

令和元年6月19日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07222

研究課題名(和文) インドールアミン酸素添加酵素2がサイトカイン分泌に及ぼす影響

研究課題名(英文) Lipopolysaccharide shock reveals the immune function of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 through regulation of IL-6/stat3 signalling

研究代表者

山本 康子 (Yamamoto, Yasuko)

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：00331869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2)は、トリプトファンをキヌレニンに代謝する酸素添加酵素として近年同定された代謝酵素であるが、生体内での機能については不明な点が多い。本研究では、IDO2の免疫系におよぼす影響について検討を行った。IDO2遺伝子欠損マウスを用いて炎症モデルにおける解析を行ったところ、野生型マウスに比べ生存率の低下および炎症性サイトカインの分泌亢進が認められた。また培養細胞にマウスIDO2遺伝子を導入したところ、野生型細胞に比べサイトカインシグナル経路の抑制が認められた。本検討によりIDO2は、重要な免疫調節因子である事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インドールアミン酸素添加酵素1 (IDO1)は、炎症時における免疫抑制因子として知られている。IDO1のアイソフォームとして同定されたIDO2は、その生理的機能については未だ不明な点が多い。本研究では、IDO2が感染時における炎症抑制因子として重要な役割を果たしている事を明らかにした。IDO2が免疫系に及ぼす機序の解明や各種炎症性疾患との関係を解析することで、トリプトファン代謝酵素が創薬のターゲット分子となるのみならず、臨床サンプルの発現検索による疾患バイオマーカーとしての意義を明らかに出来ると考えられ、今後の新しい阻害剤開発も含めさらなる臨床研究に貢献できるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) is a recently identified catalytic enzyme in the tryptophan-kynurenine pathway. To elucidate the biological role of IDO2 in immune function, we introduced lipopolysaccharide (LPS) endotoxin shock to IDO2 knockout mice, which led to higher mortality than that in the wild type mice. LPS-treated IDO2 KO mice had increased production of inflammatory cytokines (including interleukin-6; IL-6) in serum and signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation in the spleen. By contrast, the overexpression of IDO2 in the murine macrophage cell line (RAW) suppressed cytokine production and decreased stat3 expression. Finally, RAW cells overexpressing IDO2 did not alter nuclear factor kappa B (NF-kappa B) or stat1 expression, but IL-6 and stat3 expression decreased relative to the control cell line. These results reveal that IDO2 modulates IL-6/stat3 signalling and is induced by LPS, providing novel options for the treatment of immune disorders.

研究分野：病態生化学

キーワード：トリプトファン代謝 炎症 免疫調節因子

### 1. 研究開始当初の背景

IDO1 は、生体内におけるトリプトファン代謝の主要経路であるキヌレニン経路の初期反応を触媒するトリプトファン分解酵素であり、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )などの炎症性サイトカインにより酵素誘導され、樹状細胞、マクロファージ、上皮細胞等で発現し、免疫調節因子として働いている(図1)(Muller AJ et al. Nat Med. 2005 11:312-319.)。近年、IDO1に加えて、IDO1と45%のホモロジーを有したIDO2と呼ばれる新しいアイソフォームが同定された。IDO2はIDO1に比べてトリプトファン代謝活性が低い分子であり、これまでに樹状細胞で酵素誘導がみられること、また恒常的に脳、肝臓、腎臓など多くの組織に発現していることが代表者らの検討により明らかとなっている。しかし、IDO2の生体内での生理学的機能はいまだ不明な点が多い。

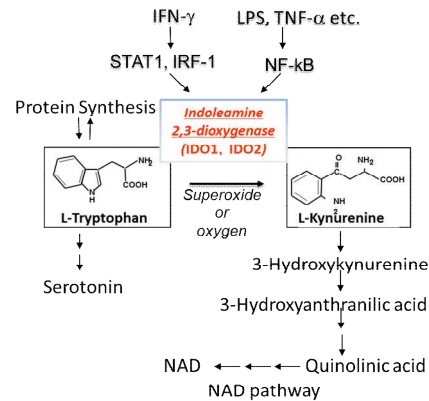


図1. トリプトファン代謝経路

### 2. 研究の目的

本研究では、IDO2遺伝子欠損マウスやIDO2強発現培養細胞を用いた検討により、生体内でのIDO2の生理的機能を明らかにすることを目的とした。

またこれまでにトリプトファン代謝は免疫反応に深く関与していることが報告されている。そこで新規トリプトファン代謝酵素IDO2が炎症反応に及ぼす影響を明らかにするために下記の検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### 1) IDO2遺伝子欠損マウス

IDO2遺伝子欠損マウスは、Knockout Mouse project; KOMP (California, USA) より入手した。また野生型マウスは、C57BL/6N (日本チャールズリバー) を使用した。本実験計画は藤田医科大学動物実験委員会で承認され、藤田医科大学動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication, 85-23, 1985) に準じて行った。

#### 2) マウス急性炎症モデル

C57BL/6マウスおよびIDO2遺伝子欠損マウスにリポポリサッカライド(LPS)を腹腔投与し、生存率の確認を行った。またLPS投与後6時間および24時間後に安楽死後、血清および臓器の摘出を行い、各種解析を行った。

#### 3) IDO2強発現細胞

マウスマクロファージ由来RAW264.7細胞にマウスIDO2遺伝子を遺伝子導入し、IDO2を強発現した細胞を作成した。細胞は37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養した。

#### 4) サイトカインの測定

血清サイトカイン測定はBio-Plex Pro mouse Cytokines Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用い各種サイトカイン量を測定した。測定項目は、Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-13、IL-17A、Eotaxin、Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、Granulocyte - macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)、Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )、MIP-1 $\beta$ 、Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)、Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )である。

#### 5) 統計学的解析

データはすべて平均±標準偏差(mean±SD)で表記した。生存率は、カプランマイヤー法にて算出した。多群間比較にはKruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA)とTukey testを用い、2群間比較にはPaired t testを用いた。P<0.05を統計学的に有意差ありと判断した。

### 4. 研究成果

#### 1) 急性炎症モデルを用いた解析

急性炎症モデルを用いて、炎症反応におけるIDO2欠失の影響を検討したところ、IDO2遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べ生存率の低下が見られた。また組織障害の増強およびIL-6などの炎症性サイトカイン分泌亢進がみとめられた(図2)。

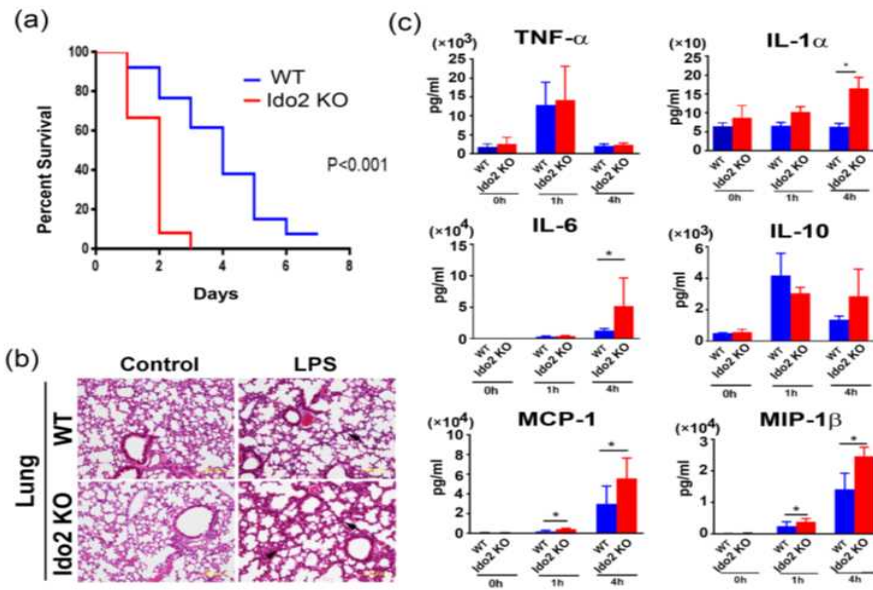


図 2 急性炎症モデルを用いた解析

野生型マウスおよびIDO2遺伝子欠損マウスを用いてLPSによる急性炎症モデルを作成した。(a)LPS投与後7日間の生存率、(b)24時間後の肺の組織像、(c)LPS投与後の血中サイトカイン量を示す。

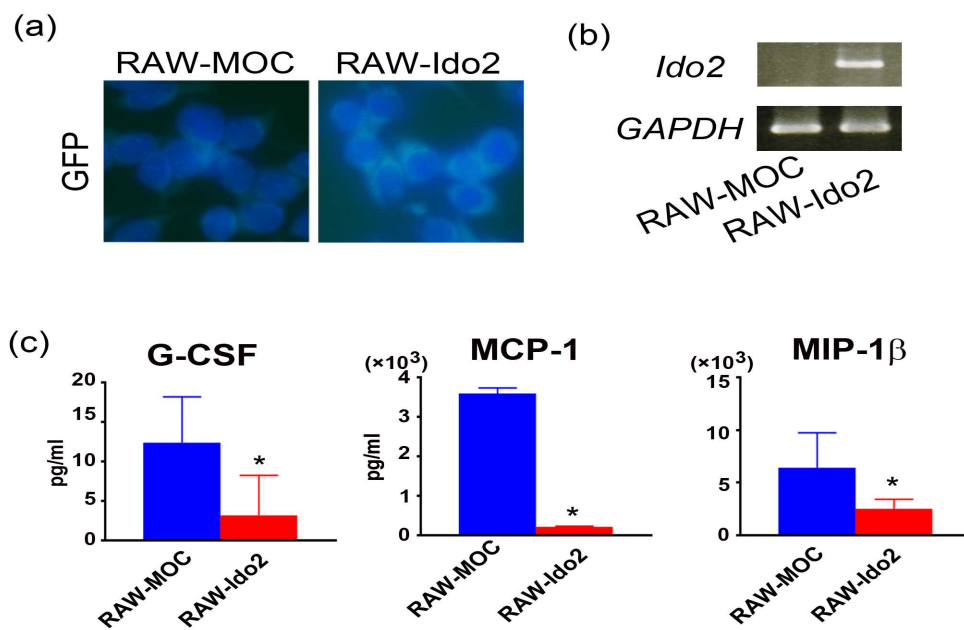


図 3 IDO2 強発現がサイトカイン分泌に与える影響

IDO2 遺伝子強発現細胞を用いて、培養上清中のサイトカイン量を測定した。

(a)IDO2 遺伝子発現の確認、(b)IDO2 mRNA 発現の確認、(c)培養上清中サイトカイン量。

## 2) IDO2 強発現がサイトカイン分泌に与える影響

遺伝子欠損マウスを用いた解析より IDO2 欠失が炎症反応時のサイトカイン分泌を亢進する事が明らかになったため、培養細胞を用いて IDO2 発現がサイトカイン分泌に与える影響について検討を行った。IDO2 遺伝子をマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に遺伝子導入を行い、培養上清中のサイトカイン分泌量を測定した。IDO2 強発現細胞は、コントロール細胞に比べて、サイトカインの分泌量が低下した(図 3)。

また網羅的遺伝子発現解析により IDO2 遺伝子の発現は、NF- $\kappa$ b の発現には影響を与えないが、IL-6 の発現を低下させる事が明らかとなった。また細胞内シグナル因子である stat3 の発現も減少していた(図 4)。本検討により IDO2 が炎症反応においてサイトカインの発現に影響を与える重要な免疫抑制因子として働いている事が明らかとなった。

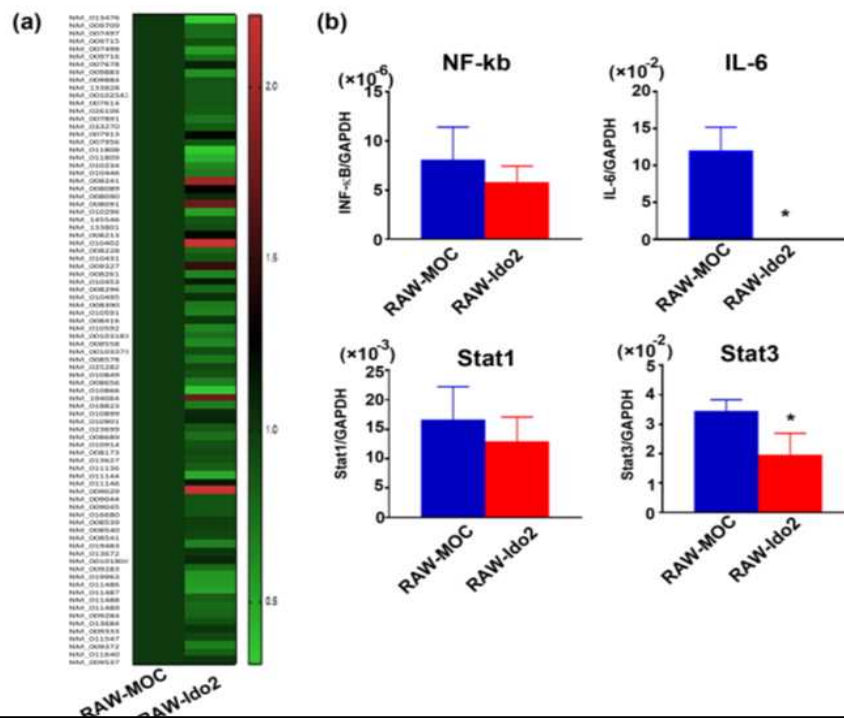


図 4 IDO2 強発現細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析  
(a)網羅的遺伝子発現解析、(b)炎症性シグナル分子の遺伝子発現解析。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Yamamoto, Y., Yamasuge, W., Imai, S., Kunisawa, K., Hoshi, M., Fujigaki, H., Mouri, A., Nabeshima, T., and Saito, K. (2018) Lipopolysaccharide shock reveals the immune function of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 through the regulation of IL-6/stat3 signalling. *Sci Rep* 8, 15917
2. Kawaguchi, K., Sakurai, M., Yamamoto, Y., Suzuki, E., Tsuda, M., Kataoka, T. R., Hirata, M., Nishie, M., Nojiri, T., Kumazoe, M., Saito, K., and Toi, M. (2019) Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep* 9, 2924
3. Fujigaki, H., Mouri, A., Yamamoto, Y., Nabeshima, T., and Saito, K. (2019) Linking phencyclidine intoxication to the tryptophan-kynurenine pathway: Therapeutic implications for schizophrenia. *Neurochem Int* 125, 1-6

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Yasuko Yamamoto, Wakana Yamasuge, Shinjiro Imai, Kazuo Kunisawa, Masato Hoshi, Hidetsugu Fujigaki, Akihiro Mouri, Toshitaka Nabeshima, Kuniaki Saito.  
Lipopolysaccharide shock reveals the immune function of indoleamine 2, 3-dioxygenase 2 through regulation of IL-6/STAT3 signalling.  
15th International Society for Tryptophan Research (ISTRYP) Conference.  
September 18th-21st, 2018. Shiga.
2. Kyoka Yamazaki, Hidetsugu Fujigaki, Yukihiro Yoshida, Yasuko Yamamoto, Toshitaka Nabeshima, Kuniaki Saito. Development of kynurenine aminotransferase II inhibitor screening assay.  
15th International Society for Tryptophan Research (ISTRYP) Conference.  
September 18th-21st, 2018. Shiga.
3. Yukihiro Yoshida, Hidetsugu Fujigaki, Yasuko Yamamoto, Kyoka Yamazaki, Fumika Kimura, Hisako Kubo, Tsutomu Fukuwatari, Toshitaka Nabeshima, Kuniaki Saito.  
Kynurenine 3-monooxygenase is essential for de novo biosynthesis of NAD+.  
15th International Society for Tryptophan Research (ISTRYP) Conference.  
September 18th-21st, 2018. Shiga.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：齋藤 邦明  
ローマ字氏名：SAITO, Kuniaki  
藤田医科大学大学院・医療科学部・教授  
研究者番号：80262765