

〈原著論文〉

精巣上体炎における indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の役割に関する検討

大平 伸

川崎医科大学泌尿器科学

抄録 Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) は、必須アミノ酸であるトリプトファンのキヌレニン代謝経路における律速酵素であり、免疫反応への関連性が示唆されている。これまでに我々は、IDO が精巣上体頭部に高く発現すると報告している。しかし、その役割について明らかにされていない。今回、我々は精巣上体炎における IDO の役割について検討した。

実験動物は12週齢、雄性、C57BL/6マウス、野生型マウス (*Ido*^{+/+}) および IDO ノックアウトマウス (*Ido*^{-/-}) を用いた。精管側から精巣上体へ lipopolysaccharide (LPS) を投与することで、精巣上体炎モデルを作成し、LPS 投与後に精巣上体を摘出した。精巣上体における IDO の経時的な発現について IDO 定量検査 (ELISA 法) を用いて解析した。また、精巣上体における炎症性変化について、網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査により代表マーカーを選出し、免疫染色を行うことで、精巣上体炎における IDO の働きについて生化学的および免疫組織学的に検討した。

HE 染色では、*Ido*^{-/-} は *Ido*^{+/+} と比較して、リンパ球優位の炎症細胞浸潤および精巣上体内の腺管構造破壊が抑制されていた。IDO 定量検査 (ELISA 法) では、*Ido*^{+/+} は *Ido*^{+/+}sham と比較して、LPS 投与後1日目、3日目において、精巣上体内における IDO 発現の有意な上昇を認めた。*Ido*^{-/-} では全ての観察期間において IDO の発現を認めなかった。網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査では、*Ido*^{-/-} において *Ido*^{+/+} と比較して、炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) の発現が抑制され、炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) の発現が促進されていた。各種マーカーを用いた免疫染色においても同様に、炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) の発現が抑制され、炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) の発現が促進されていた。

精巣上体では、IDO を介したサイトカイン/ケモカインの調節が行われている可能性がある。IDO を阻害することにより、精巣上体炎に対して精巣上体内の組織保護作用を有すると推測され、抗菌薬に加えて IDO 阻害薬が新規治療薬となる可能性があると考えられる。

doi:10.11482/KMJ-J44(1)1 (平成29年10月13日受理)

キーワード：精巣上体炎, Indoleamine 2,3-dioxygenase

緒言

必須アミノ酸の1つであるトリプトファン

は、体内の合成経路ではタンパク合成に利用される。分解経路では、約95%のトリプトファン

別刷請求先

大平 伸

〒701-0192 倉敷市松島577

川崎医科大学泌尿器科学

電話：086 (463) 4747

ファックス：086 (463) 4747

Eメール：ohira@med.kawasaki-m.ac.jp

は、キヌレニン経路から分解され、中間代謝産物やニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド (NAD) を合成する¹⁾。1～5%のトリプトファンは、メトキシインドール経路から、セロトニンを経てメラトニンを合成する¹⁾。Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) は、キヌレニン経路の律速酵素であり (図1)、403個のアミノ酸から構成された45kDaのモノメリックな酵素である²⁻⁵⁾。IDOは、感染症や炎症等の免疫システムの活性化が伴う病態において局所あるいは全身性に数倍から数十倍と強く誘導され、免疫反応に関与することが判明している^{3, 6)}。また近年、IDO阻害による全身性感染症に対する炎症を抑制する効果が判明している^{7, 8)}。しかし、現時点で局所感染症に対するIDOの役割は一定の見解は得られていない。

Yoshidaら⁹⁾は、齧歯動物におけるIDOの臓器発現を検討し、精巣上体において高発現することを報告した。また、Takikawaら¹⁰⁾は、精巣上体におけるIDOの発現について検討し、精

巣上体内では他臓器におけるIDOの主な誘導物質であるINF- γ の作用を受けず恒常的にIDOを発現していることを報告した。その後、哺乳動物においても精巣上体におけるIDO mRNAの発現が確認された¹¹⁻¹³⁾。精巣上体は組織解剖学的に頭部、体部、尾部の3つの領域に分類される^{14, 15)}。我々は、これまでにマウスを用いて精巣上体内におけるIDOの局在を検討し、精巣上体頭部に局在して発現していることを確認した^{12, 16)}。しかし、現時点で精巣上体頭部におけるIDO発現や役割については明確にされていない。

精巣上体炎は、精巣上体における代表的な炎症性疾患であり、成人男性の0.25～0.65%に発症する¹⁷⁾。抗菌薬治療を行った場合でも、治療抵抗性を示す難治例が散見される。難治例に対しては、現在、明確な治療薬が存在しない¹⁸⁾。我々は、IDOが免疫反応に関与し、精巣上体に高く発現することに着目し、IDOを阻害することで精巣上体の局所感染である精巣上体炎にお

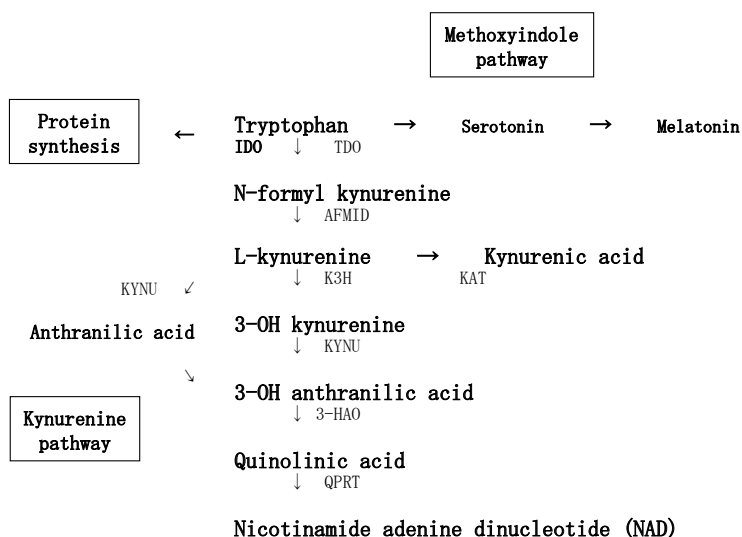


図1 トリプトファン代謝経路

キヌレニン代謝経路は必須アミノ酸トリプトファンの主な代謝経路である。IDOおよび tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) は、キヌレニン代謝経路の律速酵素である。トリプトファンは様々な酵素により代謝分解され、最終産物であるニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド (NAD) を生合成する。キヌレニン代謝経路の中間代謝産物には、様々な生理活性を有するものが多い。AFMID: arylformamidase, KYNU: kynureninase, K3H: kynurenine 3-hydroxylase, KAT: kynurenine aminotransferase, 3-HAO: 3-hydroxyamino oxidase, QPRT: quinolinate phosphoribosyltransferase

いても炎症抑制効果があると推測しており、今回、マウス精巣上体炎モデルを作成し、精巣上体炎におけるIDOの役割について検討した。

対象と方法

実験動物

12週齢、雄性、C57BL/6マウス、野生型マウス (*Ido*^{+/+}, Jackson Laboratory, ME, USA)、およびIDOノックアウトマウス (*Ido*^{-/-}, Jackson Laboratory, ME, USA) に対して、セポフルラン (導入5%, 維持3%, Phizer Incorporated, Tokyo, Japan) を用いて吸入麻酔下に精管側から精巣上体に lipopolysaccharide (LPS) *Escherichia Coli* O26 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 100 μ g (溶液: 超純水100 μ l) を投与し、精巣上体炎モデルを作成した。LPS投与後1, 3, 5および7日目に精巣上体を摘出し、精巣上体内の組織変化を検討した。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会および川崎医科大学組換えDNA実験安全委員会の承認を受け (No.14-108, 16-047, 川換14-35), 川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施した。

組織学的解析

摘出組織をカルノア液 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) により固定 (固定時間: 3時間) を行った。エタノールによる脱水処理を加えた後、パラフィン埋没を行った。埋没組織を5 μ m厚で薄切し、脱パラフィン後にヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色を行い、光学顕微鏡 (Olympus BX-53, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて組織学的解析を行った。

IDOの発現解析

摘出組織に Cell Lysis Buffer[®] (ホスファターゼ阻害薬・プロテアーゼ阻害薬含有, Cell signaling technology, CA, USA), PMSF (1mM, Cell signaling technology, CA, USA) を加え、ホモジナイザーによる破碎を行った。遠心分離 (15,000 \times g, 5分間, 5 $^{\circ}$ C) を行った後、組織片を除去した。精巣上体

におけるIDOの経時的な発現を Ido ELISA Kit (Mouse) (OKEH03384)[®] (Aviva Systems Biology, CA, USA) を用いて検討した。測定機器は Varioskan Flash[®] (Thermo Fisher Scientific, Weltham, MA, USA) を用いて、測定波長を540 nm に設定し、吸光度を測定することで定量検査を行った。

炎症性変化に対する生化学的解析

ホモジナイズを行い、組織片を除去した精巣上体サンプル内のタンパク濃度を300 μ g/ml に調整し、Mouse Cytokine Antibody Array, Panel A[®] (R&D Systems, MN, USA) を用いて網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査を行った。画像解析装置 Image Quant LAS4000 mini[®] (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan), 画像解析ソフトウェア Image Quant TL[®] (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いて pixel density (PD) を算出し、PD ratio は *Ido*^{-/-} / *Ido*^{+/+} PD 比を用いた。

炎症性変化に対する免疫組織学的解析

パラフィン埋没組織を5 μ m厚で薄切し、脱パラフィン後に BLOXALL[™] (Vector laboratories, CA, USA) を用いてブロッキング処理 (室温, 10分間) を行った。1次抗体は網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査で選出したマーカーを使用した。1次抗体として、anti-rabbit IL-1 α antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-rabbit IL-6 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-rabbit CCL3 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-rabbit CXCL1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-rabbit IL-4 antibody (Novus Biologicals, CO, USA) および anti-rabbit IL-10 antibody (Bioss Antibodies Inc., MA, USA) を用いて、2.5% normal horse serum (Vector laboratories, CA, USA) により100倍希釈した後、反応 (4 $^{\circ}$ C, overnight) を行った。2次抗体として免疫染色試薬 ImmPRESS[™]-Alkaline Phosphatase (AP) Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit[®] (Vector

laboratories, CA, USA) を用いた。免疫染色基質として IL-1 α および IL-6 免疫染色に対しては, ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase (AP) Substrate[®] (Vector laboratories, CA, USA), CCL3 および CXCL1 免疫染色に対しては, BCIP/NBT Alkaline Phosphatase (AP) Substrate Kit, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium[®] (Vector laboratories, CA, USA), IL-4 および IL-10 染色に対しては Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment, Alexa Fluor 488 Conjugate[®] (Cell signaling technology, CA, USA) を用いた。対比染色として 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector laboratories, CA, USA) を用いて核染色を行い, VectaMount Permanent Mounting Medium[®] (Vector laboratories, CA, USA) により封入を行った後, 蛍光顕微鏡 (Olympus BX-53, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて免疫組織学的検討を行った。

統計学的解析

網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査の結果は, 平均値 (mean) で記した。また, IDO の発現解析と代表的サイトカイン/ケモカインの経時的変化は, 平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で記した。群間の比較には Welch test を用

いた。p<0.05を有意差ありとした。統計解析は Microsoft Excel 2016 edition を使用した。

結果

組織学的解析 (図2)

HE 染色では, *Ido*^{+/+} において, LPS 投与後 1 日目からリンパ球優位の炎症細胞浸潤が認められ, LPS 投与後 5 日目から精巣上体内の腺管構造の破壊が認められた。*Ido*^{-/-} は *Ido*^{+/+} と比較して, 炎症細胞浸潤および精巣上体内の腺管構造の破壊が抑制されていた。

IDO の発現解析 (図3)

IDO の経時的変化について定量検査 (ELISA 法) を用いて検討した。IDO 定量検査 (ELISA 法) において, *Ido*^{+/+} は *Ido*^{+/+} sham と比較して, LPS 投与後 1 日目, 3 日目において, 精巣上体内における IDO 発現の有意な上昇を認めた。*Ido*^{-/-} では全ての観察期間において IDO の発現を認めなかった。

炎症性変化に対する生化学的解析 (表1, 図4)

網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査では, *Ido*^{-/-} は *Ido*^{+/+} と比較して, 炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン

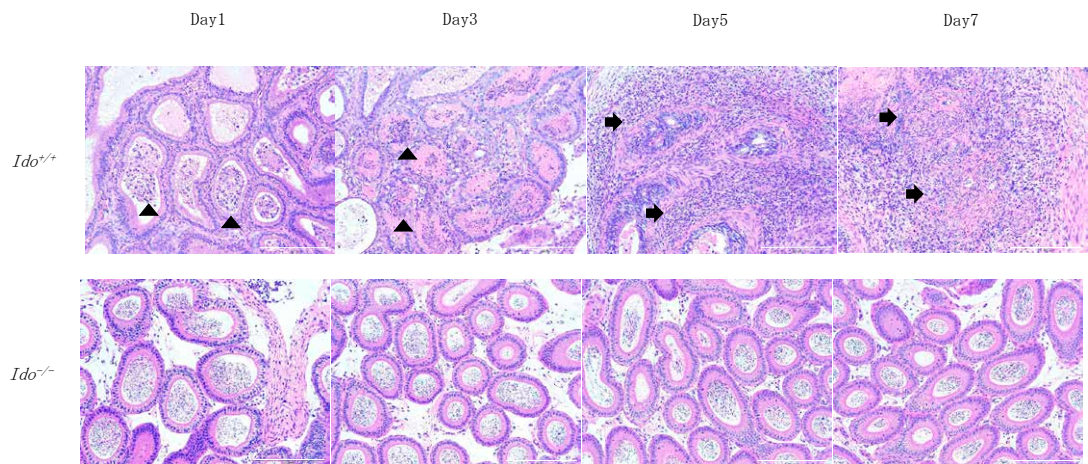


図2 精巣上体の HE 染色像 (n=5)

Ido^{+/+} において, LPS 投与後 1 日目からリンパ球優位の炎症細胞浸潤 (▲) を認め, 5 日目から精巣上体内の腺管構造破壊 (➡) を認めた。*Ido*^{+/+} と比較して *Ido*^{-/-} では, 炎症細胞浸潤および腺管構造の破壊が抑制されていた。スケールバー: 200 μ m, 観察倍率: 200倍

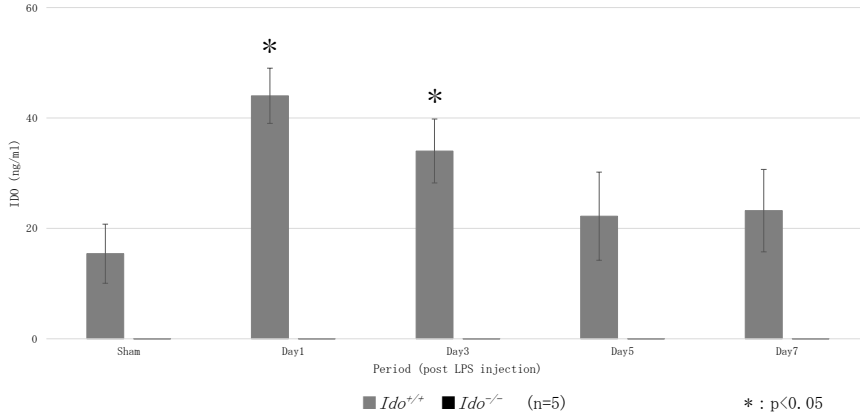


図3 IDOの発現解析

Ido^{+/+} は *Ido*^{+/+} sham と比較して、LPS 投与後1日目、3日目において、精巣上体内におけるIDO発現の有意な上昇を認めた。*Ido*^{-/-} では全ての観察期間においてIDOの発現を認めなかった。

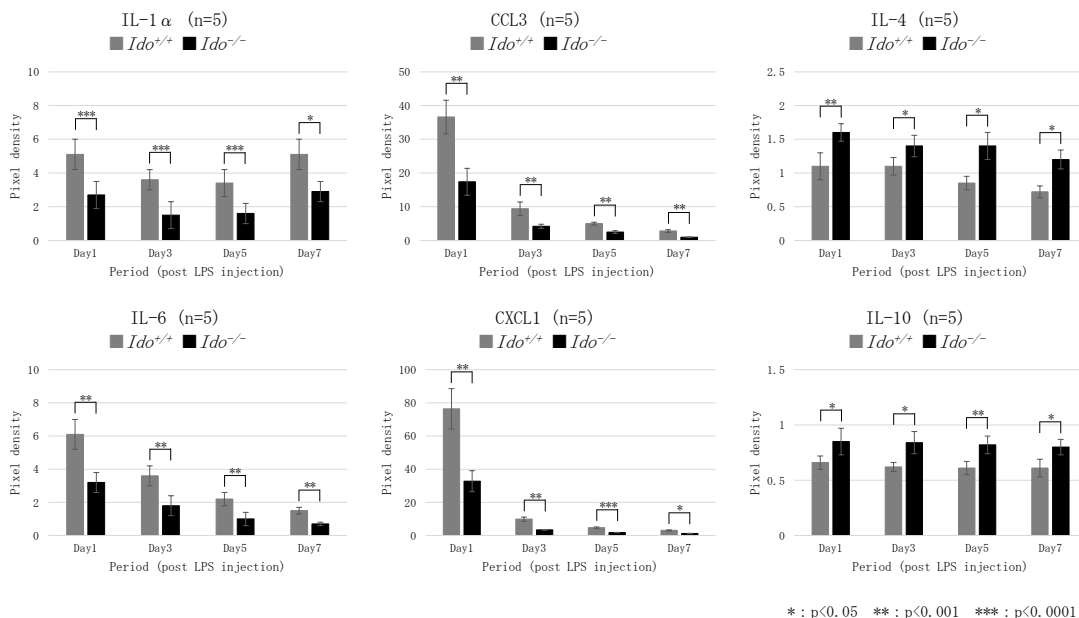
表1 精巣上体におけるサイトカイン/ケモカインの網羅的解析

PD ratio	IL-1 α	CXCL1	CCL3	IL-6	IL-12p70	IL-1 β	CXCL2	TREM1	CCL2	CCL4	TNF- α	CXCL12	CXCL9	CCL5	IL-23	CCL12	G-CSF	TIMP	M-CSF	CXCL10
Day1	0.53***	0.51**	0.57**	0.62**	0.63*	0.71*	0.71*	0.72*	0.86*	0.68*	0.67*	0.72**	0.72*	0.71**	0.77***	0.76***	0.72*	0.86*	0.71	0.89*
Day3	0.42***	0.44**	0.54**	0.59**	0.67**	0.62**	0.69**	0.80*	0.78*	0.71*	0.86*	0.75*	0.89*	0.79**	0.86***	0.77**	0.71*	0.76*	0.76	0.74**
Day5	0.46***	0.58***	0.59**	0.67**	0.78**	0.86*	0.74*	0.74*	0.66**	0.76*	0.79*	0.79*	0.71**	0.79*	0.75***	0.77**	0.85**	0.75**	0.84	0.88*
Day7	0.57*	0.66*	0.66**	0.67**	0.76**	0.72*	0.82*	0.71*	0.72*	0.88*	0.72**	0.81**	0.79*	0.83*	0.74***	0.84**	0.86	0.83*	0.91	0.84*

PD ratio	IL-27	IL-16	GM-CSF	CCL11	IL-2	CCL1	IL-13	INF- γ	CXCL13	CD54	CXCL11	IL-7	IL-3	IL-5	C5/C5a	IL-1ra	CCL17	IL-17	IL-4	IL-10
Day1	0.96	0.81*	0.99	1.01	0.99	0.98	0.88	0.99	0.99	0.89	0.99	0.99	1.00	1.03	0.99	1.03	0.98	1.01	1.21**	1.29*
Day3	0.77*	0.87*	0.92	0.71*	0.89*	0.96	0.93	1.00	0.95	0.99	0.92	0.99	0.99	1.02	0.99	1.07	1.01	1.06	1.31*	1.37*
Day5	0.87*	0.83*	0.78**	0.78	0.87	0.97	0.94	0.96	0.84	1.01	0.97	0.97	0.96	0.98	0.96	0.99	1.01	0.96	1.23*	1.44**
Day7	0.70*	0.88	0.72*	0.96	0.84*	0.75*	0.94	0.78*	0.98	0.91	0.93	0.86	0.96	0.89	0.99	0.99	0.99	0.99	1.33*	1.31*

PD ratio (mean) = *Ido*^{-/-} / *Ido*^{+/+} PD (n=5) * : p<0.05 ** : p<0.001 *** : p<0.0001

Ido^{-/-} は *Ido*^{+/+} と比較して、炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) の有意な低下を認めた。他の単球・マクロファージ系炎症促進性サイトカインおよびケモカインにおいても、経時的変化を確認した場合、一時的に有意な低下を認めた。一方、*Ido*^{-/-} は *Ido*^{+/+} と比較して、炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) の有意な上昇を認めた。



* : p<0.05 ** : p<0.001 *** : p<0.0001

図4 代表的サイトカイン/ケモカインの経時的変化

Idm^{-/-} は *Idm*^{+/+} と比較して、LPS 投与後 1 日目、7 日目を中心として IL-1 α の有意な低下を認めた。また、*Idm*^{-/-} は *Idm*^{+/+} と比較して、LPS 投与後 1 日目、3 日目を中心として IL-6、CCL3、CXCL1 の有意な低下を認めた。一方、*Idm*^{-/-} は *Idm*^{+/+} と比較して、全ての観察期間において IL-4、IL-10 の有意な上昇を認めた。

(CCL3, CXCL1) の有意な低下を認めた。他の単球・マクローファージ系炎症促進性サイトカインおよびケモカインにおいても、経時的変化を確認した場合、一時的に有意な低下を認めた。一方、*Idm*^{-/-} は *Idm*^{+/+} と比較して、炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) の有意な上昇を認めた。網羅的定量検査で選出された、炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6)、ケモカイン (CCL3, CXCL1) および炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) の経時的変化では、*Idm*^{-/-} は *Idm*^{+/+} と比較して、LPS 投与後 1 日目、7 日目を中心として IL-1 α の有意な低下を認め、LPS 投与後 1 日目、3 日目を中心として IL-6、CCL3、CXCL1 の有意な低下を認めた。一方、*Idm*^{-/-} は *Idm*^{+/+} と比較して、全ての観察期間において IL-4、IL-10 の有意な上昇を認めた。

炎症性変化に対する免疫組織学的解析 (図5)

サイトカイン/ケモカインの網羅的定量検査で選出された、炎症促進性サイトカイン (IL-1 α ,

IL-6)、ケモカイン (CCL3, CXCL1) および炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) を代表的マーカーとして免疫染色を行った。免疫染色では、*Idm*^{+/+} において、腺管細胞および間質を中心とした炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) の発現が亢進していた。*Idm*^{-/-} では、腺管細胞および間質における炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) の発現が抑制され、間質および腺管内での炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) の発現が促進されていた。

考察

精巣上体における免疫担当細胞は、その役割が明確に区別されている¹⁹⁾。精巣上体内における免疫担当細胞数は、精巣上体頭部で最も多く、活動性が高いことが報告されており、尾部では、徐々に細胞数および活動性が低下していることが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。マクローファ-

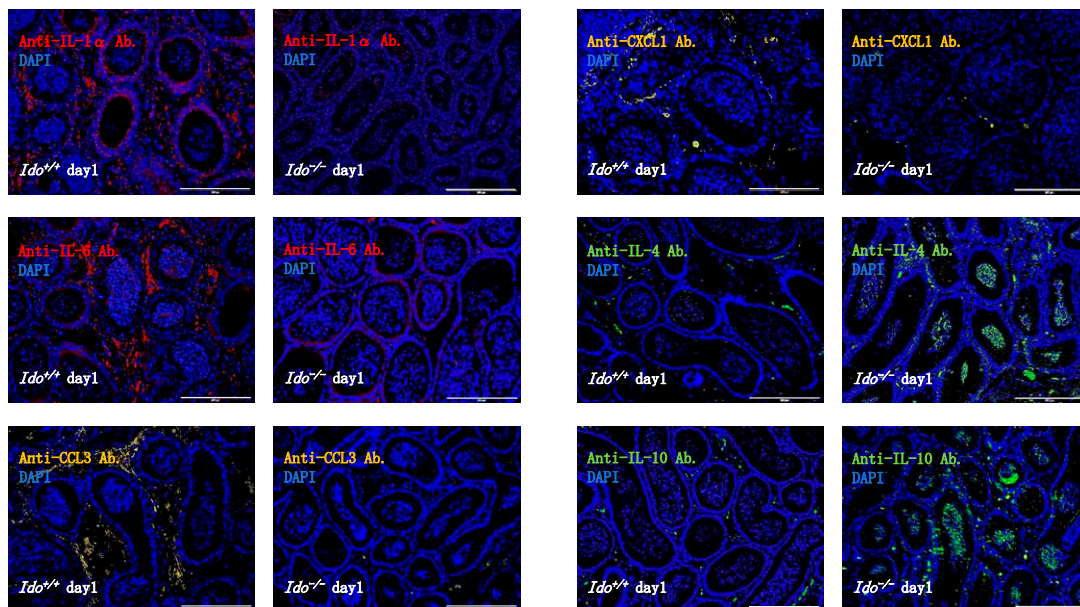


図5 精巣上体の免疫組織染色像 (n = 5)

Ido^{+/+}において、腺管周囲および間質を中心とした炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) の発現が亢進していた。*Ido*^{-/-}では、腺管細胞および間質における炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) の発現が抑制され、間質および腺管内での炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) の発現が促進されていた。対比染色：DAPI核染色、スケールバー：200 μ m、観察倍率は200倍

ジは、代表的な免疫担当細胞であり、精巣上体内の管腔周囲や間質に存在し、主に主要組織適合抗原 (MHC) class II を介した、CD4⁺ T 細胞による液性免疫を調整していることが報告されている^{19, 20, 22}。樹状細胞もまた代表的な免疫担当細胞であり、基底層に存在し、腺管上皮における CD8⁺ T 細胞を介した細胞性免疫を調整し^{19, 20, 22, 23}、間質における CD4⁺ T 細胞を介した液性免疫を調整していることが知られている²¹。これらは、精巣上体内の精子における免疫反応に対して抑制的調節機構として働き、感染症などの異物抗原に対する免疫反応に対して促進的調節機構として働く²⁴。また、IDO は精巣上体頭部に高く発現し¹¹⁻¹³、TGF- β ファミリーである activin A により mRNA の発現調整を受けることが報告されている^{25, 26}。Activin A により発現された IDO は、免疫担当細胞を活性化するとともに、異物識別能を有する Toll 様レセプター (TLR) を発現させる²⁷。精巣上体頭部における TLR1~6 の発現は、精巣と同程

度であるが^{28, 29}、TLR7, 9, 11 および CD14 共結合 TLR4 は、精巣より高い傾向にある^{28, 29}。精巣上体特有の TLR 分画が免疫系に関与し、その調節の中心的役割が IDO である可能性がある。

Takikawa⁷⁾は、LPS 投与によるマウス敗血症モデルを作成し、敗血症による IDO の誘導がトリプトファン代謝を亢進させ、トリプトファンレベルの枯渇状態を招くことを報告した。この状態は、トリプトファンを正常レベルに戻そうとする生体防御反応としてタンパク質の異化亢進を招き、膠質浸透圧の維持に支障をきたすことで危機的な状況を招くと推測されている。Jung ら⁸⁾は、LPS 投与による敗血症モデルを作成し、*Ido*^{+/+} は *Ido*^{-/-} と比較して、IDO が有意に誘導されることを報告した。また、*Ido*^{-/-} は *Ido*^{+/+} と比較して、炎症促進性サイトカインである TNF- α , IL-6 および IL-12 の血中濃度が低下し、炎症抑制性サイトカインである IL-10 の血中濃度が上昇し、敗血症性ショックによる

死亡率が低下したことを報告した。IDO の誘導と炎症性変化の増悪には関連性があると推測されている。本研究では、局所感染モデルである LPS を用いた精巣上体炎に対する IDO の役割について検討を行った。精巣上体における局所感染症においても、全身感染症の代表疾患である敗血症モデルと同様に、*Ido*^{+/+} において、IDO が有意に誘導されることを確認した (図 3)。また、*Ido*^{-/-} は *Ido*^{+/+} と比較して、炎症促進性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) およびケモカイン (CCL3, CXCL1) が抑制され、炎症抑制性サイトカイン (IL-4, IL-10) が促進されており、IDO 阻害による炎症抑制効果を確認した。精巣上体における局所感染症においても、全身感染症と同様に、IDO の誘導と炎症性変化の増悪には経時的な相関性があると推測される。我々は、IDO が誘導されることで炎症性変化を増悪する機序として、キヌレニン代謝産物が中心的な役割を担っており、加えてトリプトファンの枯渇が病状の増悪を助長すると推測している。キヌレニン代謝産物の産生阻害およびトリプトファン補充による追加検討が必要であり、また、臨床応用に向けて IDO 阻害薬を用いた炎症抑制効果を検討する必要があると考えられる。

結 語

精巣上体では、IDO を介したサイトカイン / ケモカインの調節が行われている可能性がある。IDO を阻害することにより、精巣上体炎に対して精巣上体内の組織保護作用を有すると推測され、抗菌薬に加えて IDO 阻害薬が新規治療薬となる可能性があると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御高閣を賜りました川崎医科大学泌尿器科学教授 永井敦先生、東京電機大学大学院生命理工学系分子発生生物学教授 刀柄重信先生、川崎医科大学泌尿器科学講師 原綾英先生には、深なる謝意を表します。なお、本研究は公益財団法人・川崎医学・医療福祉学振興会の研究助成により行われた。

引用文献

- 1) Oxenkrug GF: Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1199: 1-14, 2010
- 2) Shimizu T, Nomiya S, Hirata F, Hayaishi O: Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem* 253: 4700-4706, 1978
- 3) Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayaishi O: Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 261: 3648-3653, 1986
- 4) Werner ER, Bitterlich G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Szabo G, Dierich MP, Wachter H: Human macrophages degrade tryptophan upon induction by interferon-gamma. *Life Sci* 41: 273-280, 1987
- 5) Taylor MW, Feng GS: Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5: 2516-2522, 1991
- 6) Yoshida R, Hayaishi O: Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 3998-4000, 1978
- 7) Takikawa O: Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 12-19, 2005
- 8) Jung ID, Lee MG, Chang JH, *et al.*: Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *J Immunol* 182: 3146-3154, 2009
- 9) Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayaishi O: Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch Biochem Biophys* 203: 343-351, 1980
- 10) Takikawa O, Tagawa Y, Iwakura Y, Yoshida R, Truscott RJ: Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice. *Adv Exp Med Biol* 467: 553-557, 1999
- 11) Yeung AW, Terentis AC, King NJ, Thomas SR: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 129: 601-672, 2015
- 12) Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL: Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod*

- Immunol 61: 67-77, 2004
- 13) Tone S, Britan A, Jrad A, Maffre V, Drevet JR: The mouse epididymis: A site of strong and constitutive expression of the tryptophan metabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). *Int Congr Ser* 1304: 233-240, 2007
 - 14) Lasserre A, Barrozo R, Tezón JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH: Human epididymal proteins and sperm function during fertilization: an update. *Biol Res* 34: 165-178, 2001
 - 15) Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F: Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63: 319-341, 2005
 - 16) Jrad-Lamine A, Henry-Berger J, Gourbeyre P, *et al.*: Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. *J Biol Chem* 286: 8030-8042, 2011
 - 17) Çek M, Sturdza L, Pilatz A: Acute and Chronic Epididymitis. *Eur Urol Suppl* 16: 124-131, 2017
 - 18) Nickel JC: Chronic epididymitis: a practical approach to understanding and managing a difficult urologic enigma. *Rev Urol* 5: 209-215, 2003
 - 19) Flickinger CJ, Bush LA, Howards SS, Herr JC: Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat Rec* 248: 380-390, 1997
 - 20) Nashan D, Malorny U, Sorg C, Cooper T, Nieschlag E: Immuno-competent cells in the murine epididymis. *Int J Androl* 12: 85-94, 1989
 - 21) Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ, Breton S: A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141: 653-663, 2011
 - 22) Ritchie AW, Hargreave TB, James K, Chisholm GD: Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens? *Br J Urol* 56: 79-83, 1984
 - 23) Yakirevich E, Yanai O, Sova Y, Sabo E, Stein A, Hiss J, Resnick MB: Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum Reprod* 17: 275-283, 2002
 - 24) Michel V, Pilatz A, Hedger MP, Meinhardt A: Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. *Asian J Androl* 17: 756-763, 2015
 - 25) Winnall WR, Wu H, Sarraj MA, Rogers PA, de Kretser DM, Girling JE, Hedger MP: Expression patterns of activin, inhibin and follistatin variants in the adult male mouse reproductive tract suggest important roles in the epididymis and vas deferens. *Reprod Fertil Dev* 25: 570-580, 2013
 - 26) Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, *et al.*: Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 12: 870-878, 2011
 - 27) Hedger MP: Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl* 32: 625-640, 2011
 - 28) Malm J, Nordahl EA, Bjartell A, Sørensen OE, Frohm B, Dentener MA, Egesten A: Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with spermatozoa and prostasomes. *J Reprod Immunol* 66: 33-43, 2005
 - 29) Rodrigues A, Queiróz DB, Honda L, Silva EJ, Hall SH, Avellar MC: Activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by in vivo and in vitro exposure of rat epididymis to lipopolysaccharide from *Escherichia Coli*. *Biol Reprod* 79: 1135-1147, 2008

〈Regular Article〉

The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in epididymitis

Shin OHIRA

Department of Urology, Kawasaki Medical School

ABSTRACT Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) catalyzes the first and rate-limiting step of tryptophan catabolism and has been implicated in immune tolerance. IDO is induced in various tissues during systematic bacterial infection and plays a key role in immune response. In a previous study, we showed that epididymal IDO expression in mouse is restricted to the caput region. We hypothesize that IDO plays a central role in local immunological reactions in the epididymis. To examine this hypothesis, we investigated several cytokines in an epididymitis model in an IDO knockout mouse (*Ido*^{-/-}).

Twelve-week-old male mice were used in the study. Wild type mice (*Ido*^{+/+}) and *Ido*^{-/-} were injected with lipopolysaccharide (LPS 100 μ g) in the epididymis on the side of the vas deferens. After LPS injection, the epididymis was removed in a time-dependent manner. Expression of IDO in the epididymis was chronologically analyzed using ELISA methods. Inflammatory changes were analyzed using a comprehensive cytokine/chemokine assay to identify representative candidates, and immunohistological changes were then analyzed separately for each of these candidates.

Histological analysis showed invasion of lymphocyte-predominant inflammatory cells and destruction of epididymal ductal structure in the epididymitis model in *Ido*^{+/+} compared with *Ido*^{-/-}. IDO assay showed significant up-regulation of IDO were observed in *Ido*^{+/+} compared with *Ido*^{+/+}sham at day1 and day3. On the other hand, there were not observed the expression of IDO in *Ido*^{-/-} anytime in time series. The comprehensive cytokine/chemokine assay identified six significant markers: pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-6) and chemokines (CCL3, CXCL1) were downregulated and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) were up-regulated in *Ido*^{-/-} compared with *Ido*^{+/+}. Similar results were obtained from immunohistochemical staining for these molecules.

IDO is involved in epididymal immunological reactions via cytokines/chemokines, and inhibition of IDO may contribute to protection of epididymis tissue when inflammation occurs in this tissue. Therefore, IDO might be a novel target for therapy for epididymitis, in addition to antimicrobial agents.

(Accepted on October 13, 2017)

Key words : Epididymitis, Indoleamine 2,3-dioxygenase

Corresponding author
Shin Ohira
Department of Urology, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 463 4747
Fax : 81 86 463 4747
E-mail : ohira@med.kawasaki-m.ac.jp