

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462242

研究課題名(和文) 変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼの分子生物学的解析とその臨床応用

研究課題名(英文) Molecular analysis of mutated isocitrate dehydrogenase and its clinical application

研究代表者

加藤 幸成 (Kato, Yukinari)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00571811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)1/2は、low grade gliomaにおいて高頻度に変異が生じ、予後診断マーカーとして注目されている。これまで、変異型IDH1/2を検出する手段としては遺伝子検査が主であるが、本研究ではモノクローナル抗体による診断法の確立を目指した。その結果、複数の変異型IDH1/2に交差反応性を示し、野生型IDH1/2には反応しないマウスモノクローナル抗体(クローン：MsMab-1)の作製に成功した。免疫組織染色での有用性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH1/2) mutations have been reported in gliomas, and are remarkably specific to a single codon in the conserved and functionally important arginine 132 residue (R132) of IDH1 or arginine 172 residue (R172) of IDH2. To date, we have established several monoclonal antibodies (mAbs) specific for IDH1/2 mutations. Here, we established MsMab-1 mAb that reacts with IDH1-R132H, IDH1-R132S, IDH1-R132G, and IDH2-R172M, but not with wild type IDH1/2. MsMab-1 stained the IDH1-R132S or IDH1-R132G -expressing glioma cells in immunohistochemistry. MsMab-1 is expected to be useful for immunohistochemical determination of IDH1/2 mutation-bearing tumors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：IDH IDH1-R132H glioma モノクローナル抗体 HMba-2

1. 研究開始当初の背景

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 / 2 (isocitrate dehydrogenase1/2: IDH1/2) は、WHO 分類の grade II、III の神経膠腫 (glioma) や、low grade の神経膠腫から進行した grade IV の神経膠腫である神経膠芽腫 (secondary glioblastoma) において、高頻度に点突然変異が生じることが報告された。一方、神経膠芽腫として初発する神経膠腫 (primary glioblastoma) ではほとんど変異が検出されない。また、酵素活性中心である IDH1 の 132 番目のアルギニン (R132)、IDH2 の 172 番目のアルギニン (R172) に変異が集中しており、変異型 IDH1/2 は、イソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換する活性を失う (loss of function) だけでなく、 α -ケトグルタル酸を 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) に変換する新しい酵素活性を得る (gain of function) ことが報告された。臨床的に重要なことには、野生型 IDH1/2 と比べ、変異型 IDH1/2 を保持する神経膠腫の予後は格段に良く、神経膠腫の予後診断マーカーとして有用である。我々はこれまでの研究において、変異型 IDH1/2 を認識する各種抗体の作製に成功した。しかしながら、1つの抗体が1種類の変異型のみを認識するため、検査試薬として臨床応用するためには多くの問題点があった。

2. 研究の目的

変異型 IDH1/2 に対する multi-specific なモノクローナル抗体を樹立し、神経膠腫の予後診断マーカーとして確立することを目的とした。

3. 研究の方法

変異型 IDH1-R132G のペプチド (GGVKPIIIGGHAYGDQYRA) を合成し、Balb/c マウスの tailbase に免疫した。腸骨リンパ節よりリンパ球を分離し、polyethylene glycol (PEG) を用いてミエローマ細胞との融合を行った。変異型 IDH1-R132G に反応し、野生型 IDH1 に反応しない抗体を産生するハイブリドーマを ELISA 法により選択した。また、IDH1/2 の各種リコンビナントタンパク質に対するウェスタンブロット法により、その特異性を確認した。さらに、ダイレクトシーケンシング法により、各種変異型 IDH1/2 を保持する神経膠腫を探索し、樹立抗体の特異性を免疫組織染色法にて調べた。

4. 研究成果

まず、変異型 IDH1-R132G に対する特異的抗体 (クローン MsMab-1; mouse IgG_{2a},) を樹立することに成功した。他の変異型 IDH1/2 に対する交差反応性を調べたところ、IDH1-R132G だけでなく、複数の変異型 IDH1/2 に対する反応性が ELISA 法により確認された。次に、ウェスタンブロット法により、大腸菌および CHO 細胞に発現させたりコンビナント

タンパク質に対する反応性を調べたところ、IDH1-R132H, IDH1-R132S, IDH1-R132G だけでなく、IDH2-R172M に対する交差反応性が見られた (図1)。さらに、免疫組織染色において、MsMab-1 の反応性を調べたところ、IDH1-R132S, IDH1-R132G を保持する神経膠腫に対して、高い反応性を示した。

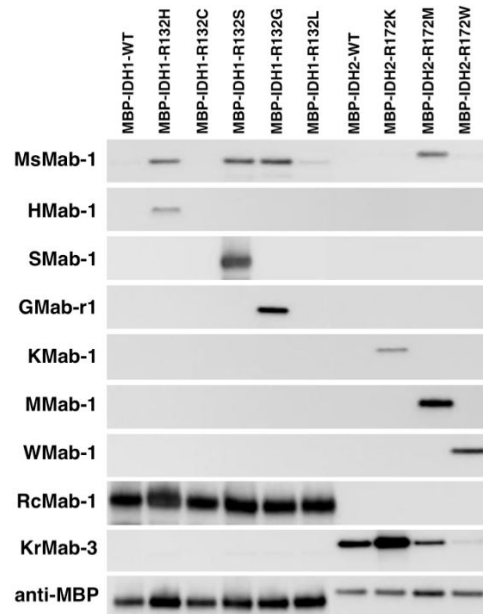


図1. MsMab-1 抗体による特異性の確認 (ウェスタンブロット法)。MsMab-1 抗体は複数の変異型 IDH1/2 を認識する。

我々はこれまで、変異型 IDH1/2 を認識する各種抗体 (HMab-1, SMab-1, GMab-r1, KMab-1, MMab-1, WMab-1) を作製してきたが、1つの抗体が1種類の変異型のみを認識するため、検査試薬として臨床応用するためには複数の抗体をカクテルにする必要があり、実用化に向けての課題が多い。それに対し、本研究により樹立した MsMab-1 抗体は、複数の変異型 IDH1/2 を認識する multi-specific 抗体であり、しかも野生型 IDH1/2 には全く反応しない。MsMab-1 により、神経膠腫に見られる 95% 以上の変異型 IDH1/2 を認識することができる。しかしながら、IDH1-R132C に対しては反応性が低く、IDH2-R172K/R172W に対しては反応しないため、MsMab-1 だけでは、すべての変異型 IDH1/2 を見つけることができない。今後、すでに樹立した抗体を組み合わせるだけでなく、さらに新規の抗体を開発する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計18件) *責任著者

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.*, Apr;33(2):107-16., 2016 doi: 10.1007/s10014-016-0260-x, 査読有り

Kato Y.* Specific monoclonal antibodies against IDH1/2 mutations as diagnostic tools for gliomas. *Brain Tumor Pathol.*, 32(1): 3-11, 2015, doi: 10.1007/s10014-014-0202-4., 査読有り

Fujii Y, Ogasawara S, Oki H, Liu X, Kaneko MK, Takano S, Kato Y.* A high-sensitive HAb-2 specifically detects IDH1-R132H, the most common IDH mutation in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun.*, 466(4),733-739, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.070., 査読有り

Ikota H, Nobusawa S, Arai H, Kato Y, Ishizawa K, Hirose T, Yokoo H. Evaluation of IDH1 status in diffusely infiltrating gliomas by immunohistochemistry using anti-mutant and wild type IDH1 antibodies. *Brain Tumor Pathol.*, 32(4):237-44, 2015, doi: 10.1007/s10014-015-0222-8., 査読有り

Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Liu X, Ishikawa E, Kaneko MK, Ogasawara S, Matsuda M, Noguchi M, Matsumura A. Diagnostic advantage of double immunohistochemistry using two mutation-specific anti-IDH antibodies (HAb-1 and MsMab-1) in gliomas. *Brain Tumor Pathol.*, 32(3):169-175, 2015, doi: 10.1007/s10014-015-0214-8., 査読有り

Liu X, Ogasawara S, Kaneko MK, Oki H, Hozumi Y, Goto K, Takagi M, Kato Y.* A novel monoclonal antibody SMab-2 recognizes endogenous IDH2-R172S of chondrosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.*, 459(4), 636-642, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.162, 査読有り

Moriya K, Kaneko MK, Liu X, Hosaka M, Fujishima F, Watanabe M, Ogasawara S, Sakuma J, Sasahara Y, Kure S, Kato Y.* IDH2 and TP53 mutations are correlated with gliomagenesis in a patient with Maffucci syndrome. *Cancer Sci.*, 105(3),359-362, 2014, doi: 10.1111/cas.12337., 査読有り

Ohka F, Ito M, Ranjit M, Senga T, Motomura A, Motomura K, Saito K, Kato K, Kato Y, Wakabayashi T, Soga T, Natsume

A. Quantitative metabolome analysis profiles activation of glutaminolysis in glioma with IDH1 mutation. *Tumor Biol.* 35(6):5911-20, 2014, doi: 10.1007/s13277-014-1784-5, 査読有り

Kaneko MK, Liu X, Oki H, Ogasawara S, Nakamura T, Saidoh N, Tsujimoto Y, Matsuyama Y, Uruno A, Sugawara M, Tsuchiya T, Yamakawa M, Yamamoto M, Takagi M, Kato Y.* IDH2 mutation is frequently observed in giant cell tumor of bone. *Cancer Sci.*, 105(6),744-748, 2014, doi: 10.1111/cas.12413., 査読有り

Sabit H, Nakada M, Furuta T, Watanabe T, Hayashi Y, Sato H, Kato Y, Hamada JI. Characterizing invading glioma cells based on IDH1-R132H and Ki-67 immunofluorescence. *Brain Tumor Pathol.*, 31(4):242-6, 2014, doi: 10.1007/s10014-013-0172-y., 査読有り

Kaneko MK, Morita S, Tsujimoto Y, Yanagiya R, Nasu K, Sasaki H, Hozumi Y, Goto K, Natsume A, Watanabe M, Kumabe T, Takano S, Kato Y.* Establishment of novel monoclonal antibodies KMab-1 and MMab-1 specific for IDH2 mutations. *Biochem Biophys Res Commun.*, 432(1):40-45, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.088., 査読有り

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.*, 30(3):175-9, 2013, doi: 10.1007/s10014-012-0118-9., 査読有り

Kato Y.*, Natsume A, Kaneko MK. A novel monoclonal antibody GMab-m1 specifically recognizes IDH1-R132G mutation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 432(4):564-567, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.049., 査読有り

Kato Y.* and Kaneko MK. Generation of a novel monoclonal antibody WMab-1 specific for IDH2-R172W mutation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 433(4), 374-378, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.106., 査読有り

Kaneko MK, Tsujimoto Y, Hozumi Y, Goto K, Kato Y.* Novel monoclonal antibodies

GMAb-r1 and LMAb-1 specifically recognize IDH1-R132G and IDH1-R132L mutations. Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 32(3):224-8, 2013, doi: 10.1089/mab.2013.0006., 査読有り

Kaneko MK, Ogasawara S, Kato Y*. Establishment of a novel multi-specific monoclonal antibody MsMab-1 recognizing both IDH1 and IDH2 mutations. Tohoku J Exp Med., 230(2), 2013, doi.org/10.1620/tjem.230.103, 査読有り

Liu X, Kato Y*, Kaneko MK, Sugawara M, Ogasawara S, Tsujimoto Y, Naganuma Y, Yamakawa M, Tsuchiya T, Takagi M. Isocitrate dehydrogenase 2 mutation is a frequent event in osteosarcoma detected by a multi-specific monoclonal antibody MsMab-1. Cancer Med. 803-814, 2013, doi: 10.1002/cam4.14., 査読有り

Ogasawara S, Kaneko MK, Tsujimoto Y, Liu X, Kato Y*. A multi-specific monoclonal antibody MsMab-2 recognizes IDH1-R132L and IDH2-R172M mutations. Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 2(6), 377-381, 2013, doi: 10.1089/mab.2013.0050., 査読有り

[学会発表](計9件)

劉興、小笠原諭、金子美華、大木弘治、加藤幸成；新規 IDH2 抗体による軟骨肉腫における IDH2-R172S 変異の解析；第 74 回日本癌学会学術総会；2015 年 10 月 8 日；名古屋国際会議場（名古屋市）

加藤幸成；変異型 IDH に対する特異的抗体の開発；第 74 回日本癌学会学術総会；2015 年 10 月 8 日；名古屋国際会議場（名古屋市）

高野晋吾、山本哲哉、石川栄一、坂本規影、松田真秀、中井啓、阿久津博義、加藤幸成、松村明；分子診断による grade III グリオーマの予後解析；第 33 回日本脳腫瘍病理学会；2015 年 5 月 29 日；JR ホテルクレメント高松（高松市）

劉興、加藤幸成；骨肉腫における変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼの発現解析；第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会；2014 年 6 月 26 日；アエル仙台（仙台市）

辻本雄太、加藤幸成；変異型 IDH1/2 に対する multi-specific 抗体の開発とその臨

床応用；；第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会；2014 年 6 月 26 日；アエル仙台（仙台市）

淑瑠へムラサビット、中田光俊、渡邊卓也、加藤幸成、林裕；変異型 IDH1/2 を検出する新規抗体 MsMab-1 の免疫組織化学的検討；第 32 回日本脳腫瘍病理学会；2014 年 5 月 24 日；あわぎんホール（徳島市）

加藤幸成；脳腫瘍の分子診断に有用ながん特異的抗体の開発；第 32 回日本脳腫瘍病理学会；2014 年 5 月 24 日；あわぎんホール（徳島市）

辻本雄太、金子美華、小笠原諭、加藤幸成；変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1/2 に対する Muti-specific 抗体の作製；第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会；2013 年 10 月 2 日；パシフィコ横浜（横浜市）

加藤幸成、小笠原諭、金子美華；変異型 IDH1/2 に対する新規抗体 MsMab-1 の樹立；第 72 回日本癌学会学術総会；2013 年 10 月 4 日；パシフィコ横浜（横浜市）

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 幸成 (Kato, Yukinari)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00571811