

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K09322
研究課題名（和文）新規トリプトファン代謝酵素阻害剤とインターフェロンによるグリオーマ複合免疫療法

研究課題名（英文）Novel combination immunotherapy for glioma with new Tryptophan metabolizing enzyme inhibitor and Interferon

研究代表者
川瀧 智之（Kawataki, Tomoyuki）
山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：20303406
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）：トリプトファン代謝酵素Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の局所発現が免疫寛容に関与しており、免疫療法への応用が期待されている。今回、3種類のIDO阻害薬を創製し、IDOを誘導するIFN-gammaの局所的な抑制がIDO阻害剤と賦活的に働くという仮説をマウスグリオーマモデルで検証した。新規IDO阻害剤は、グリオーマ腫瘍抑制効果を有した。また、IFN-gammaは、IDO発現を惹起しキヌレニンの蓄積に作用し、IFN-gammaの局所的な抑制がIDO阻害に相乗的に関与し抗腫瘍効果を惹起している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプトファン代謝酵素Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は、各種の癌細胞に認められ、免疫寛容に関与していることが推定されている。これまでに癌に対するIDO阻害剤の開発が行われているが、有用な創薬は見つかっていない。一方、IFN-gammaは、一般的には免疫賦活に働くが、近年、IDOならびにPDL1の賦活に働き免疫抑制的な機能の重要性が注目されている。我々は、IDO阻害薬を有効に働かせるためには、IFN-gammaの抑制が重要であるという仮説にも基づきこれを、マウスグリオーマモデルで示したことは意義深く、今後の癌治療への応用が期待できる成果である。

研究成果の概要（英文）：Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), catalyzes tryptophan (Trp) into kynurenine (Kyn) and is involved in immunotolerance during cancer progression. Previously, we have demonstrated strong expression of IDO1 and its correlation with prognosis in the pathological tissues of glioblastoma patients. Although many clinical trials are currently ongoing, investigating the efficacy of treatment with IDO1 inhibitors on cancer progression, the use of an IDO inhibitor alone has not been shown to be sufficient to decrease tumor progression thus far. We have produced three new IDO1 inhibitors and hypothesized that local IFN- inhibition induces IDO1 suppression, resulting in a synergistic anti-tumor effect in combination with IDO1 inhibitors. Oral administration of novel IDO1 inhibitors suppressed glioma tumor growth. Local administration of anti-IFN- antibodies had a synergistic effect on IDO1 inhibition.

研究分野：Brain tumor

キーワード：IDO malignant glioma immunosuppression IFN- a mouse model glioblastoma

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、中枢神経系で最も頻度が高い原発性脳腫瘍である。外科的切除、放射線療法、化学療法を含む集学的治療にもかかわらず、生存期間中央値は数年程度で予後不良である。PD-1 抗体を使用した治験でも有効性は示されず、免疫療法の限界も明らかである。このため、悪性グリオーマが有する免疫寛容の理解が課題である。申請者らは、強力な免疫回避機構を有するトリプトファン代謝酵素 Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO) に着目して研究してきた。IDO は、腫瘍微小環境内のトリプトファンを枯渇させ、その代謝産物であるキヌレニンなどの蓄積により免疫寛容を促進し、エフェクター T 細胞と Treg 機能の強化を誘導する機序が推定されている。

申請者らはグリオーマ手術標本における IDO の発現と悪性度を検討し、IDO 発現と組織学的悪性度及び予後との相関について報告した¹⁾。次に IDO 発現をノックダウンしたグリオーマ細胞株の移植マウスを用い生存期間の有意な延長効果を明らかにした²⁾。同時期に、一般的な IDO 阻害剤である 1-methyl-tryptophan (1-MT) を用いた再発腫瘍に対する第 II 相試験が米国で行われたが、有意な抑制効果が得られなかった。この原因としては、1-MT の IDO 阻害活性が低いことに加えサイトカイン環境による IDO 阻害効果が不十分であった可能性が考えられた。IDO 阻害剤の有効性を高めるためには、IDO 酵素活性及び薬物動態に基づいた IDO 阻害剤の選択と IDO 発現調節分子を複合的に最適化し、グリオーマの頑強な免疫抑制機構を打ち破る必要がある。

IDO 阻害剤は、これまで様々な種類の癌に対し臨床試験が行われているが、IDO 阻害剤単独投与により有意な癌抑制効果が得られた報告はない。一方、Interferon- γ (IFN- γ) は、免疫賦活物質として発見されたが、IDO およびプログラム細胞死リガンド 1 (PD-L1) などのチェックポイント阻害剤の主要な誘導物質であり、腫瘍免疫の key 分子である。単純に IDO 阻害を行っても、IFN- γ による IDO の局所発現が誘導される可能性が推察される。IDO 阻害を最適化するには、腫瘍局所における IFN- γ の役割の解明が必要である。

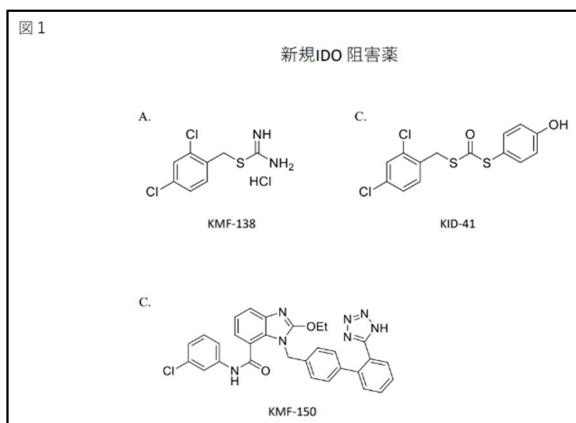
2. 研究の目的

酵素活性に基づき 3 種類の IDO 阻害薬を創薬しその有効性を、免疫学的に正常なマウスグリオーマモデルで検討する。さらに、IDO を強力に誘導する IFN- γ を標的に中和抗体を用いて局所的に抑制し IDO 阻害剤と同時に投与することで腫瘍免疫に相乗的に働くという仮説を検証する。

3. 研究の方法

方法：GL261 細胞 1×10^6 を $100 \mu\text{l}$ 生食の浮遊液として C57BL6 右大腿皮下に移植した。コントロール群 (CTL) は、生食 $100 \mu\text{l}$ のみを皮下注射した。

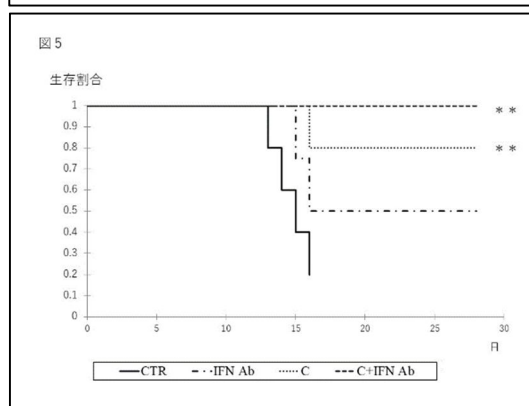
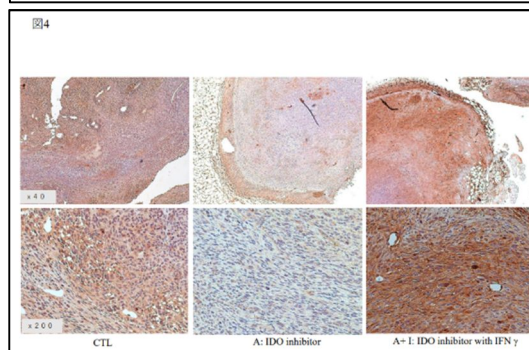
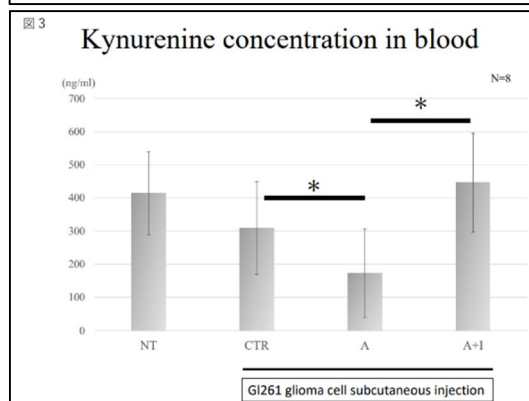
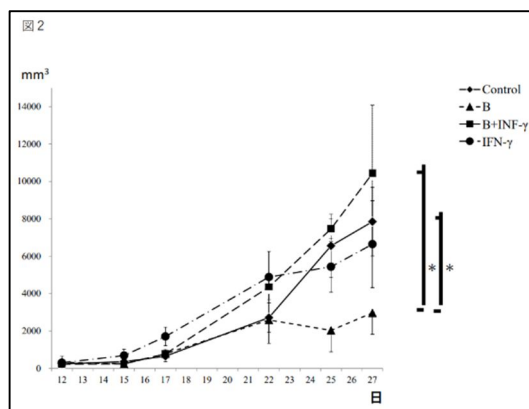
- (1) IDO 阻害薬：今回創薬した IDO 阻害薬 A, B, C (KMD-138, KID-41, KMF-150) を用いた。(図 1) 各創薬は、0.5% Tween 80 と 0.5% methylcellulose を等量希釈した溶液で混合し、 $100 \mu\text{l}$ 溶液あたり、それぞれ $800 \mu\text{g}$, 5 mg , 4 mg に調整し、胃管より細胞移植翌日より連日投与し経時的な腫瘍体積を測定した。コントロール (CTR) 群は、溶液のみを投与した。各群の $n = 5-10$ について平均腫瘍体積を経時的に比較し、Mann-Whitney U テストにて平均値の有意差を検討し $p < 0.05$ を有意とした。



- (2) IFN- γ の影響：Recombinant mouse IFN- γ (#4850MI) と mouse IFN- γ 抗体 (#12827) は、R&D systems (USA and Canada) と Abcam (USA) よりそれぞれ購入した。INF- γ は、PBS で 1000 倍に希釈し、 $100 \mu\text{l}$ を移植部近傍に皮下注射、anti-IFN- γ 抗体は、 $100 \mu\text{g}$ を PBS で 10 倍に希釈し皮下注射とし、移植翌日から週 1 回行った。
- (3) 免疫染色：十分に移植した腫瘍組織を切除し、10%ホルマリンで固定し、バラフィン包埋切片を用いて anti-mouse IDO1 monoclonal antibody (H-11; Santa Cruz Bio, 米) を 50 倍に希釈し免疫染色を行った。
- (4) ELISA：各群の血清トリプトファン-キヌレニン濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。ELISA キット (ImmuSmol, 仏) を使用し、スタンダードカーブから濃度を定量した。採血は、移植後 10 日目に行い、グループ毎に 8 サンプルを測定し、その平均値を比較した。
- (5) 生存曲線の検討：上記(1)の検討から最も腫瘍抑制効果が高い薬剤 C について、コントロール、薬剤 C 投与群、薬剤 C + IFN- γ 抗体群で生存期間を Kaplan-Meier 曲線で比較しロジック法を用いて有意差検定を行った。

4. 研究成果

- (1) IDO 阻害薬による抗腫瘍効果と IFN- γ の影響：IDO 阻害薬投与による腫瘍平均体積の移植後 25 日における CTL 比は、IDO 阻害薬 A, B, C 群でそれぞれ 47.0, 57.0, 9.8 % で ($P < 0.05$) 有意差を認め、阻害薬 C が最も抑制効果が高かった。IDO 阻害薬 B に IFN- γ に局所投与を併用すると、阻害薬 B による腫瘍体積抑制効果は、腫瘍移植後 27 日目において 69.0%抑制された。IFN- γ は、IDO 阻害薬による単独の抗腫瘍効果を減弱した。IFN- γ 単独では、CTL と比べ明らかな腫瘍抑制効果は認めなかった。(図 2)
- (2) IDO 阻害薬と IFN- γ 抗体の効果：IDO 阻害薬に加えて IFN- γ 抗体投与群では、IDO 阻害薬単独投与による抗腫瘍効果に対して 36.8, 38.5, 5.5 % と IDO 阻害薬の抑制効果が増強した。
- (3) キヌレニン血中濃度の比較：normal control 群(NT, 移植なし)、CTR 群(生食のみ移植) A 群 (IDO 阻害薬 A 単独) A + I 群(A 薬+IFN- γ 群)におけるキヌレニン血中濃度の平均値を示す ($n = 8$)。A 群のキヌレニン血中濃度は最も低く、IDO 阻害により IDO 代謝が抑制された結果と考えられた。IFN- γ を同時に投与するとこの抑制効果がキャンセルされた。(図 3)
- (4) グリオーマモデルマウスにおける IDO 発現：免疫染色では、IDO 発現は腫瘍組織では非常に高いものの、IDO 阻害薬 A 投与で IDO 発現は著明に抑制され、IFN- γ 投与により IDO 発現の著しい亢進が認められた。(図 4)
- (5) IDO 阻害薬+IFN- γ 抗体による生存期間：IDO 阻害薬 C および C+IFN- γ 抗体群は、CTL 群に比べ生存期間の有意な延長を認めた ($P = 0.009$)。(図 5)
- (6) 結果サマリーと結論：新規 IDO 阻害剤の経口投与は、グリオーマ腫瘍抑制効果を認めた。IFN- γ は、IDO 発現を惹起しキヌレニンの蓄積に作用した。IFN- γ 抗体は、IDO 阻害に相乗的に関与し、複合免疫療法の可能性が示唆された。以上、本研究は、免疫療法の IDO 阻害剤の最適化を試みた。また、本研究では、IFN- γ が、局所において腫瘍抑制的に働かず、むしろ oncogenic な働きをしている可能性を示し、興味深い結果である。また、本免疫治療は、既存の免疫治療との併用が可能であり、今後の応用が期待できる。



< 引用文献 >

1. Mitsuka K, Kawataki T, Satoh E, Asahara T, Horikoshi T, Kinouchi H. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and correlation with pathological malignancy in gliomas. *Neurosurgery*. Jun 2013;72(6):1031-8; discussion 1038-9.
2. Hanihara M, Kawataki T, Oh-Okada K, Mitsuka K, Nakao A, Kinouchi H. Synergistic antitumor effect with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition and temozolomide in a murine glioma model. *Journal of neurosurgery*. Jun 2016;124(6):1594-601.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	松野 研司 (Matsuno Kenji) (50433214)	安田女子大学・薬学部・教授 (35408)	

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