

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：33916
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15785
研究課題名(和文) 転移性腫瘍におけるトリプトファン代謝酵素制御による新規免疫療法の確立と病態解析

研究課題名(英文) Establishment and pathological analysis of novel immunotherapy by control of tryptophan-metabolizing enzymes in metastatic tumors

研究代表者
星 雅人(Hoshi, Masato)
藤田医科大学・保健学研究科・講師

研究者番号：40633996
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腫瘍肺転移モデルを作製し、トリプトファン代謝の役割について解析した。キヌレニン代謝の律速酵素である、kynurenine 3-monooxygenase遺伝子欠損(KMOKO)マウスでは、野生型マウスと比較して、有意に腫瘍増殖を抑制していた。同様に、KMO阻害剤投与マウスにおいても腫瘍増殖は抑制されていた。これらの結果は、複数の癌細胞を移入したモデルで確認された。興味深いことに、KMOKOにおける腫瘍抑制効果は、トリプトファン代謝産物の3-ヒドロキシキヌレニンおよびキサントレン酸の投与で無効化された。すなわち、トリプトファン代謝産物の一種が、腫瘍増殖に深く関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の投与は、従来の治療と比較して飛躍的に治療効果を向上させた。一方で、未だ7割程度の患者では十分な効果が得られていないことや高額な医療費が問題点として上げられる。本研究では、上記問題点を解決するために、トリプトファン代謝に着目し、研究したところ、代謝酵素の一つであるKMOを阻害することで腫瘍細胞の増殖が、抑制できることを明らかにした。これらの成果は、現在の治療法で効果のない患者の新規治療法を考える上で、重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A mouse lung metastasis model was generated and the roles of tryptophan metabolism were analyzed. Kynurenine 3-monooxygenase gene deficient (KMOKO) mice, a rate-limiting enzyme for kynurenine metabolism, significantly inhibited tumor growth compared to wild-type mice. Similarly, tumor growth was inhibited in KMO inhibitor-treated mice. These results were also confirmed in a various tumor model. Interestingly, the tumor suppressive effect in KMOKO was abolished by administration of the 3-hydroxykynurenine and xanthurenic acid. Thus, we showed that a type of tryptophan metabolite was deeply involved in tumor growth.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：トリプトファン代謝 KMO IDO KAT キヌレニンキサントレン酸 がん微小環境 B16F10細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 CTLA-4 や抗 PD-1 抗体等を用いた各種腫瘍(主として固形癌)に対する免疫チェックポイント阻害療法は、標準的治療である化学療法と比較して極めて効果的に作用することが知られている。従来の免疫療法では細胞免疫を高める方法が主であったが、同時に抑制機構が働くため十分な効果が得られなかった。しかし、免疫チェックポイント阻害剤はこの抑制機構を解除することで免疫細胞の効果を高めることを示した。一方で、腫瘍細胞は周囲免疫細胞から逃避する機構を複数有しており、より効果を高めるためには複数の免疫チェックポイント機構の解明が必要である。さらに、各種抗体療法は医療費の高額化が問題となっており、より安価かつ効果を期待できる低分子化合物の研究が早急の課題である。

Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1)は種々の炎症性サイトカインやリガンドにより酵素誘導され、トリプトファンをキヌレニン経路へ代謝する律速酵素である。これまでに申請者らは、IDO1 活性の結果として、局所トリプトファンの枯渇あるいは細胞毒性を有するトリプトファン代謝産物増加により T 細胞や NK 細胞の機能を制御し、種々の病態(腫瘍、脳虚血、ウイルス感染症等)における IDO1 の免疫制御因子としての重要な役割を明らかにしてきた。さらに、IDO1 遺伝子欠損(KO)マウス及び IDO1 阻害剤(1-methyl-DL-tryptophan; 1-MT)を使用し、種々の病態における IDO1 制御によるトリプトファン代謝産物の役割について数多くの報告をしてきているが、腫瘍細胞における IDO1 やその他トリプトファン代謝関連酵素または酵素誘導により生成される各種代謝産物の腫瘍免疫に関する役割は十分に理解されていない。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍細胞に対する免疫細胞の誘導や活性を強力に制御し、周囲免疫応答から逃避させることで注目されている各種トリプトファン代謝酵素により生成される代謝産物に着目し、腫瘍の微小環境における免疫逃避機構の解明と効果の期待できる集団を弁別する検査法の確立を主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍肺転移モデルの作製とマウス

マウスは C57BL6/J または N (8 週齢、オス) の WT 及び IDO1KO、IDO2KO、KMOKO、QPRTKO を使用した。また各種酵素阻害剤投与マウスとして WT に D-1-MT、L-1MT、Ro 61-8048、INCB024360 等を経口または腹腔内投与した。転移性腫瘍モデルは、各種セルライン(B16, EL-4, LLC)を尾静脈に投与($1 \times 10^6/200 \mu\text{l}$)し、肺転移モデルとした。

(2) 腫瘍に対する阻害剤及び遺伝子欠損の効果判定

腫瘍移入後、WT、各種 KO マウス及び阻害剤投与マウスにおける生存率の比較、転移巣を中心とした腫瘍量の検索を病理組織所見および組織重量・容積により評価した。

(3) トリプトファン代謝関連酵素の発現および代謝産物の測定

各種モデルマウスにおける肺臓やリンパ節等におけるトリプトファン代謝関連の各種酵素の発現・活性をリアルタイム RT-PCR 法、免疫組織化学染色(抗 IDO1, IDO2, KMO, QPRT 抗体等)及び Western blotting 法を用いて解析した。また、肺臓中のトリプトファン代謝産物(トリプトファン、キヌレニン、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニール酸等)を高速度液体クロマトグラフィーで測定した。

(4) 各種トリプトファン代謝産物投与マウスにおける腫瘍増殖の判定

腫瘍移入 1 週間後の KMOKO マウスに、各種代謝産物(3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニール酸、キサンツレン酸、キノリン酸)を腹腔内投与(10mg/kg, 1 回/日)し、腫瘍量の検索を病理組織所見および組織重量により評価した。

(5) ヒト肺癌組織および血清における解析

ヒト肺癌組織標本を用いて、KMO および KAT1 の発現を免疫組織学染色により解析した。血清中のトリプトファン代謝産物は、HPLC を用いて測定した。また、発現解析結果および代謝産物量と病期および症状等の関連性について調査した。

4. 研究成果

(1) B16F10 腫瘍細胞をマウスに尾静脈投与し、肺転移モデルを作製した。前実験の結果より、IDO1KO マウスおよび IDO1 阻害剤投与マウスでは、野生型マウスと比較して有意に肺/体重比が減少することを明らかにした。肺転移モデルマウスから、肺臓を摘出し、mRNA の発現および病理組織学的検索を実施した。腫瘍細胞および腫瘍周囲の免疫細胞で、IDO1、KMO および KAT が高発現していることを定量的 PCR 法および免疫組織化学染色により確認した。腫瘍細胞の増殖とトリプトファン代謝の役割を明らかにするために、キヌレニンを 3-ヒドロキシキヌレニンに代謝する律速酵素である KMO に着目した。興味深いことに、KMOKO マウスに B16F10 腫瘍細胞を尾静脈投与し、肺転移モデルを作製したところ、野生型マウスと比較して有意に肺/体重比が減少していることを明らかにした。さらに、KMO 特異的阻害剤である Ro61-8048 を投与したところ、

KMOKO 同様に腫瘍の増殖が抑制されていた。すなわち、肺転移した B16F10 細胞の抗腫瘍メカニズムに重要なトリプトファン代謝産物はキヌレニン、キヌレン酸およびアントラニール酸以外の代謝産物の阻害が重要と考えられた。同様に、LLC 細胞を尾静脈投与したところ、野生型マウスと比較して KMOKO マウスでは、有意に肺/体重比が減少していた。すなわち、KMO 欠損による、腫瘍抑制効果は普遍的に様々な種類のがんに対して効果があると推察された。さらに、肺転移モデルに加えて、皮下投与モデルにおける効果についても調査したところ、KMOKO で有意に腫瘍を抑制した。すなわち、肺臓に限定的な現象ではなく、複数の臓器においても同様の効果が期待された。

(2)(1)の研究結果から、次に KMOKO マウスでみられた腫瘍抑制効果とトリプトファン代謝産物の関係を調査した。腫瘍投与後 2 週間で野生型マウスと KMOKO マウスから肺臓を摘出し、肺臓内のトリプトファン代謝産物量を高速液体クロマトグラフィーで解析した。KMOKO マウスでは、野生型マウスと比較して、有意にキヌレニン、キヌレン酸およびアントラニール酸が増加していた。一方で、3 - ヒドロキシキヌレニン、3 - ヒドロキシアントラニール酸、キサンツレン酸が有意に減少していた。すなわち、高キヌレニン血症のマウスであっても、抗腫瘍効果を失うことはなかった。従来、キヌレニンは細胞障害性 T 細胞の抑制や制御性 T 細胞の誘導を介した腫瘍免疫を制御していると考えられていたが、本研究において、少なくともがん微小環境のキヌレニンレベルの増加は腫瘍免疫の制御に関与しないと考えられた。

(3)肺臓内トリプトファン代謝産物と腫瘍増殖抑制の関係を明らかにするために、腫瘍細胞を移入した KMOKO マウスに各種キヌレニン代謝産物(3 - ヒドロキシキヌレニン、3 - ヒドロキシアントラニール酸、キサンツレン酸、キノリン酸)を連日腹腔内投与した。興味深いことに、3 - ヒドロキシキヌレニンおよびキサンツレン酸投与 KMOKO マウスでは、腫瘍抑制効果が無効化されていた。

(4)ヒト肺腺癌の病理組織標本において KMO、KAT 等の免疫染色を実施した。いずれも腫瘍細胞や一部の免疫細胞で発現していることが確認された。また、ステージ別の発現解析等については現在進行中である。

本研究において、各種 KO マウスを使用することによりトリプトファン代謝産物と腫瘍増殖機構の関係の一部が解明されつつある。すなわち、従来キヌレニンを中心とした代謝産物が、エフェクター T 細胞を抑制することや制御性 T 細胞を分化誘導することにより、腫瘍細胞が免疫より逃れていると考えられてきたが、これらの報告に加えてさらに下流の代謝産物もまた、腫瘍免疫に深く関与していることが示唆された。今後さらなる検討により、責任細胞の同定やメカニズムを解明し、トリプトファン代謝を標的とした、新規免疫療法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tashita C, Hoshi M, Hirata A, Nakamoto K, Ando T, Hattori T, Yamamoto Y, Tezuka H, Tomita H, Hara A, Saito K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Kynurenine plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 918-932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v26.i9.918.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamasuge W, Yamamoto Y, Fujigaki H, Hoshi M, Nakamoto K, Kunisawa K, Mouri A, Nabeshima T, Saito K.	4. 巻 110
2. 論文標題 Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 depletion suppresses tumor growth in a mouse model of Lewis lung carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3061-3067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Noguchi Kei, Tomita Hiroyuki, Kanayama Tomohiro, Niwa Ayumi, Hatano Yuichiro, Hoshi Masato, Sugie Shigeyuki, Okada Hideshi, Niwa Masayuki, Hara Akira	4. 巻 14
2. 論文標題 Time-course analysis of cardiac and serum galectin-3 in viral myocarditis after an encephalomyocarditis virus inoculation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0210971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Yasuko, Yamasuge Wakana, Imai Shinjiro, Kunisawa Kazuo, Hoshi Masato, Fujigaki Hidetsugu, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Lipopolysaccharide shock reveals the immune function of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 through the regulation of IL-6/stat3 signalling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34166-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kubo H, Hoshi M, Matsumoto T, Irie M, Oura S, Tsutsumi H, Hata Y, Yamamoto Y, Saito K.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Sake lees extract improves hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipids Health Dis.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12944-017-0501-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masato Hoshi
2. 発表標題 Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice
3. 学会等名 15th International Society for Tryptophan Reserch (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Moe Niijima
2. 発表標題 The deficit of quinolinic acid phosphoribosyltransferase induces hypolocomotion and cognitive impairment through impairment of dopaminergic neuronal function
3. 学会等名 AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 K A T阻害活性を有する化合物を含有するがん治療用組成物	発明者 星雅人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-030363	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 D - サイクロセリンまたはその塩を含有するがん治療用組成物	発明者 星 雅人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-035509	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----