

氏名 (本籍)	星 雅 人 (新潟県)		
学位の種類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第	835	号
学位授与日付	平成 22 年 9 月 30 日		
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	The absence of indoleamine 2, 3-dioxygenase upregulates type I interferon production resulting in suppression of viral replication in retrovirus-infected mouse		
審 査 委 員	(主査) 教授	高 見	剛
	(副査) 教授	森 脇 久 隆	教授 中 島 茂

### 論文内容の要旨

レトロウイルス感染症により引き起こされる免疫不全症の増加は、現在世界でも共通の問題となりつつあり、その免疫機構の解明は極めて重要である。近年、必須アミノ酸であるトリプトファン代謝の律速酵素であるインドールアミン酸素添加酵素 (IDO) は、炎症性サイトカインで誘導され、重要な免疫制御因子として注目されている。IDO は腫瘍細胞や種々のウイルス感染症においてマクロファージおよび樹状細胞で発現するが、詳細な役割は未だ明らかではない。

本研究は、マウスレトロウイルスである LP-BM5 ウイルスを、IDO 遺伝子欠損マウスおよび IDO 阻害薬投与マウスに感染させ、IDO による免疫制御機構の解明を試みた。

#### 【対象と方法】

4 週齢の C57BL/6j 野生型マウス (WT), IDO 遺伝子欠損マウス (IDO-KO) および IDO 阻害薬投与マウス (I-MT) に LP-BM5 ウイルスを腹腔内投与した。LP-BM5 ウイルス感染後、WT マウスにおいて、血清中トリプトファン代謝産物を高速液体クロマトグラフィーで解析し、同時に脾臓での IDOmRNA を定量的 RT-PCR 法で、IDO 蛋白の発現量および発現細胞を、western blotting 法および病理組織標本での蛍光二重染色 (抗 IDO, 抗 CD11c 抗体) にて確認した。次に、IDO-KO および I-MT からの脾臓を使用し、WT との炎症性および抑制性サイトカインの mRNA とタンパク量の比較を定量的 RT-PCR 法および ELISA 法で、同時に細胞種類を Flow cytometry 法により比較した。さらに、LP-BM5 ウイルス感染後 8 週での脾臓中 LP-BM5 ウイルスコピー数を定量的 RT-PCR 法で解析し、IDO-KO からの脾細胞より CD11c 陽性細胞を単離し、*ex vivo* で type I IFN 中和抗体と培養し、ウイルス増殖抑制効果を判定した。生存率の比較は、*Toxoplasma gondii* と LP-BM5 の二重感染モデルあるいは、LP-BM5 単独感染モデルを作成した。検定は、2 群間の比較は t 検定を、3 群間以上の比較には一元分散分析で検定した。生存率の比較は、Kaplan-Meier 法 Log rank 試験にて検定した。p<0.05 の場合を統計的有意差ありと判定した。

#### 【結果】

- ① LP-BM5 ウイルス感染後 WT において、血清中 L-キヌレニン は感染後 8 週で未感染マウスと比較して有意に増加しており、同時にトリプトファンは有意に低下していた。また、脾臓中 IDOmRNA, IDO 酵素活性および IDO タンパク量は感染後 2 週で有意に増加していた。さらに、感染後 8 週の脾臓において、特に CD11c 陽性細胞で IDO が発現していた。
- ② WT および IDO-KO に LP-BM5 感染後、脾臓中抑制性サイトカインおよび type I インターフェロン

(type I IFNs) の mRNA 量を比較した。抑制性サイトカインに有意な差を認めなかったが、感染後 8 週の ID0-KO の type I IFNs mRNA 量は顕著に増加していた。さらに、CD11c 陽性細胞の培養上清中の type I IFNs 産生量は WT に比較して ID0-KO および 1-MT において有意に増加していた。

- ③ Type I IFNs の産生細胞の検討では、形質細胞様樹状細胞が WT と比較して ID0-KO で有意に増加していた。実際、ID0-KO の脾細胞増殖能は、ConA 刺激下で WT より有意に増加していた。
- ④ LP-BM5 ウイルス量は、感染後 8 週で ID0-KO および 1-MT 脾臓中のウイルス量は WT より有意に低下していた。さらに、ID0-KO および 1-MT において増加した type I IFNs の抗ウイルス作用を確認するために、WT および ID0-KO からの脾細胞と type I IFNs の中和抗体で培養したところ、中和抗体添加群において、有意にウイルス量が増加した。
- ⑤ LP-BM5 単独感染あるいは LP-BM5 と *T. gondii* の二重感染モデルを使用して生存率の比較を行った。LP-BM5 単独感染モデルにおいて ID0-KO は WT と比較して生存率が増加傾向にあった。また、二重感染モデルにおいて、ID0-KO および 1-MT は WT より有意に生存率の増加を示した。

#### 【考察】

本研究において、マウスレトロウイルス感染における ID0 の欠損および阻害は、脾臓中での形質細胞様樹状細胞増加による type I IFNs の増加によって、ウイルス量を抑制していることが確認された。実際、ID0 の増加は局所トリプトファン低下により種々の細胞における細胞周期を変化させ細胞死に導く作用があること、さらに、トリプトファン代謝産物における直接的な細胞毒性により細胞死を引き起こすことが知られている。HIV をはじめ、レトロウイルス感染症の免疫制御機構は未だ明らかではなく、本研究において、レトロウイルス感染におけるトリプトファン代謝という新しい免疫制御機構の一つを解明したことは、新しい治療戦略および創薬に極めて重要であると考えられた。

#### 【結論】

LP-BM5 感染マウスにおいて、ID0 の欠損および阻害は type I IFNs を増加させ、ウイルス量を抑制することを示した。結果として、トリプトファン代謝は形質細胞様樹状細胞の成熟あるいは細胞死に極めて重要な役割を果たしていると考えられた。今後は、トリプトファン代謝と樹状細胞の制御機構の解明が必要である。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 星 雅人は、LP-BM5 感染マウスにおいて、ID0 の欠損および阻害は type I IFNs を増加させ、ウイルス量を抑制することを明らかにした。本研究は、レトロウイルス感染症における免疫制御機構の一端を解明したもので、免疫学ならびに病態情報解析医学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Masato Hoshi, Kuniaki Saito, Akira Hara, Ayako Taguchi, Hirofumi Ohtaki, Ryo Tanaka, Hidetsugu Fujigaki, Yosuke Osawa, Masao Takemura, Hidetoshi Matsunami, Hiroyasu Ito, Mitsuru Seishima : The absence of indoleamine 2, 3-dioxygenase upregulates type I interferon production resulting in suppression of viral replication in retrovirus-infected mouse  
Journal of Immunology 185, 3305-3312 (2010)