

平成21年 6月 16日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791177  
 研究課題名 (和文) 胎児-母体間免疫におけるトリプトファンの役割、およびその作用機構の解明  
 研究課題名 (英文) Role of tryptophan and clarification of its action mechanism in the immunity between embryo-mother's bodies  
 研究代表者  
 岡本 威明 (OKAMOTO TAKEAKI)  
 川崎医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：20398431

研究成果の概要：A431細胞におけるIFN- $\gamma$ 誘導性IDO mRNA発現の調節機能は、IDOの基質であるトリプトファンに特異的なものであり、そのIDO mRNA発現増強の作用機序として、Jak-StatシグナリングよりもむしろNF- $\kappa$ Bシグナリングの関与が示唆された。さらに、各種トリプトファン誘導体によるIDO発現調節活性とインドール環表面の静電ポテンシャルとは強い正の相関を示し、インドール環における各種官能基による修飾が認識分子との親和性・安定性に影響を与えているのではないかと推察された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、胎児-母体間免疫、トリプトファン、IDO

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胎児と母親の間では、遺伝的に異質であるにもかかわらず妊娠時には拒絶反応が生じない。現在、このメカニズムにおいては、未だ詳細には明らかとなっていない。しかし、1998年、トリプトファン(Trp)分解酵素の一つであるインドールアミン2,3酸素添加酵素(IDO)活性を阻害すると、マウスが流産するとの報告がなされ (Munn DH *et al.*, *Science* 281, 1998)、IDO活性と妊娠維持と関連することが示唆されている。また、Munnらの報告によると、IDOを誘導した樹状細胞

はT cellを活性化する能力を欠失していることが報告され (*Science* 297, 2002)、IDOが誘導されることで樹状細胞が不応期へ入り、免疫抑制機構が誘導されることが示唆されている。IDOの基質であるTrpは制限アミノ酸であり、特に妊娠時には胎児の成長に必須のアミノ酸であるにもかかわらず、妊娠初期から中期にかけて、胎盤上にそれを分解するIDOが強力に誘導されてくることは何を意味しているのだろうか？ 2001年に我々は、受精卵着床後からマウス胚にトリプトファン2,3酸素添加酵素(TDO)が強力

に誘導され、その後、着床10日ぐらいで改めて胎盤などにIDOが誘導されてくることを見出した (Suzuki S *et al.*, *Biochem J*.355,2001)。よって、IDOが免疫抑制のメカニズムをなし、IDOは、その維持に働いており、Trpそのものが免疫誘発カスケードの一員となっているのではとないかと現在考えている。

(2) これまでにIDOは、胸腺、肺、副睾丸、小腸等において、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) およびリポポリサッカライド (LPS) によって強力に誘導されることが明らかとなっており、また、IDO酵素活性阻害剤として、トリプトファンのアナログである1-メチル-L-トリプトファン(1-MT)やメチルヒダントイン-DL-トリプトファン (MTH-Trp) が報告されている (Muller AJ *et al.*, *Nat.Med.*11,2005)。また、Kudoらのグループは、Trpの胎盤透過がIDO酵素阻害剤で抑制されることを報告している (*J Physiol.* 531, 2001)。一方、2006年に我々は、1-MT、MTH-TrpならびにTrpが、ヒト表皮ガン細胞株A431において、IFN- $\gamma$ 誘導性のIDOの発現を転写レベルで増強し、マウス直腸ガン細胞株CMT-93においては、IFN- $\gamma$ 誘導性のIDOの発現を転写レベルで抑制することを見出した。また、TrpによるIDOのmRNA発現レベルの調節は、他のアミノ酸であるフェニルアラニンやメチオニン刺激下では変化しないことより、Trp特異的な作用であることを確認した。

## 2. 研究の目的

(1) 制限アミノ酸の一種であるTrp、およびTrp誘導体によるIDOの転写調節機構を検討し、胎児-母体間免疫におけるTrpの役割およびその作用機構の解明を目的とする。

(2) 女性健常者における性周期とIDO発現との関連性について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、必須アミノ酸の一種であるトリプトファンの転写調節機構の解明を行った。本因子の転写調節機構の解明には、ヒト表皮系ガン細胞株A431ならびにマウス直腸ガン細胞株CMT-93を用いた。また、培養培地として、トリプトファン不含の培地を用いた (コージンバイオ株式会社・埼玉)。

(2) Jak1、Jak2およびSTAT1のリン酸化に及ぼす影響に関しては、各種抗体およびリン酸化抗体を用いてウエスタンブロッティング法ならびに酵素抗体法 (ELISA法) を用いて検討した。IDOのメッセンジャーRNA発現レベルに関しては、Real-time RT-PCR法を用いて検討した。

(3) TrpのNF- $\kappa$ Bの活性化経路に及ぼす影響に関して、NF- $\kappa$ Bの発現は、ウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) 近年我々は、CMT-93細胞においてトリプトファンがIFN- $\gamma$ 誘導性IDO発現を抑制することを報告してきた。そこで、本年度はA431細胞において、トリプトファンによるIFN- $\gamma$ 誘導性IDO発現の調節機構をNF- $\kappa$ BシグナリングおよびJak-Statシグナリングに着目して検討した。IDO mRNA発現レベルの解析においては、Real time RT-PCR法を用いた。その結果、トリプトファンは、75 $\mu$ Mの培地への添加でA431細胞におけるIFN- $\gamma$ 誘導性IDO mRNA発現を、最大2.2倍に増強した。このトリプトファンによる増強効果は、他のアミノ酸であるフェニルアラニンやメチオニンでは認められなかった。また、細胞核内でのNF- $\kappa$ B発現レベルは、トリプトファン刺激により増大した (図1)。さらに、トリプトファンによるIDO mRNAの増強効果はNF- $\kappa$ B活性化阻害剤として作用するプロテアソームの特異的阻害剤Lactacystin (10 $\mu$ M) 処理により完全に消失することから、NF- $\kappa$ B活性化シグナリングの関与が示唆された。トリプトファンによるIFN- $\gamma$ 誘導性IDO mRNA発現の調節機能は、IDOの基質であるトリプトファンに特異的なものであり、そのIDO mRNA発現増強の作用機序として、Jak-StatシグナリングよりもむしろNF- $\kappa$ Bシグナリングの関与が示唆された。

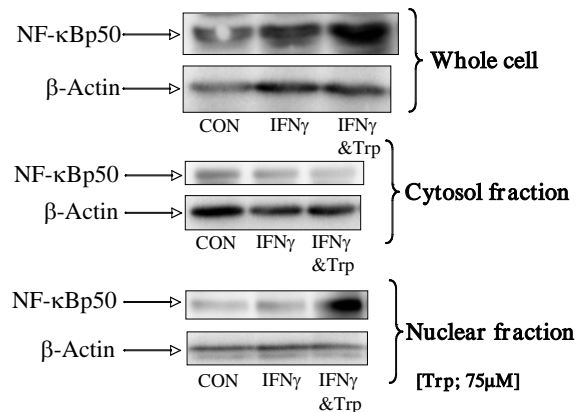


図1 細胞内でのNF- $\kappa$ B発現レベル

(2) IFN- $\gamma$ 刺激に対して感受性が高く、強力なインドールアミン酸素添加酵素 (IDO) の発現誘導が認められる細胞株として、ヒト類表皮ガン細胞株A431が報告されている。近年我々は、A431細胞においてトリプトファンがIFN- $\gamma$ 誘導性IDO発現を転写レベルで促進することを報告してきた。本研究では、A431細胞を用いて約10種のトリプトファンアナログの構造とIFN- $\gamma$ 誘導性IDOmRNA発現との相

関について検討した。トリプトファンアナログとして、1-メチル-L-トリプトファン、6-ニトロ-L-トリプトファン、5-ハイドロキシ-L-トリプトファン等を用いた。IDO mRNA 発現レベルの解析は、real time RT-PCR 法を用いた。また、各種トリプトファンアナログにおいて、非経験的な分子軌道計算により分子構造と電子状態を算出した。得られた電子状態に基づき全電子密度表面を発生させ、その上に3次元静電ポテンシャルを写像させた。計算レベルには HF/3-21G レベル、計算プログラムには Gaussian03、結果の可視化には Gauss View を利用した。その結果、L-トリプトファンは、A431 細胞における IFN- $\gamma$  誘導性 IDO 発現を、約 2 倍に増強し、他のアミノ酸であるメチオニンやフェニルアラニンには増強効果は認められなかった。また、6-ニトロ-L-トリプトファン刺激では、トリプトファンよりも強い約 3 倍の IDO 発現増強効果が認められ (図 2)、1-メチル-L-トリプトファンや、インドールには、約 1.5 倍の弱い IDO 発現増強効果が認められた。さらに、インドール環表面の静電ポテンシャルを検討したところ、ニトロ基の修飾により非修飾とくらべて正電荷に偏ることが明らかとなった。各種トリプトファン誘導体による IDO 発現調節活性とインドール環表面の静電ポテンシャルとは強い正の相関を示し、インドール環における各種官能基による修飾が認識分子との親和性・安定性に影響を与えているのではないかと推察された。

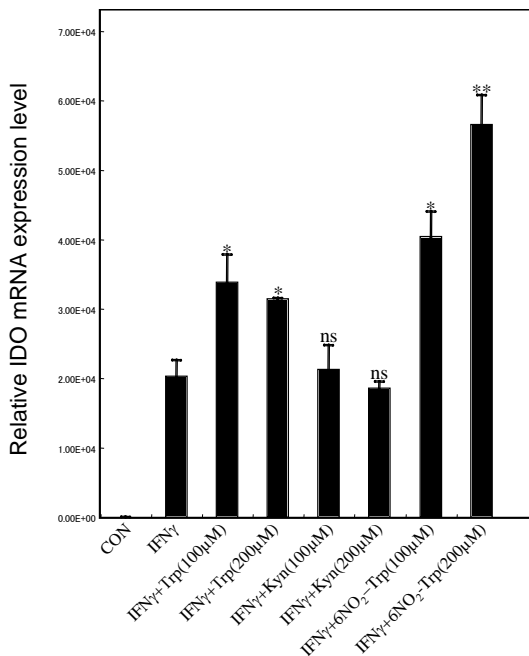


図 2 トリプトファン誘導体の IDO 発現調節機能

(3) 女性健常者 3 名より各性周期毎に末梢血を採取し、ミルテニーバイオテック株式会社の Blood dendritic isolation kit を用いて樹状細胞を分離・精製を行った。その後、IFN- $\gamma$  処理を行い、24 時間後の IDO mRNA 発現を測定したところ、排卵期に近づくにつれて IDO の発現が上昇し、その後、減少する結果が得られた。これらの結果より、性周期と IDO の発現とは相関性をもつことが明らかとなった。今後、妊娠初期・中期・後期の期間での IDO の発現を検討していく予定である。

#### 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 2 件)

① Takeaki Okamoto, Shigenobu Tone, Hiroaki Kanouchi, Chie Miyawaki, Sayuri Ono, Yohsuke Minatogawa  
Transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tryptophan and its analogue  
*Cytotechnology*, 54:107-113. 2007 査読有

② Masao Yamasaki, Akiko Kawabe, Kentaro Nishimoto, Harishkumar Madhyastha, Yoich Sakakibara, Masahito Suiko, Takeaki Okamoto, ほか 3 名  
Dihydro-alpha-lipoic acid has more potent cytotoxicity than alpha-lipoic acid  
*In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 45:275-280 2009 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 岡本 威明  
必須アミノ酸トリプトファンによる IFN- $\gamma$  誘導性 IDO 発現調節機構の解明  
第 11 回生物機能研究会 2007 年 6 月 9 日  
鹿児島大学(鹿児島)

② 岡本 威明  
トリプトファンによる IDO 転写調節機構の解明  
国立遺伝学研究所研究会 2007 年 10 月 26 日  
国立遺伝学研究所(三島)

③ Takeaki Okamoto  
NF- $\kappa$ B activation contributes to indoleamine 2,3-dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN- $\gamma$  and tryptophan  
3rd International Conference on Polyphenols and Health (ICPH 2007) Satellite Symposium in Kagoshima  
24<sup>th</sup> November 2007 Kagoshima University (Kagoshima)

④ 岡本 威明

トリプトファンおよびトリプトファン誘導体による IFN- $\gamma$ 誘導性 IDO 発現調節機構  
第 29 回日本トリプトファン研究会学術集会 2007 年 12 月 8 日  
昭和女子大 (東京)

⑤ 岡本 威明

トリプトファンによる IFN- $\gamma$ 誘導性 IDO mRNA 発現調節機構の解析  
第 30 回日本分子生物学会年会・  
第 80 回日本生化学会大会 合同大会  
2007 年 12 月 12 日 パシフィコ横浜 (横浜)

⑥ 岡本 威明

トリプトファンアナログの IDO 転写調節機能とその構造との相関  
日本トリプトファン研究会 第 30 回学術集会 2008 年 12 月 7 日  
川崎医科大学(岡山県倉敷市)

⑦ 岡本 威明

トリプトファン誘導体の構造と IDO 転写調節機能との相関  
第 31 回日本分子生物学会年会  
第 81 回日本生化学会大会 合同大会  
2008 年 12 月 11 日  
神戸ポートアイランド  
(神戸国際展示場)

[図書] (計 2 件)

① Takeaki Okamoto, Sigenobu Tone, Hiroaki Kanouchi, Fumio Ohyama, Yohsuke Minatogawa  
Down-regulation of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) transcription by tryptophan analogue  
*The interdisciplinary conference on tryptophan* 352-356 2007

② Fumio Ohyama, Shigenobu Tone, Takeaki Okamoto ほか 2 名,  
Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in small intestine of mouse infected with parasitic helminth, *hymenolepis nana*  
*The interdisciplinary conference on tryptophan* 286-289 2007.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=104>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本威明 (OKAMOTO TAKEAKI)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20398431

(2) 研究協力者

刀祢重信 (TONE SHIGENOBU)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70211399

宮脇智恵 (MIYAWAKI CHIE)  
川崎医科大学・医学部・研究補助員