

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860376

研究課題名(和文) マウス転移性腫瘍モデルにおけるIDO阻害によるNKT細胞免疫療法の効果と病態解析

研究課題名(英文) The effects of NKT cell-mediated immunotherapy by IDO inhibitor in mouse lung metastasis model

研究代表者

星 雅人(Hoshi, Masato)

藤田保健衛生大学・医療科学部・講師

研究者番号：40633996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：-GalCerを投与した野生型、IDO1KO、IDO2KO、IDO1またはIDO2阻害剤投与マウスにB16F10細胞を静脈注射で移入し、2週間後の肺転移モデルを作製した。肺転移巣におけるIDO1、2のmRNAおよび蛋白レベルの増加が確認された。さらに、IDO1、2のKOマウスまたは阻害剤投与マウスにおいて抗腫瘍効果を確認したところ、野生型マウスと比較して、IDO1阻害では有意に腫瘍量の減少を認めた。一方で、IDO2阻害では腫瘍量の減少を認めなかった。各マウスの肺内トリプトファン代謝産物を測定したところ、IDO1の阻害では代謝産物の有意な減少を認めたが、IDO2の阻害では認められなかった。

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 -GalCer administrated mice of wild type (WT), IDO1 KO, IDO2 KO, and mice treated with 1-methyl-D or L-tryptophan (D or L-1MT), an inhibitor of Ido1 or Ido2 respectively, to study the importance of Trp-Kyn pathway metabolites. The levels of Ido1 and Ido2 mRNA and protein expression in the lung from WT mice were significantly higher than those from non-injected WT mice. The anti-tumor effect in the lung from IDO1 KO mice or L-1MT treated mice was markedly improved compared to that in WT mice, IDO2 KO mice, and D-1MT treated mice. Moreover, the levels of Trp metabolites in lung from IDO1 KO mice or L-1MT treated mice was significantly decreased compared to that in lung from WT mice, IDO2 KO mice, and D-1MT treated mice.

研究分野：病態検査学

キーワード：インドールアミン酸素添加酵素1、インドールアミン酸素添加酵素2、トリプトファン代謝産物、B16F10細胞、抗腫瘍効果、細胞免疫療法

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 IDO1 または IDO2 に着目し、これらの酵素により生成される代謝産物が NKT 細胞活性リガンド投与により誘導される免疫制御の影響を解明することを目的とした。

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 C57BL6/J (8 週齢、オス) の野生型マウス(WT)、IDO1 遺伝子欠損マウス(IDO1 KO)および IDO2 遺伝子欠損マウス(IDO2 KO)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 に腫瘍投与 2 日前より経口投与した(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 細胞活性リガンドである α -GalCer (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を B16 細胞移入 1 週間後に腹腔内に単回投与した。

(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, IDO2, Kyn 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の測定

各種マウスにおいて、B16 細胞移入後 1 週間で 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、キヌレン酸、アントラニール酸、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニール酸)を高速液体クロマトグラフィーで測定した。さらに、B16 細胞移入後 2 週間での肺内トリプトファン代謝産物を測定した。

(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。すなわち、NKT 活性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 投与群では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。IDO1 mRNA 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。IDO2 mRNA 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、腫瘍移入群での IDO1 および IDO2 は B16 細胞でそれぞれ強陽性および弱陽性を示した。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 ID0 発現細胞を同定する予定である。

(3) 腫瘍細胞による ID0 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、ID01 KO マウス、ID02 KO マウス、ID01 の阻害剤である 1-methyl-L-tryptophan (L-1MT) および ID02 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。ID01 KO マウスおよび ID01 阻害剤と -GalCer の併用投与群では -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、-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、-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 ID01 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。一方、ID02 KO マウスおよび ID02 阻害剤と -GalCer の併用投与群では -GalCer 単独投与群と比較して肺/体重比が減少傾向はあったが有意な差は認めなかった。病理組織学的検索においても同様の結果であった。

(4) ID0 の制御により、腫瘍縮小所見が得られたが、ID0 酵素誘導により肺内でのトリプトファン代謝産物の変化は明らかではない。特に、複数の代謝産物があるため、主として腫瘍免疫に影響している代謝産物を同定するために、高速液体クロマトグラフィーを用いた一斉測定系を確立した。WT マウスにおいて、腫瘍投与後 2 週間の肺臓内代謝産物量を測定したところ、キヌレニンおよび 3-ヒドロキシキヌレニンが未投与群の WT マウスと比較して有意に増加していた。同様に、ID01 KO マウス、ID02 KO マウスおよび ID01 または 2 阻害剤投与マウスにおいて肺内代謝産物量を測定したところ、ID01 KO マウスおよび ID01 阻害剤投与マウスでは、キヌレニンおよび 3-ヒドロキシキヌレニンが WT マウスと比較して有意に減少していた。ID02 KO マウスおよび ID02 阻害剤投与マウスではこれら代謝産物量に有意な差を認めなかった。すなわち、ID0 制御による抗腫瘍効果の影響にはトリプトファン代謝産物が深く関与していることが示唆された。

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 ID0 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 ID01 が活性化され、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 活性化リガ

ンド投与により誘導された ID0 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 3 件)

1. Absence of kynurenine 3-monooxygenase reduces mortality of acute viral myocarditis in mice.

Kubo H, Hoshi M, Mouri A, Tashita C, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K.

Immunol Lett. 2017 Jan;181:94-100. doi: 10.1016/j.imlet.2016. 査読有

2. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression alters immune response in colon tumor microenvironment in mice.

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

Cancer Sci. 2015 Aug;106(8):1008-15. doi: 10.1111/cas. 査読有

3. Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation.

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

Neurosci Lett. 2015 Apr 10;592:107-12. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.061. 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. A rapid and highly sensitive method to evaluate the quinolinic acid using recombinant enzymes with HPLC-Fluorescence detection

Fujigaki H, Sakamoto-Morise A, Fujigaki S, Hirabayashi-Takahashi K, Hoshi M, Yamamoto Y, Sanford P. Markey, and Saito K

14th International Society for Tryptophan Research, Grand Rapids, USA, 2015.9.16-18. 査読有

2. Blockade of Indoleamine 2,3-dioxygenase reduces mortality from peritonitis and sepsis in mice by regulating function of CD11b+ peritoneal cells

Hoshi M, Osawa Y, Ito H, Seishima M, Saito K

14th International Society for Tryptophan Research, Grand Rapids, USA, 2015.9.16-18.

査読有

3. マウス致死性敗血症モデルにおけるインドールアミン酸素添加酵素の役割について
星 雅人 久保 緋紗子 毛利 彰宏 勅使河原 知明 山菅 和可奈 和田 直也 山本 康子 鍋島 俊隆 齋藤 邦明
第37回日本トリプトファン研究会学術集会，東京，2016.12.10-11. 査読有

4. 久保 緋紗子 星 雅人 毛利 彰宏 勅使河原 知明 山菅 和可奈 和田 直也 山本 康子 鍋島 俊隆 齋藤 邦明
第37回日本トリプトファン研究会学術集会，東京，2016.12.10-11. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/teacher/health/e-health/m-hoshi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

星 雅人 (HOSHI, Masato)
藤田保健衛生大学・医療科学部・講師
研究者番号：40633996

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

清島 満 (SEISHIMA, Mitsuru)
齋藤 邦明 (SAITO, Kuniaki)
伊藤 弘康 (ITO, Hiroyasu)
原 明 (HARA, Akira)