

色氨酸 2,3-双加氧酶 2 在肿瘤免疫中的研究进展

李沂玮, 金 儿

(浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310006)

摘要:随着对肿瘤免疫微环境的广泛而深入的研究,越来越多的研究发现肿瘤细胞的免疫耐受和免疫逃逸机制在肿瘤发生发展方面起了重要作用。色氨酸 2,3-双加氧酶 2 (TDO2) 是色氨酸沿犬尿酸途径催化分解为犬尿酸的限速酶之一。TDO2 异常活化导致色氨酸耗竭和分解代谢物的蓄积,产生包括犬尿酸及其衍生物等一系列负性调控信号,通过多种途径影响肿瘤细胞的生物学行为。因此,作为一种潜在的治疗靶点,进一步了解 TDO2 在肿瘤发生发展中的作用至关重要。

关键词:色氨酸 2,3-双加氧酶 2; 肿瘤; 微环境; 免疫调节

中图分类号: R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)05-0376-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.05.B002

Progress on Tryptophan 2,3-dioxygenase2 in Tumor Immune

LI Yi-wei, JIN Er

(Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China)

Abstract: With the in-depth understanding of tumor immune microenvironment (TME), the values of immune tolerance and escape mechanisms of TME in the development of tumor have been widely reported. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2) comprises of a family of enzymes that catalyze conversion of tryptophan into kynurenine as the first and rate-limiting step. The upregulation of TDO2 results in a decrease in tryptophan and the accumulation of kynurenine and its metabolites, leading to the transformation of tumor biological characteristics. As a potential therapeutic target, to better understand the role of TDO2 in tumorigenesis and development is crucial.

Subject word: tryptophan-2,3-dioxygenase; tumor; microenvironment; immunoregulation

免疫治疗包括免疫检查点抑制剂、程序性死亡受体/配体 1、细胞毒 T 淋巴细胞相关蛋白 4 抗体以及过继细胞转移疗法等,完全改变了当前肿瘤治疗的格局^[1-2]。但是,仍有一些曾经在免疫治疗中获益的患者,在后续治疗中反应不佳^[3]。大量研究发现,肿瘤特异性 T 细胞功能低下是导致此类患者免疫治疗效果不佳的关键因素之一^[4]。与此同时,肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 或肿瘤边缘存在 CD8⁺T 细胞浸润将会增加 PD-L1 的疗效^[5]。因此,若能再次激活肿瘤患者的 T 细胞毒性反应,将会

给患者带来新生。

作为一种必需氨基酸,色氨酸 (tryptophan, TRP) 仅从人类的饮食摄入中获得。TRP 及其代谢物在多种生理过程中起着关键作用,作为神经递质进行信号传递,是细胞和组织信号转导的重要组分,并促进细胞生长、更新。在肿瘤患者中,TRP 是维持免疫抑制微环境的重要信号通路。TRP 主要通过色氨酸 2,3-双加氧酶 2 (tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO2) 和吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 催化分解,因此, TDO2 和 IDO1 是 TRP 代谢最重要的限速酶。TDO2 和 IDO1 活性的增加耗竭局部微环境中的 TRP,导致犬尿酸 (kynurenine, Kyn) 等代谢产物明显增多。T 细胞通过不带电荷的 t-RNA 以及序贯激活的 GCN2 (general control non-

基金项目: 浙江省基础公益研究项目 (LY19H160031); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2019KY126)

通信作者: 金儿, 副主任医师, 医学博士; 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院呼吸内科, 浙江省杭州市上城区浣纱路 261 号 (310006); E-mail: amyier@163.com

收稿日期: 2019-11-12; **修回日期:** 2020-02-03

derepressible 2)感知到低水平 TRP,进而启动氨基酸饥饿反应,最终发生细胞周期阻滞和死亡,导致肿瘤免疫逃逸,并加速肿瘤的恶性发展^[6]。由于T细胞对低水平 TRP 相当敏感,此种非特异性的代谢途径在局部免疫抑制微环境的形成中发挥了重要的作用。有研究认为,局部 TRP 代谢失调导致的免疫抑制状态是低水平 TRP 以及高水平 TRP 代谢产物共同作用的结果^[6]。因此,进一步了解 TRP 降解过程关键酶的作用尤为重要。

1 TDO2 结构和生理作用

TDO2 主要存在于肝脏和神经元细胞中,是一类含血红素的多聚体双加氧酶,受类固醇激素和色氨酸水平调节,不仅具有分解代谢 TRP 的高度特异性,也参与维持 TRP 水平的稳态。人类 TDO 对 TRP 的 K_m 值大约为 $190\mu\text{M}$,当 TRP 浓度高于生理水平(约 $80\mu\text{M}$)时,TDO2 表达及活性显著性升高,从而高效降解 TRP。在真核生物中,TDO 是由 4 号染色体 TDO2 基因编码而成的同源四聚体,全长约 16kb,包含 12 个外显子和 6 个内含子,具有 4 个亚基,由 3 个相互垂直的双轴组成,其核心基序由 3 个长 α -螺旋组成,形成结合位点,由于每个 TDO 单体的 N-末端残基形成相邻单体中底物结合位点的一部分,故其四聚体结构也可看作为螺旋双二聚体结构^[7]。

生理状态下,其他正常组织中的 TDO2 表达基本可以忽略^[8],在一定条件刺激下,某些组织如骨髓、免疫系统、肌肉、胃肠道、肾脏、膀胱和脑中会有表达。最近研究发现,肿瘤细胞中亦存在 TDO2 高表达,如恶性神经胶质瘤、肝细胞癌、恶性黑色素瘤和膀胱癌等^[9],提示 TDO2 参与多种肿瘤的发生发展,并在抗肿瘤免疫反应中扮演重要角色。

2 TDO2 肿瘤免疫调控

作为肿瘤的特征性标志,肿瘤细胞及其 TME 细胞中的代谢重编程是加速肿瘤增殖、进展和转移的关键。TRP 代谢失衡存在于多种癌症中,其代谢物 Kyn 被认为是一种重要的微环境因子,在血红素与氧分子共同作用下,TDO2 和 IDO1 催化 TRP 的 C2-

C3 双键处的吡啶环裂解,产生 N-甲酰基犬尿氨酸(N-formylkynurenine,NFK),NFK 迅速地自发转化为 Kyn,可抑制 T 细胞增殖,并诱导 T 细胞凋亡,进而影响肿瘤免疫^[10]。

另外,Kyn 进一步转化为一系类代谢产物,包括诱导免疫抑制的下游因子,即 3-羟基-L-犬尿氨酸(3-HK),3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)和喹啉酸(QA)等^[10],犬尿酸和羟基犬尿素已被证实是 Kyn 芳羟受体 AhR 的内源性配体。配体激活的 AhR 可转位至细胞核,上调 IL-6 和 PGE2 生物合成酶的表达基因,两者分别增加 TDO2 和 IDO1 活性;或可通过促进 IL-10 产生、调节 DC 和 T 细胞分化,抑制 TME 中免疫细胞的肿瘤杀伤性^[11];或可上调 TiPARP [TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase],导致干扰素调控转录因子失活,削弱 IFN- γ 的反应,最终导致免疫抑制性 TME 的形成。

3 TDO2 在不同肿瘤中的作用机制

3.1 乳腺癌

在三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)细胞系中,研究发现 TDO2 通过 NK- κ B 依赖性通路表达上调,过表达 TDO2 产生了足够量的 Kyn,以激活 AhR。这一信号轴对 TNBC 的发生发展中起到了至关重要的作用。通过对 TDO2 或 AhR 进行药物抑制或遗传衰减可以增加细胞对失巢凋亡的敏感性,也可抑制 TNBC 细胞的增殖、迁移和侵袭^[12]。促进肿瘤自分泌作用和潜在的免疫抑制旁分泌信号转导作用的结合使这一途径成为乳腺癌治疗中潜在的靶点。Greene 等^[12]对 77 例乳腺癌患者及 40 例正常对照的血浆进行 TRP 以及 Kyn 水平检测,发现 TNBC 细胞通过操纵 TRP 分解代谢酶 TDO2 抑制 CD8⁺T 细胞的功能,而且乳腺癌患者的 TRP 和 Kyn 水平显著性低于非乳腺癌患者,这种现象在雌激素受体(estrogen receptor,ER)阴性的乳腺癌患者和 III~IV 期患者中尤为突出。

在体内实验中,作用于 TDO2 的小分子药物可明显抑制 TNBC 细胞(MDA-MB-231)的迁移活性,TDO2 和 Kyn 以及 AhR 受转录因子 NF- κ B 调控,NK- κ B 信号增加将会提高悬液中细胞的迁移能力。有研究发现色氨酸水平在 ER 受体阳性或阴性患者

中没有区别,而在 ER 受体阴性的肿瘤患者中 Kyn 的水平明显增高^[13]。另一项研究发现 TDO2 在 ER 受体阴性的肿瘤患者中表达明显增高,阻断 TDO2 活性将会完全阻止 Kyn 的诱导分泌^[14]。抑制 TDO2 活性除了可以消除 Kyn 的自分泌促肿瘤作用外,还可抑制免疫细胞中通过 AhR 的 Kyn 活化作用,从而减少 TNBC 的免疫逃逸,但还有待进一步验证。

3.2 肺癌

在非小细胞肺癌患者中,血清 Kyn 水平或 Kyn/TRP 比值升高与肿瘤进展和预后相关^[15-17]。然而在这些研究中,Kyn 来源尚不清楚,Kyn 作为免疫抑制介质的作用亦尚不明确。Astigiano S 等^[18]曾报道 21 例非小细胞肺癌肿瘤组织中的正常间质细胞,而不是肿瘤细胞,表达 IDO1,但 TDO2 在肿瘤组织中的分布尚不明确。因此,了解肿瘤细胞、周围间质细胞与免疫细胞之间的相互作用,对于开发以 TME 为靶点的抗癌策略大有裨益。

近来,有研究揭示了肺肿瘤纤维细胞(lung cancer associated fibroblasts, LCAF)在肺癌免疫逃逸中的机制。当 LCAF 存在时,DC 不能下调单细胞标志物 CD14,但可上调 DC 标志物 CD1a 和 IL-12 表达。TDO2 下调逆转了 LCAF 的免疫抑制作用,说明 Kyn 参与了 LCAF 介导的免疫抑制作用。当敲除 TDO2 后,LCAF 失去了促进肿瘤细胞增殖和运动的能力。在小鼠模型中,针对 TDO2 的靶向治疗明显延缓了肿瘤进展,恢复了小鼠的肿瘤免疫活性。此外,TDO2 抑制剂可以显著性改善 DC 的分化和功能,恢复 T 细胞对小鼠 Th1 表型的反应。与此同时,越来越多的研究证实了 Kyn 在肿瘤发展和预后中的作用,即 Kyn 通过激活 AhR 及相关信号通路,从而促进肿瘤球实体形成。AhR 通路的过表达亦可促进肺癌 A549 细胞系的增殖;并且,Kyn 增加了钙黏蛋白的降解,进一步促进了肿瘤细胞的迁移^[19]。Hsu 等^[20]的研究发现,癌症及其间充质成纤维细胞之间的协同作用为 TRP 代谢提供了有价值的研究线索。对肿瘤间质细胞多靶点的选择性抑制可能成为肺癌治疗的一种新方法。

3.3 脑癌

在脑癌中,犬尿氨酸途径代谢失调,耗竭局部 TRP 从而促进了肿瘤免疫抑制微环境的形成。Guastella 等^[21]对 73 例胶质瘤和 48 例脑膜瘤患者进

行了 IDO1/IDO2/TDO2/AhR 的表达水平检测,对每个基因进行了 9 例体外细胞特异性的抗体治疗。观察到肿瘤分级与 IDO1、IDO2、TDO2 平均免疫组化染色分数呈正相关,其中 TDO2 相关性最强。所有级别的胶质瘤和脑膜瘤均有 AhR 免疫染色出现,其中胶质母细胞瘤染色强度最高。在胶质瘤和脑膜瘤中,AhR 核定位与组织学分级呈正相关,提示随着肿瘤分级的升高,AhR 活性增加。与酶抑制不同,AhR 在经过体外药物拮抗治疗后显著性降低了脑癌细胞活力,提示针对 AhR 的靶向药物可能对部分其他治疗无效的患者有重要意义。

3.4 梅克尔细胞癌

梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma, MCC)是一种罕见的侵袭性神经内分泌皮肤癌,约 80% 病例与梅克尔细胞多瘤病毒 (Merkel cell polyomavirus, MCPyV) 有关。一项来自日本的研究探讨了 MCC 中 IDO1/TDO2/AhR 表达与 MCPyV 状态及预后的关系^[22]。研究纳入 24 例 MCPyV 阳性的 MCC,1 例 MCPyV 阴性的鳞状细胞癌 MCC,7 例 MCPyV 阴性的单纯性 MCC,研究发现 MCPyV 阴性组细胞 IDO1 表达高于 MCPyV 阳性组($P < 0.001$)。MCPyV 阴性 MCC 的 TME 中 TDO2 表达高于 MCPyV 阳性 MCC($P < 0.001$)。TME 中 TDO2 和 AhR 低水平表达和肿瘤细胞中 IDO1 低水平表达者总体生存率均显著性增高。TME 中 TDO2 表达水平下调将延长疾病特异性生存周期($P = 0.016$)。上述结果说明评估 IDO1/TDO2/AhR 表达对于 MCC 患者的免疫治疗选择尤为重要。

3.5 食管鳞状细胞癌

一项研究检测了 90 例食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中 TDO2 蛋白的表达^[23]。Ⅲ/Ⅳ期患者 TDO2 高表达和低表达分别为 26 例和 6 例($P = 0.001$),复发患者中高表达 18 例,低表达 4 例($P = 0.012$)。CD44 阳性的病例中,TDO2 高表达 49 例,低表达 28 例($P = 0.026$),提示 TDO2 过表达与 ESCC 的肿瘤分期、复发及 CD44 表达相关。TDO2 过表达提示预后不良,同时 TDO2 表达的下调导致表皮生长因子受体信号通路失活,提示 TDO2 在 ESCC 的发生发展中起重要作用。

3.6 恶性黑色素瘤

CD8+T 细胞产生的干扰素 γ 刺激肿瘤再增殖细胞产生高水平 Kyn,并通过 SLC7A8 和 PAT4 转运

至邻近的 CD8⁺T 细胞,诱导芳香烃受体(AhR)激活,进而上调程序性死亡受体蛋白-1(PD-1),阻断该通路可提高小鼠恶性黑色素瘤模型中过继性T 细胞治疗的疗效^[24]。一项 I 期临床研究证实了 IDO1 单抗-Epacadostat 联合派姆单抗在恶性黑色素瘤中的疗效,当 Epac 治疗剂量大于 50mg,一日二次,所有患者均获得了临床缓解,主要不良反应为药物相关性超敏反应,无药物相关死亡发生,提示两者联用治疗恶性黑色素瘤效果显著^[25]。

3.7 其他肿瘤

TDO2 在许多其他肿瘤类型中也有表达,如膀胱癌、肾细胞癌、胰腺癌、结肠直肠癌、头颈癌等,但所涉及的研究病例数少,表达水平较弱且仅在部分样本中有表达^[26],然而这些数据与在小样本量的一系列人类肿瘤样本中获得的 RT-qPCR 数据基本一致^[8,27]。另外,在多种体外建立的人类肿瘤细胞系(包括成胶质细胞瘤、结直肠癌、头颈癌和胆囊癌)可检测到 TDO2 的表达^[26]。人类蛋白质图谱数据库的研究结果表明,TDO2 和 IDO1 基因的高表达与神经胶质瘤、胰腺癌、肾癌、前列腺癌和子宫内膜癌患者的生存期下降相关。但是,人类蛋白质图谱数据库的基因表达数据无法区别检测到的 IDO1 或 TDO2 基因表达是来源于肿瘤细胞还是肿瘤间质细胞,且关于 TDO2/IDO1 蛋白在肿瘤组织中的精确细胞类型与定位及其临床意义的研究很少,有待于进一步验证^[9]。

4 总 结

TDO2 在许多肿瘤中被证实与不良预后相关,均是细胞内的药物靶点。目前只有少数 TDO2 抑制剂处于临床前或临床早期研究状态,其抗癌治疗效果尚无法确定。由于存在不同的药理学或药代动力学效应,为了减少与第一代候选药物类似的短板,进一步扩展 TDO2 和/或 IDO1 抑制剂的结构多样性是至关重要的。在现有数据库中,筛选识别新的分子结构是一种快速、经济且行之有效的方法。TDO2 与色氨酸的结合并不影响酶的活性,但提高了酶的稳定性。是否存在一种小分子可以选择性地结合到这个外显位点上,从而影响 TDO2 酶的稳定性,以及进一步探索 TDO2 在不同肿瘤发生发展中的作用机制是今后研究的重点。

参考文献:

- [1] Buque A, Bloy N, Aranda F, et al. Trial watch: immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications[J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(4): e1008814.
- [2] Lim WA, June CH. The principles of engineering immune cells to treat cancer[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 724–740.
- [3] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 707–723.
- [4] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 568–571.
- [5] Spranger S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment[J]. *Int Immunol*, 2016, 28(8): 383–391.
- [6] Platten M, von Knebel DN, Oezen I, et al. Cancer immunotherapy by targeting IDO1/TDO and their downstream effectors[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 673.
- [7] Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase[J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt 6): 1120–1123.
- [8] 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[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(2): 161–172.
- [9] Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(10): 1113–1120.
- [10] Yu CP, Song YL, Zhu ZM, et al. Targeting TDO in cancer immunotherapy[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(5): 73.
- [11] Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor[J]. *Nature*, 2011, 478(7368): 197–203.
- [12] Greene LI, Bruno TC, Christenson JL, et al. A role for tryptophan-2,3-dioxygenase in CD8 T-cell suppression and evidence of tryptophan catabolism in breast cancer patient plasma[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(1): 131–139.
- [13] Tang X, Lin CC, Spasojevic I, et al. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(4): 415.
- [14] D'Amato NC, Rogers TJ, Gordon MA, et al. A TDO2-AhR signaling axis facilitates anoikis resistance and metastasis in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(21): 4651–4664.
- [15] Chuang SC, Fanidi A, Ueland PM, et al. Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and

- lung cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(3):461–468.
- [16] Creelan BC, Antonia S, Bepler G, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in stage III non-small cell lung cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(3):e23428.
- [17] Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2010, 67(3):361–365.
- [18] Astigiano S, Morandi B, Costa R, et al. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(4):390–396.
- [19] Shimba S, Komiyama K, Moro I, et al. Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor(AhR) accelerates the cell proliferation of A549 cells[J]. *J Biochem*, 2002, 132(5):795–802.
- [20] Hsu YL, Hung JY, Chiang SY, et al. Lung cancer-derived galectin-1 contributes to cancer associated fibroblast-mediated cancer progression and immune suppression through TDO2/kynurenine axis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19):27584–27598.
- [21] Guastella AR, Michelhaugh SK, Klinger NV, et al. Investigation of the aryl hydrocarbon receptor and the intrinsic tumoral component of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in primary brain tumors[J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2018, 139(2):239–249.
- [22] Wardhani LO, Matsushita M, Iwasaki T, et al. Expression of the IDO1/TDO2-AhR pathway in tumor cells or the tumor microenvironment is associated with Merkel cell polyomavirus status and prognosis in Merkel cell carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2019, 84:52–61.
- [23] Pham QT, Oue N, Sekino Y, et al. TDO2 overexpression is associated with cancer stem cells and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncology*, 2018, 95(5):297–308.
- [24] Liu Y, Liang X, Dong W, et al. Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8+ T cells by transferring kynurenine and AhR activation[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):480–494.e7.
- [25] Gangadhar TC, Hamid O, Smith DC, et al. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced melanoma and select solid tumors; updated phase 1 results from E-CHO-202/KEYNOTE-037[J]. *Annals of Oncology*, 2016, 27(suppl_6):vi379–vi400, 2016.
- [26] Knox WE. Two mechanisms which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase activity: specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary adrenal system[J]. *Br J Exp Pathol*, 1951, 32(5):462–469.
- [27] Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(7):2497–2502.