

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., Ginzinger, 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

られている。例えば、慢性蕁麻疹は夜間に、アレルギー性鼻炎は早朝に症状が発現することが多い。なかでも、概日リズムとの関連がよく知られているのは気管支喘息で、喘息発作は午前4時を中心に午後10時から午前7時までに集中し、これに先立つ血中アドレナリン、サイクリックAMP、コルチゾールなどの濃度低下とヒスタミン濃度の上昇が気道狭窄を亢進し、ピークフローの低下につながると考えられている^{1,2)}。

また、1976年にMillerとChurchらはマウスにおける受動皮膚過敏 (passive cutaneous anaphylaxis: PCA) 反応が日内変動を示すことを報告し³⁾、Seeryらは1998年に、喘息患者における皮膚過敏反応が概日リズムを示すことを報告している⁴⁾。それらの機序として、概日リズムを示すコルチゾールなどの副腎ホルモン分泌との関連が示唆されているが、その分子機構の詳細は不明であった。

筆者らはこの現象に、近年同定された「時計遺伝子」が関与しているのでは、と考え研究を行っている。これまでに、IgE/マスト細胞依存性PCA反応の概日性の症状発現が主要な時計遺伝子の一つである *Period2* によって制御されていることを明らかにした。さらに、マスト細胞自身にも時計遺伝子が発現し、概日リズムを示すことも明らかにした⁵⁾。

本稿では、アレルギー性疾患 (PCA 反応) で見られる概日性の病態形成における体内時計 (時計遺伝子) の役割

を、筆者らが行ってきた研究成果を中心に紹介する。

2. 体内時計

地球上のほぼすべての生物 (シアノバクテリアや酵母からヒトにいたるまで) は、睡眠と覚醒、血圧、行動様式などの生理現象において、概日リズムと呼ばれる24時間周期性の生命活動を、内在する体内時計の制御を介して行っている^{6~8)}。

90年代後半、哺乳類から *Period (Per)* や *Clock*, *Bmal1*, *Cryptochrome (Cry)* といった時計遺伝子が相次いで発見された。その後数年の間に、これら時計遺伝子による概日リズム形成の基本的な機序が明らかとなり、時計分子間の転写翻訳を介した負のフィードバックループモデルで説明されるようになった^{6,8)}。

哺乳類における、体内時計の中核 (中枢時計) は、脳内視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在することが明らかになっている⁷⁾。さらに最近の研究によって、末梢の臓器 (皮膚、肝臓、肺、末梢白血球など) においても体内時計 (末梢時計) が存在していることが明らかとなり、中枢時計は、光などの環境の変化に応じて、末梢時計が同じ時刻を刻むように様々な神経性、液性因子を介して制御していると考えられている¹⁰⁾ (図1)。

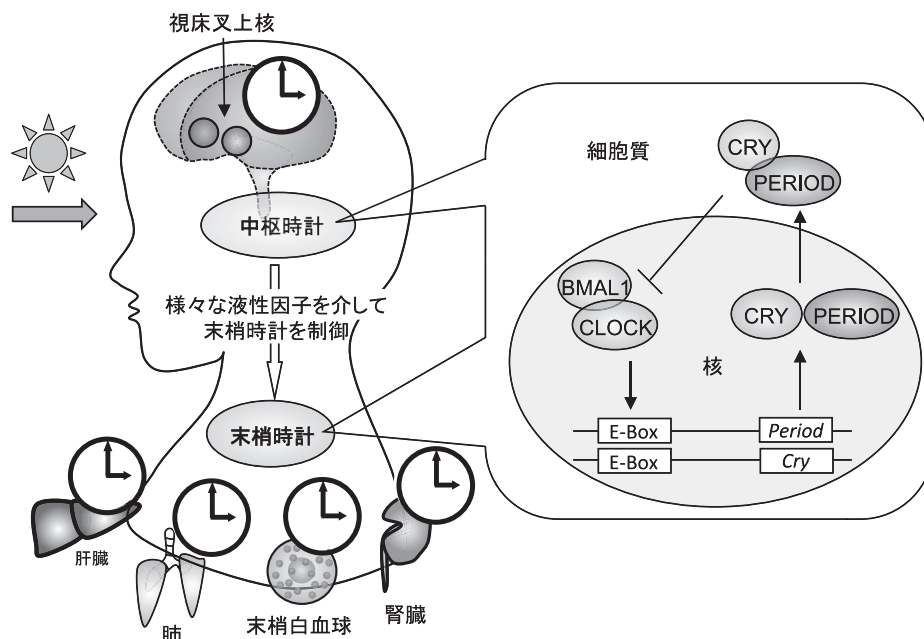


図1 体内時計システムと分子メカニズムの基本モデル

3. 体内時計によるアレルギー反応の制御

1) 時計遺伝子とPCA反応

筆者らはまずPCA反応の概日性に体内時計が関与するか否かを検討した。野生型マウスと主要な時計遺伝子である *Period2* (*Per2*) を変異させ体内時計機能を消失した (*mPer2^{m/m}*) マウス¹¹⁾を用いて、PCA反応を継時的に背部皮下で惹起させ検討した。その結果、野生型マウスにおけるPCA反応は午前10時で高く、午後10時に最も低いという日内変動が確認された。対照的に *mPer2^{m/m}* マウスでは、どの時間においても同程度の反応を示すことが確認でき、PCA反応の日内変動が消失していた。さらに、全身性の過敏反応を誘導し、それに伴う体温低下を反応の指標として評価するIgE/マスト細胞依存性PSA反応における日内変動についても検討した。その結果、野生型マウスでは午後10時よりも午前10時における体温低下が著しいことが確認でき、PCA反応と同様に日内変動が確認された。一方、*mPer2^{m/m}* マウスでは両時間ともに同等の体温低下を示し、PSA反応においても日内変動が消失していた。これらの結果から、PCA反応の日内変動は時計遺伝子 *Per2* の概日リズム依存的に制御されていることが示唆された。

2) PCA反応の日内変動と副腎由来内分泌因子

PCA反応の周期性と副腎由来内分泌因子(コルチゾールなど)の概日リズム性分泌との関連が古くから示唆されている^{10,11)}。また、*mPer2^{m/m}* マウスでは、コルチコステロン(げっ歯類におけるコルチゾール)などの副腎由来内分泌因子の概日リズム性分泌が消失することも報告されている¹²⁾。筆者らの実験においても、既報と同様に、野生型マウスでは日内変動を示し、*mPer2^{m/m}* マウスでは消失することを確認している。また、両マウスにおける血中コルチコステロン濃度がPCA反応と逆相関関係にあることが示されていた。

これらのことから、筆者らは、PCA反応の日内変動は副腎由来内分泌因子により制御されていると考え、副腎を摘出した(ADX)マウスを用いて検討した。その結果、ADXマウスにおけるPCA反応は日内変動を示さないことが明らかとなった。加えて、PSA反応においてもADXマウスでは反応の日内変動が消失することが確認された。以上の結果から、*Per2* によるPCA反応の日内変動の調節は、副腎由来の内分泌因子(おそらくコルチコステロン)の概日性分泌の制御を介して行われている可能性が示唆された。

また、哺乳類におけるコルチコステロンの概日リズム性分泌は加齢によって減弱することが報告されている¹³⁾。若齢マウスと高齢マウスを用いて検討を行った結果、高齢マウスではPCA反応の日内変動が消失することが示された。さらに、中枢時計であるSCNを物理的に破壊したマウスを用いた検討においても、コルチコステロンの概日リズムが消失するとともに、PCA反応の概日リズムも消失することも確認できている(未発表データ)。これらの結果によって、PCA反応は副腎由来分泌因子によって制御されていることがさらに強く示唆された。

3) 時計遺伝子とマスト細胞

PCA反応はI型アレルギーであり、IgEとマスト細胞によって引き起こされる。*mPer2^{m/m}* マウスで確認されたPCA反応の概日リズム消失はマスト細胞機能の違いにも起因する可能性があると考えられた。そこで、野生型マウスと *mPer2^{m/m}* マウス由来培養マスト細胞(BMBCs)を用いて、脱顆粒反応の比較を行ったが、ほぼ同様の脱顆粒反応を示した。しかしながら、*Per2* 遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、PER2::LUCIFERASE融合タンパク質を産生するマウス(PER2::LUC)¹⁴⁾由来BMBCsを用いて検討した結果、BMBCsにおけるPER2発現にも概日リズムがあることが明らかになった。加えて、野生型マウス由来BMBCsにおける *Per2*、IgE受容体 α 、 β 鎖(*FcεRIα*、 β)のmRNA発現をリアルタイムPCRを用いて、培地交換後24~48時間まで経時的に測定した。その結果、*Per2*は概日リズムを示したが、*FcεRIα*、 β は概日リズムを示さなかった。Wangらも野生型マウス由来BMBCsを用いて、ほぼ同様な解析を行っており、マスト細胞に時計遺伝子の発現を確認している¹⁵⁾。さらに、筆者らは生体内でもマスト細胞の体内時計が機能しているか否かについて、マスト細胞欠損(W/Wv)マウスにPER2::LUCマウス由来BMBCsを移植し、*in vivo*イメージングシステムを用いて検討した。その結果、生体内においてもPER2発現が確認でき、概日リズムを示すことが観察された。これらのことから、マスト細胞に体内時計が存在することが明らかとなった。

4) *Per2*とグルココルチコイド感受性

*Per2*によってグルココルチコイドの概日性分泌が制御されることは既報¹⁴⁾と上記の筆者らの実験から明らかとなっている。また、最近の報告で *Per2*転写開始サイトのの上流にグルココルチコイドレセプター(GR)結合配列が同

定され、GRがダイレクトにPer2発現を活性化できることが明らかとなった¹⁶⁾。これらのことから、PCA反応の日内変動は、概日性分泌を示すコルチコステロンによる制御だけでなく、コルチコステロンに対する感受性の変化にも起因する可能性があると考えられた。そこで、筆者らはPCA反応に対する合成副腎皮質ホルモンであるデキサメタゾン (DEX) に対する感受性を野生型マウスと *mPer2^{m/m}* マウスを用いて検討した。PCA反応を惹起する2時間前にDEXを腹腔内投与して行った結果、野生型マウスではPCA反応が抑制され、*mPer2^{m/m}* マウスでは抑制されなかった。加えて、BMSCsを用いた脱顆粒反応においても同様な結果が得られている。これらの結果から、Per2はマスト細胞におけるグルココルチコイドに対する感受性にも影響を与えていることが考えられ、それゆえにPCA反応の日内変動に影響を与えていると考えられた。Per2による制御機構からは生体のホルモンバランスなどの概日リズムの維持に加え、末梢の細胞内 (マスト細胞) における体内時計制御機構の存在が予測でき、詳細の解明が今後の課題である。

4. おわりに

時計遺伝子Per2が副腎由来内分泌因子を介してIgE/マスト細胞依存性PCA反応の日内変動を制御していることが明らかとなった。しかしながら、その反応の主役である

マスト細胞に内在する体内時計によって、脱顆粒などの機能がどのように制御されているかについての解析は不十分であり、さらなる詳細の解明が必要である (図2)。今後、それらの仕組みの詳細を明らかにすることで、アレルギー性疾患の予防/治療法の開発につながる、新規の標的分子/経路を見いだすことが可能であると筆者らは考えている。

- 1) Barnes, P., FitzGerald, G., Brown, M., & Dollery, C. (1980) *N. Engl. J. Med.*, **303**, 263-267.
- 2) Dethlefsen, U. (1985) *Med. Klin.*, **80**, 44-47.
- 3) Miller, P. & Church, M.K. (1876) *Clin. Exp. Immunol.*, **25**, 177-179.
- 4) Seery, J.P., Janes, S.M., Ind, P.W., & Datta, A.K. (1998) *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **80**, 329-332.
- 5) Nakamura, Y., Harama, D., Shimokawa, N., Hara, M., Suzuki, R., Tahara, Y., Ishimaru, K., Katoh, R., Okumura, K., Ogawa, H., Shibata, S., & Nakao, A. (2011) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 1038-1045.
- 6) Dunlap, J.C. (1999) *Cell*, **96**, 271-290.
- 7) Young, M.W. & Kay, S.A. (2001) *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 702-715.
- 8) Takahashi, J.S., Hong, H.K., Ko, C.H., & McDearmon, E.L. (2008) *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 764-775.
- 9) Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., & Weitz, C.J. (1998) *Science*, **280**, 1564-1569.
- 10) Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2002) *Nature*, **418**, 935-941.
- 11) Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M.,

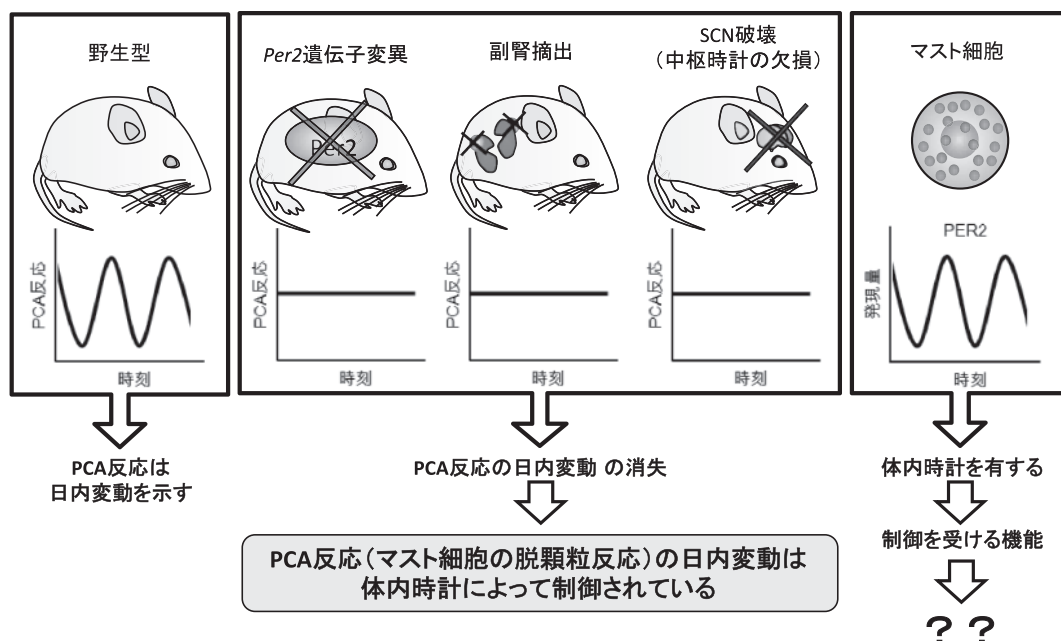


図2 PCA反応の概日リズムは体内時計によって制御される

- Eichele, G., Lee, C.C., & Bradley, A. (1999) *Nature*, 400, 169-173.
- 12) Yang, S., Liu, A., Weidenhammer, A., Cooksey, R.C., McClain, D., Kim, M.K., Aguilera, G., Abel, E.D., & Chung, J.H. (2009) *Endocrinology*, 150, 2153-2160.
- 13) Milcu, S.M., Bogdan, C., Nicolau, G.Y., & Cristea, A. (1978) *Endocrinologie*, 16, 29-39.
- 14) Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., & Takahashi, J.S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 5339-5346.
- 15) Wang, X., Reece, S.P., Van, Scott, M.R., & Brown, J.M. (2010) *Brain Behav. Immun.*, 25, 127-134.
- 16) So, A.Y., Bernal, T.U., Pillsbury, M.L., Yamamoto, K.R., & Feldman, B.J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 17582-17587.

中村 勇規

(山梨大学大学院医学工学総合研究部免疫学講座)

The circadian clock regulates daily rhythms in allergic reaction

Yuki Nakamura (Department of Immunology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan)

GDP型Gタンパク質シグナリング

1. はじめに

インスリンは、血中のグルコース濃度すなわち血糖値の維持に重要なホルモンで、その分泌不全是糖尿病発症の主たる原因である。インスリンは、膵臓のランゲルハンス島(膵島)に存在する膵β細胞から分泌される。細胞内で合成されたインスリンは、顆粒膜に包まれた後に細胞膜近傍へ輸送される。グルコース刺激は、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を介して顆粒膜と細胞膜の融合を促進し、インスリンを細胞外に放出させる。本稿では、低分子量Gタンパク質Rab27aとそのエフェクター分子を介したインスリン分泌の制御機構を概説する。

2. インスリン分泌

インスリン分泌に関する文献では、「分泌 (secretion)」, 「放出 (release)」, 「開口放出 (exocytosis)」という言葉がしばしば同義語のように用いられている。しかし、本来こ

れらの言葉は異なる事象を表現している。「分泌」とは、合成されたインスリンが顆粒膜にパックされ、最終的に細胞外に出るまでの一連の現象をさす。一方、「放出」は、インスリンが刺激により細胞外に出る現象のみをさす。「開口放出」は、細胞外にインスリンを出す形式の一つである。分泌と放出が混同されてきた原因の一つに、放出以外の分泌過程を解析することが困難であったことが挙げられる。1950年代後半にインスリンの測定が可能になってから20年の間は、分泌を評価する実験手法はインスリン放出量の測定に限られていた。さらに、膵β細胞ではインスリン含量がインスリン放出量に比べて極めて多いことが知られていた。そのため、1980年代までは、放出されるまでの過程よりも放出される量に重点がおかれたわけである。

1969年、Grodskyはtwo compartment storage theoryを提唱した¹⁾。このモデルでは、細胞内に蓄えられているインスリン顆粒を「stable」と「labile」の二つに分類している。そして、インスリン分泌とは、インスリン顆粒がstableからlabileに進み、刺激により細胞外に放出される一連の現象であると説明した。さらに彼は、「labile compartment」を「readily-releasable」と考えた。このモデルの提唱から40年経った今、インスリン分泌過程は分子レベルでの解析が進んでいる。初期の研究では、先行していた神経細胞を用いた分泌研究の成果をそのままインスリン分泌に応用する試みがなされていた。しかし、神経細胞と膵β細胞を同じ土俵で議論することはできない。膵β細胞では、生理的刺激であるグルコースが直接または代謝されて間接的にインスリンを放出する。つまりインスリン分泌とは、脱分極刺激による分泌とは異なり、代謝物によるシグナル増幅も兼ね備えた複雑な過程である。

3. 低分子量Gタンパク質

低分子量Gタンパク質は、分子量が約2万~3万の単量体で働くGタンパク質である。他のGタンパク質と同様に、GTPと結合したGTP型とGDPと結合したGDP型の2種類の形態をとる。これまでの研究では、GTP型のみがエフェクターと呼ばれるタンパク質群と結合し、下流にシグナルを伝達することが示されてきた。そのため、GTP型は活性型、GDP型は不活性型とも呼ばれ、Gタンパク質は細胞内でオン/オフスイッチとして働くと考えられてきた。

通常、GDP型Gタンパク質はGDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) と複合体を形成し、細胞質に局在す