

# 博士論文

## 表現型スクリーニングによる IDO1/TDO 二重阻害化合物の発見

### **Discovery of a novel dual inhibitor of IDO1 and TDO by phenotypic screening**

本論文は、静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府 博士論文である

2023 年 3 月

March 2023

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士後期課程  
薬科学専攻 創薬探索センター

吉岡 紗衣子

YOSHIOKA Saeko

## 目次

序論 .....	1
第一章 表現型スクリーニングに用いる細胞の TDO 発現制御メカニズム解析 .....	7
1-1 実験材料及び実験方法 .....	7
1-1-1 実験材料 .....	7
1-1-2 実験機器、解析ソフト .....	10
1-1-3 細胞培養 .....	10
1-1-4 細胞における Kyn 産生量の測定 .....	10
1-1-5 細胞生存率の測定 .....	11
1-1-6 TDO 酵素、IDO1 酵素の Kyn 産生量の測定 .....	11
1-1-7 RT-qPCR による遺伝子発現解析 .....	12
1-1-8 ウェスタンブロッティングによるタンパク発現解析 .....	13
1-1-9 RNA 干渉による遺伝子ノックダウン .....	13
1-1-10 統計解析 .....	13
1-2 実験結果と考察 .....	14
1-2-1 表現型スクリーニングに用いる細胞株の選択 .....	14
1-2-2 A172 細胞における TDO 発現制御メカニズムの解析 .....	15
1-2-3 他がん細胞種における MEK/ERK 経路による TDO 発現制御の検証 .....	21
1-3 小括 .....	22
第二章 IDO1/TDO 二重阻害化合物の同定 .....	24
2-1 実験材料及び実験方法 .....	24
2-1-1 実験材料 .....	24
2-1-2 実験機器、解析ソフト .....	26
2-1-3 細胞培養 .....	26
2-1-4 Kyn 産生量の測定 .....	26
2-1-5 細胞生存率の測定 .....	26
2-1-6 ヒト TDO および IDO1 酵素の Kyn 産生量の測定 .....	26
2-1-7 ウェスタンブロッティングによるタンパク発現解析 .....	26
2-1-8 分子ドッキング法による分子シミュレーション .....	26
2-1-9 iNOS 酵素に対する阻害活性評価 .....	27
2-1-10 カイネティクス解析 .....	27
2-1-11 統計解析 .....	27

2-2 実験結果と考察.....	28
2-2-1 イソチオウレア誘導体ライブラリーの表現型スクリーニングの実施.....	28
2-2-2 PVZB3001 の IDO1/TDO 二重阻害作用と選択性の検証.....	30
2-2-3 PVZB3001 の IDO1/TDO 二重阻害作用の作用機序の検証.....	33
2-2-4 PVZB3001 の阻害様式の検証.....	34
2-3 小括.....	37
<b>第三章 IDO1/TDO 二重阻害化合物の抗腫瘍効果の検証 .....</b>	<b>39</b>
3-1 実験材料及び実験方法.....	39
3-1-1 実験材料 .....	39
3-1-2 実験機器 .....	40
3-1-3 細胞培養 .....	40
3-1-4 Kyn 産生量の測定.....	40
3-1-5 細胞生存率の測定.....	41
3-1-6 NK 細胞の細胞生存率と細胞障害活性の定量.....	41
3-1-7 in vivo における抗腫瘍活性評価 .....	41
3-1-8 統計解析 .....	42
3-2 実験結果と考察.....	42
3-2-1 IDO1/TDO 二重陽性細胞における Kyn 産生阻害活性の評価 .....	42
3-2-2 Kyn 産生阻害の NK 細胞の増殖や機能に対する作用の検証.....	44
3-2-3 in vivo モデルにおける抗腫瘍効果の検証.....	46
3-3 小括.....	49
<b>総括 .....</b>	<b>51</b>
<b>謝辞 .....</b>	<b>54</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>55</b>

## 略語

AhR: aryl hydrocarbon receptor

$\alpha$ -MEM: alpha minimum essential medium

ARNT: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

BH<sub>4</sub>: tetrahydrobiopterin

Bin1: bridging integrator 1

Cas9: CRISPR associated protein 9

C/EBP $\beta$ : CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$

COX2: cyclooxygenase 2

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CTL: cytotoxic T-lymphocyte

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

CYP: cytochrome P450

DC: dendritic cell

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DTT: DL-dithiothreitol

EP4: prostaglandin E<sub>2</sub> receptor 4

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FAD: flavin adenine dinucleotide

FBS: fetal bovine serum

FMN: flavin mononucleotide

GAS: IFN- $\gamma$ -activated site

GCN2: general control non-derepressible 2

HEPES: 4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid

IDO1: indoleamine 2,3-dioxygenase 1

IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$

iNOS: inducible nitric oxide synthase

IL-6: interleukin-6

IL-10: interleukin-10

JAK1: Janus kinase 1

JAK2: Janus kinase 2

Kyn: kynurenine

L-1MT: L-1-methyltryptophan

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MDSC: myeloid-derived suppressor cell

MEK: mitogen-activated protein kinase kinase

mIDO1: mouse IDO1  
MOE: molecular operating environment  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NK: natural killer  
PBS: phosphate-buffered saline  
PDB: protein data bank  
PD-1: programmed death receptor 1  
PD-L1: programmed death receptor ligand 1  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandin E<sub>2</sub>  
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase  
PROTAC: proteolysis targeting chimera  
PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10  
rhIDO1: recombinant human IDO1  
rhTDO: recombinant human TDO  
RIPA: radio-immunoprecipitation assay  
miNOS: mouse iNOS  
RTK: receptor tyrosine kinase  
RT-qPCR: realtime-quantitative PCR  
siRNA: small interfering RNA  
STAT1: signal transducers and activators of transcription 1  
STAT3: signal transducers and activators of transcription 3  
SD: standard deviation  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
TBS-T: Tris Buffered Saline with Tween20  
TDO: tryptophan 2,3-dioxygenase  
TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$   
Treg: regulatory T-cell  
Trp: tryptophan

## 序論

### がん免疫療法

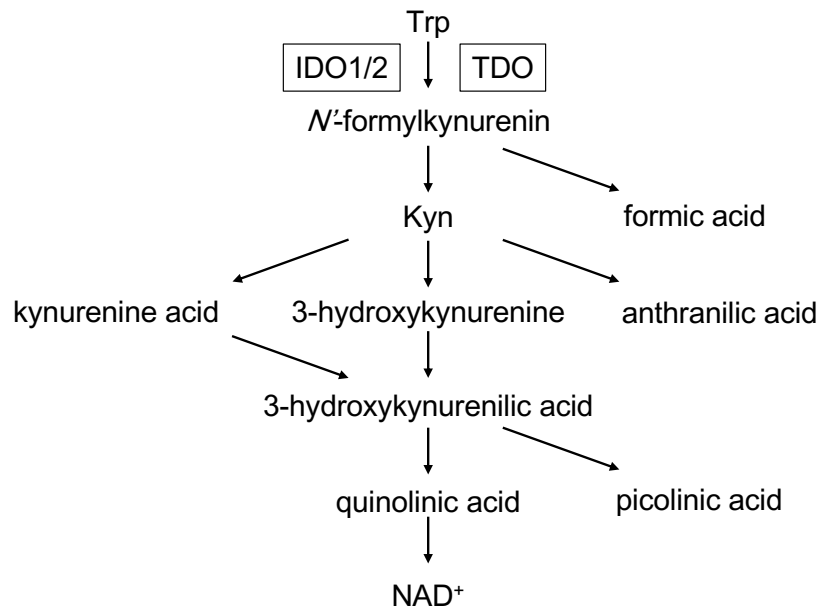
従来の増殖性の細胞をターゲットとする放射線療法や化学療法は、正常細胞にも作用し、強い副作用を示す。正常細胞への毒性を解決するためにがん細胞に特異的な分子を標的とする分子標的薬の開発が進んできたが、一部薬剤に不応の腫瘍が存在すること、使用するうちに腫瘍が薬剤耐性を示すようになるといった課題が残る<sup>1</sup>。

近年、別のアプローチとして免疫チェックポイント阻害剤を始めとするがん免疫療法が注目されている<sup>2</sup>。がん細胞は通常、腫瘍抗原分子や natural killer (NK) 細胞受容体リガンドなどの免疫原性分子を発現することから非自己として認識され、免疫システムにより排除される。しかし、変異を繰り返す中で免疫原性の低いがん細胞の出現や、免疫応答を弱める機構の活性化により、がん細胞の増殖に有利ながん微小環境が構築され、積極的に免疫を回避し増殖するようになることが知られている<sup>3</sup>。がん免疫療法はこの腫瘍特異的な免疫抑制機構を正常化し、がん細胞の増殖を抑える手法である<sup>2</sup>。Programmed death receptor 1 (PD-1) や programmed death receptor ligand 1 (PD-L1)、cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) を標的とする免疫チェックポイント阻害剤は、治療効果が得られた患者では長期の奏功が見られるものの、治療効果が得られる患者が2~3割程度に限られる点や投与を続けるうちに腫瘍が治療抵抗性を示すようになる点、また抗体医薬であるため非常に高価である点がボトルネックとなっている<sup>4</sup>。そのため、がん免疫の別の機構を標的とし、抗体医薬と比較して安価で侵襲性の低い低分子医薬の開発が求められている。

### Kynurenine 経路と免疫寛容

がん細胞での要求性が高いことで知られる必須アミノ酸の一つである tryptophan (Trp) は主に kynurenine (Kyn) 経路によって代謝される (Figure 1A)。Kyn 経路の律速酵素である indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) および tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) はヘム鉄を活性中心に含み、L-Trp のインドール環に直接酸素原子を挿入、切断する反応を触媒し、N<sup>1</sup>-formylkynurenine に変換する<sup>5</sup> (Figure 1B)。

**A**



**B**

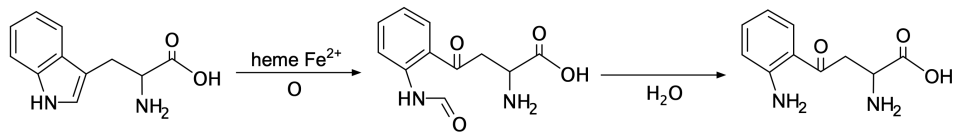


Figure 1 Kyn 経路と Trp 代謝反応  
(A) Kyn 経路と (B) Trp 代謝反応を示した。

腫瘍には免疫系を抑制し、がんの進行を促進する複数のメカニズムが知られているが、中でも腫瘍微小環境における Kyn 経路の活性化は、免疫寛容の重要なメカニズムであり、がんの進行を促進する<sup>6,7</sup>。そのため Kyn 経路は新たな創薬標的として注目されている。

Kyn は aryl hydrocarbon receptor (AhR) の内因性リガンドとして作用し、AhR を活性化する<sup>8</sup>。AhR はリガンド依存性転写受容体であり、interleukin-6 (IL-6) や interleukin-10 (IL-10) などの標的遺伝子のプロモーター領域にある応答エレメントに結合する aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。AhR は樹状細胞 (dendritic cell, DC)、マクロファージ、NK 細胞、自然リンパ球、細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T-lymphocyte, CTL)、17 型ヘルパー T 細胞、22 型ヘルパー T 細胞を抑制し、制御性 T 細胞 (regulatory T-cell, Treg) や骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) などの免疫抑制系細胞を活性化する<sup>4</sup>。つまり、Kyn は AhR の活性化を介して、NK 細胞やエフェクター CD4<sup>+</sup> T 細胞、CTL の増殖や機能を抑制し、Treg や MDSC を活性化することで免疫を抑制する (Figure 2)。

また IDO1、TDO の過剰発現によるトリプトファンの枯渇により、遊離 t-RNA が上昇し、general control non-derepressible 2 (GCN2) の活性化や mammalian target of rapamycin (mTOR) の抑制を介して T 細胞の増殖や分化の抑制、アネルギーが誘発されることも明らかとなっている<sup>4,9</sup>。また、TGF- $\beta$  により IDO1 を発現した DC は、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を Treg へ誘導し、免疫抑制に働くことが報告されている<sup>9</sup>。これらの知見より、IDO1 と TDO をはじめとする Kyn 経路の分子は腫瘍環境における免疫抑制に大きく関与していると考えられ、がん免疫療法の新たな標的として注目されている。

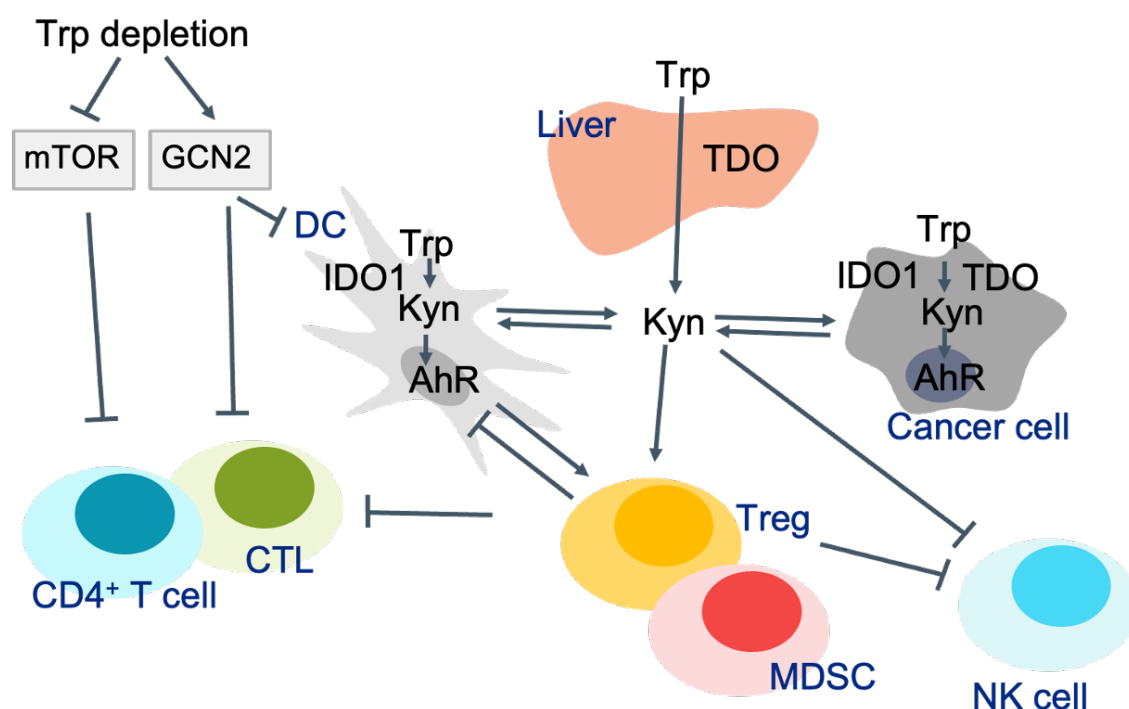


Figure 2 Kyn 経路と免疫システム

### IDO1

IDO1 は、DC やマクロファージなどの抗原提示細胞や肺、胎盤などの多くの組織で広く発現しており<sup>10</sup>、腫瘍においては悪性黒色腫、子宮頸がん、腎臓がん、非小細胞肺がんなどのさまざまながん種で発現が認められている<sup>10</sup>。さらに、がん微小環境下では制御性 DC や MDSC において IDO1 が発現上昇しており、がん細胞の免疫監視機構回避を促進している<sup>4</sup>。Janus kinase 1 (JAK1)、Janus kinase 2 (JAK2)、および interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) によって活性化される signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) は、IDO1 プロモーター領域内の IFN- $\gamma$ -activated site (GAS) への結合を介して IDO1 の転写を促進する<sup>11,12</sup>。さらに、Kyn が AhR を活性化することで IL-6 の産生を促進し、分泌された IL-6 がその受容体に結合し、signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) のリン酸化と



IDO1 の転写を誘導する。この正のフィードバック制御によって、IDO1 の恒常発現が維持されることが知られている (Figure 3) <sup>13</sup>。免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を示すようになった腫瘍では IDO1 の発現上昇が認められており <sup>12</sup>、AhR-IL-6-STAT3 シグナル伝達を使用して免疫応答を抑制し、免疫チェックポイント阻害剤を含む抗がん剤に対する耐性を獲得すると考えられている <sup>4</sup>。さらに、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路、bridging integrator 1 (Bin1)、nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) による発現制御も知られている <sup>9</sup>。

## **IDO2**

IDO2 は IDO1 と 43% のホモロジーを有するが Trp 代謝酵素としての活性は低い <sup>14</sup>。肝臓、腎尿細管、および生殖管のほか、B 細胞や DC などの抗原提示細胞で発現しており、一部のがんで高発現していることが知られている <sup>15</sup>。IDO2 の発現制御分子としては、IFN- $\gamma$  や IL-10、AhR、prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) など IDO1 と共通する分子のほか、リポ多糖が報告されている <sup>14</sup>。いまだに IDO2 の機能は十分に明らかになっていないが、IDO1 と同様に CD4<sup>+</sup> T 細胞や CTL の増殖抑制作用や Treg の誘導が報告されている <sup>14</sup>。また自己免疫の炎症促進因子としての機能が明らかになっており <sup>14,15</sup>、リウマチ性関節炎などの自己免疫疾患における新規標的として期待されている <sup>16</sup>。

## **TDO**

TDO は主に肝臓と脳で発現し、肝臓での L-Trp の恒常性維持に関与しており <sup>4,17</sup>、腫瘍においては膠芽腫、大腸がん、膀胱がん、肺がん、肝細胞がん、および乳がんが発現している <sup>8,18,19</sup>。また腎細胞がんにおいて、免疫チェックポイント阻害剤に耐性を示す患者の腫瘍では TDO の過剰発現と Treg の浸潤が認められること、TDO が高発現している患者では免疫チェックポイント阻害剤を投与しても予後不良であることから、TDO は免疫チェックポイント阻害剤治療に対する耐性に関与していると考えられている <sup>20</sup>。さらに、マウスにおける TDO ノックアウトは、血中の Trp 濃度を高く維持することにより、抗 CTLA-4 抗体および抗 PD-1 抗体の有効性を高めることが報告されている <sup>21</sup>。がん細胞における TDO の発現制御メカニズムについての報告は未だに少ないが、正常細胞における TDO 発現は、糖質コルチコイド、ヘム、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) の負のフィードバック、および PGE<sub>2</sub> によって活性化されることが知られている (Figure 3) <sup>4,22,23</sup>。また TDO は L-Trp 代謝の活性部位とは異なる L-Trp 結合部位を持ち、L-Trp が結合することでユビキチン/プロテアソーム系によるタンパク質分解を遅らせることが知られている <sup>24</sup>。

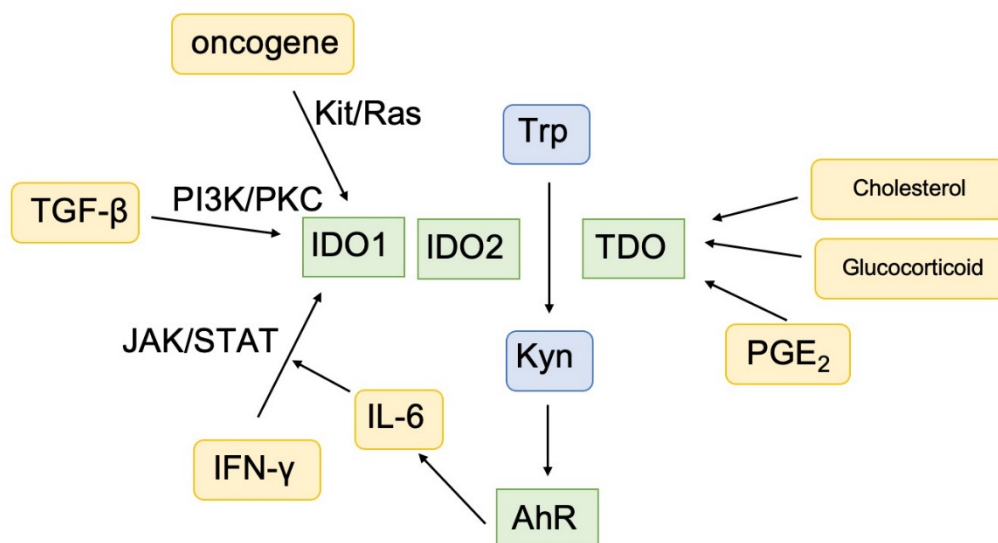


Figure 3 Kyn 経路の発現制御メカニズム

### IDO1/TDO を標的とする治療薬

細胞表面に発現する免疫チェックポイント分子と異なり、IDO1/2、TDO は細胞内に発現することから低分子医薬によるアプローチが期待される。

これまでにさまざまな阻害様式の IDO1 阻害剤が見出されており<sup>25</sup>、IDO1 の競合阻害剤である epacadostat、navoximod、indoximod、BMS986205、非競合阻害である PF-06840003 などの複数の IDO1 阻害剤が臨床開発段階にある。悪性黒色腫に対する epacadostat と抗 PD-1 抗体であるキイトルーダの併用療法の臨床開発試験では、第 3 相試験においてキイトルーダ単剤と比較して病勢進行または死亡のリスクに対する有効性に統計学的有意な差が確認されなかったとして、臨床試験は中止となった。中止の原因としては、epacadostat の投与量不足で IDO1 依存的な免疫抑制の阻害が十分でなかったという考察のほかに、阻害剤による IDO1 の活性低下に伴い代償的に TDO の発現や活性が上昇し、機能を補完した可能性も考察されており、TDO 阻害剤や IDO1/TDO 二重阻害剤の開発が期待されている<sup>26,27</sup>。

TDO 阻害化合物は 680C91 や LM10 など複数の報告があるものの<sup>21,28,29</sup>、臨床上有望な化合物はまだない。IDO1/TDO 二重阻害化合物は近年報告が増えており<sup>30,31</sup>、HTI-1090、M4112、DN1406131 の三剤が臨床試験段階にある<sup>32,33</sup>。しかし三剤とも第 1 相試験段階であり、患者における有効性はまだ確認されておらず、TDO 阻害剤や IDO1/TDO 二重阻害剤の創製は依然として求められている。

最近では AhR 阻害化合物<sup>34</sup>や proteolysis targeting chimera (PROTAC)<sup>35</sup>、IDO1 を制御する microRNA<sup>9</sup>、Kyn への結合活性を上げた改良型の Kyn 分解酵素 kynureninase<sup>4</sup> など、Kyn 経路の IDO1、TDO 以外の分子をターゲットとする阻害化合物や低分子化合物以外のモダリティの報告がある。

## 表現型スクリーニング

表現型スクリーニングは特定の標的を定めずに細胞の表現型の変化を指標にスクリーニングする手法である。これまでは特定の標的を定め、単離・生成されたタンパク質などの標的分子を用いて化合物を探索する標的ベーススクリーニングが主流であったが、創薬標的の枯渇や近年のファーストインクラス薬剤の多くが表現型スクリーニングから見つかったことを背景に表現型スクリーニングが注目されている<sup>36,37</sup>。表現型スクリーニングは、あらかじめ標的を定めずに細胞の表現型を正常に戻す化合物を探索する手法であり、表現型の要因となる経路などの生物学的要因が不明であってもスクリーニング可能である。そのため、オリジナリティの高い化合物取得が可能であることや新規のバイオロジーの知見が得られるというメリットがある<sup>36</sup>。一方で細胞を使用するため、安定性とスループットが高い評価系構築の難易度が高い、ヒット化合物の標的同定が必要になるといった課題も存在する。標的同定においては small interfering RNA (siRNA) や clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated protein 9 (Cas9) システムを使用した機能ゲノミクススクリーニングや標的既知の既存薬ライブラリーのスクリーニングを活用する例が報告されている<sup>38,39</sup>。

## 本研究の目的

以上の背景により本研究では、TDO の新規低分子阻害化合物の同定を目的として、阻害化合物の効率的な取得のため、Kyn 産生を指標とした表現型スクリーニングを用いた。表現型スクリーニングに用いる細胞として TDO 依存的な Kyn 産生を示した、神経膠芽腫細胞株 A172 を選択した。また、スクリーニングのヒット予測や標的同定のため、キナーゼ阻害剤ライブラリーを使用して、A172 細胞における TDO 発現制御メカニズムの検証を行った。

次に独自のイソチオウレア誘導体ライブラリーを、A172 細胞を用いた表現型スクリーニングに供し、IDO1/TDO 二重酵素阻害化合物として PVZB3001 を同定した。他の IDO1 や TDO 阻害化合物との比較のため、PVZB3001 の阻害様式や IDO1/ TDO 二重陽性細胞における Kyn 産生阻害作用を検証した。また、Kyn は NK 細胞の増殖と機能を阻害することが知られていることから、PVZB3001 による Kyn 産生阻害が NK 細胞の増殖と機能に与える作用を検証した。最後に mouse IDO1 (mIDO1) 過剰発現細胞を移植したマウスの *in vivo* モデルにおける PVZB3001 の抗腫瘍効果を検証した。

## 第一章 表現型スクリーニングに用いる細胞の TDO 発現制御メカニズム解析

IDO1 と TDO による Trp 代謝は、さまざまな腫瘍において促進されている重要な免疫抑制経路である。IDO1 は多くの選択的阻害剤が開発されており、臨床開発中の化合物も存在するのに対し、TDO 阻害化合物は報告があるものの<sup>21,28,29</sup>、臨床上有望な化合物はない。神経膠腫や大腸がん、膵臓がんの一部では IDO1 と TDO の過剰発現が認められ、予後不良であることが知られている<sup>33,40,41</sup>。さらに、IDO1 阻害剤により IDO1 活性が抑制された際に、TDO により働きが補完されている可能性が報告されている<sup>20,26,27</sup>。このことから、Kyn 経路の阻害には IDO1 に加え、TDO の阻害も重要だと考えられている。そのため、本研究では新規 TDO 阻害化合物の取得を目指した。本章では TDO 阻害化合物取得のためのスクリーニングに用いる細胞株の選択と TDO 発現メカニズムの解析を行った。

### 1-1 実験材料及び実験方法

#### 1-1-1 実験材料

- Dulbecco's modified eagle medium with high glucose [Phenol Red (+) /L-glutamine (+) ] (DMEM high glucose) (富士フィルム和光純薬)
- RPMI-1640 (富士フィルム和光純薬)
- fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- 5,000 units/mL penicillin (Thermo Fisher Scientific)
- 5,000 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific)
- 0.25 % Trypsin-EDTA (Thermo Fischer Scientific)
- phosphate-buffered saline (PBS) (ナカライテスク)
- recombinant human TDO (rhTDO) (BPS Bioscience)
- recombinant human IDO1 (rhIDO1) (BPS Bioscience)
- L-Trp (Sigma-Aldrich)
- IFN-γ (Sigma-Aldrich)
- キナーゼ阻害剤ライブラリ (Selleck Biotech)
- INCB14943 (MedChemExpress)
- 680C91 (Tocris Bioscience) \*
- trametinib (ChemScene) \*
- TAK-733 (AdooQ Bioscience) \*
- AZD8330 (ChemieTek) \*
- DMSO (富士フィルム和光純薬)
- Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)
- 100[v/w] % trichloroacetic acid solution (富士フィルム和光純薬)

- p-dimethylaminobenzaldehyde (富士フィルム和光純薬)
- 酢酸 (ナカライテスク)
- milliQ 水 (millipore)
- potassium phosphate buffer (pH 6.5) (ナカライテスク)
- L (+) -ascorbic acid pH 7.0 (ナカライテスク)
- methylene blue (ナカライテスク)
- catalase from bovine (Sigma-Aldrich)
- NucleoSpin® RNA (タカラバイオ)
- PrimeScript™ RT reagent kit (タカラバイオ)
- Premix Ex Taq (Probe PCR) (タカラバイオ)
- TaqMan Gene Expression Assays primers and probes (Thermo Fisher Scientific)
- cOmplete® Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
- 10x RIPA Buffer (Cell Signaling Technology)
- sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (ナカライテスク)
- Pierce® BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- 10% Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (Bio-Rad)
- Running Buffer Solution (10×) for SDS-PAGE, Tris-Glycine (ナカライテスク)
- Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad)
- PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (東洋紡)
- スキムミルク (ナカライテスク)
- Tris Buffered Saline with Tween20 (TBS-T) Tablets, pH7.6 (タカラバイオ)
- Can Get Signal Solution (東洋紡)
- 抗 TDO 抗体 (Merck Millipore, Cat. No. MABN1537)
- 抗 IDO1 抗体 (Oriental Yeast, Cat. No. 47150000)
- 抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology, Cat. No. 4695)
- 抗 p-ERK1/2 (Thr202/Thr204) 抗体 (Cell Signaling Technology, Cat. No. 4370)
- 抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich, Cat. No. T9026 Sigma-Aldrich)
- 抗マウス IgG HRP 標識二次抗体 (Global Life Sciences Technologies Japan, NA9310)
- 抗ウサギ IgG HRP 標識二次抗体 (Global Life Sciences Technologies Japan, NA9340)
- ECL Prime Western Blotting Detection System (Global Life Sciences Technologies Japan)
- ON-TARGET plus SMART pool (Horizon Discovery)
- Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)
- serum-free Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)

\*評価化合物は DMSO で溶解後使用した。

Table 1 使用した細胞株

細胞株	由来	入手先
A172	神経膠芽腫	JCRB 細胞バンク
U-87MG	神経膠芽腫	ATCC
A431	扁平上皮がん	ATCC
A549	肺腺がん	理研バイオリソース研究センター
AsPC-1	膵臓がん	ATCC
BxPC-3	膵臓がん	ATCC
PANC-1	膵臓がん	ATCC
Caki-1	腎細胞がん	ATCC
Caov3	卵巣がん	ATCC
SKOV3	卵巣がん	ATCC
DU145	前立腺がん	ATCC
HCT116	大腸腺がん	ATCC
SW480	大腸腺がん	ATCC
HeLa	子宮頸がん	理研バイオリソース研究センター
HepG2	肝細胞がん	理研バイオリソース研究センター
Hep3B	肝細胞がん	Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development
LoVo	大腸がん	JCRB 細胞バンク
MDA-MB-453	乳がん	ATCC
MDA-MB-468	乳がん	ATCC
KARPAS299	リンパ腫	ECACC
MM1R	多発性骨髄腫	ATCC
MM1S	多発性骨髄腫	ATCC

### 1-1-2 実験機器、解析ソフト

- ・ マイクロプレートリーダー SpectraMax (Molecular Devices)
- ・ リアルタイム PCR 装置 PikoReal Real-time PCR System (Thermo Fischer Scientific)
- ・ ブロットティング装置 Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad)
- ・ ルミノイメージメーター LAS-3000 (富士フイルム)
- ・ ルミノイメージメーター ImageQuant LAS 500 imager (Global Life Sciences Technologies Japan)
- ・ XLfit (IDBS)
- ・ GraphPad PRISM5 (MDF)

### 1-1-3 細胞培養

使用した細胞株は DMEM high glucose (10% FBS, 50 units/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin) (以下 DMEM 基本培地) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。継代時、細胞は PBS で洗浄し、0.25% trypsin-EDTA と 5 分間程反応させることで剥離させた。DMEM 基本培地を加え懸濁した細胞を遠心 (240 ×g, 3 min, 25°C) により回収し、その約 4 分の 1 量を継代した。使用した器具および試薬類は全て、乾熱滅菌、オートクレーブ滅菌、またはフィルター滅菌を施した。

### 1-1-4 細胞における Kyn 産生量の測定

1-1-3 項に従って細胞を培養、回収し、評価に用いた。細胞株のスクリーニングでは DMEM 基本培地、それ以外の評価では Phenol Red 不含の RPMI 培地 10% FBS, 50 units/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin) (以下、RPMI アッセイ培地) を用いて懸濁し、細胞数を測定した。細胞懸濁液を、96 穴平底プレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養した。培養後、RPMI アッセイ培地で培地交換を行い、調製済み化合物溶液を添加した。1 時間 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベート後に 20 mM L-Trp を RPMI アッセイ培地で希釈し添加した。L-Trp 終濃度は先行研究において Kyn 産生量が最大となった濃度として、スクリーニング時は 178 µM、それ以外の評価では A172 細胞は 524 µM、A431 細胞は 178 µM とした。A431 細胞に対しては IDO1 発現誘導のため L-Trp 添加と同じタイミングで終濃度 10 ng/mL となるように IFN-γ を添加した。24 時間培養後、SpectraMax を用いて、460 nm の吸光度を測定し、バックグラウンド値とした。水で 100% trichloroacetic acid solution を 7%[v/v] に希釈した trichloroacetic acid solution と p-dimethylaminobenzaldehyde を酢酸で溶解した p-dimethylaminobenzaldehyde 酢酸溶液を 2:5 [v/v] で調製したものを Kyn 定量試薬とした。測定後、Kyn 定量試薬を 200 µL/well で添加して 5 分間反応させた後、再度 460 nm の吸光度を測定し、下記の計算式より Kyn 産生量を求めた。IC<sub>50</sub> 値の計算には GraphPad PRISM5 を使用した。

Kyn 産生量の算出

$$\text{Kyn 産生量 (\%)} = \frac{(\text{化合物溶液での吸光度}) - \text{バックグラウンド値}}{(\text{DMSO 溶液での吸光度}) - \text{バックグラウンド値}} \times 100$$

#### 1-1-5 細胞生存率の測定

1-1-3 項に従って細胞を培養、回収し、以下、RPMI アッセイ培地を用いて懸濁し、細胞数を測定した。RPMI アッセイ培地で懸濁した細胞を、96 穴平底プレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養した。培養後、RPMI アッセイ培地で培地交換を行い、調製済み被検化合物溶液を添加した。1 時間後に 20 mM L-Trp を RPMI アッセイ培地で希釈し添加した (L-Trp 終濃度 A172 細胞: 524  $\mu$ M、A431 細胞: 178  $\mu$ M)。A431 細胞に対しては IDO1 発現誘導のため L-Trp 添加と同じタイミングで終濃度 10 ng/mL となるように IFN- $\gamma$  を添加した。24 時間培養後、RPMI アッセイ培地で 5 倍希釈した Cell Counting Kit-8 溶液で全量置換した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 40~60 分インキュベート後、SpectraMax を用いて、450 nm の吸光度を測定し、下記の計算式より細胞生存率を求めた。細胞を播種していない well の吸光度をバックグラウンド値とした。

細胞産生量の算出

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{(\text{化合物溶液での吸光度}) - \text{バックグラウンド値}}{(\text{DMSO 溶液での吸光度}) - \text{バックグラウンド値}} \times 100$$

#### 1-1-6 TDO 酵素、IDO1 酵素の Kyn 産生量の測定

Recombinant human TDO タンパク (rhTDO、終濃度 0.8  $\mu$ g/mL) 溶液と recombinant human IDO1 タンパク (rhIDO1、終濃度 0.3  $\mu$ g/mL) 溶液をそれぞれ 2%DMSO となるように Table 2 のアッセイバッファで調製した被検化合物と混合し、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、L-Trp を反応溶液に添加し (終濃度 rhTDO: 2 mM、IDO1: 200  $\mu$ M)、トータル 200  $\mu$ L とした反応溶液を 37°C で 120 分間反応させた。L-Trp の代わりに milliQ 水を添加した条件を Negative Control とした。反応後、当該反応溶液に 30% [v/v] trichloroacetic acid solution を 40  $\mu$ L 添加し酵素反応を停止させ、タッピングでよく攪拌後、50°C で 15 分間加熱し N<sup>7</sup>-formylkynurenine の Kyn 変換を促進した。加熱後、遠心 (19,500 xg, 5 min, 24°C) して、上清 150  $\mu$ L を 96 穴平底プレートに移し、SpectraMax マイクロプレートリーダーを用いて、490 nm における吸光度を測定し、バックグラウンド値とした。測定後、2% [w/v] p-dimethylaminobenzaldehyde 酢酸溶液を 150  $\mu$ L/well 添加して 5 分間反応させた後、再度 490 nm における吸光度を測定した。

以下の計算式より酵素活性を求めた。各被検化合物の濃度依存性曲線の描画には XLfit、IC<sub>50</sub> 値の計算には GraphPad PRISM5 を使用した。



$$\text{酵素活性 (\%)} = \frac{(\text{化合物溶液での吸光度}) - \text{バックグラウンド値}}{(\text{DMSO 溶液での吸光度}) - \text{バックグラウンド値}} \times 100$$

Table 2 TDO/IDO1 酵素アッセイバッファーの組成

試薬名	終濃度
potassium phosphate buffer (pH 6.5)	50 mM
L (+) -ascorbic acid (pH 7.0)	20 mM
methylene blue	10 $\mu$ M
catalase from bovine liver	100 $\mu$ g/mL
milliQ 水	-

#### 1-1-7 RT-qPCR による遺伝子発現解析

1-1-3 項に従って細胞を培養して回収し、NucleoSpin® RNA を用いて添付文書に準拠して細胞由来 RNA を抽出した。得られた RNA 500 ng を鋳型として PrimeScript™ RT reagent kit を用いて添付文書に準拠して逆転写し cDNA を合成した。得られた cDNA を Premix Ex Taq (Probe PCR) 及び TaqMan Gene Expression Assays primers and probes と混和して、PikoReal Real-time PCR System を使用して realtime-quantitative PCR (RT-qPCR) を実施した。使用した TaqMan Gene Expression Assays primers and probes を Table 3 に示した。得られたデータは  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法を用いて *ACTB* mRNA 発現量による補正を行い相対定量した。 $\Delta\Delta\text{Ct}$  値及び相対定量値は以下の式により算出した。

$\Delta\text{Ct} = \text{目的遺伝子の Ct 値} - \text{ACTB の Ct 値}$

$\Delta\Delta\text{Ct} = \text{試験条件の } \Delta\text{Ct} - \text{対照条件の } \Delta\text{Ct}$

相対定量値  $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Table 3 使用した TaqMan Gene Expression Assays primers and probes

遺伝子名	Cat. No
<i>TDO</i>	Hs00194611_m1
<i>ERK1</i>	Hs00385075_m1
<i>ERK2</i>	Hs01046830_m1
<i>MEK1</i>	Hs00605615_mH
<i>MEK2</i>	Hs00360961_m1
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1

#### 1-1-8 ウェスタンブロッティングによるタンパク発現解析

1-1-3 項に従って細胞を培養し、回収した細胞を cOmplete® Protease Inhibitor Cocktail を添加した RIPA buffer を用いて可溶化し、5 分の 1 量の SDS sample buffer と混和して 95°C にて 5 分間加熱した。タンパク質濃度は Pierce® BCA™ Protein Assay Kit を用いて添付文書に準拠して測定した。タンパク質濃度のリファレンススタンダードとしてはキットに付属の BSA を用いた。サンプルを 10% Mini-PROTEAN TGX Precast Gels を用いて 200V にて 30 分間電気泳動し、Trans-Blot Turbo Transfer System を用いて Trans-Blot Turbo PVDF membrane に転写した。PVDF membrane を 5% スキムミルクもしくは Blocking Reagent for Can Get Signal にて 1 時間室温でブロッキングし、5% スキムミルクもしくは Can Get Signal Solution で 1000 倍希釈した一次抗体溶液を 4°C にて終夜反応させた。PVDF membrane を TBS-T 洗浄した後に 5% スキムミルクもしくは Can Get Signal Solution で 1000 倍希釈した二次抗体溶液を室温にて 1 時間反応させた。洗浄した後に、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いて発色させ、LAS-3000 もしくは ImageQuant LAS 500 imager を用いて撮像した。

#### 1-1-9 RNA 干渉による遺伝子ノックダウン

siRNA (ON-TARGET plus SMART pool) とトランスフェクション試薬である Lipofectamine RNAiMAX は血清不含 OptiMEM でそれぞれ希釈し、混合した。5 分間室温でインキュベート後、混合溶液を 96well 平底プレートに分注した。そこに、1-1-3 項に従って細胞を培養し、回収した細胞を、抗生物質を除いた培養培地で懸濁した細胞懸濁液を 15,000 cells/well となるように細胞を播種した。使用した siRNA を Table 4 に示した（最終濃度 20 nM）。トランスフェクションの 48 時間後に各種試験に供した。

Table 4 使用した siRNA (ON-TARGET plus SMART pool)

ターゲット	Cat. No.
human <i>ERK1</i>	L-003592-00-0005
human <i>ERK2</i>	L-003555-00-0005
human <i>MEK1</i>	L-003571-00-0005
human <i>MEK2</i>	L-003573-00-0005
human <i>TDO</i>	L-008506-01-0005
Non-targeting	D-001810-10-20

#### 1-1-10 統計解析

データは平均値±標準偏差 (standard deviation, SD)、もしくは各サンプルの値を記載した。有意差検定は Dunnett の検定を用い、p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。統計解析には Excel を使用した。

## 1-2 実験結果と考察

### 1-2-1 表現型スクリーニングに用いる細胞株の選択

過去に当研究室において、エールリヒ反応により Kyn 産生量を定量するハイスループットなセルベースドアッセイ系を構築した<sup>42</sup>。本研究ではこのアッセイ系を活用し、TDO 阻害化合物探索のための表現型スクリーニング実施することとした。

初めに、化合物スクリーニングに用いる TDO 依存的な Kyn 産生細胞株の探索を行った。21 種のがん細胞株における Kyn 産生量を評価し、高い Kyn 産生能を示した上位 4 株として、A172 細胞株、U-87MG 細胞株、SKOV3 細胞株、MDA-MB-453 細胞株を選択した (Figure 4A)。

次に、それぞれの細胞株の Kyn 産生が IDO1、TDO のどちらに依存しているかを検証するため、IDO1 選択的阻害化合物である INCB14943<sup>43</sup> と TDO 選択的阻害剤である 680C91<sup>44</sup> による Kyn 産生阻害作用を評価した。その結果、SKOV3 細胞では INCB14943 により、A172 細胞、U-87MG 細胞、MDA-MB-453 細胞では 680C91 により、Kyn 産生量が抑制された (Figure 4B, 4C)。このことから、SKOV3 細胞は IDO1 依存的に、A172 細胞、U-87MG 細胞、MDA-MB-453 細胞は TDO 依存的に Kyn を産生していることが示唆された。Kyn 産生量をもっとも高く、680C91 による Kyn 産生阻害作用が見られた A172 細胞株についてウェスタンブロッティングにより IDO1 と TDO のタンパク発現量を確認したところ、TDO のみ発現が認められた (Figure 4D)。以上の結果より A172 細胞では TDO 依存的に Kyn が産生されることが示されたため、スクリーニングに用いる細胞を A172 細胞株に決定した。

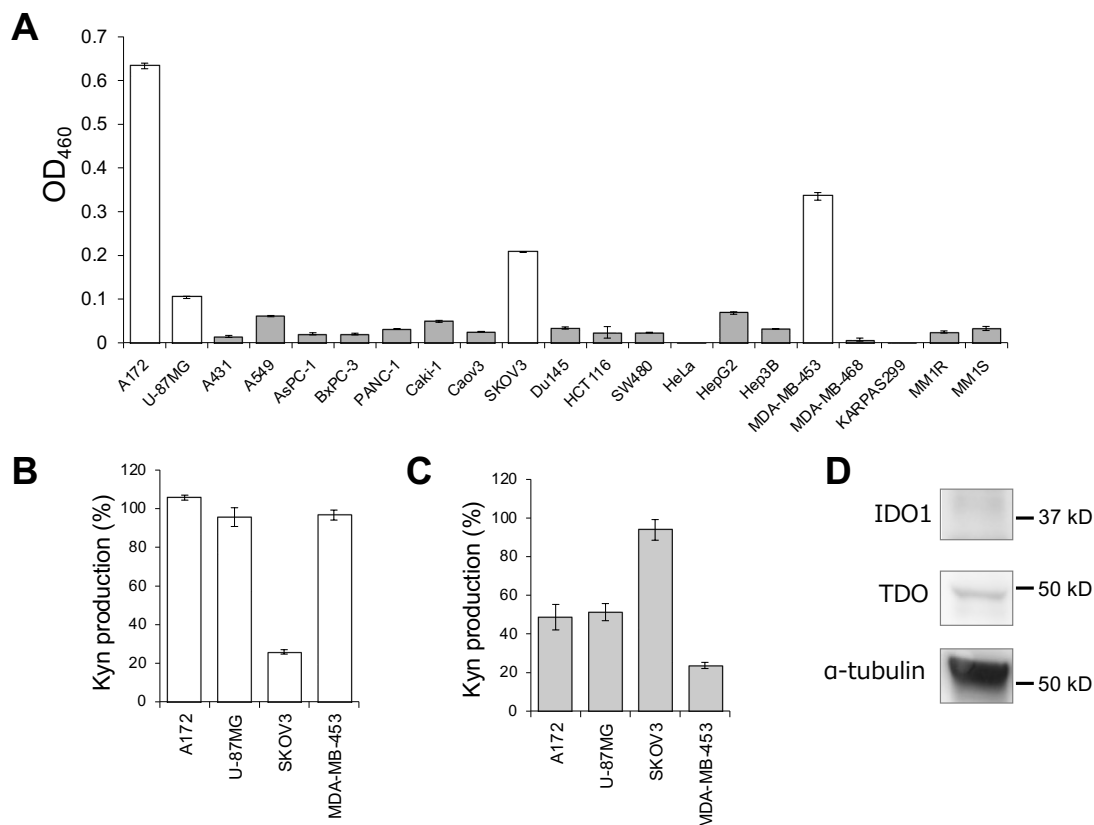


Figure 4 表現型スクリーニングに用いる細胞株の探索

Kyn 産生量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。(A) 21 細胞株の Kyn 定量時の吸光度を示した。Kyn 産生量の高かった上位 4 株を白色で示した。(B) IDO1 選択的阻害剤 INCB14943 添加時の各細胞株における Kyn 産生量を示した。(C) TDO 選択的阻害剤 680C91 添加時の各細胞株における Kyn 産生量を示した。(D) A172 細胞における IDO1 と TDO のタンパク発現量を示した。タンパク発現量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより評価した。ローディングコントロールとして  $\alpha$ -tubulin を使用した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。

### 1-2-2 A172 細胞における TDO 発現制御メカニズムの解析

化合物スクリーニングの前に A172 細胞における TDO の恒常発現制御メカニズムを理解することはヒット化合物の予測や標的の同定に重要であることから、ヒトプロテインキナーゼを標的とする 270 化合物から成るキナーゼ阻害剤ライブラリーを、A172 細胞を用いた Kyn 産生アッセイにより評価した。

A172 細胞株での評価に先んじて、本アッセイ系がスクリーニング系として適切かを判断するため、IFN- $\gamma$  刺激により IDO1 を発現することが知られている A431 細胞で<sup>45</sup>、キナーゼ阻害剤ライブラリーを評価し、細胞毒性を示さず、Kyn 産生阻害活性を示す化合物選抜のため、ヒットクライテリアを Kyn 産生量  $\leq 20\%$ 、細胞生存率  $\geq 80\%$  に設定した。その結果ヒットクライテリアを満たす 8 化合物が選択され、そのうち 7 化合物は JAK 阻害剤であった (Figure 5)。JAK 経路は STAT1 や STAT3 を介して IDO1 の転写を促進することが知ら

れており<sup>11,12</sup>、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた Kyn 産生量を指標とするスクリーニングの妥当性が示された。

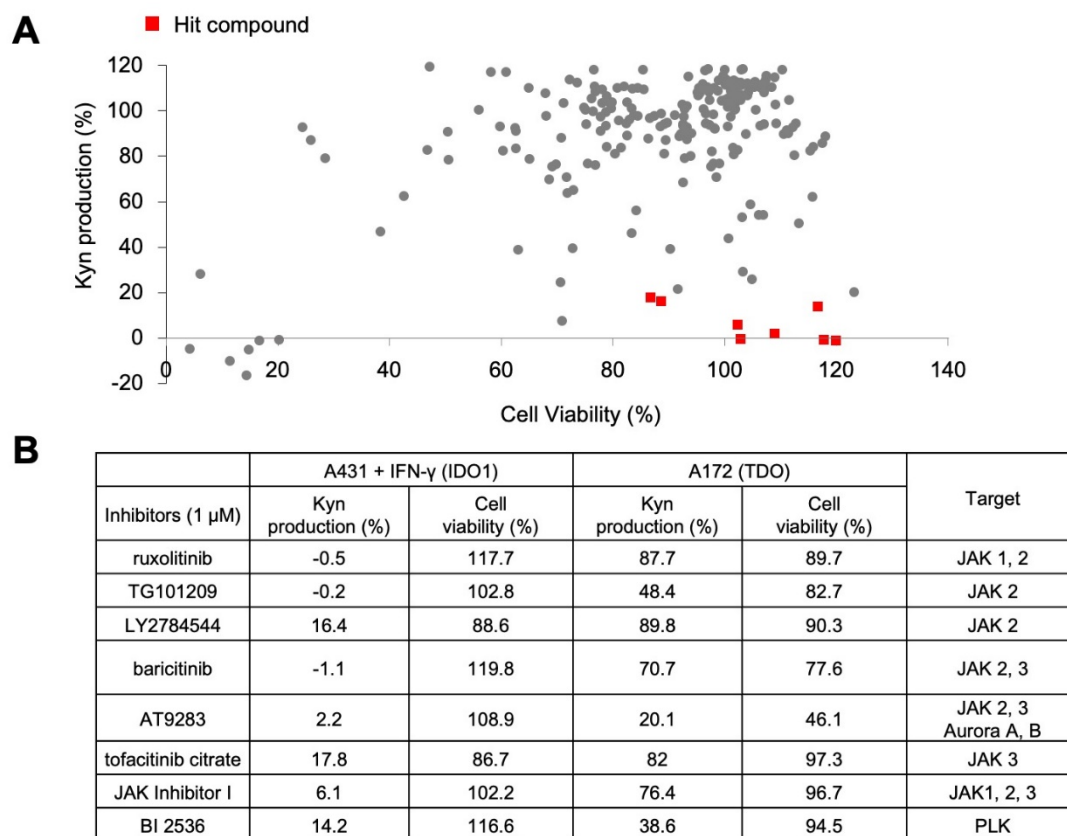
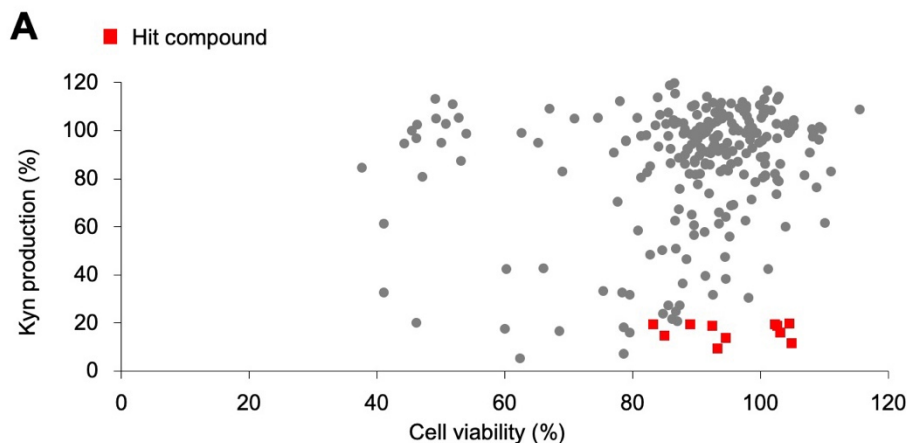


Figure 5 A431 細胞を用いたキナーゼ阻害剤ライブラリーのスクリーニング

(A) キナーゼ阻害剤ライブラリー (270 化合物) の A431 細胞の表現型スクリーニング結果を散布図で示した (縦軸: Kyn 産生量、横軸: 細胞生存率)。ヒット化合物は赤点で示した。Kyn 産生量は L-Trp (終濃度 178  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に終濃度 10  $\mu$ M となるように添加した。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。(B) ヒット化合物の A431 細胞と A172 細胞におけるスクリーニング時の Kyn 産生量と細胞生存率、ターゲットを表に示した。

次に A172 細胞における TDO 発現制御メカニズムの解明のため、キナーゼ阻害剤ライブラリーを A172 細胞を用いたスクリーニングに供した。その結果、ヒットクライテリアである Kyn 産生量  $\leq 20\%$ 、細胞生存率  $\geq 80\%$  を満たす 10 化合物が選択された (Figure 6A、6B)。また、ヒット化合物のうちカウンターアッセイとして実施した IDO1 を発現する A431 細胞での評価において、Kyn 産生阻害作用 (Kyn 産生量  $\leq 20\%$ ) や細胞毒性 (細胞生存率  $\leq 80\%$ ) を示した化合物は TDO 選択性がなく、細胞障害性があると判断し、除外した。その結果、5 化合物が選択的 mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 阻害剤であったことから、MEK 阻害剤に着目し、検証を進めた。



**B**

Inhibitor (1 $\mu$ M)	A172		A431		Target
	Kyn production (%)	Cell viability (%)	Kyn production (%)	Cell viability (%)	
TAK-733	9.5	93.2	82.8	115.2	MEK 1, 2
PD325901	11.7	104.8	80.7	112.4	MEK 1, 2
trametinib	14.1	94.5	86.1	117.3	MEK 1, 2
AZD8330	16	103	84.1	81.3	MEK 1, 2
AS703026	19.1	102.5	76.3	76.7	MEK 1, 2
PD318088	20	104.5	80.9	101.6	MEK1,2/AURORA
PIK-75 Hydrochloride	19	92.3	-10	11.4	PI3K
flavopiridol hydrochloride	19.6	89	-16.3	14.4	CDK 1, 2, 4, 6
AT7519	19.5	83.2	-0.6	20.1	CDK 1, 2, 4, 6, 9
PHA-848125	14.8	84.9	99.9	76.3	CDK 2

Figure 6 A172 細胞を用いたキナーゼ阻害剤ライブラリーのスクリーニング

(A) キナーゼ阻害剤ライブラリー (270 化合物) の A172 細胞における表現型スクリーニング結果を散布図で示した (縦軸: Kyn 産生量、横軸: 細胞生存率)。ヒット化合物は赤点で示した。Kyn 産生量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に終濃度 10  $\mu$ M となるように添加した。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。(B) ヒット化合物のスクリーニング時の A172 細胞と A431 細胞における Kyn 産生量と細胞生存率、ターゲットを表に示した。

このうち、もっとも Kyn 産生阻害活性が高かった trametinib は extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) のリン酸化阻害を伴い (Figure 7A)、濃度依存的に Kyn 産生量を阻害した (Figure 7B)。また、TDO 特異的酵素阻害剤である 680C91 よりも低濃度から同程度の Kyn 産生阻害を示した。Trametinib による Kyn 産生阻害が TDO 酵素阻害によるものなのか、TDO 発現阻害によるものなのかを検証するため、rhTDO に対する阻害活性を、Kyn 産生量を指標に評価した。680C91 と異なり、trametinib は rhTDO への阻害作用を示さなかった (Figure 7C)。そこで RT-qPCR による mRNA 発現量の検出と、ウェスタンブロッティングによるタンパク発現量の検出により、trametinib による TDO 発現量への影響を評価した。その結果、trametinib により mRNA 発現、タンパク発現の両方で TDO の発現低下が認められた (Figure 7D、7E)。

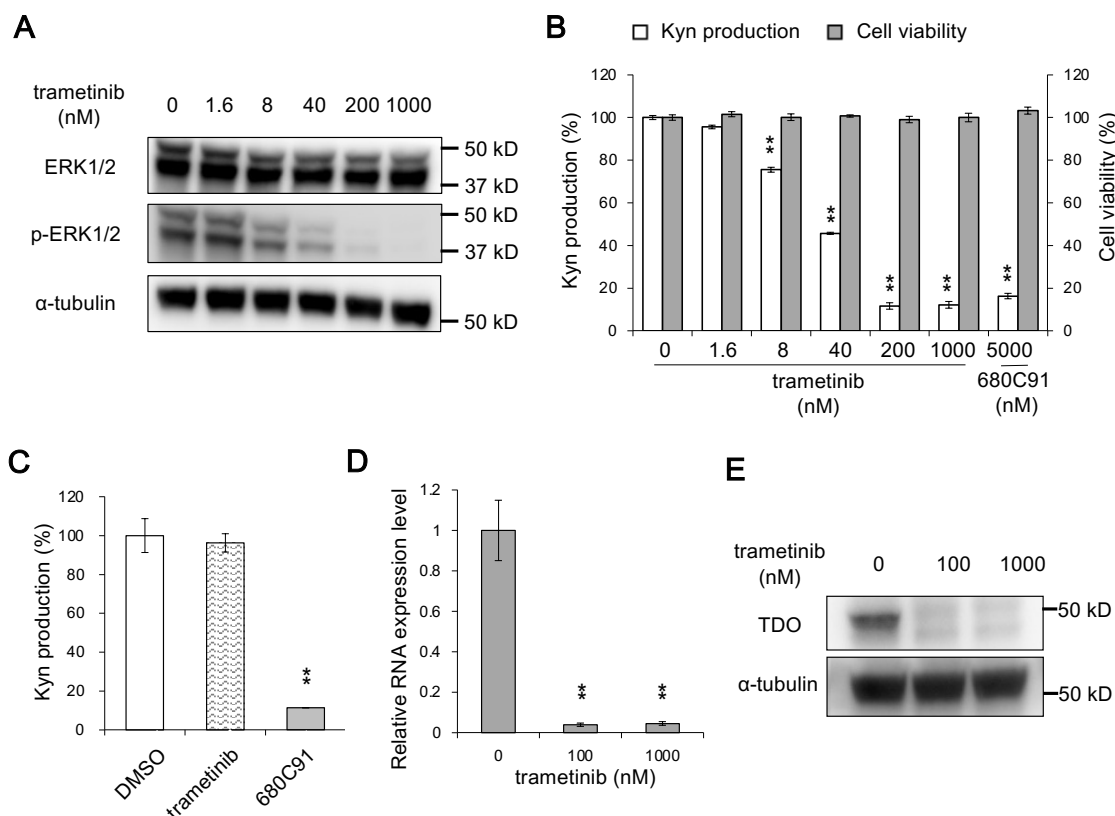


Figure 7 TDO 依存的な Kyn 産生に対する trametinib の作用

(A) A172 細胞における ERK1/2 とリン酸化 ERK1/2 のタンパク発現量に対する trametinib の作用を示した。タンパク発現量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロットングにより解析した。ローディングコントロールとして  $\alpha$ -tubulin を使用した。(B) A172 細胞における Kyn 産生量と細胞生存率に対する trametinib の作用を示した。Kyn 産生量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に終濃度 10  $\mu$ M となるように添加した。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。(C) trametinib の rhTDO における Kyn 産生量に対する作用を示した。680C91 はポジティブコントロールとした。trametinib と 680C91 の化合物濃度はそれぞれ 1  $\mu$ M と 5  $\mu$ M とした。Kyn 産生量はエールリヒ反応により定量した。(D) A172 細胞における TDO mRNA 発現量に対する trametinib の作用を示した。mRNA 発現量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出と cDNA 合成後、RT-qPCR で評価した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。(E) A172 細胞における TDO のタンパク発現に対する trametinib の作用を示した。タンパク発現量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロットングにより解析した。ローディングコントロールとして  $\alpha$ -tubulin を使用した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は DMSO 処理条件を比較対象とし、Dunnett の検定により判定した (\*\*  $p < 0.01$ )。

さらに、ヒットした他の MEK 阻害剤である TAK-733 と AZD8330 による Kyn 産生や TDO 発現への作用を評価した。A172 細胞において TAK-733、AZD8330 共に濃度依存的な Kyn 産生量低下が認められたが (Figure 8A)、rhTDO においては Kyn 産生量に変化はなかった (Figure 8B)。また、RT-qPCR による mRNA 発現量の検出と、ウェスタンブロットングによるタンパク発現量の検出により TAK-733、AZD8330 共に TDO の発現低下が認められた (Figure 8C, 8D)。以上の結果より、MEK 阻害剤に共通して TDO 発現

低下を伴う Kyn 産生阻害作用が認められたことから、A172 細胞における TDO 依存的な Kyn 産生には、MEK 経路による TDO 発現制御が関与していることが示唆された。

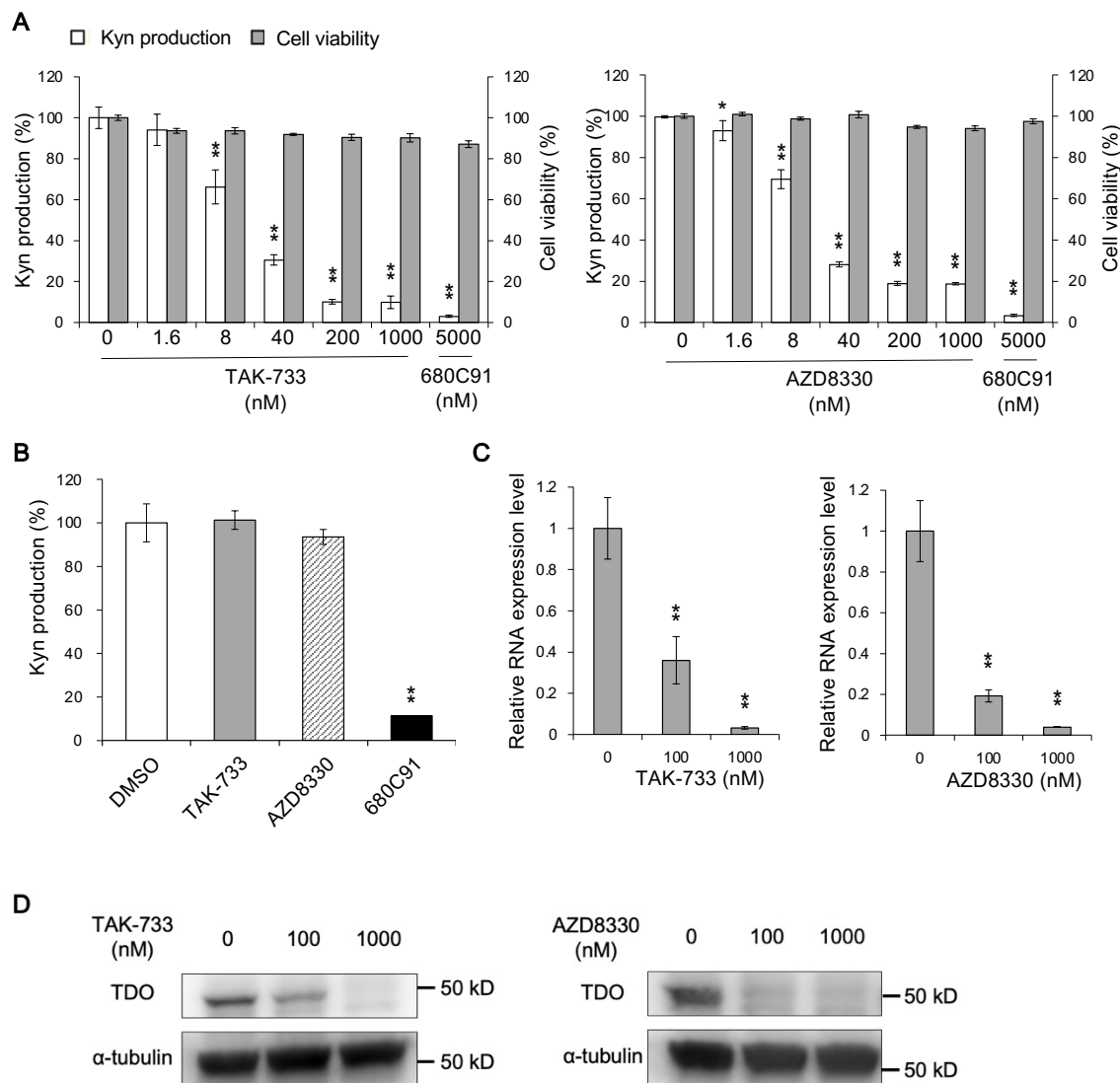


Figure 8 TDO 依存的な Kyn 産生に対する他の MEK 阻害剤の作用

(A) A172 細胞における Kyn 産生量と細胞生存率に対する TAK-733 と AZD8330 作用を示した。Kyn 産生量は  $L$ -Trp (終濃度  $524 \mu\text{M}$ ) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。化合物は  $L$ -Trp 添加の 1 時間後にグラフに示した終濃度となるように添加した。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。(B) TAK-733 と AZD8330 の rhTDO における Kyn 産生量に対する作用を示した。680C91 はポジティブコントロールとした。TAK-733 と AZD8330、680C91 の化合物濃度はそれぞれ  $1 \mu\text{M}$  と  $1 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$  とした。Kyn 産生量はエールリヒ反応により定量した。(C) A172 細胞における TDO mRNA 発現量に対する TAK-733 と AZD8330 の作用を示した。mRNA 発現量は  $L$ -Trp (終濃度  $524 \mu\text{M}$ ) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出と cDNA 合成後、RT-qPCR で評価した。化合物は  $L$ -Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。(D) A172 細胞における TDO のタンパク発現に対する TAK-733 と AZD8330 の作用を示した。タンパク発現量は  $L$ -Trp (終濃度  $524 \mu\text{M}$ ) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより解析した。ローディングコントロールとして  $\alpha$ -tubulin を使用した。化合物は  $L$ -Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は DMSO 処理条件を比較対象とし、Dunnett の検定により判定した (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )。



次により直接的に MEK 経路の TDO 発現制御への関与を検証するため、siRNA 処理による *MEK1/2*、*ERK1/2*、および *TDO* のノックダウン下での *TDO* mRNA 発現量への影響を評価した。まず、用いた siRNA によりターゲットの遺伝子特異的に遺伝子発現がノックダウンされていることを RT-qPCR による mRNA 発現解析により確認した (Figure 9)。

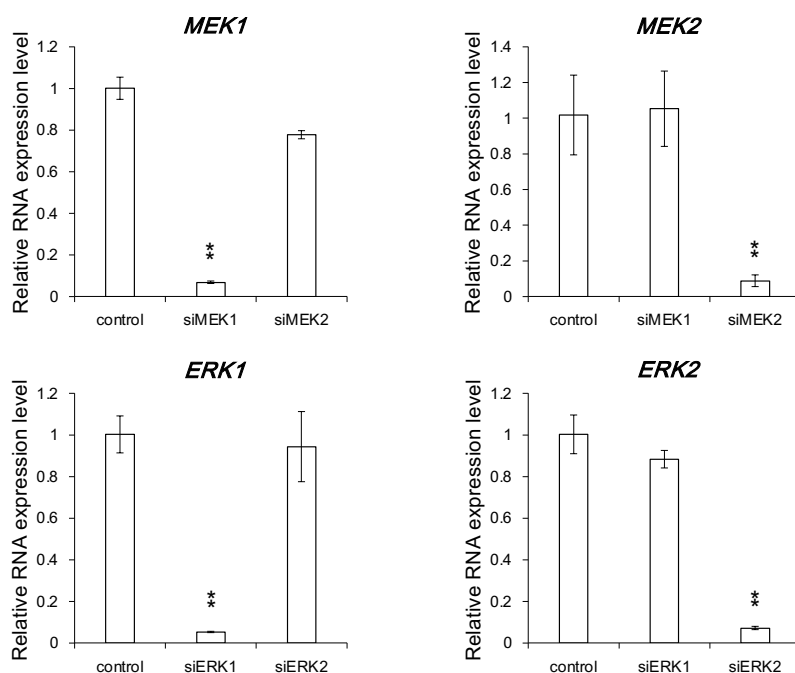


Figure 9 各 siRNA のノックダウン効率

A172 細胞における各 siRNA のノックダウン効率を、mRNA 発現量を指標に示した。mRNA 発現量は siRNA によるトランスフェクションの 48 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出と cDNA 合成後、RT-qPCR で評価した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は Non-targeting siRNA 処理条件を control として比較対象とし、Dunnnett の検定により判定した (\*\*  $p < 0.01$ )。

次に各 siRNA による *TDO* 発現量への影響を評価したところ、*MEK1/2*、*ERK1/2*、および *TDO* のノックダウンにより、*TDO* mRNA 発現量の低下が認められた (Figure 10)。各 siRNA による *TDO* 発現の阻害レベルは MEK 阻害剤よりも低かったが、これは MEK 阻害剤が MEK1、MEK2 の両方を阻害していることに起因すると考えられる。*TDO* の mRNA 発現量の低下の程度はターゲットとする遺伝子によって異なり、*MEK1* または *ERK1* のノックダウンによる発現低下は、*MEK2* または *ERK2* のノックダウンによる発現低下よりも顕著であった。MEK1 と MEK2、ERK1 と ERK2 はそれぞれ機能的に重複しているが<sup>46</sup>、がん細胞の細胞周期進行<sup>47</sup>、細胞増殖<sup>48</sup>、および細胞形態と浸潤能<sup>49</sup>において MEK1 と MEK2 で寄与度が異なるという報告がある。同様に ERK1 と ERK2 についても、細胞周期の進行<sup>50</sup>および移動と浸潤<sup>51</sup>において機能が異なることが報告されている。これらの知見

から、A172 細胞における TDO 発現の調節において、MEK1 と MEK2 および ERK1 と ERK2 の寄与度は異なることが推測された。

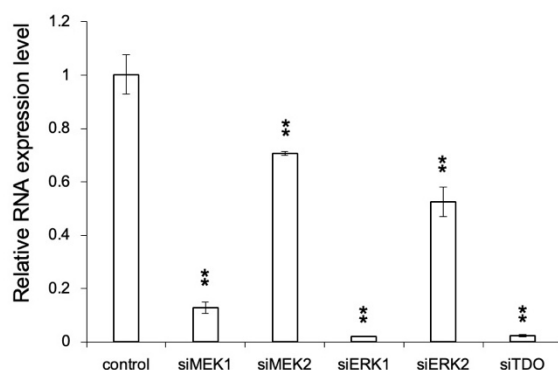


Figure 10 MEK/ERK ノックダウン条件での TDO 発現量

A172 細胞における TDO mRNA 発現量に対する、siRNA を用いた MEK1/2、ERK1/2 のノックダウンの作用を示した。mRNA 発現量は siRNA によるトランスフェクションの 48 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出と cDNA 合成後、RT-qPCR で評価した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は Non-targeting siRNA 処理条件をコントロールとして比較対象とし、Dunnett の検定により判定した (\*\* p<0.01)。

### 1-2-3 他がん細胞種における MEK/ERK 経路による TDO 発現制御の検証

MEK 経路による TDO 発現制御が、がん細胞共通の機構であるかの検証のため、乳がん細胞株である MDA-MB-453 細胞における MEK 阻害剤による Kyn 産生阻害活性を評価した。MEK 阻害剤は MDA-MB-453 細胞において細胞生存率に影響することなく、Kyn 産生量の阻害を示した (Figure 11A)。また、RT-qPCR による解析で TAK-733 による TDO の mRNA 発現量低下が認められた (Figure 11B)。このことから、MEK 経路による TDO 発現制御は一部のがん細胞に共通する機構であることが示唆された。MEK/ERK 経路は、がん細胞において receptor tyrosine kinase (RTK)、Ras、および Raf の活性化により上方制御される。MDA-MB-453 細胞には Ras 変異があり、mitogen activated protein kinase

(MAPK) シグナルが活性化されている<sup>52</sup>。A172 細胞では RTK、Ras、および Raf の活性化変異は明らかになっていないが、phosphatase and tensine homolog (PTEN) 遺伝子の欠失が知られている<sup>53</sup>。PTEN は MEK/ERK 経路の活性化を阻害するという報告があることから<sup>54-56</sup>、A172 細胞では PTEN の欠失により MEK/ERK 経路が活性化され、TDO の過剰発現になっていると推測される。しかし、1-2-1 項で細胞株の選定に用いた 21 の細胞株では A431<sup>57</sup>、HepG2<sup>58</sup>、および MDA-MB-468<sup>59</sup> 細胞株で MEK/ERK 経路の活性化が報告されているが Kyn 産生は高くはないことから (Figure 4A)、MEK/ERK 経路による TDO 発現制御は必要条件ではあるが十分条件ではなく、MEK/ERK 経路以外の経路も関与していることが推測される。PGE<sub>2</sub>/Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor 4 (EP4) 経路による TDO 発現制御、およ

び MEK/ERK 経路による cyclooxygenase2 (COX2) /PGE<sub>2</sub> の調節が報告されていることから<sup>60-62</sup>、MEK/ERK 経路による TDO の発現制御には COX2/PGE<sub>2</sub>/EP4 経路が関連している可能性が考えられる。また、TDO のプロモーターの CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) 結合部位が、神経膠芽腫細胞における構成的な TDO 発現に不可欠であることが報告されている<sup>63</sup>。A431 および MDA-MB-468 細胞は COX2 の発現が弱い、もしくは発現しておらず<sup>64,65</sup>、HepG2 では Kyn 産生量はそれほど高くないものの (Figure 4A)、COX2<sup>66</sup>、C/EBP $\beta$ <sup>67</sup>、および TDO<sup>68</sup> の発現が報告されている。これらのことから、COX2/PGE<sub>2</sub>/EP4 経路や C/EBP $\beta$  の発現が、MEK/ERK 経路の TDO 発現調節に関与している可能性が考えられる。TDO 発現の調節におけるこれらの因子と MEK/ERK 経路との関係を解明するには、さらなる検証が必要である。

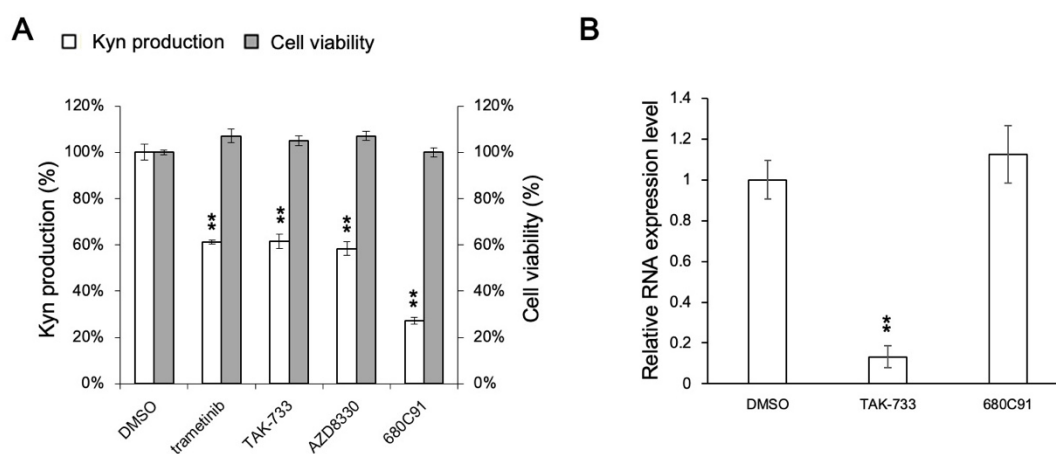


Figure 11 MDA-MB-453 細胞における MEK 阻害剤の作用

(A) MDA-MB-453 細胞における Kyn 産生量と細胞生存率に対する MEK 阻害剤の作用を示した。Kyn 産生量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に添加した。化合物の終濃度は 3 種の MEK 阻害剤は 1  $\mu$ M、680C91 は 5  $\mu$ M とした。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。(B) A172 細胞における TDO mRNA 発現量に対する TAK-733 の作用を示した。mRNA 発現量は L-Trp (終濃度 524  $\mu$ M) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出と cDNA 合成後、RT-qPCR で評価した。TAK-733 と 680C91 の化合物終濃度はそれぞれ 1  $\mu$ M と 5  $\mu$ M とした。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は DMSO 処理条件を比較対象とし、Dunnett の検定により判定した(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )。

### 1-3 小括

IDO1 と TDO による Trp 代謝は、さまざまな腫瘍において促進されている重要な免疫抑制経路である。IDO1 に対しては多くの選択的阻害剤が開発されており、臨床開発中の化合物も存在するのに対し TDO 阻害化合物は報告があるものの<sup>21,28,29</sup>、臨床上有望な化合物は見出されていない。神経膠腫や大腸がん、膵臓がんの一部では IDO1 と TDO 両方の過剰発現が認められ、予後不良であることが知られている<sup>33,40,41</sup>。さらに、IDO1 阻害剤により IDO1 活性が抑制された際に、代償的に TDO の発現が上昇することにより働きが補完され

ている可能性が報告されている<sup>20,26,27</sup>。これらの背景から、Kyn 経路の阻害には IDO1 に加え、TDO の阻害も重要であると考えられている。そのため、本研究では新規の TDO 阻害化合物の取得を目指した。本章では TDO 阻害化合物取得のためのスクリーニングに用いる細胞の選択と TDO 発現メカニズムの解析を行った。

TDO 阻害化合物のスクリーニングには過去に当研究室にて構築したエールリヒ反応により Kyn 産生量を定量するハイスループットなセルベースドアッセイ系を用いることとした。用いる細胞は 21 種の細胞株をスクリーニングし、最も Kyn 産生量が高く、TDO 依存的な Kyn 産生を示した A172 細胞を選択した。

次に、A172 細胞における TDO の恒常発現制御メカニズムの解析のため、キナーゼ阻害剤ライブラリーを Kyn 産生を指標としたスクリーニングに供した。A172 細胞を用いたスクリーニングに先んじて行った IFN- $\gamma$  刺激下で IDO1 を発現する A431 細胞のキナーゼ阻害剤ライブラリーのスクリーニングでは、IDO1 の発現の制御分子である JAK の阻害剤がヒットしたこと、系の妥当性が示唆された。A172 細胞でのスクリーニングでは、ヒットした 10 化合物からカウンターアッセイである A431 細胞での評価において Kyn 産生阻害作用を示した、もしくは細胞障害性があった化合物は除外したところ、5 化合物が選択的 MEK 阻害剤であった。複数の MEK 阻害剤で TDO の発現減少を伴う Kyn 産生阻害作用が認められたことから、MEK 経路による TDO 発現制御が示唆された。さらに、MEK1/2、ERK1/2 のノックダウンにより TDO mRNA 発現量が減少したことから、A172 細胞において TDO 発現に MEK 経路が関与していることが示された。しかし、MEK1/2、ERK1/2 それぞれのノックダウンで TDO 発現の抑制の程度が異なったことから、MEK1/2 および ERK1/2 で TDO 発現制御への寄与度の違いが示唆された。

さらに、MEK 阻害剤は A172 細胞だけでなく、乳がん細胞株である MDA-MB-453 細胞でも Kyn 産生を減少させたことから、MEK/ERK 経路による TDO 発現調節メカニズムは、一部のがん細胞で共通である可能性が示唆された。より詳細なメカニズム解明は今後の研究課題である。

本章では Kyn 産生を指標とした表現型スクリーニングに使用する細胞としての A172 細胞の同定と A172 細胞における MEK/ERK 経路による TDO 発現制御を明らかにした。

## 第二章 IDO1/TDO 二重阻害化合物の同定

前章では Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニングに用いる細胞として、TDO 依存性の高い Kyn 産生能を示したヒト神経膠芽腫細胞株である A172 細胞を選択した。A172 細胞における TDO の発現制御メカニズム解明のため、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニングを実施したところ、MEK 阻害剤がヒットした。MEK 阻害剤や MEK/ERK 経路のノックダウンによる *TDO* の mRNA 発現量を評価し、A172 細胞において MEK/ERK 経路が TDO 発現を制御していることを示した。本章では選択した A172 細胞を用いた Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニングにより TDO 阻害化合物の探索を試みた。

### 2-1 実験材料及び実験方法

#### 2-1-1 実験材料

- A172 (ヒト神経膠芽腫) (JCRB)
- A431 (扁平上皮がん) (ATCC)
- DMEM high glucose (富士フィルム和光純薬)
- RPMI-1640 (富士フィルム和光純薬)
- FBS (Thermo Fisher Scientific)
- 5,000 units/mL penicillin (Thermo Fisher Scientific)
- 5,000 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific)
- 0.25 % Trypsin-EDTA (Thermo Fischer Scientific)
- PBS (ナカライテスク)
- rhTDO (BPS Bioscience)
- rhIDO1 (BPS Bioscience)
- L-Trp (Sigma-Aldrich)
- IFN-γ (Sigma-Aldrich)
- 680C91 (Tocris Bioscience) \*
- epacadostat (MedchemExpress) \*
- (4-chlorophenyl) methyl carbamimidothioate (PVZB1890, Array BioPharma Inc.) \*
- 1,2-Phenylenebis (methylene) dicarbamimidothioate (PVZB3001, Sigma-Aldrich) \*
- 1,3-Phenylenebis (methylene) dicarbamimidothioate (PVZB3056, Sigma-Aldrich) \*
- 1,4-Phenylenebis (methylene) dicarbamimidothioate (PVZB3057, Sigma-Aldrich) \*
- L1-MT (Sigma-Aldrich)
- DMSO (富士フィルム和光純薬)
- Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)

- 100 [v/w] % trichloroacetic acid solution (富士フィルム和光純薬)
- p-dimethylaminobenzaldehyde (富士フィルム和光純薬)
- 酢酸 (ナカライテスク)
- milliQ 水 (millipore)
- potassium phosphate buffer (pH 6.5) (ナカライテスク)
- L (+) -ascorbic acid (pH 7.0) (ナカライテスク)
- methylene blue (ナカライテスク)
- catalase from bovine (Sigma-Aldrich)
- NucleoSpin® RNA (タカラバイオ)
- PrimeScript™ RT reagent kit (タカラバイオ)
- Premix Ex Taq (Probe PCR) (タカラバイオ)
- TaqMan Gene Expression Assays primers and probes (Thermo Fisher Scientific)
- cOmplete® Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
- 10x radio-immunoprecipitation assay (RIPA) Buffer (Cell Signaling Technology)
- SDS sample buffer (ナカライテスク)
- Pierce® BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- 10% Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (Bio-Rad)
- Running Buffer Solution (10×) for SDS-PAGE, Tris-Glycine (ナカライテスク)
- Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad)
- PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (東洋紡)
- スキムミルク (ナカライテスク)
- TBS-T Tablets, pH7.6 (タカラバイオ)
- Can Get Signal Solution (東洋紡)
- 抗 TDO 抗体 (Merck Millipore, Cat. No. MABN1537)
- 抗 IDO1 抗体 (Oriental Yeast, Cat. No. 47150000)
- 抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology, Cat. No. 4695)
- 抗 p-ERK1/2 (Thr202/Thr204) 抗体 (Cell Signaling Technology, Cat. No. 4370)
- 抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich, Cat. No. Sigma-Aldrich)
- 抗マウス IgG HRP 標識二次抗体 (Global Life Sciences Technologies Japan, NA9310)
- 抗ウサギ IgG HRP 標識二次抗体 (Global Life Sciences Technologies Japan, NA9340)
- ECL Prime Western Blotting Detection System (Global Life Sciences Technologies Japan)
- L-arginine (ナカライテスク)
- 4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (ナカライテスク)
- NADPH (ナカライテスク)
- tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) (富士フィルム和光純薬)
- DL-dithiothreitol (DTT) (ナカライテスク)

- flavin adenine dinucleotide (FAD) (ナカライテスク)
- flavin mononucleotide (FMN) (ナカライテスク)
- NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay kit-FX (Fluorometric) 2,3-Diaminonaphthalene Kit (DOJINDO)
- mouse iNOS (miNOS, Sigma-Aldrich, Cat. No. N2783)

\*評価化合物は DMSO で溶解後使用した。

## 2-1-2 実験機器、解析ソフト

- マイクロプレートリーダー SpectraMax (Molecular Devices)
- ブロットティング装置 Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad)
- ルミノイメージメーター LAS-3000 (富士フイルム)
- ルミノイメージメーター ImageQuant LAS 500 imager (Global Life Sciences Technologies Japan)
- 分子シミュレーションソフト molecular operating environment (MOE) 2019.0102 (MOLSYS)
- AMBER10 (Amber Molecular Dynamics)

## 2-1-3 細胞培養

1-1-3 の記載に従って実施した。

## 2-1-4 Kyn 産生量の測定

1-1-4 の記載に従って実施した。

## 2-1-5 細胞生存率の測定

1-1-5 の記載に従って実施した。

## 2-1-6 ヒト TDO および IDO1 酵素の Kyn 産生量の測定

1-1-6 の記載に従って実施した。

## 2-1-7 ウェスタンブロットティングによるタンパク発現解析

1-1-8 の記載に従って実施した。

## 2-1-8 分子ドッキング法による分子シミュレーション

分子ドッキングは、分子シミュレーションソフト MOE, version 2019.0102 を用いて実施した。IDO1 と TDO の 3 次元構造は protein data bank (PDB) から取得し、IDO1 は PDB ID: 5xe1、TDO は PDB ID: 6pyy, 5tia を採用した。ダウンロードしたタンパク質構造は MOE のデフォルトパラメータ (AMBER10 と Extended Hueckel Theory を組み合わせたプログラム) を用いて 3 次元プロトン化、部分電荷付与と水素原子のエネルギー最小化を行った

後、元のリガンドを除去した。PVZB3001 と PVZB1890 は MOE の Builder プログラムを用いて 3 次元構造のエネルギー最小化を行いドッキングに用いた。ドッキングは、Alpha Site Finder を用いて元のリガンド結合周辺サイトをドッキングサイトに指定し、MOE のデフォルトパラメータ (AMBER10: EHT force field) にてドッキング計算し、結合自由エネルギー (GBVI/WSA スコア) を求めた。ドッキング計算にて、結合自由エネルギーが最も低いリガンドポーズを採用し、リガンドとタンパク質との相互作用解析を行った。

#### 2-1-9 iNOS 酵素に対する阻害活性評価

5%DMSO となるように Table 5 に示すアッセイバッファーで調製した被検化合物を miNOS 溶液と混合した。1 mM L-arginine 水溶液を終濃度 100  $\mu$ M となるように添加し、37°C で 60 分間反応させた。miNOS 溶液の代わりに 10% glycerol/50 mM HEPES を添加した条件を Negative Control とした。反応後、50°C で 15 分間加熱して酵素反応を停止させ、遠心後上清を回収した。上清中の miNOS 活性は NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay kit-FX (Fluorometric) 2,3-Diaminonaphthalene Kit を使用し添付文書に準拠して評価した。蛍光値は SpectraMax を用いて、励起波長= 360 nm、蛍光波長= 460 nm で蛍光を測定した。

Table 5 miNOS 酵素アッセイバッファーの組成

試薬名	終濃度
HEPES	26.5 mM
NADPH	0.1 $\mu$ M
BH <sub>4</sub>	10 $\mu$ M
DTT	200 $\mu$ M
FAD	10 $\mu$ M
FMN	10 $\mu$ M

#### 2-1-10 カイネティクス解析

IDO1 および TDO の酵素活性のカイネティクス解析は 1-1-6 記載の方法に従い、rhTDO、rhIDO1 における Kyn 産生量を指標に実施した。基質である L-Trp の濃度は 6 点設定し、IDO1 では 20、24、30、40、60、120  $\mu$ M、TDO では 300、375、500、750、1500、3000  $\mu$ M とした。化合物の濃度はそれぞれ 2 点設定し、680C91 は 0.5 と 1  $\mu$ M、L1-MT は 15 と 30  $\mu$ M、PVZB3001 は 1 と 2  $\mu$ M とした。初期反応速度は各基質濃度で 4 つの時点 (4、8、12、および 16 分) から計算した。阻害様式は Lineweaver-Burk plot を使用して決定した。

#### 2-1-11 統計解析

1-1-10 記載の手順に従って実施した。



## 2-2 実験結果と考察

### 2-2-1 イソチオウレア誘導体ライブラリーの表現型スクリーニングの実施

当研究室の先行研究において、IFN- $\gamma$  により IDO1 の発現を誘導した A431 細胞を用いた Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニングにより、IDO1 酵素阻害化合物として S-ベンジルイソチオウレア誘導体である PVZB1890 を同定した<sup>69</sup>。PVZB1890 の構造式を Figure 12 に示す。

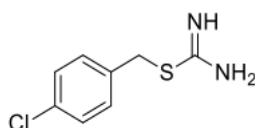


Figure 12 PVZB1890 の構造式

PVZB1890 のイソチオウレア基が IDO1 の触媒ドメインであるヘムへの結合に重要なファーマコフォアであると推測されたこと、また TDO は IDO1 と同様にヘムタンパクであることから、イソチオウレア基が TDO の酵素阻害に重要である推測された。この仮説の下、イソチオウレア誘導体 139 化合物で構成される独自の化合物ライブラリーを、第一章で構築した A172 細胞を用いた表現型スクリーニングに供した。カウンターアッセイとして IFN- $\gamma$  により IDO1 発現を誘導した A431 細胞における Kyn 産生量を評価した。その結果、もっとも Kyn 産生阻害を示した化合物としてビスイソチオウレア誘導体である PVZB3001 を同定した (Figure 13)。PVZB3001 の構造式を Figure 14 に示す。

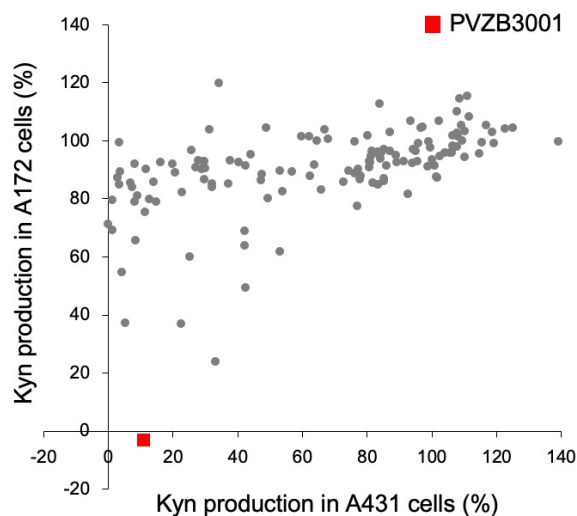


Figure 13 イソチオウレア誘導体ライブラリーのスクリーニング結果

イソチオウレア誘導体ライブラリー（139 化合物）の A172 細胞と A431 細胞を用いた Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニング結果を散布図（縦軸: A172 細胞における Kyn 産生量、横軸: A431 細胞における Kyn 産生量）で示した。ヒット化合物である PVZB3001 は赤点で示した。Kyn 産生量は L-Trp（A172 細胞: 終濃度 524  $\mu$ M、A431 細胞: 178  $\mu$ M）を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に終濃度 10  $\mu$ M となるように添加した。A431 細胞に対しては IDO1 発現誘導のため Trp 添加と同じタイミングで IFN- $\gamma$ （終濃度 10 ng/mL）を添加した。

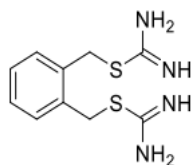


Figure 14 PVZB3001 の構造式

PVZB3001 は A431 細胞においても強い Kyn 産生阻害活性を示した。さらに、PVZB3001 は A172 細胞と A431 細胞の両方で細胞生存率に影響を与えることなく、濃度依存的な Kyn 産生阻害作用を示した（Figure 15）。IC<sub>50</sub> 値は A172 細胞において 0.96  $\mu$ M、A431 細胞において 0.74  $\mu$ M であった。これらの結果より、PVZB3001 は TDO と IDO1 の両方に対して阻害作用を持つことが示唆されたことから、作用機序解明のためさらに詳細な解析を行った。

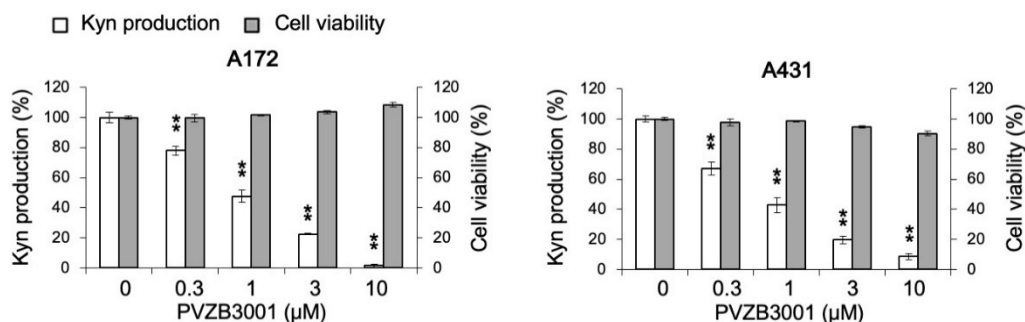


Figure 15 A172 細胞と A431 細胞における Kyn 産生量に対する作用

TDO を発現する A172 細胞と IDO1 を発現する A431 細胞における Kyn 産生量に対する PVZB3001 の作用を示した。Kyn 産生量は L-Trp (A172 細胞: 終濃度 524 μM、A431 細胞: 178 μM) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。PVZB3001 は L-Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。A431 細胞に対しては IDO1 発現誘導のため Trp 添加と同じタイミングで IFN-γ (終濃度 10 ng/mL) を添加した。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は DMSO 処理条件を比較対象とし、Dunnett の検定により判定した (\* p<0.05、\*\* p<0.01)。

## 2-2-2 PVZB3001 の IDO1/TDO 二重阻害作用と選択性の検証

PVZB3001 の阻害作用が酵素阻害と発現阻害のどちらによるものなのかを検証するため、酵素アッセイを実施した。PVZB1890 は rhIDO1 では低濃度から Kyn 産生阻害作用を示したのに対し、rhTDO では高濃度でのみ阻害作用を示した (Figure 16A 左)。一方、PVZB3001 は rhTDO と rhIDO1 の両方において低濃度から Kyn 産生阻害作用を示した (Figure 16A 右)。PVZB1890 の IC<sub>50</sub> 値は TDO に対して >30 μM、IDO1 に対して 4.09 μM、PVZB3001 の IC<sub>50</sub> 値は TDO に対して 0.62 μM、IDO1 に対して 1.71 μM であった (Table 6)。それぞれ TDO と IDO1 の酵素阻害剤である 680C91 と epacadostat の IC<sub>50</sub> 値と比較した。680C91 と epacadostat の構造式を Figure 17 に示す。TDO に対しては 680C91 よりも強い活性を、IDO1 に対しては epacadostat より低い活性であった。Epacadostat は酵素アッセイにおいては高濃度で TDO 阻害作用を示すことが知られているが<sup>70</sup>、PVZB3001 よりも活性は低かった。さらに、PVZB3001 は A172 細胞において TDO、A431 細胞における IDO1 のタンパク発現量に影響しなかったことから (Figure 16B)、PVZB3001 は TDO と IDO1 に対する酵素阻害剤であることが示された。

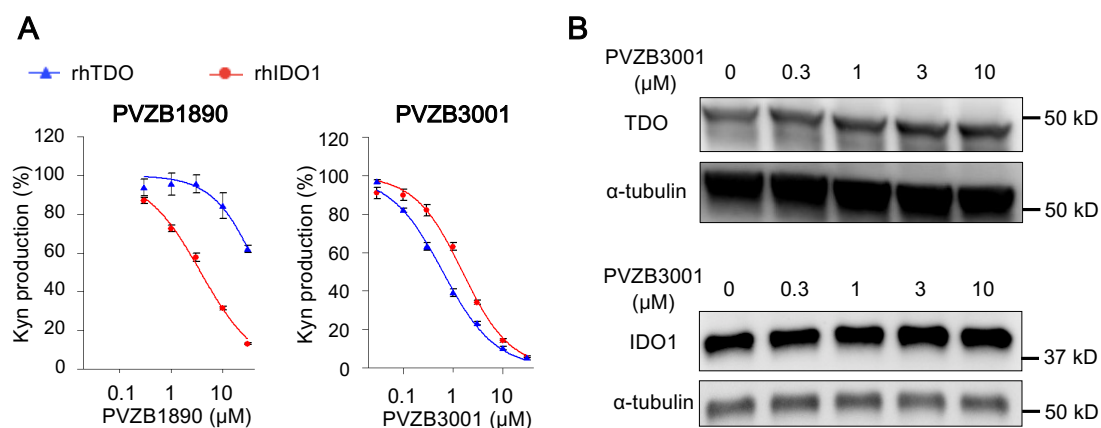


Figure 16 TDO と IDO1 の酵素活性とタンパク発現量に対する作用

(A) rhTDO と rhIDO1 に対する PVZB1890 と PVZB3001 の作用を、Kyn 産生量を指標に示した。Kyn 産生量はエルリヒ反応により評価した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。(B) A172 細胞における TDO と A431 細胞における IDO1 のタンパク発現に対する PVZB3001 の作用を示した。タンパク発現量は L-Trp (終濃度 524 μM) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより評価した。ローディングコントロールとして α-tubulin を使用した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。

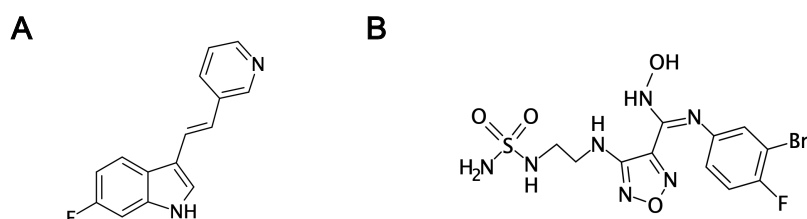


Figure 17 680C91 (左) と epacadostat (右) の構造式

Table 6 rhTDO と rhIDO1 に対する各化合物の阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値)

Enzyme	IC <sub>50</sub> value (μM)					
	PVZB1890	PVZB3001	PVZB3056	PVZB3057	epacadostat	680C91
rhTDO	>30	0.62	>30	>30	2.01	0.88
rhIDO1	4.09	1.71	>30	>30	0.01	>10

PVZB3001 の異性体でも同様の阻害活性を示すのかを検証するため、PVZB3001 の異性体である PVZB3056 と PVZB3057 の Kyn 産生に対する作用を評価した。PVZB3056 と PVZB3057 の構造式を Figure 18 に示す。PVZB3056 と PVZB3057 は rhIDO1、rhTDO のどちらに対しても Kyn 産生阻害作用を示さなかったことから (Figure 19、Table 6)、IDO1

と TDO の酵素阻害には 2 つのイソチオウレア基がオルト位にあることが重要であることが示唆された。

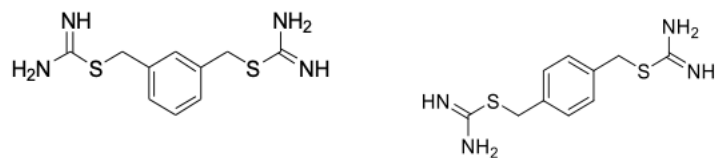


Figure 18 PVZB3056 (左) と PVZB3057 (右) の構造式

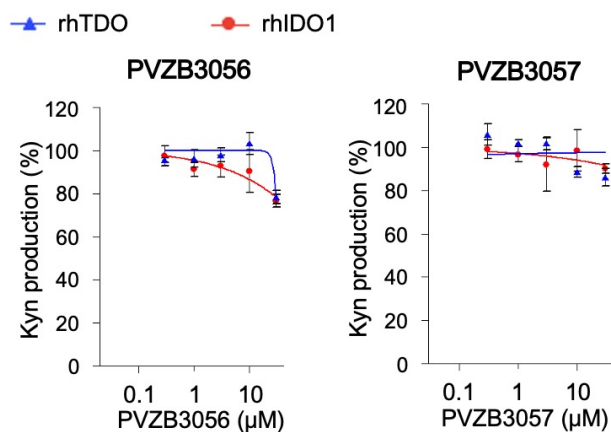


Figure 19 TDO と IDO1 の酵素活性に対する PVZB3001 の異性体の作用

Kyn 産生量を指標に rhTDO と rhIDO1 に対する PVZB3056 と PVZB3057 の作用を示した。Kyn 産生量はエールリヒ反応により定量した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。

PVZB3056 と PVZB3057 は inducible nitric oxide synthase (iNOS) 阻害活性を示すことが過去に報告されていることから<sup>71</sup>、PVZB3001 の選択性を評価のため、miNOS および cytochrome P450 (CYP) 酵素を含む代表的なヘム酵素に対する阻害作用を評価した。その結果、CYP2D6 に対しては弱い阻害作用が確認されたものの、他のヘム酵素に対する阻害作用は認められなかった (Table 7)。このことから、PVZB3001 は TDO、IDO1 選択的に阻害することが示された。

Table 7 ヘム酵素に対する PVZB3001 の阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値)

Inhibitory activity IC <sub>50</sub> value (μM)						
miNOS	human CYP450					
	CYP1A2	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
>30	>10	>10	>10	>10	8.1	>10

### 2-2-3 PVZB3001 の IDO1/TDO 二重阻害作用の作用機序の検証

より詳細に PVZB3001 の TDO と IDO1 に対する阻害作用の作用機序を検証するため、*in silico* で分子ドッキング解析を行った。TDO のドッキングテンプレートとしては、解像度が高く、IDO1 阻害剤である PF-06840003 と複合体を形成している PDB id: 6pyy の結晶構造を選択した<sup>72</sup>。IDO1 のドッキングテンプレートとしては PVZB1890 のイソチオウレア基のアミジンおよびフェニル環 Cl 原子と配位子が類似している INCB14943 と複合体を形成している PDB id: 5xe1 の IDO1 の結晶構造を選択した<sup>73</sup>。PVZB3001 のフェニル環は TDO、IDO1 両方のヘムポケットの疎水性空間に位置し、イソチオウレア基の NH がヘムのプロピオン酸と水素結合を形成した (Figure 20A, B)。さらに、TDO との相互作用ではオルト位にある 2 つのイソチオウレア基の NH がそれぞれ TDO の Ser155 と Glu180 と水素結合を形成した (Figure 20A)。一方、PVZB1890 と TDO の分子ドッキングではイソチオウレア基の NH とヘムのプロピオン酸の間の水素結合とイソチオウレア基の S 原子とヘムのポルフィリン環の間に立体反発が認められた (Figure 20C)。IDO1 との分子ドッキングでは、イソチオウレア基の NH と、ヘムのプロピオン酸と Ser263 の間の水素結合、及び疎水性空間のフェニル環の Cl 原子と Cys129 の間のハロゲン結合も確認された (Figure 20D)。これらの結果は PVZB3001 が IDO1 と TDO の二重酵素阻害化合物であり、PVZB1890 が IDO1 選択的阻害化合物であること、また、2 つのイソチオウレア基が TDO 阻害に重要であることを裏付けるものである。

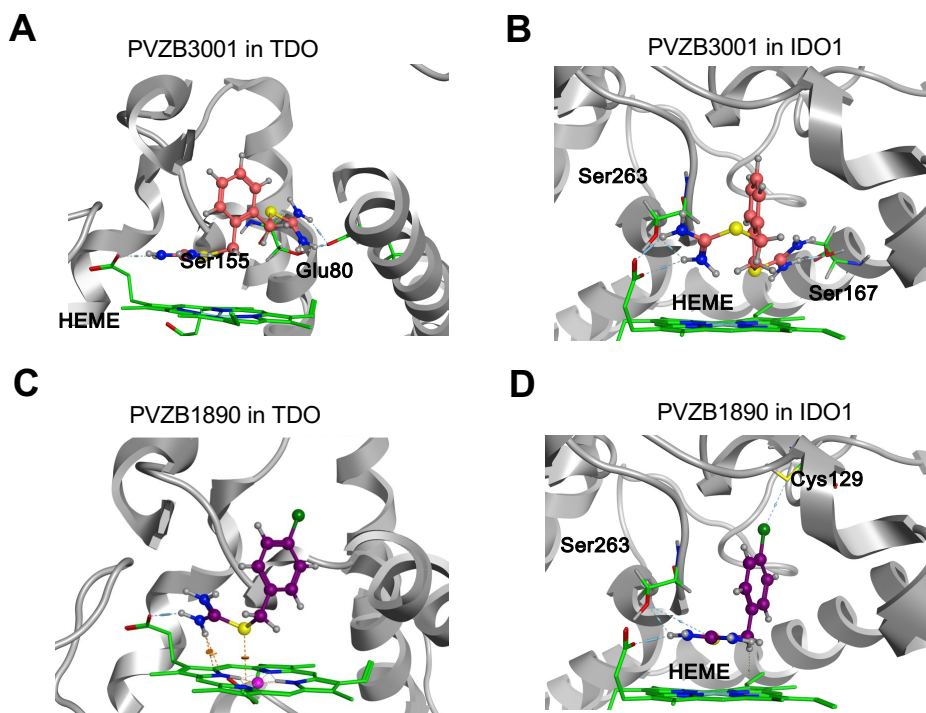


Figure 20 分子ドッキングによる PVZB3001 と TDO/IDO1 の相互作用の解析  
化合物と TDO もしくは IDO1 のドッキングポーズと相互作用を示した。シミュレーションには MOE 2019.0102 を使用した。三次元構造は PDB から取得し、TDO は PDB id: 6pyy、IDO1 は PDB id: 5xe1 を使用した。炭素原子は PVZB3001 ではピンク、PVZB1890 では紫、ヘムでは緑のスティック表示で示した。また、水素原子は灰色、硫黄原子は黄、窒素原子は青、酸素原子は赤のスティック表示で示した。水素結合もしくはハロゲン結合は点線で示した。(A) PVZB3001 と TDO の相互作用、(B) PVZB3001 と IDO1 の相互作用、(C) PVZB1890 と TDO の相互作用、(D) PVZB1890 と IDO1 の相互作用

#### 2-2-4 PVZB3001 の阻害様式の検証

IDO1 阻害化合物は、 $L$ -Trp による競合阻害、IDO1 のヘム鉄結合による非競合阻害、IDO1 のヘムフリーのアポ型を標的とする不可逆的阻害など、さまざまな阻害様式が報告されている<sup>70,74,75</sup>。一方、IDO1/TDO 二重阻害化合物の阻害様式を分析した報告はほとんどない。他の IDO1、TDO 阻害化合物や二重阻害化合物との違いを理解するため、PVZB3001 の阻害様式の決定を目的にカイネティクス解析を実施した。阻害様式は Lineweaver-Burk plot 解析により判定した。阻害様式ごとの Lineweaver-Burk plot のパターンを Figure 21 に示す。

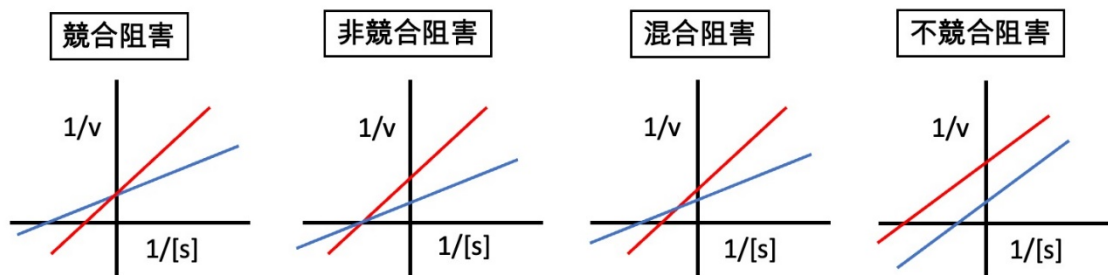


Figure 21 Lineweaver-Burk plot による阻害様式の判定

阻害様式ごとの Lineweaver-Burk plot のパターンを示す。縦軸: 反応速度の逆数、横軸: 基質濃度の逆数

まず本アッセイ系により阻害様式の同定が可能であることを示すため、TDO、IDO1 それぞれに対する競合阻害化合物である 680C91<sup>3</sup> と L-1-methyltryptophan (L-1MT)<sup>43</sup> に対し、Lineweaver-Burk plot 解析を実施した。既報の通り、680C91 と L-1MT はそれぞれ TDO と IDO1 に対して競合阻害を示したことから、本アッセイ条件の妥当性が示唆された (Figure 22A, B)。次に PVZB3001 に対しても Lineweaver-Burk plot 解析を実施したところ、TDO に対して PVZB3001 が Trp と競合することが示された (Figure 22C)。一方で IDO1 に対する阻害様式は設定した 2 濃度で異なる阻害様式を示した (Figure 22D)。1.0  $\mu\text{M}$  では PVZB1890 と同様に非競合阻害を示したが<sup>69</sup>、2.0  $\mu\text{M}$  では混合阻害を示した。混合阻害は、競合的阻害と非競合的阻害の両方の特徴を含み、遊離した酵素と酵素-基質複合体で阻害化合物との結合の親和性が異なる場合に発生する<sup>76</sup>。IDO1 の反応速度の測定と解釈は複雑であり、その要因として以下の 3 つの要素があることが知られている<sup>77</sup>。1 つ目は L-Trp の結合の前に IDO1 に結合する酸素分子の存在である。競合阻害が見られた際も Trp に対する競合なのか、酸素分子に対する競合なのかを評価する必要があるが、酸素濃度の条件を変えての反応速度評価は実験の難易度が高く、判断が難しい。2 つ目は L-Trp は高濃度になると IDO1 に対する基質阻害が認められ、正確な  $V_{\text{max}}$  を決定することが困難となる点である。3 つ目は一部の化合物では活性型の第一鉄を含む IDO1 よりも非活性型の第二鉄を含む IDO1 に対して高いアフィニティを示す場合があることがあげられる。このような化合物の場合、IDO1 の活性化を阻害することから非競合阻害になる。このように IDO1 に対する阻害様式の判定は困難である。一方で、Figure 22B において IDO1 選択的阻害剤 L-1MT は既報の通り競合阻害を示したことから、今回の実験条件では競合阻害は判定可能であることが推察される。そのため PVZB3001 の IDO1 に対する阻害様式は少なくとも競合阻害ではないと考えられ、IDO1 と TDO で異なる阻害様式を示すことが示唆された。PVZB3001 の IDO1 阻害様式を正確に決定するためには化合物-酵素複合体の X 線構造解析を用いたより詳細な解析が必要である。



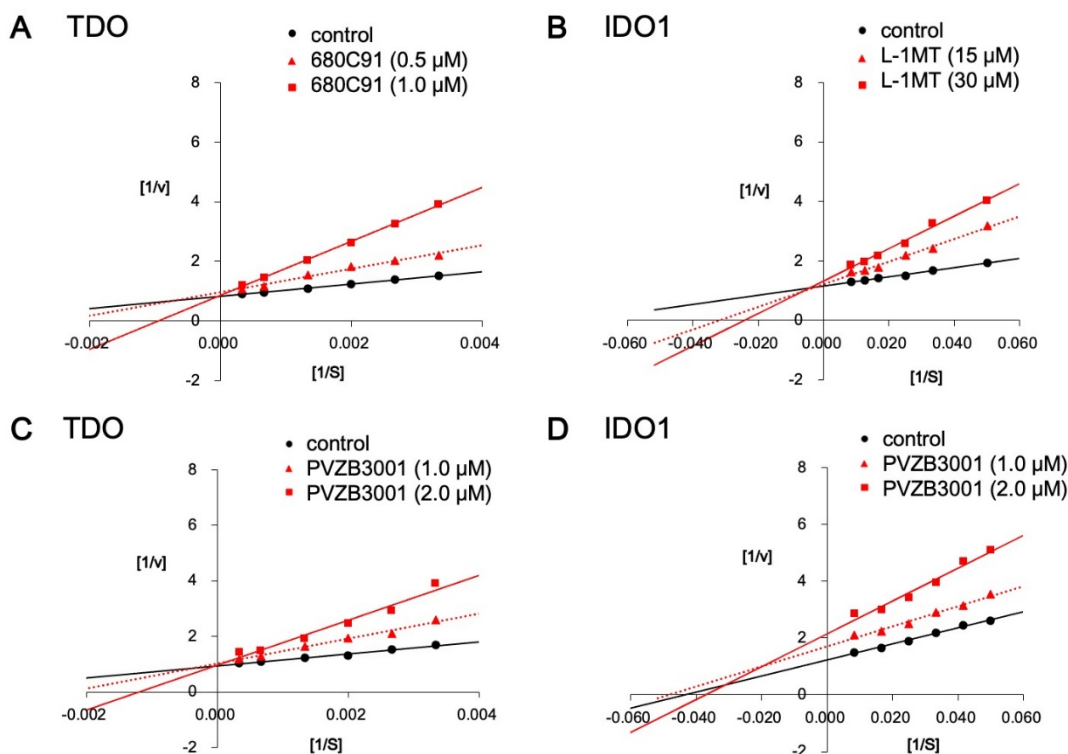


Figure 22 Lineweaver-Burk Plot による PVZB3001 の阻害様式の判定

各化合物存在下での rhTDO と rhIDO1 の反応速度を求め、Lineweaver-Burk plot で示した ( (A) 680C91 存在下での rhTDO (B) L-1MT 存在下での rhIDO1 (C) PVZB3001 存在下での rhTDO (D) PVZB3001 存在下での rhIDO1)。縦軸は反応速度  $v$  の逆数、横軸: 基質濃度  $[S]$  の逆数である。反応速度は rhTDO と rhIDO1 における Kyn 産生量を指標に求めた。基質である L-Trp の濃度は 6 点設定し、IDO1 では 20、24、30、40、60、120  $\mu\text{M}$ 、TDO では 300、375、500、750、1500、3000  $\mu\text{M}$  とした。化合物の濃度はそれぞれ 2 点設定し、680C91 は 0.5 と 1  $\mu\text{M}$ 、L-1MT は 15 と 30  $\mu\text{M}$ 、PVZB3001 は 1 と 2  $\mu\text{M}$  とした。DMSO 処理条件を control とした。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。

TDO に対する PVZB3001 の競合阻害の背後にあるメカニズムをよりよく理解するために、Trp と TDO の共結晶構造 (PDB id: 5tia)<sup>24</sup> を使用して、2-2-3 項と同様の手法で分子ドッキングを行った。Figure 23 に示すように、PVZB3001 のフェニル環は、Trp のインドール環と同様の姿勢で配向している。さらに、PVZB3001 のイソチオウレア基の NH は、Trp のアミノ基の NH と同様に、ヘムのプロピオン酸および Thr342 と水素結合を形成した。これらのドッキング結果は、PVZB3001 が Trp と同様の相互作用によって TDO の基質結合部位に結合することを示唆しており、TDO に対する PVZB3001 で得られた競合阻害の結果を裏付けるものである。

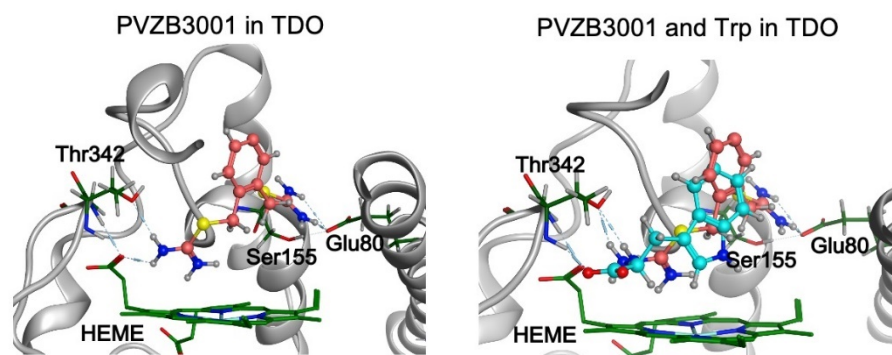


Figure 23 分子ドッキングによる PVZB3001 の阻害様式の解析

Trp 非存在下 (左) と superimpose (右) における PVZB3001 と TDO のドッキングポーズと相互作用を示した。MOE 2019.0102 を使用してシミュレーションし、三次元構造は TDO と Trp と共結晶構造 PDB id: 5tia を使用した。炭素原子は PVZB3001 ではピンク、Trp では水色、ヘムでは緑のスティック表示で示した。また、硫黄原子は黄、水素原子は青、酸素原子は赤のスティック表示で示した。水素結合は点線で示している。

### 2-3 小括

前章では Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニングに用いる細胞として、TDO 依存的な Kyn 産生が認められた A172 細胞を選択した。また、A172 細胞において MEK/ERK 経路が TDO 発現を制御していることを示した。本章では選択した A172 細胞を用いた Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニングにより TDO 阻害化合物の同定を試みた。

独自のイソチオウレア誘導体ライブラリーを、A172 細胞を用いた表現型スクリーニングに供したところ、最も高い Kyn 阻害活性を示した化合物として PVZB3001 を同定した。PVZB3001 は IDO1 を発現する A431 細胞に対しても Kyn 阻害活性を示したことから、IDO1/TDO 二重阻害化合物であることが示唆された。PVZB3001 は TDO と IDO1 の発現量には影響せずに rhTDO と rhIDO1 に対する阻害作用を示したことから、IDO1/TDO 二重酵素阻害化合物であることが示された。また、分子ドッキングにより、PVZB3001 のフェニル環と 2 つのイソチオウレア基、および IDO1 と TDO の基質結合ポケットの間の相互作用が示唆された。このことは PVZB3001 が IDO1 と TDO の二重阻害化合物であることを裏付けるものである。PVZB3001 の異性体である PVZB3056 と PVZB3057 は IDO1 または TDO に対して阻害活性を示さなかったことから、フェニル環上の 2 つのイソチオウレア基の適切な配置が、IDO1/TDO 二重阻害にとって重要であることが示唆された。また、PVZB3056 と PVZB3057 が iNOS に対する阻害活性の報告があることから、iNOS や CYP をはじめとする代表的なヘム酵素に対する PVZB3001 の阻害活性を評価した。PVZB3001 は iNOS や CYP に対しては阻害活性を示さなかったことから、IDO1 および TDO に対して高い選択性を持つ阻害化合物であることが示された。

次に、IDO1 阻害化合物はさまざまな阻害様式が報告されていることから、他の IDO1 や TDO に対する選択的阻害化合物や二重阻害化合物との違いを理解するため、カイネティク

ス解析により PVZB3001 の IDO1、TDO の阻害様式の検証を行った。Lineweaver-Burk plot 分析と分子ドッキングにより、PVZB3001 は TDO に対して競合阻害をすることが示された。一方、IDO1 に対しては 2 濃度で異なる阻害様式を示した。IDO1 の阻害様式決定のためには、X 構造解析等による詳細な阻害様式の検証が必要である。

本章では A172 細胞を用いた表現型スクリーニングにより IDO1/TDO 二重阻害化合物である PVZB3001 を同定した。また、酵素アッセイや分子ドッキングを用いて PVZB3001 は TDO と IDO1 に対して高い選択性を持つ酵素阻害化合物であること、オルト位にある 2 つのイソチオウレア基が IDO1 と TDO の阻害に重要であることを示した。

### 第三章 IDO1/TDO 二重阻害化合物の抗腫瘍効果の検証

前章では独自のイソチオウレア誘導体ライブラリーを、A172 細胞を用いた Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニングに供し、最も Kyn 産生量を抑制した化合物として PVZB3001 を同定した。酵素を用いた Kyn 産生量の評価やタンパク発現量の評価により PVZB3001 が選択性の高い IDO1/TDO 二重酵素阻害化合物であることを示した。本章では PVZB3001 の抗がん剤リード化合物としての有用性をより詳細に検証するため、PVZB3001 の抗腫瘍効果を検証した。

#### 3-1 実験材料及び実験方法

##### 3-1-1 実験材料

- A172 (ヒト神経膠芽腫、JCRB)
- NK-92MI (ヒト悪性非ホジキンリンパ腫、ATCC)
- HeLa (ヒト子宮頸がん、理研バイオリソース研究センター)
- CT26 (大腸がん、ATCC)
- CT26-mIDO1 (mIDO1 過剰発現 CT26 細胞株、静岡県立大学 創薬探索センターにて樹立<sup>78)</sup>)
- DMEM high glucose (富士フィルム和光純薬)
- RPMI-1640 (富士フィルム和光純薬)
- alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (富士フィルム和光純薬)
- FBS (Thermo Fisher Scientific)
- L-glutamine (Thermo Fisher Scientific)
- 5,000 units/mL penicillin (Thermo Fisher Scientific)
- 5,000  $\mu$ g/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific)
- myo-inositol (Sigma-Aldrich)
- 2-mercaptoethanol (ナカライテスク)
- 葉酸 (ナカライテスク)
- ウマ血清 (SACF)
- 0.25 % Trypsin-EDTA (Thermo Fischer Scientific)
- rhTDO (BPS Bioscience)
- rhIDO1 (BPS Bioscience)
- L-Trp (Sigma-Aldrich)
- IFN- $\gamma$  (Sigma-Aldrich)
- 680C91 (Tocris Bioscience) \*
- epacadostat (MedchemExpress) \*

- Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)
- CellTiter-Glo (Promega)
- Human Granzyme B ELISA Kit (Diaclone)
- 6 週齢 BALB/c マウス (日本エスエルシー)
- gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)
- Kynurenine ELISA Kit (ImmuSmol)
- Tryptophan ELISA Kit (ImmuSmol)

### 3-1-2 実験機器

- マイクロプレートリーダー SpectraMax (Molecular Devices)
- プレートリーダー ARVO Light 1420 (Perkin Elmer)
- ブロットティング装置 Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad)
- ルミノイメージメーター LAS-3000 (富士フイルム)
- ルミノイメージメーター ImageQuant LAS 500 imager (Global Life Sciences Technologies Japan)

### 3-1-3 細胞培養

A172 細胞は 1-1-3 の記載に従い、培養した。

NK92-MI 細胞は  $\alpha$ -MEM (12.5% FBS、12.5% ウマ血清, 50 units/mL penicillin、20  $\mu$ g/mL streptomycin、0.2 mM myo-inositol、0.1 mM 2-mercaptoethanol、0.02 mM 葉酸) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。myo-inositol、2-mercaptoethanol、葉酸は使用する直前に添加した。

CT26 細胞および CT26-mIDO1 細胞は RPMI (10% FBS、2 mM L-glutamine、1 mM L-Trp、50 units/mL penicillin、50  $\mu$ g/mL streptomycin) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 3-1-4 Kyn 産生量の測定

1-1-3 項に従って A172 細胞を培養、回収し、RPMI アッセイ培地を用いて懸濁し、細胞数を測定した。RPMI アッセイ培地で懸濁した A172 細胞を、96 穴平底プレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養した。培養後、RPMI アッセイ培地で培地交換を行い、調製済み化合物溶液を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 時間インキュベート後に 20 mM L-Trp を RPMI アッセイ培地で希釈し添加した (L-Trp 終濃度 524  $\mu$ M)。IDO1 発現誘導のため L-Trp 添加と同じタイミングで終濃度 10 ng/mL となるように IFN- $\gamma$  を添加した。24 時間培養後、SpectraMax を用いて、460 nm の吸光度を測定し、バックグラウンド値とした。水で 100% trichloroacetic acid solution を 7% に希釈した 7% [v/v] trichloroacetic acid solution と *p*-dimethylaminobenzaldehyde を酢酸で溶解した *p*-dimethylaminobenzaldehyde 酢酸溶液を 2:5 [v/v] で調製したものを Kyn 定量試薬とした。測定後、Kyn 定量試薬を 200

μL/well で添加して 5 分間反応させた後、再度 460 nm の吸光度を測定し、1-1-4 記載の計算式より Kyn 産生量を求めた。

### 3-1-5 細胞生存率の測定

1-1-3 項に従って A172 細胞を培養、回収し、RPMI アッセイ培地を用いて懸濁し、細胞数を測定した。RPMI アッセイ培地で懸濁した細胞を、96 穴平底プレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養した。培養後、RPMI アッセイ培地で培地交換を行い、調製済み被検化合物溶液を添加した。1 時間後に 20 mM  $L$ -Trp を RPMI アッセイ培地で希釈し添加した ( $L$ -Trp 終濃度 TDO: 524 μM)。IDO1 発現誘導のため  $L$ -Trp 添加と同じタイミングで終濃度 10 ng/mL となるように IFN-γ を添加した。24 時間培養後、RPMI アッセイ培地で 5 倍希釈した Cell Counting Kit-8 溶液で全量置換した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 40~60 分インキュベート後、SpectraMax を用いて、450 nm の吸光度を測定し、1-1-5 記載の計算式より細胞生存率を求めた。

### 3-1-6 NK 細胞の細胞生存率と細胞障害活性の定量

1-1-3 項に従って A172 細胞を培養、回収し、RPMI アッセイ培地を用いて懸濁し、細胞数を測定した。RPMI アッセイ培地で懸濁した A172 細胞を、96 穴平底プレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養した。培地を 500 μM  $L$ -Trp 含有の NK-92MI 培養培地に交換し、被検化合物をウェルに添加した。被検化合物で 1 時間処理後、終濃度 10 ng/mL となるように IFN-γ を各ウェルに添加した。細胞を 48 時間培養後、培養培地の上清を条件培地として収集した。NK-92MI 細胞を 96 穴平底プレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、条件培地で 24 時間培養した。72 時間後、NK-92MI 細胞を細胞生存率と、細胞障害活性の評価に用いた。細胞生存率の評価では、CellTiter-Glo を各ウェルに添加し、発光をプレートリーダー ARVO Light 1420 で測定した。細胞障害活性の評価では、HeLa 細胞を 96 穴平底プレートに  $1.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養後、条件培地で 72 時間培養した NK-92MI 細胞と 5 時間共培養した。その後 NK-92MI 細胞を洗い流し、3-1-5 の手順に従い、HeLa 細胞の細胞生存率を測定した。

Granzyme B 産生アッセイでは、NK-92MI 細胞を  $L$ -Kyn (終濃度 0, 100, 200, 400 μM) を添加した培地で 72 時間前培養後、Kyn を含まない新しい培地で 5.5 時間培養し、培養上清を回収した。上清中の Granzyme B 濃度は Human Granzyme B ELISA Kit を使用し添付文書に準拠して評価した。

### 3-1-7 *in vivo* における抗腫瘍活性評価

移植には当研究室で樹立した CT26-mIDO1 細胞株を用いた。CT26-mIDO1 細胞の *Ido1* 発現は 1-1-7 項記載の RT-qPCR によって確認した。使用した遺伝子 TaqMan Gene Expression Assay Probes (Thermo Fisher Scientific) は *Ido1* (Mm00492586\_m1) と *Gapdh*

(Mm99999915\_g1)である。CT26-mIDO1細胞を6週齢のメスのBALB/cマウスの左右の背部に $1 \times 10^5$ 個皮下移植した。移植の6日後にランダムにvehicle、12.5 mg/kg PVZB3001 単独投与群、25 mg/kg PVZB3001 単独投与群、50 mg/kg PVZB3001 単独投与群に分類した(n=8)。

被検化合物は6日目より1日1回経口投与した。腫瘍体積は2日おきにデジタルキャリパーを用いて以下の計算式から算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \frac{(\text{短軸の長さ (mm)})^2 \times \text{長軸の長さ (mm)}}{2}$$

抗腫瘍効果は、移植後14日目の腫瘍重量に基づいて腫瘍増殖阻害率(% IR)として以下の式より算出した。

$$\text{腫瘍増殖阻害率 (\% IR)} = \frac{\text{被検化合物投与群の腫瘍重量の平均}}{\text{Vehicle 投与群の腫瘍重量の平均}}$$

また、試験化合物の忍容性評価のために2日おきに体重を測定し、以下の式に従い相対体重比を算出した。

$$\text{相対体重比} = \frac{n \text{ 日目の体重}}{1 \text{ 日目の体重}}$$

mRNA 発現量は、NucleoSpin RNA の Lysis Buffer 内で gentleMACS Dissociator を用いて腫瘍を破碎後、1-1-7 項の記載に従って定量した。Kyn/Trp 比は、PBS 内で gentleMACS Dissociator によって腫瘍を破碎後、Kyn および Trp の濃度をそれぞれ Kynurenine ELISA Kit および Tryptophan ELISA Kit を用いて、添付文書に準拠して評価した。すべての動物実験は静岡県立大学実験動物委員会の承認を得た上で、委員会のガイドラインに準じて実施した。

### 3-1-8 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差(SD)、もしくは各サンプルの値を記載した。有意差検定は2群間比較の場合 Welch の t 検定、多群間比較の場合は Dunnett の検定を用い、p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。統計解析には Excel を使用した。

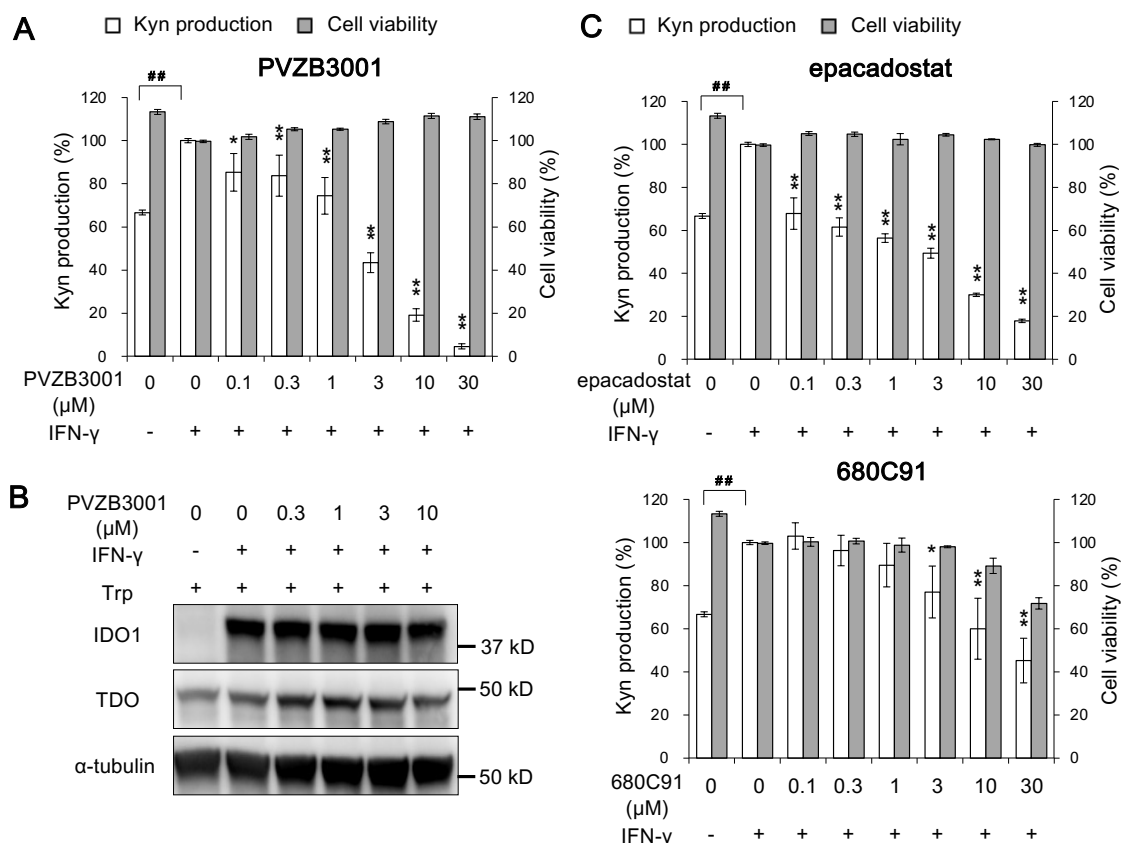
## 3-2 実験結果と考察

### 3-2-1 IDO1/TDO 二重陽性細胞における Kyn 産生阻害活性の評価

IDO1 と TDO の両方を発現するがん細胞に対しては、両タンパク質を阻害することでより効果的な腫瘍抑制効果が期待できる<sup>79</sup>。そこで、IDO1/TDO 二重陽性細胞における

PVZB3001 の Kyn 産生抑制作用を評価した。A172 細胞は IFN- $\gamma$  刺激の添加により、TDO に加えて IDO1 を発現することが知られていることから<sup>80</sup>、IDO1/TDO 二重陽性細胞として IFN- $\gamma$  刺激を加えた A172 細胞を用いた。最初に A172 細胞において IFN- $\gamma$  刺激により、TDO の発現量を変えずに IDO1 の発現が誘導され、Kyn 産生量が増加することを確認した (Figure 24A, B)。この条件下で PVZB3001 は細胞毒性を示すことなく濃度依存的に Kyn 産生量を低下させた (Figure 24A)。また、PVZB3001 による IDO1、TDO のタンパク発現量の変化は認められなかった (Figure 24B)。同じ条件下で IDO1 阻害剤である epacadostat と TDO 阻害化合物である 680C91 の Kyn 産生阻害作用を評価したところ、濃度依存的な Kyn 産生阻害作用は示したものの、高濃度では PVZB3001 よりは弱い阻害作用を示した (Figure 24C)。680C91 の結果から、IDO1/TDO 二重陽性細胞における Kyn 産生の完全な阻害には TDO 選択的阻害では不十分であることが示唆された。一方、IDO1 阻害剤である epacadostat は 680C91 よりも Kyn 産生阻害作用が高いが、PVZB3001 よりは低いエフィカシーを示した。epacadostat は、TDO よりも IDO1 に対して 100 倍以上の活性を示すが TDO に対しても阻害作用を持つことが知られており<sup>70</sup>、実際に 1  $\mu$ M 以上の濃度で TDO の酵素活性阻害が認められた (Table 6)。このことより、epacadostat は、1  $\mu$ M 以上の濃度では、IDO1 と TDO の二重阻害により Kyn 産生をより強く阻害したと考えられる。PVZB3001 は 680C91 と epacadostat よりも強い阻害作用を示したことから、IDO1 と TDO の二重阻害の重要性と IDO1/TDO の二重陽性腫瘍に対する新たな治療薬創製のためのリード化合物としての有用性が示唆された。





**Figure 24 IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞における Kyn 産生量に対する PVZB3001 の作用**  
 (A) IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞における Kyn 産生量に対する PVZB3001 の作用を示した。Kyn 産生量は L-Trp (終濃度 524 μM) を細胞に添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。IDO1 発現誘導のため Trp 添加と同じタイミングで IFN-γ (終濃度 10 ng/mL) を添加した。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。(B) IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞における TDO と IDO1 のタンパク発現に対する PVZB3001 の作用を示した。タンパク発現量は L-Trp (終濃度 524 μM) を細胞に添加して 24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより解析した。ローディングコントロールとして α-tubulin を使用した。化合物は L-Trp 添加の 1 時間後に図に示した終濃度となるように添加した。(C) IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞における Kyn 産生量と細胞生存率に対する IDO1 阻害剤の epacadostat と TDO 阻害剤の 680C91 の作用を示した。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は IFN-γ 添加かつ DMSO 処理条件を比較対象とした多群間比較では Dunnett の検定により判定した (\*p<0.05, \*\*p<0.01)。また、IFN-γ 非添加かつ DMSO 処理条件を比較対象とした二群間比較では Welch の t 検定により判定した (##p<0.01)。

### 3-2-2 Kyn 産生阻害の NK 細胞の増殖や機能に対する作用の検証

Trp の枯渇は GCN2 の活性化を介して T 細胞の増殖や分化の抑制、アネルギーの誘発を、Kyn は AhR の活性化を介して T 細胞や NK 細胞の増殖や機能の抑制と Treg をはじめとする免疫抑制系細胞の活性化を引き起こすが知られていることから<sup>81,82</sup>、PVZB3001 による Kyn 産生阻害による NK 細胞の増殖や機能に対する作用を評価した。

最初に、Kyn による NK-92MI 細胞の増殖や機能の阻害作用を評価した。機能については、NK-91MI 細胞により放出される Granzyme B 産生量を指標に ELISA 法により評価した。Granzyme B は NK 細胞や CTL の顆粒中に含まれるセリンプロテアーゼで、procaspase-

3 をプロセッシングし caspase-3 に活性化することで標的細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られている<sup>83</sup>。NK-92MI 細胞において、既報の通り Kyn 濃度依存的な細胞増殖の低下 (Figure 25A)<sup>84</sup>、および、Granzyme B 産生量の低下が認められた (Figure 25B)。これらの結果より Kyn により NK 細胞の増殖と機能が抑制されることが示された。

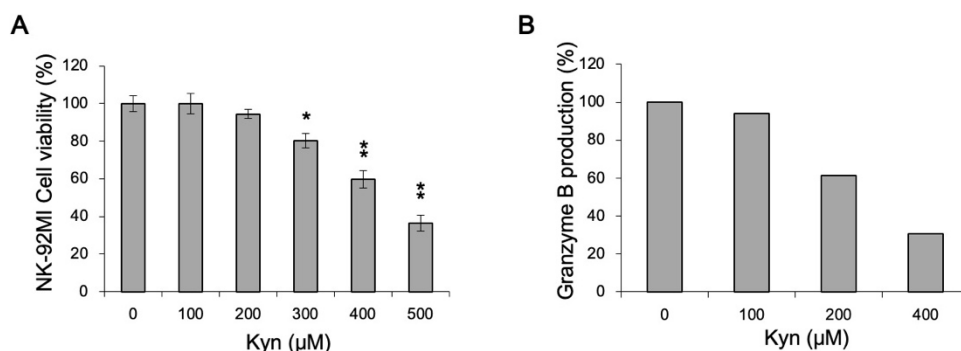


Figure 25 NK-92MI 細胞における細胞生存率と Granzyme B 産生に対する Kyn の作用

(A) NK-92MI 細胞における細胞生存率に対する Kyn の作用を示した。細胞生存率は Kyn を細胞に添加後 72 時間後に CellTiter-Glo で評価した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は Kyn 非添加条件を比較対象と、Dunnett の検定により判定した (\* p<0.05, \*\* p<0.01)。(B) NK-92MI 細胞における Granzyme B 産生に対する Kyn の作用を示した。Kyn を添加後 72 時間後に細胞を再播種し、5.5 時間後に細胞上清を回収し、ELISA により Granzyme 産生量を評価した。各データは独立して 2 回実験し、代表データを示した。

次に、PVZB3001 の Kyn 産生阻害による NK 細胞の増殖性や機能性に対する作用を検証した。PVZB3001 で処理した IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞の培養上清を回収し、条件培地として使用した。条件培地で培養した NK-92MI 細胞は PVZB3001 濃度依存的に細胞生存率の向上が認められた (Figure 26A)。さらに条件培地で培養した NK-92MI 細胞と HeLa 細胞を 5.5 時間共培養し、NK-92MI 細胞の細胞障害作用を評価した。HeLa 細胞は PVZB3001 濃度依存的に生存率が低下したことから、PVZB3001 濃度依存的な NK-92MI 細胞の細胞障害作用の回復が認められた (Figure 26B)。以上のことから、PVZB3001 は IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞の Kyn 産生を抑制することで、NK 細胞の増殖性と機能性を回復させることが示唆された。

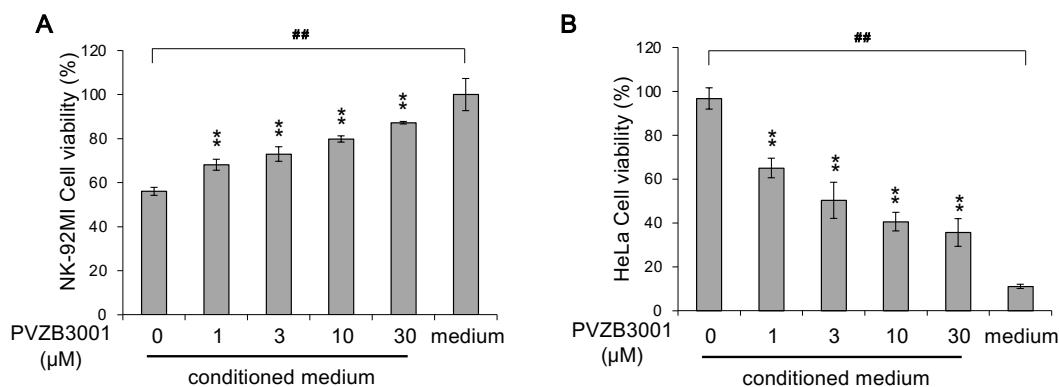


Figure 26 NK-92MI 細胞の増殖と機能に対する PVZB3001 の作用

(A) PVZB3001 で処理した IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞から回収した条件培地下で 72 時間培養した NK-92MI 細胞の細胞生存率を示した。細胞生存率は CellTiter-Glo で評価した。medium は NK-92MI 細胞を培養培地で 72 時間培養した際の細胞生存率を示した。DMSO で処理した IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞から回収した条件培地下で培養した NK-92MI 細胞の細胞生存率をコントロールとした。(B) PVZB3001 で処理した IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞から回収した条件培地下で 72 時間培養した NK-92MI 細胞と HeLa 細胞を 5 時間共培養した際の HeLa 細胞の生存率を示した。細胞生存率は CellCounting-kit8 で評価した。medium は培養培地で培養した NK-92MI 細胞と HeLa 細胞を共培養した際の HeLa 細胞の生存率を示した。DMSO で処理した IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞から回収した条件培地下で培養した NK-92MI 細胞と HeLa 細胞を共培養した際の HeLa 細胞の生存率をコントロールとした。各データは独立して 3 回実験し、代表データを示した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差はコントロールを比較対象とした多群間比較では Dunnett の検定により判定した (\*\*  $p < 0.01$ )。また、コントロールを比較対象とした二群間比較では Welch の t 検定により判定した (##  $p < 0.01$ )。

### 3-2-3 *in vivo* モデルにおける抗腫瘍効果の検証

実際の生体系ではより複雑な免疫システムが働くことから、マウスモデルを用いて *in vivo* における PVZB3001 の抗腫瘍効果を評価した。

IDO1 阻害化合物の非臨床試験では、結腸がん細胞株である CT26 細胞に mIDO1 を過剰発現させた細胞をメスの BALB/c マウスの皮下に移植した同種移植マウスモデルが多く使用されていることから<sup>85-87</sup>、本研究では 6 週齢のメスの BALB/c マウスに mIDO1 過剰発現 CT26 細胞移植した同種同系移植マウスモデルを採用した。同種移植マウスモデルはマウスのがん細胞を免疫機能が正常なマウスに移植して腫瘍を形成させるモデルであり、より生体内の腫瘍に近い環境での化合物の抗腫瘍効果の評価が可能である。移植には当研究室で樹立した mIDO1 過剰発現 CT26 細胞（以降 CT26-mIDO1 細胞とする）株を使用した<sup>78</sup>。CT26-mIDO1 細胞における *Ido1* の過剰発現を確認するため、RT-qPCR による mRNA 発現量解析を行った。親株の CT26 細胞（以降 CT26-Wild type 細胞とする）と比較して CT26-mIDO1 細胞では *Ido1* の mRNA 発現量の上昇が認められた (Figure 27A)。一方、*Tdo* の mRNA 発現量は検出限界以下であった。次に CT26-mIDO1 細胞における PVZB3001 の Kyn 産生阻害作用を検証したところ、PVZB3001 は、CT26-mIDO1 の細胞生存率を低下させることなく、Kyn 産生を阻害した (Figure 27B)。

CT26-mIDO1 細胞の造腫瘍能を検証するため、CT26-Wild type 細胞と CT26-mIDO1 細胞をそれぞれマウスの皮下に移植した。CT26-Wild type 細胞移植マウスと CT26-mIDO1 細胞移

植マウスの両方で腫瘍が形成され、mIDO1 過剰発現細胞はより高い腫瘍増殖能を示した (Figure 27C)。また、腫瘍内の Trp と Kyn の濃度を、ELISA キットを用いて測定し、Kyn/Trp 比として表した。Kyn/Trp 比は臨床でも Trp 代謝経路異常の指標として用いられ、IDO1 や TDO の高発現により Trp 代謝が過剰に進むと Kyn/Trp 比が上昇する<sup>88</sup>。mIDO1 過剰発現腫瘍では Kyn/Trp 比の上昇が見られた (Figure 27D)。このことより、mIDO1 の過剰発現により、Trp 代謝が過剰に促進され、Kyn 産生量が増加することで造腫瘍能が上昇したことが示された。

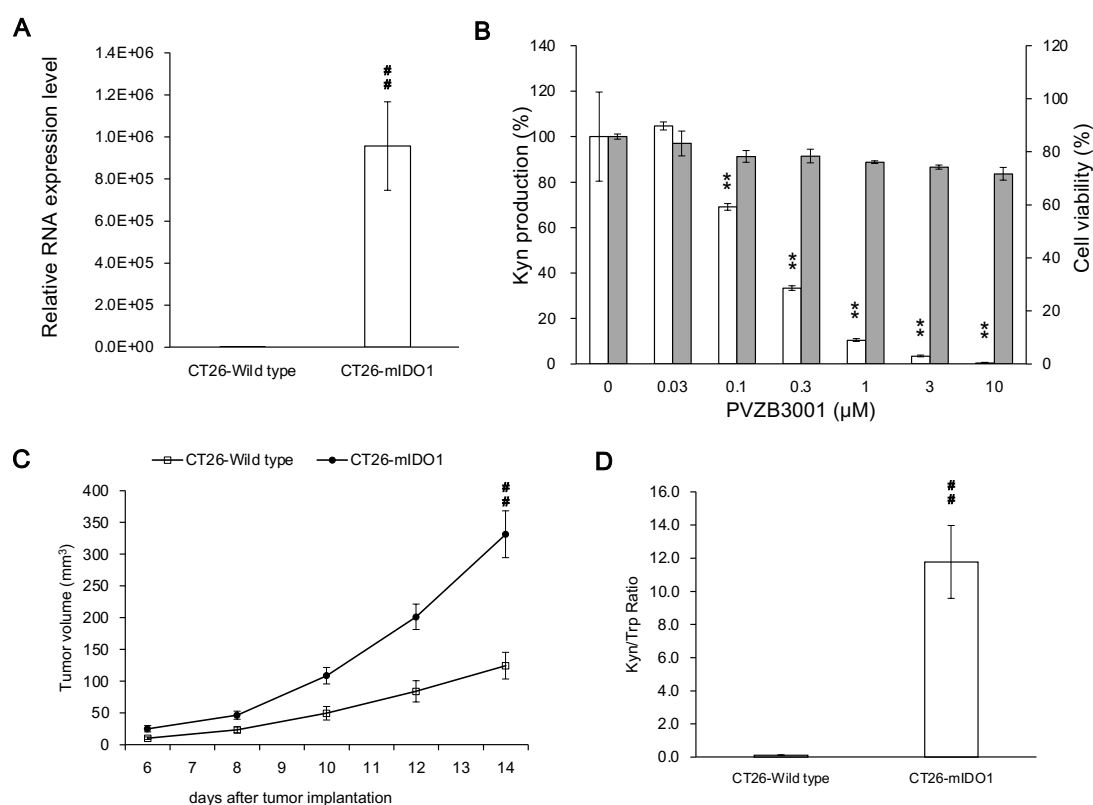


Figure 27 mIDO1 過剰発現細胞移植マウスを用いた *in vivo* モデルの構築

(A) mIDO1 を過剰発現させた CT26-mIDO1 細胞における *Ido1* 発現量を示した。(B) CT26-mIDO1 細胞における Kyn 産生量に対する PVZB3001 の作用を示した。Kyn 産生量は PVZB3001 を添加して 24 時間後にエールリヒ反応により評価した。細胞生存率は Kyn 産生量の評価と同じタイミングで Cell Counting Kit-8 により評価した。(C) CT26-Wild Type 細胞移植マウスと CT26-mIDO1 細胞移植マウスにおける腫瘍体積の経時変化を示した。(D) CT26-Wild Type 細胞移植マウスと CT26-mIDO1 細胞移植マウスにおける腫瘍における Kyn/Trp 比を示した。Kyn と Trp の濃度は ELISA により評価した。グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差は DMSO 処理条件を比較対象とした多群間比較では Dunnett の検定により判定した (\*\*  $p < 0.01$ )。また、day14 における CT26-Wild type 細胞移植マウスを比較対象とした二群間比較では Welch の *t* 検定により判定した (##  $p < 0.01$ )。

次に、CT26-mIDO1 細胞移植マウスにおける PVZB3001 の抗腫瘍効果を検証した。CT26-mIDO1 細胞移植マウスに PVZB3001 を経口投与したところ、マウスの体重減少は認められず、用量依存的な腫瘍の増殖の抑制が認められた。特に 50.0 mg/kg で投与した群では

day14 において有意な抗腫瘍効果を示した (Figure 28A)。一方、IDO1 阻害剤である epacadostat を CT26-mIDO1 細胞移植マウスに経口投与したところ、用量依存的に腫瘍サイズは減少したものの、統計的に有意な差は認められなかった (Figure 28B)。PVZB3001 投与マウスの腫瘍では、Kyn/Trp 比の減少が認められたことから (Figure 28C)、PVZB3001 は CT26-mIDO1 細胞移植マウスにおいて、Kyn 産生を阻害することで抗腫瘍効果を示したと考えられる。PVZB3001 が epacadostat よりも高い抗腫瘍効果を示した理由として、TDO に対する阻害作用により、肝臓等で発現している内在性の TDO による Kyn 産生も阻害したことが考えられる。PVZB3001 投与群においても継時的な腫瘍体積の上昇が見られているが、50.0 mg/kg の投与群では vehicle 投与群の腫瘍サイズと比較して半分程度であることから (Figure 28A)、PVZB3001 には mIDO1 過剰発現に依存する細胞増殖抑制作用があると考えられる。さらなる活性増強のためには、化合物の構造最適化が必要である。

PD-1 や CTLA-4 による IDO1 の発現誘導や、免疫チェックポイント阻害剤の抵抗性の原因に IDO1 高発現の関与が報告されており<sup>89</sup>、実際に IDO1 阻害剤と抗 PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体との併用両方が臨床試験で行われている<sup>70</sup>。このことから、PVZB3001 も抗 PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体との併用により抗腫瘍効果が向上する可能性が考えられる。また、腫瘍環境での Kyn 経路の阻害は卵巣がんで代替的に NAD<sup>+</sup>生成経路を活性化し、NAD<sup>+</sup>の増加によりアデノシン A2a/A2b 受容体を介して T 細胞の増殖と機能を阻害することが報告されたことから<sup>90</sup>、PVZB3001 と A2a/A2b の antagonist の併用療法による抗腫瘍効果の向上が期待できる。PVZB3001 の構造最適化による活性向上や併用療法による抗腫瘍効果の向上は今後の研究課題である。

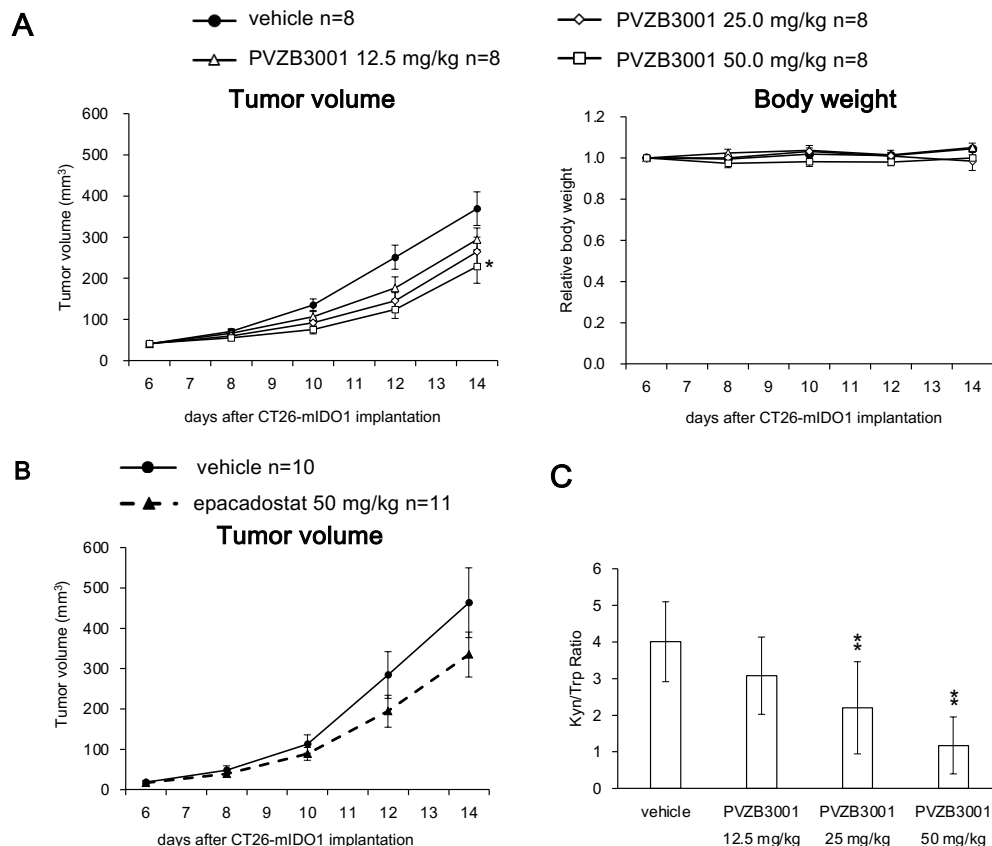


Figure 28 *in vivo* における PVZB3001 の抗腫瘍効果

(A) PVZB3001 投与時の CT26-mIDO1 細胞移植マウスにおける腫瘍体積 (左) と体重 (右) の経時変化を示した。(B) epacadostat 投与時の CT26-mIDO1 細胞移植マウスにおける腫瘍体積の経時変化を示した。(C) PVZB3001 を投与した CT26-mIDO1 細胞移植マウスの腫瘍における Kyn/Trp 比を示した。Kyn と Trp の濃度は ELISA により評価した。有意差は day14 における vehicle 投与群を比較対象とし、Dunnnett の検定により判定した (\* <0.05, \*\* p<0.01)。

### 3-3 小括

前章では独自のイソチオウレア誘導体ライブラリーを、A172 細胞を用いた Kyn 産生量を指標とする表現型スクリーニングに供し、最も Kyn 産生量を抑制した化合物として PVZB3001 を同定した。酵素を用いた Kyn 産生量の評価やタンパク発現量の評価により PVZB3001 が選択性の高い IDO1/TDO 二重酵素阻害化合物であることを示した。本章では PVZB3001 の抗がん剤としての有用性を検証するため、PVZB3001 の抗腫瘍効果を評価した。

一部のがんでは IDO1 と TDO 両酵素の過剰発現が認められ、悪性度が高いことが知られている<sup>33,40,41</sup>。そこで、TDO の発現に加え IFN- $\gamma$  刺激により IDO1 の発現を誘導した A172 細胞を用いて、PVZB3001 の Kyn 産生阻害作用を検証した。PVZB3001 は TDO、IDO1 の選択的阻害剤である 680C91 と epacadostat よりも強い阻害作用を示したことから、IDO1 と

TDO の二重阻害の重要性と PVZB3001 の IDO1/TDO の二重陽性腫瘍に対する新たな治療薬としての有用性が示唆された。

次に、Kyn は AhR を活性化することにより、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CTL、および NK 細胞の増殖と機能を抑制し免疫抑制を誘導することから、*in vitro* での NK-92MI 細胞の増殖性と細胞障害性に対する PVZB3001 の作用を検証した。NK-92MI 細胞の増殖性は PVZB3001 で処理した IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞から回収した条件培地によって大幅な回復が認められた。PVZB3001 で処理した IDO1/TDO 二重陽性 A172 細胞から回収した条件培地で培養した NK-92MI 細胞は共培養した HeLa 細胞の生存率を減少させたことから、NK-92MI 細胞の細胞障害性が回復することが示された。これらの結果より、PVZB3001 の Kyn 産生阻害作用により NK-92MI 細胞の増殖性と細胞障害性が回復することが示された。

次に、マウス大腸がん細胞である CT26 細胞に mIDO1 を過剰発現させた CT26-mIDO1 細胞を移植したマウスを使用して、PVZB3001 の *in vivo* 抗腫瘍活性を検証した。CT26-mIDO1 細胞は親株である CT26-Wild type 細胞と比較して腫瘍の増殖性が高かったことから、mIDO1 の過剰発現による腫瘍の悪性度の向上が示唆された。CT26-mIDO1 細胞移植マウスに対する経口投与で、PVZB3001 は epacadostat よりも高い腫瘍増殖抑制効果を示した。また、腫瘍内の Kyn/Trp 比は PVZB3001 用量依存的に減少した。これらの結果より、*in vivo* において PVZB3001 が IDO1 の酵素活性を阻害することにより、Kyn 産生量を抑制し抗腫瘍効果を発揮することが示された。

本章では PVZB3001 は *in vitro*、*in vivo* の両方において IDO1 と TDO の二重阻害による Kyn 産生抑制により、高い抗腫瘍効果を示すことが示された。構造最適化による PVZB3001 の活性向上や併用療法による抗腫瘍効果向上の検討は必要であるものの、PVZB3001 の IDO1/TDO 選択的二重阻害リード化合物としての可能性が示された。

## 総括

Trp の代謝産物である Kyn は、免疫寛容などの哺乳類の免疫応答の重要な調節因子である。Trp 代謝の最初の律速段階を調節する主要な酵素である IDO1 や TDO を含む Kyn 経路は、さまざまながんで促進されていることが知られており、抗がん剤の新たな標的として注目されている。

IDO1 は発現制御メカニズムがすでに解明され、阻害化合物も多く報告されており、複数の阻害剤が臨床試験まで進んでいる。一方、TDO は未だに発現制御メカニズムや阻害化合物の報告は少なく、臨床試験段階の化合物も存在しない。IDO1/TDO 二重阻害剤は一部臨床試験が開始しているが、いずれも第 1 相の段階であり、有効性はまだ確認されていない。一部のがんでは IDO1 と TDO の過剰発現が認められ、予後不良であることが知られており、さらに、IDO1 阻害剤により IDO1 活性が抑制された際に、代償的に TDO の発現が上昇し、働きが補完されている可能性が報告されている。このことから、Kyn 経路の阻害には IDO1 に加え、TDO の阻害も重要だと考えられている。そこで本研究では Kyn 産生量を指標とした表現型スクリーニングにより、効率的な新規 TDO 阻害化合物を探索することを目的とした。

第一章では表現型スクリーニングに用いる細胞の選択と、選択した細胞における TDO 発現制御メカニズムの解析を行った。まずスクリーニングに用いる TDO 発現細胞株の選択のため、21 種のがん細胞株のスクリーニングを行った。その結果、最も Kyn 産生量が高かった A172 細胞に対し、IDO1 と TDO それぞれの選択的阻害剤による Kyn 産生量への作用とタンパク発現量を評価した。TDO 阻害剤選択的な Kyn 減少や TDO のタンパク発現を示したことから、TDO 依存的な Kyn を産生する細胞株として A172 細胞を選択した。次に A172 細胞における TDO 発現制御メカニズムの解析のため、A172 細胞における Kyn 産生量を指標にキナーゼ阻害剤ライブラリーを評価したところ、複数の MEK 阻害剤がヒットした。MEK 阻害剤である trametinib は A172 細胞では濃度依存的な Kyn 産生阻害を示したものの、TDO 酵素においては Kyn 産生を抑制しなかったことから、trametinib による Kyn 産生阻害作用は TDO の発現抑制によることが示唆された。また、RT-qPCR とウェスタンブロッティングを用いた TDO 発現評価において、trametinib による TDO 発現抑制が示された。ヒットしたその他の MEK 阻害剤も濃度依存的な Kyn 産生や TDO 発現の抑制を示したことから、MEK 経路が TDO の発現制御に関与していることが示唆された。そこで、より直接的に MEK 経路による TDO 発現への作用を検証するため、siRNA を用いた MEK/ERK 経路のノックダウン実験を実施したところ、TDO 発現量の減少が見られた。さらに、他の細胞株でも同様の結果が得られた。以上の検証により、MEK/ERK 経路が TDO の発現制御に関わっていることを新たに見出した。



第二章では新規 TDO 阻害化合物の探索を目的とし、A172 細胞株を用いた表現型スクリーニングを実施した。先行研究において S-ベンジルイソチオウレア誘導体 PVZB1890 が IDO1 酵素阻害化合物であることを同定し、イソチオウレア基がヘムへの結合に重要なファーマコフォアであると推測した。TDO は IDO1 と同様にヘムタンパクであることから、イソチオウレア基が TDO 酵素阻害に重要であるという仮説の下、イソチオウレア誘導体で構成される独自の化合物ライブラリーを、A172 細胞を用いた表現型スクリーニングに供した。その結果、最も Kyn 産生量を抑制した化合物としてビスイソチオウレア誘導体である PVZB3001 を同定した。PVZB3001 は IDO1 を発現する A431 細胞においても強い Kyn 産生抑制を示したことから、PVZB3001 は IDO1/TDO 二重阻害化合物であることが示唆された。酵素を用いた Kyn 産生量評価で PVZB3001 は TDO だけではなく、IDO1 に対しても酵素阻害作用を示したことから、PVZB3001 は IDO1/TDO 二重酵素阻害化合物であることが示された。

PVZB3001 の異性体の Kyn 産生活性の評価と分子ドッキングによるシミュレーションにより、IDO1 と TDO の二重阻害にはフェニル環のオルト位にあるイソチオウレア部分が重要であることが示唆された。また、PVZB3001 の異性体は iNOS 阻害作用を示すことが過去に報告されていることから、PVZB3001 の選択性評価のため、代表的なヘム酵素に対する阻害作用を検証した。その結果、ヘム酵素への阻害作用は認められなかったことから、PVZB3001 の高い IDO1 と TDO 選択性が明らかとなった。また、カイネティクス解析と分子ドッキング法により PVZB3001 は TDO に対して競合阻害することが示唆された。

第三章では PVZB3001 の抗がん剤としての有用性をより詳細に検証するため、PVZB3001 の IDO1/TDO 二重陽性細胞における Kyn 産生阻害活性と *in vivo* 抗腫瘍効果を検証した。

一部のがんでは IDO1 と TDO の過剰発現が認められ、悪性度が高いことが知られている。そこで、TDO の発現に加え IFN- $\gamma$  刺激により IDO1 の発現を誘導した A172 細胞を用いて、PVZB3001 の Kyn 産生阻害作用を評価した。その結果、PVZB3001 は IDO1、TDO それぞれの選択的阻害化合物よりも強い Kyn 産生阻害作用を示した。このことから、IDO1 と TDO の二重阻害の重要性と PVZB3001 の IDO1/TDO の二重陽性腫瘍に対する新たな治療薬としての有用性が示唆された。

次に、Kyn は AhR を活性化することにより、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CTL、および NK 細胞の増殖と機能を抑制し免疫抑制を誘導することから、*in vitro* での NK-92MI 細胞の増殖性と細胞障害性に対する PVZB3001 の作用を検証した。PVZB3001 を処理した IDO1/TDO 二重陽性細胞の培養上清から得られた条件培地で培養した NK-92MI 細胞は、DMSO 処理の条件培地で培養した NK 細胞と比較して大幅な生存率と機能の回復が見られた。

さらに、mIDO1 過剰発現がん細胞株移植マウスにおいて PVZB3001 の *in vivo* 抗腫瘍活性を検証した。PVZB3001 の経口投与により、Kyn/Trp 比の低下を伴い、有意に腫瘍の増殖を抑制することを確認した。これらの結果より、PVZB3001 は IDO1 阻害により Kyn 産生

量を低下させ、Kyn による免疫抑制を解除することで抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

以上の研究において、Kyn 産生を指標とした表現型スクリーニングによって、がん細胞株において MEK/ERK 経路が TDO の発現制御に関与していることを明らかとし、さらに新規 IDO1/TDO 選択的二重酵素阻害化合物として PVZB3001 を発見した。これらの結果はメカニズム解明や新規化合物探索における表現型スクリーニングの有用性と PVZB3001 の IDO1/TDO 選択的二重阻害リード化合物としての可能性を示すものである。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の進め方や研究方法についてだけではなく、研究に対する姿勢や考え方に関しましても終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜り、最高の研究環境を与えていただき、また研究だけでなく私生活や体調面にもお気遣いいただいた静岡県立大学大学院薬学研究院 教授浅井章良先生に深謝の意を表します。

本論文に関して審査及び御指導、御助言を賜りました大学院薬学研究院教授 石川智久先生、同教授橋本博先生、同教授竹内英之先生に心より感謝致します。

本研究の遂行、本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜り、貴重な御助言をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院講師 小郷尚久先生、同助教 村上央先生、国立長寿医療研究センター研究所 治験・臨床研究推進センター開発・連携推進部部長 滝川修先生、愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫制御トランスレーショナルリサーチ分野ユニット長 村岡大輔先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり多大なる御尽力をいただき、御助言と御激励のお言葉を下さった太田克美氏、河合佑里香氏、池田智則氏、福地壮吾氏をはじめ、静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センターの諸兄に篤く御礼申し上げます。

最後に、研究生活を全面的に支えてくださった家族に心より感謝致します。

## 参考文献

1. Zhong L, Li Y, Xiong L, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41392-021-00572-w
2. Hoteit M, Oneissi Z, Reda R, et al. Cancer immunotherapy: A comprehensive appraisal of its modes of application (Review). *Oncol Lett*. 2021;22(3). doi:10.3892/ol.2021.12916
3. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707-723. doi:10.1016/j.cell.2017.01.017
4. Cheong JE, Sun L. Targeting the IDO1/TDO2–KYN–AhR Pathway for Cancer Immunotherapy – Challenges and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39(3):307-325. doi:10.1016/j.tips.2017.11.007
5. Rafice SA, Chauhan N, Efimov I, Basran J, Raven EL. Oxidation of L-tryptophan in biology: A comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(2):408-412. doi:10.1042/BST0370408
6. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1147-1154. doi:10.1172/JCI31178.effects
7. Routy JP, Routy B, Graziani GM, Mehraj V. The kynurenine pathway is a double-edged sword in immune-privileged sites and in cancer: Implications for immunotherapy. *Int J Tryptophan Res*. 2016;9(1):67-77. doi:10.4137/IJTR.S38355
8. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011;478(7368):197-203. doi:10.1038/nature10491
9. Liu M, Wang X, Wang L, et al. Targeting the IDO1 pathway in cancer: From bench to bedside. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1-12. doi:10.1186/s13045-018-0644-y
10. Theate I, Van Baren N, Pilotte L, et al. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(2):161-172. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0137
11. Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL. Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon- $\gamma$ -inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem*. 1996;271(29):17247-17252. doi:10.1074/jbc.271.29.17247
12. Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R. Mechanism of interferon- $\gamma$  action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon - $\gamma$  and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem*. 1988;263(4):2041-2048.

13. Litzenburger UM, Opitz CA, Sahm F, et al. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*. 2014;5(4):1038-1051. doi:10.18632/oncotarget.1637
14. Li P, Xu W, Liu F, et al. The emerging roles of IDO2 in cancer and its potential as a therapeutic target. *Biomed Pharmacother*. 2021;137(January):111295. doi:10.1016/j.biopha.2021.111295
15. Merlo LMF, Mandik-Nayak L. IDO2: A Pathogenic Mediator of Inflammatory Autoimmunity. *Clin Med Insights Pathol*. 2016;9s1:21-28. doi:10.4137/CPath.S39930
16. He G, Wan S, Wu Y, et al. Discovery of the First Selective IDO2 Inhibitor As Novel Immunotherapeutic Avenues for Rheumatoid Arthritis. *J Med Chem*. November 2022. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00263
17. Wu W, Nicolazzo JA, Wen L, et al. Expression of Tryptophan 2,3-Dioxygenase and Production of Kynurenine Pathway Metabolites in Triple Transgenic Mice and Human Alzheimer's Disease Brain. *PLoS One*. 2013;8(4). doi:10.1371/journal.pone.0059749
18. van Baren N, Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol*. 2015;6(FEB). doi:10.3389/fimmu.2015.00034
19. Ye Z, Yue L, Shi J, Shao M, Wu T. Role of IDO and TDO in cancers and related diseases and the therapeutic implications. *J Cancer*. 2019;10(12):2771-2782. doi:10.7150/jca.31727
20. Sumitomo M, Takahara K, Zennami K, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase in tumor cells is associated with resistance to immunotherapy in renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2021;112(3):1038-1047. doi:10.1111/cas.14797
21. Schramme F, Crosignani S, Frederix K, et al. Inhibition of tryptophan-dioxygenase activity increases the antitumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(1):32-45. doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0041
22. Badawy AAB. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int J Tryptophan Res*. 2017;10(1). doi:10.1177/1178646917691938
23. Salter M, Pogson CI. The role of tryptophan 2,3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells: Effects of glucocorticoids and experimental diabetes. *Biochem J*. 1985;229(2):499-504. doi:10.1042/bj2290499
24. Lewis-Ballester A, Forouhar F, Kim SM, et al. Molecular basis for catalysis and substrate-mediated cellular stabilization of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Sci Rep*. 2016;6(October):1-13. doi:10.1038/srep35169
25. Le Naour J, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G, Vacchelli E. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2020;9(1). doi:10.1080/2162402X.2020.1777625

26. Van den Eynde BJ, van Baren N, Baurain J-F. Is There a Clinical Future for IDO1 Inhibitors After the Failure of Epacadostat in Melanoma? *Annu Rev Cancer Biol.* 2020;4(1):241-256. doi:10.1146/annurev-cancerbio-030419-033635
27. Muller AJ, Manfredi MG, Zakharia Y, Prendergast GC. Inhibiting IDO pathways to treat cancer: lessons from the ECHO-301 trial and beyond. *Semin Immunopathol.* 2019;41(1):41-48. doi:10.1007/s00281-018-0702-0
28. Pei Z, Mendonca R, Gazzard L, et al. Aminoisoxazoles as Potent Inhibitors of Tryptophan 2,3-Dioxygenase 2 (TDO2). *ACS Med Chem Lett.* 2018;9(5):417-421. doi:10.1021/acsmchemlett.7b00427
29. Parr BT, Pastor R, Sellers BD, et al. Implementation of the CYP Index for the Design of Selective Tryptophan-2,3-dioxygenase Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2020;11(4):541-549. doi:10.1021/acsmchemlett.0c00004
30. Ning XL, Li YZ, Huo C, et al. X-ray Structure-Guided Discovery of a Potent, Orally Bioavailable, Dual Human Indoleamine/Tryptophan 2,3-Dioxygenase (hIDO/hTDO) Inhibitor That Shows Activity in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Med Chem.* 2021;64(12):8303-8332. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00303
31. Winters M, DuHadaway JB, Pham KN, et al. Diaryl hydroxylamines as pan or dual inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase-1, indoleamine 2,3-dioxygenase. *Eur J Med Chem.* 2019;162:455-464. doi:10.1016/j.ejmech.2018.11.010
32. Peng X, Zhao Z, Liu L, et al. Targeting Indoleamine Dioxygenase and Tryptophan Dioxygenase in Cancer Immunotherapy: Clinical Progress and Challenges. *Drug Des Devel Ther.* 2022;16(August):2639-2657. doi:10.2147/DDDT.S373780
33. Naing A, Eder JP, Piha-Paul SA, et al. Preclinical investigations and a first-in-human phase i trial of M4112, the first dual inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and tryptophan 2,3-dioxygenase 2, in patients with advanced solid tumors. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2):1-10. doi:10.1136/jitc-2020-000870
34. Campesato LF, Budhu S, Tchaicha J, et al. Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenine. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-11. doi:10.1038/s41467-020-17750-z
35. Hu M, Zhou W, Wang Y, et al. Discovery of the first potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10(10):1943-1953. doi:10.1016/j.apsb.2020.02.010
36. Moffat JG, Vincent F, Lee JA, Eder J, Prunotto M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: An industry perspective. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(8):531-543. doi:10.1038/nrd.2017.111

37. Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(7):507-519. doi:10.1038/nrd3480
38. Heynen-Genel S, Pache L, Chanda SK, Rosen J. Functional genomic and high-content screening for target discovery and deconvolution. *Expert Opin Drug Discov.* 2012;7(10):955-968. doi:10.1517/17460441.2012.711311
39. Dafniet B, Cerisier N, Boezio B, et al. Development of a chemogenomics library for phenotypic screening. *J Cheminform.* 2021;13(1):1-12. doi:10.1186/s13321-021-00569-1
40. Du L, Xing Z, Tao B, et al. Both IDO1 and TDO contribute to the malignancy of gliomas via the Kyn–AhR–AQP4 signaling pathway. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):1-13. doi:10.1038/s41392-019-0103-4
41. Liang H, Li T, Fang X, et al. IDO1/TDO dual inhibitor RY103 targets Kyn-AhR pathway and exhibits preclinical efficacy on pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2021;522:32-43. doi:10.1016/j.canlet.2021.09.012
42. Nakano S, Takai K, Isaka Y, et al. Identification of novel kynurenine production-inhibiting benzenesulfonamide derivatives in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;419(3):556-561. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.059
43. Koblisch HK, Hansbury MJ, Bowman KJ, et al. Hydroxyamidine inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase potently suppress systemic tryptophan catabolism and the growth of IDO-expressing tumors. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(2):489-498. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0628
44. Salter M, Hazelwood R, Pogson CI, Iyer R, Madge DJ. The effects of a novel and selective inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase on tryptophan and serotonin metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(10):1435-1442. doi:10.1016/0006-2952(95)00006-L
45. Leung BS, Stout LE, Shaskan EG, Thompson RM. Differential induction of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) by interferon- $\gamma$  in human gynecologic cancer cells. *Cancer Lett.* 1992;66(1):77-81. doi:10.1016/0304-3835(92)90283-2
46. Buscà R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK1 and ERK2 map kinases: Specific roles or functional redundancy? *Front Cell Dev Biol.* 2016;4(JUN):1-23. doi:10.3389/fcell.2016.00053
47. Ussar S, Voss T. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *J Biol Chem.* 2004;279(42):43861-43869. doi:10.1074/jbc.M406240200
48. Skarpen E, Flinder LI, Rosseland CM, et al. MEK1 and MEK2 regulate distinct functions by sorting ERK2 to different intracellular compartments. *FASEB J.* 2008;22(2):466-476. doi:10.1096/fj.07-8650com

49. Lei Zhou Xiaodong Tan Hidenobu Kamohara Wei Wang Baosheng Wang Jingang Liu Hiroshi Egami Hideo Baba Xianwei Dai. MEK1 and MEK2 isoforms regulate distinct functions in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 2010;24(1). doi:10.3892/or\_00000853
50. Jung SM, Park SS, Kim WJ, Moon SK. Ras/ERK1 pathway regulation of p27KIP1-mediated G1-phase cell-cycle arrest in cordycepin-induced inhibition of the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2012;681(1-3):15-22. doi:10.1016/j.ejphar.2012.02.003
51. Gagliardi M, Pitner MK, Park J, et al. Differential functions of ERK1 and ERK2 in lung metastasis processes in triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-12. doi:10.1038/s41598-020-65250-3
52. Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY. Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncol Lett.* 2011;2(6):1131-1137. doi:10.3892/ol.2011.375
53. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene.* 1998;16(17):2259-2264. doi:10.1038/sj.onc.1201756
54. Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol.* 1998;143(5):1375-1383. doi:10.1083/jcb.143.5.1375
55. Mahandranauth ,A C, Cimona, V H. PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer. *Bone.* 2012;23(1):1-7. doi:10.3109/10799893.2012.695798.PTEN
56. Thomas SL, Alam R, Lemke N, Schultz LR, Gutiérrez JA, Rempel SA. PTEN augments SPARC suppression of proliferation and inhibits SPARC-induced migration by suppressing SHC-RAF-ERK and AKT signaling. *Neuro Oncol.* 2010;12(9):941-955. doi:10.1093/neuonc/noq048
57. Chilampalli C, Guillermo R, Zhang X, et al. Effects of magnolol on UVB-induced skin cancer development in mice and its possible mechanism of action. *BMC Cancer.* 2011;11(1):456. doi:10.1186/1471-2407-11-456
58. Malmlöf M, Roudier E, Högberg J, Stenius U. MEK-ERK-mediated phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in hepatocytes: Mdm2 is activated in response to inhibited Akt signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2288-2296. doi:10.1074/jbc.M604953200
59. Liu CY, Chu PY, Huang CT, et al. Varlitinib downregulates HER/ERK signaling and induces apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Cancers (Basel).* 2019;11(1). doi:10.3390/cancers11010105
60. Ochs K, Ott M, Rauschenbach KJ, et al. Tryptophan-2,3-dioxygenase is regulated by prostaglandin E2 in malignant glioma via a positive signaling loop involving



- prostaglandin e receptor-4. *J Neurochem.* 2016;136(6):1142-1154.  
doi:10.1111/jnc.13503
61. Xia Q, Hu Q, Wang H, et al. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1702. doi:10.1038/cddis.2015.69
  62. Chiu WT, Shen SC, Chow JM, Lin CW, Shia LT, Chen YC. Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE2 activation. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):118-129.  
doi:10.1016/j.nbd.2009.09.015
  63. Kudo T, Prentzell MT, Mohapatra SR, et al. Constitutive Expression of the Immunosuppressive Tryptophan Dioxygenase TDO2 in Glioblastoma Is Driven by the Transcription Factor C/EBP $\beta$ . *Front Immunol.* 2020;11(May):1-9.  
doi:10.3389/fimmu.2020.00657
  64. Tai MH, Weng CH, Mon DP, Hu CY, Wu MH. Ultraviolet C Irradiation induces different expression of Cyclooxygenase 2 in NIH 3T3 cells and A431 cells: The roles of COX-2 are different in various Cell lines. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4351-4366.  
doi:10.3390/ijms13044351
  65. Kochel TJ, Reader JC, Ma X, Kundu N, Fulton AM. Multiple drug resistance-associated protein (MRP4) exports prostaglandin E2 (PGE2) and contributes to metastasis in basal/triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(4):6540-6554.  
doi:10.18632/oncotarget.14145
  66. Zhu H, Liu W, Cheng Z, et al. Targeted Delivery of siRNA with pH-Responsive Hybrid Gold Nanostars for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2029.  
doi:10.3390/ijms18102029
  67. Chen YH, Yang CM, Chang SP, Hu ML. C/EBP beta and C/EBP delta expression is elevated in the early phase of ethanol-induced hepatosteatosis in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(8):1138-1143. doi:10.1038/aps.2009.109
  68. Liu Q, Hua S, Wang X, Chen F, Gou S. The introduction of immunosuppressor (TDO inhibitor) significantly improved the efficacy of irinotecan in treating hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(2):497-508. doi:10.1007/s00262-020-02697-3
  69. Matsuno K, Takai K, Isaka Y, et al. S-Benzylisothiurea derivatives as small-molecule inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2010;20(17):5126-5129. doi:10.1016/j.bmcl.2010.07.025

70. Tang K, Wu YH, Song Y, Yu B. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors in clinical trials for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):1-21. doi:10.1186/s13045-021-01080-8
71. Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, et al. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem*. 1994;269(43):26677-26683. doi:10.1016/s0021-9258(18)47072-x
72. Pham KN, Lewis-Ballester A, Yeh SR. Structural Basis of Inhibitor Selectivity in Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 and Tryptophan Dioxygenase. *J Am Chem Soc*. 2019;141(47):18771-18779. doi:10.1021/jacs.9b08871
73. Wu Y, Xu T, Liu J, Ding K, Xu J. Structural insights into the binding mechanism of IDO1 with hydroxylamidine based inhibitor INCB14943. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(2):339-343. doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.061
74. Opitz CA, Somarribas Patterson LF, Mohapatra SR, et al. The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122(1):30-44. doi:10.1038/s41416-019-0664-6
75. Prendergast GC, Malachowski WP, DuHadaway JB, Muller AJ. Discovery of IDO1 Inhibitors: From bench to bedside. *Cancer Res*. 2017;77(24):6795-6811. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2285
76. Robin T, Reuveni S, Urbakh M. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-9. doi:10.1038/s41467-018-02995-6
77. Röhrig UF, Majjigapu SR, Vogel P, Zoete V, Michielin O. Challenges in the Discovery of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors. *J Med Chem*. 2015;58(24):9421-9437. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00326
78. 河合佑里香. キヌレニン経路の亢進による腫瘍微小環境の免疫学的変化と阻害薬による効果. 静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府修士論文. 2022.
79. Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2497-2502. doi:10.1073/pnas.1113873109
80. Tourino MC, de Oliveira EM, Bellé LP, et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. *Cell Biochem Funct*. 2013;31(5):361-364. doi:10.1002/cbf.2980
81. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation

- induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 2002;196(4):459-468. doi:10.1084/jem.20020121
82. Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, et al. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*. 2006;108(13):4118-4125. doi:10.1182/blood-2006-03-006700
  83. Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, et al. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol*. 2003;160(6):875-885. doi:10.1083/jcb.200210158
  84. Song H, Park H, Kim YS, et al. L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(8):932-938. doi:10.1016/j.intimp.2011.02.005
  85. Yue EW, Sparks R, Polam P, et al. INCB24360 (Epcadostat), a Highly Potent and Selective Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor for Immuno-oncology. *ACS Med Chem Lett*. 2017;8(5):486-491. doi:10.1021/acsmchemlett.6b00391
  86. Grobben Y, de Man J, van Doornmalen AM, et al. Targeting Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Cancer Models Using the Novel Small Molecule Inhibitor NTRC 3883-0. *Front Immunol*. 2021;11(January):1-15. doi:10.3389/fimmu.2020.609490
  87. Jiang X, Li X, Zheng S, et al. Comparison study of different indoleamine-2,3 dioxygenase inhibitors from the perspective of pharmacodynamic effects. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2020;34. doi:10.1177/2058738420950584
  88. Badawy AAB, Guillemin G. The Plasma [Kynurenine]/[Tryptophan] Ratio and Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Time for Appraisal. *Int J Tryptophan Res*. 2019;12. doi:10.1177/1178646919868978
  89. Hellmann MD, Gettinger S, Chow LQM, et al. Phase 1 study of epcadostat in combination with atezolizumab for patients with previously treated advanced nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2020;147(7):1963-1969. doi:10.1002/ijc.32951
  90. Odunsi K, Qian F, Lugade AA, et al. Metabolic adaptation of ovarian tumors in patients treated with an IDO1 inhibitor constrains antitumor immune responses. *Sci Transl Med*. 2022;14(636). doi:10.1126/scitranslmed.abg8402