

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月11日現在

機関番号：11501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791584
 研究課題名（和文）グリオーマの発生に関わる変異型 IDH1/2 の病態生理学的解析とその臨床応用
 研究課題名（英文）Production of anti-mutated IDH1/2 monoclonal antibodies and its clinical application
 研究代表者
 加藤 幸成 (KATO YUKINARI)
 山形大学・医学部・非常勤講師
 研究者番号：00571811

研究成果の概要（和文）：イソクエン酸脱水素酵素（IDH）は、低グレードのグリオーマや secondary glioblastoma において高頻度に点突然変異が生じるが、primary glioblastoma ではほとんど変異が検出されない。本研究では、変異型 IDH1 で最も頻度の高い R132H に対する抗体（HMAb-1）、比較的頻度の高い R132S に対する抗体（SMAb-1）を樹立し、免疫組織染色における有用性を示した。これらの変異型抗体は、グリオーマの予後良好因子となることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations occur in low-grade gliomas. However, specific mAbs against mutated IDH1 have not been reported. In this study, we established anti-mutated IDH1-specific mAbs (HMAb-1 and SMAb-1), which are useful in immunohistochemistry of glioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：モノクローナル抗体、グリオーマ、IDH1、IDH2、変異型 IDH1/2、R132H、R132S、免疫組織染色

1. 研究開始当初の背景

変異型 IDH1/2 は、WHO 分類のグレード II、III のグリオーマや、そこから進行したグレード IV のグリオブラストーマ (secondary glioblastoma:sGBM) で高頻度に検出されるが、グリオブラストーマとして初発するグリオーマ (primary/de novo glioblastoma:prGBM) ではほとんど変異が検出されない (図 1)。IDH1/2 に一旦変異が入ると、アストロサイトーマにおける p53 の変異、オリゴデンドログリオーマにおける 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、グリオーマの発生に最も重要な分子として現在注目されている。また、変異型 IDH1/2 が検出されるグリオーマの予後は野生型 IDH1/2 の予後よりも格段に良く、グリ

オーマ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。

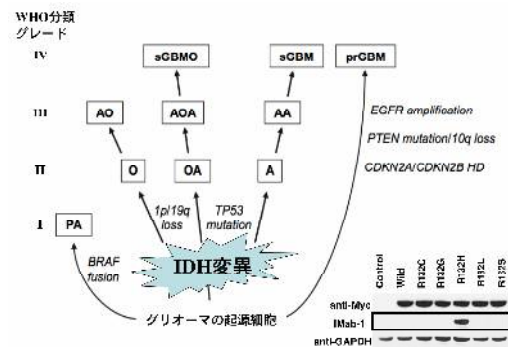


図1：変異型IDH1によるグリオーマの発生

図2：抗IDH1-R132H抗体 (IMab-1)

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の樹立に成功した (図 2 ; Kato et al., BBRC, 2009)。この特異的抗体 (IMab-1) はグリオーマの免疫組織染色に非常に有用である。

抗 IDH1-R132 抗体 (IMab-1) の利点として、以下のことが挙げられる。まず、免疫組織染色において、IMab-1 抗体は R132H タイプの変異型 IDH1 を保持する腫瘍細胞のみを特異的に染色し、予後の良いグリオーマを鑑別できる。また、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。さらに、バ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。一方、ダイレクトシーケンスによる IDH1 の変異の検出は困難なことが多い。

変異型 IDH1/2 の機能としては、以下のことが知られていた。まず、野生型 IDH1/2 はがんを抑制する方向に働く。また、変異型 IDH1/2 は、HIF-1 経路を誘導することによって腫瘍原性に寄与する (Zhao et al, Science, 2009)。さらに、変異型 IDH1/2 は、 α -ケトグルタル酸から 2-ヒドロキシグルタル酸を合成し、腫瘍原性に寄与する (Dang, Nature, 2010)。一方、変異型 IDH1 は、野生型の IDH1 や IDH2 と二量体を形成することが知られていた。

2. 研究の目的

これまで我々は、IDH1-R132H に対する抗体 IMab-1 を樹立した。これだけでは、グリオーマで見られる変異型 IDH1/2 のおよそ 90% しか検出できない。そこで本研究では、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を行い、グリオーマ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を目的とした。

3. 研究の方法

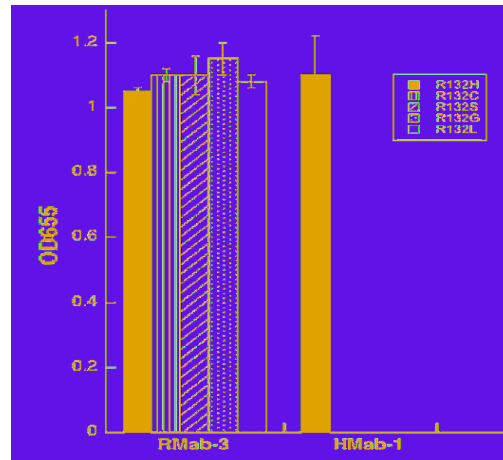
マウスへの免疫原として、変異型 IDH1、変異型 IDH2 のペプチド (12-19 アミノ酸) をデザインし合成した。同時に、スクリーニングの際の固相化抗原として、変異型 IDH1/2 のタンパク質を、大腸菌を用いて調整した。変異型 IDH1/2 に対する特異的抗体の正確な評価のため、各変異型 IDH1/2 のグリオーマ症例を国内の研究協力者から収集した。必要に応じて、ダイレクトシーケンスにより、グリオーマ切片から DNA を抽出し、IDH1/2 の変異型を決定した。

4. 研究成果

最初に、変異型 IDH1 で最も頻度の高い R132H に対する抗体 (HMAb-1; mouse IgG₁) を樹立した。HMAb-1 は野生型 IDH1 のペプチドを認識せず、R132H のペプチドのみを特異

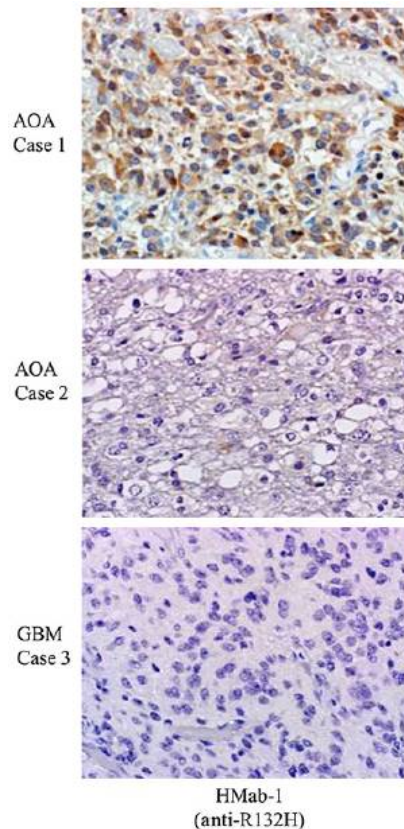
的に認識することを、ELISA 法にて確認した (図 3)。

< 図 3 > HMAb-1 は R132H のペプチドのみに反応した。



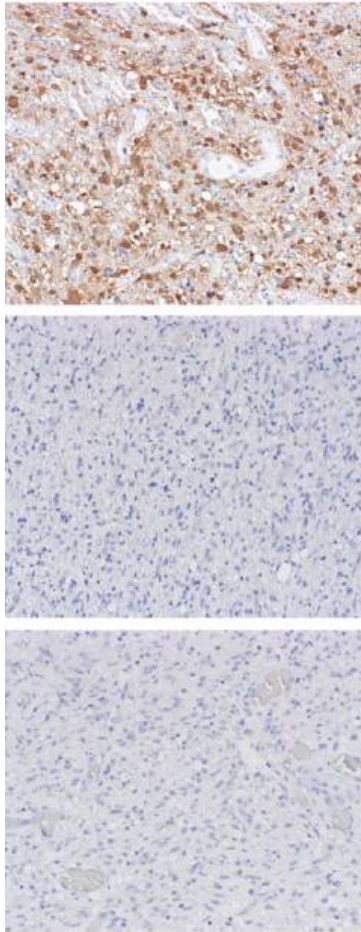
また、HMAb-1 は、R132H 陽性のグリオーマに対する免疫組織染色にて腫瘍細胞特異的に反応した (図 4)。

< 図 4 > AOA (Case 1): R132H ; AOA (Case 2): R132S; GBM (Case 3): 野生型を保有している症例に対する免疫組織染色。AOA (Case 1) のみに HMAb-1 が反応した。



次に、比較的頻度の高いR132Sに対する抗体 (SMab-1; mouse IgG₁) を樹立した。SMab-1も同様に、ELISA法、Western-blot法、免疫組織染色にて、R132Sのみを特異的に認識した (図5)。

<図5>上から、R132S、R132H、野生型を保有している症例に対する免疫組織染色。R132SのみにSMab-1が反応した。

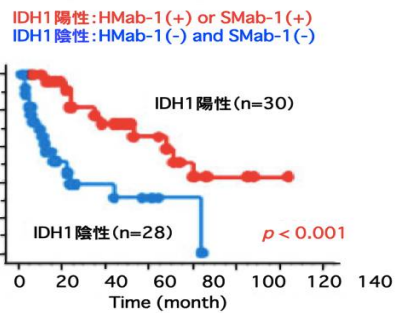


これらの変異型特異的抗体を組み合わせ、グレード III 症例の生存曲線解析を行うと、IDH1 変異が予後良好因子となることがわかった (図6)。

以上のように、HMAb-1, SMab-1 はグリオーマの予後診断に有用であるが、他の変異型 IDH1 (R132C, R132G, R132L)、変異型 IDH2 (R172K, R172M, R172W) に対する抗体についても、特異的抗体の作製を続行中である。

<図6>

抗変異型IDH1抗体による予後解析 (grade III glioma)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

(1) Yoshikawa A, Nakada M, Watanabe T, Hayashi Y, Sabit H, Kato Y, Suzuki S, Ooi A, Sato H, Hamada JI. Progressive adult primary glioblastoma in the medulla oblongata with an unmethylated MGMT promoter and without an IDH mutation. Brain Tumor Pathol DOI: 10.1007/s10014-012-0118-9, in press、査読有

(2) Motomura K, Natsume A, Watanabe R, Ito I, Kato Y, Momota H, Nishikawa R, Mishima K, Nakasu Y, Abe T, Namba H, Nakazato Y, Tashiro H, Takeuchi I, Mori T, Wakabayash T. Immunohistochemical analysis-based proteomic subclassification of newly diagnosed glioblastomas with integrated genomic and epigenetic profiles Cancer Sci.,103(10):1871-9., 2012、査読有

(3) Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, Matsuda M, Nakai K, Yanagiya R, Morita S, Tsuboi K, Matsumura A. (*corresponding author). Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53 and internexin as a prognostic factor of glial tumors J Neurooncol. 2012 Jul;108(3):361-73、査読有

(4) Kwon MJ, Kim ST, Kwon MJ, Kong DS, Lee D, Park S, Kang SY, Song JY, Nam DH, Kato Y, Choi YL, Suh YL. IDH1 mutation is a favorable prognostic factor for type 2 gliomatosis cerebri Brain Pathol. ;22(3):307-317, 2012、査読有

(5) Kaneko MK, Tian W, Takano S, Suzuki H, Sawa Y, Hozumi Y, Goto K, Yamazaki K, Kato Y* (*corresponding author). Establishment of a novel monoclonal antibody SMab-1 specific for

IDH1 R132S mutation. Biochem Biophys Res Commun., 406(4), 608-613, 2011、査読有

(6) Takano S, Tian W, Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Kaneko MK, Yamazaki K, Kato Y, Matsumura A. Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing. Brain Tumor Pathology., 28(2), 115-123, 2011、査読有

〔学会発表〕(計1件)

①加藤幸成、グリオーマの予後診断マーカーとして有用な変異型IDH1/2に対する特異的抗体の開発、第32回日本分子腫瘍マーカー研究会、2012年9月18日、札幌、さっぽろ芸文館

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科・加藤研究室

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 幸成 (KATO YUKINARI)

山形大学医学部・非常勤講師

研究者番号：00571811