

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10748

研究課題名(和文) 脳腫瘍の変異型IDHを標的とした高精度診断法の確立と分子生物学的解析

研究課題名(英文) Development of specific anti-mutated IDH monoclonal antibodies for diagnosis of gliomas

研究代表者

加藤 幸成 (Kato, Yukinari)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授

研究者番号：00571811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：変異型IDH1/2はgliomaの予後診断マーカーとして有用である。本研究では、変異型IDH1/2に対する特異的抗体を樹立しgliomaの臨床診断に応用すると共に、特異的抗体とそのエピトープを共結晶化し、抗体による変異型IDHの認識様式の解明を目指した。我々が樹立した各種抗IDH抗体のうち、MsMab-1は複数の変異型IDH1/2を認識する。そこで、MsMab-1のFab断片と、そのエピトープであるIDH1-R132SおよびIDH2-R172Sのペプチドとの共結晶化しX線構造解析を行った結果、MsMab-1によるIDH1-R132SおよびIDH2-R172Sの認識メカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳腫瘍の中でも、グリオーマには複数の種類があるが、患者さんの予後は簡単には推測ができない。そこで、グリオーマにおいて見られる遺伝子変異を標的にモノクローナル抗体を作製し、患者さんの予後の診断を行うことは臨床的にとても重要である。我々が注目した変異型IDH1/2はグリオーマにおいて予後診断マーカーとして有用である。本研究では、変異型IDH1/2に対する特異的抗体を樹立しグリオーマの臨床診断に応用すると共に、その作用メカニズムの解明を目指した。その結果、変異型IDH1/2に対する特異的抗体の認識メカニズムが明らかとなり、今後の診断法のさらなる開発につながる成果となった。

研究成果の概要(英文)：A point mutation in IDH1/2 is linked to the pathogenesis of gliomas. Several antibodies that can distinguish between mutant and wild-type enzymes have been established to detect this mutation. MsMab-1 has a unique multi-specific character against several types of mutated IDH1/2. This promiscuous character is in remarkable contrast to the highly specific antigen recognition typically observed with a monoclonal antibody. We solved the crystal structure of MsMab-1 Fab fragment in complex with either IDH1/IDH2-derived peptides. Based on the structure, it became clear that the peptide-binding pocket of the antibody is highly complementary to the core determinant shared between the IDH1 and IDH2, while leaving just enough space for the side chain of the pathogenic but not the wild-type amino acids located in the mutation position. Clarification of the molecular basis for the peculiar binding characteristics of MsMab-1 in atomic detail will help facilitating its diagnostic application.

研究分野：抗体創薬

キーワード：IDH イソクエン酸デヒドロゲナーゼ IDH1 IDH2 モノクローナル抗体 グリオーマ 脳腫瘍 特異的抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変異型 IDH1/2 は、WHO 分類の grade II、III の glioma や、そこから進行した grade IV の secondary glioblastoma: sGBM で高頻度に検出されるが (70%以上)、glioblastoma として初発する primary/de novo glioblastoma: prGBM ではほとんど変異が検出されない (5%以下)。IDH1/2 に一旦変異が入ると、astrocytoma における p53 の変異、oligodendroglioma における 1p/19q loss などの一連の変異が生じ、悪性化が進むことが報告され、glioma の発生に最も重要な分子として現在注目されている。変異型 IDH1/2 が検出される glioma の予後は野生型 IDH1/2 の予後よりも格段に良く、glioma の予後診断マーカーとして有用であることが示されてきた (Yan et al, NEJM, 2009)。我々は世界に先駆けて、IDH1 の変異型として最も頻度の高い R132H タイプ (変異型 IDH1/2 の約 90%) に対するモノクローナル抗体 (IMab-1) の樹立に成功した。さらに、比較的頻度の高い R132S タイプに対するモノクローナル抗体 (SMab-1) の樹立にも成功した。

抗変異型 IDH1 抗体の利点としては、以下の点が重要である。(1) 免疫組織染色において、抗変異型 IDH1 抗体 (HMab-1, IMab-1, SMab-1) はそれぞれの変異型 IDH1 を保持する腫瘍細胞のみを特異的に染色し、予後の良い glioma を鑑別できる。(2) 正常組織に浸潤した腫瘍細胞を高感度に検出することができる。(3) パイオプシーなどのわずかな標本でも、ひとつの腫瘍細胞の変異型 IDH1 の検出が可能である。(4) 抗変異型 IDH1 抗体による glioma の予後診断は、臨床上有用である。

変異型 IDH1/2 の機能としては、以下の点が重要である。(1) 野生型 IDH1/2 はがんを抑制する方向に働く。(2) 変異型 IDH1/2 は HIF-1 経路を誘導する (Zhao et al, Science, 2009)。(3) 変異型 IDH1/2 は、 α -ketoglutarate から onco-metabolite の D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) を合成し、腫瘍原性に寄与する (図 4; Dang, Nature, 2010)。D-2HG は glioma 治療の新しい標的として注目されている。(4) 変異型 IDH1 は野生型 IDH1/2 と二量体を形成し、野生型 IDH1/2 の機能を抑制する。

2. 研究の目的

すべての変異型 IDH1/2 を免疫組織染色で検出するための特異的抗体の作製、glioma の診断と治療方針の決定に役立つ検出法の開発を行うことが第一目標である。具体的には、変異型 IDH1/2 の免疫抗原等の作製、glioma 症例における IDH1/2 の遺伝子型のスクリーニング、マウス・ラットへの抗原の免疫とハイブリドーマの樹立、multi-specific 抗体のスクリーニング法の検討、免疫組織染色における樹立抗体の検証を目的とした。

また、変異型 IDH1/2 に対する特異的抗体と変異型 IDH1/2 との結合様式の解析が第二目標である。具体的には、変異型 IDH1/2 に対する抗体の Fab 断片と変異型 IDH1/2 ペプチドとの共結晶化を行い、X 線構造解析による抗体の認識部位の解析を目的とした。

3. 研究の方法

変異型 IDH1/2 のペプチド抗原を作製し、マウス・ラットに免疫した。次に、改変センダイウイルス法あるいはポリエチレングリコール法 (PEG 法) を用いて、細胞融合を実施した。限界希釈法あるいは Semi-solid 培地を用いて、ハイブリドーマのシングルコロニーを選択した。特異的に変異型 IDH1/2 を認識する抗体を選別し、評価した。

また、変異型 IDH1/2 に対する種々の抗体の Fab 断片を精製し、変異型 IDH1/2 ペプチドとの共結晶化を行う。さらに、X 線構造解析を行い、特異的抗体による認識様式を解明した。

4 . 研究成果

変異型 isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH1/2) が検出される glioma の予後は、野生型 IDH1/2 の予後よりも格段に良く、glioma の予後診断マーカーとして有用である。本研究において、変異型 IDH1/2 の免疫抗原等の作製および glioma 症例における IDH1/2 の遺伝子型のスクリーニングを行った後、すべての変異型 IDH1/2 に対する特異的抗体を樹立し、glioma の臨床診断に応用することを目指した。さらに、すでに樹立した変異型 IDH に対する特異的抗体とそのエピトープとを共結晶化し、抗体による変異型 IDH の認識メカニズムを解明することを第二の目的とした。平成 28 年度までに、これまで作製した変異型 IDH1/2 に対する抗体の中で、MsMab-2 を用いた免疫組織染色を実施した。その結果、MsMab-2 は IDH1-R132L の変異型の切片に対し、特異的に反応性を示した。これまで、IDH1-R132H に対する H Mab-1、H Mab-2、IDH1-R132S に対する S Mab-1、複数の変異型に対する MsMab-1 が免疫組織染色に有用であることがわかっていたが、これらの組み合わせにより、より正確に IDH の変異型を免疫組織染色で見分けることが可能になった。また、複数の変異型 IDH1/2 を認識する MsMab-1 抗体の Fab 断片と、そのエピトープである IDH1-R132S および IDH2-R172S のペプチドとの共結晶化に成功した。X 線構造解析を行った結果、MsMab-1 による IDH1-R132S および IDH2-R172S の認識メカニズムが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Kaneko MK, Yamada S, Itai S, Furusawa Y, Nakamura T, Yanaka M, Handa S, Hisamatsu K, Nakamura Y, Fukui M, Harada H, Kato Y. Epitope mapping of an anti-alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked monoclonal antibody AMab-6. *Biochem Biophys Rep.*, 15: 76-80, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.07.003>, 2018 (査読有)
2. Furusawa Y, Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y. Epitope mapping of anti-telomerase reverse transcriptase (TERT) monoclonal antibodies. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 37(4): 185-187, <https://doi.org/10.1089/mab.2018.0019>, 2018 (査読有)
3. Yamamichi A, Ohka F, Aoki K, Suzuki H, Kato A, Hirano M, Motomura K, Tanahashi K, Chalise L, Maeda S, Wakabayashi T, Kato Y, Natsume A. Immunohistochemical ATRX loss cannot be a surrogate for 1p19q codeletion. *Brain Tumor Pathol.*, 35(2):106-113, doi: 10.1007/s10014-018-0312-5., 2018 (査読有)
4. Masui K, Komori T, Kato Y, Masutomi K, Ichimura K, Ogasawara S, Kaneko MK, Oki H, Suzuki H, Nitta M, Maruyama T, Muragaki Y, Kawamata T, Sawada T, Shibata N. Elevated TERT Expression in TERT Wild-Type Adult Diffuse Gliomas: Histological Evaluation with a Novel TERT-Specific Antibody. *Biomed Res Int.*,7945845. doi: 10.1155/2018/7945845, 2018 (査読有)
5. Ohka F, Yamamichi A, Kurimoto M, Motomura K, Tanahashi K, Suzuki H, Aoki K, Deguchi S, Chalise L, Hirano M, Kato A, Nishimura Y, Hara M, Kato Y, Wakabayashi T, Natsume A. A Novel All-in-one Intraoperative Genotyping System for IDH1-mutant Glioma. *Brain Tumor Pathol.*, 34(2):91-97, doi: 10.1007/s10014-017-0281-0., 2017 (査読有)
6. Takano S, Ishikawa E, Sakamoto N, Matsuda M, Akutsu H, Noguchi M, Kato Y, Yamamoto T, Matsumura A. Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular

- genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. Brain Tumor Pathol., 33(2), 107-116, doi: 10.1007/s10014-016-0260-x, 2016 (査読有)
7. Ogasawara S, Fujii Y, Kaneko MK, Oki H, Sabit H, Nakada M, Suzuki H, Ichimura K, Komori T, Kato Y. Establishment of Anti-Human ATRX Monoclonal Antibody AMab-6. Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 5(5): 254-258, DOI:10.1089/mab.2016.0037, 2016 (査読有)
8. Kitago Y, Kaneko MK, Ogasawara S, Kato Y, Takagia J. Structural basis for multi-specific peptide recognition by the anti-IDH1/2 monoclonal antibody, MsMab-1. Biochem Biophys Res Commun., 478(3):1274-9., doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.110, 2016 (査読有)
9. Hayashi A, Misumi K, Shibahara J, Kokudo N, Kato Y, Fukayama M. Immunohistochemistry Using Monoclonal Antibody MsMab-2 Is Useful to Detect IDH1 R132L in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. Pathol Int. 66(10); 578-582, doi: 10.1111/pin.12459, 2016 (査読有)

[学会発表](計6件)

- 1、会議名：第76回日本癌学会学術総会
演題：Does ATRX immunohistochemistry deserve a surrogate of 1p/19q codeletion in grade II, III gliomas?
発表者：Akane Yamamichi, Yukinari Kato, Atsushi Natsume
期日：2017年9月30日(土)
会場：パシフィコ横浜、横浜市
- 2、会議名：The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences
演題：IMMUNO-WALL LAB-ON-A-CHIP PROTEIN ANALYSIS DEVICES FOR HIGHLY PRECISION SURGERY OF GLIOMAS
発表者：Toshihiro Kasama, Akane Yamamichi, Fumiharu Ohka, Yukinari Kato, Hiromichi Suzuki, Akira Kato, Kazuya Motomura, Masanori Hirano, Melissa Ranjit, Lushun Chalise, Michihiro Kurimoto, Goro Kondo, Kosuke Aoki, Noritada Kaji, Toshio Matsubara, Hidenori Suzuki, Manabu Tokeshi, Toshihiko Wakabayashi, Atsushi Natsume, Yoshinobu Baba
期日：9-13 October 2016
会場：Dublin City University, IRELAND
- 3、会議名：第75回日本癌学会学術集会(シンポジウム)
演題：脳腫瘍 IDH1 遺伝子変異の新しい迅速診断技術
発表者：山道茜、大岡史治、笠間敏博、鈴木啓道、青木恒介、本村和也、千賀威、金子美華、若林俊彦、馬場嘉信、加藤幸成、木村晋也、夏目敦至
期日：2016年10月7日
会場：パシフィコ横浜、横浜市
- 4、会議名：第89回日本生化学会大会(口頭発表、ポスター発表)
演題：変異型 IDH に対する高感度特異的抗体の樹立
発表者：藤井勇樹、小笠原諭、金子美華、加藤幸成
期日：2016年9月27日
会場：仙台国際センター、仙台
- 5、会議名：第34回日本脳腫瘍病理学会

演題：グリオーマにおける TERT 発現の免疫組織化学的解析

発表者：増井憲太、小森隆司、加藤幸成、市村幸一、新田雅之、丸山隆志、柴田亮行、村垣善浩、川俣貴一

期日：2016年5月28日

会場：東京コンファレンスセンター有明、東京

6、会議名：第34回日本脳腫瘍病理学会

演題：An immunohistochemical study with an anti-TERT antibody (TMab-6) in brain tumors

発表者：石澤圭介、加藤幸成、安達淳一、小森隆司、小笠原諭、金子美華、市村幸一、西川亮、佐々木惇

期日：2016年5月28日

会場：東京コンファレンスセンター有明、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科・抗体創薬研究分野

<http://www.med-tohoku-antibody.com/index.htm>

6．研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし