

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590088

研究課題名(和文) アレルギー性疾患発症における時計遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Study on roles of circadian clock gene in allergic immune response

研究代表者

柏田 正樹 (KASHIWADA, MASAKI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20270639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性疾患の多くは、早朝に発症しやすい時間特異性があることが経験的に知られているが、なぜこのような時間特異性があるのかは不明である。本研究では、時計遺伝子NFIL3がアレルギー性疾患の発症にどのように関わっているか検討した。NFIL3遺伝子欠損マウスでは、炎症細胞の浸潤やサイトカインの産生など病態の悪化が認められた。また肥満細胞の分化にはNFIL3は必要ではないが、その機能発現にはNFIL3が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although many studies have indicated that allergic attack and symptoms were most severe in the early morning, the precise mechanisms by which the circadian clock regulates the time of day-dependent phenotypes in allergic reaction are still unknown. We investigated the roles of the circadian clock gene NFIL3 in the allergic immune responses using NFIL3-deficient mice. In NFIL3-deficient mice, enhanced infiltration of inflammatory cells and development of airway hyperresponsiveness were observed in a mouse asthma model. Ablation of NFIL3 expression limited mast cell functions including cytokine production but did not impact on the development of mast cells.

研究分野：免疫学・時間生物学

キーワード：時計遺伝子 アレルギー 喘息 肥満細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎のようなアレルギー性疾患の多くは、現在死因の上位にある癌、心疾患、脳血管疾患のように致命的な病気ではないが、日本人の3人に1人が罹患し、現実には気管支喘息で亡くなる人もいることから、恐ろしい病気であることには変わりない。またこれらの疾患の多くは経験的に、概日リズムを示すことが知られている。しかし概日リズムの制御に関与する遺伝子群が、実際にこれらの疾患の時間特異的発症に関与しているかどうかは未だ不明である。

私達は、アレルギー反応において中心的な役割を持つサイトカイン IL-4 による病態制御機構を解析している中で、IL-4 によって最も強く誘導される転写因子として時計遺伝子の一つ NFIL3 を同定した。NFIL3 は、睡眠や概日リズムを制御する時計遺伝子として、脳神経系、内分泌系、代謝系に広く機能すると考えられ、一群の時計遺伝子の転写、翻訳の振動ループの制御に関わり、それ自身の発現も 24 時間のリズムを示す。申請者は NFIL3 欠損マウス (KO マウス) の作成し、NFIL3 の免疫系における役割について、以下のことを明らかにしてきた。即ち、

- (1) IL-4 により誘導される IgE 定常部領域の転写 (germline transcription) を直接制御し、IgE クラススイッチを制御する (Kashiwada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。
- (2) Th2 細胞に強く発現し、IL-13 遺伝子の転写を直接負に制御する。また JunB を含む AP1 を介して間接的に IL-4 遺伝子の転写を正に制御する (Kashiwada et al., *EMBO J.* 2011)。
- (3) クロスプレゼンテーションを担う CD8 α ⁺ 樹状細胞の分化を制御する (Kashiwada et al., *Blood* 2011)。
- (4) 腸管マクロファージにおいて炎症性サイトカインの一つ IL-12 遺伝子の転写を直接制御し、ヒトとマウスの大腸炎発症に関与している (Kobayashi et al., *J. Immunol.* 2011)。
- (5) NK 細胞系列特異的な分化、機能を制御する。

興味深いことに、NFIL3 発現の日内変動と喘息発症の時間特異性には強い相関が見られる。さらに NFIL3 は IL-4 のみならず、炎症反応に関与する IL-3, IL-6, IL-10, IL-15 などのサイトカイン、その他にも成長ホルモンやインスリンなど多くのホルモンにより誘導され、様々な病態との関連性が指摘されている。これらの知見は、NFIL3 が広く免疫反応の制御に関与していることを示唆しており、申請者の作成した NFIL3 KO マウスは本研究を行う上で、有用なモデルとなると考えられる。

2. 研究の目的

喘息や鼻炎などのアレルギー性疾患は、早朝に発症しやすい時間特異性があることが経験的に知られているが、なぜこのような時間特異性があるのかは不明である。本研究では、時計遺伝子の一つ NFIL3 がアレルギー性疾患の発症制御にどのように関わっているのか、その分子機構を明らかにすることによって、発症時間の特異性に合わせた薬物の投与方法や新規治療薬の開発を目指した分子基盤を確立することを目的としている。具体的な目的は、以下のとおりである。

- (1) 喘息モデルによる NFIL3 欠損マウスの免疫反応性と気道炎症の解析
- (2) 肥満細胞における NFIL3 の機能解析

3. 研究の方法

- (1) 喘息発症における NFIL3 の機能解析

NFIL3 KO マウスでは、Th2 細胞における IL-13、IL-5 の産生亢進などが見られたことから、NFIL3 がアレルギー性喘息発症あるいはその症状悪化に関与している可能性がある。そこで NFIL3 KO マウスの喘息モデルにおける表現型を解析し、NFIL3 の喘息発症における役割を明らかにする。以下の実験により、NFIL3 がどの細胞で、どのように喘息発症に関わっているかが明らかとなる。

抗原として卵白アルブミン (OVA) と Alum を腹腔内投与し、追加免疫、さらに気道感作を 2 度行う。感作マウスについて、野生型 (WT) マウス及び非免疫群と共に、以下の点について解析する。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) における浸潤免疫細胞数を測定する。

BALF におけるサイトカインおよびケモカイン濃度、及び BALF 細胞におけるそれら遺伝子の発現量を測定する。

肺組織における浸潤細胞を組織学的に解析する。

気道粘液の分泌、杯細胞過形成を組織染色により解析する。

ベンチレーターを用いて、メタコリン刺激による非特異的気道過敏性の亢進程度を評価する。

縦隔リンパ節内の T 細胞によるサイトカイン産生量を測定する。

- (2) 肥満細胞の機能発現における NFIL3 の役割

これまで Th2 細胞において NFIL3 が Th2 サイトカイン遺伝子発現を制御していることを明らかにしたが、肥満細胞も Th2 サイトカインを産生し、さらに IL-6 や TNF- α など炎症性サイトカインを分泌する。そこで NFIL3 KO マウスにおける肥満細胞の分化、活性化状態を解析、肥満細胞による Th2 サイトカインの産生制御を解析する。

肥満細胞分化、活性化における NFIL3 の

役割

NFIL3 KO 骨髄細胞を IL-3 存在下培養し、肥満細胞 (BMMC) を誘導し、細胞内顆粒、形態、肥満細胞特異的遺伝子の発現を確認する。

常在性肥満細胞数を組織染色、あるいは FACS により比較する。

活性化肥満細胞における NFIL3 の機能解析として、IgE/DNP-HSA、IL-3 で刺激後のサイトカイン産生、及びそれらの mRNA 量を調べる。刺激後の脱顆粒反応をモニターする。

BMMC は IL-3 依存的に増殖し、その枯渇でアポトーシスを起こす。IL-3 依存的 B 細胞株では NFIL3 の強発現でアポトーシスのブロックが起こることから、NFIL3 は抗アポトーシス蛋白と考えられている。IL-3 依存的 BMMC の生存シグナルにおける NFIL3 の役割を調べるために、IL-3 枯渇後の NFIL3 欠損 BMMC のアポトーシスをモニターする。

サイトカインやケモカイン以外に、NFIL3 欠損により発現が変化し、肥満細胞の機能に影響を与えている分子を同定する。

4. 研究成果

1. 気道炎症における NFIL3 の役割解析

代表的なアレルギー疾患モデルである、マウスの気道炎症モデルを用い、NFIL3 の発現の有無が気道炎症の発症と病態にどのような影響を与えるか検討した。NFIL3 KO マウスでは、Th2 細胞における IL-13、IL-5 の産生が亢進しており、NFIL3 がアレルギー発症あるいはその症状の悪化に関与していると仮定した。常法により卵白アルブミン (OVA) と Alum を腹腔内投与し、気道感作を行った。感作マウスについて野生型 (WT) マウスとの比較により、以下のことを明らかにした。即ち NFIL3 KO マウスでは、

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好酸球数の上昇解析

BALF 中の Th2 サイトカイン濃度やケモカイン濃度の上昇解析

杯細胞過形成解析

気道粘液分泌量の上昇などが観察された。以上の結果から、時計遺伝子 NFIL3 がアレルギー疾患の発症あるいは症状の悪化に関与していることを明らかにした。

2. 肥満細胞における NFIL3 の役割

肥満細胞は抗原に反応し、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターを産生することによりその症状を悪化させるなど、アレルギー疾患の病態において非常に重要な役割を持っている。本研究では、肥満細胞の分化とその活性化における NFIL3 の役割を解析した。NFIL3 KO マウスと WT マウスの骨髄由来肥満細胞 (BMMC) について、以下のことを明らかにした。

NFIL3 KO マウス由来 BMMC においても、IL-3 存在下で WT と同様、4 週間程度で 98% 以上の細胞が c-kit⁺FcεR1α⁺ となった。即ち、IL-3

依存的 BMMC の分化には、NFIL3 の発現は必要でないことが明らかとなった。

BMMC は抗原刺激により様々なサイトカインを産生するが、KO と WT BMMC の比較により、Th2 サイトカインの産生には NFIL3 の明らかな関与が認められた。他の炎症性サイトカインやケモカインなどの遺伝子発現にも、KO と WT BMMC 間で差が認められた。即ち、BMMC においても Th2 細胞同様、NFIL3 は種々のサイトカイン遺伝子の発現制御に関わっていることを示す。

未刺激の BMMC において NFIL3 の発現量は、Th2 細胞のそれより弱い。抗原刺激や PMA/Ionomycin などの刺激により、強く誘導された。従って、アレルギー病態時のように炎症性サイトカインなどが多いときには、NFIL3 が誘導され、結果的に炎症反応の制御に関わっている可能性が示された。

以上の結果より、時計遺伝子 NFIL3 は、肥満細胞や Th2 細胞など様々な免疫細胞においてアレルギー性炎症の制御に強く関わっていることが示された。今後の課題として、in vivo における炎症制御に NFIL3 がどのようなメカニズムで機能するのか解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kobayashi, T., Steinbach, E.C., Russo, S.M., Matsuoka, K., Nochi, T., Maharshak, N., Borst, L.B., Hostager, B., Garcia-Martinez, J.V., Rothman, P.B., Kashiwada, M., Sheikh, S.Z., Murray, P.J. and Plevy, S.E.: NFIL3-deficient mice develop microbiota-dependent, IL-12/23-driven spontaneous colitis.: *J. Immunol.*, (査読有り), 192: 1918-1927 (2014), doi: 10.4049/jimmunol.1301819
2. Yu, X., Rollins, D., Ruhn, K.A., Stubblefield, J.J., Green, C.B., Kashiwada, M., Rothman, P.B., Takahashi, J.S. and Hooper, L.V.: TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock.: *Science*, (査読あり), 342: 727-730 (2013), doi: 10.1126/science.1243884
3. Qiu, X., Guo, G., Chen, K., Kashiwada, M., Druker, B.J., Rothman, P.B. and Chen, J.L.: A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis.: *Neoplasia*, (査読有り), 14: 547-558 (2012), doi:10.1596/neo.12230

〔学会発表〕(計 6件)

1. Yu, X.: NFIL3 suppresses Ror t transcription and links intestinal Th17 cell differentiation to the circadian clock network.: 78th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology; Immunity & Tolerance: 2013年5月29日~6月3日, Cold Spring Harbor (USA)
2. Yu, X.: NFIL3 suppresses Ror t transcription and links intestinal Th17 cell differentiation to the circadian clock network.: IMMUNOLOGY, 2013年5月3~7日, Honolulu (USA)
3. 柏田正樹: サイトカイン誘導性転写因子 NFIL3/E4BP4 による Th2 反応制御.: 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27 ~30 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. Kobayashi, T.: NFIL3 deficient mice develop severe innate immune mediated spontaneous colitis.: Digestive Disease Week (DDW), 2012 年 5 月 19~22 日, San Diego (USA)
5. Kashiwada, M.: Lineage-specific regulation of natural killer cell development and function by the transcription factor NFIL3/E4BP4.: Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Gene Expression & Signaling in the Immune System, 2012 年 4 月 24~28 日, Cold Spring Harbor (USA)
6. 柏田正樹: 転写因子 NFIL3/E4BP4 による NK 細胞系列特異的な分化、機能発現制御.: 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28~31 日, 北海道大学(北海道札幌市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏田 正樹 (KASHIWADA, Masaki)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20270639

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: