

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09548

研究課題名(和文)概日時計がスギ花粉症舌下免疫療法の効果に及ぼす影響

研究課題名(英文)AIT efficacy regulated by the circadian clock in mice

研究代表者

中村 勇規 (NAKAMURA, Yuki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：90580465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物における約24時間周期(概日)性のリズムを持つ生命活動(睡眠や覚醒、血圧等)を司っている「概日時計」がアレルギー反応の強さを時間依存的に調節していることをこれまで明らかにしてきた(JACI 2011, 2014)。それらの研究を土台として、本研究では、アレルギー性鼻炎(花粉症)におけるAIT(舌下免疫療法)の実地する時間によって効果の最適化ができるか否かを検討した。その結果、アレルギー性鼻炎(花粉症)モデルマウスにおけるAITの実地する時間を休眠期に行うことがより効果が高いことを見出した。これらの結果から、AITの効果の最適化に「概日時計」が深く関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have been showed that the circadian clock regulates symptoms of some allergic diseases exhibit prominent variations with a period of approximately 24 h [JACI 2011, 2014]. Based on these studies, this study performed whether the effect of time of day on AIT [Antigen specific Immunotherapy] efficacy with the goal of optimizing the therapeutic outcome in the mouse model of allergic rhinitis. In the AR model, mice sublingually receiving an antigen during resting phase exhibited a greater decrease in antigen-specific IgE levels than mice treated during waking phase or in a random manner. In addition, mice treated during resting phase exhibited reductions in antigen-specific cytokine production by splenocytes relative to mice treated during waking phase or in a random manner. These results suggested that the circadian clock regulates AIT to maximize its effectiveness.

研究分野：アレルギー

キーワード：花粉症 概日時計

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー特異的免疫療法 (Allergen specific Immunotherapy:AIT) は、アレルギー治療の中で唯一治療が期待できる治療法であり、現在そのメカニズムについての研究が多方面から進展中である。本邦においても、スギ花粉症患者(Cry j 1 アレルゲン)を対象にした舌下免疫療法剤 (シダトレン) が初めて承認され、今後臨床において AIT が普及していくことが予想される。一方で、これまで AIT を施行する時間 (アレルゲンを注射や舌下に投与する時間) が、その治療効果 (アレルゲン特異的な免疫寛容誘導) に与える影響についての情報はほとんど得られていない。

ヒトを含むほ乳動物では、“時計遺伝子” と呼ばれる遺伝子群が概日リズムをもつ自律的振動体を形成しており、この「概日時計」によって睡眠や体温、ホルモン分泌などの生理現象の日内リズムがコントロールされている (Annu Rev Physiol 72:517,2010)。概日時計は全身のほぼすべての細胞 (マスト細胞も含む) が持っている (末梢時計) が、概日時計の中心 (主時計) は、脳の中の視交叉上核 (SCN) という神経細胞の集まりが担っている (Nat Rev Genet 9:764,2008)。

主時計は網膜から神経性の入力を受けて、朝の光で位相 (時計の針の位置) を毎朝修正し、概日リズムを 1 日 24 時間の日周リズムに変えその時間情報を末梢時計に自律神経や内分泌経路を介して伝えている (図 1)。つまり概日時計は、体全体の中でシステムとして機能していると考えられ、我々の社会における“電波時計”システムに似ている。

研究代表者らは、「概日時計」(時計遺伝子) が、マスト細胞の IgE 誘導性脱顆粒反応を時間依存的にコントロールしていること、さらにマスト細胞に発現される時計遺伝子がこの脱顆粒反応の時間的制御の中心にあることを報告した (JACI 2011, 2014)。これらの知見は世界で初めてアレルギーにおける時間的制御の生物学的基盤ならびに重要性を明らかにしたとして高い評価を得ている。またこれらの研究は“時間アレルギー学 (Chronoallergology)” という新しい研究分野を開拓した (Chronobiol Int 2015)。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、概日時計 (時計遺伝子) がアレルギー反応を時間依存的に制御していることを踏まえ、AIT を施行する時間が、体内における免疫寛容誘導 (トレランスの誘導効果) に与える影響について検討する。特に本研究では、本邦においてこの秋から開始されるスギ花粉症患者を対象にした舌下免疫療法をモデルとして検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) スギ花粉症モデルの作製

精製スギ花粉 (Cry j 1) と Alum (Al(OH)<sub>3</sub>) アジュバントを用いて、腹腔内投与によって全身的感作する (2 週間おきに 2 回, Day 0, Day 14)。最終感作の 1 週間後 (Day 21) にスギ花粉エキス凍結乾燥末を用いて、鼻腔投与 (チャレンジ) を 7 日間行い、アレルギー症状として、鼻掻き行動やくしゃみ回数、鼻腔粘膜組織の炎症状態の病理学的検討、脾臓 T 細胞のスギ花粉アレルゲン特異的な反応性 (IL-5, IL-13, INF- $\gamma$  産生) スギ花粉特異的 IgE、IgG1, 2a 産生を測定しスギ花粉症モデルを作製した。

### (2) AIT 効果を最適化するスギアレルゲンエキス舌下投与時間についての解析

上述したスギ花粉症様モデルマウスを作製する 7 日前から毎日朝 10 時 (マウスの休眠期) のみ、夜 10 時 (マウスの覚醒期) のみあるいは毎日異なる時間に精製 Cry j 1 を舌下投与 (5  $\mu$ L/ head/ time, Day -6 ~ Day 0) し、AIT 効果を比較・検討した。最終感作 2 週間後 (Day 21) から上述のように精製 Cry j 1 で鼻腔投与 (チャレンジ) を行いスギ花粉エキス舌下投与の時間によるスギに対する免疫寛容 (トレランス) の誘導効果について比較・解析した。

評価項目としては症状スコア (鼻ひっかき行動、くしゃみ回数のカウント)、脾臓 T 細胞頸部リンパ節リンパ球の精製 Cry j 1 に対する反応性 (IL-5, IL-13, INF- $\gamma$  産生を ELISA 法で測定)、頸部リンパ節中の Foxp3 陽性制御性 T 細胞 (制御性 T 細胞) 数 (フローサイトメーター)、血清 Cryj1 特異的 IgE (ELISA 法) 等を用いる。

## 4. 研究成果

### (1) スギ花粉症モデル樹立

BALB/c マウスに精製スギ花粉 (Cry j 1) 及び Alum (Al(OH)<sub>3</sub>) アジュバント腹腔内投与によってスギ花粉症モデルを誘導 (感作) した結果、スギ花粉特異的 IgE、脾細胞スギ花粉再刺激における Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) 産生が確認でき、適切なスギ花粉症モデル作成に成功した。

### (2) AIT を休眠期行うことでより効果を得ることができる

スギ花粉症様モデルマウスを作製する 7 日前から毎日朝 10 時 (マウスにおける休眠期) のみ、夜 10 時 (マウスにおける覚醒期) のみあるいは毎日異なる時間に精製 Cry j 1 を舌下投与 (5  $\mu$ L/ head/ time, Day -6 ~ Day 0) し、

AIT 効果と比較・検討した結果、毎朝 10 時(マウスにおける休眠期)に AIT を施行したマウスにおける効果(スギ花粉特異的 IgE、IgG1 の減少、IgG2a の上昇)がその他の時間に AIT を施行した群に比べ、より強いことが確認できた。さらに、毎日異なる時間に AIT を施行したマウスにおける効果は、マウスごとに大きく異なり、コントロール群と比較しても有意に差が認められなかった。

さらに同様の実験を卵白アルブミン(OVA)を用いて行った結果、同様の結果がより明確に得られ、加えて頸部リンパ節における Treg 細胞の増加が朝 10 時(マウスにおける休眠期)に AIT を施行したマウスのみで確認できた(図 1)。

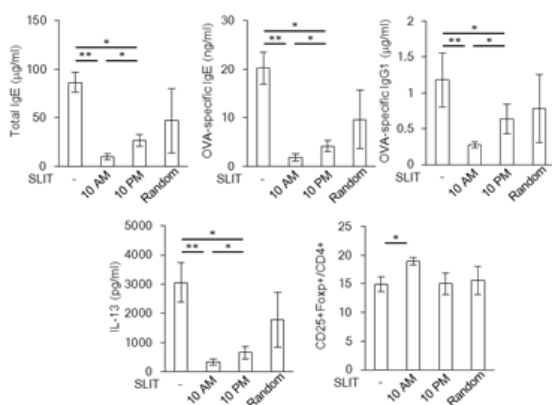


図1. 朝10時のみ、夜10時のみ、毎日異なる時間にAITを施行したマウスにおけるAITの効果。花粉症モデル作製前にOVAを朝10時(10 AM)のみ、夜10時(10 PM)のみ、毎日異なる時間(Random)に7日間舌下投与(SLIT)し、その効果を比較した。Total IgE(a)、OVA-specific IgE(b)、OVA-specific IgG1(c)、脾細胞OVA再刺激によるIL-13産生の減少(d)、加えて頸部リンパ節内におけるTreg細胞の増加(e)が朝10時のみにSLITを施行した群のマウスで顕著に確認できた。n=10, One-way ANOVA with Tukey-Kramer's test. \*\*p<0.01, \*p<0.05

これらの結果から、AIT を施行する時間(アレルゲンを注射や舌下に投与する時間)が、その治療効果(アレルゲン特異的な免疫寛容誘導)に与える可能性が示唆された。

本研究の成果は、スギ花粉症に対する唯一の治療法と言われるAITの効果をより強くあるいは早くするためのアイデアの一つとなることが期待できる。

## 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 8 件)

(原著)

- Matsuzawa T, Nakamura Yuki, Ogawa Y, Ishimaru K, Goshima F, Shimada S, Nakao A, Kawamura T: Differential Day-Night Outcome to HSV-2 Cutaneous Infection. *Journal of Investigative Dermatology* 138(1)233-236, 2018 査読有
- Thu Le HP, Nakamura Yuki, Oh-oka K, Ishimaru K, Nakajima S, Nakao A: The

frequency of Th17 cells in the small intestine exhibits a day-night variation dependent on circadian clock activity. *Biochem Biophys Res Commun* 490(2) 290-295, 2017 査読有

- Ihara T, Mitsui T, Kira S, Miyamoto T, Sawada N, Nakagomi H, Yoshiyama M, Takeda M, Nakamura Yuki, Nakao A, Shinozaki Y, Koizumi S: The Clock mutant mouse is a novel experimental model for nocturia and nocturnal polyuria. *Neurourology and Urodynamics* 36(4)1034-1038, 2017 査読有
  - Kawauchi T\*, Ishimaru K\*, Nakamura Yuki, Nakano N, Hara M, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nakao A: Clock-dependent temporal regulation of IL-33/ST2-mediated mast cell response. *Allergology International* 66(3)472-478, 2017 (\*Thease authors contributed equally to this work.) 査読有
  - Nakamura Yuki, Ishimaru K, Shibata S, Nakao A: Regulation of plasma histamine levels by the mast cell clock and its modulation by stress. *Scientific Reports* 7 Article number:39934, 2017 査読有
  - Ihara T, Mitsui T, Nakamura Yuki, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Hirayama Y, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Andersson KE, Nakao A, Takeda M, Koizumi S: Clock Genes Regulate the Circadian Expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26, and VNUT in an Ex Vivo Mouse Bladder Mucosa. *PLoS One* 12(1):e0168234, 2017 査読有
  - Igarashi S, Suzuki K, Nakamura Yuki, Ishimaru K, Fukano C, Masuyama K, Ohashi-Doi K, Nakao A: The efficacy of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis may vary with the time of day. *Int Arch Allergy Immunol* 171(2)111-118, 2016 査読有
  - Nakamura Yuki, Nakano N, Ishimaru K, Ando N, Katoh R, Suzuki-Inoue K, Koyanagi S, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nakao A: Inhibition of IgE-mediated allergic reaction by pharmacologically targeting the circadian clock. *J Allergy Clin Immunol* 137(4)1226-1235, 2016 査読有
- [学会発表](計 12 件)
- Nakamura Yuki, Nakao A: Regulation of

steady state plasma histamine levels by the mast cell clock. 2018 SRBR Meeting 2018年5月12-16日 Florida, USA

2. **Nakamura Yuki**, Nakao A: Circadian regulation of allergy. The 95th Annular Meeting of Physiological Society of Japan 2018年3月28-30日 香川
3. **Nakamura Yuki**, Nakao A: Regulation of plasma histamine levels by the mast cell clock and its modulation by stress. 第46回日本免疫学会学術集会 2017年12月12-14日 仙台
4. **中村勇規**, 柴田重信, 中尾篤人: マスト細胞の概日時計による血中ヒスタミン濃度の調節. 第40回日本分子生物学会年会 2017年12月6-9日 神戸
5. **Nakamura Yuki**, Shibata S, Nakao A: Regulation of plasma histamine levels by the mast cell clock. 第24回日本時間生物学会学術大会 2017年10月28-29日 京都
6. **中村勇規**: マスト細胞の概日時計とアレルギー. 日本睡眠学会第42回定期学術集会 2017年6月29-30日 横浜
7. **中村勇規**, 中尾篤人: マスト細胞の概日時計による血中ヒスタミン濃度の調節. 第66回日本アレルギー学会学術大会 2017年6月16-18日 東京
8. **Nakamura Yuki**, Nakao A, Shibata S: Inhibition of IgE-mediated allergic reaction by pharmacologically targeting the circadian clock. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月5-7日 沖縄
9. Le Pham Thu Ha, **Nakamura Yuki**, Nakao A: Migration of Th17 cells to the small intestine is temporally regulated by the circadian clock. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月5-7日 沖縄
10. **中村勇規**, 柴田重信, 中尾篤人: Regulation of plasma histamine levels by the mast cell clock and its modulation by stress. 第23回日本時間生物学会学術大会 2016年11月12-13日 名古屋
11. **中村勇規**: 概日時計とアレルギー性疾患. 日本睡眠学会第41回定期学術大会 2016年7月7-8日 東京
12. **中村勇規**, 柴田重信, 中尾篤人: 薬理的概日時計制御によるIgE依存性アレルギー反応の抑制. 第65回日本アレルギー学

会学術大会 2016年6月17-19日 東京

〔図書〕(計1件)

1. **中村勇規**(翻訳): 付録 ~ 『アバズリックマン-ピレ 分子細胞免疫学 原著第9版』 エルゼビア・ジャパン株式会社 p543-568, 2018 中尾篤人(監訳) [原著者: Abul K.Abbas, Andrew H.Lichtman, Shiv Pillai 原著書名: Cellular and Molecular Immunology, Ninth Edition]

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

山梨大学医学部免疫学講座ホームページ  
[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical\\_basic/para0imm/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/para0imm/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 勇規 (NAKAMURA, Yuki)  
山梨大学・大学院総合研究部・准教授  
研究者番号: 90580465

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし