

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24591545
 研究課題名(和文) アレルギー発症増悪における体内時計遺伝子と環境相互の分子遺伝学的解析と臨床展開

 研究課題名(英文) Analysis of relationship between biological clock genes and environments for development of allergic diseases, and clinical application

 研究代表者
 近藤 直実 (kondo, naomi)

 岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授

 研究者番号：50124714

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は(1)アレルギー発症増悪のアレルギー免疫系遺伝子および体内時計遺伝子と環境の関係の解明と(2)それによる、アレルギーの画期的予防・治療法の確立である。

成果として、(1)体内時計遺伝子(主にCLOCK遺伝子)の発現の日内変動が明らかになった。また、アレルギー発症にブレーキをかけるIFN- γ 産生は、pHの環境により変動した。体内時計分子の精製を進めている。(2)画期的治療法の確立として、IL-18とIL-18受容体の結合様式が世界に先駆けて解明されたので、アレルギー患者に応用できるようにIL-18シグナル伝達系を調節する創薬などの開発に着手した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is (1) analysis of relationship among allergic genes and biological clock genes and environments, and (2) establishment of an epoch-making prevention and treatment for allergic diseases.

As results, (1) expressions of biological clock genes (eq. CLOCK gene) were changeable during day and night, and production of interferon (IFN)- γ that suppresses allergic reactions was suppressed by pH change. (2) The binding mode between interleukin (IL-18) and IL-18 receptor became clear, and then development of new medicines that are able to regulate IL-18 signaling was started for allergic diseases.

研究分野：小児、アレルギー

キーワード：体内時計遺伝子 アレルギー関連遺伝子 アレルギー発症 環境因子 テーラーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

近年、気管支喘息などアレルギー性疾患患者の急増が大きな社会問題になっている。遺伝的因子に加えて、日常環境と太陽光(概日リズム)、CO₂蓄積、温暖化、酸性雨など地球規模的環境の関与が推測される。従って、生態系の視野に立脚し、遺伝・環境相互の直接的関係の分子レベルでの解明に基づく適格な対策の確立が急務である。

2. 研究の目的

本研究の全体構想と目的は、次の如く極めてユニークで明解である。

- (1) アレルギー発症増悪のアレルギー免疫系遺伝子および体内時計遺伝子と環境の直接的相互関係の遺伝子分子レベルでの解明。
- (2) その解明に基づいた、アレルギーの画期的予防・治療法の確立(テラーメイド医療を含む)。

以上の成果を、アレルギーの独創的かつ先駆的な予防・治療法(テラーメイド医療を含む)の確立開発に応用・展開し、広く社会に貢献する。

具体的には、

- (1) 体内時計遺伝子群の生体における発現とアレルギー免疫系との関連の分子レベルでの解明およびアレルギー発症増悪における体内時計遺伝子の役割の解明
- (2) アレルギーを新たに系統的遺伝子学的に分類する
- (3) アレルギー発症増悪のアレルギー免疫系遺伝子分子および体内時計遺伝子と環境の直接的相互関係の解明
- (4) 以上の解明に基づいた、アレルギーの画期的予防・治療法の確立(テラーメイド医療を含む)

3. 研究の方法

- (1) 体内時計遺伝子群の生体における発現とアレルギー免疫系との関連の分子レベ

ルでの解明、およびアレルギー発症増悪における役割の解明。

日内環境における体内時計遺伝子群の生体における発現を、PCRを用いて明らかにする。このために種々の日内環境下での血球細胞のサンプリングを行う。

体内時計遺伝子群とアレルギー免疫系分子の関連を明らかにし、アレルギー発症増悪における役割を解明する。

- (2) アレルギー(アトピー)の病因遺伝子群を系統的、大局的に解明し、アレルギーの系統的遺伝子学的分類をすすめる。

- (3) アレルギー病因遺伝子群分子群および体内時計遺伝子群と環境因子・地球規模的環境因子との直接的関連の解明。リンパ球を、環境因子・地球規模的環境因子である pH、温度など種々の条件で刺激し、培養し、種々のサイトカイン(IFN- γ , IL-4, IL-12, IL-18 など)の産生の変化を明らかにする。

- (4) 解明されたアレルギーの病因遺伝子群と、体内時計遺伝子の構造生物学的解明(構造プロテオミクス)と機能異常との関連を解明し(構造機能相関)、テラーメイド治療予防法を開発する。明らかになった多病因遺伝子群と時計遺伝子群のコードするタンパクとその機能を分析する。明らかになった病因遺伝子などがコードするタンパクを構造生物学的に解析する。

- (5) 以上の成果を、アレルギーの画期的予防・治療法の確立(テラーメイド医療を含む)へ応用する。

遺伝子と抗アレルギー薬との関連の解析によるテラーメイド治療の試み。

IL-18遺伝子の調節領域および coding 領域の異常を分子遺伝学的及び構造生物学的に明らかにする。さらに IL-18、IL-18 レセプターの構造と完全な結合様式とそのシグナル伝達系を決定し、遺伝子異常などによりこのシグナル伝達系の異常なアレルギー患者に対するテラーメイド創薬の開発を進め

る。

4. 研究成果

(1) 日内環境における体内時計遺伝子群（主に CLOCK 遺伝子）の生体における発現を、PCR を用いて検討した結果、朝方 am4:00 では発現が低く、am10:00、pm4:00 には発現が高くなり、日内変動が示されたと共に、昼間時間帯の発現の重要性が示された。

(2) アレルギー発症増悪に関するアレルギー免疫系遺伝子の環境因子との関連において、喘息などアレルギー発症と関連する遺伝子として、IL12B C3757T、IL4R Val501Ie、IL13 Arg110Gln、TGF 1 T-509C、IFN- R1 L467P、LTC4S A-444C、IL-18 C-133G、CD14 T-159C、ADR 2 Arg16Gly、TLR 1・6・10 などあげられた。

以上などをもとに、新規にアレルギーの系統的遺伝子学的分類をさらに進めた。抗原（アレルゲン）認識部位、IgE 産生系と抑制系、メディエーター産生系、標的臓器の4つにおける遺伝子変化に整理分類できた。には HLA、TCR など、には IL-12、IFN-、IL-4R など、には LTC4S など、には ADAM33 などが含まれる。上述の IFN- はアレルギー発症抑制系に位置した。

(3) アレルギー発症にブレーキをかける IFN- の産生は、pH などの環境により変動した。

(4) 体内時計遺伝子の発現実験を進めた。カイコの発現系を用いた時計遺伝子蛋白の発現について、まず、時計遺伝子 (BMAL, CLOCK, CRY1) 発現ベクターの構築を行った。PCR 反応で増幅した断片を精製し、pFastBac1 にサブクローニングし、シークエンサーを用いて DNA 配列を確認した。

時計遺伝子については、さらにカイコでの発現系を進め、CLOCK 遺伝子タンパクなどがウエスタンブロットで確認されたので、現在、精製を進めている。

IL-18 のタンパク構造の解明に引き続いて、IL-18 と IL-18 受容体との結合様式が解明された。

(5) 上記の成果を応用して、アレルギー、喘息に対するテーラーメイド医療の確立をすすめた。遺伝子型に対応した抗アレルギー薬の有効性の検討がすすめられた。

IL-12 および IL-18 は、アレルギー患者で増加あるいは減少することが確認されているが、このうち IL-18 のシグナル伝達系の調節のために、今回明らかになった IL-18 と IL-18 受容体の結合様式を利用して、その伝達系を調節する創薬についての研究を開始した。

以上より 3 年間の本研究の成果として、(1)アレルギー発症増悪のアレルギー免疫系遺伝子および体内時計遺伝子と環境の直接的相互関係の遺伝子分子レベルでの解明として、体内時計遺伝子（主に CLOCK 遺伝子）の発現の日内変動が明らかになった。また、アレルギー発症にブレーキをかける IFN- 産生は、pH などの環境により変動した。体内時計遺伝子の精製を進めている。(2)アレルギーのテーラーメイド医療を含む画期的治療法の確立として、IL-18 と IL-18 受容体の結合様式が解明されたので、これを利用して、アレルギー患者の治療に応用できるように IL-18 シグナル伝達系を調節する創薬などの開発に着手した。

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5件)

Kondo N, Kuwabara M, Matsui E, Kodama H, Kumada M, Kondo K, Nagata T, Toida S, Mishina H, Iwasaki J, Matsuno Y, Furuta Y, Shinoda A, Yoshizaki S, Tanaka C, Akita A, Taguchi K, Hirano K,

Personalized Medicine for bronchial asthma and allergies、Personalized Medicine Universe、査読有、Vol. 3、2014、pp. 11-14

近藤直実、特集 アレルギー疾患における特異的抗体の意義。免疫学的側面 1. IgE 抗体産生のメカニズム：遺伝素因と環境の影響、アレルギー・免疫、査読無、Vol. 20、No. 1、2013、pp. 14 23

〔学会発表〕(計5件)

木村 豪、堤 尚孝、有田恭平、有吉眞理子、大西秀典、白川昌宏、近藤直実、枋尾豪人、加藤善一郎、アレルギー、自己免疫、自己炎症疾患治療薬に向けた IL-18 受容体高次複合体の構造解析、第 51 回日本小児アレルギー学会、平成 26 年 11 月 9 日、四日市都ホテル(三重県・四日市市)

桑原愛美、堀信宏、近藤直実、気管支喘息のテーラーメイド的予知と予防 Personalized prediction and prevention for bronchial asthma、第 19 回国際個別化医療学会学術集会、平成 26 年 11 月 15 日、御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター(東京都・千代田区)

近藤直実、食物アレルギー診療はまさに個別化医療、第 13 回食物アレルギー研究会、平成 25 年 1 月 27 日、昭和大学 旗の台キャンパス 上條講堂(東京都・品川区)

〔図書〕(計2件)

近藤直実、松井永子、診断と治療社、日常診療にすぐに活かせる 喘息・アレルギーのテーラーメイド治療、2013、196

〔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：
出願年月日：
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

近藤 直実 (KONDO Naomi)
岐阜大学・医学系研究科・名誉教授
研究者番号：50124714

(2) 研究分担者

加藤 善一郎 (KATO Zenichiro)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90303502

松井 永子 (MATSUI Eiko)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90334929

木村 豪 (KIMURA Takeshi)
岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60422705

(3)連携研究者

()

研究者番号：