

氏名	長坂 優香
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第86号
学位授与年月日	令和6年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	Deficiency of BMAL1 promotes ROS generation and enhances IgE-dependent degranulation in mast cells (BMAL1 の欠失はマスト細胞の ROS 産生を増加させ IgE による脱顆粒反応を亢進させる)
論文審査委員	委員長 教授 櫻井 大樹 委員 教授 吉野 修 委員 講師 三井 広

## 学位論文内容の要旨

### Background

*Bmal1* (*Brain and muscle arnt-like*, or *Arntl*) is a bHLH/PAS domain transcription factor central to the transcription/translation feedback loop of the circadian clock. *Bmal1* forms a heterodimer with the protein product encoded by the *Clock* gene. This heterodimer in turn binds genes with E-box elements such as *Per 1*, *Per 2*, *Per 3*, *Cry 1*, and *Cry 2* to activate their transcription. PER and CRY proteins can inhibit CLOCK/BMAL1 heterodimer activity, which leads to formation of a negative feedback loop. Mast cells are crucial for effector functions in allergic reaction and their activity follows a circadian rhythm. In previous studies employing mouse models with mutations in clock genes such as *Clock* and *Per 2*, reports have suggested a dependence on the circadian clock in IgE-dependent mast cell activation. However, the functional roles of *Bmal1* in mast cells remain to be determined. This study aimed to elucidate the specific roles of *Bmal1* in IgE-dependent mast cell degranulation.

### Materials and Methods

*Bmal1*-deficient mice (*Bmal1*-KO mice) and wild-type mice (WT mice) were used. Bone marrow-derived mast cells (BMMCs) were generated from mice femoral bone marrow cells and cultured. Cultures were maintained under conditions with or without 0.1% 2-Mercaptoethanol (2-ME). Mast cell-deficient C57BL/6-Kit<sup>W-sh</sup> mice were reconstituted with subcutaneous injections of BMMCs ( $1.5 \times 10^6$ /mouse) derived from WT or *Bmal1*-KO mice.

### Results

We found that IgE-dependent degranulation was more robust in *Bmal1*-KO BMMCs than in WT BMMCs in the absence of 2-ME in culture, as determined by the  $\beta$ -hexosaminidase release assay. The extent of Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reactions in *Bmal1*-KO mice was also more robust than those in WT mice, though the number of mast cells in mouse back skin was comparable between WT and *Bmal1*-KO mice. Mast cell-deficient Kit<sup>W-sh</sup> mice reconstituted with *Bmal1*-KO BMMCs showed more robust PCA reactions than Kit<sup>W-sh</sup> mice reconstituted with WT BMMCs. In the absence of 2-ME in culture, the mRNA expression of the anti-oxidative genes NF-E2-related factor 2 (*Nrf2*), superoxide dismutase 2 (*SOD2*), and *heme*

*oxygenase-1 (HO-1)* was lower and reactive oxygen species (ROS) generation was higher in *Bmal1*-KO BMBCs than in WT BMBCs at steady state. Exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased apoptosis of *Bmal1*-KO BMBCs compared with WT BMBCs in the absence of 2-ME in culture, which was associated with enhanced ROS generation and impaired *Nrf2* and *SOD2* mRNA induction.

## Discussion

There was report suggesting that the circadian clock regulates the expression and activity of mitochondrial anti-oxidant enzymes and redox homeostasis in several tissues. For instance, investigations have revealed a heightened expression of *Bmal1* in hepatocytes in mice afflicted with metabolic-associated fatty liver disease, demonstrating a negative correlation with increased ROS accumulation. This study suggests that this is also the case in mast cells, which is linked to enhanced IgE-dependent degranulation. Thus, the current results uncover a role for *Bmal1* in regulating anti-oxidative responses in mast cells to control IgE-dependent degranulation. The present findings additionally showed that 2-ME in cell culture could have significant impact on intracellular ROS generation and IgE-dependent degranulation in mast cells. It remains unclear whether this observation is specific to mast cells, but the results suggest that we should be cautious to evaluate cellular physiological outputs in the presence of 2-ME in in vitro cell culture system since 2-ME can affect intracellular ROS levels.

## Conclusion

The current findings suggest that *Bmal1* controls the expression of anti-oxidative genes in mast cells and *Bmal1* deficiency enhanced IgE-dependent degranulation associated with promotion of ROS generation. Thus, *Bmal1* may function as a key molecule that integrates redox homeostasis and effector functions in mast cells.

## 論文審査結果の要旨

背景として、体内には外の光を捉えて細胞の活動を周期する機構が存在し、いわゆる体内時計として時計遺伝子が生体の概日リズムを制御している。喘息やアレルギー性鼻炎などアレルギー性疾患を有する患者において1日の中で夜や明け方などに症状が増悪することが知られるが、その機序については良く分かっていない。マスト細胞はアレルギー応答において中心的な役割を持つ細胞の一つであり、IgE依存性に抗原の刺激を受けて活性化し、ヒスタミンなどアレルギー症状を誘導する物質を放出する。今回、長坂優香氏は、時計遺伝子の一つである *Bmal1* に注目し、IgE依存性のマスト細胞の活性化機能における役割を研究し報告した。

長坂氏は、*Bmal1* ノックアウトマウスから骨髄由来マスト細胞を培養誘導し、野生型マウス由来のマスト細胞と機能を比較した。両者においてマスト細胞の成熟及び、IgE レセプターやシグナル伝達分子の発現には差異がないことを確認した。マスト細胞からの IgE 依存性脱顆粒応答について  $\beta$ -hexosaminidase 放出アッセイにより検討を行った。その結果、2ME 非存在下に *Bmal1* ノックアウトマウス由来のマスト細胞において脱顆粒の増強が認められた。特に、当初の実験系において両者の差異が軽微であったが、細胞培養液には抗酸化剤である 2ME がオリジナルのプロトコールでは添加されるが、2ME を除いた培養条件を設定することで、反応の違いをより明確にすることに成功した。in vivo での応答については、皮膚のアレルギー誘発反応である passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応により検討を行った。*Bmal1* ノックアウトマウスにおいて PCA 反応がより強くなることを確認した。また、*Kit<sup>w-sh</sup>* マスト細胞欠損マウスに *Bmal1* ノックアウトマウス由来のマスト細胞を移入し再構成したマウスにおいても、野生型と比較し PCA 反応が増強することを確認した。さらに、機序の解析として、*Bmal1* ノックアウトマウス由来のマスト細胞を 2ME 非存在下に培養したところ、抗酸化遺伝子である

Nrf2、SOD2、HO-1 の mRNA 発現が低下しており、活性酸素種の産生が亢進していることを明らかにした。さらに、H2O2 曝露による細胞のアポトーシスを誘導する実験系において、Bmal1 ノックアウトマウス由来のマスト細胞はアポトーシスを誘導しやすくなることを示し、Bmal1 はマスト細胞の酸化ストレスに対する耐性を制御していることを明らかにした。

本研究論文は、時計遺伝子の一つである Bmal1 が抗酸化作用を制御することで、IgE 依存性のマスト細胞の活性化を制御していることを初めて明らかにしたものであり、その学術的意義は大きいと評価する。

長坂氏は、学位審査発表会のプレゼンテーションにおいて、Bmal1 の時計遺伝子としての機能、他の時計遺伝子との関連性、また時計遺伝子とアレルギー反応との関係について分かりやすくまとめて提示した。さらに、Bmal1 とマスト細胞機能との関連性という仮説に対して、実験や検討を堅実に行って結果を出すとともに、複数の実験系により検証を行っており、実験およびデータは信頼性の高いものと考えられた。実験結果に対する考察も分かりやすく提示され、実験結果に対する解釈や発展性についても理解を深められる内容であった。

審査員より、さらに背景や実験系、結果の解釈、研究の展開などに関し多くの質問があったが、それらに対し現状の理解とともに、問題点や課題などを示し、本論文の今後の発展性についても誠実に回答していた。アレルギー反応における時計遺伝子の関連を示したことで、アレルギー疾患への応用、新たな治療法への発展が期待されるものと感じられた。

以上より、長坂氏の学位論文について、学位にふさわしいものと審査員が全員一致し評価した。