

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06247

研究課題名(和文) アリルハイドロカーボン受容体阻害剤による新規癌免疫療法

研究課題名(英文) Blocking the arylhydrocarbon receptor for cancer immunotherapy

研究代表者

二宮 空暢(Ninomiya, Soranobu)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90444281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くのタイプの癌において免疫抑制性の腫瘍微小環境を維持する中心的な経路であると考えられている必須アミノ酸トリプトファン代謝酵素であるIDOによって産生されたキヌレニンによるT細胞抑制作用は、アリルハイドロカーボン受容体(AhR)の発現に依存していることが明らかになった。実際の血液疾患患者である多発骨髄腫患者における骨髄中の形質細胞は、T細胞のAhR発現が多いと増加し、臨床病期も進行していた。つまり、腫瘍環境のキヌレニンがAhRを介して腫瘍免疫を抑制している可能性が考えられた。よって、T細胞中のAhRは、IDO陽性腫瘍に対して抗腫瘍免疫を賦活化するターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：IDO is an intracellular enzyme proceed the essential amino acid tryptophan metabolism. Accumulation of tryptophan derivatives such as kynurenine blocks antigen-specific T-cell proliferation and induces T-cell death. A recent study indicated that kynurenine was an endogenous ligand of aryl hydrocarbon receptor (AhR). We collected PBMCs from healthy blood donors, and bone marrow samples from multiple myeloma patients at first diagnosis. The cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs. We measured the expression of AhR in activated T-cells using by flow cytometry. Kynurenine produced by IDO, induce inhibitory signal in T-cells through the AhR. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies, which block directly the inhibitory signal in T-cells, have been getting some clinical benefits against such as melanoma and Hodgkin lymphoma. Therefore, the AhR in T cells might be a target for IDO-positive hematological malignancies.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫

### 1. 研究開始当初の背景

アリルハイドロカーボン受容体 (Aryl hydrocarbon receptor: AhR) は、長年ダイオキシンの受容体として認識され、外来異物に対する毒性発現の細胞内因子として、環境毒性の分野で研究が進んできたが、2011年、この受容体の生体内のリガンドがキヌレニンであることが初めて発見され、免疫学の分野においても注目されるようになった。

キヌレニンは必須アミノ酸であるトリプトファンの代謝産物であり、細胞内酵素であるIDOの作用を受けて産生され、T細胞やNK細胞の活性を抑制する。IDOは、過剰な免疫反応を抑えるブレーキとして生体内に備わっていると考えられるが、腫瘍細胞はこのメカニズムを免疫細胞の攻撃から逃れるために利用している。

IDOによる癌免疫抑制作用を阻害する薬剤の研究がすすめられており、IDO阻害剤の臨床試験がアメリカでは始まっているが、単剤では明らかな効果を認めていないのが現状である。しかし近年、抗PD-1抗体や抗CTLA-4抗体など癌を攻撃する細胞の表面抗原を分子標的とし、癌免疫のブレーキを解除する癌治療が有効であることが臨床試験で示されており、細胞障害性T細胞に入る抑制性のシグナルを直接阻害する癌免疫療法は大きな可能性を秘めているものと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、IDOの腫瘍免疫抑制作用から回避するために、腫瘍中のIDO活性を抑制するのではなく、癌を攻撃する免疫細胞側のキヌレニン受容体であるAhRに着目する新しい概念にもとづいた研究である。免疫細胞のAhR発現が癌患者に与える臨床的意義を明らかにし、AhRに注目した新たな癌免疫治療を開発することを目的とする。従来行われてきた腫瘍中のIDO活性を阻害するアプローチではなく、「抑制される側」である癌免疫細胞のキヌレニンの受容体であるAhRをブロックし、IDOによる腫瘍免疫抑制作用を回避する新規治療法の開発を念頭においた特色のある研究である。本研究を通じて、癌患者におけるAhR発現の重要性を解明し、immune checkpoint 阻害療法として、癌免疫治療に新たな展開をもたらすことが期待される。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、血液腫瘍患者におけるAhR発現の臨床的意義の検討、およびIDO陽性腫瘍の増殖と癌免疫細胞のAhR発現の関連性が2つの主たる研究課題である。血液疾患患者の末梢血単核細胞を用いて活性化T細胞を作成し、そのAhR発現をフローサイトメーターにより調べ、その臨床データとの関連性を検討する。AhRの発現と、キヌレニンによ

るT細胞の抑制作用の関連性を、細胞増殖性、アポトーシス誘導、サイトカイン産生、細胞傷害性に関して検討を行う。また、AhR阻害剤を用いてその重要性を明らかにする。

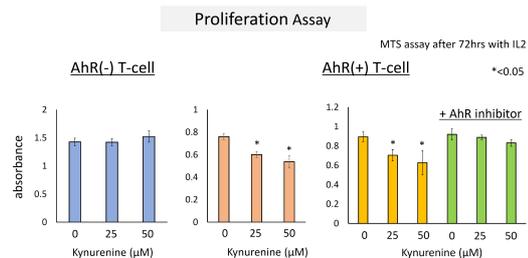
### 4. 研究成果

まず、T細胞におけるAhRの発現を検討するために、健康人の末梢血単核細胞を用いて活性化T細胞をCD3およびCD28で刺激しIL2添加培地で培養し作成した。刺激後、7日目にAhRの発現をフローサイトメーターを用いて検討した。興味深いことに症例間でAhRの発現が4.5%から35%と大きな違いがあることがわかった。そこで、AhRの発現が違うT細胞を用いて、AhRのリガンドであるキヌレニンによる反応性の違いを検討した。

キヌレニンを加えた培地を用いて培養すると、AhRを発現していない細胞は細胞増殖能に変化は認めなかったが、AhRを発現している細胞はキヌレニンにより細胞増殖が有意に抑制されることがわかった。そして、AhR阻害剤を加えると、キヌレニンによる細胞増殖抑制作用を阻害された。図(1)

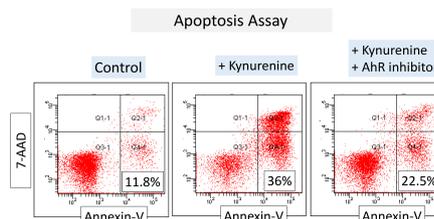
つまり、ヒトT細胞におけるAhRのリガンドのひとつはキヌレニンであり、AhRをブロックすることでキヌレニンの作用を阻害することができること明らかになった。

図(1)



次に、キヌレニンに誘導されるT細胞のアポトーシスをAnnexin V assayを用いて検討を行った。結果は同様に、AhRの発現が高いT細胞はキヌレニンによりアポトーシスが誘導されたが、AhR阻害剤を加えるその作用が抑制されることがわかった。図(2)

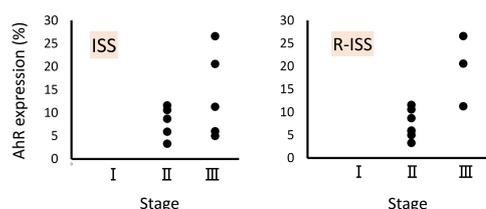
図(2)



IDO 腫瘍の環境下に近づけるために、IDO 強制発現細胞株をB細胞性腫瘍株であるRajiを用いて作成した。IDO 発現細胞株は、72 時間後の培地中のキヌレニン値は上昇し、トリプトファン値は減少していることを確認した。IDO の発現の違いでRaji の増殖能には有意な変化は見られなかった。この IDO 発現細胞とT細胞の共培養を行い、72 時間後に腫瘍細胞とT細胞数を検討した。AhR の発現が弱いT細胞は腫瘍側の IDO 発現の有無には影響されなかったが、AhR の発現が高いT細胞は、IDO 発現細胞との共培養でT細胞は IDO 陰性細胞と培養した条件に比べ減少していた。その減少は、CD4/CD8 比に変化はなかった。

次に、実際の血液疾患患者である多発性骨髄腫患者検体を用いて AhR の発現を検討した。診断時に行った骨髄穿刺の保存骨髄細胞を用いて CD3 および CD28 で刺激し IL2 添加培地で培養し、活性化 T 細胞の作成を試みると 12 例中 10 例で CD3 陽性 T 細胞の増殖を確認できた。刺激後 7 日目の AhR の発現は、3.3%-26.6%であった。この AhR 発現と臨床パラメーターの関係性を調べたところ、T 細胞の AhR 発現が高いほど、骨髄中の形質細胞の割合が高いことがわかり、有意な相関を認められた。また、診断時の臨床病期と AhR 発現の関係性を検討すると、AhR 発現が高い症例ほど臨床病期が進行していることがわかった。図(3)

図(3)



上記の結果より、多くのタイプの癌において免疫抑制性の腫瘍微小環境を維持する中心的な経路であると考えられている必須アミノ酸トリプトファンの代謝酵素である IDO によって産生されたキヌレニンによる T 細胞抑制作用は、アリルヒドロカーボン受容体 (AhR) の発現に依存していることが明らかになった。実際の血液疾患患者である多発性骨髄腫患者における、骨髄中の形質細胞は、T 細胞の AhR 発現が多いと増加し、臨床病期も進行していた。つまり、腫瘍環境のキヌレニンが AhR を介して腫瘍免疫を抑制している可能性が考えられた。よって、T 細胞中の AhR は、IDO 陽性腫瘍に対して抗腫瘍免疫を賦活化するターゲットとなる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hara T, Matsumoto T, Shibata Y, Nakamura N, Nakamura H, Ninomiya S, Kitagawa J, Nannya Y, Shimizu M, Ito H, Saito K, Tsurumi H. Prognostic value of the combination of serum l-kynurenine level and indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA expression in acute myeloid leukemia. *Leukemia Lymphoma*. 2016 Sep;57(9):2208-11. 査読有

Shibata Y, Hara T, Matsumoto T, Nakamura N, Nakamura H, Ninomiya S, Kitagawa J, Goto N, Nannya Y, Ito H, Kito Y, Miyazaki T, Takeuchi T, Saito K, Seishima M, Takami T, Moriwaki H, Shimizu M, Tsurumi H. Serum concentrations of l-kynurenine predict clinical outcomes of patients with peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. *Hematological Oncology*. 2016 Jun 24. in press 査読有

Shibata Y, Hara T, Nagano J, Nakamura N, Ohno T, Ninomiya S, Ito H, Tanaka T, Saito K, Seishima M, Shimizu M, Moriwaki H, Tsurumi H. The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Diethylnitrosamine-Induced Liver Carcinogenesis. *PLoS One*. 2016 Jan 4;11(1)in press

〔学会発表〕(計 3 件)

二宮 空暢, The Roles of Aryl Hydrocarbon Receptor in T-cells at IDO-positive Tumor Microenvironment、アメリカ血液学会、2016 年 12 月 4 日、サンディエゴ(アメリカ)

二宮 空暢, 腫瘍微小環境中 T 細胞におけるアリルヒドロカーボン受容体の重要性、第 78 回日本血液学会学術集会、2016 年 10 月 14 日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

二宮 空暢, Kynurenine Inhibits T-cells through the Aryl Hydrocarbon Receptor at IDO-positive Tumor Microenvironment、ヨーロッパ血液学会、2016 年 6 月 24 日、マドリード(スペイン)

〔その他〕

ホームページ等

岐阜血液疾患研究グループ

<http://seesaawiki.jp/ghsg/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

二宮 空暢 (Ninomiya Soranobu)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90444281