

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16632

研究課題名(和文) IDH変異型グリオーマにおける表面抗原を標的とした術中療法の開発

研究課題名(英文) Targeting surface antigens for intraoperative treatment of IDH mutant gliomas

研究代表者

粟田 学 (Natsumeda, Manabu)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：00515728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はグリオーマに対して術中抗体療法を確立することが目的である。イソクエンサンデヒドロゲナーゼ(IDH1) R132H変異グリオーマ細胞株2株、IDH1変異抗体4種類を用いてフローサイトメトリーを行った所、10～20%程度、弱陽性細胞を認めたのみで、近赤外線光線免疫療法(NIR-PIT)には適さないと思われた。IDH1変異蛋白は腫瘍細胞に細胞質に発現し、細胞膜には発現しないからと考えた。

次に、悪性グリオーマで高率に発現する膜貫通蛋白であるポドプランニンに着目し、ポドプランニンを発現する膠芽腫細胞株2株はポドプランニン抗体4種類に対してほぼ100%陽性反応を認め、NIR-PITの良い候補と考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫は極めて予後の悪い脳腫瘍であり、その治療法の確立は急務である。周囲脳に細胞が浸潤し、手術で取り切れない。本研究は悪性神経膠腫に対して、近赤外線光線免疫療法(NIR-PIT)という、腫瘍細胞の表面抗原を標的し腫瘍細胞のみを破壊する抗原特異的免疫療法の確立を目指した。腫瘍特異抗体を蛍光標識することで術中の残存腫瘍の評価にも利用できることから、NIR-PITの実現は神経膠腫に革命的な治療の進歩をもたらす可能性を秘めている。細胞表面ではなく細胞質に発現するIDH1抗体によるNIR-PITは上手く行かなかったが、その後、ポドプランニンという細胞膜蛋白に対するNIR-PITの有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present research was devoted to looking at the potential application of intraoperative antibody treatment targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant protein. We tested 4 IDH1-mutant antibodies (HMab1, HMab-2, H09, and MsMab-1) against 2 IDH-mutant glioma cell lines (MGG152, BT142) by flow cytometry and found that only 10-20% of cells stained weakly positive. These results suggested that IDH1-mutant protein was not a good target for near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) in gliomas, probably because IDH1 mutation is expressed in the cytoplasm of IDH1-mutant gliomas and not the cell surface. Next, we targeted podoplanin, a membrane bound antigen highly expressed in malignant gliomas by using 4 podoplanin antibodies against 2 podoplanin expressing cell lines, and found an almost 100% positivity by flow cytometry. NIR-PIT using podoplanin-IR700 conjugate induced blebbing and cell death in glioblastoma cell lines in vitro.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ 神経膠腫 NIR-PIT 光線免疫療法 術中療法 ポドプランニン

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は手術で全摘出することは難しく、摘出腔周囲の脳組織に浸潤した腫瘍細胞から再発する。そこで残存腫瘍に対し放射線治療とテモゾロミド (TMZ) を用いた化学療法の併用が標準治療とされているが、ほぼ全例で再発を来す。このような理由で悪性神経膠腫に対する新規治療戦略が急務である。一方で IDH はクエン酸回路の酵素で、変異すると DNA やヒストンのメチル化を惹起し、グリオーマ形成に深く関わっている。

近赤外線光線免疫療法 (NIR-PIT) は米国 NIH 小林久隆先生のグループにより開発され、表面抗原を標識する抗体に IR700 を複合させるように設計された。IR700 の構造はポルフィリンに類似し、赤色に発色する。抗原抗体反応を利用して標的腫瘍の細胞表面に結合した IR700 は、近赤外線照射により生じた熱エネルギーにより腫瘍細胞の細胞膜を破壊する。生じた細胞膜小孔から親水性の高い IR700 が細胞外液と共に細胞内へ大量流入し、腫瘍細胞が膨張・破裂する。IR700 により生じる熱エネルギーは限局的であり、周囲の正常細胞には影響がない。

今回、我々は IDH 変異型グリオーマに特異的な表面抗原を同定しそれに対する抗原を作成することで IDH 変異型グリオーマに対する NIR-PIT を実現させ、集学的治療への導入を目指した。

IDH1 R132H 抗体は特異性が極めて高く、IDH1 変異を有する腫瘍細胞 1 個 1 個の細胞質が染色される事から、NIR-PIT の候補として期待された。問題点としては、IDH1 変異蛋白は細胞膜ではなく、細胞質に局在することであった。しかし、Shumacher ら (文献) により IDH1 R132H に対するペプチドワクチンが開発され、MHC クラス II 反応により腫瘍細胞の表面で抗原抗体反応が生じる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は IDH 変異型グリオーマに対する NIR-PIT 療法の確立である。また、可能であれば、IDH 野生型グリオーマに対する NIR-PIT 療法の確立も行う。最終的には臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

IDH1 R132H 変異を有するグリオーマ細胞株 2 株 (MGG152, BT142) に対する、IDH1 変異抗体の 4 種類 (HMab-1, HMab-2, H09, MsMab-1) の抗原抗体反応、さらにはポドプラニン発現細胞株 2 株に対する、抗ポドプラニン抗体 4 種類の抗原抗体反応をフローサイトメトリーで確認した。各細胞株における IDH1 R132H、ポドプラニン発現は Western blot 法を用いて調べた。さらには、抗体 A-IR 700 複合体を作成し、近赤外線照射を行った。

4. 研究成果

フローサイトメトリーを用いて、IDH1 R132H 変異を有するグリオーマ細胞株 2 株 (MGG152, BT142) に対する、IDH1 変異抗体 4 種類 (HMAb-1, HMAb-2, H09, MsMAb-1) 抗原抗体反応を調べたところ、10-20%の弱陽性細胞を認めるのみであった(Fig 1, 表 1)。これは、IDH1 変異蛋白はグリオーマ細胞の細胞質に位置し、細胞表面では十分な抗原抗体反応が得られないことを示唆し、IDH1 変異抗体は NIR-PIT の候補としては適切ではないと考えられた。

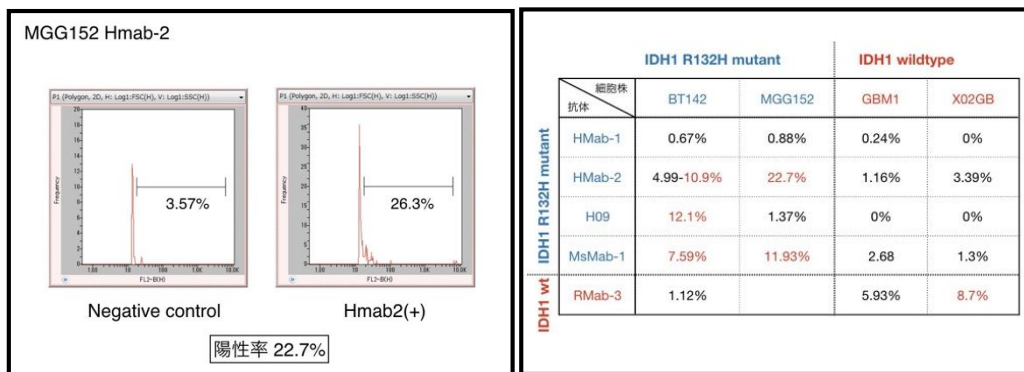


Fig 1. フローサイトメトリーの一例

表 1 IDH1 変異抗体の陽性率

そこで、膜貫通蛋白であり、高率に悪性神経膠腫に発現するポドプラニンに着目した。まずは膠芽腫細胞株を Western blot 法でスクリーニングし、ポドプラニンが発現している細胞株を 2 株同定した(Fig 2)。フローサイトメトリーを用いて抗ポドプラニン抗

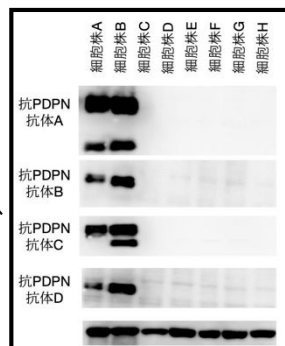


Fig 2. 細胞株 PDPN 発現

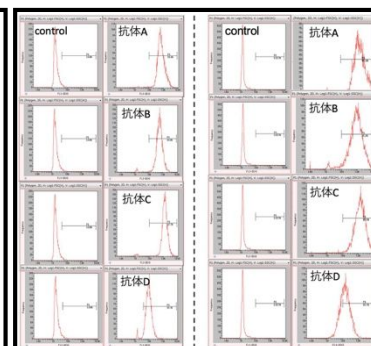


Fig 3. PDPN フローサイトメトリー

体 4 種類の陽性率を測定したところ、全ての抗体に対して、良好な抗原抗体反応が得られ (Fig 3) ポドプラニンは NIR-PIT の良い候補と考えられた。

さらに抗体 A-IR 700 複合体を作成して近赤外線照射をしたところ、細胞の bleb 形成を認め(Fig 4)、in vitro で悪性神経膠腫に対するポドプラニンを標的とした NIR-PIT の有効性が示された。

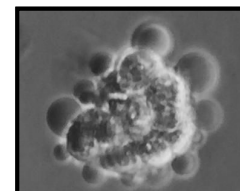


Fig 4. Bleb 形成

<引用文献>

Schumacher et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumor immunity. Nature Comm, 512:324-327, 2014.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Jun Watanabe, Manabu Natsumeda, Masayasu Okada, Yu Kanemaru, Yoshihiro Tsukamoto, Makoto Oishi, Akiyoshi Kakita, Yukihiro Fujii. Podoplanin expression and IDH-wildtype status predicts venous thromboembolism in patients with high-grade gliomas in the early postoperative period. *World Neurosurg*, 2019. doi: 10.1016/j.wneu.2019.05.049. (epub ahead of print)
2. Jun Watanabe, Manabu Natsumeda, Masayasu Okada, Daiki Kobayashi, Yu Kanemaru, Yoshihiro Tsukamoto, Makoto Oishi, Akiyoshi Kakita, Yukihiro Fujii. High detection rate of MYD88 mutations in cerebral spinal fluid from patients with central nervous system lymphomas. *JCO Precision Oncol*, 2019. doi: 10.1200/PO.18.00308. (epub ahead of print)
3. Hideaki Abe, Manabu Natsumeda, Yu Kanemaru, Jun Watanabe, Yoshihiro Tsukamoto, Masayasu Okada, Junichi Yoshimura, Makoto Oishi, Yukihiro Fujii. MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27M-mutant diffuse midline gliomas and MGMT silencing to temozolomide sensitivity in IDH-mutated gliomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 58(7):290-295, 2018. doi: 10.2176/nmc.ra.2018-0044.

〔学会発表〕(計 3 件)

栗田 学. 悪性神経膠腫の新規治療について-光線力学療法の現状と展望- .

第 72 回新潟脳神経外科懇話会(2018 年 12 月)

栗田 学. IDH 変異型グリオーマの診断と治療～コラボレーションを通して実現を目指す～. 第 18 回日本蛋白質学会年会(招待講演)(2018 年 6 月)

栗田 学. IDH 変異グリオーマを標的とした術中イメージング法・治療法確立の試み .

第 1 回新潟県 PDT (光線力学療法) 研究会 .(2017 年 9 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：加藤 幸成

ローマ字氏名：(KATO, Yukinari)

研究協力者氏名：阿部 英明

ローマ字氏名：(ABE, Hideaki)

研究協力者氏名：岡田 正康

ローマ字氏名：(OKADA, Masayasu)

研究協力者氏名：渡邊 潤

ローマ字氏名：(WATANABE, Jun)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。