

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

変異型 IDH を標的とした悪性脳腫瘍・肉腫・胆管がんに対する革新的治療法の開発

業務主任者 北林 一生 国立がん研究センター研究所 造血器腫瘍研究分野

研究要旨 IDH1 遺伝子及び IDH2 遺伝子は、脳腫瘍・急性骨髄性白血病・骨髄異形成症候群・胆管がん・軟骨肉腫・骨肉腫・血管免疫芽球形 T 細胞リンパ腫など様々ながんにおいて高頻度に変異が見られる。IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病モデルマウスを開発し、変異型 IDH の発現ががんの維持に必須であることを証明した。変異型 IDH1 特異的阻害剤を開発し、IDH1 変異を有する急性骨髄性白血病モデルの白血病細胞を顕著に減少させることを明らかにした。新規の変異型 IDH1/2 に対する新規の特異的モノクローナル抗体（MsMab-1 抗体）を樹立した。MsMab-1 抗体は、複数の変異型 IDH1/2 に交差反応性を示し、この MsMab-1 抗体と以前に作製した H Mab-1 抗体を組み合わせることにより、IDH1-R132H だけでなく、複数の変異型 IDH1/2 を高感度に検出することができ、診断に有用であることがわかった。

担当責任者

成田 善孝（国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科）

中馬 広一（国立がん研究センター中央病院・骨軟部腫瘍・リハビリテーション科）

奥坂 拓志（国立がん研究センター中央病院・肝胆膵内科）

加藤 幸成（東北大学大学院医学系研究科腫瘍生物学）

A．研究目的

本研究では、がん特異的な変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 (IDH1) を発現する悪性脳腫瘍、胆道がん、軟骨肉腫などの稀少がんの治療法及び診断法を確立し、3 年以内に臨床研究に進めることを目的とする。変異型 IDH 遺伝子変異を有する患者由来の組織を免疫不全マウスに移植した異種移植片 (PDX) のマウスモデルを作製し、これらのマウスモデルに独自に開発した変異型 IDH 阻害剤を投与することにより、変異型 IDH の標的妥当性を検証するとともに、変異型 IDH 阻害剤の治療効果を検証し、生体内での薬物動態を調べることにより、治療薬としての最適化を進める。さらに、変異型 IDH を有する患者の早期診断のため、変異型 IDH を特異的に認識する抗体を作製し、治療対象患者の診断法を確立する。

B．研究方法

変異型 IDH 阻害剤の開発

脳腫瘍・軟骨肉腫・骨肉腫・胆管がんの患者由来組織片を NOG マウスの皮下又は各組織に移植することにより、各がんの患者由来組織片移植 (PDX) モデルを作製する。

PDX モデルに変異型 IDH 阻害剤を投与し、腫瘍ボリュームの測定、染色像の観察、血漿中や腫瘍組織内の 2HG レベルの定量などを行い、変異型 IDH 阻害剤に対する感受性を調べる事により、脳腫瘍・軟骨肉腫・骨肉腫・胆管がん等における変異型 IDH の標的妥当性を検証すると共に、変異型 IDH 阻害剤の治療効果を確認する。

診断法の確立

変異型 IDH のある患者の診断法を確立するため、変異型 IDH に特異的な抗体を作製し、ヒト病理切片に対して免疫組織染色を行い、有用性の確認を行う。

C．研究結果

IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病モデルマウスを開発し、Cre-loxP システムを用いて変異型 IDH を除去すると急性骨髄性白血病の発症が抑制されることが示された。変異型 IDH を除去した白血病細胞を調べると、白血病幹細胞マーカーの発現が顕著に低下し、白血病誘導能が消失していることが明らかとなった。第一三共株式会社と共同で変異型 IDH1 に対する阻害剤を独自に開発した。急性骨髄性白血病モデルにおいて変異型 IDH1 阻害

剤が、変異型 IDH により産生される腫瘍細胞内及び血漿中の 2-ヒドロキシグルタレイトの量をほぼ完全に抑制し、白血病細胞を顕著に減少させることを証明した。物質特許及びこれらの抗腫瘍効果を含む主要特許を出願した。「IDH1 変異を有するモデル評価系の作出と新規薬剤感受性の試験」に関する研究計画を国立がん研究センターの倫理審査委員会に提出し承認を得た。3例の変異型 IDH1 変異を有する脳腫瘍試料を免疫不全マウスの皮下に移植し、繰り返し移植可能な株を1株樹立した。

IDH1-R132G に反応し、野生型 IDH1 に反応しない複数のクローンを ELISA 法により選択した。次に、複数の変異型 IDH1/2 に対する ELISA を実施したところ、新規に樹立した MsMab-1 抗体 (IgG₁, kappa) は、複数の変異型 IDH1/2 に交差反応性を示すことがわかった。ウェスタンブロット法により、IDH1-R132H、IDH1-R132S、IDH1-R132G、IDH2-R172M、IDH2-R172S、IDH2-R172G のリコンビナントタンパク質に対する反応性が見られた。さらに、免疫組織染色においても、MsMab-1 抗体は IDH1-R132H、IDH1-R132S 等の変異型 IDH1/2 を保有する glioma に対して高い反応性を示した。以上のことから、MsMab-1 抗体は、変異型 IDH1/2 陽性の glioma の診断マーカーとして有用であることがわかった。この MsMab-1 抗体と以前に作製した HMAb-1 抗体 (IDH1-R132H に対する特異的抗体) を組み合わせ、免疫組織染色を実施した結果、54 症例の grade III の glioma のうち、30 症例 (55.6%) が IDH1/2 の変異陽性となった。さらに、IDH1/2 の変異陽性群と IDH1/2 の変異陰性群の glioma の予後の比較を行ったところ、IDH1/2 の変異陽性群の予後が有意に良いことがわかった。

D . 考察

IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病モデルを用いて、変異型 IDH の発現ががんの維持に必須であることを証明した。これらの結果は、変異型 IDH が治療標的として妥当であることを示している。さらに独自に開発した変異型 IDH1 阻害剤が白血病細胞を顕著に減少させることを明らかにした。この結果は、変異型 IDH1 阻害剤に抗腫瘍効果があることを示している。

変異型 IDH1/2 を検出する方法としては、Sanger 法によるダイレクト DNA シークエンス法、パイロシークエンス法、免疫組織染色法などが存在する。

ダイレクト DNA シークエンス法が多くの施設で実施されており、比較的安価で感度も高い反面、試料に含まれる IDH の 20%以上が変異型でないと、IDH1/2 の変異を検出することができない。また、パイロシークエンス法は、すべての変異型 IDH1/2 を高感度に検出できるが、特殊な機器を必要とするため、汎用性がないのが現状である。一方、免疫組織染色法は、感度・特異度が高く、どの施設でも実施可能であり汎用性が高い反面、免疫組織染色に有用な特異的抗体が必要となる。そこで本研究では、変異型 IDH1/2 に対する特異的抗体の開発を実施した。我々はこれまで、glioma で見られる変異型 IDH1/2 の中で最も頻度の高い (約 90%) IDH1-R132H に対する特異的抗体 (HMAb-1) を樹立した。HMAb-1 抗体は、grade III の glioma の予後診断に有用である。しかしながら、HMAb-1 抗体は他の変異型 IDH1/2 を認識することができないため、約 10%の変異型 IDH1/2 を見逃すことになる。従って本研究では、複数の変異型 IDH1/2 を同時に認識する抗体の樹立を目指した。その結果樹立した MsMab-1 抗体は、IDH1-R132H 以外の変異型も認識し、HMAb-1 抗体単独よりも、grade III の glioma の予後を有意に診断することが可能となった。HMAb-1 抗体と MsMab-1 抗体の有用性を比較した結果、より多くの変異型 IDH1/2 を検出するという観点からは、MsMab-1 抗体が有用である。一方、MsMab-1 抗体を用いた免疫組織染色においては、非特異反応も検出される割合が HMAb-1 抗体よりも多く、施設間でのばらつきが多くなることが懸念される。HMAb-1 抗体は IDH1-R132H 特異的であるが、非特異反応が少ないため、施設間でのばらつきのない安定した結果が得られる可能性が高い。今後、コンパニオン診断薬の開発という観点から、よりばらつきのない安定した検出系の開発を行う必要がある。

E . 結論

変異型 IDH が治療標的として妥当であり、変異型 IDH1 阻害剤は治療薬として有望である。また、HMAb-1/MsMab-1 抗体の組み合わせによる免疫組織染色において、変異型 IDH1/2 を高感度に検出することが可能となり、診断薬への応用が期待できる。

G . 研究発表

1 . 論文発表

Arita H, Narita Y, Matsushita Y, Fukushima S, Yoshida A, Takami H, Miyakita Y, Ohno M, Shibui S, Ichimura K. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 32:22-30.2015.

Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol.*, in press

Ogawara Y, Takuo Katsumoto T, Aikawa Y, Shima Y, Kagiya Y, Soga T, Matsunaga H, Seki T, Araki K, Kitabayashi I. IDH2 and NPM1 mutations cooperate to activate Hoxa9/Meis1 and hypoxia pathways in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2015 Mar 20. pii: canres.2200.2014. [Epub ahead of print]

Shima H, Yamagata K, Aikawa Y, Shino M, Koseki H, Shimada H, Kitabayashi I. Bromodomain-PHD finger protein 1 is critical for leukemogenesis associated with MOZ-TIF2 fusion. *Int. J. Hematology* 9: 21-31, 2014.

Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, Akashi K, Watanabe T, Kitabayashi I. The nuclear export signal (NES) within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia. *Cancer Sci.* 105:315-23, 2014.

Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A. MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acids Res.* 42:4241-56, 2014

Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H, Iwama A. The TIF1 α -HP1 System Maintains Transcriptional Integrity of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2:145-52, 2014.

Nakahata S, Ichikawa T, Maneesay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun.* 5:3393, 2014.

Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Ueno M, Miyake Y, Yokoyama Y, Asabe Y, Kamada Y, Muto H, Obara N, Suzukawa K, Hasegawa Y, Kitabayashi I, Uchida K, Hirao A, Yagita H, Kageyama R, Chiba S. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. *Leukemia*, 29:576-85. 2015.

Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Yanagimoto S, Shiozawa Y, Nanmoku T, Satomi K, Muto H, Obara N, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Izutsu K, Ota Y, Sanada M, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Kitabayashi I, Takeuchi K, Nakamura N, Ogawa S, Chiba S. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One.* 9:e109714, 2014.

Aikawa Y, Yamagata K, Katsumoto T, Shima Y, Shino M, Stanley ER, Cleary ML, Akashi K, Tenen DG, Kitabayashi I. Essential role of PU.1 in maintenance of MLL-associated leukemia stem cells. *Cancer Sci.* 2014 Dec 22. doi: 10.1111/cas.12593. [Epub ahead of print]

Kato Y. Specific monoclonal antibodies against IDH1/2 mutations as diagnostic tools for gliomas. *Brain Tumor Pathol.* ,32(1): 3-11, 2015

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 (HMab-1 and MsMab-1) in gliomas. *Brain Tumor Pathol.*, DOI: 10.1007/s10014-015-0214-8

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.*, in press

H . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

【発明の名称】変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1阻害剤としてのイソキサゾール誘導体

【発明者】斉藤昭一、伊藤雅夫、藤沢哲則、斉藤博直、清塚洋平、渡邊秀昭、松永大典、小川原陽子、

北林一生

【出願日】2014/10/1

【出願番号】特願2014-203475