

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18H02848  
研究課題名(和文)「時間アレルギー学」推進のための基盤研究

研究課題名(英文)"Chronoallergy" Research

研究代表者

中尾 篤人 (NAKAO, Atsuhito)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：80317445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：時間アレルギー学とはアレルギーと概日時計との関連を解明する新しい領域である。時間アレルギー学をさらに発展させることを目的として、本研究では(1)マスト細胞における概日時計制御遺伝子(群)の網羅的同定とその機能解析(2)老化がマスト細胞概日時計リズムとアレルギー反応に及ぼす影響(3)マスト細胞概日時計リズムに影響を与える化合物の同定とアレルギー反応への効果の3項目について検討した。その結果マスト細胞内で概日リズム性の転写制御を受ける約100個の遺伝子群の同定、老化による概日時計リズムの減衰とアレルギー反応の低下、時計遺伝子Rev-ERBアゴニストのアレルギー反応抑制作用を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患の時間医学「時間アレルギー学」の基礎研究は、研究代表者が2011年に論文を発表したことが端緒となり、以来この分野をリードしている。本研究はこの独自性のある研究をさらに進展させるものとして位置づけられる。本研究成果である(1)マスト細胞内において概日時計によって制御される遺伝子群の同定(2)老化に伴う概日時計機能の減衰とそのアレルギー反応への影響(3)概日時計を制御する化合物のアレルギー反応抑制作用の同定は、アレルギー疾患における時間依存的な病態の理解を進め、老化という生理的要因がアレルギーに及ぼす影響を明らかにし、また非免疫学的な発想の創薬を進展させるための基盤となる。

研究成果の概要(英文)：The mast cell-intrinsic circadian clock regulates IgE- and IL-33-mediated mast cell activation, both of which are key events in the development of allergic disease. However, the details of circadian regulation of mast cell function related to allergic diseases are not fully understood. This study reveals that (1) about 100 genes exhibit a time-of-day-dependent variation in mast cells relying on the mast cell clock activity, (2) aged mice show weak circadian clock activity and IgE-mediated mast cell activation, (3) SR9009, a chemical compound stimulating core clock gene, Rev-Erb, inhibits IgE-mediated mast cell activation.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー 概日時計 マスト細胞

## 1. 研究開始当初の背景

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹などのアレルギー疾患は、ある特定の時間帯に症状が出現しやすいという特徴がある。例えば花粉症では、朝方にくしゃみ、鼻水などがおこりやすく「モーニングアタック」と呼ばれている。喘息発作は深夜に頻発し、アトピー性皮膚炎やじんましんのかゆみや発疹は夜間に悪化しやすくなる。しかし、例えば、花粉は日中に飛散するもので、モーニングアタックを説明できず、アレルギー疾患の症状が示す時間依存性の背後にある生物学的なメカニズムは不明だった。

概日時計は、覚醒や睡眠、ホルモン分泌、体温、血圧など生物の行動や生理活動における24時間のリズムを生み出す仕組みである。概日時計は、約20種類の時計遺伝子による転写・翻訳のネットワークから構成されるシステムで、私達の体の中のほぼすべての細胞に存在し、個々の細胞活動を1日の時間に応じた環境変化に対して最適化している。

研究代表者は、これまでの研究で、概日時計がアレルギー症状の日内変動に関係していることを見出した。具体的には、マスト細胞の概日時計(時計遺伝子 *Period2* [*Per2*])が、IgE受容体刺激によるマスト細胞活性化反応(I型アレルギー)を、活動期は休息期に比べて抑制していることを見出した(Nakao A et al. JACI 2011, 2014, 2016, Allergy 2015)。そのため、休息期にアレルゲンに曝露されるとマスト細胞が放出するヒスタミン量が活動期より高くなり、くしゃみや鼻水、咳、じんましんなどの反応も休息期(ヒトでは夜間、夜行性のマウスでは日中)に強くなると考えられた。また近年アレルギー疾患に重要な役割していることが明らかになったサイトカインであるIL-33に対するマスト細胞の反応性にも時間依存性が存在し、マスト細胞の時計遺伝子 *Per2* がIL-33刺激によるマスト細胞活性化反応を、IgE刺激と同様に活動期は休息期に比べて抑制していることを見出した(Allergol Int 2010)。これらの知見からアレルギー反応は概日時計による強い制御を受けていることが明らかになり、研究代表者は「時間アレルギー学」という新しい研究領域を提唱している(Allergy 2015, JACI 2018)。「時間アレルギー学」をさらに発展させることは、アレルギー学に新たな視点をもたらし、アレルギー疾患の予防や、診断、治療を進化させる可能性がある。

## 2. 研究の目的

「時間アレルギー学」をさらに発展させることを目的として、本研究では(1)マスト細胞における概日時計制御遺伝子(群)の網羅的同定とその機能解析(2)老化がマスト細胞概日時計リズムとアレルギー反応に及ぼす影響(3)マスト細胞概日時計リズムに影響を与える化合物の同定とアレルギー反応への効果の3項目について検討した。

## 3. 研究の方法

(1)マスト細胞における概日時計制御遺伝子(群)の網羅的同定とその機能解析:

野生型および時計遺伝子 *Clock* 変異マウスの骨髄から培養マスト細胞(Bone Marrow-derived Mast Cells: BMMCs)を樹立した。それらのBMMCsを50%のウマ血清を用いて同調させたあと(血清ショック: *in vitro*で個々の細胞の概日時計を同調させる方法)4時間ごとにmRNAを採取しマイクロアレイ法を用いてmRNA遺伝子の発現パターンを解析した。

(2) 老化がマスト細胞概日時計リズムと I 型アレルギー反応に及ぼす影響：

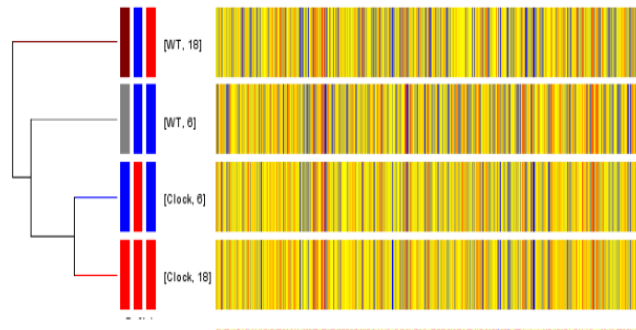
若年(8 週齢)と老齢(40 週齢)の Per2-luciferase ノックインマウスから骨髓由来マスト細胞を樹立し、概日時計(時計遺伝子 Per2)の動態及び IgE 刺激によってマスト細胞が放出するヒスタミン量を比較検討した。

(3) マスト細胞概日時計リズムに影響を与える化合物の同定と I 型アレルギー反応への効果：時計遺伝子タンパク質を活性化あるいは抑制させる作用がある化合物について実際にマスト細胞の概日時計に影響を与えるか否かについて Per2-luciferase ノックインマウスから骨髓由来マスト細胞を樹立し検討した。その後、IgE 刺激によるマスト細胞のヒスタミン放出に対する作用について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 同調刺激後 6 時間(6h)と 18 時間後(18h)における野生型(WT)マウス由来 BMBCs と Clock 変異マウス由来の BMBCs の結果を比較した(WT6h と 18h で 2 倍以上変化した遺伝子セットにおけるクラスタリング解析)。WT6h と 18h では明瞭な遺伝子発現パターンの違いがあり、Clock 変異 6h と 18h はほぼ同じパターンを示す。この結果から、野生型マスト細胞には約 100 個の概日リズム発現を示す遺伝子があることが明らかになり現在詳細を解析中である。

(2) 老化マスト細胞(40 週齢)における概日時計の振幅の減少と IgE 刺激によるマスト細胞のヒスタミン放出の減少を若年マスト細胞と比較して認めた。現在、反応低下のメカニズムを解析中である。



(3) 時計遺伝子 Rev-ERB アゴニスト SR9009 が IgE 刺激によるマスト細胞のヒスタミン放出、サイトカイン産生、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制することを見出した。本知見は、学術雑誌に受理された(Ishimaru et al. IJMS 2019)。

発表論文：

1. Nakao A: Clockwork Allergy: How the Circadian Clock Underpins Allergic Reactions. [Review] J Allergy Clin Immunol 142(4):1021-1031, 2018

2. Ishimaru K, Nakajima S, Yu G, Nakamura Y, Nakao A: The Putatively Specific Synthetic REV-ERB Agonist SR9009 Inhibits IgE- and IL-33-Mediated Mast Cell Activation Independently of the Circadian Clock. Int J Mol Sci 20(24):6320, 2019

3. Nakajima S, Manita S, Yu G, Ishimaru K, Kono K, Kitamura K, Nakao A: Activation of the reward system ameliorates passive cutaneous anaphylactic reaction in mice. Allergy 75(12):3275-3279, 2020.

4. Nakamura Y, Ishimaru K, Nakao A: Time-restricted feeding in rest phase alters IgE/mast cell-mediated allergic reaction in mice. *Allergology International* 69(2):296-299, 2020

5. Nakao A: Circadian Regulation of the Biology of Allergic Disease: Clock Disruption Can Promote Allergy. [Review] *Frontiers in Immunology* 11:1237, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Atsuhito Nakao	4. 巻 -
2. 論文標題 Circadian regulation of the biology of allergic disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Atsuhito Nakao	4. 巻 142
2. 論文標題 Clockwork allergy: How the circadian clock underpins allergic reactions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Allergy Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1021-1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2018.08.007.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （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
---------	---------