

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15377

研究課題名(和文)トリプトファン代謝経路に注目した脱髄性疾患の病態解明と新規治療薬開発

研究課題名(英文)The role of tryptophan-metabolizing enzymes in demyelination diseases

研究代表者

國澤 和生(Kunisawa, Kazuo)

藤田医科大学・保健学研究科・助教

研究者番号：60780773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症は、髄鞘が破綻する免疫介在性の炎症を特徴とする自己免疫疾患である。我々は以前に慢性脱髄モデルマウスであるPlp4e<sup>-/-</sup>マウスの解析から、脱髄領域においてトリプトファン代謝酵素Indoleamine 2,3-dioxygenase 2(IDO2)が誘導されることを発見した。本研究では、Plp4e<sup>-/-</sup>マウスにおけるIDO2欠損がどのような影響を与えるか行動学的解析により検討した。我々はPlp4e<sup>-/-</sup>マウスでのIDO2欠損が脱髄症状を惹起することを明らかにした。以上の結果より、IDO2が脱髄進行の制御因子として重要な役割を担う可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症は難治性・進行性の脱髄性疾患であるが、現在の治療は抗炎症薬等による対症療法に限られており、その発症機序解明とそれを基盤とする根本的な治療法確立は急務である。本研究では、PLP4e<sup>-/-</sup>マウスとIDO2欠損マウスを掛合わせたダブルトランスジェニックマウスの行動解析を行うことで、IDO2の病態形成への関与およびそれに基づく新規治療薬開発をより促進的に遂行できる。また、IDO2はT細胞等の末梢免疫細胞の活性化にも関与し、腫瘍増殖に影響を与える。従って、IDO2の機能的役割や免疫細胞の活性化機構が明らかになれば、腫瘍等の他の疾患発症を抑制する機能性因子の発見にも貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by immune-mediated inflammation, which attacks the myelin sheath. We previously found that Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) expression is induced in demyelinating lesions of murine model of transgenic demyelinating disease, Plp4e<sup>-/-</sup>. Here, we investigated the effects of IDO2 deletion in the Plp4e<sup>-/-</sup> mice by using behavioral analysis (locomotor activity, rotarod, and hanging-wire test). IDO2 deletion significantly increased severity of demyelination in the Plp4e<sup>-/-</sup> mice. Thus, these results suggest that IDO2 plays a major role and regulates the demyelination and remyelination process in Plp4e<sup>-/-</sup> mice.

研究分野：病態神経科学、神経免疫

キーワード：IDO2 多発性硬化症 PLP4e<sup>-/-</sup> 脱髄

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は若年成人で発症し、慢性的・進行性に歩行障害・認知機能低下を引き起こし、患者の日常生活や社会生活に重大な影響を及ぼす。しかし、当疾患発症の詳細な機構は未だ解明されておらず、現在の治療はステロイドや対症療法によるものであり、殆どの患者は再発する。従って、多発性硬化症の病態を解明し、それに基づく根本な治療薬の開発は急務である。申請者らは以前に、多発性硬化症モデルマウスを用いて免疫組織化学的解析を行い、脱髄が重篤化する時期に Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) が誘導されることを見出した。IDO2 は、必須アミノ酸であるトリプトファン分解代謝系の律速酵素で、トリプトファンをキヌレニンやキノリン酸など生理活性物質として知られる代謝産物へ変換する。これまでに、IDO2 の誘導によりトリプトワンの代謝産物が増加し、T 細胞等の末梢免疫細胞が過剰に活性化されることが報告されている (Muller et al., Nat Med, 2005)。従って、IDO2 活性の亢進が多発性硬化症で生じる免疫異常に関与し、病態形成に重要な役割を果たしている可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、IDO2 が多発性硬化症の病態に関与するか明らかにするため、慢性脱髄モデルマウスであるプロテオリピド蛋白(PLP)トランスジェニックマウスと IDO2 欠損マウスを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスを作製し、運動機能を評価した。評価項目として自発運動量測定試験、ローターロッド試験、Hanging wire 試験の3つの行動試験を実施することで IDO2 欠損が PLP トランスジェニックマウスの脱髄進行に影響を与えるか詳細に検討した。

### 3. 研究の方法

多発性硬化症モデルマウスとして髄鞘の主要構成蛋白質であるプロテオリピド蛋白(PLP)を過剰発現させた PLP トランスジェニックマウス(PLP<sup>4el/+</sup>マウス)を用いた。このマウスでは、生後4ヶ月頃より自発性の脱髄が生じ始め、6ヶ月目には脱髄/髄鞘再生を繰り返し、歩行障害を呈する。8ヶ月目までには大部分の軸索は脱髄状態となり自力歩行が不可能となる(Kagawa et al., Neuron, 1994)。本研究では、PLP<sup>4el/+</sup>マウスと IDO2 欠損マウスを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスにて4週間毎8ヶ月齢まで各種行動評価(自発運動量測定試験、ローターロッド試験、Hanging wire 試験)を実施した。

自発運動量測定試験は、マウスを1匹ずつアクリル製ボックス装置に入れ、そのボックス内を2時間自由に探索させた。その時間内の自発運動量を赤外線センサーにより定量解析した。

ローターロッド試験は、ローターロッド装置を用いて12rpmの速度で回転するローラー上を走らせる試行を最大180秒として合計5回行い、その平均値を算出した。

Hanging wire 試験は、地上から高さ60cmの位置に設置したワイヤーにマウスの前肢をしがみ付け、ワイヤーから落ちるまでの時間を最大600秒として測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) PLP<sup>4el/+</sup>マウスに対する IDO2 欠損の効果[自発運動量測定試験]

PLP<sup>4el/+</sup>マウスに対する IDO2 欠損の効果を自発運動量測定試験にて評価した。wild-type と比較して PLP<sup>4el/+</sup>マウスでは週齢が進むにつれて自発運動量の低下が認められた。さらに、PLP<sup>4el/+</sup>マウスにおいて IDO2 を欠損させたマウスでは若齢より自発運動量の有意な低下が認められることが明らかとなった。尚、wild-type に対する IDO2 欠損では自発運動量に差は認められなかった。

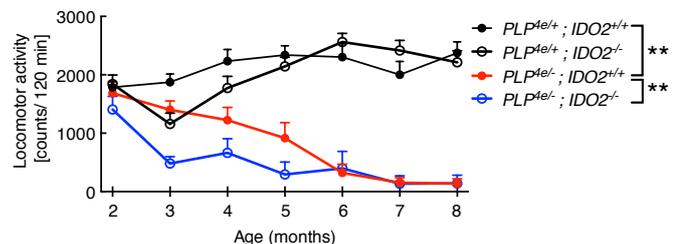


図1: IDO2欠損がPLP<sup>4el/+</sup>マウスの自発運動量測定試験に与える影響

#### (2) PLP<sup>4el/+</sup>マウスに対する IDO2 欠損の効果[ローターロッド試験]

PLP<sup>4el/+</sup>マウスに対する IDO2 欠損の効果をローターロッド試験にて評価した。wild-type と比較して PLP<sup>4el/+</sup>マウスでは若齢(2-3ヶ月齢)では有意な差は認められなかったものの、4ヶ月齢以降では週齢が進むにつれて協調運動の低下が認められた。興味深いことに、PLP<sup>4el/+</sup>マウスにおいて IDO2 を欠損させたマウスでは若齢より協調運動の著しい低下が認められた。このことから、IDO2 欠損は自発運動よりも協調運動などより複雑な運動機能に対して影響を与える可能性が示唆された。尚、wild-type に対する IDO2 欠損では協調運動に差は認められなかった。

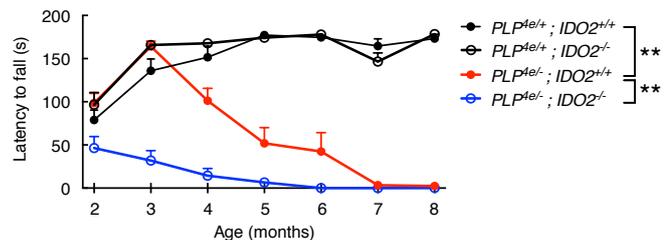


図2: IDO2欠損がPLP<sup>4el/+</sup>マウスのローターロッド試験に与える影響

### (3) PLP<sup>4e/-</sup>マウスに対する IDO2 欠損の効果 [Hanging wire 試験]

PLP<sup>4e/-</sup>マウスに対する IDO2 欠損の効果を Hanging wire 試験にて評価した。wild-type と比較して PLP<sup>4e/-</sup>マウスでは若齢(2-3 ヶ月齢)では有意な差は認められなかったものの、4 ヶ月齢以降では週齢が進むにつれて前肢による運動機能の低下が認められた。また、ローターロッド試験と同様に PLP<sup>4e/-</sup>マウスにおいて IDO2 を欠損させたマウスでは若齢より運動機能の著しい低下が認められた。一方で、wild-type に対する IDO2 欠損では協調運動に差は認められなかった。

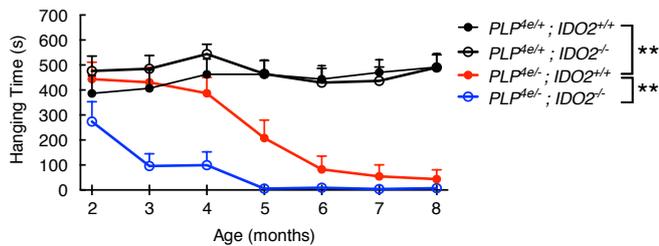


図3: IDO2欠損がPLP<sup>4e/-</sup>マウスの Hanging wire試験に与える影響

以上の結果から、脱髄領域における IDO2 発現が脱髄進行を抑制する制御因子である可能性が明らかとなり、新規治療法開発の手がかりを得た点で大変貴重な発見である。今後も当該マウスの解析を進め、IDO2 が制御する下流分子を同定していくことで多発性硬化症の病態機構の解明ならびに新規標的分子の発見を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Yasuko, Yamasuge Wakana, Imai Shinjiro, Kunisawa Kazuo, Hoshi Masato, Fujigaki Hidetsugu, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Lipopolysaccharide shock reveals the immune function of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 through the regulation of IL-6/stat3 signalling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34166-4	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 Kunisawa Kazuo, Shimizu Takeshi, Kushima Itaru, Aleksic Branko, Mori Daisuke, Osanai Yasuyuki, Kobayashi Kenta, Taylor Anna M., Bhat Manzoor A., Hayashi Akiko, Baba Hiroko, Ozaki Norio, Ikenaka Kazuhiro	4. 巻 147
2. 論文標題 Dysregulation of schizophrenia-related aquaporin 3 through disruption of paranode influences neuronal viability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 395 ~ 408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14553	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 該当する
1. 著者名 Yoshida Yukihiro, Fujigaki Hidetsugu, Kato Koichi, Yamazaki Kyoka, Fujigaki Suwako, Kunisawa Kazuo, Yamamoto Yasuko, Mouri Akihiro, Oda Akifumi, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Selective and competitive inhibition of kynurenine aminotransferase 2 by glycyrrhizic acid and its analogues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46666-y	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 Yamasuge Wakana, Yamamoto Yasuko, Fujigaki Hidetsugu, Hoshi Masato, Nakamoto Kentaro, Kunisawa Kazuo, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 110
2. 論文標題 Indoleamine 2,3 dioxygenase 2 depletion suppresses tumor growth in a mouse model of Lewis lung carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3061 ~ 3067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14179	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 Lu Qiaohui, Mouri Akihiro, Yang Yang, Kunisawa Kazuo, Teshigawara Tomoaki, Hirakawa Mami, Mori Yuku, Yamamoto Yasuko, Libo Zou, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 372
2. 論文標題 Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 112053 ~ 112053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2019.112053	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Akihiro Mouri, Aika Kosuge, Tsubasa Iida, Bolati Wulaer, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima
2. 発表標題 ID01 regulates vulnerability to social defeat stress
3. 学会等名 AsCNP-ASEAN 2019 Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Takeshi Shimizu, Itaru Kushima, Yasuyuki Osanai, Kenta Kobayashi, Anna M. Taylor, Manzoor A. Bhat, Akiko Hayashi, Hiroko Baba, Norio Ozaki and Kazuhiro Ikenaka.
2. 発表標題 Dysregulation of schizophrenia-related aquaporin 3 through disruption of paranode influences neuronal viability
3. 学会等名 第23回グリア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國澤 和生、毛利 彰宏、山本 康子、齋藤 邦明、鍋島 俊隆
2. 発表標題 うつ病発症におけるトリプトファン代謝の関与
3. 学会等名 第34回日本ストレス学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Akihiro Mouri, Aika Kosuge, Tsubasa Iida, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima.
2. 発表標題 Repeated social defeat induces social interaction deficits associated with the alteration of kynurenine pathway activity in the prefrontal cortex
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Akihiro Mouri, Aika Kosuge, Tsubasa Iida, Bolati Wulaer, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima
2. 発表標題 IDO1 regulates vulnerability to social defeat stress
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会第62回日本神経化学大会合同年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Akihiro Mouri, Aika Kosuge, Tsubasa Iida, Bolati Wulaer, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima
2. 発表標題 The role of tryptophan metabolism in major depressive disorder
3. 学会等名 6th Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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