

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07432

研究課題名（和文）トリプトファン代謝を標的とした敗血症の免疫制御と新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）Targeting Tryptophan Metabolism for Immune Regulation of Sepsis and Novel Therapeutic Strategies

研究代表者

星 雅人（Hoshi, Masato）

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

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）：敗血症の理解は進んでいるものの、負担を軽減する新規の治療的介入はいまだ見つかっていない。現在の治療法は限られており、死亡率が年々低下しているのは、支持療法の改良によるものである。ここでは、KMO阻害剤Ro61-8048で処理したWTマウスまたはKMOKOを用いて、LPS誘発内毒素血症におけるKMOの免疫制御における役割を検討した。その結果、KMOKOマウスにおいて、LPS誘発またはCLPの死亡率および肝IL-6産生が増加し、肝マクロファージにおけるATF4シグナルの増加が関与していると考えられた。さらに、敗血症マウスを3HKで処理すると、KMOの有無に関わらず、死亡率および炎症反応が減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬の出現により細菌感染による死亡率は著しく減少したが、抗菌薬使用による耐性菌の問題やさらなる治療成績向上には、細菌を標的とする抗菌薬に加えて、生体側の免疫制御を標的とした新規治療戦略および検査法の確立が早急の課題である。

本研究では、マウス敗血症モデルにおけるKMOの役割を明らかにしたと共に、KMOの制御は耐性菌やさらなる治療効果の向上に向けた新規治療戦略となり得ることが期待された。

研究成果の概要（英文）：Despite advances in our understanding of endotoxic shock, novel therapeutic interventions that can reduce the burden of sepsis remain elusive. Current treatment options are limited, and it is only through refinements in the ways that we deliver supportive care that mortality has fallen over the years.

Here, the role of kynurenine 3-monooxygenase (KMO) in immune regulation was examined in LPS-induced endotoxemia using KMOKO and WT mice treated with the KMO inhibitor Ro61-8048. We showed that LPS-induced or cecal ligation and puncture-induced mortality and hepatic IL-6 production increased in the absence of KMO, possibly involving increased ATF4 signaling in hepatic macrophages. Moreover, treatment of septic mice with 3-hydroxykynurenine reduced mortality rates and inflammatory responses regardless of the presence or absence of KMO.

研究分野：実験病理学

キーワード：KMO 3-hydroxykynurenine Endotoxic shock Interleukin-6 ATF4 Sepsis

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍や自己免疫性疾患等の各種炎症性疾患において、生物学的製剤や免疫チェックポイント阻害剤等が治療の中心となり、劇的な治療効果の改善と QOL の向上を実現している。一方で、細菌感染症においては抗菌薬による治療が主体であり、厚生労働省より発表された平成 27 年度の国内調査では、悪性疾患を除く敗血症による死亡率は約 10% と極めて高い状況であり、死因の多くは全身的な炎症が制御不能となり引き起こされる多臓器不全である。また、世界的には 2000 万 ~ 3000 万人が罹患し、死亡率は約 30% との報告がある。すなわち、抗菌薬の出現により細菌感染による死亡率は著しく減少したが、抗菌薬使用による耐性菌の問題やさらなる治療成績向上には、細菌を標的とする抗菌薬に加えて、生体側の免疫制御を標的とした新規治療戦略および検査法の確立が早急の課題と考えられる。

IFN- $\gamma$  を主とする炎症性サイトカインや LPS 等の各種リガンドにより酵素誘導される indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) や kynurenine 3-monooxygenase (KMO) は、トリプトファン (TRP) 代謝に関わる律速酵素である。これまでに申請者は、IDO 活性の結果として、局所 TRP の枯渇あるいはキヌレニン (KYN) を中心とする TRP 代謝産物の増加が、T 細胞や NK 細胞の機能を制御し、種々の病態 (敗血症、ウイルス感染モデル等) において重要な免疫制御因子であることを明らかにしてきた (Hoshi M et al. J Immunol. 2010;185:3305-12., J Immunol. 2012;188(8):3980-7. Infect Immun. 2014;82(11):4487-95. )。しかし、TRP 代謝関連酵素またはその代謝産物は複数存在しており、敗血症において免疫制御の中心として作用する成分の同定には至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、細菌感染症等において免疫細胞の誘導や活性を強力に制御することで知られている TRP 代謝関連酵素およびその代謝産物に着目し、敗血症モデルマウスを用いた TRP 代謝の免疫制御に及ぼす効果を明らかにする。さらに、従来の抗菌薬治療に加えて生体側の免疫能を改善させる新規治療戦略を視野に入れた標的因子の同定と、治療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) 敗血症モデルマウスの作製

マウスは C57BL6/J (8 週齢、オス) の野生型マウス (WT) 及び KMO 遺伝子欠損マウス (KMOKO) を使用した。また KMO 酵素阻害剤として WT に Ro 61-8048 を腹腔内投与した。敗血症モデルは、LPS (15 mg/kg) を腹腔内投与しエンドトキシンショックモデルとした。さらに、盲腸結紮穿刺モデルを作製し、敗血症モデルで普遍性を評価した。

### (2) 各種臓器(細胞)におけるトリプトファン代謝関連酵素の発現・活性量の測定

各種敗血症モデルにおける肺臓、肝臓及びリンパ節等及び発現臓器よりフローサイトメーターまたは磁気ビーズを用いて単離した各種細胞 (マクロファージ、樹状細胞等) の TRP 代謝関連酵素の発現・活性を RT-qPCR 法、免疫組織化学染色 (KMO 抗体等) 及び Western blotting 法等を用いて解析した。

### (3) 敗血症に対する各種酵素阻害剤及び遺伝子欠損の効果判定

各種敗血症モデルにおいて、WT、KMOKO 及び阻害剤投与マウスにおける生存率の比較、各種臓器の病理組織学的解析をした。さらに、各種モデル作製後 0, 6, 24 時間で採血および臓器等を回収し、TRP 代謝産物 (TRP、KYN、3-ヒドロキシキヌレニン (3HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸 (3HAA) 等) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で、血中サイトカイン量等は IL-6、IL-1 $\beta$  及び TNF- $\alpha$  を中心に ELISA 法を用いて分析した。

### (4) IL-6 産生シグナルの解析

WT および KMOKO マウスに LPS を投与した後に、肝臓を採取し、IL-6 産生シグナルである NF- $\kappa$ B シグナルと ATF4 シグナル解析を Western blotting 法および免疫組織化学染色を用いて解析した。さらに、これらのシグナルに TRP 代謝産物の 3HK が与える影響について評価した。

### (5) 3HK 投与による敗血症モデルマウスの予後評価

LPS 投与した WT および KMOKO に 3HK を連日腹腔内投与し、生存率の評価および血中 IL-6 産生量を ELISA 法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌由来の LPS を WT および KMOKO マウスに腹腔内投与 (15mg/kg) し、敗血症モデルを作製した。重要なことに WT マウスと比較し、KMOKO マウスでは、有意に生存率が低下した。ま

た、実際の患者で起こり得る生細菌感染による敗血症への影響を調査するために、盲腸穿孔敗血症 (CLP) モデルを使用したところ、LPS 誘導性敗血症と同様に KMOKO マウスでは WT マウスと比較して有意に生存率が低下した。

(2) LPS 投与により、特に障害が強く出る肺臓、肝臓および腎臓を摘出し、KMO の発現・活性および TRP 代謝産物の測定を行った。どの臓器においても KMO の発現を認めたものの、特に肝臓における KMO の経時的変化は顕著であった。また、肝臓の KMO は肝細胞の他、特に F4/80 陽性細胞 (肝内マクロファージ) で強い発現を認めた。肝臓内の TRP 代謝産物の経時的変化を確認したところ、KMO で代謝生成される 3HK の有意な増加を認めた。

(3) 各種敗血症モデルにおいて、KMOKO マウスで確認された IL-6 増加に伴う生存率の低下の原因として、KMO タンパクそのものの作用なのかあるいは KMO 酵素活性阻害による下流代謝産物の抑制によるものかを確認するため、KMO 特異阻害剤を使用した。KMO 阻害剤の投与は KMOKO と同様の変化を認めたため、敗血症において KMO により代謝される産物が重要な役割を持つと推察された。そこで、LPS を投与した KMOKO マウスに下流代謝産物である 3HK を連日腹腔内投与したところ、生存率が劇的に改善されることを明らかにした。さらに、この効果は LPS を投与した WT マウスにおいても有効であった。

(4) 肝臓内および血清中のサイトカイン (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ ) およびケモカイン量 (CCL2, CCL5, CCL25) を測定した。肝臓中および血清中の IL-6 量は、LPS 投与 WT マウスと比較し KMOKO マウスで有意に高値であった。また、LPS モデルにおいて観察された、KMOKO マウスにおける有意な血中 IL-6 濃度の上昇は、CLP モデルでもまた確認された。

(5) LPS を投与した KMOKO で IL-6 が高値となるメカニズムを解明するために、IL-6 産生シグナルとして知られている、ATF4 と NF- $\kappa$ B について解析した。LPS 投与 WT マウスと比較し KMOKO マウスの肝臓において、NF- $\kappa$ B シグナルは有意な差を認めなかったが、ATF4 は有意に増加していた。さらに、肝臓中で ATF4 を発現している主要な細胞は、クッパ細胞であることを明らかにした。WT および KMOKO マウスから単離されたクッパ細胞を培養し、LPS 処置による ATF4 発現量を確認したところ、WT と比較して KMOKO で有意に ATF4 シグナルが活性化していた。一方、KMOKO 由来のクッパ細胞に 3HK を添加したところ、ATF4 発現量は WT と同程度まで減少した。

以上の結果より、LPS 投与によりクッパ細胞で KMO 酵素活性により生成された 3HK は、ATF4 シグナルを抑制した結果として IL-6 の産生量が減少し、致死率が減少することが示唆された。敗血症における KMO の役割を明らかにしたと共に、KMO の制御は耐性菌やさらなる治療効果の向上に向けた新規治療戦略となり得ることが期待された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki Kyoka, Hoshi Masato, Tezuka Hiroyuki, Morita Nanaka, Hirayama Masaya, Sato Fumiaki, Yoshida Sayaka, Saito Kuniaki	4. 巻 47
2. 論文標題 D-allose enhances the efficacy of hydroxychloroquine against Lewis lung carcinoma cell growth by inducing autophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2022.8328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ando Tatsuya, Hoshi Masato, Tezuka Hiroyuki, Ito Hiroyasu, Nakamoto Kentaro, Yamamoto Yasuko, Saito Kuniaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Absence of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 promotes liver regeneration after partial hepatectomy in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2022.12911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Yuko, Mouri Akihiro, Kunisawa Kazuo, Hirakawa Mami, Kubota Hisayoshi, Kosuge Aika, Niijima Moe, Hasegawa Masaya, Kurahashi Hitomi, Murakami Reiko, Hoshi Masato, Nakano Takashi, Fujigaki Suwako, Fujigaki Hidetsugu, Yamamoto Yasuko, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 405
2. 論文標題 Kynurenine 3-monooxygenase deficiency induces depression-like behavior via enhanced antagonism of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by kynurenic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113191 ~ 113191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbr.2021.113191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Genki, Hoshi Masato, Nakamoto Kentaro, Sakurai Masayo, Nagashima Kazuko, Fujita Takashi, Ito Hiroyasu, Hata Tadayoshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Evaluation of red blood cell parameters provided by the UF-5000 urine auto-analyzer in patients with glomerulonephritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)	6. 最初と最後の頁 1547 ~ 1553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/cc1m-2021-0287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshi Masato, Kubo Hisako, Ando Tatsuya, Tashita Chieko, Nakamoto Kentaro, Yamamoto Yasuko, Tezuka Hiroyuki, Saito Kuniaki	4. 巻 5
2. 論文標題 3-Hydroxykynurenine Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated IL-6 Production and Protects against Endotoxic Shock in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 523 ~ 534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2100028	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 Morita Nanaka, Hoshi Masato, Hara Takeshi, Ninomiya Soranobu, Enoki Taisuke, Yoneda Misao, Tsurumi Hisashi, Saito Kuniaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Viability of diffuse large B-cell lymphoma cells is regulated by kynurenine 3-monooxygenase activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.13051	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 Mori Y, Mouri A, Kunisawa K, Hirakawa M, Kubota H, Kosuge A, Niijima M, Hasegawa M, Kurahashi H, Murakami R, Hoshi M, Nakano T, Fujigaki S, Fujigaki H, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K.	4. 巻 405
2. 論文標題 Kynurenine 3-monooxygenase deficiency induces depression-like behavior via enhanced antagonism of 7 nicotinic acetylcholine receptors by kynurenic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behav Brain Res .	6. 最初と最後の頁 113191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshi M, Osawa Y, Nakamoto K, Morita N, Yamamoto Y, Ando T, Tashita C, Nabeshima T, Saito K.	4. 巻 438
2. 論文標題 Kynurenine produced by indoleamine 2,3-dioxygenase 2 exacerbates acute liver injury by carbon tetrachloride in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2020.152458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田那奈架、星 雅人、手塚裕之、吉田清賀、佐藤史明、横井浩幸、斎藤邦明
2. 発表標題 CD8 + 制御性T細胞はLPS誘導性敗血症の重症化を抑制する
3. 学会等名 第54回藤田医科大学医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aika Kosuge, Kazuo Kunisawa, Hiroyuki Tezuka, Masato Hoshi, Nanaka Morita, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima, Akihiro Mouri
2. 発表標題 Involvement of cerebellum blood-brain barrier in the depression-like behaviors induced by chronic social defeat stress.
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋和紀、木下充弘、星雅人、高橋和男
2. 発表標題 HILIC-ESI-MS/MSによる希少糖ヌクレオチドの探索
3. 学会等名 第40回日本糖質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田那奈架、星 雅人、吉田清賀、佐藤史明、斎藤邦明
2. 発表標題 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の生存率はキヌレニン-3-モノオキシゲナーゼにより制御される
3. 学会等名 第40回JSTRY
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	手塚 裕之  (Tezuka Hiroyuki)  (30375258)	   (33916)	
研究協力者	齋藤 邦明  (Saito Kuniaki)  (80262765)	   (33916)	
研究協力者	森田 那奈架  (Morita Nanaka)  (60980779)	   (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------