

研究課題名	概日時計による食物アレルギーの調整機構の解明
フリガナ	ナカムラ ユウキ
代表者名	中村 勇規
所属機関 (機関名) (役職名)	山梨大学大学院総合研究部 医学域基礎医学系 免疫学講座 講師
本助成金による発表論文, 学会発表	平成 29 年度中に成果をまとめ、学会・論文発表を行う予定である。

## 研究結果要約

食物アレルギー症状が休息期に食物を摂取したときのほうが重症になることが知られているが、この症状をコントロールするメカニズムは未だ明確ではない。本研究では、マスト細胞の概日時計(時計遺伝子)が食物アレルギー症状の日内変動に果たす役割について検討した。

マスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスを Clock 遺伝子変異型マウス骨髓細胞由来マスト細胞(BMMCs)を作製し、マスト細胞欠損(W/W<sup>v</sup>)マウスに移入することで作成した。このマウスを用いてアレルギーモデルを作製し、食物アレルギーの症状増悪にマスト細胞の概日時計が関与するか否かを検討した結果、野生型 BMMCs を移入したマウスでは症状増悪が時間依存的に変化したが、Clock 変異型 BMMCs を移入したマウスでは消失していた。さらに、これらのマウスにおける腹腔マスト細胞を用いた検討では IgE 受容体の発現変化が症状と一致し、マスト細胞の概日時計が IgE 受容体発現を制御している可能性が示唆された。

以上の結果から、本研究ではマスト細胞の概日時計が食物アレルギーの症状発現の時間依存的な制御に果たす役割の一つとして、IgE 受容体の時間依存的発現変動である可能性が示唆された。この知見は、マスト細胞の概日時計を標的としたこれまでと異なる食物アレルギーの予防・治療法の開発につながる可能性がある。

## 研究目的

ほぼすべての生物は概日時計(体内時計)が制御する約 24 時間周期性のリズム(概日リズム)を持ち、そのリズムに生理活動を同期することで環境に順応している。その概日時計(時計遺伝子)が I 型アレルギー反応(マスト細胞の IgE 刺激による脱顆粒反応)を時間依存的に制御していること、さ

らにマスト細胞の概日時計の位相（時計遺伝子の発現レベル）を薬理的に変化させることで IgE によるマスト細胞の脱顆粒反応を抑制できることをこれまで明らかにしてきた<sup>2-4</sup>。加えて、ヒトスギ花粉症患者において好塩基球(マスト細胞と同様に IgE 刺激によって脱顆粒反応を起こす細胞)のスギ花粉に対する反応性が時間依存的であることも明らかにした<sup>5</sup>。これらの研究は概日時計（時計遺伝子）がアレルギー反応の制御因子の1つであることを示し、“時間アレルギー学（Chronoallergy）”という研究分野を開拓した<sup>6</sup>。さらに、食物アレルギー症状は、食物アレルゲン（食物アレルゲン）を休息期に摂取したときのほうが活動期に摂取したときよりも悪化すること、この食物アレルギー症状の時間帯による重症度変化は、概日時計（時計遺伝子）によってコントロールされていることを報告した<sup>7</sup>。しかしながら、概日時計が時間帯によって食物アレルギー症状をコントロールするメカニズムは未だ明確ではない。

これらの背景から、本研究ではマスト細胞の概日時計（時計遺伝子）が食物アレルギー症状の日内変動に果たす役割について検討した。アナフィラキシーショックなどの食物アレルギー症状が休息期に食物を摂取したときのほうが重症になることはヒトでも知られている。したがって、活動期に食物アレルギー症状が重症になりにくいメカニズムを解明することは新しい発想の食物アレルギーの予防・治療法の開発につながる可能性がある。

## 研究計画及び研究手法

### 1, マスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスの作製

マスト細胞欠損 W/W<sup>v</sup> マウスに野生型マウスまたは時計遺伝子 Clock 変異型マウスの骨髄由来培養マスト細胞（Bone Marrow-derived culture Mast Cells: BMDCs）を静脈内に投与し（全身性のマスト細胞の移入）マスト細胞だけ時計遺伝子機能が障害されたマウスを作製した。移入したマスト細胞が生着したか否かを両マウスの背部皮膚を採取し、トルイジンブルーを用いて染色（マスト細胞のみが赤紫に染色される）し確認した。

### 2, マスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスを用いた卵白アルブミン(OVA)感作モデルの作製

上記で作成したマスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスと OVA と水酸化アルミニウム(Alum)を1週間に1度(Day1, 8の2回)腹腔内に投与し、OVAに感作(OVAアレルギー)した。Day14に採血し、血中OVA特異的IgE濃度をELISA法を用いて測定し、アレルギーモデル作成の可否を判定した。その後、感作が確認できたマウスを用いて、AM10:00とPM10:00にOVA(50mg/kg)を静脈内投与し、10分ごとに直腸体温を測定し症状の強弱を比較検討した。投与10分後または180分後に採血を行い、血清を回収し血中ヒスタミン濃度または血中CCL2(MCP-1)濃度をELISA法を用いて測定し症状の強弱を比較検討した。

### 3, マスト細胞の概日時計による食物アレルギー症状の時間依存的制御において重要な遺伝子候補の同定

野生型 BMMCs と Clock 変異型 BMMCs を作成し、培養開始から 6 時間後と 18 時間後に mRNA を回収し、マイクロアレイ法を用いて網羅的に遺伝子発現を比較検討した。

#### 計画と異なる点

マスト細胞特異的時計遺伝子変異(Clock 変異型マウス由来 BMMCs)マウス作製は計画書通り行えたが、別の主要な時計遺伝子変異型マウス(Period2 変異型)を用いた検討を行うことができなかった。理由として Clock 変異型マウス由来 BMMCs を用いたマスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスの実験を行う検体数まで作製することが困難であったため、計画を変更し Clock 変異型マウス由来 BMMCs を用いた検討のみにした。

OVA 特異的 IgE を静脈投与し、OVA 感作モデルを作成する計画であったが、実際の食物アレルギー患者と同様な感作状況と似たモデルで比較検討を行うため OVA とアジュバンド(Alum)を用いたアレルギーモデル作製法に変更した。また、症状を惹起する方法として、大量のアレルゲン(OVA)を経口投与方法を用いて行う計画であったが、症状の誘発が不十分であったため徐脈内投与方法に変更し比較検討を行った。

腸管マスト細胞を単離し、mRNA の回収を試みたが解析に必要な量を回収することが困難であったため(1 検体から得られる mRNA 量が少ない、Clock 変異型マウスの繁殖等)、BMMCs を用いて比較検討を行った。

## 結果と考察

### 1, マスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスの作製

マスト細胞欠損 W/W<sup>v</sup> マウスに野生型マウスまたは時計遺伝子 Clock 変異型マウス由来 BMMCs を静脈内に投与し(全身性のマスト細胞の移入)、マスト細胞だけ時計遺伝子機能が障害されたマウスを作製した結果、約 2 か月後に野生型マウス由来 BMMCs および Clock 変異型マウス由来 BMMCs が同様に生着していることが確認できた(Fig. 1)。

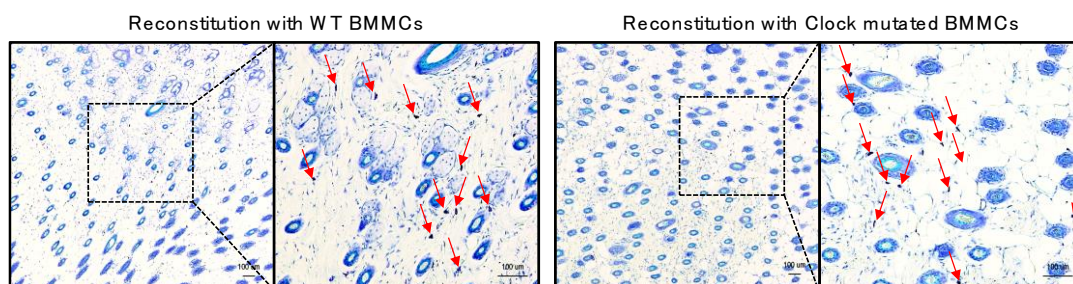


Fig. 1 Toluidine blue staining.

Toluidine blue staining of mast cells (indicated by red arrows) on the back skin of mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice reconstituted with i.v. injections of BMMCs derived from wild-type or Clock mutated mice. Scale bar = 100  $\mu$ m.

## 2, マスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスを用いた卵白アルブミン(OVA)感作モデルの作製

上記で作成したマスト細胞特異的時計遺伝子変異マウスに OVA と水酸化アルミニウム(Alum)を1週間に1度(Day1, 8の2回)腹腔内に投与し、OVAに感作(OVAアレルギー)した。Day14に採血し、血中OVA特異的IgE濃度をELISA法を用いて測定した結果、野生型BMMCsまたはClock変異型BMMCsを移入したマウスともにOVA特異的IgEの上昇が認められ、感作が成立していることが確認できた。

その後、感作が確認できたこれらのマウスを用いて、AM10:00とPM10:00にOVA(50  $\mu$ g/kg)を静脈内投与し、5分ごとに直腸体温を測定し症状の強弱を比較検討した結果、野生型BMMCsではPM10:00よりもAM10:00における症状が強い傾向にあることが確認できた。一方、Clock変異型BMMCsを移入したマウスではAM10:00とPM10:00における体温低下がほぼ同程度であることが確認できた。さらに、投与10分後または180分後に採血を行い、血清を回収し血中ヒスタミン濃度または血中CCL2(MCP-1)濃度をELISA法を用いて測定し症状の強弱を比較検討した結果、野生型BMMCsではPM10:00よりもAM10:00における血中ヒスタミン濃度、血中CCL2(MCP-1)濃度が高い傾向にあることが確認できた。一方、Clock変異型BMMCsを移入したマウスではAM10:00とPM10:00における血中ヒスタミン濃度、血中CCL2(MCP-1)濃度がほぼ同程度であることが確認できた。さらに、感作したマウスからAM10:00またはPM10:00に腹腔マスト細胞を採取し、IgE結合量を抗IgE抗体を用いて検出した結果、10時に採取した腹腔マスト細胞上に結合するIgE量が多いことが野生型BMMCsを移入したマウスで確認でき、Clock変異型マウスではほぼ同程度であることが確認できた。

## 3, マスト細胞の概日時計による食物アレルギー症状の時間依存的制御において重要な遺伝子候補の同定

野生型BMMCsとClock変異型BMMCsを作成し、培養開始から6時間後と18時間後にmRNAを回収し、マイクロアレイ法を用いて網羅的に遺伝子発現を比較検討した結果、その結果、時計遺伝子(Per2, Bmal1など)の時間依存的発現でき、さらに食物アレルギーの症状と関連する遺伝子としてIgE受容体(Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ )の発現量に時間依存的発現変動が確認できた(Fig. 2)。

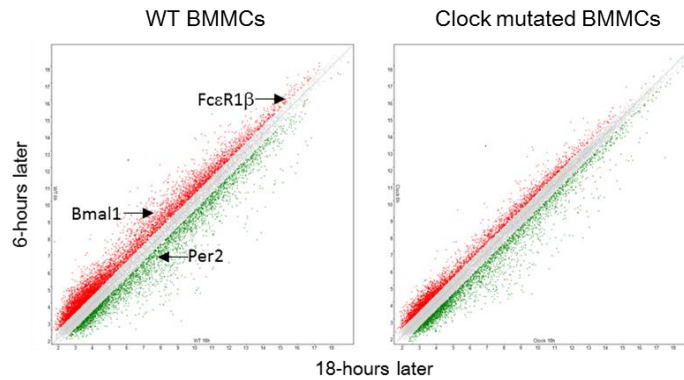


Fig. 2 Gene expression in wild-type or Clock mutated BMMCs

BMMCs were analyzed using whole-transcriptome microarray analyses. The data from the microarray are graphed on a scatter plot to visualize variations in gene expression between arrays. The values on the X and Y axes of the scatter plot are the normalized signal values for the samples (log2 scaled). The gray zone are fold-change lines (the default fold-change value is 2.0).

以上の結果から、本研究ではマスト細胞の概日時計が食物アレルギーの症状発現の時間依存的な制御に果たす役割の一つとして、IgE 受容体の概日リズム性発現変動である可能性が食物アレルギーモデルマウスを用いた検討から示唆された。

我々はこれまでに受動型のアレルギーモデルマウスを用いた実験で皮膚におけるアレルギー症状増悪の周期性が FcεR1 の概日リズム性発現に依存することを明らかにしてきたが、本研究ではさらに臨床に近い食物アレルギーモデルを用いても同様に FcεR1 の概日リズム性発現に依存することを確認できた。しかしながら、野生型 BMMCs を移入したマウスを用いて行った症状の解析では、時間依存的な症状の変動がある可能性を示すことはできたが、まだ確証に至っていない。この点については今後検体数を増やす、移入するマスト細胞数を増やしマスト細胞再構築モデルの改善を試みる必要があると考えられる。

また、マイクロアレイ法を用いて網羅的に BMMCs の遺伝子発現を検討した結果、食物アレルギーと関連する因子として FcεR1 が確認することができたが、さらに新規の因子を同定することが今後の課題であると考えられる。

本研究の成果は上述した課題を解決し、平成 29 年度内に成果をまとめ、学会・論文発表を行う予定である。

## 今後の研究活動について

本研究によってマスト細胞自体の概日時計が食物アレルギー症状の強さを時間依存的に調節していること、かつ時計遺伝子タンパク質によるこの調節機構の一端が明らかになることが予想される。さらに、本研究の成果からマスト細胞の時計遺伝子タンパク質あるいはこの時計遺伝子タンパク質が制御する標的分子や経路をコントロールすることによって、食物アレルギー症状（特にアナフィラキシーショック）における新しい予防や治療法の開発に結びつくことが予想できることから、新規薬剤の開発を目指したいと考えている。

また、概日時計は、精神的ストレス、外気温、不眠などの睡眠障害、高脂肪食（肥満）などによって影響をうけることがよく知られている。これらの要因は食物アレルギーを含むアレルギー症状の増悪因子であることが知られているがそのメカニズムは未だ解明されていない。本研究成果を生かし、これらの因子と食物アレルギー症状との関係についても明らかにしていきたい。

また、アレルゲンとなる食物の摂取時間によって食物アレルギー症状が変化するという知見は患者さんへの注意を喚起することや服薬時間を調節するなどに活用することができ、既に臨床的有用性があると考えられる。

## 参考文献

- 1) Y. Nakamura, D. Harama, N. Shimokawa et al. Circadian clock gene Period2 regulates a time-of-day-dependent variation in cutaneous anaphylactic reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011; 127(4): 1038–1045.
- 2) 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*. 2014; 133(2): 568-575.e12.
- 3) Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Ando N, Katoh R, Suzuki-Inoue K, Koyanagki 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*. 2016; 137(4): 1226-1235.
- 4) 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. 2015; 70(3): 319-322.
- 5) Nakao A, Nakamura Y, and Shibata S. The Circadian Clock Functions As A Potent Regulator of Allergic Reaction. [Review] 2015; 70(5): 467-473.
- 6) Nakamura Y, Ishimaru K, Tahara Y et al. Disruption of the Suprachiasmatic Nucleus Blunts

A Time of Day-Dependent Variation in Systemic Anaphylactic Reaction in Mice. Journal of Immunology Research. 2014; vol.2014 Article ID474217. work.)

以上