

- J., Fu, M., Moser, J., Hillebrands, J.L., Ploeg, R.J., Yang, G., Leuvenink, H.G., & van Goor, H. (2013) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24, 759–770.
- 11) Yamada, H., Akahoshi, N., Kamata, S., Hagiya, Y., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Takano, N., Mori, M., Ishizaki, Y., Izumi, T., Kumagai, Y., Kasahara, T., Suematsu, M., & Ishii, I. (2012) *Free Radic. Biol. Med.*, 52, 1716–1726.
- 12) Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., & Snyder, S.H. (2009) *Sci. Signal.*, 2, ra72.
- 13) Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Stepan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E., & Snyder, S.H. (2011) *Circ. Res.*, 109, 1259–1268.
- 14) Sawa, T., Zaki, M. H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, 3, 727–735.
- 15) Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y., & Akaike, T. (2012) *Nat. Chem. Biol.*, 8, 714–724.

石井 功

(慶應義塾大学薬学部生化学講座)

Reconsideration of homocysteinemia

Isao Ishii (Department of Biochemistry, Keio University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Shibakoen 1-5-30, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan)

抑制型レセプター LMIR3/CD300f は脂質セラミドを認識する

1. はじめに

免疫を制御するレセプター（受容体）の中にはペア型免疫レセプターと呼ばれる一群がある。その特徴は、細胞外領域の相同性が極めて高い活性化型と抑制型レセプターが対を形成することである。一般に、活性化型レセプターは細胞内領域にシグナル伝達配列をもたないが、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) を細胞内領域にもつアダプター分子 (FcγR や DAP12 など) と会合して、ITAM のリン酸化を介して活性化シグナルを伝える。一方、抑制型レセプターは細胞内領域に ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) をもち、ITIM のリン酸化を介して抑制シグナルを伝える。leukocyte mono-

immunoglobulin-like receptor (LMIR, 別名 CD300/CLM/MAIR) は、細胞外領域に1個の免疫グロブリン様領域をもつペア型免疫レセプターファミリーであり、主にミエロイド系細胞に発現する。マウスの LMIR は少なくとも8種類存在して、11番染色体に連座する。LMIR1/CD300a と LMIR3/CD300f は抑制型レセプターであり、他の LMIR/CD300 のメンバーは活性化型レセプターである¹⁻⁶⁾。今回、われわれは LMIR3/CD300f のリガンドとして細胞外脂質のセラミドを同定し、生体内における役割を明らかにした⁷⁾。その内容を研究の経過とともに概説する。

2. LMIR/CD300 ファミリーのリガンドについて

LMIR/CD300 ファミリーのリガンドは不明であったが、われわれはレトロウイルスを利用した発現クローニング法によりマウス LMIR5/CD300b のリガンドとして TIM1 (T cell immunoglobulin mucin 1) を同定した⁸⁾。最近、マウスの LMIR1/CD300a は PS (phosphatidylserine) に結合すること、ヒトの CD300a と CD300c は PS や PE (phosphatidylethanolamine) に結合することが示された⁹⁻¹¹⁾。マウスおよびヒトの CD300a は脂質への結合を介してアポトーシス細胞を認識するが、その際マウスのマスト細胞は腹膜炎における炎症を抑制すること⁹⁾、ヒトのマクロファージはアポトーシス細胞の貪食を抑制すること¹⁰⁾が示された。現在、LMIR/CD300 ファミリーの主なリガンドは脂質である可能性が示唆されている^{7,9-12)}。

3. LMIR3/CD300f の構造・発現・機能について

マウスの LMIR3/CD300f は細胞外領域に1個の免疫グロブリン様構造をもち、細胞内領域に2個の ITIM と1個の ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITIM と同様の機能を有する) をもつ抑制型レセプターである。LMIR3 の発現はミエロイド系細胞全般 (マスト細胞・好中球・マクロファージ・樹状細胞など) に認められる。われわれは、LMIR3 の発現レベルが高いマウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC: bone marrow-derived mast cell) に注目して、その機能解析を始めた。培養プレートに固定した特異的な抗体により高親和性 IgE レセプター (FcεRI) と LMIR3 を共架橋する系を利用した。さまざまな LMIR3 の変異体を作製して解析した結果、LMIR3 シグナルは BMMC の FcεRI シグナルを抑制すること、その際、2個の ITIM と1個の ITSM のリン酸化を介してチロシンホスファターゼの SHP1 と SHP2 を動員することが示された¹³⁾。以上より、LMIR3 はそのリガンドとの結合を介してマス

ト細胞の FcεRI シグナルを抑制することが想定された。

4. LMIR3 欠損マスト細胞の解析

LMIR3 の生体内における働きを調べるために、LMIR3 欠損マウスを作製した。LMIR3 欠損マウスの成長・発達は正常であり、ミエロイド系細胞の分化・増殖にも異常はなかった。組織に局在するマスト細胞数も野生型マウスと同等であった。最初に、野生型および LMIR3 欠損マウスの骨髄より BMMC を誘導したが、BMMC の分化・増殖に差は認められなかった。さらに、IgE と抗原により FcεRI を刺激したときの BMMC の反応性を調べたが、脱顆粒 (βヘキソサミニダーゼの放出率) やサイトカイン・ケモカインの産生量に有意な差は認められなかった⁷⁾。これらの結果より、LMIR3 のリガンドは少なくともマスト細胞表面には発現していないと考えられた。

5. マスト細胞に発現する LMIR3 の生体内における役割

生体内においてマスト細胞の LMIR3 が FcεRI シグナルを抑制するかを調べるために、野生型および LMIR3 欠損マウスに対してアレルギーモデル実験を試みた。マスト細胞の FcεRI が関与するアレルギーモデルとして、PSA (passive systemic anaphylaxis) 反応と PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応を試みた。前者は、IgE を静脈注射して 24 時間後に特異抗原を静脈注射してマウスの直腸温を測定する系である。マウスの全身に分布するマスト細胞から脱顆粒されたヒスタミンやセロトニンが血管透過性を亢進させて血圧・体温の低下を引き起こす。後者は、耳介に IgE を皮下注射して 24 時間後に抗原と色素を静脈注射して、耳介に漏出する色素を定量化する系である。色素漏出量は耳介のマスト細胞の脱顆粒に伴う血管透過性の亢進を反映する。最初に PSA 反応を試した結果、LMIR3 欠損マウスでは野生型マウスと比較して著しい直腸温の低下とその遷延が認められた。次に、PCA 反応を調べたが、LMIR3 欠損マウスの耳介における色素漏出量は野生型マウスと比較して著しく高い値を示した。これらの結果より、LMIR3 欠損マウスでは FcεRI を介するマスト細胞の活性化が亢進することが示された。さらにマスト細胞における LMIR3 の役割を明確にするために、マスト細胞欠損 (*Ki^{W-sh/W-sh}*) マウスの耳介に野生型あるいは LMIR3 欠損 BMMC を再構築してから PCA 反応を試みた。その結果、LMIR3 欠損 BMMC が再構築されたマウスの耳介では血管透過性が著しく亢進した。次に、LMIR3 欠損 BMMC に野生型 LMIR3 あるいは変異型 LMIR3 (LMIR3 の 2 個の ITIM と

1 個の ITSM のチロシン残基をすべてフェニルアラニン残基に置換した変異体) を発現させてからマスト細胞欠損マウスの耳介に再構築して同様の実験を行った。その結果、変異型 LMIR3 を発現する BMMC が再構築されたマウスの耳介では、LMIR3 欠損 BMMC が再構築されたマウスの耳介と同程度に、血管透過性の亢進が認められた。以上の結果より、生体内においてマスト細胞の LMIR3 がその ITIM と ITSM を介して FcεRI シグナルを抑制することが証明された (図 1)⁷⁾。

6. LMIR3 リガンドの同定

LMIR3 のリガンドを同定するために、物理的な結合アッセイと機能的なレポーターアッセイを利用した (図 2)。前者では LMIR3 の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 領域の融合タンパク質 (LMIR3-Fc) を作製して、LMIR3-Fc と結合する分子をスクリーニングした (図 2A)。後者では、NFAT が活性化すると緑色蛍光タンパク質 GFP の発現が誘導されるレポーター細胞株 (2B4-GFP) を利用した。LMIR3 の細胞外および膜貫通領域にヒト CD3ζ の (ITAM を有する) 細胞内領域を融合させたキメラレセプター (LMIR3-CD3ζ) を 2B4-GFP 細胞に発現させて、新たなレポーター細胞株 (2B4-LMIR3-GFP) を作製した。もし LMIR3 のリガンドがレポーター細胞のキメラレセプターに結合してキメラレセプターを架橋刺激すると、その ITAM のリン酸化に伴い NFAT の活性化が起こり GFP の発現が誘導されると想定した (図 2C)。実際、LMIR3 抗体を固相化したプレート上で 2B4-LMIR3-GFP 細胞を培養すると GFP の発現が誘導されること、また、その培養液中に LMIR3 抗体を添加すると GFP の発現誘導が阻止されることを確認した。当初、LMIR3 リガンドとして (組織のマスト細胞の周囲に存在する) 細胞表面タンパク質や細胞外マトリックスタンパク質を想定したが、これらのアッセイ系によりリガンド候補分子を見いだすことはできなかった。そこで、LMIR3 のリガンドとして組織に存在する脂質に注目した。

最初に、さまざまな脂質が固定されたシートを用意して、LMIR3-Fc が結合するかどうかを調べたところ、LMIR3-Fc は特異的にセラミドと結合することが判明した (図 2B)。また、セラミドを固定したプレート上で培養された 2B4-LMIR3-GFP 細胞では GFP の発現が誘導された (図 2D)。その際、LMIR3 抗体を添加すると GFP の発現誘導は阻害された。したがって、セラミドは LMIR3 のリガンド候補分子であると考えられた。さらに、他の脂質や

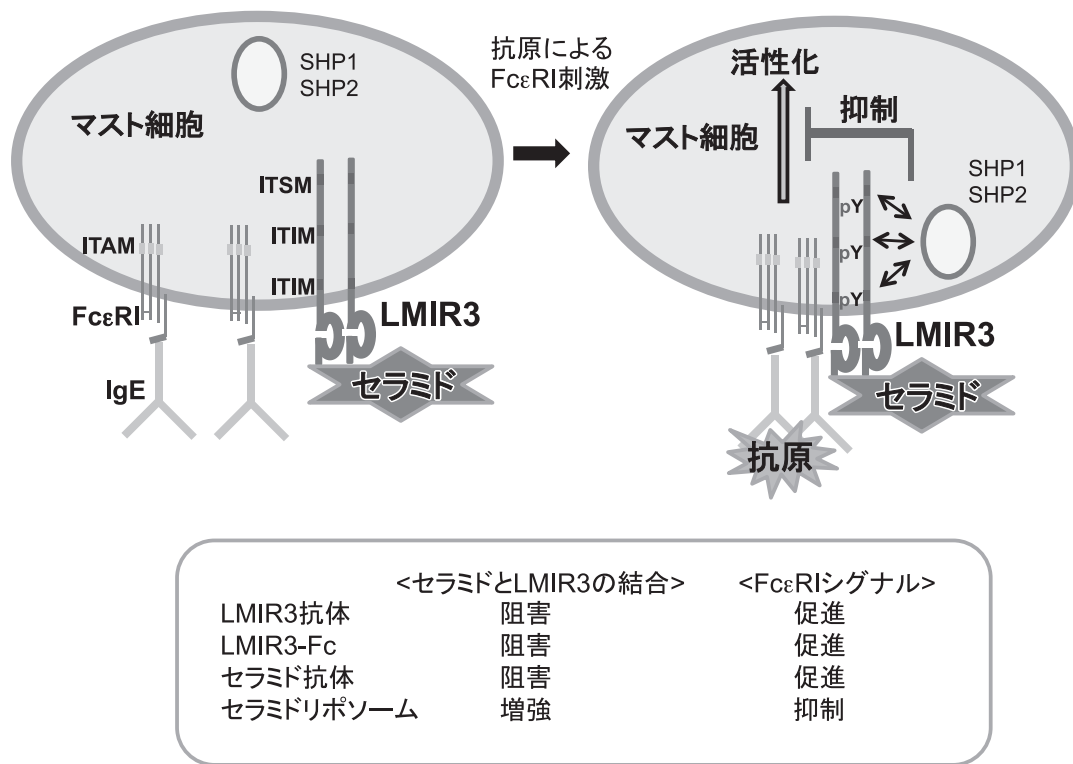


図1 マスト細胞のLMIR3とセラミドの結合によるFcεRIシグナルの抑制

組織の細胞外セラミドがマスト細胞のLMIR3に結合するだけではLMIR3のチロシンリン酸化は誘導されない。その状況下でIgEと抗原によりFcεRIシグナルが活性化されるとFcεRIとLMIR3が速やかに共局在するため、LMIR3のITIMとITSMが効率よくチロシンリン酸化されてSHP1やSHP2が動員される。その結果、LMIR3はマスト細胞におけるFcεRIシグナルを抑制する。また、野生型マウスのPCA反応において、LMIR3抗体、LMIR3-Fc、あるいはセラミド抗体の耳介への投与はすべてマスト細胞のLMIR3とセラミドの結合を阻害するためPCA反応を増悪させる。一方、セラミドリポソームの投与はLMIR3とセラミドの結合が増強するためPCA反応を抑える。

リポタンパク質をプレートに固相化してスクリーニングした結果、LMIR3のリガンド候補分子としてホスファチジルコリン (PC: phosphatidylcholine)、スフィンゴシルホスホコリン (SPC: sphingosylphosphocholine) やリポタンパク質のHDLやLDLが同定された。実際に、これらのリガンド候補分子がマスト細胞のLMIR3のリガンドとして機能するかどうかを確かめるために、これらの分子を固相化したプレート上でBMMCをIgEと抗原により刺激した。その結果、セラミド、SPCおよびリポタンパク質はLMIR3との結合を介してBMMCの脱顆粒を抑制した。一方、PCにはBMMCの脱顆粒を抑制する作用が認められなかった。したがって、セラミド、SPC、およびリポタンパク質がマスト細胞に発現するLMIR3のリガンドとして機能することが示された⁷⁾。

7. マスト細胞のLMIR3とセラミドの結合によるFcεRIシグナル抑制の機序

細胞内シグナル伝達を調べると、セラミドとLMIR3の結合だけ、あるいは、IgEと抗原によるFcεRI刺激だけでは、LMIR3のチロシン残基はリン酸化されることが示された。他方、LMIR3とセラミドの結合とFcεRIの刺激が同時に起こるとLMIR3のチロシン残基はリン酸化されてSHP1やSHP2が動員されることが判明した。また、固相化したセラミドだけでなくリポソームのセラミドもBMMCのFcεRIシグナルを抑制することを確認したのち、セラミドリポソームの添加がBMMCのFcεRIとLMIR3の局在に及ぼす影響を調べた。無刺激時、FcεRIとLMIR3は細胞表面上に発現するが、両者の局在は必ずしも一致しなかった。また、セラミドリポソームを添加するだけで

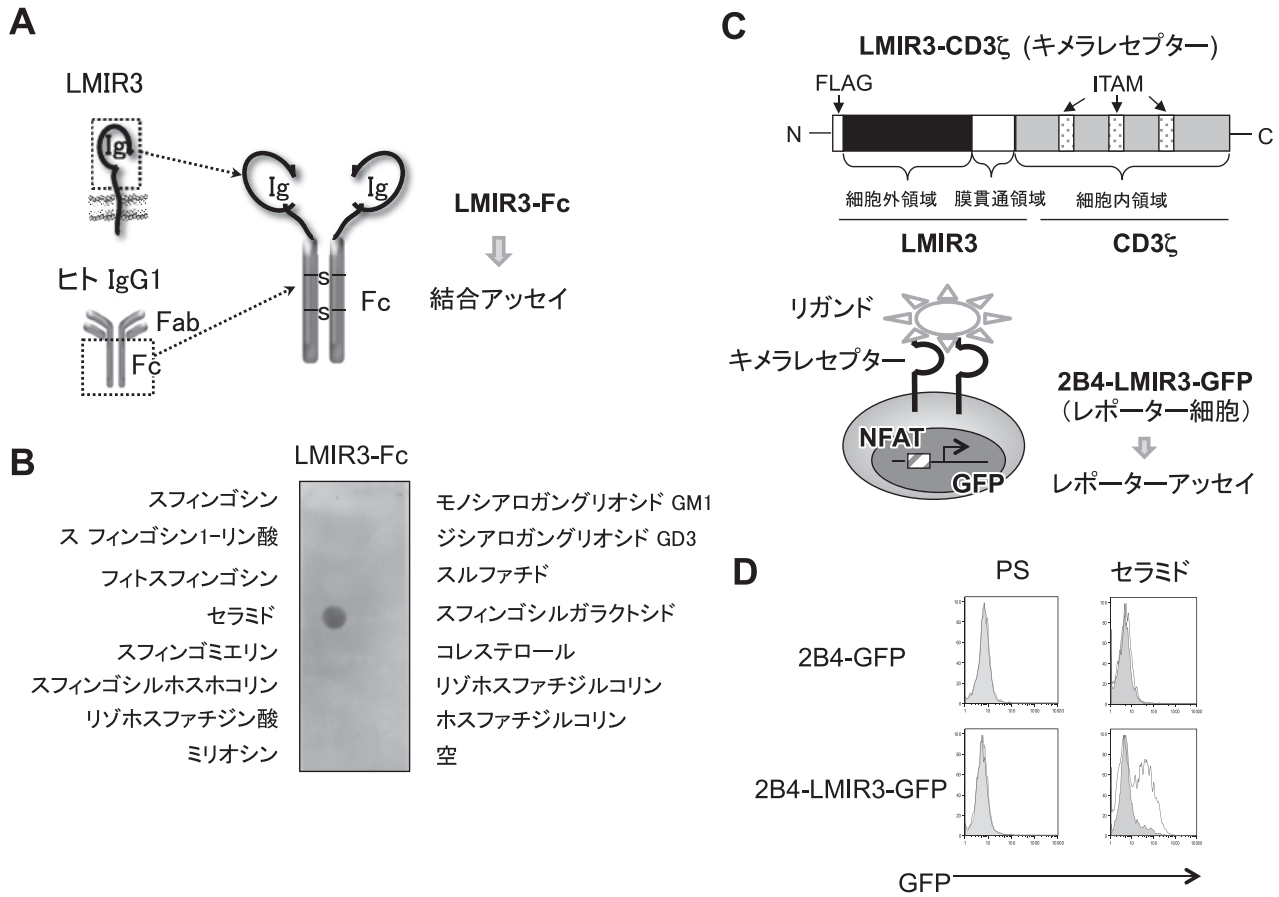


図2 LMIR3 リガンドの同定

- (A) LMIR3-Fc (LMIR3 プロブ) の構造。
 (B) 固相化された脂質と LMIR3-Fc の結合。
 (C) キメラレセプター (LMIR3-CD3 ζ) を発現するレポーター細胞 (2B4-LMIR3-GFP) の構造。
 (D) セラミドを固相化したプレート上で培養した 2B4-LMIR3-GFP 細胞における GFP の発現誘導。

は、その局在に変化はなかった。Fc ϵ RI が架橋刺激されると Fc ϵ RI と LMIR3 は一部で共局在することが示された。他方、セラミドリポソームの添加と共に Fc ϵ RI が架橋刺激されると、Fc ϵ RI と LMIR3 は強く共局在することが示された。これらの結果を総合すると、BMMC の LMIR3 と細胞外のセラミドが結合しているときに Fc ϵ RI が刺激されると、LMIR3 と Fc ϵ RI は速やかに共局在するために、LMIR3 の ITIM と ITSM は効率よくリン酸化されて Fc ϵ RI シグナルが抑制されると考えられた (図 1)⁷⁾。

8. 生体内におけるマスト細胞の LMIR3 と細胞外セラミドの結合の生理的な意義

セラミドは細胞外脂質として皮膚の表皮に豊富であることはよく知られている。実際に、セラミド抗体で皮膚の組

織を免疫染色した結果、セラミドは表皮のみならずマスト細胞が局在する真皮にも細胞外脂質として存在すること、しばしば細胞外セラミドがマスト細胞と接することが示された。最後に、生体内においてマスト細胞の LMIR3 とセラミドの結合がアレルギー反応を抑制するかどうかを調べた。PCA 反応の実験系で耳介に IgE を投与する際にセラミドリポソームも皮下注射すると、野生型マウスの PCA 反応による血管透過性が抑制された。また、同様の系で耳介に IgE を投与する際にセラミド抗体を皮下注射すると、野生型マウスの PCA 反応は LMIR3 欠損マウスの場合と同程度に亢進した。一方、セラミドリポソームやセラミド抗体の投与は LMIR3 欠損マウスの PCA 反応には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、細胞外脂質のセラミドはマスト細胞の LMIR3 と結合して生体内における Fc ϵ RI シグ

ナルを抑制することが明らかになった (図 1)⁷⁾.

9. お わ り に

今回の研究により, マスト細胞の周囲に存在するセラミドが LMIR3 のリガンドとして働き, マスト細胞の FcεRI シグナルの活性化と付随するアレルギー反応を抑えることが示された⁷⁾. PS が LMIR3 のリガンドであるという報告¹⁰⁾もあるが, われわれの実験結果からは否定的である. また, リポタンパク質の構成成分であるセラミドが LMIR3 のリガンドとして働くことも示された. 今後, LMIR3 のリガンドとして機能するセラミドの由来をさらに解明する必要がある. 皮膚炎を呈したマウスの真皮では細胞外セラミドの量が増加する傾向が認められたので, 慢性炎症時において LMIR3 の抑制作用はより重要な意味をもつかもしいない. マスト細胞の LMIR3 とセラミドの結合は過剰なアレルギー反応を抑える生体内の仕組みとして存在すると考えられた. 今後, LMIR/CD300 ファミリーによる脂質認識の全体像を明らかにしたい.

- 1) Chung, D.H., Humphrey, M.B., Nakamura, M.C., Gininger, D. G., Seaman, W.E., & Daws, M.R. (2003) *J. Immunol.*, 171, 6541-6548.
- 2) Kumagai, H., Oki, T., Tamitsu, K., Feng, S.Z., Ono, M., Nakajima, H., Bao, Y.C., Kawakami, Y., Nagayoshi, K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Kawakami, T., & Kitamura, T. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 719-729.
- 3) Yotsumoto, K., Okoshi, Y., Shibuya, K., Yamazaki, S., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Osawa, M., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tenen, D.G., Iwama, A., Nakauchi, H., & Shibuya, A. (2003) *J. Exp. Med.*, 198, 223.
- 4) Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Oki, T., Shibata, F., Kumagai, H., Nakajima, H., Maeda-Yamamoto, M., Hauchins, J.P., Tybulewicz, V.L., Takai, T., & Kitamura, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 17997-18008.
- 5) Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Matsuoka, T., Oki, T., Lu, Y., Shibata, F., Yamazaki, S., Kumagai, H., Nakajima, H., Maeda-Yamamoto, M., Tybulewicz, V.L., Takai, T., & Kitamura, T. (2008) *Blood*, 111, 688-698.
- 6) Enomoto, Y., Yamanishi, Y., Izawa, K., Kaitani, A., Takahashi, M., Maehara, A., Oki, T., Takamatsu, R., Kajikawa, M., Takai, T., Kitamura, T., & Kitaura, J. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 35274-35283.
- 7) Izawa, K., Yamanishi, Y., Maehara, A., Takahashi, M., Isobe, M., Ito, S., Kaitani, A., Matsukawa, T., Matsuoka, T., Nakahara, F., Oki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Okumura, K., Kitamura, T., & Kitaura, J. (2012) *Immunity*, 37, 827-839.
- 8) Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Abe, T., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K., & Kitamura, T. (2010) *J. Exp. Med.*, 207, 1501-

1511.

- 9) Nakahashi-Oda, C., Tahara-Hanaoka, S., Shoji, M., Okoshi, Y., Nakano-Yokomizo, T., Ohkohchi, N., Yasui, T., Kikutani, H., Honda, S., Shibuya, K., Nagata, S., & Shibuya, A. (2012) *J. Exp. Med.*, 209, 1493-1503.
- 10) Simhadri, V.R., Andersen, J.F., Calvo, E., Choi, S.C., Coligan, J.E., & Borrego, F. (2012) *Blood*, 119, 2799-2809.
- 11) Takahashi, M., Izawa, K., Kashiwakura, J., Yamanishi, Y., Enomoto, Y., Kaitani, A., Maehara, A., Isobe, M., Ito, S., Matsukawa, T., Nakahara, F., Oki, T., Kajikawa, M., Ra, C., Okayama, Y., Kitamura, T., & Kitaura, J. (2013) *J. Biol. Chem.*, 288, 7662-7675.
- 12) Cannon, J.P., O'Driscoll, M., & Litman, G.W. (2012) *Immunogenetics*, 64, 39-47.
- 13) Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Kaitani, A., Sugiuchi, M., Takahashi, M., Maehara, A., Enomoto, Y., Oki, T., Takai, T., & Kitamura, T. (2009) *J. Immunol.*, 183, 925-936.
- 14) Choi, S.C., Simhadri, V.R., Tian, L., Gil-Krzewska, A., Krzewski, K., Borrego, F., & Coligan, J.E. (2011) *J. Immunol.*, 187, 3483-3487.

北浦 次郎, 伊沢 久未, 北村 俊雄
(東京大学医科学研究所細胞療法分野)

An inhibitory receptor LMIR3/CD300f recognizes ceramide
Jiro Kitaura, Kumi Izawa and Toshio Kitamura (Division of Cellular Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Division of Cellular Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

体内時計によるアレルギー反応の制御

1. は じ め に

“アレルギー”は「体内に侵入した異物を特異的に排除する免疫反応であり, その反応が過剰あるいは異常な方向に働いた結果, 全身あるいは局所に障害が及ぶ状態」と1906年にC. von Pirquetによって提唱された. その後, 1963年にGellとCoombsによって組織傷害機序の違いからI~IV型に分類され, 近年ではIgE抗体とマスト細胞, 好塩基球が関与するI型アレルギーを“アレルギー”と呼ぶことが多い.

いくつかのアレルギー性疾患(アレルギー性鼻炎, 喘息, 蕁麻疹など)では, 症状が増悪しやすい時間帯があり, 24時間の周期性(概日リズム)が存在することが古くから知