

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08904

研究課題名(和文) REV-ERBアゴニストによる 型アレルギー反応抑制機序の解析

研究課題名(英文) A putative REE-ERB agonist SR9009 inhibits IgE-mediated mast cell activation

研究代表者

石丸 かよ子 (Ishimaru, Kayoko)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：10710353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患では1日のある特定の時間帯に症状が出現、悪化することがよく知られている。しかしながらその生物学的起案は不明であった。研究代表者らは、私たちの生理活動の日内リズムを司る時計遺伝子の1つであるREV-ERBがアレルギー反応の形成に重要であることを本研究で明らかにした。特にREV-ERBを活性化する化合物がアレルギー反応を顕著に抑制することを見出した。REV-ERBを活性化する化合物は肥満や癌に対する治療薬としても期待されており、アレルギー疾患以外にも有用性をもつ夢のようなアレルギー創薬に繋がる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の3人に1人が花粉症や喘息、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎などの何らかのアレルギー疾患に罹患しており、その治療法の開発は医学だけでなく社会的課題である。しかしながら現在の抗アレルギー薬のほぼ全てが対症療法薬であり根本的かつ新しい治療法が望まれている。本研究で研究代表者らは、私たちの生理活動の日内リズムを司る体内時計の構成要素である時計遺伝子を標的とすることがアレルギー創薬に繋がることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The cell-autonomous circadian clock regulates IgE- and IL-33-mediated mast cell activation, both of which are key events in the development of allergic diseases. Accordingly, clock modifiers could be used to treat allergic diseases, as well as many other circadian-related diseases, such as sleep and metabolic disorders. The nuclear receptors REV-ERB- and - (REV-ERBs) are crucial components of the circadian clockwork. Efforts to pharmacologically target REV-ERBs using putatively specific synthetic agonists, particularly SR9009, have yielded beneficial effects on sleep and metabolism. Here, we found that bone marrow-derived mast cells (BMMCs) obtained from wild-type mice expressed REV-ERBs. SR9009, a REV-ERB agonist, inhibited IgE- and IL-33-mediated mast cell activation in wild-type BMMCs in association with inhibition of Gab2/PI3K and NF- $\kappa$ B activation. Thus, SR9009 or other synthetic REV-ERB agonists may have potential for anti-allergic agents.

研究分野：アレルギー

キーワード：マスト細胞 時計遺伝子 アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

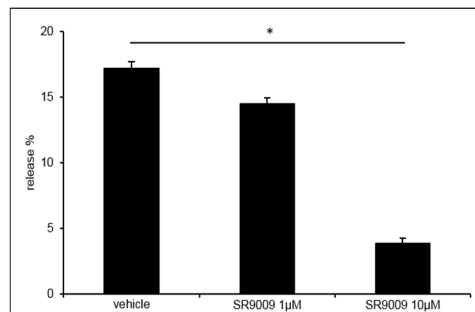
## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の症状は1日うちのある特定の時間帯が起りやすい。花粉症では早朝にくしゃみや鼻水、鼻閉などの症状悪化が見られ(「モーニングアタック」)、喘息発作は深夜に、慢性特発性蕁麻疹は夕方に頻発する。しかしながらそのメカニズムは長らく不明だった。

地球上のほぼすべての生物は、概日時計(時計遺伝子)によって生理活動に24時間周期性のリズム(睡眠覚醒、体温、血圧など)を生み、地球の自転に伴う環境変化に適応し進化してきた。研究代表者らは、近年、時計遺伝子がIgE受容体刺激によるマスト細胞の脱顆粒(I型アレルギー反応)を強く制御していることを明らかにした(J Allergy Clin Immunol [Review] 2018;142:1021)。具体的には、概日時計の主たる構成因子の1つである時計遺伝子ClockがIgE受容体鎖のプロモーター領域に結合し遺伝子発現を時間依存的に調節することでアレルギーに対するマスト細胞の脱顆粒反応に概日リズムを生じさせていた(J Allergy Clin Immunol 2014;133:568)。このメカニズムがアレルギー疾患の症状が特定の時間帯に起こりやすいことの一因であると推測される。

これらの研究過程で、概日時計リズムの安定性に寄与している時計遺伝子であるREV-ERBのアゴニスト(SR9009)(Nature 2012;485:62)がI型アレルギー反応を顕著に抑制することを偶然見出した(図1)。しかしながら、REV-ERBとマスト細胞のIgE受容体シグナルとの関係はこれまで全く報告されておらず全く不明であった。

図1: SR9009による脱顆粒抑制(\* p<0.05)



## 2. 研究の目的

REV-ERBのI型アレルギー反応における役割を本研究で解明する。

## 3. 研究の方法

### [1] REV-ERBアゴニストSR9009がI型アレルギー反応を抑制する機序の解析

SR9009はIgE刺激によるマウス骨髄由来マスト細胞(bone marrow-derived mast cells: BMMCs)の脱顆粒反応(ヘキソサミダーゼ・ヒスタミン放出、細胞表面へのCD63分子発現誘導)を抑制するか否かについて確認する。

その後、抑制メカニズムを明らかにするために、

- 1)ウエスタンブロット法によってIgE受容体刺激後のマスト細胞(BMMCs)内シグナル分子(Syk, Lyn, Gab2, ERKs, PI3K/AKT, NF-kB, SHIP等)の活性化(リン酸化および脱リン酸化)状態についてSR9009刺激の有無で比較検討する。
- 2)Flow cytometryを用いて細胞内カルシウム濃度定量を行いIgE受容体刺激後のマスト細胞(BMMCs)内のカルシウムシグナル状態についてSR9009刺激の有無で検討する。

- 3) レポータープラスミドをマスト細胞 (BMMCs) に導入し IgE 受容体刺激後のマスト細胞内での NF- $\kappa$ B 経路や MAPK 経路活性化に対する SR9009 刺激の効果について検討する。
- 4) *Clock* 変異マウスまたは *Bmal1* 欠損マウスから BMMCs を作成し、機能的な概日時計の有無が SR9009 刺激による IgE シグナル抑制に影響するか否かマスト細胞の脱顆粒反応、細胞内シグナル分子活性化 (リン酸化) 等を指標として上記 1-3) の方法で検討する。

これらの実験から SR9009 が (REV-ERB 活性化を介して) どのレベルで IgE 受容体細胞内シグナル経路を抑制しているかが明らかになる。また SR9009 の作用が、概日時計機能を介したのか REV-ERB が持つ非概日時計関連機能によるものであるかを明らかにできる。

#### 4. 研究成果

SR9009 は IgE 刺激によるマウス骨髄由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cells: BMMCs) の脱顆粒反応 (ヘキソサミダーゼ・ヒスタミン放出、細胞表面への CD63 分子発現誘導) を抑制した。さらに SR9009 は Gab2 および p65 の活性化を抑制した。よって SR9009 はそれらの IgE 受容体の細胞内シグナル経路を抑制し IgE による脱顆粒を阻害することが示唆された。また、時計遺伝子 *Clock* 変異 BMMCs においても SR9009 は IgE による脱顆粒反応を抑制したことから、SR9009 の抑制機序に概日時計機能は関与しないことが示唆された。これらの結果は、学術誌 *Int J Mol Med* (IF4.101) に投稿し受理された (Ishimaru K. et al. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 14;20(24):6320.)。

しかしながら、SR9009 が I 型アレルギー反応を抑制する詳細な分子メカニズムは未だ不明であり、SR9009 をはじめとする REV-ERB アゴニストをアレルギー創薬に結び付けるに、それらの解明が不可欠である。今後はこの分子メカニズムの詳細についてさらに解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kayoko Ishimaru, Shotaro Nakajima, Guannan Yu, Yuki Nakamura, Atsuhito Nakao  | 4. 巻<br>20              |
| 2. 論文標題<br>The putatively specific synthetic REV-ARB agonist SR9009 inhibits IgE- and IL-33-mediated mast cell activation independently of the circadian clock. | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>6320 6031 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms20246320   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakajima S, Manita S, Yu G, Isihmarau K, Kono K, Kitamura K, Nakao A.                         | 4. 巻<br>75              |
| 2. 論文標題<br>Activation of the reward system ameliorates passive cutaneous anaphylactic reaction in mice. | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Allergy   | 6. 最初と最後の頁<br>3275 3279 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/all.14442  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura Y, Ishimaru K, Nakao A.  | 4. 巻<br>69            |
| 2. 論文標題<br>Time-restricted feeding in rest phase alters IgE/mast cell-mediated allergic reaction in mice. | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Allergology International   | 6. 最初と最後の頁<br>296 299 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.alit.2019.09.004   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|