HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	鼻粘膜における末梢時計機構の研究 ： 時計遺伝子発現リズムを指標としたアレルギー性鼻炎に対する時間治療法の開発［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	本間, あや
Description	配架番号：2232
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12128号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61733
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Aya_Homma_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　本間　あや

学 位 論 文 題 名

鼻粘膜における末梢時計機構の研究：時計遺伝子発現リズムを指標としたアレルギー性鼻炎に対する時間治療法の開発
(Circadian clock in the nasal mucosa: Analysis of clock gene expression rhythm to develop the chronotherapy for allergic rhinitis)

【背景】
多くの疾患において症状発症にはピーク時刻があり、概日時計により制御されていると考えられる。アレルギー性鼻炎の症状にも概日リズムがあり、内分泌系や自律神経系の概日リズムの関与が考えられるが、鼻粘膜組織それ自体にも抗原反応性等におけるリズムが存在すると推測される。
哺乳類の概日リズム機構は、中枢時計である視床下部視交叉上核（SCN）と全身の組織に存在する末梢時計により制御されている。グルココルイドは、多くの末梢時計にとって中枢時計にリズム同期する同調因子として知られている。アレルギー性鼻炎の治療に鼻噴霧用ステロイド薬が使用されるが、鼻粘膜の概日リズムに対するグルココルチコイドの影響は明らかではない。

【目的】
1. マウス鼻粘膜組織の時計遺伝子産物 PERIOD(PER)2 の発現リズムを、ルシフェラーゼレポーターを使用して解析し、その概日リズム特性を明らかにする。また、グルココルチコイド投与時刻による時計遺伝子発現の位相変位を測定し、グルココルチコイドの鼻粘膜末梢時計への影響を検討する。
2. アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける鼻粘膜末梢時計の振動パターンを解明し、アレルギー性鼻炎に対する鼻噴霧用ステロイド治療における適切な時間治療法を開発する。

【方法】
実験には雄性成獣マウスを用い、明期 12 時間、暗期 12 時間の明暗サイクルの環境下で飼育した。以後、明期開始を Zeitgeber Time(ZT)0 と定義する。

1. 鼻粘膜時計遺伝子発現リズム測定と Dexamethasone（DEX）による鼻粘膜末梢時計への影響の検討
時計遺伝子産物 PER2 と生物発光酵素ルシフェラーゼの融合タンパクを発現する PER2::LUC ノックインマウス（C57BL/6J バックグラウンド）を用い、左右の鼻粘膜をルシフェリン含有培地にて培養した。鼻粘膜の発光リズムを連続 5 日以上光電子増倍管にて経時的に測定し、PER2 レベルの概日変動パターンを解析した。
次に、培養 5 日目に DEX を培養液に滴下し、滴下前後の鼻粘膜 PER2 リズムの位相変化を検討した。DEX 投与は PER2 リズムのピーク値、最低値、両者の中間値の 4 時点のいずれかで行い、対照群には同量の滅菌水を投与した（*ex vivo* 実験）。また、ZT0、ZT6、ZT12、ZT18

のいずれかに DEX を PER2::LUC ノックインマウスに腹腔内投与した後、鼻粘膜を培養し、PER2 発光リズムの相違を検討した。対照群には同量の溶媒（PBS）を投与した（*in vivo* 実験)。さらに、内因性グルココルチコイドの鼻粘膜末梢時計への影響を調べるために、副腎摘出マウスにおける鼻粘膜の PER2::LUC リズムを測定解析した。

2. アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける鼻粘膜時計遺伝子発現リズム測定

PER2::LUC ノックインマウスとアレルギー誘導性の高い野生型マウス（Balb/C）を交配した F1 マウスにオボアルブミン(OVA)を腹腔内投与し 1 週毎 4 回投与して一次感作させた後、5 週目には 3 日連続で OVA を点鼻し、アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成した。対照群には同量の PBS を腹腔内投与し、点鼻した。最後の点鼻直後 10 分間の鼻かき、くしゃみの回数を計測した。最後の点鼻の 30 分後にマウスを屠殺し、鼻粘膜を培養、PER2 発光リズムを計測した。

また、野生型（Balb/C）を用いてアレルギー性鼻炎を作成し、OVA 点鼻時刻（ZT0 と ZT12）による鼻炎症状の相違を検討した。

【結果】

1. PER2 発光リズム測定の結果、マウス鼻粘膜組織では主観的暗期前半にピーク値をもつ安定したリズムが観察された。PER2 リズムの平均周期は約 23 時間であった。

ex vivo 実験においは、DEX 投与は位相依存的に PER2::LUC リズムを変位させ、ピーク位相における投与で約 11 時間の位相後退を示した。*in vivo* 実験においは、暗期中間（ZT18）の DEX 投与において約 4 時間の位相後退を認めた。*ex vivo*、*in vivo* いずれも、対照群では有意な位相変位を認めなかった。マウス鼻粘膜 PER2 リズムは、主観的暗期前半の DEX 投与で最大の位相後退変位を示した。副腎摘出マウスの鼻粘膜の PER2::LUC リズムは偽手術を行った対照群のリズムと有意差を認めなかった。

2. アレルギー性鼻炎モデルマウスにおいても、主観的暗期前半にピーク値をもつ PER2 発光リズムが観察され、ピーク位相、周期、標準化振幅のいずれも、対照群のそれと有意差を認めなかった。鼻炎症状は、鼻かきの回数はアレルギー鼻炎モデルマウスが有意に多かったが、くしゃみでは両群に有意差を認めなかった。

また、抗原暴露時刻による症状の差は、ZT12 に比較し ZT0 の OVA 点鼻で、鼻かき、くしゃみともに回数が多かった。また、ZT12 の OVA 点鼻では、鼻かき、くしゃみともに対照群との間に有意差を認めなかった。対照群では時刻による有意差は認めなかった。

【考察】

マウス鼻粘膜には末梢時計が存在し、DEX により位相依存的な位相変位を示した。内因性グルココルチコイドが鼻粘膜末梢時計の位相調節に関与していることが示唆された。アレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻粘膜末梢時計も同様のリズムを発振し、グルココルチコイドの低い位相の抗原暴露で鼻炎症状が強いことから、マウスでは明期開始の DEX 投与が末梢時計への影響を最小限にし、さらに鼻炎症状の治療効果も期待される。

【結論】

鼻粘膜は安定した概日リズムを示す末梢時計を持ち、グルココルチコイドにより位相調節される。このため、鼻噴霧用ステロイドの使用は、鼻粘膜末梢時計に脱同調を生じない位相が望ましく、人の場合は暗期前半に相当することが判明した。