

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15272

研究課題名(和文)トリプトファン代謝に着目した癌免疫療法抵抗性の病態解明

研究課題名(英文) Cancer immunotherapy resistance focusing on tryptophan metabolism

研究代表者

二宮 空暢 (Ninomiya, Soranobu)

岐阜大学・医学部附属病院・招聘教員

研究者番号：90444281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞性腫瘍の表面抗原であるCD19と、T細胞の表面抗原であるCD3の両方を標的とする二重特異性抗体であるBlinatumomabは、新規癌免疫療法として近年注目されている。本研究では、トリプトファン欠乏およびキヌレニン過剰状態が、Blinatumomabが結合したT細胞に与える影響の解析、IDO陽性腫瘍に対するBlinatumomabの抗腫瘍効果の検討、IDO阻害剤併用Blinatumomab療法の有効性の解明の3つを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブリナツモマブは新規抗体医薬品で、急性リンパ性白血病(ALL)に対して2017年にアメリカで承認された。Blinatumomabの臨床試験での奏効率は約50%であり、既存の治療法に比べてきわめて効果的ではあるが、一方で約半数の患者においては、効果が乏しいのが現状である。そのため、Blinatumomabの治療効果予測のバイオマーカーや、効果を高める治療法の開発が期待されています。今回、我々はBlinatumomab療法の効果が抑制されている理由が、癌細胞中のIDOによってトリプトファンが代謝され、産生されたキヌレニンによるものであることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Blinatumomab, a bispecific antibody that targets both CD19, a surface antigen of B-cell tumors, and CD3, a surface antigen of T cells, has recently attracted attention as a novel cancer immunotherapy. In this study, (1) Analysis of the effects of tryptophan deficiency and kynurenine excess on Blinatumomab-bound T cells, (2) Examination of the antitumor effect of Blinatumomab on IDO-positive tumors, and (3) Elucidation of the effectiveness of Blinatumomab therapy combined with IDO inhibitors.

研究分野：癌免疫

キーワード：がん免疫 腫瘍微小環境 癌免疫療法 トリプトファン代謝 IDO

1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞が免疫監視機構を逃避するメカニズムの解明が進み、それらを標的とした癌免疫療法の開発が進んでいる。免疫応答を負に制御する分子である PD-1 や CTLA-4 をターゲットとした免疫チェックポイント阻害薬、キメラ抗原受容体発現 T 細胞療法 (CAR-T 療法) や二重特異性抗体 (bi-specific T-cell engager: BiTE) の臨床開発は、ここ数年で大きく飛躍し、癌の治療体系自体を大きく変える可能性を秘めている。B 細胞性腫瘍の表面抗原である CD19 と、T 細胞の表面抗原である CD3 の両方を標的とする Blinatumomab は、再発/難治性急性リンパ性白血病 (ALL) に対して 2017 年に FDA に承認された最初の BiTE である。BiTE は、腫瘍抗原を標的とする一本鎖抗体 (scFv) と T 細胞上の CD3 を認識する scFv を結合させた、2 つの scFv からなる抗体であり、腫瘍細胞と T 細胞が BiTE を介して物理的に会合することで、CD3 陽性 T 細胞が増殖、活性化し、グランザイムやパーフォリンを介して癌細胞傷害活性を発揮する。Blinatumomab の臨床試験での奏効率は約 50% であり、既存の治療法に比べてきわめて効果的ではあるが、一方で約半数の患者においては、効果が乏しいのが現状である。そのため、Blinatumomab の治療効果予測のバイオマーカーや、効果を高める治療法の開発が期待されている。

そこで本研究では、Blinatumomab 療法をはじめとする、「癌免疫療法の治療抵抗性メカニズムは何であるのか」という「問い」に答えることにより、治療効果の改善につなげることを目指す。生存や増殖を維持するために、癌細胞の糖代謝や脂質代謝、これらに関連するアミノ酸の代謝が環境に対応して再構築されることが近年わかってきた。実際、癌細胞ではトリプトファンやグルタミン、セリン、グリシンといったアミノ酸の消費が癌種によらず共通して高く、アミノ酸の代謝物を利用して細胞間で連絡し、宿主の抗腫瘍免疫を回避する戦略をとっている。必須アミノ酸であるトリプトファンは、細胞内酵素であるインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) により代謝されキヌレニンが産生される。キヌレニンは、癌細胞の生存や増殖、運動性を促進するだけでなく、免疫細胞には抑制的に作用することで癌への攻撃を妨害し、癌細胞の生存戦略を巧妙に支えていることがわかってきた。しかし、癌免疫療法における、トリプトワンの役割、消費亢進でトリプトファンが欠乏した際の細胞間のネットワーク、免疫細胞へのキヌレニンの働きかけなど、十分解明できていない点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌免疫療法におけるトリプトファン代謝の意義を明らかにすることである。具体的には、B 細胞性腫瘍に対する Blinatumomab 療法の効果が抑制されている理由が、癌細胞中の IDO によってトリプトファンが代謝され、産生されたキヌレニンによるものであることを明らかにする。そして、IDO 阻害剤が Blinatumomab 療法の治療効果を高めることを示す。これまで、申請者らは癌治療とアミノ酸代謝の関連性に注目し、特に IDO に関して成果を上げてきた。悪性リンパ腫組織中に IDO が発現していることを明らかにし、その発現や血清中のキヌレニンが患者の予後に悪影響を及ぼしていることを報告した (Ninomiya et al. *Annals of Hematology* 2011, *Leukemia Lymphoma* 2012)。さらに、B 細胞性腫瘍に対する新規癌免疫細胞療法である CAR-T 療法において、腫瘍中の IDO がこの治療法の阻害因子のひとつであることを見出した (Ninomiya et al. *Blood* 2015)。そこで、本研究では B 細胞性腫瘍に対する新規癌免疫療法である BiTE 療法と腫瘍内 IDO の関連性について注目する。

3. 研究の方法

Blinatumomab 療法の治療抵抗性のメカニズムを IDO に注目して検討し、この治療法の効果予測バイオマーカーや IDO 阻害剤併用療法の臨床応用の基盤となる研究を行う。上半期は細胞を用いた実験にて評価を行い、下半期にはマウスを用いた実験を行うことでデータの信頼性を高める。具体的には、期間内には以下のことを明らかにする。

A) トリプトファン欠乏およびキヌレニン過剰状態が、Blinatumomab が結合した CD3 陽性 T 細胞に与える影響の検討

IDO 発現環境下で Blinatumomab 結合 T 細胞が抑制的な影響をうけるかどうかを検討するため、キヌレニンを加えた培地およびトリプトファン濃度を低下させた培地条件にて健常人および B 細胞性腫瘍患者の末梢血単核球を用いて次の項目を調べる。

a) T 細胞増殖因子である IL2 添加条件において Blinatumomab 結合 T 細胞の増殖能を調べる。

b) T 細胞のアポトーシスを FACS を用いて Annexin V アッセイにて確認する。

- c) T細胞の活性化能を培養液中の IL2、INF などのサイトカインを ELISA 法にて測定する。
 d) Blinatumomab 結合 T細胞の腫瘍細胞傷害性を検討するために、CD19陽性リンパ腫細胞株(Raji) と共培養を行い、3日後に Raji および T細胞の細胞数を FACS にて測定し評価する。
 e) 共培養後の T細胞のフェノタイプの変化に関して表面マーカーを用いて調べる。

B) IDO 陽性腫瘍に対する Blinatumomab の抗腫瘍効果の検討

腫瘍の IDO 発現の有無により Blinatumomab の効果に違いがないかどうかを検討する。Raji は IDO を発現しておらず、IDO を遺伝子導入した IDO 強制発現 Raji 株を作成済である。この IDO 発現(-)と IDO 発現(+)Raji 細胞株をターゲットとして Blinatumomab の効果を共培養の実験系を用いて評価する。また、SCID マウスを用いて左右の背部に IDO(-)および IDO(+)Raji 腫瘍を作成し、Blinatumomab と T細胞を静注し、その後の腫瘍サイズを測定することで抗腫瘍効果の違いを示す。また、腫瘍内に浸潤した T細胞の数やフェノタイプを免疫染色にて評価する。

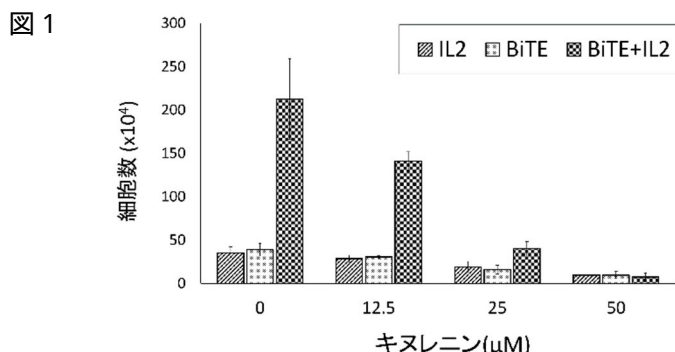
C) IDO 阻害剤併用 Blinatumomab 療法の有効性の検討

最終的には、IDO 陽性腫瘍を作成したマウスに IDO 阻害剤(1-MT)を投与し、Blinatumomab および CD3 陽性 T細胞を静注し、その腫瘍サイズの変化を調べることで、腫瘍内の IDO を阻害することが Blinatumomab の治療効果を高めるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

1)

IDO 発現環境下で Blinatumomab 結合 T細胞が抑制的な影響を受けるかどうかを検討するため、キヌレニンを加えた培地およびトリプトファン濃度を低下させた培地条件にて健常人の末梢血単核球を用いて、T細胞増殖因子である IL2 添加条件において Blinatumomab 結合 T細胞の増殖能を調べた。(図1)



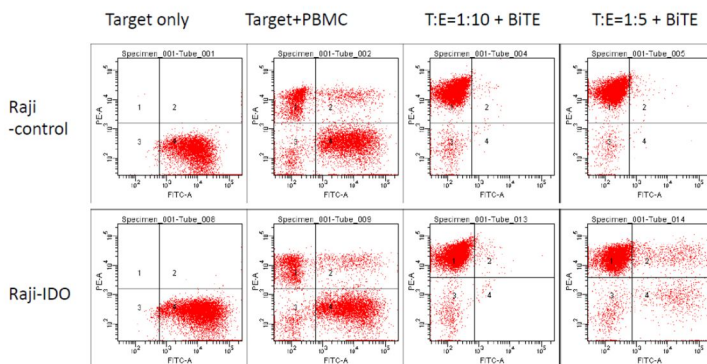
Blinatumomab に結合した T細胞は IL2 存在下で細胞増殖能が活性化された。その増殖は4倍以上であった。しかし、その増殖は、トリプトファンの代謝産物であるキヌレニンに培地を加えることで、キヌレニンの濃度依存性に抑制された。

次に、この増殖抑制の作用を検討するために、T細胞のアポトーシスをフローサイトメトリーを用いて Annexin V アッセイにて確認した。その結果、Blinatumomab に結合した T細胞は IL2 存在下でキヌレニンによりアポトーシスが誘導されていた。また、T細胞の活性化能を培養液中の IL2、INF などのサイトカインを ELISA 法にて測定したところ、キヌレニン添加培地中には IL2、INF とともに有意に減少していた。

2)

Blinatumomab 結合 T細胞の腫瘍細胞傷害性を検討するために、CD19陽性リンパ腫細胞株(Raji) と共培養を行い、3日後に Raji および T細胞の細胞数をフローサイトメトリーにて測定し評価した(図2)。Raji は IDO 発現しておらず、レトロウィルスベクターを用いて IDO を強制発現させた Raji-IDO 細胞を作成した。この Raji-IDO 細胞は、培養液中のトリプトファンをキヌレニンに代謝していることを確認した。

CD19 陽性である Raji と活性化 T細胞および Blinatumomab を共培養すると、72時間後には Raji 細胞は 1 : 10 ではすべて消失していた。腫瘍細胞 : T細胞が 1 : 5 の条件では、IDO 陰性の Raji 細胞はすべて消失したが、IDO 陽性の Raji 細胞は残存していた。つまり、Blinatumomab の抗腫瘍効果は、腫瘍細胞の IDO 発現により減弱すると考えられた。そのメカニズムとして、IDO 陽性細胞による代謝産物キヌレニンが T細胞をアポトーシスに誘導し、その抗腫瘍効果を抑制していると考えられた。



3)

次に造血器腫瘍患者の診断時の血清を用いて、トリプトファンの代謝産物を測定することで、疾患別の IDO 活性の増減を調べた。下記が患者背景で、合計 157 症例を検討した。

Table 1. Concentrations of tryptophan metabolites and relative ratios of the metabolites in 157 patients with hematological malignancies.

| | Total | n = 157 |
|--|-------|----------------------|
| Age | | 67 (15-93) |
| males | | 94 (60%) |
| Tryptophan (μM) | | 45.84 (8.94-391.06) |
| Kynurenine (μM) | | 2.00 (0.44-23.57) |
| Kynurenic acid (nM) | | 32.98 (3.65-1498.91) |
| Anthranilic acid (nM) | | 74.89 (0.37-943.19) |
| 3-Hydroxyanthranilic acid (nM) | | 3.19 (0.33-50.48) |
| Kynurenine/Tryptophan ratio | | 0.047 (0.017-0.473) |
| Kynurenic acid/Kynurenine ratio | | 16.34 (1.59-374.52) |
| 3-Hydroxyanthranilic acid/Kynurenine ratio | | 1.64 (0.10-14.45) |
| Anthranilic acid/Kynurenine ratio | | 35.2 (0.19-687.05) |
| 3-Hydroxyanthranilic acid/Anthranilic acid ratio | | 0.041 (0.001-2.277) |

男女間で比較すると、トリプトファンは女性で有意に低いことがわかった。これは以前にも報告されている結果と一致している。他の、キヌレニン含めトリプトファンの代謝産物は男女間で有意な差は認められなかった。

Table 2. Comparison of tryptophan metabolites by gender and age.

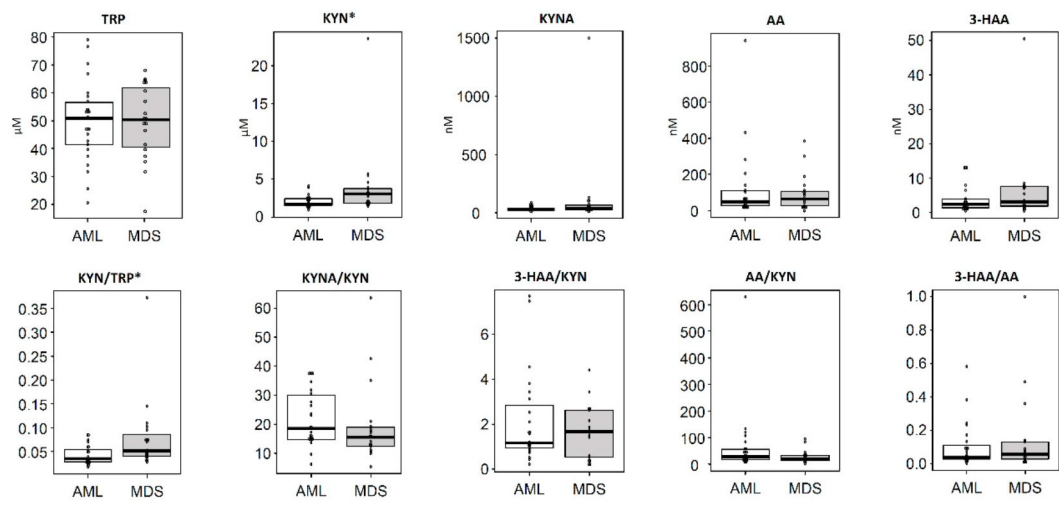
| | Gender | | p | Age | | p |
|------------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|-------|
| | males (n = 94) | females (n = 63) | | <60 (n = 42) | ≥60 (n = 115) | |
| TRP (μM) | 47.46 (15.63-88.62) | 41.43 (8.94-91.06) | <0.001 | 47.49 (20.61-91.06) | 45.83 (8.94-88.62) | 0.679 |
| KYN (μM) | 2.10 (0.71-23.57) | 1.82 (0.44-10.34) | 0.083 | 1.71 (0.44-4.84) | 2.11 (0.60-23.57) | 0.025 |
| KYNA (nM) | 34.37 (3.65-1498.91) | 32.25 (13.36-278.09) | 0.368 | 29.58 (11.05-272.58) | 35.84 (3.65-1498.91) | 0.034 |
| AA (nM) | 78.04 (5.90-943.19) | 70.12 (0.37-583.99) | 0.933 | 64.15 (0.37-391.07) | 76.92 (12.16-943.19) | 0.237 |
| 3-HAA (nM) | 3.29 (0.27-50.48) | 2.78 (0.33-20.95) | 0.226 | 2.58 (0.33-13.43) | 3.49 (0.27-50.48) | 0.003 |
| KYN/TRP | 0.04 (0.02-0.47) | 0.05 (0.02-0.35) | 0.727 | 0.04 (0.02-0.16) | 0.05 (0.02-0.47) | 0.011 |
| KYNA/KYN | 15.77 (1.59-374.52) | 16.61 (6.59-110.33) | 0.404 | 16.12 (5.42-304.55) | 16.48 (1.59-374.52) | 0.736 |
| 3-HAA/KYN | 1.72 (0.19-14.45) | 1.53 (0.10-8.19) | 0.658 | 1.50 (0.10-9.44) | 1.72 (0.10-14.45) | 0.078 |
| AA/KYN | 32.13 (4.14-628.80) | 41.84 (0.19-687.05) | 0.220 | 43.81 (0.19-269.59) | 33.02 (4.60-687.05) | 0.687 |
| 3-HAA/AA | 0.049 (0.001-2.277) | 0.034 (0.002-1.000) | 0.300 | 0.028 (0.002-2.277) | 0.049 (0.001-1.059) | 0.187 |

TRP: tryptophan; KYN: kynurenine; KYNA: kynurenic acid; AA: anthranilic acid; 3-HAA: 3-hydroxyanthranilic acid.

次に、造血器腫瘍間での検討を行った。急性骨髄性白血病 (AML 25 例)、骨髄異形成症候群 (MDS 19 例)、多発性骨髄腫 (MM 24 例)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL 65 例)、濾胞性リンパ腫 (FL 24 例) の 6 疾患の症例を検討した。男女の症例数の差はなかった。各トリプトファン代謝産物を検討すると、多発性骨髄腫でトリプトファンは低く、骨髄異形成症候群でキヌレニンが高く、濾胞性リンパで 3-HAA が高いことがわかった。そこで今回、急性骨髄性白血病と骨髄異形成症候群に注目して、2 疾患での比較検討を行った。

Table 4. Comparison of clinical characteristics of patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients.

| Diagnosis | AML (n = 25) | MDS (n = 19) | p |
|---------------------------------|------------------|------------------|-------|
| Age | 59 (17-83) | 67 (15-89) | 0.144 |
| Males | 16 (64%) | 14 (74%) | 0.53 |
| Total bilirubin (mg/dL) | 0.7 (0.1-1.3) | 0.9 (0.3-2.8) | 0.33 |
| Aspartate transaminase (IU/L) | 23 (11-55) | 23 (6-49) | 0.983 |
| Alanine aminotransferase (IU/L) | 22 (6-49) | 20 (5-66) | 0.684 |
| Lactate dehydrogenase (U/L) | 300 (131-797) | 281 (122-517) | 0.715 |
| Creatinine (mg/dL) | 0.81 (1.57-0.40) | 1.15 (0.44-5.50) | 0.155 |
| Blood urea nitrogen (mg/dL) | 16.5 (6.6-37.2) | 15.9 (5.2-25.4) | 0.769 |



骨髄異形成症候群はやや背景患者年齢が高いが、男女差はなかった。上記が各代謝物別のグラフである。トリプトファン値に差はなかったが、キヌレニン値は有意に骨髄異形成症候群で高値であった。一般的に IDO 活性の指標として用いられるトリプトファン/キヌレニン比も骨髄異形成症候群で有意に高値であった。

今回の研究で、造血器腫瘍間で IDO 活性に違いがあり、特に骨髄異形成症候群で IDO 活性が高いことが分かり、その病態に免疫機構が関与していることが考えられ、IDO 阻害剤の適応疾患となり得る。Blinatumomab は、患者 T 細胞の作用を使い抗腫瘍効果をもたらしており、腫瘍細胞の IDO 発現が、その効果を抑制させることを明らかにした。今後、IDO 阻害剤のとの併用療法の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Ninomiya S, Nakamura N, Nakamura H, Mizutani T, Kaneda Y, Yamaguchi K, Matsumoto T, Kitagawa J, Kanemura N, Shiraki M, Hara T, Shimizu M, Tsurumi H. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Low Levels of Serum Tryptophan Underlie Skeletal Muscle Atrophy. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nutrients | 6. 最初と最後の頁 E978 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12040978 | 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0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|