

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07697

研究課題名(和文) AhRおよびそのリガンドによるがんの免疫逃避機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on immune evasion mechanism of tumor by AhR and its ligands

研究代表者

椎崎 一宏 (Shiizaki, Kazuhiro)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：20391112

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)：AhRは外来化学物質センサーだけでなくがんの免疫逃避に関わる可能性がある。AhR遺伝子欠損マウス(AhR-KO)で起こる盲腸での発がんが免疫寛容の破綻によるものと考え、免疫不全を示すRAG2欠損マウスと炎症性サイトカインIL-6欠損マウスとの二重欠損マウスを作出したところ、RAG2/AhR二重欠損マウスでは盲腸発がんは生じず、IL-6/AhR二重欠損マウスでは盲腸発がんが見られた。免疫寛容に関与するキヌレニンはAhRで転写制御されるIDOが律速酵素となり産生される。B16F10メラノーマ細胞のAhR欠損細胞株を作成し、マウスで担癌実験を行ったところ、肺転移病巣数の有意な減少が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法は最新の画期的がん治療法である一方で高額なうえ、効果は患者によって異なる。この原因はがんの免疫逃避能の獲得が一因と考えられる。このがん免疫逃避機構にはIDOおよびAhRが関与していると考えられ、本研究で着目したAhRの免疫寛容およびがん免疫逃避機構の解明が進めば、新たな免疫療法補助剤の開発が期待できる。AhRはリガンド依存的転写因子であることから、比較的低分子の化学物質によって制御が可能であるため、作動薬の開発が可能である。さらに本研究で使用したAhR-KOマウスへの遺伝子改変メラノーマ細胞の担癌実験は、AhR作動薬を開発するうえでの重要なin vivo実験系になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：AhR is considered to be involved not only in xenobiotic sensors but also in immune evasion of cancer. The cecum tumorigenesis shown in AhR deficient (AhR-KO) mice is thought to be due to a breakdown in immune tolerance. Therefore, we generated double-deficient mice of RAG2, which indicate immunodeficient mice, and inflammatory cytokine IL-6. The RAG2/AhR double-deficient mice did not develop cecum tumor, while IL-6/AhR double-deficient mice did. Kynurenine, which is involved in immune tolerance, is produced by the rate-limiting enzyme IDO, which is transcriptionally regulated by AhR. We generated an AhR-deficient cell line derived from B16F10 melanoma cells and tested it in mice. In tumor-bearing experiments, AhR knockout B16F10 cells significantly reduced the number of metastatic lesions.

研究分野：がん免疫学

キーワード：AhR IDO IL-6 免疫寛容 キヌレニン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ダイオキシン受容体として知られるアリール炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AhR)は、ベンゾ[a]ピレンやメチルコランスレンなどの変異原物質をリガンドとする核内受容体として同定された。AhR はこれらの化学物質を代謝する薬物代謝酵素を標的遺伝子として発現誘導することから「生体異物センサー」として働いていると考えられてきた。一方で、AhR 欠損マウス(AhR-KO)において盲腸に腫瘍が発生することが明らかとなり、また AhR-KO 雌マウスでは胎仔死亡による産仔数の減少が認められることが分かった。さらに AhR-KO マウスでは感染症への脆弱性が観察され、LPS 投与による誘発性の炎症では致死率が上昇し、炎症反応の亢進がおこることが報告された。これらの現象は AhR が何らかの生体内物質をリガンドとして活性化することで、雌性生殖器官の調節制御や盲腸での発がんの抑制、および感染症に起因する炎症の抑制に重要な役割を果たしていることを示している。AhR はリガンド依存性転写因子であるため、何らかの AhR の内因性リガンドが機能していると考えられるが、そのうちの一つ、トリプトファン代謝経路の中間代謝物であるキヌレニン(Kyn)が AhR のリガンドであることが最近になって示された。Kyn はトリプトファンからインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO) およびトリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ(TDO) によって作られるが、このうち IDO(IDO-1/ IDO-2)は AhR の標的遺伝子であり、AhR の活性化に伴い誘導されることから、Kyn-AhR - IDO によるポジティブフィードバックループが存在すると仮定される。Kyn は T 細胞の分化において、Treg をはじめとする免疫寛容をつかさどる T 細胞への分化を促進し、TH17 などの炎症に寄与する T 細胞を抑制する。すなわち、Kyn による炎症の抑制と免疫寛容の促進という免疫系の調節には、AhR がキー転写因子として重要な役割を果たしていることが予測される。さらにがん組織においては IDO と同様の代謝活性を持つ TDO の発現亢進により、Kyn を大量に産生することで、免疫監視機構を回避していることが示されている。

(2) 我々はこれまで、AhR-KO マウスにおける盲腸発がんの解析を行う過程で、いくつかの示唆的な知見を得た。炎症性サイトカイン IL-1 の成熟に必要な ASC 遺伝子と AhR 遺伝子とのダブルノックアウト動物では、腫瘍形成の遅延が見られた<sup>(1)</sup>。さらに AhR による転写制御が報告されている IL-6 が IL-1 シグナルの下流にあることから、この炎症反応において関与している可能性がある。また、盲腸内容物や盲腸内細菌叢代謝物からは AhR リガンド様物質が検出された<sup>(2)</sup>。また、AhR-KO マウスに抗菌剤を飲水投与して飼育した場合には盲腸発がんが見られない。これらのことから、盲腸では AhR を介して腸内細菌に対する免疫寛容が成立しており、AhR-KO マウスでは、IDO の発現低下による免疫寛容の破綻で引き起こされる慢性的な炎症が発がん原因の一つである、という仮説を立てるに至った。さらに我々の研究では、AhR-KO 雌マウスでは第 2 回目の妊娠以降、産仔数の低下が認められるが、この際に胎仔死亡が増加していることが明らかとなった。この胎仔死亡は母マウスの AhR 遺伝子型に依存し、胎仔の AhR 遺伝子型には関係がない。すなわち、AhR-KO マウスに見られる産仔数の低下は排卵数の減少に加えて、母体側に起因する胎仔死亡も一因であることが分かった。興味深い事に、妊娠マウスへの IDO 阻害薬、D-1-methyl-tryptophan 投与によって仔死亡と流産が増加することが報告されている<sup>(3)</sup>。以上のことを総合的に考察すると、AhR の欠損によって引き起こされる盲腸発がんや流産という現象には、AhR の標的遺伝子である IDO と免疫寛容が深く関係していることが推測できる。また、AhR とキヌレニン経路の関係について、現在の知見では、Kyn が AhR リガンドとなって IDO を誘導することでさらに Kyn 産生を増強する、というポジティブフィードバックループのみ仮定される。AhR による免疫寛容制御の全貌解明に近づくためには、ネガティブフィードバック機構の解明、すなわち AhR や他の転写因子を介した Kyn 除去に関わる機構の解明も必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

自己免疫疾患は免疫寛容の破綻によって引き起こされ、様々な難治性疾患の原因となっている。また、がんの免疫療法には、がん細胞による免疫監視機構の回避をいかに制御するかが鍵になると考えられている。Kyn-AhR - IDO のフィードバックループを制御し、免疫寛容を調節することにより、それら難治性疾患の治療および予防方法の開発につながることを期待できる

そこで、本研究では AhR の生理的な役割の一つが Kyn-AhR - IDO フィードバックループによる免疫寛容の制御であり、AhR-KO マウスの胎仔死亡と盲腸発がん発症のメカニズムが、免疫寛容の破綻によることを証明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 抗原認識のための抗体産生および免疫寛容の成立には B 細胞の成熟や Treg 細胞の分化が不可欠である。そこで、成熟 T 細胞や成熟 B 細胞が存在しない RAG2 ノックアウトマウス(RAG2-KO)を AhR ノックアウトマウス(AhR-KO)と交配してダブルノックアウトマウス(AhR:RAG1-DKO)を交配により作出した。また、AhR による転写制御が知られている炎症性サイトカイン IL-6 を欠損したマウス(IL-6-KO)との交配によりダブルノックアウトマウス(AhR:IL-6-DKO)についても作出した。AhR-KO マウスでは 30 週齢程度で盲腸腫瘍が生じることから、各遺伝子型動物での腫瘍の発生を検討した。

(2) Kyn-AhR - IDO フィードバックループが発がん免疫逃避にどのように関わっているかを明確化するため、悪性黒色腫 B16F10 細胞から AhR 欠損細胞株や IDO 欠損株を作成した。それぞれの遺伝子の強制発現株を皮下注射または尾部静脈から移植する担癌実験を行い、二週間後に腫瘍の定着、増大

および肺での転移巣形成について検討した。

(3) AhR-KO 雌マウスにおける胎仔死亡に Kyn による母体-胎仔免疫寛容が関与しているかを検討するため、胎仔および胎盤での IDO-1 mRNA の発現について定量的解析を行った。

(4) Kyn の AhR リガンドとしての報告には、Kyn が直接的リガンドであるという報告<sup>(4)</sup>と、とキヌレニン酸(KA)がより強力なリガンドであるという報告<sup>(5)</sup>があり、議論が分かれていることから、哺乳類細胞でのトリプトファン代謝経路を持たない酵母レポーターアッセイ系を用いた Kyn 経路代謝物の AhR リガンド様活性について調べた。酵母レポーターアッセイでは細胞壁や薬物排出ポンプによって Kyn 経路代謝物の細胞透過性や細胞内蓄積が結果に影響する可能性があることから、遺伝子改変を施した好感度化アッセイ酵母を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 研究期間内に作成した 12 匹の AhR:RAG2-DKO マウス全てにおいて、盲腸腫瘍の発生は認められなかった。一方、AhR:IL-6-DKO では盲腸腫瘍の形成に変化はなかったことから、AhR-KO マウスにおける盲腸腫瘍の発生には炎症反応が不可欠であるものの、炎症は自然免疫による炎症反応よりも獲得免疫に起因する割合が高いことが示された。また、抗生物質投与によって盲腸腫瘍の発生頻度が減少することから、獲得免疫の抗原となる対象については腸内細菌である可能性が示唆され、盲腸での腸内細菌に対する免疫寛容の異常による慢性炎症が発がんに関与していると考えられた。このことは腸内での AhR の働きは腸内細菌に対する免疫応答の制御であり、腸内細菌が産生する AhR リガンドや食餌性の AhR リガンド、Kyn による AhR の活性化が重要であることが示唆された。

(2) B16F10 細胞の AhR 欠損細胞株のうち、細胞増殖能に関して親株との差が見られない細胞株を選抜し野生型マウス皮下に注射したところ、固形腫瘍重量の減少傾向が認められた(図1)。また、微静脈注射による肺への転移について調べたところ、転移巣数の有意な減少が認められた。このことから AhR はがん組織の成長および転移に関するがん免疫逃避に寄与していることが示唆された一方、AhR が細胞運動能あるいは細胞の接触阻害に関与しているとの報告があることから、作成した各遺伝子型細胞株の遊走能の調査が必要であると考えられた。

(3) 妊娠中の母体および胎盤での IDO-1 mRNA 発現について、交配後経時的に胎仔および胎盤を摘出して解析した結果、IDO-1 の発現は GD14 で最大になることが分かった。また、AhR-KO マウスが母体である場合には GD12 での IDO-1 の発現に減少傾向が見られたものの有意な差は認められなかった。このことから、胎仔死亡に関わるとみられる Kyn の産生は母体側の免疫細胞における IDO-1 発現が重要であると考えられる。この仮説の証明のためには母体の免疫系細胞での IDO-1 の発現について脾臓細胞等を用いて検討する必要がある。

(4) Kyn 経路代謝物の AhR リガンド様作用を酵母レポーターアッセイ系にて検討したところ、Kyn と KA およびアントラニル酸に活性が認められた。一方、Kyn が非酵素的に二量体化した TEACOP が活性本体であるという報告<sup>(6)</sup>から、Kyn 経路代謝物を 37 °C でインキュベートした後に短時間の曝露にてレポーターアッセイを行ったところ、Kyn のみ EC50 値で 10 倍程度のリガンド活性の上昇が認められた。これらのことから、非酵素的に生じる TEACOP が活性本体である可能性が示唆されたが、生体内でこの二量体化反応が起こりうるかについては引き続き検討を要する。

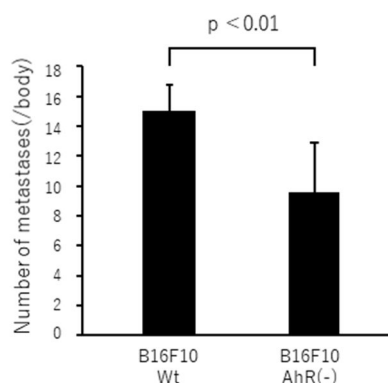


図1 B16F10細胞移植2週間後の肺転移巣数

- (1) Ikuta T, et al. Carcinogenesis. 2013;34(7):1620-1627
- (2) Shiizaki K, et al. Drug Metab Dispos. 2014;42(10):1690-1697
- (3) Munn DH, et al. Science 1998;281(5380):1191-1193
- (4) Bessede A, et al. Nature 2014;511(7508):184-190
- (5) DiNatale BC, et al. Toxicol Sci. 2010;115(1):89-97
- (6) Seok SH, et al. J Biol Chem. 2018;293(6):1994-2005

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito-Harashima Sayoko, Matano Mami, Onishi Kana, Nomura Tomofumi, Nakajima Saki, Ebata Shingo, Shiizaki Kazuhiro, Kawanishi Masanobu, Yagi Takashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Construction of reporter gene assays using CWP and PDR mutant yeasts for enhanced detection of various sex steroids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00159-x	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 TOTSUKA Yukari, MAESAKO Yuya, ONO Hanako, NAGAI Momoko, KATO Mamoru, GI Min, WANIBUCHI Hideki, FUKUSHIMA Shoji, SHIIZAKI Kazuhiro, NAKAGAMA Hitoshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 180 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.96.015	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 Shiizaki Kazuhiro, Kido Kenta, Mizuta Yasuhiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Insight into the relationship between aryl-hydrocarbon receptor and -catenin in human colon cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0224613	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 Shiizaki Kazuhiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Postlabeling/PAGE Method for Detection of DNA Adducts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology	6. 最初と最後の頁 213 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0323-9_18	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝田幸平、椎崎一宏
2. 発表標題 「転写共役DNA修復（TCR）を考慮した変異原性試験の構築」
3. 学会等名 日本環境変異原学会第48回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原島 小夜子、椎崎 一宏、川西 優喜、八木 孝司
2. 発表標題 「ヒト生体異物受容体 CAR のリガンドを検出する酵母レポーターアッセイ系の確立」
3. 学会等名 日本環境変異原学会第48回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池 芽生、軽部 梨香子、小松 升和、金丸 咲葵、原島 小夜子、川西 優喜、八木 孝司、椎崎 一宏
2. 発表標題 汎用除草剤プロマシルの AhR リガンド様作用
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会
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
研究分担者	生田 統悟  (Ikuta Togo)  (00262072)	地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・研究員   (82402)	

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
---------	---------