

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659361

研究課題名(和文) 肝炎ウイルス感染症におけるインドールアミン酸素添加酵素の役割と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The role of IDO in the HBV-related liver diseases.

研究代表者

清島 満 (SEISHIMA, Mitsuru)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10171315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：近年、トリプトファンの代謝酵素であるインドールアミン酸素添加酵素(IDO)が宿主免疫抑制に重要な役割を果たしていることが各種疾患モデルにおいて明らかにされつつある。本研究ではHBV感染におけるIDOの関与を明らかにした。HBV排除に必要なHBs抗原特異的CTLの誘導に対しては、IDOはその誘導効率を低下させていると考えられた。また、急性肝障害においては、IDOの発現は、肝障害をより増悪させ得るものと推測された。このように、HBV感染症においては、IDOは重要な役割を果たしていると考えられ、その発現・活性化を制御することは、HBV感染症における新規治療薬の開発に繋がるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), an enzyme that is ubiquitously distributed in mammalian tissues and cells, converts tryptophan (Trp) to L-kynurenine (L-Kyn), and it is noted as a relevant molecule in promoting tolerance and suppressing adaptive immunity. In this study, we revealed the role of IDO in the induction of HBV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) and acute hepatitis induced by HBV-specific CTL. IDO impaired the induction of HBV-specific CTL after immunization with HBsAg and alpha-GalCer. In acute hepatitis model, the inhibition of IDO expression improved the liver injury induced by HBV-specific CTL. These results demonstrated that IDO is critical in the induction of HBV-specific CTL and acute hepatitis. The control of IDO activity leads to a new therapy for diseases caused by HBV infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス インドールアミン酸素添加酵素 細胞傷害性T細胞 急性肝炎

1. 研究開始当初の背景

近年、必須アミノ酸であるトリプトファンの代謝酵素であるインドールアミン酸素添加酵素 (IDO) が免疫学の分野において注目されている。トリプトファンの重要な代謝経路であるキヌレニン経路はトリプトファン酸素添加酵素 (IDO) や IDO により代謝制御を受けているが、特に IDO は IFN- γ や TNF- α などの炎症性サイトカインにより酵素誘導され、さらには樹状細胞の抗原提示能や T cell の機能を調節することが明らかにされている。免疫寛容と IDO の過剰発現との関係 (Muller AJ et al, Nat Med 2005) あるいは腫瘍の増殖と IDO の関与を示唆するデータ (Uyttenhoe C, et al, Nat Med, 2003) も相次いで報告され、世界的にも注目されている。最近の申請者らの研究結果では HBV 抗原を高発現する HBV トランスジェニックマウスに HBV 抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) を移入して誘導するマウス劇症肝炎モデルにおいて肝内での IDO 発現の増強を初めて確認した。また、C 型肝炎ウイルスにおいては臨床例で肝組織内 IDO の発現増強が確認されている (Larrea E et al, J Virol 2007)。しかしながら IDO 発現の肝炎における役割については不明である。

2. 研究の目的

本研究は IDO 制御による肝炎ウイルス感染症に対する新規治療法の開発を最終目的とする。近年、IDO が宿主免疫抑制に重要な役割を果たしていることが各種疾患モデルにおいて明らかにされつつあるが、本研究では HBV トランスジェニックマウスおよび IDO ノックアウト (KO) マウスを用い、HBV 感染における HBV 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) 誘導機構およびその肝障害における IDO の関与を明らかにし、HBV 感染症による肝障害に対する新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) IDO-KO マウスを用いた HBV 特異的 CTL 誘導能の解析

通常の WT および IDO-KO マウスを用い、HBV 抗原単独および HBV 抗原とアジュバンドとして α -galactosylceramide (GalCer) を同時に投与することにより免疫を行い、CTL の誘導能および誘導能修飾機構を解析する。CTL 誘導能の解析には抗原特異的 IFN- γ 産生能 (ELISPOT アッセイ) および特異的抗原認識能 (MHC テトラマー法を用いる) を用いる。WT マウスおよび IDO-KO マウスとの間で誘導能の差異が確認できた場合、CTL 誘導に重要とされるサイトカインなどの分子 (IL-2、IL-12b、CD40L など) の発現解析を行う。IDO の免疫学的な機能としてリンパ球の増殖およびアポトーシスに深いかかわりがあると報告 (Terness P et al, J Exp Med 2002) があるため、リンパ球 (特に CTL) の増殖能 (CFSE による細胞増殖能検出) を FACS にて

行う。

2) HBVTg/IDO-KO マウスを用いた急性肝障害の解析

IDO-KO マウスと HBVTg マウスを掛け合わせた HBVTg/IDO-KO マウスを樹立する。これらのマウスに HBV 特異的 CTL を経静脈的に移入し、肝障害を惹起させ、IDO 欠損状態における肝障害の程度を比較し、IDO の影響を解析する。i) WT および IDOKO の HBVTg マウスに HBV 特異的 CTL を移入し、肝障害を誘導する。それぞれ肝障害の程度を致死率、血清 AST・ALT、病理学的解析 (HE 染色、TUNNEL 法によるアポトーシスの評価) により検討する。ii) IDO が肝障害に対し、増悪作用もしくは抑制作用があると推測されるが、それらのメカニズムを明らかにするため、肝内サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、FasL など) の発現をリアルタイム PCR 法にて解析する。iii) 肝内リンパ球の発現型の解析を表面マーカーの染色をして FACS を行う。

3) IDO 阻害薬を用いた CTL 誘導能と肝障害に対する効果の検証

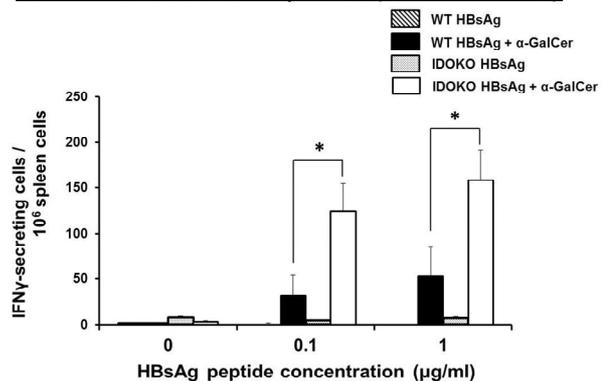
IDO の拮抗阻害剤である 1-メチルトリプトファン (1-MT) を経口投与して CTL 誘導能実験および CTL 移入による肝障害誘導実験を行い、1-MT の CTL 誘導能 (抗原特異的細胞障害性試験など) および肝障害に対する効果を検証する。

4. 研究成果

1) IDO-KO マウスを用いた HBV 特異的 CTL 誘導能の解析

WT および IDO-KO マウスに対して HBs 抗原と GalCer により免疫を行ったところ、ex vivo で行った ELISPOT アッセイの結果より、HBs 抗原特異的な IFN- γ 産生細胞数は IDO-KO マウスにて多くみられた (図 1)。

図1 HBV抗原特異的IFN- γ 産生能(ELISPOTアッセイ)



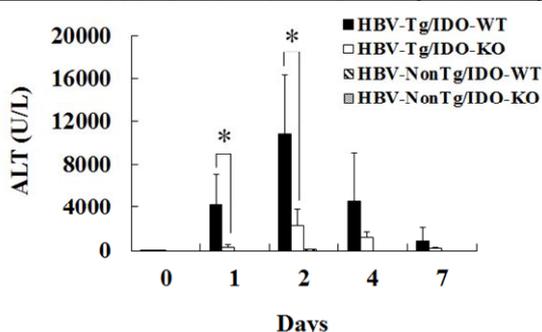
この結果より、IDO-KO マウスにて免疫により Th1 反応の増強がみられたこととなる。また、MHC ダイマー法や HBs 抗原特異的細胞傷害性試験の結果より、IDO-KO マウスにて HBs 抗原特異的な CTL の誘導効率が低いことが明らかとなった。また、免疫後のリンパ節内でのサイトカインの発現をリアルタイム RT-PCR 法により検討してみたところ、IDO-KO マウスにて、IL-2 や IL-12b の発現が増強していた。

これらのサイトカインは、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導に重要な役割をしており、今回の検討でも、IDO-KO マウスにて IL-2 や IL-12b の発現増強が CTL の誘導効率を高めたことに寄与していた可能性がある。また、免疫後、リンパ節内では特に CD11b 陽性細胞が IDO を発現し、抗原特異的 CTL の増殖能を抑制するため、その IDO 発現を取り除くことにより HBV 特異的 CTL 誘導能を高めたと考えられた。さらに、IDO の拮抗阻害剤である 1-メチルトリプトファン (1-MT) も HBs 抗原特異的免疫応答を増強できることが ELISPOT アッセイおよび MHC ダイマー法にて確認できた。以上より、

2) HBVTg/IDO-KO マウスを用いた急性肝障害の解析

WT および IDOKO の HBVTg マウスに HBV 特異的 CTL を移入し、肝障害を誘導した。移入後の肝障害の程度を血清 ALT 値でモニタリングすると、明らかに IDO-KO マウスにて肝障害の軽減が認められた (図 2)。さらに、組織

図 2 HBV 抗原特異的 CTL による肝障害 (血清 ALT 値)



学的な検討においても IDO-KO マウスでは、肝炎症像があまり観察されなかった。また、TUNEL 染色法にて組織学的な検討を行うと肝実質細胞の陽性細胞数が IDO-KO マウスにて減少していた。以上の結果より、HBs 抗原特異的 CTL による急性肝炎モデルでは、IDO の欠損により、肝障害が軽減されることが示唆された。さらに、IDO の拮抗阻害剤である 1-MT を投与することにより、肝障害を軽減することができた。そのメカニズムを検証するために、IDO の活性化により増加するトリプトファンの代謝産物であるキヌレニンについて検討した。HBVTg/IDO-KO マウスにても HBs 抗原特異的 CTL とキヌレニンを投与することにより肝障害の悪化がみられた。さらに、HBs 抗原特異的 CTL の代わりにリコンビナント IFN- γ とキヌレニンを HBVTg/IDO-KO マウスに投与しても肝障害の悪化がみられた。したがって、HBVTg マウスにおいては、IFN- γ とキヌレニンが増加することにより肝実質細胞のアポトーシスが誘導され、肝障害が増悪するものと考えられた。

3) まとめ

以上の結果より、HBV 排除に必要な HBs 抗

原特異的 CTL の誘導に対しては、IDO はその誘導効率を低下させていると考えられた。また、急性肝障害においては、IDO の発現は、肝障害をより増悪させ得るものと推測された。このように、HBV 感染症においては、IDO は重要な役割を果たしていると考えられ、その発現・活性化を制御することは、HBV 感染症における新規治療薬の開発に繋がるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M. Induction of HBsAg-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated by the inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Immunology*. 2014 Mar 3. DOI: 10.1111/imm.12274. 査読有

Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. Kynurenine production mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced fulminant hepatitis. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr 24. pii: S0925-4439(14)00102-1. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.04.015. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤弘康、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島 満、インドールアミン酸素添加酵素の発現抑制による HBV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導効果、第 40 回日本肝臓学会西部会、2013.12. 岐阜

伊藤弘康、安藤達也、石川哲也、清島 満、インドールアミン酸素添加酵素の発現制御を用いた HBV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導効果の検討、第 60 回日本臨床検査医学会学術集会、2013. 10. 神戸

伊藤弘康、大瀧博文、安藤達也、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島 満、マウス B 型肝炎モデルにおけるインドールアミン酸素添加酵素の解析、第 49 回日本肝臓学会総会、2013.6. 東京

安藤達也、大瀧博文、伊藤弘康、星 雅人、石川哲也、斎藤 邦明、清島 満、細胞障害性 T 細胞により誘発されるマウス劇症肝炎モデルにおける indoleamine 2, 3-dioxygenase の解析、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会、2012. 11. 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~labmed/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清島 満 (SEISHIMA, Mitsuru)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10171315

(2)研究分担者

伊藤 弘康 (ITO, Hiroyasu)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80373075

(3)連携研究者

なし