



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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                                           |
| 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                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k12128">https://doi.org/10.14943/doctoral.k12128</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/63360">https://hdl.handle.net/2115/63360</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Aya_Homma.pdf                                                                                   |



# 学 位 論 文

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)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

本間 あや



# 学 位 論 文

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)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

本間 あや

## 目 次

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録                      | 1 頁  |
| 1. 緒言                                | 3 頁  |
| 2. 略語表                               | 6 頁  |
| 3. 実験方法                              | 7 頁  |
| (1) 実験動物                             |      |
| (2) 組織学的評価                           |      |
| (3) 定量的 real-time PCR                |      |
| (4) 発光リズム測定                          |      |
| (5) Dexamethasone (DEX)投与法とリズム位相反応解析 |      |
| (6) 副腎摘出                             |      |
| (7) グルココルチコイドアッセイ                    |      |
| (8) アレルギー性鼻炎モデルマウス作成                 |      |
| (9) イムノグロブリン・サイトカインアッセイ              |      |
| (10) 統計学的処理                          |      |
| 4. 実験結果                              | 19 頁 |
| (1) 免疫染色                             |      |
| (2) 定量的 real-time PCR                |      |
| (3) 培養鼻粘膜の発光リズム                      |      |
| (4) DEX による培養鼻粘膜生物時計の位相反応曲線          |      |
| (5) 副腎摘出                             |      |
| (6) 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        |      |
| 5. 考察                                | 34 頁 |
| 6. 総括および結論                           | 42 頁 |
| 7. 謝辞                                | 43 頁 |
| 8. 引用文献                              | 44 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

### 原著論文

1. Aya Honma, Yoshiko Yamada, Yuji Nakamaru, Satoshi Fukuda, Ken-ichi Honma, & Sato Honma. Glucocorticoids reset the nasal circadian clock in mice. *Endocrinology* 156, 4302-4311 (2015).

症例報告 なし

総説 なし

著書 なし

本研究の一部は以下の学会に発表した。

### 国際学会

1. Aya Honma, Yuji Nakamaru, Satoshi Fukuda, Ken-ichi Honma, & Sato Honma. Effects of glucocorticoids on circadian clock gene expression rhythms in mouse nasal mucosa. The 30<sup>th</sup> anniversary meeting of Sapporo Symposium on Biological Rhythms, Hokkaido University Conference Hall, July 25-27, 2014.
2. Aya Honma, Yuji Nakamaru, Satoshi Fukuda, Ken-ichi Honma, & Sato Honma. Dexamethasone shifts the nasal clock: monitoring Per2 expression rhythm using a luciferase reporter. The 11th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Sapporo, Furate Hall, Hokkaido University Graduate School of Medicine. Sep.4-5, 2014.
3. Aya Honma, Yoshiko Yamada, Yuji Nakamaru, Satoshi Fukuda, Ken-ichi Honma, & Sato Honma. Phase response of nasal clock by Dexamethasone : Monitoring PER2 rhythm using a luciferase reporter. 14<sup>th</sup> EBRS and 4<sup>th</sup> WCC combined meeting, Manchester University, Manchester, UK. Aug 2-6, 2015.
4. Aya Honma, Yoshiko Yamada, Yuji Nakamaru, Satoshi Fukuda, Ken-ichi Honma, & Sato Honma. Dexamethasone resets the nasal clock: Monitoring PER2 rhythm using a luciferase reporter. Asian Forum on Chronobiology 2015. Hokkaido University Conference Hall, Sapporo,

Sep.6-9, 2015.

5. Sato Honma, Yoshiko Yamada, Aya Honma, Yuji Nakamaru, Satoshi Fukuda, & Ken-ichi Honma. Shanghai International Symposium on Respiratory Diseases 2015. Fudan University, Shanghai, China, Nov, 14-15, 2015.

## 国内学会

1. 本間あや、中丸裕爾、福田 諭、本間研一、本間さと. マウス鼻粘膜末梢時計の概日リズムとグルココルチコイドへの反応. 第 20 回日本時間生物学会大会、近畿大学、大阪市. 11.9-10, 2013.
2. 本間あや、中丸裕爾、福田 諭、本間研一、本間さと. マウス鼻粘膜における時計遺伝子 PER2 レベルの概日リズムとグルココルチコイドの影響. 第 91 回日本生理学会大会、鹿児島大学、鹿児島市. 3.16-18, 2014.
3. 本間あや、中丸裕爾、福田 諭、本間研一、本間さと. グルココルチコイドはマウス鼻粘膜における時計遺伝子発現の概日性リズムを調整する. 日本生理学会北海道地方会、北海道大学医学部フラテホール、札幌市. 8.30, 2014.
4. 本間あや、中丸裕爾、福田 諭、本間研一、本間さと. グルココルチコイドは鼻粘膜末梢時計を調整する : PER2 発光リズムを指標とした解析. 第 21 回日本時間生物学会大会、九州大学百年記念会館、福岡市. 11.8-9, 2014.
5. 本間あや、中丸裕爾、高木 大、鈴木正宣、本間研一、本間さと、福田 諭. 鼻粘膜時計遺伝子発現の概日リズムにグルココルチコイドが影響を及ぼす. 第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会、広島国際会議場、広島市. 10.1-3, 2015.
6. 本間あや、中丸裕爾、高木 大、鈴木正宣、本間研一、本間さと、福田 諭. グルココルチコイドによる鼻粘膜末梢時計の調整 : PER2 発光リズムを指標とした解析. 第 34 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、鳥羽国際ホテル、鳥羽市. 2.4-6, 2016.

## 1. 緒言

バクテリアからヒトにいたるまで、地球上のほぼ全ての生物は、睡眠覚醒、体温、自律神経機能などの生理機能に内因性のリズムがある。その周期は約 24 時間であることから、概日リズムと呼ばれる。概日リズムの生理的意義は、昼夜変化や季節変動などの環境の周期性に同調し、各生体機能の最適化を図るとともに、その時間的秩序を維持することにある。

多くの疾患において症状発症にはピーク時刻が存在し、これらは概日時計によって制御されていると考えられている。アレルギー性鼻炎の症状にも概日リズムがあり、くしゃみ、鼻汁、鼻閉の鼻炎 3 症状は早朝に増悪するが (図 1) <sup>1,2</sup>、その背後には、神経系および内分泌系の概日リズムの関与が考えられる。例えば、炎症性サイトカインの生成を抑制するグルココルチコイドの血中レベルは朝方上昇し、夜間に下降する <sup>3</sup>。カテコラミンは、血管収縮作用により鼻閉を改善するが、その分泌量には夜間遅くから明け方にかけて最も低値となる概日リズムが存在する <sup>4,5</sup>。さらに、アレルギー性鼻炎の患者では、外界刺激に対する鼻の過敏反応に昼夜差があり、午前 6 時の methacholine 投与が、午後 3 時投与に比較して投与後の反応性が高いという報告もある <sup>6</sup>。しかしながら、アレルギー性鼻炎症状の原因ともなりうる鼻粘膜末梢組織それ自体の反応性に関する概日リズムの研究は未だない。

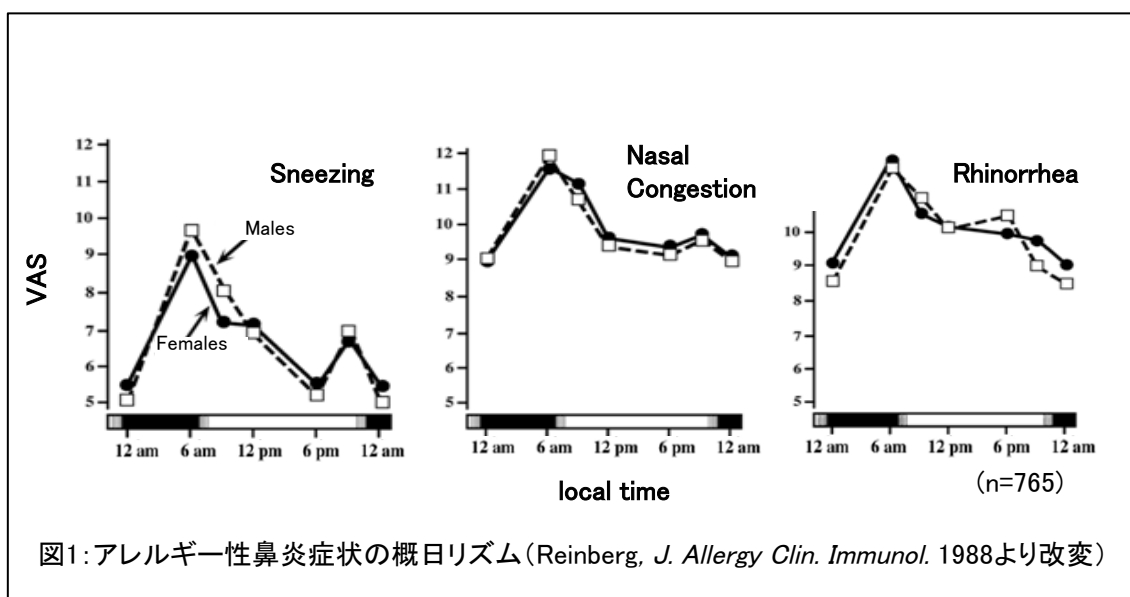
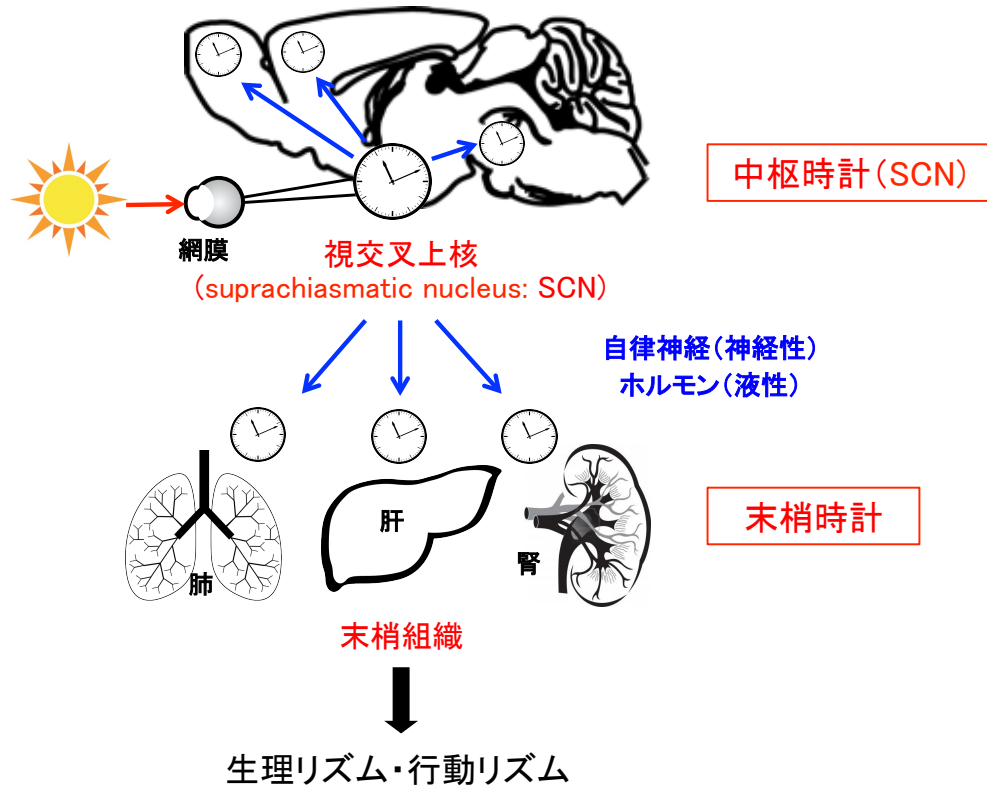


図1: アレルギー性鼻炎症状の概日リズム (Reinberg, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988より改変)

哺乳類の概日リズム機構は、視床下部視交叉上核（suprachiasmatic nucleus; SCN）にある中枢時計と、SCN 以外の脳内や全身の臓器、組織に存在する末梢時計からなる（図 2A）<sup>7</sup>。SCN の中枢時計は網膜からの光入力を受け、明暗サイクルに同調する。さらに、中枢時計は神経性・液性シグナルを介して末梢時計にリズム情報を伝え、体温、ホルモン、睡眠覚醒リズム等の位相調節を行い、全身の生理機能を時間的に統合する。SCN 細胞内のリズムは *Clock*、*Bmal1*、*Period* (*Per*)、*Cryptochrome* (*Cry*) 等の時計遺伝子の転写と、タンパク産物による転写抑制のフィードバックにより、約 24 時間周期で振動する。転写因子である CLOCK、BMAL1 の二量体が *Per* や *Cry* のプロモーター上にある E-box 領域に結合して遺伝子の転写を促進する。こうして合成された PER と CRY が二量体を形成し、核内に移行して CLOCK、BMAL1 二量体に対し抑制をかけ、*Per*、*Cry* の遺伝子転写を抑制する。このフィードバックループが 1 回転するのに約 24 時間かかり、その結果、細胞内リズムが発現する。（図 2B）<sup>8,9</sup>。

多くの末梢時計はグルココルチコイドを介して中枢時計に同調することが知られている。血中グルココルチコイド値は視床下部-下垂体-副腎皮質（hypothalamo-pituitary-adrenocortical; HPA）系により調節されており、ヒトでは朝方高値となる。HPA 系は SCN 中枢時計により制御されており、また、その活性はストレス刺激にも反応する。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なく、治療効果に何らかの影響を来す可能性もある。本研究では、実験 I にて、鼻粘膜末梢時計の存在を明らかにし、グルココルチコイドが鼻粘膜末梢時計に与える影響について検討した。さらに、実験 II で、アレルギー性鼻炎モデルを用い、時間治療への応用について検討した。末梢時計への影響は、グルココルチコイド投与後の概日リズムの位相変化を計測し、位相反応曲線（phase-response curve; PRC）を作成することにより検討した。PRC の形は定常状態における同調因子（本研究ではグルココルチコイド）との関係を表し、また、同調因子による概日リズムの位相変化の方向と大きさを予測するものである。本実験では、発光レポーターを用いて、マウス鼻粘膜の時計遺伝子産物 PER2 レベルの概日リズムの有無と、グルココルチコイドによる位相調節の有無を、*ex vivo* 実験および *in vivo* 実験を通して検証し、さらに、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リズムと鼻炎症状の概日リズムの関連性について検討した。

A



B

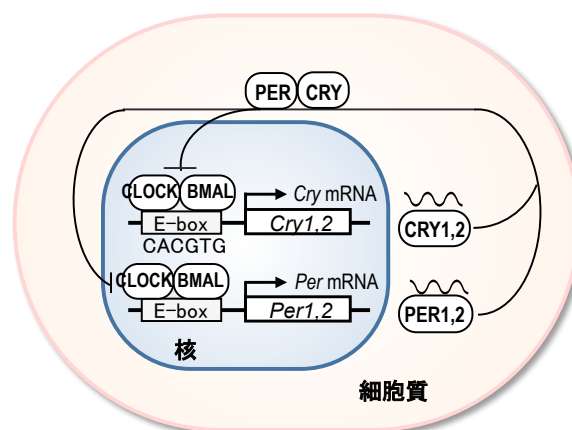


図2: 哺乳類概日機構: 中枢時計と末梢時計からなる階層的多振動体構造

- (A) 哺乳類の概日リズム機構の模式図。中枢振動体としての視交叉上核(SCN)と脳や全身組織の振動体による階層的リズム支配機構が、統一された個体の生理機能リズムを生み出す。
- (B) 概日リズム発現の分子機構。個々の細胞内で、時計遺伝子(*Clock*, *Bmal1*, *Cry*, *Per*)とそのタンパク産物が転写翻訳フィードバックループを形成し、約24時間周期で自律振動を発振している。

## 2. 略語表

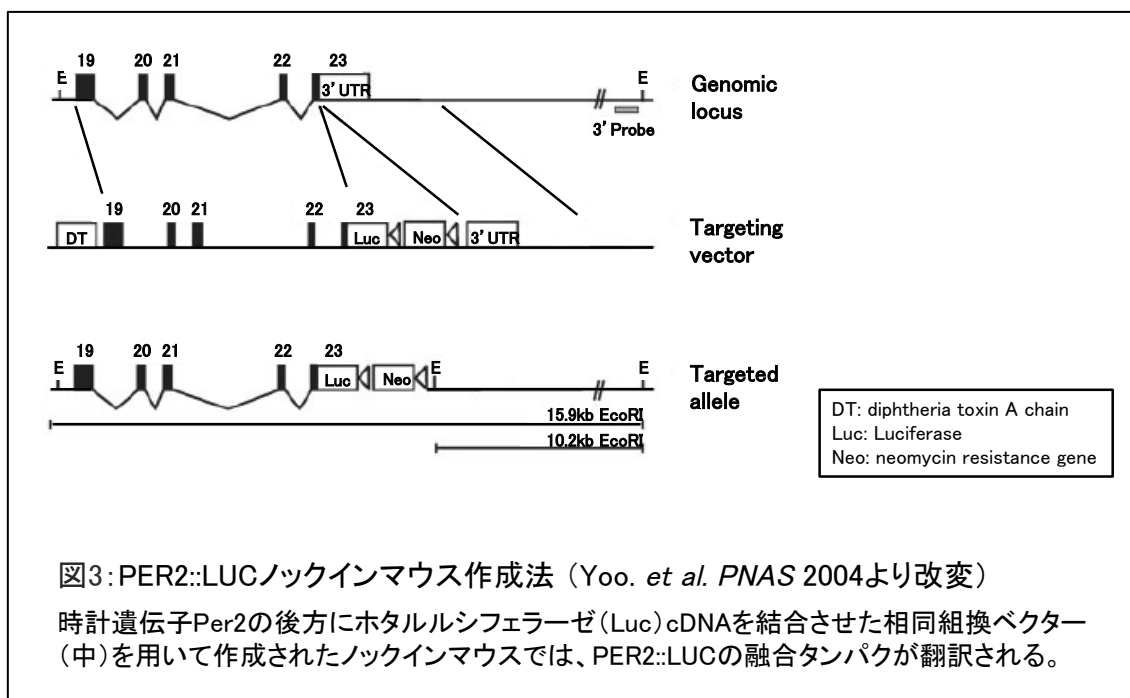
本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

|            |                                                    |
|------------|----------------------------------------------------|
| ATP        | adenosine triphosphate                             |
| AMP        | adenosine monophosphate                            |
| ANOVA      | analysis of variance                               |
| CRH        | corticotropin releasing hormone                    |
| CT         | circadian time                                     |
| <i>Cry</i> | <i>cryptochrome</i>                                |
| EDTA       | disodium ethylenediamine tetra-acetic acid         |
| GAPDH      | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase           |
| GR         | glucocorticoid receptor                            |
| GRE        | glucocorticoid response element                    |
| HEPES      | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HPA        | hypothalamo-pituitary-adrenocortical               |
| IL         | interleukin                                        |
| INF        | interferon                                         |
| LUC        | luciferase                                         |
| OVA        | ovalbumin                                          |
| PB         | phosphate-buffer                                   |
| PBS        | phosphate-buffered saline                          |
| PCA        | passive cutaneous anaphylaxis                      |
| <i>Per</i> | <i>period</i>                                      |
| PRC        | phase response curve                               |
| SCN        | suprachiasmatic nucleus                            |
| ZT         | zeitgeber time                                     |

### 3. 実験方法

#### (1) 実験動物

実験Ⅰ 鼻粘膜時計遺伝子発現リズム解析実験には C57BL/6J バックグラウンドの雄性成獣マウス（6-12 週齢）野生型（自家繁殖および CLEA Japan）および、時計遺伝子 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 ノックインマウスを用いた。ノックインマウスは米国 Northwestern 大学の J.S. Takahashi 氏により作成され(図 3)<sup>10</sup>、譲渡された。実験には 13 世代以上 C57BL/6J マウスとバッククロスした PER2::LUC ノックインマウスを用い、ホモ接合体同士で交配したものを用いた。



実験Ⅱ アレルギー性鼻炎モデルを用いた時間治療への応用の検討では、発光計測にはPER2::LUCノックインマウス（C57BL/6Jバックグラウンド）と野生型マウス（Balb/C、CLEA Japan）の交雑F1の、抗原暴露時刻による症状変化の実験ではBalb/Cの、いずれも雄性成獣マウスを用い、実験Ⅰと同条件で飼育した。アレルギー感作は生後6-7週齢で開始した。

マウスは12時間ごとの明暗サイクル(明期:6-18時、明期の照度:約100 lux)、室温 $22 \pm 2$  °C、湿度 $60 \pm 10$  %の条件下で繁殖飼育した。なお、時刻については、明暗条件下の*in vivo* 実験では明期開始をZeitgeber Time (ZT) 0、暗期開始をZT12とするZTで表示し、培養実験では、PER2::LUCリズムのピーク位相をCircadian Time (CT)12 (1 CT=リズム周期/24時間) とするCTで表示した。新生マウスは生後3週目で離乳し、以後はポリカーボネート樹脂製マウスケージ(17.2×24.0×12.9 cm)に3-4匹ずつ集団飼育した。また、特に記載しない限り、マウスには固形飼料(オリエンタルMF)と給水瓶に入った水道水を自由摂取させた。実験に使用したマウス個体数の内訳を表1に示した。

全ての実験は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程第7条第1項の規定に基づき、総長より承認をうけた動物実験計画「概日振動の分子・細胞メカニズム：中枢時計の同調と末梢時計の統合」(承認番号：13-0064)の一環として行われ、「北海道大学動物実験に関する規定」と「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」に従って実施した。

表1: 各実験に使用したマウス個体数

実験Ⅰ：鼻粘膜時計遺伝子発現リズムとDexamethasone (DEX)による影響

| 系統             | 匹数 | 測定項目  |
|----------------|----|-------|
| 野生型 (C57BL/6J) | 44 | mRNA  |
| PER2::LUC KI   | 15 | 発光リズム |

| 系統           | 対照群 | 実験群 | 測定項目                        |
|--------------|-----|-----|-----------------------------|
| PER2::LUC KI | 16  | 17  | 発光リズム ( <i>ex vivo</i> DEX) |
| PER2::LUC KI | 20  | 20  | 発光リズム ( <i>in vivo</i> DEX) |
| PER2::LUC KI | 6   | 6   | 発光リズム(副腎摘出)                 |

実験Ⅱ：アレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻粘膜時計遺伝子発現リズムと鼻炎症状

| 系統                    | 対照群 | 実験群 | 測定項目              |
|-----------------------|-----|-----|-------------------|
| 野生型 (C57BL/6J)        | 4   | 9   | 鼻炎症状・血清IgE        |
| 野生型 (Balb/c)          | 3   | 6   | 鼻炎症状・血清IgE        |
| PER2::LUC KI x Balb/c | 6   | 6   | 鼻炎症状・血清IgE・発光リズム  |
| 野生型 (Balb/c)          | 16  | 16  | 点鼻時刻による鼻炎症状・血清IgE |

## (2) 組織学的評価

### 1) ヘマトキシリン-エオジン染色

ZT10 に野生型のマウスを頸椎脱臼にて屠殺後、断頭し鼻組織を、下面は上顎骨、尾側は眼窩後方ラインで切断して採取した (図 4A)。鼻組織は 10 %ホルマリン液にて 48 時間固定した後、10 % EDTA 溶液 (pH 7.4) にて 10 日間脱灰した。鼻組織は、パラフィンに包埋後、冠状断で 6  $\mu\text{m}$  に薄切した。組織切片は、脱パラフィン後、4 %ヘマトキシリン溶液および 0.25 %エオジン溶液にて染色した。

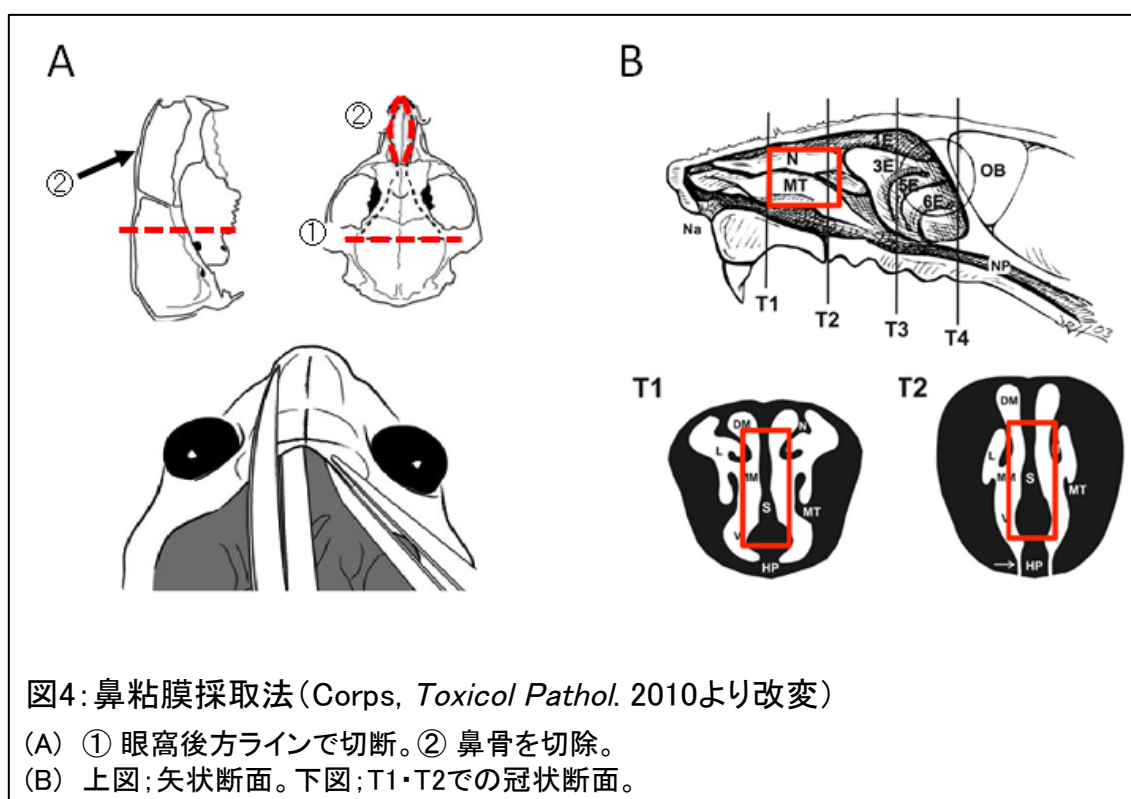


図4: 鼻粘膜採取法 (Corps, Toxicol Pathol. 2010より改変)

(A) ① 眼窩後方ラインで切断。② 鼻骨を切除。  
(B) 上図; 矢状断面。下図; T1・T2での冠状断面。

### 2) 免疫染色

野生型マウスを、ZT0 または ZT12 にイソフルラン麻酔下にて、経心臓的に灌流固定した。左心室より冷却 0.9 %NaCl 溶液を約 30 ml 灌流し、引き続き、冷却 4 %パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB 溶液を 20 ml 灌流した。断頭後、上記手順にて鼻組織を採取し、4 %パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB 溶液にて一晩固定し (−4 °C 下)、10 % EDTA 溶液 (pH 7.4) にて 10 日間脱灰した。その後、20 %ショ糖含有 0.1 M PB 溶液に置換し、使用時までは−80 °C 下で保

管した。-20 °C 下に組織を戻し、クリオスタットにて冠状断で 12 µm に薄切し、スライドガラスに貼付した。一次抗体にポリクローナルウサギ抗マウス PER2 抗体 (Alpha Diagnostic 社) を 1:500 で使用、二次抗体にヤギ抗ウサギ抗体 (Jackson 社) を 1:500 で使用し、Avidin-Biotin complex method (Vector Lab 社) にて免疫染色を施行した。酵素反応産物は 0.04 % 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich 社) 0.04 % NiCl 溶液にて標識した。

### (3) 定量的real-time PCR

ZT0 から 4 時間おきに 24 時間、野生型マウスを断頭した (n=8 匹×6 時点/日=48 匹)。両鼻粘膜を顕微鏡下に採取し、RNA 安定化液 RNAlater (Sigma-Aldrich 社) 中に入れ-80 °C 下で保存した。RNeasy Micro Kit (QIAGEN 社) を使用し、総 RNA 量を定量した。SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies 社) を使用し、RNA 0.35 µg を逆転写し、DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes 社) を使用して ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems 社) にて定量的 real-time PCR (qPCR) を施行した。全ての検体において、*Per1*, *Per2*, および *Glucocorticoid Receptor* (GR) の発現量を定量し、同一サンプルのハウスキーピング遺伝子 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA 発現量との比で算出した。なお、使用したプライマーの配列は表 2 の通りである。PCR の設定は 95 °C 15 分の後、94 °C 10 秒、60 °C 20 秒、72 °C 30 秒を 45 サイクルである。

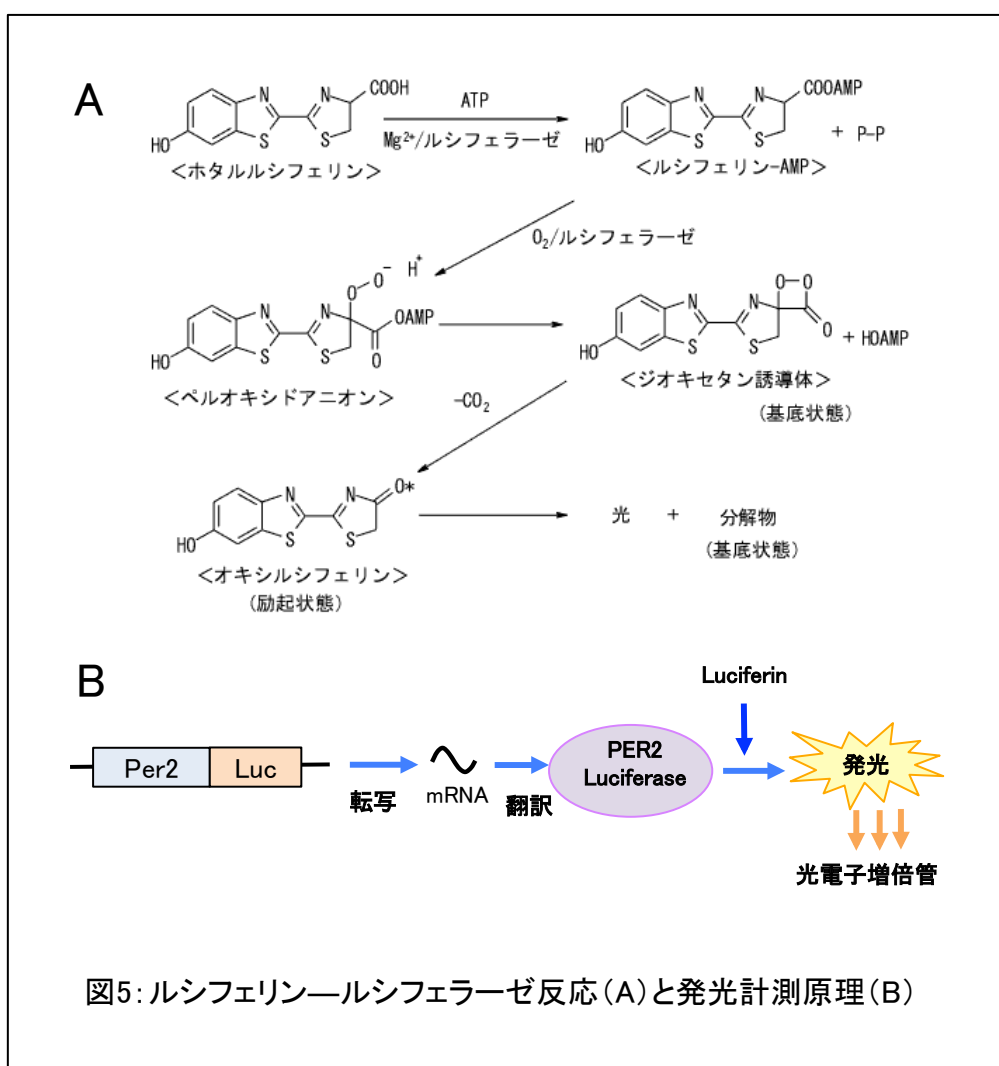
表2: 定量的real-time PCRに用いたプライマー配列

| 遺伝子   | プライマー                                                        |
|-------|--------------------------------------------------------------|
| Per1  | 5'-CGTCCTACCTCCTTTATCCAGA-3'<br>5'-TGTTTGCATCAGTGTCATCAGC-3' |
| Per2  | 5'-CATTGAACTTGAGACTGAGGT-3'<br>5'-AAGGGAACACACTGAGAGGAT-3'   |
| GR    | 5'-ATGGCGTGAGTACCTCTGGA-3'<br>5'-TCCAGACCCTTGGCACCTAT-3'     |
| GAPDH | 5'-TGCGACTTCAACAGCAACTC-3'<br>5'-ATGTAGGCCATGAGGTCCAC-3'     |

#### (4) 発光リズム測定

##### 1) 測定原理

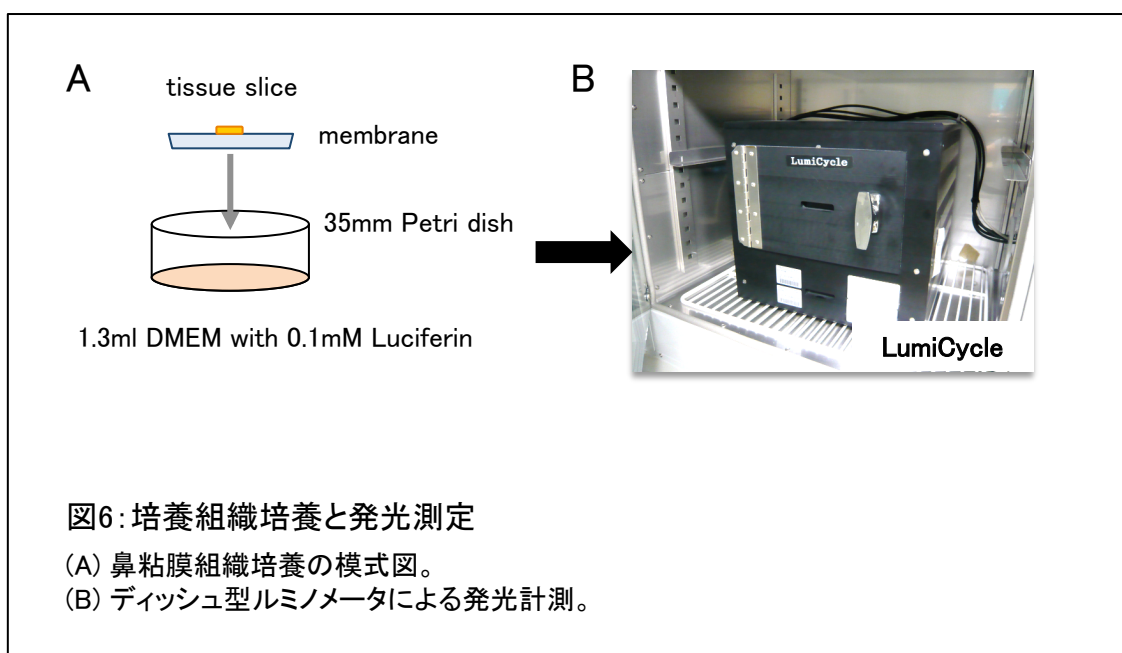
培養組織におけるPER2タンパクレベルをルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による生物発光の光学的測定により経時的に定量計測した（図5）。実験に用いたPER2::LUCノックインマウスは、時計遺伝子*Per2*の後方にホタルルシフェラーゼ（*Luc*）cDNAを結合させた相同組換えベクターを用いて作成された。本ノックインマウスではPER2の代わりにPER2とルシフェラーゼの融合タンパクが合成される。このマウスの組織培養では、あらかじめ培養液中に基質のホタルルシフェリンを添加しておく、脂溶性のルシフェリンは細胞内に取り込まれる。組織中でルシフェラーゼが合成されると、ATP、Mg存在下に細胞内のルシフェリンと反応し、細胞内で酸化されオキシルシフェリンとなる。励起状態にある



オキシルシフェリンが基底状態に遷移するときに発光が生じ、発光量は、十分量のルシフェリン存在下では、合成されたルシフェラーゼの量に比例する。培養組織が放出する光子量を光電子増倍管により増幅し、ディッシュ型ルミノメーターで連続測定することで、遺伝子発現の変動を高感度、高時間分解能でリアルタイム解析することが可能となる。

## 2) 鼻粘膜培養、PER2 発光リズム測定法

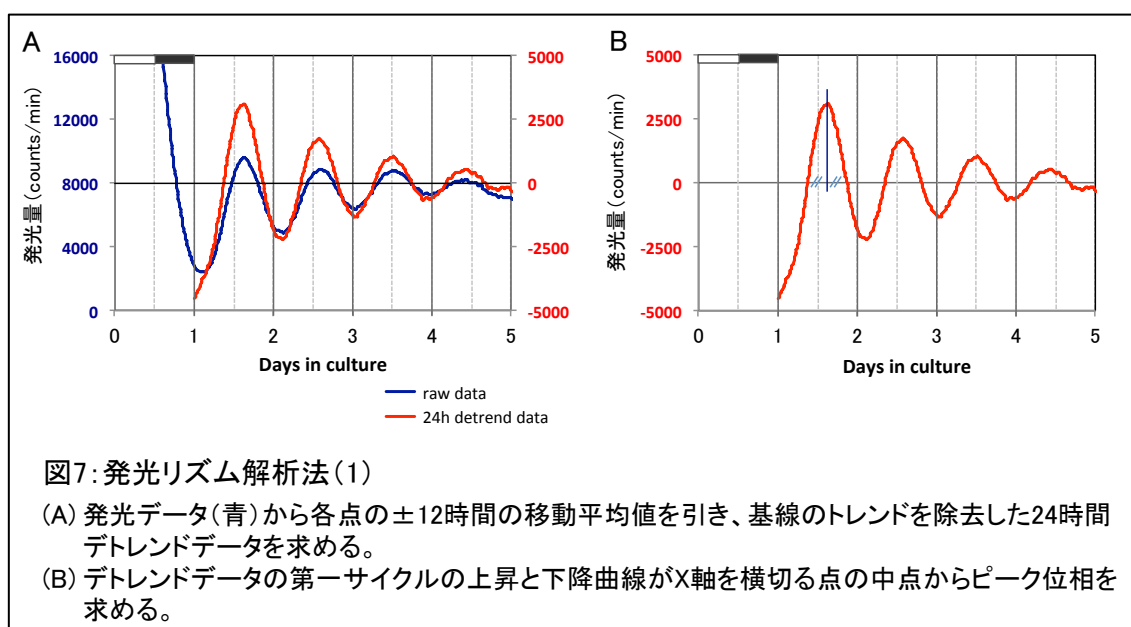
ZT9-10にPER2::LUCノックインマウスを頸椎脱臼にて屠殺後断頭し、鼻組織を採取した。冷却Hanks緩衝液にて粘液を洗い流した後、冷却Hanks緩衝液中において眼科用剪刀およびローゼン深針を用いて、実体顕微鏡下に両側鼻中隔粘膜を剥離し、約 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ のサイズに粘膜をトリミングした。鼻粘膜組織は直径35 mmのペトリ皿内で培養膜（Millicell-CM Culture Insert, EMD Millipore社、孔径 $0.4 \text{ }\mu\text{m}$ ）に載せ、1.3 mLの培養液を加え、パラフィルムで蓋をシールしたうえ、大気下 $36.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ で気水界培養を行った（図6 A）。培養液は $0.1 \text{ mM}$  d-Luciferin potassium salt（DOJINDO社）含有のDulbecco's modified Eagle's medium（Invitrogen社）に、 $10 \text{ }\mu\text{M}$  HEPES、 $2.7 \text{ mM}$   $\text{NaHCO}_3$ 、 $20 \text{ mg/L}$  kanamycin（Gibco社）、 $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$  Apo-transferrin（Sigma社）、 $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$  insulin（Sigma社）、 $100 \text{ }\mu\text{M}$  putrescine（Sigma社）、 $20 \text{ nM}$  progesterone（Sigma



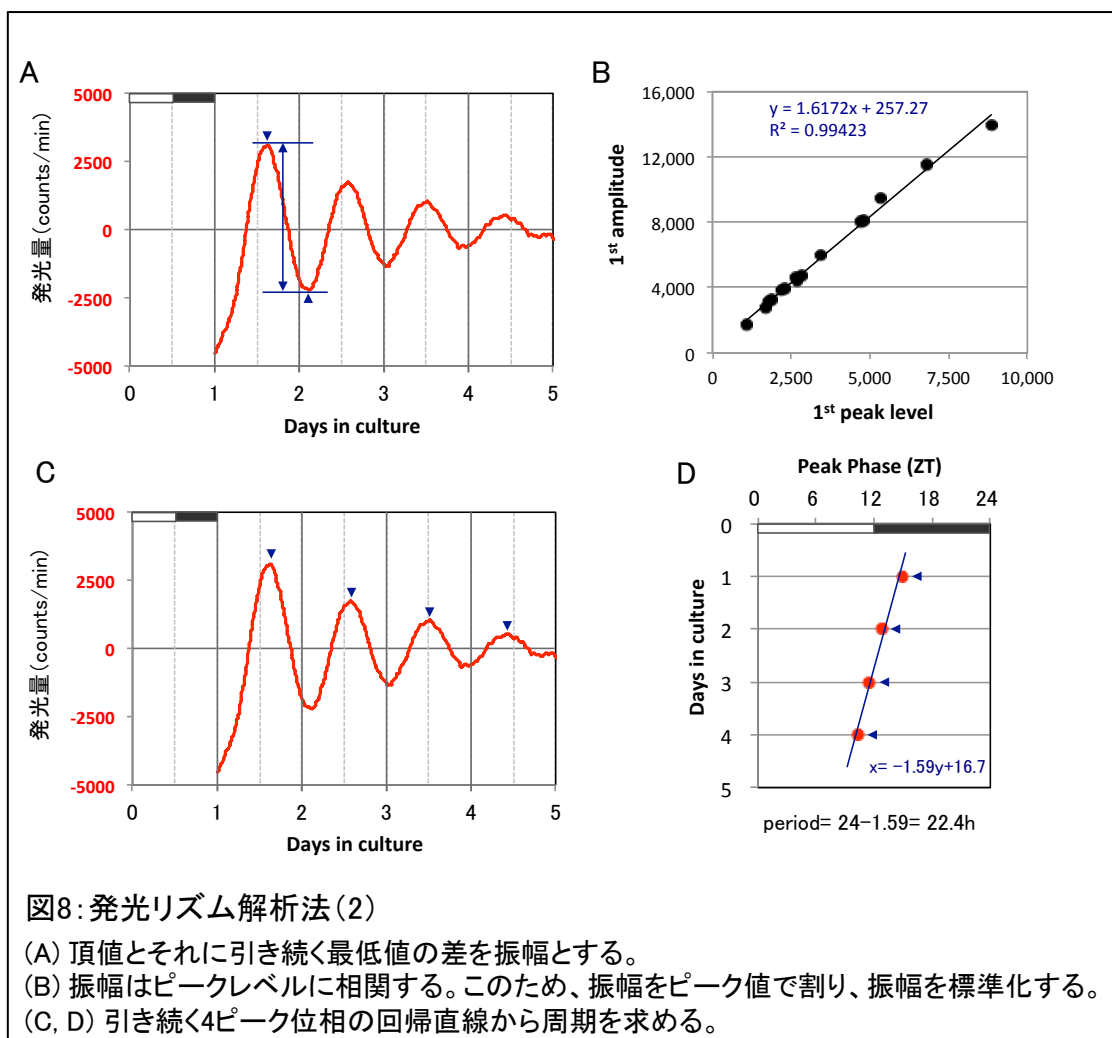
社)、30 nM sodium selenite (Gibco社) を添加して用いた。培養鼻粘膜組織からの発光量を、光電子増倍管を用いたディッシュ型ルミノメーター (Lumicycle、Actimetrics社) により10分毎に1分間の測定条件で、5日間以上連続測定した (図 6 B)。

### 3) PER2 発光リズム解析

発光リズムの解析は、10 分間隔で得られる発光値 (1 分間の発光量) の時系列より、前後 12 時間の平均値を差し引く「24 時間デトレンド法」を用いて基線レベルのトレンドを補正した (図 7 A)<sup>11</sup>。得られたデトレンド値を 5 点移動平均法により、さらに平滑化した。発光リズム測定開始から 24 時間以内に出現する最初の発光リズムピークを第 1 ピークとし、中点 2 点法 (図 7 B) を用いてピーク位相を算出した。



発光リズムの振幅 (図 8 A) は、第 1 ピークの発光値と高い有意の相関を示し (図 8B)、発光測定機器の感度、および組織の大きさに依存した。このため、測定開始後の 24 時間以内の最高発光値 (第 1 ピーク値) と、これに続く第 1 最低値の差 (振幅) を求め、この値を測定値の第 1 ピーク値で割ることで、標準化されたリズム振幅値を算出した (図 8B)。発光リズム周期は、リズムの第 1 ピーク位相から第 4 ピーク位相までの回帰直線から算出した (図 8C、D)。



## (5) Dexamethasone (DEX)投与方法とリズム位相反応解析

### 1) *ex vivo* 実験

培養 5 日目の異なる 4 位相（ピーク位相、それに続く最低発光値位相、ピーク値前後の最低値との中間位相）において、培養液中に 13  $\mu$ l の DEX（最終濃度  $10^{-7}$  M : Sigma 社）を添加し、添加前後での PER2 発光リズムの変化を検討した（図 9）。対照群には同量の滅菌水を使用した。

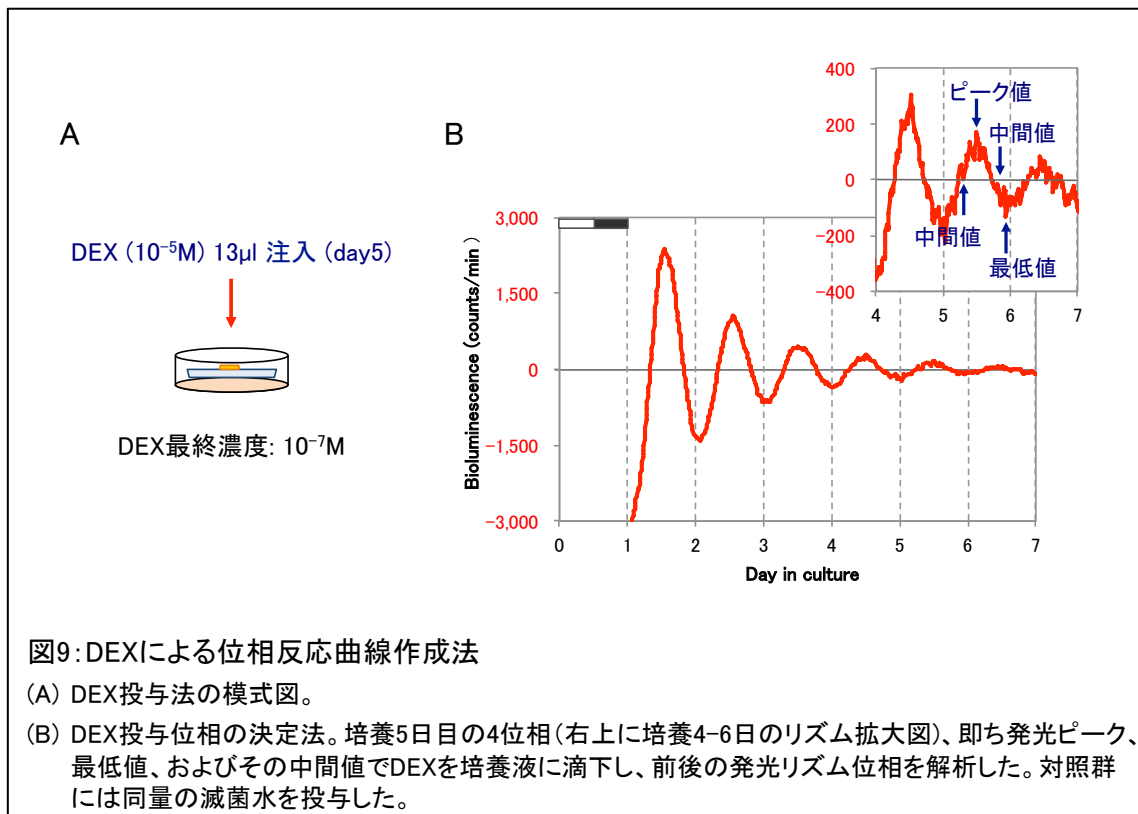


図9: DEXによる位相反応曲線作成法

(A) DEX投与方法の模式図。

(B) DEX投与位相の決定法。培養5日目の4位相(右上に培養4-6日のリズム拡大図)、即ち発光ピーク、最低値、およびその中間値でDEXを培養液に滴下し、前後の発光リズム位相を解析した。対照群には同量の滅菌水を投与した。

## 2) *in vivo* 実験

個体レベルでの鼻粘膜時計遺伝子発現に対する DEX の影響を検討するために、2 mg/kg の DEX (300  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) を1日の異なる時刻 (ZT0、ZT6、ZT12、ZT18) に腹腔内投与した。対照群には phosphate-buffered saline (PBS) を腹腔内投与した。腹腔内投与後、ZT9-10 にマウスを断頭し、上記手順にて鼻粘膜を採取、培養し、PER2 発光リズムの第1ピーク位相を比較した。

### (6) 副腎摘出

11週齢のマウスを使用。イソフルラン麻酔下に、背部から両側副腎を摘出した。術後は水の代わりに0.9 % NaCl溶液を飲水させた。対照群は同様に手術し、ただし副腎は摘出しなかった。対照群には水道水を飲水させた。術後2週目の ZT9-10 に断頭採血し、上記方法にて鼻粘膜採取後、培養鼻粘膜の発光リズムを測定した。

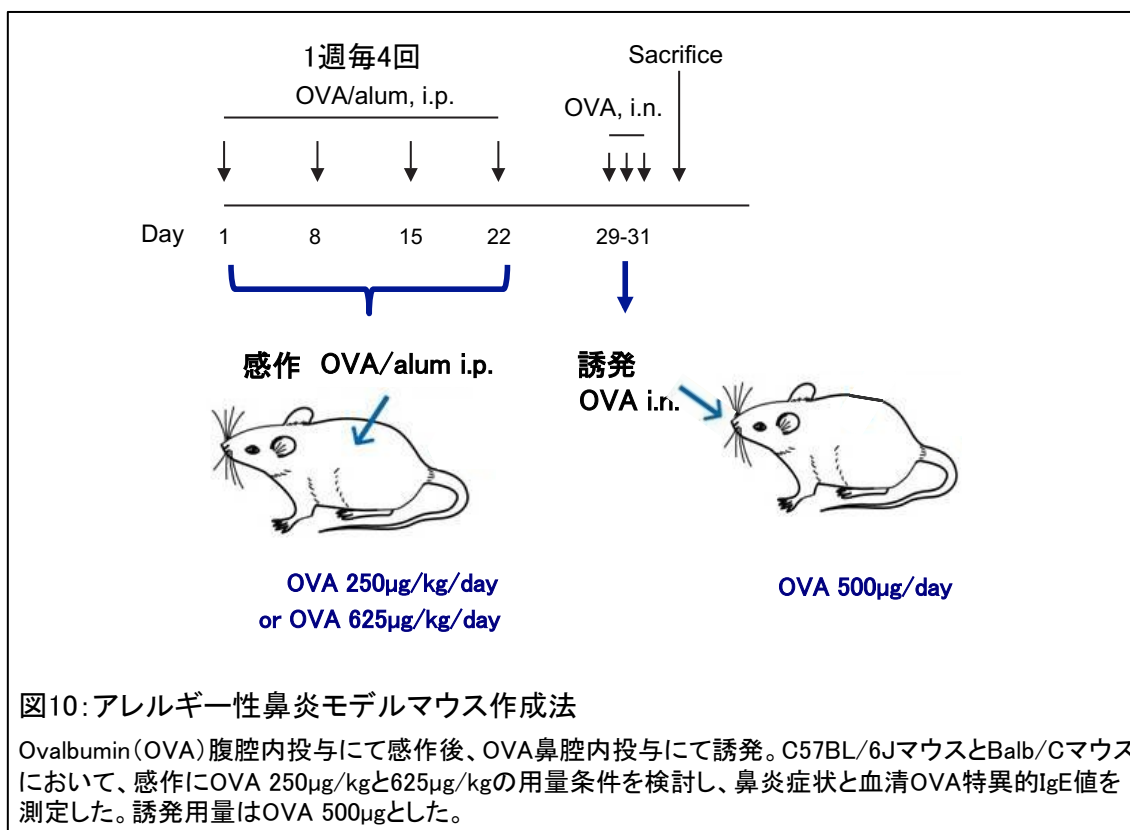
## (7) コルチコステロンアッセイ

副腎摘出したマウスおよび対照群のマウスよりヘパリン添加採血管に採取した血液は、4 °C下2,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を-30 °C下にて保存した。血漿コルチコステロン値をCorticosterone ELISAキット (Assaypro社) を使用して測定した。

## (8) アレルギー性鼻炎モデルマウス作成

### 1) アレルギー感作

PER2::LUCノックインマウスのバックグラウンドであるC57BL/6J系の野生型マウスとIgE高誘導性のBalb/C系の野生型マウスを用いた。オボアルブミン (Ovalbumin; OVA, Sigma社) 溶液を1週毎4回 (OVA 250 µg/kgまたは625 µg/kg) 腹腔内投与して感作させた後、5週目には3日連続でOVA 500 µg/10 µlをハミルトンシリンジにて点鼻し、アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成した (図10) <sup>12</sup>。最後の点鼻直後10分間のくしゃみ、鼻掻き回数を計測した。



最後の点鼻の30分後にマウスを断頭採血した。なお、OVA溶液は、OVA (20 µg/mlまたは50 µg/ml in PBS) と アジュバントであるAl(OH)<sub>3</sub>溶液 (4 mg/ml in PBS) の1:1混合液である。対照群には同量のPBSとAl(OH)<sub>3</sub>溶液の1:1混合液を腹腔内投与し、5週目には3日連続で10 µlのPBSを点鼻し、実験群と同様の計測、採血を行った。

## 2) 培養鼻粘膜のPER2発光リズム測定

PER2::LUC ノックインマウスと野生型マウス (Balb/C) を交配した F1 マウスを用いた。まず、F1 マウスに上記手順で感作させ (OVA 250 µg/kg)、ZT 9-10 に OVA 点鼻、最後の点鼻直後 10 分間のくしゃみ、鼻搔き回数を計測した。最後の点鼻の 30 分後にマウスを断頭採血し、鼻汁および鼻粘膜を採取した。実験 I と同様に鼻粘膜培養を行い、鼻粘膜 PER2 発光リズムを測定した。対照群は、上記と同様 PBS 処置を行った。

## 3) 抗原暴露時刻による症状変化

アレルギー性鼻炎症状の概日変動の観察には、野生型 (Balb/C) を用い、同様の手順で感作 (OVA 250 µg/kg) を行った後、OVA 点鼻を ZT0 に行う群と ZT12 に行う群の 2 群に分け、最後の点鼻直後 10 分間のくしゃみ、鼻搔き回数を計測した。また、最後の点鼻の 30 分後にマウスを断頭採血し、鼻汁を採取した。鼻汁のギムザ染色を施行した。

## (9) イムノグロブリン・サイトカインアッセイ

### 1) OVA特異的IgE測定

アレルギー性鼻炎モデルマウス (C57BL/6J、Balb/C、および交雑F1) および対照群のマウスより採取した血液を、室温で15分放置後、4 °C下2,000 rpm で15分間遠心分離し、血清を-30 °Cにて保存した。マウスIgE ELISA (OVA) キット (DSファーマバイオメディカル社) を使用し、血清OVA特異的 IgE値を測定した。

### 2) IL-4, IL-5, IL-13, INF-γ 測定

アレルギー性鼻炎モデルマウスおよび対照群のマウスより採取した片側の鼻粘膜を1ml PBSが入ったマイクロチューブに入れ、氷上で歯科モータを使用し

homogenate後、4 °C下12,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を-80 °C下にて保存した。鼻汁は断頭後、上咽頭側より24 Gサーフロチューブを鼻腔に挿入し、PBSを350 µlを注入して、希釈液をマイクロチューブに採取した<sup>13</sup>。その後、4 °C下400 rpmで10分間遠心分離し、上清を-80 °C下にて保存した。

鼻粘膜homogenate液および鼻汁のIL-4, IL-5, IL-13およびINF- $\gamma$  値をQuantikine ELISAキット (R&D system社) を使用し測定した。また、各検体のサイトカイン量を比較するため、Pierce BCA protein assay kit (Thermo scientific社) を使用し、検体中のタンパク量を計測した。

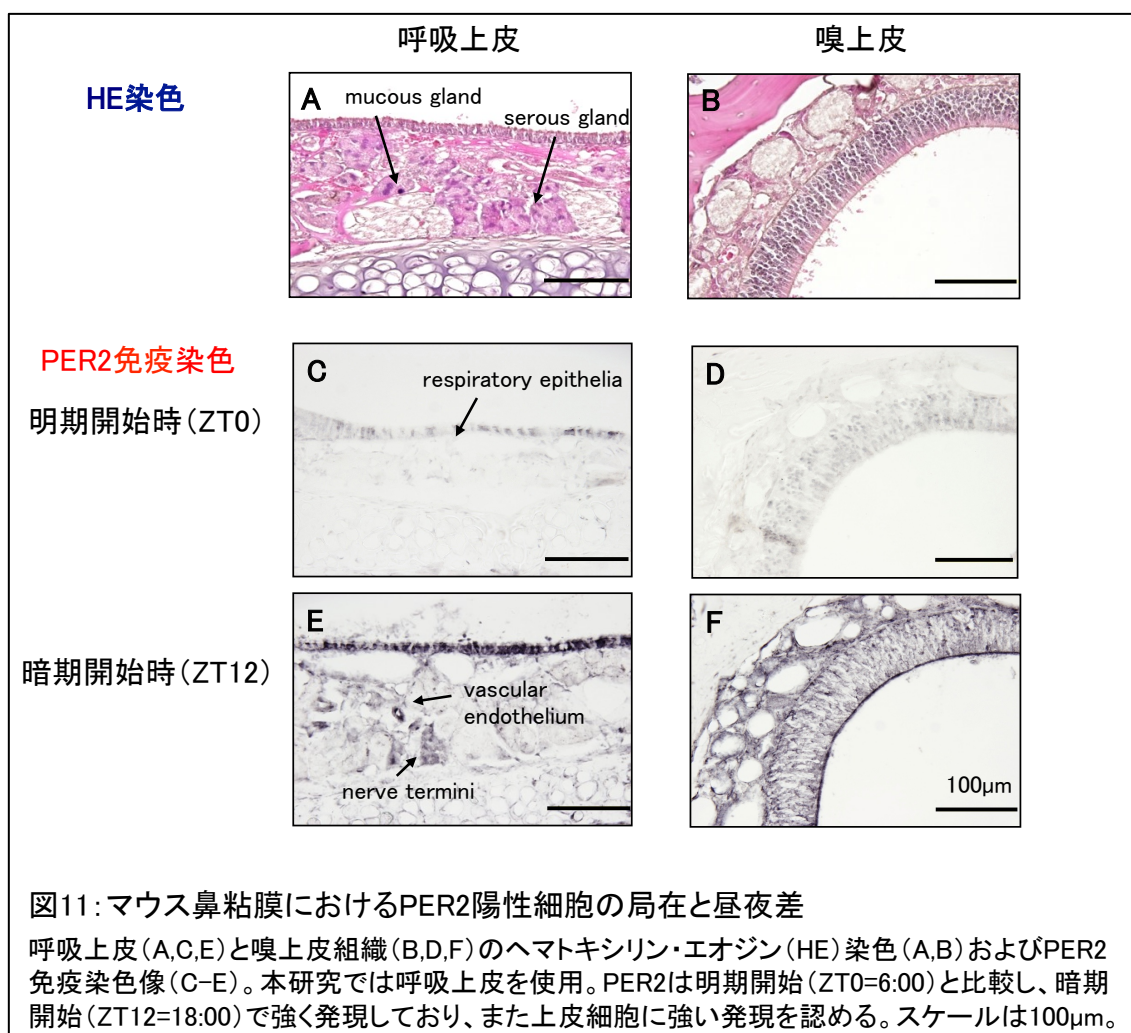
#### (10) 統計学的処理

統計値は平均値±標準誤差にて示した。概日リズムの検定は one-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc Bonferroni 試験を施行した。対照群と実験群の差は、two-way ANOVA with a post hoc Bonferroni 試験により検定した。また、二群間の検定には Student's *t* 試験を使用した。統計ソフトには Prism 6 (GraphPad Software 社) を使用した。

## 4. 実験結果

### (1) 免疫染色

鼻粘膜組織のヘマトキシリン・エオジン染色と PER2 抗体を用いた免疫染色の結果を図 11 に示す。PER2 陽性細胞は呼吸上皮組織と嗅上皮組織の両方に認めた。ZT0 では PER2 はいずれも上皮細胞のみが薄く染まる程度であるのに対し (図 11C, D)、ZT12 では上皮細胞の他、血管内皮細胞、神経終末にも、強い発現を認めた (図 11E, F)。



## (2) 定量的 real-time PCR (qPCR)

鼻粘膜 *mPer1*、*mPer2*、グルココルチコイド受容体 (*GR*) の mRNA 量を 4 時間毎 24 時間に渡り qPCR 法にて測定し、同一組織の *GAPDH* 量に対する相対値で示した。その結果、*mPer1*、*mPer2* の発現量には有意な 24 時間変動を認め、(*mPer1*,  $p < 0.05$ , *mPer2*,  $p < 0.01$ ,  $n = 6-8$  各時刻) (図 12A, B)、*mPer2* の概日リズムは ZT12、即ち、明暗サイクルの明期後半から暗期の移行期にピー

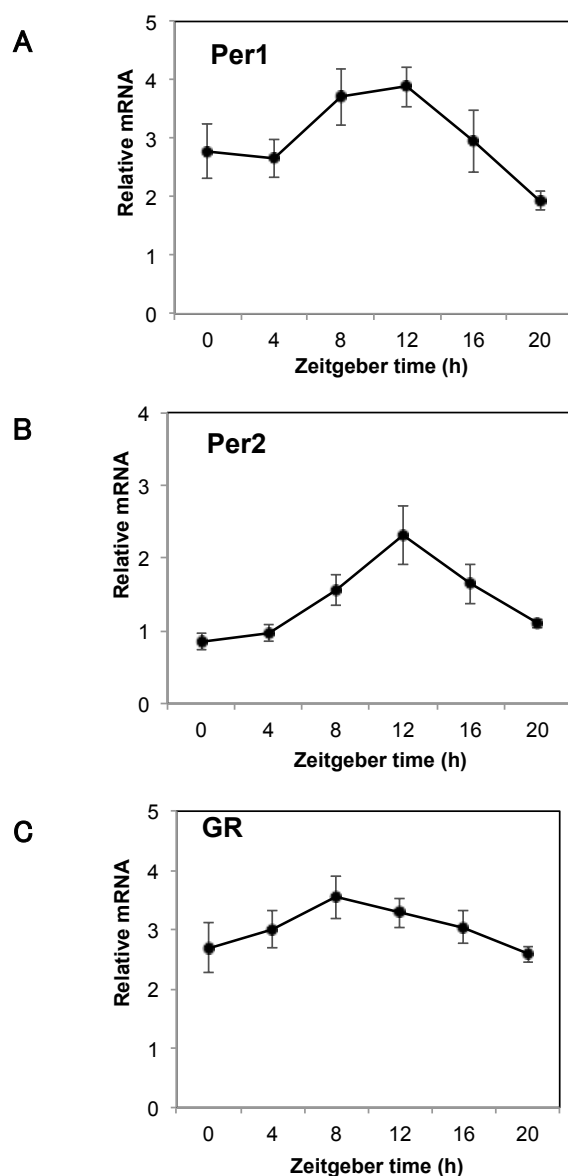
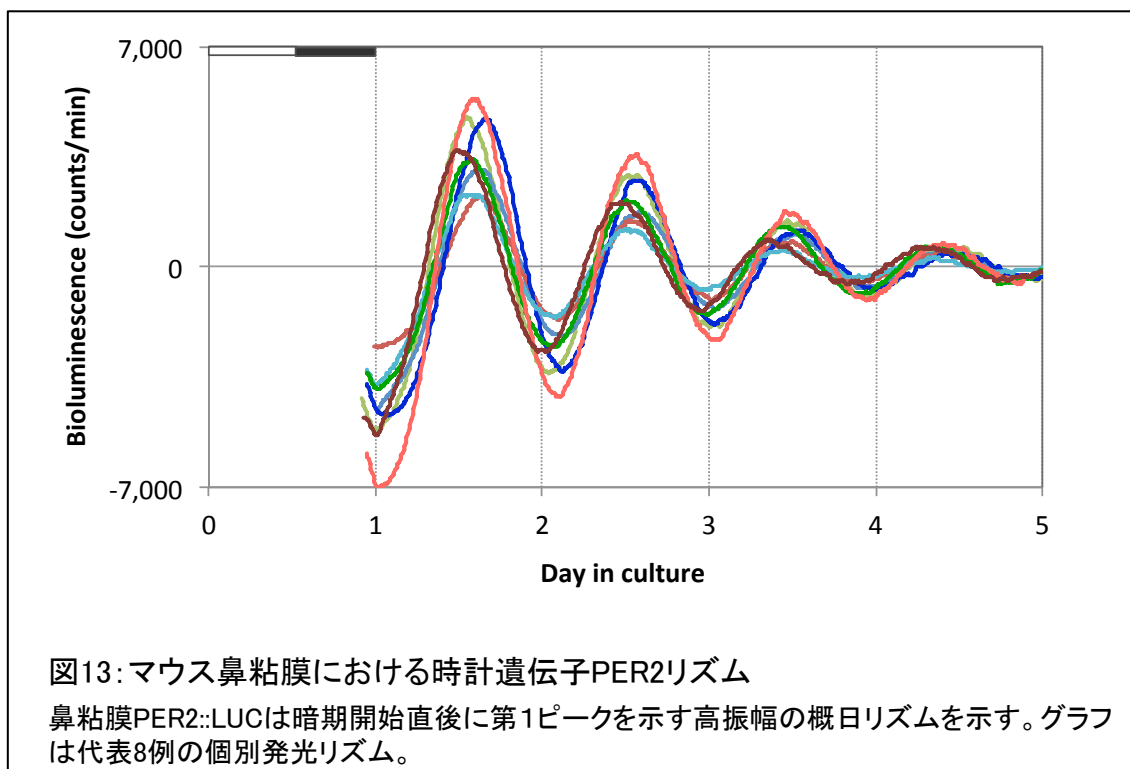


図12: マウス鼻粘膜における*Per1*(A), *Per2*(B), *GR* (C) mRNAの24時間変動パターン  
*Per1*, *Per2* mRNAには有意の24時間変動が認められた(One-Way ANOVA with post hoc Benferroni test, *Per1*,  $p < 0.05$ ; *Per2*,  $p < 0.01$ )。データは平均値±標準誤差。

クを示した。*mPer1*のリズム振幅は*mPer2*と比較し小さいが、ZT8とZT12の値がほぼ同じであることから、概日リズムのピークは両者の間にあることが示唆された。したがって、鼻粘膜における*mPer1*の概日リズムは*mPer2*よりも数時間前進しており、これは他の組織の結果と一致する<sup>14</sup>。一方で、*GR* mRNAの発現には有意な概日リズムは認めなかった。(n=6–8 各時刻) (図 12C)。

### (3) 培養鼻粘膜の発光リズム

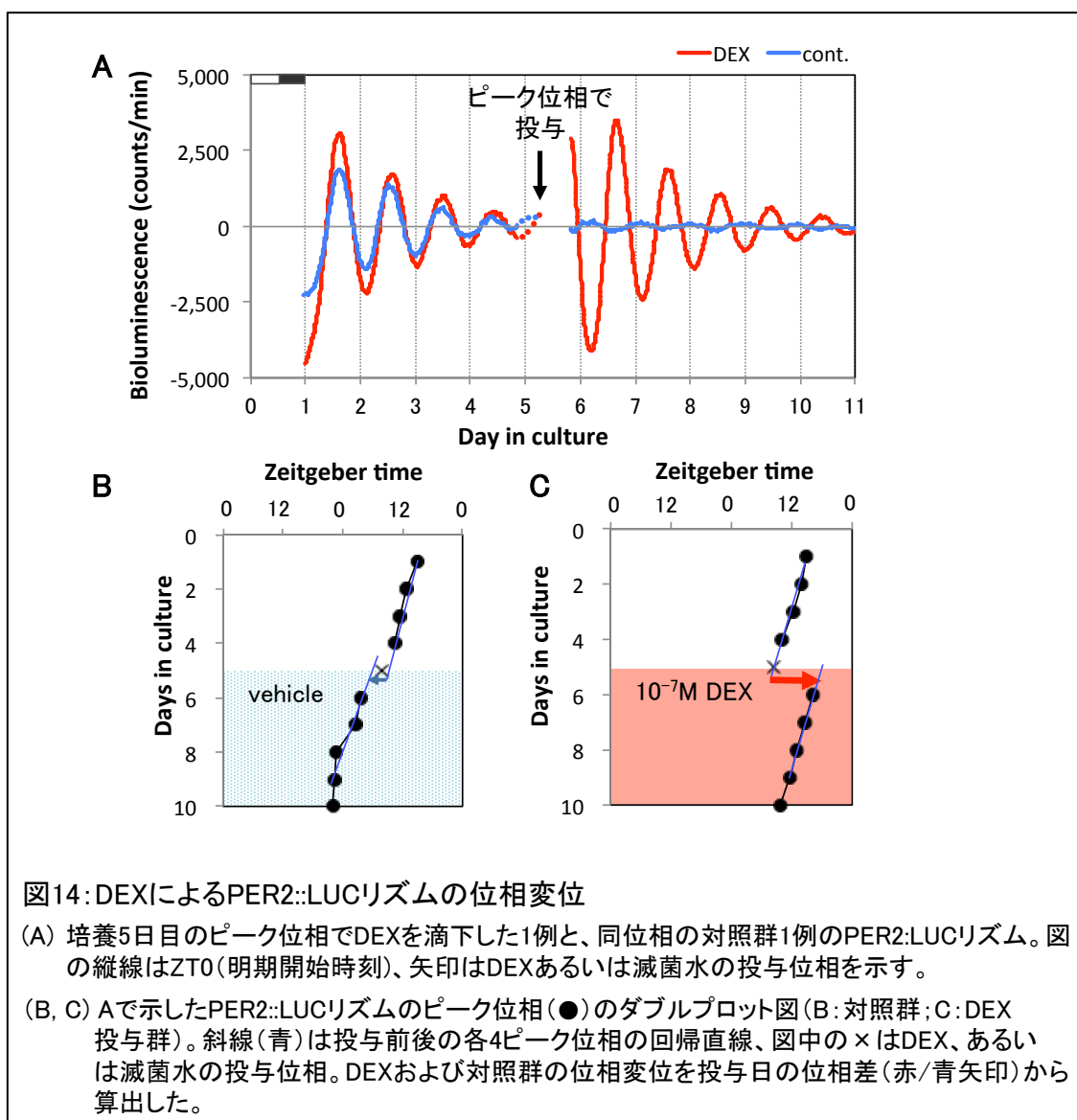
PER2::LUC ノックインマウスの培養鼻粘膜を培養膜上で連続5日以上器官培養し、その発光パターンを解析した。鼻粘膜 PER2::LUC 発現には主観的暗期前半にピークを持つ概日リズムを認めた (ZT14.2±0.3, n=15) (図 13)。概日リズム周期は 22.7±0.1 時間、培養第1周期の標準化振幅は 1.7±0.02 であった。また、培養日数を経るごとに PER2::LUC リズムは徐々に減衰し、第4周期における標準振幅を第1周期のそれと比較したところ、減衰率は 0.1±0.01 であった。

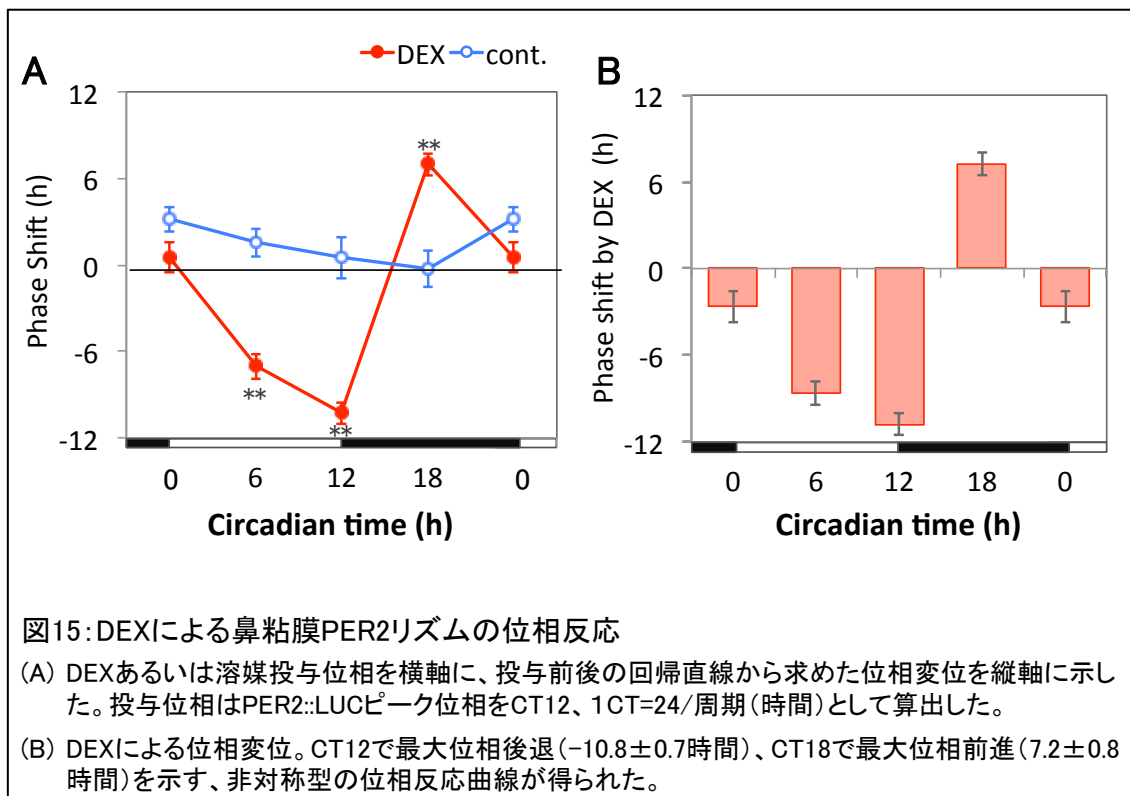


#### (4) DEX による培養粘膜生物時計の位相反応曲線

##### 1) *ex vivo* 実験

培養鼻粘膜を用い、グルココルチコイドによる位相調節の有無と様式を明らかにするため、培養 5 日目の 4 位相に DEX を投与した。鼻粘膜 PER2::LUC の概日リズムは DEX 投与（最終濃度:  $10^{-7}$  M）により位相変位を示したが、対照群の溶媒投与では有意の位相変位を示さなかった（図 14）。DEX 投与による PER2::LUC リズムの位相変位は、DEX 投与位相に依存していた（one-way ANOVA,  $p < 0.01$ ,  $n = 4-5$  各位相）（図 15A）。PER2::LUC リズムは CT12 で最大位相後退（ $-10.8 \pm 0.7$  時間）、CT18 で最大位相前進（ $7.2 \pm 0.8$  時間）を示した。

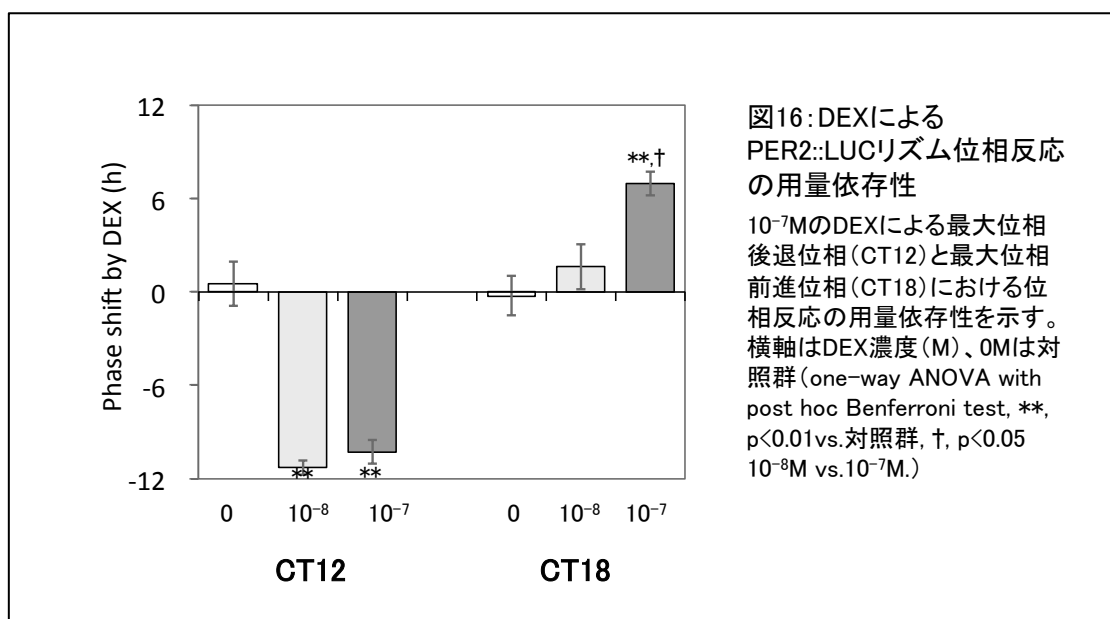


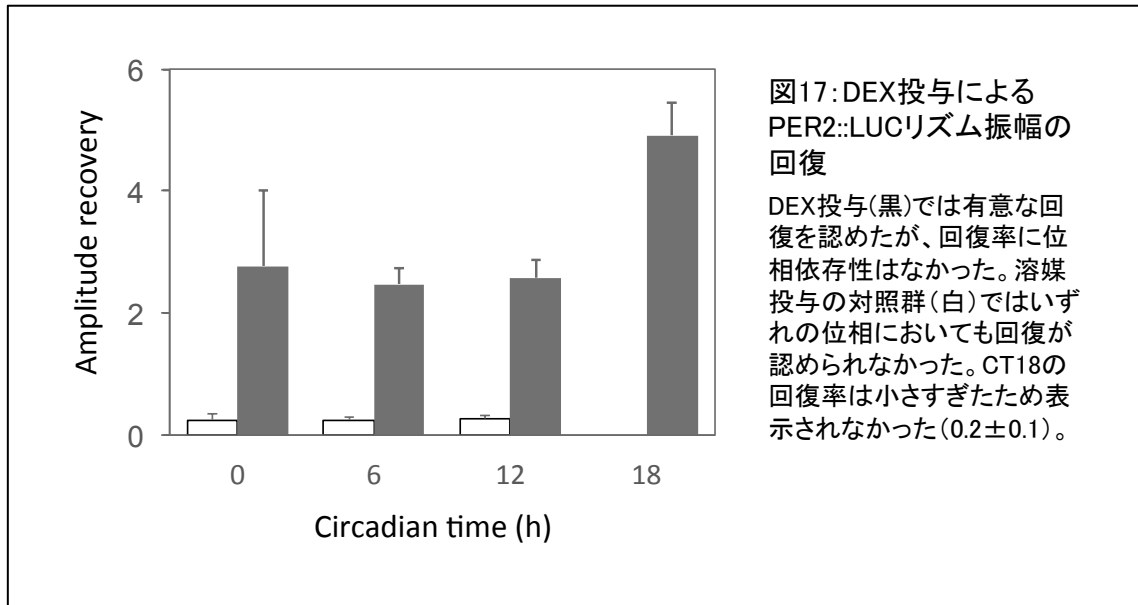


CT0 では有意な位相変位を認めなかった。位相後退に比較して位相前進が小さかったことから、CT12 と CT18 の間の大きな位相前進を見逃した可能も否定できない。このため、CT15 での DEX 投与も行ったが、位相前進は  $8.1 \pm 0.7$  時間 ( $n=5$ ) であり、CT18 と有意差がなかった。一方、対照群においては位相依存性の位相変化は認めなかった。DEX による位相反応曲線 (PRC) を作成するために、各位相において DEX によって生じた位相変位を、同位相の対照群の平均値との差から計測した。その結果、DEX による PRC は非対称性であり、最大位相後退は  $-10.8 \pm 0.7$  時間 (CT12)、最大位相前進は  $7.2 \pm 0.8$  時間 (CT18) と、位相後退部が大きく、位相前進部が小さいことが明らかになった (図 15B)。

次に、DEX による位相反応の用量依存性を、 $10^{-7}$  M DEX による最大位相後退 (CT12) と最大位相前進 (CT18) の時点で低濃度の DEX (最終濃度:  $10^{-8}$  M) を投与し、検討した。その結果、CT12 では有意な位相後退を認め (one-way ANOVA,  $p < 0.01$ , 各群  $n=5-6$ )、その大きさは  $10^{-7}$  M DEX による後退と有意差がなかった。一方、CT18 では、 $10^{-8}$  M DEX により有意な位相変位を認めなかった (図 16)。DEX による PER2::LUC リズム位相以外への影響として、培養

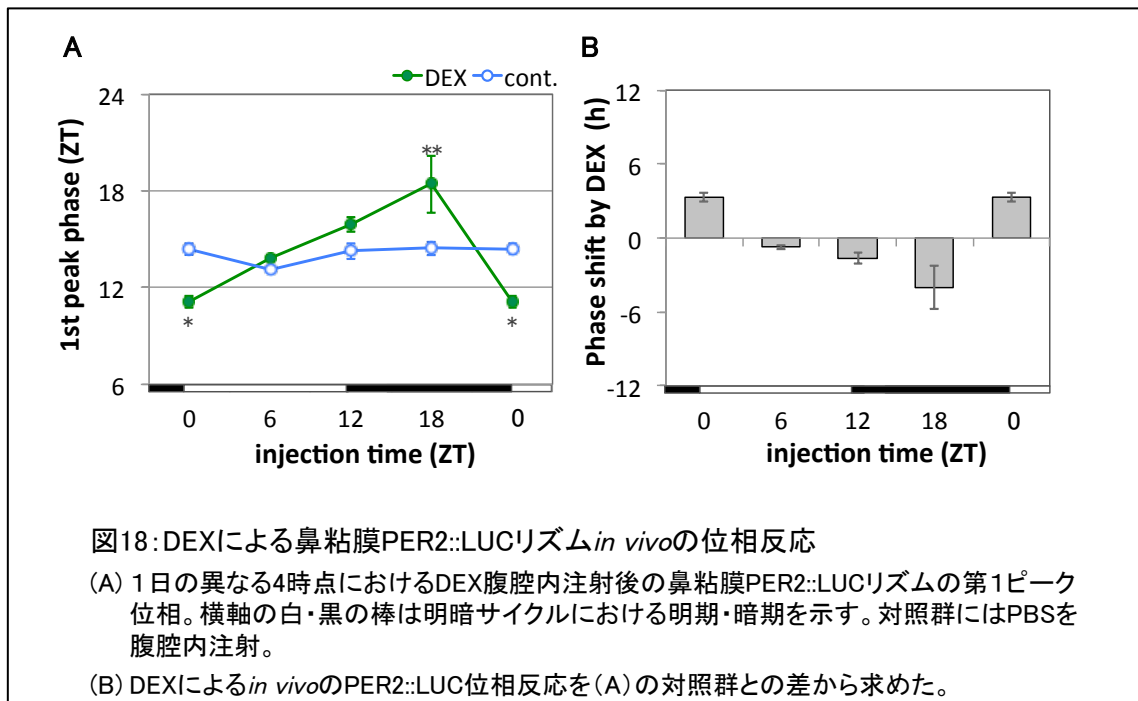
日数経過にて減衰したリズム振幅が、DEX 投与後に培養当初レベルまで回復する現象を認めた (図 14A)。そこで、DEX の PER2::LUC リズム振幅に対する影響とその位相依存性を検討した。PER2::LUC リズム振幅の回復率は培養 6 日目 (DEX 投与 1 日後) の振幅と培養 4 日目 (DEX 投与 1 日前) の振幅の比より算出した。その結果、DEX 投与群および対照群の両群において、振幅回復率に位相依存性を認めなかった (各群  $n=4-5$ ) (図 17)。このため、DEX 群、対照群で各位相のデータを合計して回復率を算出した。DEX による振幅の回復率は  $3.3 \pm 0.4$  ( $n=17$ ) であったが、対照群においてはリズム振幅の回復を認めなかった (回復率:  $0.2 \pm 0.03$ ,  $n=16$ )。振幅の減衰率を投与前 (培養 1 日目と 2 日目)、投与後 (投与 1 日目と 2 日目、即ち培養 6 日目と 7 日目) の振幅の比を用いて算出したところ、DEX 投与前後で変化を認めなかった (投与前:  $0.6 \pm 0.03$ , 投与後:  $0.5 \pm 0.01$ ,  $n=17$ )。





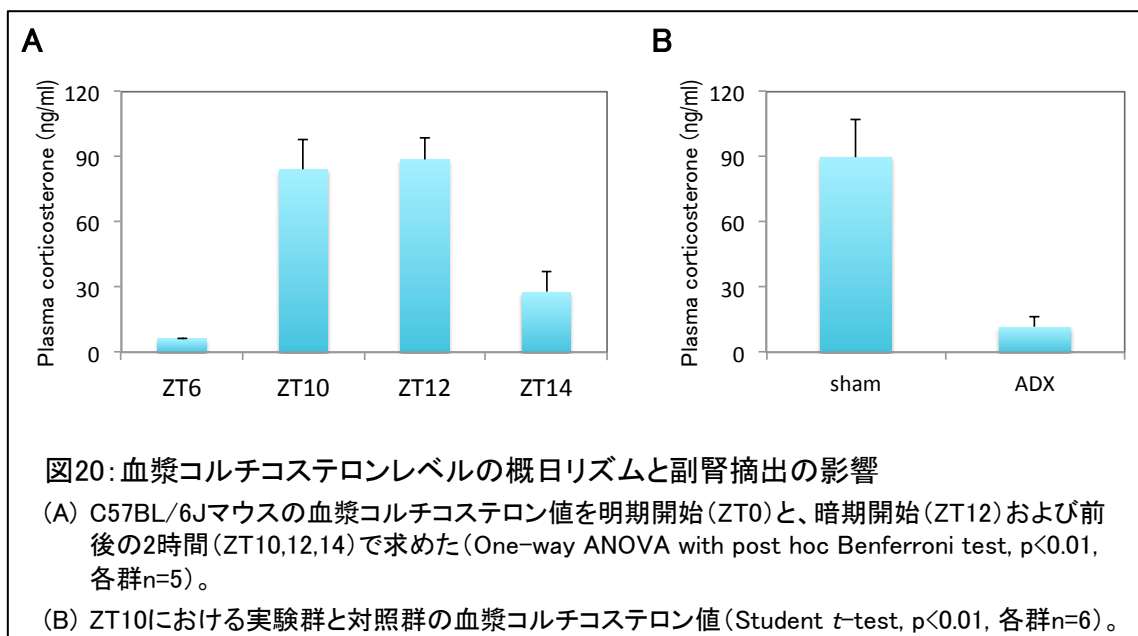
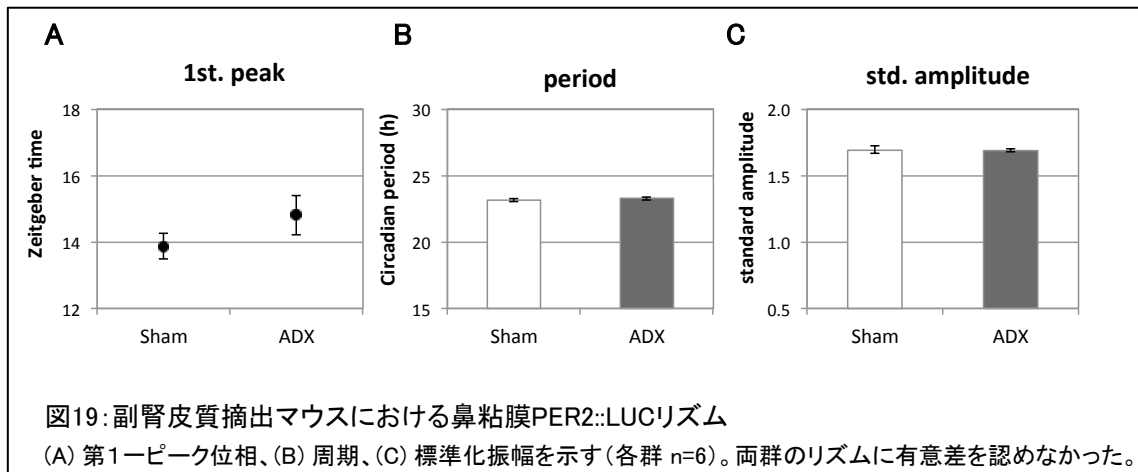
## 2) *in vivo* 実験

*in vivo* における鼻粘膜末梢時計への DEX の影響を明らかにするため、1 日の異なる 4 時点にマウスに DEX を腹腔内注射し、培養鼻粘膜の発光リズムの第 1 ピーク位相を測定し、PBS のみを腹腔内投与した対照群と比較することにより、*in vivo* の DEX による位相反応曲線 (PRC) を作成した。対照群の第 1 ピーク位相は注射時刻にかかわらず一定であり、全データの平均ピーク位相は ZT14.1 $\pm$ 0.3 であった (n=20)。DEX 投与群では、注射時刻により第 1 ピーク位相の変位を認めた。(one-way ANOVA,  $p < 0.01$ , n=5) (図 18A)。また、実験群と対照群の位相反応の間に有意差を認めた。(two-way ANOVA,  $p < 0.01$ , n=5)。DEX による位相変位量を、DEX 注射による位相変位と同時刻の対照群の第 1 ピーク位相の平均値との差から算出した。その結果、DEX 注射による PER2::LUC の概日リズムには位相依存性の位相変位が認められ (one-way ANOVA,  $p < 0.01$ )、ZT18 の注射で最大位相後退 ( $-4.0 \pm 0.8$  時間)、ZT0 の注射で最大位相前進 ( $3.3 \pm 0.4$  時間) を示した (図 18B)。標準化振幅および周期は、DEX 群 (振幅:  $1.7 \pm 0.03$ , 周期:  $22.8 \pm 0.1$  時間, n =20) と対照群 (振幅:  $1.7 \pm 0.02$ , 周期:  $22.7 \pm 0.1$  時間, n =20) との間に有意差を認めなかった。また、PBS を注射した対照群は、第 1 ピーク位相 (ZT14.1 $\pm$ 0.3)、振幅 ( $1.7 \pm 0.02$ ) (各 n=20) とともに図 13 に示した無処置マウスにおける第 1 ピーク位相 (ZT14.2 $\pm$ 0.3)、振幅 ( $1.7 \pm 0.02$ ) (各 n=15) との間に有意差を認めなかった。



## (5) 副腎摘出

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。副腎摘出した実験群の鼻粘膜 PER2::LUC リズムの第1ピーク位相は  $ZT14.8 \pm 0.4$  ( $n=6$ ) であり、偽手術を行った対照群 ( $ZT13.9 \pm 0.6$ ,  $n=6$ ) と有意差は認めないものの、遅延傾向を示した。リズム振幅(実験群:  $1.7 \pm 0.03$ , 対照群:  $1.7 \pm 0.01$ ) および周期(実験群:  $23.3 \pm 0.2$  時間, 対照群:  $23.1 \pm 0.1$  時間)では実験群と対照群の間に有意差を認めなかった(図 19A-C)。なお、血漿コルチコステロン値は実験群において有意に低値であった(実験群:  $11.6 \pm 4.8$  ng/ml, 対照群:  $89.9 \pm 17.5$  ng/ml, Student's *t*-test,  $p < 0.01$ ,  $n=6$  各群)(図 20)。

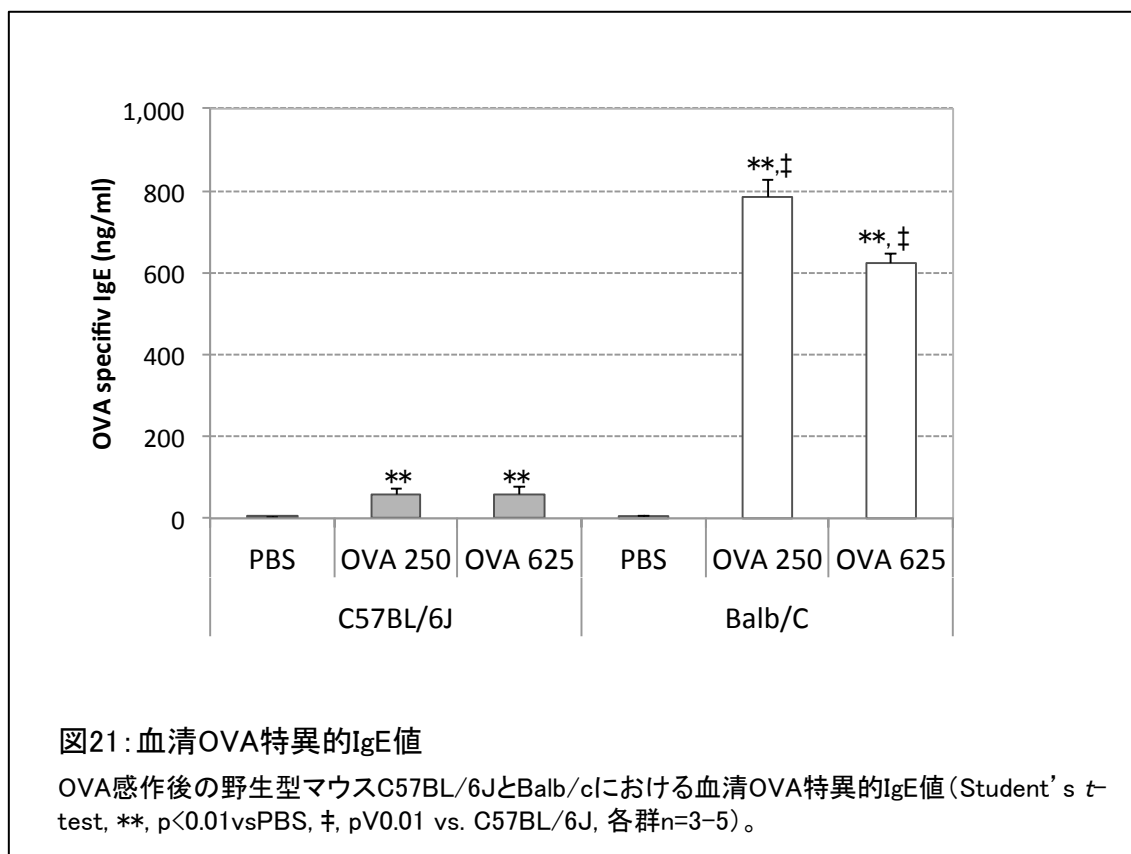


## (6) アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける鼻粘膜末梢時計

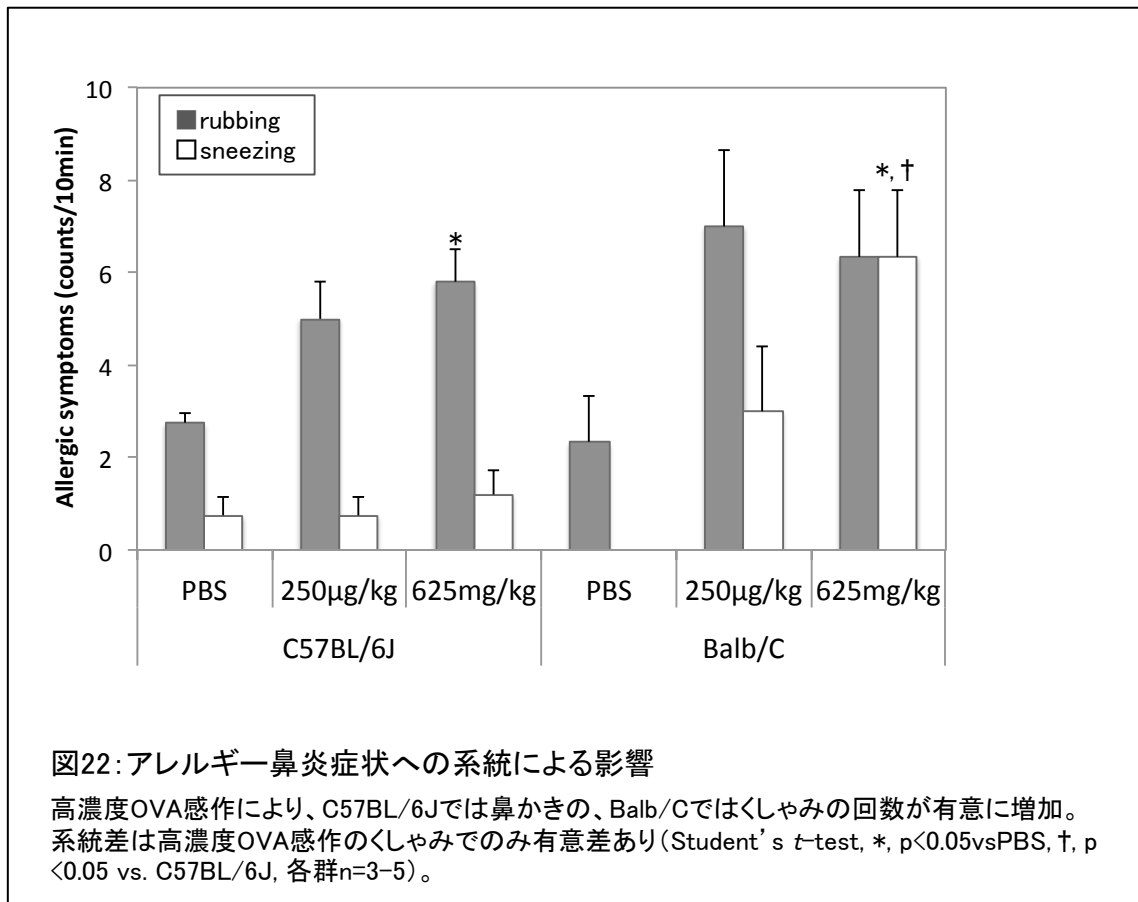
### 1) マウスの系統による感作への影響

概日リズム研究では、明瞭で安定した概日リズムを示す C57BL/6J が標準となっており、本研究でも発光レポーターマウスは C57BL/6J に 13 代以上バッククロスして用いている。一方、C58BL/6J は IgE 低誘発の系統であるため、アレルギー実験では余り用いられていない。そこで、IgE 高誘発の Balb/C 系統と OVA による感作を比較検討した。血清 OVA 特異的 IgE 値は、C57BL/6J、Balb/C 両系統とも、PBS を注射した対照群と比較し OVA 感作群では有意に高かったが、OVA 感作濃度による差は両系統とも認めなかった。また、C57BL/6J と比

較し、Balb/Cの方が、低濃度 OVA (250 mg/kg) 感作群および高濃度 OVA (625 mg/kg) 感作群ともに有意に血清 OVA 特異的 IgE 値が高かった (図 21)。

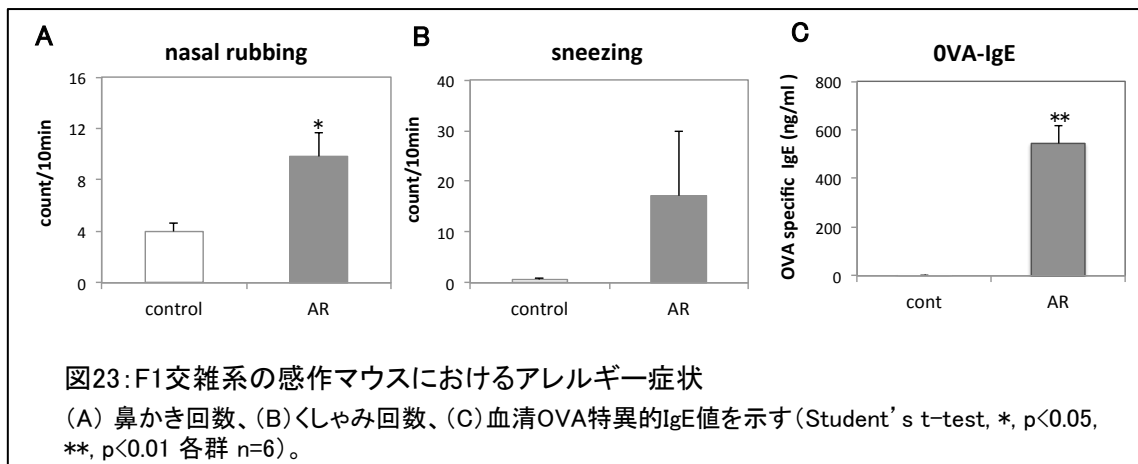


鼻かき、くしゃみの鼻炎症状に関しては、C57BL/6J、Balb/C 両系統どちらにおいても、高濃度 OVA 感作群および低濃度 OVA 感作群の間に有意差は認めなかった。両系統間の差については、高濃度 OVA 感作群のくしゃみの回数が Balb/C で有意に多かったが、低濃度 OVA 感作群および高濃度群 OVA 感作群の鼻かき症状では有意差を認めなかった (図 22)。



OVA によるアレルギー感作の結果から、PER2::LUC ノックインマウスのバックグラウンドである C57BL/6J 系統のマウスでも感作が成立していたが、血清 IgE 値が大きく異なるため、アレルギー誘導性の高い Balb/C 系統のマウスと交配した F1 マウスを使用して、鼻粘膜の発光リズムを測定した。また、高濃度 OVA 注射時にアナフィラキシー症状を呈し死亡するマウスが出現したこと、ならびに、高濃度と低濃度の OVA によるアレルギー鼻炎症状に、Balb/C のくしゃみ症状以外に差を認めなかったことから、以下の実験は低濃度 OVA にて感作を施行した。

F1 交雑系アレルギー感作マウスの鼻炎症状は、鼻かきの回数は感作群の方が有意に多かった (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ,  $n=6$  各群) (図 23)。一方、くしゃみは感作群で多い傾向にあるものの有意差は認めなかった。血清 OVA 特異的 IgE 値は、感作群で有意に高かった (Student's *t*-test,  $p < 0.01$ ,  $n=6$  各群)。



## 2) 培養鼻粘膜の発光リズム

C57BL/6J 系統の PER2::LUC マウスと Balb/C 系統のマウスの F1 交雑系を用い、アレルギー感作後に鼻粘膜を培養し、PER2::LUC リズムを計測した。その結果、培養鼻粘膜はいずれも PER2::LUC 発現に、主観的暗期前半に第 1 ピーク位相 ( $ZT13.7 \pm 0.2$ ,  $n=6$ ) を持つ、明瞭な概日リズムを示した (図 24)。鼻粘膜 PER2::LUC のリズム周期は  $22.8 \pm 0.1$  時間、培養初日の標準化振幅は  $1.7 \pm 0.02$  であった。非感作対照群 (F1 交雑系) における培養鼻粘膜の PER2::LUC 発現リズムは、第 1 ピーク位相が  $ZT13.2 \pm 0.1$ 、リズム周期は  $22.8 \pm 0.2$  時間、培養初日の標準化振幅は  $1.6 \pm 0.02$  であり、ピーク位相、周期、振幅すべてにおいて両群間に有意差を認めなかった (図 25)。

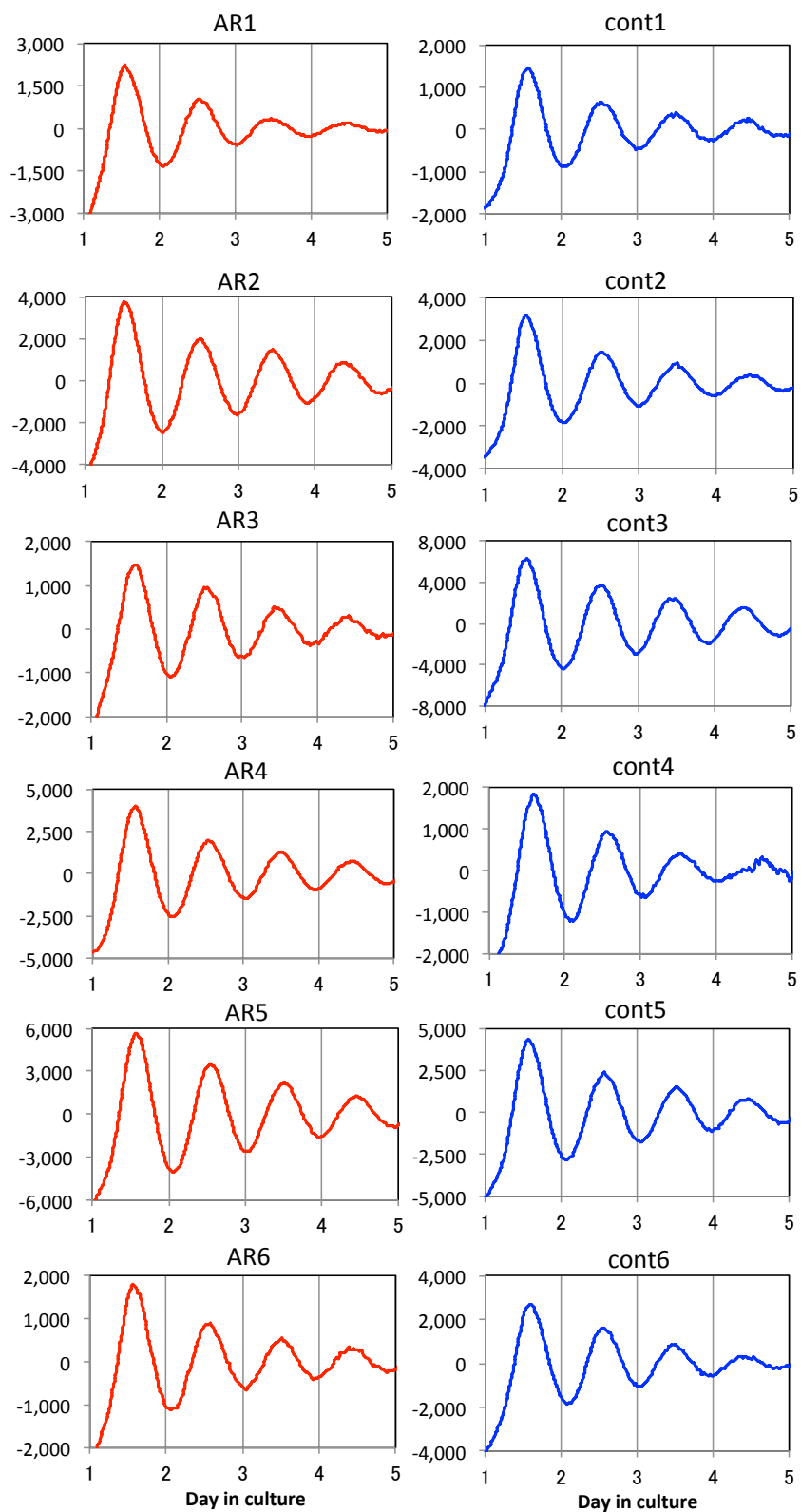
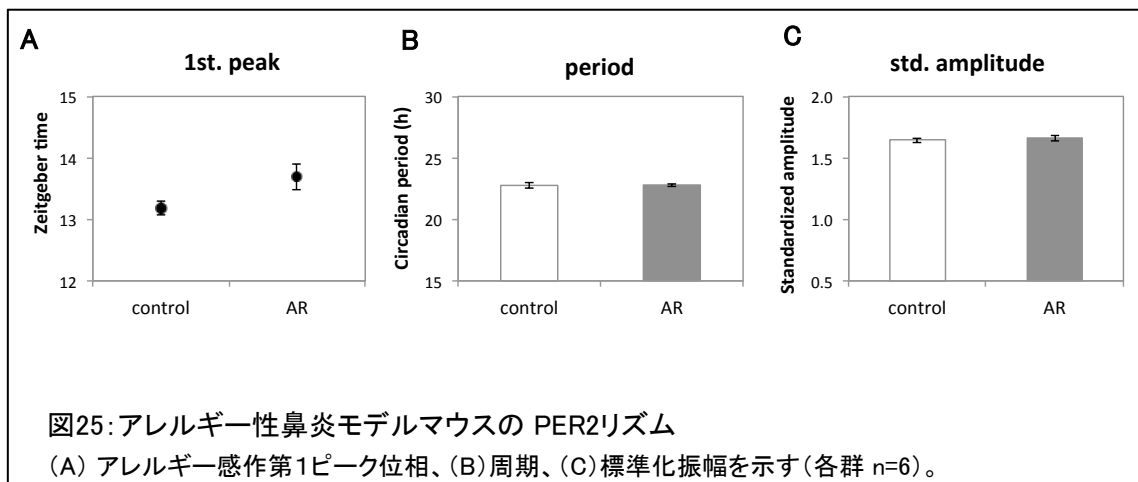


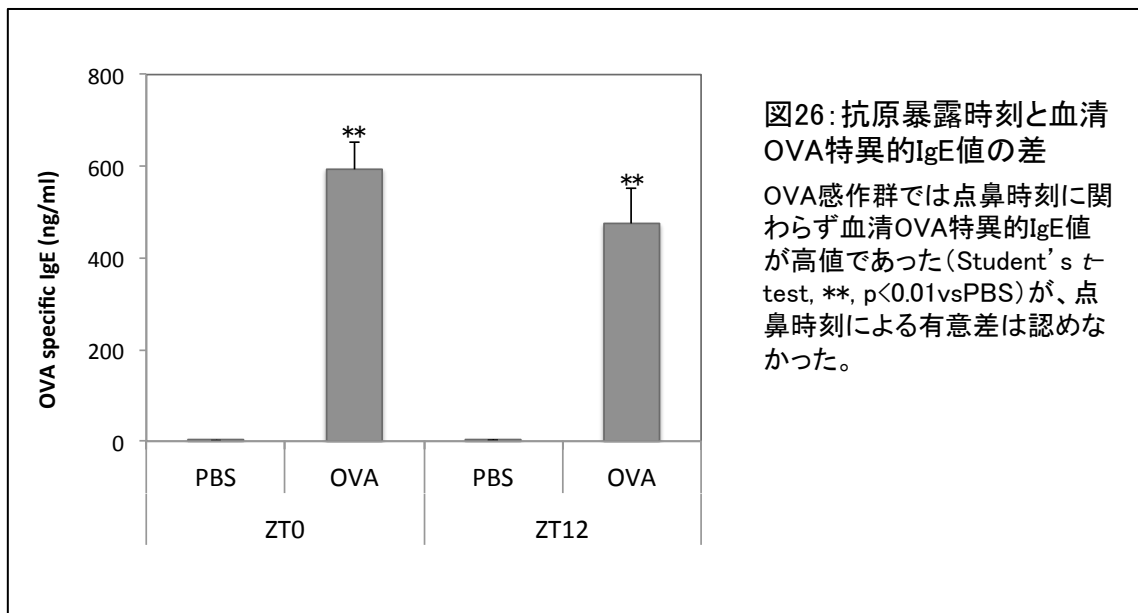
図24: アレルギーモデルマウスおよび対照群の鼻粘膜PER2リズム

アレルギー感作群 (AR, 赤) と対照群 (cont, 青) 各6例の鼻粘膜PER2::LUCリズムを示す。図中の縦線は飼育下での明期開始位相。

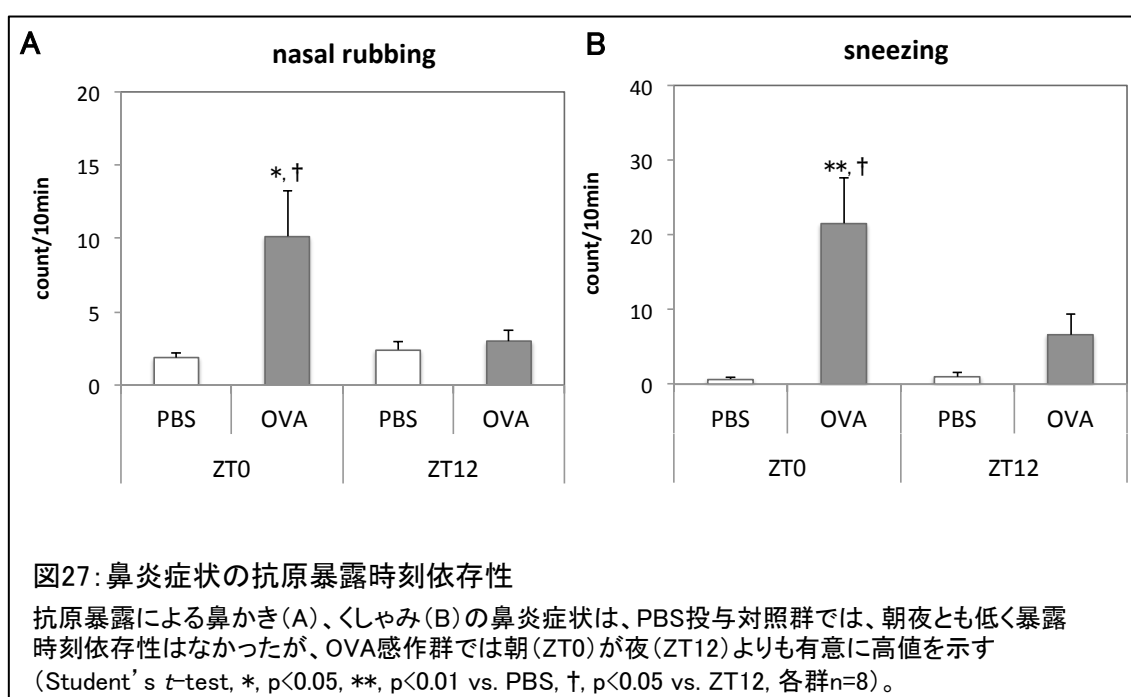


### 3) 抗原暴露時刻による症状変化

血清 OVA 特異的 IgE 値は、ZT0 点鼻群、ZT12 点鼻群ともに、OVA 感作群が、対照群と比較し有意に高かった (Student's *t*-test,  $p < 0.01$ ,  $n = 8$  各群) (図 26)。ZT0 点鼻群と ZT12 点鼻群の間には有意差を認めなかった。



OVA 感作群では、抗原暴露による鼻炎症状に明瞭な昼夜差がみられた。OVA 感作群は、鼻掻き、くしゃみのいずれの鼻炎症状も、ZT12 点鼻群に比較し、ZT0 点鼻群において、有意に回数が多かった (Student's *t*-test,  $p<0.05$ ,  $n=8$  各群) (図 27)。また、ZT0 点鼻群では同時刻点鼻の対照群との間に、両症状において有意差を認めるのに対し (Student's *t*-test, 鼻掻き:  $p<0.05$ , くしゃみ:  $p<0.01$ ,  $n=8$  各群) (図 27)、ZT12 点鼻群においては対照群との間に有意差を認めなかった。



抗原暴露による鼻汁好酸球数の変化に暴露時刻の影響があるかどうかを検討するため、PBS による鼻腔洗浄液を回収し、沈査の塗抹標本を作製して、細胞の組織学的評価を試みた。しかし、OVA 群、対象群どちらにおいても鼻汁中に好酸球を認めなかった。検討のためには、鼻汁採取法のさらなる改良が必要と考えられる。

#### 4) IL-4, IL-5, IL-13, INF- $\gamma$ 測定

鼻粘膜および、鼻汁の IL-4、IL-5、IL-13、INF- $\gamma$  値は、OVA 感作群、対照群どちらも検出値以下であった。血清 IL-4 も両群ともに検出値以下であった。

## 5. 考察

ほ乳類の概日時計は SCN にある中枢時計と全身の様々な組織に存在する末梢時計から成る<sup>7</sup>。本実験では、マウス鼻粘膜に末梢時計が存在することを明らかにし、さらに、鼻粘膜末梢時計の概日リズムが DEX によって位相依存性の位相変化を示すことを時計遺伝子の発光レポーター系を用い、初めて検証した。鼻粘膜 PER2::LUC 発現リズムのピーク位相は、主観的暗期前半に認めた。これは免疫染色や qPCR で測定した mRNA の発現値の結果と合致するものであった。鼻粘膜末梢時計の概日リズムは、下気道組織のリズムと類似していた<sup>15</sup>。肺の概日時計はクララ細胞に存在すると報告されており<sup>16</sup>、クララ細胞は肺サーファクタントに類似した粘液を分泌することで、細気管支の上皮組織を外的刺激から保護していると言われている<sup>17,18</sup>。また、クララ細胞から分泌されるケモカイン CXCL5 の概日リズムが、肺の炎症反応における昼夜差を生み出しているとの報告もある<sup>19</sup>。本実験の免疫染色の結果、鼻粘膜上皮に PER2 陽性細胞を認めた。鼻粘膜上皮は生体が呼吸を介して必然的に受ける物理的、化学的刺激、および病原体から身体を守る最前線であり、鼻粘膜末梢時計の要となることが予想される。鼻粘膜上皮が高振幅の時計遺伝子発現リズムを示すことは、生体が環境の周期性を予測して生体防御を行っていると考えられる。

### アレルギー症状の概日リズムとそのメカニズム

睡眠覚醒、体温、血圧をはじめ、生体のほとんどの生理機能は生物時計に駆動される明瞭な概日変動を示す。様々な疾病の症状にも明瞭な概日リズムが見られる<sup>20</sup>。虚血性心疾患の発症は朝方に集中し、関節リウマチは朝に増悪する。アレルギー性疾患も、発症に明瞭な概日リズムがあることが古くから知られており、蕁麻疹は夜に、気管支喘息は夜半から明け方に発症のピークを示す。一方、アレルギー性鼻炎症状は、夜間から出現し早朝最も増悪する<sup>1,2</sup>。ルシフェラーゼレポーターの導入により、中枢時計の SCN だけでなく、生体の各臓器が培養下で時計遺伝子発現に明瞭な概日リズムを示すことから、末梢時計の存在が明らかとなり<sup>21</sup>、これら末梢時計が臓器特異的なリズムを発現することで、各生体機能リズムを生じる重要な役割をもつことが判かってきた。末梢時計は、外界の 24 時間周期の明暗サイクルに同調した中枢時計 SCN により位相調節を受けるが、その機序としては各末梢時計が、SCN により調節されたホルモンや

自律神経系の概日リズムに反応することが考えられている<sup>22</sup>。さらに、各末梢時計はそれぞれ若干異なる内因性周期をもつため<sup>14</sup>、各々、臓器特異的なリズム位相を示し、各臓器の生理機能に特異的なリズムを生じると考えられる。したがって、同じアレルギー性疾患でも、皮膚、気管支、そして鼻粘膜の末梢時計が異なる位相で反応すると考えられる。最近の研究では、IgE 抗体による肥満細胞脱顆粒反応である受動型皮膚アレルギー反応（passive cutaneous anaphylaxis: PCA）には概日リズムがあり、野生型マウスにおける PCA は主観的暗期に低くなるという報告がある<sup>23</sup>。PER2 を産生できない *Per2* 変異マウスや副腎摘出マウスにおいては、PCA の 24 時間変動を認めなかった。これらの結果は、肥満細胞の IgE 依存性脱顆粒反応は、副腎からの周期的なグルココルチコイド分泌、肥満細胞の時刻依存的なグルココルチコイドに対する反応性、のどちらか、あるいは両方を通して、時計遺伝子 *Per2* によって制御されていることを示唆している。

#### グルココルチコイドによる末梢時計の同調

本研究では、鼻粘膜の末梢時計がグルココルチコイドにより同調することを明らかにし、位相反応曲線の形から、血中グルココルチコイドが鼻粘膜末梢時計の内因性同調因子である可能性を強く示唆する結果を得た。HPA 系の活動には概日リズムが存在し、マウスにおいては、グルココルチコイドが夕方上昇する明瞭な概日リズムを示すことは、SCN の中枢時計の発見以前から知られている。SCN の出力線維が室傍核 Corticotropin Releasing Hormone (CRH) 産生細胞の近傍に終わっており、SCN の破壊で HPA 系の概日リズムが消失するため、SCN が CRH 合成を直接制御している可能性が高い<sup>24</sup>。グルココルチコイドは高振幅で安定した概日リズムを示すことから、中枢時計から末梢時計へと信号を送る液性伝達物質である可能性が検討されていた。事実、肝臓や線維芽細胞などの末梢時計ではグルココルチコイドによって時計遺伝子リズムが位相変位することが明らかにされてきた<sup>25</sup>。グルココルチコイドは、多くの末梢時計の同調因子であると考えられる。

#### 鼻粘膜末梢時計の位相反応曲線の特徴

本実験の結果から、グルココルチコイドが鼻粘膜末梢時計にとっても、強力な同調因子であることが判明した。グルココルチコイドによる鼻粘膜 PER2::LUC

発現リズムの PRC は、*ex vivo* および *in vivo* どちらにおいても、広い位相後退相と比較的狭い位相前進相から成り立っている。PRC の大きさと形は、各生物時計の当該同調因子による同調の範囲と様式を示している。位相前進および後退反応ともに約 12 時間の大きな変位を示す PRC を 0 型 PRC と呼び、この場合、どの位相に同調因子が作用しても位相反応の結果同じ位相に変位する。今回の鼻粘膜リズムは、位相後退は 0 型 PRC に匹敵する大きさであったが、前進相が小さい非対称性である。*ex vivo* では最大位相後退が約 11 時間に及び、一度の刺激でリズム位相の逆転までを生じること示しているが、最大位相前進は約 7 時間である。さらに CT15 での DEX 投与では、CT18 と有意差のない位相前進が確認されたことから、PRC の形の非対称性は、測定位相の不足によるものではない。

一方、今回の PRC の形は光刺激によるマウスの行動リズムの PRC の結果に類似している<sup>26</sup>。マウスの生物時計の内因性周期は 24 時間よりも短い。また、鼻粘膜末梢時計の周期も 22.7 時間である。24 時間より短い周期の時計は、同調因子によって位相後退することで 24 時間に同調する。このため、環境の 24 時間周期への同調のためには、位相前進はほとんど不要である一方、位相後退相の大きい PRC をもつことは有利であり、今回の PRC の形には地上の 24 時間周期への同調に適した時計をもつことを意味する。マウスの血漿グルココルチコイド値は明期後半から暗期前半 (ZT10 から ZT14) にかけて高値となり (図 20)、今回得られた PRC の形では、この時刻に DEX による位相後退が見られる。グルココルチコイドによる PRC の形と内因性グルココルチコイドのリズムは一致しており、内因性グルココルチコイドが鼻粘膜末梢時計の位相を調整する SCN からの同調因子である可能性を示唆している。

### ***ex vivo* PRC と *in vivo* PRC の相違**

今回の実験では、*ex vivo* と *in vivo* の PRC の形、振幅に差異が認められた。PRC の形の差異は、位相後退相から前進相への移行点 (Crossover point) にみられ、*in vivo* PRC が *ex vivo* PRC に比較し、約 6 時間後退している (*ex vivo* PRC で CT12 と CT18 の間、*in vivo* PRC で ZT18 と ZT24 の間)。振幅、すなわち位相変位の大きさについては、位相後退相も前進相も、*in vivo* PRC が *ex vivo* PRC に比較して小さい。*in vivo* 実験では、明暗サイクル環境の下でマウスを飼育していることから、SCN の中枢時計からのリズム信号による影響を無視でき

ず、これが DEX の鼻粘膜時計に対する作用に何らかの影響を及ぼし、位相変位の大きさや crossover point の位相に差異を生じさせた可能性が考えられる。また、培養操作それ自体が位相変位を生じさせる組織もあり、*ex vivo* PRC の crossover point が若干前進した可能性も否定できない<sup>27,28</sup>。ただし、本研究では、培養操作が組織採取時間に依存して PER2::LUC リズム位相に影響する可能性を除去するため、組織採取時間を一定にしている。また、今回測定された PER2::LUC リズム位相が、qPCR にて解析したリズム位相と一致していることから、鼻粘膜 PER2 リズム位相に培養操作それ自体が影響した可能性は低いと考えられる。PRC の振幅の差については、一般的に *ex vivo* PRC は *in vivo* PRC の振幅より遥かに大きいことが知られている<sup>25,29</sup>。この差は、*in vivo* における生体システム（階層性振動体のネットワーク）、組織システム（振動細胞ネットワーク）の存在が、過大なシフトを抑制している可能性が示唆されている。中枢時計である SCN では振動細胞間に強いネットワークが存在し、このため、個々の内因性細胞振動周期が大きく異なるにも関わらず、器官培養では長期に渡り細胞振動が同期し、組織として安定したリズムを発振することが知られている<sup>30-32</sup>。SCN 内の振動細胞間ネットワークが過大な位相変位や、温度変化による位相変位を抑制していることが、テトロドトキシンによるネットワークの遮断や、各種時計遺伝子変異体による検討の結果、明らかにされている<sup>33-36</sup>。

### グルココルチコイド位相調節の投与法と用量依存性

今回の実験では、多くの先行研究による情報が豊富な DEX の培養液中への Bath application により<sup>25</sup>、グルココルチコイドによるリズム位相調節を検討した。培地交換は、それだけで株化された細胞や末梢時計の位相を変位させることが知られている<sup>22,29</sup>。その際、培養下で消費される培養液中のグルコース濃度<sup>37</sup>、培養中に変化する可能性のある pH<sup>38</sup> や浸透圧<sup>39</sup> が位相変位のシグナルとなりうることも報告されている。そこで、培養液を交換することなく、グルココルチコイドの投与を行った。培養液中での DEX の半減期は不明であるが、12 時間近い大きな位相変化であっても、移行期がみられず、変位が一日以内に出現した後は安定したリズムを示した（図 14C）。この実験結果から、リズム位相への影響は DEX 投与直後に出現すると考えられる。DEX による位相反応は DEX の濃度に依存する。しかし、用量依存性は、位相後退相と前進相で異なることが分かった。 $10^{-7}$  M の DEX 投与で最も位相前進した CT18 において、 $10^{-8}$

M の DEX では有意な位相反応を認めなかった。一方で、 $10^{-7}$  M の DEX 投与で最も位相後退した CT12 においては、 $10^{-8}$  M の DEX でも  $10^{-7}$  M とほぼ同程度の有意な位相後退を認めた。このような DEX 濃度による位相反応の相違から、DEX による位相後退と位相前進は、異なる機序によって生じているものと推測できる。光刺激による位相後退と位相前進も異なる機序が想定されており、異なる伝達物質や細胞内情報伝達系の関与の可能性が示唆されている<sup>40-42</sup>。

### グルコルチコイド以外の同調因子

意外なことに、副腎摘出は培養鼻粘膜の概日時計位相に、ほとんど影響を与えなかった。先行研究における副腎摘出による概日リズムへの影響は、組織および遺伝子によって異なり、下垂体、肺、SCN および SCN 外のいくつかの脳組織の時計遺伝子リズムにはほとんど影響がないという報告がある<sup>43-45</sup>。また、肝臓において概日変動を示す約 200 の遺伝子の内、副腎摘出によって約半数の肝代謝に関わる様々な遺伝子の発現概日リズムが消失したが、解析されたすべての時計遺伝子および時計関連遺伝子の発現には影響がなかったという報告もある<sup>46</sup>。これらの結果から、内因性のステロイド以外にも、交感神経から分泌されるノルアドレナリン等が、グルコルチコイドの存在しない状況下において、代償的に時計を調整する役割を果たしているものと推測される<sup>47</sup>。肝臓においても、グルコルチコイドが強力な同調因子として作用する一方、アドレナリン投与でも時計遺伝子発現リズムを変位することが報告されている<sup>47</sup>。また、顎下腺末梢時計は、多くの末梢時計位相をシフトさせる周期的制限給餌によってもリズム位相が変位しないが、顎下腺を支配している交感神経節である上頸神経節を切除すると、容易に周期的制限給餌により変位することが報告されている<sup>48</sup>。時計を調整する仕組みが数多く存在することは、個々の障害があっても鼻粘膜の機能の概日リズムを維持することが可能となるため、鼻粘膜概日時計にとって有益と思われる。一方、鼻粘膜末梢時計が副腎摘出によって独自の内因性周期でフリーランし、その周期が 24 時間に極めて近かったため、2 週間後のリズム位相測定では有意差が出なかった可能性は完全には否定できない。この可能性の検討は、より長期間の副腎皮質摘出実験や視交叉上核破壊動物を用いた DEX 同調実験により可能と思われ、今後の課題である。

### グルココルチコイドの鼻粘膜末梢時計への作用機序

本実験の結果では、鼻粘膜の *GR* mRNA 発現量に 24 時間変動を認めなかった (図 12)。このため、DEX による位相依存性の位相変位は、単に細胞内 *GR* レベルの概日リズムを反映しているわけではなく、概日リズム発振の細胞内メカニズムである時計遺伝子の転写翻訳自律発振分子フィードバックループ (コアループ) に作用して生じていると考えられる。一方で、*GR* の機能および、その下流因子の概日リズムもまた、補足的に位相依存性に影響を及ぼしている可能性がある。*Per2* のプロモーターにはグルココルチコイド反応領域 (Glucocorticoid response element: GRE) が存在し、*Per2* が周期的に発現している間は *GR* が結合しており、グルココルチコイドによる時計遺伝子の調整に重要な役割を果たしていると報告されている<sup>49</sup>。グルココルチコイドと結合した活性型 *GR* は、熱ショックタンパク質を解離して核に移行し、*Per2* プロモーター上の GRE に結合して、*Per2* の転写を促進させる。*Per2* の転写率が変化することで、コアループにおける転写が加速または減速し、それによってリズム位相が変位することが予測される<sup>50</sup>。

本実験で、鼻粘膜のリズム振幅は DEX 投与後に回復した。DEX による振幅増強の機序は不明であるが、振幅の減衰率が DEX 投与前後で変化がないことから、その増幅効果は 1 周期以内で消失すると考えられる。DEX 投与後の減衰率は、培養初期の減衰率と有意差がないこと、また、DEX の PRC がほぼ 0 型並みの大きな振幅を示すことから、培養下で脱同調した個々の細胞振動が DEX で一斉に同調したことが、振幅増大の要因と考えられる。なお、DEX による振幅増強に位相依存性を認めないことから、グルココルチコイドの細胞内情報伝達系は概日リズムの影響をほとんど受けないと思われる。

### 鼻粘膜末梢時計の位相反応の時間治療への応用

ステロイド局所投与はアレルギー性鼻炎の有効な治療法であり、治療薬の中には 1 日 1 回の使用で有効なものもある<sup>51-53</sup>。鼻噴霧用ステロイド薬は体循環にほとんど吸収されず、吸収されても速やかに分解され、HPA 系への重篤な副作用は今までに報告されていない<sup>54</sup>。今回の実験から、グルココルチコイドが投与位相により鼻粘膜の末梢時計位相を大きくシフトさせることが分かった。鼻粘膜末梢時計は、外界からの物理・化学的刺激や微生物感染からの予防が必要となる活動期には粘液の分泌やサイトカインの活性化により生体防御活性を

上昇させ、休息期には細胞修復を行うなど、鼻粘膜の生理機能維持に作用していると考えられる。このため、ステロイド投与により、鼻粘膜末梢時計が中枢時計のリズムから乖離するだけでなく、他の末梢時計とも乖離を生じる可能性がある。鼻粘膜の時計が個体の活動と休息のリズムから乖離することは、生体防御の観点からも好ましくない。また、時刻を無視してステロイドを投与すると、鼻粘膜のリズム位相が変位する可能性があるため、最適投与位相を推定することができなくなる。時間生理学の観点からは、鼻噴霧用ステロイド薬の最適使用時刻は、位相変位が最小の時間帯が望ましい。夜行性のマウスの場合、DEX による位相変位を認めない時間帯は ZT0-6 の間、つまり明期前半である。これは、昼行性のヒトの場合、暗期前半に相当する。この結果は、吸入ステロイド薬が喘息の治療に最も効果的である時刻と一致する<sup>55,56</sup>。不適切な時刻のステロイド局所投与は、鼻粘膜末梢時計を中枢時計や他の末梢時計から脱同調させるが、内的脱同調を繰り返すことで、疾病の危険性が高まるという報告や<sup>57</sup>、高齢マウスにおける死亡率上昇などが報告されている<sup>58</sup>。適切な時間帯でのステロイド投与で、生体の時間的統合を維持しなら治療効果を得る必要がある。

#### アレルギー感作の生物時計への影響

概日リズム研究では、安定した明瞭な行動リズムを示す C57BL/6J マウスが標準となっており、このため、今回用いた PER2::LUC マウスも、すでに 13 代以上バッククロスを行ってから使用している。一方、C57BL/6J 系統は IgE 低誘導性であり、アレルギー感作実験では余り用いられないことがない。本研究においても、OVA 感作により C57BL/6J マウスも、血中 IgE レベルが有意の上昇を示したものの、高誘導性の Balb/C マウスと比較すると、誘導レベルは 1/10 以下であった。一方で、アレルギー性鼻炎症状には C57BL/6J と Balb/C との間の有意差がなく、IgE レベルが必ずしもアレルギー症状の程度を反映していないことを示唆する（図 21, 22）。

アレルギー感作の鼻粘膜末梢時計への影響については、時計遺伝子レベルの検討には、PER2::LUC マウスと Balb/C の F1 交雑系を用い、鼻粘膜 PER2::LUC を測定することにより検討し、その他のアレルギー性症状の概日変動の検討については、Balb/C 野生型マウスを用いて検討した。興味深いことに、PER2::LUC リズムは、アレルギー感作の影響をほとんど受けず、対照群と有意差のないリ

ズムを示し、概日リズムの頑強性が鼻粘膜においても確認することができた。  
(図 24)。

一方、Balb/C マウスを用いたアレルギー性症状の検討では、明瞭な概日変動が認められ、ZT0 (明期開始) が ZT12 (暗期開始) に対し同一の抗原暴露に対して症状増悪が認められた (図 27)。この場合も、OVA 投与群の血清 IgE 値には ZT0 と ZT12 に有意差がなく (図 26)、血清 IgE 値と症状との乖離が明らかとなった。血漿グルコルチコイドの低い時刻 (ZT0) に比較し、高い時刻 (ZT12) ではアレルギー症状が弱いことから (図 27)、内因性グルコルチコイドのレベルがアレルギー性症状に影響することが推測される。この結果は、野生型マウスにおける PCA の 24 時間変動とも一致した<sup>23</sup>。さらに、本研究の DEX による位相反応の結果、マウスでは明期前半の投与が位相変位を生じない適切な時間帯である。このため、明期前半のステロイド投与 (昼行性のヒトの場合は暗期前半に相当) は、時計をシフトさせることなく、アレルギー症状を有効に減少させると考えられる。

## まとめ

本実験では、鼻粘膜概日時計の調節機構を初めて提示した。マウス鼻粘膜の PER2 リズムは、*ex vivo* および *in vivo* どちらにおいても、DEX によって位相依存的に位相変位を示した。DEX による PRC から、鼻粘膜末梢時計は内因性グルコルチコイドによって位相調節されていることが示唆された。同一刺激に対する鼻粘膜アレルギー症状にも昼夜差があり、内因性グルコルチコイドの影響が示唆された。ステロイド噴霧時間治療は、鼻粘膜末梢時計のシフトを最小限に抑えることで中枢末梢時計間の脱同調を予防する点でも、症状の増悪を適切に予防する点でも、マウスにおいては明期前半の投与が、またヒトにおいては暗期前半、つまり夕方の投与が推奨される。

## 6. 総括および結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである。

1. マウス培養鼻粘膜には主観的暗期前半にピーク位相を持つ **PER2** リズムが存在した。
2. **PER2** は鼻粘膜の上皮細胞、血管内皮細胞、および神経終末に強く発現した。
3. 鼻粘膜 **PER2** リズムは **DEX** 投与により位相依存性の位相変化を示し、暗期前半の投与で最大位相後退を、暗期後半の投与で最大位相前進を示した。
4. **DEX** 投与にて、**PER2** リズムの振幅回復を認めたが、回復率に位相依存性は認めなかった。
5. **DEX** による **PER2** リズムの位相反応には用量依存性があったが、その程度は位相前進と後退で異なった。
6. 副腎摘出は培養鼻粘膜 **PER2** リズムの位相、周期、振幅に影響を与えなかった。
7. アレルギー性鼻炎は培養鼻粘膜 **PER2** リズムの位相、周期、振幅に影響を与えなかった。
8. アレルギー性鼻炎症状は、明期開始の抗原暴露において、暗期開始の暴露よりも強く生じた。

本研究はマウス鼻粘膜末梢時計の存在を明らかにし、さらに鼻粘膜末梢時計が内因性グルコルチコイドにより位相依存性に位相調節されることを示した。末梢時計と中枢時計の脱同調により様々な機能障害が生じるため、鼻粘膜末梢時計への影響を最小限にする鼻噴霧用ステロイドの投与時刻は、ヒトの場合は暗期前半、つまり夕方投与が望ましい。この結果は、喘息の治療に用いる吸入用ステロイドの治療効果の高い時刻と一致することから、治療効果および副作用の点からも最適時刻であることが推測される。本研究において、概日リズムに着目した時間治療により、既存の薬物を効果的に利用してアレルギー性鼻炎の効果的予防・治療法を提示したことは、大きな意義と考える。

今後の課題としては、グルコルチコイド以外の同調因子の存在の有無や、鼻粘膜末梢時計が鼻粘膜生理機能にどのように関与しているかを追求し、実臨床での有効性を検討しなければならない。

## 7. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて頂き、学位論文作成の御指導を頂きました福田諭教授に篤く御礼申し上げます。また、直接御指導下さいました中丸裕爾先生、および、本間研一名誉教授、本間さと特任教授に心より御礼申し上げます。また実験を行う際、数多くの助言と協力を頂きました北海道大学大学院医学研究科旧時間生理学分野、旧連携研究センター光イメージング部門、そして時間医学講座の全ての皆様、組織標本作製の指導をして頂きました歯学研究科口腔病態学講座の進藤正信教授、北村哲也先生に心より感謝申し上げます。

本実験に使用した PER2::LUC ノックインマウスは米国 Northwestern 大学の Dr. J.S. Takahashi (現 University of Texas Southwestern Medical Center 教授) より提供頂きました。また本研究は、文部科学省先端融合研究「未来創薬医療イノベーション拠点形成プロジェクト」、日本学術振興会科学研給費補助金 (No. 24390055、本間さと教授) による助成を受けました。

## 8. 引用文献

- <sup>1</sup> Reinberg, A. *et al.* Circadian and circannual rhythms of allergic rhinitis: an epidemiologic study involving chronobiologic methods. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 51–62 (1998).
- <sup>2</sup> Smolensky, M.H., Lemmer, B. & Reinberg, A.E. Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **59**, 852–882 (2007).
- <sup>3</sup> Liddle, G.W. Analysis of circadian rhythms in human adrenocortical secretory activity. *Arch. Intern. Med.* **117**, 739–743 (1966).
- <sup>4</sup> Linsell, C.R. *et al.* Circadian rhythms of epinephrine and norepinephrine in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**, 1210–1215 (1985).
- <sup>5</sup> Scheer, F.A. *et al.* Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 20541–20546 (2010).
- <sup>6</sup> Aoyagi, M. *et al.* Circadian variation in nasal reactivity in children with allergic rhinitis: correlation with the activity of eosinophils and basophilic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **120**, 95–99 (1999).
- <sup>7</sup> Reppert, S.M. & Weaver, D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–941 (2002).
- <sup>8</sup> Gekakis, N. *et al.* Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564–1569 (1998).
- <sup>9</sup> Darlington, T.K. *et al.* CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* **280**, 1599–1603 (1998).
- <sup>10</sup> Yoo, S.H. *et al.* PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 5339–5346 (2004).
- <sup>11</sup> Abe, M. *et al.* Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* **22**, 350–356 (2002).
- <sup>12</sup> Nakamaru, Y. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) contributes to the development of allergic rhinitis. *Cytokine* **31**, 103–108 (2005).
- <sup>13</sup> Cho, S.H. *et al.* Spontaneous eosinophilic nasal inflammation in a genetically-mutant mouse: comparative study with an allergic inflammation model. *PLoS One* **7**, e35114 (2012).
- <sup>14</sup> Nishide, S.Y. *et al.* New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues. *Genes Cells* **11**, 1173–1178 (2006).
- <sup>15</sup> Bando, H. *et al.* Vagal regulation of respiratory clocks in mice. *J. Neurosci.* **27**, 4359–4365 (2007).
- <sup>16</sup> Gibbs, J.E. *et al.* Circadian timing in the lung; a specific role for bronchiolar epithelial cells. *Endocrinology* **150**, 268–276 (2009).

- <sup>17</sup> Dierynck, I., Bernard, A., Roels, H. & De Ley, M. Potent inhibition of both human interferon-gamma production and biologic activity by the Clara cell protein CC16. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**, 205–210 (1995).
- <sup>18</sup> Wendt, C. *et al.* Club cell secretory protein improves survival in a murine obliterative bronchiolitis model. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **305**, L642–650 (2013).
- <sup>19</sup> Gibbs, J.E. *et al.* An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat. Med.* **20**, 919–926 (2014).
- <sup>20</sup> Smolensky, M.H & Haus, E. Circadian rhythms and clinical medicine with applications to hypertension. *Am. J. Hypertens.* **14**, 280S–290. (2001).
- <sup>21</sup> Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682–685 (2000).
- <sup>22</sup> Nishide, S.Y., Honma, S. & Honma, K. The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 2686–2690 (2008).
- <sup>23</sup> Nakamura, Y. *et al.* Circadian clock gene *Period2* regulates a time-of-day-dependent variation in cutaneous anaphylactic reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1038–1045 (2011).
- <sup>24</sup> Kalsbeek, A., Perreau-Lenz, S. & Buijs, R.M. A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol. Int.* **23**, 201–215 (2006).
- <sup>25</sup> Balsalobre, A. *et al.* Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**, 2344–2347 (2000).
- <sup>26</sup> Daan, S. & Pittendrigh, C.S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* **106**, 253–266 (1976).
- <sup>27</sup> Yoshikawa, T., Yamazaki, S. & Menaker, M. Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J. Biol. Rhythms.* **20**, 500–512 (2005).
- <sup>28</sup> Guilding, C. *et al.* A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. *Mol. Brain* **2**, 28 (2009).
- <sup>29</sup> van der Veen, D.R. *et al.* Cardiac Atrial Circadian Rhythms in PERIOD2::LUCIFERASE and per1:luc Mice: Amplitude and Phase Responses to Glucocorticoid Signaling and Medium Treatment. *PLoS One* **7**, e47692 (2012).
- <sup>30</sup> Herzog, E.D. *et al.* Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J. Biol. Rhythms* **19**, 35–46 (2004).
- <sup>31</sup> Honma, S. *et al.* Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci. Lett.* **250**, 157–160 (1998).
- <sup>32</sup> Honma, S., Nakamura, W., Shirakawa, T. & Honma, K. Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci. Lett.* **358**, 173–176 (2004).
- <sup>33</sup> Buhr, E.D., Yoo, S.H. & Takahashi, J.S. Temperature as a universal resetting cue for

- mammalian circadian oscillators. *Science* **330**, 379–385 (2010).
- <sup>34</sup> Shimomura, K. *et al.* Circadian behavior and plasticity of light-induced c-fos expression in SCN of tau mutant hamsters. *J. Biol. Rhythms* **13**, 305–314 (1998).
- <sup>35</sup> Dallmann, R., DeBruyne, J.P. & Weaver, D.R. Photic resetting and entrainment in CLOCK-deficient mice. *J. Biol. Rhythms* **26**, 390–401 (2011).
- <sup>36</sup> Nakamura, W., Honma, S., Shirakawa, T. & Honma, K. Clock mutation lengthens the circadian period without damping rhythms in individual SCN neurons. *Nat. Neurosci.* **5**, 399–400 (2002).
- <sup>37</sup> Hirota, T. *et al.* Glucose down-regulates *Per1* and *Per2* mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **277**, 44244–44251 (2002).
- <sup>38</sup> Kon, N. *et al.* Activation of TGF-beta/activin signalling resets the circadian clock through rapid induction of *Dec1* transcripts. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1463–1469 (2008).
- <sup>39</sup> Yoshitane, H. *et al.* JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Report* **13**, 455–561 (2012).
- <sup>40</sup> Ralph, M.R. & Menaker, M. Bicuculline blocks circadian phase delays but not advances. *Brain Res.* **325**, 362–365 (1985).
- <sup>41</sup> Honma, K., Honma, S. & Hiroshige, T. Response curve, free-running period, and activity time in circadian locomotor rhythm of rats. *Jpn. J. Physiol.* **35**, 643–658 (1985).
- <sup>42</sup> Nakahara, K. *et al.* Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling pathway is involved in light-induced phase advance, but may not be in phase delay, of the circadian melatonin rhythm in chick pineal cell. *J. Pineal Res.* **30**, 234–242 (2001).
- <sup>43</sup> Pezük, P., Mohawk, J.A., Wang, L.A. & Menaker, M. Glucocorticoids as entraining signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology* **153**, 4775–4783 (2012).
- <sup>44</sup> Bur, I.M. *et al.* The comparison between circadian oscillators in mouse liver and pituitary gland reveals different integration of feeding and light schedules. *PLoS One* **5**, e15316 (2010).
- <sup>45</sup> Lamont, E.W., Robinson B., Stewart J. & Amir S. The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein *Period2*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 4180–4184 (2005).
- <sup>46</sup> Oishi, K. *et al.* Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res.* **12**, 191–202 (2005).
- <sup>47</sup> Terazono, H. *et al.* Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 6795–6800 (2003).
- <sup>48</sup> Vujovic, N., Davidson, A.J. & Menaker, M. Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R355–360 (2008).
- <sup>49</sup> So, A.Y. *et al.* Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 17582–17587 (2009).

- <sup>50</sup> Cheon, S., Park, N., Cho, S. & Kim, K. Glucocorticoid-mediated *Period2* induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6161–6174 (2013).
- <sup>51</sup> Okano, M. Mechanisms and clinical implications of glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. *Clin. Exp. Immunol.* **158**, 164–173 (2009).
- <sup>52</sup> Okubo, K. *et al.* Dose-ranging study of fluticasone furoate nasal spray for Japanese. *Curr Med Res Opin.* **24**, 3393–3403 (2008).
- <sup>53</sup> Gotoh, M., Okubo, K., Okuda, M. & Hamada, C. Clinical pharmacology study of the corticosteroid nasal spray dexamethasone cipeclate (NS-126): examination of the durability of efficacy in the nasal induction test. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 1475–1486 (2010).
- <sup>54</sup> Benninger, M.S., Ahmad, N. & Marple, B.F. The safety of intranasal steroids. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **129**, 739–750 (2003).
- <sup>55</sup> Pincus, D.J., Szeffler, S.J., Ackerson, L.M. & Martin, R.J. Chronotherapy of asthma with inhaled steroids: the effect of dosage timing on drug efficacy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**, 1172–1178 (1995).
- <sup>56</sup> Noonan, M. *et al.* Comparison of once-daily to twice-daily treatment with mometasone furoate dry powder inhaler. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **86**, 36–43 (2001).
- <sup>57</sup> Costa, G. Shiftwork and occupational medicine: an over view. *Occup. Med.* **53**, 83–88 (2003).
- <sup>58</sup> Davidson, A.J. *et al.* Chronic jet-lag increases mortality in aged mice. *Curr. Biol.* **16**, R914–R916 (2006).