

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870276

研究課題名(和文)花粉症における体内時計の役割の解明

研究課題名(英文)The role of the circadian clock in pollen allergy

研究代表者

中村 勇規 (NAKAMURA, Yuki)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：90580465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：花粉症では鼻水や鼻閉などの症状が夜から明け方に悪化することが知られている。しかし、「体内時計」が花粉症の病態に関与するか否かについては未だに明らかではない。そこで、動物モデルを用いて「体内時計」が花粉症の病態に関与することを検証した。マウス花粉症モデルを用いて検討した結果、野生型マウスにおける花粉症の症状は日内変動を示し、時計遺伝子Clock変異マウスでは消失することが確認できた。また、体内時計に作用する薬剤を投与することで、花粉症の症状が抑制できること、加えて、マウス慢性時差ぼけモデルではこの日内変動が消失していた。これらの結果から、体内時計が花粉症の病態に関与することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In most pollen allergy patients, symptoms worsen overnight or early in the morning. Although the circadian pathophysiology of pollen allergy is well documented, the biological basis of this phenomenon remain poorly unknown. In this study, "circadian clocks" were directly verifies that involved in the pathogenesis of pollen allergy using allergic rhinitis model. The severity of allergic rhinitis symptoms in wild-type mice showed a time-of-day-dependent variation, whereas, was absent in clock mutant mice. Furthermore, a time-of-day-dependent variation in the severity of allergic rhinitis symptoms observed in wild-type mice was absent by administering a drug that effects on the circadian clocks. A time-of-day-dependent variation in the severity of allergic rhinitis symptoms in the healthy mice was absent in the mouse chronic jet lag model. These results suggested that "circadian clocks" is involved in pathogenesis of pollen allergy.

研究分野：アレルギー学

キーワード：花粉症 体内時計

1. 研究開始当初の背景

花粉症をはじめとするアレルギー疾患には症状の発現に約24時間の周期性(概日性)が見られることはよく知られている(JACI 116:1179, 2005, JACI 114:S146,2004)。特に、花粉症(アレルギー性鼻炎)では、非常に顕著に、深夜から早朝にかけて鼻水、鼻閉、くしゃみなどの症状が増悪する(“モーニングアタック”)。また、最近では、睡眠時無呼吸症候群が花粉症を悪化させることが報告されている。このような症状の概日性の悪化あるいは睡眠障害による症状の悪化は「体内時計」(後述)が花粉症の病態形成に非常に重要な要素の1つであることを強く示唆する。

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「体内時計」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)。体内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、体内時計の中心(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)。つまり体内時計は、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、これまでの研究で、野生型(WT)マウスにおけるIgE/マスト細胞依存性の即時型皮膚過敏反応(passive cutaneous anaphylaxis: PCA)は、概日性の日内変動を示し、時計遺伝子 *Period2* 変異(*mPer2^{m/m}*)マウス、視交叉上核(SCN)破壊マウス、慢性時差ぼけモデルマウス及び副腎摘出マウスにおいて、この日内変動が消失することを見出した(図1)。つまり、マスト細胞の脱顆粒反応には概日リズムが存在し、「体内時計」システムが、副腎由来の液性因子の分泌リズムを制御することによって、その反応の強さを調節していることが示された。

この知見は、マスト細胞の脱顆粒反応が主たる病態である花粉症にも「体内時計」が強く関与することを示唆している。しかしながら、花粉症と体内時計との関係を直接的に証明した研究はこれまで報告されていない。

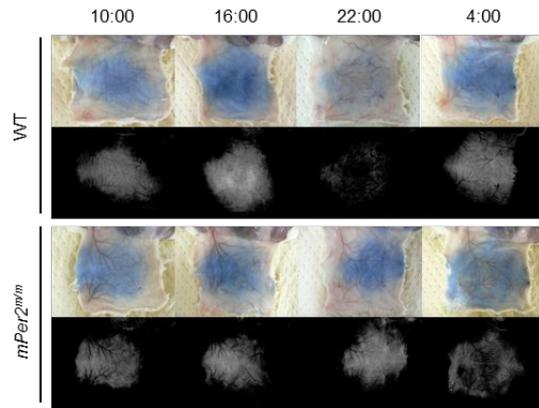


図1: PCA反応の日内変動は時計遺伝子 *Per2* 変異によって消失するマウスPCA反応の日内変動野生型マウス(WT)では夜22時にPCAを行うと日中に比べて反応が著明に低下している。 *Period2* 遺伝子の変異マウス(*mPer2^{m/m}*)では夜22時でもPCA反応が顕著に認められる。(背景が黒色の写真は定量用に反応を強調したもの)

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では「体内時計」が花粉症の病態に重要な役割を果たしていることを動物モデルを用いて直接的に検証する。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスおよび時計遺伝子 *Clock* 変異マウスを用いた花粉症モデルの解析

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)及びアラム(Al(OH)_3)アジュバントを Day0, 7 に腹腔内に投与し、感作した。 Day14 から1週間、鼻腔に OVA をチャレンジすることによって花粉症モデルを作成した。花粉症モデル作成後、血清中の OVA 特異的 IgE、マウスの鼻ひっかき行動やくしゃみの回数を測定し、比較・検討を行った。

(2) 睡眠障害(慢性時差ぼけ = 体内時計の機能的異常)マウスを用いた花粉症モデルの解析

睡眠時無呼吸症候群などの睡眠障害が花粉症の悪化因子であることが近年指摘されている(*JACI* 18:415,2008)。また睡眠障害は、「体内時計」の異常を惹起する(その逆もある)(*J Clin Invest* 121:2133,2011)。そこで「体内時計」システムが機能的に障害されることが知られている「慢性時差ぼけマウス」モデルを作成し、その後、上記の花粉症モデルを惹起し、正常マウスとフェノタイプを比較検討することによって睡眠障害(体内時計システムの機能的異常)が花粉症の発症に与える影響について解析した。

4. 研究成果

(1)花粉症発症および症状発現に「体内時計」が関与する

野生型マウス(WT)と時計遺伝子 Clock 変異マウス(*Clock*^{Δ19})を用いて、卵白アルブミン(OVA)及びアラム(AIOH₃)アジュバント投与によって OVA アレルギーを誘導(感作)した結果、OVA 特異的 IgE、脾細胞における Th2 サイトカイン産生量が異なることが分かった。(図2)

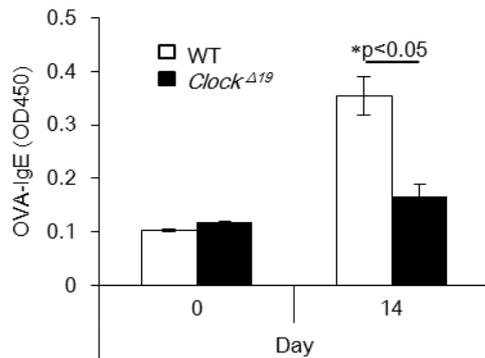


図2: 野生型マウスおよび時計遺伝子Clock変異マウスを用いた花粉症モデルにおける血中OVA特異的IgE

野生型マウスと時計遺伝子Clock変異マウスでは感作後14日の血中OVA特異的IgE(OVA-IgE)量で有意に差があった。

さらに、これらのマウスを用いて、AM10:00(朝)とPM10:00(夜)にOVAを鼻腔内に投与した結果、野生型マウスでは症状の発現(鼻かき、くしゃみの回数)が日内変動を示すのに対し、時計遺伝子Clock変異マウスでは消失することが分かった。

これらの結果から、花粉症発症および症状発現に「体内時計」が関与することが分かった。

(2)体内時計機能破綻は花粉症の症状増悪の危険因子である

上述のように、野生型マウスを用いて花粉症モデルを作成し、3時間周期ごとの明暗条件下で8週間飼育することによって体内時計機能が破綻した「慢性時差ボケ」モデルマウス作成し、通常の飼育条件(12時間周期の明暗条件下)で飼育したマウスと比較・検討した。その結果、「慢性時差ボケ」モデルマウスにおけるOVA鼻腔内投与後の鼻かき、くしゃみの日内変動がなくなり、回数が増加していることが分かった。(図3)

さらに、花粉症モデル作成時に、PERIODタンパクを分解し体内時計を制御する酵素であるCK1 epsilon/deltaを阻害する薬剤(CK1 inhibitor)を投与し、花粉症の症状悪化で見られる鼻粘膜への好酸球の浸潤を病理標本を用いて測定した。その結果、薬剤投与に

おける好酸球浸潤の抑制が確認できた。(図4)

これらの結果から、体内時計が花粉症の病態に関与することを強く示唆された。

本研究の成果は、花粉症に対する新しい発想(非免疫学的な)の予防または治療法の開発に結びつくことが期待される。

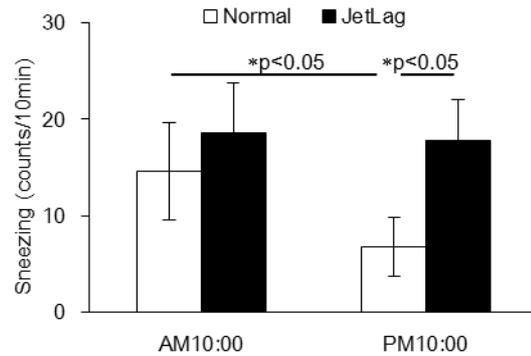


図3: 慢性時差ボケ(JetLag)モデルマウスでは花粉症モデルにおける症状発現の日内変動が消失した

花粉症モデル作成後、3時間周期の明暗条件下で飼育し、体内時計機能が破綻した「慢性時差ボケ」モデルを作成した。通常の飼育条件(Normal)ではくしゃみ(Sneezing)の発現に日内変動が確認できるが、「慢性時差ボケ」モデルでは消失していた。さらに、PM10:00におけるくしゃみの回数はNormalに比べ、増加していた。

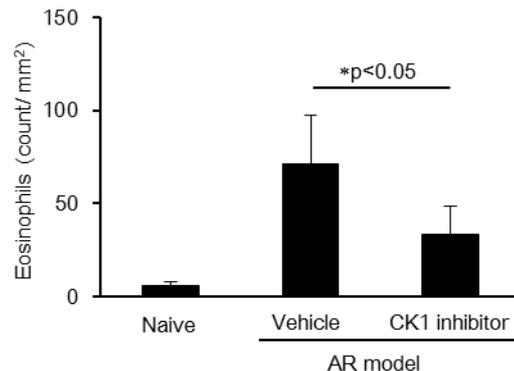


図4: 体内時計を制御する薬剤(CK1 inhibitor)は花粉症(AR)モデルにおける好酸球浸潤を抑制する

花粉症モデル作成時に時計遺伝子PERIODを分解するCK1 inhibitorを投与することで、花粉症の症状増悪に伴い増加することが知られている鼻粘膜への好酸球(Eosinophils)浸潤が抑制された。Naive: 無感作、Vehicle: 生理食塩水。

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4件)
(原著)

1. Ando N, Nakamura Y, Ishimaru K, Ogawa H, Okumura K, Shimada S, and Nakao A: Allergen-specific basophil reactivity exhibits daily variations in seasonal allergic rhinitis. Allergy 70(3)319-322, 2015 査読有
2. Nakamura Y, Ishimaru K, Tahara Y, Shibata S, Nakao A: Disruption of the Suprachiasmatic Nucleus Blunts A Time of Day-Dependent Variation in Systemic Anaphylactic Reaction in Mice. Journal of Immunology Research vol.2014 Article ID474217, 2014 査読有
3. Fukumoto S, Toshimitsu T, Matsuoka S, Maruyama A, Oh-oka K, Takamura T, Nakamura Y, Ishimaru K, Fujii-Kuriyama Y, Ikegami S, Ito H, Nakao A: Identification of a probiotic bacteria-derived activator of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits colitis. Immunology and Cell Biology 92(5)460-465, 2014 査読有
4. Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Hara M, Ikegami T, Tahara Y, Katoh R, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nishiyama C, and Nakao A: Circadian regulation of allergic reaction by the mast cell clock in mice. J Allergy Clin Immunol 133(2)568-575.e12, 2014 査読有

[学会発表](計3件)

1. Nakamura Y: Circadian regulation of allergic reaction by the mast cell clock in mice. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014年5月9-11日 京都府
2. 中村勇規, 中尾篤人: マスト細胞の内在時計による IgE 受容体の日内変動の調節. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28-30日 東京都
3. 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アレルギー反応の日内変動の調節. 第20回日本時間生物学会学術大会 2013年11月9-10日 大阪府

[図書](計0件)

[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/

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 勇規 (NAKAMURA Yuki)
山梨大学・総合研究部・講師
研究者番号: 90580465

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし