

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790346

研究課題名(和文) 神経膠腫における IDH1 変異：免疫組織化学による診断基準の確立

研究課題名(英文) IDH1 mutation in glioma: establishment of diagnostic criteria of immunohistochemistry

研究代表者

伊古田 勇人 (Hayato, Ikota)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90420116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマにおける IDH1 変異を、変異型 IDH1R132H に対する抗体(mIDH1)による免疫染色で検出する方法が確立されている。本研究では変異型 IDH1R132H と野生型 IDH1 発現の関係を明らかにし、mIDH1 弱陽性症例の判定方法を以下のように見出した。びまん性グリオーマにおいて、1. 広範に mIDH1(+) であれば IDH1 変異(G395A)ありと判定。2. mIDH1(+/-)の場合、IDH1 wild type の免疫染色を追加。3. IDH1 wild type(+) であれば IDH1 変異(G395A)なしと判定。IDH1 wild type(+/-)の場合は DNA シークエンスを行う。

研究成果の概要(英文)：Detection of IDH1 mutation in glioma through immunohistochemistry with the antibody for mutant IDH1R132H (mIDH1) is an established method. In this study, we elucidated the relation of expression between mutant IDH1 and wild type IDH1 and found diagnostic criteria for mIDH1 weakly-positive cases. In diffuse gliomas, (1) if mIDH1 is strongly positive, IDH1 mutation (G395A) is considered to be positive. (2) If mIDH1 is weakly positive, immunohistochemistry for IDH1 wild type is added. (3) If IDH1 wild type is positive, IDH1 mutation (G395A) is considered to be negative. If IDH1 wild type is weakly positive, DNA sequence is added.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：IDH1

1. 研究開始当初の背景

Glioma の代表格は astrocytoma と oligodendroglioma で、それぞれ特徴的な臨床像と病理像を示す独立した腫瘍型である。分子遺伝学的には astrocytoma では発生の早期に TP53 変異が見られ、oligodendroglioma では 1 番染色体短腕(1p)と 19 番染色体長腕(19q)の共欠失が主な遺伝子異常である。一方で組織学的にこの二種類の腫瘍が混在した oligoastrocytoma も存在し、astrocytoma と oligodendroglioma は一つのスペクトラムを形成している。このことから、両組織型に共通する腫瘍発生メカニズムの存在が予想されていた。

そして 2008 年、astrocytoma と oligodendroglioma に共通する遺伝子異常、すなわち IDH1 のヘテロポイントミューテーションが発見された。IDH1 はクエン酸回路を構成し、エネルギー代謝や抗酸化作用などさまざまな細胞機能に寄与する酵素である。IDH1 変異は WHO grade II および III の glioma と、これらが progression して発生する secondary glioblastoma の 60-80% に認められ、この遺伝子異常が glioma の発生に関与すると考えられている。現在では glioma 前駆細胞にまず IDH1 変異が生じ、この状態に TP53 変異が加わると astrocytoma が、かわりに 1p/19q co-deletion が加わると oligodendroglioma が生じるといふ、両組織型を包括した新たな glioma の発生モデルが確立されつつある。

上記の知見を知った時、glioma 以外の脳腫瘍にも IDH1 変異があるのか、また非腫瘍性の全身臓器に変異型 IDH1 を含む細胞が存在するのかに強い関心を持った。現在、変異型 IDH1 に反応する抗体 mIDH1R132H が開発され、免疫組織化学を通じて IDH1 変異を検出する方法が確立されている。そこで多種類の脳腫瘍における変異型 IDH1 の発現状況、および非腫瘍性臓器における変異型 IDH1 発現の有無を免疫組織化学で明らかにすることを考案し、組織マイクロアレイで網羅的に検索した。その結果、IDH1 変異がある場合には細胞質と核両方に染色が見られた。以上より、免疫染色で IDH1 変異を指摘するには細胞質と核両方の染色像が必要であることを提唱した。

2. 研究の目的

その後より多くの glioma を検討するにつれて、陽性が偽陽性か迷うほど染色強度が弱くても、DNA シークエンスでは IDH1 変異が検出される症例が見出されるようになった(特に oligodendroglioma)。そのため単に染色の局在に着目して判断するだけではない、免疫染色のより確実な判定方法が必要と考えた。IDH1 変異があっても mIDH1R132H の染色強度が弱い症例では、変異型 IDH1 の発現が何らかの機序で抑制されているのではないかと推測した。Glioma における IDH1 変異は常に

ヘテロポイントミューテーションで、もう一方のアレルには変異がない。よって IDH1 変異を有する腫瘍細胞においても野生型 IDH1 が発現しているはずである。もし野生型および変異型 IDH1 の発現を調節する機構が同じと仮定すれば、mIDH1R132H の染色強度が弱い症例では野生型 IDH1 の発現も低下していると考えられる。そこで変異型 IDH1R132H と野生型 IDH1 発現の関係を明らかにし、mIDH1 弱陽性症例の判定方法を見出すことを目的に、研究を立案した。

3. 研究の方法

症例の中心は mIDH1 R132H (-) ~ (+/-) の 10 例の anaplastic oligoastrocytoma。比較対象としてびまん性グリオーマ 8 例 (diffuse astrocytoma 2 例、oligoastrocytoma 2 例、oligodendroglioma 1 例、anaplastic astrocytoma 3 例) を加えた。以上の症例に対し、mIDH1 および野生型 IDH1 に対する抗体 (IDH1 wt) の免疫染色と DNA シークエンスを行った。抗体の詳細は下表の通り。

Antibody	Source	Category	Clone	Dilution	Antigen retrieval
mIDH1	Dianova	mouse monoclonal	H09	1:50	Autoclaving (citrate buffer)
IDH1 wt	Dianova	mouse monoclonal	W09	1:20	Autoclaving (citrate buffer)

4. 研究成果

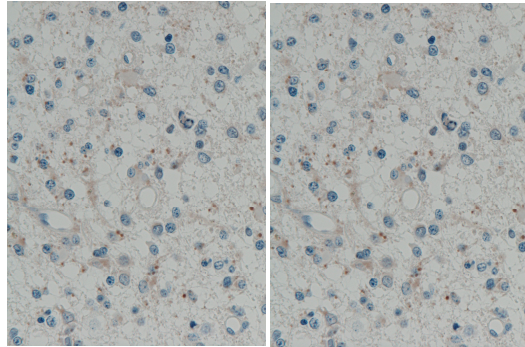
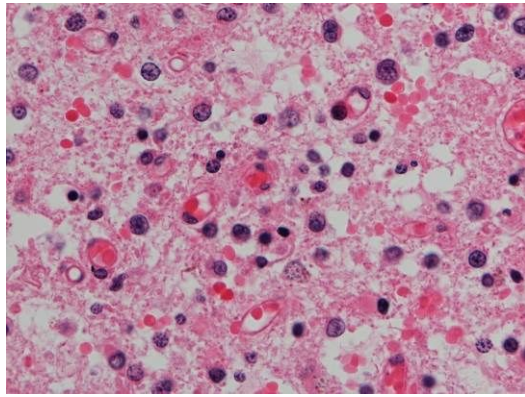
(1) 本研究で用いた症例、免疫染色、DNA シークエンスの結果は下表の通り。

番号	年齢	性別	部位	病理診断	mIDH1	IDH1 wt	IDH1 変異
1	67	F	右島回	AOA	(-)	(+)	C394T
2	16	F	右前頭葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
3	34	M	左右前頭葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
4	55	F	右前頭葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
5	42	M	左側頭葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
6	48	M	左前頭葉、頭頂葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
7	39	F	左前頭葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
8	70	F	左前頭葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
9	43	M	左側頭葉	AOA	(-)	(+)	(-)
10	34	M	左右前頭葉	AOA	(+/-)	(+/-)	G395A
11	30	F	右側頭葉	DA	(+)	(+)	G395A
12	36	F	右前頭葉	DA	(+)	(+)	G395A
13	23	M	左前頭葉	OA	(+)	(+)	G395A
14	48	M	右前頭葉	OA	(+)	(+)	G395A
15	58	F	右側頭葉、島回	O	(+)	(+/-)	G395A
16	27	M	左前頭葉	AA	(-)	(+)	(-)
17	56	M	右側頭葉	AA	(-)	(+)	(-)
18	61	M	右側頭葉	AA	(-)	(+)	(-)

略語の説明は次の通りである。AOA: anaplastic oligoastrocytoma, DA: diffuse astrocytoma, OA: oligoastrocytoma, O: oligodendroglioma, AA: anaplastic astrocytoma.

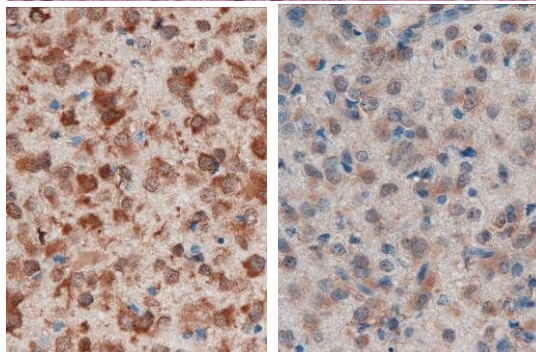
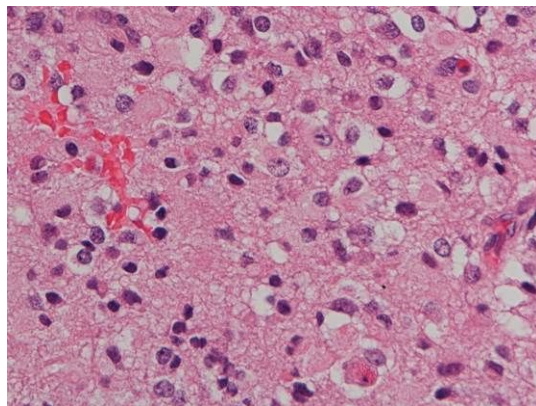
(2) 代表的な組織像

本研究の端緒となった、mIDH1 が弱陽性にもかかわらず、IDH1 変異が見られる anaplastic oligoastrocytoma である。IDH1 wt も同様に染色強度が弱い。



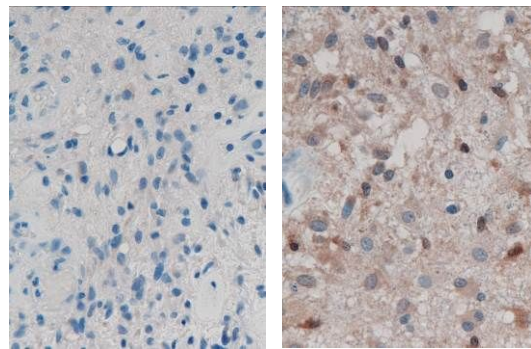
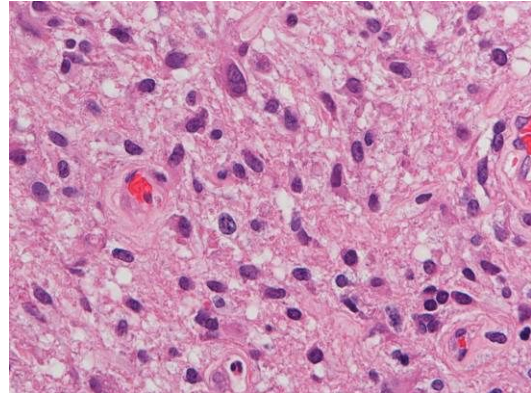
(左 : mIDH1、右 : IDH1 wt)

対象症例の一つである oligoastrocytoma 症例。DNA シークエンスで *IDH1* 変異が確認されており、mIDH1(+)である。また同時に IDH1 wt も陽性である。



(左 : mIDH1、右 : IDH1 wt)

対象症例の一つである anaplastic astrocytoma 症例。DNA シークエンスで *IDH1* 変異はなく、mIDH1(-)である。IDH1 wt は陽性である。



(左 : mIDH1、右 : IDH1 wt)

(3)結果の解釈

IDH1 変異(G395A) (+)かつ mIDH1 (+/-) 症例は、IDH1 wt (+/-)であった。診断上、mIDH1 (+/-)でその解釈が難しい場合、IDH1 wt の免疫染色を加える価値がある。もし IDH1 wt (+)であれば IDH1 全体の発現の低下はないので、mIDH1 は偽陽性と判断できる。

(4) IDH1 発現の制御機構に関する考察

IDH1 発現低下の機序は明らかではないが、一つの可能性として *IDH1* 変異(G395A)に伴うプロモーター領域のメチル化が挙げられる。

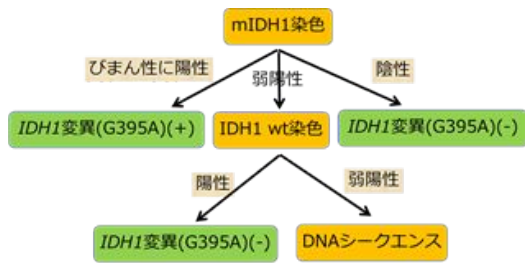
(5)まとめ

以下の手順により、びまん性グリオーマにおける *IDH1* 変異(G395A)をより正確に判定できると考えられる(下図)。

広範に mIDH1(+)であれば *IDH1* 変異(G395A)ありと判定する。

mIDH1 (+/-)の場合、IDH1 wt の免疫染色を追加する。

IDH1 wt (+)であれば *IDH1* 変異(G395A)なしと判定する。IDH1 wt (+/-)の場合は DNA シークエンスを行う。



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

びまん性グリオーマにおける変異型 IDH1 および野生型 IDH1 発現の関係 伊古田 勇人、
 信澤 純人、新井 秀雄、横尾 英明 第32
 回日本脳腫瘍病理学会 平成26年5月24日
 徳島

6. 研究組織

研究代表者

伊古田 勇人 (IKOTA, Hayato)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90420116