

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860874

研究課題名(和文) Imiquimod 乾癬モデルマウスにおける体内時計の関与

研究課題名(英文) Circadian Gene Clock Regulates Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice

研究代表者

安藤 典子 (ANDO, Noriko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：90345710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物には24時間周期の概日リズムがある。概日リズムの分子的基盤として複数の時計遺伝子が同定され、24時間周期の振動を繰り返すことによって「体内時計」を形成する。私たちはイミキモド乾癬モデルをもちいて、gdT細胞のIL23 receptor (IL23R)が時計遺伝子Clockにより直接調整されていることを発見した。Clockの変異マウスは皮膚炎が抑制され、Period2の変異マウス(Period2はClockを抑制し、逆相関の関係にある)では増悪した。さらにクロマチン免疫沈降法ではCLOCKがIL23Rのプロモーター領域に結合しており、乾癬と体内時計のメカニズムにおける関連が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The mechanistic link between psoriasis and "the circadian clock," remains unclear. This study determined whether the core circadian gene, Clock, had a regulatory role in the development of psoriasis. We compared the development of psoriasis-like skin inflammation induced by imiquimod (IMQ) between wild-type mice and mice with a loss-of-function mutation of Clock. We also compared the development of dermatitis between wild-type mice and mice with a loss-of-function mutation of Period2 (Per2), another key circadian gene that inhibits CLOCK activity. We found that Clock mutation ameliorated IMQ-induced dermatitis, whereas the Per2 mutation exaggerated IMQ-induced dermatitis, when compared with wild-type mice associated with decreased or increased IL-23 receptor (IL-23R) expression in  $\gamma$  / + T cells, respectively. In addition, CLOCK directly bound to the promoter of IL-23R in  $\gamma$  / + T cells. These findings established a mechanistic link between psoriasis and the circadian clock.

研究分野：自己免疫

キーワード：circadian clock IL23R psoriasis imiquimod

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 尋常性乾癬(以下、乾癬)は後天性の皮膚角化症の1つであり皮膚角化細胞の増殖が異常に亢進し紅斑や鱗屑などの皮膚症状を呈する慢性疾患である。IL-17 や IL-22 を産生する Th17 細胞がこの疾患に重要な役割を果たしていると考えられているがその発症機序や病態、増悪因子およびその機序などは未だによく理解されていない。

(2) ヒトを含む哺乳類の生理現象には約 24 時間周期性(概日性)のリズムがあり、睡眠リズムや血圧・体温の日内変動などが代表的である。哺乳類は体内にそれらの生理的リズムを司る体内(概日)時計を持つ。時計遺伝子は哺乳類の体のほぼすべての細胞で概日性に発現、活性化し体内時計の分子基盤としてはたらいっている (Nat Rev Neurosci. 2013)。

(3) 最近、乾癬と体内時計との関係を示唆する報告がされた。夜勤の多い看護師では乾癬の発症率が高い (J Invest Dermatol. 2013)、また正常人で見られる夜間の血圧低下が乾癬患者では見られない (Wien Klin Wochenschr. 2012)との報告がある。さらに乾癬患者の重症度は、体内時計と密接な関連が明らかになっているメタボリックシンドロームと相関があることが知られている (J Dermatol Sci. 2009, J Rheumatol. 2013, Nature. 2012)。

## 2. 研究の目的

以上の背景から乾癬の病態に体内時計が関与しているか否かを明らかにするために研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 主要な時計遺伝子の1つである *clock* の変異マウス (*clock*<sup>19</sup>) に Toll-like receptor (TLR)7 のリガンドである imiquimod をマウスの耳と背部皮膚に塗布し、乾癬様皮膚炎モデル (Leslie F et al : J Immunol . 2009) を誘導し解析した。さらに別の乾癬モデル (マウスの耳に IL23 を皮内

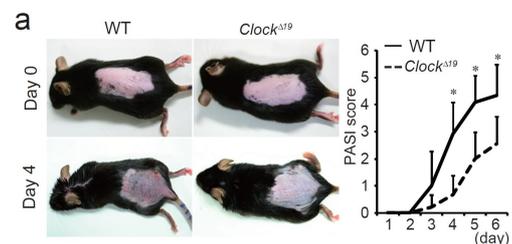
注射して皮膚炎をおこす J Exp M. 2006) でも解析した。時計遺伝子はいくつかの主要な遺伝子が 24 時間で規則正しく増減を繰り返している。*clock* とは別の主要な時計遺伝子 *period2* (*PER2*) は *clock* と逆の変動を示す。*clock* が *Per2* の転写を活性化し、つくられた PER2 蛋白が *clock* を抑制する。*clock*<sup>19</sup> とは別の *period2* 変異マウス (*mPer2*<sup>m/m</sup>) をもちいて、二つの乾癬モデルで解析した。

(2) これらの結果より IL23

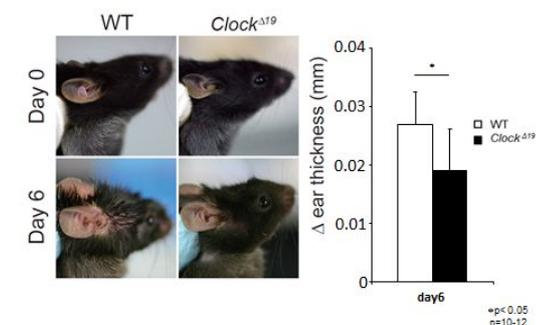
*receptor* (*IL23R*) に着目し、gdT cell を用いて CHIP assay をおこない、*clock* が直接 *IL23R* を制御しているか検討した。

## 4. 研究成果

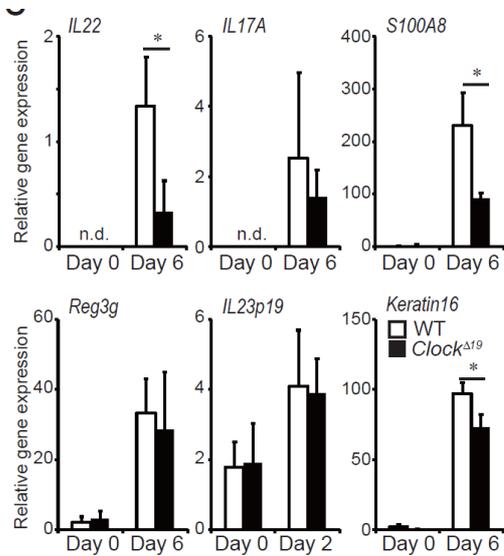
(1) WT に比べて *clock*<sup>19</sup> では乾癬様症状が顕著に抑制された。



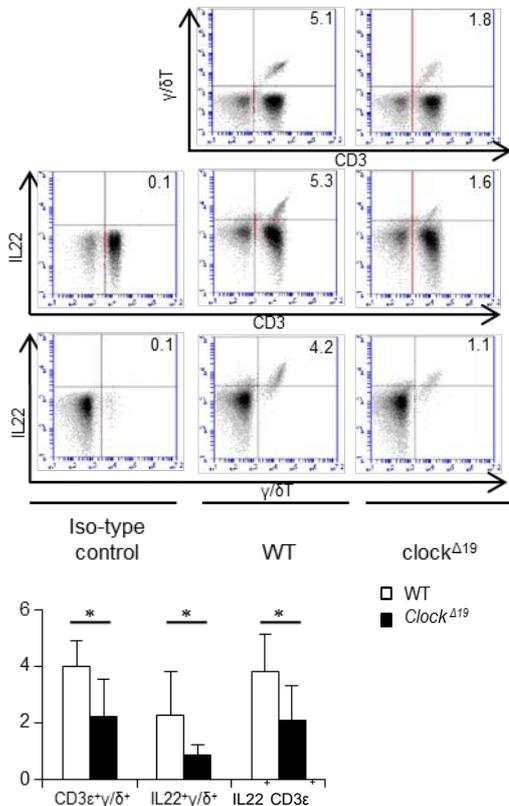
*clock*<sup>19</sup> では耳の肥厚が抑制される



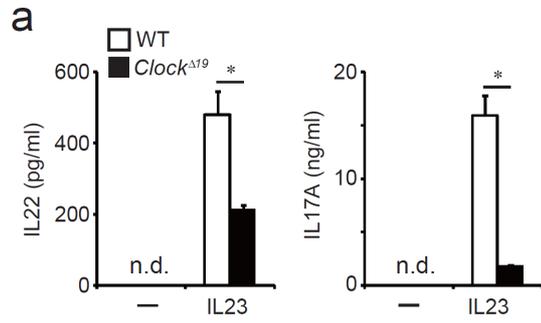
病変皮膚の mRNA レベルにおいて IL-22 や抗菌蛋白 S100A8 が *clock*<sup>19</sup> で低下しており、



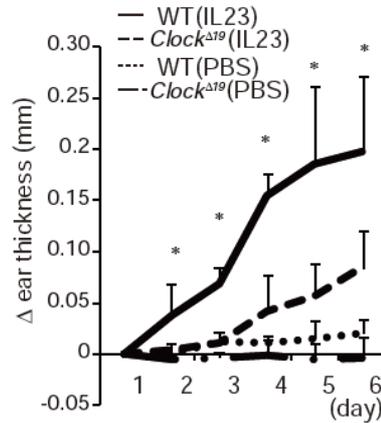
所属リンパ節では IL-22 産生 gdT 細胞が有意に減少していた。さらに皮膚の IL-23 mRNA に差はなく、所属リンパ節中の IL-23 産生 MHC class 細胞の割合に差はなかった。



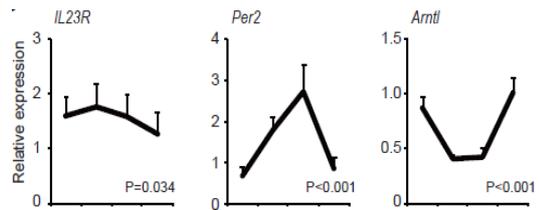
(2) 次に naïve な WT および *clock*<sup>19</sup> の脾臓から gdT cell を磁場分離し、リコンビナント IL23 で 3 日間刺激し上清中の IL17 および IL22 を ELISA 法で計測した。*clock*<sup>19</sup> ではこれらのサイトカインの産生は顕著に抑制された。



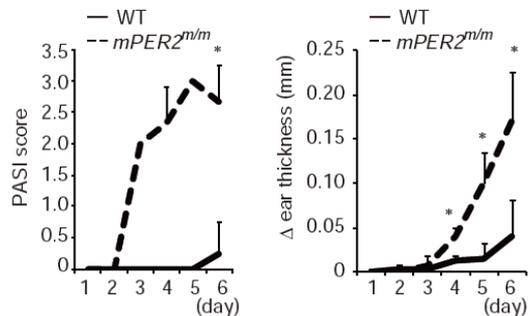
IL23 を直接皮内注射するモデルにおいても同様に *clock*<sup>19</sup> の方が抑制された。



(3) 以上より *IL23R* に着目し naïve な WT の耳より継時的に mRNA をサンプリングし qPCR 法を行った。*IL23R* は他の時計遺伝子と同様に日内変動をしていた。

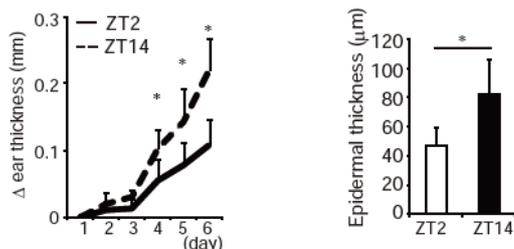


(4) さらに *mPer2*<sup>m/m</sup> では *clock*<sup>19</sup> と逆に imiquimod モデルでも IL23 局注モデルでも皮膚炎は増悪した。

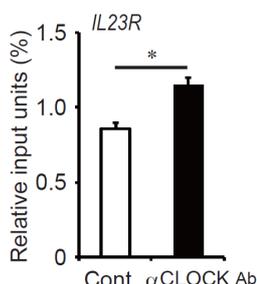


この結果は、*clock* の発現が低い時に PER2 は

高く発現し、clock 発現が高くなると PER2 は低下するという時計遺伝子の変動に一致していた。最後に WT マウスに imiquimod を外用する時間を朝 (ZT4) と夜 (ZT12) で外用したところ、gdT 細胞の IL23R 発現の高い夜 (ZT12) に外用したほうが有意に皮膚炎は増悪した。



(5) *IL23 receptor (IL23R)* に着目し、spleen gdT cell を用いて CHIP assay をおこない、*clock* が直接 *IL23R* を制御しているか検討したところ、ZT4 で転写因子 *clock* が *IL23R* のプロモーター領域に結合していることが明らかになった。



(6) gdT 細胞の *IL23R* が直接 *clock* によって制御されていることが明らかになった。体内時計が乱れ *clock* の発現が変わると乾癬の発症や症状にも影響があることが十分に予測される。体内時計を動かす化合物がいくつか報告されているが、これらの化合物が乾癬の治療に役立つ可能性がある。体内時計という新たな視点は、乾癬の治療や発症を考えるうえで重要である。

## 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 1 件)

Ando N, Nakamura Y, Aoki R, Ishimaru K, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Shimada S, Nakao A.

J Invest Dermatol. 査読有, 2015, 135, 3001-3008.

DOI: 10.1038/jid.2015.316.

〔学会発表〕(計 2 件)

Noriko Ando, Yuki Nakamura, Rui Aoki, Kayoko Ishimaru, Shinji Shimada, Atsuhito Nakao

Circadian Gene Clock Regulates Psoriasis-like Skin Inflammation in Mice

日本研究皮膚科学会 第 40 回 年次総会

2015.12.11-2015.12.13

岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市

安藤典子、川村龍吉、島田眞路、中尾篤人

マウスイミキド乾癬モデルにおける体内時計の関与

第 82 回日本皮膚科学会山梨地方会

2015.12.5

セレス甲府、山梨県・昭和町

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical\\_basic/para0imm/kenkyuu/kenkyuu.php](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/para0imm/kenkyuu/kenkyuu.php)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 典子 (ANDO, Noriko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 90345710

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

中尾 篤人 (NAKAO, Atsuhito)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 80317445

中村 勇規 (NAKAMURA, Yuki)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号: 90580465

島田 眞路 (SHIMADA, Shinji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 10114505