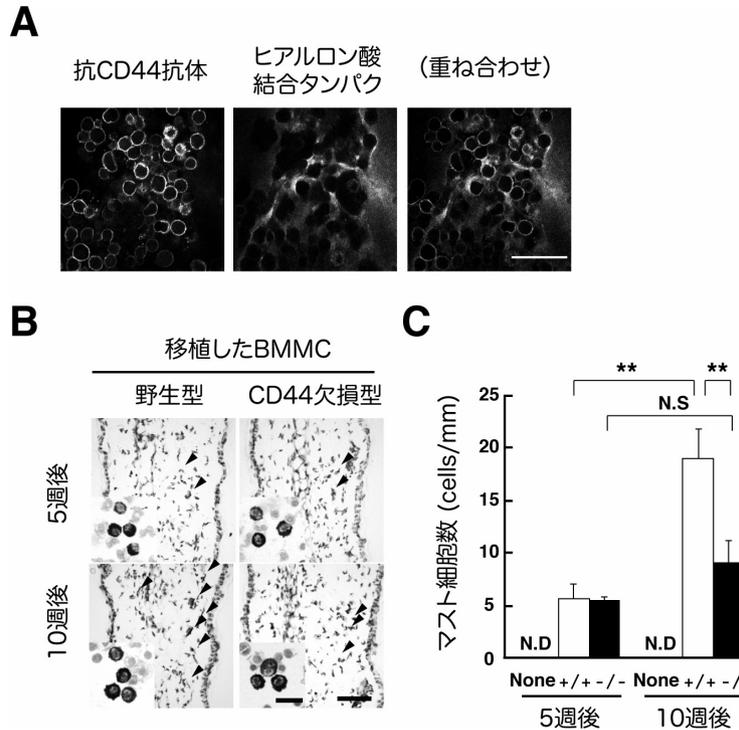


図6 マスト細胞におけるCD44の機能

(A) BMMCと線維芽細胞株との共培養モデルにおけるCD44とヒアルロン酸の局在を調べた。CD44はマスト細胞の表面に分布しており、一方でヒアルロン酸はマトリックス構造を形成していた。重ね合わせの像からは、マスト細胞がマトリックスに結合してクラスターを形成している様子が分かる。Bar=100 μm。(B) マスト細胞欠損モデルである*Kit^{W/V}*マウスの耳介皮膚組織、および腹腔に、野生型およびCD44遺伝子欠損のBMMCを移植し、5週間後、あるいは10週間後に観察した。Bar=20 μm (挿入図, 腹腔), 100 μm (皮膚組織)。(C) CD44を欠損するマスト細胞は、皮膚組織への移植後の増殖応答が見られなかった。

といった指標では両者に相違は見られなかったが、CD44の発現誘導が見られる培養8日目からの細胞増殖の顕著な抑制および³Hチミジン取り込みの低下が認められた。こうした結果は、マスト細胞の分化に伴う細胞増殖応答にCD44が必要であることを示している。CD44は1回膜貫通型タンパク質であり、そのサイトゾル領域は比較的小さいが、いくつかの細胞骨格制御因子が結合することが報告されている。ezrinやmoesinとmerlinの間では競合関係があり、細胞密度の低いときにはmerlinがリン酸化されezrinやmoesinがCD44に結合し、Ras-MAPKの経路やRacが活性化され細胞増殖が促進される。一方で、merlinが脱リン酸化されると、ezrinやmoesinと置換し細胞増殖に抑制的にはたらく³⁹⁾。これらは接着細胞での知見であるが、c-kitを介する細胞増殖にはRacの活性化が関わることが報告されており⁴⁰⁾、CD44の機能の一つはSCFによる増殖シグナルの増強である可能性が考えられる。

CD44欠損マウスにおける組織マスト細胞について調べたところ、皮膚組織、腹腔、いずれにおいてもCD44欠損マウスでマスト細胞数の有意な減少が認められた³⁸⁾。

CD44は、線維芽細胞や内皮細胞をはじめ様々な細胞で発現しており、また血球系細胞の接着や遊走に関わることも報告されている⁴¹⁾。そのため、組織におけるマスト細胞数減少には、マスト細胞の組織における増殖だけでなく、組織への遊走あるいは定着といったプロセスが関与する可能性も考えられた。そこで、組織マスト細胞を欠失する*Kit^{W/V}*マウスにBMMCを移植するマスト細胞再構成モデルを用いて、移植後のマスト細胞数の変化を調べた。その結果、腹腔では移植後5週間と10週間で有意な変化は認められなかったが、皮膚組織では野生型が有意なマスト細胞数の増加を示すのに対して、CD44欠損BMMCを移植した場合は、マスト細胞数の変化は認められなかった(図6B, C)³⁸⁾。即ち、マスト細胞に発現するCD44は、皮膚組織における自身の増殖を正に制御する因子であることが推察された。そこで、さらにIgE依存性の受動皮膚アナフィラキシー(PCA)応答について比較を行ったが、CD44欠損マウスにおいても野生型マウスと同程度の反応が認められた。マスト細胞数が減少しているにも関わらず即時型応答が減弱しないことは予想外であったが、CD44欠損マ

ウスの解析ではしばしば炎症反応の増悪が報告されている。CD44はヒアルロン酸のクリアランスに関わる受容体であるため、CD44欠損マウスでは組織のヒアルロン酸量が増大する。ヒアルロン酸受容体として機能するタンパク質は、CD44の他にもいくつか報告されているが、RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility, CD168) は一部のCD44の機能を補償する。CD44欠損マウスでは、コラーゲン誘発関節炎モデルの増悪が認められるが、これには蓄積したヒアルロン酸とRHAMMが関与することが示唆されている⁴²⁾。

ヒアルロン酸は分子量 10^6 - 10^7 という巨大分子としてマトリックスを構成するが、炎症反応や腫瘍付近ではヒアルロナーゼや活性酸素種による切断を通じて、低分子のヒアルロン酸が産生される。高分子と低分子のヒアルロン酸、あるいはオリゴ糖としてのヒアルロン酸は、それぞれ異なる(場合によっては相反する)作用をもつことが報告されている^{41,43)}。マスト細胞は、腫瘍周辺や移植組織、関節炎の際の滑膜付近に集積することが知られている²⁾が、こうした組織はいずれも活発にヒアルロン酸が合成、分解されている。ヒアルロン酸-CD44複合体により、マスト細胞の集積、あるいは増殖が生体内でどのように制御されているかは興味深い課題である⁴⁴⁾。

(3) マスト細胞の成熟におけるヒスタミンの役割

現在、ヒスタミン受容体は H_1 から H_4 まで4種類が同定されているが、多数のリガンドが開発され、臨床応用が進んでいる受容体研究と比較すると、ヒスタミン生合成のメカニズムや制御機構については不明な点が数多く残されている。筆者は、ヒスタミン生合成が重要な役割を果たす生理機能を見いだすことを目標として、渡邊、大津、Nagy、Falusらとの共同研究によりHDC欠損マウスを作製した⁴⁵⁾。HDC欠損マウスは、生殖可能であり、顕著な異常は認められなかった。一方で、IgE依存性のPCA応答や全身性アナフィラキシー応答はほぼ完全に消失しており、即時型アレルギー様症状を呈さないことが分かった^{46,47)}。こうした即時型アレルギーモデルはいずれも H_1 受容体アンタゴニストを前処理することにより完全に抑制されるため、筆者らは当初、反応性の消失はヒスタミンの欠如に起因するものと考えていた。しかしながら、皮膚や腹腔に分布するマスト細胞の観察により、HDC欠損マウスは極めて電子密度の低下した異常な顆粒をもつことが明らかとなった⁴⁵⁾。筆者は、先に述べた線維芽細胞株との共培養系を用いて、BMMCのレベルではHDCの欠損は大きな影響を与えないこと、共培養系による成熟はHDCの欠損により顕著に抑制されることを見いだしており、HDCはマスト細胞の最終分化においてはたらくと推察される(未発表)。実際、共培養系では一過性のHDC活性の誘導が認

められ、ヒスタミン含量も増大する³⁷⁾。ヘパリン合成に関わる酵素群の一つであるglucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulphotransferase-2 (NDST-2)の遺伝子欠損マウスでは、組織マスト細胞の異常が報告されている^{48,49)}。NDST-2欠損マウスでは、HDC欠損マウスと同様に、顆粒の電子密度の低下や顆粒のマスト細胞プロテアーゼ群の発現低下が起こる。しかしながら、HDC欠損マウスでは細胞あたりの顆粒数は野生型と比べて変化はないが、NDST-2欠損マウスでは顆粒数は低下し、大型化しているという違いが認められた。Forsbergらは、NDST-2欠損マウスの腹腔マスト細胞においてヒスタミン含量が野生型の約6.5%に減少していることを報告している⁴⁹⁾。ヘパリンは顆粒内でヒスタミンと静電的な相互作用をしていると推測されているが、NDST-2欠損マウス、HDC欠損マウスのいずれにおいてもマスト細胞の顆粒成熟に異常が認められることは興味深い知見である。

酪酸はヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤として機能し、様々な細胞の分化を誘導することが知られているが、マスト細胞においてもヘパリン合成をはじめとする顆粒形成を誘導するという報告がある⁵⁰⁾。筆者は、酪酸がマウスがん化マスト細胞株、P-815のヒスタミン合成を誘導することに着目した。HDCは、一次配列に相同性のある他のアミノ酸脱炭酸酵素と異なり、C末端に約20 kDaの独自の領域をもち、ラットマスト細胞株において酵素の細胞内局在性の調節に機能することを既に報告している⁵¹⁾。P-815細胞では、酪酸刺激によるヒスタミン合成の誘導は、HDCの翻訳後プロセッシングを介する活性化を伴うことが明らかとなった。HDCのプロセッシング酵素は同定されていなかったが、この系を利用して、酪酸刺激により活性化されるカスパーゼ9がHDCの変換酵素の一つであることを明らかにした⁵²⁾。酪酸刺激ではカスパーゼ3やカスパーゼ9の酵素活性が顕著に上昇したが、アポトーシス応答は認められなかった。近年、こうしたアポトーシスを伴わないカスパーゼの活性化が他の細胞種でも報告されているが、マスト細胞の分化におけるカスパーゼの機能についてはさらなる解析が必要である。

マスト細胞の成熟や分化に影響を及ぼすIL-3やSCF、IgE、酪酸といった刺激は、いずれもヒスタミン合成を誘導するという点で共通している。HDC欠損マウスのマスト細胞の異常は、マスト細胞の成熟過程にHDCの誘導、およびヒスタミン合成が関わることを示唆している(図7)。マスト細胞が産生するヒスタミンが、どのようなメカニズムで自身の顆粒形成を促進するかについて、現在検討を進めているところである。

4. おわりに

近年の分子生物学的なアプローチの発展は、マスト細胞

に発現する遺伝子の網羅的な解析を可能とし、これまで予想されていなかった遺伝子のマスト細胞における機能に焦点が当てられるようになった。特に、組織中の単一細胞のレベルで遺伝子発現解析が可能となったことにより、生体内のマスト細胞の機能の理解が一段と深まることが期待されている⁵³⁾。また、BMMCをマスト細胞欠損マウスに移入する実験系が確立、普及したことにより、局所のマスト細胞の機能をピンポイントに解析することが可能となり⁵⁴⁾、多様な免疫応答に対するマスト細胞による制御機構が明らかにされている。こうした新たな手法を組み合わせることを通じて、今後も引き続き新しいマスト細胞機能が発見されていくことが予想される。一方、医薬品の開発を視野に入れたマスト細胞の機能制御の解明という観点からは、これらのアプローチだけではなお不十分である。遺伝子発現解析は細胞機能を理解する上で重要であるが、刺激

を受けた際の酵素活性の変化を通じた制御や、脱顆粒のような機能に関する情報は得られない。また、マスト細胞再構成実験では、特定のマスト細胞発現遺伝子の欠損による局所の変化は再現できるものの、どのようなメカニズムでマスト細胞を介する個体レベルの変化がもたらされるかに関してはブラックボックスとなってしまうことが多い。筆者は、両者を結ぶ実験系として、優れた細胞培養系の開発が必要であると考えている。共培養系は、複数種の細胞が混在し、その解釈が困難であることから従来は敬遠されてきたが、筆者らが得た知見のように、細胞外マトリックスを含めたある特殊な微小環境下における細胞応答を調べる上で有用な手法であり、共培養系、あるいは三次元的な培養系を利用した解析手法の洗練は、マスト細胞の機能のより深い理解につながるものである。

マスト細胞については、これまでに即時型アレルギーや炎症、寄生虫感染防御における機能が注目され、詳細な解析を通じて数々の知見が蓄積されてきた。一方で、分布する組織によっては、マスト細胞が存在する生理的意義は長い間明らかではなかった。近年の一連の研究は、マスト細胞の表面に多様な環境因子に対する受容体が発現していることを明らかにしている。また、刺激に応じて産生されるメディエーターも多彩である⁵⁵⁾。一方で、こうした報告は全てのマスト細胞に等しく当てはまるものではなく、局所環境に応じてある特定の受容体・メディエーターのサブセットが選択されている。即ち、マスト細胞は、局所の微小環境に応じて分化、成熟を遂げることを通じて、局所環境に最適なセンサー細胞として機能しているという仮説が考えられる(図8)。ごく最近、脂肪組織の間質に分布するマスト細胞が、脱顆粒やサイトカイン産生を通じて、肥満やそれに伴い起こる耐糖能の低下に促進的にはたらくこ

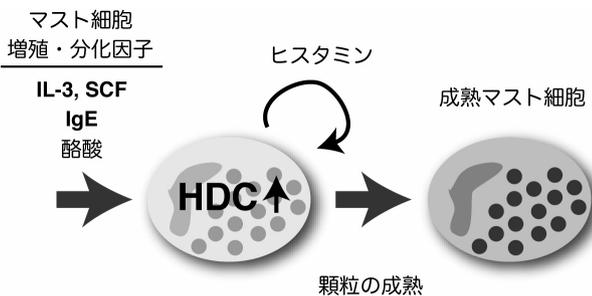


図7 マスト細胞の成熟におけるヒスタミンの機能
IL-3やSCFはマウスのマスト細胞の増殖、分化の両方を制御するサイトカインであるが、これらはいずれもHDCを転写レベルで誘導する。また、単量体IgE応答や、酪酸処理による分化の際にもHDCが誘導される。産生されるヒスタミンはオートクライン作用により、マスト細胞の顆粒の成熟(プロテオグリカンの修飾、顆粒プロテアーゼ発現の誘導)を促進すると考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。

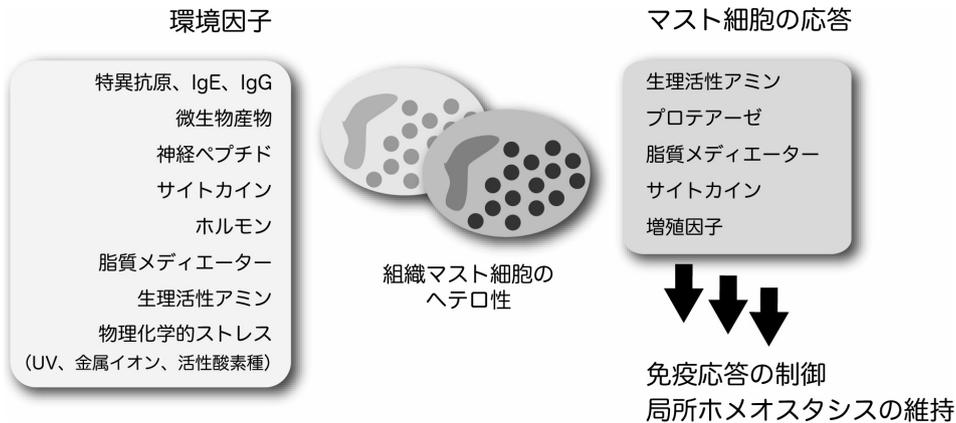


図8 組織のセンサーとしてのマスト細胞
マスト細胞は様々な環境因子に対する受容体を発現しており、そうした刺激に応じて種々のメディエーターを産生する。受容体の発現パターンや、産生メディエーターの組合せは分布する組織により異なる。近年、マスト細胞の新たな機能が次々と見いだされているが、これらはいずれも、マスト細胞が組織におけるセンサーとして働き、免疫応答の制御や微小環境のホメオスタシスの維持に寄与することを示唆している。

とが示唆されている⁹⁾。マスト細胞の活性化の引き金が何かは明らかではないが、肥満に伴う脂肪組織内の変質をマスト細胞が早い段階で察知し、過剰に応答するというメカニズムが想定されている。筆者は、全身の様々な組織に分布するマスト細胞を局所のセンサー細胞として見直すことにより、新たなマスト細胞の機能を見いだすことができると考えている。

謝辞

本研究は、筆者が学生、大学院生、助手として在籍していた京都大学大学院薬学研究科・生体情報制御学分野(旧・衛生化学教室)、および准教授として主宰いたしました武庫川女子大学薬学部免疫生物学研究室において行われたものです。

学生時代から一貫してご指導を賜りました市川厚教授(武庫川女子大学)に深甚の謝意を表します。また、研究室において、常に励まし、また支援していただきました杉本幸彦教授(熊本大学)、中山和久教授(京都大学)、そしてともに研究をすすめた大学院生のみなさまに深く感謝申し上げます。また、個々の研究テーマを進める中で、たくさん素晴らしい研究者に出会い、ご助力いただきました。共同研究を通じてご指導いただきましたみなさまに厚く御礼申し上げます。

文 献

- Ehrlich, P. (1877) *Arch. mikr Anat.*, **13**, 263-277.
- Metcalf, D.D., Baram, D., & Mekori, Y.A. (1997) *Physiol. Rev.*, **77**, 1033-1079.
- Galli, S.J., Grimaldeston, M., & Tsai, M. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 478-486.
- Piconese, S., Gri, G., Tripodo, C., Musio, S., Gorzanelli, A., Frossi, B., Pedotti, R., Pucillo, C.E., & Colombo, M.P. (2009) *Blood*, **114**, 2639-2648.
- Lu, L.F., Lind, E.F., Gondek, D.C., Bennett, K.A., Gleeson, M. W., Pino-Lagos, K., Scott, Z.A., Coyle, A.J., Reed, J.L., Van Snick, J., Strom, T.B., Zheng, X.X., & Noelle, R.J. (2006) *Nature*, **442**, 997-1002.
- Stelekati, E., Bahri, R., D'Orlando, O., Orinska, Z., Mittrücker, H.W., Langenhaun, R., Glatzel, M., Bollinger, A., Paus, R., & Bulfone-Paus, S. (2009) *Immunity*, **31**, 665-676.
- McLachlan, J.B., Shelburne, C.P., Hart, J.P., Pizzo, S.V., Goyal, R., Brooking-Dixon, R., Staats, H.F., & Abraham, S.N. (2008) *Nat. Med.*, **14**, 536-541.
- Grimbaldeston, M.A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M., & Galli, S.J. (2007) *Nat. Immunol.*, **8**, 1095-1104.
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., Doria, A., Libby, P., Blumberg, R.S., Kahn, B.B., Hotamisligil, G.S., & Shi, G.P. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 940-945.
- Sun, J., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Yang, M., Kitamoto, S., Libby, P., Macfarlane, L.A., Clair, J.M., & Shi, G.P. (2007) *Nat. Med.*, **13**, 719-724.
- Metz, M., Piliponsky, A.M., Chen, C.C., Lammel, V., Abrink, M., Pejler, G., Tsai, M., & Galli, S.J. (2006) *Science*, **313**, 526-530.
- Gonzalez-Espinosa, C., Odom, S., Olivera, A., Hobson, J.P., Martinez, M.E., Oliveira-Dos-Santos, A., Barra, L., Spiegel, S., Penninger, J.M., & Rivera, J. (2003) *J. Exp. Med.*, **197**, 1453-1465.
- Andrews, N.L., Pfeiffer, J.R., Martinez, A.M., Haaland, D.M., Davis, R.W., Kawakami, T., Oliver, J.M., Wilson, B.S., & Lidke, D.S. (2009) *Immunity*, **31**, 469-479.
- Huber, M., Helgason, C.D., Damen, J.E., Liu, L., Humphries, R.K., & Krystal, G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11330-11335.
- Asai, K., Kitaura, J., Kawakami, Y., Yamagata, N., Tsai, M., Carbone, D.P., Liu, F.T., Galli, S.J., & Kawakami, T. (2001) *Immunity*, **14**, 791-800.
- Kalesnikoff, J., Huber, M., Lam, V., Damen, J.E., Zhang, J., Siraganian, R.P., & Krystal, G. (2001) *Immunity*, **14**, 801-811.
- Kohno, M., Yamasaki, S., Tybulewicz, V.L., & Saito, T. (2005) *Blood*, **105**, 2059-2065.
- Tanaka, S., Takasu, Y., Mikura, S., Satoh, N., & Ichikawa, A. (2002) *J. Exp. Med.*, **196**, 229-235.
- Kawakami, T. & Kitaura, J. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 4167-4173.
- Kitaura, J., Song, J., Tsai, M., Asai, K., Maeda-Yamamoto, M., Mocsai, A., Kawakami, Y., Liu, F.T., Lowell, C.A., Barisas, B. G., Galli, S.J., & Kawakami, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12911-12916.
- Tanaka, S., Mikura, S., Hashimoto, E., Sugimoto, Y., & Ichikawa, A. (2005) *Eur. J. Immunol.*, **35**, 460-468.
- James, L.C., Roversi, P., & Tawfik, D.S. (2003) *Science*, **299**, 1362-1367.
- Liu, Y., Furuta, K., Teshima, R., Shirata, N., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., & Tanaka, S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 38976-38981.
- Kitaura, J., Asai, K., Maeda-Yamamoto, M., Kawakami, Y., Kikkawa, U., & Kawakami, T. (2000) *J. Exp. Med.*, **192**, 729-740.
- Kawakami, Y., Nishimoto, H., Kitaura, J., Maeda-Yamamoto, M., Kato, R.M., Littman, D.R., Leitges, M., Rawlings, D.J., & Kawakami, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 47720-47725.
- Holgate, S., Casale, T., Wenzel, S., Bousquet, J., Deniz, Y., & Reischer, C. (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **115**, 459-465.
- Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H., & Karasuyama, H. (2001) *J. Immunol.*, **167**, 3427-3434.
- Bryce, P.J., Miller, M.L., Miyajima, I., Tsai, M., Galli, S.J., & Oettgen, H.C. (2004) *Immunity*, **20**, 381-392.
- Kitamura, Y. (1989) *Annu. Rev. Immunol.*, **7**, 59-76.
- Chen, C.C., Grimaldeston, M.A., Tsai, M., Weissman, I.L., & Galli, S.J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11408-11413.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F., & Akashi, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18105-18110.
- Hallgren, J. & Gurish, M.F. (2007) *Immunol. Rev.*, **217**, 8-18.
- Nocka, K., Tan, J.C., Chiu, E., Chu, T.Y., Ray, P., Tractman, P., & Besmer, P. (1990) *EMBO J.*, **9**, 1805-1813.
- Lantz, C.S., Boesiger, J., Song, C.H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R.C., Nawa, Y., Dranoff, G., & Galli, S.J. (1998) *Nature*, **392**, 90-93.
- Levi-Schaffer, F., Austen, K.F., Gravallesse, P.M., & Stevens,

- R.L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6485–6488.
- 36) Ogasawara, T., Murakami, M., Suzuki-Nishimura, T., Uchida, M.K., & Kudo, I. (1997) *J. Immunol.*, **158**, 393–404.
- 37) Takano, H., Nakazawa, S., Okuno, Y., Shirata, N., Tsuchiya, S., Kainoh, T., Takamatsu, S., Furuta, K., Taketomi, Y., Naito, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsujimoto, G., Murakami, M., Kudo, I., Ichikawa, A., Nakayama, K., Sugimoto, Y., & Tanaka, S. (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 1444–1450.
- 38) Takano, H., Nakazawa, S., Shirata, N., Tamba, S., Furuta, K., Tsuchiya, S., Morimoto, K., Itano, N., Irie, A., Ichikawa, A., Kimata, K., Nakayama, K., Sugimoto, Y., & Tanaka, S. (2009) *Lab. Invest.*, **89**, 446–455.
- 39) Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H., & Herrlich, P. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 968–980.
- 40) Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G., & Besmer, P. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6250–6262.
- 41) Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P.A. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 33–45.
- 42) Nedvetzki, S., Gonen, E., Assayag, N., Reich, R., Williams, R. O., Thurmond, R.L., Huang, J.F., Neudecker, B.A., Wang, F.S., Wang, F.S., Turley, E.A., & Naor, D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 18081–18086.
- 43) Toole, B.P. (2004) *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 528–539.
- 44) Tanaka, S. (2010) *Expert Opin. Ther. Targets*, **14**, 31–43.
- 45) Ohtsu, H., Tanaka, S., Terui, T., Hori, Y., Makabe-Kobayashi, Y., Pejler, G., Tchougounova, E., Hellman, L., Gertsenstein, M., Hirasawa, N., Sakurai, E., Buzás, E., Kovács, P., Csaba, G., Kittel A., Okada, M., Hara, M., Mar, L., Numayama-Tsuruta, K., Ishigaki-Suzuki, S., Ohuchi, K., Ichikawa, A., Falus, A., Watanabe, T., & Nagy, A. (2001) *FEBS Lett.*, **502**, 53–56.
- 46) Ohtsu, H., Kuramasu, A., Tanaka, S., Terui, T., Hirasawa, N., Hara, M., Makabe-Kobayashi, Y., Yamada, N., Yanai, K., Sakurai, E., Okada, M., Ohuchi, K., Ichikawa, A., Nagy, A., & Watanabe, T. (2002) *Eur. J. Immunol.*, **32**, 1698–1708.
- 47) Koarai, A., Ichinose, M., Ishigaki-Suzuki, S., Yamagata, S., Sugiura, H., Sakurai, E., Makabe-Kobayashi, Y., Kuramasu, A., Watanabe, T., Shirato, K., Hattori, T., & Ohtsu, H. (2003) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**, 758–763.
- 48) Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.T., Huang, C., Sharpe, A.H., & Stevens, R.L. (1999) *Nature*, **400**, 769–772.
- 49) Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., & Kjellén, L. (1999) *Nature*, **400**, 773–776.
- 50) Jacobsson, K.G., Riesenfeld, J., & Lindahl, U. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 12154–12159.
- 51) Tanaka, S., Nemoto, K., Yamamura, E., & Ichikawa, A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8177–8182.
- 52) Furuta, K., Nakayama, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., & Tanaka, S. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 13438–13446.
- 53) Tsuchiya, S., Tachida, Y., Segi-Nishida, E., Okuno, Y., Tamba, S., Tsujimoto, G., Tanaka, S., & Sugimoto, Y. (2009) *BMC Genomics*, **10**, 35.
- 54) Grimbaldston, M.A., Chen, C.C., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Tam, S.Y., & Galli, S.J. (2005) *Am. J. Pathol.*, **167**, 835–848.
- 55) Galli, S.J., Nakae, S., & Tsai, M. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 135–142.
-