

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790904

研究課題名（和文） 体内時計が喘息の病態に果たす役割

研究課題名（英文） Role of circadian clocks in allergic asthma

研究代表者

中村 勇規 (NAKAMURA YUKI)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：90580465

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、体内時計がアレルギー性喘息の発症または症状発現に果たす役割を解明し、体内時計制御による気管支喘息の予防/治療へのまったく新しいアプローチを提唱することである。異なった感作の時刻で、野生型マウスと時計遺伝子 Clock 変異マウスを用いてアレルギー性喘息モデル作製した結果、野生型マウスで見られる重症度の違いが時計遺伝子 Clock 変異マウスでは消失することを見出した。加えて、野生型マウス由来培養樹状細胞（BMDC）における Toll-like receptor (TLR) 4 の発現が体内時計によって制御されることを見出した。これらの結果から、アレルギー性喘息発症に体内時計の関与が認められ、それは樹状細胞の体内時計に制御される TLR4 の発現変動に依存している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research is to solve the role which the biological clock plays in development of symptoms and condition revelation of allergic asthma and to advocate the new approach to prevention/medical treatment of the allergic asthma by circadian clocks control. In the wild-type mouse, the difference in condition was accepted by carrying out sensitization to different time. However, the difference in condition was not accepted in Clock, a key clock gene, mutant mouse. In addition, it found out that revelation of Toll-like receptor (TLR) 4 on wild-type mice origin bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) was controlled by a biological clock. These results suggest that the onset of allergic asthma was dependent on circadian change of TLR4 on dendritic cells controlled by the circadian clock.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：体内時計、樹状細胞、喘息

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息（以下、喘息）は、ダニ成分などに対するアレルギー型免疫反応によって惹起される気道の慢性炎症疾患である。2004年の統計で、世界中で約3億人の患者さんがおり（Allergy 59:469,2004）、現在もその患者数は増加している。喘息のコントロールにおいては副腎皮質ホルモンの吸入剤が極めて有効であるが、決して喘息が根治するわけではない。現在、基礎免疫学の知見を基盤とした根治的な治療薬あるいは予防法の研究が世界中で行われているが、喘息のような遺伝的／環境的な多くの因子が複合的に作用し発症する疾患においては、一方向からの発想だけでなくまったく新しい着想による治療／予防法の開発も必要である。

ヒトを含むほ乳類は、睡眠や体温、血圧、ホルモン量の変化などの生理現象において、概日リズムと呼ばれる24時間周期性の生命活動を行っている。近年、この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、それらの時計遺伝子が遺伝子及びタンパク質レベルで24時間周期の振動を繰り返すことによって「体内時計」を形成し、概日リズムが生み出されていることが明らかになってきた。現在、この体内時計（時計遺伝子の振動）は、当初明らかにされた脳内の特殊な部位に存在するだけでなく（中枢時計）、末梢の臓器（皮膚、肝臓、肺など）においても存在しており（末梢時計）、各臓器における固有の生理機能を調整していると考えられている（Nature 418:935-941, 2002）。

ただし免疫担当細胞における末梢時計機構の存在は未だほとんどわかっていない。喘息では、喘鳴、呼吸困難などの症状が1日のうちのある特定の時間（例：喘鳴や呼吸困難の症状は深夜から明け方に発生のピークを示す）に起こりやすいことがよく知られている（図1）（J Allergy Clin Immunol 116:1179, 2005）。しかし、このような喘息の24時間周期性（概日性）の症状が起る分子的機構はこれまでまったく不明であった。

以上の背景から、我々は、免疫担当細胞（樹状細胞）における末梢時計の変動が喘息に見られる概日性の症状・または発症に影響を与えているのではないかと考え研究を行っている。

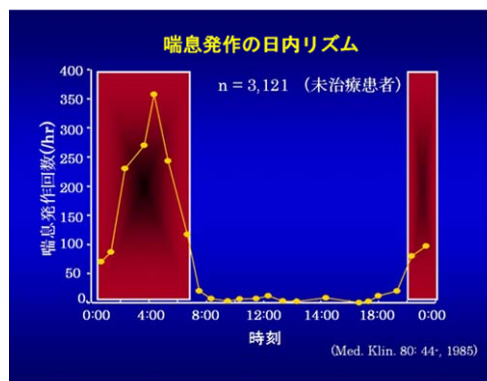


図1：喘息発作の日内リズム

喘鳴や呼吸困難の症状は深夜から明け方に発生のピークを示す。

2. 研究の目的

樹状細胞における「体内時計」が喘息の病態形成に果たす役割について解明し、樹状細胞の「体内時計」制御による喘息予防・治療への新しいアプローチを提唱することである。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスおよび時計遺伝子 Clock 遺伝子変異マウスを用いた喘息モデルマウス作成と解析

野生型マウスと時計遺伝子群において中心的な役割を果たしている Clock 遺伝子変異マウス（Cell 89:641-653,1997）に対して卵白アルブミン(OVA)及びLPSの同時吸入による感作を AM10:00（朝）と PM10:00（夜）に行い、OVAを吸入チャレンジすることによって既報のように喘息モデルを作成し（J Exp Med 196:1645,2002）、喘息の症状（脾細胞における Th2 サイトカイン産生能、血清中 OVA 特異的 IgE 濃度、気管支周囲における細胞浸潤など）を比較・検討を行った。

(2) 樹状細胞における概日リズム性の機能の同定

野生型マウス骨髄由来培養樹状細胞 (BMDC)において、時計遺伝子が24時間周期性（概日性）に発現しているか否かを検討し、喘息モデル作製時のアジュバンド

である LPS などの病原体に特徴的な成分である Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)によるサイトカイン産生反応、およびそれらを認識する受容体について、24時間周期性の変動が認められるか否かについて検討した。

また、主要な時計遺伝子の1つである Clock 遺伝子変異マウスから BMDC を作成し、上記の検討で認められた概日性の機能が Clock 遺伝子に依存するか否かについて野生型マウス由来 BMDC の反応と比較・検討した。

4. 研究成果

(1) 喘息発症に「体内時計」が関与する

野生型マウスと時計遺伝子 Clock 変異マウスを用いて、AM10:00 (朝)とPM10:00 (夜)に LPS と卵白アルブミン(OVA)投与によって喘息発症を誘導 (感作) した結果、野生型マウスでは感作の時間によって症状 (脾細胞における Th2 サイトカイン産生能、血清中 OVA 特異的 IgE 濃度、気管支周囲における細胞浸潤) の重症度に違いがあり、時計遺伝子 Clock 変異マウスではどの時間に感作しても同様な症状であることが分かった (図2)。

これらの結果から、喘息発症に「体内時計」が関与することが分かった。

(2) BMDC の Toll-like receptor (TLR) 4 の発現は体内時計によって制御される

野生型マウスの骨髄由来培養樹状細胞 (BMDC) を用いて、「体内時計」を持つか否かについて検討した。その結果、時計遺伝子が概日性をもって発現していることが確認された。加えて、病原体の特徴的な成分 (LPS など) に対するサイトカイン産生反応、それらの成分を認識する受容体 (TLR4) の発現に概日性があることが確認でき、これらの周期性は時計遺伝子 Clock 変異マウス由来の BMDC では消失していた (図3)。

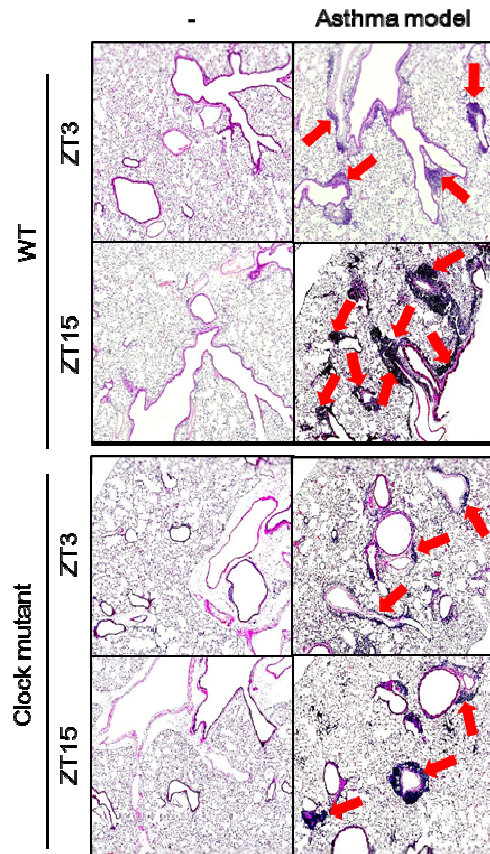


図2: 野生型マウスおよび時計遺伝子 Clock 遺伝子変異マウスを用いた喘息モデルマウスにおける肺病理画像 (HE 染色)

野生型マウスでは感作の時間によって気管支周囲への細胞浸潤 (赤矢印) に違いがあり、時計遺伝子 Clock 変異マウスではどの時間に感作しても同様な症状であった。

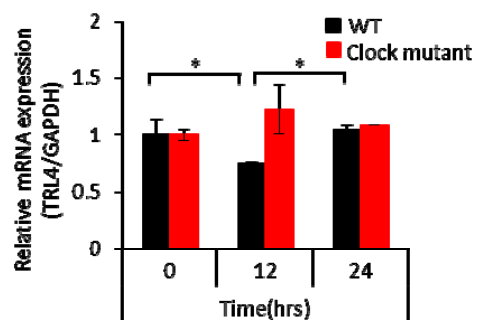


図3: 野生型マウスおよび時計遺伝子 Clock 遺伝子変異マウス BMDC における TLR4 の発現量

野生型マウス (WT) BMDC では TLR4 の概日リズム性の発現変動が確認できたが、Clock 遺伝子変異マウス (Clock mutant) BMDC では消失していた。

これらの結果から、喘息発症に「体内時計」が関与していることが分かり、それは樹状細胞の「体内時計」に制御される TLR4 の発現変動に依存している可能性が示唆された。

本研究の成果は、樹状細胞の「体内時計」制御による気管支喘息の予防/治療へのまったく新しいアプローチにつながる可能性があることが示唆された。

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 3 件)

1. Zhu Y, Ohba T, Ando T, Fujita K, Koyama K, Nakamura Y, Katoh R, Haro H, Nakao A: Endogenous TGF- β activity limits TSLP expression in the intervertebral disc tissue by suppressing NF- κ B activation. J Orthop Res in press 2013 査読有
DOI: 10.1002/jor.22337
2. Takita E, Yokota S, Tahara Y, Hirao A, Aoki N, Nakamura Y, Nakao A, Shibata S: Biological clock dysfunction exacerbates contact hypersensitivity in mice. Brit J Dermatol 168(1)39-46, 2013 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2133.2012.11176.x
3. Okada Y, Oh-oka K, Nakamura Y, Ishimaru K, Matsuoka S, Okumura K, Ogawa H, Hisamoto M, Okuda T, Nakao A: Dietary resveratrol prevents the development of food allergy in mice. PLoS One 7(9)e44338, 2012 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0044338

[学会発表] (計 4 件)

1. 中村勇規, 中尾篤人, 柴田重信: マスト細胞の内在時計による即時型皮膚反応の日内変動の調節. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年11月29日 大阪市
2. 中村勇規, 中尾篤人, 柴田重信: マスト細胞の内在時計による即時型皮膚反応の日内変動の調節. 第14回応用薬理シンポジウム 2012年9月3日 甲府市
3. 中村勇規, 中尾篤人, 柴田重信: 体内時計システムによる即時型皮膚反応の日内変動の調節. 第18回日本時間生物学会学術大会 2011年11月24日 名古屋

4. 中村勇規, 中尾篤人: 体内時計システムによる即時型皮膚反応の日内変動の調節. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月11日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 勇規 (NAKAMURA YUKI)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 90580465

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし