

平成 24 年 4 月 19 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2008～2011
課題番号：20390167
研究課題名（和文） インドールアミン酸素添加酵素遺伝子組換えによる病態解析と関連した診断治療法の開発
研究課題名（英文） The pathophysiologic role of indoleamine 2,3-dioxygenase in viral infectious diseases
研究代表者 齋藤 邦明 (SAITOU KUNIAKI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：80262765

研究成果の概要（和文）：

インドールアミン酸素添加酵素(IDO)阻害により、レトロウイルス感染モデルでウイルス量が抑制された。ウイルス感染した IDO-KO あるいは IDO 阻害剤投与のマウスの脾臓で抗ウイルス活性を有する 1 型インターフェロン (IFN) の発現および脾細胞中の形質細胞様樹状細胞 (pDC) が著明に増加しており IDO 誘導による関連代謝産物の増減が 1 つの重要な因子であることと推定された。

研究成果の概要（英文）：

The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the L-tryptophan (Trp)-kynurenine(Kyn) pathway after viral infection was investigated. We used IDO deficient (IDO^{-/-}) mice and mice treated with 1-methyl-D, L-Trp (1-MT), an inhibitor of IDO, to study the importance of Trp-Kyn pathway metabolites. After viral infection (i.e myocarditis virus), the levels of Kyn increased, while those of Trp decreased, and IDO activity increased in the tissues. The survival rate of IDO^{-/-} or 1-MT-treated mice was significantly greater than that of IDO^{+/+} mice. Indeed, the viral load was suppressed in the IDO^{-/-} or 1-MT-treated mice. Furthermore, the levels of type I interferons in IDO^{-/-} mice were significantly higher than those in IDO^{+/+} mice, and treatment of IDO^{-/-} mice with Kyn metabolites eliminated the effects of IDO^{-/-} on the improved survival rates. Our findings show that Kyn metabolites regulate the production of type I IFNs by decreasing the number macrophages. Consequently, modulation of the Trp-Kyn pathway may be an effective strategy for treating certain viral infectious diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
21 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
22 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：①臨床検査医学 ②生理活性物質 ③サイトカイン ④炎症・免疫

1. 研究開始当初の背景

| インドールアミン酸素添加酵素(IDO)活性が

脳虚血時に海馬の神経障害に先行して虚血後2日目に神経細胞で著明に増加(約100倍)し、さらには海馬に於ける神経脱落がIDO活性を阻害する事により変化することを申請者らは見出している。すなわち、IDO活性の制御が病態に重大な影響を与える事を示唆している。IDO酵素誘導に関して、その重要性は前述の如く免疫寛容との関連において、免疫療法等を視野に入れた研究開発が世界的に活発であるが、特にIDOに関して、感染症マウスモデルを用いた治療の標的分子に加え予後判定あるいは治療効果予測に関する研究は国際的にもユニークである。

2. 研究の目的

IDOは、必須アミノ酸であるトリプトファンを基質としインターフェロン γ やTNF- α により酵素誘導され、さらには樹状細胞の抗原提示能やT-cellの機能を調節することで知られる。特に、免疫寛容とIDOの過剰発現との関係あるいは腫瘍の増殖とIDOの関与が示唆され、世界的に近年注目されている。本研究は、特に免疫関連疾患における新たな免疫制御因子としてのIDOに関して1) ウイルス感染性マウス疾患モデル 2) トキソプラズマ感染モデルを用いて病態解析、さらにIDO欠損マウスおよびIDO阻害剤を用いて、*in vivo*疾患モデルにおけるIDO酵素誘導についての生理的意義について明らかにする。酵素活性の変動、免疫染色によるIDO発現細胞の同定、IDO関連代謝産物およびIDO誘導因子として考えられるサイトカインなどの定量を行う。さらに、申請者らはIDOの翻訳後修飾が活性に影響をおよぼすこと、またIDOとNOとの相互作用をすでに報告しており、疾患モデル動物の臓器から免疫沈降によりIDOを精製、ナノスプレーESI/MS/MSを用いて解析し、IDOの翻訳後修飾による酵素活性におよぼす影響およびIDO誘導に関連するタンパクについて明らかにする。

3. 研究の方法

IDO遺伝子組換え動物を用いた病態解析疾患

マウス疾患モデルに申請者らが作成に成功した遺伝子組み換えマウスを応用して種々の炎症生疾患病態解析を実施し、生体内でのIDOの役割と治療のターゲット分子としての可能性について検討する。トキソプラズマ感染、心筋炎ウイルス感染モデル他の免疫関連疾患モデルを用いて評価する。

ウイルス感染マウスモデル:

マウス(C57BL/6)にウイルス感染させ、病態の進行に応じて、IDOmRNA、酵素活性さらに

は免疫染色での検討およびRT-PCRによる種々サイトカインの検索、病理的検索、ウイルス量の定量を行う。また、IDO関連代謝産物について定量する。IDOノックアウトおよびIDO-siRNAに対する影響について検討する。

治療薬としてのIDO阻害剤の有効性の検討

IDOの生理的役割の解明を目的とした種々動物疾患モデルの解析に加え、新たに治療のターゲットとして評価を加える事は極めて重要である。すなわち、複数のIDO阻害剤を疾患モデルに投与しその薬効について評価する。また、IDO誘導はサイトカインに加えRegulatory T細胞(Treg)が発現しているCTLA-4(cytotoxic T lymphocyte antigen-4)と樹状細胞、マクロファージの持つB7が結合することでIDOを誘導することが知られており、それに関連した検討を行う。

IDO翻訳後修飾および相互作用を有するタンパクの解析

IDO翻訳後修飾の解析を実施する。種々疾患モデルマウスのターゲット臓器から抗体カラムを用いてIDOを免疫沈降法で精製し、種々翻訳後修飾の解析をナノスプレー型LC/MS/MSを用いて行い酵素活性との相関について検討する。また、各種翻訳後修飾に対する抗体(抗リン酸化チロシン、ニトロチロシン抗体等)を用いたウエスタンブロッティングなどによる解析も行う。さらにIDOとiNOSとの相互作用等についての検討を行う。

4. 研究成果

レトロウイルス感染症におけるIDOの役割

Human Immunodeficiency Virus (HIV)あるいはSimian Immunodeficiency Virus (SIV)感染時に、CD4/gp120を介してウイルスにより刺激された形質細胞様樹状細胞がIDOを誘導することにより、結果的にCD4⁺T細胞の減少に関与していると報告された。これらの現象はIDOの阻害剤である1-methyl-D-tryptophan (1-MT)の投与で回復され、新薬としての臨床応用が期待されている。本研究結果より、マウスレトロウイルス感染モデルにおいて、脾臓内の樹状細胞でIDOの発現が顕著に増加し、血中トリプトファン量の低下およびキヌレニン量の増加が明らかとなった。さらに、LP-BM5感染モデルで1-MT投与マウスおよびIDO1遺伝子欠損マウス(IDO-KO)を用いて検討した結果、感染した野生型マウス(WT)と比較して、IDOを

阻害した感染マウスで有意にウイルスコピー数の低下および細胞数の増加を示すことが明らかとなった。

ウイルスの種類など種々の病原体によるシグナルの差、発症期間あるいは重症度などにより生体内でのIDOの誘導あるいは制御機構が異なることが考えられ、さらにはIDO1に加えてIDO2の生体内での意義についても不明な点が多く、今後新たな特異的阻害剤や組織特異的KOマウスを用いた研究成果が待たれる。

I型インターフェロンとIDO

IDO阻害により、ヒトおよびマウスなどのレトロウイルス感染症でウイルス量を抑制することが示されたが、IDOの阻害により何故ウイルス量に影響するか不明であった。著者らは、抗ウイルス活性を有する代表的なサイトカインであるIFNに着目し、ウイルスに感染したIDO-KOあるいは1-MT投与のマウスの脾臓でIFNの発現についてWTと比較検討した。その結果、ウイルス感染により産生されるIFNがIDOの阻害により著明に増加し、さらに脾細胞中の形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid Dendritic Cell : pDC)が顕著に増加することが明らかとなった。

pDCは1999年にSiegalaらおよびCellaらによりIFNを多量に産生する細胞として確立された。本細胞は様々なウイルス(DNAおよびRNAウイルス)をTLR7およびTLR9で認識することで多量のIFNを分泌する。実際、無症候性のHIV患者のリンパ節ではpDCが増加しており、pDCの増加とIFN産生増加に正の相関が得られることが報告されている。したがって、ヒトおよびマウスレトロウイルス感染症においてIDOの持続的誘導により、トリプトファンの減少あるいは代謝産物の増加によりT細胞のみならず樹状細胞の機能や増殖などを制御することで、生体内での免疫系を制御していることが推察された。また、本研究結果より、脳心筋炎ウイルス(Encephalomyocarditis virus : EMCV)感染マウスモデルにおいてもIDO-KOあるいは1-MT投与マウスにおいて、EMCV感染WTに比較して著明にIFNの増加がみとめられ、ウイルス量の抑制が見られた。すなわち、IDO阻害によるIFN産生増加は、レトロウイルスのみならず複数種のウイルスにより引き起こされると考えられる。これらの現象はIDOを阻害したEMCV感染マウスにトリプトファン代謝産物を腹腔内投与することで、IFNの産生増加は認められなくなる。すなわち、IDO誘導による関連代謝産物の増減が1つの重要な因子であることを示唆している。IFNの産生誘導は、ウイルスの種類により認識されるレセプター(TLRsファミリー、NOD-like

receptorsファミリー、RIG-I like receptorsファミリー、C-type lectin receptorファミリー)が異なることが知られ、IDO誘導によるトリプトファン代謝の亢進がIFNを産生誘導する複数のシグナル経路を制御している可能性やIFN産生細胞の機能を変化させることなどが推察される。また、ウイルスの種類あるいは感染経路により、IDOにより制御されるIFN産生細胞はpDCのみならず多岐におよぶ可能性が考えられる。実際、ニューカッスル病ウイルスなどによる肺の局所感染時では肺胞マクロファージやconventional DCがIFN産生の主体となり、pDCはバックアップ的に働くことが報告されている。さらに、局所トリプトファンの減少は、アミノ酸合成阻害によりpDC内でGCN2を活性化することでIFNの産生を抑制、あるいはmammalian target of rapamycin (mTOR)の抑制によりIFNの産生が抑制されることなどが推察される。すなわち、IDOの活性化によるIFN抑制機構は局所トリプトファン減少による種々のシグナル因子への影響や代謝産物増加による細胞増殖抑制や細胞死によるものと推察された。

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8件)

L-tryptophan-mediated enhancement of susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease is dependent on the mammalian target of rapamycin.

Osawa Y, Kanamori H, Seki E, Hoshi M, Ohtaki H, Yasuda Y, Ito H, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. *J Biol Chem*. 査読有

doi: 10.1074/jbc.M111.235473

2011 286(40):34800-8.

Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor tissue indicates prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP.

Ninomiya S, Hara T, Tsurumi H, Hoshi M, Kanemura N, Goto N, Kasahara S, Shimizu M, Ito H, Saito K, Hirose Y, Yamada T, Takahashi T, Seishima M, Takami T, Moriwaki H. *Ann Hematol*. 査読有

DOI10.1007/s00277-010-1093-z

2011 90(4):409-16..

Ability of IDO to attenuate liver injury in alpha-galactosylceramide-induced hepatitis model.

Ito H, Hoshi M, Ohtaki H, Taguchi A, Ando K, Ishikawa T, Osawa Y, Hara A, Moriwaki H, Saito K, Seishima M.

J Immunol. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.0904173 2010 185(8):4554-60.

The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse.

Hoshi M, Saito K, Hara A, Taguchi A, Ohtaki H, Tanaka R, Fujigaki H, Osawa Y, Takemura M, Matsunami H, Ito H, Seishima M.

J Immunol. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.0901150 2010 185(6):3305-12.

Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP.

Yoshikawa T, Hara T, Tsurumi H, Goto N, Hoshi M, Kitagawa J, Kanemura N, Kasahara S, Ito H, Takemura M, Saito K, Seishima M, Takami T, Moriwaki H. *Eur J Haematol.*

査読有

DOI: 10.1111/j.1600-0609.2009.01393.x 2010; 84(4):304-309.

Interaction between LPS-induced NO production and IDO activity in mouse peritoneal cells in the presence of activated Valpha14 NKT cells.

Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M, Tanaka R, Osawa Y, Yokochi T, Moriwaki H, Saito K, Seishima M.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有

doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.120 2009; 389(2):229-34.

Changes in serum tryptophan catabolism as an indicator of disease activity in adult T-cell leukemia/lymphoma.

Hoshi M, Ito H, Fujigaki H, Takemura M, Takahashi T, Tomita E, Ohyama M, Tanaka R, Ohtaki H, Saito K, Seishima M. *Leuk Lymphoma.*

査読有

doi:10.1080/10428190903045393

2009; 50(8):1372-1374.

Marked increases in hippocampal neuron indoleamine 2, 3-dioxygenase via IFN-gamma-independent pathway following transient global ischemia in mouse.

Hoshi M, Saito K, Murakami Y, Taguchi A, Fujigaki H, Tanaka R, Takemura M, Ito H, Hara A, Seishima M.

Neurosci Res. 査読有

doi:10.1016/j.neures.2008.12.003 2009; 63(3):194-198.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 免疫抵抗性疾患耐性をもった動物の育種方法

発明者: 齊藤邦明、市村直也

権利者: 齊藤邦明、成宮明

種類: 特願 2010

番号: 158056

出願年月日: 平成22年7月12日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ:

<http://www.hs.med.kyoto-u.ac.jp/saito-k/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 邦明 (SAITO KUNIAKI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 80262765

(2) 研究分担者

山本 康子 (YAMAMOTO YASUKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 00331869

船渡 忠男 (FUNATO TADAO)

東北福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号: 70165455

(3) 連携研究者

伊藤 宏康 (ITO HIROYASU)

岐阜大学・医学研究科・講師

研究者番号: 80373075

清島 満 (SEISHIMA MITSURU)

岐阜大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10171315