

ヒスタミン生合成を介して発現する生理機能の解析

田中 智之

Physiological Function Mediated by Histamine Synthesis

Satoshi TANAKA

Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received April 4, 2003)

Histamine is involved in a variety of physiologic responses, such as inflammation, type I allergy, gastric acid secretion, and neurotransmission. Previous studies have focused on specific receptors for histamine and histamine release through degranulation, and the regulation of histamine synthesis and its physiologic roles remain to be clarified. We have studied histidine decarboxylase (HDC), the rate-limiting enzyme for mammalian histamine synthesis. Immunocytochemical approaches with an anti-HDC antibody revealed that histamine synthesis occurs in two distinct compartments of mast cells, cytosol and granules, and is regulated by the posttranslational processing of HDC. We also found that histamine synthesis in mast cells is markedly induced by IgE even in the absence of antigens, which may be relevant to enhanced responses of mast cells under allergic conditions. We then developed HDC-deficient mice by gene targeting to investigate the physiologic roles of histamine. We not only confirmed that histamine is essential for type I allergy and stimulates gastric acid secretion, but also found that histamine may regulate the proliferation and differentiation of mast cells. Furthermore, in HDC-deficient mice histamine produced by infiltrated neutrophils can suppress the production of antitumoral cytokines, such as interferon- γ and tumor necrosis factor- α through H_2 receptors in the tumor tissues. In this review, we describe recent topics in histamine research, including our results focusing on histamine synthesis and its physiologic roles.

Key words—histamine; histidine decarboxylase; mast cell; allergy; intracellular localization; gastric acid secretion

1. はじめに

ヒスタミンは炎症、アレルギー、胃酸分泌、神経伝達と言った生体反応を調節する生体アミンであり、そのアンタゴニストはアレルギーや消化性潰瘍の優れた治療薬として長い歴史を有している。近年ではヒスタミンはそのような作用に加えて、腫瘍増殖や免疫応答の調節にも関与することが報告されており、生体内の広い範囲で多彩な作用を有することが明らかにされている。ヒスタミン産生細胞としてはマスト細胞や、好塩基球、ECL細胞 (enterochromaffin-like cell) などがよく知られているが、いずれの細胞においてもヒスタミンは顆粒内に貯留され、刺激に応じて細胞外へと放出される。放出さ

れたヒスタミンは標的細胞の特異的受容体を介してその作用を発揮するが、現在のところ4種のGタンパク質共役型受容体の特異的受容体として同定されている。炎症、即時型アレルギーに関与する H_1 受容体、胃酸分泌反応に関与する H_2 受容体は、いずれもアンタゴニストが臨床で成功を収めており、基礎的研究も比較的進展している。一方、中枢特異的に発現する H_3 受容体、血球系細胞特異的に発現する H_4 受容体はごく最近遺伝子がクローニングされ、新たな創薬の標的として注目を集めている。従来の研究では薬理学的手法による受容体研究とそのリガンド開発、あるいは脱顆粒機構の解析に重点が置かれてきたことから、ヒスタミン生合成過程に関しては不明な点が数多く残されていた。しかしながら、生合成酵素であるヒスタジジン脱炭酸酵素 (L-histidine decarboxylase; HDC) は誘導性の酵素であり、刺激に応じて数倍から百倍以上にも酵素活性が上昇することが様々な系において報告されてお

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: satoshit@pharm.kyoto-u.ac.jp

*本総説は、平成15年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

り、合成を介したヒスタミン作用の調節という観点に基づいた研究が必要と考えられた。

HDC に関してはいくつかのグループが精製を目指していたが、同様にビタミン B₆ を補酵素とする他の脱炭酸酵素のグループと比較するとその精製は困難であった。著者の所属する研究室ではマウス癌化マスト細胞株、P-815 から HDC の精製を行いその部分配列の同定に初めて成功し、¹⁾ 引き続きその cDNA クローニングを行った。²⁾ その結果、精製酵素は 53-kDa の分子量から成る 2 量体であるが、cDNA がコードするタンパク質の分子量は 74-kDa であり、HDC において翻訳後プロセシングが起こっている可能性が示された。そこで著者らは特異的な抗体を作製し、マスト細胞内における HDC の翻訳後プロセシングを解析し、その役割が酵素の細胞内局在性を調節することにあることを見出した。ヒスタミンが細胞内においてどこで合成され、またどのような機構で顆粒に貯留されるのかは従来不明であり、HDC の細胞内局在を明らかにすることはその解明につながる知見である。著者らはその後、ヒスタミン生合成という観点からその生理作用を解析し、近年は HDC 欠損マウスを用いてヒスタミン合成が重要な機能を果たす生理現象の解明に努めている。本総説では、著者らが得たヒスタミン研究の成果を中心に、ヒスタミンの機能に関して近年新たに得られた知見を併せて紹介する。

2. HDC の翻訳後プロセシングとその細胞内局在性の解析

HDC は B₆ 酵素ファミリーに分類されるが、一次構造上の特徴として他の HDC とホモロジーのある脱炭酸酵素と相同性のない C-末端側 20-kDa の領域を有することが挙げられる。精製酵素のプロテアーゼ断片の解析から、この部分は翻訳後プロセシングにより失われる領域であることが推察された。²⁾ また一般的にプロ体で合成される酵素はその細胞内での活性調節の必要性から低活性体であることが多いが、発現系での検討では 74-kDa 分子種にも酵素活性が認められた。バキュロウイルス-昆虫細胞発現系や COS 細胞発現系では、74-kDa の前駆体分子種は不溶性画分に、C-末端 20-kDa の領域を欠失させた変異体 54-kDa 分子種は可溶性画分に、それぞれ分布することが明らかとなり、プロセシングは酵素の細胞内局在性を支配している可能

性が考えられた。^{3,4)} そこで著者らは HDC に対する特異抗体を作製し、⁵⁾ 高い HDC 活性を有する細胞株であるラット好塩基球細胞株、RBL-2H3 を用いて酵素の細胞内局在性を検討した。⁶⁾ [³⁵S] 標識した細胞を用いて免疫沈降法により新生 HDC の代謝回転を検討したところ、74-kDa 分子種から 53-kDa 分子種への翻訳後プロセシングが確認された。また Streptolysin-O 処理により形質膜を選択的に透過させた際には、74-kDa 分子種のみが漏出し、約 40% の活性を得た。このことはサイトゾルには 74-kDa 分子種のみが活性体として存在することを示唆している。さらに Percoll を用いた密度勾配遠心分画により、小胞体、ゴルジを含む画分においてプロセシングが起こっていること、また 53-kDa 分子種は顆粒画分にも分布することが明らかとなった。酵素活性、及びヒスタミンはサイトゾルと顆粒の両画分に検出された。次に 53-kDa 分子種の局在の詳細を検討することを目的として、ジギトニンで形質膜を選択的に透過処理した後にトリプシン消化を行ったところ、74-kDa 分子種が完全に消化されるのに対して 53-kDa 分子種は抵抗性を示し、その他のサイズの分子種は検出されなかった。このことは、74-kDa 分子種がサイトゾルあるいはサイトゾルに接した領域に分布すること、及び 53-kDa 分子種がプロテアーゼによる消化から免れる領域、すなわちオルガネラの腔側に存在することを示唆している。以上の結果から、HDC はサイトゾルで翻訳された後、小胞体へと輸送されその腔側でプロセシングを受け、顆粒へと輸送されることが推察された。しかしながら、HDC は膜タンパク、分泌タンパクの多くに見られる N-末端側の典型的なシグナル配列を持たないこと、また膜貫通可能な疎水性領域を持たないことなどから、小胞体への輸送は未知の機構で行われている可能性が考えられた。そこで、ウサギ網状赤血球を用いた *in vitro* 翻訳系にイヌ臍臓ミクロソーム膜を再構成した実験系において輸送に関する解析を行ったところ、HDC のミクロソームへの移行は翻訳と共役しないことが明らかとなった。⁷⁾ COS 細胞発現系を用いた C-末端欠変異体の解析から C-末端側 10-kDa の領域が小胞体移行に重要であることが判明し、その領域を C-末端側に結合させた Green fluorescent protein (GFP) 融合タンパク質はやはり小胞体へと

局在し、この領域に小胞体輸送シグナルが含まれていることが明らかとなった。⁷⁾このような移行機構は哺乳類のタンパク質ではほとんど報告がないが、一部のサイトカインや増殖因子においてもメカニズムはやはり不明であるがシグナル配列非依存的な細胞外への分泌が報告されており、HDCの輸送経路はこれらとの関連においても興味深い例である。また酵母において報告されている同様の可溶性タンパク質の小胞体移行に関しては、新生ペプチド輸送チャンネルであるSec61複合体を利用する点ではシグナル配列を有する場合と同じであることが示されているが、どのようにして小胞体まで輸送されるかと言った詳細は不明である。このような局在性、移行はHDCのC-末端側配列により支配されていることから、現在その領域に結合するタンパク質の同定を進めている。

著者らは一連の解析過程で、53-kDa分子種に比してサイトゾルに存在する74-kDa分子種は非常に不安定であることを見出した。そこで種々のプロテアーゼ阻害剤を培地中に添加し74-kDa分子種の分解を測定したところ、ラクタシスチンを初めとするプロテアソーム阻害剤により分解が抑制された。この反応を透析したサイトゾルを用いて*in vitro*で測定を行ったところHDCの分解は観察されず、

ATPを添加することにより促進されることを見出した。またプロテアソーム阻害剤存在下培養し、抗HDC抗体で免疫沈降、抗ユビキチン抗体でイムノブロットを行うことによりポリユビキチン化されたHDCの蓄積を確認した。⁸⁾HDCには複数のPEST領域と呼ばれる配列が存在することが報告されている。PEST領域を有するタンパク質は一般的に短寿命であり、因果関係は必ずしも明確ではないがプロテアソームにより分解されることが示されており、HDCもまたこのカテゴリーに含まれることが明らかとなった。

以上のHDCの細胞内局在性、代謝回転に関する知見を模式的に図示した (Fig. 1)。マスト細胞ではヒスタミンはサイトゾル、顆粒という2つのコンパートメントにおいて合成され、それぞれ74-kDa、53-kDa分子種が関与すると考えられる。それぞれのプールの役割は现阶段では明確ではないが、サイトゾルにおけるヒスタミン合成は74-kDa分子種が短寿命であることから、HDCの転写レベルでの誘導パターンと密接に関連することが推察される。HDCは種々の刺激により転写レベルで誘導を受ける発現量変化の大きい酵素であることから、速やかなヒスタミン産生が必要な応答ではサイトゾルにおけるヒスタミン合成が寄与するものと考えられる。

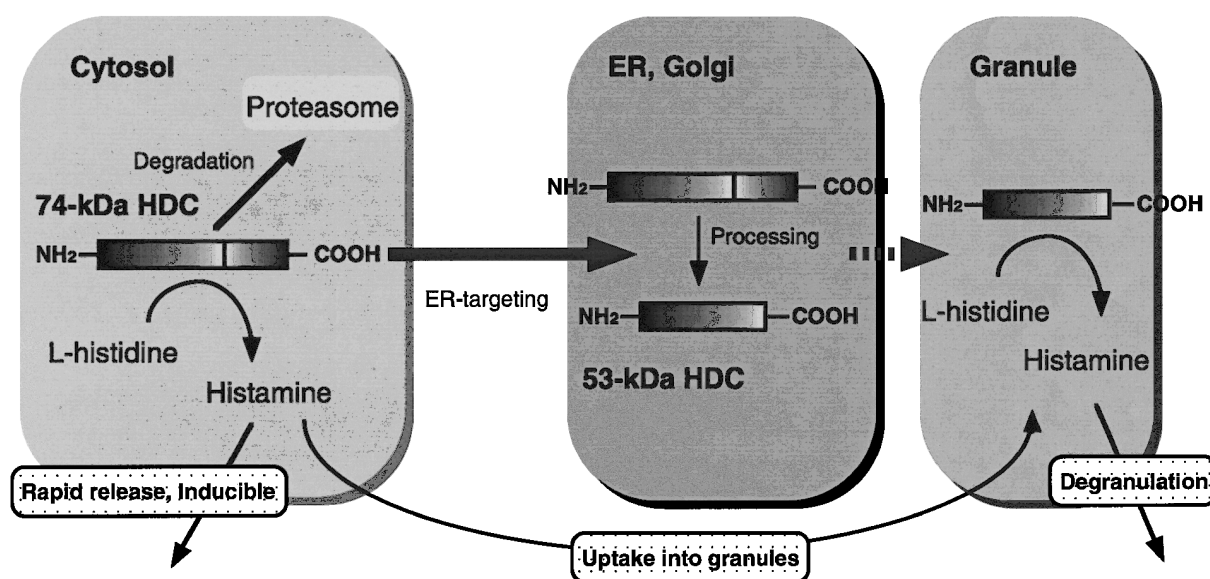


Fig. 1. Intracellular Localization of HDC in Mast Cells

This figure presents a proposed model for intracellular localization of HDC in mast cells. HDC is translated in the cytosol as a precursor, of which molecular weight is 74-kDa, and then targeted to the ER, in which the posttranslational processing of HDC occurs. Histamine is synthesized in the two compartments of mast cells, cytosol and granules. The 74-kDa precursor form was also found to be degraded through ubiquitin-proteasome pathway.

培養系ではマスト細胞は脱顆粒の起こらない無刺激の状態においても持続的にヒスタミン分泌を行うことはよく知られているが、著者らはサイトゾルで合成されるヒスタミンの代謝回転は非常に速く、顆粒に貯留されずに速やかに分泌されるという可能性を想定している。近年、マクロファージ細胞株において小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤であるタブシガージン処理により一過性の HDC 誘導が起こること、またその際には 74-kDa 分子種が主として誘導されていることが報告されている。⁹⁾ マクロファージにおける誘導性のヒスタミン産生では細胞内への貯留はほとんど観察されず、合成されたヒスタミンは直ちに細胞外へと放出されることから、この報告は著者らの仮説を支持するものである。また顆粒画分のヒスタミン合成は、ヒスタミンがマスト細胞の顆粒に蓄積することを考慮すると合理的な局在であるが、基質であるヒスチジンはどのように顆粒内へ取り込まれ、またそれはどのように調節されているかなど多くの未解決な点が残されている。サイトゾルから顆粒内へのヒスタミン取り込みに関しては、発現する細胞が HDC とほぼ一致していること、他のモノアミンと比較すると大きい K_m ながらも *in vitro* の実験系ではヒスタミンを取り込む能力を有することなどから、vesicular monoamine transport (VMAT-2) の関与が提案されている。しかしながら、他の基質アミンの取り込みがレゼルピンで強く抑制されるのに対して、ヒスタミン取り込みは抑制されないことなど細胞内でヒスタミンが VMAT-2 を介して顆粒に蓄積されているかどうかに関しては議論の余地がある。今後さらに HDC の顆粒における局在性を詳細に検討することにより、ヒスタミンの顆粒への貯留機構が明らかになることが予想される。

HDC のプロセッシングを司るプロテアーゼに関しては未だ明らかではない。著者らはマウスに断続的に寒冷ストレスを加えることにより胃の HDC 活性が上昇することを見出し、この際に *in vitro* 翻訳系で調製した 74-kDa 分子種を 53-kDa 分子種へと変換するプロテアーゼ活性が誘導されることを見出している。¹⁰⁾ その後、組換え体の 74-kDa HDC 分子種を 53-kDa 分子種にする活性を指標に P-815 細胞からプロセッシング酵素の精製を行い、分子量約 40-kDa のセリンプロテアーゼを見出しているが、一次配列の同定には至っていない。¹¹⁾

3. マスト細胞における IgE 感作時のヒスタミン合成誘導機構

花粉症やアトピー性皮膚炎に代表される慢性アレルギーは先進国において増加の一途をたどっており、効果的な治療法の開発が望まれている。こうした疾患の発症メカニズムは未だ明らかではないが、1つの特徴として多くの場合、患者の血中 IgE 濃度が健常者の 10 倍から 100 倍以上にも達することが挙げられる。マスト細胞はその細胞膜表面に高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) を発現しており、組織に分布するマスト細胞はその表面に IgE を結合した状態で存在することが知られている。マスト細胞は皮膚や粘膜といった外環境との接点に分布し、いち早くバクテリアや寄生虫、異物の侵入に応答し、脱顆粒による炎症性メディエーターの放出、脂質メディエーター及びサイトカイン、ケモカインの産生を通じてその後の免疫応答を活性化させる役割を持っている。¹²⁾ 従来の研究からは、こうしたマスト細胞の活性化は特異抗原が IgE を介して受容体を架橋することにより初めて起こると考えられており、そのシグナル伝達機構に関しても詳細な解析が行われている。しかしながら、近年マスト細胞に IgE が結合する感作のステップにおいても、抗原抗体反応とは別のタイプの活性化が引き起こされる可能性が指摘されている。例えば、IgE 添加により数時間後から数日後にかけて FcεRI 分子のアップレギュレーションが起こること、¹³⁾ またインターロイキン (IL)-3 依存性骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) を用いた解析では、IL-3 除去により引き起こされるアポトーシスの抑制、¹⁴⁾ IL-6 を初めとするサイトカイン産生の亢進、¹⁵⁾ といった報告がある。著者らはこうした報告と同時期に、マウス BMMC において IgE 添加により顕著なヒスタミン合成の誘導が起こることを見出した。¹⁶⁾ この応答は HDC の転写レベルで起こっており、刺激後 6 時間をピークとする一過性の酵素活性の上昇が確認された。BMMC の細胞内ヒスタミン含量は刺激後 12 時間で約 4 倍に達し、その後もそのレベルは維持された。酵素活性の上昇は、IgE の濃度にして 1 μg/ml から有意に観察され、3 μg/ml から 10 μg/ml でプラトーレベルに達した。この濃度はマウスの血中 IgE 濃度の約 10 倍程度の範囲の値であり、慢性アレルギー病態形成時には十分到達し得る範囲の濃度であると考え

られる。また HDC の転写レベルでの誘導は緩衝液中でも観察されることから血清依存性はないと考えられるが、緩衝液中のカルシウムイオンを除くことにより誘導は完全に抑制された。さらに BMMC に IgE を添加することにより持続的なカルシウム流入が観察され、この流入が直接 HDC の誘導に関与するものと考えられた。IgE 添加によるカルシウム流入はホスホリパーゼ C 阻害剤である U73122 により抑制され、抗原抗体反応と同様にイノシトールリン脂質代謝がシグナル伝達機構の上で重要であることが推察された。カルシウムシグナルの重要性は、タブシガージン処理やカルシウムイオノフォアである A23187 処理により IgE 添加に匹敵する HDC の誘導が起こることによっても確認された。しかしながら、IgE 感作では抗原抗体反応とは異なり脱顆粒やアラキドン酸代謝物の遊離等は観察されない。そこで FcεRI の β 鎖と結合した状態で存在し、抗原抗体反応の際に速やかに活性化するチロシンキナーゼである Lyn の活性化を *in vitro* kinase assay により検討した。その結果、抗原抗体反応とは異なり IgE 感作では Lyn の自己リン酸化は起こっておらず、Lyn を経由するシグナル伝達経路は関与しないことが推察された。他のグループの報告では IgE 感作により、MAP キナーゼや p38 MAP キナーゼといったリン酸化酵素を含むシグナルカスケードが活性化していることが示されている。^{14,15)} そこで種々のリン酸化酵素阻害剤を用いて IgE による HDC 誘導に対する効果を検討したところ、HDC 誘導は MAP キナーゼカスケード関連の阻害剤では全く阻害されず、Gö6976 や H7, staurosporine といった一部のプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤や herbimycin A, PP2 といった Src ファミリーのチロシンキナーゼ阻害剤により有意に阻害されることが明らかとなった。PKC に関しては PKC を活性化するホルボールエステル処理によっても HDC が誘導されることを確認している。現在のところ、IgE 感作により活性化するシグナル伝達機構の全貌は明らかではないが、抗原抗体反応と同様に多彩なシグナル経路の活性化が伴うことが推察される。BMMC は骨髓細胞を IL-3 存在下長期培養することにより得られる初代培養系であるが、その性質として未成熟なマスト細胞の特徴を反映する系と考えられている。マスト細胞の分化過程は後述するように不明な

点が数多く残されているが、今回得られた知見から、血中に存在すると仮定されているマスト細胞前駆体の細胞表面に IgE が結合する際に、この種の誘導反応が引き起こされる可能性が考えられる。慢性アレルギー病態形成時の IgE とマスト細胞活性化の仮説を図示した (Fig. 2)。特異抗原はマスト細胞の表面の IgE 受容体を架橋することにより脱顆粒を初めとする応答を誘導するが、慢性アレルギー病態においては血中 IgE 濃度が極端に高いために、感作期においても IgE 受容体の増加やヒスタミン含量の増加などの反応が抗原の有無と無関係に進行している可能性が考えられる。慢性アレルギーにおいて増加する IgE は必ずしも特異抗原に対する IgE が選択的に増加するのではなく、異なる抗原特異性の IgE クローンも同時に増加する。このような IgE 総量の増加が病態形成に果たす役割はこれまで明らかではなかったが、著者らの知見からは抗原の有無とは無関係に IgE の増加自身をアレルギーの増悪因子として捉えることができる。実際、IgE に対する中和抗体は血中 IgE の濃度を低下させ、予想以上の効果を現わしているが、¹⁷⁾ この効果の一端にも上記のメカニズムが関与する可能性がある。

4. HDC 欠損マウスを用いたヒスタミンの生理作用の解析

ヒスタミン生合成の個体レベルにおける生理的な重要性を明らかにする目的で、著者らは共同研究を通じてピリドキサル結合部位を含むエクソンを欠失させることにより、遺伝的に HDC の酵素活性を持たない変異マウスを作製した。¹⁸⁾ HDC 欠損マウスの種々の組織ではヒスタミン合成活性はほぼ検出レベル以下であったが、組織内ヒスタミン含量は極めて低いながらも測定可能であった。これは食餌中にヒスタミンを添加することによりさらに増加したことから、消化管から吸収され蓄積するものと推察された。著者らは低ヒスタミン食を用いてできるだけ組織ヒスタミン含量を測定限界以下に抑えることを試みたが、腸内細菌である乳酸菌等にも一次構造は異なるもののヒスタミン合成酵素が発現していることから、完全なヒスタミンフリーの状態に動物を置くことは不可能であった。HDC 欠損マウスは生殖、成長、外観上の顕著な異常はいずれも現在のところ観察されていないが、戻し交配を進めていると

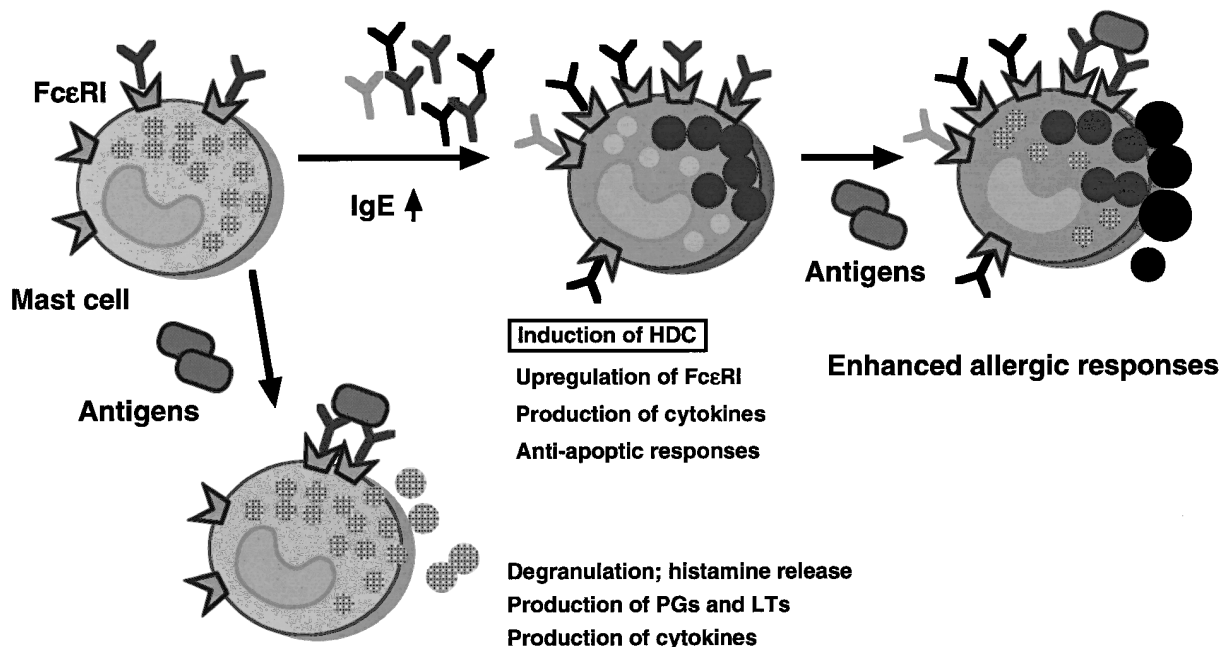


Fig. 2. IgE-Mediated Mast Cell Activation under Allergic Conditions

Tissue mast cells are usually found to be sensitized with IgE and cross-linking of the FcεRI receptors by specific antigens causes activation of the cells, such as degranulation, lipid mediator release, and cytokine production. On the other hand, sensitization with IgE has also been found to cause mast cell activation, such as up-regulation of the FcεRI receptors, cytokine production, and induction of HDC even in the absence of its specific antigens. These results suggest that high concentrations of IgE, which are often observed under chronic allergy, can enhance allergic responses even in the absence of its antigens.

ころであり、遺伝的背景が統一されることにより今後新たな表現型が見い出される可能性は残されている。

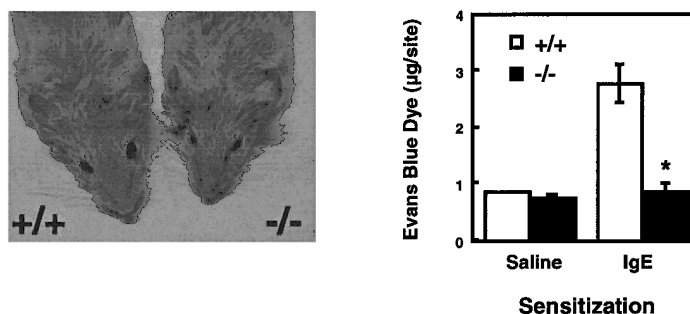
既に H₁ 受容体、H₂ 受容体欠損マウスは作製されており、^{19,20} それぞれあるいは両者を共に欠失させたマウスを用いて解析が進んでいる。またごく最近 H₃ 受容体欠損マウスも作製されている。²¹ HDC 欠損マウスの作製により、ヒスタミン合成が重要な意味を持つ生理応答を明らかにすることが可能となったのみならず、こうした受容体欠損マウスとの比較により新たなヒスタミン作用の発見も期待することができる。

4-1. 即時型アレルギーの解析 H₁ 受容体を介する即時型アレルギー反応はヒスタミンの関与する代表的な応答であるが、近年ではロイコトリエンや PAF (platelet activating factor) といった脂質メディエーターがこの作用に関与することが報告されている。そこで HDC 欠損マウスを用いて即時型アレルギー反応においてヒスタミンが必須であるかどうかを解析した。²² 背部皮内にヒスタミン、あるいは G タンパク質を介してマスト細胞の脱顆粒を引き起こすことが知られている塩基性ポリマーである

compound 48/80 を投与し、エバンスブルーを用いた色素漏出反応を指標に血管透過性の亢進を検討した。その結果、野生型、HDC 欠損マウスともにヒスタミンに対する血管透過性亢進応答は確認されたが、compound 48/80 による応答は欠損マウスで完全に消失することが明らかとなった。このことは欠損マウスでは H₁ 受容体を介する応答は損なわれていないものの、皮膚組織内のマスト細胞からヒスタミン遊離が起らないために compound 48/80 に対する応答が起らないものと考えられた。また IgE 依存性の即時型アレルギーモデルである受動皮膚アナフィラキシー反応 (Passive cutaneous anaphylaxis; PCA) はマスト細胞依存的な反応で、ヒスタミンが有力なメディエーターであると考えられている。そこで HDC 欠損マウスを用いて IgE 依存性の PCA 反応を確認したところ、色素漏出は全く観察されなかったことから、即時型アレルギー反応におけるヒスタミンの重要性が確認された (Fig. 3)。

こうした結果の解釈として当初はマスト細胞内にヒスタミンがないことが直接の原因であると考えられたが、後述するように組織マスト細胞において野生型と欠損マウス、両者において大きな形態学的相

IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis



Mast cells in HDC deficient mice

1. Decrease in tissue mast cell number (Skin, Peritoneal cavity)
2. Aberrant granule formation

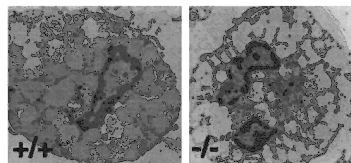


Fig. 3. Characterization of HDC Deficient Mice

A type I allergy model, IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis was not observed in HDC deficient mice, indicating that histamine is an essential mediator in type I allergy (upper panel). Furthermore, the number of mast cells was decreased and aberrant granule formation was observed in HDC deficient mice upon electron microscopic analyses (lower panel).

違があることが判明し、現在はヒスタミン以外のメディエーター産生等、マスト細胞の応答性に関するさらなる検討が必要と考えている。

4-2. 胃酸分泌機構の解析 胃酸分泌もまた即時型アレルギーと同様にヒスタミンが中心的な働きをする生理応答である。H₂アンタゴニストは強い胃酸分泌抑制効果を有しており、消化性潰瘍や逆流性食道炎の治療において現在も重要な位置を占めている。生理的な胃酸分泌においては、ヒスタミン以外に様々な酸分泌刺激因子が作用すると考えられているが、多くの酸分泌刺激因子は同時にヒスタミンの遊離、合成を促進する作用を有しており、それらの因子が単独で胃酸分泌にどのように関わるのかは解析が困難であった。またH₂アンタゴニストやプロトンポンプ阻害剤はいずれも優れた酸分泌抑制効果を持つが、投薬停止時にリバウンド現象として過剰な酸分泌を引き起こしやすいと言う欠点を持っている。そこでヒスタミン産生のないHDC欠損マウスを用いることにより、こうした問題点を解決するアプローチが得られるのではないかと考え、検討を加えた。²³⁾

HDC欠損マウスの基礎酸分泌は野生型に比べてわずかに低いものの無酸症ではなく、何らかの代償システムが働いていることが推察された。血中ガストリン濃度は酸分泌の低下を反映して、約3-4倍の高値を示しいわゆる高ガストリン血症を示した (Table 1)。刺激に応じた酸分泌では欠損マウスはヒスタミンに対して高い感受性、2倍程度の最大酸分泌量を示し、これは臨床で見られるリバウンド現象とよく一致していた。酸分泌刺激因子としてはヒスタミンの他にガストリン、アセチルコリン (ムスカリン神経系) の寄与が大きいことが知られている。ガストリン受容体CCK-B受容体はECL細胞、壁細胞の両方に発現しているが、HDC欠損マウスではガストリンによる酸分泌は全く観察されず、ガストリンの酸分泌刺激作用はECL細胞からのヒスタミン遊離に依存することが明らかとなった。一方、カルバコール刺激による酸分泌は野生型マウスでは二相性であり初期相はH₂アンタゴニストに非感受性であり、持続相はアンタゴニスト処理により強く抑制される。HDC欠損マウスでは初期相のみが維持される一方持続的な酸分泌は観察され

ず、 H_2 アンタゴニストの作用と良い一致を示した。ムスカリン受容体は ECL 細胞には M_1 受容体、壁細胞には M_3 受容体が発現していることが知られており、 M_3 受容体を介する壁細胞に対するムスカリン神経系の直接作用にはヒスタミンは関与しないと考えられる。こうしたムスカリン神経系、ガストリンとヒスタミンとの相関関係を図示した (Fig. 4)。このモデルは既に薬理実験、あるいは精製壁細胞等を用いた *in vitro* 解析を通じて推測されていたものであるが、個体レベルで刺激応答時の酸分泌におけるヒスタミンの役割を初めて明確に証明したものである。また HDC 欠損マウスにおけるヒスタミンに対する過剰な酸分泌応答はアトロピンに

より部分的に抑制され、CCK-B アンタゴニストにより影響を受けないことから、ムスカリン神経系の活動の亢進が欠損マウスにおけるヒスタミン作用の増強に関わる可能性が示唆された。HDC 欠損マウスはヒスタミン遊離を伴う酸分泌刺激因子の作用を解析する良いツールであり、またリバウンド現象のモデルとしても有用である。

ヒスタミンと胃酸分泌に関しては先に H_2 受容体欠損マウスのモデルが報告されており、酸分泌に関してはヒスタミンに対する応答を除けば概ね一致した表現型を示している。²⁰ 興味深いことにこのマウスでは加齢に伴い顕著な粘膜肥厚、過形成に伴うメネトリエ病様の組織変化が観察されている。HDC 欠損マウスでも高齢マウスにおいて同様の傾向は若干見受けられるが、 H_2 受容体欠損マウスほど顕著ではなく特徴的な空胞形成も見られない。ガストリンは胃粘膜の形成、成熟に重要な因子であるが、HDC 欠損マウスと H_2 受容体欠損マウスは同程度の高ガストリン血症であり、今後両者を比較することにより胃粘膜における細胞増殖に対するヒスタミンの作用が明らかになる可能性があり非常に興味深い。

4-3. マスト細胞の異常 即時型アレルギー、胃酸分泌はともにヒスタミンの作用としてはよく知られたものであるが、HDC 欠損マウスの解析から

Table 1. Comparison of Histamine Synthesis, Serum Gastrin, and Basal Acid Output between Wild Type and HDC Deficient Mice

	Wild type	HDC-KO
HDC activity (pmol/min/mg, n=4)	1.30±0.357	N.D.
Tissue histamine (μ g/g tissue, n=4)	12.4±1.42	N.D.
Serum gastrin (pg/ml, n=4)	100±24.5	302±31.2*
Basal acid output (μ molH ⁺ /15 min, n=40)	0.59±0.02	0.52±0.01*

* $p < 0.05$ by the Student's *t* test

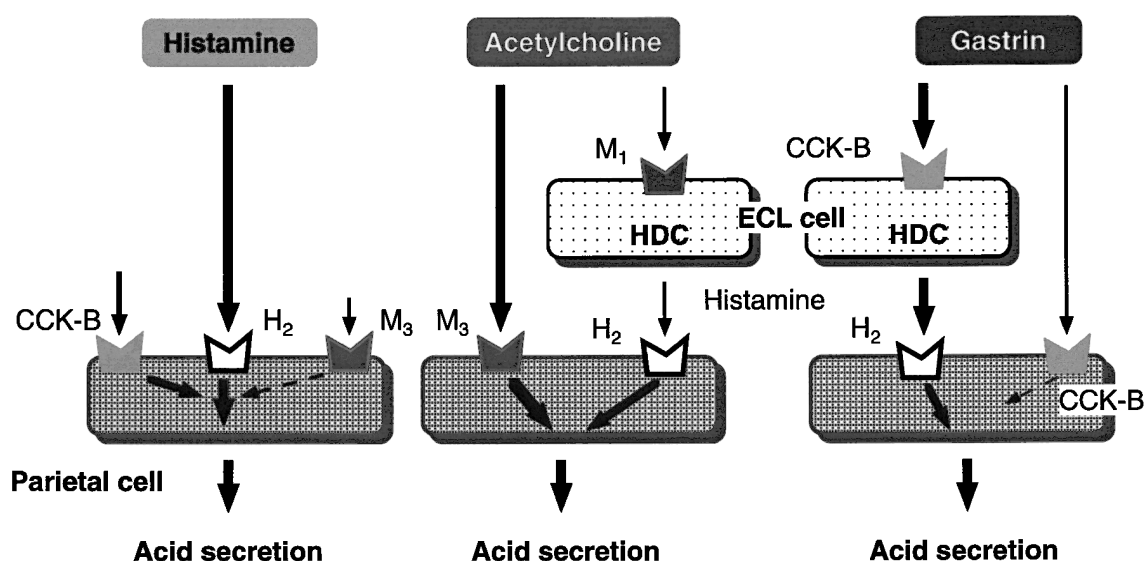


Fig. 4. Role of Histamine in Gastric Acid Secretion Induced by Muscarinic System or by Gastrin

Involvement of histamine in gastric acid secretion induced by muscarinic system and gastrin remained to be clarified *in vivo*, since acetylcholine and gastrin can act on both enterochromaffin-like cells (ECL cells) and parietal cells via their specific receptors. Analyses of induced acid secretion in HDC deficient mice have revealed that histamine is essential for acid secretion induced by gastrin, but not by muscarinic pathway.

組織内のマスト細胞に異常があることが判明した。¹⁸⁾ HDC 欠損マウスでは腹腔内、皮膚組織においてマスト細胞数が減少しており、またサフラニンで染色した際の染色性の顕著な低下が認められた。また電子顕微鏡により腹腔マスト細胞を観察したところ、顆粒内の電子密度の著しい低下が観察された。同様の顆粒形成の異常はヘパリン硫酸基転移酵素欠損マウスやチロシンキナーゼ Btk 欠損マウスでも報告されているが、その原因に関しては全く分かっていない。現在、マスト細胞の分化・増殖、さらには顆粒形成におけるヒスタミンの作用を明らかにすべく骨髄由来初代培養系を用いた解析を進めている。また腹腔マスト細胞を精製し、DNA アレイ解析を行い顆粒形成あるいは分化・成熟に関する遺伝子の同定に関しても検討中である。

5. 新たなヒスタミン作用の発見

5-1. 雄性生殖組織における HDC の発現

cDNA クローニングにより得られた情報をもとに HDC の組織分布を検討したところ、胃や腎臓とともに精巣において非常に高い HDC mRNA の発現が確認された。しかしながら、精巣における HDC の酵素活性は非常に低く、これまで精巣におけるヒスタミン合成に着目した報告は全くなかった。そこで *in situ* hybridization, 免疫組織化学的アプローチを行ったところ、HDC が精細管内腔に発現することを見出した。²⁴⁾ 雄性生殖細胞の分化・成熟過程では雄性生殖細胞の発現する c-kit (stem cell factor (SCF) 受容体) とセルトリ細胞の発現する SCF とを介した相互作用が必須であり、いずれかに障害のある個体雄は不妊であることが知られている。そこで c-kit に変異を有する W/W^V マウスを用いて、HDC の発現、酵素活性を検討したところ、いずれも全く検出されなかった。このことは HDC が雄性生殖細胞の分化途上において発現していることを間接的に示唆するものである。さらに共焦点観察により核染色と比較して解析を行ったところ、精子細胞の先体に HDC が発現していることが明らかとなった。先体は一種の顆粒であり内部には種々のプロテアーゼやリパーゼと言った加水分解酵素が大量に含まれている。受精において精子が卵の透明帯に到達した際に先体の脱顆粒(先体反応)が起こり、こうした酵素群が卵の周辺で作用することが受精の成立において重要であることが既に知られている。

実際に精子においてヒスタミン合成があることを確認するため、精巣上体尾部から精子を回収し、*in vitro* で培養し酵素活性を測定したところ、測定可能な HDC 活性を示しヒスタミンを含有することが明らかとなった。そこで回収した精子にカルシウムイオノフォアを添加することにより実験的な先体反応を行ったところ、約 30% のヒスタミン遊離を検出した。雄性生殖組織における組織ヒスタミン量や HDC 活性が非常に低いことから、これまでヒスタミン作用の報告はなかったが、実験的先体反応においてヒスタミン遊離が確認されたことから、受精段階においてヒスタミンは何らかの作用を有するものと考えられる。受け手であると考えられる卵におけるヒスタミン受容体の発現は不明であり、今後検討が必要である。

5-2. 腫瘍増殖におけるヒスタミンの作用 ヒスタミンと腫瘍増殖の関係に関しては古くから臨床報告があり、一部の腫瘍組織における高いレベルのヒスタミン産生や、H₂ アンタゴニストの抗癌剤との併用が一部の腫瘍に対しては有効であることが知られていた。しかしながら、その作用機構に関しては不明であり、実験的にも癌化した細胞そのものがヒスタミン産生能を有するケースや浸潤細胞によるヒスタミン合成と推測されるケースなど様々な例があり、それらが同じメカニズムなのかあるいは個々の例によってヒスタミンが異なる作用をするのかと言った点の理解は進んでいなかった。そこで著者らは Balb/c マウスに同系の腫瘍細胞でヒスタミン合成能を持たない CT-26 を移植する系を用いて、自然発生の腫瘍に近いモデルにおいてヒスタミンの作用を解析した。^{25,26)} このモデルでは CT-26 細胞移植後 2—3 日目から固形腫瘍の形成が確認され、経時的にそのサイズ、重量は増大した。一方、ヒスタミン合成は移植後 6, 7 日目に顕著に誘導され、その後も高いレベルのヒスタミン産生が確認された。*In situ* hybridization, 免疫組織化学的検討から腫瘍組織内の HDC 発現細胞は浸潤白血球、特に好中球であることが明らかとなった。そこで、ヒスタミンアンタゴニストを連日皮下投与し腫瘍サイズの変化を測定したところ、H₂ アンタゴニストであるシメチジンを低濃度 (0.12 mg/kg, 胃酸分泌抑制効果を示す濃度の約 100 分の 1) で投与することにより有意な腫瘍増殖抑制が観察された。²⁵⁾ また H₁ アンタゴ

ニストであるメピラミン、 H_3/H_4 アンタゴニストであるチオペラミドの投与は腫瘍増殖に対して影響を与えなかった。この際の腫瘍免疫の成立を評価するために、腫瘍組織内におけるサイトカイン mRNA の発現量を RNase protection 法により測定した。その結果、シメチジン投与群では LT- β , TNF- α , IFN- γ と言ったいずれも腫瘍増殖に対して抑制的に働くサイトカイン類の mRNA 発現が亢進していた。また HDC 欠損マウスではシメチジンの腫瘍増殖抑制効果は観察されず、 H_2 アゴニストであるディマプリットにより有意に腫瘍増殖が促進された。次にこの系におけるヒスタミンあるいはアゴニスト、アンタゴニストの作用部位を明らかにすることを目的として、HDC を安定発現させた CT-26 細胞を作製し HDC 欠損マウスに移植した。このモデルでは腫瘍局所において高いヒスタミン合成を確認することができるが、このマウスにシメチジンを連日投与したところ顕著な腫瘍増殖の抑制が観察され、移植後 2 週間以降では外見上ほとんど腫瘍組織を認めないレベルにまで至った。この際の腫瘍内サイトカイン mRNA 発現を測定したところ、対照群と比較して顕著な LT- β , TNF- α , IFN- γ mRNA 発現の亢進が認められた。²⁶⁾

以上の結果から、腫瘍組織内では好中球を中心とした浸潤白血球によりヒスタミンが産生され、それ

はリンパ球を初めとする免疫担当細胞の H_2 受容体を介して腫瘍免疫に対して抑制的に作用しているという可能性が考えられた (Fig. 5)。そのため H_2 アンタゴニストは腫瘍増殖に対して抑制的に作用するという結果が得られることが推察された。著者らは既に腹腔浸潤好中球に高い HDC の発現を見出しているが (投稿予定)、炎症・免疫応答において高いレベルのヒスタミン産生が起こる生理的意義に関しては未だ十分に明らかにされていない。今後、どのような刺激により HDC が誘導されるのか、あるいは産生されるヒスタミンはどのような作用を有するかに関して引き続き検討が必要である。

6. 今後の展望

著者らは HDC の精製、cDNA クローニングに端を発し、従来知見の少なかったヒスタミン合成に関して、その細胞内局在性、活性調節機構あるいはその作用と言った点に関して新たな知見を得た。そこで今後の展望に関して、最近の知見を交えつつ述べたい。

最近のヒスタミン研究におけるトピックとしてはまず H_1 , H_2 受容体を介したヘルパー T 応答の調節を挙げることができる。Jutel らはヘルパー T 細胞に発現する H_1 受容体は Th1 応答を増強する作用を有する一方、 H_2 受容体は Th1, Th2 両応答に抑制的に作用することを報告している。また Th1 タイ

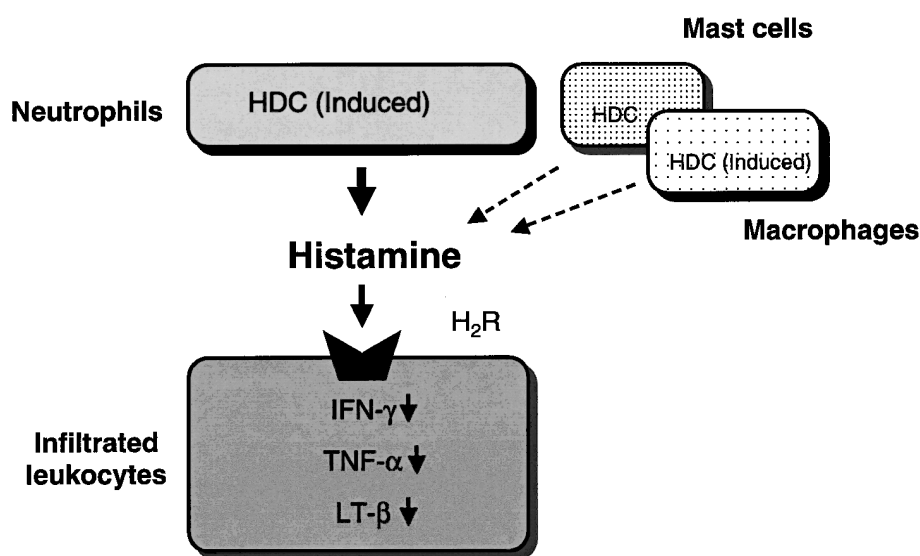


Fig. 5. Effects of Local Histamine on Tumor Immunity

In clinical trials, H_2 antagonists, such as cimetidine, have been reported to suppress tumor development. In an experimental tumor model, histamine was found to be produced largely by infiltrated neutrophils and cimetidine suppressed the tumor growth. Histamine was found to suppress intratumoral expression of anti-tumoral cytokine mRNAs, such as IFN- γ , TNF- α , and LT- β , via the H_2 receptors.

プのヘルパー T 細胞は H₁ 受容体を主要なヒスタミン受容体として発現しており、Th2 タイプは H₂ 受容体を主要なヒスタミン受容体として発現していることから、ヒスタミンは免疫応答を Th1 に誘導する作用を持つことが提唱されている。²⁷⁾ 一方、Mazzoni らは樹状細胞に着目し、未成熟な樹状細胞には H₁ 及び H₂ 両受容体が発現していること、ヒスタミンは H₂ 受容体を介して IL-10 産生を増大させ、IL-12 産生を減少させることにより Th2 タイプの免疫応答を誘導することを示している。²⁸⁾ 同様の結果は Caron らによっても報告されている。²⁹⁾ こうした報告は相互に矛盾する訳ではないが、最終的な Th バイアスの傾向は異なっておりヒスタミンの持つ複雑な免疫調節作用を反映するものと考えられる。また重要な点としては、いずれの実験においてもヒスタミンは培養系に添加することにより評価されており、こうした免疫応答の調節に関与する内在性のヒスタミンはどの細胞種によっていつ産生されるかが明らかではないことが挙げられる。著者らは好中球やマクロファージといった細胞種における誘導性のヒスタミン産生に注目しているが、マスト細胞、好塩基球の関与の可能性も残されている。著者らの腫瘍モデルは H₂ 受容体を介する Th1 タイプの免疫応答に対する抑制作用が強く表れていると考えられるが、*in vivo* におけるヒスタミンの免疫応答調節作用を検討した報告は未だ数少ないことから、両者のモデルに関して今後さらに検証していく必要がある。ごく最近の報告としては、H₁ 受容体遺伝子が自己免疫疾患の原因遺伝子の 1 つであり、H₁ 受容体欠損マウスは自己免疫疾患モデルに対して抵抗性を持つと言うことが明らかにされており興味深い。³⁰⁾

最近のトピックとしては中枢における H₃ 受容体の作用あるいは覚醒メカニズムにおけるヒスタミンの作用に関しても注目が集まっている。H₃ 受容体アンタゴニストはアルツハイマー病や注意欠陥過活動性障害 (ADHD) に有効な治療法として現在臨床応用が進められている。また近年、オレキシンによる覚醒機構の下流に H₁ 受容体が関与することが H₁ 受容体欠損マウスを用いて明らかにされた。³¹⁾ 中枢では比較的速いヒスタミンの代謝が報告されており、ニューロンにおけるヒスタミン合成、HDC 発現の調節機構は興味深いテーマである。しかしな

がら現在このテーマに注力しているグループはなく、今後の検討が必要である。

H₃ 受容体は薬理的な同定からその cDNA クローニングまで 15 年を要している。³²⁾ これは H₃ 受容体の一次構造が既にクローニングされていた H₁ あるいは H₂ と言った受容体のいずれとも類似していなかったことが一因であり、H₃ 受容体は長い間オーファン受容体であった。また H₃ 受容体の cDNA クローニングに引き続いて H₃ と 40% 程度のホモロジーを有する H₄ 受容体のクローニングが行われた。³³⁾ ペプチド性リガンドの受容体と比較すると、低分子生理活性物質の受容体では受容体アイソタイプ間でホモロジーが低い、あるいはほとんどない進化的にも独立した遺伝子であるケースがあり、新たな受容体の発見とともにリガンドの新たな生理作用が見い出されることがある。ヒスタミンに関しても H₄ 受容体は薬理的には全く予想されていなかった受容体であり、これをきっかけにヒスタミンの新たな作用が見い出される可能性がある。

著者らの興味深い発見として HDC 欠損マウスにおけるマスト細胞数の減少、顆粒形成の異常が挙げられる。マスト細胞は骨髄の造血幹細胞に起源を有し、組織に浸潤し分化すると考えられているがその詳細に関しては明らかではない。造血幹細胞が分布する骨髄や胎仔肝と言った造血組織ではヒスタミン合成が盛んに行われていることが知られているが、その生理的意義は明らかにされていない。著者らは骨髄細胞には H₁, H₂, H₄ 受容体が発現していることを見出ししているが、これらが骨髄細胞の機能にどのように関与するかはやはり不明である。最近クローニングされた H₄ 受容体の組織分布は特異であり、骨髄に特に高い発現が認められている。こうした知見を併せて考慮するとマスト細胞を含む血球系細胞の分化・増殖といった相においてヒスタミンが何らかの作用を有している可能性は十分あり得るように思われる。骨髄、あるいは胎仔肝といった造血組織におけるヒスタミン合成は今後の魅力あるテーマとして検討していく予定である。

謝辞 本総説で述べた著者の研究はすべて、京都大学大学院薬学研究科生体情報制御学分野 (旧衛生化学講座) で行われたものであり、ご指導いただきました市川 厚教授に深く感謝いたします。また

研究室のみなさまのご協力に厚く感謝申し上げます。さらに学外の共同研究者の方々のご協力に深甚の謝意を表します。本研究の一部は文部科学省科学研究助成金により行われたものであり、併せて感謝致します。

REFERENCES

- 1) Ohmori E., Fukui T., Imanishi N., Yatsunami K., Ichikawa A., *J. Biochem.*, **107**, 834–839 (1990).
- 2) Yamamoto J., Yatsunami K., Ohmori E., Sugimoto Y., Fukui T., Katayama T., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **276**, 214–218 (1990).
- 3) Yamamoto J., Fukui T., Suzuki K., Tanaka S., Yatsunami K., Ichikawa A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1216**, 431–440 (1993).
- 4) Tanaka S., Fukui T., Yamamoto J., Shima Y., Kume T., Ohgo M., Ichikawa A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1253**, 9–12 (1995).
- 5) Asahara M., Musiaki S., Shimada S., Fukui H., Kinoshita Y., Kawanami C., Watanabe T., Tanaka S., Ichikawa A., Uchiyama Y., Narushima Y., Takasawa S., Okamoto H., Tohyama M., Chiba T., *Gastroenterology*, **111**, 45–55 (1996).
- 6) Tanaka S., Nemoto K., Yamamura E., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 8177–8182 (1998).
- 7) Suzuki S., Tanaka S., Nemoto K., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **437**, 44–48 (1998).
- 8) Tanaka S., Nemoto K., Yamamura E., Ohmura S., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **417**, 203–207 (1997).
- 9) Hirasawa N., Murakami A., Ohuchi K., *Eur. J. Pharmacol.*, **418**, 23–28 (2001).
- 10) Tanaka S., Funakoshi E., Kawahara A., Nemoto K., Fukui T., Suzuki T., Igarashi K., Ichikawa A., *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **17**, 25–29 (1995).
- 11) Ichikawa A., Funakoshi E., Tanaka S., Nemoto K., Fukui T., *Inflamm. Res.*, **47**, S46–S47 (1998).
- 12) Review; Metcalfe D. D., Baram D., Mekori Y. A., *Physiol. Rev.*, **77**, 1033–1079 (1997).
- 13) Yamaguchi M., Lantz C. S., Oettgen H. C., Katona I. M., Flemming T., Yano K., Miyajima I., Kinet J-P., Galli S. J., *J. Exp. Med.*, **185**, 663–672 (1997).
- 14) Asai K., Kitaura J., Kawakami Y., Yamagata N., Tsai M., Carbone D. P., Liu S. J., Kawakami T., *Immunity*, **14**, 791–800 (2001).
- 15) Kalensnikoff J., Huber M., Lam V., Damen J. E., Zhang J., Shiraganian R. P., Krystal G., *Immunity*, **14**, 801–811 (2001).
- 16) Tanaka S., Takasu Y., Mikura S., Satoh N., Ichikawa A., *J. Exp. Med.*, **196**, 229–235 (2002).
- 17) Review; MacGlashan D. Jr., *Clin. Allergy Immunol.*, **16**, 519–532 (2002).
- 18) Ohtsu H., Tanaka S., Terui T., Hori Y., Makabe-Kobayashi Y., Pejler G., Tchougounova E., Hellman L., Gertsenstein M., Hirasawa N., Sakurai E., Buzas E., Kovacs 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.*, **502**, 53–56 (2001).
- 19) Inoue I., Yanai K., Kitamura D., Taniuchi I., Kobayashi T., Niimura K., Watanabe T., Watanabe T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13316–13320 (1996).
- 20) Kobayashi T., Tonai S., Ishihara Y., Koga R., Okabe S., Watanabe T., *J. Clin. Invest.*, **105**, 1741–1749 (2000).
- 21) Toyota H., Dugovic C., Koehl M., Laposky A. D., Weber C., Ngo K., Wu Y., Lee D. H., Yanai K., Sakurai E., Watanabe T., Liu C., Chen J., Barbier A. J., Turek F. W., Fung-Leung W., Lovenberg T. W., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 389–397 (2002).
- 22) 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., *Eur. J. Immunol.*, **32**, 1698–1708 (2002).
- 23) Tanaka S., Hamada K., Yamada N., Sugita Y., Tonai S., Hunyady B., Palkovits M., Falus A., Watanabe T., Okabe S., Ohtsu H., Ichikawa A., Nagy A., *Gastroenterology*, **122**, 145–155 (2002).
- 24) Safina F., Tanaka S., Inagaki M., Tsuboi K., Sugimoto Y., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **277**, 14211–14215 (2002).
- 25) Takahashi K., Tanaka S., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 1113–

- 1119 (2001).
- 26) Takahashi K., Tanaka S., Furuta K., Ichikawa A., *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **297**, 1205–1210 (2002).
- 27) Jutel M., Watanabe T., Klunker S., Akdis M., Thomet O. A., Malolepszy J., Zak–Nejmark T., Koga R., Kobayashi T., Blaser K., Akdis C. A., *Nature*, **413**, 420–425 (2001).
- 28) Mazzoni A., Young H. A., Spitzer J. H., Visintin A., Segal D. M., *J. Clin. Invest.*, **108**, 1865–1873 (2001).
- 29) Caron G., Delneste Y., Roelandts E., Duez C., Bonnefoy J. Y., Pestel J., Jeannin P., *J. Immunol.*, **167**, 3682–3686 (2001).
- 30) Ma R. Z., Gao J., Meeker N. D., Fillmore P. D., Tung K. S. K., Watanabe T., Zachary J. F., Offner H., Blankenhorn E. P., Teuscher C., *Science*, **297**, 620–623 (2002).
- 31) Huang Z., Qu W., Li W., Mochizuki T., Eguchi N., Watanabe T., Urade Y., Hayaishi O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 9965–9970 (2001).
- 32) Lovenberg T. W., Roland B. L., Wilson S. J., Jiang X., Pyati J., Huvar A., Jackson M. R., Erlander M. G., *Mol. Pharmacol.*, **55**, 1101–1107 (1999).
- 33) Oda T., Morikawa N., Saito Y., Masuho Y., Matsumoto S., *J. Biol. Chem.*, **275**, 36781–36786 (2000).