

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02778

研究課題名（和文）IDO-1阻害と放射線照射がもたらす抗腫瘍効果のマルチレイヤー解析

研究課題名（英文）Multilayer analyses on anti-tumor activities of IDO1 blockade and radiation therapy

研究代表者

野澤 宏彰（Nozawa, Hiroaki）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80529173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：Colon26細胞株とColon26細胞株由来のマウス皮下腫瘍において1-methyl-tryptophan (1-MT)と放射線照射の併用がNADが著減することがメタボローム解析で示された。このようなNADのde novo合成経路の阻害は、さらに1-MTと放射線照射併用でのアポトーシス増強を引き起こしていた。さらに1-MT投与によりヒト大腸癌細胞株DLD-1のhealing, migration能力が抑えられ、E-cadherin発現上昇およびVimentin, Snail, Slug発現低下が生じており上皮間質転換（EMT）が抑制されることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の1-MT、放射線照射によるアポトーシス増強はNADを標的とする同様の療法が今後の大腸癌治療戦略として有効であることを示唆するものである。また1-MTが人大腸癌細胞株でのE-cadherin発現上昇およびVimentin, Snail, Slug発現低下など上皮間質転換（EMT）の表現型を抑制する効果を示したことから、IDO1が転移ステップに関与することが示唆され、IDO1が大腸癌の進行期における治療標的となりうる可能性も示された。

研究成果の概要（英文）：Metabolome analyses using Colon26 cell lines and Colon26-derived subcutaneous tumors in Balb/c mice revealed that 1-methyl-tryptophan (1-MT) and radiation induced a marked reduction in NAD. It seemed to be associated with an increase in apoptotic cells treated by 1-MT and radiation. We also found that 1-MT decreased invasive and migrating capabilities of DLD-1 cells which were accompanied by suppressed phenotype of Epithelial-Mesenchymal Transformation, namely upregulated E-cadherin and downregulated vimentin, Snail, and Slug.

研究分野：下部消化管外科学

キーワード：インドールアミン酸素添加酵素 1-methyl-tryptophan 大腸癌 転移 アポトーシス 放射線照射
メタボローム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (IDO1)は、tryptophan (Trp)を kynurenine (Kyn)に代謝する酵素である。Kyn の増加は細胞障害性 T 細胞の活性を低下、ならびに、制御性 T 細胞の活性化を促す。すなわち、IDO1 は腫瘍免疫を介して腫瘍増殖を亢進させると考えられている。これまでの研究で colon26 マウス大腸癌細胞株を用いた細胞実験において IDO1 阻害剤 (1-methyl-tryptophan: 1-MT)を投与すると用量依存性に細胞増殖が抑制されることを確認した。また、1-MT と放射線照射併用群は放射線照射単独群と比較し有意に細胞増殖の抑制が認められた。このように IDO1 をターゲットとした腫瘍抑制効果が示された一方で、細胞内における生化学的変化および腫瘍抑制メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

腫瘍細胞内における代謝産物に着目し、IDO1 阻害剤および放射線照射に伴う生化学的な腫瘍抑制メカニズムを明らかにすることを目的としてメタボローム解析を中心に研究を行いさらにそこから派生する解析を行って腫瘍細胞での IDO1 の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Metabolomics

マウス大腸癌細胞株 colon 26 および colon26 由来のマウス皮下腫瘍をサンプルとして、control (Ctrl)群の他、1-MT 単独(1-MT)群、放射線照射(RT)群、1-MT+RT 併用(MR)群の4群を設定し、それぞれメタボローム解析を行った。1-MT は光学異性体としてL体とD体が存在するが、マウス皮下腫瘍に対してはD体を使用した。cell line に対してはL体とD体の両方を使用した。解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー (HMT) に依頼した。

Western blotting assay

1-MT(L体)によるDNA損傷修復阻害作用を検証するため、colon26 マウス大腸癌細胞を10%FBSを含むRPMI1640を用いて培養し、放射線を4Gy照射後、2時間ごとにタンパクを回収し、電気泳動(SDS-PAGE)後PDVF膜へtransferした。5%スキムミルク入りTris-buffered saline + 0.05%Tween-20でブロッキングを行い、1次抗体と4 overnightで反応させ洗浄したのち、各2次抗体と室温で1時間incubateした。発色反応はECL Prime Western Blotting Detection Reagent(Cytiva)を用いた。定量したのは、DNA損傷マーカーとして知られるH2A.Xやapoptosisに関わるpoly(ADP-ribose) polymerases (PARP)である。また1-MTによる上皮間葉転換(EMT)へ影響に関してはヒト大腸癌細胞株DLD-1へ1,000 μMの1-MTの投与前後(48時間)でタンパクを回収し同様の方法でwestern blotting解析を行った。評価したタンパクはE-cadherin、vimentin、N-cadherin、fibronectin、Snail、Slug、ZEB1、TWIST1である。

ROS detecting assay

放射線照射および1-MT(L体)によるreactive oxygen species (ROS)の変化を調べるためにROS detecting assayを行った。マウス大腸癌細胞株 colon26 に放射線照射を行い、24時間後のcell lineをサンプルとして回収し、ROS Detecting Cell-Based Assay (DHE) kit (Cayman Chemical, #601290)を用いて蛍光プレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

Flow cytometryによるアポトーシス評価

マウス大腸癌細胞株 colon26 における放射線照射と1-MT(L体)投与に伴うapoptosisの変

化を検証するため flow cytometry を用いた apoptosis assay を行った。

Wound scratch assay

6-well plate に DLD-1 を 1.2×10^5 個の濃度で播き、80% confluence となった時点で 1,000- μ L 用の pipette tip を用いて scratch を施した。FBS を除いた培地に交換し、1-MT (L 体; 1,000 μ M) の有無で scratch した幅の縮小を顕微鏡下に 24 時間後、48 時間後で比較・定量化した。

Boyden chamber assay

8- μ m の小孔のある collagen type I をコーティングした filter 付の 96-well plate (Boyden chamber) の上層に 1% BSA を含む培地に suspend した 5.0×10^5 個の DLD-1 細胞を置き、下層には 5% FBS 含有培地を入れた。上層に 0-2, 500 μ M までの 1-MT (L 体) を投与し、24 時間 incubate した。Filter を取り出し上層に付着した細胞を除いたうえで Differential Quick III Stain Kit を用いて染色し蛍光プレートリーダーを用いて 620 nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

マウス皮下腫瘍のメタボローム解析

Ctrl 群と比較し、Trp は RT 群で減少を認めしたが、1-MT 群および MR 群では明らかな変化を認めなかった。Kyn は 1-MT 群で増加した一方で、RT 群および MR 群では減少した。IDO1 の活性化の指標として知られる Kyn/Trp 比は、1-MT 群で上昇した一方、RT 群および MR 群では低下した。NAD は RT 群で減少し、ADP-ribose は RT 群で有意に増加した。

マウス大腸癌細胞 colon26 のメタボローム解析

Ctrl 群と比較し、Trp は L-1-MT 群、D-1-MT 群の両方で有意な増加を認めた。1-MT と放射線併用では、L-1-MT+RT 群では有意に増加を認めただけで、D-1-MT+RT 群では明らかな変化を認めなかった。Kyn は D-1-MT 群と RT 群で増加したが、L-1-MT+RT 群と D-1-MT+RT 群では減少を認めた。NAD⁺ は L-1-MT 群、D-1-MT 群、RT 群で増加した一方で、L-1-MT+RT 群と D-1-MT+RT 群では減少を認めた。Kyn/Trp 比は、L 体と D 体のいずれにおいても、1-MT 群と 1-MT+RT 群で減少を認めた。

次に、グルタチオン代謝に関わる産物の比較を示す。還元型グルタチオン (GSH) は RT 群で増加し、1MT+RT 併用群で減少を認めた。特に D-1-MT+RT 群において有意な減少を認めた。酸化型グルタチオン (GSSG) は、RT 群および L-1-MT+RT 群で増加を認めた。一方、D-1-MT+RT 群では減少を認めた。細胞の酸化ストレスの指標とされる GSSG/GSH 比は L-1-MT+RT 群と D-1-MT+RT 群で有意に高い結果が得られた。

マウス大腸癌細胞 colon26 の H2A.X 発現変化

放射線を照射した colon26 マウス大腸癌細胞の H2A.X 発現を western blotting assay にて経時的に検討した。H2A.X は放射線照射から 2 時間後に最も高い発現を認めた。同様に、1-MT+RT 群における照射 12 時間後まで H2A.X の経時的な発現を調べると、6 時間後までは発現上昇を認めただけで、8 時間後以降は減弱した。続いて、各治療群における放射線 4Gy 照射 2 時間後の H2A.X の発現を確認したが、RT 群と 1-MT+RT 併用群の H2A.X の発現はおおよそ同程度であった。同様に、放射線 4Gy 照射 2 時間後の poly(ADP-ribose) polymerases (PARP) の発現を確認したが、それぞれの治療群の間に明らかな変化を認めなかった。

ROS の変化

Ctrl 群と比較し、1-MT 群で ROS の有意な減少を認めた。1-MT+RT 群は RT 群よりも ROS が増加する傾向を認めた。1-MT 群 RT 群、1-MT+RT 群はいずれも Ctrl 群よりも ROS が少なかった。

アポトーシス変化

各治療群における放射線 4Gy 照射後 48h の apoptosis の状況について結果を示す。放射線 4Gy 照射の 6 時間後には RT 群および 1MT+RT 群でアポトーシスの増加を認めた。Ctrl 群に比べて 1-MT 群、RT 群の方がアポトーシスの像かがみられ、1-MT+RT 群で最も効率にアポトーシスが誘導されていた。

浸潤能の変化

Wound scratch assay では 1,000 μ M の 1-MT 処理をした DLD-1 細胞での healing は未処理の細胞にくらべて 24 時間で 38%、48 時間で 27%抑制された。

Migration の変化

Boyden chamber assay では 1-MT の用量依存的に下層へ移動する DLD-1 細胞数が減少し、2,500 μ M の 1-MT 投与では 85%の抑制がみられた。

EMT 関連タンパクの変化

1-MT 投与による DLD-1 細胞での EMT 関連タンパクの発現変化を western blotting で検討した。1-MT 投与によって E-cadherin の発現は増加し、vimentin, Snail, Slug の発現は減少した。ZEB1 の発現には変化が認められなかった。1-MT 投与の有無にかかわらず N-cadherin, fibronectin, TWIST1 のタンパクの検出はできなかった。

考察

今回、IDO1 阻害剤である 1-MT と放射線照射を外部刺激とした場合の生体内における代謝変化を検討するため、マウスの皮下腫瘍と大腸癌細胞株の両方をサンプルとしてメタボローム解析を行った。マウス皮下腫瘍の場合、1-MT の投与により Kyn 合成が阻害されることを予想していたが、実際は 1-MT 群で Trp 量の変化はなく、Kyn は増加を認めた。IDO1 活性の指標とされる Kyn/Trp 比は、Ctrl 群と比較し 1-MT 群で上昇が認められ 1-MT 投与による影響の予想と反する結果となった。この結果の原因として、サンプルであるマウスの腫瘍内が腫瘍細胞そのものの生化学的側面のみならず腫瘍微小環境を構成する他の細胞との免疫学的作用その他によってコントロールされていることが考えられた。また、1-MT は光学異性体によって作用が異なるとされ、L 体は IDO1 阻害活性が有意に高い一方、今回マウスに投与された D 体は抗腫瘍活性が有意に高いと報告されることも原因として考えられた。

続いて、大腸癌細胞 colon26 をサンプルとしたメタボローム解析の結果を検討した。colon26 における Kyn/Trp 比は、L 体と D 体のいずれの 1-MT を投与した場合においても 1-MT 群および 1-MT+RT 群で低下しており、1-MT による IDO1 活性が阻害されている結果が得られた。Trp の代謝下流にあたる Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) は、Ctrl 群と比較し L-1-MT 群、D-1-MT 群、RT 群で増加した一方で、L-1-MT+RT 群と D-1-MT+RT 群では減少を認めた。NAD は、生体内における様々な反応の補酵素として作用する以外に、PARP や class 脱アセチル化酵素サーチュインの基質としても働く。PARP は自己 ADP リボシル化を介することで DNA 損傷修復を

開始することから、すなわち、NAD が DNA 損傷修復に寄与しているものと考えられる。NAD は細胞膜透過性がなく、哺乳類ではトランスポーターも存在しないことから外部からの取り込みはできず、体内で生合成されている。合成経路には Tryptophan から Kynurenine を経由し NAD を新規合成する *de novo* 経路、ニコチン酸を利用する Preiss-Handler 経路、nicotinamide (NAM) を利用する Salvage 経路、の 3 つがある。1-MT により *de novo* 合成経路が阻害されているものと考えられたが、実際は 1-MT 単独投与の場合に、前述の通り ID01 の活性阻害効果は示されたにもかかわらず、NAD の減少は認めなかった。これは通常の細胞において NAD の産生の多くが salvage 経路によって行われているためと考えられた。すなわち、1-MT 単独で *de novo* 経路を阻害しても、salvage 経路によって NAD が十分に供給されたため減少しなかったものと考えられた。一方で、1-MT+RT 群では NAD 量の減少を認めた。Ikura らは、放射線によるゲノム損傷ストレスにより NAD 産生が細胞質での salvage 経路依存から細胞核内の *de novo* 経路依存に変遷することを報告している。本実験系においても同様に、放射線照射により NAD 合成の主体が salvage 経路から *de novo* 経路に switch した可能性が考えられた。

メタボローム解析の結果から、1-MT と放射線の併用が NAD の *de novo* 合成経路の遮断を介して DNA 損傷修復阻害を生じる可能性が示唆された。続いて、DNA 損傷修復阻害効果を検証した。

H2A.X に対する western blotting assay の結果、RT 群と 1-MT+RT 群で H2A.X の増加を認めしたが、双方の間には明らかな変化を認めなかった。PARP は DNA 一本鎖切断を認識し修復経路を活性化するとされるが、H2A.X は複数の DNA 損傷において発現が認められると報告されることから、RT 群と 1-MT+RT 群の間に有意な差が認められなかったと考えた。Ikura らは相同組み換え修復 (HR) の活性を評価する Assay for Site-specific HR Activity (ASHRA) を用いて DNA 損傷修復活性を評価しており、本実験系でもこのような各修復形式に特化した方法に用いれば RT 群と 1-MT+RT 群の差を評価できる可能性がある。一方で、経時的な発現を比較すると放射線単独の場合の H2A.X の発現は照射 2 時間後のみで増加していたのに対し、1-MT+RT 群では照射 6 時間後まで高発現が遷延しており、DNA 損傷の修復遅延が起きている可能性が示唆された。Flow cytometry の結果を見てみると、同様に 1-MT と放射線を併用した場合においてアポトーシスの遷延が認められた。以上から、NAD の *de novo* 合成経路の阻害が細胞におけるアポトーシスの遷延、すなわち、腫瘍抑制効果に寄与する可能性が考えられた。

NAD が転移形成に関与するという報告も他癌腫で見られることから、大腸癌細胞株の浸潤能や EMT についての検討を追加で行った。DLD-1 での検討の結果、1-MT 投与が scratch wound assay, Boyden Chamber assay などで評価される浸潤、migration を抑制し、EMT への shift も抑制されていることがその関連タンパクの変動から示唆された。ただし、N-cadherin の変化は見られず、ID01 以外の影響や feedback 機構が関与していることも考えられ、更なる検討が必要であるのと、*in vivo* での検証を行っていないのが limitation である。

結論として、1-MT は放射線照射と併用することで NAD の *de novo* 合成経路を阻害し、DNA 損傷修復が遅延する可能性、細胞内における酸化ストレスを放射線照射単独の場合よりも増強させる可能性が示唆された。特に前者では実際に 1-MT と放射線照射がアポトーシスを増強することが確認された。さらに ID01 の転移における役割も示唆された。NAD を標的とする同様の療法が今後の大腸癌治療戦略として有効であることを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nozawa H, Taira T, Sonoda H, Sasaki K, Murono K, Emoto S, Yokoyama Y, Nagai Y, Abe S, Ishihara S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhancement of radiation therapy by indoleamine 2,3 dioxygenase 1 inhibition through multimodal mechanisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 62-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-023-10539-5	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 Matsunaga K, Sasaki K, Hata K, Nozawa H, Kawai K, Murono K, Emoto S, Yokoyama Y, Sonoda H, Ueda K, Kuriyama S, Yamada T, Yoshida H, Ishihara S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Clinical significance of the KRAS G13D mutation in anastomotic recurrence of colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 192-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2023.13778	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 Yokota Y, Nozawa H, Sonoda H, Yokoyama Y, Emoto S, Murono K, Sasaki K, Ishihara S.	4. 巻 44(8)
2. 論文標題 Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitor Suppresses Colon Cancer Cell Migration, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 3337-3342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.17153	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 1件）

1. 発表者名 Nozawa H, Ishihara S
2. 発表標題 Synergistic suppression of colon cancer cells by Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition and radiation therapy
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abe K, Nozawa H, Yokota Y, Sonoda H, Taira T, Ishihara S.
2. 発表標題 Roles of indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (IDO1) in colon cancer elucidated by metabolome analysis
3. 学会等名 The Eighth JCA-AACR Special Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 野澤宏彰, 平哲郎, 石原聡一郎
2. 発表標題 消化器癌における免疫治療と分子標的治療の基礎研究と臨床 腫瘍細胞および腫瘍内免疫細胞を標的とするインドールアミン酸素添加酵素阻害と放射線療法による大腸癌抑制
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022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	石原 聡一郎 (Ishihara Soichiro) (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	佐々木 和人 (Sasaki Kazuhito) (00781238)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	園田 洋史 (Sonoda Hirofumi) (80770205)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	川合 一茂 (Kawai Kazushige) (80571942)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	令和4年3月31日付けで、研究分担からはずれた

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