

氏 名	中村 勇規
博士の専攻分野の名称	博 士 (医科学)
学 位 記 番 号	医工博甲 第 281 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 6 年 3 月 2 0 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
専 攻 名	人間環境医工学専攻 (生体環境学コース)
学 位 論 文 題 名	Circadian regulation of allergic reaction by the mast cell clock in mice (マウスにおけるアレルギー反応の日内変動はマスト細胞の内在時計によって制御される)
論 文 審 査 委 員	委員長 教授 桐戸 敬太 委 員 准教授 犬飼 岳史 委 員 講 師 三枝 岳志

学位論文内容の要旨

(Background)

Allergic diseases are characterized by symptoms that exhibit prominent 24-hour variations. Although these phenomena have been recognized for decades, the precise mechanisms remain enigmatic. The circadian clocks drive daily rhythms in physiology that enable organisms to keep track of the time of day. In mammals the circadian clocks present in nearly all cells, including mast cells, drive the daily rhythms of physiology. The mechanisms of rhythm generation are based on transcriptional-translational feedback loops, wherein two transcription factors, CLOCK and BMAL1, activate the transcription of the *Period (Per)* and *Cryptochrome (Cry)* genes. The PER and CRY proteins in turn inhibit their own expression by repressing CLOCK/BMAL1 activity. Recently, we have shown that the circadian clocks drive the daily rhythms in IgE/mast cell-mediated allergic reactions (Nakamura et al, 2011). **However, the precise mechanisms, particularly the specific roles of the mast cell-intrinsic clockwork in the temporal regulation, have been unclear.**

(Objective)

This study aimed to determine whether the mast cell clockwork contributes to the temporal regulation of IgE/mast cell-mediated allergic reactions.

(Methods)

The kinetics of a time-of-day-dependent variation in passive cutaneous anaphylactic (PCA)

reaction were compared between mast cell-deficient (W/W^v) mice reconstituted with bone marrow-derived cultured mast cells (BMCMCs) generated from mice with wild-type allele and with a dominant-negative type mutation of a key clock gene *Clock*. In addition, we examined the temporal responses of wild-type and *Clock*-mutated BMCMCs to IgE stimulation *in vitro*. Furthermore, factors influencing the mast cell clockwork were determined using *in vivo* imaging.

(Results)

1. The mast cell clock times PCA reaction

The extent of PCA reactions showed a time-of-day-dependent variation in W/W^v mice reconstituted with wild-type BMCMCs. This variation was absent in W/W^v mice reconstituted with *Clock*-mutated BMCMCs. In contrast, the daily profiles and levels of serum corticosterone (CORT) was comparable between the mice.

2. IgE-mediated mast cell responses show temporal variations *in vitro*

The extent of IgE-mediated β -hexosaminidase release and the total tyrosine phosphorylation levels of cell lysates were significantly higher in the 12-hour cultured wild-type BMCMCs than in the 24-hour cultured wild-type BMCMCs. These temporal variations were absent in *Clock*-mutated BMCMCs.

3. *Fc ϵ RI β* transcription is under circadian control by the mast cell clock

A qPCR analysis revealed that *Fc ϵ RI β* showed circadian mRNA expression with a peak at around 8 hours, and with a nadir at around 20 hours after a medium change in wild-type BMCMCs. The circadian oscillation of *Fc ϵ RI β* mRNA was not observed in *Clock*-mutated BMCMCs.

4. CLOCK binds to the promoter of *Fc ϵ RI β* and modulates its transcription

To directly show that *Fc ϵ RI β* is a target of the mast cell clockwork, we performed ChIP assays using anti-CLOCK antibody. CLOCK bound to the promoter of *Fc ϵ RI β* in the 6-hour and 24-hour, but not 12-hour, cultured wild-type BMCMCs. *Fc ϵ RI β* mRNA levels decreased in association with the reduction of IgE-mediated β -hexosaminidase release in *Clock* siRNA-treated wild-type BMCMCs.

5. The adrenal gland is important to synchronize the mast cell clockwork

The addition of CORT induced *Per2* mRNA expression in wild-type BMCMCs, but not in *Clock*-mutated BMCMCs. The bioluminescence emission from W/W^v mice subcutaneously reconstituted with PER2::LUC BMCMCs showed a time-of-day-dependent variation in the PER2::LUC protein in sham-operated mice, with a peak at 10:00 PM, whereas adrenalectomy resulted in the absence of the variation.

(Discussion)

The extent of the PCA reactions showed a time of day-dependent variation in W/W^v mice reconstituted with wild-type BMCMCs. In contrast, this variation was absent in W/W^v mice reconstituted with *Clock*-mutated BMCMCs. Additionally, CORT did not induce *Per2* mRNA in *Clock*-mutated BMCMCs suggesting that the circadian clock in *Clock*-mutated mast cells cannot reset its clockwork according to a systemic timing cue. Because the daily profiles and levels of

serum CORT were comparable between the mice, these findings strongly suggest that the mast cell-intrinsic clockwork is critical to the circadian regulation of PCA reactions. We also found that $Fc\epsilon RI \beta$ is a key molecule that links the mast cell clockwork and IgE-mediated mast cell responses. Because $Fc\epsilon RI \beta$ is a critical modulator of $Fc\epsilon RI$ expression and signaling, CLOCK targeting $Fc\epsilon RI \beta$ might be a reasonable strategy for temporally fine tuning $Fc\epsilon RI$ signaling in mast cells. The *in vivo* imaging of W/W^v mice reconstituted with PER2::LUC BMCMCs study suggests that CORT might function as a timing signal to reset the mast cell clockwork. We suggest that the circadian clock in mast cells is a primary driver for the daily rhythm generation in IgE/mast cell-mediated allergic reaction. Our results reveal a novel regulatory mechanism for IgE-mediated mast cell response that may underlie the circadian pathophysiology in allergic diseases.

(Conclusion)

The mast cell-intrinsic clockwork, entrained by humoral factor(s) from the adrenal gland, primarily contributes to the temporal regulation of IgE/mast cell-mediated allergic reaction.

論文審査結果の要旨

1. 学位論文研究テーマの学術的意義

本研究論文はアレルギー応答と生体の日内周期との関連がテーマである。発表者は、これまでにマスト細胞の脱顆粒反応が個体レベルでの日内時計により制御されていることを明らかにしている(参考文献; Nakamura Y et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2011)。今回は、マスト細胞そのものが持つ時計に注目し、解析が進められている。まず、マスト細胞において時計制御分子である Clock の機能を抑制することにより、脱顆粒反応の日内周期が失われることが示された。次いで、その分子生物学的なメカニズムとして、マスト細胞の脱顆粒に関わる重要な分子である $Fc\epsilon RI \beta$ の発現が clock により制御されていることが示された。その裏付けとなるデータとしては、CHIP アッセイにより Clock が $Fc\epsilon RI \beta$ 遺伝子のプロモーターに結合しうること、正常型マウスでは $Fc\epsilon RI \beta$ の mRNA の発現に周期性が認められるが、Clock 変異マウスではそれが失われることが呈示されている。さらに、siRNA を用いて Clock の発現を抑制することにより、マスト細胞の脱顆粒反応が減弱することが確認されている。以上の結果は、時計制分子によりアレルギー反応の制御がなされるという全く新しい知見を明確にしたものであり、その学術的な意義は極めて高いと判断された。発表者は、さらに個体レベルでの時計制御と末梢（この場合にはマスト細胞）の時計との関連性についても着目し、副腎より分泌されるコルチゾールがマスト細胞の時計の同調に関与していることをも明らかにしている。

以上、本研究発表は、テーマの新規性・独創性も高く、また研究内容に関しても、*in vivo* および *in vitro* から詳細な解析がなされており、学術論文としての完成度は極めて高いと評価できる。

2. 学位論文及び研究の争点、問題点、疑問点、新しい視点等。

研究発表は、論理の進め方も非常に分かり易く、研究の **quality** も十分に高いものと評価できる。一方、研究手法について、下記のようにいくつかの指摘があった。

(1) 遺伝子改変マウスや移植実験を用い、**in vivo** におけるマウスト細胞の脱顆粒現象を解析しているが、これは同一個体を用いた経時的な解析であるのか、それぞれの **time point** で異なる個体を用いての解析であるのか。

(2) **Fc ϵ R1 β** の周期的な発現制御は本論文の中核をなす重要なデータと考えるが、**mRNA** レベルではなく、タンパクレベルや細胞表面へのレセプターとしての発現についても調べるべきではないか

(3) **In vitro** の実験に関しては、マウスより抽出したマスト細胞をどのようにして、同調させるのかについての質問がなされた。

それぞれについて、発表者からの確な回答が得られている。

また、時計分子によるアレルギー応答についての生物学的な意義の追求や、時計分子をターゲットとしたアレルギー治療の可能性など今後の展開が期待される。

3. 実験及びデータの信頼性

研究の手法は明確であり、マウスを用いた実験においても十分な個体数により行われており、統計学的な解析も的確に行われている。

4. 学位論文の改善点

上記2で指摘された疑問点については、論文発表のさいにすべて申請者より十分な説明がなされており、論文への加筆・変更などは必要ないと判断される。