

山梨県若手研究奨励事業 研究成果報告書

所属機関名 山梨大学大学院総合研究部免疫学講座
職名・氏名 講師・中村勇規

1. 研究テーマ

概日時計によるアナフィラキシーショック制御機構の解明

2. 研究の背景

2-1. アナフィラキシーショック

アナフィラキシーショックは食物やハチ、薬物等にアレルギーをもつ患者がそれらのアレルゲンに高度に暴露されたときに、アレルゲンに特異的に結合するIgEを結合したマスト細胞からヒスタミン等の化学物質の過剰放出によって血圧が低下し生命が脅かされる状態である。特に小児においては学校給食における食物アレルギー性のアナフィラキシーショックの発症が社会的に極めて問題となっている。このようなアレルギー性疾患の中で最重症の病態の1つにもかかわらずアナフィラキシーショックの制御機構の理解はここ数十年間ほとんど進歩していない。

2-2. 概日時計

地球上の動植物は、地球の自転にともなう周期的な昼夜の繰り返しに適応するように、自身の体内に概日リズム（約24時間周期性のリズム）を刻む“時計”を進化させてきた。この「概日時計」が、行動や生理活動における概日リズムを生み出している。

ほ乳類では、この「概日時計」の中心は、脳の視床下部にある視交叉上核(SCN)という神経細胞の集まりに存在する。この神経細胞では、*Clock*や*Period2(Per2)*などの時計遺伝子が概日性に発現の増減を繰り返すことで振動体として機能し、その結果周期性のある電気活動が生み出され、睡眠や覚醒、体温、血圧、ホルモン分泌など様々な生体の概日リズム性の生理機能を調節している。

一方、「概日時計」(時計遺伝子)は、実はほぼ全身の細胞に存在し、1つ1つの細胞が自律的に時を刻んでいる(末梢時計)ことが近年明らかにされた。それらは、個々の臓器や組織における固有の生理機能に概日リズムをもたらしている。これらの末梢時計の時刻は、外界の光によって時刻を調整できるSCNにある中枢時計によって、自律神経や内分泌系

を介して同調される。つまり、概日時計は、体全体で調和のとれた1つのシステムとして、機能している。(図1)

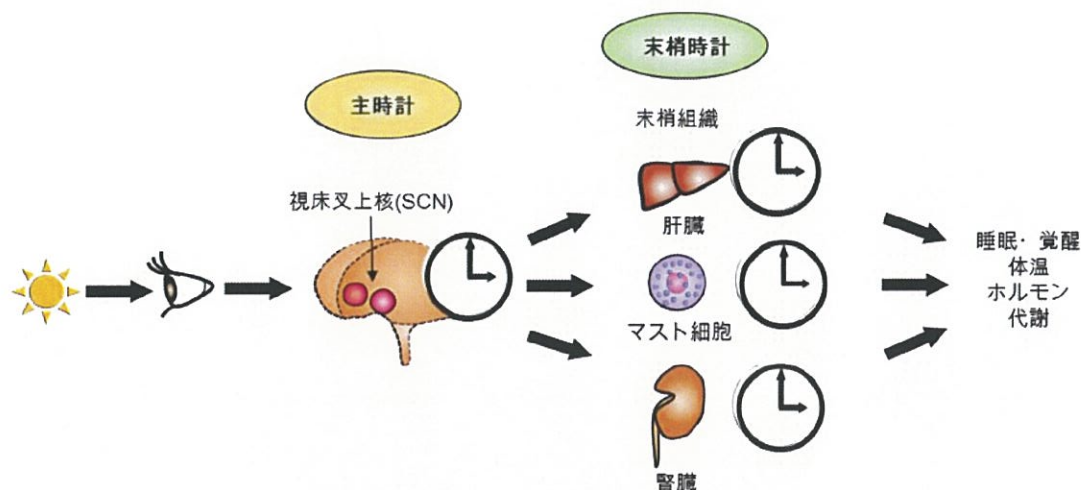


図1. ほ乳類における概日時計システム

2-3. アナフィラキシーショックと概日時計

我々はアナフィラキシーショックが惹起される時間帯でその重症度に違いがあること(活動期に惹起されると弱く、休息期には強い)、また時計遺伝子 *Per2* 変異マウスや SCN 破壊マウスではこのアナフィラキシーショックの日内変動が消失することを見出した(図2)(*J Allergy Clin Immunol*:JACI 2011, *J Immunol Res* 2014)。

これらの結果は、概日時計がアナフィラキシーショックを制御するしくみの1つであることを明らかにした。しかしながら、これらの結果は実際のヒトにおけるアナフィラキシーショックとは異なる(IgE を受動的に投与して各時間にアレルゲンを投与して惹起したマウスモデル)ことなどを考えると、概日時計がアナフィラキシーショックを制御するしくみの詳細は未だ不明な点が多い。

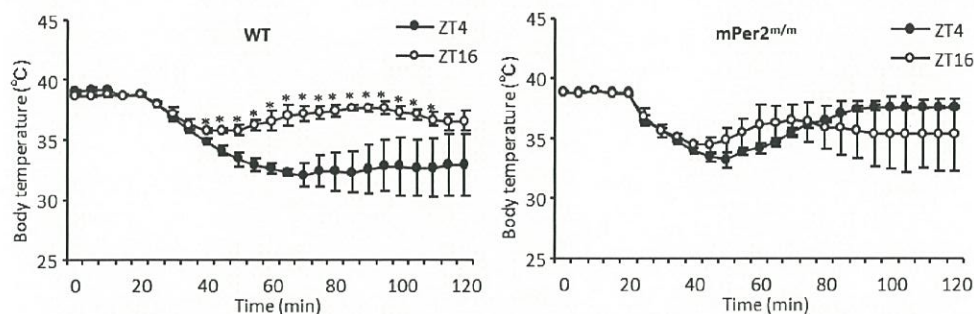


図2. 野生型、*Per2*変異マウスにおけるpassive systemic anaphylactic (PSA)反応 ZT4(AM10:00), ZT16(PM10:00)においてPSA反応を惹起すると野生型マウスではZT4(休息期)にZT16(活動期)より体温低下が著明となるが*Per2*変異マウスではそのような日内変動が見られない(JACI 2011)。

3. 研究の目的

以上の背景から、本研究では概日時計によるアナフィラキシーショックの時間依存的な制御のしくみを解明し、その新知見をアナフィラキシーショックの予防/治療へと結びつけることを目指す。アナフィラキシーショックでは IgE 刺激によるマスト細胞の活性化反応が重要な役割を果たしていることから、特にマスト細胞の概日時計がアナフィラキシーショックの時間依存的な制御に果たす役割およびその制御のメカニズムについて主として解析する。

4. 研究の方法

4-1. アナフィラキシーショックの時間依存的制御機構にかかわるマスト細胞遺伝子（群）の探索

マウス骨髄細胞由来培養マスト細胞(Bone-marrow derived culture mast cells: BMMCs)を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(*Clock*^{d19/d19})から作製し、培養開始から 6 時間、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アナフィラキシーショックに関連する遺伝子の発現を比較検討した。

さらに、野生型マウスを用いて、卵白アルブミン(OVA)及びアラム(Al(OH)₃)アジュバントを 1 日目と 7 日目に腹腔内に投与し、OVA に感作させ OVA アレルギーモデルマウスを作製した。その後、14 日目に腹腔マスト細胞上における IgE 結合量を経時的に測定した。

4-2. マスト細胞の概日時計がアナフィラキシーショックの時間依存的制御に果たす役割の検討

野生型マウスを用いて、卵白アルブミン(OVA)及びアラム(Al(OH)₃)アジュバントを 1 日目と 7 日目に腹腔内に投与し、OVA に感作させ OVA アレルギーモデルマウスを作製した。このマウスを用いて、アレルギーを有する個体を用いたアナフィラキシーショックモデルである ASA(active systemic anaphylactic)反応を 10 時と 22 時に OVA を静脈内投与することで誘導し、体温低下、血中ヒスタミン濃度について比較検討した。

5. 研究成果

5-1. 高親和性 IgE 受容体 (FcεR1) は概日リズムを示す

マウス骨髄誘導培養マスト細胞 (BMMCs) を野生型マウスと時計遺伝子 *Clock* 変異マウスから作製し、マイクロアレイ法を用いて網羅的にアナフィラキシーショックに関連する遺伝子発現傾向を解析した。その結果、時計遺伝子 (*Per2*, *Bmal1* など) の時間依存的発現でき、さらにアナフィラキシーショックと関連する遺伝子として IgE 受容体 (*FcεR1β*) の発現量に時間依存的発現変動が確認できた (図 3)。

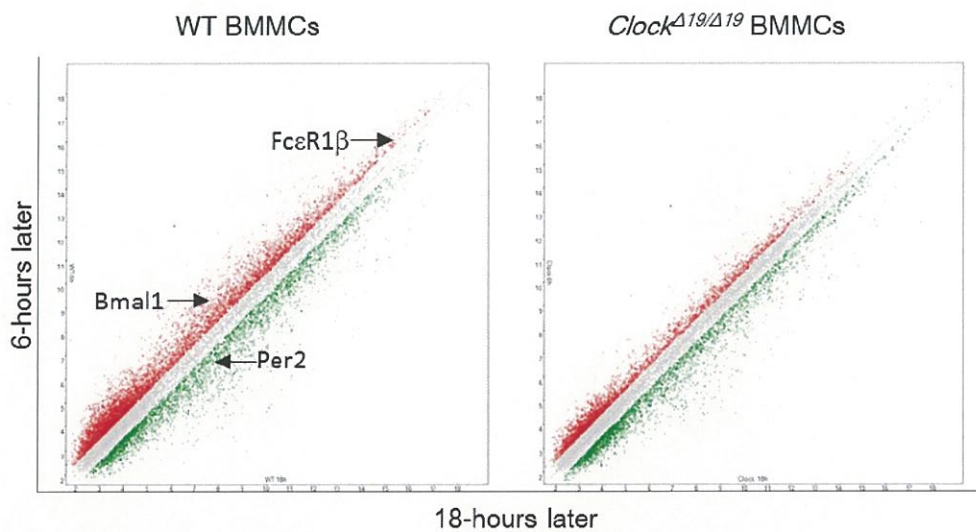


図3. 野生型(WT)または時計遺伝子*Clock*変異(*Clock*^{Δ19/Δ19})BMMCsにおける時間依存的遺伝子発現
WTまた*Clock*^{Δ19/Δ19} BMMCsの培養開始から6、18時間後の遺伝子発現量。WT BMMCsでは1.5倍以上
発現変動がみられる遺伝子数が約6000種に対し、*Clock*^{Δ19/Δ19} BMMCsでは約1000種だった。
赤: 6時間後に18時間後と比べ高く発現している遺伝子、緑: 18時間後に6時間後と比べ高く発現している遺伝子

さらに、卵白アルブミン(OVA)と Alum アジュバンドを用いて感作したマウスから 10 時または 22 時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 量が多いことが明らかとなった(図 4-A, B)。また、各時間に腹腔マスト細胞を回収したマウスの感作レベル(アレルギーの重症度)に違いがないことも、血中 OVA 特異的 IgE を測定することで確認した(図 4-C)。

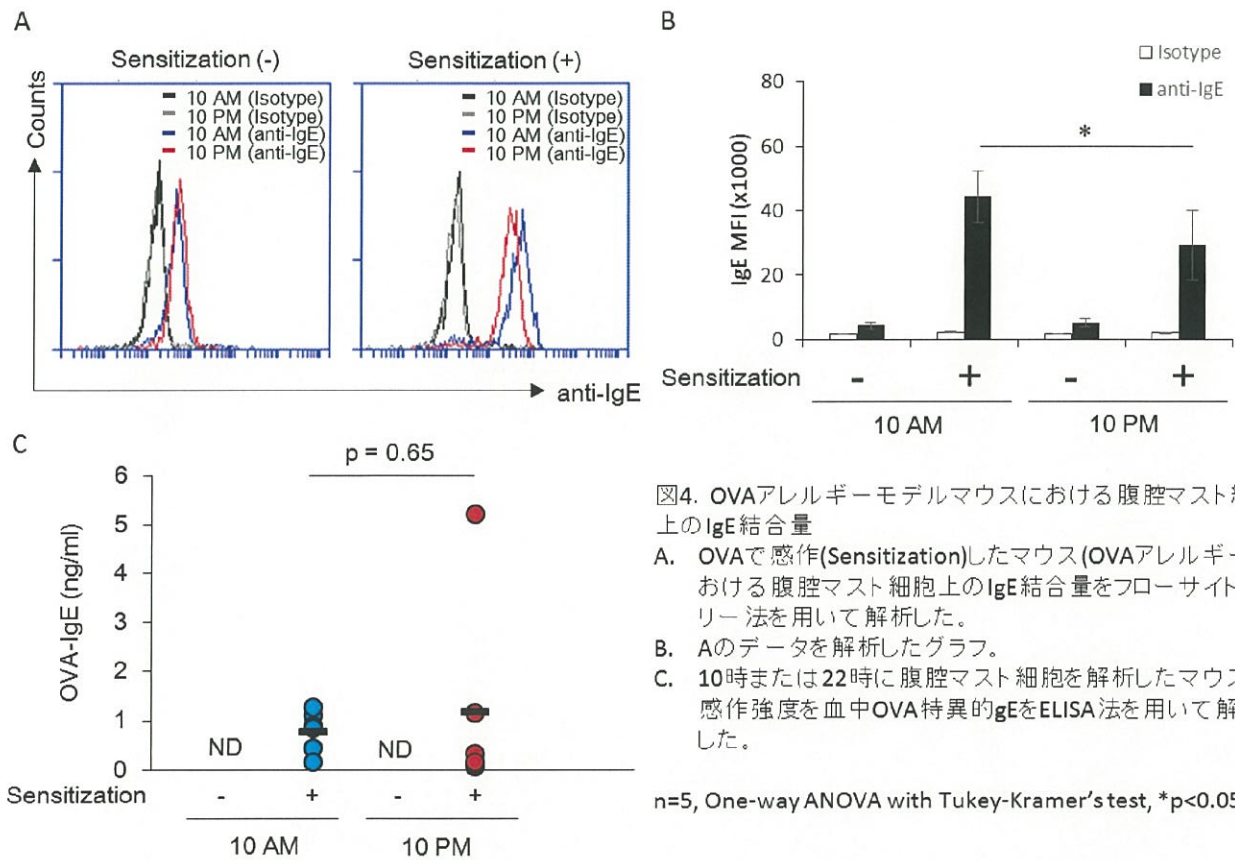


図4. OVAアレルギーモデルマウスにおける腹腔マスト細胞上のIgE結合量

A. OVAで感作(Sensitization)したマウス(OVAアレルギー)における腹腔マスト細胞上のIgE結合量をフローサイトメトリー法を用いて解析した。

B. Aのデータを解析したグラフ。

C. 10時または22時に腹腔マスト細胞を解析したマウスの感作強度を血中OVA特異的IgEをELISA法を用いて解析した。

n=5, One-way ANOVA with Tukey-Kramer's test, *p<0.05

5-2 アナフィラキシーショックの症状増悪時間はFcεR1の概日リズム性発現に依存する

上記のBMMCsと腹腔マスト細胞を用いた実験からマスト細胞の概日時計は高親和性IgE受容体の発現変動を制御し、アレルギーのマウスモデルにおけるマスト細胞上のIgE結合量に概日リズムが明らかになった。そこで、我々は次にこの結果がアナフィラキシーショックの症状と相関するか否かをOVAアレルギーモデルマウスを用いて検討した。

上述した方法で、OVAに対するアレルギーモデルマウスを作成し、10時または22時にOVAを静脈内投与することでアナフィラキシーショックを誘導し直腸体温を指標として重症度を比較・検討した。その結果、22時よりも10時にアナフィラキシーショックを誘導したマウスにおける体温が顕著に低下していることが明らかとなった。加えて、アナフィラキシーショックで中心的な役割を果たすヒスタミン血中濃度もこの症状と同様に、22時よりも10時に顕著に上昇していた。これらの結果は上述した腹腔マスト細胞上のIgE結合量と相関し、アナフィラキシーショックの時間依存的症状増悪を示すメカニズムとして、

FcεR1 の概日リズム性発現に依存することが示唆された。

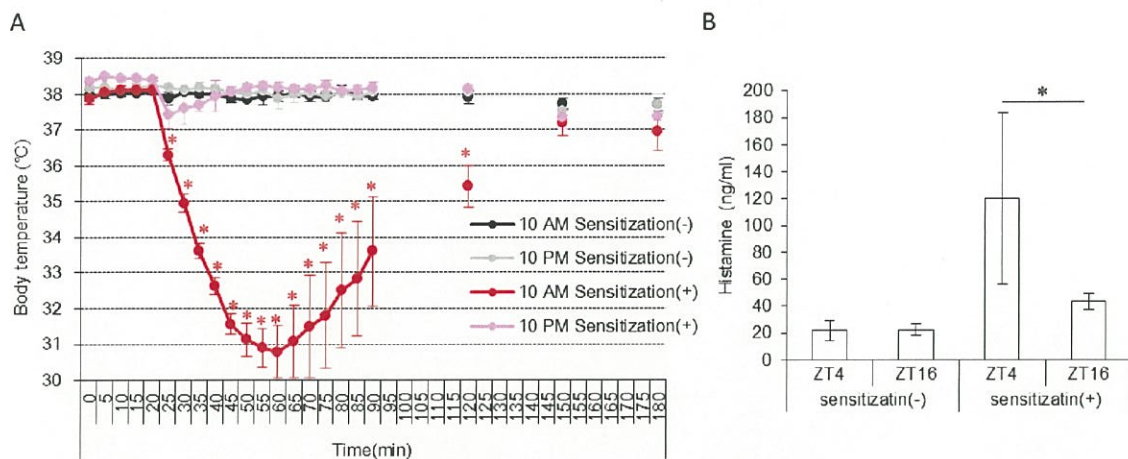


図5. OVAアレルギーモデルマウスにおけるアナフィラキシーショックは概日リズムを示す
 A. OVAに対するアレルギーモデルマウスを作成し、10時または22時にOVAを静脈内投与し、直腸体温を測定した。
 B. Aで用いたマウスから180分後に血液を採取し血中ヒスタミン濃度をELISA法を用いて測定した。
 n=5, One-way ANOVA with Tukey-Kramer's test, *p<0.05

6. 考察

以上の結果から、本研究ではマスト細胞の概日時計がアナフィラキシーショック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ことがOVAアレルギーモデルマウスで明らかとなった。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のアナフィラキシーショックに近い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、時計遺伝子変異マウス、マスト細胞欠損マウスを用いていないこと、さらに概日時計を何らかの方法を用いてコントロールし症状が緩和・増悪するか否かについての検討を行っていないこと等を考えると、さらなる検討を行いデータの補強が必要であると考えられる。