

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：34104

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890270

研究課題名(和文)NK T細胞免疫療法におけるIDOによる免疫制御機構の解明と病態解析

研究課題名(英文)The investigation of immune regulation by IDO in NKT cell-mediated immunotherapy

研究代表者

星 雅人(Hoshi, Masato)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・助教

研究者番号：40633996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：B16F10細胞を静脈注射で移入することにより肺転移モデルを作製し、移入後7日目に各種リガンドを投与した。 α -GalCer投与後6時間で血中IFN- γ およびIDO活性は未投与群と比較して有意な増加を認め、移入後2週の肺転移巣では従来の報告通り、腫瘍縮小に一定の効果が得られた。また、移入後2週における肺臓でのIDO1と2のmRNA、免疫組織化学染色および血中トリプトファン代謝産物は α -GalCer投与により未投与群と比較して有意に増加していた。さらに、IDO1および2の特異阻害剤と α -GalCerを併用投与したところ肺転移巣への抗腫瘍効果は α -GalCer単独投与群と比較して著効していた。

研究成果の概要(英文)：The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (Ido) in the L-tryptophan (Trp)-kynurenine (Kyn) pathway after lung metastasis model by injecting B16F10 cells was investigated. We used mice treated with 1-methyl-D or L-tryptophan (D or L-1MT), an inhibitor of Ido1 or Ido2, to study the importance of Trp-Kyn pathway metabolites. On day 7 after B16F10 cells, we administered each NKT activated ligands (α -GalCer and 7DW8-5). The levels of serum IFN- γ and Ido activity in mice 6 hours after α -GalCer injection were higher than those in non-treated mice. Furthermore, the levels of Ido1 and Ido2 mRNA and protein expression in the lung and serum Trp metabolites from mice treated with α -GalCer were significantly higher than those from non-treated mice. Moreover, the anti-tumor effect in the lung from mice treated with α -GalCer and D- or L-1MT combined administration was markedly improved compared to that in mice treated with α -GalCer single administration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：インドールアミン酸素添加酵素 トリプトファン代謝 α -ガラクトシルセラミド NK T細胞免疫療法
腫瘍

1. 研究開始当初の背景

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) は各種リガンドやサイトカインにより酵素誘導され、トリプトファンをキヌレニン経路へ代謝する律速酵素である。これまでに申請者らは、種々の病態（腫瘍、脳虚血、ウイルス感染症等）における IDO の役割を報告しており、IDO 活性の結果として、局所トリプトファンの枯渇あるいは細胞毒性を有するトリプトファン代謝産物増加により、T 細胞や NK 細胞の機能を制御することから新規免疫制御因子として注目されている。最近、NKT 細胞を活性化するリガンドである α -GalCer を使用した、各種腫瘍（主として固形癌）に対する免疫療法について臨床試験を含めた数多くの報告がなされているが、極めて効果的に作用する腫瘍と効果が期待できない腫瘍があり、特に造血器腫瘍に対する効果は十分ではない。 α -GalCer による刺激は、NKT 細胞の活性化により大量の IFN- γ 及び IL-10 が産生され、細胞障害性 T 細胞 (CTL) が誘導され抗腫瘍免疫に働く。一方で、IFN- γ は IDO を強力に誘導し抗腫瘍免疫からの逃避に関与する。すなわち、各種腫瘍に対する α -GalCer の効果の違いの一つとして、腫瘍細胞の IDO 誘導によることが推測された。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍細胞に対する NKT 細胞等の細胞性免疫を強力に制御することで注目されている IDO に着目し、NKT 細胞活性化リガンド投与により誘導される IDO による NKT 細胞の免疫制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 転移腫瘍モデルの作製とマウス

マウスは C57BL/6/J (8 週齢、オス) の野生型マウス (WT) を使用した。また IDO1 阻害剤として 1-methyl-L-tryptophan (L-1MT) を IDO2 阻害剤として 1-methyl-D-tryptophan (D-1MT) をそれぞれ WT に NKT 活性化リガンド投与前 2 日より経口投与した (5 mg/ml)。転移性腫瘍モデルは、B16F10 細胞株を培養増殖したものを尾静脈より投与 ($1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$) し、肺転移モデルを作製した。また、NKT 細胞活性化リガンドである α -GalCer (1 $\mu\text{g/ml}$) および 7DW8-5 (1 $\mu\text{g/ml}$) を B16 細胞移入 1 週間後に腹腔内単回投与した。

(2) IDO1 と IDO2 の発現

腫瘍発症 WT において未処置群及び α -GalCer 投与群における肺臓での IDO1 および IDO2 の発現を RT-qPCR 法および免疫組織化学

染色 (抗 mouse IDO1, 2 抗体) を用いて解析した。

(3) 腫瘍に対する α -GalCer の効果判定

B16 細胞移入後 1 週間で、WT 及び 1-MT 投与マウスに α -GalCer を投与し、肺転移巣の腫瘍量の検索を病理組織所見および組織重量により評価した。

(4) トリプトファン代謝産物およびサイトカイン量の経時的変化

WT 及び 1-MT 投与マウスにおいて、B16 細胞移入後 1 週で α -GalCer を投与後 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 時間で採血を行い、血中のトリプトファン代謝産物 (トリプトファン、キヌレニン) を高速液体クロマトグラフィーで、サイトカイン量は IFN- γ を ELISA 法で分析した。

(5) 統計解析

統計は統計解析ソフト StatView4.5 を使用し、ANOVA 解析により有意差検定を行い、 $P < 0.05$ 未満を有意とした。

4. 研究成果

(1) B16 細胞を WT に移入後 1 週間で各種 NKT 細胞活性化リガンドを投与し、血清中 IFN- γ 、IDO 活性を表す Kyn/Trp 比、血清中キヌレニン濃度および血清中トリプトファン濃度の経時的変化を確認したところ、 α -GalCer 投与群において IFN- γ は投与後 6 時間で最も高値を示した。また、IFN- γ 等の炎症性サイトカインで誘導される IDO 活性は投与後 6 時間で未投与群と比較して有意に上昇し、48 時間で最も高値を示した。7DW8-5 投与群においては血清中での IFN- γ の増加は確認出来なかったが、IDO 活性は投与後 48 時間で未投与群と比較して有意に増加していた。すなわち、NKT 活性化リガンド投与により IFN- γ の産生増加により IDO が誘導され、トリプトファン代謝産物であるキヌレニンが血中レベルで増加したと推測される。さらにリガンド投与後 1 週間後の肺における腫瘍量を重量および病理組織学的検索により確認したところ、 α -GalCer および 7DW8-5 投与群ともに肺重量の低下および病理組織学的に腫瘍の縮小が得られたが、十分な効果ではなく、腫瘍細胞が免疫から逃避する機構の存在が推察された。

(2) NKT 活性化リガンド投与による抗腫瘍効果の違いに、IDO が関与していることが推測されたので、B16 細胞移入後 2 週間での肺臓における IDO1, 2 の mRNA 発現量と免疫組織

化学染色により発現細胞の確認を解析した。IDO1mRNA はリガンド投与群でコントロール群と比較して有意に増加していた。IDO2mRNA はリガンド投与群および未投与群でコントロール群と比較して有意に増加しており、リガンド投与群と未投与群の間に有意な差を認めなかった。次に免疫組織化学染色結果より、腫瘍移行群での IDO1 は B16 細胞で弱陽性を示し、マクロファージで強陽性を示した。また IDO2 は B16 細胞で強陽性を示していた。すなわち、肺転移巣においてリガンド投与により腫瘍細胞の IDO1,2 が活性化し周囲トリプトファンの低下あるいはキヌレニン等の代謝産物の増加を導いたと考えられる。今後蛍光抗体法等で IDO 発現細胞を同定する予定である。

(3) 腫瘍細胞による IDO の発現と NKT 細胞による抗腫瘍効果の関係を明らかにするために、IDO1 の阻害剤である 1-methyl-L-tryptophan (L-1MT) および IDO2 の阻害剤である 1-methyl-D-tryptophan (D-1MT) を投与したモデルを用いて、抗腫瘍効果を評価した。IDO1 阻害剤または IDO2 阻害剤と α -GalCer の併用投与群では α -GalCer 単独投与群と比較して有意に肺/体重比が減少していた。また、病理組織学的に腫瘍量を確認したところ、 α -GalCer 単独投与群と比較して、明らかに併用投与群では腫瘍の縮小効果が得られた。すなわち、 α -GalCer 投与による NKT 細胞免疫療法の効果に影響を与える因子として IDO が極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究において、NKT 細胞免疫療法における抗腫瘍効果の違いの一つとして、腫瘍細胞における IDO の発現が深く関与している事が明らかとなった。すなわち、NKT 細胞活性化リガンド投与により大量の IFN- γ が産生されることで、腫瘍細胞の IDO が活性化され、周囲トリプトファンの枯渇あるいはキヌレニン等の代謝産物が増加することで抗腫瘍免疫細胞を抑制していると推察された。今後さらなる検討により、NKT 活性リガンド投与により誘導された IDO がどのようなメカニズムで抗腫瘍効果を抑制しているのか明らかにし、新規 NKT 細胞免疫療法の確立を目指す。

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)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Kynurenine production mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced

fulminant hepatitis.

Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Moriwaki H, Saito K, Seishima M.

Biochim Biophys Acta. 2014 Apr 24. pii: S0925-4439(14)00102-1. doi: 10.1016/j.bbadis. 査読有

2. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is upregulated in activated microglia in mice cerebellum during acute viral encephalitis.

Taguchi A, Niwa M, Hoshi M, Saito K, Masutani T, Hisamatsu K, Kobayashi K, Hatano Y, Tomita H, Hara A.

Neurosci Lett. 2014 Apr 3;564:120-5. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.051. 査読有

3. IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice.

Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, Saito K, Hara A.

J Immunol. 2013 Sep 15;191(6):3057-64. doi: 10.4049/jimmunol.1203306. 査読有

4. Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells.

Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O.

PLoS One. 2013 Jun 3;8(6):e65251. doi: 10.1371/journal.pone.0065251. 査読有

5. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human colorectal cancer cells.

Ogawa K, Hara T, Shimizu M, Nagano J, Ohno T, Hoshi M, Ito H, Tsurumi H, Saito K, Seishima M, Moriwaki H.

Oncol Lett. 2012 Sep;4(3):546-550. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3673646/> 査読有

6. Remarkable role of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolites in infectious diseases: potential role in macrophage-mediated inflammatory diseases.

Murakami Y, Hoshi M, Imamura Y, Arioka Y, Yamamoto Y, Saito K.

Mediators Inflamm. 2013;2013:391984. doi: 10.1155/2013/391984. 査読有

7. Studies on tissue and cellular distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase 2: the absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis.

Fukunaga M, Yamamoto Y, Kawasoe M, Arioka Y, Murakami Y, Hoshi M, Saito K. *J Histochem Cytochem.* 2012 Nov;60(11):854-60. doi: 10.1369/0022155412458926. 査読有

8. Pre-administration of L-tryptophan improved ADR-induced early renal failure in mice.

Arioka Y, Yamamoto Y, Hoshi M, Matsumoto K, Takamatsu M, Hara A, Seishima M, Saito K. *Life Sci.* 2012 Aug 21;91(3-4):100-6. doi: 10.1016/j.lfs.2012.06.018. 査読有

9. Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection.

Murakami Y, Hoshi M, Hara A, Takemura M, Arioka Y, Yamamoto Y, Matsunami H, Funato T, Seishima M, Saito K. *Cytokine.* 2012 Aug;59(2):245-51. doi: 10.1016/j.cyto.2012.04.022. 査読有

10. High susceptibility to lipopolysaccharide-induced lethal shock in encephalomyocarditis virus-infected mice.

Ohtaki H, Ito H, Hoshi M, Osawa Y, Takamatsu M, Hara A, Ishikawa T, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. *Sci Rep.* 2012;2:367. doi: 10.1038/srep00367. 査読有

11. L-tryptophan-kynurenine pathway metabolites regulate type I IFNs of acute viral myocarditis in mice.

Hoshi M, Matsumoto K, Ito H, Ohtaki H, Arioka Y, Osawa Y, Yamamoto Y, Matsunami H, Hara A, Seishima M, Saito K. *J Immunol.* 2012 Apr 15;188(8):3980-7. doi: 10.4049/jimmunol.1100997. 査読有

12. Suppression of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by 1-methyltryptophan, an inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase.

Ogawa K, Hara T, Shimizu M, Ninomiya S, Nagano J, Sakai H, Hoshi M, Ito H, Tsurumi H, Saito K, Seishima M, Tanaka T, Moriwaki

H. *Cancer Sci.* 2012 May;103(5):951-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02237.x. 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

星 雅人 (HOSHI MASATO)
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・助教
研究者番号：40633996

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

齋藤 邦明 (SAITO KUNIAKI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：80262765

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