

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460675

研究課題名(和文) インドールアミン酸素添加酵素2による増殖制御機構が腫瘍細胞に及ぼす影響

研究課題名(英文) Antitumor efficacies of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 in lewis lung carcinoma mice model.

研究代表者

山本 康子 (Yamamoto, Yasuko)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号：00331869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インドールアミン酸素添加酵素2 (Indoleamine 2,3-dioxygenase 2; IDO2) は、トリプトファンをキヌレニンに代謝する酵素である。本研究ではIDO2の生理的機能を解析し、IDO2発現が腫瘍形成に及ぼす影響について明らかにする事を目的とした。IDO2のトリプトファン代謝能を検討するため、IDO2強発現細胞を作製したところ、キヌレニン量の増加が認められた。またマウス肺癌細胞を用いた担癌マウスモデルにおいて、野生型に比べIDO2 KOマウスでは、腫瘍体積の縮小およびサイトカインの分泌増強が認められた。本研究によりIDO2発現の抑制は、抗腫瘍効果を有する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) catabolizes tryptophan to kynurenine at the first step of tryptophan metabolism. Recently, in addition to IDO1, a new isoform called IDO2 was identified. The aim of this study was to observe the effect of IDO2 on the growth of transplanted lewis lung carcinoma (LLC) in mice. LLC cells were inoculated subcutaneously into the dorsal of WT (C57BL/6 mice) and IDO2 knock out (IDO2 KO) mice. All mice were sacrificed on day 15, and the tumors were obtained and weighed and the tumor inhibitory rate was calculated. Tumor growth was suppressed in the IDO2 KO mice compared to WT mice. The amount of Trp metabolites in serum of IDO2 KO mice did not change compared to WT mice. These data suggest that IDO2 control the tumor growth and therapeutic target of cancer.

研究分野：病態生化学

キーワード：IDO2 トリプトファン代謝 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)は、生体内におけるトリプトファン代謝の主要経路であるキヌレニン経路の初期反応を触媒するトリプトファン分解酵素である。IDO1は、インターフェロン γ (IFN- γ)などの炎症性サイトカインにより酵素誘導され、樹状細胞、マクロファージ、上皮細胞等で発現し、免疫調節因子として働いている。近年、IDO1に加えて、IDO1と45%のホモロジーを有したIDO2と呼ばれる新しいアイソフォームが同定された。IDO2はIDO1に比べてトリプトファン代謝活性が低い分子であり、これまでに樹状細胞で酵素誘導がみられること、また恒常的に脳、肝臓、腎臓、精巣上体など多くの組織に発現していることが我々の検討から明らかとなっている(Fukunaga M, Yamamoto Y J Histochem Cytochem. 2012 Nov;60(11):854-60)。しかし、IDO2の生体内での生理学的意義はいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、IDO2強発現培養細胞やIDO2遺伝子欠損マウスを用いた検討により、生体内でのIDO2の生理的機能を明らかにすることを目的とした。またこれまでにトリプトファン代謝は腫瘍免疫に深く関与していることが報告されている。そこで新規トリプトファン代謝酵素IDO2が腫瘍の悪性度に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) IDO2強発現細胞

マウスマクロファージ由来RAW264.7細胞にマウスIDO2遺伝子をトランスフェクションし、IDO2を強発現した細胞を作成した。細胞は37℃、5%CO₂条件下で10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養した。

2) IDO2遺伝子欠損マウス

IDO2遺伝子欠損マウスは、Knock Mouse project; KOMP (California, USA)より入手した。また野生型マウスは、C57BL/6(日本チャールズリバー)を使用した。本実験計画は藤田保健衛生大学動物実験委員会で承認され、藤田保健衛生大学動物実験指針およびPrinciples of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication, 85-23, 1985)に準じて行った。

3) マウス担癌モデル

C57BL/6マウスおよびIDO2遺伝子欠損マウスに 1×10^5 個のLewis肺癌(LLC)細胞(理化学研究所)を背側に皮下接種したモデルを用いた。接種後、経時的な体重変化および腫瘍体積の測定を行った。腫瘍接種後15日目に血清の採取および各種臓器の採取を行っ

た。

4) トリプトファン代謝産物測定

血清のトリプトファン代謝産物の測定は、10%過塩素酸(PCA)を用いて除タンパク後、上清を高速液体クロマトグラフィーLC-20AD (SHIMAZU, Kyoto, Japan)に50 μ l注入し、Tryptophan(Trp)、Kynurenine(Kyn)、Anthranilic acid (AA)、Kynurenic acid (KA)、3-Hydroxyanthranilic acid (3HAA)を測定した。移動相として、10mM酢酸ナトリウム(pH4.5)、0.5~1.25%アセトニトリルを調整し、流量を0.9ml/minに設定した。カラムはTSKgel ODS-100v 粒子径3 μ m 内径4.6mm \times 15cm (TOSOH, Tokyo, Japan)を用い、カラム温度40℃で測定を行った。Trp、Kynの測定には紫外線可視分光検出器SPD-20A (SHIMAZU, Kyoto, Japan)を用い、Trp測定はUV波長280nm、Kyn測定はUV波長365nmで行った。AA、KA、3HAA測定には蛍光検出器RF-10AXL (SHIMAZU, Kyoto, Japan)を用い、AA、3HAA測定は励起波長320nm、蛍光波長420nmで、KA測定は励起波長334nm、蛍光波長380nmで行った。

5) サイトカインの測定

血清サイトカイン測定はBio-Plex Pro mouse Cytokines Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)を用い27種類の各種サイトカイン量を測定した。測定項目は、Interleukin-1 β (IL-1 β)、IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、Eotaxin、Basic fibroblast growth factor (bFGF)、Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、Interferon- γ (IFN- γ)、IFN-inducible protein 10 (IP-10)、Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)、Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)、MIP-1 β 、Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB)、Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)である。

統計学的解析

データはすべて平均 \pm 標準偏差(mean \pm SD)で表記した。多群間比較にはKruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA)とDunn's testを用い、2群間比較にはPaired t testを用いた。P<0.05を統計学的に有意差ありと判断した。

4. 研究成果

IDO2 のトリプトファン代謝能を明らかにするため、IDO2 強発現細胞を作製し、培養上清中のキヌレニン量を測定したところ、キヌレニン量の増加が認められた(図1)。

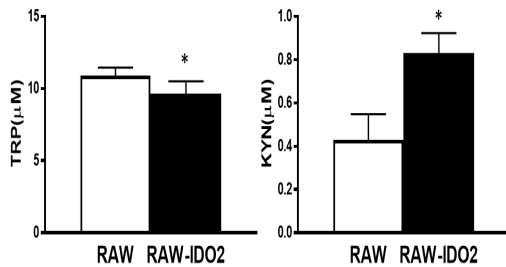


図1. IDO2 強発現による培養上清中のトリプトファン代謝産物の変化
IDO2 発現に伴い培養上清中のキヌレニン量の増加が認められた。

また IDO2 遺伝子欠損マウスの血清中トリプトファン代謝産物を測定したところ、野生型マウスに比べキヌレニン量の減少が認められた。培養細胞およびノックアウトマウスを用いた解析より IDO2 は生体内でのトリプトファン代謝に関与している機能的な蛋白質であることが明らかとなった。また IDO2 遺伝子欠損マウス由来マクロファージを培養したところ、野生型由来マクロファージの培養上清中キヌレニン量に比べ有意な減少が見られた。さらに IDO2 強発現細胞を用いて二次元電気泳動により、IDO2 の発現に伴い発現が変動する数種のタンパク質を同定した。

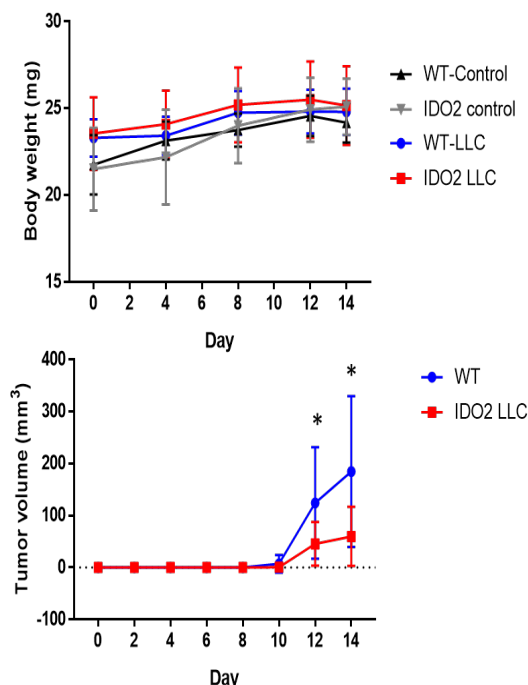


図2. マウス担癌モデルにおける検討
IDO2KO マウスにおいて腫瘍の縮小効果が認められた。

これまでにトリプトファン代謝と腫瘍免疫は、様々な報告がなされており、各種腫瘍での IDO1 の発現増加が腫瘍の悪性度に関与していることが報告されている。そこで、IDO2 遺伝子欠損マウスを用いて、IDO2 が腫瘍の悪性度に及ぼす影響について明らかにすることを目的として、以下の検討を行った。モデルとしては、マウス肺癌細胞 (Lewis lung carcinoma cell line; LLC) を用いた皮下接種担癌マウスモデルを用いた。腫瘍接種後経時的に体重と腫瘍体積の測定を行ったところ、体重に変動は見られなかったが、IDO2 遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ腫瘍の有意な縮小がみられた(図2)。

また腫瘍接種 15 日後の血清トリプトファン代謝産物の測定を行ったところ、IDO2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスにおいてトリプトファン量およびキヌレニン量において差は認められなかった。また血清中のサイトカインを測定したところ IDO2 遺伝子欠損マウスでの RANTES の分泌量の亢進が認められた。

本研究により IDO2 は生体内のトリプトファン代謝に関与し、IDO2 発現の抑制は、抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。

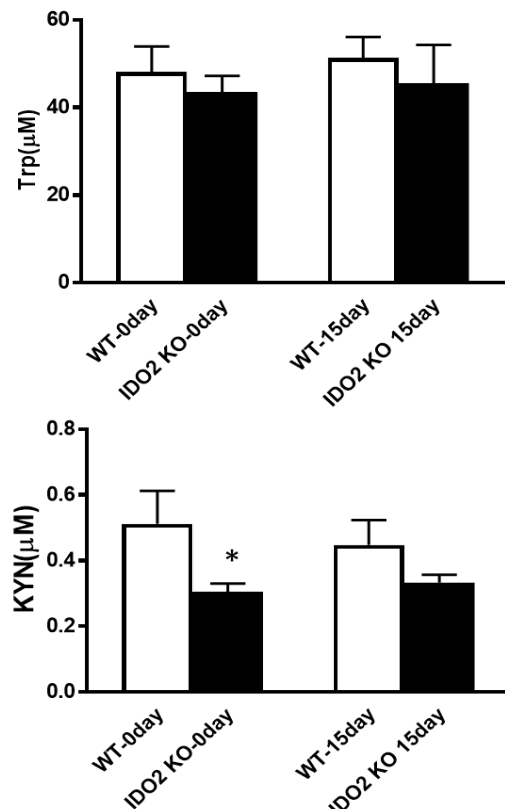


図3. マウス担癌モデルにおけるトリプトファン代謝産物の変動
腫瘍の接種によりトリプトファン代謝産物量に変動は認められなかった。

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 5 件)

Kubo H, Hoshi M, Mouri A, Tashita C, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K. Absence of kynurenine 3-monooxygenase reduces mortality of acute viral myocarditis in mice. Immunol Lett.181:94-100(2017). <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.11.012> 査読有

Fujigaki H, Yamamoto Y, Saito K. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. Neuropharmacol. 112 ; 264-274(2016). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.011> 査読有

Ohta Y, Kubo H, Yashiro K, Ohashi K, Tsuzuki Y, Wada N, Yamamoto Y, Saito K. Effect of water-immersion restraint stress on tryptophan catabolism through the kynurenine pathway in rat tissues., J Physiol Sci 2016 (In press). DOI: 10.1007/s12576-016-0467-y. 査読有

Murakami Y, Ishibashi T, Tomita E, Imamura Y, Tashiro T, Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y, Mitani S, Fujigaki H, Ohta Y, Kubo H, Mamiya T, Nabeshima T, Kim HC, Yamamoto Y, Saito K. Depressive symptoms as a side effect of Interferon- α therapy induced by induction of indoleamine 2,3-dioxygenase 1. Sci Rep 6, 29920 (2016) doi:10.1038/srep29920 査読有
Tashiro T, Murakami Y, Mouri A, Imamura Y, Nabeshima T, Yamamoto Y, Saito K. Kynurenine 3-monooxygenase is implicated in antidepressants-responsive depressive-like behaviors and monoaminergic dysfunctions. Behav Brain Res. 317:279-285 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.050> 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 勅使河原知明、久保緋紗子、毛利彰宏、鍋島俊隆、尾崎紀夫、山本康子、斉藤邦明
周産期抑うつにおけるトリプトファン代謝関連分子の変化
第 56 回日本臨床化学学会学術大会
2016 年 12 月 熊本県民交流館パレア熊本
2. 久保緋紗子、星雅人、毛利彰宏、田下

智恵子、勅使河原知明、山菅和加菜、和田直也、山本康子、鍋島俊隆、斉藤邦明
第 37 回日本トリプトファン研究会学術集会
2016 年 12 月 東京農業大学
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

- (1)研究代表者 山本康子
(YAMAMOTO, Yasuko)
藤田保健衛生大学大学院・医療科学研究科
・準教授
研究者番号：00331869
- (2)連携研究者 斉藤 邦明
(SAITO, Kuniaki)
藤田保健衛生大学大学院・医療科学部
・教授
研究者番号：80262765