

機関番号：13501
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591709
 研究課題名 (和文) インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼの悪性グリオーマ免疫回避機構への影響
 研究課題名 (英文) Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on immune escape mechanism in malignant glioma
 研究代表者
 佐藤 英治 (SATOU EIJI)
 山梨大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：10235319

研究成果の概要 (和文)：インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ (IDO) はトリプトファンの代謝酵素である。免疫抑制作用を持ち、腫瘍の免疫回避機構に関与している。本研究では、グリオーマ組織中の IDO の発現とその予後との関連性について検討した。グレード II の星細胞腫に比べ、悪性度の高いグレード IV の膠芽腫では、IDO が高発現している例が多かった。予後との関連では、膠芽腫において、IDO 低発現のものは、高発現のものに比べ、生存期間が延長していた。IDO の発現は悪性度の高いグリオーマに高発現しており、生命予後の悪化因子となっていた。

研究成果の概要 (英文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a tryptophan catabolic enzyme participating in immune tolerance and tumor immune escape process. Recently, IDO expression has been found to correlate with prognosis of malignant tumor, but the involvement of IDO in glioma progression remains unknown. The present study investigated the relationship between IDO expression and histological malignancy in glioma. IDO expression rate was compared in each histological grade, and survival analysis in correlation with IDO expression was performed. IDO was expressed in 71 of 74 gliomas with varying intensities. IDO was strongly expressed in malignant gliomas, and weakly in low grade gliomas. Survival analysis by the Kaplan-Meier methods revealed that patients with higher IDO expression tended to have poorer clinical outcome compared with lower IDO expression. The present study suggests that IDO expression in glioma cells promotes tumor malignancy and may affect clinical outcome.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 100,000 | 30,000 | 130,000 |
| 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：外科系臨床医学・脳神経医科学

キーワード：インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ、グリオーマ、免疫回避機構

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、手術療法、放射線療法と化学療法による集学的治療が施行されているが、その予後は不良である。新たな治療として、腫瘍ワクチン療法が施行されつつあるが十分な成果は得られていない。この原因として、悪性グリオーマが免疫回避機構を持つことがあげられる。この免疫回避機構として、グリオーマからの免疫抑制物質の分泌、グリオーマ細胞の抗原提示能の低下、そして Treg などの免疫抑制作用を持つ免疫細胞の関与が知られている。最近になり、トリプトファン代謝酵素であるインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) の免疫回避機構への関与が知られてきている。IDO によりトリプトファンから代謝されるキヌレニンには、強力な免疫抑制作用があり、IDO 陽性の樹状細胞は Treg の分化に関与している。また、IDO の発現は予後悪化因子であることが、ovarian carcinoma, colon carcinoma などでも明らかとなった。IDO 阻害薬である 1-methyl-tryptophan(1-MT)は腫瘍細胞の IDO の発現を抑制し、化学療法との併用にてその抗腫瘍効果の増強が確認されており、IDO の発現を抑制することは悪性腫瘍の治療に有効であることが明らかにされつつある。

2. 研究の目的

グリオーマ細胞における IDO の発現の報告はあるが、その免疫抑制作用、悪性度や予後との関連は明らかにされていない。IDO が悪性グリオーマ免疫回避機構に関連しているかを解明することは、悪性グリオーマの免疫療法の発展に重要な課題と考えられる。本研究では、悪性グリオーマにおける IDO の免疫抑制作用を明らかにすることを目的とし、グリオーマにおける IDO の発現、予後との関連について検討した。

3. 研究の方法

(1) 対象：1986 年から 2008 年までに当科にて治療されたグリオーマ患者 68 例の 74 手術摘出標本を対象とした。対象症例は diffuse astrocytoma(WHO grade II)15 例、anaplastic astrocytoma(grade III)20 例、glioblastoma(grade IV)39 例であった。39 例中 6 例の glioblastoma は grade2 もしくは 3 から再発した 2 次性の glioblastoma であった。同一のプロトコールにより治療された 20 例中 18 例の anaplastic astrocytoma と 39 例中 23 例の glioblastoma 患者について IDO 発現と予後の関連を検討した。化学療法は ACNU, carboplatin, vincristine と etoposide によ

る化学療法が 2 か月毎に施行され、放射線治療は局所にて anaplastic astrocytoma 60Gy, glioblastoma 66Gy の総線量にて施行した。

(2) 免疫組織染色は：パラフィン包埋された手術標本の切片を作成し、1 次抗体をマウス抗 IDO モノクローナル抗体、2 次抗体をストレプトアビジン付き抗マウス抗体を用い染色を行った。

(3) IDO 発現の評価：IDO 発現の点数化を以下の基準にて行った。

発現頻度：0(1%未満), 1(1-24%), 2(25-49%), 3(50%以上)

染色度：0(ナシか弱), 1(強)

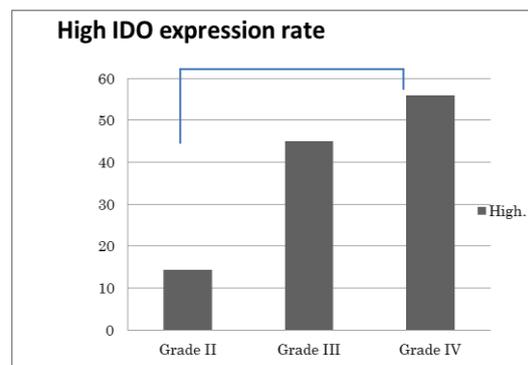
発現頻度と染色度の合計点により高発現；4 点、中発現；3 点、低発現；2 点以下の 3 群に分け、IDO 高発現群の頻度を WHO grade II, III, IV にて比較検討した。また、2 次性の glioblastoma については、初回組織と再発時組織の IDO 発現を比較した。

(4) 統計学的解析：IDO 発現と腫瘍無増大期間、生存期間との関連の単変量解析は Kaplan-Meier 法にて評価した。KPS, 手術摘出度、年齢、性差、IDO 発現と予後との多変量解析は Cox 比例ハザードモデルにて行った。

4. 研究成果

(1) グリオーマ組織における IDO の発現：diffuse astrocytoma14 例では、低発現 12 例、中発現 2 例であった。Anaplastic astrocytoma21 例では、低発現 12 例、中発現 7 例、高発現 2 例であった。Glioblastoma34 例では、低発現 15 例、中発現 12 例、高発現 7 例であった。中発現と高発現を合わせた割合は、diffuse astrocytoma14%、anaplastic astrocytoma43%、glioblastoma56%であり、glioblastoma では diffuse astrocytoma に比べ優位に高かった (P<0.05)。(Figure 1)

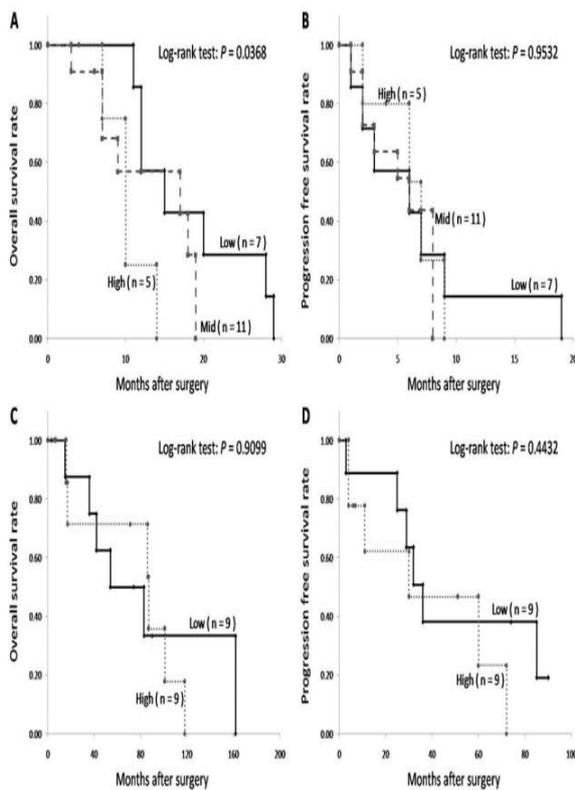
Figure 1



(2) 2次性 glioblastoma における IDO 発現: 2次性 glioblastoma 6例の初回手術時の IDO 発現は、4例が低発現、2例が高発現であったが、2回目の手術時の IDO 発現は全例、高発現であった。

(3) IDO 発現と予後との関連: 同一のプロトコルによる化学療法と放射線療法行われた anaplastic astrocytoma 18例と glioblastoma 23例の IDO 発現と腫瘍無増大期間、生存期間との関連を検討した。単変量解析では、glioblastoma において IDO の低発現は高発現に比べ、優位に生存期間が延長していた ($P=0.0368$) (Figure 2)。腫瘍無増大期間でも同様の傾向があったが有意の差はなかった。Anaplastic astrocytoma では、IDO 低発現は、高発現に比べ腫瘍無増大期間、生存期間ともに延長する傾向があったが、有意の差はなかった。

Figure 2



Kaplan-Meier curves of overall survival (A, C) and progression-free survival (B, D) in patients with grade IV (A, B) or grade III (C, D) glioma, as determined by log-rank test.

多変量解析では、生存期間では、術前 KPS と手術摘出度、腫瘍無増大期間では、手術摘出度が危険因子であったが、IDO 発現は関連がなかった (Table 1)。

Table 1. Multivariate analysis of overall survival and PFS in glioblastoma

| Variables | Overall survival | | Progression free survival | |
|----------------|------------------|-------|---------------------------|-------|
| | HR (95% CI) | P | HR (95% CI) | P |
| Age | | | | |
| >60 | 1.004 | | 0.545 | |
| ≥60 | (0.328-3.073) | 0.994 | (0.174-1.707) | 0.298 |
| Sex | | | | |
| Male | 0.450 | | 0.809 | |
| Female | (0.118-1.720) | 0.243 | (0.246-2.663) | 0.727 |
| KPS | | | | |
| >60 | 5.079 | | 2.073 | |
| ≥70 | (1.273-20.262) | 0.021 | (0.676-6.359) | 0.202 |
| Resection | | | | |
| P*, S** | 13.398 | | 0.086 | |
| T*** | (2.029-88.464) | 0.007 | (1.350-48.423) | 0.022 |
| IDO expression | | | | |
| 1+/2+ | 1.052 | | 0.826 | |
| 3+/4+ | (0.252-4.382) | 0.945 | (0.199-3.428) | 0.792 |

* Partial, ** Subtotal, *** Total resection

(4) 結果のまとめ

グリオーマの悪性度と IDO 発現との関連では、悪性度の高い glioblastoma は、悪性度の低い diffuse astrocytoma に比べ高発現の頻度が高く、IDO の発現は悪性度とともに増加していた。これは、悪性グリオーマにおいては IDO の高発現による免疫抑制状態が強く、治療抵抗性の一因となっている可能性が示唆されている。また、2次性の glioblastoma では、初回手術時に比べ IDO 発現の増加がみられ、IDO 発現は悪性化による遺伝子変化が関連している可能性もある。予後との関連では、単変量解析にて IDO 発現は glioblastoma 生存期間の悪化因子となっていた。以上の結果からは、IDO 発現は悪性グリオーマの治療抵抗性の一因となっており、予後の悪化因子となっており IDO をターゲットとした治療はグリオーマにおいてもその予後を改善させる可能性がある。今後の研究として、すでに作成済みである IDO ノックダウングリオーマ細胞を用いた免疫抑制作用の変化の確認や IDO 抑制剤である 1-MT の抗腫瘍効果をマウスモデルを用いて明らかに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)

該当なし

[その他]
ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 英治 (SATOU EIJI)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10235319

(2) 研究分担者

川瀧 智之 (KAWATAKI TOMOYUKI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20303406

(3) 連携研究者

なし