

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590985

研究課題名（和文）

インドレアミン・ジオキシゲナーゼ阻害を介した結核に対する新規細胞ワクチンの開発

研究課題名（英文）

Novel dendritic cell vaccine for tuberculosis with inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase.

研究代表者

須田 隆文 (SUDA TAKAFUMI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：30291397

研究成果の概要（和文）：免疫応答を抑制し、免疫寛容を誘導する indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) を阻害することによって、結核感染症などの細胞内寄生菌に対する樹状細胞 (DC) ワクチンのワクチン効果の増強を試み、さらにヒトの感染症における IDO 活性の臨床的意義を検討した。DC ワクチンを 1-methyl- L-tryptophan (1MT) で処理することによって、IDO 活性が抑制され、IL-10 などの抑制性サイトカインの産生が低下し、DC ワクチンの抗原提示能が増強することが明らかとなった。また、市中肺炎や肺結核症において、血清 IDO 活性が予後因子となることを証明した。

研究成果の概要（英文）：The present study was conducted to develop a novel potent dendritic cell (DC) vaccine by inhibiting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity for intracellular pathogen infections, such as tuberculosis. We demonstrated that treatment with 1-methyl- L-tryptophan (1MT) decreased IL-10 production from DCs, resulting in augmentation of their antigen-presenting capacity. In addition, we also showed that serum IDO activity is a significant prognostic factor in community-acquired pneumonia and pulmonary tuberculosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：樹状細胞，ワクチン，結核，細胞内寄生菌，indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)

1. 研究開始当初の背景

免疫応答を抑制し，免疫寛容を誘導する indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) は，LPS などで成熟させた樹状細胞 (DC) ワクチンにおいて高発現していることが明らかになってきた。そこで，この IDO を阻害することによって，結核感染症などの細胞内寄生菌に対する樹状細胞 (DC) ワクチンの効果を増強できる可能性が考えられる。また，ヒトの感染症における IDO 活性の意義についてはいまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

IDO を選択的に阻害することによって，結核などの細胞内寄生菌感染に対するより強力な DC ワクチンの作製を試みる。さらに，ヒトの感染症における IDO 活性の臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BALB/c マウスの骨髄細胞から GM-CSF と IL-4 を添加し，骨髄由来の DC (BM-DC) を分化させ，CD11c 結合磁気ビーズを用いて BM-DC を精製した。この BM-DC を，LPS や CpG などの Toll-like receptor (TLR) のリガンドで成熟させ，培養上清中の tryptophan (Trp) と kynurenine (Kyn) 濃度を liquid chromatography-mass spectrometry (LC-Mass) を用いて測定し，IDO 活性 (Trp/Kyn 比) を計算した。さらに，定量 RT-PCR によって BM-DC における IDO mRNA の発現を検討した。

(2) 各種 TLR リガンドで刺激した BM-DC が

抑制性サイトカインである IL-10 を産生することを確認した後に，IDO の選択的阻害薬 1-methyl-L-tryptophan (1MT) が IL-10 産生に及ぼす影響を検討した。さらに，異種リンパ球混合試験 (mixed lymphocyte proliferation assay, MLR) によって，1-MT 処理が BM-DC の抗原提示能に及ぼす効果を明らかにした。

(3) ヒトの結核感染症や市中肺炎において，血清中の Trp と Kyn の濃度を LC-Mass で測定し，計算した IDO 活性と予後との関連を検討した。

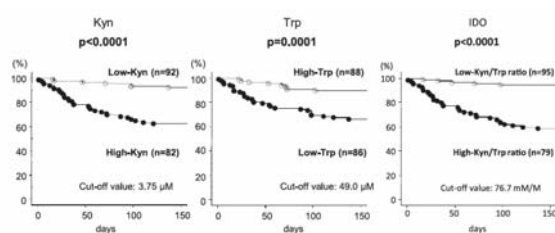
4. 研究成果

(1) LPS や CpG などの TLR リガンドの刺激によって，培養上清中の Trp /Kyn 比が著明低下し，BM-DC の IDO 活性が機能的に誘導されることが明らかとなった。また，定量 RT-PCR でもこれらの刺激によって，mRNA レベルでの IDO 発現の誘導がおきていることも確認された。

(2) 各種 TLR リガンドで刺激し，IDO を誘導した BM-DC においては，IL-10 産生が増加したが，1-MT 添加によってこの IL-10 産生が著明に抑制された。さらに，MLR においては，1-MT 添加によって BM-DC の抗原提示能が有意に増強することを明らかにした。以上より，通常 DC ワクチンの成熟刺激として用いる各種 TLR リガンドは同時に IDO 発現と抑制性サイトカイン IL-10 産生を誘導するが，1-MT 処理によって選択的に IDO 活性を阻害すると，この抑制が解除され，DC ワクチンの抗原

提示能が高まる可能性が示唆された。

- (3) 肺結核および市中肺炎患者において、血清IDO活性(Trp/Kyn比)は有意な独立した予後規定因子で有り、下図に示すように、肺結核患者においては、血清Tryが低く、血清Kynが高く、あるいはIDO活性が高い症例の予後が有意に不良であることが明らかとなった。以上より、IDO活性の上昇は、その免疫抑制効果を介して感染症の重症化に関わっている可能性が示唆された。



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9件)

1. Suzuki Y, Suda T, et al: Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity predicts prognosis of pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, in press, 2012. (査読有り)
2. Suzuki Y, Suda T, et al: Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia. *J Infect*, 63:215-121, 2011. (査読有り)
3. Suzuki Y, Suda T, et al: Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer* 67: 361-365, 2009. (査読有り)
4. Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, Shibata K, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Nakamura H, Chida K: Mouse CD11b^{high} lung dendritic cells have more potent capability to induce IgA than CD103⁺ lung dendritic cells *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, in press, 2012. (査読有り)
5. Furuhashi K, Suda T, et al: Mouse lung CD103⁺ and CD11b^{high} dendritic cells preferentially induce distinct CD4⁺ T cell responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46(2): 165-172, 2011. (査読有り)
6. Kono M, Nakamura Y, Suda T, et al: Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. *Vaccine*, 30:2633-2639, 2012. (査読有り)
7. Uto T, Tsujimura K, Suda T, et al: A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 61: 189-196, 2011. (査読有り)
8. Kato M, Nakamura Y, Suda T, et al: Enhanced anti-tumor immunity by superantigen-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*, 60: 1029-1038, 2011. (査読有り)
9. Hasegawa H, Inui N, Suda T, et al: Expressions of multidrug resistance protein 1 and multidrug resistance-associated protein 1 in lung dendritic cells. *Life Sci*, 89(7-8): 282-287, 2011. (査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 隆文 (SUDA TAKAFUMI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：30291397

(2) 研究分担者

中村 祐太郎 (NAKAMURA YUTARO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436962

(3) 連携研究者

永田 年 (NAGATA TOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90275024