

平成 2 9 年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）交付申請書

平成 2 9 年 4 月 5 日

独立行政法人
日本学術振興会理事長 殿

所属研究機関の本部の 所在地及び名称	〒 4 7 0 - 1 1 9 2 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1 番地 9 8		
	名称 藤田保健衛生大学		
所属研究機関の長の 職名・氏名	職名 学長	氏名 星長 清隆	
研究代表者の部局名（番号）・ 職名（職番号）・研究者番号	部局番号： 618 部局名 医療科学部	職番号： 22 職名 講師	研究者番号： 40633996
	フリガナ ホシ マサト 研究代表者の氏名 星 雅人 印		

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）（若手研究(B)）について、
次のとおり交付を申請します。なお、交付された助成金は、交付条件に従い適正に使用します。

研究課題名	転移性腫瘍におけるトリプトファン代謝酵素制御による新規免疫療法の確立と病態解析
補助事業期間	平成 2 9 年度 ~ 平成 3 1 年度

助成金額（交付予定額）	直接経費合計		間接経費合計		直接経費と間接経費の合計（ + ）		
	3,300,000 円		990,000 円		4,290,000 円		
	年度別・費目別 内訳	直接経費（円）					間接経費 （円）
		物品費	旅費	人件費・謝金	その他	計	
	平成 2 9 年度	800,000	100,000	0	200,000	1,100,000	330,000
	平成 3 0 年度	900,000	200,000	0	0	1,100,000	330,000
	平成 3 1 年度	600,000	200,000	0	300,000	1,100,000	330,000
	平成 3 2 年度	0	0	0	0	0	0
	平成 3 3 年度	0	0	0	0	0	0
合計	2,300,000	500,000	0	500,000	3,300,000	990,000	

主要な物品の内訳（1 品又は 1 組若しくは 1 式の価格が 5 0 万円以上のもの）

品名	仕様 （製造会社名・型）	数量	単価 （円）	金額 （円）	納入予定時期
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月
					平成 年 月

キーワード	ID O 1	ID O 2	B 1 6 F 1 0	K M O	トリプトファン代謝産物
機関番号	33916	研究種目	若手研究(B)	課題番号	17K15785

経費管理担当者・部局・職・氏名	部局・職 研究支援推進センター・課長	氏名 杉山 賢祐	(1 / 3)
-----------------	-----------------------	-------------	-----------

（注）・印刷に当たっては、A 4 判（縦長）・両面印刷すること。

研究の目的

近年、抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体等を用いた治療は、種々の腫瘍細胞に対する免疫チェックポイント阻害剤として高い効果が得られている。一方で、腫瘍細胞の種類あるいは進行度によっては十分な効果が得られず、他の免疫制御因子の解明が早急の課題である。本研究は、腫瘍細胞に対する免疫細胞の誘導や活性を強力に制御し、周囲免疫応答から逃避させることで注目されている各種トリプトファン代謝酵素により生成される代謝産物に着目し、腫瘍の微小環境における免疫逃避機構の解明と効果の期待できる集団を弁別する検査法の確立を主たる目的とする。

平成 29 年度の研究実施計画

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WT及びID01-KO、ID02-KO、KMO-KO、QPR T-KOを使用する。また各種酵素阻害剤としてWTにD-1-MT、L-1MT、Ro 61-8048、INCB024360等を経口または腹腔投与する。転移性腫瘍モデルは、各種セルライン（B16、EL-4、LLC）を尾静脈に投与（ 5×10^5 及び $1 \times 10^6/200 \text{ } \mu\text{l}$ ）し、肺転移モデルを作製する。

各種臓器におけるトリプトファン代謝関連酵素の発現・活性：腫瘍発症WTにおける各種組織（肺臓、肝臓及びリンパ節等）及び発現臓器より単離した各種細胞（マクロファージ、樹状細胞等）のトリプトファン代謝関連の各種酵素の発現・活性をリアルタイムRT-PCR法、フローサイトメトリー法、免疫組織化学染色（抗ID01、ID02、KMO、QPR抗体、抗キヌレニン抗体等）及びWestern blotting法を用いて同定する。

腫瘍に対する阻害剤及び遺伝子欠損の効果判定：セルライン投与後、WT、各種KOマウス及び阻害剤投与マウスにおける生存率の比較、転移巣を中心とした腫瘍量の検索を病理組織所見（免疫組織化学染色、免疫蛍光抗体法）、フローサイトメーター、in vivo イメージャーおよび組織重量・容積により評価する。

トリプトファン代謝産物、サイトカインおよびNKT細胞の経時的変化：WT、各種KOマウス及び阻害剤投与マウスにおいて、セルライン投与後 1, 3, 7, 14日で採血を行い、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、3 - ヒドロキシキヌレニン、3 - ヒドロキシアントラニル酸等）を高速液体クロマトグラフィーで、サイトカイン量はIL-12及びIFN- γ を中心にELISA法で分析する。同時に、NKT細胞数および申請者がすでに所持している腫瘍特異ペプチドを用いて、腫瘍特異的CTL細胞数をフローサイトメーターで解析する。

平成 30 年度の研究実施計画

IFN- γ 産生細胞数およびCTL誘導による細胞障害性試験

WT及び各種KOマウスの肺臓またはリンパ節等の転移巣より単核細胞を分離し、ELISPOTアッセイによりIFN- γ 陽性細胞数を定量する。同様に、クロムリリースアッセイにより、腫瘍特異的CTLの細胞障害能を評価する。

CTL誘導及び腫瘍増殖シグナル経路に及ぼすトリプトファン代謝産物の影響

CTL及びNKT細胞等の誘導阻害による腫瘍の免疫逃避機構にトリプトファン代謝産物の関与が予想される。したがって、抗腫瘍免疫効果の得られたKOマウスより単離した細胞にin vitroで欠乏した各種トリプトファン代謝産物を添加した群と無添加群での細胞障害能及び誘導効率をクロムリリースアッセイ及びフローサイトメーターを用いて比較検討する。また、サイトカイン産生シグナル(NF- κ B等)や腫瘍増殖シグナル(Ras等)及びセルサイクルをWestern blotting法やフローサイトメトリー法で解析する。

平成 3 1 年度の研究実施計画

各種酵素阻害剤による抗腫瘍効果の判定と投与法

これまでに得られた知見を基に、各種酵素阻害剤（D-1MT、L-1-MT、DL-1-MT、Ro 61-8048、INCB024360等）の投与方法についても検討する。阻害剤の直接投与経路（経口、腹腔、静脈注等）や投与量を検討する。さらに、新規阻害剤の候補分子の探索スクリーニング法が確立しており、多種類のフィトケミカルを用いてより効果的かつ有害事象のない阻害剤の開発も目指す。フィトケミカルはすでに抽出したストックを数百種類所持しており、研究協力者の内諾はすでに得られている。

阻害剤効果応答群と不応等群判別法の確立

抗腫瘍効果にはトリプトファン代謝産物量が深く関与していることが予想され、本代謝産物を迅速かつ正確に測定することは新規治療戦略に介入する検査として極めて重要である。HPLCを使用したトリプトファン代謝産物の一斉測定を確立し、抗腫瘍効果を期待できる群のカットオフ値（各種トリプトファン代謝産物値によるインデックス解析も視野に入れる）を求め、トリプトファン代謝のどの酵素を阻害すれば抗腫瘍応答が得られるかを弁別し、阻害剤の適切な投与量を決定する。in vitroで抗腫瘍効果とインデックス解析を行い、可能であれば臨床検体での解析も視野に入れている。

藤田医科大学
医療科学部・臨床検査学科
齋藤 邦明 様

2018 年 3 月 14 日

ご応募いただきました、2018 年度 教員研究助成費につきまして、審査の結果、
下記の通り採択となりましたので通知いたします。

【 記 】

2018 年度藤田医科大学教員研究助成費(領域単位)

タイトル「トリプトファン代謝産物が抑うつ病態に与える影響について」

交付額 450,000 円

決定された交付額にて交付申請書をご作成頂き、下記提出先宛にメール添付で
ご提出ください。

<提 出 先> 研究支援推進センター事務部 研究費管理課
メールアドレス : kenkanri@fujita-hu.ac.jp

<提出書類> 交付申請書(画面最下 書類一覧 No 3)
<https://info2.fujita-hu.ac.jp/rpsc-kanri/post-3.html>

<提出期限> 2018 年 3 月 28 日(水) 17:00

以上

研究支援推進センター事務部研究費管理課
担当: 杉山 賢祐(内線 2906)
Email: kenkanri@fujita-hu.ac.jp
