

新たなマスト細胞制御因子の同定と制御メカニズムの発見

武 富 芳 隆

Emerging Roles of Phospholipase A₂s in Mast Cell Biology

Yoshitaka Taketomi

Lipid Metabolism Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science; 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8555, Japan.

(Received July 16, 2014)

Tissue-resident mast cells are derived from circulating committed progenitors, which are originated from pluripotent hematopoietic stem cells in bone marrow. These progenitors migrate into extravascular tissues, where they undergo differentiation and maturation into tissue-specific mast cell phenotypes. When activated by antigen or microenvironmental factors, mast cells release various biologically active products, including pre-formed mediators stored in secretory granules, *de novo* synthesized lipid mediators, and newly transcribed cytokines and chemokines, thereby promoting anaphylactic inflammation as well as other acute and chronic inflammatory diseases. Here, I will highlight the newest understanding of the phospholipase A₂ (PLA₂)-driven lipid networks in the maturation and effector functions of mast cells and attendant allergic responses. Group III secreted PLA₂, the sole mammalian homolog of the potent extrinsic anaphylaxis inducer bee venom PLA₂, regulates mast cell maturation through the paracrine prostaglandin D₂ (PGD₂) circuit. While cytosolic PLA₂ α is essential for the generation of PGD₂ and leukotriene C₄ by mast cells, it is also functionally coupled, through the arachidonic acid transfer mechanism, with PGE₂ synthase in stromal fibroblasts to provide anti-anaphylactic PGE₂. In addition, the roles of two particular mast cell maturation-responsible genes, NDRG1 and NLRP3, in mast cells will be discussed.

Key words—phospholipase A₂; lipid mediator; mast cell; maturation; degranulation; anaphylaxis

1. はじめに

アレルギーは外来抗原による暴露から免疫組織での抗原特異的 IgE の産生に至るまでの獲得免疫のステップ（感作相）と抗原再暴露に伴う局所性あるいは全身性の炎症惹起相からなる。アレルギー担当細胞の 1 つであるマスト細胞は後者の惹起相に深く係わるアレルギー性炎症のコンダクターとして認知されている。マスト細胞は高親和性 IgE 受容体（high-affinity IgE receptor; FcεRI）と異染性の分泌顆粒を持つ点で特徴的であり、IgE と抗原の刺激に応答し、数分でヒスタミンやプロテアーゼなどの顆粒内容物を遊離するとともに（脱顆粒）、プロスタグランジン D₂（prostaglandin D₂; PGD₂）、ロイコ

トリエン C₄（leukotriene C₄; LTC₄）、血小板活性化因子などの脂質メディエーターを産生する。また、数時間で様々なサイトカイン（tumor necrosis factor; TNF- α , interleukin-6; IL-6 など）やケモカイン（CC chemokine ligand 2; CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β など）を産生する。マスト細胞はこれらの機能を介して即時型アレルギーの責任細胞として働くが、それだけでなく本細胞は多彩な生理・病態にも係わることが近年明らかとなってきた。¹⁾

マスト細胞は骨髓造血幹細胞を起源とし、初期分化を遂げた前駆細胞の状態から血中から組織へと遊走・定着する。組織に定着した未熟なマスト細胞は局所微小環境の影響を受けて組織特有の亜群へと最終成熟する。²⁾ 例えば未熟なマスト細胞は、皮膚などの結合組織では幹細胞増殖因子（stem cell factor; SCF）の影響を受けて主に即時型アレルギーに係わる結合組織型マスト細胞（マウス connective tissue-mast cells; CTMCs; ヒト MC_{TC}）へと成熟し、消化管粘膜などでは SCF に加えて IL-3 の影響を受けて

The author declares no conflict of interest.

公益財団法人東京都医学総合研究所脂質代謝プロジェクト（〒156-8555 東京都世田谷区上北沢二丁目 1-6）
e-mail: taketomi-ys@igakuken.or.jp

本総説は、平成 25 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

寄生虫感染防御などに係わる粘膜型マスト細胞（マウス mucosal mast cells; MMCs; ヒト MC_T）へと成熟する。また、マスト細胞は一度成熟した後も局所微小環境の変化に応じて形質を転換させることもできる。これまでの研究において、筆者らはこの局所微小環境に依存するマスト細胞の機能を分化成熟の観点から究明し、マスト細胞の新たな機能分子を複数同定してきた。³⁻⁶⁾ また、マスト細胞と局所微小環境の細胞間脂質ネットワークによる新たなアレルギー制御機構を提唱した。⁷⁾ 今回、筆者はこれまで未解明であったマスト細胞の成熟を制御する中核分子 [リン脂質分解酵素 III 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ (group III secreted phospholipase A₂; sPLA₂-III)] を新たに発見し、責任脂質の動員から受容に至るまでの一連の脂質マシナリーを解明した。⁸⁾ 本稿では、マスト細胞の成熟を制御する新たな脂質経路の発見を中心に、マスト細胞と局所微小環境の細胞間クロストークによるマスト細胞の制御、そしてそれが直結するアレルギーの制御について詳述する。

2. PLA₂ とマスト細胞に関するこれまでの知見

PLA₂ はグリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解する酵素の一群である。哺乳動物では 30 種類以上の PLA₂ 又はその類縁酵素が同定されており、細胞内酵素である細胞質型 PLA₂ 群 (cytosolic phospholipase A₂; cPLA₂) 及び Ca²⁺ 非依存性 PLA₂ 群 (Ca²⁺-independent phospholipase A₂; iPLA₂)、分泌性酵素である sPLA₂ の三大サブファミリーとその他の PLA₂ に大別されている。⁹⁾ PLA₂ は脂質メディエーター生合成のボトルネック酵素として位置づけられており、分解産物である不飽和脂肪酸とリゾリン脂質は直接作用するか、アラキドン酸代謝に代表される一連の代謝経路を通じて各種脂質メディエーターへと変換され、産生される。産生された脂質メディエーターは標的細胞表面のそれぞれ特異的な受容体を介して脂質シグナルを伝達し、生理活性を発揮する。

PLA₂ の筆頭格はアラキドン酸含有リン脂質に高い選択性を示す cPLA₂α であり、PLA₂ を起点とした脂質メディエーターの供給プロセスはこれまで本酵素を中心に考えられてきた。マスト細胞の活性化に伴い細胞質の Ca²⁺ 濃度が上昇すると、cPLA₂α は C2 ドメイン依存的に核周縁膜に移行する。¹⁰⁾ こ

の際、cPLA₂α は mitogen-activated protein kinase などによりリン酸化され、活性が数倍に上昇する。¹¹⁾ cPLA₂α によって核周縁膜のリン脂質から切り出されたアラキドン酸は、同じく核膜に局在するシクロキシゲナーゼ (cyclooxygenase; COX) を通じて造血器型 PGD₂ 合成酵素 (hematopoietic prostaglandin D synthase; H-PGDS) により PGD₂ に、5- リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase; 5-LOX) を通じて LTC₄ 合成酵素 (leukotriene C₄ synthase; LTC4S) により LTC₄ へと変換され、産生される。cPLA₂α 欠損マウス由来のマスト細胞では野生型マスト細胞と比べて脱顆粒は不変であるものの、アラキドン酸の遊離並びに PGD₂, LTC₄ の産生が消失する。^{8,12,13)} したがって、マスト細胞において cPLA₂α はアラキドン酸由来の脂質メディエーターの産生に極めて重要な役割を担う。

一方、sPLA₂ は異なる組織・細胞分布と基質リン脂質の極性基と脂肪酸に対して異なる選択性を持つ 10 種類の活性型アイソザイム (IB, IIC, IIA, IID, IIE, IIF, V, X, III, XIIA) が存在する。マウスマスト細胞には複数の sPLA₂、ヒト肺マスト細胞には全 sPLA₂ の発現がみられる。^{8,14)} sPLA₂-IIA をマスト細胞に添加あるいは強制発現すると酵素活性依存的に脱顆粒が増強される。^{15,16)} 反対に、古典的 sPLA₂ 阻害剤はマスト細胞の脱顆粒を抑制する。¹⁷⁾ sPLA₂-IIA は活性化マスト細胞の形質膜と顆粒膜の融合部に局在することから、この場で本酵素は開口分泌を促進するなんらかの脂質代謝物を動員することが想定される。¹⁶⁾ sPLA₂-IIA はジーンターゲットイングにおいて汎用される C57BL/6 系マウスでは先天的に欠損しているため内因性 sPLA₂-IIA の生理的機能は検証されていない。¹⁸⁾ sPLA₂-V 又は X をラットマスト細胞に強制発現すると脱顆粒並びに PGD₂ あるいは LTC₄ 産生の亢進がみられる。^{16,19)} しかし、これらの欠損マウス由来マスト細胞の IgE



武富芳隆

2001 年、昭和大学大学院薬学研究科修士課程修了 (工藤一郎教授)。'03 年、同博士課程中退。'03-09 年、同学遺伝子組換え実験室・助教。'07 年、博士 (薬学) 取得。'09 年～現職、東京都医学総合研究所脂質代謝プロジェクト・主席研究員 (村上 誠リーダー)。テーマ：リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A₂ の生体内機能の解析。

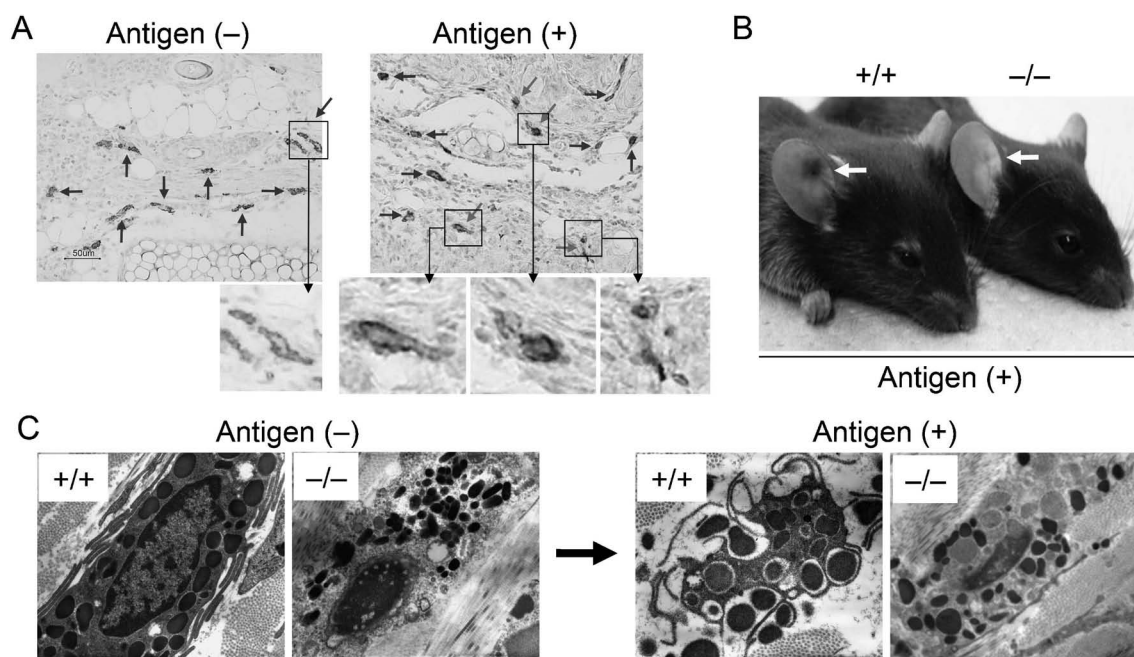


Fig. 1. Group III sPLA₂, a Regulator of Mast Cell Maturation

A, Immunohistochemistry of sPLA₂-III in the mouse skin before and after stimulation with antigen. sPLA₂-III is stored in and released from toluidine blue⁺ mast cells. Arrows indicate mast cells. B, Mast cell-associated IgE-mediated passive cutaneous anaphylactic responses in *Pla2g3*^{+/+} and *Pla2g3*^{-/-} mice. A representative photo of dye leakage (arrows) is shown. C, Transmission electron microscopy of ear mast cells in *Pla2g3*^{+/+} and *Pla2g3*^{-/-} mice before and after stimulation with antigen. (Modified from Ref. 8)

依存的な活性化及び欠損マウスのマスト細胞介在性アナフィラキシー応答は野生型マウスと同等であることが示されており、マスト細胞の sPLA₂-V, X はマスト細胞の即時的な活性化には係わらない.^{8,20)} sPLA₂-V はマスト細胞の SCF + IL-1β + IL-10 による遅発的な PGD₂ 産生や Toll 様受容体 1,2 を介した PGD₂ 産生に促進的に係わっており、本酵素の欠損により低下が認められている.^{20,21)} 類似の事柄として、sPLA₂-IIE 又は IIF をヒトマスト細胞に添加すると脱顆粒の増強がみられるが、これらの欠損マウスのアナフィラキシー応答は正常である.^{8,22)} このように、sPLA₂ は分泌されて近隣の膜リン脂質にパラクリン (ないしオートクリン) 的に作用して脱顆粒を始めとした細胞機能を亢進させる、あるいはアラキドン酸代謝を動員することが提唱されてきたが、*in vivo* での確固たる証拠は皆無であった。本研究では従来解析対象であった古典的 sPLA₂ とは異なる特殊な構造上の特徴を有し、古典的 sPLA₂ 阻害剤では抑制されない機能未知の atypical sPLA₂ (sPLA₂-III) が、局所微小環境のアラキドン酸代謝を動員することによりマスト細胞の成熟を制御することを初めて実証した。⁸⁾

3. Anaphylactic sPLA₂ (= sPLA₂-III) はマスト細胞の成熟を制御する中核分子である

ハチ毒に大量に含まれる sPLA₂ はヘルパー Th2 免疫応答誘導性のアナフィラキシー誘起物質あるいはマスト細胞活性化因子として知られている.²³⁾ 筆者は sPLA₂-III はハチ毒 sPLA₂ の唯一の哺乳動物ホモログであることを理論背景に、²⁴⁾ 本酵素は内因性のマスト細胞制御因子ではないかと仮説を立てこれを検証した。

sPLA₂-III はマスト細胞の分泌顆粒に局在しており、IgE と抗原又は SCF の刺激により分泌された [Fig. 1 (A)]. sPLA₂-III 欠損 (*Pla2g3*^{-/-}) マウスはマスト細胞依存性のアナフィラキシーに低応答性を示し、反対に本酵素の過剰発現マウスでは増悪した [Fig. 1 (B)]. 本欠損マウスの組織マスト細胞は、数は正常であるものの形態が未熟で、ヒスタミンや顆粒プロテアーゼ、FcεRI の表面発現などが著減しており、活性化が不全であった [Fig. 1 (C)]. 類似のマスト細胞不全はヘパリン合成酵素 NDST2、ヒスタミン合成酵素 (histidine decarboxylase; HDC)、プロテオグリカンのコアタンパク質 Serglycin などの分泌顆粒と関連の深い分子の欠損マウスで認められており、sPLA₂-III はマスト細胞

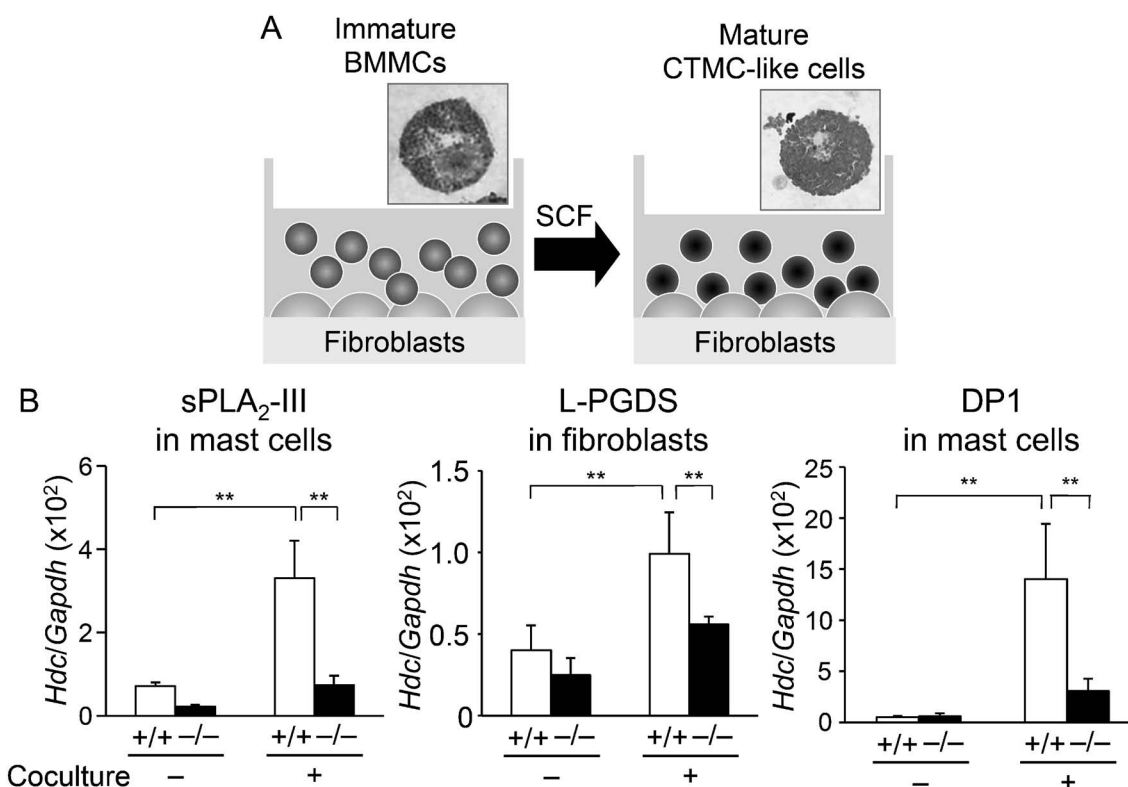


Fig. 2. Defective Fibroblast-driven Mast Cell Maturation by sPLA₂-III, L-PGDS or DP1 Deficiency

A, IL-3-driven BMMCs were co-cultured with or without Swiss 3T3 fibroblasts in the presence of SCF to allow maturation to CTMC-like cells. B, Expression of *Hdc* (histamine synthase) relative to *Gapdh* in BMMCs before and after co-culture. sPLA₂-III-null or DP1-null mast cells, or mast cells co-cultured with L-PGDS-ablated fibroblasts exhibited impaired *Hdc* induction in mast cells. ** $p < 0.01$. (Modified from Ref. 8)

の成熟に係わるものと考えられた。²⁵⁻²⁸⁾ 未成熟な IL-3 依存性のマウス骨髄由来培養マスト細胞 (bone marrow-derived mast cells; BMMCs) を SCF 存在下で線維芽細胞と共培養すると、マスト細胞は線維芽細胞との相互作用依存的に CTMC 様の亜群へと成熟する [Fig. 2(A)].^{3,5)} このマスト細胞の成熟に伴い野生型 BMMCs では FcεRI 表面発現の増強やヒスタミン、プロテアーゼなどの増加 (顆粒の育成) が認められたが、sPLA₂-III 欠損 BMMCs ではそれらが正常に起こらなかった [Fig. 2(B)]. 網羅的遺伝子発現プロファイリングの結果、野生型 BMMCs において成熟に伴い発現が上昇する遺伝子のうち約 60% の遺伝子の発現上昇が欠損 BMMCs では低下していた。さらに、この欠損 BMMCs をマスト細胞欠損 *Kit^{W-sh/W-sh}* マウスに移植再構成すると、全身性欠損マウスと同様にマスト細胞成熟不全及びアナフィラキシー不応答性を生じたことから、マスト細胞の成熟にはマスト細胞の sPLA₂-III が重要であることが判明した。

4. マスト細胞の成熟を制御する sPLA₂-III 依存の脂質ネットワークの解明

マスト細胞の組織への定着や増殖には線維芽細胞が産生する SCF とマスト細胞のその受容体 c-Kit のシグナル伝達軸が必須である。²⁹⁾ しかしマスト細胞の成熟には SCF 単独の作用だけでは不十分で、マスト細胞と線維芽細胞との相互作用に依存するなんらかの未知因子がさらに必要であることが想定され、長年これが何であるか探し求められてきた。²⁾ 筆者は、このマスト細胞の成熟を制御する責任分子はサイトカインや接着因子などのタンパク質性因子ではなく、線維芽細胞が産生する脂質メディエーター「PGD₂」であり、マスト細胞から分泌される sPLA₂-III 依存的な時空間的 PGD₂ サーキットはマスト細胞成熟のブラックボックスを補完することを発見した。⁸⁾

27 種類の PLA₂・下流脂質代謝・受容体の欠損マウスの包括的解析を通じて、リポカリン型 PGD₂ 合成酵素 (lipocalin-type prostaglandin D synthase; L-PGDS) 並びに PGD₂ 受容体 (D prostanoid 1

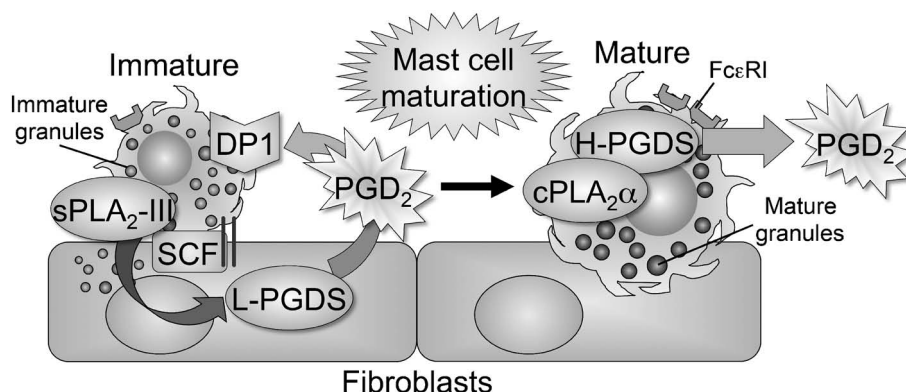


Fig. 3. sPLA₂-III Promotes Mast Cell Maturation and Thereby Allergy through Driving a Paracrine PGD₂ Loop

Interaction between mast cells and fibroblasts are essential for proper mast cell maturation in tissues. sPLA₂-III, an “anaphylactic sPLA₂” that is released from immature mast cells, is coupled with fibroblastic L-PGDS to promote sustained production of microenvironmental PGD₂, which in turn acts on DP1 on mast cells to facilitate mast cell maturation. Mature mast cells have more histamine granules and surface FcεRI and express higher levels of cPLA₂α and H-PGDS. Crosslinking of FcεRI with multivalent antigen elicits explosive activation of mature mast cells, which leads to pro-allergic histamine release and thereby allergic reactions. On the other hand, cPLA₂α/H-PGDS-driven immediate production of PGD₂ (via COX-1 and 2, which are omitted in the figure) by mature mast cells is anti-allergic.

receptor; DP1) の欠損マウスにおいて sPLA₂-III 欠損マウスと類似のマスト細胞成熟不全及びアナフィラキシー不応性が生じることを突きとめた。これは PLA₂-III の下流で PGD₂-DP1 軸がマスト細胞の成熟に係わることを想定させるものである。これらの分子の発現分布の位置関係は、L-PGDS は主にマスト細胞を取り巻く線維芽細胞、DP1 はマスト細胞であり、sPLA₂-III を起点とした PGD₂ サーキットはパラクリンループを形成するものと考えられた。マウス及びヒトのマスト細胞-線維芽細胞の共培養によれば、マスト細胞の成熟に伴う Hdc (ヒスタミン合成酵素) の遺伝子発現誘導は、マスト細胞の sPLA₂-III、線維芽細胞の L-PGDS、マスト細胞の DP1 を中和抗体や阻害剤、拮抗薬、欠損マウス由来初代細胞などによって遮断するといずれも抑制された [Fig. 2(B)]。以上のことから、未熟マスト細胞から SCF の刺激により分泌される sPLA₂-III は周縁線維芽細胞の L-PGDS と連関して PGD₂ を産生し、この PGD₂ はマスト細胞の DP1 受容体を活性化してマスト細胞を成熟に導くものと結論した (Fig. 3)。本研究成果は、①マスト細胞の成熟を制御するブラックボックスの解明、②sPLA₂ の作用機序並びに生物学的意義の解明、③脂質メディエーター (PGD₂) の新しい生理作用の発見、④2 種の異なる PGDS の機能的役割分担の解明 (後述)、⑤ハチ毒 sPLA₂ がアナフィラキシー誘起物質として作用することの位置付けの確立、など多くの新知見を含み、脂質及び免疫の双方の研究領域に貢献する

とともに、アレルギー制御の新しい概念として *Nat. Immunol.* 誌の表紙とハイライトに掲載された。³⁰⁾ 本知見を支持するものとして最近、マスト細胞の成熟にはヒスタミン H4 受容体が部分的に関与することや、³¹⁾ マスト細胞と局所微小環境の細胞間サイトカインネットワーク (マスト細胞から産生される IL-1β は近傍の線維芽細胞に作用し、これにより線維芽細胞から産生される IL-33 はマスト細胞の IL-33 受容体を活性化する) によって、マスト細胞はさらに機能的成熟を遂げること³²⁾ などが報告された。

5. マスト細胞-線維芽細胞の細胞間脂質ネットワークによるアレルギー制御

5-1. 2 種の PGDS の機能的役割分担

MMC は主に LTC₄ を、CTMC は優先的に PGD₂ を産生する。マスト細胞サブセットにおける脂質メディエーター産生様式はマスト細胞成熟の観点から説明することができる。筆者の検討によると、MMC 様の形質を示す IL-3 依存性の BMMC は主に LTC₄ を産生するが、マスト細胞-線維芽細胞の共培養によって CTMC 様へと成熟した BMMC は優先的に PGD₂ を産生する。^{3,5,8)} これはマスト細胞-線維芽細胞の共培養に伴い、BMMC において cPLA₂α, COX-2, H-PGDS など PGD₂ の生合成に係わる酵素群の発現が一括的に誘導され、反対に LTC₄S の発現の低下や LTB₄ 分解酵素の発現の増加など LTs の量が相対的に下がる方向にシフトするためである。⁸⁾ すなわち、マスト細胞の成熟は脂

質メディエーター生合成酵素群の発現の再編成からも説明することができる。

PGDS には L-PGDS と H-PGDS の 2 種類が存在するが、両酵素はそれぞれ機能的役割の異なる PGD₂ プールを動員することを見出した。⁸⁾ L-PGDS は局所環境細胞に発現し、H-PGDS は大量に PGD₂ を産生しないが持続的に PGD₂ を動員したことから、この持続性がマスト細胞の成熟には重要であるものと考えられた。既述の通り、この局所微小環境から動員される L-PGDS 由来の PGD₂ はマスト細胞成熟の誘導を通じてマスト細胞介在性アレルギーに対して促進的に働く。これに対し、H-PGDS はマスト細胞を始めとする免疫細胞に発現し、活性化に伴い一過的に大量の PGD₂ プールを動員した。これまでマスト細胞が産生する PGD₂ は炎症の促進に関与するものと想定されてきたが、これに反し H-PGDS 欠損マウスのマスト細胞依存性アナフィラキシー応答は増悪した。⁸⁾ これを支持するものとして、H-PGDS 欠損マウスでは接触性皮膚炎などの遅延型アレルギーが増悪することや、マスト細胞の H-PGDS 欠損により大腸炎やがんが増悪することも最近報告され、³³⁻³⁵⁾ H-PGDS 由来の PGD₂ は往々にして炎症の抑制に係わるものと推察される。このように、PGD₂ が炎症の促進と抑制の両面に係わり得る理由の 1 つは PGD₂ の供給プロセスの違いにある。したがって、いつ、どの細胞から、どちらの PGDS に依存して PGD₂ が産生されるかを理解することは、PGD₂ による生体応答の制御機構を解明する鍵となる。これに加えて、PGD₂ は DP1 と DP2/CRTH2 の 2 種類の PGD₂ 受容体に作用するが、どちらの受容体に作用するかによっても生体応答は正にも負にも制御される。sPLA₂-III 欠損マウスでは局所微小環境の L-PGDS 由来 PGD₂ 並びに成熟マスト細胞の活性化に伴う H-PGDS 由来の PGD₂ の両 PGD₂ プールが減少しているが、PGD₂ に依存する生体応答が sPLA₂-III 欠損によりどのように変化するかについては今後の検討課題としたい。

5-2. 細胞間アラキドン酸代謝によるアレルギー制御 マスト細胞-線維芽細胞の共培養において、培養上清中には一過的に PGE₂ が蓄積することを見出した。⁷⁾ この PGE₂ の蓄積はマスト細胞の cPLA₂α を欠損させると大幅に減少することから、

マスト細胞の cPLA₂α に依存的であった。PGE₂ 合成酵素には cPGES, microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1), mPGES-2 の 3 種類が知られているが、マスト細胞-線維芽細胞の共培養に伴って線維芽細胞において mPGES-1 の発現誘導がみられた。放射ラベルされたアラキドン酸を取り込ませたマスト細胞を線維芽細胞と共培養すると、このアラキドン酸は線維芽細胞へと移行し、それに相関して PGE₂ が産生された。Kit^{W-sh/W-sh} マウスの組織中 PGE₂ は野生型マスト細胞を移植再構成することにより増加したが、cPLA₂α 欠損マスト細胞の再構成ではそれがみられなかった。したがって、マスト細胞の cPLA₂α 依存的に切り出されたアラキドン酸は細胞間移行により周縁線維芽細胞に取り込まれ、線維芽細胞の mPGES-1 によって PGE₂ に変換され、産生されることが明らかとなった (Fig. 4)。この局所微小環境が産生する PGE₂ はアレルギーに拮抗的に働いており、mPGES-1 及び PGE₂ 受容体 (E prostanoid receptor; EP1-EP4) のうち EP3 の欠損マウスではマスト細胞介在性アナフィラキシー応答が増悪した。^{8,36)} そのほか、EP3 欠損マウスではアレルギー喘息や低濃度の抗原暴露によって生じる接触性皮膚炎なども増悪することが示されている。^{36,37)}

既述のように、マスト細胞の脂質メディエーター産生は cPLA₂α によって担われる。マスト細胞依存性のアナフィラキシー応答は LTC₄ による血管透過性の亢進に部分的に依存することから、³⁸⁾ この LTC₄ の供給に必須である cPLA₂α の欠損マウスではアナフィラキシー応答は当然軽減することが予想されるが、これに反し cPLA₂α 欠損マウスのアナフィラキシー応答は野生型マウスと同等であった。⁸⁾ マスト細胞の H-PGDS 由来 PGD₂ 並びに局所微小環境の mPGES-1 由来 PGE₂ はともに抗アナフィラキシー作用を持つことを踏まえると、cPLA₂α 欠損マウスではアナフィラキシーに促進的及び抑制的に作用する脂質メディエーターの産生が同時に消失し、作用を打ち消し合ったためアナフィラキシー応答は不変となったものと推察される。非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) の服用によりアスピリン不耐性 (喘息やショックなど) を起こすことがある。この発症機構として、NSAIDs が持つ COX 活性の阻害により

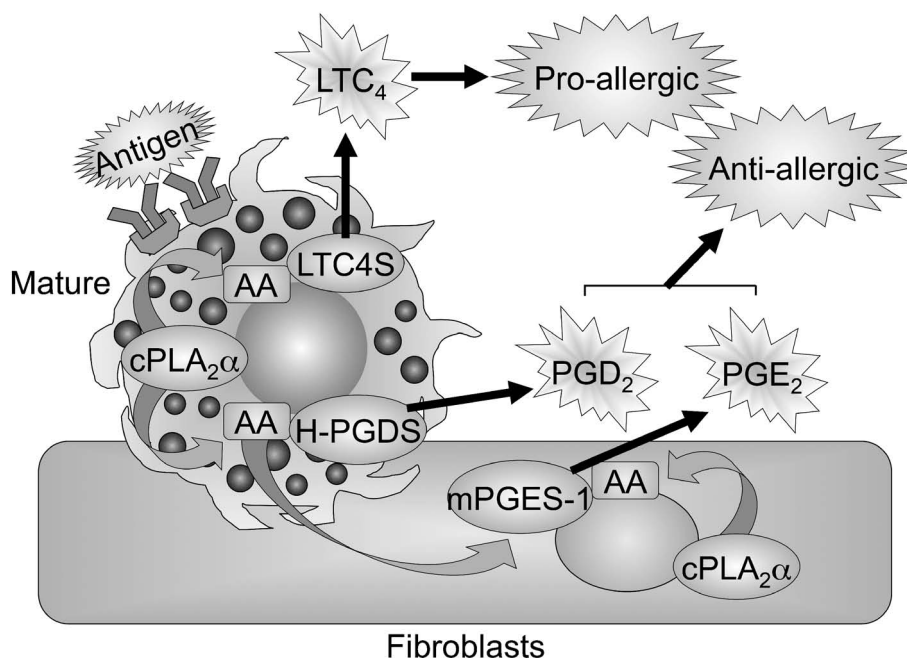


Fig. 4. Mast Cell PLA₂α-dependent Biosynthesis of Anti-anaphylactic PGE₂ *in Vivo*

During mast cell maturation, PGE₂, which exerts an anti-allergic effect *via* the PGE₂ receptor EP3, is produced by fibroblasts in a manner dependent upon cPLA₂α in mast cells, where cPLA₂α-driven arachidonic acid is transferred to adjacent fibroblasts through the transcellular route and then metabolized to PGE₂ by mPGES-1.

アラキドン酸代謝は LOX 経路の方へと傾き（シャunting効果）、アナフィラキシー促進性の LTC₄（又はその代謝物）の産生が過剰になることが想定されてきたが、筆者らを含めいくつかの研究結果を踏まえ、最近では COX 経路の下流で機能する抗アレルギー性脂質メディエーター、特に PGE₂ の産生が低下することもアスピリン不耐性を生じる原因の1つであると考えられるようになった。実際、mPGES-1 や EP3 の欠損マウスではアレルギー喘息が増悪する。^{36,39)} 一方、PGD₂ と同様に PGE₂ もまた作用する受容体の相違や状況によってはアレルギー性炎症に対して促進的に働く。例えば、PGE₂-EP4 軸はリンパ節での T helper 1 (Th1), Th17 細胞の増殖を促進しており、本経路を遮断すると Th1 応答主体の接触性皮膚炎や Th17 応答主体の実験的自己免疫性脳脊髄炎は改善することが知られている。⁴⁰⁾ マスト細胞には EP 受容体のうち EP3 が最も高発現しているが、マスト細胞における PGE₂-EP3 軸は IgE 非依存的なマスト細胞の脱顆粒に対して促進的に働く。⁴¹⁾

6. マスト細胞の成熟に伴って発現誘導される遺伝子群の解析

筆者はマスト細胞-線維芽細胞の共培養におい

て、マスト細胞の成熟に伴い発現誘導される遺伝子群を一括的に同定した。^{3,4)} このうち、機能未知であった *N-myc* downstream regulated gene-1 (NDRG1) 並びに NACHT, LRR and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) についてマスト細胞内における機能を明らかとした。⁴⁻⁶⁾

6-1. 脱顆粒促進因子としての NDRG1

NDRG1 (Cap43/Drg1/Ndr1/RTP) はある種のストレスや低酸素、がん細胞を分化誘導させると発現誘導される分子としていくつかの研究グループにより同定された。⁴²⁾ 筆者はマスト細胞の成熟早期に強く発現誘導される遺伝子として NDRG1 を同定し、本因子をマスト細胞に強制発現させると脱顆粒が亢進することを見出した。⁴⁾ さらに、マスト細胞-線維芽細胞の共培養において、未熟な BMMCs のエフェクター機能は NDRG1 の欠損の影響を受けなかったが、成熟後の BMMCs では NDRG1 の欠損は脂質メディエーター産生やサイトカイン産生に影響を与えることなく脱顆粒のみを低下させた。⁵⁾ これと合致して、*Ndr1* 欠損マウスでは組織マスト細胞の脱顆粒の低減を主要因としてアナフィラキシー応答が改善した。すなわち、NDRG1 は成熟マスト細胞に特有の脱顆粒マシナリーを促進させ

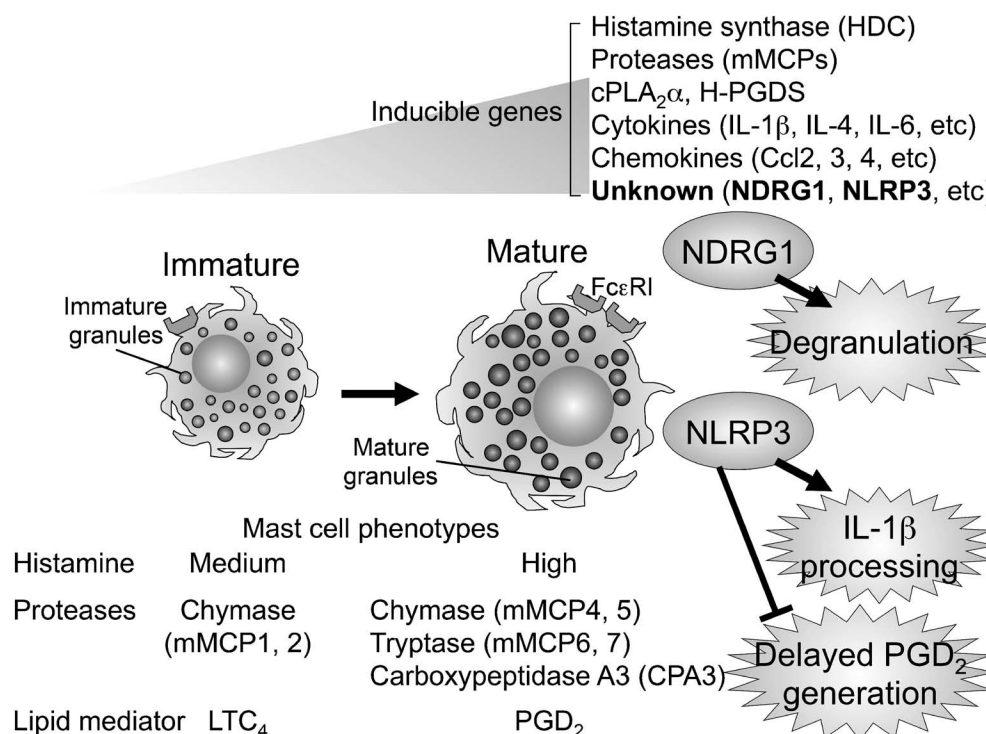


Fig. 5. Regulation of Mast Cell Function by NDRG1 or NLRP3

The profile of histamine content, protease expression, and lipid mediator generation has been used to define subsets of mast cells. Maturation immature mast cells into CTMCs is accompanied by increased expression of genes related to degranulation, lipid mediator biosynthesis, cytokines and chemokines, or unknown function. Of these, NDRG1 plays a pivotal role in the exocytotic degranulation of mast cells. NLRP3, a central component of the inflammasome that regulates IL-1β processing, counter-regulates COX-2-dependent sustained production of PGD₂.

ることが明らかとなった (Fig. 5). NDRG1 は血清グルココルチコイド誘導性プロテインキナーゼ (serum/glucocorticoid regulated kinase 1; SGK1) によるリン酸化の制御を受けることが知られているが, 最近 SGK1 はマスト細胞の脱顆粒におけるアクチン骨格の再構成を制御することが報告された.^{43,44)} SGK1 欠損マスト細胞ではこのアクチン骨格の再構成が生じないために脱顆粒が減弱する. 筆者の予備的検討によれば, 成熟後の *NdrG1* 欠損マスト細胞ではアクチン骨格の再構成に係わる分子群の発現が数多く減少していることから, *NdrG1* 欠損マスト細胞における脱顆粒減弱には SGK1 依存的なアクチン骨格の再構成が関与する可能性が想定される.

6-2. IL-1β 産生及び遅発的 PGD₂ 産生調節因子としての NLRP3 NLRP3 は蕁麻疹関連疾患であるクリオピリン関連周期性症候群 (cryopyrin-associated periodic syndrome; CAPS) の原因遺伝子として同定された.⁴⁵⁾ NLRP3 は活性化に伴い PYD ドメインを介して下流分子 apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) や

procaspase-1 とともにインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体を形成する.⁴⁶⁾ インフラマソームでは caspase-1 が活性化され, それによって IL-1β は前駆体から活性型へと変換され, 放出される. 筆者らは, NLRP3 や ASC などのインフラマソームの構成因子はマスト細胞に発現しており, この IL-1β の産生に係わり得ること, 転写因子 NF-κB の活性化とそれに伴う COX-2 依存的な遅発的 PGD₂ 産生に抑制的に作用することなどを見出した (Fig. 5).⁶⁾ その後, マスト細胞の NLRP3 インフラマソーム依存的に産生される IL-1β は脱顆粒とは無関係に皮膚局所の血管透過性の亢進と好中球性炎症を惹起することや, CAPS の皮膚では *Nlrp3* 遺伝子変異によって常時活性化 IL-1β が産生され, これが抗ヒスタミン薬耐性の蕁麻疹に直結することが報告された.^{47,48)} 後者の論文では, 皮膚に存在する細菌叢はマスト細胞における TNF-α の産生を介して NLRP3 インフラマソームを活性化することも示されている.⁴⁸⁾

7. おわりに

以上, 不明瞭であったマスト細胞の成熟マシナ

リー、そして局所微小環境での成熟に伴うマスト細胞の機能獲得とその制御機構に関する筆者のこれまでの研究結果をまとめた。最後に今後の展望について触れたい。①sPLA₂-III 欠損マウスと L-PGDS・DP1 欠損マウスの表現型を照合すると、アナフィラキシー応答、マスト細胞のヒスタミン含量、遺伝子発現プロファイルのいずれも sPLA₂-III 欠損の方が劇的なマスト細胞不全を呈する。⁸⁾ このことは sPLA₂-III の下流で機能する脂質メディエーターは PGD₂ 以外にも存在する可能性を示しており、この脂質メディエーターの実体を明らかにしたい、②マスト細胞にはいまだ機能が不明確な PLA₂ アイソザイムが複数発現しており、これらの PLA₂ のマスト細胞における機能を解明したい、③sPLA₂-III はマスト細胞以外の免疫細胞や局所環境細胞にも時空間的に発現する結果を得ている。本酵素がマスト細胞以外の免疫細胞の機能調節にいかに関わるのかについて検証してみたい、④sPLA₂-III はマスト細胞依存性の即時型アレルギー以外に獲得免疫が係わる免疫疾患にも係わるのだろうか？ また、マスト細胞は動脈硬化・動脈瘤などの循環器疾患や肥満などの代謝性疾患、がんなどの慢性炎症性疾患にも係わることが知られているが、^{49,50)} sPLA₂-III はこれらマスト細胞が係わり得る他の疾患も制御するのだろうか？ 本研究をマスト細胞制御から多彩な疾患制御へと発展させたい。最終的には、本酵素を起点とした脂質経路を応用した創薬展開を目指す。特に、sPLA₂-III は他の sPLA₂ アイソザイムとは異なるユニークな構造を示し、既存の sPLA₂ 阻害剤では抑制されない。したがって、sPLA₂-III を選択的に阻害する薬物が開発されれば、マスト細胞が係わる病態を始め様々な疾患の新しい治療薬となることが期待される。

謝辞 本研究は東京都医学総合研究所脂質代謝プロジェクト・村上 誠先生のご指導の下、筆者が大学院生の頃より村上先生とともに切磋琢磨して長年行ってきた研究の集大成である。ここに改めて村上 誠先生に心から感謝の意を表したい。

REFERENCES

1) Abraham S. N., St. John A. L., *Nat. Immunol.*, **10**, 440–452 (2010).

2) Gurish M. F., Austen K. F., *Immunity*, **37**, 25–33 (2012).

3) Ogasawara T., Murakami M., Suzuki-Nishimura T., Uchida M. K., Kudo I., *J. Immunol.*, **158**, 393–404 (1997).

4) Taketomi Y., Sugiki T., Saito T., Ishii S., Hisada M., Suzuki-Nishimura T., Uchida M. K., Moon T. C., Chang H. W., Natori Y., Miyazawa S., Kikuchi-Yanoshita R., Murakami M., Kudo I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 699–709 (2003).

5) Taketomi Y., Sunaga K., Tanaka S., Nakamura M., Arata S., Okuda T., Moon T. C., Chang H. W., Sugimoto Y., Kokame K., Miyata T., Murakami M., Kudo I., *J. Immunol.*, **178**, 7042–7053 (2007).

6) Ueno N., Taketomi Y., Koga K., Atsumi Y., Kikuchi-Yanoshita R., Kudo I., Murakami M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1781**, 415–421 (2008).

7) Ueno N., Taketomi Y., Yamamoto K., Hirabayashi T., Kamei D., Kita Y., Shimizu T., Shinzawa K., Tsujimoto Y., Ikeda K., Taguchi R., Murakami M., *J. Biol. Chem.*, **286**, 37249–37263 (2011).

8) Taketomi Y., Ueno N., Kojima T., Sato H., Murase R., Yamamoto K., Tanaka S., Sakanaka M., Nakamura M., Nishito Y., Kawana M., Kambe N., Ikeda K., Taguchi R., Nakamizo S., Kabashima K., Gelb M. H., Arita M., Yokomizo T., Nakamura M., Watanabe K., Hirai H., Nakamura M., Okayama Y., Ra C., Aritake K., Urade Y., Morimoto K., Sugimoto Y., Shimizu T., Narumiya S., Hara S., Murakami M., *Nat. Immunol.*, **14**, 554–563 (2013).

9) Murakami M., Taketomi Y., Miki Y., Sato H., Hirabayashi T., Yamamoto K., *Prog. Lipid Res.*, **50**, 152–192 (2011).

10) Stahelin R. V., Rafter J. D., Das S., Cho W., *J. Biol. Chem.*, **278**, 12452–12460 (2003).

11) Lin L. L., Wartmann M., Lin A. Y., Knopf J. L., Seth A., Davis R. J., *Cell*, **72**, 269–278 (1993).

12) Fujishima H., Sanchez Mejia R. O., Bingham C. O. 3rd, Lam B. K., Sapirstein A., Bonventre J. V., Austen K. F., Arm J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4803–4807 (1999).

13) Nakatani N., Uozumi N., Kume K., Muraka-

- mi M., Kudo I., Shimizu T., *Biochem. J.*, **352**, 311–317 (2000).
- 14) Triggiani M., Giannattasio G., Calabrese C., Loffredo S., Granata F., Fiorello A., Santini M., Gelb M. H., Marone G., *J. Allergy Clin. Invest.*, **124**, 558–565 (2009).
- 15) Murakami M., Hara N., Kudo I., Inoue K., *J. Immunol.*, **151**, 5675–5684 (1993).
- 16) Enomoto A., Murakami M., Valentin E., Lambeau G., Gelb M. H., Kudo I., *J. Immunol.*, **165**, 4007–4014 (2000).
- 17) Murakami M., Kudo I., Suwa Y., Inoue K., *Eur. J. Biochem.*, **209**, 257–265 (1992).
- 18) MacPhee M., Chepenik K. P., Liddell R. A., Nelson K. K., Siracusa L. D., Buchberg A. M., *Cell*, **81**, 957–966 (1995).
- 19) Murakami M., Koduri R. S., Enomoto A., Shimbara S., Seki M., Yoshihara K., Singer A., Valentin E., Ghomashchi F., Lambeau G., Gelb M. H., Kudo I., *J. Biol. Chem.*, **276**, 10083–10096 (2001).
- 20) Diaz B. L., Satake Y., Kikawada E., Balesrieri B., Arm J. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1489–1497 (2006).
- 21) Kikawada E., Bonventre J. V., Arm J. P., *Blood*, **110**, 561–567 (2007).
- 22) Granata F., Staiano R. I., Loffredo S., Petraroli A., Genovese A., Marone G., Triggiani M., *Biochimie*, **92**, 588–593 (2010).
- 23) Palm N. W., Rosenstein R. K., Yu S., Schenten D. D., Florsheim E., Medzhitov R., *Immunity*, **39**, 976–985 (2013).
- 24) Valentin E., Ghomashchi F., Gelb M. H., Lazdunski M., Lambeau G., *J. Biol. Chem.*, **275**, 7492–7496 (2000).
- 25) Humphries D. E., Wong G. W., Friend D. S., Gurish M. F., Qiu W. T., Huang C., Sharpe A. H., Stevens R. L., *Nature*, **400**, 769–772 (1999).
- 26) Forsberg E., Pejler G., Ringvall M., Lunderius C., Tomasini-Johansson B., Kusche-Gullberg M., Eriksson I., Ledin J., Hellman L., Kjellen L., *Nature*, **400**, 773–776 (1999).
- 27) 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., *FEBS Lett.*, **305**, 181–184 (2001).
- 28) Abrink M., Grujic M., Pejler G., *J. Biol. Chem.*, **279**, 40897–40905 (2004).
- 29) Zsebo K. M., Williams D. A., Geissler E. N., Broudy V. C., Martin F. H., Atkins H. L., Hsu R. Y., Birkett N. C., Okino K. H., Murdock D. C., Jacobsen F. W., Langley K. E., Smith K. A., Takeish T., Cattanch B. M., Galli S. J., Suggs S. V., *Cell*, **63**, 213–224 (1990).
- 30) Starkl P., Marichal T., Galli S. J., *Nat. Immunol.*, **14**, 527–529 (2013).
- 31) Nakazawa S., Sakanaka M., Furuta K., Natsuhara M., Takano H., Tsuchiya S., Okuno Y., Ohtsu H., Nishibori M., Thurmond R. L., Hirasawa N., Nakayama K., Ichikawa A., Sugimoto Y., Tanaka S., *Eur. J. Immunol.*, **44**, 204–214 (2014).
- 32) Kaieda S., Shin K., Nigrovic P. A., Seki K., Lee R. T., Stevens R. L., Lee D. M., *J. Biol. Chem.*, **285**, 21478–21486 (2010).
- 33) Yamamoto Y., Otani S., Hirai H., Nagata K., Aritake K., Urade Y., Narumiya S., Yokozeki H., Nakamura M., Satoh T., *Am. J. Pathol.*, **179**, 302–314 (2011).
- 34) Murata T., Aritake K., Matsumoto S., Kamauchi S., Nakagawa T., Hori M., Momotani E., Urade Y., Ozaki H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 19802–19807 (2011).
- 35) Iwanaga K., Nakamura T., Maeda S., Aritake K., Hori M., Urade Y., Ozaki H., Murata T., *Cancer Res.*, **74**, 3011–3019 (2014).
- 36) Kunikata T., Yamane H., Segi E., Matsuoka T., Sugimoto Y., Tanaka S., Tanaka H., Nagai H., Ichikawa A., Narumiya S., *Nat. Immunol.*, **6**, 524–531 (2005).
- 37) Honda T., Matsuoka T., Ueta M., Kabashima K., Miyachi Y., Narumiya S., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **124**, 809–818.e2 (2009).
- 38) Kanaoka Y., Maekawa A., Penrose J. F., Austen K. F., Lam B. K., *J. Biol. Chem.*, **168**, 443–449 (2001).
- 39) Lundequist A., Nallamshetty S. N., Xing W., Feng C., Laidlaw T. M., Uematsu S., Akira S., Boyce J. A., *J. Immunol.*, **184**, 433–441 (2010).

- 40) Yao C., Sakata D., Esaki Y., Li Y., Matsuoka T., Kuroiwa K., Sugimoto Y., Narumiya S., *Nat. Med.*, **15**, 633–640 (2009).
- 41) Morimoto K., Shirata N., Taketomi Y., Tsuchiya S., Segi-Nishida E., Inazumi T., Kabashima K., Tanaka S., Murakami M., Narumiya S., Sugimoto Y., *J. Immunol.*, **192**, 1130–1137 (2014).
- 42) Kokame K., Kato H., Miyata T., *J. Biol. Chem.*, **271**, 29659–29665 (1996).
- 43) Murray J. T., Campbell D. G., Morrice N., Auld G. C., Shpiro N., Marquez R., Pegg M., Bain J., Bloomberg G. B., Grahammer F., Lang F., Wulff P., Kuhl D., Cohen P., *Biochem. J.*, **384**, 477–488 (2004).
- 44) Schmid E., Gu S., Yang W., Münzer P., Schaller M., Lang F., Stournaras C., Shumilina E., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **304**, C49–C55 (2013).
- 45) Hoffman H. M., Mueller J. L., Broide D. H., Wanderer A. A., Kolodner R. D., *Nat. Genet.*, **29**, 301–305 (2001).
- 46) Agostini L., Martinon F., Burns K., McDermott M. F., Hawkins P. N., Tschopp J., *Immunity*, **20**, 319–325 (2004).
- 47) Nakamura Y., Kambe N., Saito M., Nishikomori R., Kim Y. G., Murakami M., Núñez G., Matsue H., *J. Exp. Med.*, **206**, 1037–1046 (2009).
- 48) Nakamura Y., Franchi L., Kambe N., Meng G., Strober W., Núñez G., *Immunity*, **37**, 85–95 (2012).
- 49) Sun J., Sukhova G. K., Wolters P. J., Yang M., Kitamoto S., Libby P., MacFarlane L. A., Mallen-St Clair J., Shi G. P., *Nat. Med.*, **13**, 719–724 (2007).
- 50) 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., *Nat. Med.*, **15**, 940–945 (2009).