

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688040

研究課題名(和文)サーカディアンリズムに立脚したアレルギー制御メカニズムの解明と新規治療戦略の展開

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic strategies and elucidation of mechanisms regulating allergic inflammation based on circadian rhythms

研究代表者

大森 啓太郎(Ohmori, Keitaro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：20466915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円、(間接経費) 6,180,000円

研究成果の概要(和文)：近年アレルギー疾患が急激に増加しているが、有効な治療法の確立には至っていない。本研究の目的は、概日リズムを基盤とする新しいアレルギー病態制御メカニズムを解明し、生体の概日リズムに即した恒常的な臨床症状の緩和を目指すことである。アトピー性皮膚炎自然発症マウスおよびイヌを用いた解析により、アレルギー反応には日内変動が存在し、それらが副腎由来グルココルチコイドにより制御されていることが明らかとなった。概日リズムに基づいてグルココルチコイド製剤を使用することで、アレルギー反応を効率的に緩和できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although allergic diseases have increased dramatically in recent years, effective therapy has yet to be established. The purpose of this study was to elucidate the mechanisms regulating allergic inflammation based on circadian rhythms in order to alleviate clinical signs/symptoms of allergy constantly in line with the circadian rhythms of the body. By using a mouse model for human atopic dermatitis and dogs, time-of-day dependent variations of allergic inflammation were detected, and were shown to be controlled by glucocorticoid derived from the adrenal glands. These results suggested that administration of glucocorticoid drugs based on circadian rhythms might efficiently regulate allergic reactions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

ヒトおよびイヌの約 30% は花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患に罹患しており、現在大きな社会問題となっている。アレルギー性疾患に対する研究はこれまで数多く行われてきたが、その病態は未だ完全には解明されておらず、有効な治療法の確立には至っていない。そのため、アレルギー性疾患の病態解明と新規治療法の確立が急務となっている。

本研究計画において解析したサーカディアンリズム (概日リズム) とは、約 24 時間周期で変動する生理現象で、地球上の全ての生物に存在している言わば体内時計である。動物の生命機能は、生体内に存在する概日リズムによって厳密に制御されている。概日リズムの存在は、紀元前から既に知られていたが、近年の研究から、生物の概日リズムは、約 20 個の時計遺伝子により制御されていることが明らかになった。さらに、概日リズムは癌や糖尿病などの様々な疾患にも存在し、臨床症状の発現や薬剤に対する反応性が 24 時間周期で変動することが指摘されている。概日リズムの乱れから、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病や、癌などが起こりやすくなることも、疫学調査や時計遺伝子欠損マウスを用いた研究において報告されている。

アレルギー性疾患にも概日リズムが存在すると考えられる。喘息やアトピー性皮膚炎は夜間から明け方にかけて症状が悪化し、その他の時間は症状が緩和することが臨床的に示唆されている。さらに、生活リズムの乱れが、現代人においてアレルギー性疾患が増加している大きな要因となっていることも指摘されている。アレルギー性疾患の病態に概日リズムが深く関与していると推測されるが、アレルギー性疾患の病態形成メカニズムにおける概日リズムの役割は、これまで解明されていない研究分野である。アレルギーにおける概日リズムの分子基盤を解明すれば、生体の概日リズムに即した恒常的な臨床症状の緩和を達成することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、概日リズムを基盤とする全く新しいアレルギー病態制御メカニズムを分子レベルから解明し、生体の概日リズムに即した恒常的な臨床症状の緩和を目指すことである。具体的には、次の 2 点を目的として研究を行った。

アトピー性皮膚炎自然発症マウス (NC/Nga マウス) の引っ掻き行動における概日リズムとそのメカニズム解析:

NC/Nga マウスは、アトピー性皮膚炎の発症に伴って痒みに起因する特徴的な引っ掻き行動を示す。痒みおよび引っ掻き行動は、アトピー性皮膚炎の治療対象となることから、これらの概日リズムを明らかにし、そのメカニズムについて解析した。

イヌの概日リズムの分子メカニズム解析とイヌのアレルギー反応における概日リズムの役割の解明:

哺乳動物であり、アレルギー性疾患を自然発症するイヌの概日リズムにおける分子基盤はこれまで全く明らかとなっていない。そこで、イヌにおける概日リズムの分子メカニズムを明らかにするとともに、イヌのアレルギー反応における概日リズムの役割について解析した。

3. 研究の方法

NC/Nga マウスの解析:

引っ掻き行動における概日リズムを、マウス擦過行動定量化装置を用いて解析した。また、皮膚バリア機能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) についても概日リズムを定量化した。さらに、引っ掻き行動の概日リズムにおける副腎由来グルココルチコイドの役割を明らかにするため、外科的に副腎を摘出した NC/Nga マウスを作製し、マウス擦過行動定量化装置を用いて引っ掻き行動を解析した。

イヌの解析:

イヌにおける概日リズムを解析するため、末梢血単核球における時計遺伝子の発現を 24 時間にわたり測定し、その発現制御メカニズムについて解析した。また、イヌのアレルギー反応における概日リズムの役割を解析するため、健常犬に対してヒスタミンを皮内接種し、その反応性の概日リズムを測定するとともに、メカニズムについても検討した。

4. 研究成果

NC/Nga マウスの解析結果:

NC/Nga マウスの引っ掻き行動は、午後から夜間にかけて増加し、早朝から午前にかけて減少していた。マウスの活動性と引っ掻き行動の関係を解析した結果、1 日のうちマウスの活動性が低下した時間帯にマウスの引っ掻き行動が増加し、マウスの活動性が増加した時間帯にマウスの引っ掻き行動が低下していた。皮膚バリア機能の指標である TEWL についても概日リズムが認められ、マウス引っ掻

き行動との関連性が認められた。マウスは夜行性であることから、昼行性であるヒトのアトピー性皮膚炎患者と同様の臨床症状の増悪および軽減を24時間周期で繰り返していることが明らかとなった。

また、NC/Ngaマウスにおいては、血中グルコルチコイドに日内変動が認められ、両側副腎を摘出したNC/Ngaマウスにおいては、引っ掻き行動のリズムが消失し、総引っ掻き行動回数の増加が認められた。

イヌの解析結果：

イヌの末梢血単核球において24時間に渡り時計遺伝子の発現解析を行った結果、イヌにおいては*Per1*遺伝子のみが24時間周期のリズムを刻んでいたが、その他の時計遺伝子の発現にリズムは認められなかった(図1)。ヒトにおいては、末梢血単核球において他の時計遺伝子にも24時間周期のリズムが認められていることから、イヌとヒトでは末梢における時計遺伝子発現に差が存在することが示唆された。

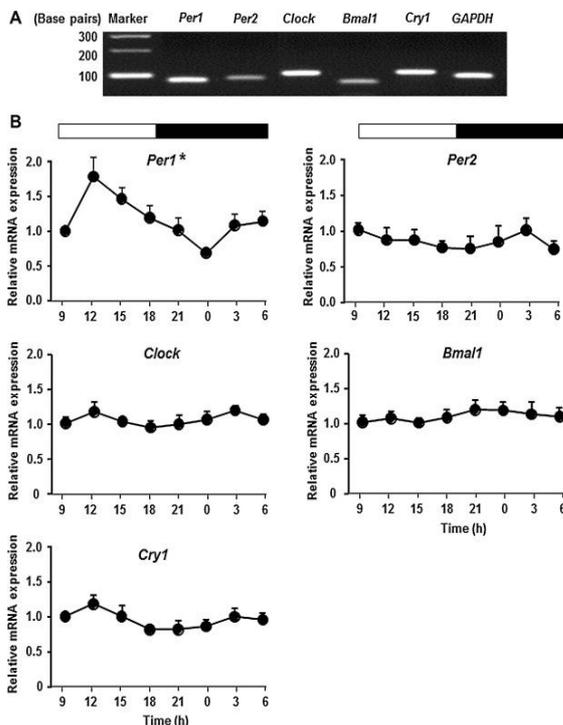


図1. イヌ末梢血単核球における時計遺伝子の発現

イヌ末梢血単核球において24時間周期のリズムを刻むマーカー時計遺伝子である*Per1*遺伝子について、その発現制御メカニズムを解析した。健常犬においては内因性グルコルチコイドであるコルチゾールが日内変動を示し、午前9時に最高値を示し、午後から夜間において低下していた。イヌ末梢血単核球を

デキサメタゾンで刺激し時計遺伝子の発現を解析すると、*Per1*遺伝子の発現が特異的に増加していた。*Per1*遺伝子の発現は、デキサメタゾンの濃度および刺激時間依存性に増加し、刺激後4時間で最大の遺伝子発現が認められた(図2)。さらに、健常犬にデキサメタゾンを投与すると、*in vivo*においても末梢血単核球の*Per1*遺伝子発現量が増加した(図3)。これらの結果から、イヌ末梢血単核球における*Per1*遺伝子の発現が、グルコルチコイドにより制御されていることが示唆された。

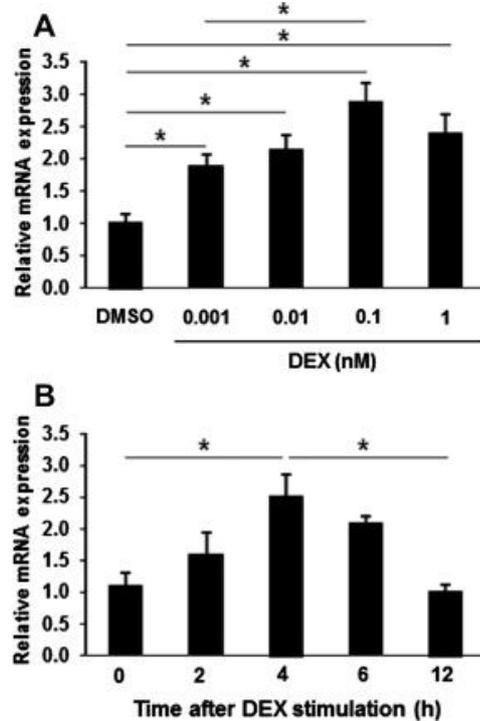


図2. デキサメタゾン(DEX)濃度および刺激時間依存性のイヌ末梢血単核球における*Per1*遺伝子発現

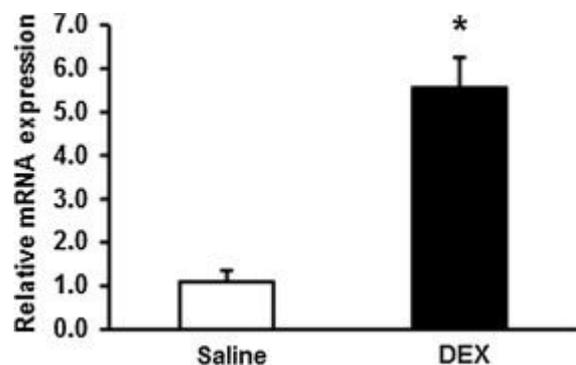


図3. イヌ末梢血単核球の*Per1*遺伝子発現に及ぼすデキサメタゾン(DEX)の *in vivo*効果

健常犬に対して24時間に渡り異なる時間にヒスタミンを皮内接種し、発赤・膨疹反応を測定した結果、ヒスタミンに対する反応性は昼間に強く、夜間に弱いことが明らかとなっ

た。さらに、薬剤によって血中グルココルチコイド濃度を調整すると、ヒスタミンに対する皮内反応のリズムが消失した。

以上、マウスおよびイヌを用いた解析結果より、アレルギー反応においても概日リズムが存在し、副腎由来グルココルチコイドがアレルギー反応の概日リズムを制御している重要な因子の1つであることが明らかとなった。グルココルチコイドは、医療や獣医療において汎用されている薬剤であることから、生体の概日リズムに基づき、副作用を最小限に留め、効果を最大限に引き出す投与方法を探索することで、アレルギー反応を効率的に緩和できる可能性が示唆された。

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13件)

- (1) Ohmori K, Nishikawa S, Oku K, Oida K, Amagai Y, Kajiwara N, Jung K, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H. Circadian rhythms and the effect of glucocorticoids on expression of the clock gene period1 in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. J.* 196(3):402-407, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.010.
- (2) Qi X, Hong J, Chaves L, Zhuang Y, Chen Y, Wang D, Chabon J, Graham B, Ohmori K, Li Y, Huang H. Antagonistic Regulation by the Transcription Factors C/EBP and MITF Specifies Basophil and Mast Cell Fates. *Immunity* 25;39(1): 97-110, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.06.012.
- (3) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Ohmori K, Matsuda H. Stem cell factor contributes to tumorigenesis of mast cells via an autocrine/paracrine mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 93(2) 245-250. 2013. 査読有 DOI: 10.1189/jlb.0512245
- (4) Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Jang H, Kajiwara N, Amagai Y, Oida K, Ahn G, Ohmori K, Kang KG, Matsuda H. Daily intake of Jeju groundwater improves the skin condition of the model mouse for human atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 40(3) 193-200, 2013. 査読有 DOI: 10.1111/1346-8138.12055.
- (5) Matsuda A, Tanaka A, Pan W, Okamoto N, Oida K, Kingyo N, Amagai Y, Xia Y, Jang H, Nishikawa S, Kajiwara N, Ahn G, Ohmori K, Matsuda H. Supplementation of the fermented soy product ImmuBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J. Dermatol. Sci.* 67(2), 130-139, 2012. 査読有 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.05.011.
- (6) Tsukui T, Sakaguchi M, Kurata K, Maeda S, Ohmori K, Masuda K, Tsujimoto H, Iwabuchi S. Measurement of canine IgE using canine recombinant high affinity IgE receptor α chain (Fc ϵ RI α). *J. Vet. Med. Sci.* 74(7):851-856, 2012. 査読有 DOI: 10.1292/jvms.10-0520.
- (7) Matsuda A, Tanaka A, Amagai Y, Ohmori K, Nishikawa S, Xia Y, Karasawa K, Okamoto K, Oida K, Jang H, Matsuda H. Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144(3-4):321-328, 2011. 査読有 DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.08.013.
- (8) Tanaka A, Nomura Y, Matsuda A, Ohmori K, Matsuda H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am. J. Physiol.* 301: C1360-C1367. 2011. 査読有 DOI: 10.1152/ajpcell.00514.2010.
- (9) Okamoto N, Tanaka A, Jung K, Karasawa K, Orito K, Matsuda A, Amagai Y, Oida K, Ohmori K, Matsuda H. Silencing of Int6 gene restores function of the ischemic hindlimb in a rat model for peripheral arterial disease. *Cardiovasc. Res.* 92: 209-217. 2011. 査読有 DOI: 10.1093/cvr/cvr203.
- (10) Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K, Okamoto N, Ohmori K, Jee Y, Shin T, Matsuda H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127(2):420-429.e1-6. 2011. 査読

有 DOI: 10.1016/j.jaci.2010.10.043.

(11) Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ebihara N, Ohmori K, Matsuda H. Retinal degeneration and ed1 mutation in NC/Tnd mice—a human atopic dermatitis model. *Curr. Eye Res.* 36: 350-357. 2011. 査読有 DOI: 10.3109/02713683.2010.542268.

(12) Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ohmori K, Matsuda H. Patterns of aquaporin expression in the canine eye. *Vet. J.* 190: 72-77. 2011. 査読有 DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.12.027.

(13) Qi X, Nishida J, Chaves L, Ohmori K, Huang H. CCAAT/enhancer-binding protein alpha (EBPalpha) is critical for interleukin-4 expression in response to FcepsilonR1 receptor cross-linking. *J. Biol. Chem.* 286: 16063-16073. 2011. 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M110.213389.

〔学会発表〕(計6件)

(1) 大森啓太郎. アトピー性皮膚炎自然発症モデルマウスの引っ掻き行動におけるサーカディアンリズム解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 2013年09月21日. 岐阜大学(岐阜県)

(2) Ohmori K, Oku K, Matsuda A, Jung K, Tanaka A, Matsuda H. Role of FcRgamma in the development of pruritus in atopic dermatitis. 22nd International Symposium of Itch. 2012年10月6日. Bell Salle Jimbocho. (東京)

(3) 大森啓太郎, 西川翔, 奥啓輔, 松田彬, Jung Kyungsook, 田中あかね, 松田浩珍. イヌ末梢血単核球における時計遺伝子の概日リズム解析. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012年09月16日. 岩手大学(岩手県)

(4) Ohmori K, Tanaka A, Matsuda A, Matsuda H. Circadian regulation of scratching behavior in NC/Tnd mice, a mouse model for human atopic dermatitis. XXII World Allergy Congress. 2011年12月7日. (メキシコ)

(5) 大森啓太郎, 田中あかね, 松田彬, 松田

浩珍. アトピー性皮膚炎自然発症モデルマウス(NC/Tndマウス)の引っ掻き行動におけるサーカディアンリズム解析. Conference of BioSignal and Medicine 2011. 2011年6月24日. (長野)

(6) Ohmori K, Tanaka A, Matsuda A, Matsuda H. Circadian scratching behavior in NC/NgaTnd mice, a mouse model for human atopic dermatitis. 22nd World Congress of Dermatology. 2011年5月27日. (韓国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 啓太郎 (OHMORI, Keitaro)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号: 20466915